

LINEARE UND NICHTLINEARE OPTISCHE
UNTERSUCHUNGEN AM SYNTHETISCHEN EUMELANIN
UND ENTWICKLUNG EINES KASKADENMODELLS

DISSERTATION
VON
GUNTER SEEWALD
GEBOREN AM 27. APRIL 1976 IN BERLIN

15.11.2011

PHOTONIK
UNIVERSITÄT POTSDAM,
INSTITUT FÜR PHYSIK UND ASTRONOMIE

This work is licensed under a Creative Commons License:
Attribution - Noncommercial - Share Alike 3.0 Germany
To view a copy of this license visit
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Published online at the
Institutional Repository of the University of Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2012/5996/>
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-59967>
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-59967>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	7
2.1	Lineare Wechselwirkung von Licht mit kleinen Molekülen oder Teilmolekülen	8
2.1.1	Lineare Absorption	8
2.1.2	Intramolekulare strahlungslose Relaxationsprozesse	11
2.1.3	Fluoreszenz und Phosphoreszenz	12
2.1.4	Relaxationsprozesse über intermolekularen Energietransfer	14
2.2	Lineare Wechselwirkung von Licht mit Polymeren und Aggregaten	17
2.2.1	Absorption von durchkonjugierten Polymerketten	17
2.2.2	Spektrale Verbreiterung der Absorption durch Exzitonische Aufspaltung bei Aggregaten und Polymeren	18
2.3	Nichtlineare Wechselwirkung von Licht mit Molekülen und Aggregaten	20
2.3.1	2-Photonen-Angeregte-Fluoreszenz (TPEF)	20
3	Morphologie des Eumelanins	25
3.1	Derzeitiger Erkenntnisstand zur Synthese und Struktur von Eumelanin	25
3.2	Bestimmen der Massenverteilung und mittleren Aggregatgröße des synthetischen Eumelanins mittels Ultrafiltration (UF)	28
3.2.1	Ultrafiltration	28
3.2.2	Per Absorptionsanteil abgeschätzte Massenverteilung der Aggregate und mittlere Aggregatsmasse der Absorption von Eumelanin	29
3.3	Bestimmen der Massenverteilung durch eine Feldflussfraktionierung (FFF) . .	32
3.3.1	Feldflußfraktionierungssystem	32
3.3.2	Per Feldflußfraktionierung ermittelte Massenverteilung der Aggregate und Vergleich mit der per Absorptionsanteil abgeschätzten Massenverteilung	33
4	Modellierung des energetischen Zustandssystems von synthetischem Eumelanin aus Ergebnissen linear-spektroskopischer Methoden	37
4.1	Absorption von nichtfraktioniertem Eumelanin	38
4.1.1	Absorptionsspektrometer und Probenpräparation	38
4.1.2	Diskussion der gemessenen Absorptionsspektren und der Erklärungsansätze zur Entstehung der kontinuierlichen Absorption im VIS	38
4.1.3	Abschätzung des möglichen Streuanteils an der messbaren Absorption	39
4.1.4	Ergebnisse der Absorptionsspektroskopie und Folgerungen für ein Zustandsmodell des Eumelanins	40
4.2	Absorption von Eumelanin-Aggregaten unterschiedlicher Masse	41

4.2.1	Spektroskopische Auswertung der Absorptionsspektren von Eumelanin-Aggregaten unterschiedlicher Masse	42
4.2.2	Zusammenfassung und Folgerung für ein Zustandsmodell des Eumelanins	43
4.3	1-Photon-Angeregte-Fluoreszenz (OPEF) von nichtfraktioniertem Eumelanin	44
4.3.1	Fluoreszenzspektrometer und Frontface(FF)-Messmodus	46
4.3.2	Berücksichtigung der Reabsorptionseffekte	47
4.3.3	Berücksichtigung der zeitlichen Veränderung der Fluoreszenzintensität durch das Ausbleichen der Lösung	49
4.3.4	Ergebnisse aus der Fluoreszenzspektroskopie und Folgerungen für ein Zustandsmodell des Eumelanins	52
4.4	Entwicklung eines kaskadierten Zustandsmodells zur Beschreibung der beobachteten spektralen Eigenschaften des Eumelanins	53
4.5	1-Photon-Angeregte-Fluoreszenz von Eumelanin-Aggregaten unterschiedlicher Masse	57
4.5.1	Verwendete Geräte und Methoden zur Messung der OPEF-Spektren und Bestimmung der relativen Fluoreszenzquantenausbeute von fraktioniertem Eumelanin	58
4.5.2	OPEF-Spektren und relativen Fluoreszenzquantenausbeuten von Eumelanin-Aggregaten unterschiedlicher Masse und Beschreibung der beobachteten Effekte mit Hilfe des Kaskadenmodells	58
4.6	1-Photon-Angeregte-Fluoreszenzanregungsspektren von Eumelanin	61
4.6.1	Verwendete Geräte und Methoden zur Messung der Anregungsspektren von synthetischem Eumelanin	61
4.6.2	Beschreibung der gemessenen Eumelanin-Anregungsspektren durch das Kaskadenmodell	61
5	Erweiterung des Modells und Nachweis der schrittweisen 2-Photonen-Angeregten-Fluoreszenz mit Hilfe von Ergebnissen nichtlinear-spektroskopischer Methoden	65
5.1	Transiente Absorption von unfraktioniertem Eumelanin	65
5.1.1	Pump-Probe-Apparatur	67
5.1.2	Bestimmung und modellbezogene Interpretation der Lebensdauerkomponenten	72
5.2	2-Photonen-Angeregte-Fluoreszenz des Eumelanins bei Anregung mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen und Pulsdauern im ns-Bereich	82
5.2.1	Konfokale Apperatur zur Messung von TPEF-Spektren von Eumelanin mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen	83
5.2.2	TPEF-Spektren von unfraktioniertem Eumelanin und von Eumelanin-Aggregaten unterschiedlicher Masse	89
5.2.3	TPEF-Spektren von Eumelanin unter Verwendung verschiedener Anregungswellelängen und Ableitung eines TPEF-Anregungsspektrums	94
5.3	Nachweis eines schrittweisen TPE-Prozesses bei Eumelanin	96
5.3.1	Nachweis der schrittweisen 2-Photonen-Anregung durch Vergleich des Absorptionswirkungsquerschnitts	97
5.3.2	Nachweis der schrittweisen 2-Photonen-Anregung über die fehlende Abhängigkeit der TPEF-Intensität von der Anregungspulsdauer	100
6	Zusammenfassung	105

Literaturverzeichnis	109
Publikationen & Tagungsbeiträge	117
Danksagung	119
A Medizinische Anwendung der 2-Photonen-Angeregten-Autofluoreszenz: Nutzung der Melanin-Fluoreszenz als Indikator des malignen Melanoms	121
A.1 Aufbau des Haut- bzw Aderhautgewebes und Präparation der untersuchten Gewebeproben	121
A.2 Autofluoreszenz des Haut- und Aderhautgewebes	124
A.3 TPEF-Spektren von Hautgewebe nach Anregung mit fs-Laserpulsen	125
A.3.1 Apparatur zum Messen von 2-Photonen-Angeregten-Autofluoreszenzspektren des Hautgewebes mit fs-Laserpulsen	126
A.3.2 TPEF-Spektren von gesundem und tumorös entartetem Hautgewebe .	127
A.4 Anhebung der Melaninfloureszenz in den TPEF-Spektren von Hautgewebe durch Anregung mit ns-Laserpulsen	128
A.4.1 Apparatur zum Messen von 2-Photonen-Angeregten-Autofluoreszenzspektren des Hautgewebes mit ns-Laserpulsen	128
A.4.2 Vergleich zwischen TPEF-Spektren gesunder und entarteter Aderhaut bei Anregung mit fs- und ns-Laserpulsen	128
A.4.3 Vergleich zwischen OPEF- und TPEF-Spektren eines Linienscans über ein malignes Melanom	130
A.4.4 TPEF-Spektren von gesundem Epidermisgewebe und Gewebe des malignen Melanoms mit alternativer Anregungswellenlänge	131
A.5 Zusammenfassung	134

Abkürzung	Beschreibung
A	Absorption von Licht
AR	hochgradig Transparent (Anti Reflexion)
AFM	Rasterkraftmikroskopie(Atomic Force Microscopy)
AF-FFF	Asymmetrische-Fluss-Feldflussfraktionierung
CCD	Bildgebender Lichtdetektor (Charge Coupled Device)
DOS	Zustandsdichte (Density of States)
ESA	Anregungszustandsabsorption (Excited State Absorption)
ET	Energietransfer zwischen zwei Zuständen
F	Fluoreszenz
FFF	Feldflußfraktionierung
FLUTOM	Projekt, welches sich mit optischer Fluoreszenz-Tomographie beschäftigt
FRET	Resonanter Förster-Energietransfer
FWHM	Breite einer Glockenkurve bei halber Amplitude (Full Width at Half Maximum)
HOMO	Höchstes besetztes Molekülorbital (Highest Occupied Molecule Orbital)
HR	Hochgradig reflektierend (High Reflexion)
IC	Strahlungsloser Relaxationsweg (Internal Conversion)
ISC	Sigulett-Triplett-Übergang oder umgekehrt(Intersystem Crossing)
LTB	Laser Technik Berlin GmbH
LUMO	Niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (Lowest Unoccupied Molecule Orbital)
MBI	Max-Born-Institut Berlin
NIR	Naher Infraroter Spektralbereich (Near Infra Red)
OPEF	1-Photonenangeregte Fluoreszenz (One-Photon-Excited-Fluorescence)
QU	Fluoreszenzlöschung durch ET (Quenching)
SHG	Erzeugung von Licht durch Licht der doppelten Wellenlänge (Second-Harmonic-Generation)
STM	Rastertunnelmikroskopie (Scanning Tunnel Microscop
TPA	2-Photonen-Absorption (Two-Photon-Absorption)
TPE	2-Photonen-Anregung (Two-Photon-Excitation)
TPEF	2-Photonen-Angeregte-Fluoreszenz (Two-Photon-Excited-Fluorescence)
TU	Technische Universität
UV	Ultravioletter Spektralbereich
VIS	Visuell sichtbarer Spektralbereich
VR	Vibrationsrelaxation

Tab. 0.1: Abkürzungen

1 Einleitung

Melanin Spätestens die Entdeckung, dass Melanin der Pilzart „Cladosporium sphaerospermum“ das Leben innerhalb solch tödlicher Gebiete wie den geborstenen Reaktorgebäuden in Tschernobyl ermöglicht, offenbart, dass dieses Aggregat über einzigartige biologische und energetische Eigenschaften verfügt [Dad07].

Die Morphologie des Melanins stellt sich dabei als sehr komplex dar, wobei grob vier Melanin-Arten unterschieden werden (siehe auch [Tri06, Bus06, Hal04, Mey01]):

- Allomelanin
Pigment, welches ausschließlich im Pflanzenreich zu finden ist (gibt z.B. dem Humus die dunkle Färbung)
- Neuromelanin
Pigment im Nervensystem sämtlicher Säugetiere (gibt den „grauen Zellen“ ihre Färbung)
- Eumelanin
Pigment in Haut, Haaren und Augen des Menschen und der Tiere
- Pheomelanin
Pigment in Haut, Haaren und Augen des Menschen und der Tiere

Melanin wird grundsätzlich zu den organisch erzeugten „black materials“ gezählt, da es in erster Linie als hocheffizienter Photonen-Phononen-Wandler wirkt. Als solches dient es in Lebewesen als Lichtschutz und Schalldämmung [Sar92, Mer06], wobei seine biologischen Funktionen jedoch über die eines Absorbers hinaus gehen. So wirkt es nachgewiesenermaßen z.B. auch als Stoffspeicher und Radikalfänger (Pseudodismutase) [Tri06, Jim94], wobei weitere biologische Funktionen vermutet werden.

Im Extremfall der oben genannten Pilze kann es von Organismen, ähnlich wie das Chlorophyll, zur Genese von Biomasse mittels elektromagnetischer Strahlung verwendet werden. Dabei ist bemerkenswert, dass statt Licht lebensfeindlich-hochenergetische Strahlung als Energiequelle für die Genese per Melanin dient. Dieser Konversionsprozess lässt auf komplexe energetische Prozesse innerhalb des Melanins schließen.

Die Komplexität spiegelt sich auch in einigen besonderen optischen Eigenschaften des Melanins wider. So zeichnet sich z.B. Eumelanin durch folgende spektroskopische Eigenschaften aus (siehe z.B. [NR05b, NR05a, Teu00]):

- es weist eine kontinuierliche Absorption über den gesamten visuellen Spektralbereich (VIS) auf
- die Fluoreszenz liegt spektral innerhalb der Absorption und ihr Maximum ist abhängig von der Anregungswellenlänge
- das Anregungsspektrum spiegelt nicht das Absorptionsspektrum wider
- die Fluoreszenzspektren der 2-Photonen-angeregten-Fluoreszenz (Two Photons Excited Fluorescence, TPEF) sind gegenüber denen der 1-Photonen-angeregten-Fluoreszenz (One Photon Excited Fluorescence, OPEF) rotverschoben

Aufgrund der zuletzt genannten Rotverschiebung des TPEF-Spektrums gegenüber dem OPEF-Spektrum wurde in der Veröffentlichung [Teu00] auf einen schrittweisen TPA-Prozess bei Eumelanin geschlossen.

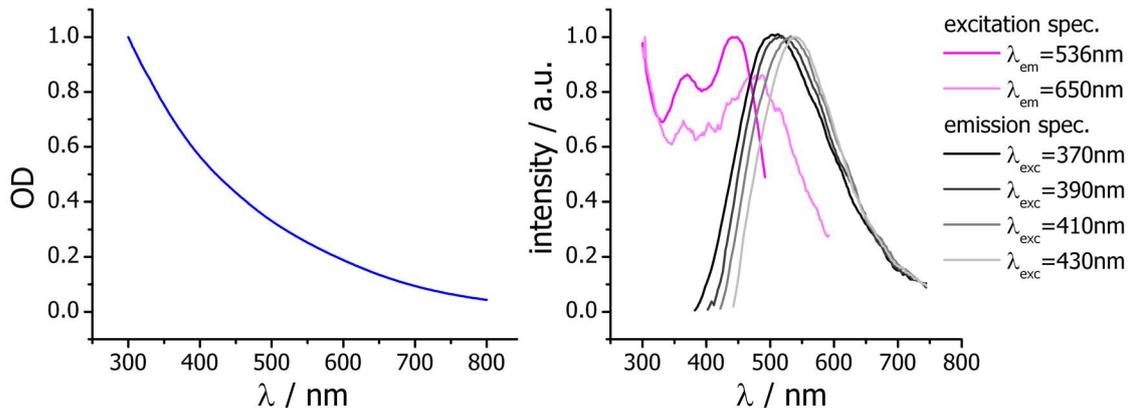


Abb. 1.1: Die charakteristischen spektroskopischen Eigenschaften des Eumelanins bestehen in der kontinuierlichen Absorption im VIS (blauer Graph im linken Diagramm), in der Abhängigkeit des Fluoreszenzmaximums von der Anregungswellenlänge, wobei die Fluoreszenz (graue Graphen im rechten Diagramm) innerhalb des Absorptionsbereichs liegt sowie in der fehlenden Spiegelbildsymmetrie zwischen Fluoreszenz- und Absorptionsspektrum und Anregungsspektren (violett), welche im Gegensatz zum Absorptionsspektrum eine Unterstruktur aufweisen.

Motivation der wissenschaftlichen Fragestellung Aufgrund der stetigen Zunahme der Neuerkrankungsrate am malignen Melanom (schwarzer Hautkrebs), die sich z.B. in Deutschland seit dem Jahr 1980 vervierfacht hat [Hus10], besteht ein großes Interesse an Diagnoseverfahren zur Früherkennung des schwarzen Hautkrebses. Im Forschungsprojekt FluoTOM (BMBF-Projekt Nr.: 13N8788), in dessen Rahmen auch die vorliegende Arbeit entstand, wurde dazu ein nichtinvasives, spektroskopisches Messgerät entwickelt, mit dem die TPEF des Hautgewebes gemessen werden konnte (siehe Anhang).

Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass sich die TPEF-Spektren von bösartig verändertem Gewebe (malignem Melanom) gegenüber denen von gesundem Gewebe (Nävus) eine Rotverschiebung aufwiesen. Die Spektren der linear angeregten Fluoreszenzen wiesen diesen Unterschied nicht auf (siehe Abbildung 1.2).

In einer Veröffentlichung von Teuchner et al. [Teu00], aus der ähnliche Beobachtungen bekannt waren, wurde vermutet, dass Eumelanin durch den schrittweisen 2-Photonen-Anregungsprozess (Two Photons Excitation, TPE) gegenüber den anderen endogenen Fluorophoren bevorzugt angeregt wird (siehe auch Kapitel 5.3). Die Rotverschiebung wurde deshalb auf die Sensitivität der TPEF von Eumelanin gegenüber Gewebeveränderungen zurückgeführt. Aus dem daraus abgeleiteten Ziel, Eumelanin als endogenen Indikator für eine optische Hautkrebs-Früherkennung zu nutzen, entstand die Notwendigkeit, die energetischen Prozesse im Eumelanin-Aggregat genauer zu untersuchen und auch den schrittweisen Anregungsprozess zu verifizieren.

Die sich daraus für diese Arbeit ergebenden wissenschaftlichen Ziele lagen in der Untersuchung und Modellierung der Anregungszustände und der intramolekularen energetischen Prozesse des Eumelanin-Aggregats bei optischer Anregung. Das Modell soll die zum Teil besonderen

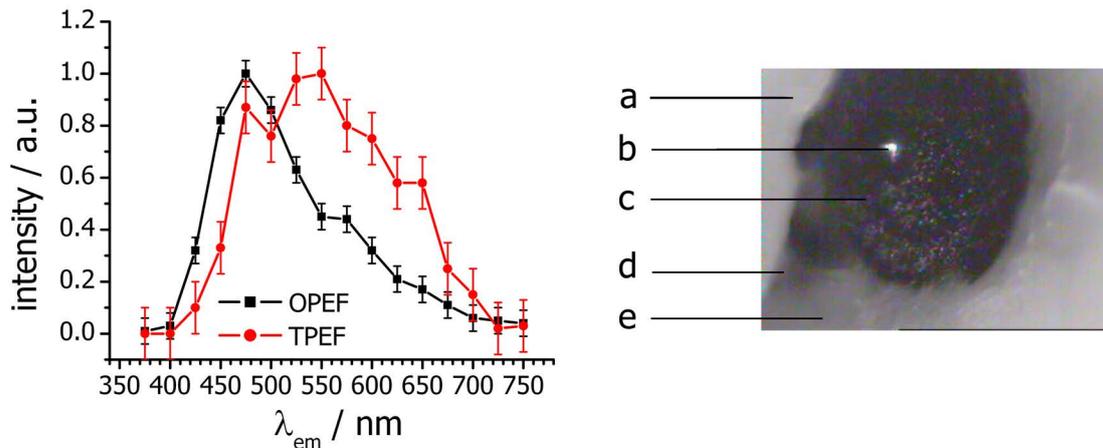


Abb. 1.2: Linear (OPEF) und nichtlinear (TPEF) angeregtes Autofluoreszenzspektrum einer bösartig veränderten Gewebestelle (malignes Melanom), die in Paraffin konserviert wurde. Das Photo rechts zeigt die Messsituation. Die Hautprobe wurde als Querschnitt präpariert. Die Buchstaben kennzeichnen folgende Gebiete: a) das die Probe einschließende Paraffin, b) Anregungslaserspot (Messort der gezeigten Spektren), c) Malignes Melanom-Gewebe, d) Hautoberfläche, e) Dermis und Unterhaut.

photonischen Eigenschaften konsistent beschreiben und auch den schrittweisen TPA-Prozess einschließen.

Geplantes Vorgehen Da sich sowohl die Mikrostruktur (Struktur der Monomer-Bausteine) als auch die Makrostruktur des Eumelanins in der wissenschaftlichen Diskussion befinden, beschränkte sich die Modellierung auf Erkenntnisse, die aus spektroskopischen Beobachtungen stammten (das heißt als abgesichert gelten). Das heißt aber auch, dass das Modell nicht den Anspruch hat, vollständig zu sein. Stattdessen beinhaltet es nur energetische Prozesse und Zustände, die zu optisch beobachtbaren Vorgängen führen.

Aufgrund der Unklarheit über das Eumelanin-Strukturmodell und der zusätzlichen Tatsache, dass sich Eumelanin als Gemisch aus verschiedenen großen Aggregaten darstellt, wird den spektroskopischen Untersuchungen ein Kapitel zur Morphologie des Eumelanin vorangestellt. In diesem Kapitel 3 werden die verschiedenen diskutierten Monomer-Bausteine und Makrostruktur-Modelle sowie die in der Literatur zu findenden Untersuchungen zur Eumelanin-Struktur vorgestellt. Durch eigene Messungen konnte eine Größenverteilung der Aggregate in der verwendeten Eumelanin-Sorte abgeschätzt werden. Dazu wurden die Ultrafiltration und Feldflussfraktionierung als zwei einander referenzierende Methoden genutzt. Mit Hilfe dieser Größenverteilung wurden wichtige Werte, wie das mittlere Teilchengewicht bzw. das Teilchengewicht des mittleren Absorbers bestimmt (genauere Erläuterung siehe Abschnitt 3.2.2), die im weiteren Verlauf für die Berechnung des nichtlinearen Absorptionsquerschnitts von Eumelanin nötig waren.

Im anschließenden Kapitel 4 werden die durchgeführten linearen Absorptions- und Fluoreszenzmessungen am Eumelanin dargelegt, aus deren Resultaten ein erstes Modell der Grund-

und Anregungszustände der 1. Stufe entwickelt wurde. Der Begriff Anregungszustand 1. Stufe wurde eingeführt, da es im Melanin-Aggregat mehrere erste Anregungszustände gibt, aus denen per Anregungszustandsabsorption zweite Anregungszustände bevölkert werden können. Die Menge der ersten Anregungszustände wird deshalb in der vorliegenden Arbeit unter dem Begriff Anregungszustände der 1. Stufe zusammengefasst, die Menge der zweiten Anregungszustände unter dem Begriff Anregungszustände der 2. Stufe.

Aufgrund der Tatsache, dass das Fluoreszenzspektrum des Eumelanins komplett im Absorptionsspektrum liegt, lag messtechnisch ein besonderes Augenmerk auf einer Korrektur der Reabsorptionseffekte.

In Anlehnung an Versuche von Simon et al. [Nof99] mit Sepia (natürliche Eumelanin-Sorte mit speziellen Eigenschaften, siehe Abschnitt 3.1) wurden verschiedene Gewichtsfractionen von Eumelanin spektroskopisch untersucht. Dabei stand die Frage im Vordergrund, ob die spektralen Eigenschaften verschiedener Aggregatsgrößen unterschiedlich genug sind, um sie als einzelne Spezies aufzufassen. Die Antwort darauf ist sowohl für die Modellierung als auch für alternative Erklärungsansätze der Rotverschiebung des TPEF-Spektrums gegenüber dem OPEF-Spektrum entscheidend.

In Kapitel 5 werden die am Eumelanin durchgeführten nichtlinearen spektroskopischen Messungen vorgestellt und die resultierenden modellrelevanten Erkenntnisse diskutiert. Der erste Abschnitt widmet sich der Untersuchung der Anregungszustandslebensdauern. Da diese Auskunft über die intramolekularen Relaxationsprozesse und die Existenz genügend langlebiger Zwischenzustände für einen schrittweisen TPA-Prozess geben, wurden sie durch Pump-Probe-Messungen im langwelligen Spektralbereich bestimmt.

Im zweiten Abschnitt des Kapitels werden speziell die 2-Photonen-Angeregten-Fluoreszenzzustände betrachtet. Mit Hilfe einer durchstimmbaren Lichtquelle konnte die Abhängigkeit der TPEF von der Anregungswellenlänge bestimmt und mit der Abhängigkeit der OPEF-Spektren verglichen werden. Dazu wurde eine Messapparatur aufgebaut und charakterisiert, mit der es möglich war, das sehr schwache TPEF-Licht über einen großen Spektralbereich ($\lambda_{em} = 400 \text{ nm} - 600 \text{ nm}$) vom durchstimmbaren Anregungslicht ($\lambda_{exc} = 700 \text{ nm} - 820 \text{ nm}$) zu trennen und zu detektieren.

Die Ergebnisse zur Anregungswellenlängenabhängigkeit der TPEF von Eumelanin konnten durch Messungen der TPEF getrennter Gewichtsfractionen ergänzt werden. Dadurch wurde es möglich, direkt zu erkennen, ob nur bestimmte Gewichtsfractionen zu einer spektralen Veränderung der Fluoreszenz bei nichtlinearer Anregung neigen. In einem weiteren Schritt konnte die Apparatur genutzt werden, um mit Hilfe von Referenzfarbstoffen den TPE-Wirkungsquerschnitt von Eumelanin zu bestimmen. Damit ist es möglich zu entscheiden, ob die TPEF über einen schrittweisen oder simultanen Prozess angeregt wird.

Um den Nachweis des Anregungsprozesses zu referenzieren bzw. zu verifizieren, wurde in einer abschließenden Messung mit einem eigens entwickelten Aufbau die Abhängigkeit der Eumelanin-TPEF von der Anregungspulsdauer bestimmt.

Um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erreichen, wurde bei allen Versuchen eine Lösung von synthetischem Eumelanin der Firma Sigma-Aldrich (Produkt-Nummer M8631) in 0,1 molarer wässriger Natronlauge ((0,1M)NaOH) verwendet.

Die Festlegung auf diesen Eumelanin-Typ war nötig, da Eumelanin auf unterschiedliche Art und Weise erstellt werden kann (Abschnitt 3.1). Da das synthetische Eumelanin laut [Teu00]

in seinem chemischen Aufbau am ehesten dem natürlichen Eumelanin ähnelt und auch in der übrigen Literatur vorrangig vertreten ist, wurde es für die hier dargelegten Versuche ausgewählt.

Als Lösungsmittel wurde 0,1 molare Natronlauge verwendet, da einige Versuche (Ultrafiltration) nur dieses Lösungsmittel erlaubten und andererseits die Vergleichsliteratur im Wesentlichen ebenfalls (0,1M) NaOH verwendet.

2 Grundlagen

Zum Verständnis der Anregungs- und Relaxationsprozesse von Molekülen durch Licht sind genaue Kenntnisse über die Wechselwirkung von Licht und Materie unabdingbar. Eine physikalische Beschreibung der Wechselwirkung zwischen Materie und elektromagnetischen Wellen erfolgt durch die Maxwell-Formeln:

$$\nabla \times \vec{H} = \vec{j} + \dot{\vec{D}} \quad (2.1)$$

$$\nabla \times \vec{E} = -\dot{\vec{B}} \quad (2.2)$$

Unter der Annahme eines linearen Zusammenhangs zwischen dem anregenden elektrischen Feld \vec{E} und der Antwort des Mediums (Polarisation) \vec{P} , sowie der Betrachtung eines Mediums der elektrischen Leitfähigkeit von $\sigma_L = 0$ und magnetischer Permeabilität von $\mu = 1$ kann aus diesen Formeln die folgende Wellengleichung formuliert werden:

$$\Delta \vec{E} - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = \mu_0 \frac{\partial^2 \vec{P}}{\partial t^2} \quad (2.3)$$

Dabei ist c die Ausbreitungsgeschwindigkeit im Medium und μ_0 die magnetische Permeabilität im Vakuum. Bei Verwendung ultrakurzer Laserpulse mit zeitlichen Breiten im Femtosekundenbereich ist die Pulsenergie jedoch so stark komprimiert, dass Intensitäten erreicht werden, bei denen sich die Polarisation des Mediums nichtlinear zur anregenden Feldstärke verhält.

Diese Veränderung ist auf einen Wechsel von der harmonischen zur unharmonischen Oszillation der Dipole des Mediums zurückzuführen, da die Amplitude der Dipolschwingung so stark wird, dass zusätzliche Wechselwirkungen mit den umgebenden Atomen und Molekülen stattfinden. Dabei ist interessant, dass unter Umständen die Polarisation statt eine Art Sättigung aufzuweisen in stärker werdendem Maße von der anregenden Feldstärke abhängt.

Um auch das nichtlineare Verhalten der Polarisation zu erfassen, wird die Polarisation in eine Potenzreihe entwickelt [Ber93]:

$$\vec{P}(\vec{E}) = \epsilon_0 \chi^{(1)} \vec{E} + \epsilon_0 \chi^{(2)} \vec{E} \vec{E} + \epsilon_0 \chi^{(3)} \vec{E} \vec{E} \vec{E} + \dots \quad (2.4)$$

Dabei ist ϵ_0 die elektrische Feldkonstante und χ^n die elektrische Suszeptibilität n-ten Grades, welche die elektrische Polarisierbarkeit des durchstrahlten Materials aufgrund eines prägenden elektrischen Feldes angibt. Durch die Suszeptibilität werden einerseits die phasenverschiebende und andererseits die energieabsorbierende Eigenschaft der Materie beschrieben, weshalb die Suszeptibilität komplex dargestellt wird:

$$\chi = \chi_{phase} - i\chi_{absorp}$$

Sowohl der die Phasenveränderung beschreibende Realteil als auch der die Absorption beschreibende Imaginärteil der Suszeptibilität sind wellenlängenabhängig (dispersiv), wobei im Resonanzfall zwischen der Frequenz der Lichtwelle und der Eigenfrequenz des wechselwirkenden Elektronensystems der Materie der Imaginärteil dominant wird (z.B. [Men07]).

Die Beträge der Suszeptibilitätswerte fallen zu höheren Graden ($n > 1$) stark ab, so dass nur sehr hohe Feldstärken ein nichtlineares Verhalten der Polarisation bewirken. Durch $\chi^{(1)}$ werden lineare Wechselwirkungseffekte wie die lineare Absorption beschrieben, durch $\chi^{(2)}$ hingegen die „Second Harmonic Generation“ (SHG) und die Hyperrayleigh-Streuung. Mit $\chi^{(3)}$ kann die „Two Photon Absorption“ beschrieben werden.

2.1 Lineare Wechselwirkung von Licht mit kleinen Molekülen oder Teilmolekülen

Da der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit in der Spektroskopie liegt, wird im Folgenden auf die durch χ_{absorp} beschriebene resonante Anregung von Atomen und Molekülen sowie die damit verbundenen intra- und intermolekularen Relaxationsprozesse eingegangen.

Der energetische Status des Moleküls setzt sich dabei in guter Näherung aus der Summe der in den elektronischen, vibronischen und rotatorischen Zuständen gespeicherten Teilenergien zusammen:

$$E_{Molekül} = E_{el} + E_{vib} + E_{rot} \quad (2.5)$$

Ein Überblick über eine typische molekulare Zustandsstruktur sowie die wichtigsten intramolekularen Übergänge ist in Abbildung 2.1 in Form eines Jablonski-Diagramms gegeben. Dabei beschreibt die Ordinate den energetischen Abstand des jeweiligen Anregungszustandes des Moleküls bezüglich seines Grundzustandes, welcher allgemein als Singulett-Zustand angenommen und mit S_0 bezeichnet wird.

Wie in Abbildung 2.1 zu sehen, beinhalten die elektronischen Anregungszustände S_i eine Vielzahl von vibronischen Unterzuständen. Da rotatorische Energien nur bei kleinen Molekülen zu beobachten sind und Eumelanin-Molekül ein Makromolekül/Aggregat darstellt, wurde sowohl im Diagramm als auch im Folgenden auf die Betrachtung von Rotationszuständen verzichtet.

Neben den höheren Singulettzuständen können auch Triplett-Zustände T_i , das heißt Zustände mit Elektronenpaaren gleicher Spinrichtung angeregt werden, die energetisch tiefer liegen als die korrelierenden Singulett-Zustände.

2.1.1 Lineare Absorption

Die Anregung der höheren Zustände kann über resonante Übergänge, das heißt durch Absorption von Photonen der „Eigenfrequenzen“ ν des Übergangs erfolgen. Dabei werden elektronische und vibronische Übergänge der Gesamtenergie des Photons angeregt (Resonanzbedingung):

$$E_{ph} = h \cdot \nu = \Delta E_{Molekül} = \Delta E_{el} + \Delta E_{vib} \quad (2.6)$$

Dabei ist h das Plancksche Wirkungsquantum und ΔE die jeweilige vom Molekül aufgenommene oder abgegebene Energie. Aufgrund der vibronischen Übergänge ist die Molekülabsorptionsbande nicht wie in der Atomspektroskopie mit einer lorenzkurvenförmigen Bande beschreibbar.

Stattdessen ergeben sie sich aus allen quantenmechanisch erlaubten Übergängen in Kombinationen von elektronisch-vibronischen Anregungszuständen. Dieser Prozess ist entsprechend molekülspezifisch und findet in einem Zeitbereich von 10^{-15} s statt. Er stellt damit den schnellsten in Abbildung 2.1 gezeigten Prozess dar.

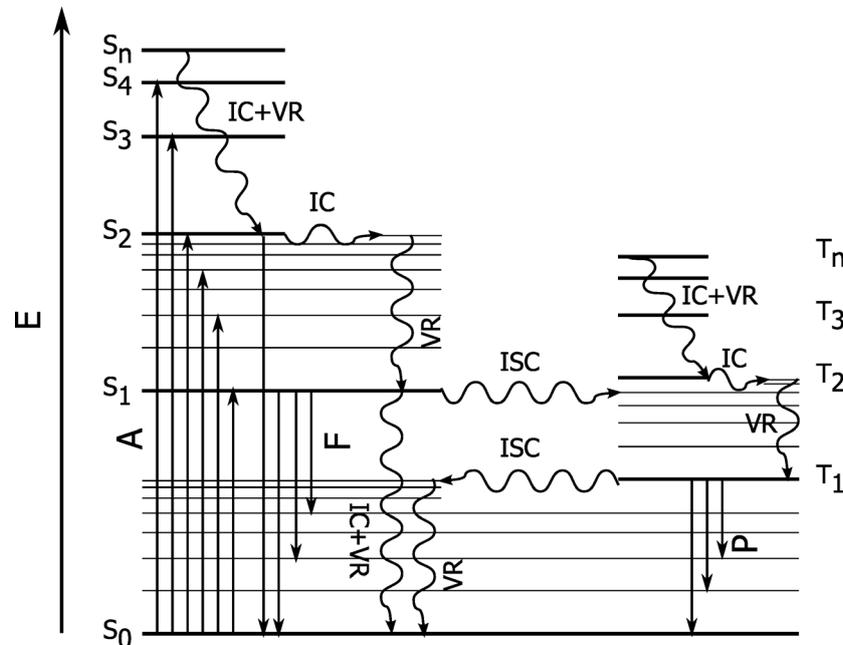


Abb. 2.1: Energieniveauschema oder auch Jablonski-Diagramm der intramolekularen energetischen Zustände und Übergänge eines Chromophors. Die Zustände werden in y-Richtung entsprechend ihrer Anregungsenergie eingezeichnet, wobei die elektronischen Zustände (S_n, T_n) eine Vielzahl von vibronischen Unterzuständen beinhalten. (Auf die Darstellung der rotatorischen Zustände wurden zur Vereinfachung verzichtet.) Zwischen den einzelnen Zuständen sind die eingezeichneten Übergänge möglich: Absorption (A), Internal Conversion (IC), Vibrationsrelaxation (VR), Intersystem Crossing (ISC), Fluoreszenz (F), Phosphoreszenz (P).

Die Wahrscheinlichkeit oder Effizienz einer resonanten Anregung von Materie mit Photonen bestimmter Energie kann dabei durch verschiedene Größen ausgedrückt werden, die aus unterschiedlichen Modell- bzw. messtechnischen Ansätzen stammen. Neben der bereits genannten elektrischen Suszeptibilität χ_{absorp} , die aus der elektrodynamischen Polarisationsbetrachtung stammt, können auch die aus den quantenmechanischen Übergangsbetrachtungen stammenden Größen des Übergangsdipolmoments μ_{jk} und der Einsteinkoeffizient der Absorption B_{jk} genutzt werden, um die Übergangswahrscheinlichkeit zwischen den elektronischen Zuständen j und k zu beschreiben. Der Einsteinkoeffizient berücksichtigt nur elektronische Zustände, weshalb er in der Molekülspektroskopie nicht verwendet wird.

Stattdessen werden die Übergangsmomente zur Beschreibung der elektronisch-vibronischen Übergänge genutzt. In das Übergangsmoment gehen neben der elektronischen auch die vibronische Übergangswahrscheinlichkeit verschiedener Schwingungszustände der Kerne zueinander ein, welche auch als Franck-Condon-Faktor p_ν bezeichnet wird. Dieser errechnet sich aus dem Überlappungsintegral der beiden am Übergang beteiligten Kernschwingungsfunktionen.

Spektral bewirken parallel zur elektronischen Anregung initiierte Molekülschwingungen, dass es durch die vorwiegende Anregung höherer vibronischer Niveaus des elektronischen Anregungszustandes zu einer Verbreiterung des elektronisch resonanten Übergangs in den kurzwelligen Bereich kommt (vibronische Schulter).

Grundsätzlich bleibt zu sagen, dass quantenmechanische oder quantenelektrodynamische Rechnungen zur Absorption nur an einfacheren Molekülen bekannter, einfacher Struktur mit akzeptablen Abweichungen möglich sind, weshalb sie in der vorliegenden Arbeit über das makromolekulare Eumelanin keine Verwendung finden.

Stattdessen wird die in der Molekülspektroskopie übliche Größe des Absorptionswirkungsquerschnitts $\sigma_{jk}^{(1)}(\nu)$ genutzt, um intra- und intermolekulare Übergangsraten auszudrücken und zu vergleichen. Dieser kann aus den im Folgenden betrachteten Messgrößen des Absorptions- und Extinktionskoeffizienten α und ϵ ermittelt werden.

Bei linearer Absorption nimmt die Lichtintensität $I(l)$ einer bestimmten Wellenlänge λ proportional zur Wegstrecke l durch das absorbierende Medium mit dem Absorptionskoeffizienten α ab:

$$\begin{aligned}\frac{dI(l, \lambda)}{dl} &= -I(l)\alpha(\lambda) \\ \int_{I(0, \lambda)}^{I(l_1, \lambda)} \frac{1}{I(l, \lambda)} dI &= \int_0^{l_1} -\alpha(\lambda) dl \\ \ln \frac{I(l_1, \lambda)}{I(0, \lambda)} &= -\alpha(\lambda)l_1 \\ \Rightarrow I(l_1, \lambda) &= I(0, \lambda)e^{-\alpha(\lambda)l_1}\end{aligned}\tag{2.7}$$

Die Gleichung 2.7 ist auch als Beer-Lambertsches Gesetz bekannt und gibt die Intensität nach der Transmission durch ein Medium nach der Strecke l_1 an. Die Größe

$$E(\lambda) = \ln \frac{I(0, \lambda)}{I(l_1, \lambda)} = \alpha(\lambda)l_1\tag{2.8}$$

wird als Extinktion bezeichnet und stellt immer eine absolute Messgröße dar.

Aus dem Absorptionskoeffizienten α kann man bei bekannter Teilchenkonzentration c des Absorbers den Absorptionswirkungsquerschnitt $\sigma_{jk}^{(1)}(\lambda)$ eines Absorberteilchens bestimmen:

$$\sigma_{jk}^{(1)}(\lambda) = \frac{\alpha}{c}\tag{2.9}$$

Oft wird die Extinktion zur Beschreibung des Absorptionsverhaltens auch zur Basis 10 ausgedrückt, wodurch das Beer-Lambertsche Gesetz die folgende Form erhält:

$$I(l_1, \lambda) = I(0, \lambda)10^{-OD}\tag{2.10}$$

Dabei wird OD als Optische Dichte oder dekadische Extinktion bezeichnet. Diese kann als Produkt aus dem dekadischen molaren Extinktionskoeffizienten ϵ , der molare Konzentration c_{mol} und der Absorptionsstreckenlänge l_1 dargestellt werden:

$$OD = \epsilon(\lambda)c_{mol}l_1\tag{2.11}$$

Aus dem dekadisch molaren Extinktionskoeffizienten ϵ kann der Wirkungsquerschnitt der linearen Absorption $\sigma_{jk}^{(1)}(\lambda)$ wie folgt errechnet werden:

$$\begin{aligned} e^{\sigma_{jk}^{(1)}(\lambda) \cdot c \cdot l_1} &= 10^{\epsilon_{mol}(\lambda) \cdot c_{mol} \cdot l_1} \\ \Rightarrow \sigma_{jk}^{(1)}(\lambda) &= \epsilon_{mol}(\lambda) \frac{\ln(10) \cdot c_{mol}}{c} \\ &= \epsilon_{mol}(\lambda) \frac{\ln(10)}{N_A} \end{aligned} \quad (2.12)$$

Dabei ist $N_A = 6.022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ die Avogadro-Zahl.

Aus dem Absorptionseffizienzwirkungsquerschnitt kann weiterhin die Oszillatorstärke f_{jk} des Absorbers bestimmt werden [Men07]:

$$\begin{aligned} f_{jk} &= \frac{4m_e c_0^2 \epsilon_0}{e_e^2} \int_{band} \frac{1}{\lambda^2} \sigma_{jk}^{(1)}(\lambda) d\lambda \\ &= 1,12958 \cdot 10^{14} \text{ m}^{-1} \int_{band} \frac{1}{\lambda^2} \sigma_{jk}^{(1)}(\lambda) d\lambda \end{aligned} \quad (2.13)$$

Dabei steht m_e für die Elektronenruhemasse, e_e für die Elementarladung und c_0 für die Vakuumlichtgeschwindigkeit. Die Oszillatorstärke stellt ebenfalls ein Maß für die Übergangswahrscheinlichkeit von Absorptions- und Emissionsübergängen dar. Für quantenmechanisch erlaubte Übergänge besitzt die Oszillatorstärke einen Wert $f_{jk} \geq 1$, womit es möglich wird, typische Wirkungsquerschnitte für die lineare Absorption abzuschätzen. Bei einer angenommenen Oszillatorstärke von $f_{jk} \approx 1$ ergeben sich abhängig von der Bandbreite der Absorption Wirkungsquerschnitte von $\sigma_{jk}^{(1)}(\nu) = 10^{-19} \text{ cm}^2 - 10^{-17} \text{ cm}^2$.

2.1.2 Intramolekulare strahlungslose Relaxationsprozesse

Durch die veränderten Orbitale der Außenelektronen des angeregten Moleküls kommt es, wie oben erwähnt, zu Schwingungen zwischen den Atomkernen des Moleküls. Diese Schwingungen relaxieren durch Wechselwirkung mit Lösungsmittelmolekülen sehr schnell mit $t_{VR} = 10^{-14} \text{ s} - 10^{-12} \text{ s}$ [Tur10] in den vibronischen Grundzustand des jeweiligen elektronischen Zustandes. Die Übergangsrate ist deshalb so hoch, da die intra- und intermolekularen Vibrationen des Moleküls sehr schnell an die Lösungsumgebung abgegeben werden können. Das umgebende Lösungsmittel stellt den angeregten Molekülen aufgrund der Vielzahl von möglichen Bewegungen (Translation, Rotation, Vibration) in allen räumlichen Freiheitsgraden ein Kontinuum von Relaxationsmöglichkeiten zur Verfügung.

Liegen elektronische Zustände energetisch dicht beieinander, kann die Anregung durch vibronische Kopplung des höheren elektronischen Anregungszustandes mit einem isoenergetisch, höheren vibronischen Zustand des tieferen elektronischen Zustandes übergehen. Dieser strahlungslose Relaxationsprozess wird Internal Conversion (IC) genannt. Die Übergangsrate der IC ist in erster Näherung gleich dem Produkt aus dem Franck-Condon-Faktor p_ν und der maximal gemessenen Übergangsrate der IC mit $k_{IC} = 10^{13} \text{ s}^{-1}$ [Iwa01, Iwa00]:

$$k_{IC} \approx 10^{13} p_\nu \quad (2.14)$$

Im Falle eines elektronisch und spin-erlaubten Übergangs fällt der Franck-Condon-Faktor exponentiell mit ansteigendem energetischen Abstand der am Übergang beteiligten elektronischen

Niveaus ab [Tur10]:

$$p_\nu \propto e^{-|\Delta E|} \quad (2.15)$$

Diese exponentielle Abhängigkeit von k_{IC} erklärt sich aus den exponentiell kleiner werdenden Überlappungsintegralen der Kernschwingungsfunktionen des vibronischen Grundzustandes mit denen sehr viel höherer vibronischer Zustände. Aus den Gleichungen 2.14 und 2.15 ergibt sich damit für die Übergangsrate der Internal Conversion :

$$k_{IC} \approx p_\nu e^{-\alpha \Delta E} \quad (2.16)$$

Dabei ist α ein Proportionalitätsfaktor. Aufgrund ihres geringen energetischen Abstandes relaxieren deshalb im allgemeinen Falle alle höheren elektronischen Zustände in einer Zeit von $t_{IC} = 10^{-13} \text{ s} - 10^{-12} \text{ s}$ über IC und VR zum vibronischen Grundzustand des 1. Anregungszustand S_1 . Dieses Verhalten wurde erstmals 1950 von M. Kasha [Kas50] diskutiert und ist deshalb als Kashas Rule bekannt.

Eine Ausnahme von Kashas Rule bildet z.B. Azulen, eine dem Indol ähnliche 5-6-Ring-Kombination (siehe Abbildung 2.2). Dieses besitzt einen untypisch großen energetischen Abstand von $\Delta E_{ph} = 1,77 \text{ eV}$ zwischen den S_1 - und S_2 -Zuständen. Daraus resultiert eine sehr geringe Übergangsrate $k_{IC} \approx 7 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$, wobei zwischen den S_1 - und S_0 -Zuständen eine hohe IC-Übergangsrate von $k_{IC} \approx 7 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1}$ existiert.

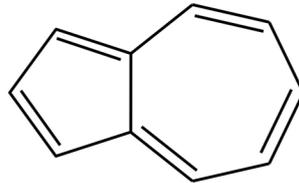


Abb. 2.2: Strukturformel des Azulenmoleküls

Das Intersystem Crossing (ISC) bezeichnet den strahlungslosen Übergang unter Spin-Umkehr aus einem Singulett-Zustand in einen Triplett- oder von einem Triplett- in einen Singulett-Zustand (siehe z.B. [Tur10, Hak06, Lak99, Dem03]). Das Intersystem Crossing ist dann besonders effektiv, wenn eine starke Spin-Bahnkopplung vorliegt, das heißt, wenn mit der Spin-Umkehr des Elektrons eine Änderung des Bahndrehimpulses verbunden ist (El-Sayeds Rule [ES63]). Weiterhin begünstigen schwere Atome und kleine Energiestufen zwischen den beteiligten Singulett- und Triplett-Zuständen das ISC. Für aromatische Moleküle ergeben sich wegen den meist nur möglichen $S_1(\pi\pi^*)-T_1(\pi\pi^*)$ -ISCs Übergangsraten von $k_{ISC} = 10^6 \text{ s}^{-1} - 10^8 \text{ s}^{-1}$ [Tur10] die im Bereich der strahlenden Übergänge liegen (siehe Abschnitt 2.1.3).

Geht man bei Eumelanin von dem schichtförmigen Aggregatsmodell aus und berücksichtigt, dass keine schweren Atome in der Molekülstruktur vorhanden sind, ist nicht von einer wesentlichen Relaxation durch ISC auszugehen.

2.1.3 Fluoreszenz und Phosphoreszenz

Zu den strahlenden Übergängen gehören die in Abbildung 2.1 gezeigte Fluoreszenz F , die Phosphoreszenz P und die nicht eingezeichnete stimulierte Emission.

Letztere spielt aufgrund fehlender Besetzungsinversion bei geringen Anregungslichtintensitäten und aufgrund des Stokes-Shiftes (siehe unten) zwischen Absorption- und Emissionsbande spektroskopisch eine untergeordnete Rolle. Da die Photonen der stimulierten Emission identisch mit den anregenden Photonen sind, wird sie indirekt bei der Absorptionsmessung (negative Absorption) mit erfaßt. Sie wird im Jablonski-Diagramm und in der weiteren Arbeit nicht gesondert betrachtet.

Liegen die energetischen Abstände zwischen zwei benachbarten elektronischen Niveaus im Bereich von einigen Elektronenvolt, wird die Anregungsenergie durch die Emission eines Photons abgegeben. Dieser Abstand ist in den meisten Fällen zwischen dem ersten Anregungszustand und dem Grundzustand gegeben (Kashas Rule - Ausnahme z.B. Azulen siehe Abschnitt 2.1.2). Dabei findet der Fluoreszenzübergang zwischen dem vibronischen Grundzustand des ersten elektronischen Anregungszustandes und einem vibronischen Zustand des elektronischen Grundzustandes statt, was sich spektral in einer Verbreiterung der Emissionsbande in Richtung längerer Wellenlängen widerspiegelt. Die höhere Übergangswahrscheinlichkeit zu höheren Vibrationsniveaus des Grundzustandes erklärt sich wie bei der Absorption aus Unterschieden in den mittleren Kernabständen des angeregten Moleküls und des Moleküls im Grundzustand. Da sowohl bei der Absorption als auch bei der Fluoreszenz neben der elektronischen auch eine vibronische Anregung erfolgt und die in den vibronischen Anregungszuständen gespeicherte Energie an die umgebenden Lösungsmittelmoleküle abgegeben wird, ergibt sich eine Differenz zwischen den Photonenenergien ΔE_{stokes} der absorbierten und der emittierten Photonen. Spektral spiegelt sich dies in einer Verschiebung der Emissionsbande bezüglich der Absorptionsbande wider, die als Stokes-Shift bezeichnet wird.

Weiterhin ergibt sich aufgrund des in erster Näherung parabelförmigen Potentials und der damit verbundenen Symmetrie der Vibrationswellenfunktionen bezüglich des jeweiligen mittleren Atomabstands eine Spiegelbildsymmetrie zwischen Absorption- und Fluoreszenzspektrum als Funktion der entsprechenden Photonenenergie (z.B. [Tur10, Atk05]).

Diese spontane Emission ist ein statistischer Prozess, mit mittleren Übergangsraten von $k_F = 10^9 \text{ s}^{-1} - 10^6 \text{ s}^{-1}$. Das Abklingen der Fluoreszenz kann man näherungsweise durch eine Überlagerung von Exponentialfunktionen (Zerfallsfunktion) der Form

$$\phi_f = \sum_i A_i e^{-\tau_i} \quad (2.17)$$

darstellen (z.B. [Bru02]). Die durch Anpassung (Fit) von Exponentialfunktionen an die Messwerte gefundenen Parameter A_i und τ_i besitzen nicht unbedingt eine physikalische Bedeutung. Diese erhalten sie erst, wenn ein physikalisches Molekül-Modell sie stützt. In Anlehnung an ein solches Modell steht i für die Anzahl der Fluorophore, die Faktoren A_i für die jeweiligen Amplituden und τ_i besitzt die Bedeutung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer des i -Fluorophors.

Die beobachtete Fluoreszenzlebensdauer spiegelt nach Kashas Rule die Lebensdauer des ersten Anregungszustandes wider, welche durch die parallel ablaufenden nichtstrahlenden und strahlenden Übergänge bestimmt wird:

$$\tau_f = \frac{1}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}} \quad (2.18)$$

Mit dem Verhältnis von der absorbierten zur emittierten Photonenmenge, welches auch als Fluoreszenzquantenausbeute η_f bezeichnet wird, kann die Übergangsrate der Fluoreszenz aus

der beobachteten Fluoreszenzlebensdauer errechnet werden:

$$\eta_f = \frac{N_F}{N_A} = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}} = k_F \cdot \tau_F \quad (2.19)$$

Die Fluoreszenzquantenausbeute des untersuchten Eumelanins lag bei $\eta_f = 10^{-4}..10^{-3}$ ([Teu00]).

Die Phosphoreszenz bezeichnet einen strahlenden Triplett-Singulett-Übergang unter Spin-Umkehr des beteiligten Elektrons (siehe z.B. [Atk05, Hak06, Tur10]). Da dieser Übergang aus Gründen des Drehimpulserhaltungssatzes verboten ist, emittiert das Molekül aufgrund der niedrigen Übergangswahrscheinlichkeit sehr langsam mit typischen Emissionslebensdauern von $\tau_{Phos} \approx 1 \mu s \dots 1 s$. Da bei Eumelanin weder in der Literatur noch in den eigenen Messungen solche langlebigen Emissionen beobachtet wurden, wird auf die Phosphoreszenz an dieser Stelle nicht näher eingegangen.

2.1.4 Relaxationsprozesse über intermolekularen Energietransfer

Förster-Energietransfer Bei der Förster-Theorie zum Energietransfer handelt es sich um einen klassischen Ansatz, der einen Energietransport zwischen einem Donor und Akzeptor beschreibt, die über keinen direkten Kontakt verfügen, das heißt zwischen denen keine ausreichende räumliche Überlappung der Elektronendichte besteht [För48]. Sie basiert auf der Übertragung der Idee des Herzschens Dipols auf Moleküle, das heißt einen Mechanismus, der über molekulare Antennen läuft, wobei die Energie strahlungslos übertragen werden kann. Die Übertragung geschieht, indem der schwingende Dipol des Donors den Dipol des Akzeptors zum Anschwingen bringt und seine Energie dabei vollständig an ihn abgibt.

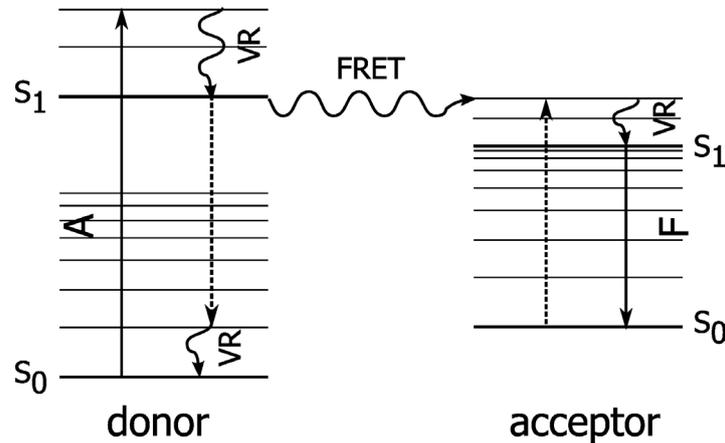


Abb. 2.3: Jablonski-Diagramm eines Förster-Energietransfers (FRET) zwischen zwei Molekülen

Die Rate für den Energietransfer wird dabei im Wesentlichen durch die Resonanz zwischen der Emissionsbande des Donors und der Absorptionsbande des Akzeptors bestimmt. Diese kann rechnerisch über das Überlappungsintegral dargestellt werden:

$$J = \int j_{F,Donor}(\lambda) \epsilon_{Akzeptor}(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (2.20)$$

Dabei ist $j_{F,Donor}(\lambda)$ die normierte Photonendichte des Donors und $\epsilon_{Akzeptor}(\lambda)$ der Extinktionskoeffizient des Akzeptors.

Die Förstertransferrate ist außerdem stark vom Donor-Akzeptor-Abstand r_{D-A} abhängig:

$$k_{FT} = \frac{R_0^6}{\tau_{Donor} r_{D-A}^6} \quad (2.21)$$

Dabei steht R_0 für den Försterradius, welcher den Abstand zwischen dem Donor und Akzeptor bezeichnet, bei dem die Effizienz einer Energieübertragung via Förster-Energietransfer 50 % beträgt. Für R_0^6 gilt dabei nach [Lak99]:

$$R_0^6 = \frac{9 \ln(10) \kappa^2 \eta_f}{128 \pi^5 n_{solv}^4 N_A} J \quad (2.22)$$

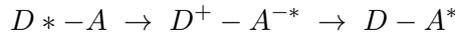
Aus den Gleichungen (2.21) und (2.22) ergibt sich für die Transferrate:

$$k_{FT} = \frac{9 \ln(10) \kappa^2 \eta_f}{128 \pi^5 n_{solv}^4 N_A \tau_{Donor} r_{D-A}^6} J \quad (2.23)$$

Dabei ist η_f die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors, n_{solv} die Brechzahl des Lösungsmittels, N_A die Avogadrokonstante, τ_{Donor} die Lebensdauer des Donor-Anregungszustandes und κ der geometrische Orientierungsfaktor. Letzterer beschreibt die Lage des Donors zum Akzeptor. Bei einer zufälligen Verteilung von Donor und Akzeptor ergibt sich ein $\kappa = \frac{2}{3}$ [För48].

Typische Donor-Akzeptor-Abstände, bei denen die Förstertransferrate konkurrierende Relaxationsprozesse dominiert, liegen im Bereich von bis zu $r_{D-A} = 10 \text{ \AA} - 100 \text{ \AA}$ und sind deshalb beim Eumelanin wahrscheinlich (siehe Kapitel 3.1).

Dexter-Energietransfer Liegen Donor und Akzeptor so nahe bei einander, dass sich ihre Orbitale überlappen, kann es zu einem Energieübertrag durch doppelten Elektronenaustausch kommen [Tur10, Dex53]. Dabei geht das angeregte Elektron zuerst auf das Akzeptor-Molekül über (charge transfer state), wobei Akzeptor und Donor als Radikalpaar vorliegen. Danach kommt es zum Ladungsausgleich, indem ein Elektron im Grundzustand vom Akzeptor zum Donor übergeht.



Der Dexter-Energietransfer wirkt bei Donor-Akzeptor-Abständen von $r_{D-A} = 5 \text{ \AA} - 10 \text{ \AA}$, wobei die Dexter-Energietransferrate exponentiell (und damit stärker als der FRET) mit dem Abstand abfällt [Jel02]:

$$k_{DT} = K_{dex} J e^{\frac{-2r_{D-A}}{L_{waals}}}$$

Dabei ist K_{dex} ein Geometriefaktor, J das aus Gleichung 2.20 bekannte spektrale Überlappungsintegral und L_{waals} die Summe der van-der-Waals-Radien von Donor und Akzeptor. Aufgrund der von Zajac [Zaj94] beobachteten Aggregatsstruktur von Eumelanin als Schichtstapel mit Schichtabständen von $r_{D-A} \approx 3,4 \text{ \AA}$ ist auch ein Energietransfer nach Dexter möglich.

Quenching Quenchen beschreibt den Effekt der Fluoreszenzlöschung durch intermolekularen Energietransfer. Es setzt sich aus einem dynamischen und einem statischen Part zusammen (z.B.[Jel02, Bru02]). Das dynamische Quenchen ist auch als Stern-Volmer-Quenchen bekannt und erfolgt über die Diffusion des Quenchers zum Fluorophor und einem Stoßvorgang zwischen beiden. Es wird dann relevant, wenn das Quencher-molekül innerhalb der Fluoreszenzlebensdauer zum Fluorophor diffundiert. Das dynamische Quenching leitet sich direkt aus den Gleichungen der Quantenausbeute ohne (2.24) und mit Quencher (2.25) ab:

$$\eta_{f,0} = \frac{k_f}{k_f + k_{ns}} \quad (2.24)$$

$$\eta_f = \frac{k_f}{k_f + k_{ns} + k_{dynQ} \cdot c_{qu}} \quad (2.25)$$

Hier bezeichnen k_f die Fluoreszenzübergangsrate, k_{ns} die Rate der nichtstrahlenden Übergänge und die von der Quencherkonzentration c_{qu} abhängige Ratenkonstante des Quenchens $k_{dynQ} \cdot c_{qu}$.

Für die relative Fluoreszenzquantenausbeute $\frac{\eta_f}{\eta_{f,0}}$ ergibt sich :

$$\frac{\eta_f}{\eta_{f,0}} = \frac{1}{1 + k_{dynQ} \cdot c_{qu}}$$

Außerdem folgt aus der Gleichung für die Fluoreszenzlebensdauer τ_f , dass sich die Fluoreszenzlebensdauer proportional zur Fluoreszenzquantenausbeute verringert:

$$\tau_f = \frac{1}{k_f + k_{ns} + k_{dynQ} \cdot c_{qu}}$$

Alternativ dazu beschreibt das statische Quenchen nach Perrin [Per24, Per27] das nicht von der Diffusion abhängige Quenchen eines Fluorophores. Letzteres bildet nach diesem Modell aufgrund der fehlenden Bewegung (Diffusion) mit einem benachbarten Quencher einen Komplex. Dieser absorbiert Licht entsprechend der Absorptionsbande des Fluorophors, wobei der angeregte Komplex danach sehr schnell strahlungslos zerfällt. Da eine Fluoreszenz des Komplexes nicht vorhanden ist, wird die Fluoreszenzkinetik des freien Fluorophors in diesem Fall nicht verändert.

Nach dem Modell von Perrin entscheidet nicht die Diffusion, sondern eine aktive Sphäre über einen stattfindenden Quenchvorgang. Befinden sich Quencher innerhalb eines bestimmten Radiuses R_s um ein Fluorophor, wird die Fluoreszenz auf jeden Fall gequencht. Ist die aktive Sphäre um ein Fluorophor frei von Quenchern, findet keine Komplexbildung statt und das Fluorophor kann in jedem Fall zur Fluoreszenz angeregt werden. Dabei gilt nach Perrin eine exponentielle Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzquantenausbeute von der Quencherkonzentration:

$$\frac{\eta_f}{\eta_{f,0}} = e^{-V_s N_A c_{qu}}$$

Dabei ist V_s das Volumen der aktiven Sphäre und N_A die Avogadro-Konstante. Oft ist es praktischer den Radius R_s der aktiven Sphäre zu verwenden. Er ergibt sich zu:

$$R_s = \left(\frac{3V_s}{4\pi} \right)^{\frac{1}{3}} = 6,5 c_{qu}^{\frac{1}{3}}$$

In vielen Fällen wird ein Fluorophor sowohl dynamisch als auch statisch gequenchet. Für das Verhältnis der Fluoreszenzquantenausbeute zu der ohne Quencher gilt dann nach Frank und Vavilov [Fra31]:

$$\frac{\eta_f}{\eta_{f,0}} = \frac{e^{-V_s N_A c_{qu}}}{1 + k_{dynQ} \cdot c_{qu}}$$

Bei den verwendeten Lösungen von synthetischem Eumelanin wurde ein Selbstquenching beobachtet (siehe Abschnitt 4.3.3), welches aus der Literatur noch nicht bekannt ist. Dieses Quenching ist deshalb bei der Diskussion der in der Literatur zu findenden Daten zur Fluoreszenzdynamik von Eumelanin, sowie bei der Ermittlung der Fluoreszenzquantenausbeute zu berücksichtigen.

2.2 Lineare Wechselwirkung von Licht mit Polymeren und Aggregaten

2.2.1 Absorption von durchkonjugierten Polymerketten

Bei Molekülen mit durchkonjugierten Doppelbindungen sind die Elektronen entlang des π -Elektronensystems delokalisiert. Das heißt, sie können sich quasi frei über den gesamten Bereich bewegen. Die resultierende Absorptionsbande kann in erster Näherung über das quantenmechanische Modell eines Teilchens im Kastenpotential berechnet werden (siehe Abbildung 2.4). Die Länge des Kastens entspricht der Antennenlänge $L = (2n_d + 1)d_{CC}$, wobei d_{CC}

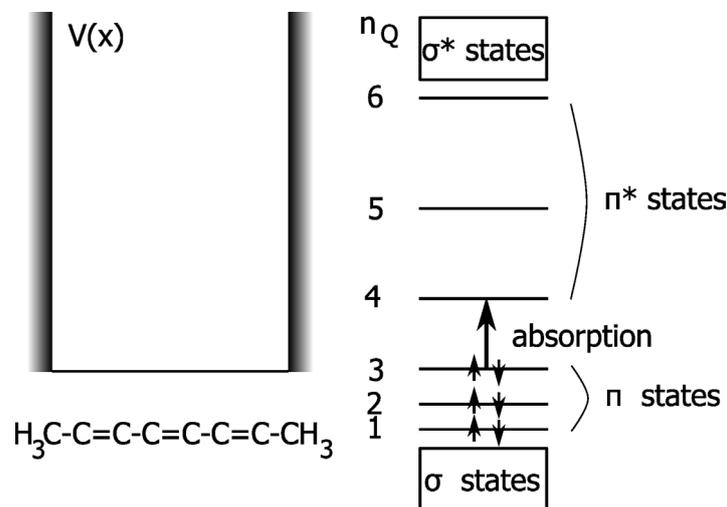


Abb. 2.4: Ansatz eines Kastenpotentials und Termschema am Beispiel von 2,4,6-Oktatrien zur Beschreibung des Energiespektrums von durchkonjugierten Kohlenwasserstoffen

den mittleren Abstand zwischen zwei verbundenen Kohlenstoffatomen ($d_{C-C} = 0,146$ nm, $d_{C=C} = 0,135$ nm, $d_{CC} = 0,141$ nm) und n_d die Doppelbindungsanzahl bezeichnet. Bei Betrachtung des Systems mittels stationärer Schrödingergleichung und der Randbedingung, dass außerhalb des Kastens die Wellenfunktion $\psi \stackrel{!}{=} 0$ ist, kann man die möglichen Wellenfunktionen mit den dazugehörigen Energieeigenwerten berechnen. Man erhält die innerhalb des Kastens

für die jeweiligen Hauptquantenzahlen n_Q möglichen Wellenfunktionen [Atk05]:

$$\begin{aligned}\psi_{n_Q}(x) &= \sqrt{\frac{2}{L}} \sin\left(n_Q \frac{\pi}{L} x\right) \\ &= \sqrt{\frac{2}{(2n_d - 1)d_{CC}}} \sin\left(n_Q \frac{\pi}{(2n_d - 1)d_{CC}} x\right),\end{aligned}\quad (2.26)$$

mit den Energieeigenwerten:

$$\begin{aligned}E_{n_Q} &= \frac{h^2 n_Q^2}{8m_e L^2} \\ &= \frac{h^2 n_Q^2}{8m_e (2n_d - 1)d_{CC}^2}\end{aligned}\quad (2.27)$$

Dabei steht h für das Plancksche Wirkungsquantum und m_e für die Elektronenruhemasse. Anhand der Gleichung 2.27 kann man feststellen, dass die Grundzustandsenergien der durchkonjugierten Polymere quadratisch zur Kettenlänge abfallen. Da dies auch für die Eigenenergien der höheren Anregungszustände ($n_Q > 1$) gilt, werden mit zunehmender Kettenlänge auch die energetischen Abstände zwischen den Eigenenergien benachbarter Anregungszustände geringer. Spektral bedeutet dies eine rot-verschobene Absorptionsbande längerkettiger Absorber.

Bei einer Polymerisation wie beim Eumelanin ist somit eine Rotverschiebung oder, bei Existenz vieler verschieden langer π -Systeme, eine Verbreiterung der resultierenden Polymer-Absorptionsbande bezüglich der Absorption der Ausgangsmomere zu erwarten.

2.2.2 Spektrale Verbreiterung der Absorption durch Exzitonische Aufspaltung bei Aggregaten und Polymeren

Bei organischen Aggregaten oder großen Polymeren mit mehreren dicht bei einander liegenden durchkonjugierten Ketten (im Folgenden als Monomere bezeichnet) kann es zu einer Aufspaltung des ersten angeregten Zustandes dieser Monomere kommen (z.B. [Dav71, Bru02, Jel02]). Der Grund dafür liegt in einer starken Kopplung der Übergangsmomente der Monomere untereinander. Diese Aufspaltung wird Davydov-Aufspaltung oder Exzitonenbildung genannt. Bei den Exzitonen spielt die geometrische Anordnung der Übergangsmomente der beteiligten Monomere eine große Rolle. Wenn diese parallel liegen, führt das zu einer Verstärkung des optischen Übergangs, die proportional mit der Anzahl N der Übergangsmomente anwächst. Liegen die Übergangsmomente antiparallel, löschen sich die Intensitäten der einzelnen Übergangsmomente destruktiv, womit das Gesamtmoment verschwindet.

In Abbildung 2.5 werden anhand eines Jablonski-Diagramms die energetischen Übergangsverhältnisse für den Fall von linear aufgereihten Übergangsdipolmomenten gezeigt. Ein im Vergleich zum Monomer energetisch tiefer liegender Übergang rührt von der gleichgerichteten Lage der Übergangsmomente einer Kette von Monomeren entsprechend Abbildung 2.5a her. Das bedeutet eine attraktive Wechselwirkung mit einem Gesamtübergangsmoment, welches der Summe der beiden Übergangsmomente der Monomere entspricht. Die entgegengerichtete Anordnung der Übergangsmomente führt hingegen aufgrund der repulsiven Wirkung zu einem energetisch höheren Anregungszustand. Da sich die Übergangsmomente gleichzeitig gegenseitig aufheben, verschwindet das Gesamtübergangsmoment und der optische Übergang (siehe Abbildung 2.5b). Dadurch kommt es zu einer Rotverschiebung des Spektrums bezüglich

der Monomerspektren und einer Intensitätsüberhöhung. Solche Aggregate werden nach ihrem Entdecker Jelly und Scheibe als J-Aggregate bezeichnet [Jel37, Sch37].

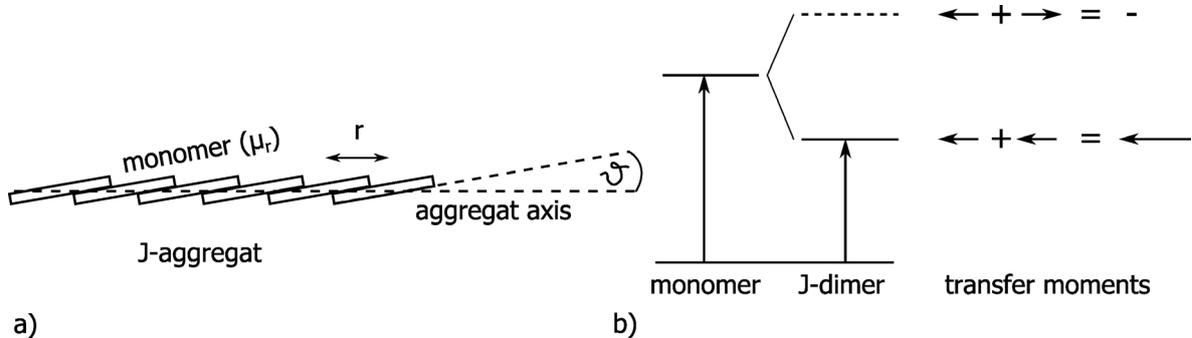


Abb. 2.5: Aufspaltung des Anregungszustands bei der Dimer-Bildung aus Monomeren mit linear angeordneten Übergangsdipolmomenten

Bei einer Aggregatbildung durch parallele Anordnung der Moleküle einer Kette von Monomeren entsprechend Abbildung 2.6a führt die daraus resultierende Orientierung der Übergangsmomente zu einem anderen Verhalten. Im antiparallelen Fall besteht eine attraktive Wechselwirkung, welche dem energieärmeren Zustand entspricht (siehe Abbildung 2.6b). Da das Gesamtübergangsmoment jedoch verschwindet, wird der dazugehörige Übergang unsichtbar. Der energiereiche Anregungszustand kommt durch die parallele Ausrichtung der Übergangsmomente zustande, welche wiederum eine repulsive Wechselwirkung darstellt. Das resultierende Übergangsmoment ist doppelt so groß wie das Übergangsmoment eines Monomers. Man beobachtet entsprechend eine Blauverschiebung des Spektrums mit einer Intensitätsüberhöhung. Aggregate mit diesem spektroskopischen Verhalten nennt man wegen ihrer Bande im Hypsochromen H-Aggregate. Während die Anregung im Kurzwelligigen erfolgt, relaxiert sie danach zur unteren Bandkante. Da der untere Anregungszustand im Idealfall aber keinen Übergangsmoment zum Grundzustand besitzt, kommt es zu keinem strahlenden Übergang in den Grundzustand.

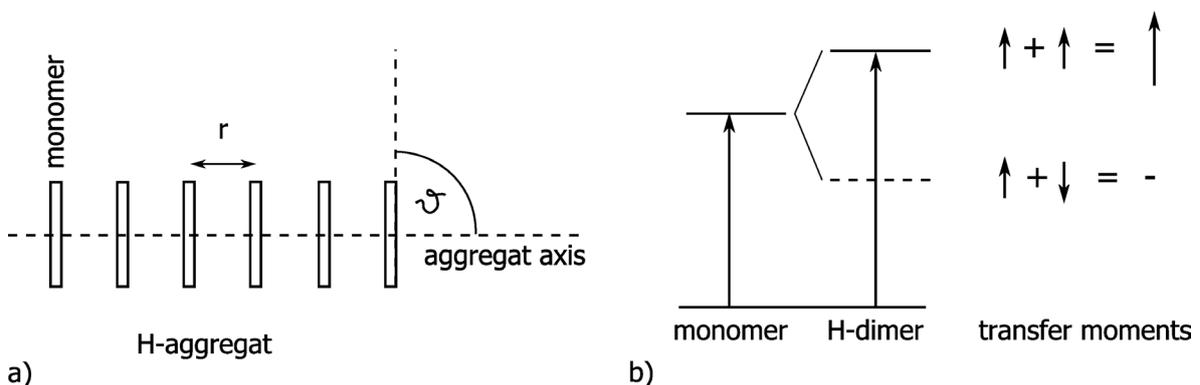


Abb. 2.6: Aufspaltung des Anregungszustands bei der H-Aggregat-Bildung aus Monomeren mit parallel angeordneten Übergangsdipolmomenten

Die beiden vorgestellten Aggregate mit linearer und paralleler Anordnung Abbildung 2.5a und Abbildung 2.6a der Übergänge stellen jedoch nur geometrische Grenzfälle dar. Mit zunehmendem Scherwinkel zwischen den Übergangsmomenten verschiebt sich der direkt anregbare

Zustand von niederen zu höheren Energien, während sich der Anregungszustand ohne Übergangsmoment entgegengesetzt verhält. Die Bandbreite ergibt sich dabei nach folgender Formel:

$$\Delta E = \frac{2|\mu_r|^2}{r^3}(1 - 3\cos^2\vartheta)$$

Die Aufspaltung hängt quadratisch vom Übergangsmoment μ_r des Monomers ab sowie von der dritten Potenz des intermolekularen Abstandes r im Nenner. Das heißt, große Aufspaltungen werden bei Aggregaten mit starken Übergangsmomenten und kleinen Abständen der Monomere beobachtet. Der Klammerterm ist bei J-Aggregaten gleich -2, bei H-Aggregaten gleich 1. Bei gleichem Übergangsmoment und Monomerabstand ist die Bandbreite des J-Aggregats deshalb doppelt so groß wie die eines H-Aggregats. Bei einem Scherwinkel von $\vartheta = 54,7^\circ$ schneiden sich beide Bandkanten, es gibt bei diesem Winkel („magic angle“) folglich keine Aufspaltung des Anregungszustandes - unabhängig von Übergangsmoment und Monomerabstand.

2.3 Nichtlineare Wechselwirkung von Licht mit Molekülen und Aggregaten

Entsprechend der Gleichung 2.4 findet bei sehr hohen Feldstärken E und damit verbundenen hohen Intensitäten $I = \epsilon_0 c E^2$ zusätzlich zur linearen Polarisation der Materie auch eine nichtlineare Anregung statt.

Die im Folgenden beschriebenen nichtlinearen optischen Effekte beschränken sich auf die für diese Arbeit relevanten Fälle einer mit zwei Photonen angeregten Fluoreszenz (Two-Photons-Excited-Fluorescence, TPEF).

2.3.1 2-Photonen-Angeregte-Fluoreszenz (TPEF)

Eine TPEF kann stoffspezifisch schrittweise oder simultan mit zwei Photonen angeregt werden. Dabei ist keine Kohärenz zwischen den beiden Photonen notwendig, da die Anregung inelastisch über Absorption erfolgt. Eine graphische Gegenüberstellung der beiden TPEF-Arten ist in Abbildung 2.7 gegeben.

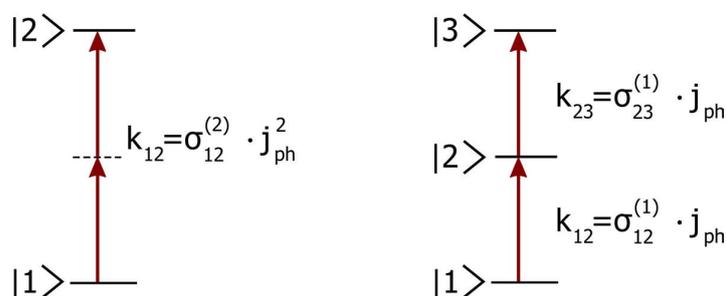


Abb. 2.7: Jablonski-Diagramme einer simultanen (links) und einer schrittweisen TPA (rechts). Lineare Absorptionsquerschnitte liegen bei $\sigma_{12}^{(1)} \approx 10^{-17} \text{ cm}^2$, die nichtlinearen Absorptionsquerschnitte für die simultane TPA, wie z.B. $\sigma_{12}^{(2)} \approx 10^{-50} \text{ cm}^4\text{s}$.

Mittels simultaner Anregung mit zwei Photonen kann jeder auch linear anregbare Zustand

bevölkert werden. Dabei muss die Summe der Quantenenergien beider Photonen die Resonanzbedingung des Übergangs nach Gleichung (2.6) erfüllen. Im Jablonski-Diagramm wird eine solche simultane 2-Photonenabsorption durch den Zwischenschritt über ein virtuelles Zwischenniveau modelliert (siehe Abbildung 2.7). Das virtuelle Niveau ist ein modelltechnisches Hilfsmittel und beschreibt den Fakt, dass die beiden beteiligten Photonen gleichzeitig mit dem Molekül wechselwirken müssen. Seine Lebensdauer entspricht deshalb ungefähr der Interaktionszeit des Moleküls mit einem Photon der Anregungswellenlänge. Über das Zeit-Bandbreite-Produkt [Die96]:

$$\Delta\nu\Delta t = c_0 \left(\frac{1}{\lambda_2} - \frac{1}{\lambda_1} \right) \Delta t = \frac{1}{2\pi} \quad (2.28)$$

mit der Vakuum-Lichtgeschwindigkeit c_0 lässt sich für Wellenlängen im VIS-Bereich die Photonentransit-Zeit (Interaktionszeit mit einem Molekül) mit $\Delta t \approx 10^{-15}$ s abschätzen. Der Wirkungsquerschnitt der simultanen 2-Photonenabsorption kann grob durch das Produkt aus dem Einphotonenwirkungsquerschnitt zum Quadrat mit der Lebensdauer des virtuellen Niveaus abgeschätzt werden. Da die Wirkungsquerschnitte der Einphotonabsorption bei ca. $\sigma_{12}^{(1)} \approx 10^{-17} - 10^{-16}$ cm² [Men07] liegen, ergeben sich für die Wirkungsquerschnitte der 2-Photonenabsorption Größenordnungen von $\sigma_{12}^{(1)} \approx 10^{-49} - 10^{-47}$ cm⁴s. Aus Gründen der Übersichtlichkeit und zu Ehren der Entdeckerin der 2-Photonenabsorption werden die 2-Photonen-Absorptionswirkungsquerschnitte in der Einheit Göppert-Mayer GM angegeben. Dabei gilt 1 GM = 10⁻⁵⁰ cm⁴s.

Die genaue Messung der simultanen 2-Photonenabsorptionswirkungsquerschnitte ist aufgrund der sehr kleinen Absorptionsraten schwer möglich. Die in der Literatur zu findenden Abweichungen liegen deshalb im Bereich von bis zu zwei Größenordnungen [Gar07]. Genauer können die simultanen 2-Photonenabsorptionsquerschnitte über die Messung der simultanen TPEF ermittelt werden. Nach [Xu96b] resultiert der Fluoreszenzphotonenfluss J_{TPEF} aus der räumlichen bzw. zeitlichen Verteilung ($\int_V \rho_P^2(\vec{r})dV$ bzw. $J_A(t)$) des Anregungslichts und seiner zeitlichen Kohärenz g . Weiter ist sie von den Quantenausbeuten der Fluoreszenz η_f und des Detektors η_d sowie von der Fluorophoranzahl N_V im angeregten Volumen und dem Absorptionsquerschnitt $\sigma_{12}^{(2)}$ abhängig.

$$J_F = \frac{1}{2} \cdot g \cdot \eta_d \cdot \eta_f \cdot \sigma_{mn}^{(2)} \cdot N_V J_A \int_V \rho_P^2(\vec{r})dV$$

Kann man den Fluoreszenz-Photonenstrom bezüglich dem eines Fluorophors mit bekanntem Wirkungsquerschnitt messen, ist der Absorptionsquerschnitt über eine einfache Verhältnisgleichung abschätzbar [Alb98]:

$$\sigma_{jk}^{(n)} = \frac{\eta_{ref} \cdot \sigma_{12,ref}(2) \cdot c_{ref}}{\eta \cdot c} \cdot \frac{j_{ref}^2}{j^2} \cdot \frac{j_{TPEF}}{j_{TPEF,ref}} \quad (2.29)$$

Dabei resultieren die messbaren TPEF-Photonenflussdichten j_{TPEF} bzw. $j_{TPEF,ref}$ des Farbstoffes mit bekanntem bzw. unbekanntem Absorptionswirkungsquerschnitt aus der jeweils verwendeten Flussdichte des Anregungslichts j . Weitere Größen sind die Fluoreszenzquantenausbeute η_f , die Fluorophorkonzentration c , jeweils für den Referenzfarbstoff (Index_{ref}) bzw. den Farbstoff mit unbekanntem Absorptionswirkungsquerschnitt.

Mit dieser Gleichung können Absorptionswirkungsquerschnitte aller Anregungsprozesse abgeschätzt werden, die die gleiche, quadratische Abhängigkeit von der anregenden Photonenstromdichte besitzen. Es ist also auch möglich, den resultierenden Absorptionsquerschnitt von schrittweisen oder Mischungen aus schrittweisen und simultanen 2-Photonen-Anregungen zu berechnen.

Im Gegensatz zur simultanen TPEF findet eine schrittweisen TPEF statt, wenn ein reales Zwischenniveau (Anregungszustand) existiert, welches durch die Grundzustandsabsorption bevölkert wird. Aus diesem erfolgt über die Absorption eines zweiten Photons (Anregungszustandsabsorption) der Übergang in einen höheren Anregungszustand, welcher strahlend relaxiert (Fluoreszenz).

Die Effizienz für den schrittweisen Anregungsprozess kann dabei analog zur simultanen 2-Photonen-Absorption aus den linearen Wirkungsquerschnitten der Grund- und Anregungszustandsabsorption $\sigma_{12}^{(1)}$ und $\sigma_{23}^{(1)}$ und der Lebensdauer des Zwischenniveaus abgeschätzt werden. Bei Annahme langlebiger Zwischenzustände mit Lebensdauern im ns-Bereich, liegt der resultierende Querschnitt damit bei $\sigma_{mn}^{(1)} \approx 10^{-41} \text{ cm}^4\text{s} - 10^{-43} \text{ cm}^4\text{s}$. Bezüglich der simultanen TPEF ergibt sich damit bei gleichen Anregungsintensitäten eine um den Faktor $10^7 - 10^9$ höhere Anregungseffizienz. Allerdings sinkt dieser Faktor proportional mit der Lebensdauer des Zwischenzustands.

Mit Hilfe des Ratengleichungssystems für die simultane bzw. schrittweise TPEF können die zu erwartenden Fluoreszenzsignalgrößen verglichen werden. Dabei errechnet man die zu erwartenden Besetzungsdichten der Fluoreszenzniveaus, aus denen man über die Fluoreszenzquantenausbeute den Photonenfluss der TPEF ableiten kann.

Wenn man von einer auf 1 normierten Gesamtbesetzungsdichte ($n_1 + n_2 + n_3 = 1$) sowie von einer geringen Besetzung der Anregungszustände zum Startzeitpunkt der Anregung ($n_1 \approx 1$) ausgeht, dann lautet die Ratengleichung für die Bevölkerung des Anregungszustandes n_2 bei einer simultanen 2-Photonenabsorption:

$$\begin{aligned} \frac{\delta n_2}{\delta t} &= k_{12} n_1 \\ &= j^2 \sigma_{12}^{(2)} \cdot 1 \end{aligned}$$

Geht man von einem zeitlich gaußförmigen Anregungspuls mit der Halbwertsbreite Δt_{FWHM} aus, folgt daraus:

$$\frac{\delta n_2}{\delta t} = j_{max}^2 \cdot e^{\frac{-4 \ln(2) \cdot t^2}{\Delta t_{FWHM}^2}} \sigma_{12}^{(2)}$$

Dabei ist j_{max} das Photonenflussdichtemaximum des Anregungspulses. Aus der Annahme, dass die Relaxationsdauer viel größer als die Anregungspulsdauer ist, folgt, dass der aufintegrierte Anregungspuls die Zustandsdichte des Anregungszustands bestimmt:

$$n_2 = j_{max}^2 \cdot \sigma_{12}^{(2)} \int_{-\infty}^{\infty} e^{\frac{-4 \ln(2) \cdot t^2}{\Delta t_{FWHM}^2}} dt$$

Nach Ausführung des bestimmten Integrals ergibt sich die mit einem Puls erzielbare Besetzung

des Anregungszustandes n_2 :

$$n_2 = \sqrt{\frac{\pi}{4 \ln(2)}} \cdot \sigma_{12}^{(2)} \cdot \Delta t_{FWHM} \cdot j_{max}^2 \quad (2.30)$$

Für den schrittweisen TPA-Prozess gibt es ein zusätzliches Niveau zu beachten. Geht man davon aus, dass die Lebensdauern der Anregungszustände im Vergleich zur Anregungspulsdauer lang sind, kann man die Anregung wie folgt modellieren:

$$\begin{aligned} \frac{\delta n_2}{\delta t} &= j(t) \sigma_{12}^{(1)} \cdot n_1 \\ \frac{\delta n_2}{\delta t} &= j_{max} \cdot e^{\frac{-4 \ln(2) \cdot t^2}{\Delta t_{FWHM}^2}} \cdot \sigma_{12}^{(1)} \cdot 1 \end{aligned}$$

Durch Integration über t erhält man für die Besetzungsdichte des Zwischenniveaus:

$$n_2 = \sqrt{\frac{\pi}{4 \ln(2)}} \cdot \sigma_{12}^{(1)} \cdot \Delta t_{FWHM} \cdot j_{max}$$

Für die Übergangsrate in den finalen Anregungszustand erhält man:

$$\begin{aligned} \frac{\delta n_3}{\delta t} &= j(t) \sigma_{12}^{(1)} \cdot n_2 \\ \frac{\delta n_3}{\delta t} &= j_{max} \cdot e^{\frac{-4 \ln(2) \cdot t^2}{\Delta t_{FWHM}^2}} \cdot \sigma_{12}^{(1)} \cdot n_2 \end{aligned}$$

Durch Einsetzen von n_2 und Integration über die Zeit t erhält man für n_3 :

$$n_3 = \frac{\pi}{4 \ln(2)} \cdot \sigma_{12}^{(1)} \cdot \sigma_{23}^{(1)} \cdot \Delta t_{FWHM}^2 \cdot j_{max}^2 \quad (2.31)$$

Wird die Besetzungsdichte für den simultanen Anregungsfall nach Gleichung (2.30) mit der für den schrittweisen Anregungsfall nach Gleichung (2.31) verglichen, kann festgestellt werden, dass sie sich durch den Gesamtwirkungsquerschnitt, aber auch durch eine Zeitabhängigkeit unterscheiden. Diese Unterschiede können verwendet werden, um aufzuklären, ob die z.B. beim Eumelanin beobachtete TPEF durch eine schrittweise oder simultane 2-Photonenabsorption angeregt wird.

3 Morphologie des Eumelanins

3.1 Derzeitiger Erkenntnisstand zur Synthese und Struktur von Eumelanin

Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist die molekulare Struktur von Eumelanin bis heute unbekannt. Sicher ist nur, dass es aus Indolderivaten besteht. Ausgehend vom Raper-Mason-Schema der Melanogenese hat sich allgemein die Überzeugung durchgesetzt, dass die in Abb.3.1 gezeigten Derivate 5,6-Dihydroxyindol (Dihydroxyindole, DHI) und die entsprechende Carboxylsäure 5,6-Dihydroxyindol-2-Carboxylsäure (Dihydroxyindolecarboxylic acid, DHICA) bzw. die ketonischen Formen 5,6-Indolchinon (Indolequinone, IQ) und 5,6-Indolchinon-2-Carboxylsäure (Indolequinonecarboxylic acid, IQCA) die repräsentativen Elementarbausteine des Eumelanins darstellen (siehe [Pro92, Ril97, Mer06]).

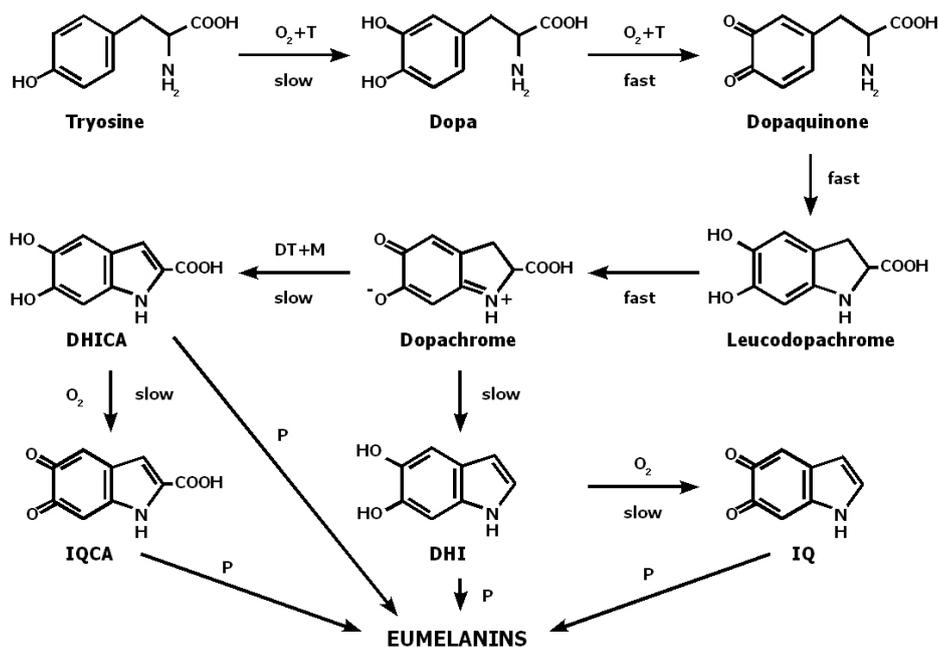


Abb. 3.1: Raper-Mason-Schema der Genese von Eumelanin aus vier Indolderivaten DHICA; IQCA ; DHI und IQ. Als Vorläuferstoffe treten auf DOPA (3,4-Dihydroxyphenylalanine), DQ (Dopaquinone), LD (Leucodopachrome) und D (Dopachrome). Als Katalysatoren treten auf T (Trypsinase), DT (Dopachrom Tautomerase), M (Metal Ions) und P (Peroxidase/H₂O₂).

Allerdings wird vermutet, dass sich diese Verbindungen während der Polymerisation zu Eumelanin noch verändern und Tautomere bilden (z.B. in [Mer06]). Als Tautomere werden chemische Verbindungen gleicher Summenformel (Isomere) bezeichnet, die durch Wanderung von Atomen

oder Atomgruppen schnell in einander übergehen, das heißt in dem die Isomere in einem schnellen chemischen Gleichgewicht zueinander stehen. Einige Veröffentlichungen beschäftigen sich mit Messungen bzw. Berechnungen der energetischen Systeme der Indolderivate bzw. ihrer Tautomere. Da allerdings die Absorptionen all dieser Monomere schmalbandig sind und im UV liegen (siehe [Il'03]), kann die kontinuierliche Absorption (im VIS) des Eumelanins nicht durch die Überlagerung spektral nebeneinander liegender Absorptionsbanden einzelner Monomere erklärt werden. Allerdings wurde durch die Berechnungen festgestellt, dass die ketonischen Formen gegenüber den alkoholischen eine starke Rotverschiebung in der Absorption aufweisen [Tra06, Mer06]. Das heißt, es wird vermutet, dass IQ und IQCA „farbig“ sind (Absorptionsbande im sichtbaren Spektralbereich), während DHI und DHICA „farblos“ erscheinen (Absorptionsbande im UV-Bereich). So sind in weiteren Veröffentlichungen [Pow05, Pow04] Absorptionsübergänge (HOMO-LUMO-Gaps) von DHI mit $E_{ph} = 3,61$ eV ($\lambda = 343$ nm) und IQ mit $E_{ph} = 2,02$ eV ($\lambda = 613$ nm) berechnet worden. Dies impliziert, dass während der Polymerisation zu Eumelanin wahrscheinlich oxidierte, ketonische Formen von DHI bzw. DHICA gebildet werden, die zu einer Verbreiterung des Absorptionsspektrums in den langwelligen Spektralbereich hinein führen. In den genannten Veröffentlichungen wurden jedoch keinerlei Messungen der Absorptionsspektren der Monomere durchgeführt, da alle Verbindungen (bis auf DHICA) in Reinform hoch reaktiv sind und automatisch polymerisieren.

Um die beobachtete kontinuierliche Absorption im visuellen Bereich zu erklären, reicht jedoch eine Rotverschiebung der Absorptionsbande nicht aus. Vielmehr wird vermutet, dass die Makrostruktur des Eumelanins die spektralen Eigenschaften entscheidend beeinflusst. Dabei werden zwei unterschiedliche Strukturmodelle diskutiert (siehe auch [Pow05]).

Das ältere Modell von Swan [Swa74] geht von einem großen und heterogenen Polymerknäuel mit unterschiedlich langen und untereinander verbundenen durchkonjugierten π -Systemen und funktionellen Gruppen aus, welches durch diese „chemische Unordnung“ (chemical disorder) eine dementsprechende Vielzahl unterschiedlichster Anregungszustände aufweist und darüber die kontinuierliche Absorption erklären kann.

Seit den ersten Rastertunnelmikroskop-Bildern von Eumelanin steht dem Polymer-Modell ein Aggregat-Modell [Zaj94] gegenüber, welches sich als Stapel aus einigen kleineren, hochgradig durchkonjugierten Oligomer-Schichten darstellt (siehe Abbildung 3.2b).

Dieses Modell kann das kontinuierliche Absorptionsspektrum durch Verbreiterung des Monomerspektrums durch chemical disorder und Exzitonenbildung erklären. Da die einzelnen Oligomerschichten im Aggregatmodell nicht weiter als $3 \text{ \AA} - 4 \text{ \AA}$ voneinander entfernt sind, ist auch ein Energietransfer zwischen den Oligomerschichten denkbar.

Die aktuelle Diskussion [Sar92, Mer06, NR07b] favorisiert momentan das Aggregat-Modell von homogenen DHI-oder DHICA-Oligomeren, wobei das ältere Strukturmodell eines heterogenen Polymers (Swan) nicht widerlegt wurde bzw. als planare Form in den Oligomerschichten des Aggregatmodells enthalten ist ([Sar92, Mer06]).

In den neuesten, theoretischen Veröffentlichungen von Meng [Men08] wird außerdem eine porphyrinartige Ringstruktur in den Oligomerschichten vermutet (siehe auch Bild 4.17)

In Anbetracht des derzeit favorisierten Aggregat-Modells wird im Folgenden das Eumelanin als Aggregat bezeichnet.

Natürliches Eumelanin kann aus biologischen Proben extrahiert werden. Der am häufigsten untersuchte Vertreter ist das Sepia, welches aus der Tinte des Oktopus gewonnen wird.

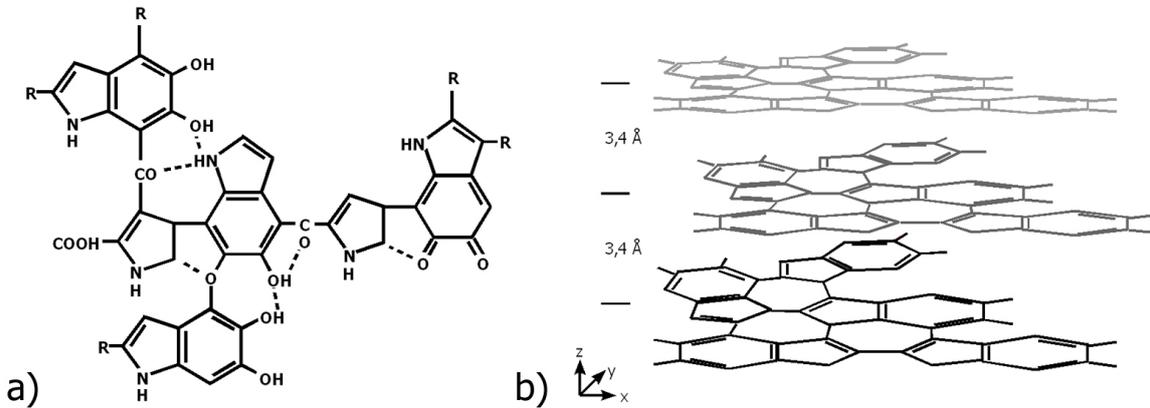


Abb. 3.2: Darstellung der Modelle für die makromolekulare Struktur des Eumelanins a) heterogenes Polymermodell nach Swan [Swa74]; b) Aggregatmodell nach Zajac [Zaj94]

Diese Form des Eumelanins liegt in festem Zustand in Form von Granulen (Kügelchen) vor. Bezüglich der Frage, ob diese auch in Lösung bestehen oder ob diese Eumelanin-Variante sich während des Trocknungsprozesses selbstorganisiert, gibt es unterschiedliche Ansichten. Während Clancy in [Cla00] schreibt, dass in Sepia-Lösungen keinerlei sichtbare Granulen existieren und diese somit erst während des Trocknens durch Selbstorganisation entstehen, spricht Liu in [Liu03a] von beobachteten zerstörten Granulen, die sich *in vitro* nicht wieder zusammenfügen. Festzuhalten bleibt, dass es mit Sepia evtl. eine selbstorganisierende Art des Eumelanins gibt.

Die Synthese von Eumelanin wird entweder durch eine enzymatische Reaktion von DOPA mit Trypsinase oder, wie im Falle des in dieser Arbeit verwendeten Eumelanins, durch direkte Oxidation mit Wasserstoffperoxid erreicht (siehe Abbildung 3.3).

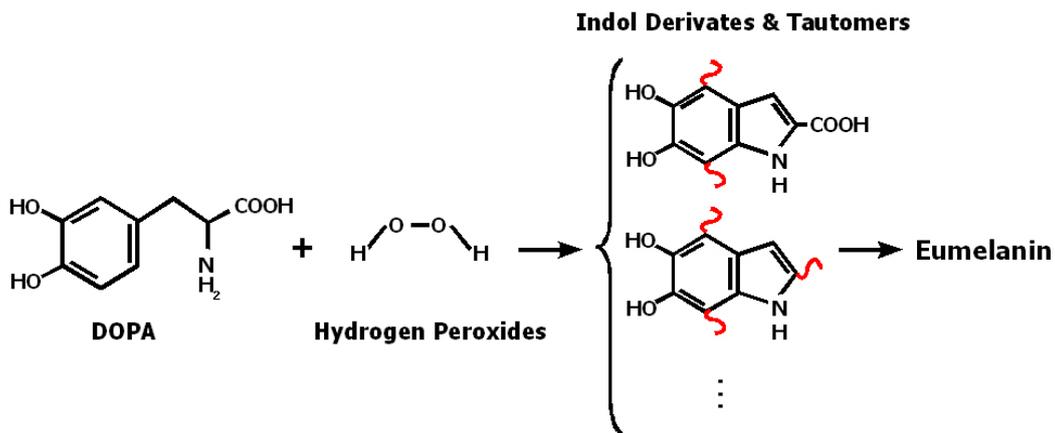


Abb. 3.3: Darstellung des synthetischen Eumelanins durch Oxidation von DOPA durch Wasserstoffperoxid. Die roten Schlingellinien der Derivate kennzeichnen die Bindestellen bei einer Polymerisation.

Aber nicht nur die Struktur des Eumelanin-Aggregats ist bis heute nicht endgültig geklärt. Auch

die mittlere Molekülgröße bzw. die Größenverteilung werden seit 1992 diskutiert. Untersuchungen zu synthetischem Eumelanin gibt es mittels Streu-Experimenten (Licht, Röntgen, Neutronen) und per Rastertunnelmikroskop (STM). Die Resultate aus verschiedenen Messverfahren weichen dabei stark voneinander ab. So lassen sich in der Literatur Werte für die mittlere Partikelgrößen finden, die von 50 Å bis zu 10 µm reichen und damit über vier Größenordnungen (siehe Tabelle 3.1).

Quelle	Messmethode	mittlere Aggregatsgröße
Huang et al. [Hua89]	Lichtstreuung	≈ 4 Å – 150 nm
Zajac et al. [Zaj94]	Rastertunnelmikroskopie (STM)	≈ 20 Å breit; ≈ 10 Å hoch
Riesz et al. [Zaj94]	Lichtstreuung (Rayleigh)	≈ 40 nm
Koeberle et al. [Koe03]	PIDS (Polarization Intensity Differential Scattering)	≈ 1 µm (synth.Eumelanin); ≈ 10 µm (Sepia)

Tab. 3.1: Übersicht über Angaben zur mittleren Partikelgröße des Eumelanins aus der aktuellen Literatur

3.2 Bestimmen der Massenverteilung und mittleren Aggregatgröße des synthetischen Eumelanins mittels Ultrafiltration (UF)

Um Aussagen über die Teilchenkonzentration und damit über Wirkungsquerschnitte und Quantausbeuten zu treffen, ist die Bestimmung der Teilchengröße von elementarer Wichtigkeit. Da die Literaturdaten über die mittlere Größe bzw. Massenverteilung von synthetischem Eumelanin in Lösung stark variieren, wurde entschieden, eine Separation von Aggregatsgrößen durch eine Ultrafiltrationsreihe vorzunehmen. (Vorversuche mit einem 30kD-Filter hatten gezeigt, dass eine Fraktionierung mit Ultrafiltern möglich ist.) Mit Hilfe von Absorptionsmessungen an diesen Fraktionen sollte eine Größenverteilung abgeschätzt und mittels Feldflussfraktionierung als Referenzmessverfahren verifiziert werden.

3.2.1 Ultrafiltration

Als Ausgangsprobe wurden 45,0 mg synthetisches Eumelanin in 7 ml (0,1M)NaOH-Lösung gelöst. Dazu wurde zuerst die NaOH-Lösung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und das Eumelanin mittels Spatel hinzugefügt. Anschließend wurde das Gemisch im Ultraschallbad ($t = 3$ min) in eine homogene Lösung überführt.

Als Filter wurden Amicon-UltraFilter von Millipore mit Cut-Off Größen von 3kD; 10kD; 30kD; 50kD; 100kD und 300kD verwendet. Das kD steht hierbei für KiloDalton, wobei ein Dalton der Masseneinheit einer Unit entspricht ($1 \text{ kD} = 1 \text{ u}$). Die Cut-Off-Grenzen sind jedoch laut Millipore unscharf (Fehler $\begin{smallmatrix} +40\% \\ -20\% \end{smallmatrix}$). Die Molekül/Aggregat-Größe kann dabei laut Millipore

nach den in Tabelle 3.2 aufgelisteten Werten aus der Aggregatsmasse (molecular weight, MW) abgeschätzt werden.

MW / kD	1 – 3	3 – 10	10 – 30	30 – 50	50 – 100	100 – 300
D_{Agg} / nm	0,7 – 1,7	1,7 – 4	4 – 6	6 – 9	9 – 19	19 – 27

Tab. 3.2: Umrechnungstabelle zwischen den angegebenen Aggregatsmassen (MW) und der entsprechenden Aggregatsdurchmesser (D_{Agg})

Die verwendeten Filter wurden vor der Filtration drei Mal mit aqua dest. zentrifugiert, um die Paraffin-Versiegelung der Filter sicher zu entfernen. Die Ausgangslösung wurde stufenweise von groß- zu kleinporigen Filtern hin abfiltriert. Dabei wurde bei jeder Filterstufe, der in Abbildung 3.4 gezeigte Ablauf vollzogen, um die jeweilige Größenfraktion vollständig zu filtern. Die jeweiligen Rückstände in den Filterstufen wurden vorsichtig abpipettiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß abgefüllt.

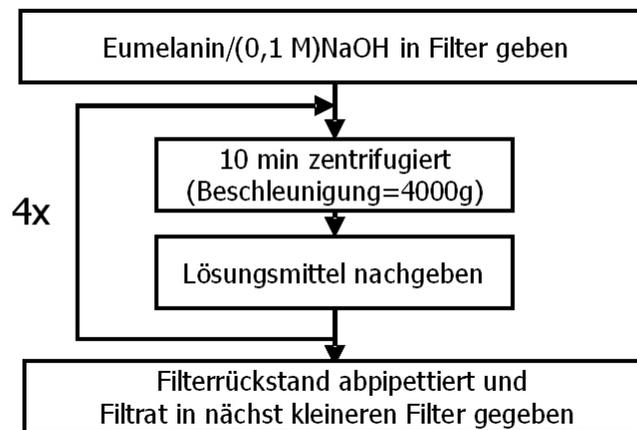


Abb. 3.4: Ablauf einer Filtrationsstufe

Um die Absorptionsspektren der zu untersuchenden Lösungen zu bestimmen, wurden diese in Küvetten mit Schichtdicken von 1 mm gefüllt. Diese wurden vor der Verwendung jeweils zwei Mal mit aqua dest. und einmal mit Ethanol gespült und mit Stickstoff ausgeblasen. Da die späteren Lösungen während der Filtration durch Zugabe von (0,1M)NaOH einen viel höheren Anteil an Lösungsmittel enthielten, wurden alle Filtratlösungen auf das gleiche Lösungsmittelvolumen gebracht. Anschließend wurden ihre Absorptionsspektren wie in Abschnitt 4.1.1 vermessen.

3.2.2 Per Absorptionsanteil abgeschätzte Massenverteilung der Aggregate und mittlere Aggregatsmasse der Absorption von Eumelanin

Für die auf gleiches Lösungsmittelvolumen gebrachten Eumelanin-Lösungen, ergaben sich die in Abbildung 3.5 links gezeigten Absorptionsspektren.

Zur Überprüfung der Vollständigkeit der gewonnenen Fraktionen wurde die Linearkombination der in Abbildung 3.5 rechts gezeigten Absorptionsspektren aller - auf das gleiche Lösungsmittelvolumen gebrachten- Fraktionen gebildet und mit dem Absorptionsspektrum einer unfraktionierten Lösung verglichen. Dabei war es notwendig, das linarkombinierte Kontrollspektrum

um den Normierungsfaktor k zu ergänzen, der den Unterschied der Eumelanin-Konzentration zur unfraktionierten Lösung berücksichtigt.

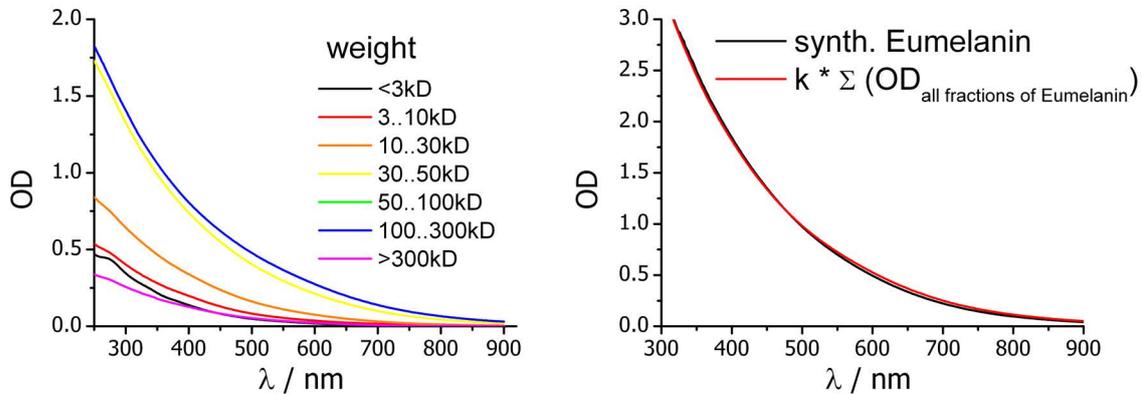


Abb. 3.5: Absorptionsspektren der einzelnen im gleichen Lösungsmittelvolumen gelösten Eumelanin-Fractionen (links) und Vergleich des Summenspektrums der einzelnen Fractionen mit dem Spektrum der Ausgangslösung (rechts)

Bei dem Vergleich beider Spektren konnte eine gute Übereinstimmung beider Spektren festgestellt werden. Dadurch ist die Vollständigkeit der ermittelten Fractionen und der in Abschnitt 3.3.2 abgeleiteten Größenverteilung der Eumelanin-Aggregate verifiziert. Die geringen Abweichungen zwischen dem Absorptionsspektrum der Ausgangslösung und dem Kontrollspektrum sind wahrscheinlich auf kleine Eumelanin-Rückstände in den Filtern zurückzuführen, die trotz Nachspülens mit Lösungsmittel nicht herausgelöst werden konnten und die somit nicht zur Absorptionsamplitude der jeweiligen Größenfraction beitragen können.

Aus den Flächen unter den Spektren ergab sich, dass die Fractionen mit Aggregatmassen von $MW = 3 \text{ kD} - 50 \text{ kD}$ ($D_{Agg} \approx 1,7 \text{ nm} - 9 \text{ nm}$) ca. die Hälfte der Gesamtabsorption ausmachen. Die Fractionen $MW = 3 \text{ kD} - 10 \text{ kD}$ ($D_{Agg} \approx 1,7 \text{ nm} - 4 \text{ nm}$) bildet einen Anteil von ca. 25 % an der Gesamtabsorption. Diese Aussage unterscheidet sich von Beiträgen zu Sepia. Liu et al. [Nof99] berichtet, dass Aggregate einer Masse $MW < 10 \text{ kD}$ nur 1 % zur gesamten Absorption beisteuern. Die Vermutung liegt nahe, dass Sepia deutlich größere Aggregate ausbildet als synthetisches Eumelanin. Wichtig bleibt jedoch die Feststellung, dass ein Photon im Mittel von einem Aggregat der Masse $MW = 50 \text{ kD}$ ($D_{Agg} \approx 9 \text{ nm}$) aufgenommen wird. Diese Masse repräsentiert somit die mittlere Aggregatmasse bei der Abschätzung des TPE-Wirkungsquerschnittes und wird im Weiteren als mittlere Aggregatsgröße der Absorption bezeichnet.

Im Vergleich mit der Literatur können Übereinstimmungen mit Clancy [Cla00] gefunden werden, der aus AFM-Phasenbildern auf Unterstrukturen der Sepia-Granulen in einem Größenbereich von $D_{Agg} = 10 \text{ nm} - 25 \text{ nm}$ schloss. Ein ähnlicher Wert für die mittlere Aggregatsgröße wurde von Riesz [Rie06] ermittelt. Dabei wurde aus der gemessenen wellenlängenabhängigen Streuung einer Eumelaninlösung über die Gleichung 4.2 für die Rayleigh-Streuung ein etwas größerer Aggregatsdurchmesser von $D_{Agg} = 38 \text{ nm}$ bestimmt.

Um aus den erhaltenen größenfraktionierten Eumelanin-Lösungen eine Massenverteilung abzuleiten, wurde auf das Modell eines Elementarabsorbers zurückgegriffen. Dabei wird davon ausgegangen, dass es eine charakteristische minimale Aggregatsgröße gibt, die erstmals das

eumelanintypische Absorptionsspektrum mit einer bestimmten Oszillatorstärke aufweist. Die größeren Eumelanin-Aggregate stellen sich dabei als Konglomerate mehrerer Elementarabsorber dar, deren Oszillatorstärke sich proportional zur Anzahl der von ihnen beinhalteten Elementarabsorbern verhält. Die Anzahl der enthaltenen Elementarabsorber ergibt sich aus dem Verhältnis der betrachteten Aggregatsmasse zur Masse des Elementarabsorbers. Dabei ist die Oszillatorstärke laut Formel 2.13 proportional zur spektral aufintegrierten Extinktion. Es ist somit möglich, über das Verhältnis der aufintegrierten Extinktion der einzelnen Fraktionen zur integrierten Extinktion des unfraktionierten Eumelanins eine relative Verteilung der Aggregatsmassen in der Ausgangslösung abzuschätzen.

Da auch die leichtesten (kleinsten) Fraktionen das charakteristische Absorptionsspektrum aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass der Elementarabsorber kleiner des kleinsten verwendeten Cut-Offs von 3 kD ist.

Wenn davon ausgegangen wird, dass der Elementarabsorber ca. 1 kD groß ist und außerdem die unterschiedlichen Größen der Filterintervalle berücksichtigt werden, können aus den Anteilen an der Gesamtabsorption Stützstellen für eine Massenverteilung nach folgender Formel abgeschätzt werden:

$$\langle n_f \rangle = \frac{A_f}{(f_{OG} - f_{UG}) \cdot \langle f_g \rangle} \quad (3.1)$$

Dabei steht $\langle n_f \rangle$ für die mittlere Teilchenanzahl pro kD des jeweiligen Filterintervalls, A_f für den Anteil der Absorption einer Molekül-Größenfraktion an der Gesamtabsorption, $f_{OG/UG}$ für untere bzw. obere Cut-Off-Grenze des Filterintervalls (berücksichtigt die unterschiedlich großen Filterintervalle) und $\langle f_g \rangle$ für den Mittelwert der Partikelgrößen des jeweiligen Filtrats.

Die auf diese Weise abgeschätzte Größenverteilung ist in Abbildung 3.6 rechts dargestellt. Demnach liegt im Gegensatz zur mittlere Aggregatsgröße der Absorption (Anteil an der Gesamttextinktion) die überwiegende Mehrzahl der Eumelanin-Teilchen als kleine Aggregate mit Massen $MW < 3$ kD vor.

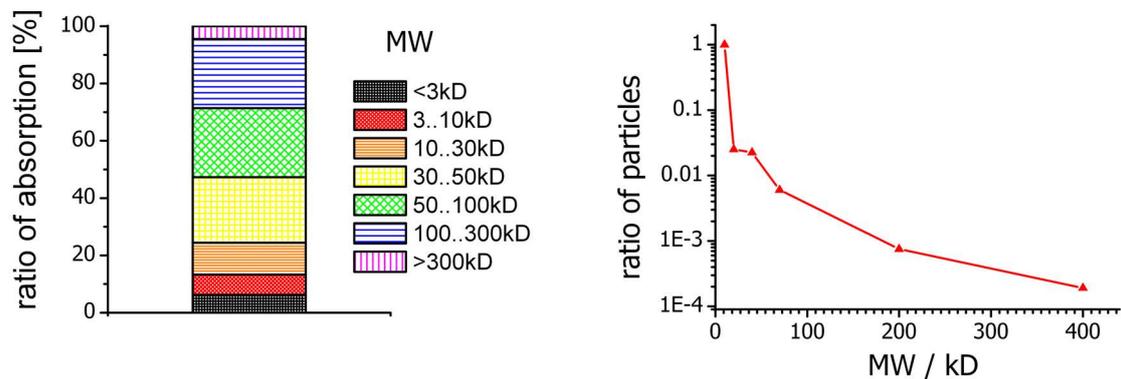


Abb. 3.6: Anteile der jeweiligen Größenfraktionen an der Gesamtabsorption (links) und die aus diesen Anteilen abgeschätzte Massenverteilung der Aggregate der untersuchten Lösung von synthetischen Eumelanins/(0,1M)NaOH (rechts)

3.3 Bestimmen der Massenverteilung durch eine Feldflussfraktionierung (FFF)

Da die Bestimmung der mittleren Aggregatsgröße bzw. der Aggregatsmassenverteilung mittels Ultrafiltration und Absorptionsmessung auf die Annahme eines Elementarabsorbers begründet war, wurde ein Referenzmessverfahren hinzugezogen, um die ermittelten Ergebnisse zu verifizieren. Dabei fiel die Wahl auf die Asymmetrische-Fluss-Feldflussfraktionierung (AF-FFF).

3.3.1 Feldflußfraktionierungssystem

Die Asymmetrische-Fluss-Feldflussfraktionierung (AF-FFF) ähnelt im Aufbau chromatographischen Verfahren, nur dass statt einer Säule ein Trennkanal verwendet wird (siehe Abbildung 3.7). Das trennende System besteht aus einem länglich-flachen Kanal (1 cm – 2 cm breit aber nur 100 μm – 500 μm hoch), welcher von Eluent (Flussmittel) und darin gelöster Probe durchströmt wird. Die obere Kanalabdeckplatte ist undurchlässig, während die untere permeabel ist und meist aus porösem Material besteht. Bedeckt wird die untere Platte meist durch Ultrafiltrationsmembran mit einer typischen Cut-Off-Grenze von 10 kD (Ansammlungswand), um einen Verlust von Partikeln der Probe zu verhindern. Partikel, die kleiner als die Cut-Off-Grenze sind, können nicht im System gehalten, das heißt auch nicht per FFF vermessen werden.

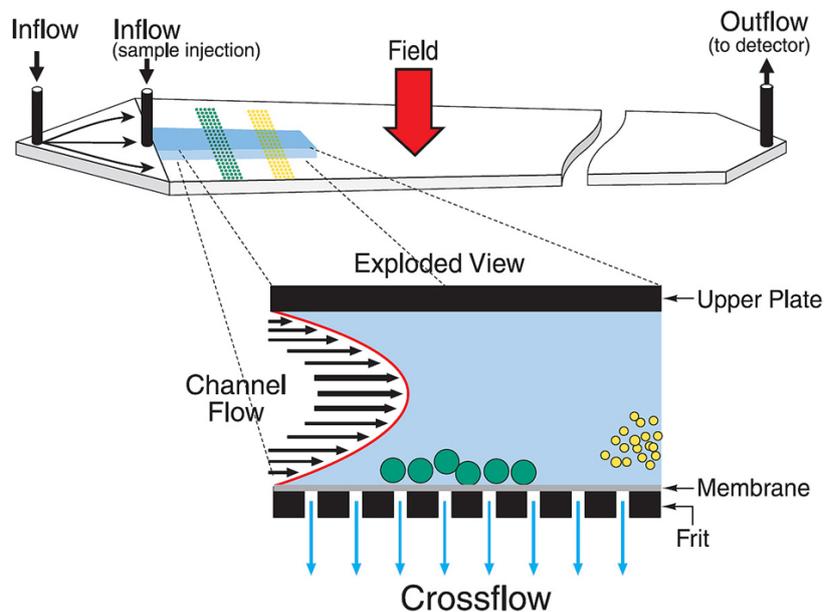


Abb. 3.7: Schematische Darstellung des Trennkanals nach [Cor05]. Die kleinen (gelb) und größeren (grün) Partikel der Probe werden innerhalb des Trennkanals durch eine Querströmung unterschiedlich stark in Richtung Kanalrand bewegt. Da die Hauptströmung (laminar) zu den Kanalrändern abfällt, werden die Partikelgrößen über Geschwindigkeitsunterschiede entlang des Trennkanals separiert. Die Querströmung wird im dargestellten Fall nur durch den zusätzlichen Abfluss durch die Membran erzeugt.

Der Hauptstrom von Eluent und Probe bildet aufgrund der laminaren Strömung ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil aus, das heißt, er bewegt sich an den den Strom begrenzenden

Seitenflächen langsamer als in der Mitte des Kanals.

Senkrecht zu diesem Strom wird nun ein zweites Strömungsfeld (in der Abbildung als „Field“ deklariert) angelegt, das heißt, der Eluent fließt auch quer zur Hauptstromrichtung durch die Ultrafiltrationsmembran. Die Diffusion aufgrund der Brownschen Molekularbewegung sorgt für eine Gegenkraft und -bewegung. Größere Partikel bieten dem Querfeld eine größere Angriffsfläche als kleinere und besitzen auch eine geringere Diffusionsrate. Daher erlangen kleinere Partikel tendenziell eine zentralere Gleichgewichtsposition, wo die Strömungsgeschwindigkeit des Hauptflusses höher ist. Über die Kanallänge separieren sich die Partikel also auch in longitudinaler Richtung, wobei die kleineren Partikel zuerst eluieren. Der so fraktionierte Probenstrom wird anschließend durch zwei optische Sensoren geführt. Im ersten Sensor wird mittels optischer Messung des Brechzahlgradientens der Probenlösung eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Der zweite Sensor führt mittels HeNe-Laserstrahlung und neun kreisförmig um den Probenstrom angeordneten Lichtsensoren eine Partikelgrößenbestimmung über eine Streulichtmessung durch. Das Ergebnis ist ein Plot, der die Partikelkonzentration über die Partikelmasse aufträgt und aus dem die Massenverteilung der Partikel ermittelt werden kann.

Die hier vorgestellte Messung wurde mit einem Gerät der Firma Wyatt durchgeführt. Da das synthetische Eumelanin sich nicht direkt im Eluenten löste, wurde eine Eluenten-NaOH-Lösung verwendet. Diese bestand aus einem Teil (1M)NaOH-Lösung und 20 Teilen Eluenten. Der Eluent selbst besteht aus einer abfiltrierten (0,1M)NaNO₃-Lösung mit 0,05 Gewichtsprozent NaNO₃.

3.3.2 Per Feldflußfraktionierung ermittelte Massenverteilung der Aggregate und Vergleich mit der per Absorptionsanteil abgeschätzten Massenverteilung

Der sich ergebende Messplot ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Auch hier zeigt sich auf den ersten Blick ein Konzentrationsmaximum von Aggregaten mit kleiner Masse. Weiterhin

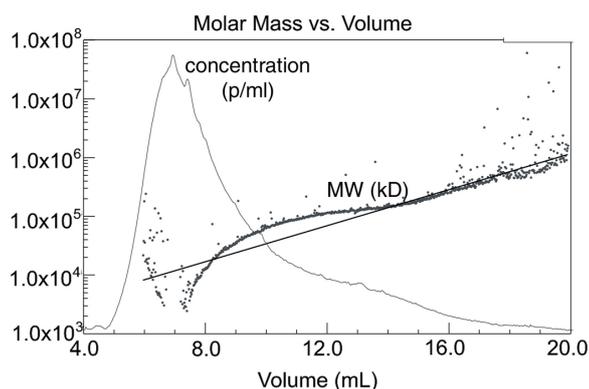


Abb. 3.8: Messausdruck des FFF-Geräts mit Verläufen der Partikel-Konzentration (durchgezogen) in Partikel pro Milliliter und der Partikelmasse in Dalton (Punkte). Die Skale der Ordinate gilt für beide Kurven. Aus diesem Diagramm kann also die Partikelkonzentration in Abhängigkeit von der Partikelgröße abgelesen werden.

sind der Einbruch in der Kurve der Aggregatsmasse und das gleichzeitige Maximum der

Konzentrationskurve bei einer approximierten Aggregatsmasse von $MW = 10$ kD auffällig. Diese Aggregatsmasse fällt leider mit der Cut-Off-Grenze der verwendeten Ansammlungswand zusammen. Aggregate kleinerer Masse konnten durch die FFF nicht erfasst werden und fehlen in der Massenverteilung.

Da die Massenverteilung aus Abbildung 3.8 schlecht ersichtlich ist, wurden die Daten der Aggregat-Konzentration mit den korrelierten Aggregatsmassen extrahiert und zusammen mit der mittels Ultrafiltration bestimmten Massenverteilung in einem Diagramm dargestellt (Abbildung 3.9). Für einen leichteren Vergleich wurden die ermittelten Massenverteilungen auf ihren jeweiligen Wert bei einer Partikelmasse von 10 kD normiert.

Im Vergleich von Ultrafiltration und FFF fällt auf, dass die durch die FFF gewonnene Massenverteilung einen ungefähr zehnmal höheren Anteil kleinerer Aggregate aufweist als die UF. Die Frage nach der Ursache für diese Abweichung kann nicht eindeutig beantwortet werden. Einerseits könnte das Modell des Elementarabsorbers unzureichend sein, da die Unterschiede der Massenverteilungen für überproportionales Anwachsen der Absorption mit der Teilchengröße sprechen könnten. Andererseits ist es wahrscheinlich, dass sich im Eluenten mehr kleinere, leichter lösliche Eumelanin-Aggregate gelöst haben, da die Polarität und damit die Wasserlöslichkeit des Eumelanins mit größer werdenden Aggregaten kleiner wird. Da aber auch die Berechnungsmethoden der Teilchengröße und -konzentration aus den Streulicht- und Brechzahlmessungen unzugänglich sind, liegen hier weitere eventuelle Fehlergrößen.

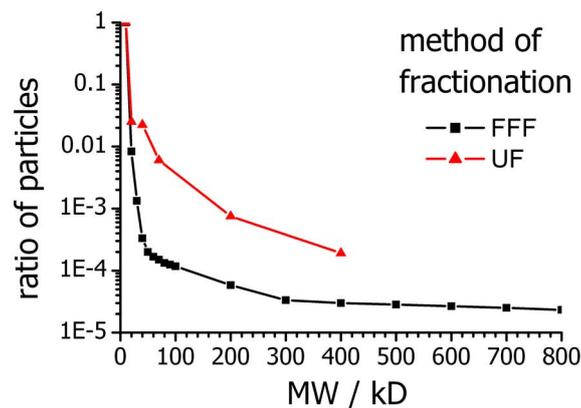


Abb. 3.9: Vergleich der durch Ultrafiltration bzw. Feldflussfraktionierung ermittelten, auf das Maximum normierten Massenverteilungen der Melanin-Aggregate

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sowohl die durch Ultrafiltration als auch durch die Feld-Fluss-Fraktionierung ermittelten Massenverteilungen ergeben, dass der Anteil von Aggregaten mit einer Masse kleiner 10 kD etwa 100-mal höher liegt als der von Aggregaten größerer Massen. Bei einer angenommenen mittleren Molekülmasse von $1 \text{ kD} = 1000 \text{ u} = 1,660 \cdot 10^{-21} \text{ g}$, enthält 1 g synthetisches Eumelanin ca. $6 \cdot 10^{20}$ Teilchen. Damit besitzt die meist verwendete Standardlösung mit 3,6 mg synth. Eumelanin auf 2000 μl (0,1M)NaOH eine Teilchenkonzentration von $2,16 \cdot 10^{20}$ Teilchen/l.

Der Unterschied in den massenabhängigen Absorptionsanteilen und der wahren Massenverteilung der Aggregate könnte auch Erklärungsansätze für die sehr großen Unterschiede zwischen den veröffentlichten Aggregatsgrößen liefern. Bei optischen Messungen des Streulichts [Rie06] liefern größere Aggregate ein höheres (leichter detektierbares) Signal, da diese das Licht viel

stärker streuen. So wächst der Wirkungsquerschnitt der Rayleigh-Streuung mit der 6. Potenz des Streuteilchen-Durchmessers (siehe Gleichung 4.2).

Mit rastermikroskopischen Verfahren (STM) hingegen [Zaj94] werden nur sehr kleine Gebiete mit hoher Ortsauflösung abgebildet. Es werden deshalb wahrscheinlich bevorzugt sehr kleine und dünne Aggregate gefunden, da große Strukturen nicht von Drift-Effekten unterschieden werden können bzw. ihre atomare Struktur durch Faltungen und Krümmungen schlecht bestimmt werden kann.

4 Modellierung der Anregungs- und Relaxationsprozesse sowie des energetischen Zustandssystems von synthetischem Eumelanin aus Ergebnissen linear-spektroskopischer Methoden

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, sind die aktuell in der Literatur zu findenden Daten zur linearen Spektroskopie am Eumelanin recht umfangreich, aber zum Teil widersprüchlich bzw. weisen Unterschiede auf (siehe z.B. OPEF-Spektren im Kap.4.3). Um einen konsistenten Datensatz zur Modellierung des Energietransfers innerhalb des Melanins zu erhalten, wurden die im Folgenden beschriebenen linear-spektroskopische Messungen an einer Lösung einer Charge von synthetischem Eumelanin in wässriger (0,1M)NaOH-Lösung durchgeführt.

Da in der Spektroskopie verschiedene Darstellungen der gemessenen Spektren möglich sind (z.B. Photonen über Wellenlänge oder Intensität über Photonenenergie), die zwar alle ineinander umwandelbar, jedoch schnell zu einer unübersichtlichen Form führen, werden für die in dieser Arbeit vorgestellten Spektren problemorientierte Darstellungen gewählt. Die Messung der optischen Spektren erfolgt immer über wellenlängenselektive Apparaturen. Daher werden in den Abschnitten, welche die Aufbereitung bzw. Fehlerdiskussion der Spektren beinhalten, immer Darstellungen bezüglich der Wellenlänge gewählt.

Für die Interpretation der spektralen Daten im Sinne eines energetischen Zustandsmodells ist jedoch der Zusammenhang mit den Quantenenergie der beteiligten Photonen interessant. Deshalb wurden die optischen Spektren für diese Diskussion bezüglich der Quantenenergie aufgetragen. Die Umrechnung der Spektren über der Wellenlänge $I(\lambda)$ in Spektren über die Photonenenergie $I(E_{ph})$ wurde über die Transformationsgleichung (4.1) durchgeführt, die sich aus dem Ansatz der Energieerhaltung herleitet.

$$\int I(E_{ph})dE_{ph} \stackrel{!}{=} \int I(\lambda)d\lambda$$
$$\text{mit } \frac{dE_{ph}}{d\lambda} = \frac{-h \cdot c_0}{\lambda^2}$$
$$\Rightarrow I(E_{ph}) = \frac{\lambda^2}{-h \cdot c_0} \cdot S(\lambda) \quad (4.1)$$

Dabei ist λ die Wellenlänge, E_{ph} die Photonenenergie, h das Plancksche Wirkungsquantum und c_0 die Vakuumlichtgeschwindigkeit. Letztere ist eine Näherung für die Lichtgeschwindigkeit im detektierten Medium, welches fast immer Luft ist und im Rahmen der vorliegenden Rechnung durch die Vakuumlichtgeschwindigkeit angenähert werden kann.

4.1 Absorption von nichtfraktioniertem Eumelanin

4.1.1 Absorptionsspektrometer und Probenpräparation

Als Probe wurde eine wie in Abschnitt 3.2.1 erstellte Eumelanin / (0,1M)NaOH-Lösung in eine Suprasil-Küvette der Schichtdicke $d = 1$ mm pipettiert.

Zur Bestimmung der Absorptionsspektren wurden das Absorptionsspektrometer Specord 40 der Firma AnalyticJena und ein Cary 5 der Firma Varian genutzt. Beide Spektrometer wurden im Ein-Strahl-Modus betrieben. Es wurde wie in Abschnitt 3.2.1 jeweils nacheinander eine Nullmessung ohne Küvette, sowie das pure Lösungsmittel und die Melanin-Lösung in Küvette gemessen. Die gewählte Integrationszeit lag bei $\Delta t = 0,5$ s, die spektrale Auflösung bei $\Delta\lambda = 2$ nm. Da die Absorptionsspektren von Melanin keinerlei Feinstruktur aufweisen und zeitlich stabil sind, waren diese Auflösungen im Zeit- und Wellenlängenbereich ausreichend.

4.1.2 Diskussion der gemessenen Absorptionsspektren und der Erklärungsansätze zur Entstehung der kontinuierlichen Absorption im VIS

Die Ergebnisse der Absorptionsmessungen (siehe Abbildung 4.1) entsprechen den in der Literatur zu findenden Absorptionsspektren (z.B.[Mer06, Teu00, Rie06]). Die Absorption fällt kontinuierlich (scheinbar asymptotisch) und ohne Substruktur von niedrigen zu hohen Wellenlängen ab. In Abhängigkeit von der Photonenenergie weist die Absorption einen fast linearen Verlauf auf.

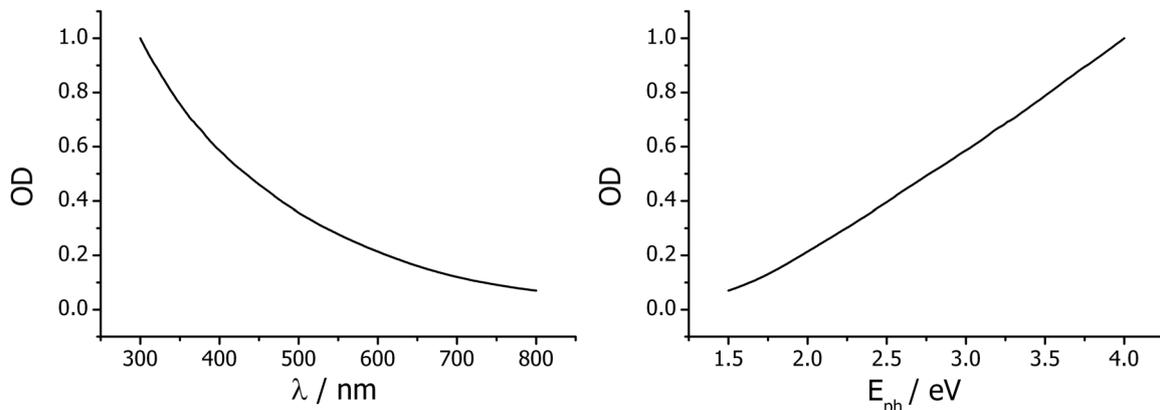


Abb. 4.1: Spektrum der Grundzustandsabsorption von synthetischem Eumelanin in (0,1M)NaOH über die Wellenlänge (links) und der Photonenenergie (rechts)

In einer Veröffentlichung von Meredith et al. [Mer06] ist die Vermutung geäußert worden, dass das Absorptionsspektrum wahrscheinlich aus vielen einander überlagernder Absorptionsbanden besteht. In dieser Veröffentlichung wurde - allerdings ohne weiterführendes Modell - ein gemessenes Absorptionsspektrum durch eine beliebige Anzahl von beliebig vereinzelt Gaußbanden gefittet. Dabei wurde ein exponentieller Abfall der Amplituden der Gaußbanden gewählt. Das wurde insoweit motiviert, als das aus Rechnungen bekannt war, dass Spezies (Eumelanin-Tautomere) mit rotverschobener Absorption eine geringere Oszillatorstärke besitzen [Il'98].

Ausgehend von den bekannten Strukturmodellen werden aktuell ein Zusammenspiel von „chemischer Unordnung“ (chemical disorder) und Aggregatbildung zur Begründung des beobachteten Absorptionskontinuums herangezogen (siehe auch Kapitel 3.1), wobei die Grundproblematik in der Erklärung der Entstehung der kontinuierlichen Absorption des Eumelanins durch die Polymerisation seiner schmalbandig im UV-Bereich absorbierenden Ausgangsstoffe liegt. Dabei steht aktuell die Suche nach Tautomeren der Ausgangsstoffe mit rotverschobenen Absorptionsbanden (Ketonische Formen der Indole) und die Berechnung von spektralen Verbreiterungen aufgrund der Aggregatbildung von Oligomerschichten aus Indolderivaten im Vordergrund der wissenschaftlichen Diskussion. Allerdings ist es nicht möglich, die interessanten Tautomere wie Indolquinone (IQ) oder Semiquinone (SQ) in Reinform herzustellen und ihre Absorptionsspektren in Lösung zu ermitteln, da sie zu instabil sind. Auch die Berechnungen von Verbreiterungen aufgrund der Aggregatbildung führen noch nicht zu dem gemessenen unstrukturierten Absorptionsverlauf (siehe auch Abschnitt 3.1).

Aufgrund der großen Diskrepanz zwischen Absorption und Fluoreszenzquantenausbeute wäre es jedoch auch möglich, dass die gemessenen Absorptionsspektren im Wesentlichen durch Streuung innerhalb der Lösung entstehen. Die Frage nach dem Streuungsanteil am Absorptionssignal wird deshalb bis heute diskutiert.

Bereits 1999 untersuchten Nofsinger, Simon und Forest [For98, Nof99] mittels photoakustischer Kalorimetrie das Streuverhalten von Melaninlösungen und kamen zu der Auffassung, dass der Streuanteil gering sei, nachdem Kurtz [Kur86a] durch theoretische Rechnungen festgestellt hatte, dass der Streuanteil sehr stark von der Partikelgröße abhängt. Sadar [Sar01] hingegen stellte in seinen Untersuchungen des Streu- und Absorptionskoeffizienten von Melaninlösungen fest, dass die Streuung > 99 % des Absorptionssignals ausmacht. Allerdings sprach Sadar von einer trüben Lösung, da sich das Melanin nicht gelöst habe und als Suspension vorliege. Diese Suspension unterscheidet sich jedoch komplett von den übrigen in der Literatur und auch in der Arbeit beobachteten homogenen Lösungen. In einer aktuellen Veröffentlichung von Riesz et al. [Rie06] wurden Streulichtmessungen an einer Eumelanin-Lösung in (0,1M)NaOH vorgestellt. Die dort zu findenden Ergebnisse sprechen von einem Anteil von < 6 % am Absorptionssignal, der auf Streuung zurückzuführen ist.

4.1.3 Abschätzung des möglichen Streuanteils an der messbaren Absorption

Mit Hilfe des in Abschnitt 4.1.2 gemessenen Absorptionsspektrums der Eumelanin-Lösung und der in Abschnitt 3.3.2 ermittelten Größenverteilung der Eumelanin-Aggregate konnte der Anteil der Streuung an der Extinktion abgeschätzt werden. Dafür wurde mit Hilfe der Formel 4.2 für die Rayleighstreuung eine Abschätzung der mittleren Aggregatsgröße vorgenommen, die notwendig wäre, um eine Streukurve zu erzeugen, die dem gemessenen Absorptionsverlauf entspricht. Diese Aggregatsgröße wurde dann mit der, in Kapitel 3.2 bestimmten, mittleren Eumelanin-Aggregatsgröße verglichen.

Für den Fall eines dominierenden Einflusses der Streuung auf die gemessene Extinktion $OD(\lambda)$ gilt nach Riesz [Rie06]:

$$\begin{aligned}
 OD(\lambda) &= (\alpha_{abs} + \alpha_{scat}) \cdot l \\
 &\approx \alpha_{scat} \cdot l = \frac{N_{Teilchen}}{V} \cdot \frac{128\pi^5}{3} \frac{d^6}{\lambda^4} \left| \frac{\epsilon_{Eumelanin}^2 - \epsilon_{(0,1M)NaOH}}{\epsilon_{Eumelanin}^2 + 2\epsilon_{(0,1M)NaOH}} \right|^2 \cdot l \quad (4.2)
 \end{aligned}$$

Dabei steht α_{abs} für den Absorptionskoeffizienten, α_{scat} für den Streukoeffizienten, l für den optischen Weg, $N_{Teilchen}$ für die Teilchenanzahl der Eumelanin-Aggregate in der Lösung, V für das Gesamtvolumen der Lösung, sowie d für den Eumelanin-Aggregatsdurchmesser, λ für die Anregungslichtwellenlänge, $\epsilon_{Eumelanin}$ für die Permittivitätskonstante des Eumelanins in Lösung und $\epsilon_{(0,1M)NaOH}$ für die Permittivitätskonstante des Lösungsmittels. Werte für die Permittivitätskonstante des Eumelanins und des Lösungsmittels werden in [Pop97] und [Kur86b] abgeschätzt. Das Wertepaar der Anregungswellenlänge und optischen Dichte können aus der Abbildung 4.2 bestimmt werden, welche die Absorptionskurve einer Lösung von synthetischem Eumelanin in (0,1M)NaOH nach dem Durchgang durch eine 1mm-Küvette zeigt.

Die aus einer angenommenen mittleren Aggregatsmasse von $MW \approx 1$ kD abgeschätzte Teilchenkonzentration des Eumelanins in der Lösung beträgt $2,2 \cdot 10^{23} \frac{\text{Teilchen}}{\text{m}^3}$. Weiterhin wurde das Wertepaar einer $OD_{1\text{mm}} = 0,84$ bei $\lambda = 400$ nm gewählt.

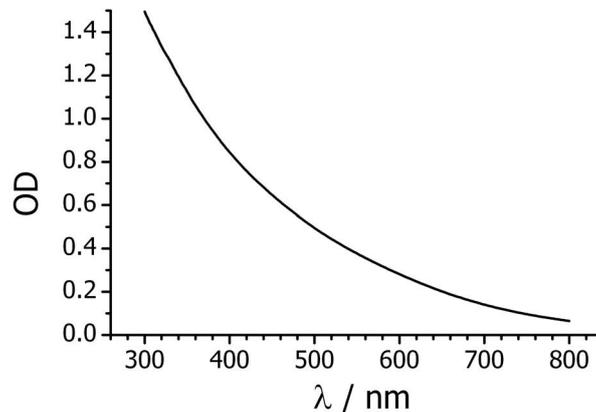


Abb. 4.2: Absorptionskurve einer (0,1M)NaOH-Lösung mit 0,0005% (Gewichtsprozent) synthetischem Eumelanin und einer Schichtdicke von 0,1 mm.

Setzt man diese Werte in die Formel für die Rayleigh-Streuung 4.2 ein, ergibt sich ein mittlerer Teilchendurchmesser von $d = 93,5 \mu\text{m}$. Ein solch großer Wert stellt eine Abschätzung dar, da für diese Teilchengrößen die Rayleigh-Streuung eigentlich nicht mehr gilt. Es kann jedoch festgestellt werden, dass die so abgeschätzte mittlere Aggregatsgröße drei bis vier Größenordnungen über der gemessenen mittleren Aggregatsgröße (siehe Abschnitt 3.3.2) liegt. Aus diesem Missverhältnis folgt, dass die Streuung keinen relevanten Anteil am Absorptionssignal besitzen kann.

4.1.4 Ergebnisse der Absorptionsspektroskopie und Folgerungen für ein Zustandsmodell des Eumelanins

Das gemessene Absorptionsspektrum kann als Überlagerung mehrerer Absorptionsbanden gedeutet werden, deren Einhüllende die Absorptionskurve darstellt. Eine Erklärung des Spektrums durch eine rein vibronische Verbreiterung kommt nicht in Frage, da das Absorptionsspektrum dafür zu breit ist und zur spektral langwelligen Seite hin abfällt (eine vibronischen Schulter bildet sich immer auf der kurzwelligen Seite der Absorptionsbande aus). Streuung scheidet aus den in [Rie06] und Abschnitt 4.1.3 genannten Gründen aus.

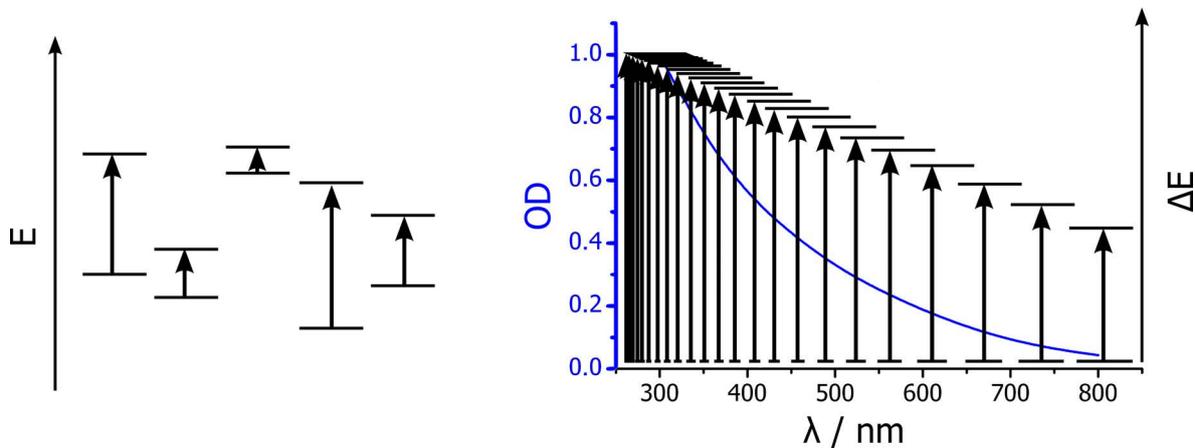


Abb. 4.3: Beim Eumelanin vermutete Vielzahl von existierenden Absorptionsübergängen mit unterschiedlichen Grundzustandsenergien (links) die in einem Jablonskidiagramm nach den Übergangsenergien geordnet werden können (rechts). Dabei ist, aus den im Text genannten Gründen, zu vermuten, dass es proportional zum Abfall der Absorption in Richtung langwelligeren Lichts auch einen Abfall der Anregungszustandsdichte zu niedrigeren Übergangsenergien hin gibt.

Daraus folgt der Modellansatz, dass sich das Eumelanin entweder als ein Aggregat mit mehreren elektronischen Anregungszuständen oder als ein Gemisch mehrerer Spezies mit verschiedenen Absorptionsbanden darstellt.

Im ersten Fall kann die spektrale Breite der Absorptionsbande durch Tautomerisation (chemical disorder, siehe Abschnitt 3.1) und in der J-Aggregatbildung (siehe Abschnitt 2.2) aus den Anregungszuständen der Monomere begründet sein. Da die Absorptionsspektren der Monomere des Eumelanins alle im UV-Bereich liegen und nur durch die Polymerisation, d.h. bei größeren Oligomeren, auch längere durchkonjugierte Ketten entstehen können, ist von einer abfallenden Dichte der Anregungszustände in Richtung niederenergetischer Anregungszustände auszugehen.

Aber auch eine Erklärung aufgrund mehrerer Spezies ist zumindest möglich, da per Ultrafiltration verschieden große Eumelanin-Teilchen gefunden wurden, die sich auch spektral unterscheiden können.

4.2 Absorption von Eumelanin-Aggregaten unterschiedlicher Masse

Um die oben genannte gestellte Frage zu beantworten, ob die Vielzahl der optischen Anregungszustände auf ein Gemisch mehrerer (evtl. recht heterogener) Spezies zurückzuführen sind, ist es nötig, die Absorptionsspektren der Fraktionen unterschiedlich großer Eumelanin-Aggregate zu kennen.

In einer Veröffentlichung von Simon [Nof99] wurden bereits Untersuchungen zu den Unterschieden in den Absorptionsspektren von separierten Aggregatsgrößen von Sepia und einer kleinen Fraktion von synthetischem Eumelanin vorgenommen. Dabei wurde Sepia bzw. Eumelanin in Wasser gelöst und durch Ultrafiltration fraktioniert. Die erhaltenen Gewichtsfaktionen lagen im Falle von Sepia in den *MW*-Intervallen > 10 kD, 10 kD – 3 kD, 3 kD – 1 kD, < 1 kD und im Falle des synthetischen Eumelanins im Intervall 3 – 1 kD.

Aus den Messungen ergab sich, dass sich das Absorptionsspektrum mit zunehmender Aggregatsgröße in den langwelligen Spektralbereich hinein verbreitert. Dieser Sachverhalt ist z.B. aus Polymerisationsversuchen von DHICA bekannt [Tra06], nicht aber der zu Grunde liegende Mechanismus.

Weiterhin geht aus der Veröffentlichung hervor, dass die Extinktion der großen Aggregate dominant ist (Aggregate mit einer $MW < 10\text{ kD}$ steuern nur 1 % zur gesamten Extinktion bei) und Sepia-Fractionen kleiner Aggregatsgrößen eine Bande bei 270 nm aufweisen, welche Proteinresten zugeschrieben wird, da sie beim synthetischen Melanin nicht reproduziert werden kann.

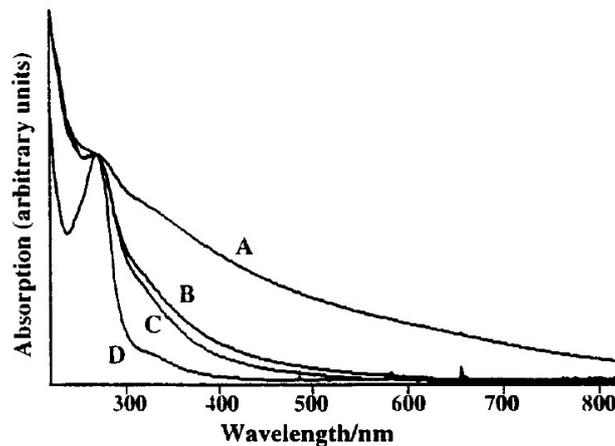


Abb. 4.4: Absorptionsspektren für wässrige Lösungen von größenabhängigen Fraktionen von Sepia (*Sepia officinalis*) mit Aggregatsmassen von: (A) $> 10\text{ kD}$; (B) $10\text{ kD} - 3\text{ kD}$; (C) $3\text{ kD} - 1\text{ kD}$; (D) $< 1\text{ kD}$ aus [Nof99]

Da aus dieser Veröffentlichung nur absorptionsspektroskopische Ergebnisse zu Sepia-Fractionen bekannt sind und sich Sepia von synthetischen Eumelanin unterscheidet - z.B. Granulenbildung (Selbstorganisation) und Fremdproteingehalt (nach Reinigung ca. 10 %) bei Sepia - wurden die im Morphologie-Abschnitt 3.2 gemessenen Absorptionsspektren der Eumelanin-Fractionen genutzt, um analoge Erkenntnisse über das synthetische Eumelanin zu erhalten.

4.2.1 Spektroskopische Auswertung der Absorptionsspektren von Eumelanin-Aggregaten unterschiedlicher Masse

Die in Abschnitt 3.2 beschriebene Fraktionierung der Eumelaninlösung mit Ultrafiltern ermöglichte es, die Filtratlösungen unterschiedlicher Aggregatsgrößen spektral zu untersuchen. Dazu wurden die Eumelanin-Lösungen aller Fraktionen auf eine gleiche Absorption $OD_{1\text{mm}} = 1,0$ bei $\lambda = 500\text{ nm}$ eingestellt und mit Hilfe eines Absorptionsspektrometers (Cary 5) vermessen. Für synthetisches Eumelanin zeigte sich dabei das aus der Literatur für Sepia bekannte Verhalten: Je größer das Aggregat, desto höher die Absorption im langwelligen Spektralbereich bzw. desto kleiner die Extinktion im kurzwelligen.

Aus den Messungen in Kapitel 3.2 war außerdem schon bekannt, dass die kleinen Aggregate einen viel geringeren Anteil an der Gesamtabsorption besitzen als die größeren. Im Gegensatz zu [Nof99] wurde jedoch für die Fraktion mit Aggregatmassen von $MW = 3\text{ kD} - 10\text{ kD}$

($\approx 1,7 \text{ nm} - 4 \text{ nm}$) ein Anteil von ca. 25 % an der Gesamtabsorption bestimmt.

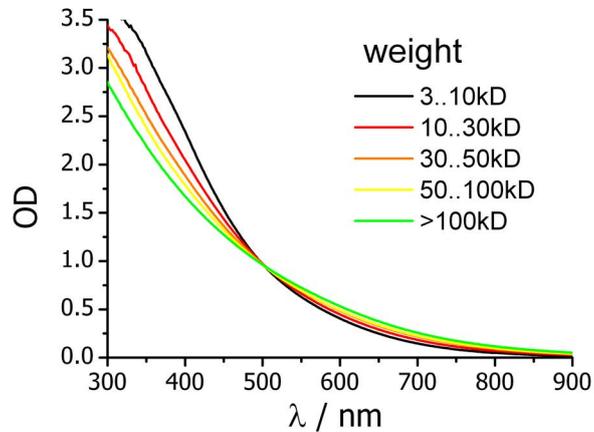


Abb. 4.5: Absorptionsspektren der Eumelanin / (0,1M)NaOH-Lösungen unterschiedlicher Aggregatsgröße, die durch entsprechende Zugabe von Lösungsmittel auf eine gleiche Optische Dichte $OD = 1$ bei $\lambda = 500 \text{ nm}$ eingestellt wurden.

Bei genauer Betrachtung der Absorptionsverläufe der leichtesten Aggregate ($MW < 3 \text{ kD}$ und $MW = 3 \text{ kD} - 10 \text{ kD}$) deutet sich ein lokales Maximum bei $\lambda = 275 \text{ nm}$ an. Da es sehr schwach ist, wurden die Messungen an neuen Filtraten wiederholt und mit verdünnter Ausgangslösung ähnlicher OD verglichen. Aus diesen Messungen ergab sich, dass das lokale Absorptionsmaximum bei den leichten Aggregaten reproduziert werden kann.

Um die Zentralwellenlänge und die Breite abzuschätzen, wurde die Absorptionskurve der $MW < 3 \text{ kD}$ -Fraktion im Bereich von $\lambda = 254 \text{ nm} - 312 \text{ nm}$ so approximiert, dass sie unstrukturiert wie eine Absorptionskurve größerer Aggregate verläuft (siehe Abbildung 3.5). Dann wurde das Differenzspektrum zwischen der realen Absorptionskurve und der approximierten gebildet, um die Subbande sichtbar zu machen. Die dadurch klar ersichtliche Nebenbande mit einem Maximum bei $\lambda = 275 \text{ nm}$ korreliert mit der von Simon gemessenen. Simon interpretierte diese jedoch, wie oben erwähnt, als Absorption von Amino- und Peptid-Resten, da er die Bande bei dem selbst erstellten synthetischen Eumelanin nicht nachweisen konnte. In der vorliegenden Arbeit kann jedoch ausgeschlossen werden, dass bei der Synthese des in dieser Arbeit verwendeten Eumelanins Peptide oder Aminosäuren entstehen (Synthese siehe Kapitel 3.1). Die Bande kennzeichnet daher zweifelsfrei eine eumelanineigene Absorptionsbande, die wahrscheinlich durch einen dominierenden Monomerbaustein des Eumelanin verursacht wird. Ein Vergleich mit den Absorptionsspektren von DHICA [Tra06], DHI bzw. IQ zeigt [Il'03], dass z.B. DHI bzw. IQ ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 275 \text{ nm}$ besitzen, weshalb z.B. diese beiden Monomere für das gefundene Nebenmaxima in Frage kommen.

4.2.2 Zusammenfassung und Folgerung für ein Zustandsmodell des Eumelanins

Da die größten Anteile der Gesamttextinktion auf Fraktionen mit Aggregatgewichten von $MW = 30 \text{ kD} - 100 \text{ kD}$ fallen und verschiedene Aggregatmassen in diesem Bereich gut durch die Ultrafiltration separiert werden konnten, war eine stichhaltige Untersuchung der die Absorption bestimmenden Spezies auf Unterschiede im Absorptionsverhalten möglich. Durch

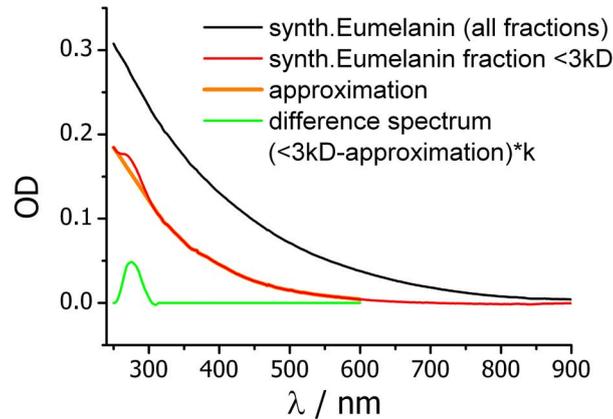


Abb. 4.6: Die Absorptionsspektren der kleinen Aggregate ($MW < 10$ kD) zeigen ein lokales Maximum bei $\lambda = 270$ nm. Die dazugehörige Bande wurde durch Bildung eines Differenzspektrums von originalem und einem in Anlehnung an das Summenabsorptionsspektrum approximierten Absorptionsspektrums der 3kD-Fraktion mit $\lambda_{center} = 275$ nm isoliert.

das Ergebnis, dass die Absorptionsspektren der verschiedenen Fraktionen (Spezies) keine wesentlichen Unterschiede in ihren Absorptionsspektren aufweisen, konnte ein heterogenes Viel-Spezies-Gemisch als Ursache für die spektral ungewöhnlich breite Absorption beim Eumelanin ausgeschlossen werden. Es wurden lediglich kleine Unterschiede festgestellt. So absorbieren größere Aggregate mit höheren Anteilen im Roten als die kleineren. Diese Anhebung der Absorption im roten Bereich bei größeren Aggregaten scheint also eher, wie in Abschnitt 4.1.4 bemerkt, durch die verstärkte J-Aggregatbildung und Tautomerisation (chemical disorder) innerhalb größerer Oligomerschichten zustande zu kommen.

Zusätzlich wurde bei kleinen Fraktionen ein lokales Absorptionsmaximum bei 275 nm gefunden, welches im Gegensatz zu [Nof99] zweifelsfrei als Eumelanin-eigene Absorptionsbande identifiziert werden konnte. Die spektrale Lage des Bandenmaximums stimmt mit den Absorptionsmaxima von DHI und IQ überein und kann ein Hinweis DHI- und IQ-Gruppen im untersuchten Eumelanin sein. Diese Erkenntnis ist in soweit interessant, als dass bis jetzt keine Einzelbanden in den Absorptionsspektren von Eumelanin-Lösungen gemessen und somit keine spektroskopischen Beiträge für die Strukturanalyses des Eumelanin-Aggregats geleistet werden konnten.

Genaueren Aufschluss könnten absorptionsspektroskopische Messungen von verschiedenen Aggregatsgrößenfraktionen während des Polymerisationsvorgangs ergeben (ähnlich zu [Tra06]).

4.3 1-Photon-Angeregte-Fluoreszenz (OPEF) von nichtfraktioniertem Eumelanin

Im Gegensatz zu der Entstehung der Eumelanin-Absorption gibt es zur Entstehung der 1-Photonen-Angeregten-Fluoreszenz (One Photon Excited Fluorescence, OPEF) von Eumelanin noch keine Modelle. Da auch insbesondere das mit der Fluoreszenz zusammenhängende Anregungsspektrum des Eumelanins Rätsel aufgibt, da es sich viel strukturierter als das Absorptionsspektrum darstellt, ist die Modellierung nicht trivial. Die vorliegende Arbeit setzt

sich deshalb verstärkt mit diesen spektralen Emissionseigenschaften des Eumelanins auseinander. Dabei soll das in Abschnitt 4.1.4 entwickelte Modell so erweitert werden, dass es den Fluoreszenz-Anregungsmechanismus konsistent beschreibt.

Die Fluoreszenzbande des synthetischen Eumelanins stellt sich in der Literatur grundsätzlich als breite unstrukturierte Glockenkurve dar [NR05b, Teu00, Mer06], die zum langwelligen hin abfällt und ausläuft. Weiterhin ist bereits bekannt, dass die spektrale Lage des Fluoreszenzmaximums von der Anregungswellenlänge abhängt. Die wichtigste Arbeit zur OPEF von synthetischem Eumelanin stammt von Nighswander-Rempel [NR05b], der eine Fluoreszenzkarte (Emissionsspektren über Anregungswellenlänge) erstellte und auch eine relative Fluoreszenzquantenausbeute ableitete. Allerdings gibt es in den zu findenden Veröffentlichungen ähnlich wie bei der mittleren Aggregatsgröße zum Teil starke Unterschiede in den gezeigten OPEF-Spektren. So unterscheiden sich z.B. die von Teuchner et al. [Teu00] und Nighswander-Rempel et al. [NR05b] bestimmten Fluoreszenzspektren in der spektralen Lage ihres Maximums bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{exc} = 400$ nm um 40 nm.

Die möglichen Ursachen hierfür sind vielfältig. Einerseits können sie an unterschiedlichen Zusammensetzungen bzw. Strukturvariationen der jeweilig verwendeten Eumelanin-Chargen liegen. Andererseits können sie auf ungenügende Korrekturen der Fluoreszenzspektren zurückzuführen sein, da die Fluoreszenzquantenausbeute des Eumelanins sehr gering ist und die Fluoreszenzbande vollständig innerhalb der Absorptionsbande liegt. Da die genaue Ursache für diese Abweichungen nicht zu ermitteln war, wurde die verwendete Eumelanin-Charge mittels eigener Fluoreszenzuntersuchung charakterisiert.

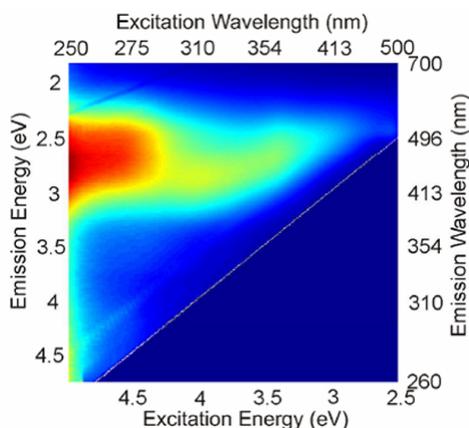


Abb. 4.7: OPEF-Spektren-Karte von synthetischem Eumelanin / (0,1M)NaOH nach [NR05b]

Bei den Vorversuchen zur Messung der OPEF von Eumelanin deutete sich eine für die Modellierung sehr wichtige und aus den Veröffentlichungen noch unbekannte Fluoreszenznebenbande des Eumelanins an. Allerdings wurde diese von einer Fluoreszenzbande des Lösungsmittels überlagert. Um die Fluoreszenz des Lösungsmittels zu unterdrücken, wurde die ungewöhnliche Vorgehensweise der Frontface-Messung an einer hochkonzentrierten Eumelaninlösung gewählt (siehe dazu auch Abschnitt 4.3.1). Die Entscheidung für eine hohe Konzentration erzeugte mehrere Effekte, deren Berücksichtigung notwendig war, um eine unverfälschte OPEF-Karte zu erstellen und die Fluoreszenznebenbande zu verifizieren. Bei den Effekten handelte es

sich im Einzelnen um die in Abschnitt 4.3.2 behandelten Reabsorptionseffekte aufgrund der starken (und spektral breiten) Absorption der Lösung und einem in der Literatur unbekanntem Ausbleichen der Lösung, welches in Abschnitt 4.3.3 beleuchtet wird.

4.3.1 Fluoreszenzspektrometer und Frontface(FF)-Messmodus

Die 1-photon-angeregten Fluoreszenzspektren (Emissions- wie Anregungsspektren) wurden mit einem Fluoreszenzspektrometer Fluorolog-II der Firma SPEX Industries gemessen. Eine Aufbauskitze und die möglichen Strahlengänge für die Anregungs- bzw. Messmodi sind in Abbildung 4.8 dargestellt. In den in diesem Kapitel vorgestellten Messungen wurde das Anregungslicht von der integrierten Xenonlampe (Source) verwandt, die alternative Einkopelöffnung („Aux In“ in Abbildung 4.8a) blieb geschlossen.

Wie bereits in Kapitel 2 erwähnt, besitzt Eumelanin nur eine sehr geringe Fluoreszenzquantenausbeute. Um aufgrund kleiner Rest-Fluoreszenzen des Lösungsmittels bzw. von minimalen Verunreinigungen ein unverfälschtes Spektrum von Eumelanin zu erhalten, wurden konzentrierte Eumelanin-Lösungen verwendet.

Da die Absorption solcher Eumelanin-Lösungen sehr stark ist, kann die Emissions-Detektion nur in Rückrichtung bezüglich der Anregung erfolgen. Dieser Messmodus wird auch als „Frontface“ (FF) bezeichnet und ist in Abbildung 4.8a blau dargestellt und mit „FF“ gekennzeichnet. Die Korrektur der Reabsorptionseffekte erfolgte nach der unten beschriebenen integrativen Methode.

Die spektrale Auflösung der Emissionsspektren wird im vorliegenden Falle durch die Spaltbreite der Monochromator-Blenden vorgegeben. Aufgrund der sehr breiten Fluoreszenz- und

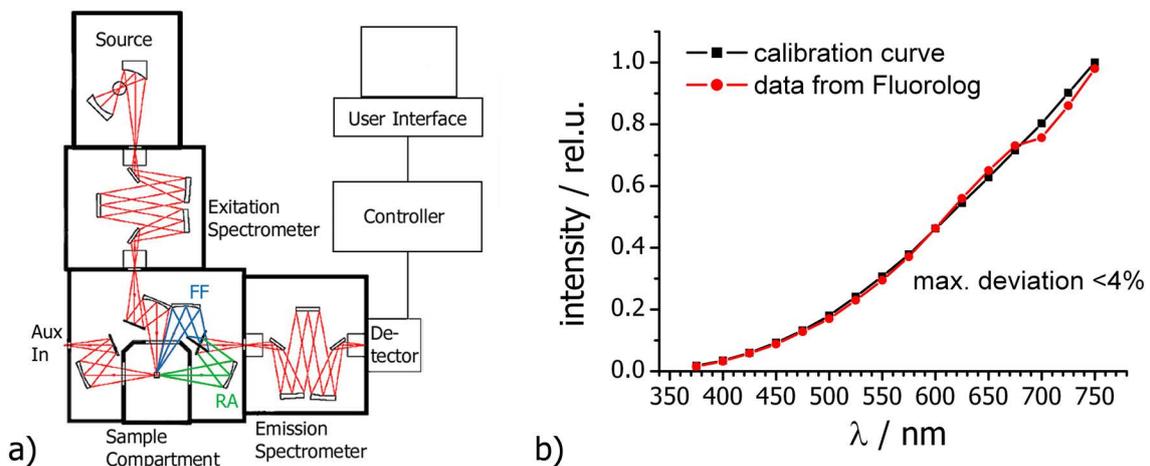


Abb. 4.8: a) Aufbau und Darstellung der rechtwinkligen (RA) bzw. frontalen (FF) Detektion des Fluoreszenzlichts bezüglich des Anregungsstrahls im Fluorolog II der Firma SPEX; b) Vorgegebenes (schwarz) und mittels Fluorolog gemessenes (rot) Emissionsspektrum der Halogenlampe. Die Abweichung vom Sollspektrum der Halogenlampe liegt über den gesamten Messbereich unterhalb von 4%

Anregungsbanden, die im gesamten Messbereich keinerlei Struktur kleiner 10nm aufweisen und der Tatsache, dass die Emission sehr schwach ist, wurden bei den Blenden-Öffnungen der Anregungsmonochromatoren eine Spaltbreite von 0,5 mm eingestellt, bei denen der Detek-

tionsmonochromatoren eine von 1,0 mm. Daraus resultierte ein spektrales Auflösungsvermögen des Fluorologs von $\Delta\lambda = 4$ nm.

Um das Rauschen der Messwerte besser abschätzen zu können und mehr Werte für eine Glättung der Spektren (Mittelwertbildung) zu erhalten, wurde das Inkrement mit 2 nm etwas kleiner als die durch die Monochromator-Öffnung vorgegebene spektrale Auflösung gewählt. Durch die niedrige Fluoreszenzquantenausbeute war dabei eine Integrationszeit von 0,5 s erforderlich.

Die Korrektur der spektralen Gittereffizienz sowie der spektralen Detektorempfindlichkeit wurden mit Hilfe des Korrekturfiles „mcorrect.spt“ durchgeführt. Zur Überprüfung wurde im Vorfeld der Messungen die Spektralkurve einer kalibrierten Halogenlampe aufgenommen und mit der Kalibrierkurve verglichen. Die Intensitätsabweichungen des gemessenen Spektrums vom Sollspektrum liegen unterhalb der angegebenen Genauigkeit der Kalibrier-Halogenlampe von 5 % (siehe Abbildung 4.8b).

4.3.2 Berücksichtigung der Reabsorptionseffekte

Beim Messen von Fluoreszenzspektren kommt es bei spektralen Überschneidungen des Emissions- und Absorptionsbereichs zur Beschneidung des wahren Emissionsspektrums durch Reabsorption von Fluoreszenzlicht innerhalb der zu messenden Fluorophor-Lösung. Die Reabsorption äußert sich dabei meist in einer Beschneidung des Fluoreszenzspektrums im kurzwelligen Bereich, da die Absorptionsbande meist kurzwelliger liegt als die Emissionsbande.

Je nach Messanordnung sind rechnerische Korrekturen zur Behebung der Reabsorptionseffekte nötig. Meist wird mit sehr dünnen Lösungen gearbeitet, um über die gesamte Anregungsstrecke eine möglichst konstante Anregungsintensität zu erreichen. Dabei wird die Fluoreszenz möglichst senkrecht zur Anregungsstrecke gemessen, um für alle Emissionspunkte einen gleichen Reabsorptionsweg zu gewährleisten. Für diesen Fall sind unterschiedliche Korrekturrechnungen bekannt [Mer04, Gal87, NR05b].

Aus den Gleichungen zu den Reabsorptionseffekten für die rechtwinklige Auskopplung wurden zwei Korrekturrechnungen für den in Abbildung 4.9 dargestellten „Frontface“-Fall abgeleitet.

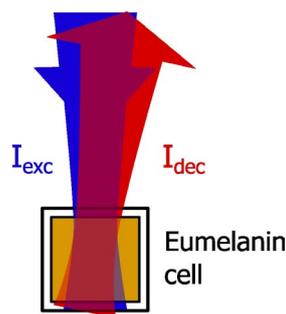


Abb. 4.9: Geometrische Anordnung von Anregungsstrahl und detektiertem Strahl bei einer „Frontface“-Messung

Dabei wurden zwei Ansätze verfolgt. Der erste geht von einem punktförmigen Fluoreszenzgebiet innerhalb der Fluorophor-Lösung aus und kann zur Korrektur der lokalisierten 2-Photonen-Angeregten-Fluoreszenz genutzt werden (siehe Abbildung 4.10a). Der zweite Ansatz betrachtet die messbare Fluoreszenz bei einer mit der Schichtdicke abfallenden Anregungsintensität und beschreibt den Fall der linearen Fluoreszenz besser (siehe Abbildung 4.10b).

In beiden Fällen dient das Beer-Lambertsche Gesetz (2.7) zur Beschreibung der Anregungs- und Fluoreszenzlichtabsorption über den jeweiligen optischen Weg hinweg. Bei Annahme einer punktförmigen Fluoreszenzanregung in der Tiefe d_1 der Lösung wird ein der Lösungs-extinktion ϵ und Wegstrecke d_1 entsprechender Teil des Lichts absorbiert. Die Intensität $I_{exc}(d_1, \lambda_1)$ steht

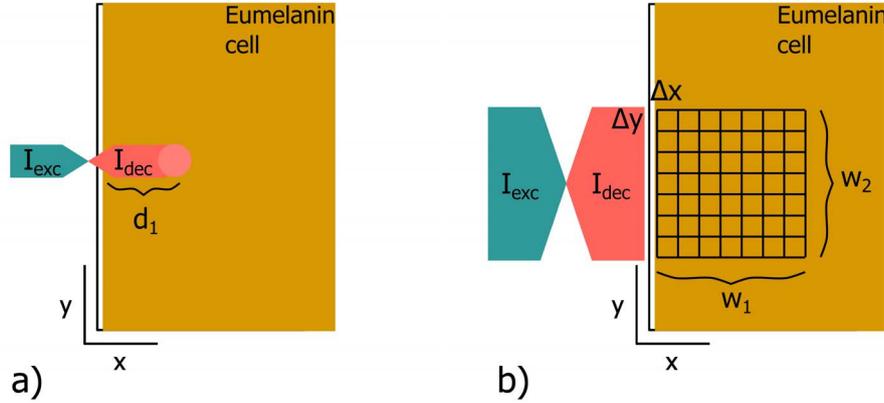


Abb. 4.10: Schema zur Korrekturrechnung a) unter der Annahme einer punktförmigen Fluoreszenz b) mittels Integral-Ansatz über ein Fluoreszenzgebiet

am Fluoreszenzort noch zur Verfügung, wird teilweise absorbiert und in das Fluoreszenzlicht $I_f(d_1, \lambda_2)$ umgewandelt:

$$I_{exc}(d_1, \lambda_1) = I(0, \lambda_1)e^{-\alpha(\lambda_1)d_1}$$

$$I_f(d_1, \lambda_2) = \eta_f \cdot I(0, \lambda_1)e^{-\alpha(\lambda_1)d_1}$$

Das Fluoreszenzlicht erleidet auf dem Rückweg durch die Lösung Verluste durch Reabsorption (wieder Beer-Lambertsches Gesetz mit dem Absorptionskoeffizienten $\alpha(\lambda_2)$ für die jeweilige Fluoreszenzwellenlänge). Der nicht absorbierte Anteil des Fluoreszenzlichts gelangt zum Detektor und wird als Intensität $I_{det}(0, \lambda_2)$ erfasst.

$$I_{det}(0, \lambda_2) = I_f(d_1, \lambda_2)e^{-\alpha(\lambda_2)d_1}$$

$$\Rightarrow I_{det}(0, \lambda_2)e^{\alpha(\lambda_2)d_1} = \eta_f \cdot I(0, \lambda_1)e^{-\alpha(\lambda_1)d_1}$$

Um das detektierte Intensitätsspektrum zu korrigieren, wendet man deshalb das Beer-Lambertsche Gesetz zweifach (mit $\alpha(\lambda_1)$ und $\alpha(\lambda_1)$) an.

$$\Rightarrow I_f(d_1, \lambda_2) = I_{det}(0, \lambda_2)e^{\alpha(\lambda_1)d_1}e^{\alpha(\lambda_2)d_1} \quad (4.3)$$

Bei der integralen Betrachtung eines Fluoreszenzgebiets mit schwächer werdender Anregungsintensität geht man von einer in der y-z-Ebene homogenen und in x-Richtung abfallenden Anregungsintensität aus. Die Tiefe des Anregungslichtfeldes wird mit w_1 , die Breite mit w_2 bezeichnet. Legt man nun ein Raster über das angeregte Gebiet, mit der Rastergröße $\Delta x/\Delta y$ und betrachtet die Intensitätsdifferenz des Anregungslichts über ein Rasterkästchen in x-Richtung, erhält man:

$$I_{exc}(x, y, \lambda_1) = e^{-\alpha(\lambda_1)x} I_{exc}(0, y, \lambda_1) \frac{\Delta y}{w_2}$$

$$\Rightarrow \Delta I_{exc}(x, y, \lambda_1) = I_{exc}(0, y, \lambda_1) \frac{\Delta y}{w_2} (e^{-\alpha(\lambda_1)x} - e^{-\alpha(\lambda_1)(x+\Delta x)})$$

Dabei bezeichnet $\alpha(\lambda_1)x$ wieder den Absorptionskoeffizienten für die Anregungswellenlänge. Die e-Funktionen können in erster Näherung durch die ersten Glieder einer Taylorreihenentwicklung ersetzt werden. Die Gleichung vereinfacht sich dadurch zu:

$$\Rightarrow \Delta I_{exc}(x, y, \lambda_1) = e^{-\alpha(\lambda_1)x} I_{exc}(0, y, \lambda_1) \frac{\Delta y}{w_2} \alpha(\lambda_1) \Delta x \quad (4.4)$$

Aus der Fluoreszenzquantenausbeute η_f und dem absorbierten Anregungslicht $\Delta I_{exc}(x, y, \lambda_1)$ kann der Fluoreszenzlichtanteil berechnet werden:

$$\Delta I_f(x, y, \lambda_1, \lambda_2) = \eta_f \cdot \Delta I_{exc}(x, y, \lambda_1)$$

Auf dem Weg zum Detektor wird wiederum ein Teil des Fluoreszenzlichtes absorbiert:

$$I_{det}(0, y, \lambda_1, \lambda_2) = C \cdot \Delta I_f(x, y, \lambda_1, \lambda_2) e^{-\alpha(\lambda_2)x}$$

Der Geometriefaktor C erfasst zusätzliche Verluste durch Aperturen im Aufbau. Wenn das Raster feiner wird, so dass $\Delta x \rightarrow dx$ und $\Delta y \rightarrow dy$ und über das gesamte Anregungsgebiet integriert, ergibt sich für $I_{det}(x, y, \lambda_2)$ folgender Ausdruck:

$$I_{det}(0, y, \lambda_1, \lambda_2) = \frac{C \eta_f I_{exc}(0, y, \lambda_1) w_1 \alpha(\lambda_1)}{w_1 w_2} \int_0^{w_1} \int_0^{w_2} e^{x(-\alpha(\lambda_1) - \alpha(\lambda_2))} dx dy$$

Das bestimmte Integral der e-Funktion ergibt sich zu:

$$I_{det}(0, y, \lambda_1, \lambda_2) = \frac{C \eta_f I_{exc}(0, y, \lambda_1) w_1 \alpha(\lambda_1)}{w_1} \frac{e^{-w_1(\alpha(\lambda_1) + \alpha(\lambda_2))} - 1}{-(\alpha(\lambda_1) + \alpha(\lambda_2))}$$

Durch erneute Näherung der e-Funktion durch das erste Glied einer Taylorreihe ergibt sich für die Fluoreszenz-Intensität:

$$I_f(0, y, \lambda_1, \lambda_2) = \frac{I_{det}(x, y, \lambda_1, \lambda_2) w_1 (\alpha(\lambda_1) + \alpha(\lambda_2))}{1 - e^{-w_1(\alpha(\lambda_1) + \alpha(\lambda_2))}} \quad (4.5)$$

Da, wie oben schon gesagt, der integrative Ansatz den Fall der linearen Fluoreszenz besser beschreibt, wurde er für die Berechnung der Reabsorptionsanteile verwendet. Da die Stärke der Reabsorption dabei von der Eindringtiefe w_1 des Anregungslichts abhängt und sich also in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge verändert, wurde w_1 in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge bestimmt. Dabei wurde es auf den Weg festgesetzt, den das Anregungslicht bis zu seiner Reduktion auf $I_0/2$ durch die Lösung zurücklegt. Damit wird die Reabsorption der Spektren nicht vollständig korrigiert. Es wird aber aus dem absoluten Reabsorptionsfehler der gemessenen Spektren ein relativer, was die korrekte Analyse von Unterschieden zwischen den Fluoreszenzspektren verschiedener Anregungswellenlängen erlaubt.

4.3.3 Berücksichtigung der zeitlichen Veränderung der Fluoreszenzintensität durch das Ausbleichen der Lösung

Nachdem die Reabsorption mittels der oben beschriebenen integrativen Methode aus den bei verschiedenen Anregungswellenlängen gemessenen Fluoreszenzspektren herausgerechnet war, wurden die in Abbildung 4.11 als Karte dargestellten Differenzspektren zwischen dem Lösungsmittel (0,1M)NaOH und einer Lösung von synthetischem Eumelanin / (0,1M)NaOH

($OD_{1\text{mm}} = 0,286$ bei $\lambda = 600\text{ nm}$) gebildet. Die Karte besitzt sowohl in Richtung der Anregungs- als auch in der Emissionswellenlänge eine Auflösung von 10 nm.

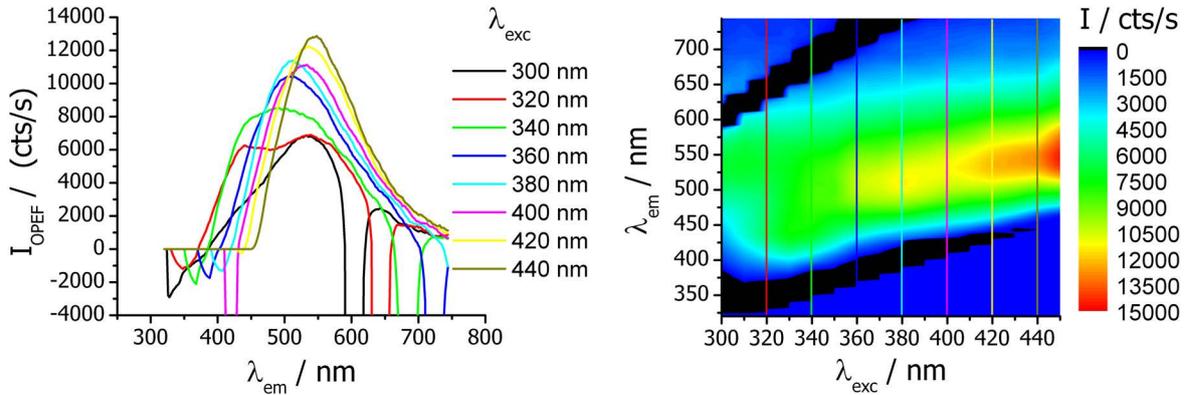


Abb. 4.11: Auswahl ermittelter Differenz-OPEF-Spektren zwischen dem Lösungsmittel (0,1M)NaOH und synthetischem Eumelanin / (0,1M)NaOH-Lösung bei verschiedenen Anregungswellenlängen λ_{exc} (links) und die aus allen Spektren generierte Fluoreszenzkarte (rechts).

Die schwarzen Bereiche kennzeichnen Intensitäten kleiner Null in den Differenzspektren. Diese Überbewertung der Lösungsmittelfluoreszenz war gewünscht, um sicherzustellen, dass das Differenzspektrum die alleinige Fluoreszenz des Eumelanins wiedergibt. Im Speziellen sollte eine Fluoreszenznebenbande des Eumelanins bei $\lambda_{em} = 450\text{ nm}$ nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 4.3.4). Unterhalb einer Anregungswellenlänge $\lambda_{exc} = 450\text{ nm}$ weist das auf eine höhere Fluoreszenzintensität des reinen Lösungsmittels im Vergleich mit der Eumelaninlösung hin. Die schwarzen Bereiche oberhalb $\lambda_{exc} = 550\text{ nm}$ erklären sich aus der viel geringeren Absorption und höheren Rückstreuung des Anregungslichts im reinen Lösungsmittel, wobei diese Anregungslichtanteile durch das Spektrometergitter mit doppelter Wellenlänge (2. Ordnung) in das Spektrum eingehen. Um die zu starke Gewichtung der Lösungsmittelfluoreszenz zu neutralisieren, wurden die Intensitäten der Eumelanin-Spektren im kurzwelligen Bereich - wo das Eumelanin selbst nicht fluoresziert - an die der Lösungsmittelspektren angeglichen. Die Bereiche, die durch das Anregungsstreulicht der 2.Ordnung verfälscht wurden, konnten durch lineare Approximation rekonstruiert werden.

Aus der generierten Fluoreszenzkarte können in waagerechter Richtung Anregungsspektren abgelesen werden. Diese Anregungsspektren besitzen eine spektrale Auflösung, die der Schrittweite zwischen den verwendeten Anregungswellenlängen bei der Messung der Fluoreszenzspektren entspricht und $\Delta\lambda_{exc} = 10\text{ nm}$ beträgt. Diese, aus einer Reihe von Fluoreszenzspektren ablesbaren, Anregungsspektren können zur Kontrolle mit direkt gemessenen Anregungsspektren (siehe Abschnitt 4.6) verglichen werden. Für eine gute Vergleichbarkeit müssen die spektralen Auflösungen der gemessenen Anregungsspektren mit denen der abgelesenen abgeglichen werden, was durch das Anpassen der spektralen Auflösung der direkt gemessenen Anregungsspektren an die der ablesbaren Anregungsspektren bewerkstelligt wurde (Zusammenfassen der gemessenen Fluoreszenzintensitäten in spektralen 10nm-Intervallen).

Bei dem Vergleich der Anregungsspektren wurde deutlich, dass die ermittelten Anregungsspektren gegenüber den direkt gemessenen einen Intensitätsanstieg im langwelligen Spektralbereich

aufwiesen (siehe Abb.4.12).

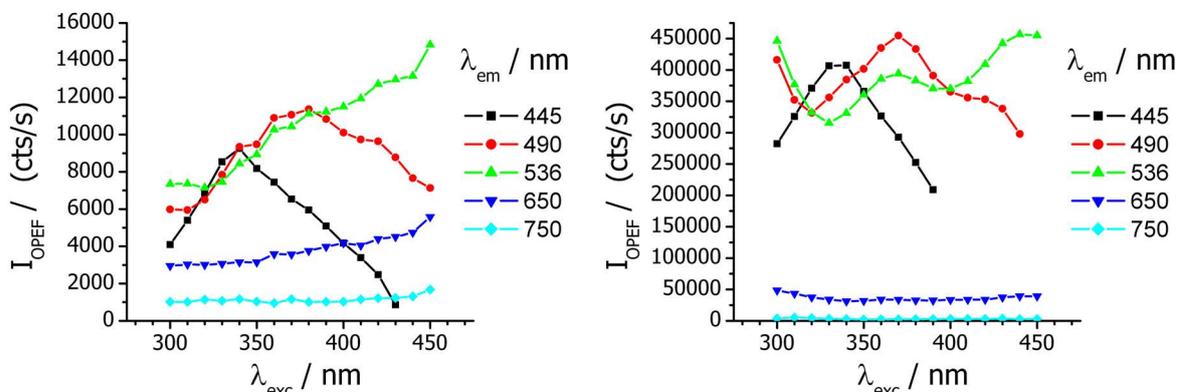


Abb. 4.12: Aus Emissionsspektren abgelesene (links) und direkt gemessene (rechts) Anregungsspektren von synthetischem Eumelanin in (0,1M)NaOH-Lösung ($OD_{1\text{mm}} = 0,286$ bei $\lambda = 600$ nm). Erstere zeigen eine Intensitätserhöhung im langwelligen Spektralbereich.

Dieser Sachverhalt korrelierte mit einer beobachtbaren Ausbleichung der Eumelanin-Lösung über die Zeit. Durch Vorversuche, die sich mit der Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenz von Eumelanin-Lösungen beschäftigten, war bekannt, dass die Fluoreszenzintensität von hochkonzentrierten Lösungen mit sinkender Konzentration steigt (wahrscheinlich Selfquenching, da sich die Lage des Fluoreszenzmaximums nicht ändert). Die Anhebung der Fluoreszenzintensität im langwelligen Spektralbereich war somit auf den späteren Messzeitpunkt zurückzuführen. Die beobachtete Ausbleichung der Eumelanin-Lösung (Zerfall der Aggregate) widerspricht der in [Ada05] beschriebenen und allgemein anerkannten, stabilisierenden Wirkung (Förderung der Polymerisation) von wässriger Alkali-Lösung mit hohem pH-Wert. Das irreversible Ausbleichen wurde jedoch bei einer Vielzahl von eigenen Versuchen beobachtet (zunehmende Transparenz der Lösung), so dass es für das verwendete Eumelanin als abgesicherte Erkenntnis gelten kann.

Um diesen Alterungseffekt zu korrigieren, war das Finden einer spektralen Korrekturfunktion nötig, die gewährleistet, dass sie alle aus den Emissionsspektren gewonnenen Anregungsspektren erfolgreich an die direkt gemessenen Spektren angleicht. Das war grundsätzlich nur möglich, wenn das Ausbleichen lediglich die Gesamtintensität, nicht aber die spektrale Verteilung verändert.

Um die Korrekturfunktion zu ermitteln, wurde zunächst die Annahme getroffen, dass sich die Eumelanin-Lösung in den Fluoreszenzeigenschaften über ein gemessenes Emissions- bzw. direkt gemessenes Anregungsspektrum hinweg nicht ändert. Diese Annahme kann getroffen werden, da der Messvorgang weniger als zwei Minuten dauerte und ein messbares Ausbleichen erst nach ca. fünf Minuten sichtbar wird. Da das Ausbleichen auch während der Messreihe von Anregungsspektren auftrat, wurden danach die Intensitäten der Anregungsspektren sämtlicher Emissionswellenlängen entsprechend einem Emissionsspektrum bei $\lambda_{exc} = 340$ nm korrigiert. Um anschließend die Emissionsspektren zu korrigieren, wurden durch einen Vergleich der jetzt korrigierten, gemessenen Werte der Anregungsspektren und den aus der Fluoreszenz abgelesenen Anregungsspektren eine Korrekturfunktion gebildet (Quotientenbildung). Wie in Abbildung 4.13 ersichtlich, weichen die Korrekturfunktionen für die einzelnen Emissionswellenlängen nur wenig und statistisch voneinander ab (Abweichung $< 7\%$). Das heißt einerseits, dass es sich bei

diesen Abweichungen um die Genauigkeit der Fluoreszenzmessungen handelt und andererseits, dass die Ausbleichung die spektrale Verteilung der Intensität nicht verändert. Durch Anwendung der gemittelten Korrekturfunktion auf die aus den Fluoreszenzspektren ermittelten Anregungsspektren werden diese mit den direkt gemessenen vergleichbar (siehe Abbildung 4.13).

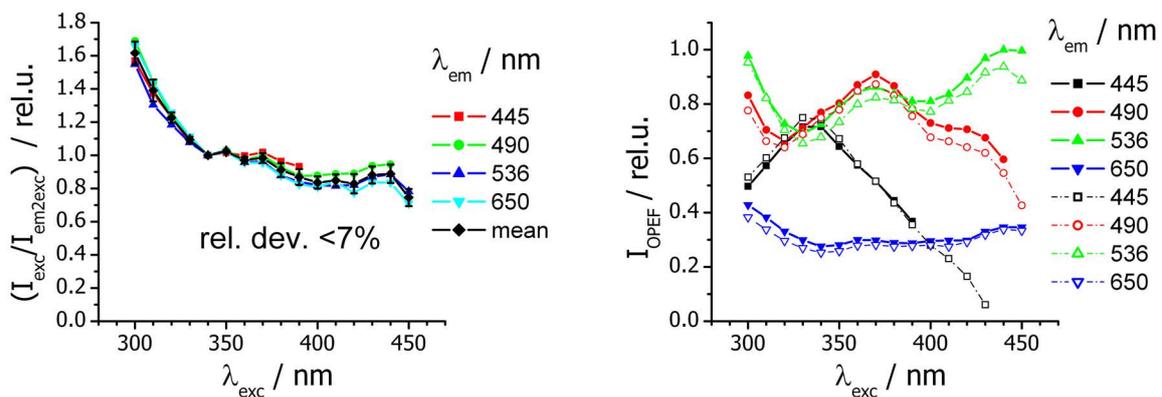


Abb. 4.13: Korrekturfunktionen aus den Quotienten der gemessenen und abgelesenen Anregungsspektren für die Emissionswellenlängen 445 nm, 490 nm, 536 nm und 650 nm (links). Im Mittel ergibt sich eine Korrekturfunktion mit einer Abweichung von < 7%. Vergleich der korrigierten Anregungsspektren von Eumelanin in (0,1M)NaOH-Lösung (rechts). Dabei ist das direkt gemessene Anregungsspektrum mit einer durchgezogenen Linie gekennzeichnet und das aus den Emissionsspektren ermittelte und korrigierte mit einer gestrichelten.

Auffällig an der Korrekturfunktion ist ihr exponentieller Abfall. Aufgrund der zeitlichen Abfolge der Messungen von Fluoreszenz- und Anregungsspektren kann angenommen werden, dass sich während der Fluoreszenzmessungen die Absorption noch stark veränderte, während sie bei den späteren Messungen der Anregungsspektren nahezu konstant blieb. Daraus folgt, dass die Korrekturfunktion die Abnahme der Absorption während der Emissionsmessungen widerspiegelt und mit einer monoexponentiellen Zerfallskurve beschreibbar ist. Diese besitzt, bei der insgesamt verstrichenen Messzeit von ca. 5 Stunden und der Annahme eines grundsätzlichen Unterschieds (Offsets) zwischen den Intensitäten der Anregungs- und Fluoreszenzspektren vom Faktor $y_0=0,8$, eine Zeitkonstante von ca. 1 Stunde (Erreichen des chemischen Gleichgewichts zwischen den verschiedenen großen Aggregaten).

4.3.4 Ergebnisse aus der Fluoreszenzspektroskopie und Folgerungen für ein Zustandsmodell des Eumelanins

Wie in Abbildung 4.14 zu sehen, wurden durch die Berücksichtigung des zeitlichen Ausbleichens der Eumelanin-Lösung die Fluoreszenz-Intensitäten im kurzwelligen Spektralbereich stark angehoben. Deutlich erkennbar ist eine Hauptfluoreszenzbande mit dem Maximum bei ca. $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$, welches sich ab einer Anregung größer $\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$ mit der Anregungswellenlänge rot-verschiebt (Interpretation siehe Abschnitt 4.4). Die Intensität der Hauptfluoreszenzbande bleibt bis auf zwei lokale Minima bei ca. $\lambda_{exc} = 330 \text{ nm}$ und $\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$ nahezu konstant, wobei das erstgenannte lokale Minimum der Hauptbandenintensität mit der

Ausbildung eines kurzwelligeren Fluoreszenzmaximums bei $\lambda_{em} = 450$ nm korreliert (siehe auch Abbildung 4.15). Diese Nebenbande fehlt in der von Nighswander erstellten Fluoreszenzkarte, ist aber für die folgende Modellentwicklung wichtig, da sie einen Beweis für konkurrierende Anregungszustände gleicher Anregungsenergie darstellt, die unterschiedliche Relaxationswege besitzen.

Gründe für das Fehlen dieser Nebenfluoreszenzbande bei Nighswander könnten in der Überlagerung durch eine Fluoreszenzbande des Lösungsmittels liegen, welche bei gering konzentrierten Eumelanin-Lösungen im gemessenen Spektrum die Eumelanin-Nebenfluoreszenzbande überdeckt. Durch Verwendung einer konzentrierten Eumelanin-Lösung konnte diese Nebenbande der Eumelanin-Fluoreszenz zugeordnet werden (siehe auch Abschnitt 4.3.3).

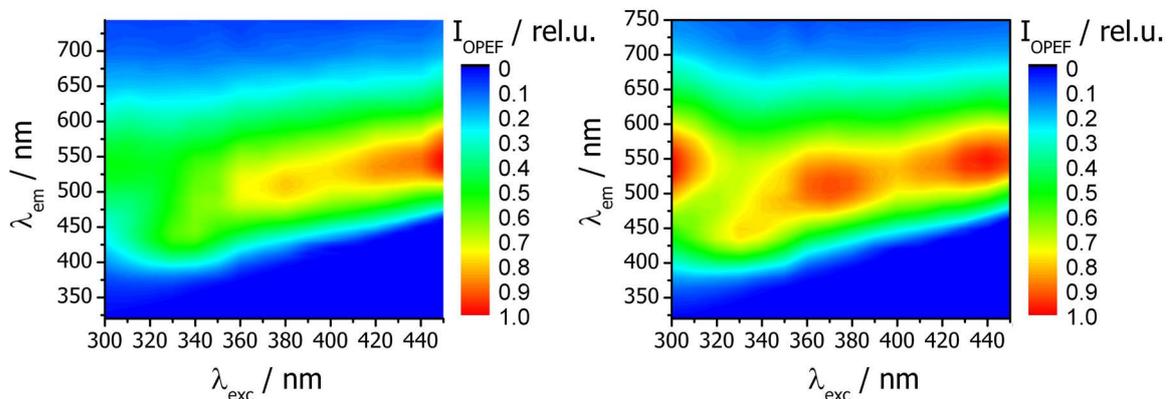


Abb. 4.14: Gegenüberstellung der OPEF-Karte ohne (links) und mit (rechts) Berücksichtigung des zeitlichen Ausbleichens der Eumelanin-Lösung

4.4 Entwicklung eines kaskadierten Zustandsmodells zur Beschreibung der beobachteten spektralen Eigenschaften des Eumelanins

Die Fluoreszenz nach 1-Photonen-Anregung ist zu komplex, um sie mit einem einfachen System aus einem oder zwei Anregungszuständen zu beschreiben. Stattdessen ist die beobachtete Verschiebung des Fluoreszenzmaximums bei Veränderung der Anregungswellenlänge nur durch einen Wechsel von angeregten elektronischen Niveaus erklärbar. Dies deckt sich auch mit der Beschreibung des kontinuierlichen Absorptionsspektrums durch eine Vielzahl von elektronischen Anregungszuständen. In professionellen Programmen zur Modellierung von molekularen Energiesystemen wird in solch einem Fall einer Vielzahl von Anregungszuständen eine spektrale Zustandsdichte oder englisch die „Density Of States“ (DOS) berechnet. Voraussetzung dafür ist neben dem Zugang zu entsprechender Software und Rechentechnik jedoch das Wissen über die geometrische Mikro- und Makrostruktur des Moleküls, was im Fall des Eumelanins nicht gegeben ist. Es ist jedoch möglich, die Zustandsdichte durch eine Anzahl von diskreten Zuständen zu nähern, unter der Voraussetzung, dass diese ausreichend dicht liegen, um die beobachteten spektralen Eigenschaften zu beschreiben.

Im Falle des Eumelanin-Aggregats können die beobachteten Fluoreszenz-Eigenschaften der Hauptbande jedoch nur über eine Kopplung der Anregungszustände beschrieben werden. Wie

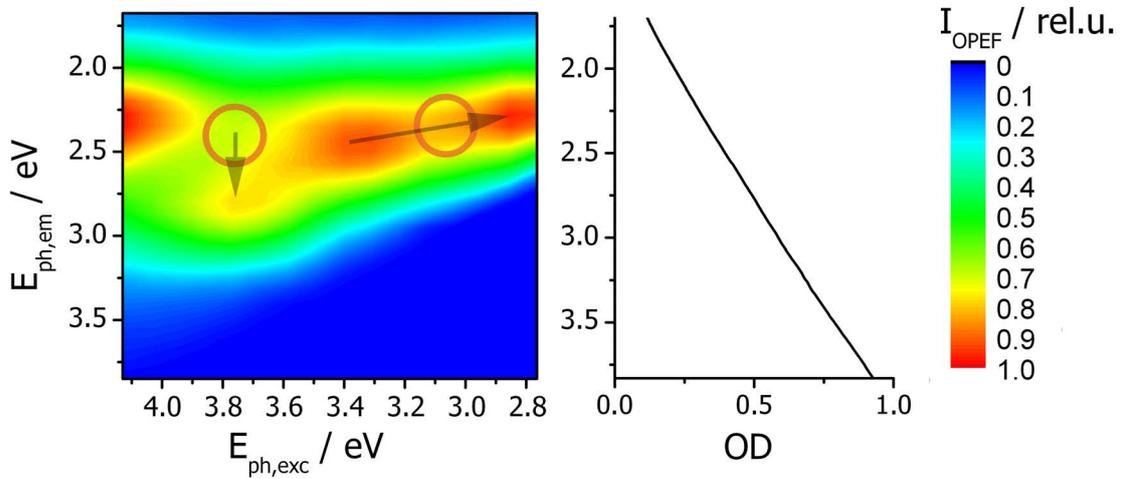


Abb. 4.15: Falschfarbenkarte der Emissionsspektren über der Anregungsenergie mit markierten Gebieten (Kreise) in denen konkurrierenden Relaxationswege zur Hauptbande angeregt werden. Der durch den ersten Konkurrenzprozess stattfindende Energietransfer aus der Hauptfluoreszenzbande in eine höherenergetische Fluoreszenznebenbande ist durch den senkrechter Pfeil gekennzeichnet. Die bereits bekannte Rotverschiebung der Hauptfluoreszenzbande bei Anregung mit Licht kleinerer Photonenenergie ist durch den 2. Pfeil markiert.

in Abbildung 4.15 zu erkennen ist, wird die Hauptfluoreszenzbande bei allen verwendeten Photonenenergien von $E_{ph,exc} = 4,1 \text{ eV}$ ($\lambda_{exc} = 300 \text{ nm}$) bis $E_{ph,exc} = 2,8 \text{ eV}$ ($\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$) angeregt. Das heißt, dass notwendigerweise im gesamten beobachteten Anregungsbereich der Fluoreszenzhauptbande untereinander gekoppelte Zustände existieren, über die die Anregung zu den Zuständen mit fluoreszierendem Übergang gelangt. In einem Jablonski-Schema kann dieses spektrale Verhalten durch eine Kaskade untereinander gekoppelter elektronischer Zustände beschrieben werden, durch die die Anregung zu Zuständen niederer Energie relaxiert. Die einzelnen Anregungszustände müssen dabei nicht Anregungszustände des gleichen Grundzustands sein. Vielmehr ist zu vermuten, dass, wie im Abschnitt 4.1.4 motiviert, verschiedene Absorber und Emittter im Aggregat vorliegen. Diese können nach den aktuellen Aggregat-Modellen räumlich dicht genug liegen, um untereinander Energie zu transferieren. Geht man z.B. von repräsentativen räumlichen Abständen zwischen Donoren und Akzeptoren von $r_{D-A} = 0,3 \text{ nm}$ (Abstand zweier Oligomerschichten) bis $r_{D-A} = 0,7 \text{ nm}$ (kleinste Aggregatsgröße mit nachgewiesenem eumelanin-typischen Absorptionsspektrum) aus und nimmt einen kritischen Försterradius von $R_0 = 5 \text{ nm}$ an (siehe Abschnitt 2.1.4), kann die Transferrate k_{FT} für einen Förster-Energietransfer über die Gleichung 2.21 abgeschätzt werden. Bei mittleren Donor-Zustandslebensdauern im ps-Bereich (siehe Tabelle 5.7) ergeben sich Transferraten $k_{FT} \gg 10^{15} \text{ s}^{-1}$ und damit Effizienzen des Energietransfers von $\eta_{ET} \approx 1$. Bei größeren Donor-Akzeptor-Entfernungen, wie sie z.B. bei größeren Aggregaten mit ($r_{D-A} = 9 \text{ nm} - 27 \text{ nm}$) vorkommen können, fällt die Transferrate auf $k_{FT} = 10^{10} \text{ s}^{-1} - 10^7 \text{ s}^{-1}$ ab. Die Effizienzen des Förster-Energietransfers würden in solchen Fällen nur noch $\eta_{ET} \approx 0,03 - 4 \cdot 10^{-5}$ betragen.

Da für die Effizienz eines Energietransfers nach Förster oder Dexter weiterhin nur die Energien der Übergänge, nicht aber die absoluten Energien der Zustände entscheidend sind (siehe Gleichung 2.20), ist eine Darstellung der an der Relaxation beteiligten Anregungszustände im Jablonski-Diagramm sinnvoll und die kaskadenförmige Relaxation über diese Anregungszustände wahrscheinlich. Dieses Modell bildet in der vorliegenden Arbeit die Grundlage für die Beschreibung der beobachteten spektralen Effekte durch energetische Prozesse im Eumelanin-Aggregat. Es wird im Folgenden Kaskadenmodell genannt.

In der Mitte der Abbildung 4.16 ist das Kaskadenmodell dargestellt. Die kleinen waagerechten Striche repräsentieren die verschiedenen Anregungszustände der 1. Stufe. Dabei wird, wie in Abschnitt 4.1.2 motiviert, von einer abnehmenden Zustandsdichte in Richtung der Anregungszustände kleinerer Anregungsenergien ausgegangen. Der Relaxationsprozess entlang der Kaskade ist durch die schwarzen Pfeile markiert, welche die einzelnen Energietransfers zwischen den Anregungszuständen symbolisieren. Die bei Anregungszuständen mit Übergangsenergien $E_{ph,em} < 3,1 \text{ eV}$ ($\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$) zu beobachtenden Fluoreszenzübergänge (Hauptbande) sind durch die roten Pfeile gekennzeichnet.

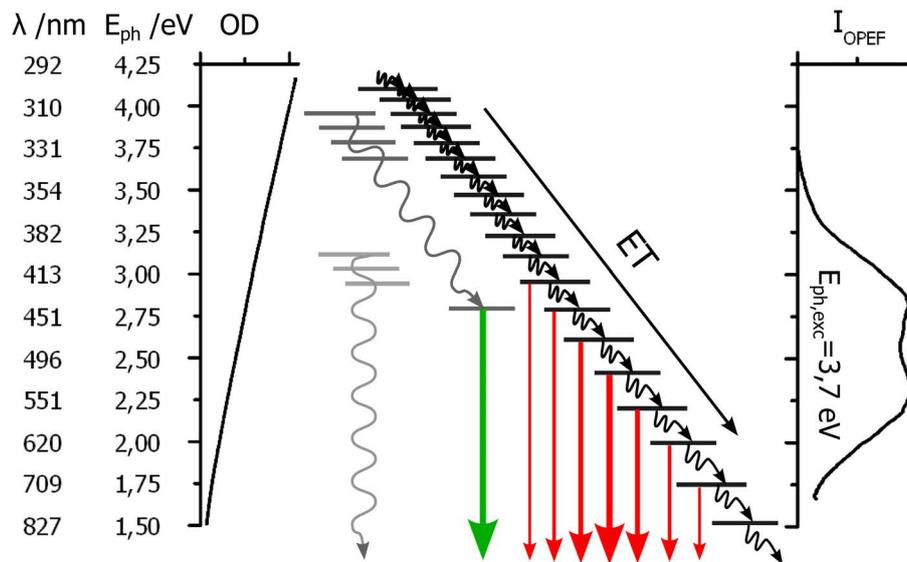


Abb. 4.16: Modell für das energetische System aus Anregungszuständen der 1. Stufe für Eumelanin / (0,1M)NaOH. Die schwarz gezeichneten Niveaus kennzeichnen Zustände, die zur Anregung der Hauptbanden-Fluoreszenz beitragen. Anregungszustände konkurrierender Relaxationsprozesse sind grau dargestellt. Strahlungslose Relaxationsschritte (Energietransfer+Vibronische Relaxation) sind als schwarze bzw. graue Pfeile eingezeichnet, strahlende Übergänge hingegen durch farbige Pfeile. Das Modell wird links dem korrelierten Absorptions- und rechts dem Fluoreszenzspektrum (bei $E_{ph,exc} = 3,7 \text{ eV}$) gegenübergestellt. Bei Anregung mit Photonen der Energie $E_{ph,exc} = 3,7 \text{ eV}$ ist im Fluoreszenzspektrum sowohl die Fluoreszenzhaupt- als auch die Fluoreszenznebenbande sichtbar.

Wie in Abschnitt 4.3.4 erwähnt, sind auch die beiden lokalen Minima der Fluoreszenzhaupt-

bande bei $E_{ph,exc} = 3,8 \text{ eV}$ ($\lambda_{exc} = 320 \text{ nm}$) und $E_{ph,exc} = 3,1 \text{ eV}$ ($\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$) für die Modellentwicklung wichtig.

Das lokale Minimum bei $E_{ph,exc} = 3,8 \text{ eV}$ ($\lambda_{exc} = 320 \text{ nm}$) korreliert mit dem Entstehen einer Fluoreszenznebenbande mit einem Fluoreszenzmaximum bei $E_{ph,em} = 2,8 \text{ eV}$ ($\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$). Das heißt, es wird bei niederenergetischerer Anregung plötzlich eine zusätzliche höherenergetische Fluoreszenz angeregt. Dieses Verhalten ist nur durch Anregungszustände zu erklären, die parallel zu den Anregungszuständen der Kaskade existieren und im Bereich um $E_{exc} = 3,8 \text{ eV}$ ($\lambda_{exc} = 320 \text{ nm}$) effektiver angeregt werden als die Zustände der Kaskade. Dieser Bereich von konkurrierenden Anregungszuständen besitzt einen eigenen Relaxationsweg über die genannte Fluoreszenznebenbande bei $E_{ph,em} = 2,8 \text{ eV}$ ($\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$).

In Abbildung 4.16 sind diese parallel existierenden Anregungszustände durch dunkelgraue waagerechte Striche dargestellt. Ob es sich dabei um mehrere elektronische Zustände handelt, oder um vibronische Zustände eines elektronischen Anregungszustands, kann an dieser Stelle nicht entschieden werden. Die Relaxation dieser Zustände zum fluoreszierenden Zustand ist durch einen dunkelgrauen Pfeil gekennzeichnet, die strahlenden Übergänge der beobachteten Fluoreszenznebenbande werden durch grüne Pfeile symbolisiert.

Eine mögliches Modell für diese konkurrierenden Anregungsprozesse wird in einer theoretischen Arbeit von Meng [Kax06, Men08] geliefert. Diese befasst sich mit einem geometrischen Eumelanin-Modell, in dem Indolderivate ein ringförmiges Oligomer bilden (ähnlich dem Porphyrin), welche sich danach in einem Aggregat stapeln können. In den Ringen gibt es zwei senkrecht aufeinander stehende Übergangsdipolmomente mit postulierten Emissionswellenlängen von $E_{ph,em} = 3,6 \text{ eV}$ ($\lambda_{exc} = 344 \text{ nm}$) und $E_{ph,em} = 2,7 \text{ eV}$ ($\lambda_{exc} = 460 \text{ nm}$).

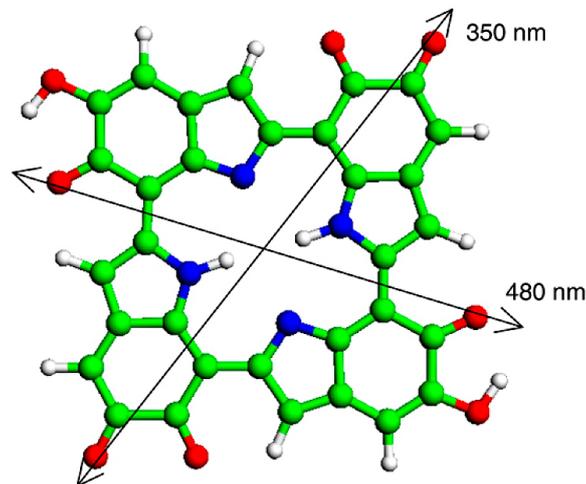


Abb. 4.17: Von Meng [Kax06, Men08] vorgeschlagene Substruktur des Eumelanin-Aggregats. Die Pfeile markieren die Richtung der Übergangsmomente für die beiden angegebenen Wellenlängen.

Bezüglich des zweiten lokalen Minimums der Fluoreszenzhauptbande bei $E_{ph,exc} = 3,1 \text{ eV}$ ($\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$) wird ebenfalls ein zur Kaskade konkurrierender Relaxationspfad vermutet, der im Gegensatz zum oben beschriebenen Fall strahlungslos verläuft. Dieser konkurrierende Relaxationspfad scheint bei direkter Anregung mit Photonen der Energie $E_{exc} = 3,1 \text{ eV}$ effizienter abzulaufen als die Relaxation entlang der zur Fluoreszenzhauptbande führenden

Kaskade.

In Abbildung 4.16 sind diese vermuteten Anregungszustände durch hellgraue waagerechte Striche dargestellt, die strahlungslose, alternativ zu Kaskade ablaufenden Relaxation durch hellgraue Pfeile.

4.5 1-Photon-Angeregte-Fluoreszenz von Eumelanin-Aggregaten unterschiedlicher Masse

Zur OPEF von fraktionierten Eumelanin-Aggregaten findet sich in der Literatur nur eine Arbeit über Sepia von Nofsinger und Simon [Nof01]. Dabei wurde sich auf Aggregatsfraktionen mit Aggregatsmassen im Bereich von $MW > 10$ kD bis $MW < 1$ kD beschränkt. Neben den Emissionsspektren bei Anregungswellenlängen von $\lambda_{exc} = 300$ nm, 325 nm und 375 nm wurden auch Anregungsspektren bei $\lambda_{em} = 400$ nm und 500 nm sowie die Fluoreszenzlebensdauern der Fraktionen bestimmt. Weiterhin wurde eine Fluoreszenzquantenausbeute abgeschätzt und festgestellt, dass diese abhängig von der Aggregatsmasse ist. Die leichtesten untersuchten Aggregate ($MW < 1$ kD) besitzen demnach eine ungefähr fünf mal größere Fluoreszenzquantenausbeute als die schweren Aggregate ($MW > 10$ kD). Allerdings wurde nicht darauf eingegangen, wie die Fluoreszenzquantenausbeute berechnet wurde. Da weder eine mittlere Aggregatsgröße noch eine Größenverteilung angegeben oder auf die verschiedenen großen Massenintervalle eingegangen wurde, ist anzunehmen, dass die Lösungen auf gleiche Optische Dichte gebracht und die gemessenen Fluoreszenzintensitäten direkt in Relation zueinander gesetzt wurden.

Außerdem wurde festgestellt, dass die leichten Aggregate ein strukturierteres Anregungsspektrum als die schwereren besitzen. Auch in der Breite und Lage der OPEF gab es Unterschiede zwischen den Fraktionen. Bei der Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda_{exc} = 300$ nm besaß die Fraktion der Aggregatsmasse $MW < 1$ kD ein Fluoreszenzmaximum bei $\lambda_{em} = 410$ nm, wohingegen das Fluoreszenzmaximum der schwereren Aggregate alle ein Maximum bei $\lambda_{em} \approx 500$ nm besitzen. Allerdings tritt dieses Verhalten nicht grundsätzlich auf. Bei zwei Anregungswellenlängen ($\lambda_{exc} = 350$ nm und 375 nm) liegen die Fluoreszenzmaxima aller Fraktionen übereinander. Außerdem ist in den OPEF-Spektren bei der Veränderung der Anregungswellenlänge von $\lambda_{exc} = 350$ nm auf 375 nm) keine Rotverschiebung des Fluoreszenzmaximums erkennbar. Auch die Breite der Fluoreszenz ändert sich uneinheitlich mit der Aggregatgröße. Besitzen die großen Aggregate bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{exc} = 300$ nm noch die breiteste Fluoreszenz, so wird diese mit längerwelliger Anregung immer schmaler und ist im Falle der Anregungswellenlänge $\lambda_{exc} = 375$ nm die schmalbandigste.

Diese Unterschiede in der Form des Fluoreszenzspektrums und der Fluoreszenzquantenausbeute sollten im folgenden Abschnitt am synthetischen Eumelanin untersucht werden. Hierbei war vor allem interessant, ob die Ergebnisse analog zu denen der Untersuchungen am Sepia sind und wie weit sie sich konsistent mit dem Kaskadenmodell beschreiben lassen.

4.5.1 Verwendete Geräte und Methoden zur Messung der OPEF-Spektren und Bestimmung der relativen Fluoreszenzquantenausbeute von fraktioniertem Eumelanin

Die OPEF-Spektren wurden, wie in Abschnitt 4.3.1 bereits beschrieben, am Fluorolog gemessen. Um die relative Quantenfluoreszenzausbeute zu bestimmen, wurden die Eumelanin-Lösungen der verschiedenen Fraktionen durch Verdünnen und mittels Extinktionsmessung per Carry 5 für die Wellenlänge $\lambda = 360$ nm auf eine gleiche Optische Dichte von $OD_{1\text{mm}} = 2,1 \pm 0,2$ gebracht. Da die Fluoreszenzspektren in diesem Fall nur bei einer Anregungswellenlänge $\lambda_{exc} = 360$ nm gemessen wurden und nur ein relativer Bezug der Fluoreszenzintensitäten zueinander nötig war, wurde auf weiterführende Korrekturen bezüglich Reabsorptions- und Filtereffekten verzichtet.

Anders wurde bei den OPEF-Messungen der neu erstellten Fraktionen mit Aggregatsmassen $MW < 10$ kD und $MW > 10$ kD verfahren. Da diese OPEF-Spektren auf spektrale Lage und Form untersucht werden sollten, wurden sie bezüglich Reabsorption und Filtereffekten korrigiert.

4.5.2 OPEF-Spektren und relativen Fluoreszenzquantenausbeuten von Eumelanin-Aggregaten unterschiedlicher Masse und Beschreibung der beobachteten Effekte mit Hilfe des Kaskadenmodells

Bei den Messungen der Fluoreszenzquantenausbeute zeigte sich, dass diese auch bei synthetischem Eumelanin von der Aggregatmasse abhängt (siehe Tabelle 4.1). Im Gegensatz zu Simons Messungen erreicht der Unterschied in der Fluoreszenz-Quantenausbeute fast eine Größenordnung, wobei die Fraktion der leichtesten Aggregate ($MW < 3$ kD) aufgrund der zu geringen optischen Dichte der Lösung nicht mit berücksichtigt werden konnte.

Molekülmasse(MW)	3-10kD	10-30kD	30-50kD	50-100kD	100-300kD	Ausgangslösung
I_{max} [counts]	1005899	287888	119931	110231	244100	365243
rel. $\eta_{Fluoreszenz}$	2,8	0,8	0,3	0,3	0,7	1

Tab. 4.1: Abgeschätzte relative Fluoreszenzquantenausbeute der jeweiligen Aggregatsgrößen-Intervalle

Um die OPEF-Spektren verschiedener Aggregatsgrößen auf spektrale Unterschiede zu untersuchen, wurden ergänzende Fluoreszenzmessungen an zwei neu filtrierten Fraktionen mit $MW < 10$ kD und $MW > 10$ kD durchgeführt. Die Separationsgrenze wurde deshalb auf $MW = 10$ kD gelegt, da unterhalb dieser Größe die stärksten Änderungen im Absorptionsspektrum und der Fluoreszenz-Quantenausbeute auftraten. Die zugrunde liegenden Messwerte weisen starke Unterschiede in der Signalamplitude auf $\frac{\eta_f(MW < 10\text{kD})}{\eta_f(MW > 10\text{kD})} \approx \frac{9}{1}$, wobei die absolute Fluoreszenz der <10 kD-Fraktionen die der >10 kD-Aggregate komplett beinhaltet (einhüllt). Im Gegensatz zu den von Nofsinger/Simon veröffentlichten normierten Spektren ist die normierte Fluoreszenzbande der schwereren Aggregate immer deutlich breiter als die der kleineren (siehe Abbildung 4.19). Gleichzeitig ist auch eine kontinuierliche Rotverschiebung der Fluoreszenzspektren mit längerwellig werdender Anregungswellenlänge erkennbar.

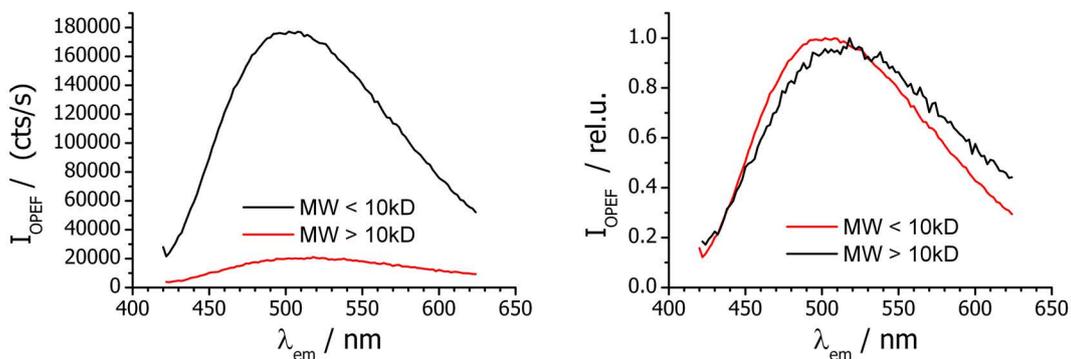


Abb. 4.18: Absolute (links) und normierte (rechts) Fluoreszenzspektren von Eumelanin-Fractionen mit einer Aggregatmasse größer bzw. kleiner $MW = 10\text{kD}$ bei Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda_{exc} = 410\text{ nm}$. In der linken Abbildung zeigt sich der große Unterschied in der Fluoreszenzquantenausbeute und in der rechten Darstellung die Rotverschiebung bei der Fluoreszenz größerer Aggregate.

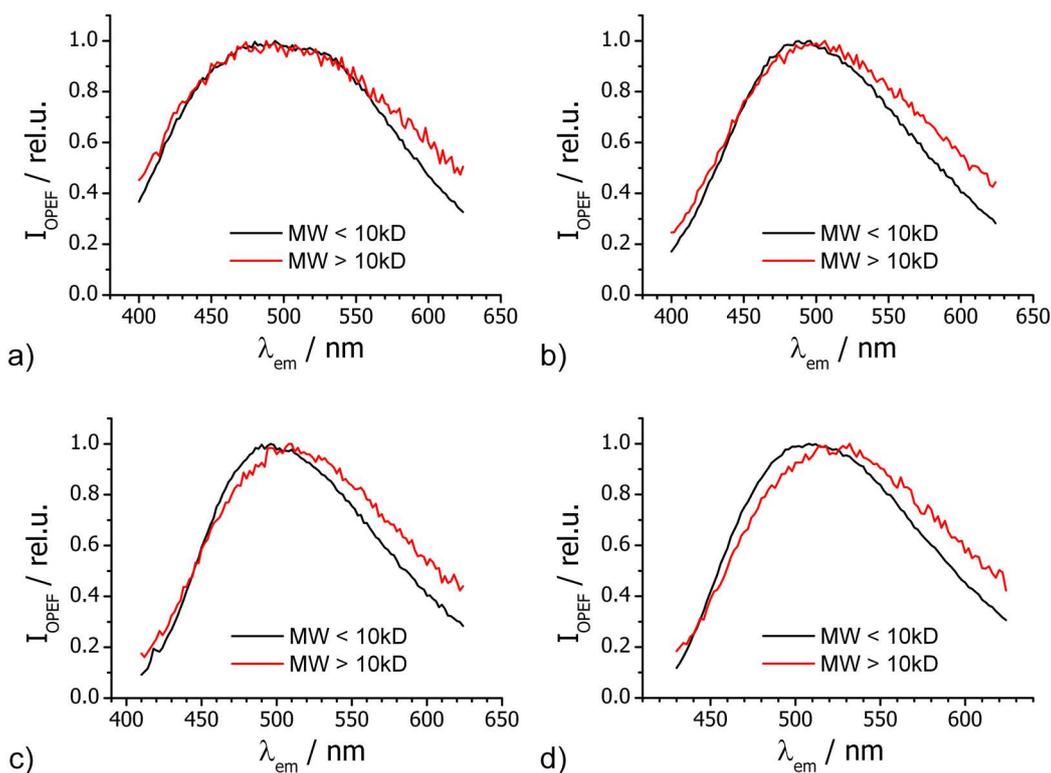


Abb. 4.19: Auswahl von normierten Fluoreszenzspektren der Fractionen mit den Aggregatmassen $MW < 10\text{kD}$ und $MW > 10\text{kD}$ bei Anregung mit Licht der Wellenlänge a) $\lambda_{exc} = 350\text{ nm}$; b) $\lambda_{exc} = 370\text{ nm}$; c) $\lambda_{exc} = 390\text{ nm}$ und d) $\lambda_{exc} = 410\text{ nm}$. Die Unterschiede in der Rauschamplitude zwischen den Fluoreszenzsignalen der beiden Fractionen ergeben sich aus der verschiedenen hohen Signalstärke.

Dieses Verhalten ist grundsätzlich zu beobachten und führt zu dem Schluss, dass die langwel-

ligen Fluoreszenzanteile bezüglich der kürzeren bei der >10 kD-Fraktion stärker gewichtet sind.

Unter der Annahme, dass es für jeden Anregungszustand der Kaskade alternative strahlungslose Relaxationsprozesse gibt, kann man die geringere und rotverschobene Fluoreszenz der größeren (schwereren) Aggregate mit dem Kaskadenmodell beschreiben. Als solche alternativen strahlungslosen Relaxationsprozesse kommen vor allem die Internal Conversion (IC) und die Vibrationsrelaxation (VR) in Frage. Durch die verstärkte Dimerbildung bzw. die größere Vielfalt an unterschiedlich lang durchkonjugierten Ketten bei größeren Aggregaten, ist ein Anstieg der Zustandsdichte bzw. eine Abnahme der energetischen Abstände benachbarter Anregungszustände zu vermuten (siehe Abbildung 4.20). Dadurch steigt die Übergangswahrscheinlichkeit per Energietransfer zwischen zwei benachbarten Anregungszuständen der Kaskade an und die Relaxation entlang der Kaskade findet bezüglich der konkurrierenden Relaxationswege effektiver statt. Das heißt aber, dass die relaxierende Anregung auf ihrem Weg in Richtung niederenergetischer Anregungszustände weniger Verluste erleidet und damit anteilig mehr niederenergetische Fluoreszenzniveaus bevölkert werden. Andererseits stellt die Relaxation entlang der Kaskade einen Konkurrenzprozess zur Fluoreszenz dar, weshalb die Fluoreszenzquantenausbeute größerer Aggregate viel geringer ist, da mehr Anregungszustände über die Kaskade relaxieren.

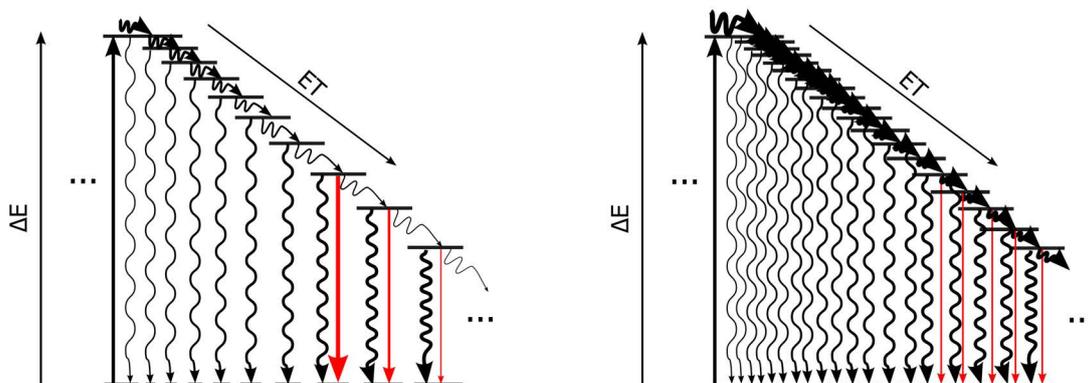


Abb. 4.20: Darstellung zweier Ausschnitte aus dem Kaskadenmodell - (links) für leichte und (rechts) für schwere Aggregate. Das Kaskadenmodell sagt aus, dass die Anregung im Wesentlichen über Energietransfers entlang einer Kaskade von Anregungszuständen relaxiert und dabei auch die Fluoreszenzniveaus bevölkert. Nach dem Modell findet parallel eine Relaxation der einzelnen Anregungszustände über Internal Conversion (IC) oder Intersystem Crossing (ISC) statt. Schwere und damit größere Aggregate verfügen wahrscheinlich über eine höhere Dichte von niederenergetischen Anregungszuständen als leichte. Deshalb sinkt die Energietransferrate leichter Aggregate entlang der Kaskade stärker als die der schweren Aggregate. Daraus ergibt sich eine rotverschobene Fluoreszenzhauptbande bei schwereren Aggregaten mit einer deutlich niedrigeren Fluoreszenzquantenausbeute.

4.6 1-Photon-Angeregte-Fluoreszenzanregungsspektren von Eumelanin

Wie schon in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt wurde, unterscheiden sich die Anregungsspektren von Eumelanin stark vom Absorptionsspektrum. Da sich bei Veränderung der Anregungswellenlänge auch das Fluoreszenzmaximum verschiebt, folgt außerdem, dass sich die Anregungsspektren unterschiedlicher Emissionswellenlängen ebenfalls von einander unterscheiden. Aus der Literatur [Mer06, Teu00, NR05a] ist dieser Sachverhalt bekannt. Modelle oder Erklärungen für diese Beobachtungen sind jedoch noch nicht vorhanden.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb überprüft, ob eine Beschreibung dieser Effekte mit dem Kaskadenmodell möglich ist. Das wäre grundsätzlich auch an bereits veröffentlichten Anregungsspektren möglich gewesen. Da sich allerdings die gemessene OPEF-Karte aus Abschnitt 4.3.4 von der in der Literatur zu findenden z.B. im Punkt der entdeckten Nebenbande unterscheidet, müssen sich auch die Anregungsspektren der hier verwendeten Eumelanin-Lösung von denen der Literatur unterscheiden. Um eine sinnvolle Grundlage für die Modellierung zu schaffen, wurden deshalb Anregungsspektren der verwendeten synthetischen Eumelanin-Lösung gemessen. Diese konnten außerdem, wie in Abschnitt 4.3.3 beschrieben, auch zur Verifizierung und Korrektur der Ausbleichung der Eumelanin-Lösung während der Fluoreszenz-Messreihe verwendet werden.

4.6.1 Verwendete Geräte und Methoden zur Messung der Anregungsspektren von synthetischem Eumelanin

Bei der Bestimmung des Anregungsspektrums der Lösung von synthetischem Eumelanin in (0,1M)NaOH ($C_{eumel} = 1,5 \text{ mg/l}$) wurde sowohl die Lösungsmittelfluoreszenz als auch die Reabsorption berücksichtigt. Dazu wurde jeweils das Anregungsspektrum des Lösungsmittels vom Anregungsspektrum der Eumelanin-Lösung abgezogen und die Reabsorptionseffekte auf das Spektrum durch Anwendung der Gleichung 4.5 entfernt. Die dafür nötigen Extinktionswerte wurden durch Messung des Absorptionsspektrums mittels Specord 40 (siehe auch Abschnitt 4.1.1) ermittelt. Die erhaltenen Anregungsspektren wurden abschließend durch Mittelwertbildung des jeweiligen Messwertes mit seinen beiden Nachbarwerten geglättet. Die resultierende spektrale Auflösung lag bei 6 nm.

4.6.2 Beschreibung der gemessenen Eumelanin-Anregungsspektren durch das Kaskadenmodell

Wie in Abbildung 4.21 zu sehen und oben schon erwähnt, ähneln die Anregungsspektren keinesfalls den Absorptionsspektren. Im Gegensatz zur Absorption besitzen die Anregungsspektren im Bereich der Hauptfluoreszenzbande einen plateauhaften Charakter mit zwei lokalen Minima bei $E_{ph,exc} = 3,7 \text{ eV}$ ($\lambda_{exc} = 335 \text{ nm}$) und $E_{ph,exc} = 3,15 \text{ eV}$ ($\lambda_{exc} = 394 \text{ nm}$), bevor die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der betrachteten Emissionswellenlänge abfällt. Anhand der Anregungsspektren bei $E_{ph,em} = 2,79 \text{ eV}$ ($\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$) und $E_{ph,em} = 2,39 \text{ eV}$ ($\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$) kann die Korrelation zwischen dem Einbruch der Fluoreszenzintensität der Hauptbande ($E_{ph,em} = 2,39 \text{ eV}$; $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$) und dem Entstehen der Nebenbande ($E_{ph,em} = 2,79 \text{ eV}$; $\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$) klar gezeigt werden. Daraus leitet sich die bereits in Abschnitt 4.3.4 beschriebene Vermutung ab, dass es im Eumelanin Zustände gleicher Anregungsenergie gibt, die

unterschiedliche Relaxationswege besitzen und somit konkurrieren.

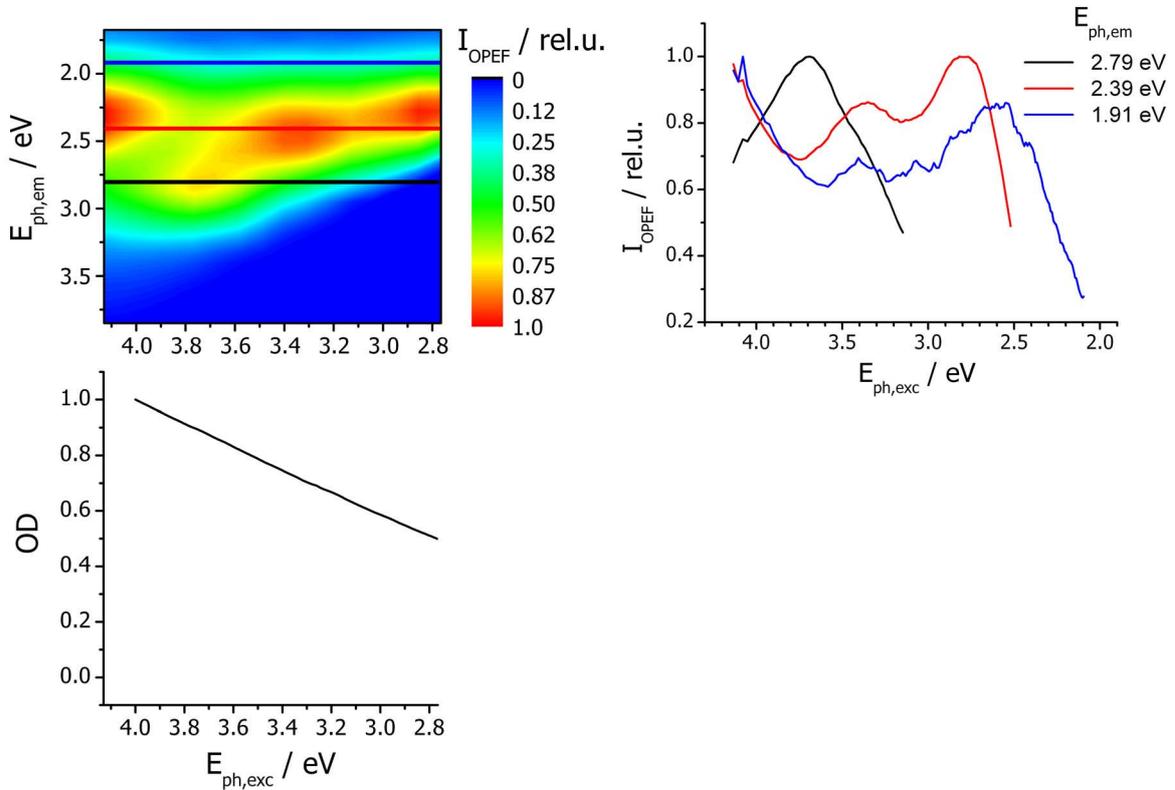


Abb. 4.21: Zuordnung von Anregungsspektren (rechts oben) und des Absorptionsspektrum (links unten) zur Fluoreszenzkarte. Klar erkennbar ist die fehlende Übereinstimmung zwischen Absorptionsspektrum und den Anregungsspektren. Gut gezeigt werden kann auch die Korrelation zwischen dem Einbruch der Fluoreszenzhauptbande (z.B. $E_{ph,em} = 2,39 \text{ eV}$ ($\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$)) und dem Entstehen einer Fluoreszenznebenbande ($E_{ph,em} = 2,79 \text{ eV}$ ($\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$)) bei Anregung mit Photonen der Energie $E_{ph,exc} = 3,8 \text{ eV}$ ($\lambda_{exc} = 326 \text{ nm}$).

Auch hier kann das Kaskadenmodell herangezogen werden, um mit einfachen Berechnungen den grundsätzlichen Unterschied zwischen dem Verlauf des Fluoreszenzanregungs- und Absorptionsspektrums plausibel zu beschreiben. Wie in Abschnitt 4.1.4 bereits gesagt, kann davon ausgegangen werden, dass die Dichte der Anregungszustände in Richtung niederenergetischer Anregungszustände abfällt. Proportional dazu steigt der energetische Abstand benachbarter Zustände der Kaskade an. Dadurch nimmt die Relaxation entlang der Kaskade zu Gunsten parallel ablaufender Relaxationsprozesse ab. Solche parallelen Relaxationsprozesse sind z.B. Internal Conversion (IC), Intersystem Crossing (ISC), die Vibronische Relaxation (VR) und die Fluoreszenz.

Für die Berechnung eines Anregungsspektrums wurde die Anregungseffizienz der an der Kaskade beteiligten Anregungszustände entsprechend des Absorptionsspektrums der Eumelanin-Lösung gewichtet (normiert). Der Abfall der Kaskaden-Anregungszustandsdichte in Richtung niederenergetischer Anregungszustände wurde durch eine proportional zum Absorptionsspektrum abnehmende Übergangswahrscheinlichkeit zwischen energetisch äquidistanten Modell-Anregungszuständen berücksichtigt. Diese Vereinfachung hatte den Vorteil, dass eine abneh-

mende Übergangswahrscheinlichkeit einfacher in einer Rechnung zu handhaben ist als eine sich verändernde Dichte von Anregungszuständen. Die jeweilige Übergangswahrscheinlichkeit zwischen zwei benachbarten Zuständen n und m wurde dabei durch das folgende Produkt gebildet:

$$p_{nm} = p_k \cdot OD_{rel}$$

Dabei steht p_k für den Ausgangswert der Übergangswahrscheinlichkeit und OD_{rel} für die auf 1 maximalwert-normierten Optischen Dichte.

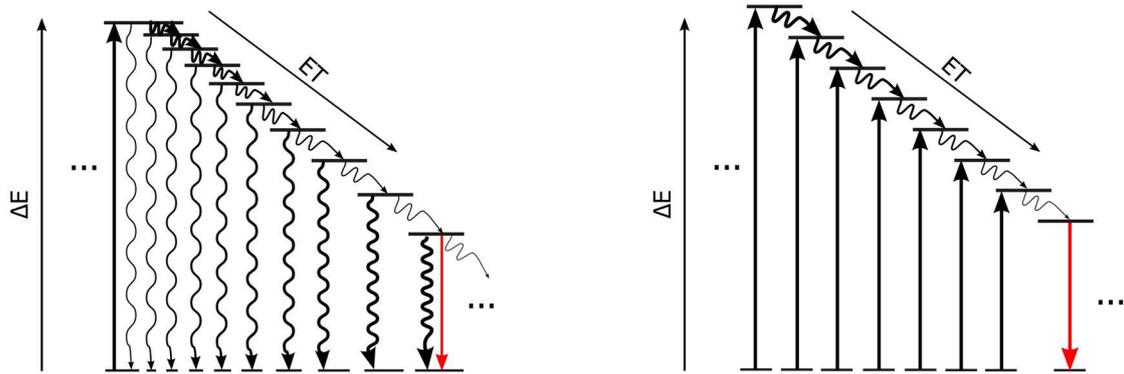


Abb. 4.22: Im Kaskadenmodell (links) wird angenommen, dass sich die Anregungszustandsdichte in Richtung niederenergetischer Übergänge ausdünn. Dadurch fällt die Übergangsrate per Energietransfer entlang der Kaskade ab, da die Anregungszustände eher über parallel ablaufende Wege wie die Internal Conversion und Vibrationsrelaxation relaxieren. Für ein Rechenmodell (rechts), dass die Diskrepanz zwischen Fluoreszenzanregungs- und Absorptionsspektrum beschreiben soll, ist diese abnehmende Übergangswahrscheinlichkeit wichtig, da sie die über die Absorption bevölkerten Anregungszustände bezüglich ihrer Relaxationswahrscheinlichkeit über das betrachtete Fluoreszenzniveau wichtet. Die abfallende Zustandsdichte wurde deshalb zur rechnerischen Vereinfachung durch eine äquidistante mit abnehmender Übergangswahrscheinlichkeit ersetzt. Das berechnete Anregungsspektrum ergab sich dann aus den für verschiedene Anregungszustände unterschiedlichen Anregungs- und Relaxationseffizienzen in das finale (betrachtete) Fluoreszenzniveau.

Um nun ein Anregungsspektrum zu ermitteln, wurde für jeden der betrachteten, durch Absorption bei λ_i bevölkerbaren Kaskaden-Anregungszustand i die resultierende relative Bevölkerung des festgelegten Fluoreszenzzustand $n_{fl,rel}$ berechnet:

$$n_{fl,rel} = n_{0,rel} \cdot j_{exc,rel} \cdot \sigma_{rel}(\lambda_i) \cdot \prod_i^k (p_{nm})$$

Dabei wurde für die relative Startbevölkerung des Grundzustandes $n_{0,rel} = 1$ und die relative Anregungsintensität $j_{exc,rel} = 1$ angenommen. Als relativer Absorptionsquerschnitt $\sigma_{rel}(\lambda_i)$ wurde die bei den jeweiligen (λ_i) gemessene, auf 1 maximalwert-normierten Optischen Dichte eingesetzt. k stellt die Anzahl der betrachteten Übergänge bis zum fluoreszenzierenden Übergang dar. Damit konnte dann das errechnete Anregungsspektrum durch Anpassung von p_k an das gemessene Anregungsspektrum angenähert werden.

In Abbildung 4.23 ist das Anregungsspektrum einem gemessenen gegenüber dargestellt. Da die Ausgangszustandsdichte der Eumelanin-Aggregate nicht bekannt ist, wurde im betrachteten Spektralbereich äquidistante Abstände von $\Delta E_{ph} = 0,05 \text{ eV}$ angenommen. Aus dieser Annahme ergab sich für ein $p_k = 0,049$ eine gute Annäherung des errechneten an das gemessene Anregungsspektrum.

Die Rechnung berücksichtigt keine direkt bei der Anregung konkurrierenden Anregungszustände, die zu den beobachteten Einbrüchen der Fluoreszenzintensität der Hauptbande bei $E_{ph,exc} = 3,7 \text{ eV}$ ($\lambda_{exc} = 335 \text{ nm}$) und $E_{ph,exc} = 3,15 \text{ eV}$ ($\lambda_{exc} = 394 \text{ nm}$) führen. Diese lokalen Minima sind deshalb nicht im berechneten Anregungsspektrum zu finden. Auch der Stokes Shift wurde in dieser einfachen Rechnung nicht berücksichtigt, weshalb der Abfall des simulierten Spektrums nicht so steil wie der des gemessenen ausfällt. Die Rechnung wird an der Stelle $E_{ph,exc} = E_{ph,em}$ unstetig, da es an dieser Stelle keinen Energietransfer entlang der Kaskade und somit keine Übergangswahrscheinlichkeit mehr gibt.

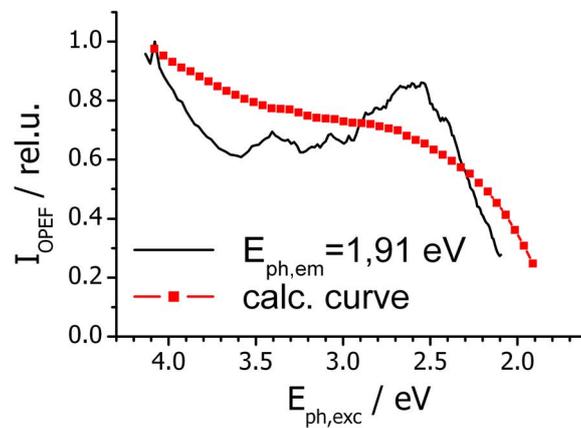


Abb. 4.23: Vergleich zwischen einem bei $E_{ph,em} = 1,8 \text{ eV}$ ($\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$) gemessenen und einem berechneten Anregungsspektrum. Die Berechnung stützt sich dabei auf das Kaskadenmodell, nachdem die Anregung im Wesentlichen über Energietransfers entlang einer Kaskade von Anregungszuständen relaxiert und dabei auch die Fluoreszenzniveaus bevölkert. Nach dem Modell findet parallel eine Relaxation der einzelnen Anregungszustände über Internal Conversion (IC) oder Intersystem Crossing (ISC) statt.

5 Erweiterung des Modells und Nachweis der schrittweisen 2-Photonen-Angeregten-Fluoreszenz mit Hilfe von Ergebnissen nichtlinear-spektroskopischer Methoden

Die Ergebnisse aus der linearen Spektroskopie ermöglichten die Entwicklung eines Zustandsmodells, mit dem die linear-spektroskopischen Eigenschaften des Eumelanins beschrieben werden können. Im Weiteren sollen nun die Ergebnisse der optisch nichtlinearen Methoden vorgestellt werden, die verwendet wurden, um z.B. die Lebensdauern der Anregungszustände der 1. Stufe zu bestimmen und bezüglich ihrer Konsistenz mit dem Kaskaden-Modell zu diskutieren. Weiterhin sollte die Frage beantwortet werden, in wieweit der vermutete schrittweise 2-Photonen-Anregungsprozess einer Fluoreszenz mit der schnellen Relaxation entlang der Kaskade vereinbart und ob ein Nachweis der schrittweisen TPEF erbracht werden kann.

5.1 Transiente Absorption von unfraktioniertem Eumelanin

In [Teu99, Teu00] wurde beobachtet, dass die TPEF von Eumelanin spektral nicht der OPEF bei Anregung mit Licht der halben Wellenlänge gleicht. Eine weitere Veröffentlichung [Sch07] berichtete von einer Anhebung der Eumelanin-TPEF im Hautgewebe bezüglich der TPEF anderer Fluorophore durch Verwendung langer Anregungspulse (Pulsdauern im ns-Bereich). Diese Beobachtungen implizierten, dass Eumelanin über eine schrittweise TPE zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Denn da bei einem schrittweisen 2-Photonen-Anregungsprozess ein Anregungszustand der 2. Stufe bevölkert wird, der über andere Prozesse relaxiert als ein mit den gleichen zwei Photonen simultan angeregter Zustand der 1. Stufe, wäre der Unterschied zwischen den Spektren erklärlich. Weiterhin würde die höhere Anregungseffizienz einer schrittweisen 2-Photonenanregung gegenüber der simultanen die Anhebung der Eumelanin-TPEF gegenüber Fluorophoren, welche nur zu einer simultanen TPEF fähig sind, erklären.

Für einen schrittweisen 2-Photonen-Anregungsprozess, welcher selbst mit Laserpulsen im ns-Bereich noch effektiv erreicht werden kann, sind jedoch auch Anregungszustände mit Lebensdauern im ns-Bereich erforderlich, aus denen eine Anregungszustandsabsorption erfolgen kann. Diese langlebigen Zwischenniveaus stehen auf den ersten Blick im Widerspruch zu den hohen Übergangsraten entlang der Kaskade bzw. der konkurrierenden Relaxationswege des entwickelten Modells.

Um längerlebige Anregungszustände für eine schrittweise TPA zu finden und gegebenenfalls auf Vereinbarkeit mit dem Kaskadenmodell zu überprüfen, mussten die Lebensdauern der für die schrittweise Anregung in Frage kommenden Zwischenzustände untersucht werden.

Aus veröffentlichten Ergebnissen von Ye und Simon [Ye03] zu Messungen der transienten

Absorption an Eumelanin waren schon globale Abklingzeiten bekannt. Dabei spiegeln die bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessenen Abklingzeiten bei Interpretation nach dem Kaskadenmodell die Lebensdauern von unterschiedlichen elektronischen Zuständen der Kaskade wider. Für die Pumpwellenlänge $\lambda_{pump} = 303 \text{ nm}$ ergaben sich nach [Ye03] für den Abfragebereich von $\lambda_{probe} = 500 \text{ nm} - 800 \text{ nm}$ folgende globale Lebensdauerkomponenten:

τ_1 /ps	τ_2 /ps	τ_3 /ps
$0,6 \pm 0,8$	$3,2 \pm 0,5$	31 ± 5

Tab. 5.1: Globale Abklingzeiten ($\lambda_{probe} = 500 \text{ nm} - 800 \text{ nm}$) der transienten Absorption für Sepia-Eumelanin nach einer Anregung bei $\lambda_{pump} = 303 \text{ nm}$ [Ye03]

Mit Blick auf das Kaskaden-Modell spricht die Tatsache, dass die bestimmten Lebensdauerkomponenten bei allen abgefragten Wellenlängen konstant sind, für eine nahezu konstante Übergangsrate der Relaxation entlang der Kaskade (siehe auch Abschnitt 5.1.2). Dabei stützen die sehr kurzen beobachteten Lebensdauern das Kaskadenmodell in der Weise, als dass sie für eine strahlungslose Relaxation (z.B. durch einen Energietransfer oder Internal Conversion) sprechen. Neben den Abklingkurven wurde jedoch auch ein Offset $y_0 \neq 0$ (siehe Gleichung 5.1) zwischen Start- und Endabsorption beobachtet. Dieser repräsentiert Abklingzeiten bzw. Lebensdauerkomponenten, die größer sind als der Messbereich von 130 ps. Hinter diesen langlebigen Komponenten könnten sich Zustände verbergen, die als Zwischenzustände für eine schrittweise TPEF dienen.

Aufgrund der inhomogenen morphologischen und komplexen spektroskopischen Eigenschaften des Eumelanins wäre es jedoch verwunderlich, wenn die vorkommenden Zustandslebensdauern grundsätzlich auf drei fixe Werte reduzierbar wären. Vielmehr wurde im Kapitel 4 gezeigt, dass es abhängig vom angeregten Zustand unterschiedliche Relaxationswege gibt. Diese mit dem spektralen Anregungsort variierenden Relaxationswege müssten sich auch in den Lebensdauer-messungen widerspiegeln.

Um einen besseren Überblick über die komplexen Relaxationsprozesse im Eumelanin zu erhalten, war es notwendig, verschiedene Anregungswellenlängen in die Lebensdauer-messungen einzubeziehen.

Neben den veröffentlichten Ergebnissen von Ye und Simon zur transienten Absorption existieren einige Arbeiten zu Fluoreszenzlebensdauer-messungen am Eumelanin. Die Ergebnisse dieser Messungen weichen jedoch relativ stark voneinander ab. Um dies zu verdeutlichen, wurde eine Auswahl dieser Fluoreszenzlebensdauerwerte in Tabelle 5.2 einander gegenübergestellt. Über die Gründe der Streuung können nur Vermutungen angestellt werden. Allerdings könnten Unterschiede im Lösungsmittel, der verwendeten Eumelanin-Charge oder Selfquenching-Effekte dafür in Frage kommen. Da das Selfquenching in den bisherigen Veröffentlichungen weder beschrieben noch berücksichtigt wurde, könnten Konzentrationsunterschiede der untersuchten Eumelanin-Lösungen zu den Abweichungen zwischen den beobachteten Lebensdauern geführt haben.

Aber auch über die Entwicklung der Zustandslebensdauer von Fluoreszenzniveaus in Richtung langwelligerer Emissionen gibt es je nach Quelle unterschiedliche Aussagen. Liu et al. [Liu03b] spricht von einer Erhöhung der Anteile längerlebiger Komponenten bei der längeren Emissionswellenlänge $\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$, Teuchner et al. hingegen von einer kontinuierlichen Abnahme der längerlebigen Anteile (bei $\lambda_{em} = 575 \text{ nm}$ zu $\lambda_{em} = 725 \text{ nm}$). Nightswander-Rempel et al. stellt wiederum fest, dass sich die Lebensdaueranteile im Bereich $\lambda_{em} = 500 \text{ nm} - 600 \text{ nm}$

Quelle Probe	Liu [Liu03b] Sepia/aqua dest.	Nighswander [NR07a] synt.Eumelanin/(0,1M)NaOH	Teuchner [Teu03] synt.Eumelanin/ (1M)KOH
λ_{exc}	370 nm	335 nm	400 nm
λ_{em}	520 nm	520 nm / 500 nm	500 nm
τ_1	58 ps \pm 7 ps	1 ns / 1 ns \pm 0,5 ns	140 ps \pm 30 ps
τ_2	0,51 ns \pm 0,07 ns	4 ns; / 3 ns \pm 1,5 ns	1,2 ns \pm 0,2 ns
τ_3	2,9 ns \pm 0,5 ns	10 ns / 9 ns \pm 2 ns	5,1 ns \pm 0,5 ns
τ_4	7,0 ns \pm 1 ns	–	–

Tab. 5.2: Vergleich von aus der Literatur bekannten Fluoreszenzlebensdauern τ_n . Die Ergebnisse variieren recht stark, was eventuell auf Unterschiede im Lösungsmittel, der verwendeten Eumelanin-Charge oder Selfquenching-Effekte zurückgeführt werden kann.

kaum ändern. Es bleibt festzuhalten, dass es auf jeden Fall längerlebige Anregungszustände im Bereich $\lambda = 600 \text{ nm} - 725 \text{ nm}$ gibt, die als Zwischenzustände für eine TPEF dienen könnten. Es bleibt festzustellen, dass die vorliegenden Daten zu inkonsistent sind bzw. noch nicht ausreichen, um eine Aussage zugunsten des Kaskadenmodells oder eines möglichen schrittweisen TPEF-Prozesses im roten Spektralbereich zu treffen. Deshalb wurden die Werte aus der Literatur mit eigenen Messwerten ergänzt.

Um, wie oben gesagt, einen Überblick über die komplexen Relaxationsprozesse im Eumelanin zu erhalten, wurden verschiedene Anregungswellenlängen in die Lebensdauermessungen einbezogen. Die ausgewählten Anregungs- und Abfrage-Wellenlängen $\lambda_{pump} = 600 \text{ nm} - 675 \text{ nm}$ ($E_{ph} = 1,77 \text{ eV} - 1,84 \text{ eV}$) und $\lambda_{probe} = 600 \text{ nm} - 750 \text{ nm}$ ($E_{ph} = 1,77 \text{ eV} - 1,65 \text{ eV}$) orientierten sich dabei an der in der Literatur bestehenden Datenlücke im roten VIS-Bereich, in welchem nach [Sch07, Teu00] auch die Möglichkeit einer schrittweise 2-Photonen-Anregung von Eumelanin vermutet wird.

5.1.1 Pump-Probe-Apparatur

Das grundsätzliche Pump-Probe-Messprinzip liegt in der Absorptionsmessung durch einen Abfragepuls (Probepuls) bezüglich des Zeitpunktes der optischen Anregung durch einen Pump-Puls. Dabei wird der Abfragezeitpunkt (Probepuls) schrittweise gegen den Anregungszeitpunkt (Pumpimpuls) verschoben und die vorhandene Ausbleichung der Lösung detektiert. Die zeitliche Verschiebung wird über eine Veränderung des optischen Weges des Pumpstrahls realisiert.

Die vorliegenden Messungen wurden an einem Pump-Probe-Aufbau der TU-Berlin durchgeführt. Der vollständige Aufbau ist schematisch in Abbildung 5.1 dargestellt.

fs-Laserquelle und Verstärkersystem Ausgangspunkt der Pump-Probe-Messung bildete ein Tsunami fs-Laser mit diodengepumptem Titan:Saphir-Oszillator. Aufgrund der spektralen Breite des Verstärkungsprofils des verwendeten Titan:Saphir-Kristalls, konnten Wellenlängen von ca. $720 \text{ nm} - 1000 \text{ nm}$ erzeugt werden. Es wurde eine Wellenlänge von $\lambda = 800 \text{ nm}$ ausgewählt, da dort die maximale Pulsenergie erreicht wird. Die dazugehörigen übrigen Laserstrahlparameter der Ausgangsstrahlung sind in Tabelle 5.3 aufgeführt. Die angegebene Repetitionsrate ergibt sich dabei aus der Umlaufzeit des einzelnen im Resonator der Länge $l = 1,83 \text{ m}$ umlaufenden Pulses. Weiterhin kann der Puls als bandbreitenbegrenzt, ungechirpt und mit zeitlich gaußförmigem Intensitätsprofil angenommen werden. Für einen solchen Puls

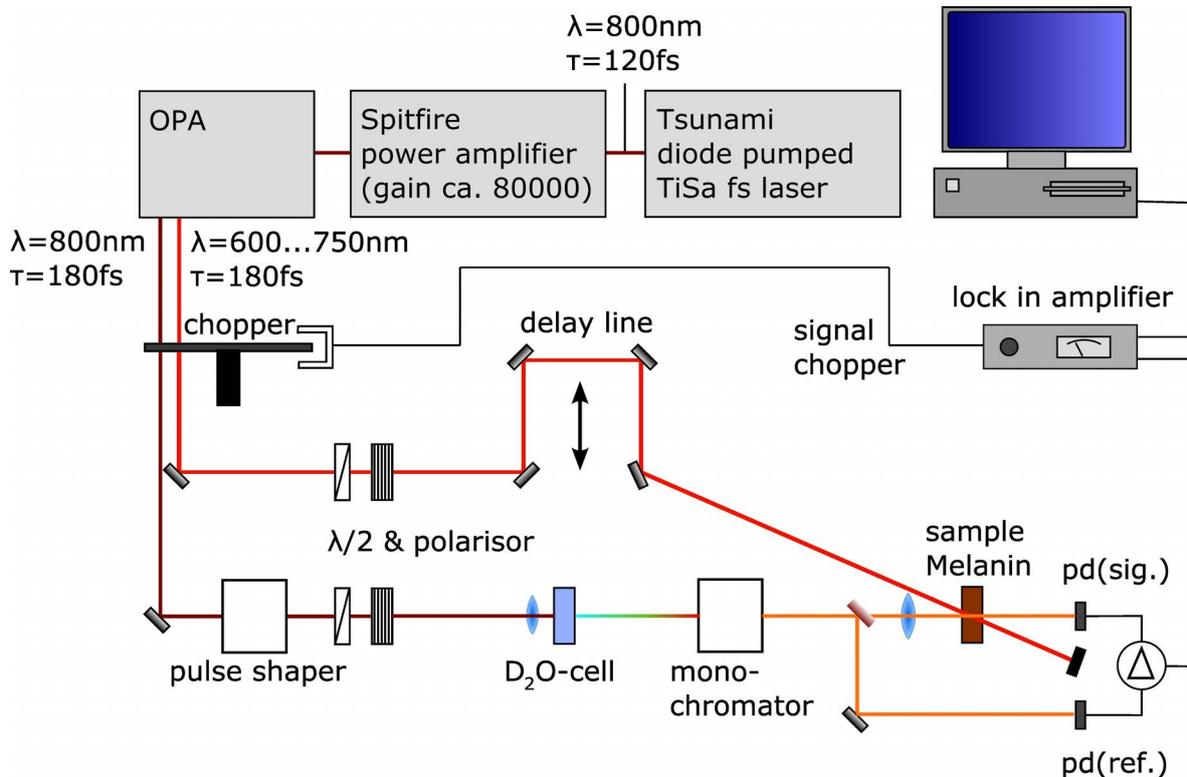


Abb. 5.1: Aufbau des Pump-Probe-Messplatzes (Erläuterungen im Text)

kann über das Zeit-Bandbreite-Produkt nach Gleichung (2.28) mit der gemessenen spektralen Halbwertsbreite von $\Delta\lambda \geq 11,6 \text{ nm}$ eine Pulsdauer von $\Delta t_p = 80 \text{ fs}$ abgeschätzt werden.

Da selbst die maximale Pulsenergie bei $\lambda = 800 \text{ nm}$ aus dem Oszillator nicht ausreicht, um eine Fluorophorlösung ausbleichen, wird die Pulsenergie innerhalb eines regenerativen Verstärkers (Spitfire) um den Faktor $8 \cdot 10^4$ gesteigert. Dazu wird als erstes die Pulsdauer durch Verwendung eines optischen Strecher auf ca. 130 ps erhöht. Als Strecher wird dabei ein Pulsshaper bezeichnet, der die einzelnen Wellenlängen des Pulses linear gegeneinander verschiebt. Dadurch entsteht ein zeitlich verbreiteter Puls mit linearem Chirp. Das Funktionsprinzip eines Pulsshapers beruht auf der spektralen Auffächerung eines Strahls durch ein Gitter und geometrisch unterschiedlich langer optischer Wege für die spektralen Komponenten des Strahls, bevor sie durch ein zweites Gitter wieder zusammengeführt werden.

Der so gedehnte Puls wird in den Verstärkerresonator eingekoppelt, der wieder einen Titan:Saphir-Kristall als Verstärkermedium besitzt. Mittels zweier Pockelszellen als Güteschalter wird der Puls im Verstärkerresonator freigeschaltet bzw. ausgekoppelt. Durch die erzeugte Dehnung des Pulses kann sichergestellt werden, dass die Pulsspitzenleistung des verstärkten Strahls unterhalb der Zerstörschwelle ($I_{krit} \approx 1 \frac{\text{GW}}{\text{cm}^2}$) des Verstärkermaterials bleibt. Der ausgekoppelte Strahl durchläuft einen weiteren Pulsshaper, welcher als Kompressor (inverser Strecher) fungiert und durch Übereinanderverschieben der spektralen Pulsbestandteile wieder einen weitgehend ungechirpten fs-Puls konvertiert. Technische Einzelheiten sind in [Las95a] zu finden. Das Resultat ist ein dem Ausgangspuls nahezu zeitlich unveränderter Puls mit erheblich höherer Energie, dessen Eigenschaften in Tabelle 5.3 aufgeführt sind.

Eigenschaften	nach dem Oszillator	nach dem Verstärker
Wellenlänge	800 nm	800 nm
Pulsdauer	80 fs	120 fs
Pulsenergie	9 nJ	720 μ J
Repetitionsrate	80 MHz	1 kHz
FWHM	11,6 nm	12 nm

Tab. 5.3: Eigenschaften des Laserstrahls am Ausgang des Tsunami fs-Lasers bzw. des Spitfire Verstärkers

Optisch Parametrischer Verstärker Um Pump-Probe-Messungen an Fluorophor-Lösungen durchführen zu können, musste das Pump-Licht an die Absorptionsbanden der jeweiligen Fluorophore angepasst werden. Durch die hohen Pulsenergien und die damit einhergehenden hohen Pulsspitzenleistungen war es möglich, den nichtlinearen Effekt der Frequenzkonversion zu nutzen, um eine Vielzahl von Pump-Licht-Wellenlängen zu erzeugen. Hierbei wurde eine spezielle Art der Frequenzkonversion verwendet, die Optisch Parametrische Verstärkung. Sie stellt eine Art der Differenzfrequenzmischung dar und gibt der Verstärkereinheit den Namen: Optisch Parametrischer Verstärker (Optical-Parametric-Amplifier, OPA).

Im verwendeten Aufbau wurde dazu ein Anteil von 3 – 4 % der 800-nm-Ausgangsstrahlung für eine Weißlichterzeugung in einem dünnen Saphirplättchen genutzt. Die für die spätere Pump-Probe-Messung gewünschte Pump-Wellenlänge wurde ausgeblendet und als Seed-Strahl für die Frequenzkonversion genutzt. Diese fand in einem anisotropen Beta-Barium-Borat-Kristall (BBO) statt. Zur optisch parametrischen Verstärkung des Seed-Strahls wurde zusätzlich der Ausgangsstrahl der Frequenz ω_p auf den BBO-Kristall gegeben. Aus diesen zwei Wellen wurde eine Hilfswelle (auch Idlerwelle) der Differenzfrequenz $\omega_i = \omega_p - \omega_s$ generiert und durch die Welle des Ausgangsstrahls verstärkt. Dabei muss die Phasenanpassungsbedingung $\Delta k = 0$ zwischen den drei Wellen erfüllt werden, um eine hohe Effizienz zu erreichen. Parallel zur Erzeugung der Hilfswelle wechselwirkte diese wiederum mit der Welle der Ausgangsstrahlung, wobei Licht der Differenzfrequenz $\omega_s = \omega_p - \omega_i$ generiert und der Seed-Strahl verstärkt wurde. Der so verstärkte Seed-Strahl wurde in einem weiteren BBO-Kristall frequenzverdoppelt und als Pump-Licht für die Pump-Probe-Messungen genutzt. Durch Verwendung der entsprechenden Wellenlänge des Seed-Strahls konnte so eine Pumpstrahl-Wellenlänge im Bereich von $\lambda_{pump,OPA} = 600 \text{ nm} - 800 \text{ nm}$ ausgewählt werden. Durch die zur Strahlumlenkung benötigten dielektrischen Spiegel engte sich dieser Bereich auf $\lambda_{pump} = 600 \text{ nm} - 700 \text{ nm}$ ein. Die übrige nicht konvertierte Ausgangsstrahlung der Wellenlänge $\lambda = 800 \text{ nm}$ verließ ebenfalls den OPA und wurde im Weiteren für die Erzeugung des Abfrage-Lichts verwendet.

Aufbau der Pumpstrahl-Strecke Um das Ausbleich-Signal einer Eumelanin-Lösung zu messen, war eine sehr empfindliche Detektion notwendig. Da das Rauschen des Umgebungslichts viel größer als das zu erwartende Signal war, wurde ein Lock-In-Verstärker genutzt, um das Messsignal herauszufiltern. Dafür passierte der Pumpstrahl nach dem Verlassen des OPAs einen Chopper, der den Strahl mit einer Frequenz von $f_{Pump} = 319 \text{ Hz}$ modulierte. Danach wurde er über einen Spiegel in einen variablen Abschwächer geleitet, welcher aus einem drehbaren $\frac{\lambda}{2}$ -Plättchen und einem nachfolgenden drehbaren Polarisationsstrahlteilerwürfel bestand. Damit war es möglich, die Polarisationsrichtung des Lichtes einer bestimmten Wellenlänge um einen beliebigen Winkel zu drehen. Das ist sinnvoll, um z.B. bei Pump-Probe-

Messungen an Lösungen kleiner Moleküle zwischen den Polarisationsrichtungen des Abfrage- und Pumpstrahls einen Magic Angle von $54,7^\circ$ einzustellen. Damit kann ein Signalverlust durch Orientierungsrelaxation vermieden werden [Men07].

Der abgeschwächte Pumpstrahl wurde anschließend über eine variable Verzögerungsstrecke (delay line) geführt. Diese bestand aus einem mittels Schrittmotor getriebenen Verschiebetisch, auf dem ein Spiegel-Paar befestigt war. Dieses Spiegel-Paar fungierte als Retroreflektor und reflektierte den Strahl parallel zum einfallenden Strahl zurück. Das Spiegelpaar konnte parallel zur optischen Achse des einfallenden/reflektierten Strahls verschoben werden, was eine programmgesteuerte Veränderung des optischen Pumpstrahl-Weges ermöglichte. So konnte der Pump-Puls kontrolliert gegenüber dem Probe-Puls verschoben werden. Eine Verschiebung des Retroreflektors um den Weg s entsprach einer zeitlichen Verschiebung zwischen Pump- und Probe-Puls von $\Delta t = \frac{2s}{c}$. In den vorliegenden Messungen wurde eine minimale Schrittweite von $s = 3 \mu\text{m}$ gewählt, was einer zeitlichen Auflösung der Ausbleich-Abklingkurven von $\Delta t = 20 \text{ fs}$ entspricht.

Danach wurde der Pumpstrahl in eine Linse der Brennweite $f = 140 \text{ mm}$ so durch die Messküvette fokussiert, dass der Fokus ca. 2 cm hinter dem Fokus des Abfragestrahls lag. Zusätzlich wurde der Fokusbereich des Pumpstrahls mit $200 \mu\text{m}$ doppelt so groß gewählt, wie der des Abfragestrahls. Damit konnte sichergestellt werden, dass der Abfragestrahl während seines Weges durch die zu untersuchende Lösung allzeit durch ein vom Pumpstrahl annähernd homogen ausgeleuchtetes Volumen läuft. Nach der Transmission durch die Lösung wurden die Reste des Pumpstrahls in einer Strahlfalle absorbiert.

Aufbau der Abfragestrahl-Strecke Der im OPA nicht wechselwirkende Anteil des Ausgangslichts mit $\lambda = 800 \text{ nm}$ wurde zur Weißlichterzeugung für die Erzeugung eines Abfragestrahles verwendet. Dazu durchlief das Licht zuerst das innere Chopperrad und wurde so mit einer Frequenz von $f_{\text{Probe}} = \frac{5}{6} \cdot 319 \text{ Hz} = 286 \text{ Hz}$ moduliert. Anschließend wurde der Strahl analog zum Pumpstrahl durch einen Abschwächer, bestehend aus $\frac{\lambda}{2}$ -Plättchen und Strahlteilerwürfel, geführt. Da die Lichtpulse beim Durchgang durch die optischen Komponenten des OPA Dispersion und somit eine Verbreiterung erfahren, wurden sie nach dem Abschwächer in einem Pulshaper komprimiert. Dies geschah wieder durch die Kompensation des linearen Chirps. Durch die kürzere Pulsdauer ergab sich zusätzlich eine höhere Pulsspitzenleistung, die zu einer effizienteren Weißlichterzeugung genutzt werden konnte.

Zur Weißlichterzeugung wurde das Licht ($E_{\text{puls}} \approx 90 \mu\text{J}$) mit einer Linse der Brennweite $f = 80 \text{ mm}$ durch eine Rotationsküvette mit schwerem Wasser (D_2O) gestrahlt. Das schwere Wasser eignet sich hervorragend für die Weißlichterzeugung, weil es eine hohe Konversionseffizienz aufweist und thermisch bzw. chemisch stabil ist [Els00, Gre08]. Durch die Drehung der Rotationsküvette und die zusätzlich damit einhergehende Durchmischung wurde die thermische Belastung des D_2O s gesenkt. Damit lassen sich stabile Weißlichtpulse mit Wellenlängen von 400 nm bis weit in den IR-Bereich generieren, die keine wesentlichen spektralen oder energetischen Fluktuationen aufweisen [The06, Gre08]. Das erzeugte Weißlicht wurde durch eine zweite Linse der Brennweite $f = 60 \text{ mm}$ kollimiert und in einen weiteren Pulshaper geführt.

In diesem Pulshaper wurde die spektrale Aufspaltung des Strahls durch das Gitter genutzt, um mit Hilfe einer Blende den Abfragestrahl mit einer spektralen Breite von $\Delta\lambda = 14 \text{ nm}$ aus dem Weißlichtspektrum zu schneiden. Dieser wirkte also als Monochromator. Gleichzeitig

wurde die Pulsdauer durch lineare Chirpanpassung für den Probenort (Messküvette) optimiert. Der Abfragepuls besaß nach dem Pulsshaper noch eine Energie von $E_{probe} \approx 40 \mu\text{J}$. Aus diesem Strahl wurde als Referenzsignal für die Lock-In-Filterung ein Anteil von ca. 15 % per Strahlteiler ausgekoppelt und zur Referenzphotodiode geführt. Der übrige Abfragestrahl wurde mittels einer Linse der Brennweite $f = 100 \text{ mm}$ durch die Messküvette fokussiert, wobei ein von der transienten Absorption der Lösung abhängiger Teil des Strahles durch die Lösung lief. Dieses Licht wurde abschließend durch eine Linse der Brennweite $f = 100 \text{ mm}$ kollimiert und auf die Signalphotodiode geführt.

	Spektralbereich	mittlere Leistung	Pulsdauer	Repetitionsrate	Fokusbereich
Anregungsstrahl	600 – 675 nm	1 mW	90 fs – 100 fs	1 kHz	200 μm
Abfragestrahl	600 – 750 nm	30 μW	120 fs – 150 fs	1 kHz	100 μm

Tab. 5.4: Überblick über die Parameter des Abfrage- und Anregungsstrahls

Pump-Probe-Messprinzip und Lock-In-Filterung Zur Bestimmung der Ausbleichung einer Lösung wurde der detektierte Intensitätsanstieg des Abfragestrahls bezüglich des vorher abgeteilten Referenzstrahls ermittelt. Dabei wurde vor der Messung die Intensität des Referenzstrahls so an die des Abfragestrahls angepasst, dass das Differenzsignal zwischen Signal(Abfragestrahl)- und Referenzphotodiode ohne Pump-Probe-Wechselwirkung Null ergab. Damit erhält man ein untergrundfreies Ausbleichsignal. Durch eine kontrollierte Veränderung der zeitlichen Abstände zwischen Anregungs- und Abfragepuls konnte der transiente Absorptionsverlauf (Abklingzeit der Ausbleichung) gemessen werden. Die maximal messbare Abklingzeit wurde durch die Länge der Verzögerungsstrecke bestimmt, wobei die zeitliche Auflösung der Pulsdauer des Probepulses entsprach. Zusammen mit der spektralen Auflösung der Pump-Probe-Messung, die sich im Wesentlichen durch die spektrale Breite des Probepulses ergab, stellten diese Größen die wesentlichen Messparameter der Pump-Probe-Messung dar. In Tabelle 5.5 wird ein abschließender Überblick über diese Parameterwerte gegeben.

spektrale Auflösung	max. messbare Abklingzeit	zeitliche Auflösung
12 nm	400 ps	120 fs – 150 fs

Tab. 5.5: Überblick über die für die Abklingzeit-Messung wichtigen Parameter der Pump-Probe-Apparatur

Durch Puls-zu-Puls-Instabilitäten des Lasers, Störfrequenzen des Raumlichts, natürliches Rauschen und Intensitätsschwankungen bei der Weißlichterzeugung wurde das Messsignal jedoch stark gestört. Daher musste es aus dem stark verrauschten Gesamtsignal gefiltert werden. Durch die sehr kurzen Pulse des Pump- und Probestrahls mit relativ hoher Pulsfrequenz (1 kHz) war eine Filterung durch eine Sample-and-Hold-Methode mit zeitlichem Gate (Torbreite) schlecht möglich. Stattdessen wurde der Pump- und Probestrahl als Quasi-Dauerstrichbetrieb (continuous wave, cw) aufgefasst. Durch die Amplituden-Modulation der beiden Strahlen mit einer bekannten Frequenz durch einen Chopper konnte das Signal nach der Lock-In-Methode gefiltert werden.

Der Lock-In stellt einen extrem schmalbandigen Bandenpassfilter dar und beruht auf dem Prinzip der Orthogonalität der Sinusfunktionen im Frequenzraum. Der Chopper moduliert die Strahlen des Messsignals (Pump- und Probestrahlen) trapezförmig (Superposition verschiedener Sinus-Funktionen). Gleichzeitig werden am Chopper durch Gabellichtschranken ebenfalls trapezförmige Referenzwellen gleicher Frequenz ν_{ref} zur Pump- und Probestrahl-Modulation erzeugt. Im Lock-In-Verstärker wird dieses Referenzsignal mit dem Messsignal U_{in} gleicher Phase ($\Delta\varphi = 0$) multipliziert. Das Produktsignal wird abschließend durch einen Tiefpass der Grenzfrequenz $\frac{1}{T}$ geglättet. Rechnerisch ergibt sich für das Ausgangssignal im vereinfachten Betrachtungsfall einer einfachen sinusförmigen Modulation somit:

$$U_{out}(t) = \frac{1}{T} \int_t^{t+T} \sin(2\pi\nu_{ref} \cdot s + \Delta\varphi) \cdot U_{in}(s) ds$$

$$\Rightarrow U_{out}(t) \propto U_{in}(s) \quad \Leftrightarrow \quad \Delta\varphi = 0 \quad \wedge \quad U_{in}(s) = \sin(2\pi\nu_{ref} \cdot s)$$

Es tragen also nur die innerhalb der Integrationszeit T zu den Zeitpunkten s aufgenommenen Signale $U_{in}(s)$ zum Ausgangssignal bei, die die Modulationsfrequenz ν_{ref} und die Phase des Referenzsignals φ besitzen, sprich das Messsignal. Sämtliche anderen Störsignale werden unterdrückt.

Da der gechopperte spätere Probestrahl eine Weißlichterzeugung durchlief, in der Intensitätsschwankungen auftraten, kam es zu einem Störanteil, der die Frequenz des Messsignals aufwies und so nicht herausgefiltert werden konnte. Deshalb wurden Probe- und Pumpstrahl mit leicht unterschiedlichen Frequenzen moduliert, wobei sich das Wechselwirkungssignal (Ausbleichung) als Schwebung der beiden Frequenzen ergab. Aus den beiden Lock-In-Referenzsignalen für die Probe- und Pumpstrahlmodulation wurde durch Subtraktion eine entsprechende Referenz-Schwebung generiert. Durch die Lock-In-Filterung mit dieser zusätzlichen Schwebungsfrequenz war es somit möglich, die mit der Probestrahl-Modulation korrelierenden Störungen des streuenden Weißlichts stärker zu unterdrücken.

5.1.2 Bestimmung und modellbezogene Interpretation der Lebensdauerkomponenten

Als Probe wurde wieder Eumelanin in (0,1M)NaOH-Lösung verwendet. Um ein gutes Messsignal zu erzeugen, wurde eine Küvette mit einer durchstrahlten Länge von $d = 2$ mm als Probenbehälter ausgewählt. Die Eumelanin-Konzentration wurde so eingestellt, dass sie bei dieser Schichtdicke und einer Wellenlänge $\lambda = 650$ nm eine Absorption von $OD = 1,0$ besaß. Der Signal-Offset zwischen Signal- und Referenzphotodiode wurde nach jedem Wechsel der Anregungswellenlänge neu abgeglichen. Nach der Pump-Probe-Messung wurde die Messung des Absorptionsspektrums wiederholt, um zu kontrollieren, ob die Lösung keine bleibende Ausbleichung erlitten hat. Wie in Abbildung 5.2 zu sehen ist, wurde eine geringe Ausbleichung im langwelligen Spektralbereich beobachtet, die wahrscheinlich dem in Abschnitt 4.3.3 beschriebenen zeitlichen Ausbleicheffekt zugeordnet werden kann.

Wie im Grundlagenteil in Abschnitt 2.1.3 beschrieben, ist die Bestimmung von Zustandslebensdauern immer an ein Modell gekoppelt. Im vorliegenden Fall wurde das Kaskadenmodell als Grundlage für die Interpretation der durch die Pump-Probe-Messung ermittelten Abklingzeiten genutzt.

Nach dem Kaskadenmodell existieren im Eumelanin-Aggregat eine Vielzahl von Anregungszu-

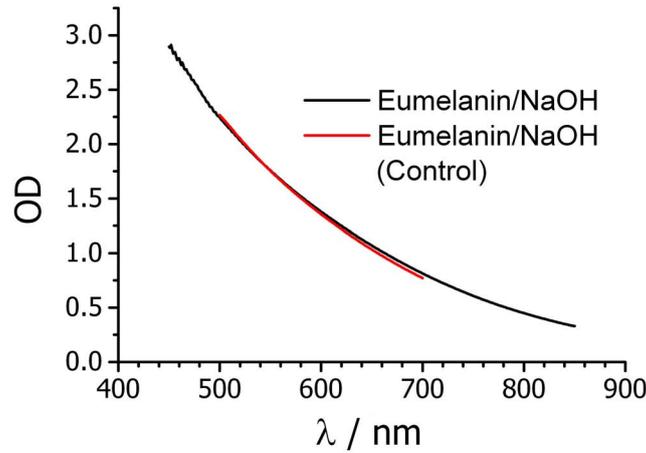


Abb. 5.2: Absorptionsspektrum von Eumelanin in (0,1M)NaOH-Lösung mit einer eingestellten Absorption von $OD_{2\text{mm}} = 1,0$ bei $\lambda = 650$ nm vor (schwarz) und nach (rot) den Pump-Probe-Messungen. Dabei wurde eine leichte Ausbleichung der Lösung beobachtet, die wahrscheinlich dem in Abschnitt 4.3.3 beschriebenen zeitlichen Ausbleicheffekt entspricht.

ständen mit verschiedenen Anregungsenergien und separaten Grundzuständen. Dabei können die einzelnen Anregungszustände untereinander mittels Energietransfers wechselwirken, wodurch sich eine kaskadenförmige Relaxation von Anregungszuständen hoher Übergangsenergien zu Anregungszuständen mit niedrigen Übergangsenergien vollzieht. Außerdem wurde im Abschnitt 4.3.4 gezeigt, dass abhängig von der Photonenenergie des Anregungslichts unterschiedliche Relaxationswege parallel zur Relaxation entlang der Kaskade beobachtet werden können.

Aufgrund dieser komplexen spektroskopischen Relaxationskinetik wurden die in Tabelle 5.6 aufgelisteten Kombinationen von Anregungs- und Abfragewellenlängen verwendet, um einen, im Rahmen des Kaskadenmodells, sinnvollen Überblick über die vorkommenden Lebensdauern der Anregungszustände zu erlangen.

Wie in der Tabelle ersichtlich, wurden einerseits die transienten Absorptionen direkt am spektralen Anregungsort abgefragt. Im Rahmen des Kaskadenmodells entspricht das einer Abfrage der durch Licht angeregten Zustände. Andererseits wurden die transienten Absorptionen in einer spektral rotverschobenen Entfernung von $\Delta\lambda = 50$ nm bezüglich der Anregungswellenlänge gemessen. Nach dem Kaskadenmodell sollten dort nur transiente Absorptionen messbar sein, wenn es einen Energietransfer vom angeregten Zustand zu diesem abgefragten Anregungszustand gibt. Die Idee dahinter bestand im Nachweis einer Relaxation entlang der Kaskade und der Untersuchung der Übergangsrate (Energietransferrate) entlang der Kaskade.

λ_{pump}	600 nm	625 nm	650 nm	675 nm
λ_{probe}	600 nm 650 nm	625 nm 675 nm	650 nm 700 nm 750 nm	675 nm 725 nm

Tab. 5.6: Übersicht über die in den Pump-Probe-Messungen verwendeten Anregungs- und Abfragewellenlängen

Die gemessenen und in den Abbildungen 5.3 und 5.4 dargestellten Kurven der transien-

ten Absorptionen wurden im Falle einer Ausbleichung invertiert. Nur bei der gemessenen Anregungszustandsabsorption (Excited State Absorption, ESA) bei $\lambda_{pump} = 650\text{ nm}$ und $\lambda_{probe} = 750\text{ nm}$ in Abbildung 5.4 wurde auf eine invertierte Darstellung verzichtet. Diese Abklingkurven können, wie in Abschnitt 2.1.3 erläutert, als Summe mehrerer Komponenten aufgefasst werden.

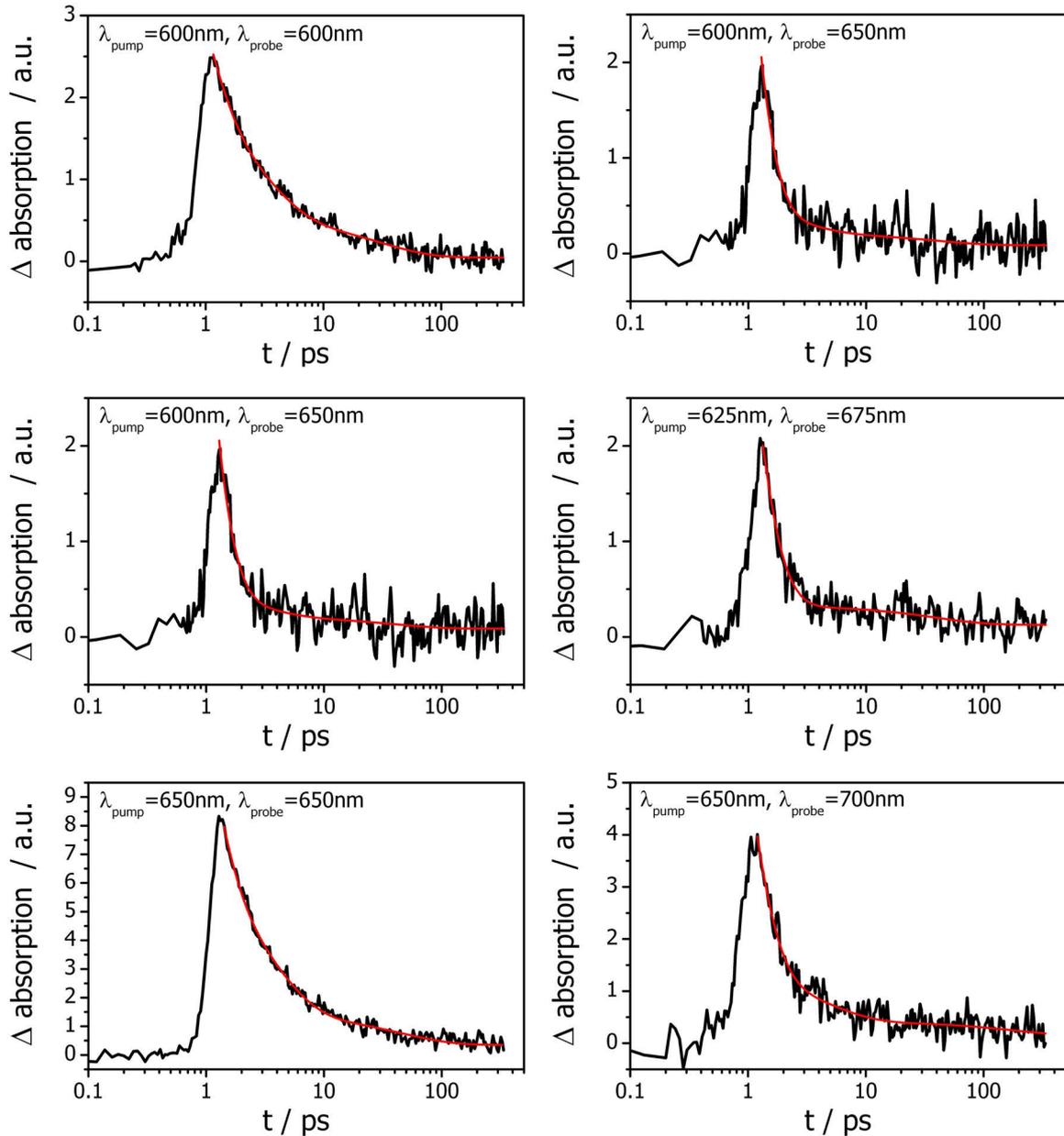


Abb. 5.3: Gemessene Abklingkurven (schwarz) der Ausbleichung von Eumelanin in (0,1M)NaOH-Lösung bei Anregung und Abfrage der angegebenen Wellenlänge λ_{pump} und λ_{probe} und den angefitzten Abklingfunktionen (rot). Alle hier gezeigten Abklingkurven wurden invertiert.

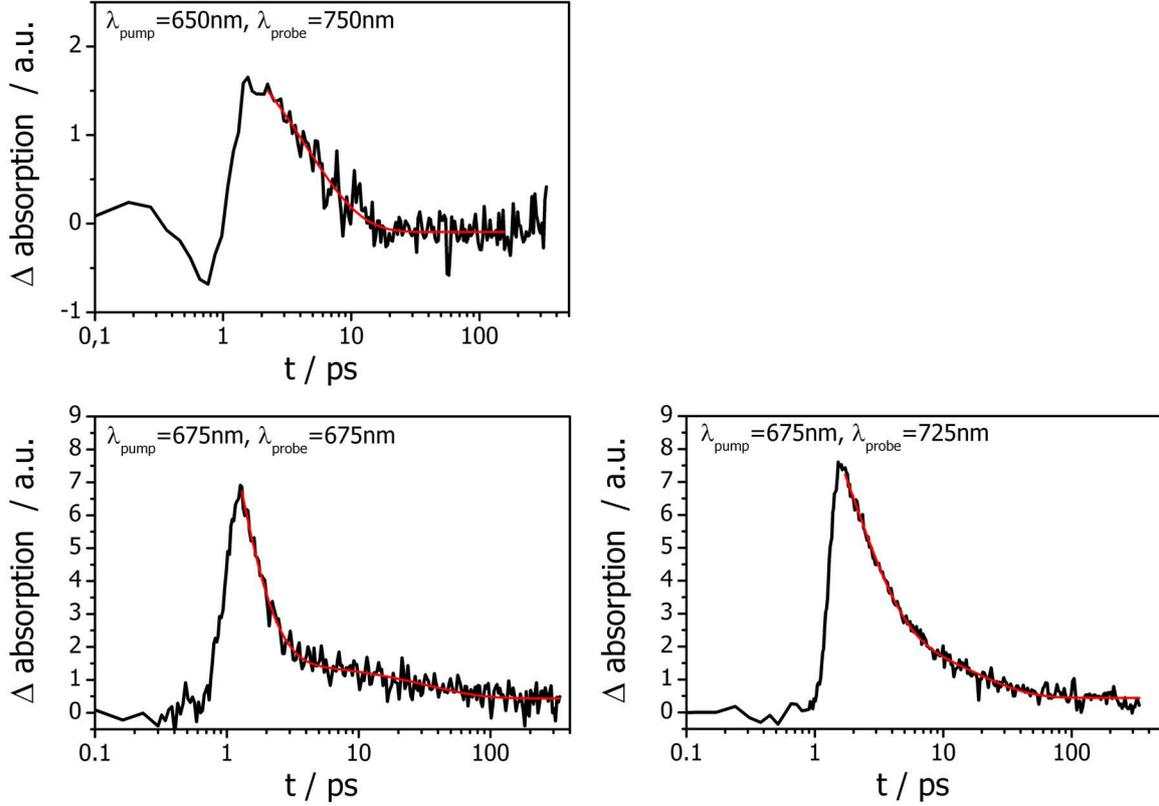


Abb. 5.4: Fortgesetzte Darstellung der gemessenen Abklingkurven (schwarz) einer Anregungszustandsabsorption (oben links) und von Ausbleichungen von Eumelanin in (0,1M)NaOH-Lösung bei Anregung und Abfrage der angegebenen Wellenlänge λ_{pump} und λ_{probe} und den angefitzten Abklingfunktionen (rot). Die hier gezeigten Abklingkurven der Ausbleichung wurden invertiert.

Im Rahmen des Kaskadenmodells ist es dabei durchaus plausibel, dass bei jeder Probe-Wellenlänge mehrere Komponenten mit spezifischen Lebensdauern zu finden sind. Nach dem Modell steht jede dieser gefundenen Komponenten für eine der parallel stattfindenden Relaxationen. Deshalb wurden nach dem Vorbild von Gleichung 2.17 als Fit-Funktionen Summen von einfach-, zweifach- oder dreifach-exponentielle Abklingfunktionen gewählt:

$$y = y_0 + A_1 \cdot e^{-\frac{t-t_0}{\tau_1}} + A_2 \cdot e^{-\frac{t-t_0}{\tau_2}} + A_3 \cdot e^{-\frac{t-t_0}{\tau_3}} \quad (5.1)$$

Die Größen t_0 und y_0 repräsentieren dabei den Zeit- bzw. Messgrößen-Offset. Der Wert von t_0 wurde auf den jeweiligen Startpunkt des zu fittenden Abfalls festgelegt. Der y_0 -Offset konnte als transiente Absorption mit einer Abklingzeit außerhalb des Messbereichs $\tau = 400$ ps aufgefasst werden, da durch den Vergleich der Absorption der Eumelanin-Lösung vor und nach der Pump-Probe-Messung kein permanentes Ausbleichen beobachtet werden konnte. Jeder der Exponentialterme ($A_n \cdot e^{-\frac{t-t_0}{\tau_n}}$) steht für einen spezifischen Relaxationsweg, dessen Lebensdauer τ_n oder Übergangsrates $k_{a \rightarrow b} = 1/\tau_n$ eine Amplitude der Größe A_n zur Summe beisteuert.

Um zu bestimmen, aus wie vielen parallel ablaufenden Relaxationen die Abklingkurve gebildet

wird, wurde das minimal notwendige Set an Exponentialtermen abgeschätzt. Dazu wurde die gemessene Kurve zuerst mit einer einfach-exponentiellen Abklingfunktion gefittet und nur dann schrittweise um einen Exponentialterm erweitert, wenn dadurch der Abweichungsprüfwert χ_{dev}^2/DoF um 10% (Erfahrungswert) verringert werden konnte. Dabei ist χ_{dev}^2 die Summe der quadrierten Messpunktabweichungen von der Fitkurve und DoF (Degree of Freedom, Freiheitsgrad) die Differenz zwischen Messpunktanzahl und Anzahl der Fitparameter. Als Programm für die Durchführung der Fits wurde dabei OriginPro der Firma OringinLab Cooperation verwendet.

Auf den ersten Blick ist bei den Diagrammen in Abbildung 5.3 erkennbar, dass die transienten Absorptionsverläufe auf der rechten Seite der Abbildung insgesamt schneller abklingen als die auf der linken. Nach dem Kaskadenmodell würde das bedeuten, dass die direkt durch Anregungslicht bevölkerten Anregungszustände im Mittel langsamer relaxieren als die indirekt, durch die Kaskade bevölkerten Zustände. Eine genauere Analyse ist jedoch erst mit den ermittelten Lebensdauerkomponenten bzw. deren Amplituden möglich.

In Abbildung 5.5 sind im linken Diagramm die aus den Abklingkurven ermittelten Lebensdauern τ_n über der Probewellenlänge aufgetragen. Im rechten Diagramm sind die entsprechenden Anteile (Amplituden) A_n an der einhüllenden Abklingkurve eingezeichnet. Die bei einer Abfragewellenlänge festgestellte kürzeste Zustandslebensdauer τ_1 und die dazugehörigen Amplituden A_1 wurden jeweils rot dargestellt. Längere Zustandslebensdauern und ihre Amplituden wurden grün (τ_2, A_2) und schwarz (τ_3, A_3) eingezeichnet. Die quadratischen Symbole kennzeichnen Werte, bei denen für die Anregung und die Abfrage die gleiche Wellenlänge verwendet wurde. Bei Kreis-Symbolen wurde bezüglich der Abfragewellenlänge eine um 50 nm kürzere Anregungswellenlänge verwendet.

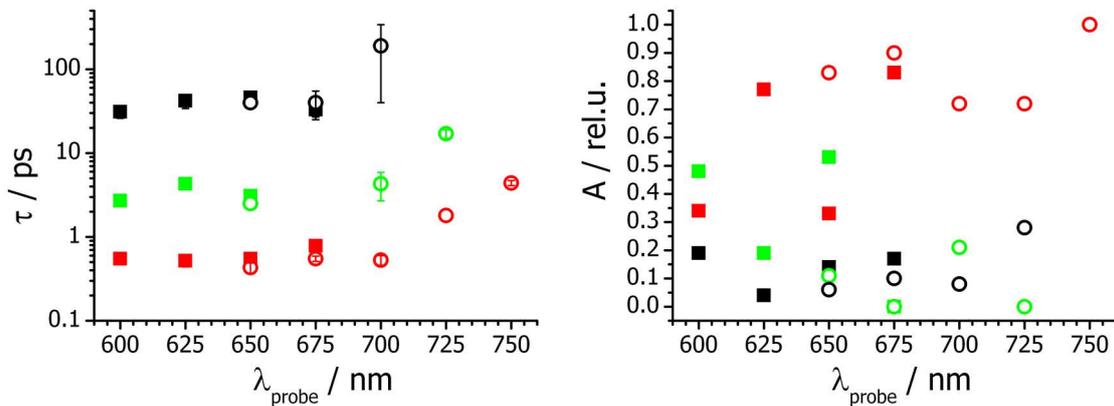


Abb. 5.5: Übersicht über die bestimmten Lebensdauern (links) und die dazugehörigen Amplituden (rechts). Es konnten fast immer drei Lebensdauer-Komponenten gefunden werden. Eine liegt im Sub-Picosekundenbereich (rot) und zwei im Picosekundenbereich (grün und schwarz). Rechteckige Symbole kennzeichnen Ergebnisse aus Pump-Probe-Messungen bei denen die Probe- gleich der Pumpwellenlänge war. Kreis-Symbole markieren die Ergebnisse, bei denen die Probe- bezüglich der Pump-Wellenlänge um mindestens 50 nm rotverschoben war. Die Markierung der Amplituden erfolgte auf die gleiche Weise und kann so den jeweiligen Lebensdauerkomponenten zugeordnet werden.

Im linken Diagramm der Abbildung 5.5 ist erkennbar, dass fast immer drei unterschiedliche

Lebensdauer-Komponenten gefunden wurden (siehe auch Tabelle 5.7). Dies gilt sowohl für den Fall $\lambda_{pump} = \lambda_{probe}$ als auch für $\lambda_{pump} \neq \lambda_{probe}$. Die Werte decken sich gut mit den in [Ye03] gefundenen Werten der globalen Lebensdauern für Sepia-Melanin nach Anregung mit der Wellenlänge $\lambda_{pump} = 303$ nm (siehe Tabelle 5.1).

τ_1 / ps	τ_2 / ps	τ_3 / ps
$0,6 \pm 0,2$	$3,5 \pm 1$	38 ± 7

Tab. 5.7: Ermittelte mittlere Abklingzeiten der Ausbleichung von Eumelanin in (0,1M)NaOH im spektralen Bereich von $\lambda = 600$ nm – 650 nm ($E_{ph} = 2,07$ eV – 1,91 eV)

Bei der Interpretation der drei Lebensdauerkomponenten wird die oben genannte Beobachtung der unterschiedlich langen Abklingzeiten der transienten Absorption zwischen den direkt durch Anregungslicht bevölkerten Anregungszuständen ($\lambda_{pump} = \lambda_{probe}$) und den durch die Kaskadere Relaxation bevölkerten Zuständen ($\lambda_{pump} \neq \lambda_{probe}$) wichtig. Da bei letzteren die Amplitude der kurzen Lebensdauerkomponenten deutlich höher liegt als bei den direkt angeregten Zuständen, wird die kürzeste Lebensdauerkomponente der Relaxation durch die Kaskade zugeordnet.

Die bei direkt angeregten Zuständen ($\lambda_{pump} = \lambda_{probe}$) meist deutlich stärker ausgeprägten längeren Lebensdauerkomponenten repräsentieren wahrscheinlich parallel zur Kaskade stattfindende Relaxationen bzw. angeregte Zustände, die nicht über die Kaskade relaxieren können und somit über alternative, weniger effektive Wege relaxieren. Hinter solchen Anregungszuständen könnten sich z.B. π -Systeme verbergen, die isoliert, das heißt außerhalb der kritischen Energietransfer-Radien von anderen π - und Aggregat-Systemen liegen.

Anscheinend werden aber auch während der Relaxation durch die Kaskade kleinere Anteile von langlebigen Zuständen bevölkert, die als Zwischenzustände für eine schrittweise TPEF in Frage kommen. Interessant ist in diesem Zusammenhang die gemessene ESA bei $\lambda_{probe} = 750$ nm ($E_{ph} = 1,65$ eV), die anzeigt, dass bei dieser Wellenlänge Zustände einer 2. Stufe angeregt werden. Leider konnten aus den in Abschnitt 5.1.1 genannten technischen Gründen (spektrale Bandkanten der Spiegelbeschichtungen) keine Probung bei $\lambda_{probe} = 780$ nm ($E_{ph} = 1,59$ eV) oder längeren Wellenlängen durchgeführt werden, um zu prüfen, ob sich der Trend zu längeren Lebensdauerkomponenten fortsetzt. Aber aus den Pump-Probe-Messungen von Ye [Ye03] ist eine ESA für Sepia bei $\lambda_{probe} = 800$ nm ($E_{ph} = 1,55$ eV) nach Anregung bei $\lambda_{pump} = 303$ nm ($E_{ph} = 4,1$ eV) bekannt. Auch wenn die Lebensdauern der Zwischenzustände zu klein sind, um eine TPEF mit ns-Pulsen zu erklären, können beide ESAs Indizien für eine mögliche schrittweise TPA von Zwischenzuständen mit Anregungsenergien $E_{ph} < 1,6$ eV darstellen.

Wie oben schon erwähnt, stellen auch die bei den Abklingkurven beobachteten Offsets (y_0 -Komponenten) langlebige Anregungszustände dar. Deren Lebensdauer übersteigt den zeitlichen Messbereich von $\tau_{max} = 400$ ps. Dabei kann die Höhe des Offsets als Amplitude der langlebigen Zustände aufgefasst werden. Wie bei den von Ye beschriebenen Pump-Probe-Messungen konnten auch in den durchgeführten Messungen y_0 -Offsets gefunden werden (siehe Tabelle 5.8). Obwohl sie keine großen Amplituden aufweisen, kann festgestellt werden, dass die Amplituden der langlebigen Zustände mit länger werdender Pumpwellenlänge ansteigen. Wie bei den ermittelten Lebensdauerkomponenten zeigt sich, dass die Amplituden der langlebigen „Offset“-Zustände bei direkter Anregung größer sind, als wenn sie durch Relaxation bevölkert werden.

Einen Ausreißer stellt in diesem Zusammenhang die Messung bei der Probewellenlänge

$\lambda_{probe} = 750 \text{ nm}$ ($E_{ph} = 1,65 \text{ eV}$) dar, die keinen y_0 -Offset aufweist. Dies könnte auf die in der transienten Absorption sichtbaren, parallel zur ESA stattfindende Ausbleichung zurückzuführen sein. Deren langlebige Anteile (Offsets) könnten sich mit denen der ESA gegenseitig aufheben (siehe Abbildung 5.4).

λ_{probe}	600 nm	625 nm	650 nm	675 nm	700 nm	725 nm	750 nm
$\lambda_{pump} = \lambda_{probe}$	0	$0,1 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	-	-	-
$\lambda_{pump} \neq \lambda_{probe}$	-	-	$0,1 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	0

Tab. 5.8: Übersicht über die Amplituden der in den Abklingkurven der transienten Absorption gefundenen y_0 -Offsets. Die Zeile $\lambda_{pump} \neq \lambda_{probe}$ gibt die y_0 -Werte der Messungen wieder, bei denen die Probewellenlänge um 50 nm länger war als die Pumpwellenlänge ($\lambda_{pump} = \lambda_{probe} - 50 \text{ nm}$). Die Offsets repräsentieren Anregungszustandslebensdauern, die oberhalb des zur Verfügung stehenden zeitlichen Messbereichs von $\tau_{max} = 400 \text{ ps}$ liegen.

Im Zusammenhang mit der nach dem Kaskadenmodell existierenden Ausdünnung der Anregungszustandsdichte der Kaskade zu Anregungszuständen mit geringeren Übergangsenergien hin entsteht abschließend die Frage, warum zu längeren Probewellenlängen hin keine Verlängerung der kurzen Lebensdauerkomponente beobachtet wurde. Ersichtlich ist zwar, dass die Lebensdauern von Anregungszuständen mit Übergangsenergien $E_{ph} < 1,77 \text{ eV}$ ($\lambda_{probe} = 700 \text{ nm}$) größer werden, allerdings ist nicht erklärlich, warum die Lebensdauern im Bereich $\lambda = 600 \text{ nm} - 650 \text{ nm}$ ($E_{ph} = 2,07 \text{ eV} - 1,91 \text{ eV}$) konstant erscheinen. Diese Frage kann durch eine genauere Betrachtung der Relaxation und des Messprinzips beantwortet werden.

Wenn die kürzeste Lebensdauerkomponente der Relaxation entlang der Kaskade zugeordnet wird, kann diese Zeitkomponente als eine mittlere Transitdauer der Ausbleichung durch das spektrale Probe-Fenster der Breite $\Delta\lambda_{probe} = 12 \text{ nm}$ aufgefasst werden [See08]. Daraus kann auf eine mittlere Relaxationsgeschwindigkeit (Energietransferrate) $\langle k_{ET} \rangle$ entlang der Kaskade geschlossen werden. Eine Veranschaulichung ist in Abbildung 5.6 für eine Relaxation nach der Anregung mit der Pumpwellenlänge $\lambda_{pump} = 650 \text{ nm}$ ($E_{ph} = 2,06 \text{ eV}$) und Abfragung der Ausbleichung bei $\lambda_{probe} = 700 \text{ nm}$ ($E_{ph} = 1,77 \text{ eV}$) gegeben.

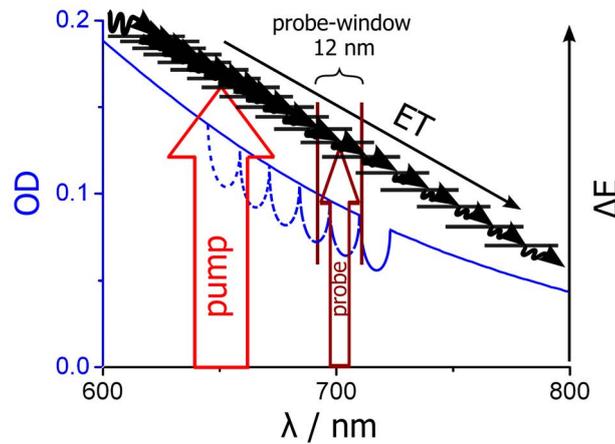


Abb. 5.6: Wanderung des Ausbleichens der Grundzustandsabsorption in den langwelligen Bereich durch Relaxation der angeregten Zustände entlang der Kaskade.

Betrachtet man entsprechend dem Modell die Relaxationsgeschwindigkeit über die Anregungsenergie der Kaskadenzustände, ist das aus photonenergetischer Sicht schmalere Probe-Fenster in Richtung von Zuständen niedrigerer Anregungsenergien zu berücksichtigen. Die mittlere Relaxationsgeschwindigkeit $\langle k_{ET} \rangle$ ergibt sich zu:

$$\begin{aligned} \langle k_{ET} \rangle &= \frac{\Delta E_{probe}}{\tau_1} \\ \langle k_{ET} \rangle &= \frac{1240 \frac{\text{eV}}{\text{nm}}}{\tau_1} \left(\frac{1}{\lambda_{probe} + \frac{\Delta \lambda_{probe}}{2}} - \frac{1}{\lambda_{probe} - \frac{\Delta \lambda_{probe}}{2}} \right) \end{aligned} \quad (5.2)$$

Dabei bezeichnen ΔE_{probe} die energetische Breite des Probe-Fensters, τ_1 die kürzeste Lebensdauerkomponente, λ_{probe} die jeweilige Probe-Wellenlänge und $\Delta \lambda_{probe} = 12 \text{ nm}$ die Breite des Probe-Fensters als Wellenlängenbereich. In Abbildung 5.7 ist der aus den kürzesten Zeitkomponenten (τ_1) berechnete Verlauf der mittleren Relaxationsgeschwindigkeit dargestellt. Es ergibt sich der nach dem Modell erwartete Abfall in Richtung der Zustände niedrigerer Anregungsenergie.

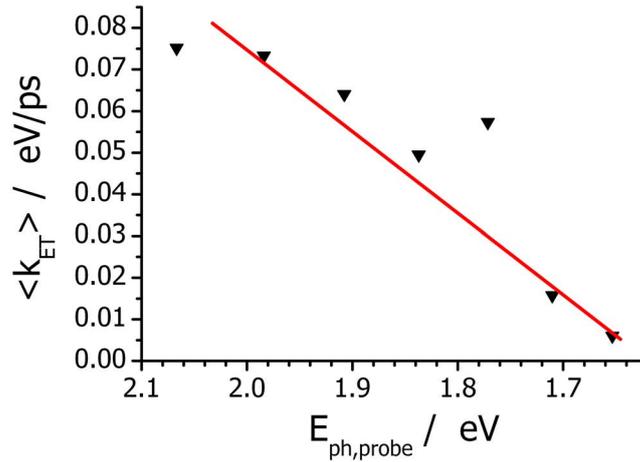


Abb. 5.7: Zuordnung der aus den τ_1 -Komponenten berechneten mittleren Übergangsrates zu den Photonenenergien des verwendeten Probelichts. Es ist ein linearer Abfall der Übergangsrates in Richtung der Anregungszustände niedrigerer Energie zu beobachten.

Werden die gewonnenen Daten im Rahmen des Kaskadenmodells interpretiert, kann zusammenfassend festgestellt werden, dass im Eumelanin durch Anregung mit Licht im roten VIS-Bereich immer mehrere Relaxationswege (Lebensdauerkomponenten) beobachtet werden. Dabei geschieht die Relaxation bei Anregungsenergien von $E_{ph,probe} = 2,6 \text{ eV} - 1,65 \text{ eV}$ im wesentlichen über schnelle Prozesse, die sich durch eine Lebensdauerkomponente mit $\tau_1 = 0,6 \pm 0,2 \text{ ps}$ ausdrücken und als mittlere Energietransferrates $\langle k_{ET} \rangle$ interpretiert wurde. Diese mittlere Energietransferrates fällt in Richtung von Anregungszustände niedrigerer Anregungsenergien ab, was nach der laut Kaskadenmodell existierenden Verringerung der Zustandsdichte in Richtung von Anregungszuständen niedrigerer Anregungsenergien zu erwarten war.

Im gesamten Messbereich sind Zustände mit Lebensdauern im Bereich $\tau = 40 \text{ ps}$ zu finden, die allerdings noch keine schrittweise TPE mit Laserpulsen im ns-Bereich erklären können. Es

sind jedoch auch Offsets der Ausbleichsabklingkurven zu beobachten, die Anregungszustände mit Lebensdauern außerhalb des zeitlichen Messbereichs von $\tau_{max} = 400$ ps repräsentieren. Die Amplitude dieser langen Zustandslebensdauern wächst in Richtung von Anregungszuständen niederenergetischer Anregung an. Dieses Verhalten lässt sich parallel zum beobachteten Anstieg der ermittelten Lebensdauern als Zeichen für die Zunahme langlebiger Anregungszustände bei Anregung im roten VIS-Bereich interpretieren. Zusätzlich wurde bei einer Anregung mit Photonen der Energie $E_{ph,probe} = 1,65$ eV eine Anregungszustandsabsorption beobachtet, die einen Hinweis auf eine schrittweise 2-Photonen-Anregung darstellen könnte. Allerdings muss auch festgehalten werden, dass ein direkter Nachweis von Anregungszuständen mit Lebensdauern im ns-Bereich mit den hier vorgestellten Pump-Probe-Messungen nicht erbracht werden konnte. Dabei gibt es aber zu berücksichtigen, dass durch die Pump-Probe-Messungen nur die dominierenden Relaxationsprozesse messbar sind. Diese Prozesse stehen mit dem vorgeschlagenen Kaskadenmodell im Einklang.

Es ist jedoch wahrscheinlich, dass neben den an der Kaskade beteiligten Zuständen auch isolierte Zustände existieren, die deutlich längere Lebensdauern besitzen und eine schrittweise 2-Photonen-Anregung ermöglichen. Außerdem kann es sein, dass sich der beobachtete Trend zu längeren Lebensdauern bei Verschiebung der Anregung zu langen Wellenlängen verstärkt, so dass bei Anregungswellenlängen um $\lambda = 800$ nm ($E_{ph} = 1,55$ eV) mittlere Lebensdauern im ns-Bereich erreicht werden.

Um zu überprüfen, ob Eumelanin über die Möglichkeit einer schrittweisen TPEF verfügt, muss also ein anderes Messverfahren angewendet werden, welches möglichst spezifisch nur den Fluoreszenzprozess beleuchtet.

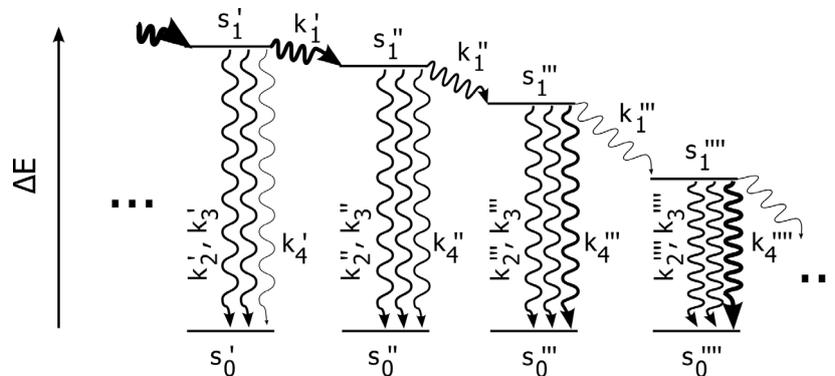


Abb. 5.8: Ausschnitt aus dem vermuteten Zustandsmodell für das Eumelanin. Eingezeichnet sind die sich aus den gefundenen Lebensdauerkomponenten ableitenden Übergangsraten k_1, k_2, k_3 für die jeweilig verwendete Anregungsenergie ($E_{ph,probe}$). Die Übergangsrates k_4 steht für die jeweilige Existenz eines y_0 -Offsets und einer damit indirekt nachgewiesenen langsameren Relaxationskomponente. Die Amplitudenverhältnisse zwischen den jeweiligen Lebensdauerkomponenten spiegeln sich in den verwendeten Strichstärken der die Übergänge markierenden Pfeile wider. Dabei ist die Abnahme der mittleren Übergangsrates k_1 entlang der Kaskade in Richtung von Anregungszuständen niedrigerer Anregungsenergien erkennbar. Korrelierend dazu finden mehr Relaxationen über andere Wege statt (per Internal Conversion, Vibronische Relaxation, Quenching), die sich in den zunehmenden Amplituden der Übergangsrates k_2, k_3 und k_4 widerspiegeln.

5.2 2-Photonen-Angeregte-Fluoreszenz des Eumelanins bei Anregung mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen und Pulsdauern im ns-Bereich

Nachdem die Relaxationsprozesse der Anregungszustände der 1. Stufe mit Hilfe von linear-spektroskopischer Methoden und von Pump-Probe-Messungen erforscht wurden, sollen nun die Anregungszustände der 2. Stufe und deren Anregungs- und Relaxationsprozesse mit Hilfe der 2-Photonen-Angeregten-Fluoreszenz untersucht werden.

Über diese Zustände und Prozesse ist bisher wenig bekannt. Die wenigen und grundlegenden Arbeiten zu diesem Thema stammen von Teuchner et al. [Teu99, Teu00, Teu03]. Bei den beschriebenen Messungen wurden u.a. Lösungen von synthetischem Eumelanin in 1 molarer Kalilauge mit fs-Laserpulsen bei $\lambda_{exc} = 800$ nm zu einer nichtlinearen Fluoreszenz (TPEF) angeregt. Dabei wurde beobachtet, dass das TPEF-Spektrum des Eumelanins gegen das OPEF-Spektrum bei Anregung mit $\lambda_{exc} = 400$ nm rotverschoben ist.

Diese Beobachtung implizierte, dass Eumelanin über eine schrittweise TPE zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Denn da bei einem schrittweisen 2-Photonen-Anregungsprozess ein Anregungszustand der 2. Stufe bevölkert wird, der über andere Prozesse relaxiert als ein mit den gleichen zwei Photonen simultan angeregter Zustand der 1. Stufe, wäre ein Unterschied zwischen den Spektren erklärlich. Weiterhin würde die höhere Anregungseffizienz einer schrittweisen 2-Photonenanregung gegenüber der simultanen die Anhebung der Eumelanin-TPEF gegenüber Fluorophoren, welche nur zu einer simultanen TPEF fähig sind, erklären.

Unterstützt wurde diese Idee wahrscheinlich durch die Tatsache, dass Eumelanin sowohl bei $\lambda_{exc} = 800$ nm als auch bei $\lambda_{exc} = 400$ nm eine Absorption besitzt. Das heißt, dass reale Anregungszustände mit Übergangsenergien von $E_{ph} = 1,55$ eV aber von $E_{ph} = 3,1$ eV existieren. Daher lag es nahe, eine schrittweise Anregung mit zwei Photonen der Energien $E_{ph} = 1,55$ eV ($\lambda_{exc} = 800$ nm) für möglich zu halten. Dabei sollte zuerst der Zustand mit der Übergangsenergien von $E_{ph} = 1,55$ eV angeregt werden, von dem aus mittels Absorption eines zweiten Photons ein Übergang in den Zustand mit der Gesamtübergangsenergien von $E_{ph} = 3,1$ eV stattfindet. Die beobachtete Rotverschiebung wurde als vibronische Relaxation des Zwischenzustandes vor dem Übergang in den zweiten Anregungszustand interpretiert.

Auf den zweiten Blick ist ein direkter Übergang vom Anregungszustand der 1. Stufe (der Übergangsenergie $E_{ph} = 1,55$ eV) in den Anregungszustand der höheren Übergangsenergie bei $E_{ph} = 3,1$ eV nicht möglich, da es sich jeweils um Anregungszustände der 1. Stufe unterschiedlicher Absorber handelt. Geht man von einer echten Anregungszustandsabsorption von einem mit $E_{ph} = 1,55$ eV angeregten Zustand aus, bevölkert man einen Anregungszustand 2. Stufe der Gesamtübergangsenergie $E_{ph} = 3,1$ eV, dessen Relaxationswege denen des Anregungszustandes 1. Stufe der gleichen Gesamtübergangsenergie $E_{ph} = 3,1$ eV nicht ähnlich sein müssen. Trotzdem steckt in dieser Vermutung ein interessanter Ansatz. Geht man, wie im Kaskadenmodell angenommen, davon aus, dass die an der Kaskade beteiligten Zustände untereinander Energie transferieren können, ist es auch möglich, dass es zu einem Energietransfer von den Anregungszuständen der 2. Stufe zu den energetisch äquivalenten Anregungszuständen der 1. Stufe kommt (siehe Abbildung 5.10).

Geht man von dieser Kopplung aus und nimmt außerdem an, dass in einem größeren Spektralbereich Anregungszustandsabsorptionen angeregt werden können, sollte eine ähnliche Abhängigkeit des TPEF-Maximums von der Anregungswellenlänge beobachtet werden wie

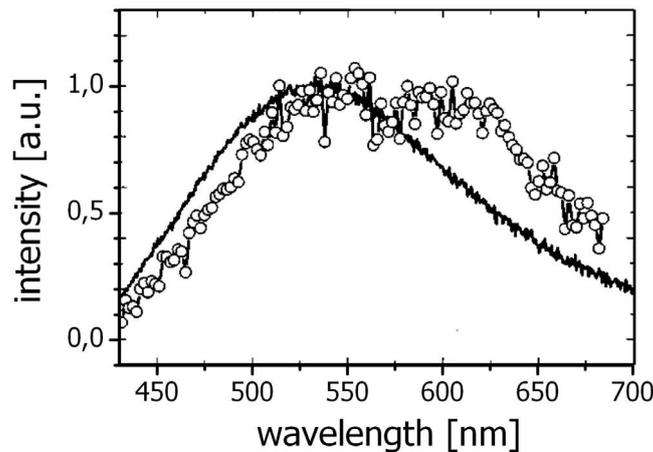


Abb. 5.9: Spektren der OPEF (durchgezogen) und TPEF (Kreissymbole) von synthetischem Eumelanin in (1,0M)KOH-Lösung nach [Teu99]. Die Spektren ähneln einander in der spektralen Breite und Lage, wobei das TPEF- gegenüber dem OPEF-Spektrum ein rotverschobenes Maximum aufweist.

bei den OPEF-Spektren in Abschnitt 4.3.4. Um diese Vorstellung zu prüfen, wurden deshalb gezielt Messungen der 2-Photonen-Angeregten-Fluoreszenz bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen durchgeführt.

Da bei den OPEF-Spektren größerer Eumelanin-Aggregate gegenüber kleinen ebenfalls eine leichte Rotverschiebung beobachtet wurde, bietet auch eine Änderung im Unterschied der Anregungseffizienzen zwischen verschiedenen großen Aggregaten eine mögliche Erklärung für die beobachtete Rotverschiebung bei Veränderung der Anregungsart von OPE zu TPE. Deshalb wurden analog zu den OPEF-Messungen verschieden schwerer Eumelanin-Aggregate auch die TPEF-Spektren von unterschiedlich schweren Eumelanin-Aggregate aufgenommen und ausgewertet.

5.2.1 Konfokale Apperatur zur Messung von TPEF-Spektren von Eumelanin mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen

Die entwickelte Messapparatur wurde so ausgelegt, dass die Intensitätsverhältnisse zwischen mit verschiedenen Wellenlängen angeregten Fluoreszenzspektren bestimmt werden konnten. Dabei sollte ein Wechsel der Anregungswellenlänge nur ein Minimum von Veränderungen im Messaufbau erforderlich machen. Deshalb wurde ein konfokaler Ansatz für die Anregungs- bzw. Detektionsstrecke mit einem Farbstofflaser als durchstimmbare Lichtquelle gewählt. Die Entwicklung und der Aufbau der Apparatur fanden in der Firma Lasertechnik Berlin GmbH (LTB) statt.

Laserquelle mit einstellbarer Wellenlänge und Pulsen im ns-Bereich Die Anregungslichtquelle bestand aus einem Farbstofflaser, der mit dem Stickstofflaser gepumpt wurde. Bei dem Stickstofflaser handelte es sich um den Typ MNL800 der Firma LTB [LTB09c]. Dieser erzeugt kurze Laserpulse im nahen UV-Bereich ($\lambda_{exc} = 337,1 \text{ nm}$), deren Energie hoch genug war, um auch bei schlechteren Anregungseffizienzen einiger Laserfarbstoffe genügend starke

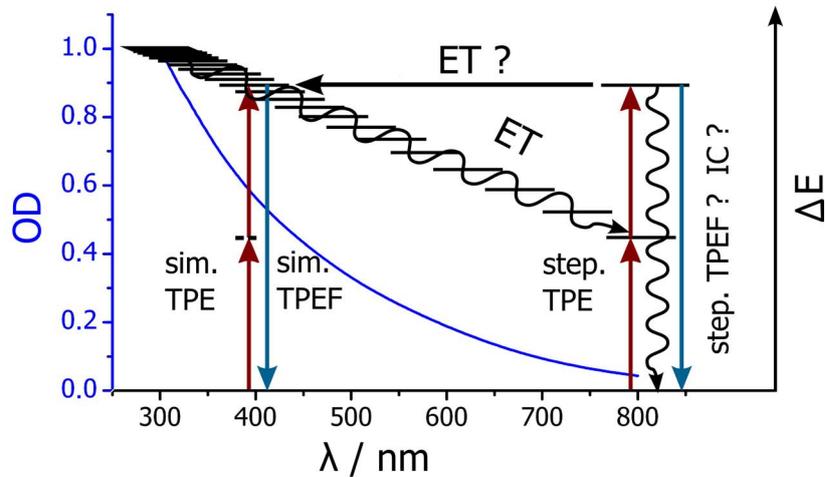


Abb. 5.10: Visualisierung des Unterschieds zwischen simultaner und schrittweiser TPA bezüglich des angeregten Zustandes bzw. des angeregten Absorbers. Es wird vermutet, dass es zu einem Energietransfer (ET) zwischen den beiden Anregungszuständen kommt. Möglich wären aber auch andere Relaxationswege durch Internal Conversion (IC) oder Fluoreszenz (F).

Farbstofflaserpulse für eine messbare TPEF im gelösten Eumelanin zu erzeugen. Die Laserparameter sind in Tabelle 5.9 zusammengestellt. Der Laser verfügte weiterhin über einen optischen Triggerausgang, der für eine Messung mit zeitlicher Torbreite (Gate) notwendig war. Bei dem verwendeten Farbstofflaser handelte es sich um einen UDL200 der Firma LTB [LTB09d] mit transversaler Pumpgeometrie. Der Einsatz verschiedener Laserfarbstoffe in 1cm-Küvetten und einem Reflexionsgitter in Littrow-Anordnung ermöglichten die Erzeugung einer beliebigen Laserwellenlänge im VIS bis IR. Zur Abdeckung des benötigten spektralen Anregungsbereichs wurden die Laserfarbstoffe Pyridin 1, Pyridin 2 und Styryl 11 [Bra00] ausgewählt. Die Pulsenergie bei der jeweilig erzeugten Wellenlänge hing dabei von der Absorption des Laserfarbstoffes bei der Sticklaserwellenlänge $\lambda = 337,1 \text{ nm}$ und seiner Fluoreszenzquantenausbeute ab.

Laser	λ	$\Delta\lambda$	T_{puls}	f_{puls}	E_{puls}	α_{strahl}
Stickstofflaser	337,1 nm	0,1 nm	1,0 ns	10 Hz	320 μJ	$\approx 6 \text{ mrad}$
Farbstofflaser	400 nm – 820 nm	2 nm	1,0 ns	10 Hz	$> 8 \mu\text{J}$	$\approx 10 \text{ mrad}$

Tab. 5.9: Parameter der verwendeten Stickstoff- und Farbstofflaser. Hierbei stehen λ für die Laserwellenlänge, $\Delta\lambda$ für deren Halbwertsbreite, T_{puls} für die Pulsdauer, f_{puls} für die Pulsrate, E_{puls} für die Pulsenergie und α_{strahl} für die Strahldivergenz.

Konfokaler Aufbau Da die im Eumelanin erzeugte TPEF sehr lichtschwach war und somit leicht durch gestreutes Raumlicht gestört werden konnte, wurde der Messaufbau eingehaust. Um Streulicht aus dem Stickstofflaserstrahl auszublenden, wurde das Anregungslicht durch ein RG1-Farbfenster in die Messkammer eingestrahlt (siehe Abbildung 5.11). Da sich die Ausgangsintensität des Farbstofflaserstrahls wellenlängenabhängig ändert, wurde hinter dem

Eintrittsfenster ein variabler Strahlteiler montiert. Kontrolliert wurde die Pulsenergie über ein pyroelektrisches Energiemeter PEM100 der Firma LTB [LTB09a], dessen Sensor am Probenort in den Strahlengang geschwenkt werden konnte. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Photonenenergien der einzelnen Anregungswellenlängen konnte so über die Messung der Pulsenergie und die jeweilige Abschwächung des Strahls für alle Anregungswellenlängen die gleiche Photonenflussdichte eingestellt werden.

Um die Anregungswellenlänge bestimmen zu können, wurde ein Teil des Anregungslichts durch eine Quarzfaser in ein Jobin-Yvone-Spektrometer des Typs CP140 mit CCD-Zeile als Detektor gekoppelt. Die gemessenen Spektren-Daten konnten über eine USB-Verbindung direkt auf dem Messcomputer dargestellt werden. Die spektrale Auflösung des Spektrometersystems lag bei $\Delta\lambda = 2\text{ nm}$. Die spektrale Kalibration des Spektrometers wurde durch den Abgleich mit einem Linienspektrum einer Quecksilberlampen realisiert.

Für die Einstellung der Anregungswellenlänge wurde der jeweilig nötige Laserfarbstoff ausgewählt (siehe Tabelle 5.10) und in den UDL200 eingesetzt. Die Feineinstellung erfolgte über die Verstellung der Gitterneigung im UDL200.

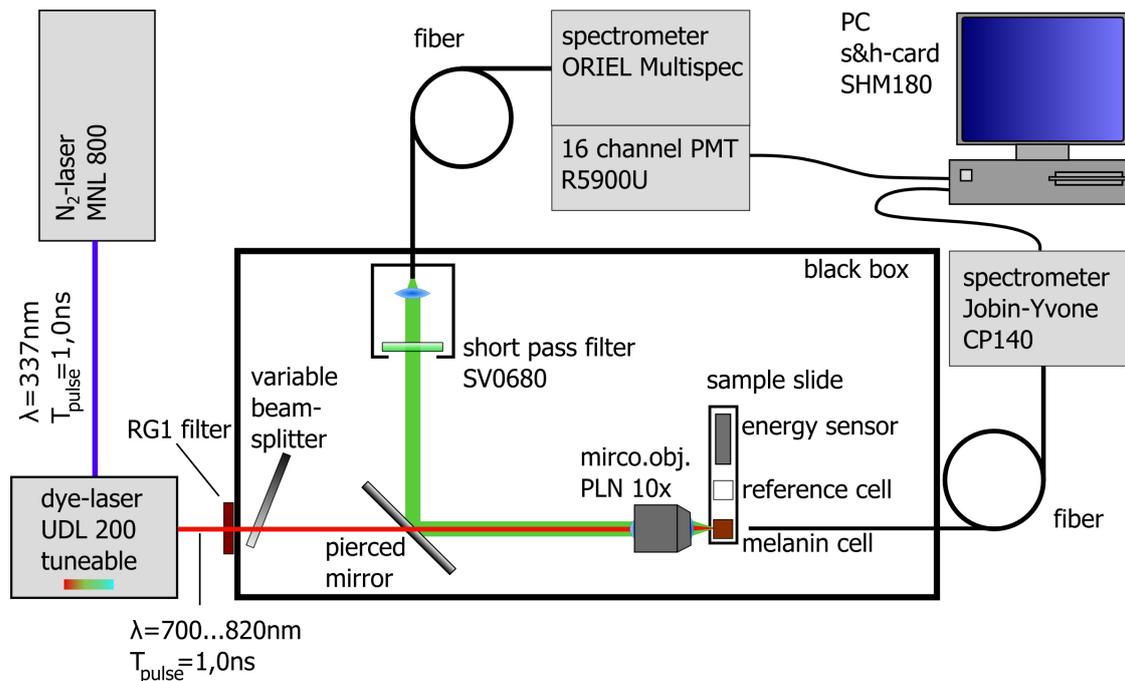


Abb. 5.11: Aufbau der Messapparatur zur Bestimmung der mit ns-Pulsen angeregten TPEF-Spektren von Eumelanin mit verschiedenen Anregungswellenlängen

Um einerseits in einem breiten Bereich die Anregungswellenlänge verändern zu können und andererseits in einem spektral breiten, direkt anschließenden Bereich die Fluoreszenz zur Detektion umzulenken, wurde ein unter 45° durchbohrter Aluminium-Spiegel als Strahlteiler verwendet. Das Anregungslicht trat dabei durch ein zentrisch im Spiegel sitzendes Loch und wurde anschließend durch ein Mikroskopobjektiv auf die Probelösung in einer Küvette fokussiert. Als Mikroskopobjektiv wurde das PLN 10x /0.25 der Firma Olympus gewählt [Oly09]. Dieser Typ weist im Vergleich zu Objektiven hoher Numerischer Apertur einen langen Arbeitsabstand von 18,5 mm auf. Dadurch war eine bequeme Positionierung bzw. ein bequemer

Wechsel der Probe und eine Fokussierung durch die Küvettenwand der Probe möglich. Durch die Strahldivergenz des Farbstofflasers besaß der Strahl beim Eintritt in das Mikroskopobjektiv einen Durchmesser von ca. 5 mm. Um den Anregungsstrahl genauer charakterisieren zu können, wurden die Strahlkaustiken für die unterschiedlichen Anregungswellenlängen mit einem Beamprofiler (WinCamD 14 bit) ausgemessen. Ein repräsentatives Ergebnis für die verschiedenen Anregungswellenlängen ist anhand einer Messung bei $\lambda_{exc} = 740 \text{ nm}$ in Abbildung 5.12 dargestellt. Es ist erkennbar, dass der Strahlquerschnitt eine elliptische Form besitzt. Zudem ist ein Astigmatismus zu sehen. Der Abstand der beiden Fokalebene n beträgt ca. 100 μm . Die mittleren Fokaldurchmesser $2w_0$ der verwendeten Wellenlängen sind in Tabelle 5.10 zusammengestellt. Daraus geht hervor, dass von einem mittleren Fokaldurchmesser (FWHM) von $2w_0 = 20 \mu\text{m}$ in Luft ausgegangen werden kann.

λ_{exc}	Farbstoff /Lösungsmittel	Mittlerer Fokaldurchmesser ($2w_0$)
700 nm	Pyridin 1 /Ethanol	$22 \mu\text{m} \pm 1 \mu\text{m}$
720 nm	Pyridin 1 /Ethanol	$20 \mu\text{m} \pm 1 \mu\text{m}$
740 nm	Pyridin 2 /Ethanol	$20 \mu\text{m} \pm 1 \mu\text{m}$
760 nm	Pyridin 2 /Ethanol	$20 \mu\text{m} \pm 1 \mu\text{m}$
780 nm	Styryl 11 /Ethylenglykol	$20,5 \mu\text{m} \pm 1 \mu\text{m}$
800 nm	Styryl 11 /Ethylenglykol	$21,5 \mu\text{m} \pm 1 \mu\text{m}$
820 nm	Styryl 11 /Ethylenglykol	$21,5 \mu\text{m} \pm 1 \mu\text{m}$

Tab. 5.10: Charakterisierung der Anregungslichtwellenlängen bezüglich der jeweilig verwendeten Laserfarbstoffe und erzeugten Fokaldurchmesser

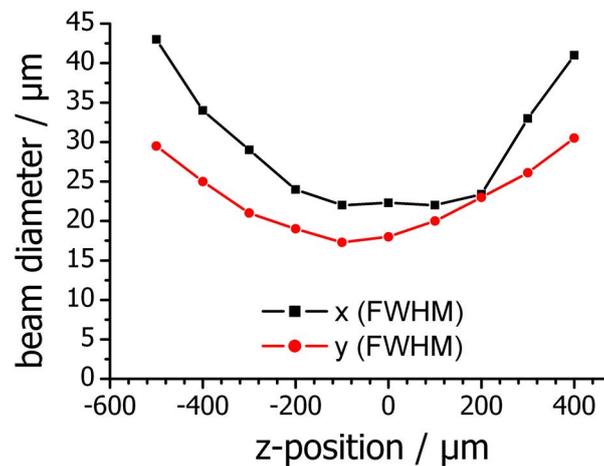


Abb. 5.12: Mit Hilfe eines Beamprofilers (WinCamD 14 bit) bestimmte Strahlkaustik für einen Strahl der Wellenlänge $\lambda_{exc} = 740 \text{ nm}$. Die gezeigte Form ist repräsentativ für alle übrigen verwendeten Wellenlängen. Es ist zu erkennen, dass der Strahl ein elliptisches Strahlprofil mit einem leichten Astigmatismus besitzt. Der mittlere Taillendurchmesser beträgt $2w_0 = 21 \mu\text{m} \pm 1 \mu\text{m}$.

Bei Annahme des Anregungslichtstrahls als Gaußstrahl, ist es möglich, den Fokaldurchmesser in Ethanol oder Wasser abzuschätzen. Bei Ausleuchtung der Eingangsapertur des

Mikroskopobjektivs ergibt sich aus der Numerischen Apertur NA des Mikroskopobjektivs der Divergenzwinkel θ_{div} (Akzeptanzwinkel) zu:

$$\sin(\theta_{div}) = \frac{NA}{n_{medium}} \quad (5.3)$$

Für den Zusammenhang zwischen Divergenzwinkel und Strahltaile w_0 bei Gaußstrahlen gilt:

$$\tan(\theta_{div}) = \frac{\lambda}{\pi \cdot w_0} \quad (5.4)$$

Mit Hilfe der Näherung für kleine Winkel (hier anwendbar, da das Mikroskopobjektiv eine $NA = 0,25$ besitzt)

$$\tan(x) = \sin(x) = x ,$$

ergeben sich aus den Gleichungen 5.3 und 5.4 unterschiedliche Strahltaillen in den Medien Wasser und Ethanol:

$$\begin{aligned} w_{0,medium} &= \frac{\lambda \cdot n_{medium}}{\pi \cdot NA} & (5.5) \\ \Rightarrow w_{0,water} &= 1,33\omega_{0,air} \\ \Rightarrow w_{0,ethanol} &= 1,36\omega_{0,air} \end{aligned}$$

Das heißt, dass sich in beiden betrachteten Flüssigkeiten mit einem Brechungsindex $n \approx 1,33$ ein $\frac{1}{3}$ größerer Fokus mit einem Durchmesser von $2w_0 \approx 30 \mu\text{m}$ ergibt. Bei einer Pulsenergie von $E_{pulse} = 5,0 \mu\text{J}$ und einer Pulsdauer von $T_{pulse} = 1 \text{ ns}$ ergibt sich für die mittlere Energiedichte ρ_e im Fokus:

$$\begin{aligned} \rho_e &= \frac{E_{pulse}}{T_{pulse}\pi(w_0)^2} & (5.6) \\ &= 1,1 \frac{\text{J}}{\text{cm}^2} \end{aligned}$$

Bei einer Photonenenergie von $E_{ph} = 1,67 \text{ eV}$ ($\lambda = 750 \text{ nm}$) entspricht das einer Photonendichte von $6,0 \cdot 10^{27} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \text{ s}}$. Diese Anregungsparameter entsprechen denen in anderen Arbeiten zur 2-Photonen-Anregung verwendeten (z.B. [Teu99, Gar07]).

Die mittels ns-Laserpulsen 2-Photonen-Angeregte-Fluoreszenz war in einer Rhodamin6G / Ethanol-Lösung mit bloßem Auge sichtbar. Im rechten Teilbild der Abbildung 5.13 ist die beobachtete, typisch lokalisierte TPEF in Rhodamin6G einer entsprechenden OPEF bei Anregung mit Licht der halben Wellenlänge im linken Teilbild gegenübergestellt.

Das in Rückrichtung strahlende Fluoreszenzlicht wurde größtenteils mit Hilfe des durchbohrten Aluminium-Spiegels umgelenkt und durch zwei optische Kurzpass-Filter mit einer Optischen Dichte von 10 gegen das Anregungslicht in eine Quarzfaser mit einem Durchmesser von $100 \mu\text{m}$ (Multimode-Faser) eingekoppelt. Die Faser leitete das Fluoreszenzlicht in ein ORIEL-Spektrometer vom Typ Multispec, wo es an einem Gitter spektral aufgespalten und anschließend durch einen 16-kanaligen Photomultiplier (PMT) des Typs R5900-16 der Firma Hamamatsu [Ham03] detektiert wurde. Von den 16 Kanälen des PMTs wurden neun Kanäle benutzt, um das Fluoreszenzlicht im Bereich von $\lambda = 388 \text{ nm} - 612 \text{ nm}$ mit neun $\Delta\lambda = 25 \text{ nm}$



Abb. 5.13: Vergleich zwischen den Anregungsfoki einer OPEF bei $\lambda_{exc} = 542$ nm und einer TPEF bei $\lambda_{exc} = 810$ nm in einer Rhodamin6G / Ethanol-Lösung. Der langgestreckte Fokus der TPEF begründet sich in der geringen Numerischen Apertur ($NA = 0,25$) des Mikroskopobjektivs sowie in höheren Brechzahl der Farbstofflösung gegenüber Luft.

breiten Stützstellen zu erfassen. Durch die fehlende Feinstruktur der Fluoreszenzspektren von Eumelanin war diese Auflösung ausreichend. In den erstellten Graphen (Spektren) sind die pro Kanal gemessenen Intensitäten immer über den Zentralwellenlängen der jeweiligen 25 nm breiten Stützstellen eingezeichnet.

Der ausgewählte spektrale Detektionsbereich wurde im Kurzwelligen durch das Transmissionsverhalten des Mikroskopobjektivs begrenzt, welches erst ab Wellenlängen $\lambda > 400$ nm eine Transmission von $T > 0,7$ aufwies. Im langwelligen Bereich begrenzte die Empfindlichkeitskurve des PMTs (Quanteneffizienz $< 0,1$ bei größeren Wellenlängen als $\lambda = 600$ nm) bzw. der Sicherheitsabstand von $\Delta\lambda_{sicher} = 100$ nm zur Anregungswellenlänge den spektralen Messbereich.

Das ORIEL-Spektrometer wurde spektral mit stark abgeschwächter Farbstofflaserstrahlung bekannter Wellenlängen kalibriert. Zur Bestimmung der spektralen Empfindlichkeit des Detektorsystems aus Spektrometer und PMT wurde die Deuterium-Wolfram-Kalibrationslampe DH-2000 der Firma Ocean Optics mit bekanntem Emissionsspektrum genutzt. Aus dem Vergleich zwischen Ist- und Soll-Spektrum wurde eine Korrekturfunktion ermittelt, mit der die gemessenen Spektren verrechnet wurden.

Sample-and-Hold-Filterung Da die zu erwartende Fluoreszenzlichtstärke sehr klein war, wurde es notwendig, das resultierende Messsignal von Störanteilen zu befreien. Aufgrund des verwendeten Stickstofflasers als Pumpquelle konnte nur mit Repetitionsraten von $f_{pulse} = 10$ Hz gearbeitet werden. Bei den damit verbundenen geringen Signalraten war die Verwendung eines Lock-In-Verstärkers zur Signalfilterung nicht sinnvoll. Stattdessen wurde eine Art Gated Measurement durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Messmethode, bei der nur während der eigentlichen Fluoreszenzprozesse Messwerte aufgenommen werden. Technisch wird dies durch ein Freischalten der Signalleitung während des Zeitintervalls der Fluoreszenz-Wechselwirkung realisiert. Dieses Zeitintervall wird auch Torzeit (Gate) genannt. Eine herkömmliche Messschaltung mit Torzeit-Integrator (gated integrator) ist bei kurzen Torzeiten fehleranfällig. Denn die Integration des Messsignals innerhalb einer Torzeit entspricht einer Faltung der Signalfunktion mit der Torzeitfunktion. Da letztere bei kurzen Torzeiten technisch kaum noch

als saubere Rechteckfunktion realisierbar ist, kommt es zu unterschiedlichen Wichtungen der Signalfunktion.

Da die Anregungspuls- und Fluoreszenzlebensdauern im ns-Bereich liegen und somit sehr kurze Torzeiten notwendig waren, wurde stattdessen eine Sample-and-Hold-Messdatenerfassung der Firma Becker&Hickl [Bec03] verwendet. Diese verwendet einen Tiefpass, der sowohl das Gate als auch den Integrator ersetzt. Der Tiefpass wirkt als dynamisches Gate, welches im Gegensatz zum konventionellen Gate kontinuierlich das Faltungsergebnis der Tiefpassfunktion mit der Messsignalfunktion zum Zeitpunkt $t = t_0 + t_{delay}$ wiedergibt. Dabei bezeichnet t_0 den Zeitpunkt der ausgelösten Fluoreszenz und t_{delay} die zeitliche Verzögerung, bis das Messsignal der Fluoreszenz im Tiefpass vorliegt. Bei einer entsprechend kurz gewählten Integrationszeit des Tiefpasses (leichter zu realisieren als eine kurze Aktiv-Passiv-Umschaltung bei konventionellen Gates) und Abfrage des momentan im Tiefpass integrierten Messsignals durch einen Analog-Digital-Konverter (Analog Digital Converter, ADC), kann das Messsignal zum Zeitpunkt t ohne Verfälschung durch verschieden gewichtete, zeitlich benachbarte Signalwerte bestimmt werden.

Als zeitlichen Referenzwert für den Fluoreszenzzeitpunkt t_0 wurde der vom Stickstofflaser ausgehende Trigger eingesetzt. Über die frei einstellbare Verzögerungszeit t_{delay} konnte dann der optimale Auslesezeitpunkt ermittelt werden.

Für die Apparatur wurden zwei Messkarten vom Typ SHM-180 mit je acht Messkanälen verwendet. Davon wurden entsprechend den genutzten PMT-Kanälen nur neun zur spektralen Darstellung verwendet. Zur Ermittlung der optimalen Verzögerungszeit t_{delay} wurde eine Rhodamin6G / Ethanol-Farbstofflösung mit bekanntem Fluoreszenzspektrum im beschriebenen Aufbau spektral vermessen und die Verzögerungszeit auf maximal gemessene Fluoreszenzintensität hin eingestellt.

Ein abschließender Überblick über die messtechnisch relevanten Parameter der verwendeten Sample-and-Hold-Module ist in Tabelle 5.11 zusammengestellt.

Tiefpass-Filter	Delay	Delay-Jitter	ADC-Auflösung	Sample Rate
30 ns	1,5 μ s	2,5 ns	12 bit	10 Hz

Tab. 5.11: Verwendete und vorgegebene Parameter des SHM-180-Moduls beim Messen der TPEF-Spektren

5.2.2 TPEF-Spektren von unfraktioniertem Eumelanin und von Eumelanin-Aggregaten unterschiedlicher Masse

In den vorliegenden Versuchen wurde eine Eumelanin / (0,1M)NaOH-Lösung in einer Küvette der Schichtdicke $d = 1$ mm als Probe verwendet. Die Küvette wurde in einem Halter mit definiertem Anschlag fest eingespannt. Der Halter selbst war über einen Anschlag und Passtift auf dem Proben-Schlitten befestigt. Durch Verfahren des Proben-Schlittens konnten abwechselnd zwei Proben mit reproduzierbarer Fokuslage vermessen werden.

Zur Berücksichtigung der Reabsorptionseffekte wäre aufgrund der Lokalisation der TPEF eine Korrekturrechnung nach dem Ansatz für eine punktförmige Fluoreszenz anzuwenden (siehe Abschnitt 4.3.2). Die Küvette konnte jedoch so positioniert werden, dass sich der Fokus und damit die TPEF direkt an die Küvettenwand anschloss. Das in Rückrichtung abgestrahlte Fluoreszenzlicht lief somit nur durch eine minimale Schichtdicke (μ m-Bereich), weshalb eine

sehr geringe Reabsorption zu erwarten war. Sicherheitshalber wurden die Einflüsse der Fokusslage auf die gemessenen Spektren im Anschluss an den Nachweis der TPEF von Eumelanin untersucht (siehe unten).

Während der Messung wurden die durch 300 Laserpulse einzeln angeregten und gemessenen Spektren akkumuliert. Um die verbleibende Varianz der spektralen Messwerte abzuschätzen, wurden immer drei solcher akkumulierten Spektren aufgenommen und in ein finales Spektrum aus Mittelwerten mit den sich ergebenden Standardabweichungen umgewandelt.

Ein auf diese Weise ermitteltes Spektrum einer mit ns-Laserpulsen bei $\lambda_{exc} = 800$ nm angeregten TPEF von Eumelanin / (0,1M)NaOH ist in Abbildung 5.14 dargestellt. Damit konnte gezeigt werden, dass eine Anregung der TPEF von Eumelanin mit ns-Pulsen möglich ist.

Zum Vergleich ist ein auf neun Stützstellen zusammengefasstes OPEF-Spektrum aus Kapitel 4.3 bei Anregung mit $\lambda_{exc} = 400$ nm ergänzt worden. Im Gegensatz zu [Teu99], ist das TPEF-Spektrum gegenüber dem OPEF-Spektrum nicht rotverschoben. Stattdessen scheint es verbreitert. Über die Gründe für die Abweichung von dem in [Teu99] gezeigten Spektrum kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. So können sowohl der Unterschied im Lösungsmittel als auch die unterschiedlichen Pulsdauern des jeweils verwendeten Anregungslichts als Ursache in Frage kommen.

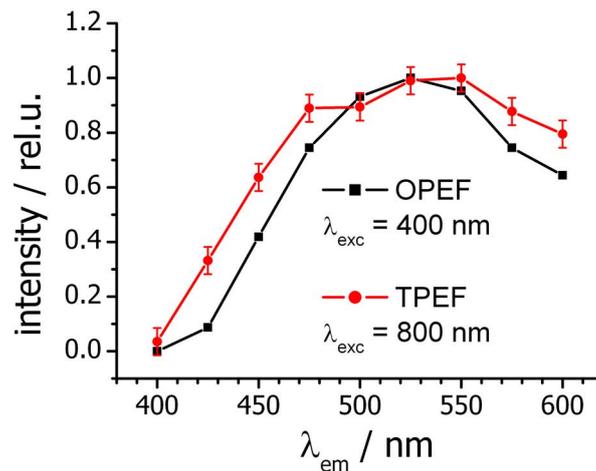


Abb. 5.14: Auf das Intensitätsmaximum normierte TPEF- einer OPEF-Spektren von Eumelanin / (0,1M)NaOH. Für das TPEF-Spektrum wurden eine Eumelaninlösung ($OD_{1mm} = 0,887$ bei $\lambda = 400$ nm) mit Laserpulsen der Wellenlänge $\lambda_{exc} = 800$ nm und Anregungspulsenergie von $E_{puls} = 8,4 \mu\text{J}$ bestrahlt. Das OPEF-Spektrum wurde aus den Messungen des Abschnitts 4.3 durch Zusammenfassen des OPEF-Spektrums bei $\lambda_{exc} = 400$ nm zu neun, den TPEF-Spektrum entsprechenden, spektralen Stützstellen erstellt.

Um sicher zu stellen, dass keine Reabsorptionseffekte das gemessene Spektrum beeinträchtigen, wurde im Anschluss die Fokusslage verändert und beobachtet, wie sensibel sich das Spektrum verändert. In Abbildung 5.15 sind das absolute und das normierte Spektrum einer Eumelanin-Lösung in Abhängigkeit von der Fokusposition dargestellt. Die Position $z = 0 \mu\text{m}$ kennzeichnet die Position höchster gemessener Intensität und entspricht der Fokusposition direkt nach der Küvettenwand. Eine Verschiebung der Fokusposition in die Fluorophor-Lösung hinein verringert die gemessene Fluoreszenzintensität, verändert aber nicht das TPEF-Spektrum. Die Messungen

bestätigen die oben genannte Vermutung, dass die Reabsorptionseffekte vernachlässigbar sind.

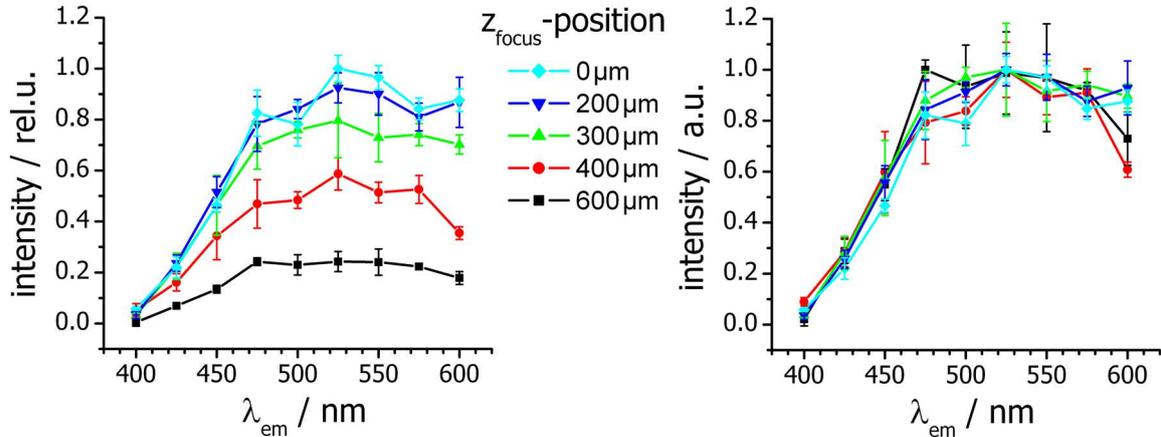


Abb. 5.15: Auf das Intensitätsmaximum normierte TPEF-Spektren von Eumelanin / (0,1M)NaOH ($OD_{1\text{mm}} = 0,642$ bei $\lambda = 400 \text{ nm}$) bei Anregung mit $\lambda_{exc} = 800 \text{ nm}$ und Anregungspulsenergie von $E_{puls} = 1,9 \mu\text{J}$. Bei der Variation der Fokusposition bezüglich der Küvettenwand konnten im Spektrum keine Reabsorptionseffekte beobachtet werden. Die Position $z = 0 \mu\text{m}$ kennzeichnet den Punkt größter gemessener Fluoreszenzintensität, bei sich der Fokus direkt an die Küvettenwand anschließt. Alle übrigen Fokusposition liegen entsprechend ihrer angegebenen Position tiefer in der Lösung.

Aufgrund der nur leichten beobachteten Verbreiterung des TPEF-Spektrums gegenüber dem OPEF-Spektrum gilt es nun die am Anfang des Abschnitts 5.2 gestellte Frage zu klären, ob die gegenüber der OPEF verbreiterte TPEF des Eumelanins auf eine veränderte Gewichtung zwischen den Fluoreszenzanteilen der kleinen und großen Eumelanin-Aggregate zurückgeführt werden kann.

Im Abschnitt 4.5 wurde festgestellt, dass die größeren Aggregate gegenüber den kleineren ein breiteres und rotverschoben erscheinendes Spektrum besitzen. Betrachtete man aber die absolute Fluoreszenzintensität der Spektren, konnte man aufgrund der höheren Fluoreszenzquantenausbeute der kleinen Aggregate feststellen, dass das breitere und rotverschoben erscheinenden OPEF-Spektrum der größeren Aggregate durch das der kleinen vollkommen abgedeckt wurde (siehe Abbildung 4.18).

Im Falle des bezüglich der OPEF verbreiterten TPEF würde es bedeuten, dass schwere Aggregate bei einer TPE stärker fluoreszieren als bei der OPE.

Um einen Überblick über das nichtlineare Fluoreszenzverhalten von unterschiedlich großen Eumelanin-Aggregaten zu bekommen, wurden die Eumelanin-Lösung wie in Abschnitt 4.5 beschrieben in zwei Fraktionen unterschiedlicher Aggregatmassen getrennt. Das Filtrat bestand aus einer Lösung von Eumelanin-Aggregaten einer Masse von $MW > 10 \text{ kD}$ und der Filtrerrückstand beinhaltete alle größeren Aggregate. Dieser wurde vorsichtig mit der (0,1M)NaOH-Lösung aus dem Filter gewaschen. Beide Lösungen wurden auf eine Absorption von $OD_{1\text{mm}} = 1,0$ bei $\lambda = 350 \text{ nm}$ eingestellt. Das entsprach bei $\lambda = 400 \text{ nm}$ einer $OD_{1\text{mm}} = 0,615$ für die Fraktion mit $MW < 10 \text{ kD}$ und einer $OD_{1\text{mm}} = 0,718$ für die Fraktion mit $MW > 10 \text{ kD}$. Eine Probe jeder Lösung wurde anschließend in eine Küvette mit der Schichtdicke $d = 1 \text{ mm}$ gefüllt und die

TPEF-Spektren gemessen. Zur Anregung wurde Licht der Wellenlänge $\lambda = 800$ nm verwendet. Die Spektren sind in Abbildung 5.16 dargestellt.

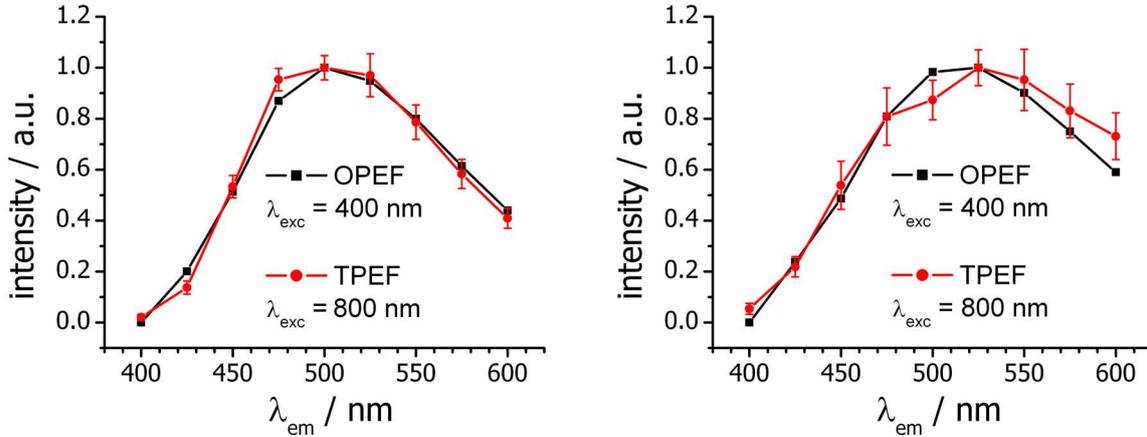


Abb. 5.16: Gegenüberstellung von OPEF- und TPEF-Spektren von zwei durch Ultrafiltration erstellter Eumelanin-Lösungen mit Aggregaten mit Aggregatsmassen $MW < 10$ kD (links) und $MW > 10$ kD (rechts) .

In der genannten Abbildung sind auch die bereits in Abschnitt 4.5 vorgestellten OPEF-Spektren der jeweiligen Fraktion eingezeichnet. Um die Spektren gut vergleichen zu können, wurden die OPEF-Spektren rechnerisch wieder auf die gleichen spektralen Stützstellen zusammengefasst wie die TPEF-Spektren.

Aus dem Vergleich wird ersichtlich, dass die Unterschiede zwischen den OPEF- und TPEF-Spektren der Fraktion $MW < 10$ kD im Rahmen des Messfehlers liegen. Bei den größeren Aggregaten ist eine leichte Anhebung des Spektrums im roten Bereich sichtbar. Aufgrund der geringen Unterschiede zwischen den jeweiligen TPEF- und OPEF-Spektren kann davon ausgegangen werden, dass bei der TPEF-Anregung schließlich die gleichen Anregungszustände bevölkert werden, wie bei der OPEF-Anregung mit Licht der halben Wellenlänge. Das kann einerseits daran liegen, dass entgegen der Vermutung doch ein simultaner 2-Photonen-Anregungsprozess stattfindet. Oder aber es findet, wie am Anfang des Abschnitts 5.2 vermutet, ein schrittweiser 2-Photonen-Anregungsprozess mit anschließendem Energietransfer zu einem äquivalenten Anregungszustand der 1. Stufe statt.

Die Verbreiterung des Spektrums der unfraktionierten Eumelanin-Lösung bei nichtlinearer Anregung ist jedoch höchstwahrscheinlich nicht oder nur teilweise das Ergebnis einer Relaxation des Zwischenzustands, denn diese müsste auch in den TPEF-Spektren der beiden fraktionierten Lösungen eine Rotverschiebung verursachen. Stattdessen ist zu vermuten, dass sich das Verhältnis der Anregungseffizienzen zwischen kleinen und großen Aggregaten bei der nichtlinearen Anregung gegenüber der linearen verändert.

Um die Anteile an der Gesamt-TPEF abzuschätzen, wurde der in Abbildung 5.17 gezeigte Fit des TPEF-Spektrums mit den TPEF-Spektren der beiden Fraktionen durchgeführt.

Es wird sichtbar, dass die TPEF der unfraktionierten Lösung durch die der größeren Aggregate dominiert wird. Das abgeschätzte Verhältnis zwischen den Fluoreszenzanteilen von Aggregaten mit $MW > 10$ kD zu $MW < 10$ kD an der Gesamt-TPEF ist 10 : 1. Im Fall der OPEF war dieses Verhältnis umgekehrt.

Nun stellt sich die Frage, ob sich dieses Verhalten mit den bis jetzt gewonnenen Erkenntnissen

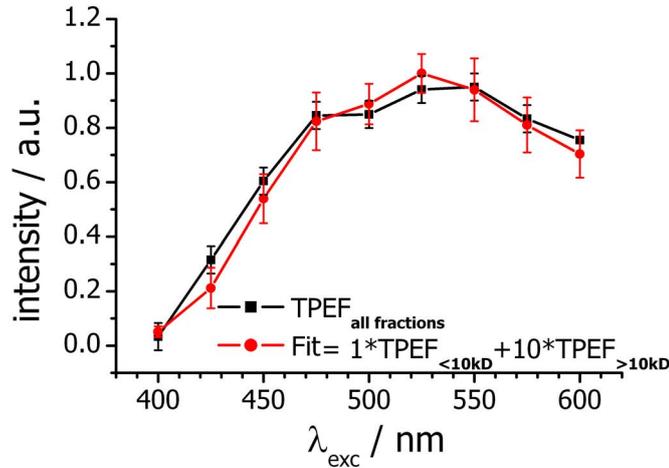


Abb. 5.17: Fit des TPEF-Spektrums einer Eumelanin-Lösung durch Superposition der TPEF-Spektren seiner fraktionierten Bestandteile ($\lambda_{exc} = 800 \text{ nm}$). Es zeigt sich, dass im Gegensatz zu den OPEF-Spektren bei der TPEF die Fluoreszenzanteile der größeren Aggregate überwiegen. Im gezeigten Fit wurde die TPEF der Aggregatsfraktion mit $MW > 10 \text{ kD}$ zur TPEF der Aggregatsfraktion mit $MW < 10 \text{ kD}$ im Verhältnis 10 : 1 gewichtet.

erklären lässt.

Dazu kann das Modell einer schrittweisen 2-Photonen-Anregung eines Anregungszustandes 2. Stufe mit nachfolgendem isoenergetischem Energietransfer zu einem Anregungszustand 1. Stufe verwendet werden, wie es in Abbildung 5.18 dargestellt ist.

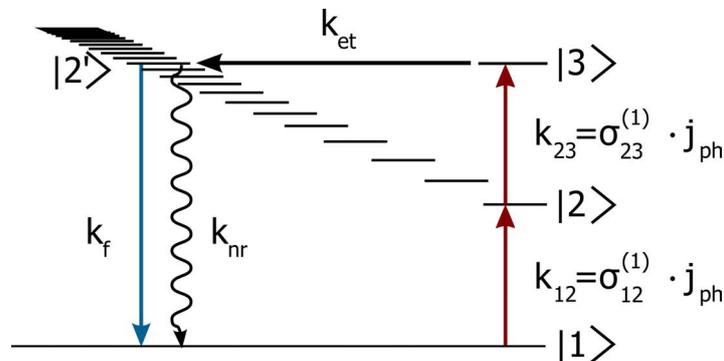


Abb. 5.18: Modell für die weiterführenden Überlegungen über mögliche Ursache für die Dominanz größerer Eumelanin-Aggregate am Gesamtfluoreszenzsignal (siehe Text).

Nach diesem Modell kann unter der Annahme eines Zwischenniveaus mit einer Lebensdauer, die länger als der Anregungspuls ist, folgende Ratengleichung abgeleitet werden:

$$\begin{aligned}
 k_f + k_{nr1} + k_{nr2} &= k_{et} \cdot k_{12} \cdot k_{23} \\
 &= k_{et} \cdot \sigma_{12}^{(1)} \sigma_{23}^{(1)} \cdot j_{ph}^2
 \end{aligned}
 \tag{5.7}$$

Dabei bezeichnet k_f die Fluoreszenzübergangsrate, k_{nr1} und k_{nr2} die Übergangsraten der nichtstrahlenden Übergänge, k_{et} die Übergangsrate des Energietransfers $\sigma_{12}^{(1)}$ bzw. $\sigma_{23}^{(1)}$ die

linearen Absorptionsquerschnitte der Grund- und der Anregungszustandsabsorption und j_{ph} die Photonendichte des Anregungslichts.

Der Wirkungsquerschnitt $\sigma_{12}^{(1)}$ kann aus der Grundzustandsabsorption OD berechnet werden:

$$\sigma_{12}^{(1)} = \frac{OD \cdot \ln(10)}{c}$$

Wie zu sehen ist, bezieht sich der Wirkungsquerschnitt auf die Teilchenkonzentration c der Absorber. In den hier dargelegten Betrachtungen sollen jedoch nur die Verhältnisse der Absorptionswirkungsquerschnitte der jeweilig gleichen Fraktionen bei unterschiedlichen Wellenlängen ermittelt werden, womit sich die konstante Teilchenkonzentration herauskürzt. Aus den Werten der in Abschnitt 4.2 gezeigten Absorptionskurven können die optischen Dichten der beiden Fraktionen für $\lambda = 400$ nm und $\lambda = 800$ nm berechnet werden (aufsummieren). Die Absorption der Fraktion der Aggregate mit $MW < 10$ kD liegt für $\lambda = 400$ nm bei $OD_{1\text{mm}} = 0,336$ und für $\lambda = 800$ nm bei $OD_{1\text{mm}} = 0,005$. Die Absorption sinkt also um den Faktor 67. Die Aggregate mit $MW > 10$ kD besitzen bei $\lambda = 400$ nm eine Absorption von $OD_{1\text{mm}} = 2,82$ und bei $\lambda = 800$ nm eine Absorption von $OD_{1\text{mm}} = 0,193$. Der Abfall der Absorption, das heißt auch des Absorptionswirkungsquerschnitts ist in diesem Fall mit 14,6 rund 4,5 mal geringer als bei den kleinen Aggregaten.

Mit der groben Näherung $\sigma_{12}^{(1)} \approx \sigma_{23}^{(1)}$ erhöht sich der Effizienzunterschied der schrittweisen 2-Photonen-Anregung zwischen kleinen und großen Aggregaten auf 1 : 20.

Das heißt, selbst bei einem Verhältnis der Fluoreszenzquantenausbeuten von kleinen zu großen Aggregaten von ungefähr 7,5 : 1 ergibt sich unter der Annahme $k_{et,MW < 10\text{kD}} \approx k_{et,MW > 10\text{kD}}$, dass der Fluoreszenzanteil der größeren Aggregate an der gesamten TPEF ca. dreimal größer ist als der der kleinen Aggregate. Es liegt jedoch die Vermutung nahe, dass die Energietransferrate aufgrund der höheren Zustandsdichte bei großen Aggregaten ebenfalls höher liegt als bei kleinen Aggregaten. Das würde für einen noch höheren Fluoreszenzanteil großer Aggregate an der beobachteten TPEF sprechen.

5.2.3 TPEF-Spektren von Eumelanin unter Verwendung verschiedener Anregungswellenlängen und Ableitung eines TPEF-Anregungsspektrums

Mit Hilfe des durchstimmbaren Farbstofflasers war es möglich, die TPEF des Eumelanins auf seine Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge hin zu untersuchen. Da der Fokusbereich über alle verwendeten Anregungswellenlängen hinweg nahezu konstant war, konnte durch die wellenlängenabhängige Anpassung der Pulsenergie außerdem die Photonendichte im Fokus konstant gehalten werden. Somit konnten auch die relativen Fluoreszenzintensitäten der TPEF bei verschiedenen Anregungswellenlängen bestimmt werden. Da die Photonenergie zur Lichtwellenlänge reziprok im Verhältnis steht:

$$E_{ph} = h \cdot \frac{c}{\lambda_{exc}}$$

wurde die höchste Pulsenergie bei den Wellenlänge $\lambda_{exc} = 700$ nm benötigt. Einen Engpass der erzeugbaren Laserpulsenergie stellte jedoch die längste verwendete Wellenlänge $\lambda_{exc} = 820$ nm dar. Denn aufgrund des großen spektralen Abstandes zur Pumpwellenlänge ($\lambda_{pump} = 337,1$ nm) war die Effizienz des Energietransfers vom Pump- zum Nutzlicht sehr gering. Da die maximal einstellbare Pulsenergie für die Wellenlänge $\lambda_{exc} = 820$ nm bei $E_{pulse} = 8,0$ μJ lag, wurden die

Pulsenergien der übrigen Anregungswellenlängen entsprechend ihrer Photonenenergie auf die gleiche Photonendichte eingestellt.

Die gemessenen TPEF-Spektren des Eumelanins wiesen die schon bei der OPEF gefundene Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge auf (siehe Abbildung 5.19). Bei einer Rotverschiebung des Anregungslichts verschob sich ebenfalls das Maximum der Eumelanin-TPEF ins Rote. Unter der Annahme eines schrittweisen Anregungsprozesses spricht dieses Verhalten für die oben genannte Vermutung, dass die Anregungszustände der 2. Stufe mit denen der 1. Stufe über einen Energietransfer gekoppelt sind.

Ein solcher Energietransfer ist auf den ersten Blick ungewöhnlich, da höhere Anregungszustände nach Kashas Rule sehr schnell über Internal Conversion und Vibronische Relaxation in den ersten Anregungszustand übergehen. Ein Grund für diesen Energietransfer könnte in einer hohen Übergangsrate ($k_{ET} \geq 10^{12} \text{ s}^{-1}$) des Energietransfers liegen. Allerdings ist auch denkbar, dass analog zum, dem Indol strukturell ähnlichen, Azulen der energetische Abstand zwischen dem ersten und zweiten Anregungszustand ähnlich groß ist wie der zwischen dem ersten Anregungszustand und dem Grundzustand. In diesem Fall wären die Übergangsraten zwischen dem zweiten und ersten Anregungszustand bzw. zwischen dem ersten Anregungszustand und dem Grundzustand ungefähr gleich groß. In diesem Falle würde Kashas Rule nicht gelten und es würden längerlebige Anregungszustände der 2. Stufe existieren, die auch bei einem weniger effizienten Energietransfer über diesen relaxieren würden.

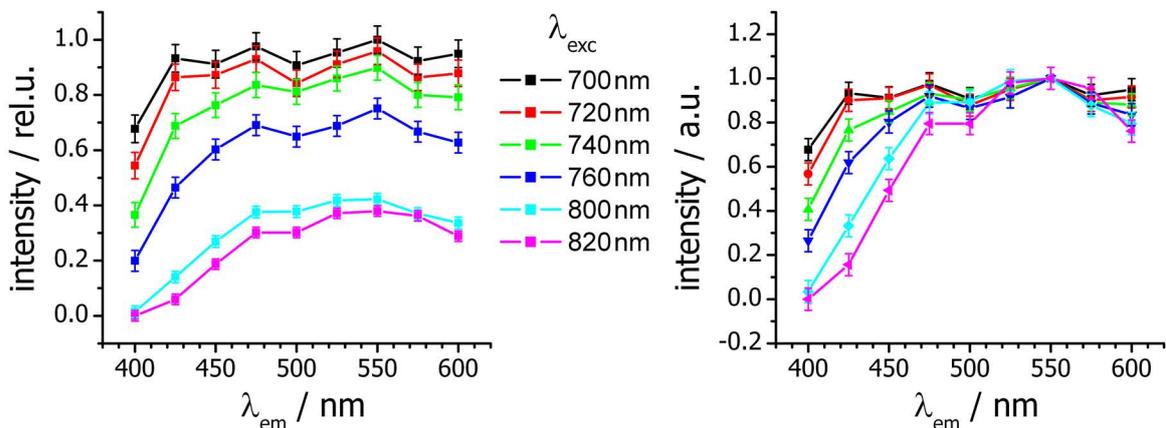


Abb. 5.19: Relative (links) und auf das Maximum normierte (rechts) TPEF-Spektren von Eumelanin / (0,1M)NaOH ($OD_{1\text{mm}} = 0,887$ bei $\lambda = 400 \text{ nm}$) in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge.

Da wie oben beschrieben die Anregungsbedingungen bei allen verwendeten Anregungswellenlängen gleich waren, spiegeln die Amplituden der TPEF-Spektren die effektiven Anregungswirkungsquerschnitte wider. Somit war es möglich, aus den TPEF-Spektren der sechs verwendeten Anregungswellenlängen das in Abbildung 5.20 gezeigte TPEF-Anregungsspektrum mit sechs Stützstellen zu erstellen. Dabei ist es einem OPEF-Anregungsspektrum aus Abschnitt 4.6 gegenübergestellt. Um das TPEF- mit einem OPEF-Anregungsspektrum vergleichen zu können, wurden zwei möglichst ähnliche Emissionswellenlängen aus den Datensätzen gewählt. Die Wahl fiel auf ein OPEF-Anregungsspektrum bei $\lambda_{em} = 535 \text{ nm}$ und ein TPEF-Anregungsspektrum bei $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$. Die Differenz zwischen den Anregungswellenlängen $\Delta\lambda_{em} = 10 \text{ nm}$ ist nach den Ergebnissen aus Abschnitt 4.6 unerheblich. Es ist

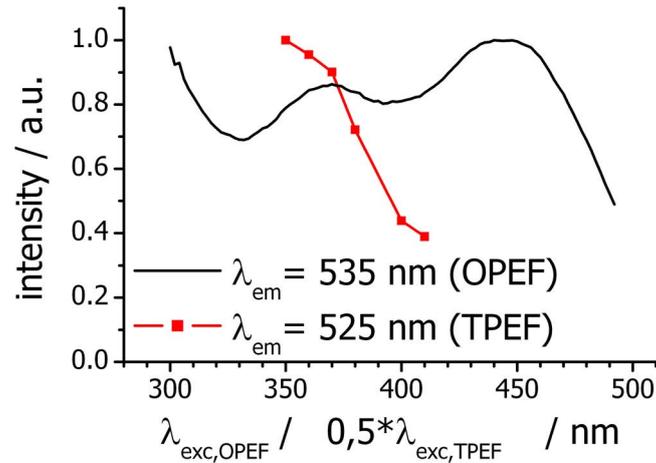


Abb. 5.20: Gegenüberstellung von einem OPEF- und einem TPEF-Anregungsspektrum von Eumelanin / (0,1M)NaOH. Das OPEF-Spektrum stammt aus den im Abschnitt 4.6 beschriebenen Messungen.

erkennbar, dass das TPEF-Anregungsspektrum von Eumelanin einen anderen Verlauf aufweist als das OPEF-Anregungsspektrum. Aufgrund der begrenzten spektralen Breite des TPEF-Anregungsspektrums kann nur vermutet werden, dass die sichtbare Flanke mit der Flanke des zweiten lokalen Minimums des OPEF-Anregungsspektrums korreliert, wobei die TPEF-Flanke etwas verbreitert und blauverschoben ist.

Der Unterschied zwischen TPEF- und OPEF-Anregungsspektrum stellt jedoch keinen Anhaltspunkt für einen schrittweisen Anregungsprozess dar, da sich auch die Anregungsspektren der simultan angeregten TPEF von den linearen Anregungsspektren unterscheiden. Der schrittweise Anregungsprozess muss also über alternative Versuche nachgewiesen werden.

5.3 Nachweis eines schrittweisen TPE-Prozesses bei Eumelanin

Die bisherigen Versuche mit Methoden der nichtlinearen Spektroskopie dienten primär der Auskunft, wie die Relaxation von Anregungszuständen der Stufe 1 und 2 vonstatten geht. Dabei wurde der schrittweise 2-Photonen-Anregungsprozess bis jetzt nicht nachgewiesen. In diesem Abschnitt soll dieser Nachweis nun erbracht werden.

Um die Vorgehensweise zu erläutern, ist als erstes ein Blick auf die zwei Modelle der schrittweisen bzw. simultanen 2-Photonenanregung sinnvoll. Wie in Abbildung 5.21 dargestellt, unterscheiden sich die Ratengleichungen der Anregungsprozesse der schrittweisen und simultanen TPE durch die Wirkungsquerschnitte. Dementsprechend soll im Folgenden der Wirkungsquerschnitt der TPE von Eumelanin bestimmt und mit dem Wirkungsquerschnitt einer simultanen TPE verglichen werden. Für die Wirkungsquerschnitte der simultanen 2-Photonenanregung endogener Fluorophore sind aus der Literatur [Gar07, Zip03, Xu96b, Xu96a] Werte im Bereich $10^{-4} \text{ GM} \leq \sigma_{12}^{(2)} \leq 10^{-1} \text{ GM}$ bekannt. Aus den in Abschnitt 2.3.1 vorgestellten Ratengleichungssystemem für die schrittweise und simultane TPEF ergibt sich außerdem ein Unterschied in der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Anregungspulsdauer. Diese unterschiedliche Abhängigkeit wird in Abschnitt 5.3.2 näher beleuchtet.

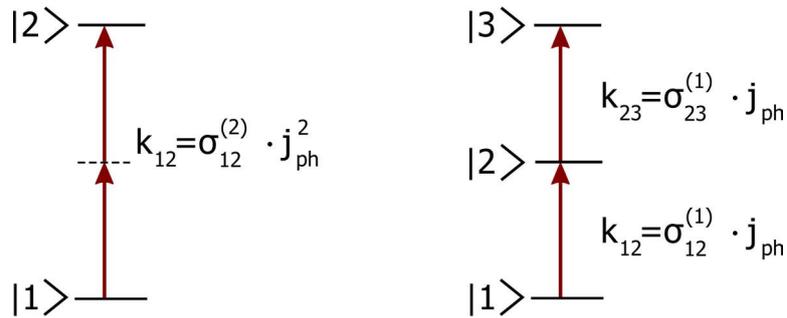


Abb. 5.21: Jablonski-Diagramme einer simultanen (links) und einer schrittweisen TPA (rechts).

5.3.1 Nachweis der schrittweisen 2-Photonen-Anregung durch Vergleich des Absorptionswirkungsquerschnitts

Um den TPE-Wirkungsquerschnitt von Eumelanin in Lösung zu bestimmen, wurde eine vergleichende Messung an Farbstofflösungen bekannter Fluorophorkonzentration und TPE-Wirkungsquerschnitte durchgeführt. Mit Hilfe der in Abschnitt 2.3.1 vorgestellten Gleichung 2.29, kann der TPE-Wirkungsquerschnitt von Eumelanin ermittelt werden:

$$\sigma_{jk}^{(n)} = \frac{\eta_{ref} \cdot \sigma_{12,ref}^{(2)} \cdot c_{ref}}{\eta \cdot c} \cdot \frac{j_{ref}^2}{j^2} \cdot \frac{j_{TPEF}}{j_{TPEF,ref}}$$

Als Referenzfarbstofflösungen wurden Coumarin307 / Ethanol und RhodaminB / Ethanol verwendet. Die Wirkungsquerschnitte des einen Farbstoffs wurden für die Berechnung verwendet, die des anderen zur Kontrolle des berechneten Wirkungsquerschnitts und Abschätzung des Messfehlers. Das Coumarin307 eignete sich aufgrund der spektralen Lage seines TPEF-Spektrums sehr gut als Referenzfarbstoff (mittig im Messbereich). Das RhodaminB lag nur teilweise im spektralen Detektionsbereich und wurde zur Kontrolle der errechneten Wirkungsquerschnitte verwendet. Es wurde ausgewählt, da sein TPEF-Anregungsspektrum charakteristisch vom OPEF-Anregungsspektrum abweicht und somit zusätzlich die nichtlineare Anregung nachweist. Für die Berechnung wurden als Referenz-TPA-Wirkungsquerschnitte für Coumarin307 die in [Xu96a] aufgeführten Werte verwendet (siehe Abbildung 5.22).

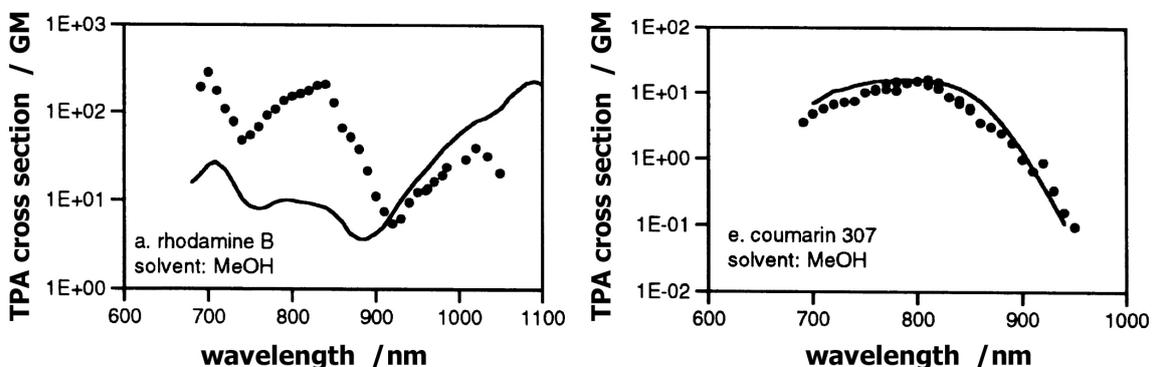


Abb. 5.22: Spektraler Verlauf der TPA-Wirkungsquerschnitte (TPEF-Anregungsspektren) für Rhodaminb und Coumarin307 nach Xu et al. [Xu96a].

Die Messung lief analog zu der im Abschnitt 5.2.3 beschriebenen TPEF-Spektroskopie von Eumelanin mit Hilfe der konfokalen Apparatur ab. Um zu vermeiden, dass Sättigungseffekte (transientes Ausbleichen) zu Verfälschungen der Anregungsspektren führen, wurden hochkonzentrierte Farbstofflösungen verwendet. Da die Fluoreszenzquantenausbeuten von Coumarin307 und RhodaminB mit $\eta_{cou307} = 0,56$ [Lee05] und $\eta_{rhoB} = 0,7$ [Gar07] sehr viel höher liegen als die von Eumelanin mit $\eta_{mel} = 10^{-3..-4}$ [Teu99], wurden zusätzliche Neutralglasfilter (NG-Filter) gemessener Transmission in den Detektorstrahlengang gestellt, um die bei RhodaminB und Coumarin306 entstehenden Fluoreszenzintensitäten im Messbereich des Detektors zu halten. Die gemessenen TPEF-Spektren der RhodaminB- bzw. Coumarin307-Lösung mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen sind in Abbildung 5.23 dargestellt.

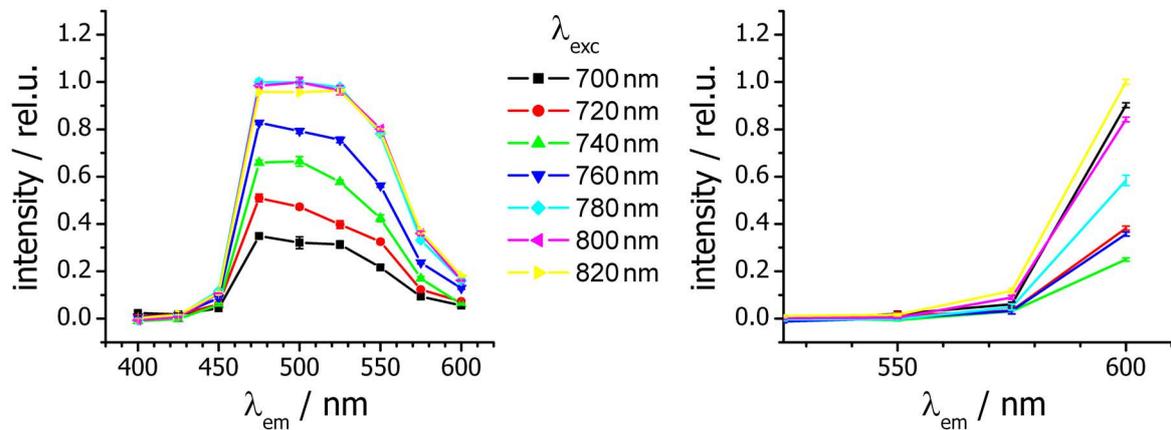


Abb. 5.23: TPEF-Spektren von Coumarin307 / Ethanol (links) und RhodaminB / Ethanol (rechts) bei Anregung mit ns-Laserpulsen unterschiedlicher Wellenlänge.

Aus diesen konnten wie bereits beim Eumelanin TPEF-Anregungsspektren ermittelt werden. Ein Vergleich zwischen den gemessenen, normierten TPEF-Anregungsspektren von Coumarin307 bzw. RhodaminB mit den übertragenen, ebenfalls normierten Literaturdaten wird in Abbildung 5.25 gezogen. Es ergab sich eine gute Übereinstimmung im Rahmen der für solche Messungen üblichen Abweichungen. Auch die charakteristische Form des TPEF-Anregungsspektrums von RhodaminB mit einem lokalen Minimum bei $\lambda_{exc} = 740$ nm wurde reproduziert.

Um den TPE-Wirkungsquerschnitt von Eumelanin nach der Gleichung 2.29 bestimmen zu können, wurden die Teilchenkonzentrationen der Referenzfarbstoff- und Eumelanin-Lösungen über eine Absorptionmessung und ihre molaren Extinktionskoeffizienten bzw. im Fall von Eumelanin über die in Abschnitt 3.2.2 bestimmte mittlere Absorbermasse und die Massenkonzentration ermittelt.

Aus den Optischen Dichten $OD_{1mm}(240 \text{ nm}) = 2,3$ für Coumarin307 und $OD_{1mm}(350 \text{ nm}) = 1,4$ für Rhodamin ergaben sich mit den jeweiligen molaren Extinktionskoeffizienten die Teilchenkonzentrationen $c_{cou307} = 1,8 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ und $c_{rhoB} = 2,0 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ für die beiden Lösungen. Die dabei verwendeten molaren Extinktionskoeffizienten wurden der Quelle [Bra00] entnommen und lagen für Coumarin307 bei $\epsilon(240 \text{ nm}) = 1,25 \frac{1}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$ und für RhodaminB bei $\epsilon(350 \text{ nm}) = 0,7 \frac{1}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$.

Für die Abschätzung der Teilchendichte des Eumelanins in Lösung wurde von der verwendeten Massenkonzentration $C_{mel} = 0,7 \frac{\text{g}}{\text{l}}$ ausgegangen.

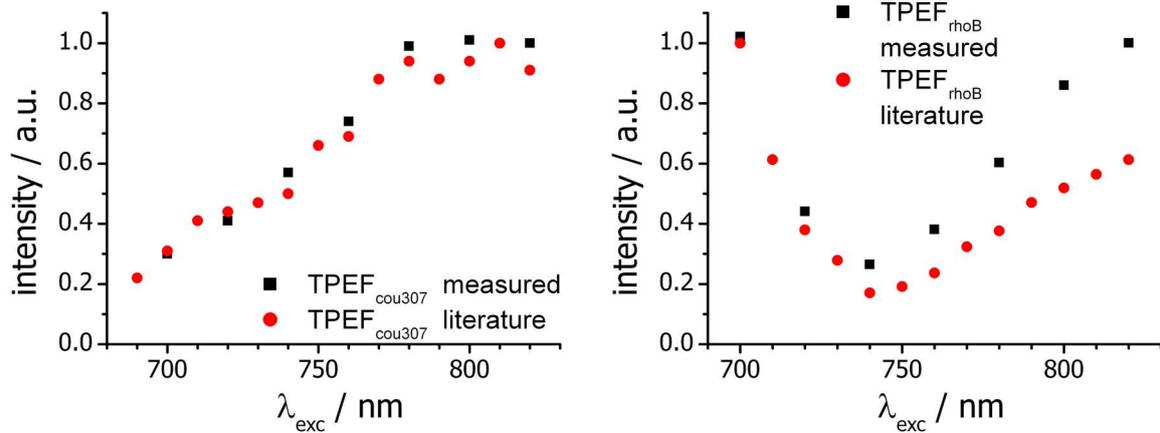


Abb. 5.24: Vergleich der gemessenen TPEF-Anregungsspektren (schwarz) von Coumarin307 / Ethanol (links) und RhodaminB / Ethanol (rechts) mit denen aus der Literatur [Xu96a] (rot).

In Abschnitt 3.2.2 wird dargelegt, dass im Mittel ein $MW = 50$ kD schweres Eumelanin-Aggregat das Licht absorbiert. Da sich aus dem Aggregat-/Molekulargewicht MW direkt die Molare Masse $M_{mel} = 50 \frac{\text{kg}}{\text{mol}}$ ergibt, kann die Eumelaninkonzentration der verwendeten Lösung mit $c_{mel} = 1,4 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ angegeben werden.

Mit Coumarin307 als Referenzfarbstoff ergaben sich damit die in Abbildung 5.25 gezeigten Wirkungsquerschnitte der Eumelanin- und RhodaminB-Lösung. Ein Vergleich der ermittelten TPA-Wirkungsquerschnitte von RhodaminB mit den Werten aus der Quelle (siehe Abb. 5.22) zeigt, dass die ermittelten Werte um eine Größenordnung geringer ausfallen. Diese Abweichung existiert jedoch auch zwischen den von verschiedene Arbeitsgruppen ermittelten TPA-Wirkungsquerschnitten und spiegelt die absolute Messgenauigkeit der TPA-Wirkungsquerschnitte wider (siehe Tabelle 5.12).

$c / \frac{\text{mol}}{\text{l}}$	Lösungsmittel	$\lambda_{exc} / \text{nm}$	$\sigma_{12}^{(2)} / \text{GM}$	Quelle
$2,0 \cdot 10^{-3}$	Ethanol	800	13,4	eigen
$3,8 \cdot 10^{-5}$	Methanol	≈ 800	20,8	Oulianov et al. [Oul01]
$1,0 \cdot 10^{-6}$	Methanol	790	24,4	Kauert et al. [Kau06]
$1,0 \cdot 10^{-4}$	Methanol	800	100 – 150	Xu et al. [Xu96b]
$1,0 \cdot 10^{-5}$	Methanol	797	720	Fischer et al. [Fis95]

Tab. 5.12: Gegenüberstellung des ermittelten Wirkungsquerschnitts für RhodaminB/Ethanol mit Werten aus der Literatur.

Verglichen mit den im Grundlagenteil abgeschätzten Unterschieden zwischen den Wirkungsquerschnitten einer simultanen und einer rein schrittweisen 2-Photonen-Anregung von $10^7 - 10^9$, fällt der ermittelte Wirkungsquerschnitt für die TPE von Eumelanin zu gering aus. Aller-

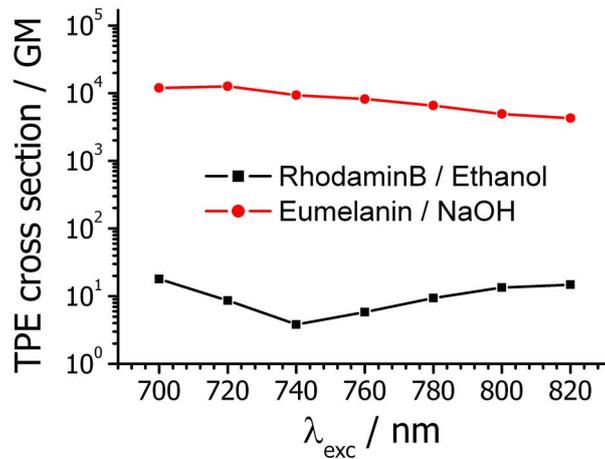


Abb. 5.25: Ausgerechnete Verläufe der TPA-Wirkungsquerschnitte von Eumelanin / (0,1M)NaOH und RhodaminB / Ethanol.

dings liegt er mit 10^4 GM auch zu hoch für eine simultane TPE. Nach der Abschätzung aus Abschnitt 2.3.1 ist entweder zu vermuten, dass der Zwischenzustand beim schrittweisen 2-Photonen-Anregungsprozess im Mittel nur eine Lebensdauer im ps-Bereich besitzt oder dass neben der schrittweisen TPE auch eine simultane TPE stattfindet, da nur ein kleinerer Teil der angeregten Zustände langlebig genug für einen schrittweisen 2-Photonen-Anregungsprozess ist. Beide Interpretationen werden durch die Ergebnisse der in Abschnitt dargelegten Pump-Probe-Messungen bestätigt, da die dabei hauptsächlich gefundenen Lebensdauerkomponenten im ps-Bereich lagen, aber außerdem kleinere Anteile von Komponenten mit Lebensdauern im ns-Bereich gefunden wurden.

An dieser Stelle ist jedoch notwendig, darauf hinzuweisen, dass die berechneten TPE-Wirkungsquerschnitte der Eumelanin-Lösung an der Signifikanzschwelle des durchgeführten Versuchs stehen. Die Gründe liegen im relativ geringen Unterschied zu den Wirkungsquerschnitten der simultanen TPA, dem nur schwer abzuschätzenden Messfehler der Teilchenkonzentration von Eumelanin und der Messgenauigkeit der TPA-Wirkungsquerschnitte. Es war somit unabdingbar, einen referenzierenden Versuch zur Belegung der schrittweisen TPEF durchzuführen.

5.3.2 Nachweis der schrittweisen 2-Photonen-Anregung über die fehlende Abhängigkeit der TPEF-Intensität von der Anregungspulsdauer

Nach den Gleichungen 2.30 und 2.31 aus dem Abschnitt 2.3.1, die in ähnlicher Form auch in einer der grundlegenden Arbeiten [Teu00] zur TPEF von Eumelanin zu finden sind, geht hervor, dass sich der simultane 2-Photonen-Anregungsprozess in seiner Abhängigkeit von der Anregungspulsdauer vom schrittweisen 2-Photonen-Anregungsprozess unterscheidet.

Die Aussage der unterschiedlichen Zeitabhängigkeit in den Gleichungen 2.30 und 2.31 wird leichter plausibel, wenn man die maximale Photonendichte j_{max} durch die Pulsenergie E_{pulse} ersetzt. Für einen zeitlich gaußförmigen Anregungspuls mit der Halbwerts-laserpulsdauer T_{pulse} ist die Pulsenergie das Produkt der zeitlich aufintegrierten Photonendichte mit der

Photonenenergie E_{ph} und der durchstrahlten Fläche A_{beam} . Es gilt:

$$\begin{aligned}
 E_{pulse} &= A_{beam} \cdot E_{ph} \cdot j_{max} \cdot \int_{-\infty}^{\infty} e^{-\frac{4\ln(2) \cdot t^2}{T_{pulse}^2}} dt \\
 &= \sqrt{\frac{\pi}{4\ln(2)}} A_{beam} \cdot E_{ph} \cdot j_{max} \cdot T_{pulse} \\
 \Rightarrow j_{max} &= \sqrt{\frac{4\ln(2)}{\pi}} \frac{E_{pulse}}{A_{beam} \cdot E_{ph} \cdot T_{pulse}} \quad (5.8)
 \end{aligned}$$

Wird j_{max} aus Gleichung 5.8 in die Gleichungen der simultanen 2.30 und schrittweisen 2.31 TPE eingesetzt, ergibt sich für den simultanen Fall:

$$n_2 = \sqrt{\frac{4\ln(2)}{\pi}} \sigma_{12}^{(2)} \frac{E_{pulse}^2}{(A_{beam} \cdot E_{ph})^2} \cdot \frac{1}{T_{pulse}} \quad , \quad (5.9)$$

und für den schrittweisen TPA-Prozess folgt:

$$n_3 = \sigma_{12}^{(1)} \cdot \sigma_{23}^{(1)} \frac{E_{pulse}^2}{(A_{beam} \cdot E_{ph})^2} \quad . \quad (5.10)$$

Das heißt, unter der Annahme, dass das Zwischenniveau bei der schrittweise angeregten TPEF langlebiger ist als die Pulsdauer des Anregungslichts, sollte im Gegensatz zum simultanen Anregungsprozess keine Abhängigkeit von der Anregungspulsdauer vorliegen. Da aus den vorangegangenen Messungen eine mittlere Lebensdauer des Zwischenniveaus im ps-Bereich vermutet wurde, war der Einsatz kürzerer Pulse sinnvoll.

Aus diesem Ansatz heraus wurde an der Universität Potsdam eine Apparatur mit einem fs-Laser als Strahlquelle aufgebaut, dessen Pulsdauer ohne Veränderung der Zentralwellenlänge oder Pulsenergie variiert werden konnte. So war es möglich, die Intensitätsänderungen der Eumelanin-TPEF in Abhängigkeit von der Pulsdauer zu bestimmen.

Aufbau eines Spektroskopie-Messplatzes mit dechirpbarer fs-Laser-Anregungsquelle

Anregungslichtquelle Die Apparatur zur Messung der Abhängigkeit der Eumelanin-TPEF von der Pulsdauer des Anregungslichts wurde an der Universität Potsdam aufgebaut. Die Strahlquelle, bestehend aus Laseroszillator und regenerativem Verstärker, entsprach dem in Abschnitt 5.1.1 beschriebenen Aufbau aus Tsunami und Spitfire. Deshalb wird an dieser Stelle auf eine detailliertere Darstellung verzichtet. Für technische Einzelheiten sei auf die Quellen [Las95a, Las95b, Muc05] verwiesen.

Durch kontrolliertes Verstellen des Kompressorspiegels im Spitfire-Verstärker und der Darstellung des zeitlichen Pulsverlaufs über einen Autokorrelator (Positiv Light SSA von Spectra Physics), konnte die Pulsdauer eingestellt werden. Die mit Hilfe eines Lasermate10 Energiemessgeräts von Coherent gemessene mittlere Laserleistung lag bei $P_{laser} = 620$ mW, die verwendete Zentralwellenlänge bei $\lambda_{exc} = 800$ nm. Die Pulsdauer konnte durch Verstellen des Kompressors im Bereich $\Delta t_{pulse} = 130$ fs – 1 ps variiert werden. Die Repetitionsrate des Lasers lag bei $f_{pulse} = 1$ kHz.

Optischer Messaufbau Die hohe Repetitionsrate konnte messtechnisch als Quasi-Dauerstrich aufgefasst werden. Da auch eine höhere mittlere Laserleistung verfügbar war, als für die Messzwecke benötigt wurde, konnte auf spezielle Signalfilterungsverfahren wie die Lock-In- oder Gate-Technik verzichtet werden. Stattdessen wurde die Detektionsstrecke eines Fluorologs II der Firma SPEX, bestehend aus automatisiertem Monochromator und einem PMT als Detektor für die Messung verwendet (siehe Abbildung 5.26). Dieses Vorgehen ermöglichte nicht nur das Erfassen der jeweiligen TPEF-Intensität, sondern auch die Überwachung des TPEF-Spektrums. Über die Ein- und Ausgangspalte des Monochromators wurde eine spektrale Auflösung von $\Delta\lambda = 10$ nm eingestellt. Bei einer Integrationszeit von $\Delta t = 2$ s konnte ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis von 100 : 1 erreicht werden.

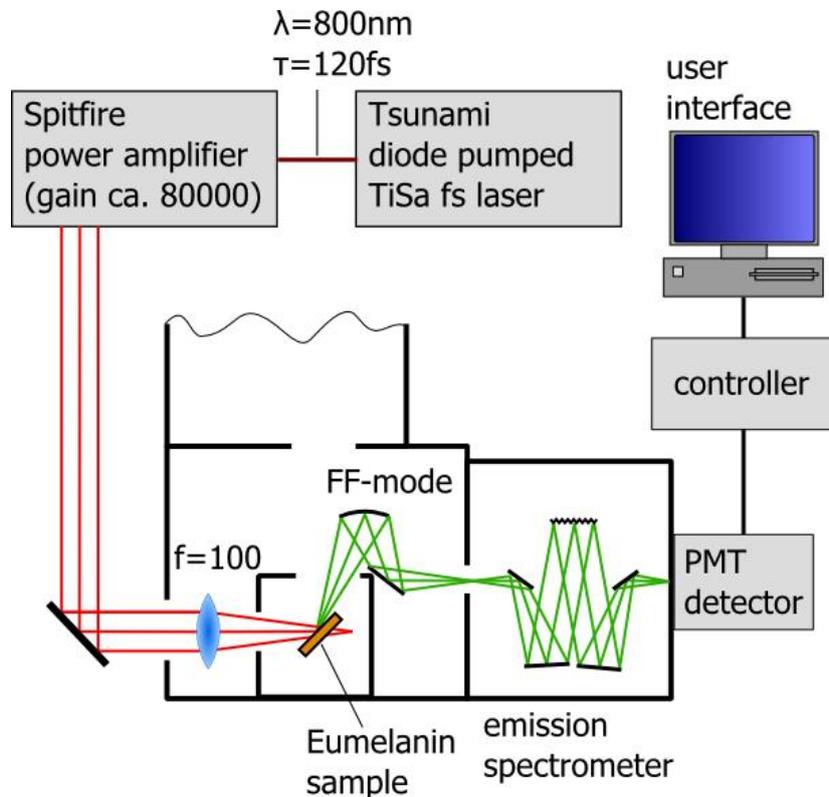


Abb. 5.26: Aufbau zur Bestimmung der Abhängigkeit der Eumelanin-TPEF-Intensität von der Laserpulsdauer des Anregungslichts.

Die Probe bestand aus einer Lösung Eumelanin / (0,1M)NaOH mit $OD_{1\text{mm}} = 2,149$ bei $\lambda = 400$ nm in einer Küvette mit einer Schichtdicke $d = 1$ mm, die durch das Anregungslicht unter einem Winkel von 45° bestrahlt wurde. Die Ausgangsstrahlung wurde dabei durch einen NG4-Filter der Dicke $d = 2$ mm auf eine mittlere Leistung von $P_{exc} = 85$ mW abgeschwächt und durch eine Linse der Brennweite $f = 100$ mm durch die Hilfsöffnung in die Messkammer (sample compartment) des Fluorologs eingekoppelt. Der Fokus wurde hinter die Probe gelegt, um etwaige Zerstörungen der Lösung durch zu hohe Intensitäten zu vermeiden. An der Grenzfläche Küvettenwand / Eumelanin-Lösung besaß der Strahl einen Durchmesser von $2w_{beam} = 1$ mm. Damit ergaben sich für das Anregungslicht der kürzesten Pulsdauer die in Tabelle 5.13 aufgeführten Parameter. Dabei steht P_{exc} für die mittlere Laserleistung, f_{pulse}

für die Repetitionsrate, E_{pulse} für die Pulsenergie, A_{beam} für den Strahldurchmesser und j für die mittlere Photonenflussdichte während eines Pulses.

P_{exc}	f_{pulse}	E_{pulse}	A_{beam}	j
0,085 mW	1 kHz	85 μ J	1 mm ²	$2,616 \cdot 10^{29} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \cdot \text{s}}$

Tab. 5.13: Parameter des Anregungslichts am Probenort für die kürzeste der verwendeten Pulsdauern.

Messung der TPEF-Intensität von Eumelanin in Abhängigkeit von der Pulsdauer des Anregungslichts

Zur Bestimmung der TPEF-Pulsdauerabhängigkeit wurde der fs-Laserpuls schrittweise durch Verstellen des Kompressors verlängert, wobei eine Messreihe von TPEF-Spektren unterschiedlicher Anregungspulsdauern entstand. Die Anregungspulsdauer selbst konnte - zusammen mit der Pulsamplitude - per Autokorrelator bestimmt werden. Konkret wurden nacheinander sieben verschiedene Halbwertspulsdauern des Anregungslichts im Bereich von $T_{pulse} = 130 \text{ fs} - 1 \text{ ps}$ eingestellt und die jeweiligen TPEF-Spektren aufgenommen. Diese TPEF-Spektren sind im linken Teil der Abbildung 5.27 dargestellt. Sie weisen die aus Abschnitt 5.2.2 bekannte, gegenüber dem OPEF-Spektrum verbreiterte Form auf. Da alle Messungen mit derselben Anregungswellenlänge (das heißt keine veränderte Reabsorption) und Anregungsenergie durchgeführt wurden und zwischen den Messungen keinerlei Veränderungen am optischen Aufbau vorgenommen wurden, spiegeln die gemessenen Intensitätsverhältnisse zwischen den einzelnen TPEF-Spektren nur die Abhängigkeit von der Anregungspulsdauer wider.

Im rechten Teilbild der Abbildung 5.27 sind die Amplituden der TPEF-Spektren den jeweiligen Anregungspulsdauern zugeordnet. Außerdem wurden die mittels Autokorrelator bestimmten Amplituden der jeweiligen Anregungspulse dargestellt. Aus Gleichung 5.9 ist bekannt, dass im simultanen Anregungsfall bei konstanter Pulsenergie des Anregungslichts zwischen Pulsdauer T_{pulse} und (integrierter) TPEF-Intensität j die Relation $\int j \, d\lambda \propto \frac{1}{\Delta T_{pulse}}$ besteht.

Dieselbe Relation ergibt sich auch zwischen Amplitude und Pulsdauer des zeitlich gaußförmigen Anregungspulses. Denn für die allgemeine Funktionenschar von gaußschen Glockenkurven konstanter Fläche (gleicher Energie) mit einem Maximum zum Zeitpunkt $t = 0$ gilt:

$$j(t) = \frac{2}{T_{pulse}} \sqrt{\frac{\ln(2)}{\pi}} \cdot e^{-\frac{4 \ln(2) \cdot t^2}{T_{pulse}^2}},$$

Dabei ist im betrachteten Fall eines zeitlich gaußförmigen Laserpulses $j(t)$ die zeitliche Photonenflussdichte und T_{pulse} die zeitliche Halbwertsbreite des Laserpulses. Damit folgt für die Pulsamplitude eine inverse Abhängigkeit von der Pulsdauer T_{pulse} :

$$j_{max}(t = 0) \propto \frac{1}{T_{pulse}}$$

Wie im Diagramm (Abbildung 5.27 rechts) ersichtlich ist, konnte nur der Verlauf der Anregungspulsamplituden erfolgreich durch eine $\frac{1}{T_{pulse}}$ -Funktion gefittet werden. Der Wert der TPEF-Amplitude war leicht linear fallend und blieb fast konstant. Das heißt, dass zwar die

zeitliche Gaußform des Anregungspulses über den ganzen Messbereich bestätigt werden konnte, der simultane TPEF-Anregungsprozess jedoch widerlegt wurde. Stattdessen belegen die fast unveränderlichen Amplituden der TPEF über den betrachteten Pulsdauerbereich hinweg den schrittweisen Anregungsprozess der Eumelanin-TPEF. Die beobachtete leichte Abhängigkeit der Eumelaninfluoreszenz von der Anregungspulsdauer könnte dabei auf einen konkurrierenden simultanen Anregungsprozess hinweisen, wobei die schrittweise TPE bei den verwendeten Pulsdauern dominant ist. Damit kann festgestellt werden, dass es Anregungszustände mit Lebensdauern im Messbereich von $\tau = 130 \text{ fs} - 1 \text{ ps}$ gibt, aus denen durch Anregungszustandsabsorption die Fluoreszenzniveaus der beobachteten TPEF bevölkert werden.

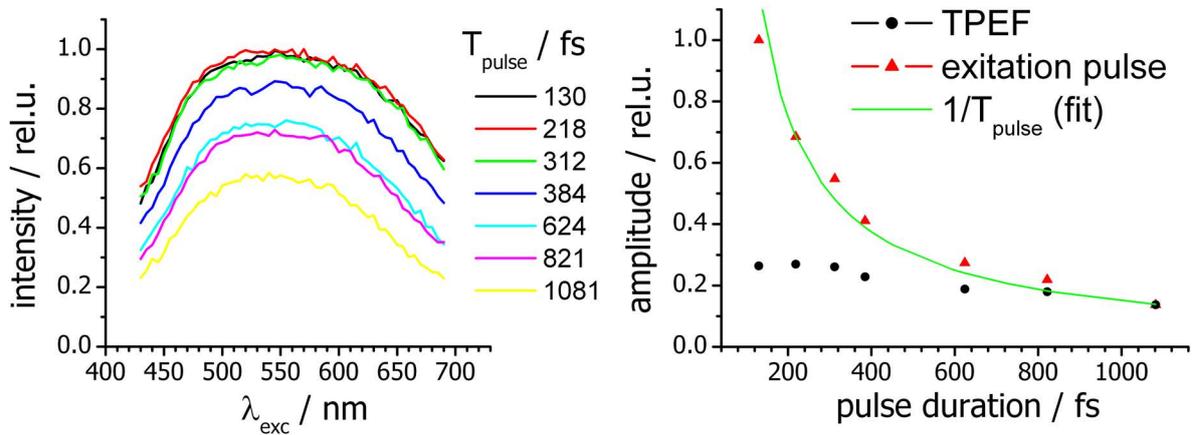


Abb. 5.27: Gemessene TPEF-Spektren in Abhängigkeit von der Laserpulsdauer des Anregungslichts (links) und Gegenüberstellung von TPEF-Amplituden und Amplitude der Anregungslichtpulses, jeweils in Abhängigkeit von der Laserpulsdauer (rechts).

Obwohl die Messergebnisse dieser Arbeit die schrittweise TPEF für Eumelanin in Lösung nachweisen, liegen die ermittelten Lebensdauern der für die schrittweise 2-Photonen-Anregung benötigten Zwischenniveaus nur im ps-Bereich. Die sich daraus ergebenden optimalen Anregungspulsdauern widersprechen auf den ersten Blick den in der Veröffentlichung [Sch07] gefundenen für Eumelanin im Gewebe, welche im ns-Bereich liegen.

Dabei ist zu beachten, dass die in Lösung gefundenen optimalen Anregungsbedingungen nicht einfach auf das Gewebe übertragen werden können, da das Eumelanin im Gewebe z.B. in Granulen gefasst ist und somit eine andere wechselwirkende Umgebung vorliegt. Außerdem ist zu vermuten, dass sich im Gewebe größere Eumelanin-Aggregate ausbilden, die wahrscheinlich auch andere organische und anorganische Stoffe (Proteine, Metalle) enthalten, welche die Zustandslebensdauern (z.B. durch Isolation einzelner π -Systeme) stark verändern können.

Allerdings ist es allein schon durch den bezüglich anderer endogener Fluorophore hohen TPE-Wirkungsquerschnitt des Eumelanins möglich, eine Dominanz der Eumelanin-Fluoreszenz in nichtlinear angeregten Autofluoreszenzspektren zu erklären. Da die 2-Photonen-Aktionsquerschnitte der endogenen Fluorophore mit $\sigma_{12}^{(2)}\eta_f \leq 10^{-4} \text{ GM} - 10^{-1} \text{ GM}$ [Gar07] viel niedriger liegen als der für das Eumelanin in Lösung ermittelte Wert von $\sigma_{13}^{(2)}\eta_f \leq 1 \text{ GM}$, ist bei der Verwendung von Anregungspulsen im ns-Bereich ein um den Faktor 10-10000 höheres Eumelanin-Fluoreszenzsignal bezüglich der Fluoreszenzen der anderen endogenen Fluorophore zu erwarten.

6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung und Modellierung der Anregungs- und Relaxationsprozesse im Eumelanin-Aggregat. Eumelanin ist ein bräunliches Pigment im Hautgewebe, welches aus spektroskopischer Sicht teilweise ungewöhnliche Eigenschaften aufweist (siehe Kapitel 1). Das zu entwickelnde Modell sollte diese beobachteten spektralen Eigenschaften des Eumelanins konsistent beschreiben.

Motiviert wurden diese Untersuchungen durch Beobachtungen einer Sensitivität der 2-Photonen-Angeregten-Fluoreszenz (TPEF) von Melanin im Hautgewebe gegenüber schwarzem Hautkrebs (malignes Melanom). Dabei führt wahrscheinlich eine Änderung im Verhältnis der Eu-/Pheomelanin-Konzentration im kranken Gewebe zu einer Rotverschiebung des TPEF-Spektrums.

Da Melanin anscheinend über die Möglichkeit verfügt, schrittweise Photonen zu absorbieren, können längere Laserpulse niedrigerer Photonendichte genutzt werden, um in einem Fluorophorgemisch (wie im Hautgewebe vorhanden) gezielt den Anteil der Melanin-TPEF an der Gesamtfluoreszenz anzuheben. Dabei wird angenommen, dass das Zwischenniveau des schrittweisen 2-Photonen-Anregungsprozesses eine Lebensdauer im Nanosekundenbereich besitzt.

Im Rahmen der Untersuchungen sollte deshalb auch geklärt werden, ob bei Eumelanin in Lösung ein schrittweiser 2-Photonen-Anregungsprozess nachgewiesen werden kann und ob die Lebensdauern (und damit die optimalen Anregungspulsdauern) wie angenommen im Nanosekunden-Bereich liegen.

Um ein Modell der Anregungszustände und Anregungs- bzw. Relaxationsprozesse zu finden, wurden lineare absorptions- und fluoreszenzspektroskopische Messungen am unfraktionierten Eumelanin durchgeführt.

Das aus den Ergebnissen abgeleitete Zustandsmodell besteht aus einer Vielzahl von Einzelabsorbieren, deren Anregungszustände untereinander Energie transferieren können und deren Zustandsdichte zu kleiner werdenden Übergangsenergien abfällt. Eine erzeugte Anregung relaxiert dabei von Zuständen höherer zu Zuständen niedrigerer Übergangsenergien, wobei auch die Fluoreszenzniveaus der Hauptfluoreszenzbande bevölkert werden. Das entwickelte Modell wurde aufgrund der kaskadenförmigen Relaxation entlang der Anregungszustände Kaskadenmodell genannt.

Um die Frage zu klären, ob die verschiedenen Anregungszustände auf eine Vielzahl von Aggregaten mit unterschiedlichen spektroskopischen Eigenschaften zurückzuführen sind oder schon intramolekular vorliegen, wurden absorptions- und fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an unterschiedlich großen Eumelanin-Aggregaten durchgeführt. Anhand dieser Messungen konnte das Viel-Spezies-Modell ausgeschlossen werden. Stattdessen liegen die Anregungszustände innerhalb der Aggregate vor und können strukturell wahrscheinlich auf unterschiedlich lang durchkonjugierte π -Systeme (chemical disorder) oder die Dimer-Bildung

zwischen benachbarten π -Systemen zurückgeführt werden.

Mit dem Modell konnten weitere spektroskopische Beobachtungen konsistent beschrieben werden:

- die stärkere Absorption größerer Eumelanin-Aggregate im langwelligen Spektralbereich
- die Abhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute und der spektralen Lage des Fluoreszenzmaximums von der Aggregatsgröße
- der Unterschied zwischen Fluoreszenzanregungs- und Absorptionsspektrum

Um die Relaxationsprozesse innerhalb der Aggregate näher zu untersuchen, wurden Messungen der transienten Absorption im roten Spektralbereich durchgeführt. Dazu wurde eine Pump-Probe-Messapparatur an der TU-Berlin verwendet.

In den Messungen konnten die nach dem Kaskadenmodell zu erwartenden schnellen Relaxationsprozesse bzw. die erwartete Zunahme der Zustandslebensdauern in Richtung von Zuständen niedrigerer Übergangsenergien beobachtet werden. Längere Lebensdauerkomponenten, die für einen schrittweisen 2-Photonen-Anregungsprozess als Zwischenniveaus in Frage kommen, wurden nur in marginalen Anteilen gefunden.

Um das Modell um die Anregungs- und Relaxationsprozesse der 2. Stufe zu erweitern und den schrittweisen 2-Photonen-Anregungsprozess zu untersuchen, wurde die nichtlinear angeregte Fluoreszenz des Eumelanins untersucht. Im Einzelnen sollte vor allem erforscht werden, wie es zur Rotverschiebung des TPEF-Spektrums gegenüber dem OPEF-Spektrum kommt und ob ein schrittweiser 2-Photonen-Anregungsprozess nachweisbar ist.

Dazu wurde eine Apparatur zur Messung der anregungswellenlängenabhängigen TPEF-Spektren bei Anregung mit Laserpulsdauern im Nanosekundenbereich entwickelt und aufgebaut.

Mit den Messungen konnte gezeigt werden, dass das TPEF-Spektrum von Eumelanin bezüglich des mit Licht der halben Wellenlänge angeregten OPEF-Spektrums entgegen den Erwartungen nicht rotverschoben, sondern verbreitert ist und dass diese Verbreiterung im Rahmen des Modells auf einen effizienteren 2-Photonen-Anregungsprozess der größeren Aggregate zurückzuführen ist und nicht zwingend ein schrittweiser Anregungsprozess vorliegen muss.

In weiteren Messungen wurde eine ähnliche Verschiebung des TPE-Fluoreszenzmaximums mit der Anregungswellenlänge wie bei den OPEF-Spektren beobachtet, was im Rahmen des Kaskadenmodells und eines schrittweisen TPE-Prozesses einen stattfindenden Energietransfer zwischen den Anregungszuständen der 2. zu denen der 1. Stufe vermuten lässt.

Um den schrittweisen 2-Photonen-Anregungsprozess bei Anregung im roten Spektralbereich nachzuweisen, wurde der Wirkungsquerschnitt der Eumelanin-TPE abgeschätzt und die Abhängigkeit der Eumelanin-TPEF-Intensität von der Anregungspulsdauer ermittelt.

Dazu wurde die Apparatur zur Messung der TPEF-Spektren bei Anregung mit Laserpulsdauern im Nanosekundenbereich genutzt und eine weitere Apparatur aufgebaut, bei der die Anregungspulsdauer bis in den Pikosekundenbereich verbreitert werden konnte ohne andere Strahlparameter zu verändern. Aus dem ermittelten Wirkungsquerschnitt und der nahezu fehlenden Anregungspulsdauerabhängigkeit konnte auf einen schrittweisen TPE-Prozess über ein Zwischenniveau mit Lebensdauern im Pikosekundenbereich geschlossen werden.

Eine abschließende Abschätzung ergab, dass auch Zwischenzustände mit deutlich kleine-

ren Lebensdauern als die im Nanosekunden-Bereich angenommenen ausreichen, damit die Melanin-Fluoreszenz das 2-Photonen-Angeregte-Autofluoreszenzspektrum dominiert. Damit kann der sinnvolle Einsatz von preiswerten Lichtquellen mit Anregungspulsdauern im Nanosekundenbereich für eine medizinische Anwendung zur Krebsfrüherkennung bestätigt werden.

Um das im Rahmen dieser Arbeit aufgestellte Kaskadenmodell im Einzelnen zu bestätigen, wäre eine zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie der Eumelanin-Fluoreszenz mit Pikosekunden-Zeitauflösung interessant. Die durch die Kaskade nacheinander bevölkerten Fluoreszenzniveaus sollten sich in einem zeitlich verzögerten Anklingen langwelliger Fluoreszenzanteile widerspiegeln.

In diesem Zusammenhang könnten auch Simulationsmethoden (wie z.B. Monte-Carlo) verwendet werden, um die beobachteten Abhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften des Eumelanins von der Aggregatsmasse und des Unterschieds zwischen Anregungs- und Absorptionsspektrum über das Kaskadenmodell noch besser nachvollziehen zu können.

Im Rahmen der in dieser Arbeit möglichen Messungen erwies sich das Kaskadenmodell als anwendbar und nützlich für das Verständnis der Anregungs- und Relaxationsprozesse. Insbesondere die Entstehung der 2-Photonen-Angeregten-Fluoreszenz von Eumelanin lässt sich mit diesem Modell nachvollziehen.

Über die im Rahmen des Kaskadenmodells beschreibbaren Relaxationsprozesse verschieden großer Aggregate stellt es weiterhin die Grundlage für eine vorgeschlagene alternative Erklärung für das Zustandekommen der rotverschobenen TPEF im Gewebe des malignen Melanoms dar (siehe Anhang).

Literaturverzeichnis

- [Ada05] ADACHI, K.; WAKAMATSU, K.; ITO, S.; MIYAMOTO, N.; KOKUBO, T.; NISHIOKA, T. und HIRATA, T.: An oxygen transporter hemocyanin can act on the late pathway of melanin synthesis. *Pigment Cell Research* (2005), Bd. 18:S. 214–219
- [Alb98] ALBOTA, M.A.; XU, C. und WEBB, W.W.: Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm. *Applied Optics* (1998), Bd. 37:S. 7352–7356
- [Atk05] ATKINS, P. und FRIEDMAN, R.: *Molecular Quantum Mechanics*, Oxford University Press (2005)
- [Bec03] BECKER & HICKL GMBH: SHM-180, Eight Channel Sample & Hold Module, Spezifikation (2003)
- [Ber93] BERGMANN, L. und SCHÄFER, C.: *Lehrbuch der Experimentalphysik, Optik (Band 3)*, Verlag Walter de Gruyter (1993)
- [Bra00] BRACKMANN, U.: *Lambdachrome Laser Dyes*, Lambda Physik AG (2000)
- [Bru02] BRUNNER, M.: *Spektroskopische Eigenschaften kovalent an Glas gebundener Fluoreszenzfarbstoffe und farbstoffmarkierter Peptide*, Inaugural-Dissertation, Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (2002)
- [Bus06] BUSH, W.D.; GARGUILO, J.; ZUCCA, F.A.; ALBERTINI, A.; ZECCA, Luigi; EDWARDS, G.S.; NEMANICH, R.J. und SIMON, J.D.: The surface oxidation potential of human neuromelanin reveals a spherical architecture with a pheomelanin core and a eumelanin surface. *PNAS* (2006), Bd. 103:S. 14785–14789
- [Cic08] CICCHI, R.; SESTINI, S.; GIORGI, V. De; MASSI, D.; LOTTI, T. und PAVONE, F.S.: Nonlinear laser imaging of skin lesions. *Journal of Biophotonics* (2008), Bd. 1:S. 62–73
- [Cla00] CLANCY, C.M.R.; NOFSINGER, J.B.; HANKS, R.K. und SIMON, J.D.: A hierarchical self-assembly of eumelanin. *Journal of Physical Chemistry B* (2000), Bd. 104:S. 7871–7873
- [Cor05] CORPORATION, Wyatt Technology: The Eclipse, The ultimate system for separating macromolecules, proteins, colloids, and nanoparticles. *Wyatt Technology Corporation info sheet* (2005)
- [Dad07] DADACHOVAL, E.; BRYAN, R.A.; HUANG, X.; MOADEL, T.; SCHWEITZER, A.D.; AISEN, P.; NOSANCHUK, J.D. und CASADEVALL, A.: Ionizing radiation changes the

- electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *PLoS One* (2007), Bd. 5:S. 1–13
- [Dav71] DAVYDOV, A.S.: *Theory of Molecular Excitons*, Plenum Press, New York (1971)
- [Dem03] DEMTRÖDER, W.: *Molekülphysik: Theoretische Grundlagen und experimentelle Methoden*, Oldenburg (2003)
- [Dex53] DEXTER, D.L.: A theory of sensitized luminescence in solids. *Journal of Chemical Physics* (1953), Bd. 21:S. 836–850
- [Die96] DIELS, J.C. und RUDOLPH, W.: *Ultrashort Laser Pulse Phenomena*, Academic Press (1996)
- [Els00] ELSCHNER, R.: *Meßtechnische Anwendungen ultrakurzer Laserpulse*, Dissertation, Institut für Optik und Atomare Physik der TU-Berlin (2000)
- [ES63] EL-SAYED, M.A.: Spin-orbit coupling and the radiationless processes in nitrogen heterocyclics. *Journal of Chemical Physics* (1963), Bd. 38:S. 2834–2839
- [Fis95] FISCHER, A.; CREMER, C. und STELZER, E.H.K.: Fluorescence of coumarins and xanthenes after two-photon absorption with a pulsed titanium-sapphire laser. *Applied Optics* (1995), Bd. 34:S. 1989–2003
- [For98] FOREST, S.E. und SIMON, J.D.: Wavelength-dependent photoacoustic calorimetry study of melanin. *Photochemistry and Photobiology* (1998), Bd. 68:S. 296–298
- [För48] FÖRSTER, T.: Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Physik* (1948), Bd. 2:S. 55–75
- [Fra31] FRANK, J.M. und VAVILOV, S.I.: Effective spheres in the extinction process in fluorescent liquids. *Zeitschrift für Physik* (1931), Bd. 69:S. 100–110
- [Gal87] GALLAS, J. M. und EISNER, M.: Fluorescence of melanin-dependence upon excitation wavelength and concentration. *Photochemistry and Photobiology* (1987), Bd. 45:S. 595–600
- [Gar07] GARZ, A.: *Aufbau und Erprobung eines Messplatzes zur orts aufgelösten Laserspektroskopie an endogenen Fluorophoren in krankhaft verändertem Gewebe*, Diplomarbeit, Eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam (2007)
- [Gav03] GAVRYUSHIN, V. und VAITKUVIENE, A.: Modelling Studies of alive tissue fluorophores spectra. *Lithuanian Journal of Physics* (2003)
- [Gre08] GREHN, M.: *fs-Absorptionsspektroskopie zum Anregungsenergietransfer an Antennensystemen photosynthetischer Organismen bei tiefen Temperaturen*, Diplomarbeit, Institut für Optik und Atomare Physik der TU-Berlin (2008)
- [Hak06] HAKEN, H. und WOLF, H.C.: *Molekülphysik und Quantenchemie*, Springer, Berlin (2006)

- [Hal04] HALLEGOT, P.; PETERANDERL, R. und LECHENE, C.: In-situ imaging mass spectrometry analysis of melanin granules in the human hair shaft. *The Journal of Investigative Dermatology* (2004), Bd. 122:S. 381–386
- [Ham03] HAMAMATSU PHOTONICS K.K.: Linear Array Multianode PMT and Assembly, Spezifikation (2003)
- [Hua89] HUANG, J.S.; SUNG, J.; EISNER, M.; MOSS, S.C. und GALLAS, J.: The fractal structure and the dynamics of aggregation of synthetic melanin in low pH aqueous solutions. *Journal of Chemical Physics* (1989), Bd. 90:S. 25–29
- [Hus10] HUSMANN, G.; KAATSCH, P.; KATALINIC, A.; BERTZ, J.; HABERLAND, J.; KRAYWINKEL, K. und WOLF, U.: *Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeit und Trends*, Westkreuz-Druckerei, Berlin (2010)
- [Il'98] IL'ICHEV, Y.V. und SIMON, J.D.: Wavelength-dependent photoacoustic calorimetry study of melanin. *Photochemistry and Photobiology* (1998), Bd. 68:S. 296–298
- [Il'03] IL'ICHEV, Y.V. und SIMON, J.D.: Building Blocks of Eumelanin: Relative Stability and Excitation Energies of Tautomers of 5,6-Dihydroxyindole and 5,6-Indolequin. *Journal of Physical Chemistry B* (2003), Bd. 2003:S. 7162–7171
- [IMR05] IMRA AMERICA INC.: FEMTOLIGHT series. *Product specification* (2005)
- [Iwa00] IWAKI, L.K.; DEAK, J.C.; RHEA, S.T. und DLOTT, D.D.: Ultrafast infrared raman spectroscopy studies of vibrational energy redistribution in polyatomic liquids. *Journal of Raman Spectroscopy* (2000), Bd. 31:S. 263–274
- [Iwa01] IWAKI, L.K. und DLOTT, D.D.: in: J.H. Moore und N.D. Spenser (Herausgeber) *Encyclopedia of Chemical Physics and Physical Chemistry*, Bd. 3, Institute of Physics Publishing, Philadelphia
- [Jel37] JELLY, E.E.: Spectral Absorption and Fluorescence of Dyes in the Molecular State. *Nature* (1937), Bd. 138:S. 1009–1010
- [Jel02] JELLEN, C.P.: *FLuoreszenzspektroskopische Untersuchungen an Aggregaten von Porphyrinen und Carotinoporpherinen*, Inaugural-Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2002)
- [Jim94] JIMBOW, K.; RESZKA, K.; SCHMITZ, S.; SALOPEK, T. und THOMAS, P.: Distribution of eu- and pheomelanins in human skin and melanocytic tumors. *Melanin: Its Role in human Photoprotection* (1994)
- [Kas50] KASHA, M.: Characterisation of electronic transitions in complex molecules. *Discussion of the Faraday Society* (1950), Bd. 9:S. 14–19
- [Kau06] KAUERT, M.; STOLLER, P.C.; FRENZ, M. und RIČKA, J.: Absolute measurement of molecular two-photon absorption cross-sections using a fluorescence saturation technique. *Optics Express* (2006), Bd. 14:S. 8434–8447
- [Kax06] KAXIRAS, E.; TSOLAKIDIS, A.; ZONIOS, G. und MENG, S.: Structural model of eumelanin. *Physical Review Letters* (2006), Bd. 97:S. 2181021–2181024

- [Koe03] KOEBERLE, M.J.; HUGHES, P.M.; SKELLERN, G.G. und WILSON, C.G.: Binding of memantine to melanin: influence of type of melanin and characteristics. *Pharmaceutical Research* (2003), Bd. 20:S. 1702–1709
- [Kur86a] KURTZ, S.K.: Light scattering calculations for melanin pigments from the Rayleigh to the Mie regime. *Journal of Investigative Dermatology* (1986), Bd. 87:S. 400–401
- [Kur86b] KURTZ, S.K.; KOZIKOWSKI, S.D. und WOLFRAM, L.J.: Optical constants of solid melanins determined from reflection measurements in the visible spectrum. *Journal of Investigative Dermatology* (1986), Bd. 87:S. 401–402
- [Lak99] LAKOWICZ, J.R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer (1999)
- [Las95a] LASERS, Spectra-Physics: *Spitfire: Multikilohertz Pulsed Ti:Sapphire Amplifier with Pulse Stretcher and Compressor, users manual*, Spectra-Physics Lasers, Inc. 1335 Terra Bella Avenue, P.O.B. 7013, Mountain View, CA 94039-7013 USA (1995)
- [Las95b] LASERS, Spectra-Physics: *Tsunami Mode-Locked Ti:Sapphire Laser, users manual*, Spectra-Physics Lasers, Inc. 1335 Terra Bella Avenue, P.O.B. 7013, Mountain View, CA 94039-7013 USA (1995)
- [Lee05] LEE, S.; THOMAS, K.R.J.; THAYUMANAVAN, S. und BARDEEN, C.J.: Dependence of the two-photon absorption cross section on the conjugation of the phenylacetylene linker in dipolar donor-bridge-acceptor chromophores. *Journal of Physical Chemistry A* (2005), Bd. 109:S. 9767–9774
- [Lin99] LINSS, W. und FANGHÄNEL, J.: *Histologie*, Walter de Gruyter, Berlin, New York (1999)
- [Liu03a] LIU, Y. und SIMON, J.D.: The effect of preparation procedure on morphology of melanin from the ink sac of *sepia officinalis*. *Pigment Cell Research* (2003), Bd. 16:S. 72–80
- [Liu03b] LIU, Y. und SIMON, J.D.: Isolation and biophysical studies of natural eumelanins: applications of imaging technologies and ultrafast spectroscopy. *Pigment Cell Research* (2003), Bd. 16:S. 606–618
- [LTB09a] LTB LASERTECHNIK BERLIN GMBH: Micro Joule Meter, Spezifikation (2009)
- [LTB09b] LTB LASERTECHNIK BERLIN GMBH: MNL 200, Midi-Nitrogen-Laser, Spezifikation (2009)
- [LTB09c] LTB LASERTECHNIK BERLIN GMBH: MNL 800, Maxi-Nitrogen-Laser, Spezifikation (2009)
- [LTB09d] LTB LASERTECHNIK BERLIN GMBH: UDL/SHG, Farbstofflaser/Frequenzverdoppler, Spezifikation (2009)
- [Men07] MENZEL, R.: *Photonics*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2007)
- [Men08] MENG, S. und KAXIRAS, E.: Theoretical models of eumelanin protomolecules and their optical properties. *Biophysical Journal* (2008), Bd. 94:S. 2095–2105

- [Mer04] MEREDITH, P. und RIESZ, J.: Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin. *Photochemistry and Photobiology* (2004), Bd. 79:S. 211–216
- [Mer06] MEREDITH, P.; POWELL, B.J.; RIESZ, J.; NIGHSWANDER-REMPEL, S.P.; PEDERSON, M.R. und MOORE, E.G.: Towards structure-property-function relationships for eumelanin. *Soft Matter* (2006), Bd. 2:S. 37–44
- [Mey01] MEYSKENS, F.L.; FARMER, P. und FRUEHAUF, J.P.: Redox regulation in human melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Research* (2001), Bd. 14:S. 148–154
- [Muc05] MUCKE, M.: *Aufbau eines Meßplatzes zur transienten Spektroskopie organischer Moleküle mit fs-Zeitauflösung*, Diplomarbeit, Institut für Physik an der Universität Potsdam (2005)
- [Nof99] NOFSINGER, J.B.; FOREST, S.E. und SIMON, J.D.: Explanation for the disparity among absorption and action spectra of Eumelanin. *Journal of Physical Chemistry B* (1999), Bd. 103:S. 11428–11432
- [Nof01] NOFSINGER, J.B. und SIMON, J.D.: Radiative relaxation of sepia eumelanin is affected by aggregation. *Photochemistry and Photobiology* (2001), Bd. 74:S. 31–37
- [NR05a] NIGHSWANDER-REMPEL, S.; RIESZ, J.; GILMORE, J.; BOTHMA, J. und MEREDITH, P.: Quantitative fluorescence excitation spectra of synthetic eumelanin. *Journal of Physical Chemistry B* (2005), Bd. 109:S. 20629–20635
- [NR05b] NIGHSWANDER-REMPEL, S.; RIESZ, J.; GILMORE, J. und MEREDITH, P.: A quantum yield map for synthetic eumelanin. *Journal of Chemical Physics* (2005), Bd. 123:123
- [NR06] NIGHSWANDER-REMPEL, S.P.: Quantitative fluorescence spectra and quantum yield map of synthetic pheomelanin. *Biopolymers* (2006), Bd. 82:S. 631–637
- [NR07a] NIGHSWANDER-REMPEL, S.P.; MAHADEVAN, I.B.; RUBINSZTEIN-DUNLOP, H. und MEREDITH, P.: Time-resolved and steady-state fluorescence spectroscopy of eumelanin and indolic polymers. *Photochemistry and Photobiology* (2007), Bd. 83:S. 1449–1454
- [NR07b] NIGHSWANDER-REMPEL, S.P. und MEREDITH, P.: Time-resolved and steady-state fluorescence spectroscopy of eumelanin and indolic polymers. *Photochemistry and Photobiology* (2007), Bd. 83:S. 1449–1454
- [Oly09] OLYMPUS CORPORATION: The advanced UIS2 system delivers high performance over a wider wavelength spectrum., Broschüre (2009)
- [Oul01] OULIANOVA, D.A.; TOMOVA, I.V.; DVORNIKOVA, A.S. und RENTZEPIS, P.M.: Observations on the measurement of two-photon absorption cross-section. *Optics Communications* (2001), Bd. 191:S. 235–243
- [Per24] PERRIN, F.: Loi de décroissance du pouvoir fluorescent en fonction de la concentration. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* (1924), Bd. 178:S. 1978–1980

- [Per27] PERRIN, F.: Fluorescence and molecular induction by resonance. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l Académie des Sciences* (1927), Bd. 184:S. 1097–1100
- [Pop97] POPE, R.M. und FRY, E.S.: Absorption spectrum (380-700 nm) of pure water. II. Integrating cavity measurements. *Applied Optics* (1997), Bd. 36:S. 8710–8723
- [Pow04] POWELL, B.J.; BARUAH, T.; BURNSTEIN, N.; MCKENZIE, K. Brake R.H.; P.MEREDITH und PEDERSON, M.R.: A first-principles density-functional calculation of the electronic and vibrational structure of the key melanin monomers. *Journal of Chemical Physics* (2004), Bd. 120:S. 8608–8615
- [Pow05] POWELL, B.J.: 5,6-Dihydroxyindol-2-carboxylic acid: a first principles density functional study. *Chemical Physical Letters* (2005), Bd. 402:S. 111–115
- [Pro92] PROTA: *Melanins and Melanogenesis* (1992)
- [Rie06] RIESZ, J.; GILMORE, J. und MEREDITH, P.: Quantitative scattering of melanin solutions. *Biophysical Journal* (2006), Bd. 90:S. 4137–4144
- [Ril97] RILEY, P.A.: Melanins. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (1997), Bd. 29:S. 1235–1239
- [Sal91] SALOPEK, T.; YAMADA, K.; ITO, S. und JIMBOW, K.: Dysplastic melanocytic nevi contain high levels of pheomelanin: comparison of pheomelanin/eumelanin levels between normal skin, common nevi and dysplastic nevi. *Pigment Cell Research* (1991):S. 172–179
- [Sar92] SARNA, T.: Properties and function of ocular melanin - a photobiophysical view. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* (1992), Bd. 12:S. 215–258
- [Sar01] SARDAR, D.J.; MAYO, M.L. und GLICKMAN, R.D.: Optical characterisation of melanin. *Journal of Biomedical Optics* (2001), Bd. 6:S. 404–411
- [Sar03] SARNA, T.; BURKE, J.M.; KORYTOWSKI, W.; ROZANOWSKA, M.; SKUMATZ, C.M.B.; ZAREBA, A. und ZAREBA, M.: Loss of melanin from human RPE with aging: possible role of melanin photooxidation. *Experimental Eye Research* (2003), Bd. 76:S. 89–98
- [Sch37] SCHEIBE, G.: Über die Veränderlichkeit der Absorptionsspektren in Lösungen und die Nebenvalezen als ihre Ursache. *Angewandte Chemie* (1937), Bd. 50:S. 212–219
- [Sch06] SCHNEIDER; LEUPOLD, D.; SEEWALD, G. und STANKOVIC, G.: Studies on autofluorescence-diagnosis of ocular melanomas. new results, Conference Talks, 104th DOG Annual Meeting (2006)
- [Sch07] SCHOLZ, M.; STANKOVIC, G.; SEEWALD, G. und LEUPOLD, D.: Uncovering of melanin fluorescence in human skin tissue. *Biophotonics* (2007), Bd. 6633:S. 73
- [See06] SEEWALD, G.; LEUPOLD, D.; STANKOVIC, G. und SCHOLZ, M.: Two-photon excited autofluorescence of human skin tissue-Chances for early detection of tumors, Conference Talks, Laser Optics Berlin (2006)

- [See08] SEEWALD, G.; LEUPOLD, D.; SCHOLZ, M.; SPITZ, Ch. und MENZEL, R.: Untersuchung des ersten Anregungszustandes bei der 2-Photonenanregung von gelöstem und amorphem Melanin mit linearen und nichtlinearen spektroskopischen Methoden, Conference Talks, Frühjahrstagung der DPG, Darmstadt (2008)
- [Sim09] SIMON, J.D.; PELES, D.; WAKAMATSU, K. und ITO, S.: Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell Melanoma* (2009), Bd. 22:S. 563–579
- [Swa74] SWAN, G.A.: Structure, chemistry, and biosynthesis of the melanins. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe* (1974), Bd. 31:S. 521–582
- [Teu99] TEUCHNER, K.; FREYER, W.; LEUPOLD, D.; VOLKMER, A.; BIRCH, D.J.; ALTMAYER, P.; STÖCKER, M. und HOFFMANN, K.: Femtosecond two-photon excited fluorescence of melanin. *Photochemistry and Photobiology* (1999), Bd. 70:S. 146–151
- [Teu00] TEUCHNER, K.; EHLERT, J.; FREYER, W.; LEUPOLD, D.; ALTMAYER, P.; STÖCKER, M. und HOFFMANN, K.: Fluorescence studies of melanin by stepwise two-photon femtosecond laser excitation. *Journal of Fluorescence* (2000), Bd. 10:S. 275–281
- [Teu03] TEUCHNER, K.; MUELLER, S.; FREYER, W.; LEUPOLD, D.; ALTMAYER, P.; STÖCKER, M. und HOFFMANN, K.: Femtosecond two-photon excited fluorescence of melanin. *Proceedings of SPIE* (2003), Bd. 4797:S. 211–219
- [The06] THEISS, Ch.: *Transiente Femtosekunden-Absorptionsspektroskopie des Anregungsenergie transfers in isolierten Pigment-Protein-Komplexen des Photosyntheseapparats*, Dissertation, Institut für Optik und Atomare Physik der TU-Berlin (2006)
- [Tra06] TRAN, M.L.; POWELL, B.J und MEREDITH, P.: Chemical and structural disorder in eumelanins: a possible explanation for broadband absorbance. *Biophysical Journal* (2006), Bd. 90:S. 743–752
- [Tri06] TRIBL, F.; RIEDERER, P.; DOUBLE, K.L. und GERLACH, M.: Neuromelanin, ein Pigment mit unbekannter Funktion. *NEUROforum* (2006), Bd. 2:S. 190–195
- [Tur10] TURRO, N.J.; RAMAMURTHY, V. und SCAIANO, J.C.: *Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules*, University Science Books, Sausalito, California (2010)
- [Urb99] URBACH, F.: The cumulative effects of ultraviolet radiation on the skin: photocarcinogenesis, in: J.L.M. Hawk (Herausgeber) *Photodermatology*, Arnold Publishers, London, S. 89–102
- [Vai02] VAITKUVIENE, A.; AUKSORIUS, E.; FUCHS, D. und GAVRIUSHIN, V.: Multivariate analysis of endometrial tissue fluorescence spectra. *Proc. of SPIE* (2002), Bd. 4903:S. 29–33
- [Wag98] WAGNIERES, G.A.; STAR, W.M. und WILSON, B.C.: In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. *Photochemistry and Photobiology* (1998), Bd. 68:S. 603–632

- [Wag02] WAGNER, J.K.; PARA, E.J.; NORTON, L.; JOVEL, C. und SHRIVER, M.D.: Skin response to ultraviolet radiation: effects of constitutive pigmentation, sex and ancestry. *Pigment Cell Research* (2002), Bd. 15:S. 385–390
- [Wie05] WIELGUS, A.R. und SARNA, T.: Melanin in human irides of different color and age of donor. *Pigment Cell Research* (2005), Bd. 18:S. 454–464
- [Wu05] WU, Y.; XI, P.; QU, J.Y.; CHEUNG, T.-H. und YU, M.-Y.: Depth-resolved fluorescence spectroscopy of normal and dysplastic cervical tissue. *Optics Express* (2005), Bd. 13:S. 382–388
- [Xu96a] XU, C.; WILLIAMS, R.M.; ZIPFEL, W. und WEBB, W.W.: Multiphoton excitation cross-sections of molecular fluorophores. *Bioimaging* (1996), Bd. 4:S. 198–207
- [Xu96b] XU, C.; ZIPFEL, W.R. und WEBB, W.W.: Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *Journal Optical Society of America B* (1996), Bd. 13:S. 481–491
- [Ye03] YE, T. und SIMON, J.D.: Comparison of the ultrafast absorption dynamics of eumelanin and pheomelanin. *Journal of Physical Chemistry B* (2003), Bd. 107:S. 11240–11244
- [Zaj94] ZAJAC, G.W.; GALLAS, J.M.; CHENG, J.; EISNER, M.; MOSS, S.C. und ALVARADO-SWAISGOOD, A.E.: The fundamental unit of synthetic melanin: a verification by tunneling microscopy of X-ray scattering results. *Biochimica et Biophysica Acta* (1994), Bd. 1199:S. 271–278
- [Zip03] ZIPFEL, W.R.; WILLIAMS, R.M.; CHRISTIE, R.; NIKITIN, A.Y.; HYMAN, B.T. und WEBB, W.W.: Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *PNAS* (2003), Bd. 100:S. 7075–7080

Publikationen & Tagungsbeiträge

Publikationen

M. Scholz, G. Stankovic, G. Seewald, D. Leupold. Uncovering of melanin fluorescence in human skin tissue. *Biophotonics*(2007), Bd. 6633:S. 73

Tagungsbeiträge

G. Seewald, D. Leupold, G. Stankovic, M. Scholz. Two-photon excited autofluorescence of human skin tissue-Chances for early detection of tumors. *Laser Optics Berlin*(2006)

M. Schneider, G. Seewald, G. Stankovic, D. Leupold. Studies on autofluorescence-diagnosis of ocular melanomas. New results. *104th DOG Annual Meeting*(2006)

G. Seewald, D. Leupold, M. Scholz, Ch. Spitz, R. Menzel. Untersuchung des ersten Anregungszustandes bei der 2-Photonenanregung von gelöstem und amorphem Melanin mit linearen und nichtlinearen spektroskopischen Methoden. *Frühjahrstagung der DPG, Darmstadt*(2008)

Danksagung

Da diese Arbeit parallel zum Entwicklungsbetrieb bei den Firmen LTB Berlin GmbH und W.O.M. World of Medicine AG entstand, konnte sie die erreichte Tiefe nur durch die Hilfsbereitschaft und das wissenschaftliche Interesse vieler Kollegen gewinnen, die ich über viele Stunden konstruktiver Zusammenarbeit sehr zu schätzen gelernt habe. Ich möchte mich herzlich bei ihnen bedanken.

Herrn Prof. Ralf Menzel möchte ich für die gute wissenschaftliche Betreuung und den Beistand in den organisatorischen Besonderheiten meiner Promotion danken. Vielen Dank weiterhin für das Vertrauen und die Motivation, die mir den Rücken gestärkt haben, wenn die Arbeit zu haken drohte.

Herrn Dr. Dieter Leupold danke ich für die Einführung in die Gewebespektroskopie, die in den nächsten Jahren die Medizintechnik hoffentlich noch viel stärker bereichern wird. Unvergessen bleiben die gegebenen Einblicke in die Welt der endogenen Fluorophore, die Unterstützung und Vermittlung innerhalb der Firma sowie natürlich auch der oft ausgetragene Wettbewerb um den abendlich vergebenen Pritschenpreis.

Herrn Dr. Christian Spitz danke ich für die Erweiterung meines spektroskopischen Weltbildes um die Exzitonenbildung in Aggregaten, die zahlreichen und sehr fruchtbaren wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen zu den komplexen energetischen Vorgängen in den Aggregaten eines sehr unscheinbaren braunen Pulvers. Herzlichen Dank weiterhin für die Unterstützung und Hilfestellung bei dem ein oder anderen Spagat zwischen Universität und Firma.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Wolfgang Regenstein, der sich trotz wohlverdientem Ruhestands der Begutachtung der Arbeit angenommen hat.

Herrn Dr. Matthias Scholz von der Firma LTB Lasertechnik Berlin GmbH und Herrn Dr. Clemens Scholz von der W.O.M. World of Medicine AG möchte ich für die gelassenen Freiräume meiner wissenschaftlichen Tätigkeiten danken. Mir ist bewußt, dass sich das Verfolgen wissenschaftliche Ziele fast immer mit einer Entwicklertätigkeit im Rahmen eines Unternehmens reibt. Das das Erreichen solcher Ziele trotzdem möglich ist, konnte ich aufgrund Ihrer Unterstützung zeigen. Danke.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Christoph Theiss und Herrn Moritz Grehn der TU-Berlin für die Bereitstellung der Pump-Probe-Apparatur sowie die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Messungen. Ohne die dort erfahrene Kooperationsbereitschaft und Hilfsbereitschaft wäre ein wichtiger Teil dieser Arbeit nicht entstanden. Vielen Dank.

Weiterhin möchte ich Frau Stephanie Schlede des Instituts für Biochemie und Biologie der Universität Potsdam für die Einführung in die Kunst der Ultrafiltration und den Beistand bei der Durchführung danken. In diesem Rahmen gilt mein Dank auch Herrn Dr. Jörg Fettke für die Durchführung der Feld-Fluss-Fraktionierung des recht widerspenstigen Eumelanins.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. Wolfgang Freyer und Fr. Regina Lendt des Max-Born-Instituts Berlin für den immer freundlichen Kontakt und die offene, uneingeschränkte Kooperationsbereitschaft bei den linearen spektroskopischen Untersuchungen des Eumelanins und seiner Ausgangsmonomere.

Herrn Dr. Karl-Heinz Schönborn danke ich für meine freundliche Aufnahme in die FluoTOM-Arbeitsgruppe der W.O.M. während der Zeit des Zusammenschreibens. Der dadurch gewonnene Abstand und die sehr konstruktive Zusammenarbeit auf dem Gebiet der 2-Photonen-Mikroskopie haben die parallel laufende Dissertation sehr positiv beeinflusst. In diesem Rahmen möchte ich mich auch für die aktive Unterstützung bei der Suche nach einem externen Gutachter und die konstruktiven Anregungen zur vorliegenden Arbeit bedanken.

Herrn Dr. Horst Gebert und Herrn Dr. Klaus Teuchner danke ich für ihre Geduld bei dem bestimmt nicht immer erfreulichen Lektorat der Arbeit und die bereichernden Diskussionen über die physikalischen und spektroskopischen Feinheiten, die eine wissenschaftliche Arbeit erst veredeln.

Im Weiteren danke ich den Kollegen der Photonik-Arbeitsgruppe der Universität Potsdam und sowie den Kollegen der Firmen LTB Lasertechnik Berlin GmbH und der Firma W.O.M., deren Offenheit und Kooperationsbereitschaft den Rahmen und das Fundament für ein produktives Arbeiten schufen. Ein besonderer Dank richtet sich hierbei an Herrn Goran Stankovič und Herrn Julian Reda der Firma LTB, für die erfolgreiche gemeinsame Zeit im Labor und Büro, die vielen bereichernden fachlichen und nichtfachlichen Diskussionen zu Religion, Eumelanin und Fischfangmethoden, sowie für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern Angelika und Günter Seewald danke ich für die Selbstverständlichkeit ihrer Liebe und ihres unbedingten Vertrauens. Mit diesem besonderen Schatz im Gepäck kann man Wüsten durchwandern oder Dissertationen schreiben. Vielen Dank auch für die Unterstützung auf diesem teils sehr steinigen Weg.

Meiner Freundin Frau Ulrike Wilke danke ich für ihren immerwährenden Beistand, der mich über alle durchgearbeiteten Urlaubstage und Wochenenden hinweg gehoben hat, und für das warme Lächeln aus ihren braunen Augen, welches mir mehr Kraft gibt als acht Stunden besten Schlafs.

A Medizinische Anwendung der 2-Photonen-Angeregten-Autofluoreszenz: Nutzung der Melanin-Fluoreszenz als Indikator des malignen Melanoms

In der aktuellen Zeit erlebt die optische Technik in medizinischen Untersuchungsverfahren einen starken Aufschwung. Dazu tragen auf der einen Seite die Verbesserungen in der Automatisierungs- und Rechentechik bei, die hochgenaue Rastermessverfahren ermöglichen und auf der anderen Seite die neuen, zum Teil schon sehr kompakten Kurzpuls-Lasersysteme, die zur nichtlinearen Fluoreszenzanregung von körpereigenen (endogenen) Fluorophoren genutzt werden können. Aufgrund der guten Zugänglichkeit können äußere Organe, wie das Hautgewebe oder das Auge, mit diesen Methoden sehr gut untersucht werden und bilden auch den Schwerpunkt der hier dargelegten Messungen.

Aufgrund der stetigen Zunahme der Neuerkrankungsrate des malignen Melanoms (schwarzer Hautkrebs), die sich z.B. in Deutschland seit dem Jahr 1980 vervierfacht hat [Hus10], besteht speziell ein großes Interesse an Diagnoseverfahren zur Früherkennung des schwarzen Hautkrebses. Im Rahmen von Untersuchungen der TPEF von Eumelanin fanden Teuchner et al. [Teu00, Teu03] einen neuen, spektralen Messkontrast zwischen gesunden und tumorös entartetem Gewebe. Während bei gesundem Gewebe das Fluoreszenzmaximum bei $\lambda = 500$ nm lag, befand es sich bei tumoröser Entartung rotverschoben bei $\lambda = 560$ nm (siehe Abbildung A.1).

In der vorliegenden Arbeit wurden weiterführende Untersuchungen zu den beobachteten Unterschieden zwischen den TPEF-Spektren von gesundem und entartetem Gewebe durchgeführt. Dazu wurde erstmals eine mobile Apparatur zur Messung von TPEF-Spektren in Funktion gebracht, die eine fs-Laserquelle zur Fluoreszenzanregung nutzte.

In einem weiteren Schritt wurde überprüft, ob der schrittweise Anregungsprozess der 2-Photonen-Angeregten-Fluoreszenz genutzt werden kann, um die Melanin-Fluoreszenz gegenüber der anderer endogener (körpereigener) Fluorophore anzuheben. Dazu wurde die fs-Laserquelle durch eine ns-Laserquelle ersetzt.

Da die verwendeten Gewebeproben im Gegensatz zu der im Hauptteil vorgestellten Eumelaninlösung ein ganz anderes Maß von Inhomogenität und Komplexität beinhalten, wird vor der Beschreibung der Messungen auf die Morphologie der Gewebeproben eingegangen.

A.1 Aufbau des Haut- bzw Aderhautgewebes und Präparation der untersuchten Gewebeproben

Das menschliche Hautgewebe gliedert sich grob in drei Schichten: die ca. $30 \mu\text{m} - 200 \mu\text{m}$ dicke Oberhaut (Epidermis), die ca. $500 \mu\text{m} - 1500 \mu\text{m}$ Lederhaut (Dermis) und darunterliegende

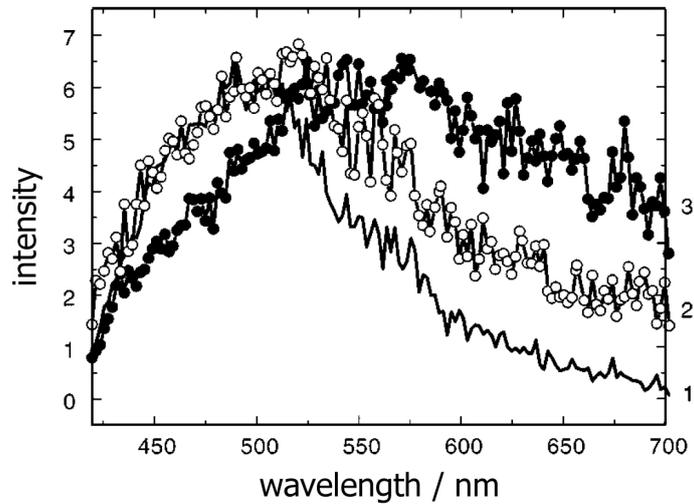


Abb. A.1: Darstellung aus [Teu00] der normierte TPEF-Spektren von Proben menschlichen Hautgewebes: typisches Beispiel für gesundes Hautgewebe (1), üblicher Nevus Cell Nevus (2) und malignes Melanoma (3).

Unterhaut (Subcutis). Für eine nichtlineare Anregung durch Laserlicht ist nur der Bereich der Epidermis erreichbar. Da sich hier jedoch auch meist die ersten Hautkrebszellen bilden und ein Durchbruch des Krebsgewebes durch die Basalmembran (Grenzschicht zwischen Epidermis und Dermis) die Diagnose meist entscheidend verändert, ist dieser Bereich aus medizinischer Sicht sehr interessant.

Die Epidermis gliedert sich wiederum in vier wesentliche Schichten auf (siehe Abbildung A.2). An der Grenze zur Dermis liegt, wie schon gesagt, die Basalmembran. Dabei handelt es sich

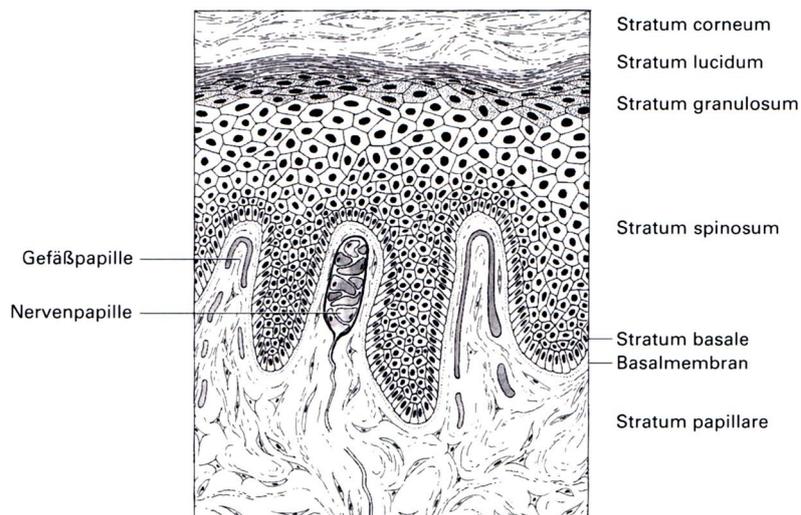


Abb. A.2: Darstellung der Zellschichten der Epidermis nach Linß und Fanghänel [Lin99].

um eine monozelluläre Schicht aus Stammzellen, die sich ständig teilen und als sogenannte Keratinozyten in Richtung Hautoberfläche abwandern. In regelmäßigen Abständen befinden

A NUTZUNG DER MELANIN-FLUORESZENZ ALS INDIKATOR DES MALIGNEN MELANOMS

sich spezielle Zellen, die Melanozyten in der Basalmembran (Stratum basale). In ihnen wird das Pigment Melanin gebildet, welches in speziellen Zellorganellen, den Melanosomen, abgepackt und an die umgebenden Keratinozyten abgegeben wird. In dem an die Basalmembran anschließende Stratum spinosum weisen die Keratinozyten noch eine spindelförmige Form auf. Die Melaninkonzentration ist hier am höchsten. Im weiteren Verlauf flachen die Keratinozyten auf ihrem Weg durch das Stratum granulosum in das Stratum corneum (Hautoberfläche) langsam ab und verhornen, wobei auch die Melaninkonzentration schwindet. Im Stratum corneum ist bei kaukasischen Hauttypen keinerlei Melanin mehr vorhanden.

Im Hautgewebe werden dabei zwei unterschiedliche Arten des Melanins gebildet - das Eumelanin und das Pheomelanin. Beide stellen Polymere bzw. Aggregate dar, wobei sie sich in den Ausgangsmolekülen unterscheiden (siehe Abbildung A.3).

Die Funktionen beider Melanin-Arten liegen primär im Schutz der im Zellkern gelagerten Erbinformationen vor hochenergetischem Licht (UV-Bereich) und einem damit verbundenem Schutz vor Hautkrebs [Urb99, Wag02].

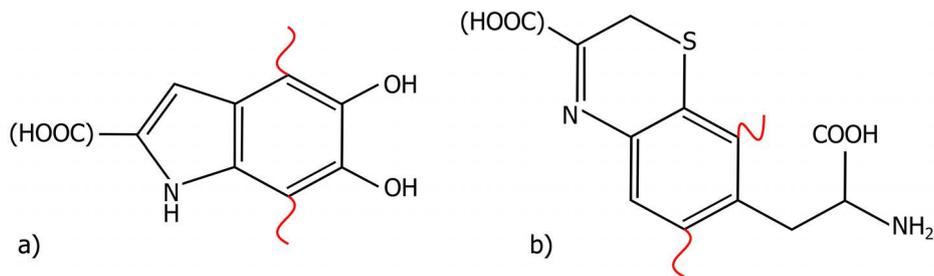


Abb. A.3: Monomerbausteine a) des Eumelanin-Aggregats und b) der Pheomelanins

In der vorliegenden Arbeit wurden auch Melanome der Choroidea (Aderhaut) des Auges untersucht. Wie in Abbildung A.4 dargestellt, befindet sich diese Gewebeschicht zwischen der außen liegenden Sklera (Lederhaut) und der Retina (Netzhaut). Durch sie wird das Auge mit mit Nähr- und Sehstoffen versorgt und das Augeninnere gegen Außen- und Streulicht abgedunkelt. Aus letzterem Grund ist in der Choroidea viel Melanin eingelagert.

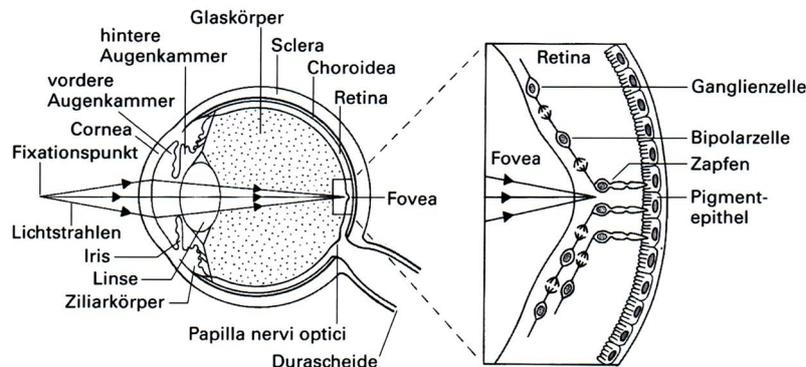


Abb. A.4: Gewebeschichten und -räume des Auges nach Linß und Fanghänel [Lin99].

Im Gegensatz zum Hautgewebe handelt es sich bei dem im Auge vorkommenden Melanin fast

ausschließlich um Eumelanin [Wie05]. Ein weiterer Unterschied besteht in der biologischen Lebensdauer des Melanins im jeweiligen Gewebe. Während das Melanin im Hautgewebe innerhalb eines Hauterneuerungszyklus von 1-2 Monaten neu gebildet und abgebaut wird, findet im Auge keine oder nur eine sehr geringe Neubildung von Melanin statt [Sar03].

Für die spektroskopischen Messungen wurden aufgrund ihrer hervorragenden Eigenschaften in Paraffin eingebettete Gewebeprobe verwendet (siehe Abbildung A.5). Das so konservierte Gewebe war langzeitstabil (auch spektroskopisch), konnte einfach gehaltert werden und wies ein Fluoreszenzspektrum auf, welches nahezu identisch mit den Autofluoreszenzspektren von in vivo gemessenen Gewebeprobe war. Im Paraffin selbst wurde keine messbare Fluoreszenz erzeugt.

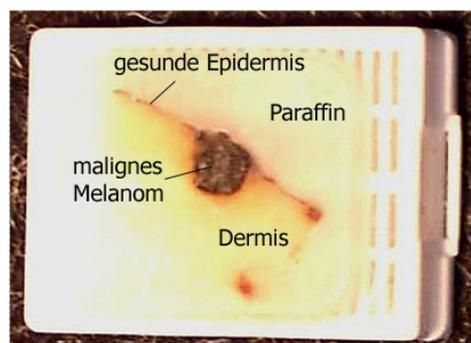


Abb. A.5: Typisch verwendete Hautgewebeprobe mit markierten Gebieten der Epidermis, Dermis und eines malignen Melanoms

Um eine Gewebeprobe in Paraffin zu konservieren, erfolgt direkt nach der Entnahme des Gewebes eine Fixierung in Alkohol oder Formalin, um die Lebensprozesse zu unterbrechen und den augenblicklichen Zustand zu erhalten. Danach wird die Probe mit Hilfe eines wasserentziehenden Stoffes (z.B. Alkohol, Aceton) entwässert. Durch Spülung der Probe in einer Reihe von Alkoholbädern aufsteigender Alkoholkonzentration (Konzentrationen richten sich nach jeweiligen Laborvorschriften) wird außerdem das Fixiermittel aus der Probe entfernt. Danach wird ein Intermedium (meist Xylol oder Chlorophorm) genutzt, um den Alkohol aus dem Gewebe zu ziehen und gleichzeitig das Eindringen von Paraffin in die Probe zu ermöglichen. In einem nächsten Schritt wird die Probe in einem Gemisch aus dem Intermedium und Paraffin gelagert, bevor sie abschließend in flüssiges Paraffin gegeben und darin eingebettet wird.

Der verwendete Probenschnitt senkrecht zur Hautoberfläche ermöglichte es, den Laser direkt auf Messpunkte in allen gewünschten Gewebeschichten zu fokussieren. Dadurch konnten störende Streu- und Fluoreszenzeffekte durch das Keratin im Stratum corneum vermieden werden, die eine Messung von oben durch die Hautoberfläche verursacht hätte [Wu05].

A.2 Autofluoreszenz des Haut- und Aderhautgewebes

Die Autofluoreszenz von Haut- und Aderhautgewebe setzt sich aus den Fluoreszenzbanden einer großen Anzahl von endogenen Fluorophoren zusammen. Obwohl die Fluoreszenzbanden der einzelnen Fluorophore in Lösung bekannt sind (siehe Abbildung A.6), ist es trotz verschie-

dener Ansätze (siehe z.B. [Gav03, Vai02, Wag98]) bisher nicht gelungen, die Autofluoreszenz aufzuschlüsseln und anteilig den endogenen Fluorophoren zuzuordnen.

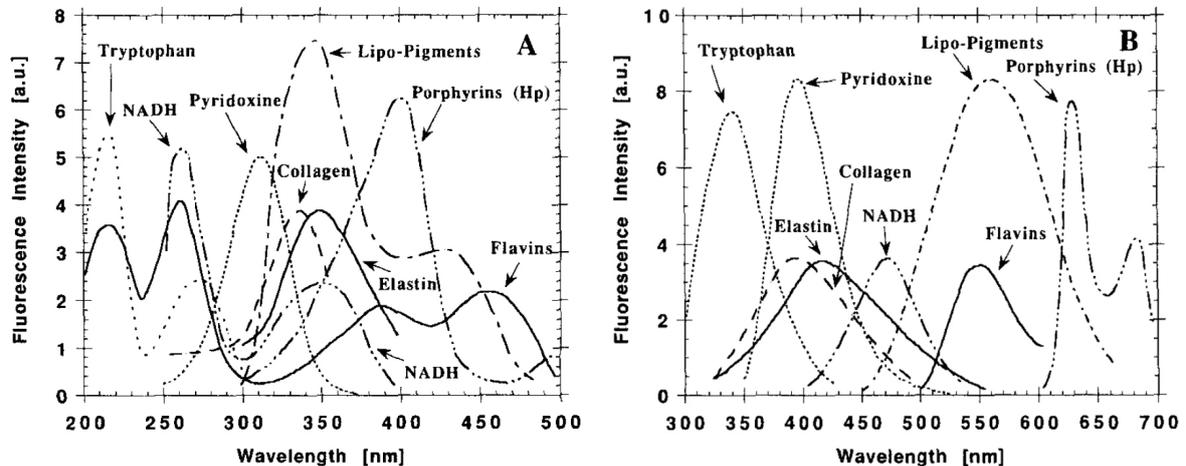


Abb. A.6: Fluoreszenz-Anregungsspektren (A) und Fluoreszenzspektren (B) von verschiedenen im menschlichen Hautgewebe vorkommenden (endogenen) Fluorophoren nach [Wag98].

Trotzdem können spektrale Veränderungen des Autofluoreszenzspektrums genutzt werden, um auf Veränderungen im Stoffwechsel oder in der Gewebeszusammensetzung zu schließen. In der oben genannten grundlegenden Arbeit von Teuchner et al. [Teu00] wurde eine Rotverschiebung des 2-photonen-angeregten Autofluoreszenzspektrums gefunden, welche mit einer tumorösen Entartung (malignem Melanom) des Gewebes korrelierte. Hierbei wurde angenommen, dass das Eu- und Pheomelanin im Gegensatz zu allen übrigen endogenen Fluorophoren über einen schrittweisen 2-Photonen-Absorptionsprozess zur Fluoreszenz angeregt werden können. Daher wurde gefolgert, dass das TPEF-Spektrum durch Fluoreszenzanteile des Melanins dominiert wird und die beobachtete Rotverschiebung auf die Sensitivität des Melanins gegenüber der malignen Entartung zurückzuführen ist.

Unter anderem wurde in einer Arbeit von Simon et al. [Sim09] festgestellt, dass es zwischen Melanosomen von gesundem und malign entartetem Hautgewebe große Unterschiede in der Eu-/Pheomelanin-Konzentration gibt. Deshalb wurde die beobachtete Rotverschiebung in einer Arbeitshypothese auf diese Konzentrationsunterschiede zurückgeführt. Nach dieser Hypothese überwiegt im gesunden Gewebe Eumelanin, während im krankhaften Gewebe der Fluoreszenzanteil des Pheomelanins dominant wird.

A.3 TPEF-Spektren von Hautgewebe nach Anregung mit fs-Laserpulsen

Da diese spektroskopische Methode ein großes Potenzial besitzt, um als nichtinvasives, diagnoseunterstützendes Arbeitsmittel für die Krebsfrüherkennung verwendet zu werden, sollte in weiterführenden Arbeiten die in [Teu00] beobachtete spektrale Rotverschiebung verifiziert und das Messverfahren optimiert werden. In diesem Zusammenhang entstand neben den hier

beschrieben, für die Anwendung entwickelten Apparaturen auch die im Hauptteil dargelegten Betrachtungen über die Anregungs- und Relaxationsvorgänge im Eumelanin. Da die Apparatur perspektivisch als Medizinprodukt entwickelt werden sollte, wurde im Rahmen dieser Promotion erstmals eine funktionsfähige, transportable Variante eines Geräts zur spektral aufgelösten TPE-Autofluoreszenzmessung an Gewebe fertig gestellt.

A.3.1 Apparatur zum Messen von 2-Photonen-Angeregten-Autofluoreszenzspektren des Hautgewebes mit fs-Laserpulsen

Um den in Abbildung A.7 Aufbau kompakt und mobil zu halten, wurde ein fs-Faserlaser des Typs A-20-SP der Firma IMRA [IMR05] als Strahlquelle benutzt. Dieser Laser lieferte Lichtpulse mit Pulsdauern von 100 fs und einer Repetitionsrate der Pulse von 50 MHz. Die Licht-Wellenlänge des Lasers lag mit $\lambda = 780$ nm in der Mitte des therapeutischen Fensters des Hautgewebes (größte Eindringtiefe). Die Pulsenergie lag mit $E_{pulse} = 0,4$ nJ zu niedrig, um sie zur nichtlinearen Fluoreszenzanregung des Gewebes zu nutzen.

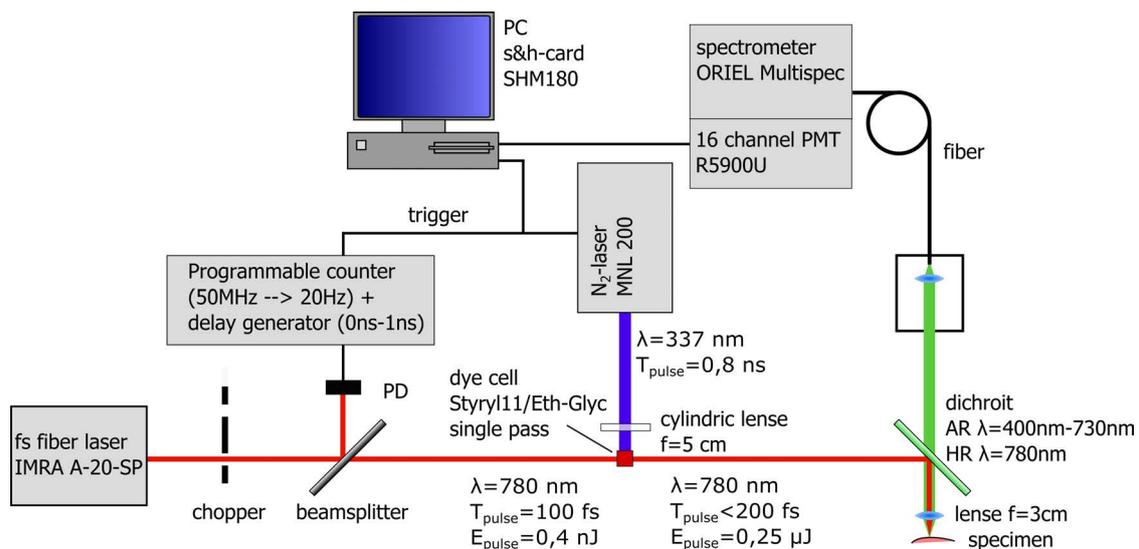


Abb. A.7: Kompakte Apparatur zur Messung der mit fs-Laserpulsen angeregten TPEF-Autofluoreszenzspektren von Hautgewebe in vivo.

Deshalb wurde die Pulsenergie mit einem bei LTB entwickelten Verstärker auf $E_{pulse} = 0,25$ μ J erhöht. Das Verstärkermedium bestand aus einer gesättigten Lösung aus Styryl 11 / Ethylen-glykol [Bra00], welche sich in einer Küvette der Schichtdicke $d = 1$ cm befand. In dieser Lösung wurde transversal ein dünner Kanal des Farbstoffs durch einen per Zylinderlinse fokussierten Stickstofflaserstrahl angeregt. Der fs-Laserstrahl wurde durch diesen Kanal gerichtet und durch die ausgelöste simulierte Emission verstärkt. Bei dem zum optischen Pumpen verwandten Laser handelte es sich um einen MNL200 [LTB09b] der Firma LTB.

Da der MNL200 nur mit einer Puls-Repetitionsrate von max. 20 Hz arbeitet, konnten nur mit dieser oder kleineren Repetitionsraten fs-Pulse verstärkt werden. Um die Pumplichtpulse zeitlich mit dem fs-Laserpulsen abzustimmen, wurde die fs-Laserpulsfolge mit einem Chopper in Pulskämme mit einer Repetitionsrate < 20 Hz unterteilt. Ein Teil des so modulierten

fs-Laserstrahls wurde auf eine Photodiode gelenkt. Diese war schnell genug, um die Pulsfrequenz von 50 MHz elektronisch abzubilden. In einem nachgeschalteten Zähler wurden aus der Anfangsflanke des Pulskammes und dem 50MHz-Signal ein korrelierendes 20Hz-Signal generiert, welches zum gezielten Pumpen eines fs-Laserpulses genutzt werden konnte. Dabei war es wichtig, dass der verwendete Pumplaser sehr genau ausgelöst werden konnte. Da der MNL200 über ein Thyatron entladen wird, ergab sich ein ausreichendes Jitter von nur 0,5 ns. Die zeitliche Feinabstimmung konnte über einen elektronischen Delay-Generator vorgenommen werden.

Die auf diese Weise verstärkten Anregungslichtpulse wurden anschließend durch einen Umlenkarm in den Messkopf gelenkt. Dieser bestand aus einer konfokalen Messoptik mit einem Dichroiten zum Trennen des Anregungslichts vom Fluoreszenzlicht. Dabei wurde das Anregungslicht mit Hilfe des Dichroiten durch eine Linse der Brennweite $f = 3$ cm gelenkt und auf die Gewebeprobe fokussiert. Das in Rückrichtung abstrahlende Fluoreszenzlicht transmittierte durch den Dichroiten und wurde in eine Quarzfaser mit einem Kerndurchmesser von 200 μm eingekoppelt.

Die Quarzfaser leitete das Fluoreszenzlicht in ein Oriel-Spektrometer, wo es, spektral aufgespalten, durch einen 16-Kanal-PMT in 16 spektralen Bereichen detektiert und per SHM180-Karte digitalisiert wurde. Diese Detektionsstrecke entspricht der in Abschnitt 5.2.1 beschriebenen und soll deshalb an dieser Stelle nicht weiter ausgeführt werden. Die Beobachtung des Messortes (Laserfokusposition) auf der Probe erfolgte über eine CCD-Kamera, wobei die Probe über einen x-y-Tisch mit Mikrometerschrauben positioniert werden konnte.

A.3.2 TPEF-Spektren von gesundem und tumorös entartetem Hautgewebe

In Abbildung A.8 sind zwei repräsentative TPEF-Spektren einer in Paraffin eingebetteten Gewebeprobe dargestellt. Da die untersuchte Probe (Proben-Nr. 3738) sowohl gesundes als

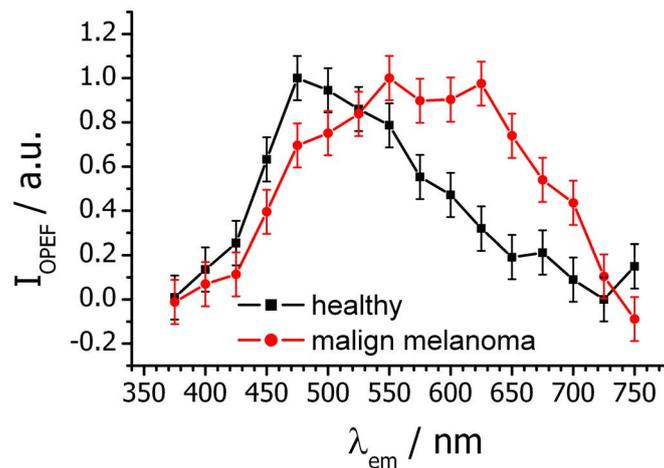


Abb. A.8: TPEF-Spektren von gesundem Epidemischgewebe (schwarz) und von Gewebe eines malignen Melanoms (rot) der gleichen Gewebeprobe. Zur Anregung wurden Laserpulse einer Pulsdauer < 200 fs, einer Pulsenergie von $E_{pulse} = 0,25 \mu\text{J}$ und einer Wellenlänge von $\lambda = 780$ nm genutzt.

auch malign entartetes Gewebe (malignes Melanom) enthielt, war es möglich, das TPEF-

Spektrum einer gesunden Stelle der Epidermis dem TPEF-Spektrum des malignen Melanoms gegenüber zu stellen. Dabei konnte erstmals mit einer mobilen Apparatur der von Teuchner et al. [Teu00] gefundene spektrale Kontrast zwischen gesundem und Krebsgewebe reproduziert werden.

A.4 Anhebung der Melaninfluoreszenz in den TPEF-Spektren von Hautgewebe durch Anregung mit ns-Laserpulsen

Nachdem die sensitive Melanin-TPEF durch Anregung mit fs-Laserpulsen erfolgreich nachgewiesen werden konnte, bestand die Frage, ob die Melanin-TPEF nicht auch mit Laserpulsen im ns-Bereich angeregt werden kann. Bei Anregung von Laserfarbstofflösungen mit ns-Laserpulsen war bereits eine TPEF beobachtet worden (siehe Abschnitt 5.2.1).

Bei Annahme eines Zwischenniveaus mit Lebensdauern im ns-Bereich würde bei Verwendung von ns-Laserpulsen ein schrittweiser 2-Photonen-Anregungsprozess weit effizienter ablaufen als ein simultaner Prozess (siehe Abschnitt 5.3.2). Daher wäre anzunehmen, dass in diesem Fall der Anteil der Melanin-Fluoreszenz an der gesamten TPEF anwachsen bzw. dominant würde. Da der Wechsel auf eine ns-Laserquelle auch technisch eine große Vereinfachung darstellte, wurde eine entsprechende Apparatur aufgebaut (siehe Abbildung A.9) und getestet.

A.4.1 Apparatur zum Messen von 2-Photonen-Angeregten-Autofluoreszenzspektren des Hautgewebes mit ns-Laserpulsen

Für den Aufbau wurde der IMRA-fs-Laser mit dem aufwendigen Verstärkersystem entfernt und durch den Farbstofflaser UDL200 ersetzt. Dieser wurde transversal durch den MNL800-Stickstofflaser gepumpt. Als Laserfarbstoff wurde wieder eine gesättigte Lösung aus Styryl 11 / Ethylenglykol verwendet. Die resultierenden Anregungspulse besaßen eine Pulsenergie von $E_{pulse} = 10 \mu\text{J}$ bei einer Wellenlänge von $\lambda = 780 \text{ nm}$ und einer Pulsdauer $T_{pulse} < 1 \text{ ns}$. Der konfokale Messkopf sowie die Detektionsstrecke wurden unverändert vom oben beschriebenen fs-Aufbau übernommen (siehe Abschnitt A.7). Auch die Beobachtung des Messortes auf der Probe erfolgte wieder über eine CCD-Kamera und die Positionierung der Probe über einen x-y-Tisch mit Mikrometerschrauben.

A.4.2 Vergleich zwischen TPEF-Spektren gesunder und entarteter Aderhaut bei Anregung mit fs- und ns-Laserpulsen

Neben den Gewebeproben aus der Epidermis wurden auch andere Gewebearten untersucht. Da eine Form des Melanoms auch in der Aderhaut des Auges auftreten kann, galt ein besonderes Interesse einer vergleichenden Messung des TPEF-Spektrums mit Aderhautmelanomen. In Abbildung A.10 wird ein in Paraffin konserviertes Auge mit Aderhautmelanom gezeigt. Die Probe war wieder so geschnitten, dass der Laser direkt auf erkranktes Gewebe fokussiert werden konnte und eine oberflächennahe Messung ohne Streuverluste möglich war. Als Referenz wurden TPEF-Spektren in gesunden Arealen der Aderhaut aufgenommen.

Die TPEF-Messungen an der Aderhaut wurden in der Umbauphase der Apparatur von fs- auf ns-Laserpulsanregung durchgeführt. Dabei wurden zuerst TPEF-Spektren nach Anregung mit

A NUTZUNG DER MELANIN-FLUORESCENZ ALS INDIKATOR DES MALIGNEN MELANOMS

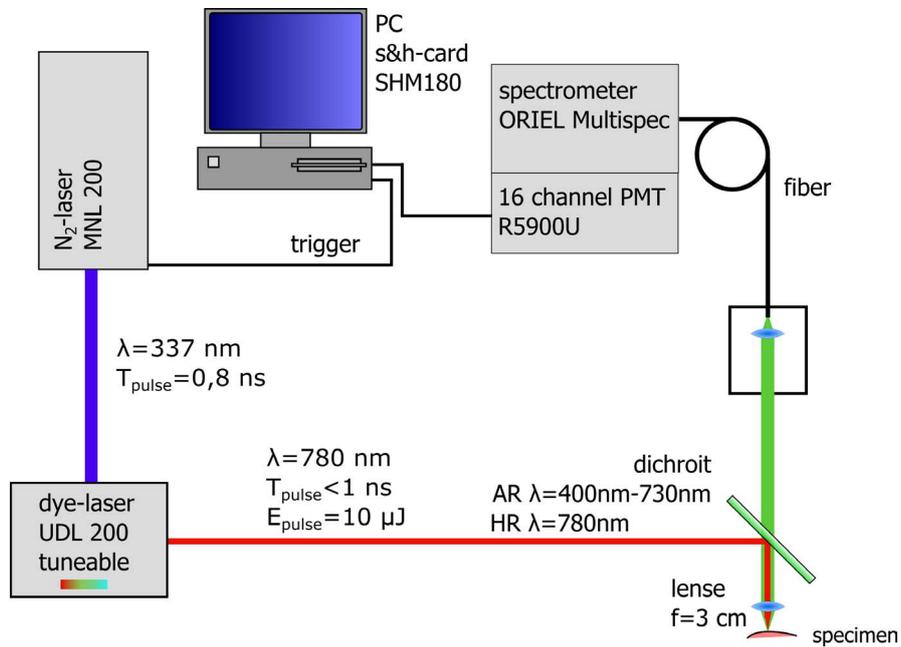


Abb. A.9: Verwendete Variante einer kompakten Apparatur zur Messung der TPEF-Autofluoreszenzspektren von Hautgewebe, wobei ns-Laserpulse zur Anregung genutzt werden.

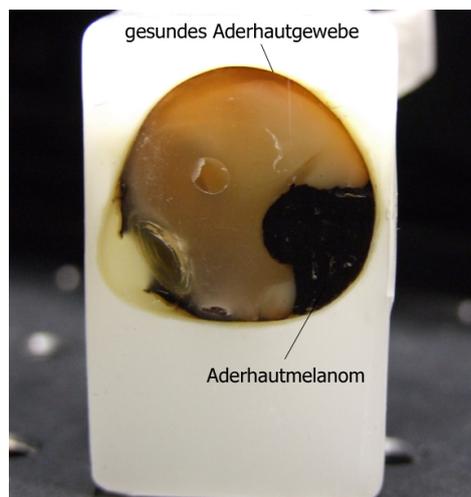


Abb. A.10: In Paraffin eingebettetes Auge mit deutlich sichtbarem Aderhautmelanom rechts unten. Durch die gewählte Schnittbenen konnte direkt im kranken Gewebe gemessen werden. Zur Referenz wurden zusätzlich TPEF-Spektren von gesunden Aderhautbereichen aufgenommen.

fs-Lichtpulsen aufgenommen und nach dem Umbau TPEF-Spektren mit ns-Pulsen. Da die Messorte nicht genau reproduziert werden konnten, werden in Abbildung A.11 repräsentative TPEF-Spektren für die Anregung mit fs- (links) und ns-Laserpulsen (rechts) gezeigt. Wie zu sehen, zeigte sich im Mittel bei Anregung mit ns-Laserpulsen eine stärkere Anhebung der TPEF-Spektren des erkrankten Gewebes im roten Spektralbereich. Diese Beobachtung bestärkt die Vermutung eines schrittweisen 2-Photonen-Anregungsprozesses der Melanin-TPEF im Gewebe und spricht dafür, dass bei Anregung des Melanins im Gewebe mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 780$ nm Zwischenzustände mit Lebensdauern im ns-Bereich bevölkert werden [Sch06, Sch07].

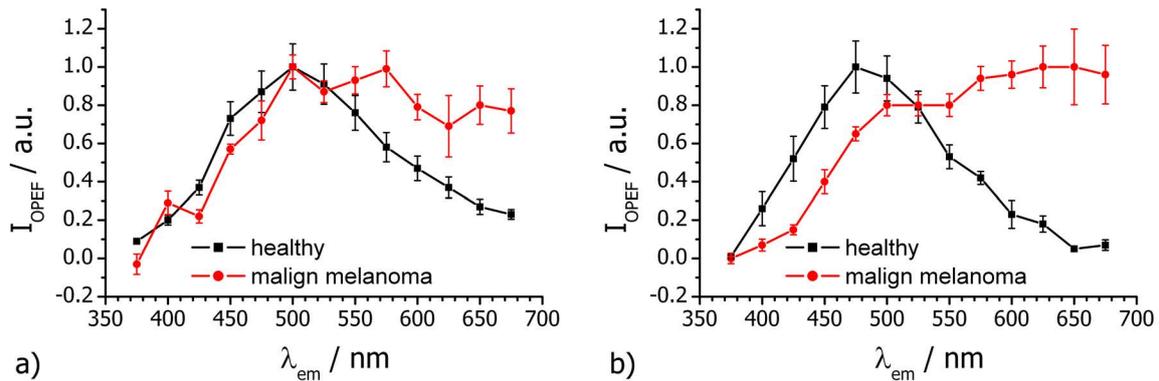


Abb. A.11: Repräsentative TPEF-Spektren von gesundem und entartetem Aderhautgewebe in Paraffin bei Anregung mit fs-Laserpulsen (links) und ns-Laserpulsen (rechts).

A.4.3 Vergleich zwischen OPEF- und TPEF-Spektren eines Linienscans über ein malignes Melanom

Die Verwendung des Farbstofflasers in der TPEF-Messapparatur mit ns-Laserpulsanregung beinhaltet die Möglichkeit eines unkomplizierten Wechsels der Anregungswellenlänge. Durch den Wechsel des Laserfarbstoffes (Farbstoffküvette) konnten die OPEF- und TPEF-Spektren bei denselben Messpositionen auf einer Gewebeprobe bestimmt und verglichen werden.

Für die Messung des TPEF Spektrums wurde der aus Abschnitt A.4.1 bekannte Aufbau verwendet. Für die Anregung des OPEF-Spektrums mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 390$ nm wurde eine Lösung von QUI / Dioxan ($C_{QUI} = 0,52$ g/l) [Bra00] in einer Küvette der Schichtdicke $d = 1$ cm als Lasermedium im UDL200 verwendet. Außerdem wurde, wie in Abbildung A.12 dargestellt, bei dieser Anregungswellenlänge ein GG15-Filter vor die Fasereinkopplung der Detektionsstrecke eingesetzt, um eine Verfälschung des OPEF-Spektrums durch Anregungslicht zu verhindern.

Als Probe wurde in diesem Fall wieder ein in Paraffin eingebettetes Stück Epidermisgewebe mit einem malignen Melanom verwendet. Die gemessenen OPEF-Spektren wiesen, zumindest in den in Paraffin konservierten Proben, keine Sensitivität gegenüber den malignen Entartungen des Gewebes auf (siehe Abbildung A.13). Dem gegenüber zeigten die TPEF-Spektren des Melanom-Gewebes deutliche Unterschiede bezüglich der TPEF-Spektren gesunder Epidermisgebiete. Während die TPEF-Spektren der gesunden Epidermis den OPEF-Spektren glichen, beinhalteten die TPEF-Spektren des entarteten Gewebes einen deutlich stärkeren Rotanteil.

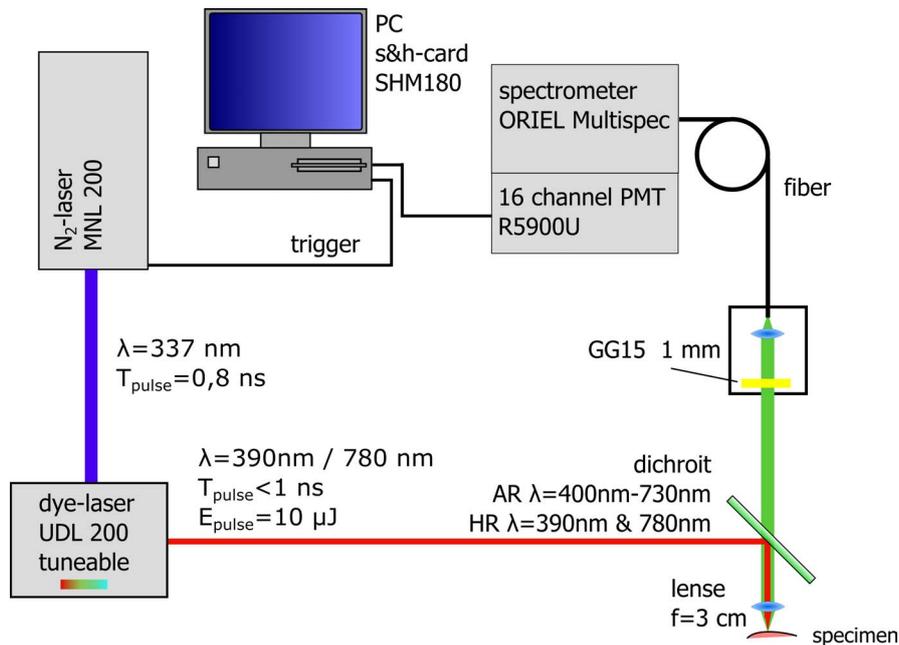


Abb. A.12: Variante einer kompakten Apparatur zur Messung der OPEF-Autofluoreszenzspektren von in Paraffin eingebettetem Hautgewebe, bei Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 390 \text{ nm}$.

Folgt man der These, dass die TPEF-Spektren durch Melanin-TPEF-Anteile dominiert werden (was gerade bei den stark pigmentierten Gebieten plausibel ist), kann durch diese Ergebnisse die Sensitivität des Melanins gegenüber dem malignen Melanom und der schrittweisen 2-Photonen-Anregungsprozess beim Melanin bestätigt werden [See06, Sch07]. Letzteres kann aus der Anhebung der Melanin-Fluoreszenz im Autofluoreszenzspektrum beim Wechsel von der 1-Photonen- zur 2-Photonen-Anregung geschlossen werden.

A.4.4 TPEF-Spektren von gesundem Epidermisgewebe und Gewebe des malignen Melanoms mit alternativer Anregungswellenlänge

In einer abschließende Messung wurde die in Abschnitt 5.2.1 vorgestellte Apparatur zur Messung von TPEF-Spektren bei Verwendung verschiedener Anregungswellenlängen genutzt, um gesundes und krankhaftes Gewebe zu untersuchen.

Die Ergebnisse dieser ersten Messungen für Anregungswellenlängen von $\lambda = 760 \text{ nm}$ und $\lambda = 800 \text{ nm}$ sind in Abbildung A.14 dargestellt. Dabei deutet sich eine ähnliche Verbreiterung der Fluoreszenzbande bei Verschiebung der Anregung zu kürzeren Wellenlängen an, wie sie für das Eumelanin in Abschnitt 5.2.2 beobachtet wurde. Weiterhin wurden in der Abbildung die TPEF-Spektren gesunder bzw. entarteter Gewebsareale den TPEF-Spektren kleiner bzw. großer Eumelanin-Aggregate gegenübergestellt. Dies sollte auf eine Ähnlichkeit zwischen den Spektren gesunden Gewebes und kleinen Eumelanin-Aggregaten bzw. den Spektren entartetem Gewebes und großer Eumelanin-Aggregate hinweisen.

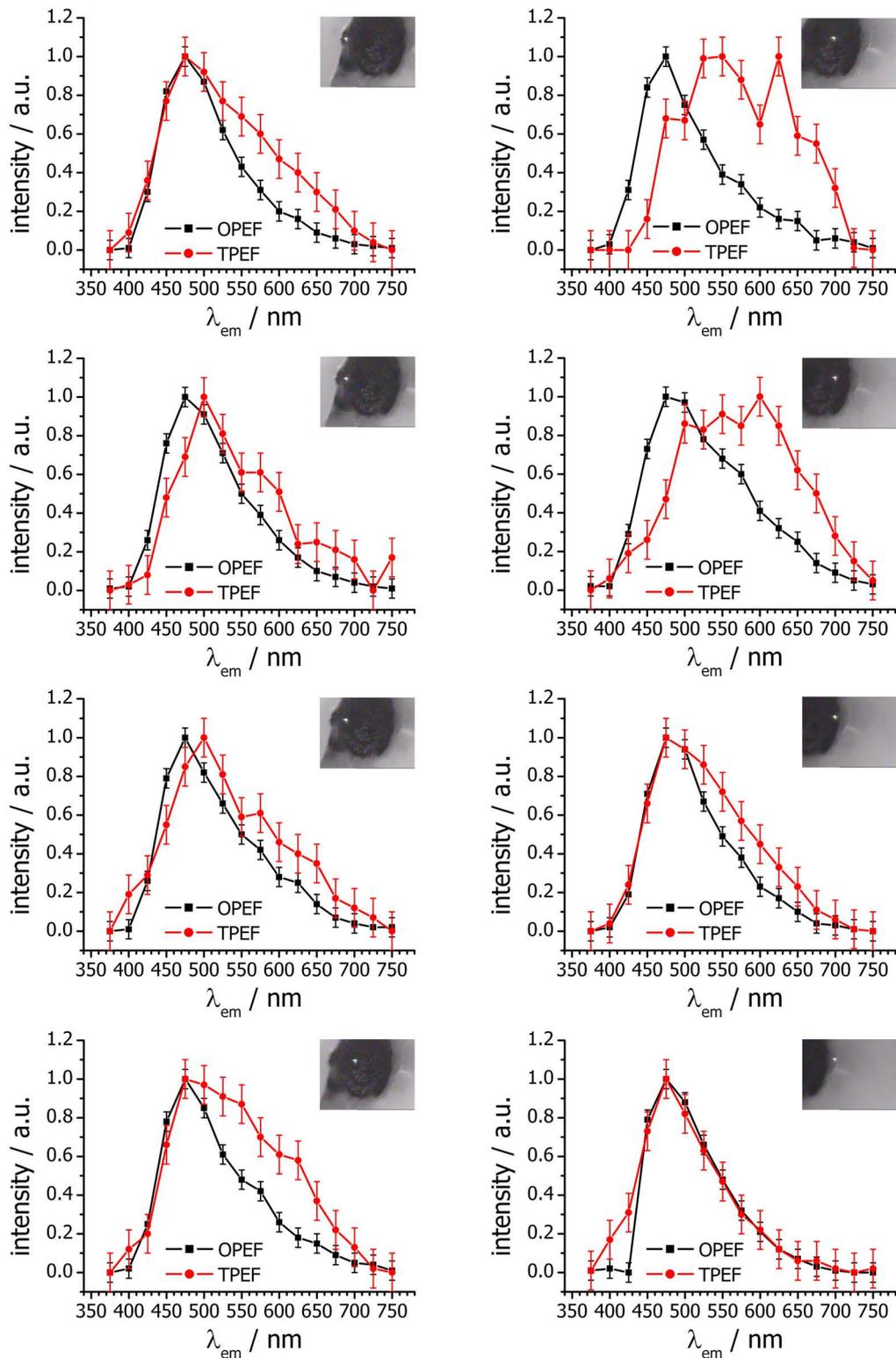


Abb. A.13: Messreihe von OPEF- und TPEF-Spektren entlang einer Linie über ein in Paraffin eingebettetes malignes Melanom. In der rechten Ecke des jeweiligen Diagramms ist die Position des Laserfokusses (Messort) auf der Probe dargestellt.

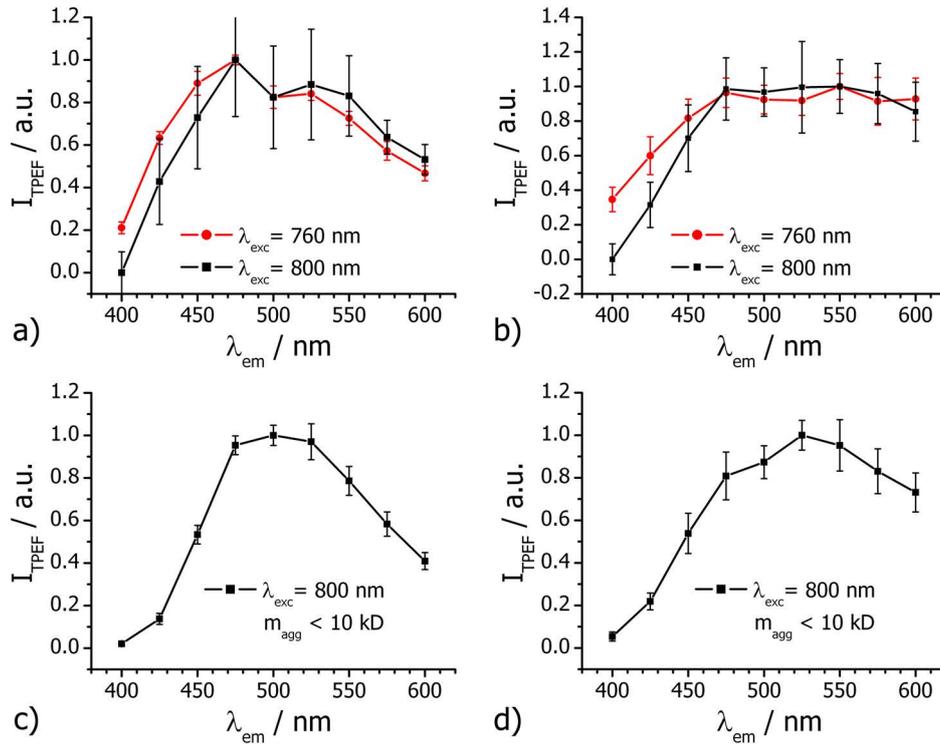


Abb. A.14: Gegenüberstellung von TPEF-Spektren die an a) gesundem, b) entartetem Gewebe (malignes Melanom) bzw. an Eumelanin-Aggregaten mit einer Aggregatsmasse von c) $< 10 \text{ kD}$ und d) $> 10 \text{ kD}$ gemessen wurden.

Aufgrund dieser Ähnlichkeit und wieder unter der Annahme, dass die gemessenen TPEF-Spektren des Gewebes im Wesentlichen durch Melanin-TPEF bestimmt werden, kann eine alternative These zum Entstehen des Messkontrastes zwischen gesundem und erkranktem Gewebe vorgeschlagen werden. Demnach ist es auch möglich, dass die Rotverschiebung des TPEF-Spektrums im kranken Gewebe nicht auf ein geändertes Pheo-/Eumelanin-Verhältnis gründet sondern auf eine Zunahme der mittleren Melanin-Aggregatsmasse im malignen Melanom. Hinweise die für diese These sprechen sind:

- In Untersuchungen von Salopek et al. [Sal91] wurde festgestellt, dass im Hautgewebe grundsätzlich ca. 5-10 Mal mehr Pheomelanin vorhanden ist als Eumelanin, so dass ein Abfall des Eumelanin-Anteils an der 2-Photonen-Angeregten-Autofluoreszenz keine starke spektrale Änderung hervorrufen sollte.
- Das OPEF-Maximum des Pheomelanins liegt Ergebnissen von Nightswander-Rempel [NR06] mit ($E_{ph} \approx 3 \text{ eV}$) kurzwelliger als das OPEF-Maximum von Eumelanin ($E_{ph} \approx 2,7 \text{ eV}$). Wenn das TPEF-Spektrum des Pheomelanins adäquat zum Eumelanin nur kleine Verschiebungen zum OPEF-Spektrum aufweist, sollte sich bei verringertem Eumelanin-Anteil eine Blau- statt eine Rotverschiebung im 2-Photonen-Angeregten-Autofluoreszenz-Spektrum ergeben.
- In diesen Messungen von Cicchi et al. [Cic08] wurde eine deutlich kürzere Lebensdauer der Autofluoreszenz im Gewebe des malignen Melanoms gefunden. Nach dem in der vorliegenden Dissertation aufgestellten Modell würde dies für eine schnellere Relaxation

entlang der Kaskade und damit für größere Aggregate sprechen.

A.5 Zusammenfassung

Durch die in diesem Kapitel beschriebenen Messungen der TPEF-Spektren von in Paraffin eingebetteten Gewebeproben konnte der durch Teuchner et al. [Teu00] gefundene spektrale Messkontrast zwischen gesundem Epidermisgewebe und Gewebe des malignen Melanoms reproduziert werden.

In Erweiterung der Messungen wurden auch die TPEF-Spektren von gesunder Aderhaut und von Gewebe des Aderhautmelanoms bestimmt und verglichen. Auch hier konnte die Korrelation zwischen entartetem Gewebe und einer Anhebung der Fluoreszenzintensität im langwelligen Bereich der TPEF-Bande nachgewiesen werden.

Bei einer Gegenüberstellung von ortskorrelierten OPEF- mit TPEF-Spektren an einer Hautgewebeprobe wurde die alleinige Sensitivität der TPEF-Fluoreszenz beobachtet, was zu der Vermutung führte, dass das TPEF-Spektrum im Gegensatz zum OPEF-Spektrum durch die krebssensitive Melanin-Fluoreszenz dominiert wird. Diese Dominanz kann mit einer effizienteren Anregung des Melanins im Gewebe über einen schrittweisen 2-Photonen-Anregungsprozess begründet werden.

In einem abschließenden Vergleich zwischen den TPEF-Spektren von gesundem Gewebe bzw. Krebsgewebe und den TPEF-Spektren von Eumelaninlösungen kleiner ($MW < 10$ kD) bzw. größerer ($MW > 10$ kD) Aggregate, wurde ein alternatives Erklärungsmodell für die Veränderung des TPEF-Spektrums von entartetem Gewebe abgeleitet und vorgeschlagen. Demnach begründet sich die beobachtete Rotverschiebung der TPEF des entarteten Gewebes nicht auf eine Zunahme des Pheomelanin-Anteils am vorkommenden Melanin sondern auf tendenziell größere Melanin-Aggregate innerhalb des kranken Gewebes.