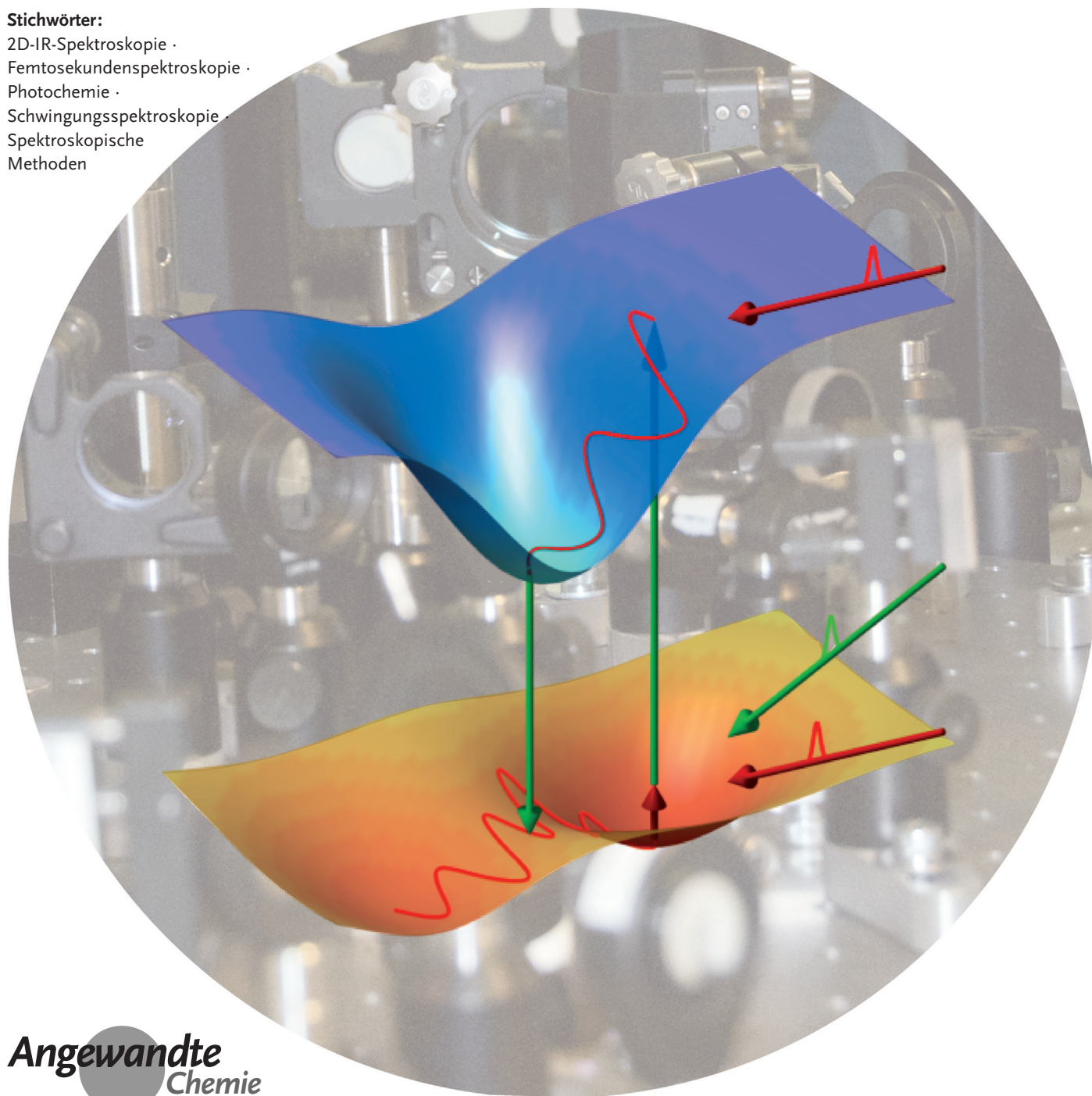


# Von ultraschnellen Strukturbestimmungen bis zum Steuern von Reaktionen: mehrdimensionale gemischte IR/nicht-IR-Schwingungsspektroskopie

*Luuk J. G. W. van Wilderen\* und Jens Bredenbeck\**

**Stichwörter:**

2D-IR-Spektroskopie ·  
Femtosekundenspektroskopie ·  
Photochemie ·  
Schwingungsspektroskopie ·  
Spektroskopische  
Methoden



**U**ltraschnelle, mehrdimensionale Infrarot-Spektroskopie ist eine leistungsstarke Methode, um Informationen über molekulare Strukturen und deren Dynamik zu erhalten, die mit linearer Spektroskopie nicht oder nur schwer zugänglich sind. IR-Pulssequenzen mit resonanten oder nichtresonanten UV-, Vis- oder NIR-Pulsen erweitern den Einsatzbereich der mehrdimensionalen Schwingungsspektroskopie erheblich und schaffen Möglichkeiten, die weit über die eines reinen IR-Experimentes hinausgehen. Dazu gehört die oberflächenspezifische 2D-IR-Spektroskopie, deren Empfindlichkeit die Untersuchung molekularer Monolagen ermöglicht, die ultraschnelle Strukturbestimmung in Nichtgleichgewichtssystemen, die getriggerte Austauschspektroskopie, die es erlaubt, Edukt- und Produktbanden miteinander zu korrelieren, Untersuchung des Zusammenspiels von elektronischen und Kernfreiheitsgraden, die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Raman- und IR-aktiven Moden, Bildgebung mit chemischem Kontrast, subensembelselektive Photochemie und sogar das Steuern von Photoreaktionen durch selektive IR-Anregung. Im Folgenden stellen wir nützliche gemischte IR/nicht-IR-Pulssequenzen vor, diskutieren deren Eigenheiten und veranschaulichen ihr Anwendungspotenzial.

## Aus dem Inhalt

1. Einführung	11791
2. Eine kurze Einführung in die 2D-IR-Spektroskopie	11792
3. Gemischte IR/nicht-IR-Pulssequenzen	11794
4. Zusammenfassung und Ausblick	11805

## 1. Einführung

Die Entwicklungen der letzten Jahre haben eine Vielzahl ausgefeilter Techniken hervorgebracht, welche Schwingungen als intrinsische Sonden in Molekülen nutzen, um deren Struktur und Dynamik zu messen.<sup>[1–4]</sup> Es sind eine Reihe von Merkmalen, die Schwingungsspektroskopie zu einer leistungsfähigen und vielseitigen Methode machen. Schwingungsspektroskopie besitzt eine hohe räumliche Auflösung, da sie Strukturveränderungen im Molekül auf der Ebene von funktionellen Gruppen und sogar einzelnen Bindungen verfolgen kann. Die intrinsische Zeitauflösung liegt dabei unter einer Pikosekunde.<sup>[5,6]</sup> Schwingungen sind empfindlich auf Änderungen in ihrer Umgebung, die ihre Frequenz, Oszillatorstärke und die Schwingungslebensdauer modulieren kann. Diese Observablen liefern damit Informationen über intermolekulare Wechselwirkungen, was zur Untersuchung von Solvatisierungsphänomenen, Wasserstoffbrücken oder Ligandenbindung genutzt wird. Schwingungen detektieren chemische Reaktionen oder Ladungstransferprozesse, welche die Stärke von chemischen Bindungen beeinflussen. Des Weiteren werden Schwingungen als Sonden genutzt, um lokale Felder innerhalb von Molekülen zu untersuchen.<sup>[7]</sup> Aufgrund anharmonischer Kopplungen sind Schwingungen sensitiv auf mechanische Energie und können verwendet werden, um intra- und intermolekularen Energiefluss zu messen.<sup>[8]</sup> Polarisationsempfindliche Messungen können die molekulare Konformation oder die Orientierung bestimmter funktioneller Gruppen bestimmen.<sup>[9,10]</sup> Die Vielfalt der für IR-Spektroskopie zugänglichen Proben erstreckt sich von der flüssigen über die feste Phase, bis hin zu Oberflächen und Membranen. Dabei ermöglicht die hohe zeitliche Auflösung die

Beobachtung von sich rasch ineinander umwandelnden Spezies als getrennte Signale in IR-Absorptionsspektren. Zeit aufgelöste IR-Spektroskopie mit Zeitauflösung im Subpikosekundenbereich ist ein häufig genutztes Mittel, um Veränderungen auf molekularer Ebene zu untersuchen.

Angeregt durch die Fülle an zugänglichen Informationen in Molekülschwingungen wurde die Entwicklung mehrdimensionaler Schwingungsspektroskopien vorangetrieben, in Analogie zur mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie. Diese Methoden nutzen Sequenzen von IR-Laserpulsen um Kopplungen und Korrelationen von Schwingungen mit einer Zeitauflösung von unter einer Pikosekunde zu messen. Die Methoden erschließen deutlich mehr Informationen als durch klassische eindimensionale Spektroskopie zugänglich sind, wie wir ausführlicher in Abschnitt 2 beschreiben werden. Mit ihnen ist es z.B. möglich, Strukturbestimmung anhand von Schwingungskopplung und der Polarisationsabhängigkeit des Signals zu betreiben, Gleichgewichtskinetiken mittels Austauschspektroskopie zu messen oder Schwingungsenergie-transfer zu verfolgen, was z.B. zur Zuordnung von Banden verwendet werden kann.

Durch das Erweitern der reinen IR-Pulssequenzen mit UV-, Vis- oder NIR(Nah-IR)-Pulsen erweitern sich Anwendungsgebiet und Möglichkeiten der mehrdimensionalen Schwingungsspektroskopie erheblich. Die zusätzlichen Pulse können verschiedenen Zwecken dienen. Reine IR-Experi-

[\*] Dr. L. J. G. W. van Wilderen, Prof. Dr. J. Bredenbeck  
Institut für Biophysik, Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main (Deutschland)  
E-Mail: vanwileren@biophysik.uni-frankfurt.de  
bredenbeck@biophysik.uni-frankfurt.de

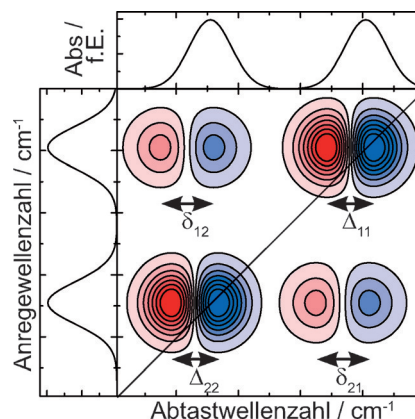


mente sind auf den elektronischen Grundzustand beschränkt und werden normalerweise genutzt, um Systeme im Gleichgewicht zu betrachten. Dies schließt viele wichtige chemische, physikalische und biologische Prozesse, die in elektronisch angeregten Zuständen stattfinden, aus, ebenso Dynamik im Grundzustand, die durch eine elektronische Anregung ausgelöst wird. Um solche Prozesse zugänglich zu machen, wird ein UV/Vis-Puls benötigt, der die Dynamik des Systems triggert. Weitergehend können gemischte IR/nicht-IR-Pulssequenzen so gestaltet werden, dass sie vibronische Kopplungen messbar oder sich diese zunutze machen. Werden Raman- und Resonanz-Raman-Prozesse einbezogen, erweitert sich die messbare Information um polarisierbarkeitsabhängige Observablen. Diese Techniken sind aufgrund der Auswahlregeln sensitiv für andere Moden und können z.B. genutzt werden, um Chromophormoden zu selektieren. Zusätzliche Vis- oder NIR-Pulse wurden darüber hinaus verwendet um Oberflächensignale aufzukonvertieren, was grenzschichtspezifische zweidimensionale Infrarot(2D-IR)-Spektroskopie mit einer Empfindlichkeit besser als eine molekulare Monolage ermöglicht.

Durch die anhaltende technische Entwicklung werden solche gemischten, mehrdimensionalen IR/UV/Vis/NIR-Experimente immer leichter zugänglich. Im Folgenden werden wir wichtige Pulssequenzen vorstellen, ihre Eigenheiten diskutieren und Anwendungsbeispiele zeigen, um Anregungen für ihre weitere Anwendung zu geben. Hierbei soll der Schwerpunkt auf dem Informationsgehalt der Experimente liegen, wobei technische Details und der theoretische Hintergrund bewusst kurz gehalten wurden. Wir beschränken uns hier auf gemischte Techniken, welche resonante und nicht-resonante UV-, Vis- oder NIR-Pulse beinhalten und Kopplung oder Korrelation mindestens zweier Schwingungen betrachten, wodurch ein 2D-Schwingungsspektrum entsteht. Zu Anfang geben wir in Abschnitt 2 eine sehr kompakte Einführung in die 2D-IR-Spektroskopie, bevor wir im Anschluss in Abschnitt 3 Experimente mit gemischten Pulssequenzen vorstellen.

## 2. Eine kurze Einführung in die 2D-IR-Spektroskopie

2D-IR-Spektroskopie<sup>[11]</sup> misst Kopplungen und Korrelationen von Schwingungsmoden, um eine Vielzahl von Informationen über die molekulare Struktur und ihre Dynamik abzuleiten.<sup>[4,12–16]</sup> Dabei ist es nicht zwingend nötig, dass die Oszillatoren räumlich benachbart sind, sie müssen sich noch nicht einmal im selben Molekül befinden. Die Interpretation von 2D-IR-Spektren (Abbildung 1) basiert auf dem Vorhan-



**Abbildung 1.** Schematisches 2D-IR-Spektrum von zwei wechselwirkenden Oszillatoren. Das obere und linke Feld zeigen das lineare Absorptionsspektrum der Oszillatoren. Das 2D-IR-Feld zeigt, dass Schwingungsanregung eines Oszillators zum Bleichen des Grundzustands und zu stimulierter Emission auf der Diagonalen (negativer Beitrag bei der Grundfrequenz des Oszillators, in blau) und einer gleichzeitigen induzierten Absorption (positiver Beitrag bei der Frequenz des ersten Obertons des Oszillators, in rot) führt. Falls die beiden Moden miteinander wechselwirken, kommt es zu Signalen abseits der Diagonalen (Kreuzsignale). Die Parameter  $\Delta$  und  $\delta$  sind die beobachteten anharmonischen Verschiebungen, von denen die Diagonal- und die Außerdiagonal-Anharmonizitäten abgeleitet werden können.<sup>[4]</sup>

densein oder Fehlen von Signalen, ihrer Form, spektralen Position, relativen Größe und ihrer zeitlichen Entwicklung. Um den Leser mit der Thematik vertraut zu machen und eine Grundlage für die Diskussion von gemischten 2D-Experimenten zu schaffen, gehen wir nun auf die einzelnen Arten von Information ein, die aus 2D-IR-Spektren erhalten werden können. Der theoretische Hintergrund und Details



Luuk van Wilderen promovierte bei Rienk van Grondelle und Marie-Louise Groot an der Vrije Universiteit Amsterdam (2007) und trat anschließend der Gruppe von Jasper van Thor am Imperial College in London im Rahmen eines FEBS-Stipendiums bei. Seit 2010 arbeitet er in der Arbeitsgruppe von Jens Bredenbeck an der Goethe-Universität in Frankfurt. Seine Forschungsschwerpunkte sind die Entwicklung und Anwendung mehrdimensionaler Spektroskopien, die Erforschung der Photochemie kleiner Moleküle sowie von Proteinen und der Entwicklung von Datenanalysemethoden.



Jens Bredenbeck (\*1975) erhielt sein Diplom in Chemie im Jahr 2000 bei R. Schinke (MPI für Strömungsforschung, Göttingen) und den Dr. sc. nat. im Jahr 2005 bei P. Hamm (Max-Born-Institut für Nichtlineare Optik, Berlin und Universität Zürich). Nach einem Postdoktorat bei M. Bonn (AMOLF, Amsterdam) wurde er mit dem Sofia-Kovalevskaja-Preis der Humboldt-Stiftung ausgezeichnet und gründete 2007 seine Gruppe an der Goethe-Universität in Frankfurt. Seit 2010 ist er Professor für Experimentelle Biophysik und Chemische Physik. Sein Interesse gilt der Erforschung molekularer Struktur und Dynamik sowie der Entwicklung nichtlinearer Schwingungsspektroskopien.

der experimentellen Umsetzung von 2D-IR-Spektroskopie waren bereits Gegenstand einiger ausgezeichneten Veröffentlichungen, Übersichtsartikel<sup>[14,15,17–27]</sup> und Bücher.<sup>[4,16]</sup>

2D-IR-Spektroskopie ist eine Spektroskopie 3. Ordnung, da das detektierte Signal (geschlängelte Linie in Abbildung 2) durch drei resonante Wechselwirkungen des Lichtfelds mit der Probe erzeugt wird. Die einfachste Umsetzung sowohl hinsichtlich der Technik, als auch zur Verdeutlichung des Konzepts, ist 2D-IR-Spektroskopie in der Frequenz-Domäne (*FD*) (Abbildung 2A).<sup>[11]</sup> Man nutzt einen intensiven, schmalbandigen Anregungspuls (Pump-Puls) (typischerweise wenige Wellenzahlen schmal), um den Wellenzahlenbereich von Interesse abzutasten. Seine Wellenzahl ergibt in Folge die so genannte Pump-Achse des Spektrums (siehe Abbildung 1 für eine schematische Darstellung). Nach einer Wartezeit  $t_1$  folgt jedem Pump-Puls ein schwacher, breitbandiger Abfragepuls (Probe-Puls), welcher die durch die Anregung ausgelöste Absorptionsänderung misst. Der breitbandige Puls wird im Anschluss mittels eines Spektrometers spektral aufgespalten, was die Probe-Achse liefert. Der Aufbau eines 2D-Spektrums kann daher als Aneinanderreihung von 1D-Spektren der jeweiligen Pump-Wellenzahlen betrachtet werden. Eine alternative Variante ist die Fourier-Transformations- oder Zeit-Domänen(*ZD*)-2D-IR-Spektroskopie (Pulssequenz dargestellt in Abbildung 2B),<sup>[28,29]</sup> bei welcher der schmalbandige Pump-Puls durch ein breitbandiges Puls-Paar ersetzt wird. Die Wartezeit  $\tau$  (die Kohärenzzeit, siehe Abschnitt 3) zwischen den Pulsen des Paares wird abgetastet und das dabei erhaltene Signal mit  $\tau$  als Transformationsvariable Fourier-transformiert, wobei die Pump-Achse des 2D-IR-Spektrums erhalten wird. Es wurde gezeigt, dass *FD*-sowie *ZD*-Ansatz im Wesentlichen dieselben Informationen liefern.<sup>[30]</sup> Um die Gleichwertigkeit des schmalbandigen Pump-Pulses und des Breitband Pump-Pulspaares, getrennt durch eine Wartezeit  $\tau$ , zu illustrieren, wurden sämtliche schmalbandigen Pump-Pulse in Abbildung 2 mit einem weißen  $\tau$  versehen. Während die *FD*-Methode erlaubt, ausgewählte Schnitte durch das Spektrum einzeln zu messen, und außerdem leichter zu implementieren ist, bietet das *ZD*-Verfahren deutliche Vorteile auf Seiten der spektralen wie der zeitlichen Auflösung. Für einen tieferen Einblick in diese und andere experimentelle Strategien mit ihren Vor- und Nachteilen verweisen wir an dieser Stelle auf Lit. [4].

Zusammengefasst zeigt ein 2D-IR-Spektrum die Wirkung der Anregung einer Schwingungsmode auf die anderen Schwingungsmoden im Spektrum und auf sich selbst. Letzteres, Anregung und Abfrage der selben Schwingung, führt zu einem so genannten Diagonal-Signal. Dieses besteht aus einem negativen Anteil (blau, Abbildung 1) bei der Frequenz der Grundschiwingung des Oszillators und einem positiven Beitrag des ersten Obertons, welcher anharmonisch verschoben ist. Infolge von Schwingungsrelaxation klingt das Diagonal-Signal während  $t_1$  ab.

Kreuzsignale können durch verschiedene Mechanismen erzeugt werden und damit auch unterschiedliche Rückschlüsse auf das System zulassen. Im Allgemeinen wird ein Kreuzsignal beobachtet, wenn ein Oszillator durch die Anregung eines anderen beeinflusst wird. Dies ist der Fall bei anharmonischer Kopplung, bei der ein Kreuzsignal bereits bei

$t_1 = 0$  auftritt. Die Anwesenheit eines solchen Signals zeigt, dass beide Schwingungen aus ein und demselben Molekül oder zwei stark wechselwirkenden Molekülen stammen. Kreuzsignale können daher verwendet werden, um Banden in Spektren von Gemischen zuzuordnen und zu gruppieren.<sup>[22,31]</sup> Die Polarisationsabhängigkeit der Kreuzsignale lässt Rückschlüsse auf den Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten der wechselwirkenden Schwingungen zu, was zur Strukturbestimmung genutzt werden kann.<sup>[32,33]</sup> Auch die anharmonische Kopplung, welche aus den beobachteten anharmonischen Verschiebungen bestimmt wird, kann verwendet werden, um die molekulare Struktur abzuleiten.<sup>[34,4]</sup>

Doch direkte anharmonische Kopplung ist nicht die einzige Möglichkeit wie Kreuzsignale entstehen können. Auch durch Schwingungsenergietransfer (SET)<sup>[8]</sup> werden solche Signale erzeugt. Hierbei ist eine Abweichung im zeitlichen Verlauf des SET-Kreuzsignals vom Verlauf des Diagonalsignals der angeregten Schwingung zu beobachten. Normalerweise wird SET über niederfrequente Moden vermittelt, welche zu einem Kreuzsignal der hochfrequenten Moden mittels anharmonischer Kopplung führen.<sup>[26]</sup> In einigen Fällen wurde auch ein direkter Populationsaustausch zwischen durch ein Kreuzsignal verbundenen Oszillatoren diskutiert.<sup>[15,35–37]</sup> Darüber hinaus wurde die Zeitabhängigkeit der durch SET verursachten Kreuzsignale genutzt, um eine räumliche Beziehung der Oszillatoren abzuleiten,<sup>[26]</sup> Signale in IR-Spektren zuzuordnen<sup>[26,38]</sup> und Aussagen über inter-<sup>[77]</sup> sowie intramolekulare Strukturen zu treffen. Durch SET entstandene Kreuzsignale sind ebenfalls polarisationsabhängig, was eingesetzt wird, um Übergangsdipolwinkel und damit die molekulare Struktur abzuleiten. Für SET wurde gezeigt, dass eine höhere Anzahl und stärkere Kreuzsignale generiert werden als bei direkter anharmonischer Kopplung, was die Menge nutzbarer Observablen in einem 2D-Spektrum beträchtlich vergrößert.<sup>[26]</sup>

Der dritte, wichtige Mechanismus in der Erzeugung von Kreuzsignalen ist chemischer Austausch, vergleichbar mit der NMR-Austauschspektroskopie (EXSY). Wenn zwei Spezies in einem dynamischen Gleichgewicht vorliegen und die Umwandlung von einer in die andere Spezies eine Veränderung der Schwingungsfrequenz zur Folge hat, wird ein Kreuzsignal zwischen den betreffenden Banden im IR-Spektrum sichtbar (2D-IR EXSY).<sup>[41]</sup> Aus der Zeitabhängigkeit des Kreuzsignals lässt sich hierbei die Austauschrate der Spezies herleiten.<sup>[12,42]</sup> Bei diesem Verfahren muss die Relaxationsrate des angeregten Oszillators von der gleichen Größenordnung oder langsamer als die Austauschrate sein, damit das Signal nicht schon vor dem Austausch abgeklungen ist. Daher lässt sich solch chemischer Austausch üblicherweise nur in einem Zeitfenster von einigen Pikosekunden betrachten. 2D-IR EXSY wurde bislang angewendet, um das Knüpfen bzw. Brechen von Wasserstoffbrücken<sup>[41,43]</sup> oder Konformationsänderungen zu verfolgen.<sup>[44,45]</sup> Als chemischer Austausch wird an dieser Stelle in der Regel die Umwandlung diskreter Zustände ineinander bezeichnet. Häufig kommt es aber zu einer kontinuierlichen Verteilung von Zuständen, z. B. unterschiedlicher Wasserstoffbrückenstärke und -winkel, was zu einer inhomogenen Linienverbreiterung führt. Im 2D-IR-Spektrum zeigt sich eine solche inhomogene Verteilung

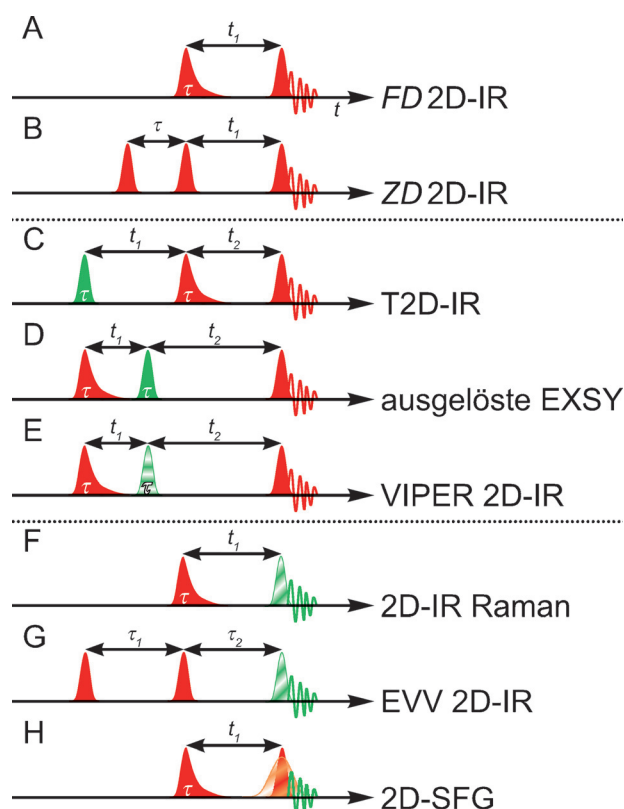
durch eine Verbreiterung der Linienform entlang der Diagonalen. Liegt Austausch in einer derartigen Verteilung vor, wird die 2D-Linienform zeitabhängig, ein als spektrale Diffusion bekanntes Phänomen.<sup>[46,49]</sup> Diese kann genutzt werden, um die Dynamik in der Umgebung eines Oszillators, beispielsweise in Lösungsmitteln oder einer Proteinumgebung zu untersuchen.<sup>[50,54]</sup> Ferner kann Energietransfer innerhalb eines Ensembles von Oszillatoren zu spektraler Diffusion führen.<sup>[55,57]</sup>

### 3. Gemischte IR/nicht-IR-Pulssequenzen

Wie bereits im letzten Abschnitt beschrieben, lässt sich eine Fülle an Informationen durch 2D-IR-Spektroskopie gewinnen. Das Einbinden von nicht-IR-Pulsen erweitert die Möglichkeiten und erlaubt konzeptionell völlig neue 2D-Schwingungsexperimente. Abbildung 2 fasst einen Großteil der verfügbaren gemischten IR/nicht-IR-Techniken zusammen, die mit zwei Schwingungsachsen arbeiten. Sie werden in den folgenden Abschnitten beschrieben. Die Pulssequenzen bestehen aus resonanten IR-Pulsen, kombiniert mit weiteren resonanten (dargestellt durch ausgefüllte Pulse) oder nicht-resonanten (gestreifte Pulse) UV-, Vis- oder NIR-Pulsen.

Im oberen Teil der Abbildung sind die *FD*- und *ZD*-Implementierungen der reinen 2D-IR-Experimente dargestellt. Wie bereits erwähnt, ist 2D-IR eine Spektroskopiemethode 3. Ordnung. *FD*2D-IR nutzt einen durchstimmbaren, schmalbandigen Anregungspuls für die ersten beiden Wechselwirkungen, wohingegen bei *ZD*2D-IR ein Paar breitbandiger Pulse, getrennt durch die Kohärenzzeit  $\tau$ , zum Einsatz kommt. Der durchstimmbare Puls wird meist durch ein computergesteuertes Etalon, ein so genanntes Fabry-Pérot-Interferometer, erzeugt. Im Gegensatz zu den Breitbandpulsen fällt der erzeugte Puls exponentiell ab und ist zeitlich verlängert. Um die Äquivalenz des schmalbandigen Pulses, welcher verantwortlich für zwei Wechselwirkungen ist, und dem Pulspar zu zeigen, ist ersterer in Abbildung 2 durch ein weißes  $\tau$  gekennzeichnet. Ein Austausch des schmalbandigen IR-Pulses durch ein breitbandiges Pulspar wurde bereits für die meisten der hier gezeigten Pulssequenzen demonstriert.

Welche Rolle spielen nun die nicht-IR-Pulse innerhalb der verschiedenen Pulssequenzen? In Abbildung 2 werden die zwei Kategorien von möglichen Experimenten gezeigt. Die erste Kategorie nutzt einen nicht-IR-Puls für eine elektronische Anregung (Sequenzen C, D und E), wohingegen die reinen 2D-IR-Experimente (Sequenz A oder B) das System im elektronischen Grundzustand und üblicherweise im Gleichgewicht betrachten. Durch die elektronische Anregung werden Dynamiken dieser Zustände, photochemische Reaktionen mit ihren Intermediaten und Produkten, photophysikalische Prozesse oder andere Phänomene, die durch UV/Vis-Anregung ausgelöst werden können, (z.B. die Freisetzung von photoaktivierbaren („caged“) Verbindungen, strukturelle Neuordnung induziert durch eingebaute Konformationsschalter oder die Dynamik lightsensitiver Proteine) zugänglich gemacht. Durch eine zweifache (daher mit einem weißen  $\tau$  gekennzeichnet) Wechselwirkung eines nicht-IR-Pulses wird in diesen Experimenten eine Nichtgleichge-



**Abbildung 2.** Pulssequenzen der unterschiedlichen Implementierungen von 2D-IR- und gemischten UV/Vis/NIR-IR-Spektroskopiemethoden. Die roten, grünen und orangenen Pulse entsprechen IR-, UV/Vis- bzw. NIR-Licht. Das Muster des Pulses bezeichnet, ob er resonant (ausgefüllt), nicht-resonant (diagonal gestreift) oder induziert-resonant (horizontal gestreift) ist. Die geschlängelte Linie stellt das zu messende emittierte Feld, das Signal, dar. Die Zeitachse ist durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Mit einem  $t$  markierte Abschnitte sind Populationszeiten, durch ein  $\tau$  markierte sind Kohärenzzeiten. Pulse mit einem weißen  $\tau$  verursachen zwei Feldwechselwirkungen und könnten auch durch ein Pulspar ersetzt werden, andere Pulse nur eine Wechselwirkung. Die verwendeten 2D-IR-Akronyme bedeuten Frequenzdomäne (*FD*), Zeitdomäne (*ZD*), transiente (*T2D-IR*), Austauschspektroskopie (*EXSY*), schwingungsunterstützte elektronische Resonanz (*VIPER*), elektronische schwingungs-schwingungs (*EVV*, auch bekannt als doubly vibrationally enhanced four wave mixing, *DOVE*) und zweidimensionale Summenfrequenzgeneration (*2D-SFG*). Einige nah verwandte Erweiterungen dieser Experimente werden in den betreffenden Abschnitten diskutiert.

wichtpopulation erzeugt. Aufgrund dieser zusätzlichen Wechselwirkungen sind diese Experimente Spektroskopietechniken 5. Ordnung. Auch die Anwendung eines NIR-Pulses zur Erzeugung von Temperatursprüngen in *T2D-IR*-Experimenten wurde bereits erfolgreich durchgeführt.

In der zweiten Kategorie werden nicht-IR-Pulse verwendet, um andere Abfrageprozesse (des Raman-Typs oder durch Summenfrequenzzeugung (*SFG*)) zu nutzen. Die bereits erwähnten Experimente 5. Ordnung messen Änderungen in der IR-Absorption – mit anderen Worten wird eine Polarisation, die bei der IR-Frequenz oszilliert, erzeugt und gemessen. Mit den gezeigten Pulssequenzen F, G und H werden hingegen Signale im sichtbaren Spektralbereich erzeugt. Hierbei interagiert der UV-, Vis- oder NIR-Puls le-



diglich einmal mit der Probe, um eine geeignete Polarisation zu erzeugen. Im Unterschied zu Experimenten 5. Ordnung besteht der Zweck des nicht-IR-Pulses also nicht darin, eine Nichtgleichgewichtspopulation zu schaffen. Verglichen mit dem reinen 2D-IR-Experiment oder den vorgestellten Spektroskopiemethoden 5. Ordnung gelten für die Raman- oder SFG-Experimente abweichende Auswahlregeln. Folglich werden auch andere Observablen zugänglich. Die Pulssequenzen F und G sind Techniken 3. Ordnung, die Raman-aktive Übergänge einbeziehen. Sie erlauben es mit einer einzelnen Messung einen breiten Spektralbereich (im Vergleich zu den meisten IR-Methoden) abzufragen und ermöglichen die Untersuchung von niederfrequenten Moden und die Beobachtung von Kopplung zwischen IR- und Raman-aktiven Moden. In Pulssequenz G werden zwei IR-Pulse verwendet, die jeweils einfach mit unterschiedlichen Oszillatoren wechselwirken (siehe Abbildung 7). Bei Vorliegen von anharmonischer Kopplung werden so Kreuzsignale erzeugt. Pulssequenz H ist eine Spektroskopiemethode 4. Ordnung, was sie aus Symmetriegründen oberflächenspezifisch macht.

Die hier gezeigten Techniken umfassen mehrere Wechselwirkungen mit Pulsen um, als Funktion ihrer zeitlichen Abstände zueinander, Signale 3., 4. oder 5. Ordnung zu erzeugen. Signale niedrigerer Ordnung, etwa entstanden durch unvollständige Wechselwirkungen, sind unerwünscht und müssen unterdrückt werden. Dies kann durch verschiedene Vorgehensweisen, wie der Verwendung von Lichtzerhackern (Choppert), Wahl der Strahlgeometrie, zyklischer Phasenverschiebung oder einer Kombination der genannten Techniken erreicht werden.<sup>[4,58,59]</sup>

Die folgenden Abschnitte diskutieren im Detail den Informationsgehalt von Spektren, welche durch die in Abbildung 2 gezeigten Pulssequenzen erzeugt wurden und heben noch einmal den Effekt der verwendeten UV-, Vis- oder NIR-Pulse hervor.

### 3.1. Transiente 2D-IR-Spektroskopie

Der typische Anwendungsbereich von 2D-IR-Spektroskopie (Abbildungen 2 A und B) sind Gleichgewichtssysteme, welche sich im elektronischen Grundzustand befinden. Um das System in einen Nichtgleichgewichtszustand zu versetzen, kann ein UV/Vis-Puls genutzt werden, der vor der Aufnahme des 2D-IR-Spektrums eingestrahlt wird (siehe Abbildung 2 C).<sup>[58]</sup> Die im Abschnitt 2 für Gleichgewichts-2D-IR-Spektren beschriebenen Informationen, beispielsweise über Schwingungskopplungen und Anharmonizitäten, Schwingungslebensdauern und Energieübertragung, spektrale Diffusion und Austausch können mit der T2D-IR-Spektroskopie für das sich entwickelnde Nichtgleichgewichtssystem als Funktion der Wartezeit  $t_1$ , welche UV/Vis- und 2D-IR-Pulse trennt, untersucht werden.

#### 3.1.1. Strukturelle Dynamik

Die T2D-IR-Pulssequenz wurde verwendet zur Charakterisierung von Struktur und Dynamik einiger Peptide und

Proteine, der Isomerisierung des Chromophors in Bakteriorhodopsin,<sup>[60]</sup> der Isomerisierung von Thiopeptiden,<sup>[61]</sup> der strukturellen Fluktuation eines Fragments des aktiven Zentrums einer durch Licht aktivierbaren Thioerduktase<sup>[58,62]</sup> und der Neuordnung der Sekundärstruktur in einer  $\alpha$ -Helix sowie eines  $\beta$ -Turns.<sup>[63,64]</sup>

Letztere Arbeit konnte zeigen, dass ein starrer  $\beta$ -Turn in einem cyclischen, disulfidverbrückten Tetrapeptid durch die Spaltung der den Ring schließenden Disulfidbrücke mittels UV-Strahlung geöffnet werden kann.<sup>[63]</sup> Hinweise auf den Entfaltungsmechanismus konnten sowohl aus den T2D-IR-Spektren als auch aus Moleküldynamik(MD)-Simulationen gewonnen werden. Der anfangs vorhandene  $\beta$ -Turn beinhaltet eine intramolekulare Wasserstoffbrücke. Die Spektren zeigen ein transientes Kreuzsignal (gekennzeichnet durch TC in Abbildung 3, besonders deutlich erkennbar in den spektralen Schnitten in Abbildung 3 C). Dieses Kopplungssignal entsteht in Folge der Schwächung bzw. des Bruchs der Wasserstoffbrücke des  $\beta$ -Turns, der es ermöglicht, dass die C=O-Gruppen der zuvor wasserstoffverbrückten Peptideinheiten sich durch Rotation annähern. Dies geschieht in Übereinstimmung mit der MD-Simulation auf einer Zeitskala von 160 ps.

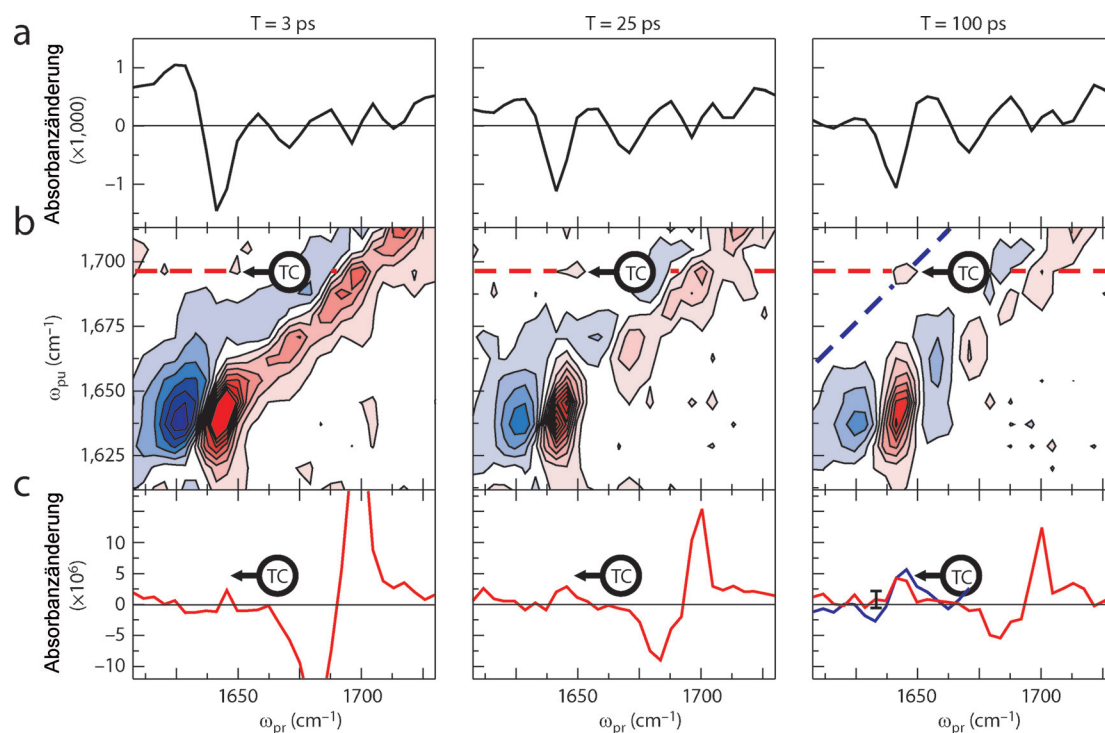
Im Falle der  $\alpha$ -Helix nutzte man zur Störung der Struktur eine S,S-Tetrazin-Verbrückung. Nach Spaltung der Disulfidbrücke durch einen UV-Puls wird die Wiederherstellung der helikalen Struktur ermöglicht.<sup>[64]</sup> An der Knickstelle wurden zwei benachbarte  $^{13}\text{C}=^{18}\text{O}$ -Reste eingefügt. Ihre Kopplung wurde aus dem T2D-IR-Spektrum bestimmt und dazu genutzt, die zeitabhängige Veränderung der Diederwinkel des Rückgrats an der Knickstelle abzuleiten. Die Ergebnisse zeigen Bewegungen auf der Pikosekunden-Zeitskala, welche zu einer extrem schnellen Wiederherstellung der helikalen Struktur führen.

Auch Nanosekunden-T-Sprung-2D-IR-Spektroskopie wurde bereits implementiert und zur Untersuchung von Proteinentfaltung<sup>[65,66]</sup> sowie bei der Beobachtung von Nanosekunden-Tautomerisierungsprozessen genutzt.<sup>[67]</sup> Bei T-Sprung-Experimenten wird ein Oberton der OH-Streck- oder vOD-Streckschwingung des Lösungsmittels angeregt, um die Probe sprunghaft zu erwärmen. Da hierbei kein nicht-IR-Puls verwendet wird, um das betrachtete Molekül direkt anzuregen, geht diese Methode über den in diesem Aufsatz behandelten Themenbereich hinaus.

Im Abschnitt 3.1.3 wird Strukturbestimmung auch an einem nichtbiologischen Beispiel, nämlich am Produkt der Photoreaktion eines anorganischen Komplexes, beschrieben.

#### 3.1.2. Schwingungsdynamik und Solvation elektronisch angeregter Zustände

Neben der Möglichkeit strukturelle Dynamik zu untersuchen, hat sich T2D-IR als überaus nützlich beim Nachweis von Wechselwirkungen zwischen elektronischen und Schwingungsfreiheitsgraden erwiesen. Mechanismen der Energieumverteilung sowohl elektronisch als auch schwingungsangeregter Zustände sowie der Einfluss von elektronischer Anregung auf die Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel konnten untersucht werden. Hauptanwendungsgebiet



**Abbildung 3.** Transiente IR- und 2D-IR-Spektren eines kleinen cyclischen Peptids (cyclo(Boc-CPUC-OMe)) nach UV-Bestrahlung. Transiente IR- (UV-Anregungs-IR-Abtast) und 2D-IR- (UV-IR-IR) Spektren zu ausgewählten UV-Zeiten sind in Feld (a) bzw. (b) dargestellt. Durch die Schwächung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke, was den Konformationsspielraum des  $\beta$ -Turns erweitert, wird ein transientes Kreuzsignal (mit TC gekennzeichnet) der Carbonylgruppen der anfangs wasserstoffverbundenen Peptideinheiten sichtbar. Die in Feld (c) gezeigten Spektren sind Schnitte durch T2D-IR-Spektren entlang der gestrichelten Linien in Feld (b). Wiedergabe aus Lit. [63].

dieses Experiments waren bisher Metallkomplexe, in welchen Ladungstransfer nach elektronischer Anregung auftritt.

Mit T2D-IR-Spektroskopie konnte man zeigen, dass zwischen dem SET im elektronischen Grundzustand und im angeregten Zustand ein erheblicher Unterschied bestehen kann. Weinstein und Mitarbeiter zeigten für  $[\text{Re}(\text{Cl})(\text{CO})_3(4,4'\text{-Diethylester-2,2'-bipyridin})]$ , dass der SET zwischen Liganden um den Faktor 8 im elektronisch angeregten Zustand beschleunigt wird.<sup>[68]</sup> Während im Grundzustand die Rate des SET vom Lösungsmittel abhängig ist, zeigt sie im Ladungstransferzustand eine solche Abhängigkeit nicht mehr. Es wurde vorgeschlagen, dass ein effizienter, intramolekularer Kopplungsmechanismus für dieses Phänomen verantwortlich ist, der nach elektronischer Anregung aktiv wird. Dies wurde Veränderungen in der Elektrostatik zugeschrieben, wobei man vermutet, dass es sich um ein generelles Verhalten von Übergangsmetallkomplexen handelt, was direkte Implikationen für deren Anwendung hätte, beispielsweise in der Photovoltaik. Eine vergleichbare Beschleunigung wurde außerdem für  $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{Bipyridin})\text{Cl}]$  beobachtet.<sup>[69]</sup> Darüber hinaus wurde auch der Einfluss von Photodissoziation auf die Schwingungsrelaxation untersucht.<sup>[70]</sup> Ein ähnliches Experiment wurde genutzt, um die Schwingungsdynamik nach Elektronenrücktransfer in einem Cyano-verbrückten gemischtvalenten Übergangsmetallkomplex  $[(\text{NC})_5\text{Fe}^{\text{II}}-\text{C}\equiv\text{N}-\text{Pt}^{\text{IV}}(\text{NH}_3)_4-\text{N}\equiv\text{C}-\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5]^{4-}$  nach Anregung im sichtbaren Bereich zu zeigen.<sup>[71,72]</sup> Im Zuge dieses

Prozesses werden weitaus höhere Schwingungszustände (bis  $\nu=8$ ) der betrachteten Moden besetzt. Mehrdimensionale Spektroskopie zeigte dabei den Energiefluss zwischen einzelnen Moden während das System nach dem Elektronentransfer in seinen Gleichgewichtszustand zurückkehrte.

Elektronische Anregung kann zu einer beträchtlichen Ladungsumverteilung führen, daher spielen Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel häufig eine entscheidende Rolle. Diese Solvationsprozesse lassen sich detailliert über die Zeitabhängigkeit der 2D-Bandenformen beobachten, welche die Dynamik des Lösungsmittel in der Umgebung der gemessenen Schwingung liefert („spektrale Diffusion“). Kubarych und Mitarbeiter wendeten dies auf einen Photokatalysator im elektronischen Grundzustand und im angeregten Zustand an.<sup>[69]</sup> Dabei wurde eine Verlangsamung der spektralen Diffusion nach elektronischer Anregung um den Faktor 3 beobachtet, was der veränderten Elektrostatik zugeschrieben wurde. Eine weit verbreitete Methode zur Untersuchung der Dynamik von Lösungsmitteln basiert auf der Beobachtung der dynamischen Fluoreszenz-Stokes-Verschiebung. Während bei Messungen der Stokes-Verschiebung die Dynamik im Grundzustand und im angeregten Zustand vermischt wird, da die Übergangsenergie abgetastet wird, kann bei T2D-IR-Spektroskopie jeder dieser Zustände einzeln betrachtet werden.<sup>[69]</sup> Zudem lässt sich lokale Information gewinnen, da sich betrachtete Oszillatoren an verschiedenen Punkten des Moleküls befinden können. Außerdem

können auch Prozesse untersucht werden, bei denen keine Fluoreszenz auftritt.

### 3.1.3. Spektroskopisches Auftrennen photochemischer Reaktionsgemische

Die wohl offensichtlichste Anwendung der T2D-IR-Spektroskopie ist die Untersuchung von Photoreaktionen, die durch den UV/Vis-Puls initiiert werden. Chemisch unterschiedliche transiente Spezies, wie z.B. Isomere, können durch diese Methode erkannt werden.

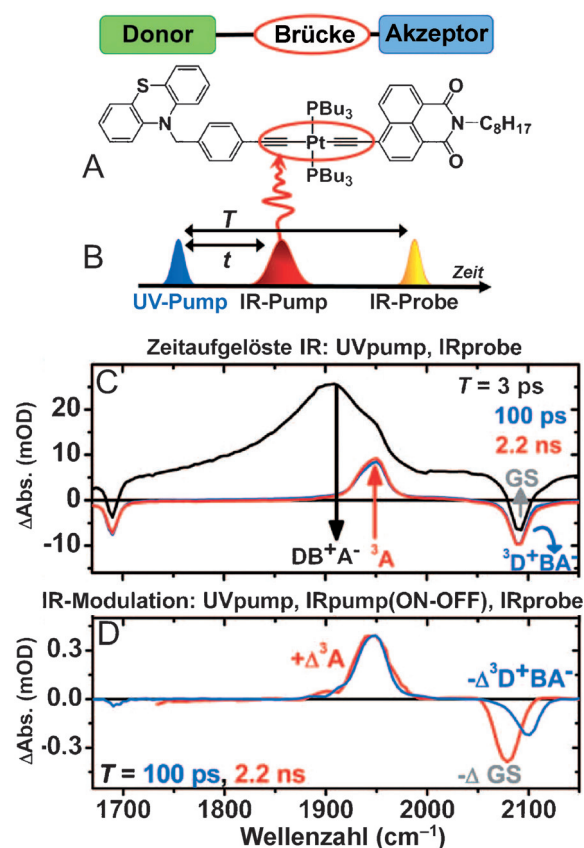
Die UV-induzierte Photoreaktion von  $[(\mu\text{-Propandithiolat})\text{Fe}_2(\text{CO})_6]$ , einer Modellverbindung für  $[\text{FeFe}]$ Hydrogenase-Enzyme, wurde mit T2D-IR untersucht.<sup>[73]</sup> Kreuzsignale zwischen allen Produktbanden belegten die Zugehörigkeit aller Banden zur selben Spezies – ein klarer Beweis, dass nur ein Photoprodukt entstanden ist. Zusätzlich nutzte man die Polarisationsabhängigkeit der T2D-IR-Messungen, um die Übergangsdipolwinkel der Schwingungsmoden des Produkts zu bestimmen. Ein Vergleich zwischen experimentell ermittelten und berechneten Winkeln ergab, dass ein axiales CO durch das Lösungsmittel ersetzt wurde. Die hier beschriebene Strukturbestimmung von Intermediaten oder Produkten bietet erhebliches Potential, ein Anwendungsschwerpunkt der T2D-IR-Spektroskopie zu werden.

T2D-IR fand auch Verwendung, um die paarweise Rekombination eines Metallocarbonyl-Dimers zu untersuchen. Dabei konnte gezeigt werden, dass von zwei möglichen Isomeren des paarigen Komplexes nur eines der Vorläufer für den sich neu bildenden Grundzustand sein kann.<sup>[74]</sup> In diesem Experiment erzeugte man monomere Radikale durch Photoanregung ( $\lambda_{\text{an}} = 400 \text{ nm}$ ) eines Molybdän-Cyclopentadienyl-Carbonyl-Dimers  $[\{\text{CpMo}(\text{CO})_3\}_2]$ , indem die Mo-Mo-Bindung gebrochen wurde. Das Dimer kann in *trans*- und *gauche*-Konformation vorliegen. Die Zentralfrequenz der C=O-Schwingung ist konformationsabhängig (das lineare Absorptionsspektrum zeigt Banden bei  $1912 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1958 \text{ cm}^{-1}$  und  $2013 \text{ cm}^{-1}$ ). Die Bande mit der höchsten Wellenzahl wird ausschließlich der *gauche*-Konformation zugeordnet. Nichtsdestotrotz lassen sich im 2D-IR-Spektrum Kreuzsignale zwischen allen drei Banden erkennen, was die Beteiligung von *gauche*- und *trans*-Konformere an den Banden bei niedriger Wellenzahl offenbart. Beide Konformere können in einer Photoreaktion dissoziiert werden. Das T2D-IR-Spektrum, aufgenommen nach 5 ps (nicht gezeigt), zeigt die Bildung von Radikalen. Die Beobachtung, dass nur die Bande bei  $1958 \text{ cm}^{-1}$  und nicht die Bande bei  $2013 \text{ cm}^{-1}$  wieder zurückkehrt, zeigt, dass die *gauche*-Form nicht an der Rekombination aus Radikal-Monomeren beteiligt ist, sondern nur die *trans*-Form gebildet wird. In Verbindung mit quantenchemischen Rechnungen konnte man feststellen, dass bereits bei großem Abstand der Mo-Bindung eine Vorauswahl zugunsten dieses Isomers getroffen wird.

Eine weitere geeignete Methode, um Reaktionsnetzwerke koexistierender Spezies zu entschlüsseln, sind getriggerte Austauschexperimente, welche wir in Abschnitt 3.2 vorstellen werden.

### 3.1.4. Steuern von Reaktionen

Nicht immer können die während eines T2D-IR Experiments angeregten Schwingungen nur als reine Zuschauer betrachtet werden. Dies ist der Fall, wenn ihre Anregung das Ergebnis der durch die UV/Vis-Bestrahlung ausgelösten Reaktion beeinflusst, sprich wenn die Schwingung Teil der Reaktionskoordinate ist. Weinstein, Towrie und Mitarbeiter nutzten die T2D-IR-Pulssequenz auf elegante Art, um dieses Phänomen zu zeigen.<sup>[75]</sup> In ihrem Experiment konnten sie Elektronentransfer (ET) regulieren, indem sie innerhalb eines Donor-Brücke-Akzeptor-Systems (DBA) mithilfe eines durchstimmbaren, schmalbandigen IR-Anregungspulses eine klar der Brücke zuzuordnende Schwingung nach Anregung mit UV-Strahlung anregten (Abbildung 4). Eine Anregungs-



**Abbildung 4.** Die Kontrolle der ET-Pfade durch IR-Anregung bei  $1908 \text{ cm}^{-1}$  mittels der T2D-IR-Sequenz. Das obere Feld zeigt die zeit aufgelösten IR-Spektren zu repräsentativen Wartezeiten. Das untere Feld zeigt die Differenzspektren  $\text{Abs}(\text{IR}_{\text{pump}}\text{ON}) - \text{Abs}(\text{IR}_{\text{pump}}\text{OFF})$  bei  $T = 100 \text{ ps}$  und  $2.2 \text{ ns}$  nach UV-Anregung ( $\text{UV}_{\text{pump}} - \text{IR}_{\text{probe}}$ -Verzögerungszeit  $t$  fixiert bei  $2 \text{ ps}$ ), welche die Unterdrückung des  $^3\text{D}^+\text{BA}^-$ -Pfades und eine Verstärkung des  $^3\text{A}$ -Pfades bei IR-Anregung verdeutlichen. Wiedergabe aus Lit. [75] mit Genehmigung der AAAS.

wellenlänge von  $400 \text{ nm}$  führte zur Bildung eines Ladungstransferzustands ( $\text{DB}^+\text{A}^-$ ), welcher in einen  $\pi\text{-}\pi^*$ -Intraligand-Triplettzustand ( $^3\text{A}$ ) am Naphthalen-Imid-Liganden, einen ladunggetrennten Zustand ( $^3\text{D}^+\text{BA}^-$ ) oder in den Grundzustand (GS) zerfallen kann. Die Anregung der C≡C-Brückenschwingung begünstigt die Bildung des  $^3\text{A}$ -Zustands



auf Kosten des ladungstrennten Zustands  ${}^3\text{D}^+\text{BA}^-$ . Dies ist sehr schön im Doppeldifferenzspektrum des Signals mit und ohne  $\text{IR}_{\text{pump}}$ -Anregung (Abbildung 4D, blaues Spektrum) erkennbar. Hier führt der IR-Anregungspuls zur Abnahme des  ${}^3\text{D}^+\text{BA}^-$ -Signals, während das  ${}^3\text{A}$ -Signal deutlich verstärkt wird. Wartet man länger (4D, rotes Spektrum) führt die IR-Anregung zu einer Zunahme von  ${}^3\text{A}$  auf Kosten der Rückkehr in den GS. Verschiebt man die IR-Anregung hingegen hin zur  $\nu(\text{C}=\text{O})$ -Schwingung, lokalisiert im Akzeptor im selben angeregten  $\text{DB}^+\text{A}^-$ -Zustand (oder hin zu einer IR-Absorptionsbande des Lösungsmittels), zeigt sich kein messbarer Effekt. Verschiebt man die Wellenzahl des IR-Anregungspulses entlang der transienten IR-Bande der  $\text{C}\equiv\text{C}$ -Schwingung im  $\text{DB}^+\text{A}^-$ -Zustand (Abbildung 4C, Bande lokalisiert bei  $1900\text{ cm}^{-1}$ ), wird erkennbar, dass die Größe des beschriebenen Effekts der Bandenform des angeregten Zustands folgt. Die quantitative Analyse zeigt, dass der Reaktionspfad entlang des  ${}^3\text{D}^+\text{BA}^-$ -Zustands durch Schwingungsanregung sogar komplett blockiert werden kann. Für ein anderes System wurde außerdem die Beschleunigung des Ladungstransfers nach Schwingungsanregung einer einzelnen Mode des Donorliganden berichtet.<sup>[76]</sup>

### 3.1.5. Ausblick

Für die Untersuchung von Nichtgleichgewichtsdynamik durch 2D-IR-Spektroskopie sind weitere Anregungsmöglichkeiten denkbar, wie der schnelle Drucksprung (um beispielsweise die Dynamik von Proteinen zu induzieren),<sup>[77,78]</sup> der pH-Sprung (eine schnelle pH-Veränderung kann durch eine Photosäure ausgelöst werden),<sup>[79,80]</sup> Stopped-Flow-Techniken (genutzt um Proteinfaltung mit ms-Zeitauflösung zu untersuchen),<sup>[81]</sup> das Ändern des Redoxpotentials oder externe elektrische sowie magnetische Felder. Die Anwendung synchronisierter Femtosekundenlaser für die Erzeugung verschiedenster Pulse wird es in Zukunft erlauben, einen weiten Bereich an Zeitskalen für 2D-IR im Nichtgleichgewicht abzudecken.<sup>[82]</sup>

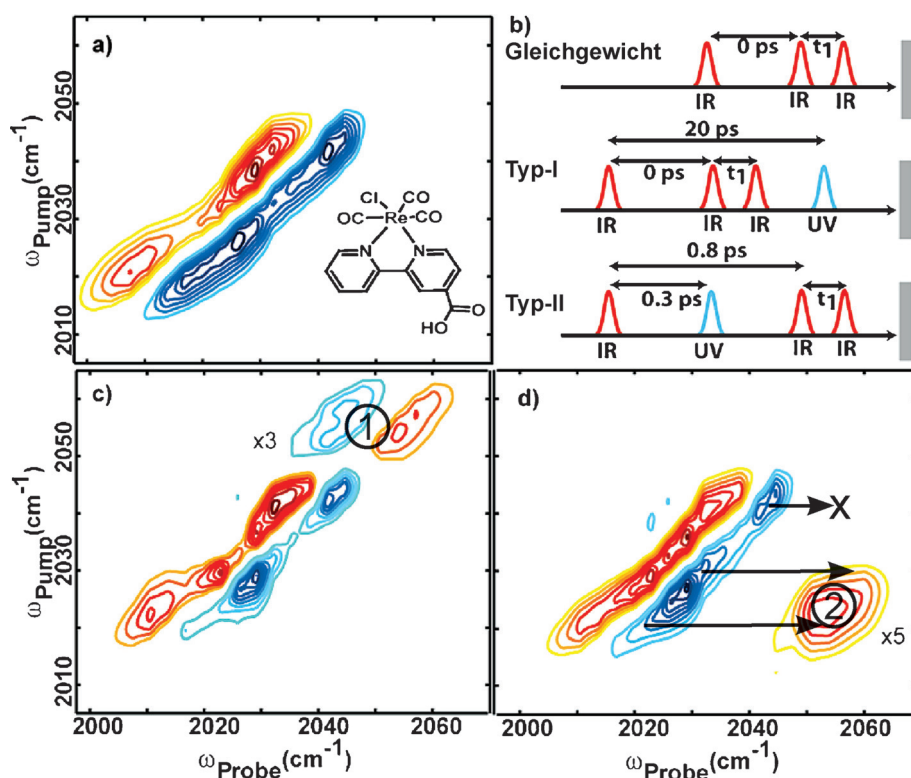
Mit der Möglichkeit, sehr detaillierte Informationen über die Struktur und Dynamik von Intermediaten und Produkten von Photoreaktionen zu liefern, empfiehlt sich die T2D-IR-Spektroskopie für die Untersuchung von Reaktionsmechanismen. Die Beispiele dieses Abschnitts zeigen, dass die Analyse von transienten Strukturen mittels T2D-IR bisher nur auf sehr grundlegendem Niveau betrieben wurde. Hingegen konnte man mit 2D-IR-Spektroskopie in Gleichgewichtssystemen bereits detaillierte Strukturanalysen durchführen.<sup>[31–34,83]</sup> T2D-IR-Spektroskopie kann solch detaillierte Information auch für transiente Spezies liefern, bei denen die hohe Zeitauflösung von Femtosekundenspektroskopie ihren vollen Nutzen entfalten kann.

Das Konzept, Schwingungen direkt anzuregen, um Reaktionen zu steuern, eröffnet neue Wege zur Beobachtung der Wechselwirkung von elektronischen und Kernfreiheitsgraden. Während gegenwärtige Studien schmalbandige IR-Pulse nutzen, wäre der Einsatz von Pulsformern im mittleren IR<sup>[84]</sup> zur Erzeugung von Wellenpaketen eine spannende Erweiterung, die ein größeres Maß an Kontrolle ermöglichen würde.

### 3.2. Nichtgleichgewichts- oder getriggerte Austauschspektroskopie

Eine faszinierende Pulssequenz ist die getriggerte 2D-IR-EXSY-Sequenz (Abbildung 2D),<sup>[85]</sup> bei welcher relativ zur T2D-IR-Sequenz die Reihenfolge von UV/Vis- und IR-Puls vertauscht wird, womit der IR-Puls die Probe zuerst erreicht. Auf diese Weise kann der Einfluss des IR-Pulses auf das Schwingungsspektrum sowohl im elektronischen Grundzustand als auch im angeregten Zustand verfolgt werden. Diese Pulssequenz korreliert Schwingungen von Reaktant und Produkt (oder Intermediat), indem spezifische Schwingungsbanden mit einer schmalbandigen IR-Anregung markiert werden. Anschließend wird ein UV/Vis-Puls nach der Zeit  $t_1$  für die elektronische Anregung eingestrahlt und abschließend das Spektrum mit einem IR-Abfragepuls aufgenommen.<sup>[85,86]</sup> Bei diesem Vorgehen werden Kreuzsignale zwischen verwandten Schwingungsmoden von Reaktant und Produkt erzeugt. Diese Methode ist auch als getriggerte Austauschspektroskopie bekannt.<sup>[87]</sup> Im klassischen 2D-IR-EXSY-Experiment, bei welchem die Pulssequenzen aus Abbildung 2A,B verwendet werden, wird das System während der Populationszeit  $t_1$  zwischen Anrege- und Abfrage-IR-Puls durch thermische Bewegung vom einen Zustand in den anderen getrieben. Bei getriggerten Austauschexperimenten treibt der UV/Vis-Puls, welcher während der Wartezeit angewendet wird, das System vom einen Zustand in den anderen. Ähnliche Experimente, bei denen Kreuzsignale zwischen den Spinübergängen von Reaktant und Produkt erzeugt werden, wurden auch in der NMR-Spektroskopie verwirklicht.<sup>[88,89]</sup> Die instruktive Anwendungen der getriggerten 2D-IR EXSY, die im Folgenden diskutiert werden sollen, befassen sich mit der Untersuchung von Ladungsinjektion durch ein inhomogenes Ensemble von Farbstoffmolekülen auf einem nanokristallinen Film<sup>[90]</sup> sowie der lichtinduzierten Ligandenwanderung in koexistierenden Proteinkonformeren.<sup>[86]</sup>

Im ersten Beispiel erfolgt eine optische Anregung eines Re-Farbstoffs durch einen Vis-Puls ( $\lambda_{\text{an}} = 400\text{ nm}$ ), welcher einen Ladungstransfer in einen nanokristallinen  $\text{TiO}_2$ -Film induziert (Abbildung 5a). Die Anregung des Farbstoffs und die Ladungsinjektion können mittels T2D-IR verfolgt werden. Untersuchungen des elektronischen Grundzustands durch 2D-IR zeigen drei Diagonalsignale in der Region der  $a'(1)$ -symmetrischen CO-Streckschwingung in Abbildung 5a (bei  $2020\text{ cm}^{-1}$ ,  $2030\text{ cm}^{-1}$  und  $2042\text{ cm}^{-1}$ ). Die Abwesenheit von Kreuzsignalen belegt, dass die Signale von drei verschiedenen strukturellen Anordnungen der Farbstoffmoleküle auf der Oberfläche herrühren. Darüber hinaus ist hiermit gezeigt, dass diese Heterogenität nicht die Folge einer Aggregation der Farbstoffmoleküle ist, da die Moleküle in Aggregaten, in welchen sie nah beieinander lägen, koppeln und Kreuzsignale erzeugen sollten. Bei Vis-Anregung (Typ-I-Sequenz in Abbildung 5b, entsprechend T2D-IR in Abbildung 2C, jedoch unter Verwendung eines Pulspaares für die IR-Anregung anstelle eines Schmalbandpulses) wird ein Elektronentransfer initiiert. Alle drei Diagonalsignale aus dem Grundzustand reagieren auf Anregung, aber nur ein Signal des angeregten Zustandes zeigt sich bei  $2060\text{ cm}^{-1}$



**Abbildung 5.** Ladungsinjektion bei einem mit einem Re-Farbstoffmolekülen beladenen TiO<sub>2</sub>-Film. a) 2D-IR-Spektrum des Systems im Gleichgewicht. b) Pulsschemata, mit denen die Spektren (a), (c) und (d) erzeugt wurden. Die Pulse sind hier, im Gegensatz zu Abbildung 2, bei der die Darstellung entlang der Zeitachse verläuft, so angeordnet, wie sie auf die Probe gelangen. Zudem wird hier ein Pulspar zur Anregung verwendet, während bei den Experimenten aus Abbildung 2 ein schmalbandiger IR-Puls eingesetzt wird. Wiedergabe aus Lit. [90]. Copyright 2009 American Chemical Society.

(Abbildung 5c ①). Nach Änderung der relativen Verzögerungen gemäß Pulssequenz Typ-II (Abbildung 5b, entsprechend dem getriggerten 2D-IR EXSY in Abbildung 2D) erhält man ein breites Kreuzsignal (Abbildung 5d ②), welches die beiden Banden aus dem Grundzustand bei 2020 cm<sup>-1</sup> und 2030 cm<sup>-1</sup> mit der Bande aus dem angeregten Zustand bei 2060 cm<sup>-1</sup> (Pfeile) korreliert. Das entsprechende Kreuzsignal für die Bande bei 2042 cm<sup>-1</sup> fehlt (Pfeil und Kreuz). Auf diese Weise offenbart das getriggerte 2D-IR EXSY Experiment, dass der elektronisch angeregte Zustand nur ausgehend von zwei der drei Konfigurationen der Farbstoffmoleküle erreicht werden kann. Da für alle drei Konformationen langlebige Grundzustandsbleichsignale erzeugt werden, schlossen die Autoren, dass die beiden Konformationen, die für die Signale bei 2020 cm<sup>-1</sup> und 2030 cm<sup>-1</sup> verantwortlich sind, einer langsamen Ladungsinjektion unterliegen, deren elektronisch angeregte Zustände mittels 2D-IR (und transiente IR) beobachtbar sind, die Konformation bei 2042 cm<sup>-1</sup> hingegen einer sehr raschen Ladungsinjektion unterliegt, sodass die auf dem Farbstoffmolekül lokalisierte Anregung nicht beobachtet werden konnte.

Im zweiten Beispiel wird die Migration eines CO-Liganden durch Proteintaschen in Myoglobin nach Lösen von seiner Bindungsstelle durch einen optischen Puls untersucht.<sup>[86]</sup> Dabei wird über die Frequenz der Streckschwingung des Liganden Information über dessen lokale Umgebung

gewonnen und gleichzeitig die Existenz vieler CO-Banden sichtbar. Die verschiedenen Banden des CO an der Bindungsstelle wurden auf verschiedene Proteinkonformationen zurückgeführt (in der Literatur: Zustand A<sub>3</sub> und A<sub>1</sub>). Nach lichtinduziertem Lösen des CO von seiner Bindungsstelle werden sogenannte B-Zustände bevölkert, bei welchen das CO in den Proteintaschen sitzt. Durch Anwendung von getriggerten 2D-IR EXSY konnten durch Kreuzsignale die Banden der Bindungsstelle und die der Proteintaschen korreliert werden, womit sich entschlüsseln ließ, welche der beobachteten Signale der Proteintaschen zu welcher Proteinstruktur gehören. Vor der Entwicklung der getriggerten 2D-IR EXSY wurde mit spektroskopischen Versuchen an gleichgewichtsverschiebenden Proteinmutanten versucht, solche Informationen zu gewinnen, was jedoch nicht zu eindeutigen Ergebnissen führte. Getriggerte 2D-IR EXSY stellt für dieses Problem eine spektroskopische Lösung dar und ermöglicht die Feststellung von Verbindungen zwischen den Zuständen (CO-gebundene Unterzustände und nicht-CO-gebundenen Unterzustände), wobei mehrere Konformationen möglich sind.

#### Ausblick

Die obigen Beispiele zeigen, dass durch getriggerte 2D-IR EXSY die Photochemie oder Photophysik von verschiedenen koexistierenden Spezies, wie etwa Proteinkonformeren oder Molekülpopulationen, die auf verschiedenen Arten auf einer Oberfläche sitzen, selektiv untersucht werden kann. Diese Anwendung der getriggerten Austauschspektroskopie wurde auch schon auf die 2D-Vis-Spektroskopie übertragen.<sup>[91]</sup> Eine weitere Option der getriggerten 2D-IR EXSY mit hohem Anwendungspotenzial ist die Zuordnung der Schwingungsbanden von elektronisch angeregten Zuständen, von Intermediaten oder Produkten, indem ausgehend vom bekannten Spektrum des Reaktanten Kreuzsignale zwischen Schwingungen des Reaktanten und der transienten Spezies erzeugt werden.<sup>[85]</sup> Zum Entschlüsseln von Spektren photochemischer Reaktionsmischungen ist dies eine sehr wertvolle Möglichkeit.

Eine wichtige Einschränkung der getriggerten 2D-IR EXSY ist, dass die Kreuzsignale nur innerhalb der Lebensdauer der durch den IR-Puls generierten, angeregten Schwingungszustände beobachtet werden können. Dies ist eine schwerwiegende Einschränkung, da es die Anwendbar-

keit der getriggerten 2D-IR EXSY auf Prozesse limitiert, die auf der gleichen oder einer kürzeren Zeitskala ablaufen als die Lebensdauer der Schwingungen. Typische Lebensdauern liegen unterhalb von 5 ps, bedeutend länger sind sie nur in Ausnahmefällen (z. B. im zweistelligen ps-Bereich für CO in Metallcarbonylen oder hunderte ps für CO bei der Migration durch ein Protein). Die Einschränkung durch die Schwingungslebensdauer kann mit der VIPER-2D-IR Pulssequenz überwunden werden, die im folgenden Abschnitt 3.3 diskutiert wird.

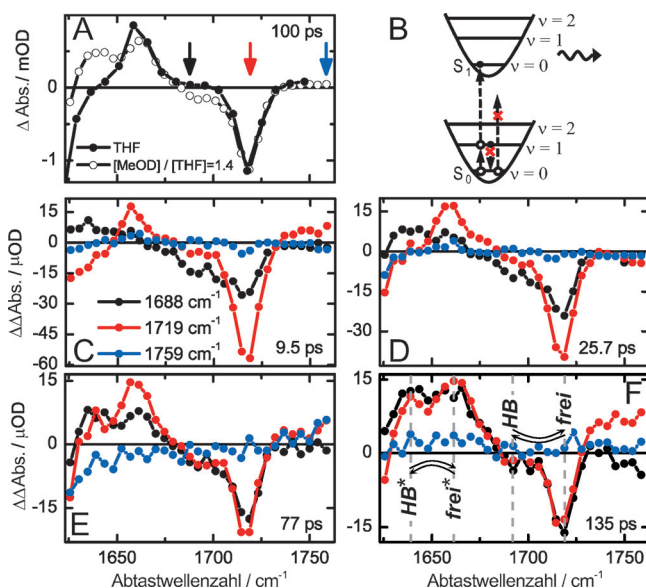
### 3.3. VIPER-2D-IR-Spektroskopie

Die VIPER-2D-IR-Sequenz (siehe Abbildung 2 E)<sup>[59]</sup> besteht aus einer IR-Anregung in Resonanz mit einer Schwingungsmode, gefolgt von einem nicht-resonanten UV/Vis-Puls nach der Zeit  $t_1$ , mit dem nur ein Unterensemble in den elektronisch angeregten Zustand befördert wird: Der UV/Vis-Puls wird so eingestellt, dass er nur mit den schwingungsangeregten Spezies resonant ist. Somit ist zum Erreichen des elektronisch angeregten Zustandes sowohl eine IR- als auch eine anschließende UV/Vis-Anregung des Moleküls nötig. Abbildung 6 B illustriert diese doppeltresonante Anregung. VIPER-2D-IR unterscheidet sich daher wesentlich von der getriggerten 2D-IR EXSY (Abbildung 2 D), bei

welcher ein resonanter UV/Vis-Puls verwendet wird. Das sich entwickelnde System wird nach der Zeit  $t_2$  mit einem IR-Abfragepuls untersucht. Das auf diese Weise erzeugte VIPER-2D-IR-Signal klingt mit der Lebensdauer des elektronisch angeregten Zustands ab, welche in vielen Fällen wesentlich länger ist als die Lebensdauer von Schwingungszuständen. Falls eine bleibende Veränderung des Moleküls durch den UV/Vis-Puls verursacht wird, etwa durch Photochemie (geschwungener Pfeil in Abbildung 6 B), ist die Lebensdauer des Signals sogar „unendlich“. Eine Voraussetzung für die Anwendbarkeit der VIPER-2D-IR-Pulsfolge ist, dass sich das UV/Vis-Spektrum bei Schwingungsanregung ändert. Als Konsequenz wird mit der VIPER-2D-IR-Pulsfolge die Information, dass ein Molekül in einem schwingungsangeregten Zustand war, in einem elektronischen Freiheitsgrad gespeichert. Manche Moleküle der Probe werden ohne IR-Anregung direkt vom UV/Vis-Puls angeregt, jedoch kann dieses Hintergrundsignal unter Verwendung eines Lichtzerhackers abgezogen werden.<sup>[59]</sup>

#### 3.3.1. Austausch jenseits der Schwingungslebensdauer $T_1$

Das herkömmliche 2D-IR EXSY-Experiment untersucht den Austausch zwischen unterschiedlichen molekularen Spezies aufgrund der Brownschen Molekularbewegung, wie beispielsweise die Umwandlung zwischen Konformeren.<sup>[42]</sup> Die getriggerte Austauschpektroskopie, wie sie in Abschnitt 3.2 diskutiert wurde, kann Schwingungen vor und nach der durch elektronische Anregung getriggerten Umwandlung korrelieren. Beide Verfahren zur Beobachtung des Umwandlungsprozesses beruhen auf der Markierung einer Schwingung durch IR-Anregung und anschließender Verfolgung der Wellenzahl der angeregten Schwingung. Daher wird das Beobachtungsfenster durch die Schwingungslebensdauer begrenzt. Diese wesentliche Einschränkung kann durch VIPER-2D-IR-Spektroskopie umgangen werden. Wie oben beschrieben, klingt das VIPER-Signal nicht mit der Schwingungslebensdauer, sondern mit der Lebensdauer des elektronisch angeregten Zustandes ab (oder überhaupt nicht, falls das System durch den UV/Vis-Puls permanent verändert wird).<sup>[59]</sup> VIPER-2D-IR-Spektroskopie wurde demonstriert anhand der Messung des chemischen Austausches zwischen wasserstoffverbrücktem und freiem Cumarin 6 unter Bedingungen, bei denen der Austausch auf einer wesentlich längeren Zeitskala stattfindet als die Relaxation des angeregten Schwingungszustandes.<sup>[59]</sup> Transiente IR-Spektren der Carbonylschwingung des Cumarin-6-Laserfarbstoffs haben gezeigt, dass bei Zugabe von Methanol eine zweite Spezies gebildet wird, welche sowohl im elektronischen Grundzustand als auch im elektronisch angeregten Zustand bei kleineren Schwingungsfrequenzen absorbiert (ersichtlich durch die negativen bzw. positiven Banden in Abbildung 6 A).<sup>[59]</sup> Bei den neuen Spezies bildet die Carbonylgruppe Wasserstoffbrücken mit dem Alkohol (siehe Abbildung 6 F für die Markierung der Banden). Unter Verwendung von schmalbandigen IR-Anregespulsen kann eine der Spezies (wasserstoffverbrückt oder frei) selektiv in den elektronisch angeregten Zustand befördert werden.



**Abbildung 6.** Chemischer Austausch von Spezies jenseits der Schwingungslebensdauer. A) Transientes IR-Spektrum von Cumarin 6 in THF in der Carbonylregion, mit und ohne deuteriertes Methanol. B) Energieniveauschema zur Veranschaulichung der doppelt resonanten VIPER-Anregung. Der nicht-resonante Vis-Puls (gestrichelte Linie) kommt kurz nach dem resonanten IR-Puls zur Anregung in  $S_1$ . Die Schwingungsrelaxation zurück in den Grundzustand wird somit verhindert (durchgestrichener, nach unten weisender Pfeil). Ohne vorangegangene resonante IR-Anregung kann  $S_1$  nicht durch den Vis-Puls allein erreicht werden (durchgestrichener, nach oben weisender Pfeil). C–F) Schnitte durch die transienten VIPER-2D-IR-Spektren einer Mischung (mit MeOH), aufgezeichnet bei verschiedenen IR-Anregerefrequenzen (farbige Pfeile in A)). Wiedergabe aus Lit. [59]. Copyright 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.



Abbildung 6C–F zeigt Schnitte durch das VIPER-2D-IR-Spektrum als Funktion der Zeit. Für das rote (schwarze) Spektrum wurde der IR-Anregepuls auf die Frequenz der freien (wasserstoffverbrückten) Spezies eingestellt. Der Austausch zwischen freier und wasserstoffverbrückter Spezies tritt, wie die Pfeile in Abbildung 6F zeigen, sowohl im elektronischen Grundzustand als auch im elektronisch angeregten Zustand auf. Der Austausch ist vollständig, wenn schwarzes und rotes Spektrum die gleiche Form haben (wie in Abbildung 6F). Dies ist nach etwa 135 ps der Fall. Es sei hier betont, dass die Lebensdauer der Carbonylschwingung nur 1.2 ps beträgt, weshalb gewöhnliche 2D-IR EXSY für dieses System nicht angewendet werden kann.

### 3.3.2. Ausblick

Der Vergleich des roten VIPER-2D-IR-Spektrums in Abbildung 6C, bei welchem eine Mischung von wasserstoffverbrückten und freien Molekülen untersucht wurde, mit dem schwarzen, zeitaufgelösten IR-Spektrum in Abbildung 6A, bei welchem sich nur freie Moleküle in der Lösung befanden, zeigt, dass es mit VIPER möglich ist, aus einer Mischung eine bestimmte Spezies auszuwählen (in diesem Fall die nicht wasserstoffverbrückte), diese selektiv optisch anzuregen und transiente Absorptionsspektren aufzunehmen. Im Vis-Spektrum überlappen die Absorptionen der verschiedenen Molekülpopulationen (z. B. wasserstoffverbrückt versus frei) oft stark, wodurch die selektive Vid-Anregung schwer oder sogar unmöglich wird. Die VIPER-Sequenz umgeht dieses Problem durch die vorgeschaltete IR-Anregung einer Spezies in der Mischung. Die ausgewählte (d. h. schwingungsangeregte) Population interagiert mit dem nicht-resonanten sichtbaren Puls, welcher die schwingungsangeregten Moleküle in den elektronisch angeregten Zustand befördert. Auf diese Weise ist es möglich, nicht nur Austausch zu untersuchen, sondern auch die Photochemie oder Photophysik koexistierender Moleküle – auch wenn deren UV/Vis-Spektren sehr ähnlich sind (was sehr oft beispielsweise bei Konformeren oder bei Molekülen in leicht unterschiedlichen Umgebungen der Fall ist) und sogar auch dann, wenn sich die koexistierenden Moleküle in einem schnellen dynamischen Gleichgewicht befinden. Getriggerte Austauschspektroskopie macht ähnliche Informationen zugänglich, allerdings nur im kleinen Zeitfenster der Schwingungslebensdauer. Im Gegensatz hierzu erlaubt das VIPER-Experiment die Verfolgung des gesamten, durch Licht getriggerten Prozesses für das durch den IR-Puls ausgewählte Subensemble. Dies könnte nicht nur für die zeitaufgelöste Spektroskopie, sondern auch für die Durchführung selektiver Photoreaktionen interessant sein.

### 3.4. Mehrdimensionale IR-Raman-Spektroskopien

Alle bisher diskutierten Pulssequenzen tasten IR-Übergänge ab. Wird stattdessen nach IR-Anregung ein Raman-Übergang abgetastet (Abbildung 2F,G), können Korrelationen zwischen IR- und Raman-aktiven Moden untersucht werden. Dies kann durch resonante Anregung von Schwingungsmoden durch einen oder mehrere Pulse und anschlie-

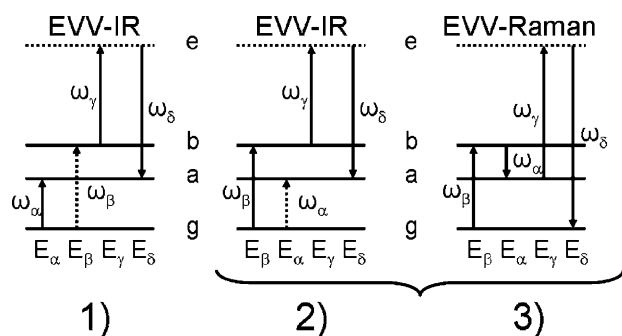
ßender Aufzeichnung der Raman-Streuung eines sichtbaren Abtastpulses erreicht werden.

#### 3.4.1. 3D-IR-Raman-Spektroskopie der Schwingungsdynamik

Die unter dem Namen 3D-IR-Raman-Spektroskopie bekannte Technik (siehe Abbildung 2F)<sup>[92–94]</sup> ist im Kontext dieses Aufsatzes eine 2D-Technik, da das Spektrum von zwei Schwingungsfrequenzen abhängt, die dritte Dimension ist die Zeit. Das 3D-IR-Raman-Experiment ist eine Spektroskopie 3. Ordnung, bei der ein IR-Anregepuls verwendet wird und anschließend mit einer inkohärenten Stokes- und/oder Anti-Stokes-Ramanabfrage das Spektrum aufgenommen wird. Historisch war das Fehlen von IR-Detektoren die treibende Kraft zur Entwicklung dieses Experiments. Die Hauptanwendung dieses Experiments, dessen Pulssequenz aus einem IR-Anregepuls und einer Vis-Abfrage besteht, war die Untersuchung der Umverteilung von Schwingungsenergie (USE). Typischerweise wird eine hochfrequente Mode angeregt und die Schwingungsdynamik über die zeitabhängige Messung der Kreuzsignale mit anderen Schwingungsmoden verfolgt. Während dies auch durch konventionelle 2D-IR-Spektroskopie möglich ist,<sup>[26,38]</sup> birgt der 3D-IR-Raman-Ansatz gewisse Stärken. Die Raman-Detektion fragt ein breites Spektrum ab, womit viele der niederenergetischen Moden, die die Schwingungsenergie empfangen, direkt beobachtet werden können. Darüber hinaus kommt das inkohärente Raman-Signal ausschließlich von angeregten Schwingungszuständen ohne Bleach-Beiträge, welche die gewöhnlichen 2D-IR-Spektren komplizieren.<sup>[93]</sup> Ein Nachteil der 3D-IR-Raman-Spektroskopie ist die sehr geringe Sensitivität, weshalb üblicherweise sehr hohe Konzentrationen verwendet oder die Messungen an reinen Flüssigkeiten durchgeführt werden. Die Notwendigkeit von intensiven Pulsen erfordert oft den Einsatz von Flüssigkeitsstrahlen, wobei verschiedene Artefakte in Kauf genommen werden müssen.<sup>[95]</sup> Die durch die Raman-Spektroskopie erhaltenen Übergänge sind zu den durch IR-Spektroskopie beobachtbaren Übergängen komplementär, da die beiden Spektroskopien verschiedenen Auswahlregeln gehorchen. Detaillierte Untersuchungen zur USE entlang von Alkylketten,<sup>[96]</sup> über Mizellen,<sup>[97]</sup> der Schwingungsdynamik in Wasser,<sup>[98]</sup> zwischen DNA-Basenpaaren<sup>[99]</sup> sowie zum Effekt von chemischen Modifikationen auf die Schwingungsdynamik<sup>[100,101]</sup> wurden mithilfe der 3D-IR-Raman-Spektroskopie durchgeführt.

#### 3.4.2. DOVE- oder EVV-2D-IR-Spektroskopie

Die IR-IR-Raman-Sequenz (Abbildung 2G), welche auch DOVE-FWM- (doubly vibrationally enhanced four wave mixing) oder EVV- (electron-vibration-vibration) 2D-IR-Spektroskopie genannt wird,<sup>[27,102–104]</sup> ist ebenfalls eine Spektroskopie 3. Ordnung. Die Pulssequenz besteht aus zwei IR-Pulsen und einem Vis-Puls. Im EVV-Prozess treten zwei IR-Übergänge (angeregt durch die IR-Pulse mit den Frequenzen  $\omega_a$  und  $\omega_b$ ) und ein Raman-Übergang (angeregt durch den Vis-Puls mit  $\omega_v$ ) auf (Abbildung 7). Das Signal wird bei  $\omega_b$  detektiert. Dementsprechend gelten IR- und Raman-

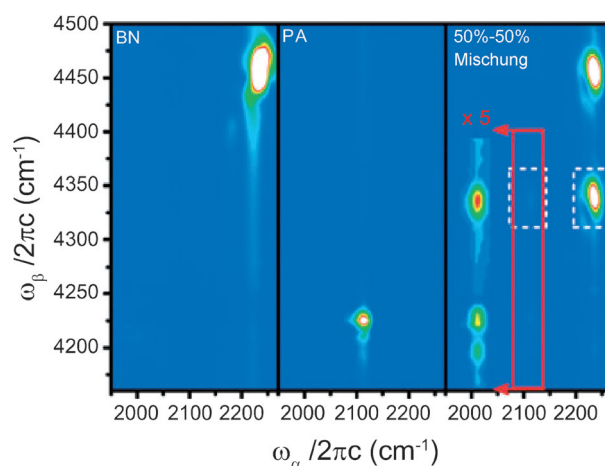


**Abbildung 7.** Energieniveaudiagramme der EVV-2D-IR-Spektroskopie.  $E_\alpha$  und  $E_\beta$  bezeichnen die IR-Anregungen,  $E_\gamma$  die Interaktion mit dem Vis-Puls und  $E_\delta$  ist das detektierte FWM (four-wave-mixing)-Feld. Sind die IR-Felder resonant, wird das FWM-Signal verstärkt. Wiedergabe aus Lit. [102]. Copyright 2009 American Chemical Society.

Auswahlregeln für die verschiedenen Wechselwirkungen.<sup>[27]</sup> Es handelt sich hier um ein kohärentes Experiment ohne Populationszeiten. Kreuzsignale werden erzeugt, wenn die IR-Pulse unabhängig voneinander in Resonanz mit zwei anharmonisch gekoppelten Schwingungen treten. Die Schwingungen können auf dem gleichen oder auf unterschiedlichen Molekülen lokalisiert sein. Die Kopplung kann durch mechanische und/oder elektronische Anharmonizität entstehen. Bei der EVV-2D-IR handelt es sich nicht um eine Differenzspektroskopiemethode, daher hängt die Sichtbarkeit der Kreuzsignale nicht von der Größe der anharmonischen Verschiebung ab, wie es in der konventionellen 2D-IR der Fall ist. Bei dieser können sich die Beiträge des angeregten Zustands und des Grundzustands gegenseitig aufheben, wenn die Anharmonizität zu klein ist. Durch Veränderung der Reihenfolge der IR-Pulse – und damit einem Wechsel zwischen Diagramm 1 und 2 (Abbildung 7) – können die Kreuzsignale der Schwingung entweder bei den Frequenzen der Schwingungsgrundzustände gemessen oder aber durch die Koppelungsenergie aufgetrennt werden,<sup>[105]</sup> was zur Vereinfachung des Spektrums beitragen kann.

#### Detektion intermolekularer Kontakte und Geometrien

Ein besonderer Vorteil des EVV-2D-IR-Ansatzes für die Untersuchung von schwachen intermolekularen Wechselwirkungen im Vergleich zu herkömmlicher 2D-IR-Spektroskopie ist die Empfindlichkeit auf die elektrisch vermittelte Schwingungskopplung durch den Raum. Kreuzsignale zwischen Schwingungen, welche auf verschiedenen Molekülen lokalisiert sind, können beobachtet und für die Geometriebestimmung verwendet werden. Dies wurde für die Komplexbildung zwischen Phenylacetylen (PA) und Benzonitril (BN) nachgewiesen.<sup>[106,107]</sup> Ein direkter Vergleich von Spektren der einzelnen Komponenten mit dem Spektrum der Mischung offenbart Kreuzsignale, die bei den einzelnen Komponenten nicht vorhanden sind (Abbildung 8). Nicht nur die relative Ausrichtung, sondern auch die Abstände können durch die EVV-2D-IR-Spektroskopie gemessen werden. So wurde ein Abstand von 3,60 Å zwischen den Bindungszentren der CC- und CN-Bindung sowie ein Winkel von 31° zwischen den Bindungsvektoren ermittelt.<sup>[107]</sup>



**Abbildung 8.** Experimentelle EVV-2D-IR-Spektren der reinen Flüssigkeiten Benzonitril (BN), Phenylacetylen (PA) und einer 50:50-Mischung dieser beiden Verbindungen. Die rote Box wurde mit dem Faktor 5 multipliziert und zur besseren Übersicht verschoben. Die Kreuzsignale bei 2225/4465  $\text{cm}^{-1}$  liegen zwischen der Fundamentalen der CN-Streckschwingung von BN und seinem ersten Oberton (linkes Feld). Das Kreuzsignal bei 2110/4226  $\text{cm}^{-1}$  liegt zwischen der Fundamentalen der CC-Streckschwingung von PA und seinem ersten Oberton (mittleres Feld). In der Mischung (rechtes Feld) treten zwei neue Kreuzsignale bei 2110/4335 und 2225/4335  $\text{cm}^{-1}$  auf (CC-CN- und CN-CC-Kreuzsignale), die auf die elektrische Anharmonizität zurückzuführen sind, verursacht durch die intermolekulare Wechselwirkung der CC- und der CN-Gruppe. Wiedergabe in Teilen aus Lit. [106] mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

#### Optische Fingerabdrücke von Peptiden und Proteinen

2D-Spektroskopie besitzt eine erhöhte Spezifität im Vergleich zur 1D-Spektroskopie, da wellenzahlabhängige Informationen auf zwei Dimensionen verteilt werden. Die oben beschriebenen Möglichkeiten in der EVV-2D-IR-Spektroskopie, das Spektrum weiter zu entzerren als in der 2D-IR-Spektroskopie, ist auch für die Erstellung von optischen Fingerabdrücken von Peptiden und Proteinen von Vorteil. Beim Fingerprinting wird eine Bibliothek von Referenzspektren (d.h. den Fingerabdrücken) von einzelnen Aminosäuren aufgebaut, um die eindeutige Bestimmung von deren Anwesenheit und Konzentration in einem Gemisch von unbekannter Zusammensetzung zu ermöglichen. In einer Studie wurde eine Bibliothek charakteristischer  $\text{CH}_2$ - und  $\text{CH}_3$ -Banden benutzt und damit die relativen Mengen von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan in Proteinen bestimmt. Zusätzlich zur Identifizierung von Proteinen wurde auch gezeigt, dass eine Quantifizierung von Proteinmengen möglich ist.<sup>[108,109]</sup> Als eine weitere Anwendung wurde die Untersuchung von posttranslationalen Modifikationen auf Basis von charakteristischen Kreuzsignalmustern vorgeschlagen<sup>[102]</sup> und zur Quantifizierung der Tyrosin-Nitrierung in Peptiden genutzt.<sup>[110]</sup>

#### Bildgebung mit chemischem Kontrast

Bildgebung mit chemischem Kontrast ist für viele Bereiche von großem Interesse. Chemischer Kontrast bedeutet hier, dass der Kontrast des Bildes durch das Vorhandensein

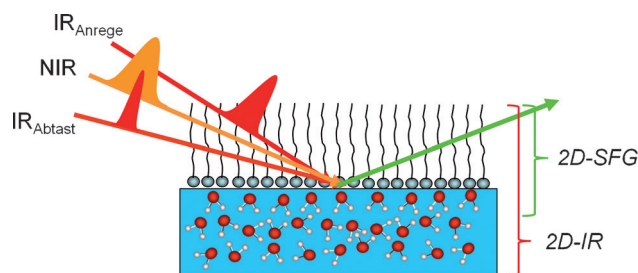
oder Fehlen eines bestimmten Moleküls oder einer funktionellen Gruppe bestimmt wird. Regionen, in denen die Konzentration des Moleküls oder einer Gruppe (z.B. innerhalb einer Zelle) hoch ist, erscheinen hell und Regionen mit niedriger Konzentration dunkel. Etablierte Ansätze beruhen auf eindimensionaler Spektroskopie wie z.B. IR, Raman und CARS. Diese Ansätze leiden jedoch unter spektraler Überlagerung von Banden. Die zusätzliche Dimension der EVV-2D-IR-Spektroskopie vereinfacht das Spektrum deutlich. Darüber hinaus kann eine hohe räumliche Auflösung im Vergleich zu IR-Mikroskopie erhalten werden, da die Auflösung durch den enger fokussierbaren Vis-Puls bestimmt wird. In einem Proof-of-Principle-Experiment wurde gezeigt, dass es möglich ist, über die Aufnahme von spezifischen Kreuzsignalen die Verteilung von Hämatoxylin sowie von Proteinen in Nierengewebe zu visualisieren.<sup>[102]</sup>

### 3.4.3. Ausblick

In den obigen Anwendungen ist der Raman-Puls nicht resonant mit einem elektronischen Übergang. Durch die Nutzung von resonanter Raman-Detektion kann eine enorme Signalverstärkung erzielt werden.<sup>[102]</sup> Der resonante Raman-Effekt wird beispielsweise bei der TRSF- (triply resonant sum frequency spectroscopy) Methode verwendet, einer vollständig kohärenten Resonanzspektroskopie 3. Ordnung mit zwei resonanten IR-Pulsen und einem resonanten UV/Vis-Puls. Die hohe Sensitivität von TRSF konnte bei der Aufnahme von 2D-Spektren des Laserfarbstoffs Styryl 9M in Lösungsmittel (deutertem Acetonitril) bei geringen Konzentrationen (50  $\mu\text{M}$ ) gezeigt werden, wo das stationäre IR-Absorptionsspektrum der Probe keine Farbstoffsignale zeigt, da die IR-Absorptionsbanden unterhalb von 0.1 mOD liegen.<sup>[111]</sup> Schwingungszustände bieten hervorragende spektrale Selektivität, während elektronische Zustände im Resonanzfall enorme Signalverstärkungen mit sich bringen und eine hohe räumliche Auflösung in der Mikroskopie ermöglichen. Die Erhöhung der Sensitivität benötigt einen geeigneten elektronischen Übergang, kann aber für biologische Anwendungen wie das hier beschriebene Fingerprinting von großer Bedeutung sein, wenn die Konzentration von Proteinen, Metaboliten oder Arzneimittelmolekülen, die nachgewiesen werden sollen, gering ist und möglicherweise viele verschiedene Substanzen in der Probe enthalten sind.

### 3.5. Grenzflächenspezifische 2D-SFG-Spektroskopie

Viele chemische, biologische und physikalische Prozesse, wie die heterogene Katalyse, der Transport durch Zellmembranen oder die Ladungsinjektion in Solarzellen, treten an Grenzflächen auf. 2D-SFG-Spektroskopie zielt genau auf diese Grenzflächensysteme, die nicht oder nur schwer mit spektroskopischen Bulk-Methoden wie 2D-IR-Spektroskopie untersucht werden können, und weist dabei eine Empfindlichkeit auf dem Niveau von monomolekularen Schichten oder besser auf (Abbildung 9).<sup>[112]</sup> 2D-IR-Spektroskopie ist ein nichtspezifisches Verfahren, bei dem die Signale sowohl von Molekülen der Oberfläche, als auch aus dem Volumen erzeugt



**Abbildung 9.** 2D-SFG-Experiment. Die beiden IR-Pulse treffen auf die Oberfläche. Ein 2D-IR-Signal wird durch Moleküle aus dem Volumen und von der Oberfläche generiert. Die Aufkonvertierung durch den NIR-Puls in den sichtbaren Spektralbereich erfolgt nur für Schwingungen, die keinen spiegelbildlichen Gegenspieler haben, weshalb Moleküle aus dem Volumen üblicherweise nicht zum Signal beitragen.

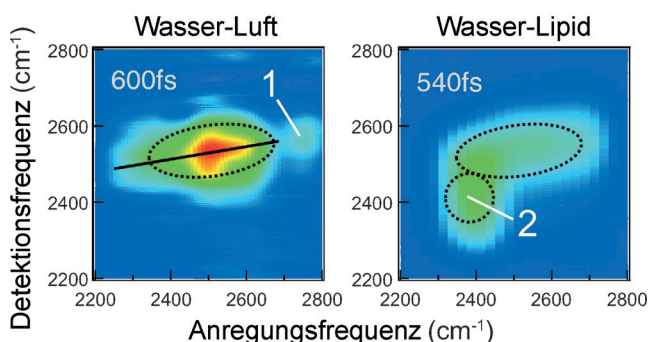
werden, wobei in der Regel das Volumensignal das Oberflächensignal überdeckt. Durch die Verwendung von Summenfrequenzerzeugung von IR mit NIR-Licht (Abbildung 2 H) ist es möglich, Signale auf eine grenzflächenspezifische Weise zu erzeugen, da für den nichtlinearen Prozess ein nicht-zentral-symmetrisches System benötigt wird.<sup>[113,114]</sup> Nach eingehender Schwingungsanregung wird eine Schwingungskohärenz 3. Ordnung erzeugt, die nach der Zeit  $t_1$  im IR-Spektralbereich gemessen werden könnte. Ein gleichzeitig ankommender, nicht-resonanter NIR-Puls zum Zeitpunkt  $t_1$  konvertiert nun jedoch via Summenfrequenzerzeugung die IR-Kohärenz in eine Kohärenz 4. Ordnung im sichtbaren Spektralbereich.<sup>[112,115]</sup> Die erste Implementierung der 2D-SFG-Spektroskopie verwendete homodyne Detektion des emittierten Vis-Signals.<sup>[112]</sup> Das bei homodyner Detektion gewonnene Signal hängt quadratisch von der Anzahl der Oszillatoren ab. Interferenz der emittierten Signale verschiedener Oszillatoren kann zu sehr komplizierten Spektren führen, bei denen sogar Kreuzsignale zwischen nicht gekoppelten Schwingungen auftreten können.<sup>[112]</sup> Heterodyne Detektion beseitigt diese Komplikationen und ist notwendig, um 2D-SFG-Spektren zu erhalten, welche äquivalent zu Bulk-2D-IR-Spektren sind. So können auf die gleiche Art wie in der 2D-IR-Spektroskopie anharmonische Verschiebungen gemessen sowie phasensensitive Messungen und Linienformanalysen durchgeführt werden.<sup>[117–120]</sup> Vorteile der 2D-SFG-Spektroskopie sind, dass hintergrundfreie Signale erhalten werden und, wie bei der Aufnahme der 2D-IR-Spektren via Chirped-Pulse-Upconversion, hocheffiziente Vis-CCD-Detektoren verwendet werden können.<sup>[116]</sup> Herkömmliche 2D-IR-Experimente an Oberflächen konnten lediglich in Fällen durchgeführt werden, in denen die Signale aus dem Volumen klein oder nicht vorhanden waren und die untersuchten Moden große Übergangsdipolmomente aufweisen (z.B. an Metallcarbonylen oder anderen kleinen Molekülen auf Goldoberflächen oder Siliciumdioxid-Schichten).<sup>[121–125]</sup> Durch die 2D-SFG-Spektroskopie kann die gesamte Palette von Informationen, die in 2D-IR-Experimenten an Molekülen aus dem Volumen erhalten werden können, nun auch für eine Vielzahl von Oberflächen und Grenzflächen zugänglich gemacht werden.



### 3.5.1. Struktur und Dynamik von Wasser an Grenzflächen

Aufgrund der großen Anzahl von Reaktionen, die an Grenzflächen von Wasser auftreten, beispielsweise in der Atmosphärenchemie oder in der Nähe von Membranen, ist die Struktur und Dynamik von Wasser an Grenzflächen von großem Interesse. Kürzlich ermöglichte die 2D-SFG-Methode Einblicke in die verschiedenen Strukturen von Wasser und seine Dynamik an den Wasser-Luft- und Wasser-Lipid-Grenzflächen.<sup>[119,120,126]</sup> Spektrale Diffusion in 2D-SFG-Messungen an der Grenzfläche von Wasser und Luft zeigte das Vorhandensein eines inhomogenen Ensembles von schwächer und stärker wasserstoffverbrückten Molekülen.<sup>[126]</sup> Eine besondere wasserstoffverbrückte Wasserspezies mit einer Wellenzahl der OH-Streckschwingung von  $3500\text{ cm}^{-1}$  oder höher mit einer vergleichsweise langsamen spektralen Diffusion wurde identifiziert (540 fs), wesentlich langsamer als Volumenwasser (50–180 fs) oder andere Oberflächenspezies im Bereich von  $3200\text{ cm}^{-1}$  bis  $3400\text{ cm}^{-1}$  (240 fs). Die Autoren folgerten, dass diese wasserstoffverbrückten OH-Oszillatoren zu Wassermolekülen gehören, deren anderes H-Atom in die Luft zeigt und somit keine Wasserstoffbrücke ausbilden kann. Ihre Moden sind lokalisierter, und die spektrale Diffusion wird nicht durch Energieübertragung gemäß Förster dominiert wie bei Volumenwasser, sondern durch strukturelle Dynamik. Die Umlagerung von H-Bindungen für diese Wassermoleküle scheint relativ langsam zu sein. Die Korrektheit dieser Zuordnung wird in einer Studie bestätigt, bei der die in die Luft zeigenden freien OD-Oszillatoren angeregt wurden (da schweres Wasser verwendet wurde, sind die Wellenzahlen nicht direkt vergleichbar).<sup>[119]</sup> Diese zeigt ein instantanes Kreuzsignal mit der blauen Seite des Spektrums der wasserstoffverbrückten Hydroxygruppen, was auf intramolekulare Kopplung der Spezies bei  $3500\text{ cm}^{-1}$  zurückzuführen ist.

Die 2D-SFG-Antwort der Wasser-Lipid-Grenzfläche (Abbildung 10) unterscheidet sich von der der Wasser-Luft-Grenzfläche.<sup>[127]</sup> In dieser Studie wurde schweres Wasser verwendet um die Frequenz der OH-Streckschwingung auf



**Abbildung 10.** 2D-SFG-Spektren der Wasser-Luft- und der Wasser-Lipid-Grenzfläche (DPTAP; 1,2-Dipalmitoyl-3-trimethylammoniumpropan) zeigen in der vOD-Region unterschiedliche spektrale Signale, die verschiedene Strukturen an der Grenzfläche offenbaren. Interessanterweise sind sich die 1D-SFG-Spektren der beiden Grenzflächen (nicht gezeigt) sehr viel ähnlicher. Es ist zu beachten, dass hier die Achsen im Vergleich zu den anderen Abbildungen in diesem Aufsatz vertauscht sind. Wiedergabe aus Lit. [127]. Copyright, AIP Publishing LLC.

etwa  $2500\text{ cm}^{-1}$  zu verschieben. Während sich die 1D-SFG-Spektren der Wasser-Luft- und der Wasser-Lipid-Grenzfläche kaum unterscheiden (nicht gezeigt), treten im 2D-SFG-Spektrum nennenswerte Unterschiede auf. Sowohl das 2D-SFG-Spektrum der Wasser-Luft- als auch das der Wasser-Lipid-Grenzfläche zeigen, in Übereinstimmung mit dem Volumenabsorptionsspektrum, die breite Bande bei  $2500\text{ cm}^{-1}$ , welche wasserstoffgebundenen Wassermolekülen entspricht (Ellipse in Abbildung 10). Interessanterweise zeigt das Wasser-Luft-Spektrum bei einer Anregungswellenzahl von  $2750\text{ cm}^{-1}$  das Vorhandensein von freien Hydroxygruppen (Signal 1 in Abbildung 10: Das markierte Signal ist das Kreuzsignal zwischen freien und wasserstoffverbrückten Hydroxygruppen, das zugehörige Diagonalsignal darüber ist schwach).<sup>[119]</sup> Dieses Signal lässt sich im Spektrum des Wasser-Lipid-Systems nicht finden. Dafür weist das Spektrum des Wasser-Lipid-Systems ein Signal von stark wasserstoffverbrückten Wassermolekülen bei  $2400\text{ cm}^{-1}$  auf (Signal 2 in Abbildung 10). Dieses Signal wurde den Wassermolekülen zugeschrieben, die starke Wasserstoffbrücken mit den Lipidkopfguppen ausbilden. Zeitabhängige Spektren zeigen, dass diese lipidgebundenen Moleküle von der lipidnahen Wasserschicht weitgehend entkoppelt sind (Ellipse im Wasser-Lipid-Spektrum, Abbildung 10). Auf einer Zeitskala von Piko-sekunden kann weder Energietransfer noch ein Austausch von Wassermolekülen beobachtet werden.

### 3.5.2. Ausblick

Die Anwendung der 2D-SFG-Spektroskopie auf andere Systeme als Wasser ist noch in den Anfängen. Auch liegt der Fokus der bisher durchgeführten Studien auf spektraler Diffusion und Energietransfer, während in theoretischen Arbeiten durchaus das Potential gesehen wird, Informationen über die Struktur, Ausrichtung und Dynamik von Molekülen an Grenzflächen durch die Messung ihrer anharmonischen Kopplungen, Schwingungslebensdauern, 2D-Linienformen und Polarisationsabhängigkeiten in Analogie zur gewöhnlichen 2D-IR-Spektroskopie am Volumen zugänglich zu machen.<sup>[128–131]</sup> Durch die Analyse der Phase ist auch die absolute Orientierung der Übergangsdipolmomente zugänglich.<sup>[132,133]</sup>

Erste Studien, die über Wasser hinausgehen, untersuchen Peptide auf Oberflächen.<sup>[134,135]</sup> Für ein Peptid, welches in Lösung weitgehend  $\alpha$ -helikal vorliegt, zeigte 2D-SFG, dass das Peptid sogar auf einer Goldoberfläche im Wesentlichen  $\alpha$ -helikal bleibt; es konnte eine aufrechte Orientierung auf der Oberfläche festgestellt werden (dies wurde aus einer kleinen Amid-I-Anharmonizität und der homogenen Linienform, die eine Denaturierung ausschließt, gefolgert).<sup>[134]</sup> In einem weiteren Beispiel wurde die Amyloidfaserbildung auf einer funktionalisierten Goldoberfläche verfolgt.<sup>[135]</sup> Viele wichtige Anwendungsgebiete wie z.B. den Energiefluss an Grenzflächen,<sup>[136]</sup> Grenzflächensysteme im Rahmen der Umwandlung von Solarenergie, die heterogenen Katalyse, reaktive Oberflächenschichten und Adsorbate, Elektrochemie und die molekulare Elektronik könnten durch die 2D-SFG-Spektroskopie erschlossen werden.

#### 4. Zusammenfassung und Ausblick

Das Anwendungsspektrum der 2D-IR Spektroskopie unter zusätzlicher Verwendung von UV-, Vis- oder NIR-Pulsen ist breit und wächst kontinuierlich. In diesem Aufsatz präsentieren wir einen Überblick über die wichtigsten experimentellen Ansätze mit dem Ziel, ihre weitere Entwicklung und Nutzung zu fördern. Die entsprechenden Pulssequenzen wurden in zwei Kategorien unterteilt, bei denen der nicht-IR-Puls entweder zur Erzeugung eines bestimmten Abtastprozesses oder zum Triggern des untersuchten Systems dient. Unsere Diskussion konzentriert sich auf den Informationsgehalt der Spektren und den Anwendungsbereich der jeweiligen Experimente. Ein Ausblick am Ende jedes Unterabschnitts beleuchtet Herausforderungen und mögliche Entwicklungen der vorgestellten Experimente.

Mehrdimensionale Infrarotspektroskopie ist eine technologisch anspruchsvolle Disziplin, die stark von der technischen Entwicklung vorangetrieben wird. Dies gilt insbesondere für viele der hier vorgestellten gemischten IR-/nicht-IR-Experimente. Einige wichtige Herausforderungen gilt es anzugehen.

Auf Seiten der Hardware gibt es ein kontinuierliches Streben nach höherem Signal-zu-Rausch-Verhältnis und kürzerer Messzeit, wodurch bislang unmögliche Experimente ermöglicht und vormals anspruchsvolle Experimente zur Routine werden. Neue Lichtquellen werden entwickelt, die weniger Rauschen verursachen, über höhere Puls wiederholungsraten, höhere Pulsintensitäten oder grössere Bandbreiten verfügen.<sup>[33,137–139]</sup> Neue Verfahren für die Detektion und Datenerfassung werden entwickelt um die Datenqualität zu verbessern und um Zugang zu neuen Observablen zu erhalten.<sup>[25,87,140–144]</sup>

2D-IR-Spektren zeigen viele Details der molekularen Welt, dementsprechend müssen die theoretischen Methoden, die die Interpretation der Spektren stützen, sehr leistungsfähig sein. Dies gilt umso mehr für die hier diskutierten 2D-Spektroskopien, die auch elektronisch angeregte Zustände und starke Abweichungen vom Gleichgewicht beinhalten. Bemühungen um eine theoretische Beschreibung müssen Werkzeuge zur genauen Beschreibung der Systemdynamik (z. B. Molekulardynamik und Quantenchemische Methoden) mit effizienten Ansätzen zur Berechnung der spektroskopischen Observablen vereinen. Einige der hier vorgestellten Experimente bergen große Herausforderungen für die theoretische Spektroskopie. Die enge Zusammenarbeit zwischen Experimentatoren und Theoretikern ist daher zur Vertiefung unseres Verständnisses der komplexen Spektren erforderlich.

Bisher waren diese Experimente technisch anspruchsvoll und wurden daher nur von wenigen spezialisierten Arbeitsgruppen durchgeführt. Somit besteht eine weitere wichtige Herausforderung darin, die Komplexität der Methoden zu reduzieren und diese, sowohl durch Reduzierung der Kosten als auch durch die Reduzierung des erforderlichen technischen Know-Hows, zugänglicher für eine breite Anwenderschaft zu machen. Verbesserungen der Hardware haben schon jetzt durch erhöhte Stabilität und Automatisierung die Anwendung vereinfacht.<sup>[25,144,145]</sup> Für die reinen IR-Pulssequenzen gibt es bereits Messaufbauten, die von Nichtspezialisten

gehandhabt werden können. Erste kommerziell erhältliche 2D-IR-Spektrometer, welche sogar die Implementierung von gemischten Pulssequenzen erlauben, finden ihren Weg auf den Markt.<sup>[145,146]</sup> Wir sind daher zuversichtlich, dass die Anzahl der Wissenschaftler, die die Möglichkeiten der hier vorgestellten mehrdimensionalen Experimente nutzen können (direkt oder über die Zusammenarbeit mit einer spezialisierten Arbeitsgruppe), in naher Zukunft erheblich wachsen wird.

#### Danksagung

Wir danken unseren Mitarbeitern und Kollegen für ihre Beiträge, welche in der Liste der Literaturverweise zu finden sind. Wir danken Thomas la Cour Jansen und Paul M. Donaldson für die kritische Durchsicht des Manuskripts. Kilian Fehre und Julian Schmidt-Engler danken wir für die Übersetzung ins Deutsche.

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 11624–11640  
*Angew. Chem.* **2015**, *127*, 11790–11807

- [1] K. Ataka, T. Kottke, J. Heberle, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5416–5424; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5544–5553.
- [2] E. A. Muller, B. Pollard, M. B. Raschke, *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 1275–1284.
- [3] S. Schlücker, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4756–4795; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 4852–4894.
- [4] P. Hamm, M. T. Zanni, *Concepts and Methods of 2D Infrared Spectroscopy*, Cambridge University Press, Cambridge, **2011**.
- [5] C. H. Londregan, C. P. Kubiak, *Chemistry* **2003**, *9*, 5962–5969.
- [6] F.-W. Grevels, J. Jacke, W. E. Klotzbücher, C. Krüger, K. Seevogel, Y.-H. Tsay, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, *26*, 885–887; *Angew. Chem.* **1987**, *99*, 960–961.
- [7] I. T. Suydam, C. D. Snow, V. S. Pande, S. G. Boxer, *Science* **2006**, *313*, 200–204.
- [8] D. V. Kurochkin, S. R. G. Naraharisetty, I. V. Rubtsov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 14209–14214.
- [9] J. T. Sage, Y. Zhang, J. McGeehan, R. B. G. Ravelli, M. Weik, J. J. van Thor, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2011**, *1814*, 760–777.
- [10] J. Manor, E. Arbely, A. Beerlink, M. Akkawi, I. T. Arkin, *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 2573–2579.
- [11] P. Hamm, M. Lim, R. M. Hochstrasser, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 6123–6138.
- [12] M. D. Fayer, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2009**, *60*, 21–38.
- [13] P. Hamm, J. Helbing, J. Bredenbeck, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2008**, *59*, 291–317.
- [14] N. T. Hunt, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1837–1848.
- [15] M. Khalil, N. Demirdöven, A. Tokmakoff, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 5258–5279.
- [16] M. Cho, *Two-dimensional Optical Spectroscopy*, CRC, Boca Raton, **2009**.
- [17] S. Woutersen, P. Hamm, *J. Phys. Condens. Matter* **2002**, *14*, R1035.
- [18] J. P. Ogilvie, K. J. Kubarych in *Advances In Atomic, Molecular, and Optical Physics*, Elsevier, Amsterdam, **2009**.
- [19] W. Zhuang, T. Hayashi, S. Mukamel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3750–3781; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3804–3838.
- [20] N.-H. Ge, M. T. Zanni, R. M. Hochstrasser, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 962–972.
- [21] M. Cho, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1331–1418.
- [22] J. Zheng, K. Kwak, M. D. Fayer, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 75–83.

- [23] Y. S. Kim, R. M. Hochstrasser, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 8231–8251.
- [24] H. Chen, H. Bian, J. Li, X. Wen, J. Zheng, *Int. Rev. Phys. Chem.* **2012**, *31*, 469–565.
- [25] W. Rock, Y.-L. Li, P. Pagano, C. M. Cheatum, *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 6073–6083.
- [26] I. V. Rubtsov, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1385–1394.
- [27] J. C. Wright, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2011**, *62*, 209–230.
- [28] M. C. Asplund, M. T. Zanni, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8219–8224.
- [29] L. P. Deflores, R. A. Nicodemus, A. Tokmakoff, *Opt. Lett.* **2007**, *32*, 2966.
- [30] V. Cervetto, J. Helbing, J. Bredenbeck, P. Hamm, *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, 5935–5942.
- [31] A. T. Messmer, K. M. Lippert, P. R. Schreiner, J. Bredenbeck, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 1509–1516.
- [32] A. T. Messmer, K. M. Lippert, S. Steinwand, E.-B. W. Lerch, K. Hof, D. Ley, D. Gerbig, H. Hausmann, P. R. Schreiner, J. Bredenbeck, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 14989–14995.
- [33] H. Bian, J. Li, X. Wen, Z. Sun, J. Song, W. Zhuang, J. Zheng, *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 3357–3365.
- [34] S. Woutersen, P. Hamm, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 11316–11320.
- [35] S. Woutersen, Y. Mu, G. Stock, P. Hamm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 11254–11258.
- [36] T. L. C. Jansen, J. Knoester, *Biophys. J.* **2008**, *94*, 1818–1825.
- [37] T. L. C. Jansen, J. Knoester, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1405–1411.
- [38] H. M. Müller-Werkmeister, Y.-L. Li, E.-B. W. Lerch, D. Bigourd, J. Bredenbeck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6214–6217; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 6334–6337.
- [39] H. Chen, H. Bian, J. Li, X. Wen, Q. Zhang, W. Zhuang, J. Zheng, *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 4333–4349.
- [40] H. Chen, H. Bian, J. Li, X. Wen, J. Zheng, *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 6052–6065.
- [41] S. Woutersen, Y. Mu, G. Stock, P. Hamm, *Chem. Phys.* **2001**, *266*, 137–147.
- [42] J. Zheng, K. Kwak, J. Xie, M. D. Fayer, *Science* **2006**, *313*, 1951–1955.
- [43] J. Zheng, K. Kwak, J. Asbury, X. Chen, I. R. Piletic, M. D. Fayer, *Science* **2005**, *309*, 1338–1343.
- [44] J. Zheng, K. Kwak, J. Xie, M. D. Fayer, *Science* **2006**, *313*, 1951–1955.
- [45] J. F. Cahoon, K. R. Sawyer, J. P. Schlegel, C. B. Harris, *Science* **2008**, *319*, 1820–1823.
- [46] N. Demirdöven, M. Khalil, A. Tokmakoff, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 237401.
- [47] M. T. Zanni, M. C. Asplund, R. M. Hochstrasser, *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 4579.
- [48] S. T. Roberts, J. J. Loparo, A. Tokmakoff, *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 084502.
- [49] K. Kwak, S. Park, I. J. Finkelstein, M. D. Fayer, *J. Chem. Phys.* **2007**, *127*, 124503.
- [50] L. J. G. W. van Wilderen, D. Kern-Michler, H. M. Müller-Werkmeister, J. Bredenbeck, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 19643–19653.
- [51] D. G. Kuroda, J. D. Bauman, J. R. Challa, D. Patel, T. Troxler, K. Das, E. Arnold, R. M. Hochstrasser, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 174–181.
- [52] J. K. Chung, M. C. Thielges, M. D. Fayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12118–12124.
- [53] K. Kwak, M. Cho, *J. Chem. Phys.* **2003**, *119*, 2256.
- [54] Z. Ren, A. S. Ivanova, D. Couchot-Vore, S. Garrett-Roe, *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 1541–1546.
- [55] J. D. Eaves, J. J. Loparo, C. J. Fecko, S. T. Roberts, A. Tokmakoff, P. L. Geissler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13019–13022.
- [56] D. Kraemer, M. L. Cowan, A. Paarmann, N. Huse, E. Nibbering, T. Elsaesser, R. J. D. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 437–442.
- [57] T. L. C. Jansen, B. M. Auer, M. Yang, J. L. Skinner, *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 224503.
- [58] J. Bredenbeck, J. Helbing, R. Behrendt, C. Renner, L. Moroder, J. Wachtveitl, P. Hamm, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 8654–8660.
- [59] L. J. G. W. van Wilderen, A. T. Messmer, J. Bredenbeck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2667–2672; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 2705–2710.
- [60] E. R. Andresen, P. Hamm, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6520–6527.
- [61] V. Cervetto, P. Hamm, J. Helbing, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 8398–8405.
- [62] J. Bredenbeck, J. Helbing, A. Sieg, T. Schrader, W. Zinth, C. Renner, R. Behrendt, L. Moroder, J. Wachtveitl, P. Hamm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 6452–6457.
- [63] C. Kolano, J. Helbing, M. Kozinski, W. Sander, P. Hamm, *Nature* **2006**, *444*, 469–472.
- [64] M. J. Tucker, M. Abdo, J. R. Courter, J. Chen, S. P. Brown, A. B. Smith, R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 17314–17319.
- [65] H. S. Chung, Z. Ganim, K. C. Jones, A. Tokmakoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 14237–14242.
- [66] C. R. Baiz, Y.-S. Lin, C. S. Peng, K. A. Beauchamp, V. A. Voelz, V. S. Pande, A. Tokmakoff, *Biophys. J.* **2014**, *106*, 1359–1370.
- [67] C. S. Peng, C. R. Baiz, A. Tokmakoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 9243–9248.
- [68] M. Delor, I. V. Sazanovich, M. Towrie, S. J. Spall, T. Keane, A. J. Blake, C. Wilson, A. J. H. M. Meijer, J. A. Weinstein, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 11781–11791.
- [69] L. M. Kiefer, J. T. King, K. J. Kubarych, *J. Phys. Chem. A* **2014**, *118*, 9853–9860.
- [70] R. Kania, A. I. Stewart, I. P. Clark, G. M. Greetham, A. W. Parker, M. Towrie, N. T. Hunt, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 1051–1063.
- [71] M. S. Lynch, K. M. Slenkamp, M. Khalil, *J. Chem. Phys.* **2012**, *136*, 241101.
- [72] M. S. Lynch, K. M. Slenkamp, M. Cheng, M. Khalil, *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116*, 7023–7032.
- [73] A. I. Stewart, J. A. Wright, G. M. Greetham, S. Kaziannis, S. Santabarbara, M. Towrie, A. W. Parker, C. J. Pickett, N. T. Hunt, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 9563–9573.
- [74] C. R. Baiz, R. McCanne, K. J. Kubarych, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13590–13591.
- [75] M. Delor, P. A. Scattergood, I. V. Sazanovich, A. W. Parker, G. M. Greetham, A. J. H. M. Meijer, M. Towrie, J. A. Weinstein, *Science* **2014**, *346*, 1492–1495.
- [76] Y. Yue, T. A. Grusenmeyer, Z. Ma, P. Zhang, R. Schmehl, D. N. Beratan, I. V. Rubtsov, *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 8609–8616.
- [77] C. Dumont, T. Emilsson, M. Gruebele, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 515–519.
- [78] D. S. Pearson, G. Holtermann, P. Ellison, C. Cremo, M. A. Geeves, *Biochem. J.* **2002**, *366*, 643–651.
- [79] M. Gutman, E. Nachliel, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1015*, 391–414.
- [80] J. S. Huebner, A. E. Popp, K. R. Williams, *J. Chem. Educ.* **1988**, *65*, 102.
- [81] H. Fabian, D. Naumann, *Methods* **2004**, *34*, 28–40.
- [82] J. Bredenbeck, J. Helbing, P. Hamm, *Rev. Sci. Instrum.* **2004**, *75*, 4462.
- [83] P. Bodis, M. R. Panman, B. H. Bakker, A. Mateo-Alonso, M. Prato, W. J. Buma, A. M. Brouwer, E. R. Kay, D. A. Leigh, S. Woutersen, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1462–1469.
- [84] D. Strasfeld, S.-H. Shim, M. T. Zanni, *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *99*, 038102.



- [85] J. Bredenbeck, J. Helbing, P. Hamm, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 990–991.
- [86] J. Bredenbeck, J. Helbing, K. Nienhaus, G. U. Nienhaus, P. Hamm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 14243–14248.
- [87] C. R. Baiz, M. J. Nee, R. McCanne, K. J. Kubarych, *Opt. Lett.* **2008**, *33*, 2533.
- [88] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Clarendon, Oxford, **1997**.
- [89] J. Schleucher, B. Schwoerer, R. K. Thauer, C. Griesinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2941–2942.
- [90] W. Xiong, J. E. Laaser, P. Paoprasert, R. A. Franking, R. J. Hamers, P. Gopalan, M. T. Zanni, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18040–18041.
- [91] S. Ruetzel, M. Kullmann, J. Buback, P. Nuernberger, T. Brixner, *Phys. Rev. Lett.* **2013**, *110*, 148305.
- [92] L. K. Iwaki, D. D. Dlott, *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 9101–9112.
- [93] D. D. Dlott, *Chem. Phys.* **2001**, *266*, 149–166.
- [94] A. Laubereau, W. Kaiser, *Rev. Mod. Phys.* **1978**, *50*, 607–665.
- [95] Y. Sun, B. C. Pein, D. D. Dlott, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 15444–15451.
- [96] Z. Wang, A. V. Pakoulev, D. D. Dlott, *Science* **2002**, *296*, 2201–2203.
- [97] J. C. Deak, Y. Pang, T. D. Sechler, Z. Wang, D. D. Dlott, *Science* **2004**, *306*, 473–476.
- [98] J. C. Deak, S. T. Rhea, L. K. Iwaki, D. D. Dlott, *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 4866–4875.
- [99] V. Kozich, Ł. Szyk, E. Nibbering, W. Werncke, T. Elsaesser, *Chem. Phys. Lett.* **2009**, *473*, 171–175.
- [100] B. C. Pein, D. D. Dlott, *J. Phys. Chem. A* **2014**, *118*, 965–973.
- [101] B. C. Pein, Y. Sun, D. D. Dlott, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 10898–10904.
- [102] F. Fournier, R. Guo, E. M. Gardner, P. M. Donaldson, C. Loeffeld, I. R. Gould, K. R. Willison, D. R. Klug, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1322–1331.
- [103] W. Zhao, J. C. Wright, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *84*, 1411–1414.
- [104] W. Zhao, J. C. Wright, *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *83*, 1950–1953.
- [105] P. M. Donaldson, R. Guo, F. Fournier, E. M. Gardner, L. M. C. Barter, C. J. Barnett, I. R. Gould, D. R. Klug, D. J. Palmer, K. R. Willison, *J. Chem. Phys.* **2007**, *127*, 114513.
- [106] R. Guo, F. Fournier, P. M. Donaldson, E. M. Gardner, I. R. Gould, D. R. Klug, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 8417–8421.
- [107] R. Guo, S. Mukamel, D. R. Klug, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 14023–14033.
- [108] F. Fournier, E. M. Gardner, R. Guo, P. M. Donaldson, L. M. C. Barter, D. J. Palmer, C. J. Barnett, K. R. Willison, I. R. Gould, D. R. Klug, *Anal. Biochem.* **2008**, *374*, 358–365.
- [109] R. Guo, M. Miele, E. M. Gardner, F. Fournier, K. M. Kornau, I. R. Gould, D. R. Klug, *Faraday Discuss.* **2011**, *150*, 161–174; discussion R. Guo, M. Miele, E. M. Gardner, F. Fournier, K. M. Kornau, I. R. Gould, D. R. Klug, *Faraday Discuss.* **2011**, *150*, 257–292.
- [110] L. R. Valim, J. A. Davies, K. T. Jensen, R. Guo, K. R. Willison, C. M. Spickett, A. R. Pitt, D. R. Klug, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 12855–12864.
- [111] E. S. Boyle, N. A. Neff-Mallon, J. C. Wright, *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 12401–12408.
- [112] J. Bredenbeck, A. Ghosh, M. Smits, M. Bonn, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2152–2153.
- [113] C. Hess, M. Cho, M. Bonn, *Surf. Sci.* **2002**, *502*, 123–128.
- [114] J. H. Hunt, P. Guyot-Sionnest, Y. R. Shen, *Chem. Phys. Lett.* **1987**, *133*, 189–192.
- [115] R. E. Pool, J. Versluis, E. H. G. Backus, M. Bonn, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 15362–15369.
- [116] M. J. Nee, R. McCanne, K. J. Kubarych, M. Joffe, *Opt. Lett.* **2007**, *32*, 713.
- [117] J. Bredenbeck, A. Ghosh, H.-K. Nienhuys, M. Bonn, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1332–1342.
- [118] W. Xiong, J. E. Laaser, R. D. Mehlenbacher, M. T. Zanni, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 20902–20907.
- [119] Z. Zhang, L. Piatkowski, H. J. Bakker, M. Bonn, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 888–893.
- [120] P. C. Singh, S. Nihonyanagi, S. Yamaguchi, T. Tahara, *J. Chem. Phys.* **2013**, *139*, 161101.
- [121] H. Bian, J. Li, H. Chen, K. Yuan, X. Wen, Y. Li, Z. Sun, J. Zheng, *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 7913–7924.
- [122] P. M. Donaldson, P. Hamm, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 634–638; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 662–666.
- [123] J. Nishida, C. Yan, M. D. Fayer, *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 523–532.
- [124] D. G. Osborne, J. A. Dunbar, J. G. Lapping, A. M. White, K. J. Kubarych, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 15407–15414.
- [125] D. E. Rosenfeld, Z. Gengeliczki, B. J. Smith, T. D. P. Stack, M. D. Fayer, *Science* **2011**, *334*, 634–639.
- [126] C.-S. Hsieh, M. Okuno, J. Hunger, E. H. G. Backus, Y. Nagata, M. Bonn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8146–8149; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 8284–8288.
- [127] Z. Zhang, L. Piatkowski, H. J. Bakker, M. Bonn, *J. Chem. Phys.* **2011**, *135*, 021101.
- [128] J. E. Laaser, M. T. Zanni, *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 5875–5890.
- [129] C. Liang, T. L. C. Jansen, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 6937–6945.
- [130] C. Liang, M. Louhivuori, S. J. Marrink, T. L. C. Jansen, J. Knoester, *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 448–452.
- [131] J. K. Carr, L. Wang, S. Roy, J. L. Skinner, *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 8969–8983.
- [132] S. Nihonyanagi, S. Yamaguchi, T. Tahara, *J. Chem. Phys.* **2009**, *130*, 204704.
- [133] M. Yeganeh, S. Dougal, H. Pink, *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *83*, 1179–1182.
- [134] J. E. Laaser, D. R. Skoff, J.-J. Ho, Y. Joo, A. L. Serrano, J. D. Steinkruger, P. Gopalan, S. H. Gellman, M. T. Zanni, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 956–962.
- [135] A. Ghosh, J.-J. Ho, A. L. Serrano, D. R. Skoff, T. Zhang, M. T. Zanni, *Faraday Discuss.* **2015**, *177*, 493–505.
- [136] M. Smits, A. Ghosh, J. Bredenbeck, S. Yamamoto, M. Müller, M. Bonn, *New J. Phys.* **2007**, *9*, 390–409.
- [137] J. Biegert, P. K. Bates, O. Chalus, *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **2012**, *18*, 531–540.
- [138] P. B. Petersen, A. Tokmakoff, *Opt. Lett.* **2010**, *35*, 1962–1964.
- [139] C. Calabrese, A. M. Stingel, L. Shen, P. B. Petersen, *Opt. Lett.* **2012**, *37*, 2265–2267.
- [140] S.-H. Shim, M. T. Zanni, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 748–761.
- [141] J. Helbing, P. Hamm, *J. Opt. Soc. Am. B* **2011**, *28*, 171.
- [142] P. M. Donaldson, H. Strzalka, P. Hamm, *Opt. Express* **2012**, *20*, 12761–12770.
- [143] J. Réhault, M. Maiuri, C. Manzoni, D. Brida, J. Helbing, G. Cerullo, *Opt. Express* **2014**, *22*, 9063–9072.
- [144] J. D. Leger, C. M. Nyby, C. Varner, J. Tang, N. I. Rubtsova, Y. Yue, V. V. Kireev, V. D. Burtsev, L. N. Qasim, G. I. Rubtsov, et al., *Rev. Sci. Instrum.* **2014**, *85*, 083109.
- [145] D. R. Skoff, J. E. Laaser, S. S. Mukherjee, C. T. Middleton, M. T. Zanni, *Chem. Phys.* **2013**, *422*, 8–15.
- [146] M. T. Zanni, C. T. Middleton, M. Arrigoni, J. Henrich, *Laser Focus World* **2013**.

Eingegangen am 6. April 2015

Online veröffentlicht am 26. August 2015