

Ultrabrza spektroskopija i fotokemija međuprodukata s potencijalnom primjenom u biologiji i medicini

Forjan, Mateo

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:905055>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-08**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Fizički odsjek

Mateo Forjan

**Ultrabrza spektroskopija i fotokemija
međuprodukata s potencijalnom primjenom
u biologiji i medicini**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Fizički odsjek

Mateo Forjan

**Ultrabrza spektroskopija i fotokemija
međuprodukata s potencijalnom primjenom
u biologiji i medicini**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
dr. sc. Silvije Vdović

Zagreb, 2022



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Physics

Mateo Forjan

**Ultrafast Spectroscopy and Photochemistry
of Intermediates With Potential Application in
Biology and Medicine**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
dr. sc. Silvije Vdović

Zagreb, 2022

O mentoru

Dr. sc. Silvije Vdović diplomirao je fiziku, smjer eksperimentalna fizika na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu 2004. godine te je iste godine zaposlen kao znanstveni novak u Laboratoriju za femtosekundnu spektroskopiju na Institutu za fiziku u Zagrebu gdje radi i danas. Doktorirao je 2010. godine također na PMF-u u Zagrebu. Nakon doktorata bio je na dvogodišnjem poslijedoktorskom usavršavanju na Institutu za kemiju Kineske akademije znanosti u Pekingu. Od početka svog znanstvenog rada bavi se razvojem i primjenom različitih metoda laserske spektroskopije, najprije u istraživanjima interakcije lasera i atoma, a u zadnjih destetak godina i u istraživanjima kemijskih reakcija raznih molekulskih sustava korištenjem metoda femtosekndne vremenski razlučive spektroskopije. Od 2020. radi na radnom mjestu višeg znanstvenog suradnika, a od 2022. godine je voditelj grupe za ultrabrzu spektroskopiju u Centru za napredne laserske tehnike. Voditelj je kolegija Nekonvencionalne tehnike u atomskoj spektroskopiji na poslijediplomskom studiju fizike na PMF-u u Zagrebu. Objavio je dvadesetak WoSCC radova koji su citirani preko 300 puta. Sudjelovao je na većem broju domaćih i međunarodnih konferencija. Tijekom godina bio suradnik na većem broju nacionalnih i bilateralnih projekata, a trenutno je voditelj HrZZ uspostavnog projekta Grupa za primijenjenu ultrabrzu spektroskopiju i fotokemijsku identifikaciju. Niz godina aktivno sudjeluje u popularizaciji znanosti.

Zahvaljujem mentoru dr. sc. Silviju Vdoviću na ogromnoj količini pomoći, savjeta i strpljenja te na prenesenom znanju iz eksperimentalnog ali i teorijskog dijela tijekom rada na doktoratu. Hvala na otvaranju puta u eksperimentalnu fiziku te na svim ozbiljnim i neozbiljnim razgovorima.

Hvala dr.sc. Damiru Dominku, dr.sc. Hrvoju Skenderoviću i dr.sc. Mariju Rakiću na svim zabavnim pričama, savjetima i proslavljenim rođendanima te druženjima uz hranu.

Dr.sc. Nikoli Basariću veliko hvala na sintezi uzoraka i velikoj količini pomoći prilikom interpretacije mjerenja. Hvala dr.sc. Marini Šekutor na teorijskim simulacijama stvaranja kinon metida.

Zahvaljujem Vedranu Brusaru na velikoj pomoći u radu u laboratoriju i na mnogobrojnim raspravama o fizici i o općenitim zanimljivostima iz života.

Virni Kisiček u kombinaciji sa Vedranom Brusarom hvala na zabavnoj atmosferi u uredu.

Hvala Dariju na korisnim savjetima i motivaciji kroz faks i doktorat te druženjima u obiteljskoj atmosferi, Lovri na raznim pričama, izmišljenim igrama i događajima koji su djetinjstvo učinili pamtljivijim te ostalim prijateljima za lijepe trenutke od djetinjstva do danas.

Veliko hvala mami na strpljenju, konstantnoj podršci, upornosti i hrabrenju već od samog upisa studija fizike. Također hvala na tisućama pohanaca koji su doputovali do Zagreba.

Veliko hvala tati na prenesenoj ljubavi prema fizici još od djetinjstva. Hvala na motivaciji i ponosu.

Posebno hvala mojoj djevojci Lani koja me podupirala i hrabrila kada je to bilo najpotrebnije. Hvala na smijehu, svakodnevnom uveseljavanju, zanimljivim šetnjama i kolačima, a najviše na ogromnoj količini pružene ljubavi.

Sažetak

U ovoj disertaciji predstavljeno je istraživanje fotokemije i ultrabrze dinamike kinon metida - međuprodukata sa potencijalnom primjenom u biologiji i medicini. Kinon metidi su važni međuprodukti u kemiji i fotokemiji fenola te su zanimljivi zbog svoje biološke aktivnosti i sve veće primjene u organskoj sintezi. Njihova biološka aktivnost temelji se na antiproliferativnom djelovanju zbog čega su primjenjivi u fotokemoterapiji. Upravo zbog procesa poput fotokemoterapije koji koriste biološku aktivnost kinon metida, od presudne važnosti je istraživanje puta fotokemijske reakcije njihovog nastajanja na ultrabrzim skalama. U svrhu provođenja istraživanja, na Institutu za fiziku u Zagrebu izgrađen je eksperimentalni postav za ultrabrznu tranzijentnu apsorpciju. Ostvarena je vremenska rezolucija od 200fs. Spektralni prozor probnog pulsa proteže se od 320nm do iznad 600nm što omogućava širokopojasno praćenje dinamike. Valnu duljinu pumpnog pulsa moguće je postaviti na jednu od harmonika: 267nm, 400nm, 800nm. Kao prekursori kinon metida odabrani su: adamantan fenol, adamantanski i neadamantanski derivat naftola te BODIPY-fenol. Kombiniranjem tranzijentne apsorpcije sa vremenski razlučivim mjerenjima fluorescencije te laserskom fotolizom otkriveno je kako kinon metid iz adamantan fenola nastaje u osnovnom stanju u ultrabrznoj reakciji fotodehidratacije preko konusnog presjeka sa vremenskom konstantom od 100fs. Uz stvaranje kinon metida, na različitim skalama dolazi i do stvaranja radikala i radikal kationa te tripletnog stanja prekursorske molekule. Kod derivata naftola uočeno je da se, iako molekule dijele kromoforu, reakcije uvelike razlikuju. Kod adamantan naftola, kinon metid također nastaje u osnovnom stanju fotodehidratacijom preko konusnog presjeka ali sporije, na nanosekundnoj skali, dok kod derivata naftola bez adamantanskog dijela isti nastaje nakon 40 μ s eliminacijom OH \cdot skupine iz radikala prekursorske molekule koji nastaje ili iz radikal kationa eliminacijom protona ili iz S₁ stanja prijenosom vodika. Vremenski razlučivim mjerenjima fluorescencije BODIPY-fenola potvrđena je anti-Kasha fizika uzorka. Naime, opažen je fluorescencijski pojas koji odgovara fluorescenciji iz viših pobuđenih singletnih stanja molekule iz kojih kreće reakcija stvaranja kinon metida.

Ključne riječi: ultrabrza spektroskopija, konusni presjek, tranzijentna apsorpcija, vremenski razlučiva mjerenja fluorescencije, kinon metidi.

Extended abstract

Introduction

The definition of the ultrashort duration of a process refers to a processes and phenomena that last less than 1ps. Hence, ultrafast spectroscopy relates to studying photo-induced processes which are of ultra-short duration. Ultrafast spectroscopy includes many methods which use ultrashort laser pulses for studying various samples such as transient absorption, fluorescence upconversion and 2D spectroscopy. One of the first femtosecond pulsed lasers was made in the 1980s, and was based on organic dyes as a laser medium. In its initial version, the laser generated pulses with a duration of 100 fs, while after the improvement of the technology, the duration of the pulses was reduced to 30 fs. Today, using a Ti:sapphire laser, it is possible to produce pulses of variable wavelength, with duration of 4-5fs, which represent the shortest pulses used in femtosecond spectroscopy, while generally the shortest laser pulses are of a hundred (or less) attoseconds duration, and are used for observation of electron dynamics.

The development of ultrafast spectroscopy opened up a new area of research - femtochemistry, a branch of physical chemistry that studies chemical reactions on femtosecond scales. Within the newly opened field as one of the most influential scientists, A.H. Zewail received the Nobel Prize in Chemistry in 1999. for his work on the study of the dynamics of atoms within a molecule during a chemical reaction. Thanks to the development of methods for creating laser pulses, ultrafast spectroscopy has experienced rapid growth and popularity in the last few decades. Namely, significant progress has been made in the generation of ultrashort pulses whose wavelength and frequency can be adjusted. Also, the stability of laser sources is significantly increased, which is very important for measuring very small spectral changes, as is the case of photochemical reactions.

Ultrafast transient absorption, the fundamental method of this dissertation, is one of the methods of ultrafast spectroscopy. The method is a type of pump-probe experiment in which a pump pulse is used to excite the sample from the ground to higher electronic states while probe pulse is used to test the dynamics of the previously excited states. In addition to testing the

dynamics of excited states, depending on the pattern and energy of the pulses, it is possible to induce a certain photochemical reaction with a pump pulse, the course of which can then be monitored with a probe pulse. Some of the most interesting applications of transient absorption include the detailed study of electron transfer during photosynthesis, one of the most important biological processes, the study of fluorescent proteins, biomimicry photo-systems (artificial imitations of systems that occur in nature), photoisomerizations (changes in the shape of molecules caused by light absorption), dynamics of RNA structures etc.

Within the scope of this thesis, experimental setup for ultrafast transient absorption technique was developed which was used for the analysis of ultrafast dynamics of short-lived intermediates with potential application in biology and medicine. Besides the setup described below, additional fs-TA measurements with higher time-resolution were obtained through Laserlab Europe project within the group of prof. Giulio Cerullo at Politecnico di Milano, Italy. Fluorescence upconversion was measured in the group of prof. Andrea Cannizo at the Institute of Applied Physics, University of Bern, Switzerland.

Principles of Ultrafast Transient Absorption

Transient absorption is a pump-probe technique in which changes in absorption of the studied system are detected with temporal and spectral resolution. The time resolution, which is very important when investigating processes with biological importance, considering that many of them take place on ultrafast scales, depends on the time duration of the pump pulse and the cross-correlation between the pump and probe pulses. Pulses from the laser are separated into two optical branches which are called pump and probe beams. In modern experimental setups, the pump pulse is directed towards the part of the experiment to vary the wavelength and shorten the pulse in time (NOPA - non-collinear optical parametric amplifier) in order to match the wavelength to the absorption of the studied system. Furthermore, for the purpose of the spectral resolution of the experiment, the probe pulse is directed towards the part of the setup for the creation of supercontinuum since it is desirable to observe absorption changes in the widest possible spectral range. Most often, this range extends over the entire visible part of the electromagnetic spectrum.

In order to achieve time resolution in the experiment, it is necessary to be able to manipulate the time gap between the probe and pump pulse, which is achieved by sending the probe pulse to a movable translator with a built-in retroreflector in order to be able to vary the optical path of the probe pulse to the sample. In most cases, the probe pulse is frequency-broadened into the supercontinuum only after reflection from the moving translator.

Both the pump and the probe pulses are directed towards the sample. The sample can be in various forms: a liquid inside the cuvette, in a gaseous state inside the chamber, as a thin film (during which ultrafast transient reflection can also be observed, which will be discussed below), a sample cooled in an optical cryostat, as a jet of liquid, etc. On the sample, the pulses must be overlapped in space, and in the initial step of the measurement also in time. It is therefore necessary to take into account the length of the optical paths of the pump and probe beam. After the sample, the pump pulse is blocked, and the probe pulse is directed towards the detection part, which consists of a spectrometer where it is desirable for it to have the possibility of very fast detection (reading frequency equal to or faster than the repetition frequency of the laser) in order to avoid the influence of fluctuations in the intensity between laser pulses.

Since the transient absorption measures changes in absorption of the excited sample compared to the unexcited sample it is necessary to install a synchronized beam chopper on the pump beam. The beam chopper is connected to the output laser TTL signal which determines the moment of the laser pulse emission and the beam chopper frequency is adjusted to half of the laser repetition frequency to block every other pump pulse. With respect to the beam chopper, the probe pulse intensity is divided into two situations: $I_{on}(\lambda, t)$ when the pump pulse passes the beam chopper and $I_{off}(\lambda, t)$ when the beam chopper blocks the pump pulse. The signal measured in TA is defined as follows: $\Delta OD(t, \lambda_{pr}) = -\log\left(\frac{I_{on}(t, \lambda_{pr})}{I_{off}(t, \lambda_{pr})}\right)$. As a result, surface diagram with one time axis and another wavelength axis is obtained. Data analysis is done by fitting exponential decays on time dynamics at selected, relevant wavelengths. More complete way of data analysis is called global and target analysis where fits are performed on a complete matrix of experimental data based on the assumed relaxation model.

Experimental Setup

The main parts of the laser system are a femtosecond laser oscillator (Tsunami, Spectra-Physics) and a femtosecond laser amplifier (Spitfire, Spectra-Physics). As a pump laser for the femtosecond laser oscillator, a CW laser (continuous wave laser) Millennia, Spectra-Physics, with a maximum output power of 5W at a wavelength of 532nm is used. Both Tsunami and Spitfire use Ti:sapphire (titanium-doped sapphire) crystals as the lasing source.

The oscillator within its resonator passively but also actively couples the modes, that is, creates laser pulses of variable wavelength. The range within which it is possible to vary the central wavelength of the output pulses is 700-900nm. Active mode locking is enabled by AOM (acousto-optic modulator), while passive mode locking is possible due to self-focusing within the Ti-sapphire crystal that occurs due to the Kerr effect. The output pulses of the oscillator have

a duration of 80 fs. In the experiments, the central wavelength was 800 nm while the spectral width of the pulses was 12 nm which gave Fourier limited pulses. The repetition frequency is 80MHz, while the average output power of the oscillator is 800mW. The laser amplifier works on the CPA principle (chirped pulse amplification) for which the Nobel Prize was awarded in 2018. Output pulses have 120fs time duration and are amplified over 10^6 times. The repetition frequency is 1kHz, and the peak power is 10^{10} W. The central wavelength of the pulses remains unchanged and is 800 nm.

Beam splitter divides the fundamental beam into 2 branches. One branch goes towards the part for creating the third harmonic and the other branch is designated for white light generation. The third harmonic is created by sum frequency generation in a β -BBO crystal of type 1. In the first step, vertically polarized fundamental pulses enter the β -BBO crystal (cutting angles: $\theta = 29.3^\circ$, $\phi = 0^\circ$) where the second harmonic of 400nm wavelength with horizontal polarization is created. Then, using a quartz $\lambda/2$ plate, the polarization of the remaining part of the fundamental infrared pulses is also oriented horizontally due to the need to mix the second harmonic and fundamental infrared pulses ($\lambda/2$ plate for 800nm, and λ plate for 400nm). After the $\lambda/2$ plate there is a α -BBO crystal with a thickness of 3.0 mm (cutting angles: $\theta = 66^\circ$, $\phi = 0^\circ$) which serves as a retardant for fundamental pulses. After the α -BBO crystal, the pulses are overlapped in time with equal polarization. At the end of the setup for creating the third harmonic, there is a second β -BBO crystal (cutting angles: $\theta = 44.5^\circ$, $\phi = 0^\circ$) in which the frequencies of fundamental pulses and pulses of second harmonic are summed and as a result pulses with a wavelength of 267nm are obtained, which is equal to the third harmonic of the input pulses with a wavelength of 800nm. After the last β -BBO crystal there are 2 harmonic separators. Harmonic separators are special dielectric mirrors whose reflection properties ensure the reflection of third harmonic pulses and the transmission of fundamental and second harmonic pulses. If all elements except the first BBO crystal are eliminated from the set-up for creating the pump beam, then, with the selection of appropriate harmonic separators, it is possible to use the second harmonic at 400nm as pump pulses. The pump beam is directed towards a chopper and towards a variable filter that enables precise adjustment of the energy of the pump pulses, which is of crucial importance for accuracy and quality measurements. Chopper is set at a frequency of 500Hz to block every second pulse of the pump beam, and is phase-matched to the 1kHz operating frequency of the laser amplifier using the output TTL signal of the laser. For the measurements energies per pulse ranging from $0.1\mu\text{J}$ to approximately $5\mu\text{J}$ were used.

The second part of the fundamental beam is separated by a beam splitter to create a probe beam. The probe beam is first directed towards a computer-controlled optical translator on which a retroreflector is located. The retroreflector provides the reflected beam with a direction

parallel to the incoming beam. After the retroreflector, the probe beam is directed towards the $\lambda/2$ plate, which serves to manipulate the polarization of the probe beam. In most cases, the polarization of the probe beam is set at a magic angle (54.7 degrees) with respect to the polarization of the pump beam in order to eliminate the contributions from rotational diffusion in the measurements. Then, a variable filter and an iris are placed on the direction of the probe beam, which ensure precise adjustment of the power and profile of the beam arriving at the crystal to produce white light.

After the filter and iris, the beam is focused with a 5cm focal length lens into a CaF_2 crystal with a thickness of 3mm, which is cut so that the direction of the optical axis of the crystal is parallel with the direction of propagation of the probe beam (c-cut) in order to eliminate the effects of birefringence. CaF_2 was chosen considering that the molecules in the research showed ultrafast photodynamics, primarily in the UV region of the electromagnetic spectrum, while the thickness of 3mm was chosen because in practice it was shown that the white light created in a 3mm crystal is more stable compared to thinner crystals, while using even thicker crystals increased the chirp of the supercontinuum. A focusing lens is mounted on the translator so that the focus of the probe beam can be moved across the thickness of the crystal to help select the broad and stable supercontinuum. The energy of the fundamental pulses of $1\mu\text{J}$ proved to be optimal for the generation of white light. To prevent damage to the CaF_2 crystal, it is mounted on a hand-made y-z translator. The white light spectrum extends from 325nm to 620nm. The spectrum actually extends to wavelengths longer than 620nm, but is cut off by the filter used to eliminate the fundamental 800nm beam.

After the CaF_2 crystal, the probe beam is collimated by a parabolic mirror (MPD129-F01; Thorlabs) and directed towards a filter that filters out the remaining fundamental 800nm. A dielectric mirror on a quartz substrate (Eksma Optics 042-0800-i0) with a polished back surface was used that ensures high reflection for a wavelength of 800 nm, and transmission for shorter wavelengths. After the filter, the probe beam was focused into the sample cuvette using a parabolic mirror (MPD169-F01; Thorlabs). The radius of the probe beam at the focus was approximately $60\mu\text{m}$. Parabolic mirrors were used to eliminate the spherical aberration normally present when focusing with a concave mirror. Then, the probe beam is collimated by a spherical mirror placed behind the cuvette and directed towards the detection system.

The cuvettes used in the measurements are flow cuvettes with an optical path of 1mm or 0.5mm. The cuvette windows are made of quartz to ensure full transmission for UV wavelengths up to approximately 200nm. The teflon tubes of the cuvette are connected to a micro-annular gear pump that ensures sample flow through the cuvette and a fresh sample for each pump pulse. The cuvette is placed on a translator that enables translation of the cuvette in the

direction of propagation of the probe beam in order to ensure overlap of the pump and probe beams in the center of the cuvette.

The detection system is a home-made spectrometer consisting of a quartz prism with a peak angle of 60 degrees and a CCD detector based on a Hamamatsu S7030-1006 sensor with modified and upgraded electronics (Etwicklungsbuero Stresing, Berlin, Germany) with the ability to record at a repetition rate of $>1\text{kHz}$ and 16-bit AD conversion. Recording at 1 kHz repetition rate ensured that the spectrum of the probe beam was recorded in *single-shot* mode, that is, the spectrum of each individual pulse was recorded without averaging over pulses. The photodiode linear sensor contains 1024 pixels, and optical filters that show sharp peaks in the transmission curve are used for wavelength calibration (Thorlabs - FGB67, SCHOTT - BG20). The detection system is mounted inside a fully enclosed plastic box to eliminate contributions from stray light from the laboratory. The box has a hole through which the probe beam comes to the prism.

Photogeneration of Quinone Methides From Adamantyl Phenol

In order to elucidate in detail the mechanism of the photoinduced process of QM generation from adamantyl phenol precursor in the ultrafast photodehydration reaction, several methods of ultrafast spectroscopy were used. By combining the results of different methods, data on different time scales, from femtoseconds to seconds was obtained. In order to elucidate the initial part of the reaction, fs-TA setup with pump pulses of sub-20fs duration and a time resolution of $\approx 50\text{fs}$ was used. On a longer time scale up to 1ns, fs-TA measurements were performed using a setup in which the pump pulse is generated as the third harmonic of the fundamental laser wavelength with a resolution of about 500fs. In ultrafast measurements, no signature of the intermediate excited state of adamantyl phenol was observed, nor was the signature of the excited state of QM photoproduct. The lack of the adamantyl phenol excited state signature in the transient spectra can be explained by very weak absorption of the excited state, which is most likely located at shorter wavelengths than those accessible by the used fs-TA setups. On the other hand, the lack of a signature of the excited state of the photoproduct (QM) is explained by the results of theoretical simulations showing that the photochemical reaction takes place via a conical section avoiding the excited state of the QM photoproduct. The mentioned reaction path is in contrast to the previously investigated photodehydration reaction mechanism of *o*-hydroxymethylphenol, where QM is formed adiabatically in an excited state.

Moreover, the transition of the wave packet created at the Franck-Condon point of the po-

tential energy surface towards the ground state of the QM photoproduct was observed indirectly by fitting the kinetic profiles at several selected wavelengths. The rise time of the signal at the selected wavelengths is longer (≈ 100 fs) than the time resolution of the setup (≈ 50 fs). The signal rise time corresponds to the transition time of the wave packet through the conical intersection to the ground state of the QM photoproduct. In order to study the excited state of the precursor **3**, invisible in fs-TA measurements, femtosecond fluorescence upconversion (FLUC) measurements were performed. FLUC measurements revealed a non-reactive conformer of adamantyl phenol, whose time evolution differs from the time evolution and dynamics of the reactive conformer which is involved in the formation of QM. Theoretical calculations confirm the existence of two conformers of adamantyl phenol. The appearance of QM could not be followed by FLUC measurements since QM is non-emissive. Lack of any signal change over time (related to the photochemical reaction) in FLUC measurements and TA measurements suggests that QM photoproduct is created directly in the ground state. In addition, LFP measurements monitored the absorption of the ground state of QM from nanoseconds up to several hundred milliseconds, thus further validating the interpretation of the fs-TA results.

The results provide a new perspective on the photochemical reactivity of phenols. It is shown that changes in the molecular structure without changing the chromophore can still change the path of the photochemical reaction. The mentioned principle must be taken into account when synthesizing molecules for a specific reaction scheme.

Photodehydration of 2-naphthol derivatives

Photochemical reactions of QM generation from 2 naphthol derivatives were investigated. Derivatives 3-hydroxymethyl-2-naphthol (**1**) and 3-(2-hydroxy-2-adamantyl)-2-naphthol (**2**) share the same naphthol chromophore, thus their absorption spectra are almost alike. Therefore, it is plausible to assume the photochemical reaction pathways would also be almost alike. However, by the results of this thesis it is proven that reaction pathways are completely different.

Upon absorption of an ultrashort UV pulse, adamantyl-naphthol undergoes a non-adiabatic excited-state intramolecular proton transfer coupled with dehydration through conical intersection, which consequently results in QM formation within a few nanoseconds. On the other hand, in the case of the naphthol derivative without the adamantyl attachment in fs-TA measurements on the nanosecond time scale only the formation and rapid decay of radical cations was observed with the internal conversion of the excited precursor molecule. Since deprotonation of radical cation usually takes place on time scales from several hundred picoseconds to several nanoseconds, the observed much faster decay (<50 ps) at characteristic wavelengths indicates

that the radical cation is reduced by dissolved electrons, resulting in the initial naphthol derivative in the ground state. It was concluded that the processes of photoionization and formation of radical cations leads to competitive processes that are not directly related to the photochemical reaction of QM formation. On the other hand, the phenoxyl radical (observed in LFP measurements) identified as a QM precursor can be generated in a hydrogen transfer reaction known to evolve on the nanosecond time scale. In that case, the formation of phenoxyl radicals could not be distinguished by fs-TA measurements that cover the nanosecond time window, neither by the LFP method in which 10ns pulses are used for excitation. Phenoxyl radical after the formation undergoes elimination of the OH· group resulting in QM as in the case of adamantyl-naphthol but in a process that takes place on a much slower, microsecond time scale.

The addition of a simple alkyl (adamantyl) to naphthol chromophore reduces the energy difference between the S_1 and S_0 potential surfaces allowing the direction of the photochemical reaction through the conical section. In the case of adamantyl-free naphthol, it undergoes photodehydration via a much slower process involving phenoxyl radicals as intermediates en route to the desired QM intermediates.

Anti-Kasha photophysics of BODIPY-phenol

Kasha's rule states that the emissive state of a molecule is the lowest one for a given multiplicity. For that reason, fluorescence spectrum of a molecule should be, in principle independent of a pump excitation wavelength. Generally, internal conversion probability is inversely proportional to the energy difference between the involved states. Since the higher energy states are usually closer to each other, the probability of an internal conversion is much higher than the one for fluorescence or photochemical reaction.

The goal of studying BODIPY-phenol photophysics was the confirmation of BODIPY-QM generation from the higher excited states ($>S_1$) of the precursor. The measurements were done using a few different pump wavelengths to determine the wavelength limit for anti-Kasha processes. In fs-TA experiments 400nm and 267nm were used without observation of any difference in the TA spectra. The reason could be that both wavelengths are above the anti-Kasha wavelength limit or that the available time window (1ns) was too short for the characteristic photoreaction time constants. In FLUC measurements fluorescence decay was observed after excitation with 495nm, 335nm and 272nm. As expected, for wavelengths 335nm and 272nm a fluorescence band, non-existent when pumping with 495nm, was visible at 370nm. It is assigned to fluorescence from higher electronic states. This result was corroborated with TC-SPC single photon counting experiment using three different excitation wavelengths: 280nm, 340nm

and 450nm. Similarly to FLUC measurements, for 280nm and 340nm excitation wavelengths a fluorescence peak was visible at 370nm. When using the 450nm excitation it was not visible, hence additionally confirming the observation of anti-Kasha process.

With described results the presence of an anti-Kasha process was confirmed but unfortunately BODIPY-QM generation was not observed. The reason most probably being too short time window of used time resolved experiments as the time window of fs-TA is 1ns and for FLUC measurements even shorter (<500ps). The ongoing theoretical simulations should help resolve the process of BODIPY-QM generation.

Conclusion

In this work, ultrafast photochemistry of short-lived and very reactive quinone methide intermediates is presented. Quinone methides were generated from 3 different precursors: adamantyl phenol and 2 naphthol derivatives and every photochemical reaction pathway was observed to be different. Main part of the experimental measurements was done using the ultrafast transient absorption setup built at the Institute of physics in Zagreb. Experimental setup has a possibility of wavelength choice between 800nm, 400nm, 267nm. A time resolution of 220 fs was achieved by the gradual inclusion of new experimental equipment and careful adjustments of the setup.

Since for quinone methide application in chemistry, medicine or biology it is necessary to know the reaction pathway, this work's goal was to elucidate the complete pathway of a few reactions of quinone methide generation. Experimental setup for ultrafast transient absorption at the Institute of physics opens up possibilities for further study of ultrafast photochemistry of various molecules as well as for research of a large number of interesting photoinduced processes important in chemistry, biology and medicine. Further improvement of the experimental setup can be started by connecting the homemade NOPA to the rest of the setup. In this way, it would be possible to select an excitation wavelength from spectral windows: 260-300nm and 500-670nm with a significantly shorter pulse duration of approximately 50fs. Additionally, by pumping the supercontinuum crystals with NOPA, the white light spectrum could be expanded to UV and the detection noise could be decreased with the use of cooled detectors.

Sadržaj

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Ultrabrza laserska spektroskopija | 9 |
| 1.1 | Uvodni pregled | 9 |
| 1.2 | Ultrakratki laserski pulsevi | 10 |
| 1.2.1 | Matematički opis pulseva | 10 |
| 1.2.2 | Stvaranje harmonika | 12 |
| 1.2.3 | Stvaranje superkontinuum | 15 |
| 1.3 | Ultrabrza tranzijentna apsorpcija | 18 |
| 1.3.1 | Opis metode | 18 |
| 1.3.2 | Interpretacija signala u tranzijentnoj apsorpciji | 24 |
| 1.3.3 | Praćenje fotokemijskih reakcija i ostalih fotoinduciranih procesa | 26 |
| 1.3.4 | Artefakti u tranzijentnoj apsorpciji | 30 |
| 1.3.5 | Eliminacija cvrkuta i artefakata | 34 |
| 1.3.6 | Utjecaj polarizacije na mjerenje | 38 |
| 1.3.7 | Modifikacije postava | 40 |
| 1.3.7.1 | Tranzijentna refleksija | 40 |
| 1.3.7.2 | Tranzijentna anizotropija | 41 |
| 1.4 | Ultrabrza vremenski razlučiva mjerenja fluorescencije | 41 |
| 1.4.1 | Opis metode | 41 |
| 1.4.2 | Fazno usklađivanje | 43 |
| 1.4.3 | Princip mjerenja | 43 |
| 1.5 | 2D spektroskopija | 44 |
| 1.5.1 | Opis | 44 |
| 1.5.2 | Interpretacija mjerenja | 46 |
| 2 | Metode analize mjerenja | 49 |
| 2.1 | Analiza pojedinih valnih duljina signala | 49 |
| 2.2 | Globalna analiza | 52 |
| 2.3 | Primjer: globalna analiza DCM molekule | 54 |
| 3 | Eksperimentalni postav | 59 |
| 3.1 | Postav za ultrabrzu tranzijentnu apsorpciju | 59 |
| 3.1.1 | Laserski sustav | 60 |
| 3.1.2 | Postav tranzijentne apsorpcije | 61 |
| 3.1.2.1 | Pumpna zraka | 61 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.1.2.2 | Probna zraka | 63 |
| 3.1.2.3 | Uzorak | 66 |
| 3.1.2.4 | Sustav za detekciju | 67 |
| 3.1.3 | TA postav visoke vremenske rezolucije | 68 |
| 3.2 | Postav za ultrabrza vremenski razlučiva mjerenja fluorescencije | 69 |
| 4 | Rezultati karakterizacije postava | 71 |
| 4.1 | Rezultati karakterizacija postava TA | 71 |
| 4.1.1 | Vremenska karakterizacija pulseva | 71 |
| 4.1.2 | Spektralna karakterizacija probnog pulsa | 73 |
| 4.1.3 | Vremenska rezolucija postava | 75 |
| 5 | Fotokemija proučavanih međuprodukata | 77 |
| 5.1 | Kinon metidi | 77 |
| 5.1.1 | Biološka važnost QM | 78 |
| 5.1.2 | Sinteza QM | 80 |
| 5.1.2.1 | Sinteza QM fotokemijskim putem | 81 |
| 6 | Fotogeneracija QM-a iz adamantan fenola u ultrabrzoj reakciji fotodehidratacije | 83 |
| 6.1 | Uvod i motivacija | 83 |
| 6.2 | Priprema uzorka i metode | 85 |
| 6.2.1 | Eksperimentalne metode | 85 |
| 6.2.2 | Priprema uzorka | 86 |
| 6.2.3 | Računske metode | 86 |
| 6.3 | Eksperimentalni rezultati | 87 |
| 6.3.1 | Apsorpcija uzorka | 87 |
| 6.3.2 | Fs-TA rezultati | 87 |
| 6.3.3 | LFP rezultati - μ s skala | 94 |
| 6.3.4 | LFP rezultati - ms skala | 95 |
| 6.3.5 | Mjerenja vremenski razlučive fluorescencije | 97 |
| 6.3.6 | Rezultati teorijskih simulacija | 101 |
| 6.4 | Diskusija | 103 |
| 7 | Mehanizmi stvaranja QM-a fotodehidratacijom derivata 2-naftola | 107 |
| 7.1 | Derivati 2-naftola | 107 |
| 7.2 | Metode | 109 |
| 7.2.1 | Priprema uzoraka | 109 |
| 7.2.2 | Eksperimentalne metode i parametri | 109 |
| 7.2.3 | Računske metode | 110 |
| 7.3 | Eksperimentalni rezultati | 110 |
| 7.3.1 | Apsorpcija i fluorescencija uzorka | 110 |
| 7.3.2 | Fs-TA rezultati | 111 |
| 7.3.2.1 | Naftol - 1 | 111 |
| 7.3.2.2 | Adamantan-naftol - 2 | 115 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 7.3.3 | LFP rezultati | 120 |
| 7.3.3.1 | Naftol - 1 | 120 |
| 7.3.3.2 | Adamantan-naftol - 2 | 122 |
| 7.4 | Rezultati teorijske analize | 125 |
| 7.4.1 | Naftol - 1 | 125 |
| 7.4.2 | Adamantan-naftol - 2 | 125 |
| 7.5 | Diskusija o mehanizmu reakcija | 128 |
| 8 | Anti-Kasha fotokemija BODIPY-fenola | 131 |
| 8.1 | Anti-Kasha fizika | 131 |
| 8.2 | BODIPY-QM | 132 |
| 8.3 | Eksperimentalni rezultati | 134 |
| 8.3.1 | fs-TA mjerenja | 134 |
| 8.3.2 | FLUC mjerenja | 137 |
| 8.3.3 | Dodatna analiza fluorescencije BODIPY-fenola | 139 |
| 9 | Diskusija | 141 |
| | Literatura | 143 |
| | Životopis | 157 |

Popis slika

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | Envelopa (zeleno) i električno polje pulsa (crveno). Puls bez prisutnog cvrkuta (a) i pulsevi sa prisutnim negativnim (b) i pozitivnim cvrkutom (c). | 12 |
| 1.2 | A) Električno polje pulsa pod utjecajem samofazne modulacije. B) Intenzitet pulsa pod utjecajem samoustrmljenja | 15 |
| 1.3 | Filamentacija laserske zrake uzrokovana samofokusiranjem i defokusiranjem zbog plazme stvorene višefotonskom ionizacijom. | 16 |
| 1.4 | Pregled eksperimentalno mjerenih superkontinuum stvorenih pumpnom valnom duljinom od 800nm u raznim materijalima. Podaci su preuzeti iz: voda - [43], kvarc - [44], YAG, safir - [45], BaF ₂ , CaF ₂ - [46], LiF - [47]. | 17 |
| 1.5 | Pojednostavljena shema eksperimentalnog postava metode TA. | 18 |
| 1.6 | Tipični proces mjerenja tranzijentne apsorpcije korišten u ovom radu. A) <i>Pump on</i> situacija gdje prekidač zrake propušta pumpni puls čime intenzitet probnog pulsa iznosi $I_{on}(\lambda, t)$ i B) prekidač zrake blokiranjem svakog drugog pumpnog pulsa u <i>pump off</i> situaciji omogućava referentni intenzitet probnog pulsa $I_{off}(\lambda, t)$ u odnosu na kojeg se mjeri promjena apsorpcije uzorka. | 21 |
| 1.7 | Shematski prikaz GVM (eng. group velocity mismatch) efekta. Zbog različitih grupnih brzina, pumpni i probni puls se tijekom propagacije kroz uzorak pomiču jedan u odnosu na drugoga što efektivno dovodi do lošije vremenske rezolucije postava. | 23 |
| 1.8 | Skica protočnog sustava korištenog u mjerenjima. Protočnom pumpom osigurava se svjež uzorak za svaki nadolazeći pumpni puls. | 24 |
| 1.9 | Interpretacija signala u TA. Pozitivan signal (crvena boja) dobiva se apsorpcijom pobuđenog stanja ili apsorpcijom produkta/međuprodukta/tripletnog stanja. Negativan signal dobiva se izbjeljivanjem osnovnog stanja te stimuliranom emisijom. Signal jednak nuli dobiva se prilikom nepromijenjene apsorpcije uzorka. | 25 |
| 1.10 | fs-TA mjerenja derivata naftola (adamantan-naftol) otopljenog u CH ₃ CN-H ₂ O (3:1). A) spektrogram mjerenja. B) Kinetički profili na 3 karakteristične valne duljine sa rezultatima prilagodbe (isprekidane linije) i C) TA spektri za razne vremenske trenutke. Smjer spektralne evolucije označen je strelicama. | 26 |
| 1.11 | A) Proces praćenja fotokemijskih reakcija metodom ultrabrze tranzijentne apsorpcije za fotokemijsku reakciju. Crvenom linijom označeni su pozitivni signali, a plavom negativni. Uz strelice označene su valne duljine prijelaza. B) Kinetički model simulirane fotokemijske reakcije. | 28 |

| | | |
|------|--|----|
| 1.12 | Simulacija TA mjerenja za ireverzibilnu fotokemijsku reakciju čija je shema dana na slici 1.11. A) 2D spektrogram mjerenja, B) vremenski profili za 4 karakteristične valne duljine. C) i D) vremenska evolucija spektara. Strelicama su označeni smjerovi vremenske evolucije određenih spektralnih pojaseva. | 29 |
| 1.13 | Vremenski profili artefakata TA metode u čistom otapalu na valnoj duljini od 325nm. A) TPA artefakt dobiven u mješavini acetonitrila i vode (1:1) na snazi pumpnog pulsa od 1.2mW. B) XPM artefakt dobiven u mješavini acetonitrila i vode (3:1) na snazi pumpnog pulsa od 0.22mW. | 32 |
| 1.14 | Prikaz vremenskog preklapanja pumpnog i probnog pulsa u početnom koraku mjerenja i u kasnijem trenutku mjerenja. | 35 |
| 1.15 | A) Nagib nultog vremena u spektrogramu TA mjerenja kao posljedica cvrkuta. B) Mjerenja dobivena naknadnom eliminacijom cvrkuta, signal nastaje u istom trenutku za sve valne duljine. | 36 |
| 1.16 | Prikaz eliminacije artefakta na mjerenjima naftola (odabrana valna duljina je 322nm). a) Izmjereni vremenski profil sa jasno vidljivim XPM artefaktom. Na prikazan profil se prilagođava konvolucija IRF-a i zbroya gausijana i njegovih derivacija (dio za artefakt) te konvolucija IRF-a i eksponencijalne funkcije (vidi <i>Metode analize mjerenja</i>) kao dio koji odgovara dinamici fotoinduciranog procesa. b) XPM artefakt dobiven konvolucijom IRF-a i gausijana i njegovih derivacija sa parametrima dobivenima prilagodbom (dio za artefakt). c) Crveno - vremenski profil bez artefakata dobiven oduzimanjem dijela za artefakt dobivenog prilagodbom. | 37 |
| 1.17 | Prikaz utjecaja polarizacije na TA mjerenja. U slučaju molekula sa izraženim dipolnim momentom pumpni puls efektivno reorijentira dipolne momente molekula (lijevo) koji se vremenskom evolucijom vraćaju nasumičnim orijentacijama (desno). U slučaju pulseva okomite polarizacije stimulirana emisija je izraženija nakon rotacijske difuzije jer je određeni dio dipolnih momenata prijelaza orijentiran u smjeru polarizacije probnog pulsa. Takvi dipolni momenti označeni su tamnijom bojom od onih okomitih na polarizaciju probne zrake. | 39 |
| 1.18 | Usporedba TA mjerenja uzorka sa izraženim električnim dipolnim momentom (adamantan-naftol otopljen u mješavini acetonitrila i vode 3:1) pri paralelnim polarizacijama pumpnog i probnog pulsa te na polarizacijama pod magičnim kutem. U slučaju paralelnih polarizacija vidljiva je početna dinamika trajanja 20-ak ps što je zapravo τ_{reor} . Svakom od 6 vremenskih profila je nadodana vrijednost n-0.001mOD kako bi se odvojili jedan od drugoga zbog lakše preglednosti. | 40 |
| 1.19 | Shematski prikaz temeljnog dijela vremenski razlučivih mjerenja fluorescencije. Obojeni dio fluorescencije zbraja se sa pulsom za uzorkovanje u nelinearnom kristalu. | 42 |
| 1.20 | Vremenski (A) i geometrijski (B) raspored pulseva tijekom 2D spektroskopskih mjerenja. Na slici B prikazan je nekolinearni raspored pulseva gdje se signal detektira spektralnom interferometrijom sa lokalnim oscilatorom. Također, raspored pulseva u prostoru može biti i kolinearan. | 47 |

| | | |
|------|--|----|
| 1.21 | Spektrogrami mjerenja 2D spektroskopijom. Svaki pojedini spektrogram posjeduje os pobude i os detekcije. Za različito vrijeme čekanja dobiva se potpuno novi spektrogram sa novim osima pobude i detekcije. | 48 |
| 2.1 | Tranzijentna apsorpcija molekule derivata naftola. Spektrogram (lijevo) te dinamika u vremenu za 3 odabrane valne duljine (desno). Pripadne funkcije prilagodbe označene su isprekidanom linijom crne boje. | 50 |
| 2.2 | Eksponencijalna funkcija pomnožena sa step funkcijom (plava linija) i eksponencijalna funkcija konvoluirana sa gausijanom poluširine 150fs (crvena linija). | 51 |
| 2.3 | A) Sekvencijalni model, B) paralelni model i C) ciljani model fotokemijske reakcije ili fotoinduciranog procesa. | 53 |
| 2.4 | Shematski prikaz globalne analize eksperimentalnih podataka dobivenih određenom metodom ultrabrze spektroskopije. Matrica ΔA se dekomponira na vremenske profile T_i te pridružene spektre S_i | 54 |
| 2.5 | TA mjerenja DCM-a. Spektrogram (lijevo) te evolucija pripadnih spektara (desno). Strelicama je naznačen smjer vremenske evolucije istaknutih spektralnih pojaseva. | 55 |
| 2.6 | Tijekom reorijentacije polarnog otapala oko molekule DCM dolazi do snižavanja energije pobuđenog stanja što kao posljedicu ima kontinuiranu promjenu valnih duljina stimulirane emisije i apsorpcije višeg stanja. Crvenim strelicama označeni su dipolni momenti molekula polarnog otapala dok su crnim strelicama označeni dipolni momenti DCM-a. | 56 |
| 2.7 | SVD analiza TA mjerenja molekule DCM-a. A) Prvih deset singularnih vrijednosti, B) vremenski profili i (C) spektri pripadnih singularnih vrijednosti. Prve dvije singularne vrijednosti su najizraženije dok su i pripadni spektri i vremenski profili najmanje šumoviti. Zbog toga se u daljnjim razmatranjima i pretpostavljanjima kinetičkog modela pretpostavlja da su u mjerenju prisutna 2 stanja. | 57 |
| 2.8 | Rezultati globalne analize TA mjerenja DCM-a. Rezultati pokazuju međusobno pomaknute spektre (B) te kinetičke profile (C). Dobivene konstante rata su dane su dane na slici (A) uz prikaz korištenog modela. | 58 |
| 3.1 | Shematski prikaz laserskog sustava. Preuzeto iz [38] | 60 |
| 3.2 | Postav za ultrabrznu tranzijentnu apsorpciju korišten u eksperimentu. Oznake: BS - djelatelji snopa, L - leće, M - zrcala, S - prekidači zrake, HS - separatori harmonika | 62 |
| 3.3 | Translator CaF_2 kristala. Sastoji se od postolja za laser CD čitača, zvučnika spojenog na H-most kojime upravlja arduino te linearnog translatora. | 64 |
| 3.4 | Spektar bijele svjetlosti stvorene u CaF_2 kristalu debljine 3mm. Kao pumpna valna duljina korišteni su pulsevi valne duljine 800nm energije $1\mu\text{J}$ čiji je nefiltrirani ostatak također spektralno razlučen. | 65 |
| 3.5 | Protočna kiveta optičkog puta 0.5mm korištena u mjerenjima. | 66 |
| 3.6 | Sustav za detekciju kućne izrade. | 67 |
| 3.7 | Stvaranje pumpne zrake u drugom TA postavu. | 69 |

| | | |
|-----|---|----|
| 4.1 | Shema FROG metode. Ulazna zraka dijeli se na dvije identične koje se pod kutem fokusiraju u BBO nelinearni kristal gdje dolazi do SHG procesa. Zbog očuvanja impulsa između ulaznih zraka dolazi do stvaranja SHG zrake. | 72 |
| 4.2 | A) FROG spektrogram i B) rezultat prilagodbe na eksperimentalne rezultate. C) intenzitet električnog polja (plava linija) i pripadna faza (crvena linija). D) spektralna amplituda (plava linija) te pripadna spektralna faza (crvena linija). | 73 |
| 4.3 | Spektar bijele svjetlosti stvorene u CaF ₂ kristalu debljine 3mm. Iznad 730nm intenzitet slabi zbog korištenja filtera za filtriranje fundamentalne zrake. | 74 |
| 4.4 | Vremenski profil XPM artefakta na 322nm u mješavini destilirane vode i acetonitrila (1:3). Plavom bojom prikazana je krivulja prilagodbe 2.1 dok je mjerenje prikazano crvenim točkama. Krivulja prilagodbe je konvolucija gausijanske funkcije i pripadnih derivacija sa IRF funkcijom koja je modelirana također gausijanskom funkcijom. Kao FWHM vrijednost IRF-a (rezolucija postava) dobila se vrijednost 219 ± 2 fs. Snaga pumpne zrake iznosila je 200 μW odnosno energija po pulsu iznosila je 0.2nJ. | 75 |
| 5.1 | Struktura para-kinona (p-kinon) te općenita struktura QM (orto-QM, para-QM) i primjer molekule adamantan fenol-QM-a koji ne posjeduje općenitu strukturu. | 78 |
| 5.2 | Osnovni princip djelovanja fototerapeutika. Preuzeto iz [94]. | 79 |
| 5.3 | Prekursori QM koji pokazuju antiproliferativnu aktivnost. | 80 |
| 5.4 | Nastajanje QM termičkim putem: zagrijavanje te eliminacija skupine ROH sa prekursora. | 81 |
| 5.5 | Fotokemijsko stvaranje QM-a iz adamantan fenola. Pobudom adamantan fenola laserskim pulsem valne duljine 267nm u S ₁ elektronsko stanje dolazi do eliminacije molekule H ₂ O u reakciji fotodehidratacije i stvaranja QM u S ₀ osnovnom elektronskom stanju. | 82 |
| 6.1 | Fotodehidratacija <i>o</i> -hidroksimetilfenola (1) i dobivanje QM u pobuđenom stanju (2). | 84 |
| 6.2 | Fotokemijsko stvaranje QM-a 4 (S ₀). | 85 |
| 6.3 | Normalizirani ekscitacijski (crveno) i emisijski (crno) spektri molekule 3 u CH ₃ CN-H ₂ O (1:1). Naznačene su emisijska i ekscitacijska valna duljina. | 87 |
| 6.4 | (A) TA spektrogram fotokemije molekule 3 u CH ₃ CN-H ₂ O (1:1) dobiven korištenjem prvog postava za fs-TA (pumpni puls = treći harmonik). (B) Kinetički profili za odabrane, karakteristične valne duljine i (C) spektri za odabrane vremenske trenutke. Vrijeme je dano na logaritamskoj skali. | 88 |
| 6.5 | Bi-eksponencijalna prilagodba na vremensku dinamiku otopljenog elektrona na 600nm. Prilagodbom su dobivena karakteristična vremena od 28.5ps i 1.5ns. S obzirom na puno dulja vremena od brzine rasta signala i trajanja artefakta, izbacivanjem prvih nekoliko točaka, uključujući i rast signala nije došlo do smanjenja točnosti prilagodbe. | 90 |

| | | |
|------|--|-----|
| 6.6 | Ovisnost jačine signala o energijskom toku pumpe u otapalu i uzorku na fiksnom vremenskom razmaku od 10ps. Otapalo (gornji red) pokazuje kvadratnu ovisnost za odabrane valne duljine 425nm i 600nm dok uzorak (donji red) pokazuje linearnu ovisnost za iste valne duljine. | 91 |
| 6.7 | Ultrabrza dinamika molekule 3 za tri odabrane valne duljine, mjerena drugim fs-TA postavom sa vremenskom rezolucijom 50fs koristeći sub-20fs UV NOPA pulseve kao pumpne pulseve. 3 je otopljen u CH ₃ CN-H ₂ O (1:1). Isprekidane crne linije predstavljaju prilagodbu eksponencijalnih funkcija konvoluiranih sa IRF-om uz modelirane artefakte. | 93 |
| 6.8 | ns-TA (LFP) mjerenja molekule 3 otopljene u CH ₃ CN-H ₂ O (1:1) koncentracije $c = 2.0 \times 10^{-4}M$. Prikazani su spektri u vremenu i prilagodba monoeksponencijalne funkcije na kinetički profil na 400nm. Lijevo - mjerenja uzorka propuhanog mlazom argona i desno - uzorak propuhan mlazom O ₂ . Energija laserskog pulsa valne duljine 266nm podešena je na 17mJ po pulsu. | 95 |
| 6.9 | ms-TA (LFP) mjerenja molekule 3 otopljene u CH ₃ CN-H ₂ O (1:1) koncentracije $c = 2.0 \times 10^{-4}M$. Prikazana je prilagodba monoeksponencijalne funkcije na kinetički profil na 400nm. Lijevo - mjerenja uzorka propuhanog mlazom argona i desno - uzorak propuhan mlazom O ₂ . Energija laserskog pulsa valne duljine 266nm podešena je na 17mJ po pulsu. | 96 |
| 6.10 | ms-TA (LFP) mjerenja molekule 3 otopljene u CH ₃ CN-H ₂ O (1:1) koncentracije $c = 2.0 \times 10^{-4}M$. Prikazani su spektri u vremenu i prilagodba monoeksponencijalne funkcije na kinetički profil na 400nm. Lijevo - mjerenja uzorka propuhanog mlazom argona i desno - uzorak propuhan mlazom O ₂ . Energija laserskog pulsa valne duljine 266nm podešena je na 17mJ po pulsu. | 97 |
| 6.11 | Dvije optimizirane strukture (3 i 3') molekule adamantan fenola dobivene na nivou teorije PCM(water)/ωB97XD/6-311++G(d,p). Relativne energije dane su u kcal mol ⁻¹ i naznačene su u zagradama. Intramolekularna vodikova veza označena je isprekidanom linijom u slučaju konformera 3 | 98 |
| 6.12 | (A) i (B) - Vremenska evolucija spektra fluorescencije molekule 3 ($c = 5.0 \times 10^{-4} M$ u CH ₃ CN-H ₂ O (1:1)). (C) Vremenski profil fluorescencije na 307nm i bi-eksponencijalna funkcija prilagodbe konvoluirana sa IRF-om poluširine 630fs. Druga eksponencijalna konstanta fiksirana je na 2ns jer je vremenski prozor mjerenja ograničen na 50ps. Uz trnuće eksponencijalne funkcije, dodana je eksponencijalna funkcija koja odgovara porastu signala. | 99 |
| 6.13 | Fluorescencijski intenzitet FLUC mjerenja molekule anizola otopljene u acetonitrilu. Molekula anizola korištena je kao primjer ne-reaktivne molekule kod koje rast signala odgovara vremenskoj rezoluciji eksperimenta. IRF funkcija je predstavljena parametrom KB dok su slovom A označene amplitude eksponencijalnih funkcija, C su eksponencijalne konstante, OS označava odmak, a D vremenski pomak. | 101 |
| 6.14 | Apsorpcijski spektar prvog pobuđenog elektronskog stanja (ESA) molekule 3 dobiven TD-DFT računskom metodom. | 102 |
| 6.15 | Apsorpcijski spektar osnovnog elektronskog stanja (ESA) molekule 4 dobiven TD-DFT računskom metodom. | 103 |

| | | |
|------|--|-----|
| 6.16 | Rezultati TD-DFT simulacija. Izračunate su stacionarne točke za osnovno i prvo pobuđeno stanje molekula 3 i 4 na nivou teorije PCM(water)/(TD-)ωB97XD/6-311++G(d,p). Relativne energije su dane u kcal mol ⁻¹ . Vertikalna pobuda S ₀ → S ₁ odgovara 243nm za 3 i 380nm za 4 | 104 |
| 6.17 | Sažetak rasvijetljenog puta fotokemijske reakcije stvaranja QM-a iz adaman-tan fenola uz naznačene karakteristične vremenske konstante dobivene pomoću različitih metoda vremenski razlučive laserske spektroskopije potkrijepljene teorijskim simulacijama. Proces rotacijske difuzije (22ps iz FLUC mjerenja) nije prikazan na slici s obzirom da proces nije nužno bitan za fotokemijsku reakciju. | 106 |
| 7.1 | Fotokemijsko stvaranje 1-QM sa derivatom benzokseta (1-BO) kao međupro-dukтом koji ulazi u reakciju otvaranja prstena.[112] | 108 |
| 7.2 | Fotodehidratacija molekule 2 i stvaranje odgovarajućeg 2-QM . [117] | 108 |
| 7.3 | Apsorpcijski spektri (lijevo) derivata naftola 1 i 2 u CH ₃ CN i normalizirani emi-sijski spektri (desno) u CH ₃ CN i CH ₃ CN-H ₂ O (1:1) uz pobudu na λ = 310nm. | 111 |
| 7.4 | A) 2D TA spektrogram uzorka 1 , B) odgovarajuća vremenska dinamika zajedno s rezultatima prilagodbe (isprekidane linije) na 3 odabrane valne duljine sa odu-zetim koherentnim artefaktom. C) TA spektri prikazani za odabrana vremena. Strelice ukazuju na smjer spektralne evolucije u vremenu. | 112 |
| 7.5 | Dva modela korištena prilikom globalne i target analize rezultata fs-TA mjere-nja uzorka 1 koji su davali najbolju kvalitetu prilagodbe. | 112 |
| 7.6 | Rezultati target analize za naftol 1 dobiveni korištenjem modela 1 sa četiri ki-netičke konstante. Na slici su prikazani SAS spektri (lijevo) i vremenski profili kojima je opisana evolucija odgovarajućih SAS-ova prikazana na logaritamskoj skali. | 113 |
| 7.7 | Rezultati target analize za naftol 1 dobiveni korištenjem modela 2 sa četiri ki-netičke konstante. Na slici su prikazani SAS spektri (lijevo) i vremenski profili kojima je opisana evolucija odgovarajućih SAS-ova prikazana na logaritamskoj skali. | 113 |
| 7.8 | Usporedba TA spektara uzorka 1 (plavo) i otapala (narančasto) u zadnjoj dos-tupnoj vremenskoj točki (1.1ns). Povećana apsorpcija uzorka na duljim valnim duljinama (>500nm) ukazuje na povećanu koncentraciju otopljenih elektrona u otopini uzorka što ukazuje na stvaranje radikal kationa. | 114 |
| 7.9 | fs-TA mjerenja uzorka 2 otopljenog u CH ₃ CN-H ₂ O (3:1). A) spektrogram mje-renja. B) Kinetički profili na 3 karakteristične valne duljine sa rezultatima pri-lagodbe (isprekidane linije) i C) TA spektri za razne vremenske trenutke. Smjer spektralne evolucije označen je strelicama. | 116 |
| 7.10 | Kinetički profili sa rezultatima prilagodbe (isprekidane linije) na karakteristič-nim valnim duljinama za uzorak 2 . A) Normalizirani kinetički profili dobiveni prvim fs-TA postavom vremenske rezolucije 250fs. B) Dinamika na karak-terističnim valnim duljinama i C) početni TA spektri mjereni drugim fs-TA postavom vremenske rezolucije <50fs. Smjer spektralne evolucije označen je strelicama. Na A) i B) prethodno su oduzeti koherentni artefakti. | 117 |
| 7.11 | Sekvencijalni model korišten prilikom globalne analize fs-TA mjerenja uzorka 2 . | 118 |

- 7.12 Evolucijski spektri (EAS) sekvencijalnog modela globalne analize sa 3 kinetičke konstante (lijevo) i pripadni kinetički profili na logaritamskoj skali (desno). 119
- 7.13 LFP mjerenja uzorka **1** otopljenog u CH_3CN nakon propuhivanja mlazom O_2 (lijeva strana) i u mješavini $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (1:1) (desna strana). Gornji red prikazuje spektralnu evoluciju dok donji red prikazuje kinetičke profile na valnim duljinama 320nm i 360nm. Jasno je vidljivo kako trnjenje signala na 360nm odgovara rastu signala na 320nm koji je pripisan QM-u. Kako do stvaranja QM-a dolazi tek na mikrosekundnoj skali, nemoguće ga je opaziti u fs-TA eksperimentima. 121
- 7.14 LFP mjerenja uzorka **1** otopljenog u mješavini $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (1:1) propuhanoj mlazom O_2 u prisutnosti natrij-fosfatnog pufera (pH 7.0, 50mM) i askorbinske kiseline. A) Kinetički profili signala na 350nm za razne koncentracije askorbinske kiseline. Vidljivo je kako se dodavanjem askorbinske kiseline skraćuje vrijeme života signala i njegov intenzitet. B) Linearna prilagodba na graf ovisnosti konstante brzine reakcije o koncentraciji askorbinske kiseline i C) linearna prilagodba ovisnosti razlike intenziteta signala od maksimalnog naspram koncentracije askorbinske kiseline. 122
- 7.15 A) Fluorescencijski spektar naftola **1** u $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (1:1) u prisutnosti natrij-fosfatnog pufera (50mM, pH 7.0) pri različitim koncentracijama askorbinske kiseline. B) apsorpcijski spektar askorbinske kiseline ($c=5.22 \cdot 10^{-5}\text{M}$) u prisutnosti natrij-fosfatnog pufera (50mM, pH 7.0). C) Linearna prilagodba na graf omjera fluorescencijskog maksimuma bez dodane askorbinske kiseline i sa dodanom askorbinskom kiselinom u ovisnosti o njenoj koncentraciji. 123
- 7.16 LFP mjerenja uzorka **2** otopljenog u mješavini $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (1:1). A) Spektralna evolucija u otopini propuhanoj mlazom O_2 . Signali na 370nm i 470nm, pripisani QM-u trnu na mikrosekundnim skalama bez dodatnih međuprodukata. B) i C) Vremenska dinamika na 440nm (triplet-triplet apsorpcija). B) otopina propuhana mlazom N_2 i C) otopina propuhana mlazom O_2 . Signal je prigušen u slučaju C) što podupire asignaciju triplet-triplet apsorpcije signalu na 440nm. Rezultati su preuzeti iz [117]. 124
- 7.17 Shema mehanizma fotokemijske reakcije dehidratacije adamantan-naftola **2** koja rezultira stvaranjem **2-QM**(S_0) preko konusnog presjeka. Konstanta od 56fs predstavlja internu konverziju S_2 stanja u S_1 stanje te radi jednostavnosti prikaza nije popraćena grafičkim prikazom. Konstanta od 3.9ps predstavlja vibracijsku relaksaciju S_1 stanja. 126
- 7.18 Shema mehanizma fotodehidratacije naftola **1** preko fenoksil radikala **1-R** kao međuprodukta u stvaranju QM-a. 126
- 7.19 Rezultat TD-DFT teorijskih simulacija stvaranja QM-a iz uzorka **2**. Stacionarne točke osnovnog i prvog pobuđenog stanja izračunate su na nivou teorije PCM(water)/(TD-) $\omega\text{B97XD/6-311++G(d,p)}$. Relativne energije dane su u kcal mol^{-1} . Razlika energija koja odgovara konusnom presjeku iznosi $1.0 \text{ kcal mol}^{-1}$. Teorijski izračunata vertikalna pobuda iz S_0 u S_1 za **2** odgovara 286nm dok za **2-QM** odgovara 526nm. 127

| | | |
|------|--|-----|
| 7.20 | Rezultat TD-DFT teorijskih simulacija za fotokemijsku reakciju stvaranja QM-a iz uzorka 1 . Stacionarne točke osnovnog i prvog pobuđenog stanja izračunate su na nivou teorije PCM(water)/(TD-)ωB97XD/6-311++G(d,p). Relativne energije dane su u kcal mol ⁻¹ . Teorijski izračunata vertikalna pobuda iz S ₀ u S ₁ za 1 odgovara 285nm dok za 1-QM odgovara 549nm. | 128 |
| 7.21 | Rezultat računskih simulacija apsorpcijskog spektra stanja 2-QM(S₀) | 129 |
| 8.1 | Prikaz kršenja Kashinog pravila. U anti-Kasha procesu dolazi do fluorescencije iz S ₂ elektronskog stanja molekule. IC = interna konverzija. | 132 |
| 8.2 | Apsorpcijski i emisijski spektar BODIPY-fenola u CH ₃ CN-H ₂ O (1:9). U kutu grafa se nalazi shematski prikaz molekule. | 133 |
| 8.3 | Označavanje proteina BODIPY-QM. Preuzeto iz [143]. | 134 |
| 8.4 | Dinamika spektara u vremenu i vremenski profili na karakterističnim valnim duljinama za BODIPY-fenol prilikom pobude na 267nm (lijevi stupac) i 400nm (desni stupac). Koherentni artefakt prilikom kod pobude na 400nm je izraženiji zbog kraćih pumpnih pulseva u spomenutom slučaju. | 135 |
| 8.5 | Usporedba integriranog signala TA mjerenja BODIPY-fenola. U slučaju A) GSB doprinosa i u slučaju B) SE doprinosa vremenska dinamika signala je otprilike identična. | 136 |
| 8.6 | FLUC spektrogrami i kinetički profili mjerenja BODIPY-fenola. A) pobuda na 495nm. U mjerenjima je vidljiva samo fluorescencija iz S ₁ stanja na 500nm koja posjeduje sporu dinamiku. B) pobuda na 335nm, u mjerenjima postaje vidljiva fluorescencija na 370nm. C) pobuda na 272nm, u mjerenjima je jasno vidljiva i potvrđena fluorescencija na 370nm. | 138 |
| 8.7 | Normalizirani fluorescencijski spektri BODIPY-fenola otopljenog u CH ₃ CN-H ₂ O (1:1) mjereni pobudom na različitim valnim duljinama. Umetak: Uvećani prikaz spektralnog raspona valnih duljina 300-400nm. Vidljivo je kako se mjereni anti-Kasha fluorescencijski pojas pojačava smanjivanjem valne duljine pobude te kako je u dobrom slaganju sa spektrima dobivenima vremenski razlučivim FLUC mjerenjima. | 140 |

Popis tablica

- 6.1 Vrijednosti dekonvoluiranih vremena rasta signala na tri valne duljine karakteristične za TA mjerenja molekule **3**. Vremena rasta odnose se na fs-TA mjerenja drugim TA postavom. Zadnji redak odnosi se na prilagodbu na signal integriran u rasponu 400-500nm. 94
- 8.1 Vrijednosti eksponencijalnih konstanti dobivenih prilagodbom na SPC mjerenja BODIPY-fenola otopljenog u CH₃CN-H₂O (1:1). Uz eksponencijalne konstante dani su relativni omjeri pripadnih eksponencijalnih amplituda. 140

Uvod

Ljudsko oko u mogućnosti je promatrati i pratiti procese koji se odvijaju na vremenskim skalama sporijima od 50ms. Sve procese koji se odvijaju na bržim skalama ljudska vrsta nije u mogućnosti procesuirati. Nakon što oko uoči sliku ili prirodnu pojavu potrebno je najmanje 50ms za slanje vizualne informacije od mrežnice do početka lančanog dijela mozga za procesuiranje slike. Proces se odvija u ponavljajućim petljama kojima se potvrđuje što oko zapravo vidi. Nasuprot tome, mnogi prirodni procesi poput općenite, osnovne atomske, molekularne i elektronske dinamike ili nekih biološki važnih mehanizama poput raznih dijelova fotosinteze odvijaju se na skalama puno kraćima od graničnih 50ms. Spomenuti procesi mogu biti vremenskog trajanja od samo nekoliko femtosekundi (10^{-15} s) što je za 12 redova veličine kraće od najkraćeg procesa vidljivog ljudskom oku. Naime, za zaobilaženje vremenskih ograničenja nametnutih prirodom ljudskog oka te za proučavanje spomenutih procesa potrebno je potražiti pomoć ultrabrze spektroskopije i njenog temelja - pulsnih lasera.

Za proučavanje procesa ne-razlučivih ljudskom oku u stvarnom vremenu potrebno je koristiti bljeskove svjetlosti kratkog trajanja kako bi se dinamika željenog procesa zamrznula u vremenu što se naziva vremenski razlučivim mjerenjima ili opažanjima. Smatra se kako razvoj vremenski razlučive optike počinje 1878. godine razvojem fotografskih eksperimenata velike brzine. Naime, te godine Eadweard Muybridge koristeći nekoliko fotoaparata uspio je u vremenu zamrznuti pokrete konja u trku što je rezultiralo usporenim filmom konjskog galopa. Danas se u svakodnevnom životu koriste fotoaparati (kamere) kratkog vremena ekspozicije sa funkcijom brzog lančanog fotografiranja (snimanja) kako bi se u vremenu zamrznuli kratki, oku neprimjetni događaji poput brzog zamaha krila ptice ili brzog leta nekog insekta. Vremena razlučivosti uobičajenih fotoaparata su otprilike 1ms ili nešto kraće. No, ukoliko se žele promatrati procesi kraći od navedenih potrebno je priskočiti elektroničkim uređajima poput brzih fotodioda koje omogućavaju pristup vremenskim dimenzijama mikrosekundi, nanosekundi ili čak nekoliko stotina pikosekundi. Naime, brzina fotodiode obično je ograničena ili električnim parametrima (kapacitivnošću i sl.) ili unutarnjim učincima kao što je vrijeme prolaska nositelja u području osiromašenja. No za sve kraće od spomenutoga potrebno je koristiti svjetlost samu

po sebi - laserske pulseve. Svjetlosni pulsevi mogu se koristiti ne samo za promatranje i zamrzavanje procesa u vremenu nego također i za njihovo pokretanje. Počeci pump-probe tehnike sežu u 1899. godinu, naime tada je razvijena tehnika u kojoj se koriste dva svjetlosna pulsa: ekscitacijski-pumpni puls koji pokreće svjetlom inducirani proces (fotoinducirani proces) i vremenski zakašnjeli probni puls kojim se mjere vremenski ovisne promjene optičkih svojstava promatranog uzorka (npr. apsorpcija ili refleksija)[1]. Spomenuta pump-probe tehnika je i danas najčešće korištena tehnika u gotovo svim metodama vremenski razlučive spektroskopije. 1949. godine Norrish i Porter [2] koristili su varijantu pump-probe tehnike zvanu *flash* fotoliza u kojoj se dva elektronički kontrolirana svjetlosna pulsa vremenskog trajanja u mili- ili mikrosekundama kombiniraju na uzorku kako bi se mjerili dugo-živi međuprodukti fotokemijskih reakcija (npr. tripletna stanja). 1967. godine za spomenuti rad osvojili su Nobelovu nagradu iz kemije.

Duljina trajanja bljeskova svjetlosti odnosno pulseva određuje vremensku skalu procesa koje je moguće promatrati. Klasične elektronički kontrolirane lampe, korištene u radu Norrish i Portera ograničene su na mikrosekundnoj ili čak nanosekundnoj skali stoga nisu dobar izbor za promatranje još kraćih procesa. Za promatranje procesa na vremenskim skalama kraćima od pikosekundnih potrebno je koristiti pulsne lasere kao izvore svjetlosnih pulseva. Naime, tehnikom sprezanja modova unutar laserskog rezonatora moguće je postići vremenska trajanja laserskih pulseva od nekoliko femtosekundi čime su otvorena vrata za proučavanje mnoštva ultrabrzih procesa od kojih su mnogi od velike biološke važnosti. Bez ultrakratkih laserskih pulseva proučavanje procesa od velike važnosti za život poput strukturnih promjena unutar fotosintetskih reakcijskih centara[3], ultrabrze fotorelaksacije adenina (nukleobaze prisutne u DNA)[4], dinamike pobuđenih atomskih i molekularnih stanja[5], dinamike atomskih jezgara tijekom kemijskih reakcija i sl. ne bi bilo moguće te bi i dalje bilo nepoznanica.

Pod pojmom ultrakratkih procesa općenito se podrazumijeva dinamika koja se odvija na vremenskim skalama kraćima od nekoliko pikosekundi. Ultrabrza spektroskopija, naziv za dio fizike koji obuhvaća niz eksperimentalnih metoda koje upražnjavaju ultrakratke laserske pulseve temelj je ove disertacije. Razvoj pulsnih lasera 1960-ih godina označen je kao jedan od najvažnijih događaja ultrabrze fizike i spektroskopije. Jedan od prvih pulsnih lasera razvijen je 1964. godine, a baziran je na helij-neon laserskom mediju [6]. Laser je bio u mogućnosti stvarati pulseve vremenskog trajanja od 2.5ns sa periodom repeticije od 17.8ns. Aktivno usklađivanje modova postignuto je AOM-om (akusto-optičkim modulatorom). Jedan od prvih femtosekundnih pulsnih lasera izrađen je 1980-ih godina, a baziran je na organskim bojama kao laserskom mediju [7]. U svojoj početnoj verziji laser je stvarao pulseve trajanja 100fs dok je nakon usavršavanja tehnologije trajanje pulseva smanjeno na 30fs. Danas je korištenjem Ti:safir lasera

moгуće proizvesti pulseve varijabilne valne duljine, trajanja 4-5fs koji predstavljaju najkraće pulseve korištene u femtosekundnoj spektroskopiji[8] dok su općenito najkraći laserski pulsevi trajanja stotinu (ili manje) atosekundi, a koriste se za promatranje elektronske dinamike. Naime, period molekularnih vibracija za frekvencije u rasponu od otprilike $300\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ iznosi 10-100fs što čini atomsku dinamiku unutar molekule pogodnom za proučavanje femtosekundnim laserskim pulsevima, no za proučavanje puno brže elektronske dinamike potrebno je koristiti još kraće, atosekundne pulseve[9].

Razvojem ultrabrze spektroskopije otvorilo se novo područje istraživanja - femtokemija, grana fizikalne kemije koja proučava kemijske reakcije na femtosekundnim skalama. Unutar novootvorenog područja kao jedan od najutjecajnijih znanstvenika, A.H. Zewail 1999. godine dobiva Nobelovu nagradu iz kemije za svoj rad na proučavanju dinamike atoma unutar molekule tijekom kemijske reakcije[10]. Zahvaljujući razvoju metoda stvaranja laserskih pulseva, ultrabrza spektroskopija u zadnjih nekoliko desetljeća doživjela je nagli rast i popularnost. Naime, značajan napredak ostvaren je u području stvaranja ultrakratkih pulseva čija se valna duljina, odnosno frekvencija mogu podešavati. Također, stabilnost laserskih pulseva značajno je uvećana što je veoma bitno za mjerenja vrlo malih spektralnih promjena kao što je to slučaj prilikom istraživanja fotokemijskih reakcija. Uz spomenuto, razvijene su metode ultrabrze spektroskopije koje se ne koriste u standardnom pump-probe postavu poput 2D spektroskopije, vremenski razlučiva mjerenja tranzijentne rešetke, spektroskopije četverovalnog miješanja. Korištenjem spomenutih metoda povećana je količina informacija koje se mogu izvući o sustavu kojeg se proučava.

Ultrabrza tranzijentna apsorpcija (TA), temeljna metoda ove disertacije jedna je od metoda ultrabrze spektroskopije. Metoda je vrsta pump-probe eksperimenta u kojoj se pumpni puls koristi za pobuđivanje uzorka iz osnovnog u viša stanja dok se probni puls koristi za testiranje dinamike prethodno pobuđenih stanja. Uz testiranje dinamike pobuđenih stanja, ovisno o uzorku i energiji pulseva, pumpnim pulsem moguće je inducirati određenu fotokemijsku reakciju čiji je tok u vremenu zatim moguće pratiti probnim pulsem. Kao neke od najzanimljivijih primjena tranzijentne apsorpcije moguće je navesti detaljno proučavanje transfera elektrona tijekom fotosinteze, jednog od najvažnijih bioloških procesa [11][12], proučavanje fluorescentnih proteina [13], biomimikrijskih foto-sistema [14] (umjetne imitacije sistema koji se javljaju u prirodi), fotoizomerizacije [15] (promjene oblika molekule uzrokovane apsorpcijom svjetlosti), dinamike RNA strukture [16] i sl.

Na Institutu za fiziku izgrađen je eksperimentalni postav TA metode sa mogućnošću istraživanja fotoinduciranih procesa vremenskom rezolucijom oko 200fs. Postav, čija je osnova lasersko pojačalo valne duljine 800nm također posjeduje i mogućnost odabira pumpne valne

duljine između dostupnih harmonika 267nm i 400nm. Specifikacije širokopojasnog probnog pulsa ovise o valnoj duljini pobude i mediju (kristalu) odabranom za stvaranje bijele svjetlosti. U slučaju CaF_2 kristala probni puls postava pokriva spektralni prozor sa minimalnom valnom duljinom od 320nm dok je u slučaju safirnog kristala minimalna valna duljina 400nm. Gornja granica spektralnog prozora ovisi o filtriranju pumpne zrake, a u oba je slučaja, u principu, spektar proširen do infracrvenih valnih duljina. Navedene minimalne valne duljine vrijede u slučaju pumpanja kristala fundamentalnom laserskom zrakom valne duljine 800nm dok se prilikom pumpanja valnom duljinom kraćom od navedene stvorena bijela svjetlost pomiče prema kraćim valnim duljinama.

U okviru disertacije spomenutim TA postavom proučavana je fotokemija nastajanja kratkoživućih međuprodukata sa potencijalnom primjenom u biologiji, kemiji i medicini - kinon metida (QM-a). Naziv QM se u literaturi prvi put pojavio 1942. godine dok se njihova rasprostranjenost i potencijalna primjena nije došla do izražaja sve do 1960-ih godina. Razlog tome je što su QM-i izrazito polarne molekule što ih čini vrlo reaktivnima i kratko-živućima sa vremenima života od <1ns do nekoliko sekundi ili minuta [17],[18] te zbog tadašnjih eksperimentalnih ograničenja u rezoluciji vremenski razlučive spektroskopije nisu bili u fokusu istraživanja. Njihova važnost temelji se na biološkoj aktivnosti [19],[20],[21] i sve većoj primjeni u organskoj sintezi [22],[23],[24], a također se koriste i u modifikacijama površina [25]. Njihova reaktivna priroda i kratka vremena života onemogućuju njihovu izolaciju i skladištenje te se stoga identificiraju metodama ultrabrze vremenski razlučive spektroskopije ili analizom produkata reakcija QM-a sa ostalim spojevima.

QM-i imaju brojne biološke i medicinske primjene: kao antimalarici [26], inhibitori mitohondrijske respiracije [27], inhibitori glukuronidaze [28], u detekciji fiziološki važnih tiola [29] te mnoge druge. Međutim, potencijalno najvažnija biološka aktivnost QM-a temelji se na križnom spajanju DNA lanaca odnosno antiproliferativnom (sprječavanje razmnožavanja tumorskih stanica) djelovanju zbog čega su primjenjivi u fotokemoterapiji te su jedan od najvažnijih međuprodukata u mehanizmu djelovanja raznih lijekova protiv raka te antitumorskih antibiotika [30],[25],[31]. Fotokemoterapija je jedna od metoda na kojoj je najjasnije vidljiva biološka primjena QM-a. Naime, ukoliko se pacijentu koji boluje od tumora ubrizga prekursor nastajanja QM-a koji u idealnom slučaju nije biološki aktivan te posjeduje i mogućnost akumuliranja u tumorskom tkivu, a zatim se područje tumora osvjetli valnom duljinom koja pokreće kemijsku reakciju, zbog antiproliferativnog djelovanja QM-a na tumorsko tkivo doći će do odumiranja istog. Upravo zbog metoda poput fotokemoterapije, metodama ultrabrze spektroskopije potrebno je detaljno, na femtosekundnim skalama rasvijetliti put fotokemijske reakcije od prekursorskih molekula do željenih produkata (QM-a) s obzirom da neidentificirani međuprodukti mogu ne-

željeno reagirati s biološkim molekulama.

Disertacija je podijeljena u 9 poglavlja. U prvom poglavlju dan je pregled metoda ultrabrze laserske spektroskopije. Uz navedeno, dan je i teorijski opis laserskih pulseva i nelinearnih efekata koji se često susreću u spomenutom području. Drugo poglavlje predstavlja detaljan opis analize mjerenja tranzijentne apsorpcije, odnosno analize pojedinih valnih duljina signala te globalne i target analize sa primjerom izvršene globalne analize na rezultatima TA mjerenja molekule DCM-a (laserska boja). U trećem poglavlju dan je detaljan opis eksperimentalnog postava TA metode izgrađenog na Institutu za fiziku. Kako su se tijekom disertacije ostvarile suradnje sa drugim znanstvenim grupama u svrhu potvrde TA rezultata, dani su i opisi odgovarajućih eksperimentalnih postava (vremenska razlučiva mjerenja fluorescencije te fs-TA postav sa vremenskom rezolucijom od 50fs). U četvrtom poglavlju prikazani su rezultati karakterizacije TA eksperimentalnog postava - spektri probne i pumpne zrake te FROG mjerenja autokorelacije izlazne zrake iz laserskog pojačala čime se dobiva vremensko trajanje fundamentalnih pulseva i određivanje vremenske rezolucije postava analizom koherentnih artefakata prisutnih u TA mjerenju otapala. Peto poglavlje daje opis QM-a, međuprodukata koji predstavljaju predmet proučavanja disertacije. Nakon općenitog opisa dan je pregled njihove biološke važnosti i potencijalnih i već ostvarenih primjena u biologiji, medicini i kemiji. Poglavlje završava opisom sinteze QM-a termičkim i fotokemijskim putem. Sljedeća poglavlja sadrže eksperimentalne rezultate dobivene u okvirima disertacije. Šesto potpoglavlje predstavlja detaljan opis fotogeneracije QM-a iz adamantan fenola u ultrabrzoj reakciji fotodehidratacije [32]. Slično prošlom poglavlju, sedmo poglavlje opisuje stvaranje QM-a fotodehidratacijom derivata 2-naftola [33]. Zadnji dio, osmo poglavlje opisuje anti-Kasha fotokemiju BODIPY-fenola, također prekursora QM-a. Nakon osmog poglavlja slijedi diskusija.

Poglavlje 1

Ultrabrza laserska spektroskopija

1.1 Uvodni pregled

Ultrabrza laserska spektroskopija naziv je za skup eksperimentalnih metoda koje se koriste za proučavanje ultrabrze dinamike raznih fotoinduciranih procesa raznovrsnih kompleksnih sistema počevši od najjednostavnijih - atoma, a zatim i molekula, nanostruktura te krutina. Neke od metoda koje su našle široku primjenu u proučavanju atomske i molekularne dinamike su: ultrabrza tranzijentna apsorpcija, vremenski razlučiva mjerenja fluorescencije, ultrabrza tranzijentna refleksija, 2D spektroskopija, razne tehnike četverovalnog miješanja kao što su vremenski razlučiva Raman spektroskopija [34],[35],[36] koja prati vibracije u fotopobuđenim tranzijentnim stanjima, vremenski razlučiva mjerenja tranzijentne rešetke [37] i dr. Metode ultrabrze laserske spektroskopije koriste laserske pulseve vremenskog trajanja od nekoliko femtosekundi ili čak par stotina atosekundi ako je predmet proučavanja elektronska dinamika kao što je spomenuto u uvodu. Ovo polje istraživanja je u zadnja dva desetljeća doživjelo velik i ubrzan razvoj zahvaljujući napretku u polju optike i stvaranja ultrakratkih pulseva. Danas je moguće stvoriti pulseve varijabilne valne duljine trajanja samo par optičkih perioda što uvelike olakšava i poboljšava istraživanje te ga proširuje na prije nedostižna područja i sisteme. Bitan preduvjet i moguće ograničenje u primjeni spomenutih tehnika ultrabrze spektroskopije je mogućnost pokretanja određenog fotoaktivnog procesa što uglavnom ovisi o energiji odnosno valnoj duljini pobude. Današnji laserski sustavi, najčešće uz pomoć nelinearnih procesa u optičkim parametarskim pojačalima, pokrivaju gotovo čitav elektromagnetski spektar od dubokog ultraljubičastog do dalekog infracrvenog dijela spektra, pa i šire (npr. THz). Iz tog razloga valna duljina pumpnog pulsa u današnjim modernim eksperimentalnim postavima većinom ne predstavlja ograničenje u izboru sistema za proučavanje. Uz ograničenje pumpnog pulsa, svaka od metoda posjeduje i ograničenje vezano uz probni dio eksperimenta. Kao primjer moguće je

navesti problem probnog pulsa prilikom mjerenja ultrabrze tranzijentne apsorpcije. Probni puls mora biti dovoljno spektralno širok te sa pravilno odabranom centralnom valnom duljinom kako bi se spektralno pokrio raspon dinamike proučavanog sistema. Ako su predmet proučavanja elektronska pobuđenja tada je poželjno da se spektar probnog pulsa prostire od ultraljubičastih valnih duljina sve do bliskih infracrvenih te da svaki spektralni dio bude dovoljno stabilan u vremenu što je veoma izazovno s obzirom da takav probni puls zapravo predstavlja superkontinuum odnosno pulseve bijele svjetlosti o kojoj će više riječi biti kasnije. Kod tehnike vremenski razlučivih mjerenja fluorescencije ograničenje predstavlja sama fluorescencija sistema koja nakon frekventnog zbrajanja sa probnim pulsom daje slabe signale koje je potrebno višestruko multiplicirati (npr. fotomultiplikatorima) kako bi ih se moglo detektirati željenom točnošću. O prednostima i nedostacima tehnika ultrabrze laserske spektroskopije bit će dano više detalja u nastavku.

1.2 Ultrakratki laserski pulsevi

1.2.1 Matematički opis pulseva

Temelj ultrabrze laserske spektroskopije su pulsni laseri - izvori ultrakratkih laserskih pulseva. Za pojavu laserskih pulseva odgovorna je tehnika sprezanja laserskih modova (eng. mode locking). Sprezanje laserskih modova je tehnika kojom se velikom broju monokromatskih elektromagnetskih stojnih valova (longitudinalni modovi) dobivenih emisijom laserskog medija (npr. kristala) nameće konstantan odnos u fazi. Odabirom odnosa u fazi moguće je postići konstruktivnu interferenciju longitudinalnih modova u nekoj točki u prostoru unutar laserskog rezonatora. Vlak pulseva, kratkih bljeskova svjetlosti na izlaznoj aperturi lasera je direktna posljedica sprezanja modova. Trajanje pulseva u vremenu ovisi o širini emisijskog spektra laserskog medija pod pretpostavkom da je prisutan velik broj longitudinalnih modova unutar rezonatora. Sam broj modova ovisi također o emisijskom spektru laserskog medija i o duljini optičkog rezonatora. S obzirom da je razlika u frekvenciji između longitudinalnih modova rezonatora dana relacijom $\Delta\nu = c/2L$ kao posljedica proizlazi tvrdnja da dulji optički rezonator podržava više modova za dani raspon frekvencija. Reflektivnost i transmitivnost optičkih elemenata unutar lasera također određuju broj longitudinalnih modova koji sudjeluju u sprezanju. Sprezanje modova moguće je postići aktivno i pasivno. U aktivnom sprezanju najčešće se koriste elementi poput AOM-a (akusto-optički modulator) i EOM-a (elektro-optički modulator) dok se u pasivnom sprezanju najčešće koriste saturabilni apsorber te tehnika sprezanja modova Kerrovim fokusiranjem. Ovdje će biti dan kratak matematički opis pulseva te nekih korištenih efekata

zaslužnih za nelinearno miješanje pulseva i stvaranje novih valnih duljina. Pasivne i aktivne tehnike sprezanja modova te detaljan matematički opis spomenutih efekata dani su u diplomskom radu [38].

Električno polje laserskog pulsa može se opisati sljedećim izrazom:

$$\mathbf{E}(t) = A(t)e^{i(\omega_0 t + \varphi(t) + \varphi_0)} \hat{\mathbf{x}}, \quad (1.1)$$

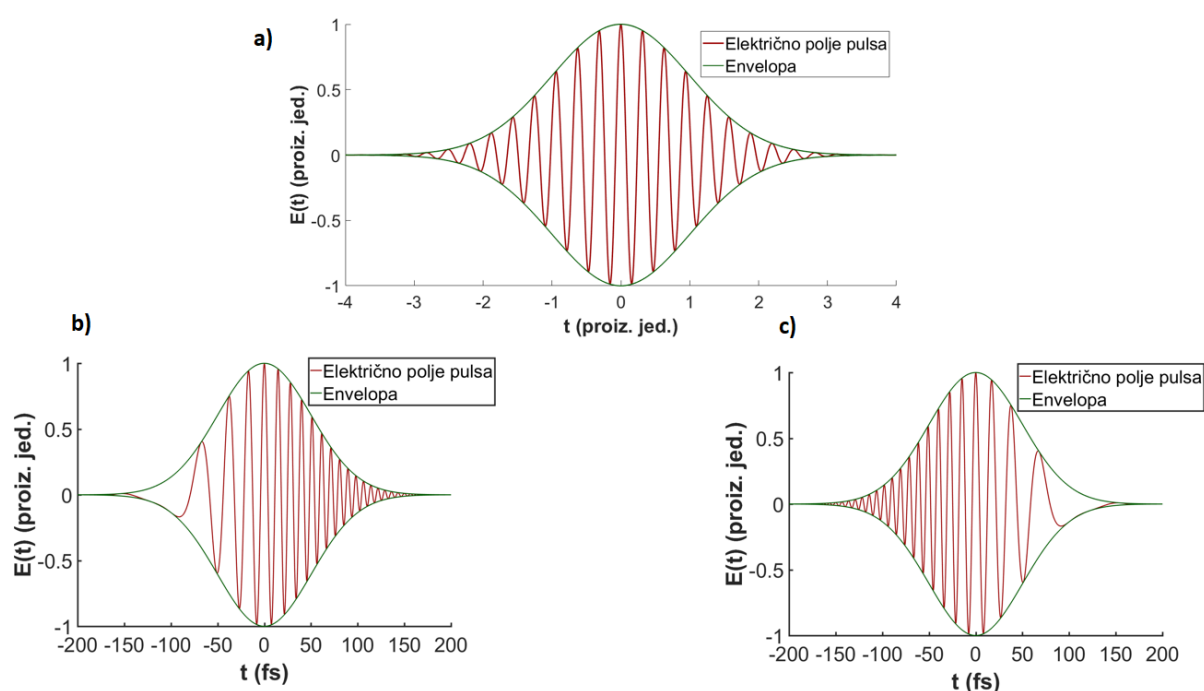
gdje je $A(t)$ envelope pulsa, ω_0 centralna frekvencija u spektru pulsa, a $\varphi(t)$ vremenski ovisna faza. φ_0 predstavlja pomak u fazi između envelope i električnog polja pulsa. Envelope pulsa je najčešće opisana Gaussovom funkcijom (gausijanom), ali moguće je istu opisati i npr. sekansom hiperbolnim. Izgled električnog polja i gausijanske envelope dan je na slici 1.1 a). Prednji dio pulsa nazivamo vodećim krilom dok stražnji dio pulsa nazivamo pratećim krilom pulsa, a maksimum pulsa nazivamo njegovim centralnim dijelom. Vremensko trajanje pulsa definira se kao puna širina na polovici maksimuma intenziteta pulsa (FWHM, eng. full width half maximum) dok je širina spektra dana kao FWHM fourier transformata intenziteta električnog polja pulsa. Spektar pulsa uvijek je širi od delta-funkcije s obzirom da se puls zapravo sastoji od mnoštva longitudinalnih modova različitih frekvencija. Za pulseve također vrijede relacije neodređenosti u frekvenciji i trajanju koje proizlaze iz Fourier transformacije. Konkretno za gausijanske pulseve vrijedi: $\Delta\omega \cdot \Delta t \geq 0.441$. Relacije neodređenosti povlače da je za širi spektar moguće (ali ne i nužno) kraće vremensko trajanje pulsa. Spomenuti umnožak je za pulseve koji posjeduju cvrkut (*vide infra*) uvijek veći od 0.441. Za pulseve čiji je umnožak širine spektra i vremenskog trajanja približno jednak graničnoj vrijednosti od 0.441 kažemo da su ograničeni transformacijom (eng. transform-limited). Na primjer, puls ograničen transformacijom čija je centralna valna duljina 800nm, a spektralna širina 9.5nm imat će vremensko trajanje od 100fs.

Kao prvi od efekata koji djeluju na vremenski oblik pulsa te njegov spektar bit će objašnjen cvrkut pulsa (eng. chirp). Cvrkut se najčešće pojavljuje zbog disperzivnosti materijala kojim je puls propagiran. Drugim riječima, prolaskom pulsa kroz disperzivni materijal, kao posljedica disperzije valne duljine, valne duljine prisutne unutar pulsa će se propagirati različitim brzinama te će se puls izdužiti u vremenu dok će se električno polje istog izmijeniti. Ukoliko je disperzija materijala takva da se dulje valne duljine propagiraju većom brzinom od kraćih (tzv. pozitivna disperzija, najčešća situacija), puls akumulira negativan cvrkut (slika 1.1 b)) dok u suprotnoj situaciji puls akumulira pozitivan cvrkut (slika 1.1 c)). Frekvencija ptičjeg pjeva posjeduje vremensku ovisnost sličnu onoj prisutnoj kod pulseva koji posjeduju cvrkut, otkuda i dolazi sam naziv efekta. Cvrkut prisutan u pulsevima moguće je pre-kompenzirati pomoću laserskog ili vanjskog kompresora ili oblikovanjem pulseva u *pulse shaper*-ima. Iznos cvrkuta moguće je izračunati korištenjem disperzije grupne brzine (GVD, eng. group velocity dispersion) koja je

definirana kao derivacija inverza grupne brzine po kutnoj frekvenciji:

$$GVD(\omega_0) = \frac{\partial}{\partial \omega} \left(\frac{1}{v_g(\omega)} \right)_{\omega=\omega_0} . \quad (1.2)$$

GVD se najčešće koristi za određivanje iznosa za koji će se puls produžiti propagacijom kroz medij. Važno je napomenuti kako kod stvaranja bijele svjetlosti, što će biti objašnjeno kasnije, dolazi do stvaranja cvrkuta kao posljedica nelinearnih optičkih efekata u pulsu zbog prostiranja pulsa iznimne spektralne širine kroz medij u kojem nastaje. Time bijela svjetlost inherentno posjeduje cvrkut.



Slika 1.1: Envelopa (zeleno) i električno polje pulsa (crveno). Puls bez prisutnog cvrkuta (a) i pulsevi sa prisutnim negativnim (b) i pozitivnim cvrkutom (c).

1.2.2 Stvaranje harmonika

Ozračivanjem materijala laserskim zračenjem dolazi do pojave oscilirajuće polarizacije unutar tog materijala, odnosno do induciranja gustoće električnih dipolnih momenata. Poznato je da polarizacije koja oscilira na frekvenciji ω stvara električno polje frekvencije ω , a ukoliko postoji komponenta polarizacije koja oscilira na frekvenciji različitoj od one nametnute vanjskim električnim poljem ista stvara električno polje frekvencije različite od one nametnute. Naime,

ukoliko je zračenje intenzivnije (kriterij koji femtosekundni laserski pulsevi zadovoljavaju) pojavljuje se i nelinearna polarizacija koja ovisi o višim potencijama intenziteta laserskog zračenja kao i o međusobnim umnošcima prostornih komponenata električnog polja što može rezultirati frekvencijama različitim od one nametnute što će u nastavku biti pokazano. Električno polje unutar materijala moguće je napisati na sljedeći način:

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \sum_n \mathbf{A}_n e^{i(\mathbf{k}_n \mathbf{r} - \omega_n t)}. \quad (1.3)$$

U prethodnoj relaciji pretpostavlja se suma po pozitivnim i negativnim frekvencijama (pod negativnom frekvencijom podrazumijevamo $-\omega_n$) jer se električno polje sastoji od dva međusobno kompleksno konjugirana člana kako bi ukupno električno polje bilo realna veličina. Koristeći istu notaciju, polarizaciju je također moguće rastaviti na komponente i tada vrijedi:

$$\mathbf{P}(\mathbf{r}, t) = \sum_n \mathbf{P}_n(\mathbf{r}, t), \quad (1.4)$$

gdje također sumacija obuhvaća i negativne frekvencije kako bi polarizacija ostala realna veličina. Također, polarizacija se može rastaviti u red potencija po električnom polju gdje su koeficijenti razvoja električne susceptibilnosti:

$$P = \epsilon_0 \chi^{(1)} E + \epsilon_0 \chi^{(2)} E^2 + \epsilon_0 \chi^{(3)} E^3 + \dots \quad (1.5)$$

Linearnom polarizacijom nazivamo prvi član reda koji je direktno proporcionalan električnom polju. Taj član oscilira frekvencijom nametnutog električnog polja te stoga ne uzrokuje pojavljivanje novih frekvencija. Ostali članovi čine nelinearnu polarizaciju te je stoga prethodnu relaciju moguće zapisati u sljedećem obliku:

$$P = \epsilon_0 \chi^{(1)} E + P^{NL}, \quad (1.6)$$

gdje drugi član označava nelinearnu polarizaciju i sastoji se od svih članova iz relacije 1.5 osim prvog. Poznato je kako općenito vrijedi [39]: $\chi^{(n+1)}/\chi^{(n)} \approx 10^{-7}$, te je svaki sljedeći red nelinearne polarizacije manjeg intenziteta. Zbog toga se na manjim intenzitetima električnog polja nelinearna polarizacija može zanemariti i većina materijala može biti opisana linearnom polarizacijom. U eksperimentima s laserskim pulsevima u kojima su nelinearni efekti poželjni biraju se materijali koji imaju što veću odgovarajuću električnu susceptibilnost. Prvi član nelinearne polarizacije moguće je definirati na sljedeći način:

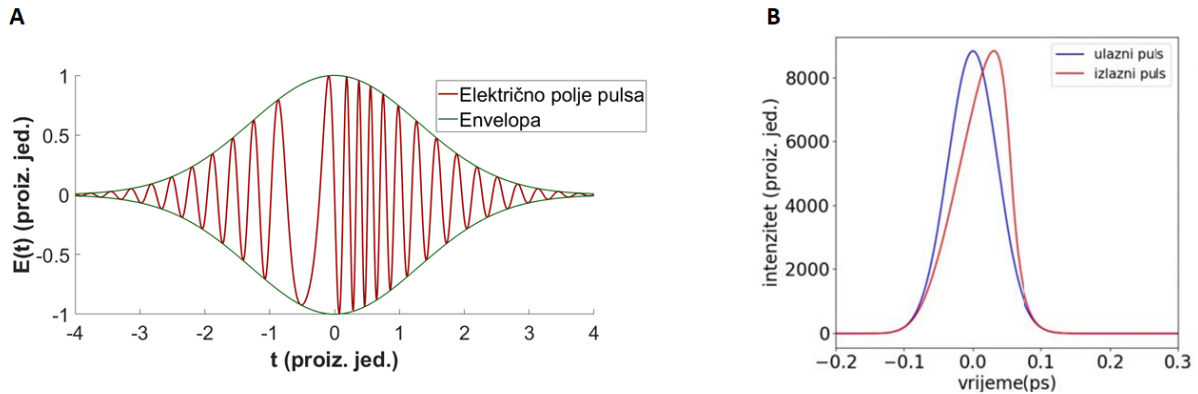
$$P_i(\mathbf{r}, t, \omega_n + \omega_m) = \sum_{jk} \sum_{nm} \epsilon_0 \chi_{ijk}^{(2)}(\omega_n, \omega_m, \omega_n + \omega_m) E_j(\mathbf{r}, \omega_n) E_k(\mathbf{r}, \omega_m) e^{-i(\omega_n + \omega_m)t}. \quad (1.7)$$

Vidljivo je kako je prethodna relacija umnožak električnih polja i električne susceptibilnosti drugog reda koja je zapravo tenzor drugog reda. Indeksi i, j, k odnose se na prostorne komponente električnog polja. Ukoliko je nametnuto samo jedno električno polje, tada je $\omega_n = \omega_m = \omega$ te je lako vidljivo kako će jedan od članova sumacije biti proporcionalan $\propto e^{i2\omega}$ što odgovara električnom polju dvostruko veće frekvencije od frekvencije ulaznog zračenja što se naziva drugim harmonikom. Nakon što se u materijalu stvori vremenski ovisna nelinearna polarizacija frekvencije drugog harmonika, ista stvara električno polje jednake frekvencije - zračenje drugog harmonika.

Ukoliko su u materijal nametnuta dva električna polja različitih frekvencija (ω_1 i ω_2), kao što je spomenuto, iz izraza 1.7 vidljivo je kako će postojati član proporcionalan $\propto e^{i(\omega_1+\omega_2)}$ što odgovara pojavi elektromagnetskog zračenja frekvencije jednake zbroju frekvencija nametnutog zračenja. Takva pojava naziva se stvaranje zračenja zbroja frekvencija (SFG, eng. sum frequency generation). Pošto je u sumaciji dozvoljeno sumiranje po negativnim frekvencijama, također će postojati član proporcionalan $\propto e^{i(\omega_1-\omega_2)}$ što odgovara pojavi zračenja frekvencije jednake razlici frekvencija nametnutog zračenja što se naziva stvaranje zračenja razlike frekvencija (DFG, eng. difference frequency generation). Najčešće korišteni materijali za nelinearno miješanje frekvencija su: β -BBO (barij-borat, BaB_2O_4), LBO (litij-triborat, LiB_3O_5), KTP (KTiOPO_4) i sl. Navedeni materijali koriste se kao kristali određene debljine precizno odrezani pod precizno određenim kutem u odnosu na njihovu optičku os. Iz relacije 1.7 vidljivo je kako su materijali nelinearni ukoliko posjeduju električnu susceptibilnost drugog ($\chi_{ijk}^{(2)}$) ili višeg reda različitu od nule.

Prilikom stvaranja nelinearne polarizacije oscilirajući dipolni momenti stvaraju električno polje. No, kako nelinearni kristal posjeduje određenu debljinu, dipolni momenti će oscilirati duž cijele duljine kristala. Kako bi se osigurala konstruktivna interferencija zračenja stvorenog iz svakog sloja materijala, potreban je pažljiv odabir kuta rezanja kristala. Efekt potpune konstruktivne interferencije zračenja iz različitih slojeva naziva se fazno usklađenim zračenjem (eng. phase-matched radiation) te se u tom slučaju na izlaznoj površini materijala postiže maksimalan intenzitet zračenja na novonastaloj frekvenciji. Iz teorijskih razmatranja izvedenih u diplomskom radu [38] slijedi da postoje dvije vrste faznog usklađivanja: tip 1 i tip 2. Pri faznom usklađivanju tipa 1, ulazna zračenja su jednake polarizacije (ordinarna ili ekstraordinarna) dok je izlazno zračenje polarizacije okomite na ulazno (ekstraordinarna ili ordinarna) što se skraćeno zapisuje ooe ili eeo. Pri faznom usklađivanju tipa 2, ulazne polarizacije su okomite odnosno u tom slučaju imamo oeo ili eoe kombinacije polarizacija zračenja. Važnost kuta rezanja kristala proizlazi iz toga što indeks loma materijala za ekstraordinarnu zraku ovisi o kutu između valnog vektora električnog polja i optičke osi. Zbog toga što intenzitet izlaznog zra-

čnja miješane frekvencije ovisi o međusobnom odnosu indeksa loma materijala na ulaznim i izlaznim frekvencijama, variranjem indeksa loma za ekstraordinarnu zraku (mijenjanjem kuta rezanja) moguće je mijenjati intenzitet izlaznog zračenja.



Slika 1.2: A) Električno polje pulsa pod utjecajem samofazne modulacije. B) Intenzitet pulsa pod utjecajem samoustrmljenja

1.2.3 Stvaranje superkontinuuma

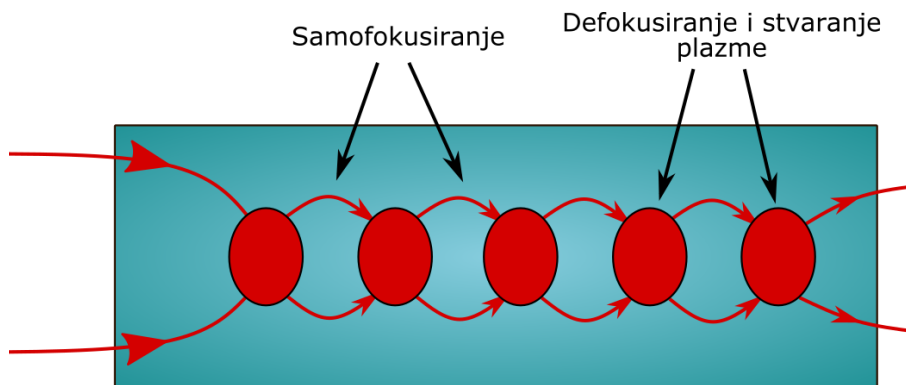
Korištenjem određenih materijala, zahvaljujući nekolicini nelinearnih procesa koji se odvijaju prolaskom pulsa kroz medij moguće je postići značajno širenje spektra laserskog pulsa. Kao primjer moguće je navesti spektralno širenje probnog pulsa prilikom mjerenja tranzijentne apsorpcije opaženo u ovoj disertaciji. Puls centralne valne duljine 800nm i spektralne širine 10nm te vremenskog trajanja 100fs moguće je spektralno proširiti na raspon valnih duljina od 320nm sve do >800 nm. Takav spektar prostire se od ultraljubičastih valnih duljina sve do infracrvenih što se naziva superkontinuumom ili bijelom svjetlošću. Uz spektralno širenje, puls se širi i u vremenskoj domeni pa tako puls superkontinuuma može imati trajanje do nekoliko ps, što između ostaloga ovisi o duljini optičkog puta u mediju u kojemu nastaje. Neki od procesa koji sudjeluju u širenju spektra su: samofazna modulacija, samoustrmljenje i Raman raspršenje, a laserska zraka samozatočena je unutar kristala zbog efekta laserski inducirane filamentacije. Efekti su temeljito opisani u diplomskom radu [38] dok će ovdje biti dan kratak pregled efekata.

Tijekom propagacije kroz kristal puls nakuplja nelinearnu fazu proporcionalnu intenzitetu samog pulsa što je direktna posljedica Kerr efekta (ovisnost indeksa loma o intenzitetu pulsa). Na taj način puls modulira sam sebe (samofazna modulacija) te dolazi do stvaranja novih frekventnih komponenti u spektru pulsa čime dolazi do spektralnog širenja. Može se pokazati kako

samofazna modulacija uzrokuje pojavu komponenti frekvencije manje od fundamentalne u vodećem krilu pulsa dok se u pratećem krilu pojavljuju frekvencije više od fundamentalne frekvencije, odnosno rast frekvencije s vremenom. Upravo takav raspored frekvencija prisutan je prilikom stvaranja bijele svjetlosti gdje se u vodećem krilu pulsa nalaze dulje valne duljine, a u pratećem krilu kraće valne duljinu. Električno polje pulsa pod utjecajem efekta samofazne modulacije prikazano je na slici 1.2A).

Efekt samoustrmljenja je također posljedica Kerr efekta. Unutar materijala, centralni dio pulsa (maksimum intenziteta) inducira nelinearni indeks loma koji se razlikuje od onoga kojeg induciraju vodeće i prateće krilo pulsa što za posljedicu ima različite grupne brzine vodećeg/pratećeg krila i centra pulsa zbog čega se vremenski profil pulsa nakrivljuje. Takvo us-trmljenje pulsa uzrokuje širenje spektra prema kraćim valnim duljinama. Intenzitet pulsa pod utjecajem efekta samoustrmljenja prikazan je na slici 1.2B).

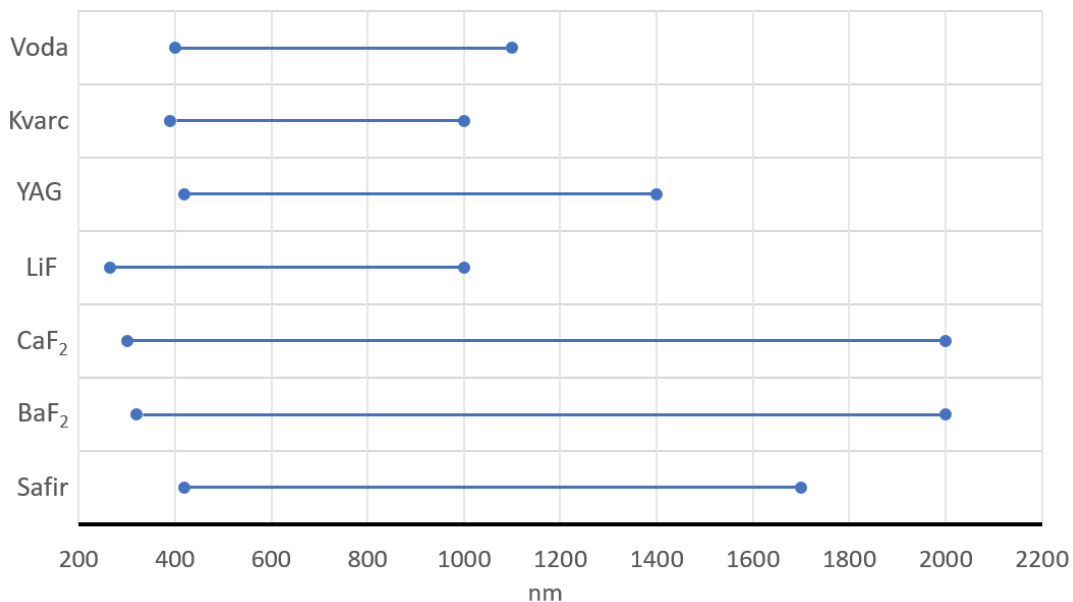
Laserski inducirana filamentacija je efekt ponavljajućeg stvaranja plazme višefotonskom ionizacijom unutar materijala zbog efekta samofokusiranja. Nakon prvotnog samofokusiranja te nakon što intenzitet prijeđe određenu granicu za stvaranje plazme, indeks loma materijala se mijenja te dolazi do defokusiranja zrake nakon čega dolazi do ponovnog samofokusiranja te stvaranja plazme što se opet ponavlja. Na taj način zraka postaje zarobljena unutar materijala tijekom propagacije. Shematski prikaz laserski inducirane filamentacije dan je na slici 1.3.



Slika 1.3: Filamentacija laserske zrake uzrokovana samofokusiranjem i defokusiranjem zbog plazme stvorene višefotonskom ionizacijom.

Za stvaranje bijele svjetlosti najčešće se koriste kristali kao što su Al_2O_3 (safir), CaF_2 (kalcij-fluorid) i $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ (YAG) debljine par milimetara. Odabir kristala ovisi o valnoj duljini laserskih pulseva kao i o željenom spektralnom rasponu bijele svjetlosti. Safir daje bijelu svjetlost s donjom granicom valnih duljina od oko 400 nm dok CaF_2 kristal daje bijelu svjetlost čija je donja granica valnih duljina pomaknuta više prema UV području (oko 320nm) stoga se za

promatranje ultrabrze dinamike u UV području često bira CaF_2 umjesto safira. Uz kristale, sve više se kao medij za stvaranje bijele svjetlosti koriste optička vlakna [40], a superkontinuum je također moguće generirati u zraku [41] i vodi [42], no u ovoj disertaciji stvaranje superkontinuuma je ograničeno na kristale. Prikaz eksperimentalno mjerenih superkontinuumova stvorenih pumpnom valnom duljinom od 800nm u raznim materijalima dan je na slici 1.4. Superkontinuum se također može dobiti pomoću valne duljine drugog ili višeg harmonika čime se donja granica spektralnog prozora superkontinuumova pomiče dodatno prema UV dijelu. No, najveća mana spomenute metode je veći šum i nestabilnost intenziteta drugog i viših harmonika naspram istih kod fundamentalne valne duljine.



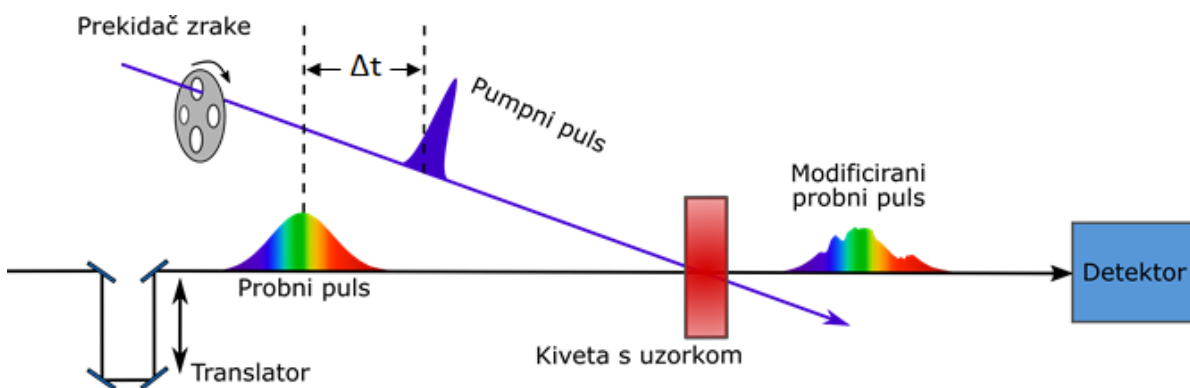
Slika 1.4: Pregled eksperimentalno mjerenih superkontinuumova stvorenih pumpnom valnom duljinom od 800nm u raznim materijalima. Podaci su preuzeti iz: voda - [43], kvarc - [44], YAG, safir - [45], BaF_2 , CaF_2 - [46], LiF - [47].

Općenito, superkontinuum je korišten u slučajevima gdje je potrebna svjetlost širokog spektra ali u isto vrijeme visokog stupnja prostorne koherencije kako bi ista mogla biti kolimirana i fokusirana. Uz primjenu u ultrabrzoj spektroskopiji za proučavanje fotoinduciranih procesa, superkontinuum ima svoju primjenu u ultrabrzoj laserskoj fizici poput detekcije i stabilizacije frekventnog pomaka između vala nosioca i envelope pulsa. Spomenuto je bitno u mjerenjima optičkih frekvencija.

1.3 Ultrabrza tranzijentna apsorpcija

1.3.1 Opis metode

Temeljna metoda ultrabrze laserske spektroskopije korištena za proučavanje kratkoživućih međuprodukata u ovoj disertaciji je ultrabrza tranzijentna apsorpcija (TA), stoga će biti opsežno opisana. TA je pump-probe tehnika u kojoj se detektiraju promjene u apsorpciji proučavanog sistema sa vremenskom i spektralnom razlučivosti. Rezolucija u vremenu, koja je vrlo bitna kod istraživanja procesa sa biološkom važnošću s obzirom da se mnogi od njih odvijaju na ultrabrzim skalama, ovisi o vremenskom trajanju pumpnog pulsa i među-korelaciji pumpnog i probnog pulsa. Kao što je spomenuto, danas je moguće postići vremensku rezoluciju mjerenu čak u atosekundama [48]. Pojednostavljeni TA eksperimentalni postav je prikazan na slici 1.5 dok će detaljni eksperimentalni postav sa svim elementima biti objašnjen u poglavlju 3. - *Eksperimentalni postav*. Izlazni pulsevi iz lasera razdvojeni su u dvije optičke grane koje nazivamo pumpna i probna zraka te je njima zasebno manipulirano u ovisnosti o sistemu kojeg se proučava. Pumpni puls u modernim eksperimentalnim postavima biva usmjeren prema dijelu eksperimenta za variranje valne duljine te skraćivanje pulsa u vremenu (npr. NOPA - nekolinearno optičko parametarsko pojačalo) kako bi se valna duljina uskladila sa apsorpcijom sistema koji je proučavan. Nadalje, u svrhu spektralne razlučivosti eksperimenta, probni puls biva usmjeren prema dijelu postava za stvaranje superkontinuuuma s obzirom da je poželjno promatrati promjene apsorpcije u što širem spektralnom rasponu. Najčešće se taj raspon proteže po cijelom vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra. Alternativno, kao probni pulsevi se mogu koristiti izlazni pulsevi NOPA-e te se u tom slučaju vrši više mjerenja za različite centralne valne duljine pulseva [49].



Slika 1.5: Pojednostavljena shema eksperimentalnog postava metode TA.

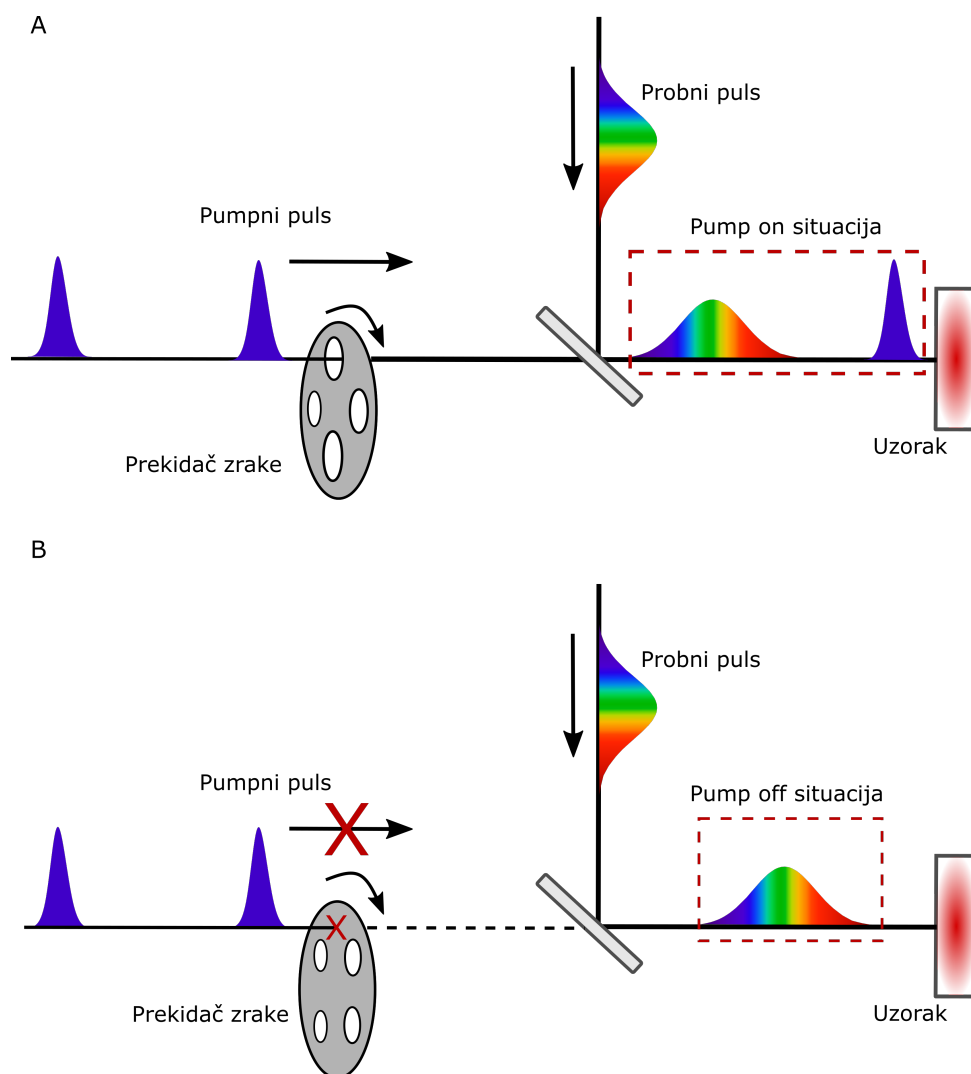
Kako bi se u eksperimentu ostvarila vremenska razlučivost, potrebna je mogućnost manipuliranja vremenskim razmakom između probnog i pumpnog pulsa što je ostvareno slanjem probnog pulsa na pomični translator sa ugrađenim retroreflektorom u svrhu mogućnosti variranja optičkog puta probnog pulsa do uzorka. Kako je optički put pumpnog pulsa do uzorka fiksiran, pomak optičkog translatora za iznos x u prostoru odgovara pomaku probnog pulsa $\frac{2x}{c}$ u odnosu na pumpni puls u vremenu, gdje je c brzina svjetlosti u vakuumu. U većini slučajeva se probni puls frekventno širi u superkontinuum tek nakon refleksije sa pomičnog translatora radi jednostavnosti i izbjegavanja mogućih polarizacijskih efekata.

Nakon stvaranja probnog i pumpnog pulsa, oba pulsa bivaju usmjereni prema uzorku. Uzorak može biti u raznim oblicima: tekućem stanju unutar kivete, u plinovitom stanju unutar komore, kao tanak film (prilikom čega se može promatrati i ultrabrza tranzijentna refleksija o čemu će biti riječi niže), uzorak u optičkom kriostatu, kao mlaz tekućine i sl. Na uzorku pulsevi moraju biti preklapljeni u prostoru, a u početnom koraku mjerenja i u vremenu stoga je potrebno voditi računa i o duljini optičkih puteva pumpne i probne zrake. Poželjno je da zrake budu preklapljene na uzorku pod što manjim kutem kako bi se valne fronte pulseva sjekle pod što manjim kutem, u suprotnom dolazi do narušavanja vremenske rezolucije [50]. Nakon uzorka pumpni puls biva blokiran, a probni puls je usmjeren prema dijelu za detekciju koji se sastoji od spektrometra sa mogućnošću veoma brze detekcije (frekvencija čitanja jednaka ili brža od frekvencije repeticije lasera) zbog izbjegavanja utjecaja fluktuacija u intenzitetu između laserskih pulseva što će biti objašnjeno u sljedećim poglavljima.

S obzirom da se u TA mjere promjene apsorpcije pobuđenog uzorka u odnosu na nepobuđeni uzorak, na pumpnu zraku je potrebno postaviti sinkronizirani prekidač zrake (eng. chopper). Prekidač zrake koji se sastoji od metalnog diska sa ekvivalentno udaljenim izbušenim rupicama prikazan je na slici 1.5. Prekidač zrake se spaja na izlazni laserski TTL signal koji određuje trenutak laserske pulsne emisije i čija je frekvencija jednaka frekvenciji repeticije lasera. Zatim se frekvencija prekidača zrake podesi na dva puta manju frekvenciju od frekvencije repeticije lasera kako bi blokirao svaki drugi pumpni puls. Situaciju u kojoj prekidač zrake blokira pumpni puls nazivamo *pump off* situacijom, dok situaciju u kojoj prekidač zrake propušta pumpni puls nazivamo *pump on* situacijom. Intenzitet probnog pulsa označavamo sa $I(\lambda, t)$, gdje je λ valna duljina probnog pulsa, a t razmak u vremenu naspram pumpnog pulsa. S obzirom na prekidač zrake, intenzitet probnog pulsa se dijeli na dvije situacije: $I_{on}(\lambda, t)$ kada prekidač zrake propušta pumpni puls i $I_{off}(\lambda, t)$ kada prekidač zrake blokira pumpni puls. Signal mjeren u TA je definiran na sljedeći način:

$$\Delta OD(t, \lambda_{pr}) = -\log \left(\frac{I_{on}(t, \lambda_{pr})}{I_{off}(t, \lambda_{pr})} \right). \quad (1.8)$$

Proces mjerenja ima sljedeći tijek: u početnom koraku mjerenja pumpni i probni puls su preklapljeni u vremenu (i prostoru) i taj se trenutak naziva nultim vremenom. U sljedećim koracima optički translator se pomiče i probni puls počinje kasniti za pumpnim pulsom. U tim koracima su bitne dvije već opisane situacije, *pump on* i *pump off* situacija. Prvi puls koji izlazi iz lasera dijeli se na pumpni puls i probni puls. U *pump on* situaciji pumpni puls pobuđuje proučavani uzorak te pokreće određenu fotokemijsku reakciju dok probni puls dolazi do uzorka nakon pumpnog pulsa, propagira se kroz uzorak, biva djelomično apsorbiran te usmjeren prema detektoru. Sljedeći puls se također dijeli na pumpni i probni puls ali nakon blokiranja pumpnog pulsa prekidačem zrake ostaje samo probni puls koji se propagira kroz uzorak, eventualno biva djelomično apsorbiran osnovnim stanjem uzorka te daje referentnu točku za praćenje promjene apsorpcije. Dio procesa mjerenja sa prekidačem zrake prikazan je shematski na slici 1.6. Radi smanjenja šuma i poboljšanja mjerenja optički translator ostaje na danom položaju za nekoliko zadanih izlaznih pulseva iz lasera (usrednjavanje po pulsevima) te se nakon usrednjavanja pomiče na sljedeći zadani položaj. Druga opcija usrednjavanja po pulsevima je da se koristi tzv. *shutter* koji prvo propusti određeni broj *pump on* pulseva, a zatim isti taj broj *pump off* pulseva s obzirom da isti najčešće ne posjeduje mogućnost rada na višim frekvencijama na kojima rade neki laseri. Valja napomenuti kako je postavljanje prekidača zrake na frekvenciju nižu od polovice repeticije lasera situacija ekvivalentna korištenju *shuttera*. No, s obzirom kako nasumične oscilacije u snazi i valnoj duljini lasera bivaju modulirane periodičnom funkcijom (zbog šuma te nesavršenosti lasera) pokazuje se kako je u svrhu smanjenja šuma za blokiranje pulseva puno bolje prikupljati spektre brzinom koja odgovara polovici frekvencije repeticije jer se time smanjuje utjecaj međupulsnih fluktuacija za danu vremensku točku. Tijekom mjerenja, pomicanjem optičkog translatora uzimaju se spektri probnog pulsa za niz vremenskih pomaka unutar vremenskog prozora od interesa. Vremenski prozor od interesa ovisi o dostupnom rasponu promjena optičkog puta probne zrake (duljini translatora) i može biti širok i nekoliko nanosekundi no većinom se ultrabrza dinamika molekula u otopinama odvija na skali od nekoliko desetaka do par stotina pikosekundi. Nakon što se optički translator pomakne do kraja svog raspona vraća se natrag na početak te počinje novo mjerenje i postupak se ponovi zadani broj puta (usrednjavanje po mjerenjima). Oba usrednjavanja, i po pulsevima i po mjerenjima uvelike doprinose smanjenju šuma kod mjerenja te se koriste kombinirano. Nedostatak usrednjavanja je duljina trajanja cjelokupnog mjerenja što može biti kritično prilikom mjerenja nestabilnih uzoraka. Također ukoliko je laserski sustav nestabilan, odnosno ukoliko dolazi do monotonog rasta ili pada energije izlaznih pulseva dulje vrijeme mjerenja uvodi dodatnu grešku u mjerenje zbog promjena u energiji pumpnih pulseva.



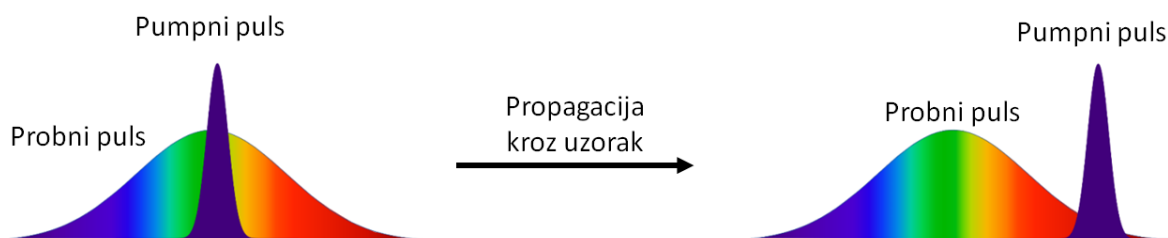
Slika 1.6: Tipični proces mjerenja tranzijentne apsorpcije korišten u ovom radu. A) *Pump on* situacija gdje prekidač zrake propušta pumpni puls čime intenzitet probnog pulsa iznosi $I_{on}(\lambda, t)$ i B) prekidač zrake blokiranjem svakog drugog pumpnog pulsa u *pump off* situaciji omogućava referentni intenzitet probnog pulsa $I_{off}(\lambda, t)$ u odnosu na kojeg se mjeri promjena apsorpcije uzorka.

Metodom TA moguće je proučavati ultrabrzu dinamiku uzorka u svim agregatnim stanjima. U ovoj disertaciji proučavani su uzorci u tekućem stanju, otopljeni u odgovarajućem otapalu te će stoga u nastavku biti najviše riječi o tekućim uzorcima. Molekule koje su predmet proučavanja otapaju se u odgovarajućem otapalu od kojih se najčešće koristi acetonitril, voda, benzen, metanol, etanol, cikloheksan i sl. Ovisno o polarnosti uzorka, odabire se određeno otapalo. Ako je uzorak polarne prirode, bira se neko od polarnih otapala u kojemu je uzorak dobro topiv kao npr. voda, acetonitril ili njihova mješavina. U slučaju da je uzorak nepolarne prirode, biraju se nepolarna otapala poput benzena ili cikloheksana. Također, prilikom odabira polarnog otapala

potrebno je voditi računa o protičnosti i aprotičnosti otapala. Protična otapala posjeduju O-H ili N-H vezu te posljedično ta otapala mogu stvarati vodikove veze. Uz spomenuto, protična otapala mogu poslužiti kao izvori protona. S druge strane, aprotična otapala ne posjeduju O-H ili N-H vezu te stoga ne mogu tvoriti vodikovu vezu među sobom. Važno je napomenuti da se samo polarna otapala dijele na protična i aprotična. Kao što je spomenuto, otapala u pravilu ne daju TA signal na vremenima različitim od nultog vremena gdje daju neizbježne artefakte. Prilikom izbora otapala se također treba izbjeći preklapanje spektra pumpnog pulsa sa apsorpcijskim spektrom otapala kako bi se dodatno osigurala pobuda isključivo molekula uzorka, a ne i otapala. Iako otapalo u pravilu ne daje direktan signal u TA mjerenjima, ako je intenzitet pumpnog pulsa previsok može doći do foto-ionizacije otapala što je najčešće primjećeno u vodi. Nakon ionizacije molekule H₂O, slobodni elektron biva okružen ostalim, neutralnim molekulama vode koje se radi svoje polarnosti reorijentiraju oko slobodnog elektrona te tako tvore kompleks zvan solvatirani elektron (eng. solvated electron) koji je sposoban apsorbirati svjetlost crvenog i infracrvenog dijela spektra. Spomenuta mogućnost apsorpcije kao posljedicu ima pojavu pozitivnog signala u TA spektrogramu centriranog oko 700nm [51] koji ima složenu dinamiku trnjenja što uvelike komplicira obradu podataka. Stoga se treba pronaći ravnoteža između intenziteta pumpnog pulsa i koncentracije uzorka u otapalu potrebne za postizanje željene jačine signala u TA spektrogramu.

Uzorak se tijekom mjerenja nalazi u kiveti čija se debljina također pomno odabire. Od važnosti prilikom odabira kivete je duljina optičkog puta kroz uzorak ali i debljina i materijal prozora kivete. Dulji optički put kroz uzorak kao posljedicu ima širenje pumpnog pulsa u vremenu te povećanje utjecaja efekta zvanog GVM (eng. group velocity mismatch). S obzirom da se valne duljine pumpnog i probnog pulsa najčešće razlikuju, kada su u vremenu preklapljeni u kiveti posjedovat će različite brzine propagacije. Zbog toga, na fiksnom položaju optičkog translatora (postavljen na nulto vrijeme), dolazi do međusobnog pomicanja pumpnog pulsa u odnosu na probni tijekom propagacije kivetom što kao posljedicu ima povećanje vremenske rezolucije jer u idealnom slučaju, na fiksnom položaju optičkog translatora željena situacija jest preklap pumpnog pulsa samo sa jednim dijelom probnog pulsa, bez međusobnog pomicanja. Shematski prikaz GVM efekta prikazan je na slici 1.7.

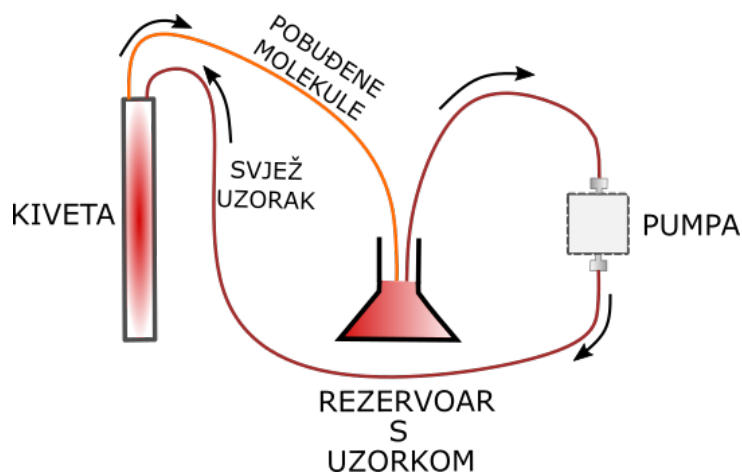
Kako je u većini TA eksperimenata koji uključuju proučavanje dinamike organskih molekula sa biološkom važnošću valna duljina pumpnog pulsa centrirana u UV dijelu elektromagnetskog spektra, materijal prozora kivete mora propuštati ultraljubičaste pulseve. Radi toga najčešće se bira kvarc kao materijal prozora kivete s obzirom da je vrijednost transmisije kvarca na valnim duljinama većim od 200nm preko 90%.



Slika 1.7: Shematski prikaz GVM (eng. group velocity mismatch) efekta. Zbog različitih grupnih brzina, pumpni i probni puls se tijekom propagacije kroz uzorak pomiču jedan u odnosu na drugoga što efektivno dovodi do lošije vremenske rezolucije postava.

Kako u istraživanim fotokemijskim reakcijama neki od međuprodukata ili konačnih produkata mogu imati vrijeme života dulje od perioda repeticije laserskog sustava, kiveta se spaja na protočni sustav. Ako radi jednostavnosti pogledamo reverzibilnu fotokemijsku reakciju koja ultrabrzo stvara produkte koji žive dulje od perioda repeticije lasera, tada prvi pumpni puls pobuđuje uzorak te stvara produkte, a probni puls ih analizira. Nakon prvog pumpnog i probnog pulsa imamo *pump off* situaciju u kojoj na uzorak nailazi samo probni puls. Ukoliko kiveta nije spojena na protočni sustav *pump off* probni puls nailazi na mješavinu prekursora (uzorka) i međuprodukata koji su stvoreni prethodnim pumpnim pulsem, a nisu se uspjeli vratiti u oblik prekursora (reverzibilna reakcija) zbog vremena života duljeg od perioda repeticije lasera. Spomenuta situacija uvodi grešku u mjerenje s obzirom da *pump off* probni puls služi kao referentna točka za promatranje promjene apsorpcije uzorka, odnosno, *pump off* probni puls treba predstavljati apsorpciju osnovnog stanja uzorka, a ne mješavine uzorka i produkata. Ukoliko je vrijeme života produkata dulje od dvostrukog perioda repeticije laserskog sustava, tada sljedeći pumpni puls u *pump on* situaciji pobuđuje ne samo molekule prekursora (uzorka) nego mješavinu produkata i uzorka što dodatno uvodi grešku u mjerenje. Radi eliminacije spomenutih neželjenih efekata, kiveta se spaja na protočnu pumpu i na rezervoar sa uzorkom. Skica protočnog sustava korištenog za mjerenja tranzijentne apsorpcije prikazana je na slici 1.8. Brzina protoka protočne pumpe je podesiva i određena je tako da za svaki sljedeći pumpni (*pump on* situacija) ili probni (*pump off* situacija) puls unutar kivete bude svježi uzorak, odnosno molekule prekursora, bez produkata i međuprodukata. U većini slučajeva, za reverzibilne fotokemijske reakcije, potreban volumen rezervoara iznosi 20ak mL. U slučaju duljih mjerenja ireverzibilnih fotokemijskih reakcija, odnosno bespovratnog nakupljanja produkata nakon svakog pumpnog pulsa, potreban je veći volumen rezervoara. Bitno je napomenuti kako je odabir materijala cijevčica kojima je spojen protočni sustav vrlo bitan. Bira se materijal koji ne reagira sa otapalom i molekulama uzorka kako bi se osigurala točnost mjerenja. Npr. u slučaju mjerenja organskih molekula sa fenolnom skupinom biraju se cijevčice od teflona pošto isti ne reagira sa

spomenutim organskim molekulama i acetonitrilom.



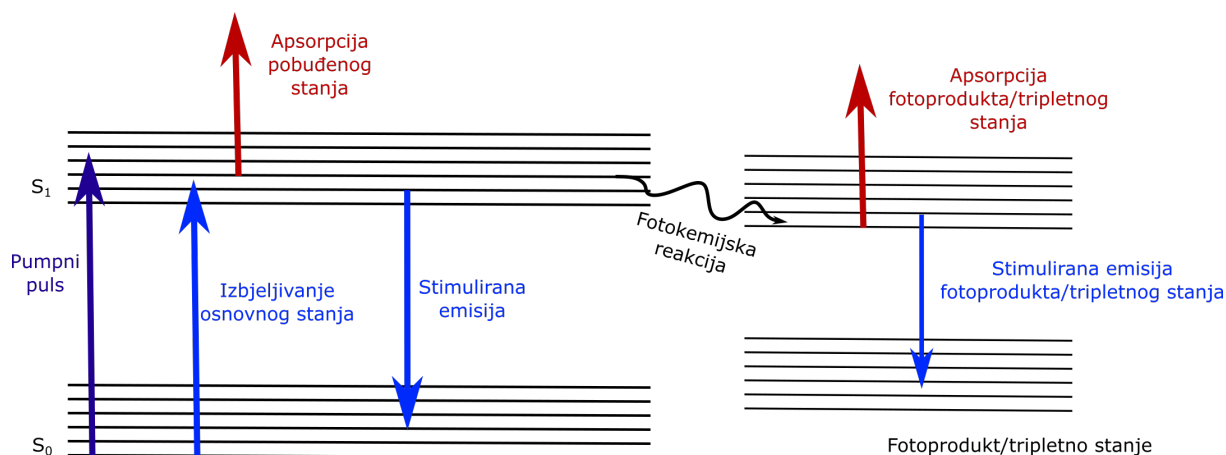
Slika 1.8: Skica protočnog sustava korištenog u mjerenjima. Protočnom pumpom osigurava se svjež uzorak za svaki nadolazeći pumpni puls.

1.3.2 Interpretacija signala u tranzijentnoj apsorpciji

Relacija 1.8 definira signal mjeren metodom TA. Signal se sastoji od negativnog logaritma omjera *pump on* i *pump off* situacije, iznos $\Delta OD(t, \lambda_{pr})$ može biti jednak nuli, pozitivan ili negativan. Sve tri situacije su shematski prikazane na slici 1.9 te je bojama strelica označen predznak signala (crveno - pozitivan signal, plavo - negativan signal).

Nakon pobude uzorka pumpnim pulsom u viša elektronska stanja (radi jednostavnosti, pretpostavimo da je to S_1) probni puls u uzorku inicira jednu od sljedećih situacija: apsorpciju pobuđenog elektronskog stanja (ESA, eng. excited state absorption) (singletnog ili tripletnog), izbjeljivanje osnovnog stanja (GSB eng. ground state bleach), stimuliranu emisiju (SE) ili apsorpciju produkta/međuprodukta (PA, eng. photoinduced absorption).

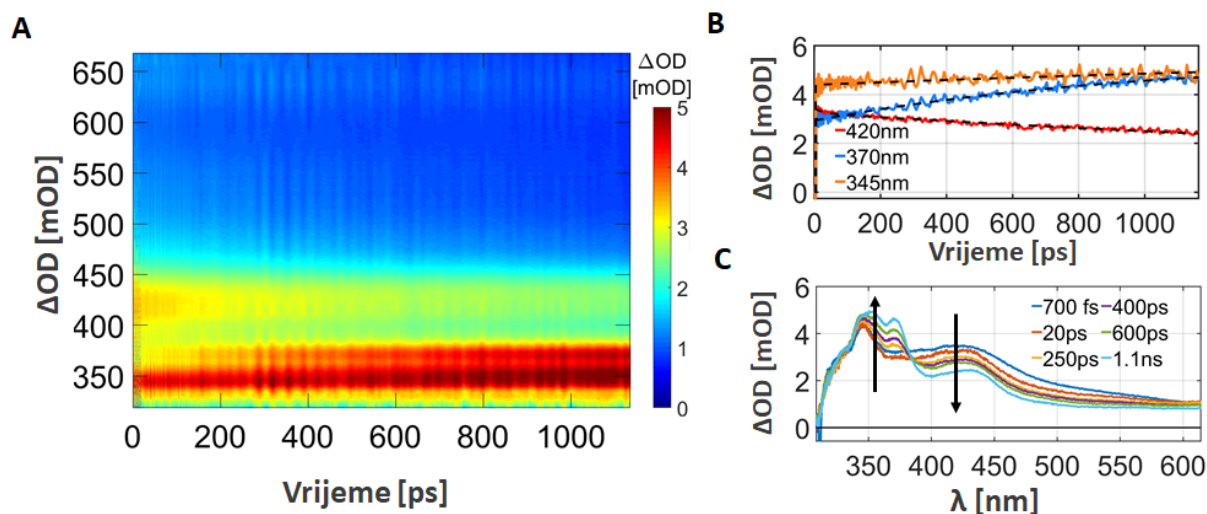
Ako razlika u energijama viših elektronskih stanja i S_1 odgovara nekoj od valnih duljina spektralno širokog probnog pulsa dolazi do apsorpcije uzorka te isti biva pobuđen u neko od viših elektronskih stanja (S_2, S_3, S_4, \dots). Budući da dolazi do apsorpcije probnog pulsa u *pump on* situaciji, intenzitet probnog pulsa na valnoj duljini koja odgovara ESA-i će biti manji od intenziteta u *pump off* situaciji, odnosno TA signal će biti pozitivan. Također, ako dolazi do singlet \rightarrow triplet prijelaza (ISC, eng. intersystem crossing), do stvaranja međuprodukta ili produkta fotokemijske reakcije, posljedično dolazi i do apsorpcije novo-stvorenih stanja što također daje pozitivan signal u TA.



Slika 1.9: Interpretacija signala u TA. Pozitivan signal (crvena boja) dobiva se apsorpcijom pobuđenog stanja ili apsorpcijom produkta/međuprodukta/tripletnog stanja. Negativan signal dobiva se izbjeljivanjem osnovnog stanja te stimuliranom emisijom. Signal jednak nuli dobiva se prilikom nepromijenjene apsorpcije uzorka.

Negativan signal je uzrokovan izbjeljivanjem osnovnog stanja i stimuliranom emisijom. Nakon pobude u više elektronsko stanje, određene valne duljine probnog pulsa mogu inicirati stimuliranu emisiju. U tom će slučaju intenzitet probe u *pump on* situaciji biti većeg iznosa od intenziteta u *pump off* situaciji što će dati negativan TA signal. Valja napomenuti kako uzrok stimulirane emisije može biti stimulirana relaksacija prekursora nazad u osnovno elektronsko stanje ali isto tako i stimulirana relaksacija međuprodukta ili produkta ako su oni stvoreni u svom pobuđenom elektronskom stanju, a ne osnovnom. Također, ako nakon pobude pumpnim pulsom dolazi do ISC u više tripletno elektronsko stanje, stimulirana emisija može doći od stimulirane relaksacije u osnovno tripletno stanje. Drugi uzrok negativnog signala je izbjeljivanje osnovnog stanja. Nakon prolaska pumpne zrake kroz uzorak, populacija molekula u osnovnom stanju biva osiromašena što za posljedicu daje i smanjenu apsorpciju osnovnog stanja uzorka. Na valnim duljinama probe koje se preklapaju sa apsorpcijom osnovnog stanja uzorka tada dolazi do smanjene apsorpcije, odnosno intenzitet probe u *pump on* situaciji biva većim od istog u *pump off* situaciji što također daje negativan signal. GSB je u eksperimentima vidljiv samo ako se preklapaju apsorpcijski spektar uzorka i spektar probnog pulsa.

Kao primjer dano je TA mjerenje adamantan-naftola prikazano na slici 1.10. O samom mjerenju, analizi i interpretaciji će biti više riječi u poglavlju 7 - *Mehanizmi stvaranja QM-a fotodehidracijom derivata 2-naftola* dok će ovdje biti objašnjen prikaz i interpretacija rezultata. Na slici 1.10A) prikazan je 2D spektrogram mjerenja. Horizontalna os predstavlja vrijeme kašnjenja probnog pulsa za pumpnim pulsom u pikosekundama, a vertikalna os predstavlja

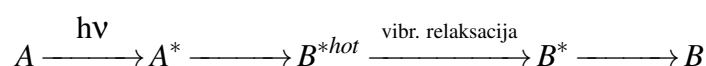


Slika 1.10: fs-TA mjerenja derivata naftola (adamantan-naftol) otopljenog u $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (3:1). A) spektrogram mjerenja. B) Kinetički profili na 3 karakteristične valne duljine sa rezultatima prilagodbe (isprekidane linije) i C) TA spektri za razne vremenske trenutke. Smjer spektralne evolucije označen je strelicama.

valnu duljinu probnog pulsa. U spektrogramu boja određuje predznak i jačinu signala - crvenom bojom označen je pozitivan signal dok je plavom bojom označen signal jednak nuli. Sa spektrograma je jasno vidljivo kako spektralni pojas centriran oko 420nm trne prema nuli dok spektralni pojas centriran oko 370nm raste. Slika 1.10B) prikazuje vremenske profile na 3 odabrane, karakteristične valne duljine: 420nm, 370nm, 345nm te pripadnu prilagodbu označenu isprekidanom crnom linijom. Na slici 1.10C) prikazani su spektri u različitim vremenima gdje je strelicama označen smjer evolucije određenih spektralnih pojaseva, odnosno pad pojasa na 420nm i rast pojasa na 370nm.

1.3.3 Praćenje fotokemijskih reakcija i ostalih fotoinduciranih procesa

Pretpostavimo da imamo ireverzibilnu fotokemijsku reakciju tipa:

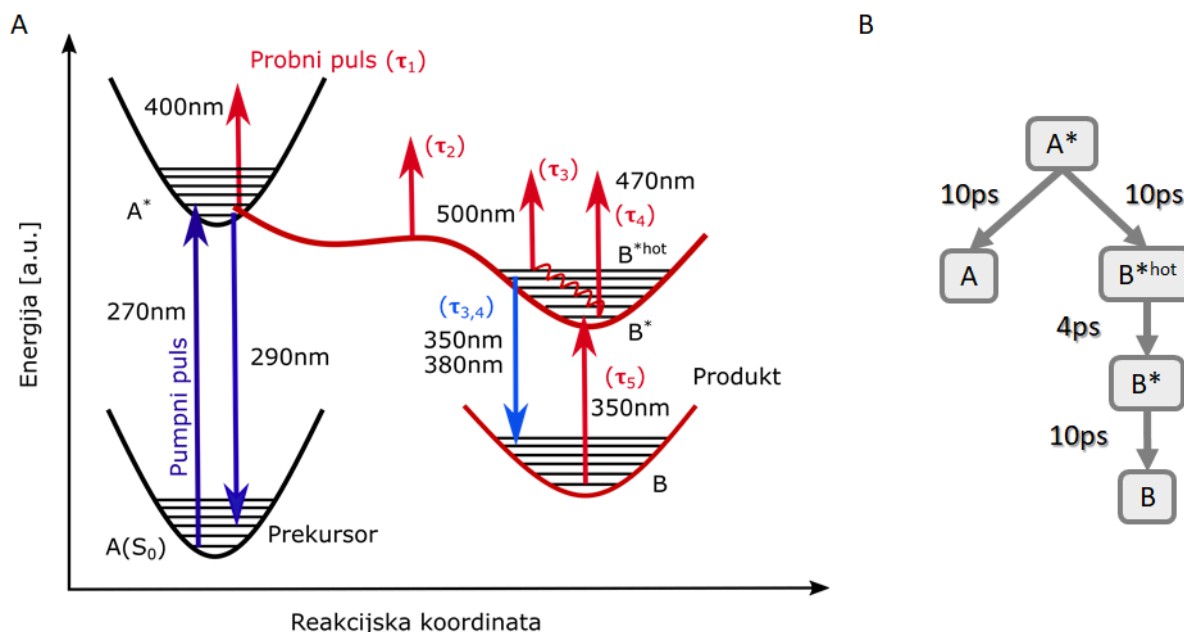


gdje je **A** molekula prekursora, a **B** produkt te kemijske reakcije. Oznakom A^* označavamo molekulu **A** u pobuđenom elektronskom stanju, a jednako vrijedi i za molekulu **B**. Nakon apsorpcije pumpnog pulsa, populacija prelazi na potencijalnu plohu pobuđenog stanja na kojoj se odvijaju razni fotoinducirani procesi poput fotokemijskih reakcija, prijenosa naboja, intra-

molekularne i intermolekularne dinamike, otapanja molekula u pobuđenom stanju i sl. Zbog drugačije elektronske konfiguracije, dipolnog momenta i kuteva između atomskih jezgara, u pobuđenom elektronskom stanju molekula \mathbf{A}^* biva podložnom ulasku u fotokemijsku reakciju koja kao produkt daje molekulu \mathbf{B} također u pobuđenom elektronskom stanju, ali i pobuđenom vibracijskom stanju što označavamo sa \mathbf{B}^{*hot} . Nakon određenog vremena molekula \mathbf{B}^{*hot} hlađenjem se relaksira prema dnu pobuđenog elektronskog stanja. Molekula \mathbf{B}^* se zatim relaksira u osnovnog elektronsko stanje i kao finalni produkt fotokemijske reakcije dobiva se \mathbf{B} . Energetska stanja i potencijalne plohe reakcije prikazani su na slici 1.11.

Proces mjerenja opisan u prethodnom poglavlju moguće je primijeniti na proučavanje spomenute fotokemijske reakcije. Metodom TA se rasvjetljava proces fotokemijske reakcije promatranjem početnog vremenskog razvoja sistema na potencijalnoj plohi pobuđenog stanja i kasnije put reakcije. Jednostavnosti radi, pretpostavimo kako signalu doprinosi samo ESA. Na slici 1.11 također su prikazani i razni trenuci u kojima dolazi do apsorpcije određenih valnih duljina probne zrake. Na slici 1.12 prikazana je jednostavna simulacija mjerenja za danu fotokemijsku reakciju uključujući 2D spektrogram, vremenske profile i spektre. U početnim koracima mjerenja, populacija prekursora \mathbf{A}^* u prvom pobuđenom stanju apsorbira prvi niz *pump on* probnih pulseva, a u signalu se dobivaju pozitivne vrijednosti promjene optičke gustoće na valnim duljinama oko 400nm. Jedan dio molekula prelazi u pobuđeno stanje produkta \mathbf{B}^{*hot} vremenskom konstantom od 10ps dok se drugi dio relaksira u osnovno elektronsko stanje \mathbf{A} istom vremenskom konstantom od 10ps. Jednostavnosti radi, odabrane su iste vremenske konstante, odnosno Pojavom pozitivne vrpce u signalu, molekula \mathbf{A}^* biva identificiranom. Nakon prijelaza $\mathbf{A}^* \rightarrow \mathbf{B}^{*hot}$ dolazi do apsorpcije molekule \mathbf{B}^{*hot} što kao posljedicu ima pojavu nove pozitivne vrpce u signalu na valnim duljinama oko 500nm. Pojavom spomenute pozitivne vrpce, produkt \mathbf{B}^{*hot} biva identificiran nakon čega se odgovarajuća pozitivna vrpca počinje pomicati prema kraćim valnim duljinama (prema 470nm) zbog hlađenja prema dnu pobuđenog elektronskog stanja ($\mathbf{B}^{*hot} \rightarrow \mathbf{B}^*$). Vibracijsko hlađenje odvija se vremenskom konstantom od 4ps. Pojavom spektralno pomaknute pozitivne vrpce centrirane oko 470nm, dno pobuđenog elektronskog stanja produkta \mathbf{B}^* biva identificiranim. Pošto vibracijskim hlađenjem dolazi do spuštanja molekula prema dnu pobuđenog elektronskog stanja, valne duljine potrebne za ESA produkta bivaju sve kraće s obzirom da se povećava razlika u energijama stanja koja sudjeluju u apsorpciji. Stoga se novonastala pozitivna vrpca pomiče prema kraćim valnim duljinama. U isto vrijeme kao i spomenute vrpca na 500nm pojavljuje se i negativna vrpca na 350nm koja se pomiče prema 380nm. Ta vrpca predstavlja stimuliranu emisiju iz pobuđenog elektronskog stanja molekule \mathbf{B} u osnovno elektronsko stanje. U slučaju negativnog signala pomak se odvija prema duljim valnim duljinama zbog već navedenog razloga. Stanje \mathbf{B}^{*hot} relaksira se u osnovno elektronsko

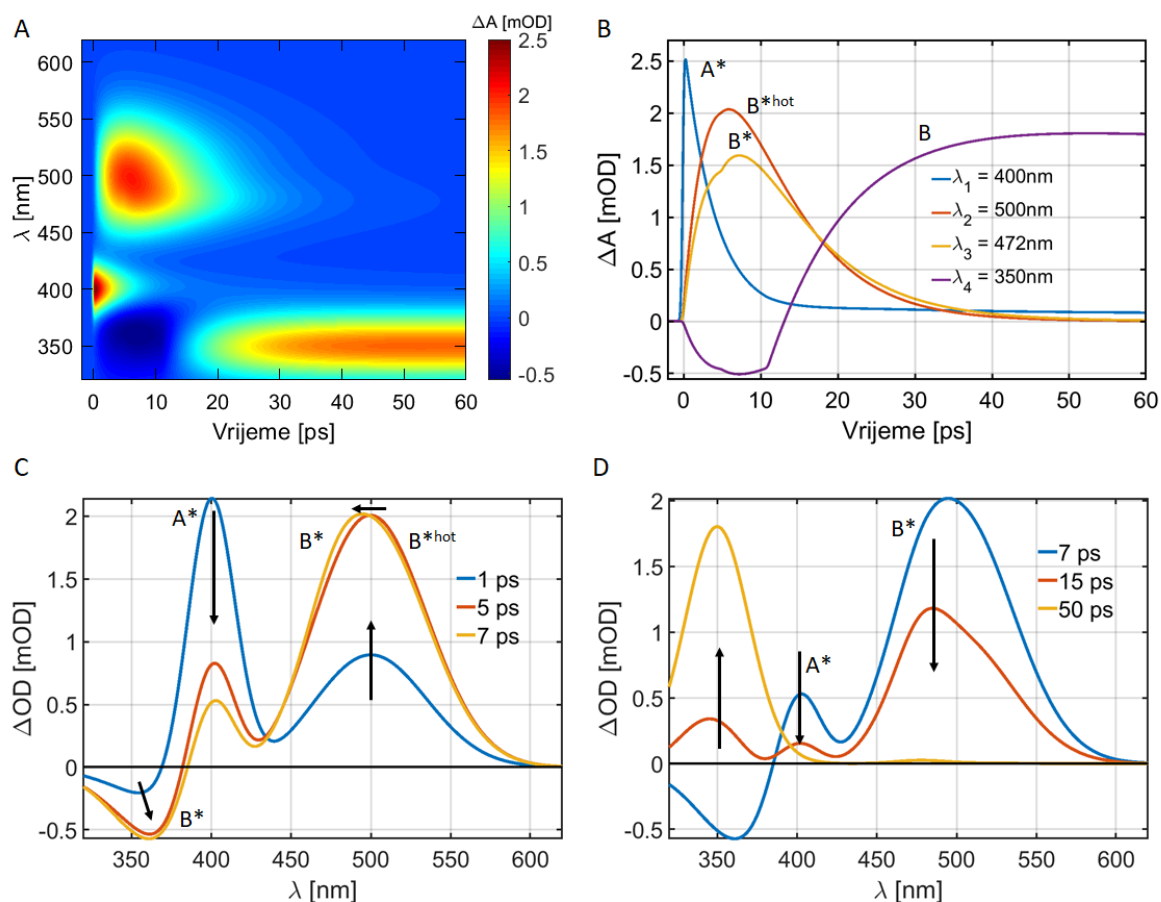
stanje produkta vremenskom konstantom od 10ps nakon čega dolazi do pojave pozitivne ESA vrpce centrirane oko 350nm čiji se TA signal saturira bez eksponencijalnog trnjenja s obzirom da je simulirana reakcija ireverzibilna. Na slikama 1.12 C i D prikazana je spektralna evolucija u vremenu sa strelicama koje označavaju smjer evolucije određenog spektralnog pojasa. Na slici 1.12 B prikazani su vremenski profili u vremenu za 4 karakteristične valne duljine.



Slika 1.11: A) Proces praćenja fotokemijskih reakcija metodom ultrabrze tranzijentne apsorpcije za fotokemijsku reakciju. Crvenom linijom označeni su pozitivni signali, a plavom negativni. Uz strelice označene su valne duljine prijelaza. B) Kinetički model simulirane fotokemijske reakcije.

Analizom vremena pojave signala (o čemu će više riječi biti kasnije) koji odgovara molekuli **B*** i **B** te trnjenjem signala koji dolazi od molekule **A*** dobivamo vremena karakteristična za spomenutu fotokemijsku reakciju. Uz dobivanje karakterističnih vremena za fotokemijsku reakciju, analizom valnih duljina na kojima se pojavljuju spektralne vrpce potpuno karakteriziramo fotokemijsku reakciju te identificiramo sve međuprodukte/produkte i njihova vremena nastanka, elektronske i vibracijske relaksacije što jest cilj korištenja metoda ultrabrze spektroskopije. Proces praćenja fotoinduciranih procesa (u kojima ne nastaju nove molekule) u potpunosti je jednak procesu praćenja fotokemijskih reakcija.

Opisanim procesom praćenja fotokemijskih reakcija i fotoinduciranih procesa može se pratiti vremenski razvoj raznih procesa poput: fotodisocijacije, fotoizomerizacije, prijenosa ener-



Slika 1.12: Simulacija TA mjerenja za ireverzibilnu fotokemijsku reakciju čija je shema dana na slici 1.11. A) 2D spektrogram mjerenja, B) vremenski profili za 4 karakteristične valne duljine. C) i D) vremenska evolucija spektara. Strelicama su označeni smjerovi vremenske evolucije određenih spektralnih pojaseva.

gije, prijenosa protona i sl. Uz praćenje, izborom valne duljine pumpnog pulsa te oblikovanjem vremenskog i spektralnog oblika pulsa moguće je čak i regulirati smjer kemijske reakcije [52]. Neki od nedostataka TA metode su moguće preklapanje raznih doprinosa signalu (ESA, GSB, SE, PA). Naime, ukoliko se dva ili više doprinosa signalu od različitih molekula spektralno preklapaju nemoguće je razlučiti ih što kao posljedicu ima otežanu identifikaciju molekula (međuprodukata ili produkata) koje sudjeluju u fotokemijskoj reakciji ili nekom drugom fotoinduciranom procesu. Također, evolucijom pobuđene populacije na plohi potencijalne energije moguće je naići na tamna stanja koja ne apsorbiraju zračenje. Tamna stanja je također nemoguće uočiti metodom TA što dodatno otežava opis fotokemijske reakcije ili drugog fotoinduciranog procesa.

1.3.4 Artefakti u tranzijentnoj apsorpciji

Kao i većina metoda eksperimentalne fizike, metode ultrabrze laserske spektroskopije također posjeduju artefakte i neizbježne neželjene signale prisutne u mjerenju. Pod artefakte TA ubrajaju se: dvofotonska apsorpcija (TPA, eng. two photon absorption), međumodulacija faze (XPM, eng. cross-phase modulation) i stimulirano Ramanovo pojačanje. Svaki od navedenih artefakata prisutan je u mjerenju isključivo za vrijeme u kojem su probni i pumpni pulsevi preklapljeni u vremenu (oko nule). Duljina trajanja artefakta u vremenu je u većini slučajeva otprilike jednaka vremenskoj rezoluciji eksperimentalnog postava što izaziva probleme s obzirom da se artefakti miješaju sa ultrabrzom dinamikom procesa koji se proučavaju. Postoje mnoge metode za razlučivanje i uklanjanje artefakata te će o njima biti više riječi kasnije, no, nažalost u nekim je slučajevima nemoguće potpuno odvojiti artefakte od stvarne dinamike sistema kojeg se proučava. U tim slučajevima je nemoguće identificirati početni tok reakcije unutar vremenskog prozora koji je jednak vremenskoj rezoluciji eksperimenta. S ciljem eliminacije artefakata provedena su TA mjerenja u čistom otapalu. Izgled vremenskih profila TPA i XPM artefakata u čistom otapalu dan je na slici 1.13. U oba slučaja u pitanju je mješavina acetonitrila i vode, no u različitim omjerima i pri različitoj snazi pumpnog pulsa. Mjerenja u čistom otapalu odrađena su u potpuno identičnim uvjetima kao i mjerenja pripadnih uzoraka. O mjerenjima u spomenutim uzorcima će više riječi biti u poglavlju 7. Iz navedenog je vidljivo kako pojava artefakata ovisi i o otapalu i o snazi pumpnih pulseva s obzirom da u prvom slučaju prisutan većinom TPA, a u drugom većinom XPM..

Dvofotonska apsorpcija uključuje apsorpciju jednog fotona pumpnog pulsa i jednog fotona probnog pulsa. TPA se pojavljuje na valnim duljinama probne zrake za koje je zadovoljen uvjet da energija $h\nu_{pumpa} + h\nu_{proba}$ odgovara energiji na kojoj uzorak apsorbira. TPA artefakt je većinom izraženiji na kraćim valnim duljinama spektrograma jer na tom dijelu spektra u TPA artefaktu sudjeluju probni fotoni najviše energije. Energija jednaka zbroju $h\nu_{pumpa} + h\nu_{proba}$ pri nižim valnim duljinama probe je u većini slučajeva dovoljna za pobudu u viša, gušća elektronska stanja. Kao što je spomenuto, trajanje TPA signala je otprilike jednako vremenskoj rezoluciji eksperimenta što u nekim situacijama može biti korisno. Ako se umjesto uzorka, unutar kivete stavi otapalo koje ne daje signal TA nego samo TPA artefakt, moguće je okvirno odrediti vremensku rezoluciju eksperimenta i duljinu trajanja pumpnog pulsa. Olakšavajuća činjenista jest da TPA signal u vremenu ima simetričan oblik gausijanske funkcije (slika 1.13A) čija je FWHM vrijednost vezana uz rezoluciju mjerenja. Naime, na pojedinim valnim duljinama među-korelacija kratkog pumpnog i puno duljeg probnog pulsa posjeduje vremenski oblik blizak obliku pumpnog pulsa. Takav način okvirnog mjerenja rezolucije je najkorisniji (i najbrži) za usporedbu trenutačne verzije eksperimentalnog postava sa nekom prijašnjom verzi-

jom postava gdje postoji sumnja da je došlo do promjene u vremenskoj rezoluciji postava. No, spomenuta metoda nije pretjerano pouzdana u određivanju apsolutne rezolucije postava. Naime, eksperimentalno je pokazano kako zbog GVD efekta širina TPA signala u vremenu ovisi o optičkoj debljini uzorka [53]. Također, pretpostavljajući gausijanski oblik funkcije međukorelacije pumpnog i probnog pulsa moguće je pokazati kako ista ovisi o raznim svojstvima pulseva i medija kojeg se promatra, kao npr. o debljini medija, razlici valnih duljina probnog i pumpnog pulsa i disperziji indeksa loma [54]:

$$G_{GVD}(t) = G_0 \cdot \frac{\sqrt{\pi}}{4\sqrt{\ln 2}} \cdot \frac{\tau_{FWHM}}{\tau_{GVD}} \left[\operatorname{erf} \left(\frac{2\sqrt{\ln 2}t}{\tau_{FWHM}} \right) - \operatorname{erf} \left(\frac{2\sqrt{\ln 2}t}{\tau_{FWHM}} - \frac{2\sqrt{\ln 2}\tau_{GVD}}{\tau_{FWHM}} \right) \right], \quad (1.9)$$

gdje je τ_{GVD} razlika u vremenima prolaska pumpnog i probnog pulsa kroz medij, G_0 je amplituda ne-modificirane međukorelacijske funkcije (mjerene u jako tankom mediju) sa vrijednošću FWHM jednako τ_{FWHM} . Za vrijednosti $\tau_{GVD}/\tau_{FWHM} > 0.6$ dobiva se širenje od 10% dok za veće vrijednosti funkcija poprima oblik šešira. Iz navedenog razmatranja jasno je kako izmjereni TPA signal nije dobra ocjena apsolutne vremenske rezolucije TA postava.

Valja napomenuti kako iznos TPA signala ovisi linearno o snazi pumpnog pulsa i o snazi probnog pulsa s obzirom da se apsorbira po jedan foton iz svakog pulsa. Naime, promjenu optičke gustoće (TA signal) moguće je aproksimirati uzimanjem prvog člana razvoja logaritma iz relacije 1.8 ($\ln(1+x) = x - 0.5x^2 + \dots$). Tada izraz za mjereni signal postaje:

$$\Delta OD(t, \lambda_{pr}) = 0.43 \cdot \frac{I_{on}(t, \lambda_{pr}) - I_{off}(t, \lambda_{pr})}{I_{off}(t, \lambda_{pr})}. \quad (1.10)$$

Važno je napomenuti kako $I_{on}(t, \lambda_{pr}) - I_{off}(t, \lambda_{pr})$ zapravo predstavlja količinu apsorbirane svjetlosti unutar uzorka. Spomenuta razlika zbog apsorpcije jednog fotona pumpnog pulsa i jednog fotona probnog pulsa unutar uzorka duljine L iznosi [53]:

$$I_{on}(t, \lambda_{pr}) - I_{off}(t, \lambda_{pr}) = \gamma \cdot I_{pumpa} \cdot I_{proba} \cdot L. \quad (1.11)$$

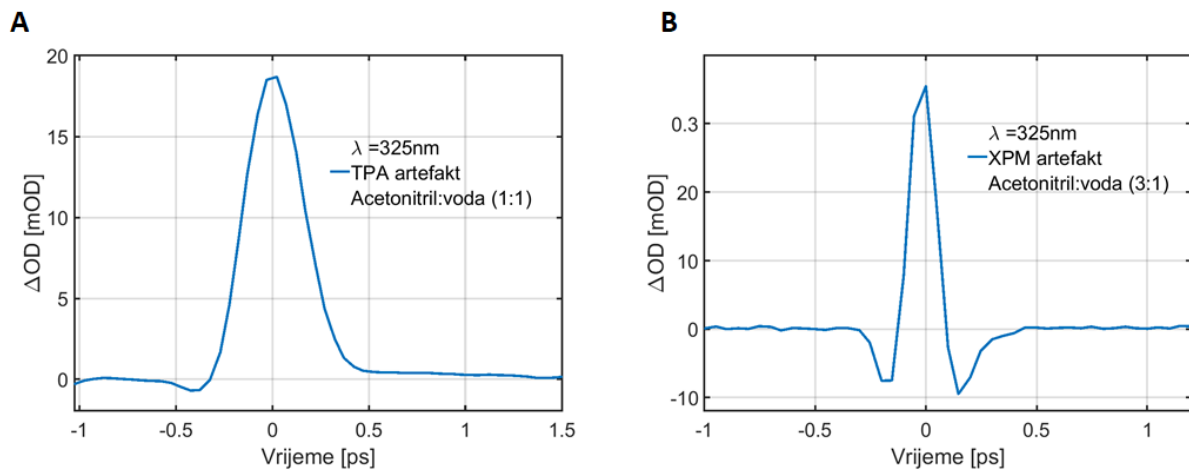
Aproksimirani TPA signal, odnosno relaciju 1.10 u koju je uvrštena prethodna relacija apsorpcije jednog pumpnog i jednog probnog fotona moguće je usporediti sa stvarnim signalom 1.8:

$$\frac{\Delta OD - \Delta OD_{aproximacija}}{\Delta OD} = 1 - \frac{0.43}{\Delta OD} (1 - 10^{-\Delta OD}). \quad (1.12)$$

Iz prethodne relacije slijedi kako se za vrijednosti tipičnih TPA signala $\Delta OD = 0.01$ dobiva

greška od 2%. S obzirom na vrlo malu grešku ispravno je zaključiti kako jačina TPA signala raste linearno sa intenzitetom pumpne zrake. Spomenuta tvrdnja dokazana je i eksperimentalno [55].

Kao što je ranije spomenuto, probni puls posjeduje pozitivan cvrkut odnosno dulje valne duljine u prednjem krilu pulsa, a kraće u stražnjem krilu pulsa. Uz cvrkut, probni puls je u većini slučajeva trajanja puno duljeg od pumpnog pulsa. Pumpni puls je ultrakratkog trajanja (<100fs) dok je probni puls zbog samog načina nastanka superkontinuuma vremenskog trajanja od par pikosekundi. Unutar uzorka pumpni puls preko Kerr efekta u indeks loma uzorka i otapala uvodi ovisnost o svom vlastitom intenzitetu [38]. Posljedično tome, brzina propagacije (koja ovisi o indeksu loma) dijela probnog pulsa koji je preklopljen sa pumpnim pulsom je izmijenjena te dolazi do modulacije faze probnog pulsa što dovodi do preraspodjele frekventnih komponenata unutar probnog pulsa. Spomenuta preraspodjela frekventnih komponenata mijenja izgled spektra u odnosu na spektar probnog pulsa u *pump off* situaciji što se očituje kao signal u TA spektrogramu. Bitno je napomenuti kako u opisanoj situaciji ne dolazi do prijenosa energije u probni puls ili iz probnog pulsa, drugim riječima XPM efekt je ne-rezonantne prirode te ga se opaža i kada je medij potpuno transparentan. Primjer XPM signala u vremenu prikazan je na slici 1.13B.



Slika 1.13: Vremenski profili artefakata TA metode u čistom otapalu na valnoj duljini od 325nm. A) TPA artefakt dobiven u mješavini acetonitrila i vode (1:1) na snazi pumpnog pulsa od 1.2mW. B) XPM artefakt dobiven u mješavini acetonitrila i vode (3:1) na snazi pumpnog pulsa od 0.22mW.

Naime, pod pretpostavkom linearno polarizirane svjetlosti i sporo-varirajuće envelope moguće je izvesti sljedeći izraz za frekventni pomak probne zrake [56][57]:

$$\Delta\omega(t) = -2\frac{n_2\omega_0 L}{c} \frac{\partial}{\partial t} |A(t)|^2, \quad (1.13)$$

gdje je $A(t)$ envelope pumpnog pulsa, L je debljina uzorka, a ω_0 je centralna frekvencija probnog pulsa. n_2 je nelinearni indeks loma u Kerrovoj relaciji $n(t) = n_0 + n_2|A(t)|^2$. Cvrkut probnog pulsa tada poprima sljedeći oblik:

$$\omega_{proba}(t) = \omega_0 + \beta t + \Delta\omega(t), \quad (1.14)$$

gdje β određuje linearni cvrkut probnog pulsa. Uvrštavajući gausijansku envelope pumpnog pulsa u relaciju 1.13, a zatim i u prethodnu relaciju, za frekvenciju probnog pulsa dobiva se:

$$\omega_{proba}(t) = \omega_0 + \beta t + \frac{\alpha\omega_0}{\tau^2} t e^{-2t^2/\tau^2}. \quad (1.15)$$

Koeficijent $\alpha = \frac{8n_2LA_0^2}{c}$. Iz prethodne relacije moguće je kvantitativno dobiti izraz za jačinu signala ΔOD u tranzijentnoj apsorpciji [53]:

$$\Delta OD(t) = 2 \log \left(1 + \frac{\alpha\omega_0}{\beta\tau^2\tau_{GVD}} \left(t e^{-2t^2/\tau^2} - (t - \tau_{GVD}) e^{-2(t-\tau_{GVD})^2/\tau^2} \right) \right). \quad (1.16)$$

Prethodna relacija korisna je za prilagodbu funkcije na XPM artefakt no u tipičnim situacijama nije prisutan samo XPM artefakt nego kombinacija TPA i XPM artefakata pa se najčešće kao funkcija prilagodbe bira gausijanska funkcija i njene derivacije što će biti pojašnjeno u sljedećem poglavlju.

Stimulirano Ramanovo pojačanje javlja se u slučajevima u kojima je valna duljina pumpnog pulsa bliska valnim duljinama probnog pulsa. Artefakt se pojavljuje ukoliko razlika energija pumpnog i probnog fotona $h\nu_{pump} - h\nu_{probe}$ odgovara energiji vibracijskih stanja molekula otapala ili uzorka. Foton probnog pulsa doprinosi vezanju pumpnog fotona i virtualnog molekularnog stanja (biva apsorbiran). Posljedično tome, foton pumpnog pulsa je neelastično raspršen nakon čega nastaje foton jednak prvom apsorbiranom fotonu probnog pulsa koji je ponovno emitiran. Ostatak energije pohranjen je kao vibracijska energija molekule. Rezultat efekta je povećanje intenziteta na frekvenciji probnog fotona što se u mjerenjima očituje kao emisija.

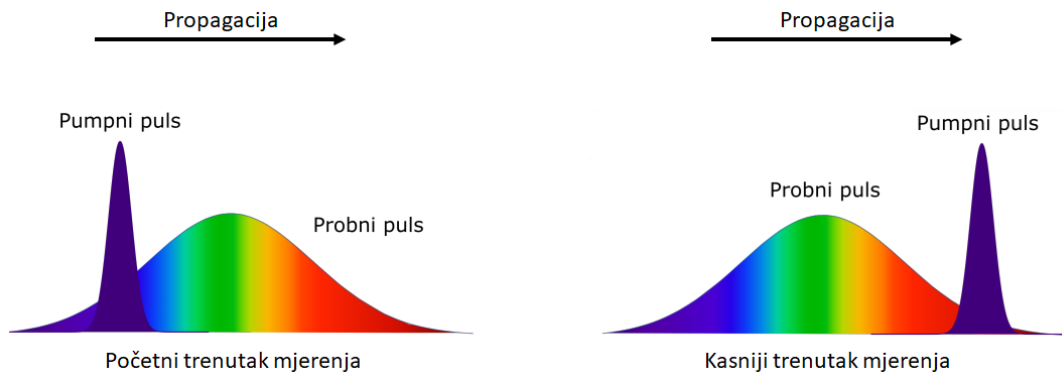
Spomenuti artefakti mogu se reducirati na nekoliko načina: korištenjem kiveta sa tankim prozorima (s obzirom da se TPA i XPM mogu javljati i prilikom preklopa pulseva unutar prozora kivete), korištenjem otapala niske susceptibilnosti trećeg reda ili uklanjanjem cvrkuta probnog pulsa [53]. Uz spomenuto, jedna od metoda prilikom rada sa tekućim uzorcima je mjerenje čistog otapala nakon mjerenja uzorka te oduzimanje čitavog spektrograma otapala od spektro-

grama uzorka. Ideja je iskoristiti činjenicu da otapalo samo po sebi ne daje TA signal nigdje, osim u nultom vremenu gdje posjeduje artefakte istovjetne onima koji se pojavljuju u mjerenjima otopljenih uzoraka. Nedostatak metode leži u tome što otopljeni uzorak ima različita optička svojstva što za posljedicu ima i različite oblike artefakata te ih je oduzimanjem otapala nemoguće u potpunosti eliminirati. Isto tako, gotovo nemoguće je izvršiti dva seta mjerenja u potpuno istim laboratorijskim uvjetima (snaga pumpne zrake i identični putevi pumpne i probne zrake). Nažalost, artefakte je u većini slučajeva nemoguće u potpunosti eliminirati stoga se poseže za raznim tehnikama računskog uklanjanja artefakata nakon mjerenja od kojih se najboljom pokazala tehnika prilagodbe zbroja gaussijana i njegovih derivacija na signal artefakta u vremenu [58].

1.3.5 Eliminacija cvrkuta i artefakata

Uzrok prisutnosti cvrkuta u probnom pulsu je, kao što je već spomenuto sam način nastanka bijele svjetlosti dok ga prolazak kroz optičke elemente dodatno pojačava. U nekim slučajevima cvrkut probnog puls, a moguće je ukloniti korištenjem zrcala za kompenzaciju disperzije (eng. chirped mirrors) ili kompresijom pulseva u kompresorima s prizmama ili optičkim rešetkama, dok se najčešće odgovarajuća korekcija obavlja softverski nakon obavljenih mjerenja, pred samu analizu podataka. Kako je cvrkut uzrokovan stvaranjem superkontinuuma pozitivnog predznaka, u vodećem krilu probnog pulsa nalaze se dulje valne duljine, a u pratećem kraće. S obzirom da je pumpni puls otprilike 1-2 reda veličine kraćeg trajanja od probnog pulsa u nultom trenutku on će biti preklopljen sa dijelom probnog pulsa gdje se nalaze kraće valne duljine dok će kasnije biti preklopljen sa dijelom sa duljim valnim duljinama jer se svakim sljedećim korakom kašnjenje probnog pulsa za pumpnim povećava. Ako pretpostavimo da u pobuđenom stanju uzorka postoji apsorpcija i u crvenom i u plavom dijelu elektromagnetskog spektra, u mjerenjima će se one očitovati u različitim trenucima upravo zbog prisutnosti cvrkuta. Drugim riječima, u početnom koraku u trenutku preklopa pumpnog pulsa sa dijelom probnog pulsa sa kraćim valnim duljinama u spektrogramu mjerenja dobivamo apsorpciju na kraćim valnim duljinama dok je na duljim valnim duljinama signal odsutan jer dulje valne duljine dolaze na uzorak u osnovnom stanju. Nakon nekoliko koraka, povećavanjem kašnjenja pumpni puls se preklapa sa vodećim krilom probnog pulsa te se i na duljim valnim duljinama pojavljuje signal. Shematski prikaz opisane situacije prikazan je na slici 1.14.

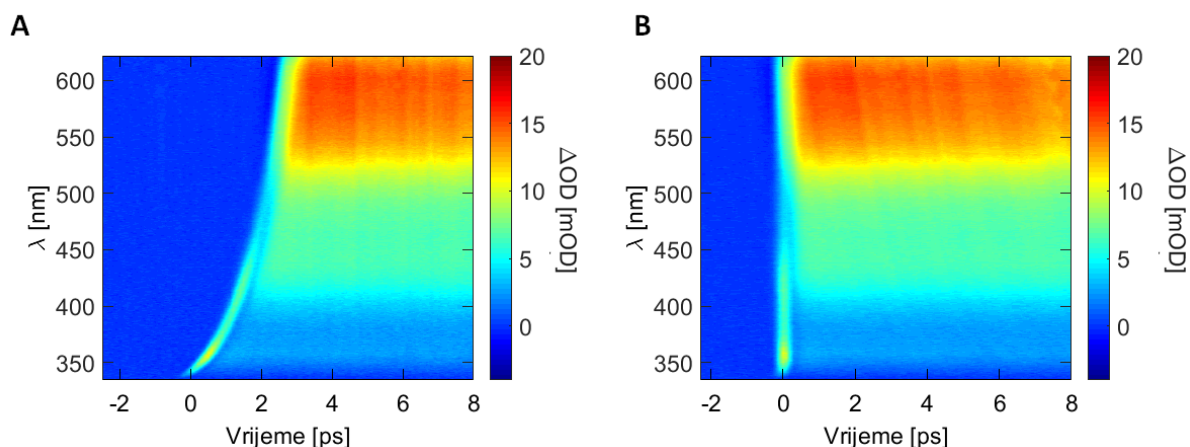
Spomenuti efekt se u spektrogramu očituje kao nagib nultog vremena što je prikazano na slici 1.15A. Kako bi se eliminirao utjecaj nagiba nultog vremena na analizu dinamike procesa, prije analize potrebno je eliminirati cvrkut. Postoji više načina na koje je moguće eliminirati



Slika 1.14: Prikaz vremenskog preklapanja pumpnog i probnog pulsa u početnom koraku mjerenja i u kasnijem trenutku mjerenja.

cvrkut. Jedan od njih je mjerenje TA u čistom otapalu koje pokazuje TPA artefakt, a zatim prilagodba polinoma trećeg reda na vrhove TPA artefakta za svaku valnu duljinu. Nakon toga, parametri polinoma dobiveni prilagodbom koriste se za eliminaciju cvrkuta na TA mjerenju uzorka. Kao referentna vremenska točka koristi se najkraća valna duljina dok se sve ostale valne duljine pomiču unazad u vremenu u skladu sa polinomom prilagođenim na TA mjerenja otapala. Nakon pomicanja signala na pojedinim valnim duljinama u vremenu dobivamo jednak početni trenutak signala za svaku valnu duljinu. Druga, najčešće korištena metoda koristi GUI (eng. graphical user interface) gdje se ručno odabiru točke TA spektrograma koje će se koristiti za prilagođavanje polinoma trećeg reda. Najčešće se bira maksimum ili minimum artefakta te se klikanjem, ručno prati nagib nultog trenutka spektrograma, a zatim softver prilagođava polinom i pomiče valne duljine unazad u vremenu te se dobiva jednak početni trenutak signala za svaku valnu duljinu što je prikazano na slici 1.15b. Negativna strana prve metode je kriterij potpuno identičnih eksperimentalnih uvjeta prilikom mjerenja cvrkuta čistog otapala i uzorka što u praksi uglavnom nije zadovoljeno. Također, pulsevi se šire u vremenu te nakupljaju dodatni cvrkut prolaskom kroz kivetu sa uzorkom/otapalom. Pošto indeks loma čistog otapala i uzorka nije jednak, u te dvije situacije se i cvrkut u TA mjerenjima može razlikovati što uvodi grešku prilikom eliminacije cvrkuta. Često je ta greška mala, ali se zbog jednostavnosti u praksi većinom koristi druga metoda ručnog odabira točaka za prilagodbu polinoma.

Nakon eliminiranja cvrkuta potrebno je eliminirati ili barem smanjiti doprinose koherentnih artefakata oko nultog vremena. Kao što je već spomenuto, za eliminiranje artefakata također postoji nekoliko metoda. Jedna metoda je, kao pri eliminaciji cvrkuta, mjerenje TA u čistom otapalu u potpuno istim eksperimentalnim uvjetima kao kod uzorka (isti vremenski raspon, iste energije laserskih zraka, isti oblik bijele svjetlosti, isti uvjeti preklapanja pumpne i probne zrake

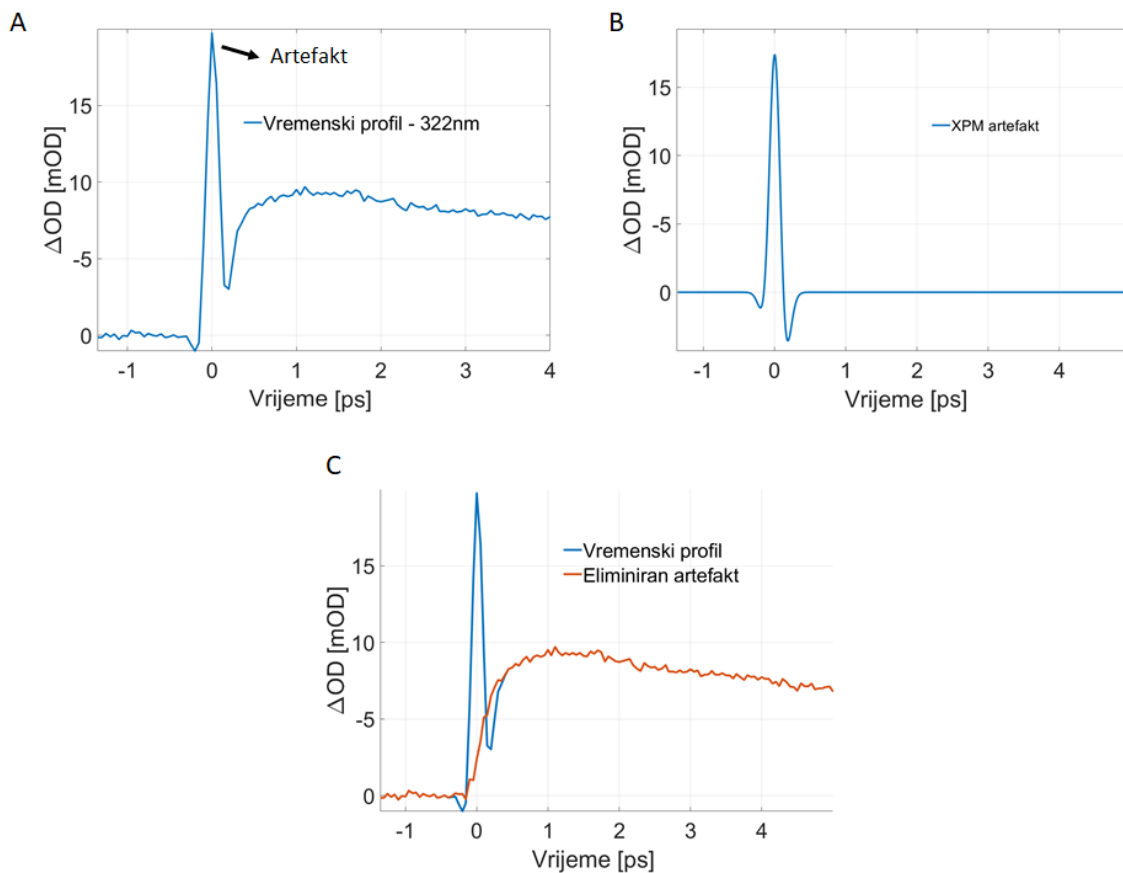


Slika 1.15: A) Nagib nultog vremena u spektrogramu TA mjerenja kao posljedica cvrkuta. B) Mjerenja dobivena naknadnom eliminacijom cvrkuta, signal nastaje u istom trenutku za sve valne duljine.

i dr.) te naknadno oduzimanje TA spektrograma otapala od spektrograma uzorka. U praksi je gotovo nemoguće postići potpuno iste eksperimentalne uvjete za mjerenja u otapalu i u uzorku, a i sami artefakti nisu potpuno identični s obzirom da molekule uzorka otopljene u otapalu mijenjaju indeks loma otopine.

Metoda koja se češće koristi je posebno eliminiranje artefakta za svaku valnu duljinu pojedino (automatiziran proces) prilagodbom gausijana i njegove prve dvije derivacije na vremenski profil odabrane valne duljine. Na slici 1.16a) jasno je vidljiv XPM artefakt prisutan u nultom vremenu prilikom TA mjerenja derivata naftola otopljenog u mješavini vode i acetonitrila (1:3). XPM artefakt je superponiran na signal kojeg daje uzorak. Na prikazani vremenski profil prilagođava se zbroj gausijana i njegovih derivacija što je zbrojeno sa konvolucijom IRF-a (eng. instrument response function) i eksponencijalne funkcije. Zbroj gausijana i njegovih derivacija odgovara vremenskom profilu artefakata (TPA, XPM i dr.) dok drugi dio funkcije, konvolucija IRF-a i eksponencijalne funkcije odgovara vremenskom profilu fotoinduciranog procesa (vidjeti poglavlje broj 2-*Metode analize mjerenja*). Na slici 1.16b) prikazan je XPM dio funkcije prilagodbe te je jasno vidljivo kako isti odgovara po amplitudi, vremenskom položaju te obliku artefaktu vidljivom na slici 1.16a). Sljedeći korak je oduzimanje funkcije prilagodbe od izmjenjenog TA vremenskog profila (slika 1.16c)). Kao rezultat dobiva se čisti vremenski profil bez artefakta. Kao i većina metoda, i spomenuta metoda ima nedostatke koji sprječavaju potpuno uklanjanje artefakta. Ukoliko mjerenje posjeduje kompleksnu ultrabrzu dinamiku u funkciju za prilagodbu potrebno je nadodati članove konvolucije IRF-a i eksponencijalne funkcije što funkciju prilagodbe čini veoma kompliciranom. Velik broj parametara otežava prilagodbu te se često prilagođen izraz ne poklapa sa mjerenim vremenskim profilima na dijelu artefakta.

Također, šum tijekom mjerenja može otežati procesu prilagodbe prepoznavanje artefakta. Dodatno, ukoliko je intenzitet artefakta usporediv s intenzitetom tranzijentne apsorpcije uzorka prepoznavanje artefakta je otežano u procesima prilagodbe. Iz navedenog bi se dalo zaključiti kako je poželjno pojačati intenzitet pumpnog pulsa kako bi artefakt bio puno većeg iznosa od realnog vremenskog profila ali to može uzrokovati ionizaciju uzorka, oštećenje prozora kivete i neželjene kemijske reakcije.



Slika 1.16: Prikaz eliminacije artefakta na mjerenjima naftola (odabrana valna duljina je 322nm). a) Izmjereni vremenski profil sa jasno vidljivim XPM artefaktom. Na prikazan profil se prilagođava konvolucija IRF-a i zbroja gausijana i njegovih derivacija (dio za artefakt) te konvolucija IRF-a i eksponencijalne funkcije (vidi *Metode analize mjerenja*) kao dio koji odgovara dinamici fotoinduciranog procesa. b) XPM artefakt dobiven konvolucijom IRF-a i gausijana i njegovih derivacija sa parametrima dobivenima prilagodbom (dio za artefakt). c) Crveno - vremenski profil bez artefakata dobiven oduzimanjem dijela za artefakt dobivenog prilagodbom.

1.3.6 Utjecaj polarizacije na mjerenje

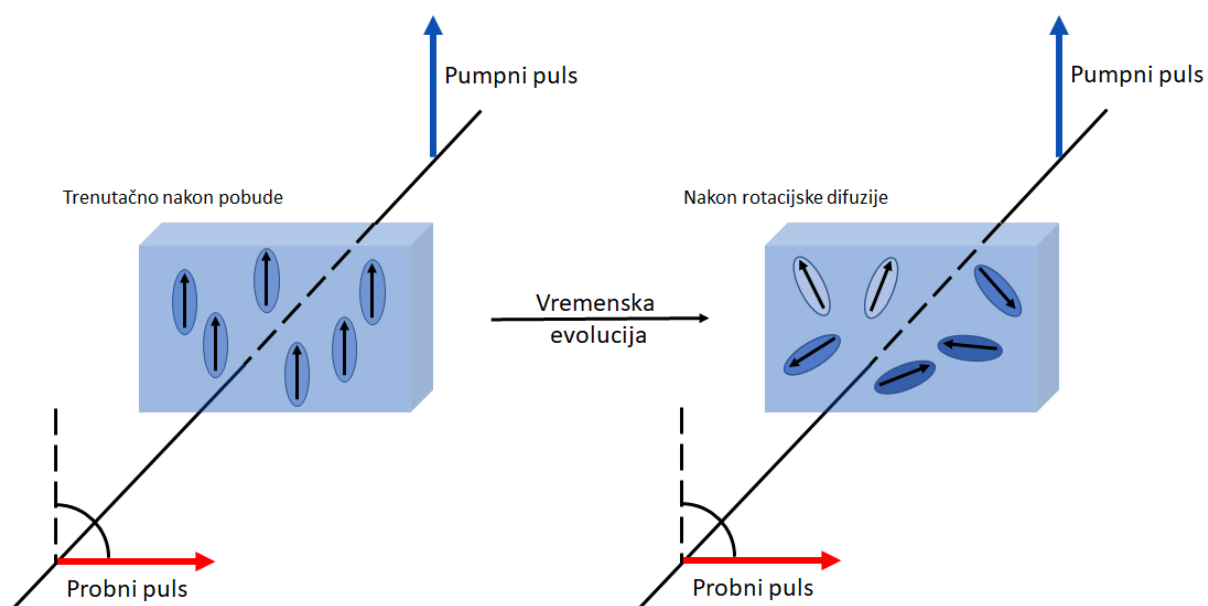
Vjerojatnost apsorpcije pumpnog fotona proporcionalna je kvadratu kosinusa kuta između polarizacija fotona i dipolnog momenta prijelaza, odnosno:

$$P \propto \cos^2 \gamma. \quad (1.17)$$

Pod pretpostavkom da su prije dolaska pumpnog pulsa na uzorak, dipolni momenti molekula uzorka nasumično orijentirani, najveću vjerojatnost pobude imaju molekule dipolnog momenta prijelaza orijentiranog u smjeru polarizacije pumpnog pulsa. Gotovo u svim slučajevima prilikom TA eksperimenata pumpni puls je linearno polariziran stoga će tako biti pretpostavljeno osim ako nije suprotno naglašeno. Nakon pobude postoji raspodjela dipolnih momenata pobuđenih molekula uzorka proporcionalna kosinusu na kvadrat. Probni puls koji dolazi do uzorka nailazi na molekule koje nisu nasumično raspodjeljene te također vjerojatnost pobude u više stanje ovisi o kvadratu kosinusa između polarizacije probnog pulsa i dipolnog momenta prijelaza molekula u više stanje. Razmotrit ćemo rubni primjer u kojemu je polarizacija probnog pulsa okomita na polarizaciju pumpnog pulsa (slika 1.17). Radi jednostavnosti, u slučaju nailaska probnog pulsa promatrat ćemo stimuliranu emisiju. Probni puls koji nailazi odmah nakon pumpnog pulsa ima jako malu vjerojatnost stimulirati emisiju s obzirom da je većina dipolnih momenata prijelaza okomita na polarizaciju probnog pulsa.

Kako promatramo sve kasniji trenutak nakon pobude, dipolni momenti molekula se reorijentiraju natrag u nasumičnu konfiguraciju, gdje brzina reorijentacije ovisi o međusobnim interakcijama uzorka i otapala te o viskoznosti otapala[59]. Nakon reorijentacije u nasumičnu konfiguraciju, probni puls ima veću vjerojatnost stimulirati emisiju molekula s obzirom da sada postoji određen broj molekula čiji se smjer dipolnog momenta prijelaza podudara sa smjerom polarizacije probnog pulsa. Posljedično, u TA mjerenjima dobivamo signal stimulirane emisije koji raste u vremenu brzinom proporcionalnom brzini reorijentacije molekula u nasumičnu konfiguraciju. Na taj način je moguće uspoređivati viskoznost otapala ili brzinu reorijentacije molekula uzorka, ali u većini TA mjerenja dinamika signala koja dolazi od reorijentacije je nepoželjna pojava s obzirom da je tijekom analize podataka sva pažnja usmjerena na dinamiku za koju se a priori pretpostavlja da dolazi od fotokemijskih reakcija ili fotoinduciranih procesa. Lako je zamijeniti rast signala stimulirane emisije sa rastom signala zbog pojave međuprodukta čija je emisija položena u sličnom dijelu spektra probnog pulsa. Zbog toga se nastoji eliminirati dinamiku čiji je uzrok reorijentacija molekula.

Moguće je TA signal shvatiti kao skup 2 doprinosa, jedan od reorijentacijskih efekata i jedan



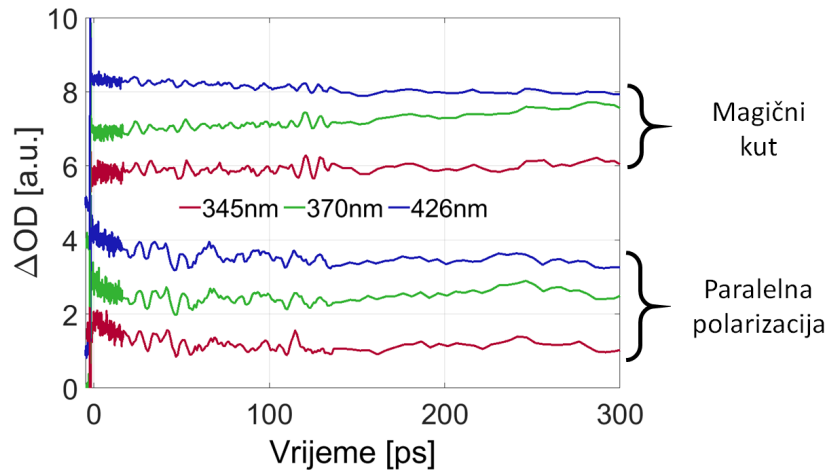
Slika 1.17: Prikaz utjecaja polarizacije na TA mjerenja. U slučaju molekula sa izraženim dipolnim momentom pumpni puls efektivno reorijentira dipolne momente molekula (lijevo) koji se vremenskom evolucijom vraćaju nasumičnim orijentacijama (desno). U slučaju pulseva okomite polarizacije stimulirana emisija je izraženija nakon rotacijske difuzije jer je određeni dio dipolnih momenata prijelaza orijentiran u smjeru polarizacije probnog pulsa. Takvi dipolni momenti označeni su tamnijom bojom od onih okomitih na polarizaciju probne zrake.

od populacijskih efekata - onih koji su cilj mjerenja. Doprinos TA signalu zbog reorijentacijskih u slučaju međusobno paralelnih i okomitih polarizacija pumpe i probe su suprotnih predznaka, a za općeniti kut u eksperimentu ukupni efekt dobije se kao zbroj doprinosa suprotnih predznaka, ovisno o projekcijama na te osi. Moguće je pokazati kako promjena energije probne zrake zbog pumpne zrake iznosi [60]:

$$\Delta U_{pr} \propto U_{pu} U_{pr} \left(\frac{1}{9} + \frac{2}{45} (2 \cos^2 \beta - \sin^2 \beta) e^{-\tau/\tau_{reor}} \right) e^{-\tau/\tau_{pop}}, \quad (1.18)$$

gdje je τ_{reor} konstanta s kojom trne doprinos signalu od reorijentacijskih efekata, U_{pr} i U_{pu} su energija probe odnosno pumpe, β je kut između polarizacije pumpne i probne zrake dok je τ_{pop} vremenska konstanta vezana uz populaciju energetskih stanja odnosno konstanta koju se želi mjeriti. Ukoliko se za β odabere tzv. magični kut (eng. magic angle) u kojem cijeli član uz $e^{-\tau/\tau_{reor}}$ iščezava, u signalu iščezavaju reorijentacijski doprinosi. Magični kut iznosi 54.7° . Na slici 1.18 uspoređeno je mjerenje adamantan-naftola, uzorka sa izraženim električnim dipolnim momentom pri paralelnim polarizacijama pumpnog i probnog pulsa te pri polarizacijama pod magičnim kutem. Na donja tri vremenska profila vidljiva je početna dinamika trajanja 20-ak ps

(τ_{reor}) na sve 3 odabrane valne duljine. S obzirom da je postavljanjem polarizacija pod magični kut ta dinamika u potpunosti eliminirana, može se zaključiti kako ista dolazi od reorijentacijske difuzije.



Slika 1.18: Usporedba TA mjerenja uzorka sa izraženim električnim dipolnim momentom (adamantan-naftol otopljen u mješavini acetonitrila i vode 3:1) pri paralelnim polarizacijama pumpnog i probnog pulsa te na polarizacijama pod magičnim kutem. U slučaju paralelnih polarizacija vidljiva je početna dinamika trajanja 20-ak ps što je zapravo τ_{reor} . Svakom od 6 vremenskih profila je nadodana vrijednost $n \cdot 0.001 \text{ mOD}$ kako bi se odvojili jedan od drugoga zbog lakše preglednosti.

1.3.7 Modifikacije postava

1.3.7.1 Tranzijentna refleksija

U slučaju krutih uzoraka, uz mjerenje TA na tankim filmovima moguće je i promatranje ultrabrze tranzijentne refleksije na tankim filmovima i na ostalim neprozirnim kristalnim uzorcima. U tom slučaju pumpna i probna zraka preklape se na površini uzorka. Reflektirana pumpna zraka se na određeni način filtrira dok je probna usmjerena prema sustavu za detekciju. Preostali dio postava je potpuno identičan onome za TA. U slučaju potrebe hlađenja uzorka moguće je postavljanje uzorka u optički kriostat. Hlađenje uzorka kriostatom omogućava proučavanje faznih prijelaza materijala ili proučavanje zamrznutih molekula. Tranzijentnom refleksijom je uz već navedene procese moguće i promatranje ultrabrze fononske dinamike te proučavanje elektron-fonon interakcija, prijenos naboja među slojevima materijala[61] i dr.

1.3.7.2 Tranzijentna anizotropija

Postav identičan onome za TA se također može iskoristiti za mjerenje ultrabrze tranzijentne anizotropije. Anizotropija je definirana na sljedeći način:

$$r(\lambda, t) = \frac{\Delta OD_{\parallel}(\lambda, t) - \Delta OD_{\perp}(\lambda, t)}{\Delta OD_{\parallel}(\lambda, t) + 2\Delta OD_{\perp}(\lambda, t)}, \quad (1.19)$$

gdje su $\Delta OD_{\parallel}(\lambda, t)$ i $\Delta OD_{\perp}(\lambda, t)$ spektrogrami TA mjerenja dobiveni pod uvjetom paralelnih odnosno okomitih polarizacija pumpne i probne zrake. Postav za tranzijentnu anizotropiju može biti potpuno isti kao i za TA dok je jedina potrebna promjena rotacija $\lambda/2$ pločica u svrhu promjene vektora polarizacije jedne od laserskih zraka. Tranzijentnom anizotropijom moguće je pratiti procese poput anizotropne relaksacije i rotacijske difuzije koji su od velikog značaja za razmišljanje kompliciranih biokemijskih procesa u živim stanicama i tkivima [62], [63]. Kao jedan od parametara koji se može izvući iz mjerenja tranzijentne anizotropije je karakteristično vrijeme rotacijske difuzije jer mjerenja tranzijentne anizotropije također posjeduju eksponencijalno trnjenje signala koje odgovara povratku molekula u nasumične, izotropne položaje nakon pobude. Iz relacije 1.19 je moguće vidjeti da je u slučaju nasumičnih, izotropnih orijentacija molekula signal $r(t)$ jednak nuli jer tada vrijedi: $\Delta OD_{\parallel}(\lambda, t) = \Delta OD_{\perp}(\lambda, t)$. Karakteristično vrijeme rotacijske difuzije je u određenim uvjetima proporcionalno viskoznosti otapala[59] te se posljedično može odrediti i lokalna unutarstanična i izvanstanična viskoznost[64].

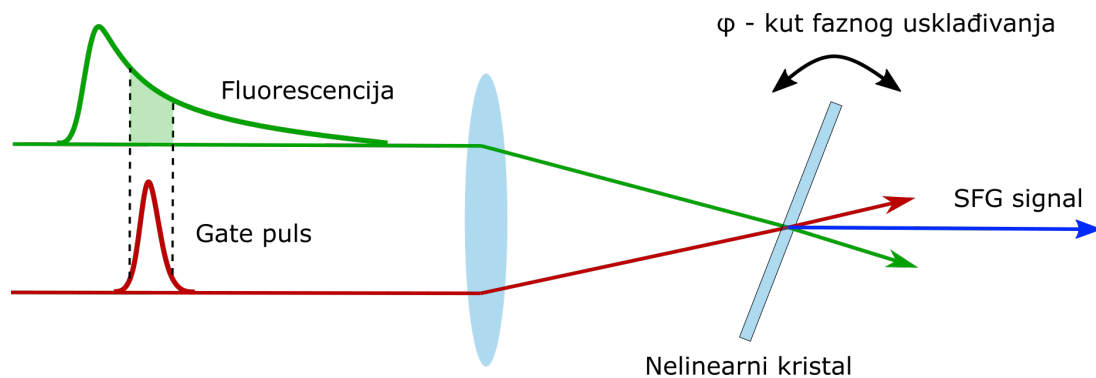
1.4 Ultrabrza vremenski razlučiva mjerenja fluorescencije

1.4.1 Opis metode

Tehnika vremenski razlučivog mjerenja fluorescencije (eng. fluorescence upconversion, FLUC) nudi mogućnost praćenja ultrabrze dinamike fluorescencije molekula te daje uvid u okruženje molekula, dinamiku otapanja, intramolekularne procese relaksacije, vibracijsko hlađenje i ultrabrzu dinamiku molekula.[65],[66],[67]. Uz TA, FLUC je jedna od najčešće korištenih metoda za proučavanje fotokemijskih reakcija u kemiji, biologiji i fizici[68],[69], a vrlo često se koristi u kombinaciji sa metodom TA te se smatra kako su spomenute metode komplementarne jedna drugoj.

Vremenski razlučiva mjerenja fluorescencije direktnim putem brojanjem fotona uz pomoć fotomultiplikatora ograničena su na razlučivost od otprilike 40-100ps[70] te je stoga za promatranje fluorescencije na ultrabrzim skalama potrebno primijeniti optičke tehnike koje nadilaze spomenutu vremensku barijeru određenu brzinom odziva detektora. U FLUC metodi, fluores-

cencija promatranog sustava se optičkim elementima poput konkavnog zrcala ili Schwarzschild objektiva usmjeri u nelinearni kristal (najčešće β -BBO, KDP) gdje je preklopljena u vremenu i prostoru sa, najčešće, infracrvenim laserskim pulsom kojeg nazivamo pulsom za uzorkovanje (eng. gate puls). Dio fluorescencijskog signala koji je trenutačno preklopljen u vremenu sa infracrvenim pulsem biva frekventno zbrojen (SFG proces) sa pulsom za uzorkovanje te se kao posljedica na izlaznoj površini kristala dobiva puls frekvencije jednake zbroju frekvencija preklopljenog dijela fluorescencije i pulsa za uzorkovanje. Vremenska rezolucija ovisi o vremenskom trajanju pulsa za uzorkovanje koje je kod najmodernijih ultrabrzih eksperimentalnih postava većinom oko nekoliko fs ili nekoliko desetaka fs. S obzirom da novonastali puls pokriva različiti pojas valnih duljina (najčešće vidljivi-UV dio elektromagnetskog spektra) te se razlikuje u smjeru propagacije od upadnih pulseva, lako ga je odvojiti od preostalih pomoću monokromatora unutar sustava za detekciju i/ili putem do samog sustava za detekciju pomoću kružnih apertura. U slučaju da je SFG proces tipa 1 (ooe ili eeo) novonastali puls se također razlikuje i po polarizaciji. Pomicanjem pulsa za uzorkovanje u vremenu u odnosu na fluorescentni puls pomoću optičkog translatora mijenjaju se dijelovi fluorescencije koji se frekventno zbrajaju. Prebrisavanjem čitavog pulsa fluorescencije dobivamo željeni signal, odnosno fluorescenciju uzorka razlučenu u vremenu (slika 1.19). S obzirom da je fluorescentni signal veoma slabog intenziteta, a SFG proces nije 100% učinkovit, FLUC signali su veoma slabog intenziteta te je stoga potreban fotomultiplikator kako bi pojačao vrijednost signala do granica mjerljivosti detektora. Na opisan način moguće je pratiti ultrabrznu dinamiku i evoluciju pobuđenih stanja proučavanog sustava.



Slika 1.19: Shematski prikaz temeljnog dijela vremenski razlučivih mjerenja fluorescencije. Obojeni dio fluorescencije zbraja se sa pulsom za uzorkovanje u nelinearnom kristalu.

1.4.2 Fazno usklađivanje

Kao što je ranije spomenuto, uvjeti faznog usklađivanja ovise o ulaznim frekvencijama (valnim duljinama) pulseva te o njihovim valnim vektorima i kutevima valnih vektora u odnosu na optičku os nelinearnog kristala. Fazno usklađivanje prilikom SFG procesa pri kojem laserske zrake na nelinearni optički kristal padaju nekolinearno veoma je zahtjevan zadatak s obzirom da se kutevi kontroliraju ručnim pomicanjem optičkih zrcala te rotiranjem nelinearnog optičkog kristala. S obzirom da fluorescencijski signal nije uske, fiksne valne duljine duž svog vremenskog profila, u slučaju fiksne orijentacije nelinearnog optičkog kristala fazno usklađivanje te učinkovitost stvaranja SFG signala ovisila bi o vremenskom koraku mjerenja, odnosno položaju optičkog translatora. Stoga bi u idealnoj situaciji bilo potrebno fazno usklađivati pulseve (odnosno rotirati optičku os nelinearnog kristala) u svakom vremenskom koraku mjerenja što je u praksi veoma zahtjevno no ne i nemoguće. Neke od metoda snimanja cijelog spektralnog raspona fluorescentnog signala su: sinkronizirano rotiranje nelinearnog kristala i skeniranje monokromatora[66] te rotiranje kristala konstantnom kutnom brzinom na svakom vremenskom koraku za određeni raspon kuteva tijekom detekcije spektrografom[71] što posljedično povećava integracijsko vrijeme za svaki korak ali se na taj način uprosječuje jačina signala za pojedine kuteve odnosno uvjete faznog usklađivanja. U slučaju promatranja uskog spektralnog raspona fluorescencije u praksi je položaj kristala i laserskih zraka moguće držati fiksnim[72].

1.4.3 Princip mjerenja

Kao i u slučaju TA metode, vremenska rezolucija je u većini slučajeva određena promatranjem signala čistog otapala[71] ili mjerenjem signala molekule koja posjeduje detaljno istraženu ultrabrzu relaksacijsku dinamiku poznatih eksponencijalnih konstanti[32]. IRF je zapravo međukorelacija IR pulsa i fluorescentnog signala.

Mjerenja teku slično kao i kod TA metode. Vremenski pomak ostvaren je pomoću računalno kontroliranog optičkog translatora na kojem se nalazi retroreflektor koji reflektira puls za uzorkovanje koji je zatim usmjeren prema nelinearnom optičkom kristalu. U slučaju konstantnog rotiranja nelinearnog kristala radi uprosječivanja faznog usklađivanja, na svakom koraku mjerenja odredi se integracijsko vrijeme potrebno za željeni broj usrednjavanja. Također je moguće usrednjavanje po pulsevima i usrednjavanje po mjerenjima. Kao rezultat mjerenja dobiva se spektrogram valnih duljina fluorescencije naspram vremena. Za razliku od TA mjerenja, signal kod FLUC mjerenja može biti samo pozitivan s obzirom da metoda prati samo fluorescenciju pobuđenih stanja sistema koji se proučava. Još jedna od razlika naspram TA metode je nedostatak koherentnih artefakata oko nultog vremena. Kako se fluorescencija preklapa sa IR pulsom

unutar nelinearnog optičkog kristala ne može doći do dvofotonske apsorpcije, XPM-a i dr. s obzirom da su signali fluorescencije višestruko slabiji od probnih pulseva u TA metodi.

Uzorci proučavani FLUC metodom također mogu biti u protočnom sistemu kao i kod TA mjerenja, dok sličan utjecaj kao i kod TA metode imaju i prozori kivete te duljina optičkog puta kroz uzorak. Uz tekuće uzorke moguće je također proučavati i uzorke u plinovitom i krutom stanju.

Metode analize mjerenja jednake su onima za TA mjerenja te su opisane u poglavlju *Metode analize mjerenja*. Spomenute dvije metode su komplementarne te skupno daju gotovo kompletnu sliku fotokemijske reakcije [32] s obzirom da su simultano praćene fluorescencija FLUC metodom te apsorpcija i stimulirana emisija TA metodom.

1.5 2D spektroskopija

1.5.1 Opis

U ovom poglavlju dan je kratak osvrt na još jednu metodu ultrabrze spektroskopije - 2D spektroskopiju. Iako nije korištena u okvirima disertacije zanimljivo je spomenuti ju s obzirom da nije standardnog pump-probe tipa. Metoda 2D spektroskopije spada u metode ultrabrze spektroskopije višeg reda. Kao što je već spomenuto, Heisenbergove relacije neodređenosti u spektralnoj i vremenskoj domeni nameću određena ograničenja metodi TA. Naime, ukoliko se želi postići trajanje pulseva kraće od 10fs, a s time i kratka vremenska rezolucija, spektar pulsa mora biti širok. Kao primjer moguće je navesti da za trajanje pulsa od 8fs, centralne valne duljine 550nm spektar mora biti širok 56nm. Stoga, postizanjem kraće vremenske rezolucije gubi se na spektralnoj rezoluciji pumpnog pulsa. Ukoliko određeni uzorak posjeduje 2 energetska stanja bliska u energiji, vrlo kratkim femtosekundnim pumpnim pulsem moguće je populariti oba stanja istovremeno što nije poželjno. Naime, u svrhu detaljnog proučavanja fotoinduciranog procesa potrebno je selektivno inicijalno populiranje pobuđenog stanja što u situaciji spektralno širokog pumpnog pulsa nije moguće. Metoda 2D spektroskopije zaobilazi ograničenja dana Heisenbergovim relacijama neodređenosti te u isto vrijeme pruža visoku rezoluciju i u spektralnoj i u vremenskoj domeni što je detaljnije opisano u nastavku.

Tijekom mjerenja koriste se 3 pulsa čiji je vremenski slijed prikazan na slici 1.20A. Eksperiment je moguće postaviti u kolinearnoj i nekolinearnoj geometriji (slika 1.20B). Nasuprot TA i FLUC metodi, u 2D spektroskopiji koriste se 2 pumpna pulsa i jedan probni puls. Fazna usklađenost dva pumpna pulsa (potpuno identični pulsevi) je vrlo bitna što je naročito zahtjevno ostvariti kod nekolinearne geometrije. Vremenski razmak između dva pumpna pulsa naziva se

vremenom evolucije ili vremenom koherencije dok se vrijeme između drugog pumpnog pulsa i probnog pulsa naziva vremenom čekanja. Kao i u TA, mjeri se signal u ovisnosti o valnoj duljini i vremenu. U nekolinearnoj geometriji svaki od navedenih pulseva dolazi do uzorka iz različitih smjerova dok u kolinearnoj geometriji dva pumpna pulsa dolaze iz istog smjera prema uzorku ali pod kutem u odnosu na probni puls. U kolinearnoj geometriji dva identična pumpna pulsa moguće je stvoriti npr. *pulse-shaper*-om kojim je također moguće i kontrolirati vremenski razmak među njima [73]. Uz spomenuto, dva identična, kolinearna, fazno usklađena pumpna pulsa moguće je stvoriti i TWINS postavom (eng. Translating-Wedge-based Identical pulses eNcoding System) [74] koji je baziran na transparentnim klinovima čije umetanje u lasersku zraku određuje vremenski razmak između pumpnih pulseva. U nekolinearnoj geometriji uobičajen način stvaranja pumpnih pulseva je razdvajanje laserskih zraka difrakcijskim rešetkama [75],[76]. Prednost korištenja nekolinearne geometrije jest odsutstvo pozadinskog signala s obzirom da je signal emitiran u smjeru različitom od smjera propagacije ostalih pulseva dok je u praksi zahtjevniji.

U nekolinearnoj geometriji nakon što 2 pumpna pulsa i probni puls interagiraju sa uzorkom dolazi do emisije signala iz uzorka u smjeru faznog usklađivanja (slika 1.20B). Smjer faznog usklađivanja razlikuje se od smjera probnog pulsa. Drugačiji smjer signala može se objasniti stvaranjem difrakcijske rešetke unutar uzorka zbog interakcije s pumpnim pulsevima. Posljedično, probni puls se raspršuje i propagira u različitom smjeru. Radi detekcije faze uvodi se pomoćni, poznati puls kojeg se naziva lokalnim oscilatorom na koji se superponira signal koji se zatim detektira. Važno je napomenuti kako u kolinearnoj geometriji sam probni puls služi kao lokalni oscilator. Nadalje, signal može biti emitiran u 2 smjera definirana faznim usklađivanjem. Jedan od smjerova je $\vec{k}_s = -\vec{k}_1 + \vec{k}_2 + \vec{k}_3$ i u tom slučaju se signal naziva *rephasing* signal. U drugom slučaju signal je emitiran u smjeru $\vec{k}_s = \vec{k}_1 - \vec{k}_2 + \vec{k}_3$ i tada se isti naziva *non-rephasing* signalom. Hoće li signal biti *rephased* ili *non-rephased* ovisi samo o tome koji od pumpnih pulseva dolazi prvi do uzorka. Nazivi signala bit će pojašnjeni u nastavku. Nasuprot, u kolinearnoj geometriji signal uvijek biva emitiran u smjeru probnog pulsa te se *rephasing* i *non-rephasing* signali ne razlikuju po smjeru propagacije.

Interakcija prvog pumpnog pulsa sa uzorkom stvara koherenciju elektronskih stanja koja evoluirala unutar vremena evolucije (t_1) odnosno nakuplja fazu. Kako svaka molekula unutar uzorka posjeduje drugačije okruženje, oscilirajuća koherentna superpozicija ubrzo poprima nasumične faze. Nakon vremena evolucije drugi pumpni puls interagira sa uzorkom te pretvara koherentnu superpoziciju stanja u populaciju. Spomenutom interakcijom svaka pojedina molekula prelazi u stanje ili populacije osnovnog stanja ili populacije pobuđenog stanja. Tijekom vremena čekanja nema nakupljanja faze i sustav je u stanju populacije. Upravo u tom vre-

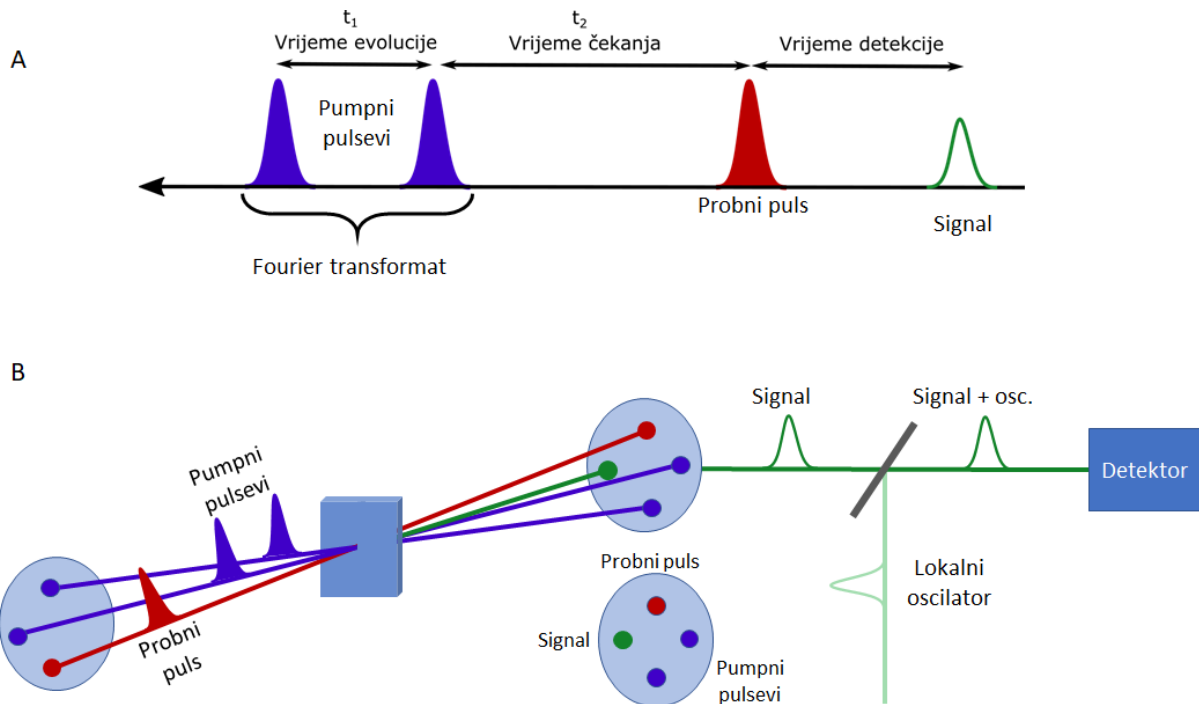
menu u uzorku se događa dinamika koja se proučava (prijenos energije, naboja itd.). Treća interakcija, sa probnim pulsom ponovno stvara koherenciju stanja i tijekom daljnjeg vremena (vremena detekcije) ponovno dolazi do nakupljanja faze. Ukoliko se radi o *rephasing* signalu tada tijekom vremena detekcije dolazi do ponovnog dobivanja koherencije i signala suprotne vremenske evolucije od one dobivene tijekom vremena evolucije. Točnije, dolazi do vremenski suprotne pojave od defaziranja (eng. *dephased*). Sustav nastavlja oscilirati gdje se zaustavio na kraju vremena evolucije te sada biva defaziran unatraske u vremenu odnosno dolazi do stvaranja koherentne oscilacije i iste faze što se još naziva *photon-echo*. U slučaju *non-rephasing* signala ne dolazi do suprotne pojave od defaziranja te sustav samo nastavlja nakupljati fazu od trenutka gdje se zaustavio nakon vremena evolucije. Za mjerenja 2D spektroskopije jednako su bitni i *rephasing* i *non-rephasing* signali.

Heisenbergove relacije neodređenosti zaobilaze se variranjem vremena evolucije odnosno vremenskog razmaka između dva pumpna pulsa i Fourierovom transformacijom spomenute vremenske dimenzije. Time se dobiva os pobudne valne duljine. Na taj način nema povezanosti između vremenskog trajanja pumpnih pulseva i pobudne valne duljine te se zaobilaze Heisenbergove relacije neodređenosti s obzirom da pumpni pulsevi mogu biti proizvoljno kratki u vremenu.

1.5.2 Interpretacija mjerenja

Tijekom mjerenja, variraju se i vrijeme evolucije (t_1) i vrijeme čekanja (t_2). U prvom koraku varira se vrijeme evolucije dok se vrijeme čekanja drži fiksnim što rezultira dobivanjem spektrograma $S(t_1, t_2, \omega_3)$ sa fiksnim t_2 . ω_3 je frekvencija signala (valna duljina) dobivena spektralnim razlaganjem u spektrometru. Fourier transformiranjem dobivenog spektrograma po vremenskoj osi t_1 dobiva se $S(\omega_1, t_2, \omega_3)$ gdje ω_1 predstavlja frekvenciju (valnu duljinu) pobude. Na taj način dobiva se spektrogram kojem je na jednoj osi valna duljina pobude, a na drugoj valna duljina detekcije. Variranjem vremena evolucije u jednom trenutku dolazi do potpunog preklapanja pumpnih pulseva. U sljedećem koraku, daljnjim variranjem vremenskog razmaka dolazi do zamjene vremenskog slijeda pumpnih pulseva. Također, sa spomenutom zamjenom dolazi i do zamjene signala iz *rephased* u *non-rephased* ili obrnuto.

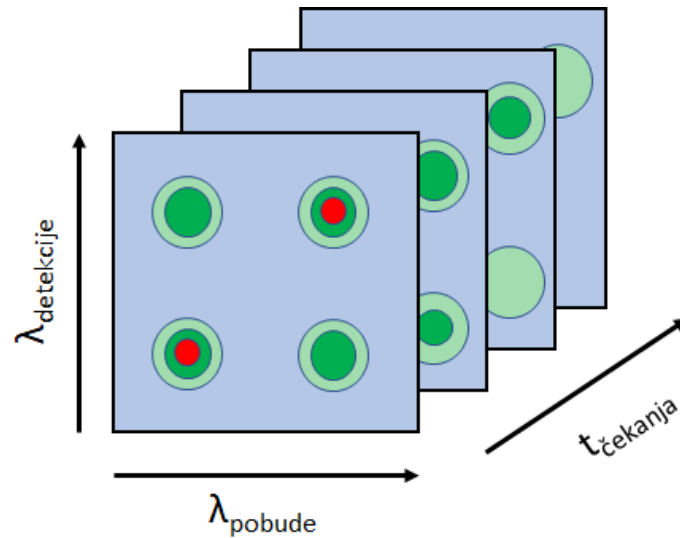
Slijedi promjena vremena čekanja te se ponovi postupak variranja vremena evolucije što ponovno rezultira dobivanjem spektrograma koji posjeduje os valne duljine pobude i detekcije. Dobiveni spektrogrami shematski su prikazani na slici 1.21. Za svako vrijeme dobiva se poseban spektrogram. Spektar za određenu valnu duljinu pobude dobiva se uzimanjem horizontalnog prereza (λ_{pobude} fiksno) jednog spektrograma dok se vremenska evolucija spektara



Slika 1.20: Vremenski (A) i geometrijski (B) raspored pulseva tijekom 2D spektroskopskih mjerenja. Na slici B prikazan je nekolinearni raspored pulseva gdje se signal detektira spektralnom interferometrijom sa lokalnim oscilatorom. Također, raspored pulseva u prostoru može biti i kolinearan.

dobiva uzimanjem istog prereza za svaki spektrogram.

Za analizu podataka bitan je i oblik, položaj i intenzitet spektralnih pojaseva ili maksimuma [77]. Položaj spektralnih maksimuma sadrže informaciju o energijskim nivoima i vezanjima istih dok oblici i intenziteti sadrže informaciju o dinamici unutar uzorka. Spektralni maksimumi se po položaju dijele na dvije vrste: oni koji padaju na dijagonalu spektrograma i oni koji se nalaze izvan dijagonale. Spektralni vrhovi izvan dijagonale pojavljuju se zbog interakcije ili vezanja određenih stanja te stoga valna duljina pobude i detekcije nisu iste. Na dijagonali se pojavljuju vrhovi čija je valna duljina detekcije jednaka valnoj duljini pobude. Ukoliko je spektralni vrh položen na valnu duljinu detekcije dulju od valne duljine pobude moguće je da je uzrokovan procesom u kojem je došlo do pobude u više stanje te zatim do transfera energije u niže stanje. U obrnutom slučaju gdje je valna duljina detekcije kraća od valne duljine pobude jedan od mogućih uzroka je apsorpcija višeg stanja. Za prikaz 2D spektroskopskih mjerenja uobičajeno je koristiti signal koji se naziva diferencijalnom transmisijom te posjeduje suprotan predznak u odnosu na metodu TA, odnosno pozitivnim predznakom označava se emisija dok se negativnim predznakom označava apsorpcija.



Slika 1.21: Spektrogrami mjerenja 2D spektroskopijom. Svaki pojedini spektrogram posjeduje os pobude i os detekcije. Za različito vrijeme čekanja dobiva se potpuno novi spektrogram sa novim osima pobude i detekcije.

Što se oblika spektralnih vrhova tiče, ukoliko je spektralni vrh izdužen po dijagonali uzrok je nehomogeno širenje spektralne linije na duljoj vremenskoj skali dok je izduživanje okomito na dijagonalu uzrokovano homogenim širenjem spektralne linije na kraćoj vremenskoj skali. Vremenskom evolucijom sustav interagira sa okolinom, a oblik spektralnih vrhova se mijenja prema kružnom.

TA spektar se može dobiti iz mjerenja 2D spektroskopije na način da se signal integrira po osi valne duljine pobude. Samim time gubi se određena količina informacije o vezanju među stanjima jer se vrhovi na dijagonali i izvan dijagonale stapaju u jedno i tu se najbolje vidi prednost 2D spektroskopije. 2D spektroskopijom se najčešće proučavaju tekući i kruti uzorci dok se analiza podataka vrši na već spomenut način - globalnom analizom ili analizom pojedinih valnih duljina. Na spomenut način moguće je proučavati kompleksne sisteme kombinacijom vrlo visoke vremenske rezolucije i vrlo visoke rezolucije u pobudnoj valnoj duljini.

Poglavlje 2

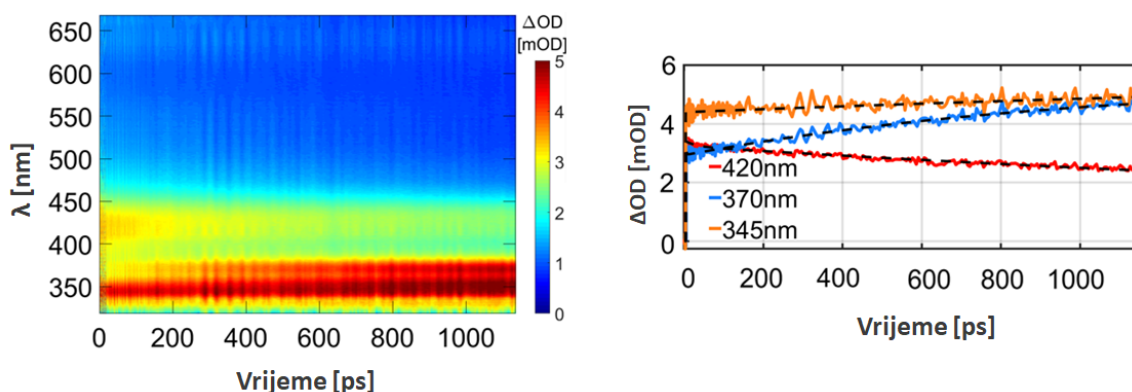
Metode analize mjerenja

2.1 Analiza pojedinih valnih duljina signala

Kako bi se izvuklo što više korisnih informacija o tijeku fotoinduciranog procesa potrebna je pažljiva analiza spektara dobivenih jednom od metoda ultrabrze spektroskopije, što je često vrlo zahtjevan posao. Postoje dvije mogućnosti analize mjerenja, a to su analiza signala pojedinih valnih duljina i globalna analiza. Kako je temeljna metoda ove disertacije TA, analiza TA mjerenja će biti objašnjena u detalje.

Na slici 2.1 prikazan je spektrogram mjerenja molekule derivata naftola i vremenski profili na 3 odabrane valne duljine označene različitim bojama. Pripadne funkcije prilagodbe označene su crnom isprekidanom linijom. O spomenutoj molekuli, njenoj ultrabrzoj dinamici, fotokemijskoj reakciji te samim mjerenjima će više riječi biti u poglavlju 7 - *Mehanizmi stvaranja QM-a fotodehidratacijom derivata 2-naftola*.

Metoda analize signala pojedinih valnih duljina oslanja se na analizu nekoliko valnih duljina karakterističnih za uzorak koji je proučavan. Detaljnom analizom spektrograma i spektara te usporedbom s dostupnim izračunatim spektrima apsorpcije pobuđenih stanja ili drugim dostupnih informacija o ultrabrzoj dinamici promatranog sustava biraju se karakteristične valne duljine. To su najčešće valne duljine koje predstavljaju maksimume spektralnih vrpca koje su prisutne u mjerenju. Sa spektrograma 2.1 je vidljivo da postoje 3 jasno vidljive spektralne vrpce, centrirane na 420nm, 370nm, te 345nm. Svaka od spektralnih vrpca je pozitivnog predznaka te predstavlja apsorpciju bilo višeg pobuđenog stanja ili apsorpciju produkta/međuprodukta. Nakon odabira valnih duljina, iste se dalje analiziraju. Prije detaljnije analize potrebno je eliminirati cvrkut kao što je to opisano u poglavlju 1.3.5. - *Eliminacija cvrkuta i artefakata* kako bismo mogli okvirno procijeniti odnos brzina rasta i trnjenja signala između odabranih valnih duljina. Nakon eli-

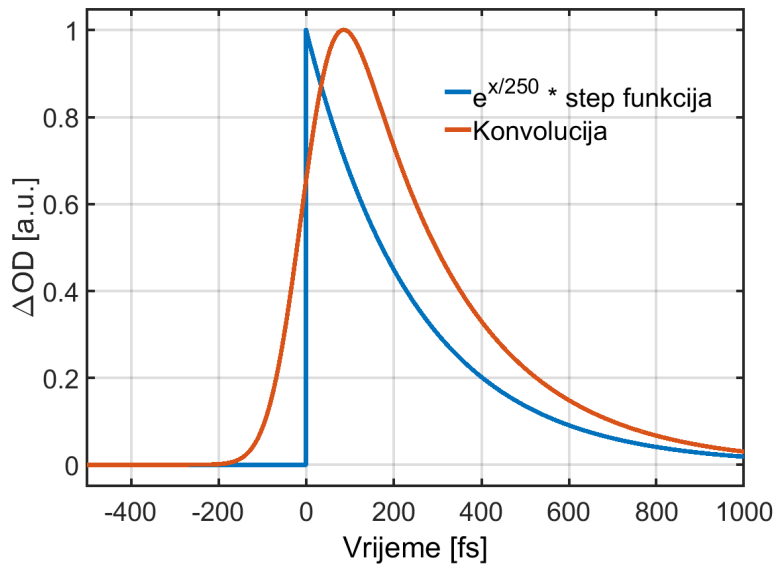


Slika 2.1: Tranzijentna apsorpcija molekule derivata naftola. Spektrogram (lijevo) te dinamika u vremenu za 3 odabrane valne duljine (desno). Pripadne funkcije prilagodbe označene su isprekidanom linijom crne boje.

minacije cvrkuta potrebno je detaljnije analizirati početnu dinamiku te identificirati prisutnost artefakata, a zatim, ukoliko artefakti interferiraju sa signalom potrebno je posegnuti za metodom njihove eliminacije. Ukoliko se dinamika signala dešava na skalama od desetak ili više pikosekundi, a vremenska rezolucija postava je otprilike 100fs, u većini slučajeva eliminacija artefakata nije ni potrebna s obzirom da će prilagođene eksponencijalne funkcije točno slijediti eksponencijalno trnjenje.

Nakon eliminacije artefakata (ukoliko je to potrebno) kreće se u prilagodbu eksponencijalnih funkcija na signale karakterističnih valnih duljina. S obzirom da je eksponencijalna funkcija $Ae^{-t/\tau}$ u vremenima $t < 0$ iznosa različitog od nule, a TA signal na karakterističnoj valnoj duljini u vremenima $t < 0$ jednak nuli, potrebno je uvesti dodatan član koji osigurava da je funkcija prilagodbe jednaka nuli u spomenutim vremenima. Prvi, očiti prijedlog je eksponencijalna funkcija pomnožena sa step funkcijom: $\theta(t) \cdot Ae^{-t/\tau}$ što je prikazano na slici 2.2 plavom bojom.

S obzirom da je eksperimentalni postav ograničene vremenske rezolucije, odnosno IRF je različit od nule, a eksponencijalna funkcija pomnožena step funkcijom posjeduje nagli skok sa nule na maksimalnu vrijednost, takav umnožak ne predstavlja dobru funkciju za prilagodbu. Razlog tome je što je u mjerenjima vrijeme rasta signala ograničeno vremenskom rezolucijom postava. Odnosno, čak i signali koji se zapravo u uzorku pojavljuju trenutno, u mjerenjima posjeduju vrijeme rasta otprilike jednako vremenskoj rezoluciji postava. Stoga, najbolji izbor za funkciju prilagodbe je eksponencijalna funkcija konvoluirana sa IRF-om, odnosno gaussijanom čiji je FWHM iznos jednak vremenskoj rezoluciji postava. Ta funkcija prikazana je na slici 2.2 crvenom bojom te je vidljivo da signal raste postepeno u vremenu jednakom vremenskoj rezoluciji postava te da zatim počinje eksponencijalno trnuti. Kao što je spomenuto, okvirna



Slika 2.2: Eksponencijalna funkcija pomnožena sa step funkcijom (plava linija) i eksponencijalna funkcija konvoluirana sa gausijanom poluširine 150fs (crvena linija).

vremenska rezolucija se najčešće odredi mjerenjem TA signala u otapalu te mjerenjem širine ili poluširine artefakta. Kao početna vrijednost u prilagodbi, FWHM IRF-a postavi se na vrijednost određenu pomoću otapala. S obzirom da je mjerenjem dobiven signal koji je inherentno konvoluiran IRF-om, prilagodbom spomenute funkcije moguće je odrediti tzv. nekonvoluirane vrijednosti rasta i trnjenja signala koje u nekim slučajevima čak znaju biti i ispod vremenske rezolucije postava. Konvolucijom gausijanske funkcije i eksponencijalne funkcije dobiva se funkcija prilagodbe koja je dana s:

$$I(t) = \frac{1}{2} e^{-\tau\left(t - \frac{\sigma^2\tau}{2}\right)} \left[1 + \operatorname{erf}\left(\frac{t - \frac{\sigma^2\tau}{2}}{\sqrt{2}\sigma}\right) \right], \quad (2.1)$$

gdje σ pripada gausijanu dok je τ konstanta eksponencijalne funkcije. Ukoliko na danoj valnoj duljini postoji sumnja da signal trne sa više od jedne eksponencijalne konstante, u prethodnu relaciju se dodaje dodatna eksponencijalna funkcija konvoluirana sa istim IRF-om. U kombinaciji sa artefaktom modeliranim gausijanom te njegovim derivacijama ukupna funkcija prilagodbe dana je s [58]:

$$A_1 e^{-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma^2}} + A_2 \frac{t_0 - t}{\sigma^3} e^{-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma^2}} + A_3 \frac{t^2 - 2tt_0 - \sigma^2 + t_0^2}{\sigma^5} e^{-\frac{(t-t_0)^2}{2\sigma^2}} + \text{relacija}(2.1), \quad (2.2)$$

iz čega se kao parametri prilagodbe dobiju nekonvoluirana vremena rasta ili trnjenja signala

(τ) te amplitude eksponencijalnih funkcija. Dodatno, ako se FWHM IRF-a postavi kao slobodan parametar, kao rezultat prilagodbe također se dobije točnije određena vremenska rezolucija postava s obzirom da je FWHM IRF-a kao parametar prilagođen na artefakte i na rast signala.

U nekim slučajevima nakon prilagodbe i dobivanja amplituda te nekonvoluiranih vremena rasta i trnjenja signala analiza završava. To je slučaj u situacijama gdje je fotokemijska reakcija vrlo jednostavna ili je nemoguće provesti globalnu analizu iz nekoliko razloga koji će biti pojašnjeni u sljedećem poglavlju.

2.2 Globalna analiza

Za razliku od analiziranja signala na pojedinim, karakterističnim valnim duljinama metoda globalne analize pruža mogućnost analize cjelokupnog mjerenja, odnosno spektrograma. Globalna analiza često je bazirana na određenom modelu. Dvodimenzionalni podaci najprije se analiziraju metodom dekompozicije matrice na singularne vrijednosti (SVD, eng. singular value decomposition) kako bi se procijenio broj komponenti signala (rang matrice) iz kojega se može odrediti podskup koji će zadovoljavajuće rekonstruirati originalne podatke korištenjem linearne kombinacije. Nakon spomenutog, vrši se globalna prilagodba cijele matrice eksperimentalnih podataka bazirana na pretpostavljenom modelu relaksacije. Kao rezultat globalne analize dobivaju se kinetički profili i pridruženi spektri zajedno s konstantama rata.

Dekompozicija matrice na singularne vrijednosti je dana sljedećim oblikom:

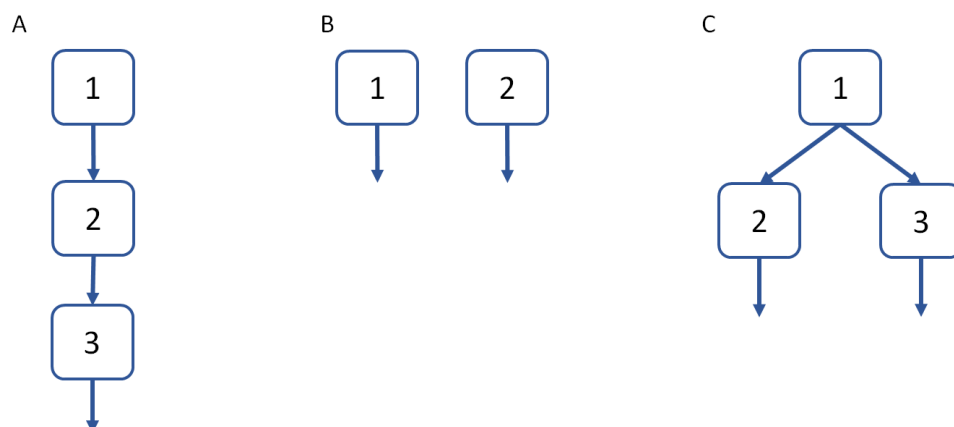
$$\Delta A = \mathbf{U}\Sigma\mathbf{V}, \quad (2.3)$$

gdje je ΔA matrica eksperimentalnih mjerenja dok su \mathbf{U} , Σ i \mathbf{V} matrice karakterističnih spektara, singularnih vrijednosti i kinetike. Matrica singularnih vrijednosti Σ je dijagonalna i jednoznačno određena. Broj singularnih vrijednosti različitih od nule je jednak rangu matrice eksperimentalnih mjerenja ΔA . Matrice \mathbf{U} i \mathbf{V} još se nazivaju lijevim odnosno desnim singularnim vektorima. Zapis relacije (2.3) preko sumacije je dan sa:

$$\Delta A = \sum_i \sigma_i \mathbf{U}_i \mathbf{V}_i, \quad (2.4)$$

iz čega je vidljivo kako je matrica dekomponirana na pojedine spektre i pripadne kinetičke profile čija je amplituda pripadna singularna vrijednost. Nakon SVD analize te odabira prisutnih karakterističnih spektara, pretpostavlja se relaksacijski model fotokemijske reakcije koja se proučava. Model može biti sekvencijalan, paralelan ili njihova kombinacija. U sekvencijalnim reakcijama svako stanje s vremenom daje isključivo jedno novo stanje dok u paralelnim reak-

cijama određeno stanje može dati dva ili više novih stanja koja također mogu dati više stanja što je prikazano na slici 2.3. Važno je napomenuti kako se uključivanjem modela relaksacije različitog od sekvencijalnog popraćena analiza naziva globalnom target analizom.



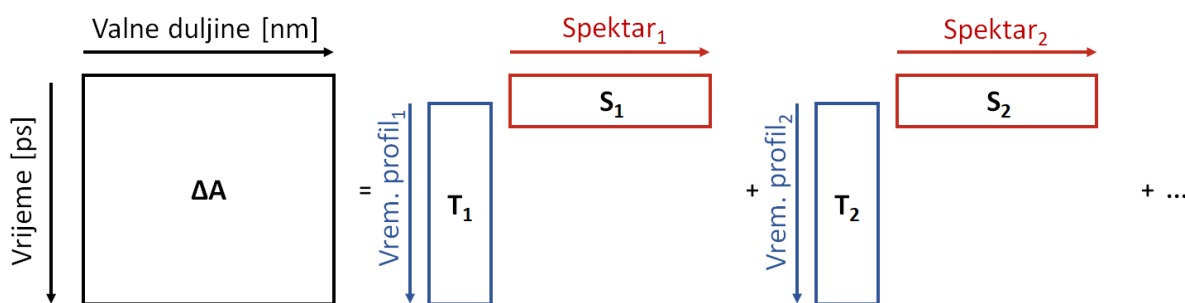
Slika 2.3: A) Sekvencijalni model, B) paralelni model i C) ciljani model fotokemijske reakcije ili fotoinduciranog procesa.

Odabrani model prilagođava se na eksperimentalna mjerenja, a relacija korištena za prilagodbu tijekom globalne analize dana je s:

$$\Delta A(\lambda, t) = \sum_i A_i(\lambda) e^{-t/\tau_i}. \quad (2.5)$$

Bitno je primjetiti da amplitude eksponencijalnih funkcija, $A_i(\lambda)$, ovise o valnoj duljini te stoga predstavljaju spektre različitih stanja odnosno molekula prisutnih u fotokemijskoj reakciji ili fotoinduciranom procesu. Slika 2.4 daje shematski prikaz prethodno opisane prilagodbe dvodimenzionalne matrice eksperimentalnih podataka. Dobiveni spektri $A_i(\lambda)$ te konstante rata τ_i u potpunosti opisuju fotokemijsku reakciju ili proučavani fotoinducirani proces u mjeri u kojoj to omogućuju dobivena mjerenja. Dobiveni spektri u slučaju korištenja sekvencijalnog modela nazivaju se EAS (eng. evolution associated spectra), u slučaju paralelnog modela nazivaju se DAS (eng. decay associated spectra), a u slučaju ciljanog modela nazivaju se SAS (eng. species associated spectra).

Treba napomenuti kako rezultat globalne analize nije jedinstven. U većini slučajeva za danu dvodimenzionalnu matricu eksperimentalnih mjerenja moguće je pretpostaviti nekoliko modela koji će imati usporedivu kvalitetu prilagodbe. Kao najrealniji model se uzima onaj kojeg podupiru teorijska razmatranja, a također, najčešće se najtočnijim rezultatom pokazuje onaj



Slika 2.4: Shematski prikaz globalne analize eksperimentalnih podataka dobivenih određenom metodom ultrabrze spektroskopije. Matrica ΔA se dekomponira na vremenske profile T_i te pridružene spektre S_i .

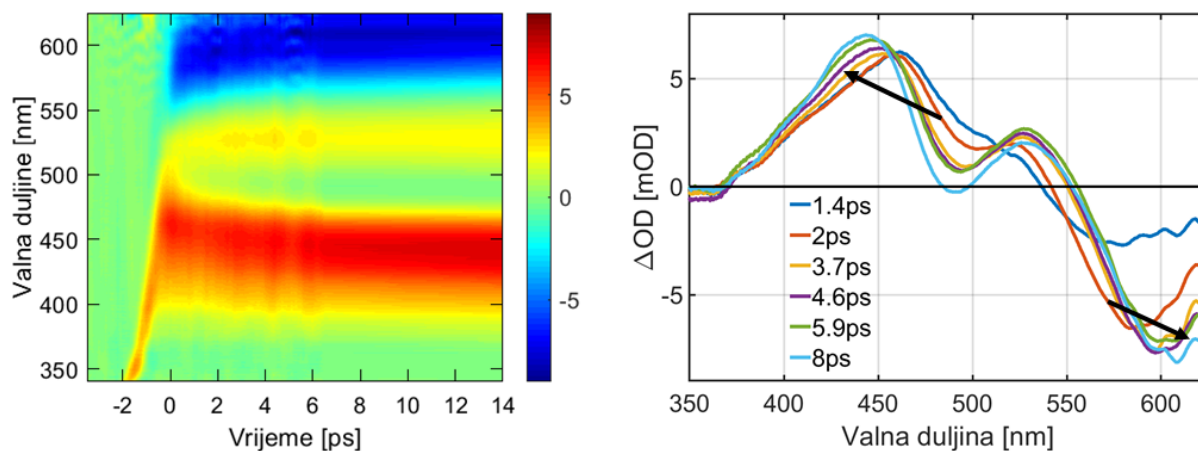
model koji ima najmanje pretpostavljenih parametara (broj spektara, kompliciranost reakcije i sl.).

2.3 Primjer: globalna analiza DCM molekule

Kao primjer globalne analize, u nastavku će biti prikazan tok globalne analize na molekuli DCM-a (eng. 4-Dicyanomethylene-2-methyl-6-p-dimethylaminostyryl-4H-pyran). DCM se koristi kao laserska boja zbog mogućnosti širokog variranja emisijske valne duljine. Kao takav, poznat je kao najefikasnija laserska boja za spektralno područje 630-680nm. Rezultat TA mjerenja DCM-a otopljenog u vodi, odnosno spektrogram i pripadni spektri prikazani su na slici 2.5. Detaljan opis eksperimentalnog postava dan je u poglavlju 3. - *Eksperimentalni postav* dok je trenutno bitno napomenuti da je valna duljina pumpnog pulsa 267nm, vremenska rezolucija oko 150fs, a spektar probnog pulsa pokriva područje valnih duljina 340-620nm. Molekula je stabilna te ne podliježe fotokemijskim reakcijama. Nakon pobude pojavljuje se pozitivna vrpca u području valnih duljina 400-470nm koja odgovara apsorpciji prvog pobuđenog elektronskog stanja [78], dok negativna vrpca odgovara stimuliranoj emisiji te se nalazi u rasponu valnih duljina 550-620nm.

Mjerenja su iskorištena kao primjer za globalnu analizu zbog toga što se maksimumi obje spektralne vrpce spektralno pomiču u vremenu te zbog toga što ESA i GSB doprinosi nisu spektralno preklapljeni. Spektralni pomak moguće je objasniti efektom otapanja polarnih molekula u polarnom otapalu[78]. Molekula DCM-a je polarna molekula te u osnovnom stanju posjeduje električni dipolni moment jednak 5.6D [79],[80],[81].

Dipolni moment pobuđenog stanja je bitno veći i iznosi 26.3D [82]. U infinitezimalno kratkom periodu nakon pobude sistem otapalo+DCM(S_1) ne nalazi u minimumu energije jer

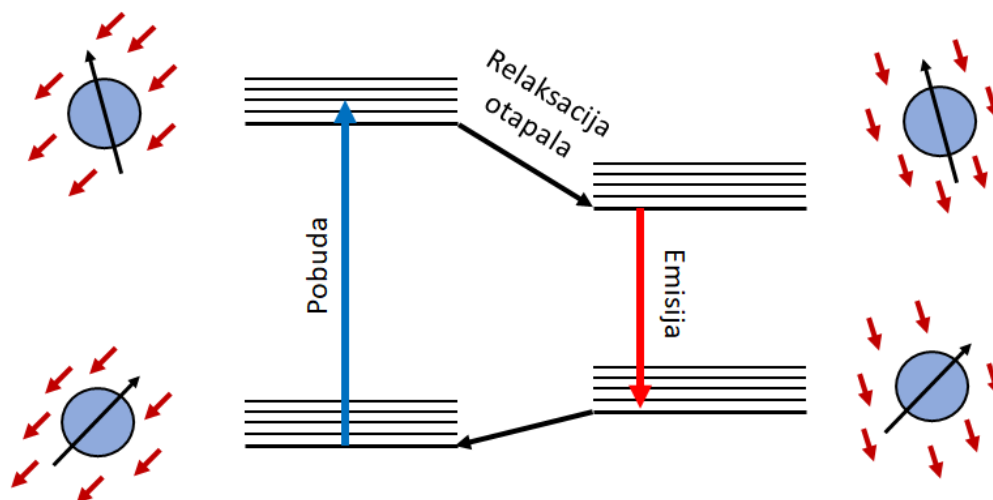


Slika 2.5: TA mjerenja DCM-a. Spektrogram (lijevo) te evolucija pripadnih spektara (desno). Strelicama je naznačen smjer vremenske evolucije istaknutih spektralnih pojaseva.

su dipolni momenti otapala orijentirani kako bi minimizirali energiju sistema dok su molekule DCM-a u osnovnom stanju, a ne pobuđenom. Kako vrijeme odmiče, molekule otapala (u ovom slučaju vode) se zbog bitno manje mase u odnosu na molekulu DCM-a reorijentiraju kako bi smanjile ukupnu energiju sustava, odnosno pobuđenog stanja DCM-a. Tijekom reorijentacije se valne duljine stimulirane emisije i apsorpcije pobuđenog stanja kontinuirano mijenjaju (slika 2.6). Valna duljina SE se pomiče prema crvenom dijelu spektra dok se valna duljina ESA pomiče prema plavom dijelu spektra.

Kao rezultat globalne analize očekujemo 2 karakteristična spektra od kojih jedan odgovara TA spektru odmah nakon pobude (nerelaksirana situacija) i prije reorijentacije molekula otapala dok drugi odgovara TA spektru nakon reorijentacije molekula otapala (relaksirana situacija) te nakon minimizacije energije pobuđenog stanja sistema. Kao kinetičke profile očekujemo eksponencijalni pad prvog spektra te komplementaran rast drugog spektra. S obzirom na jednostavnost dvodimenzionalne matrice mjerenja relativno lako je okvirno pretpostaviti točan model i rezultat globalne analize dok je u većini slučajeva to puno teže te se, kao što je spomenuto, za različite pretpostavljene modele relaksacije mogu dobiti prilagodbe slične kvalitete. I u jednostavnijem i u kompliciranijem slučaju, prvi korak je SVD analiza dvodimenzionalne matrice.

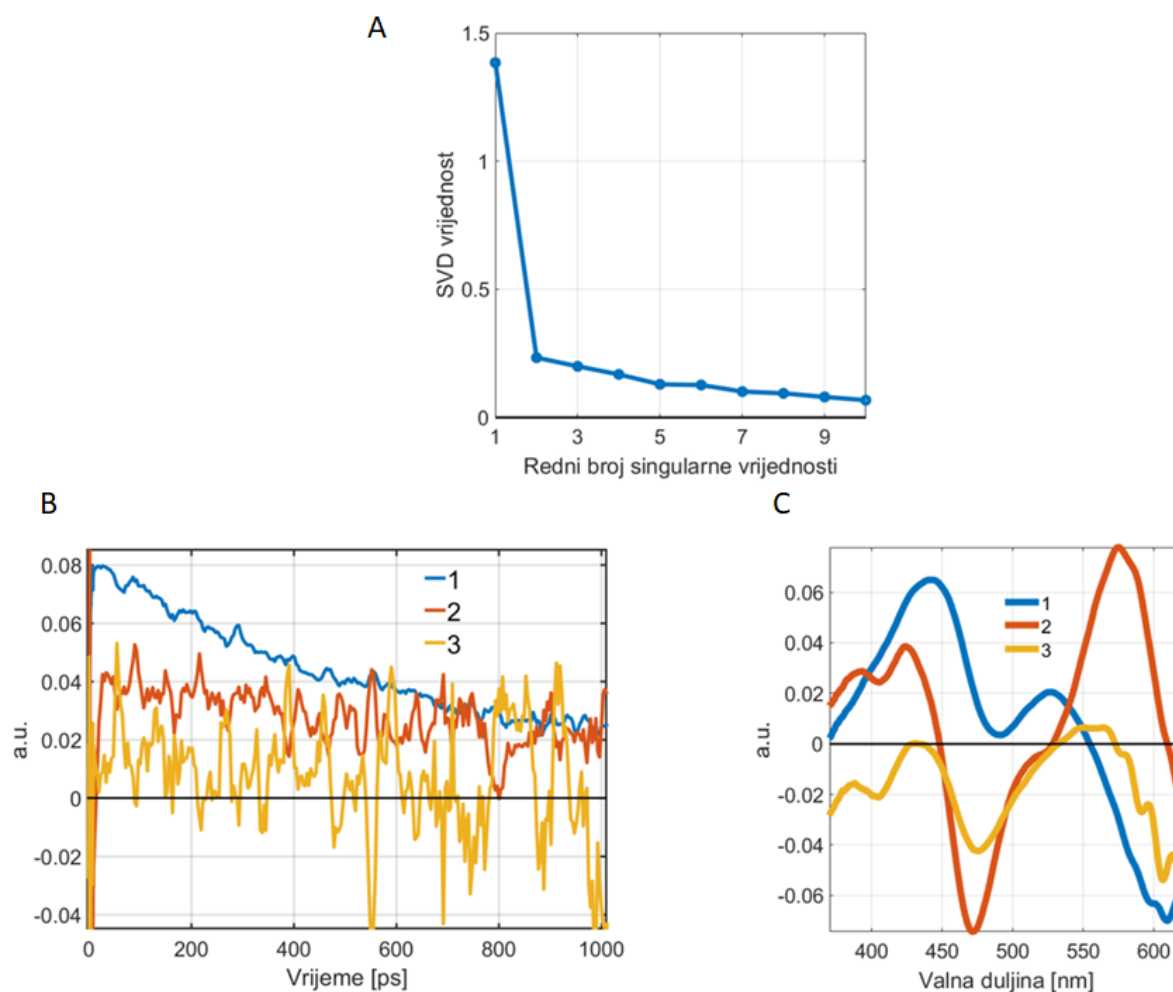
Rezultati SVD analize prikazani na slici 2.7 pokazuju kako je najizraženija prva komponenta dok su ostale puno manje vrijednosti stoga je potrebno pribjeći analizi SVD spektara i dinamike (slika 2.7 B i C). Na slikama su prikazana prva tri vektora te je jasno kako i u spektralnoj i u vremenskoj domeni treći vektor ima mnogo veći šum od prva dva stoga odlučujemo



Slika 2.6: Tijekom reorientacije polarnog otapala oko molekule DCM dolazi do snižavanja energije pobuđenog stanja što kao posljedicu ima kontinuiranu promjenu valnih duljina stimulirane emisije i apsorpcije višeg stanja. Crvenim strelicama označeni su dipolni momenti molekula polarnog otapala dok su crnim strelicama označeni dipolni momenti DCM-a.

da je broj dominantnih komponenti u matrici jednak 2. Nakon SVD analize i očitavanja prisutnih komponenti prepostavljamo relaksacijski model za spomenuti proces otapanja DCM molekula. Uz odabir modela, prilikom prilagodbe potrebno je postaviti početne vrijednosti konstanti rata za prilagodbu. Za taj korak koristi se analiza signala pojedinih valnih duljina gdje se kao karakteristične valne duljine odaberu maksimumi spektralnih vrpce koje odgovaraju ESA i SE. Na kinetiku karakterističnih valnih duljina može se prilagoditi konvolucija eksponencijalne funkcije i gausijana radi očitavanja eksponencijalne konstante koja će se postaviti kao početna vrijednost prilikom globalne analize. Također, u nekim situacijama je moguće okvirno, bez prilagodbe očitati eksponencijalnu konstantu koja se zatim postavlja kao početna vrijednost. Potreba za eliminacijom cvrkuta ovisi o softveru korištenom za globalnu analizu. U ovoj situaciji korišten je softverski paket Glotaran [83] koji ima mogućnost prilagodbe disperzije (cvrkuta) te nije potrebna eliminacija istog prije obrade podataka. Također, Glotaran nudi mogućnost prilagodbe ultrabrzih, neizbježnih artefakata te stoga ni oduzimanje artefakata nije potrebno. Nažalost u većini slučajeva kada se promatraju ultrabrzi procesi vremenske dinamike usporedive sa trajanjem artefakata može doći do netočne prilagodbe na artefakte. U tim situacijama je potrebno pribjeći drugim metodama eliminacije artefakata.

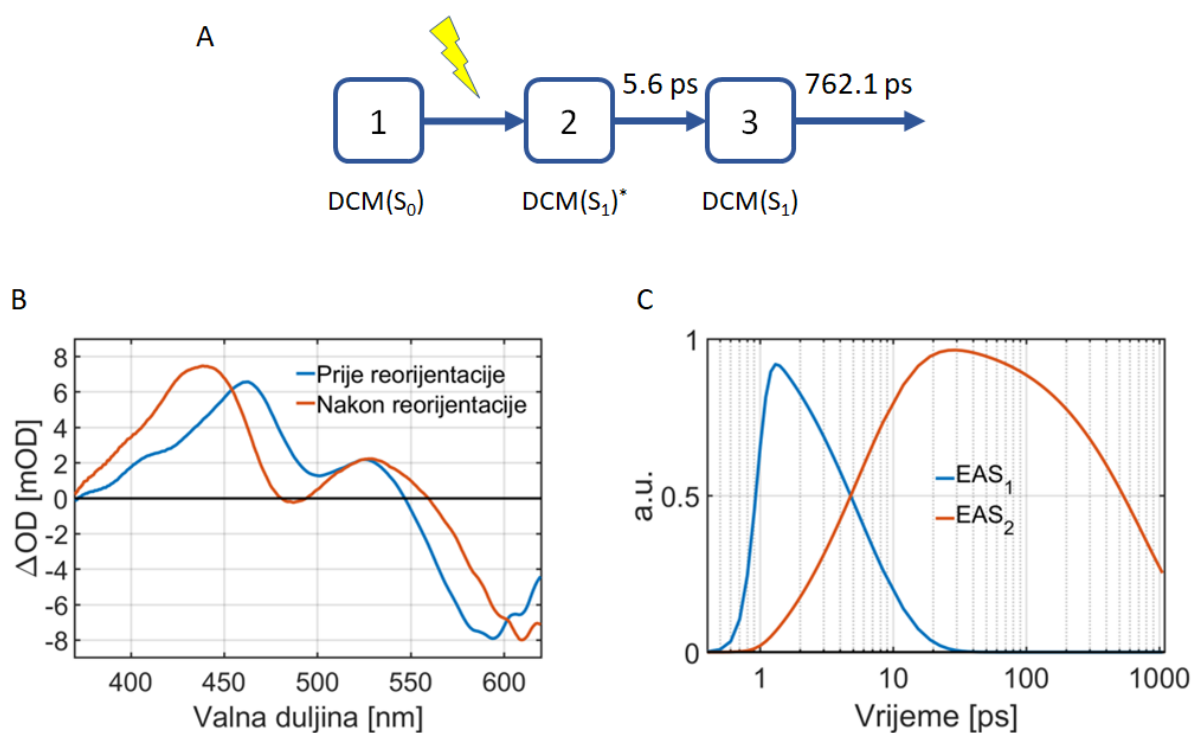
Kao model u slučaju DCM-a koristi se sekvencijalni model sa 2 pobuđena stanja, odnosno: $\mathbf{A} \rightarrow \mathbf{B} \rightarrow \mathbf{C}$ gdje je \mathbf{A} osnovno stanje molekule, \mathbf{B} predstavlja pobuđeno stanje molekule odmah nakon pobude, a \mathbf{C} je pobuđeno stanje molekule nakon reorientacije otapala. Rezultat i pripadni



Slika 2.7: SVD analiza TA mjerenja molekule DCM-a. A) Prvih deset singularnih vrijednosti, B) vremenski profili i (C) spektri pripadnih singularnih vrijednosti. Prve dvije singularne vrijednosti su najizraženije dok su i pripadni spektri i vremenski profili najmanje šumoviti. Zbog toga se u daljnjim razmatranjima i pretpostavljanjima kinetičkog modela pretpostavlja da su u mjerenju prisutna 2 stanja.

model globalne analize prikazani su na slici 2.8. Vidljivo je kako su spektri dobiveni globalnom analizom pomaknuti jedan naspram drugog upravo zbog spomenute reorijentacije otapala. Kinetički profili pokazuju komplementaran porast relaksiranog stanja i eksponencijalan pad nerelaksiranog stanja. Vremenska konstanta pripisana eksponencijalnom padu nerelaksiranog stanja iznosi 5.6ps dok ista za relaksirano stanje iznosi 762.1ps. Dobivene konstante rata u odličnom su slaganju sa pretpostavljenim procesom. Kraća vremenska konstanta u približnom je slaganju sa rezultatima tranzijentne apsorpcije DCM-a u metanolu [78] gdje ista iznosi 3.2ps. Razlog različitih eksponencijalnih konstanti leži u korištenju drugačijeg otapala. Također, pošto je karakteristična vremenska skala za reorijentaciju molekula u većini slučajeva nekoliko ps, do-

bivena vrijednost dodatno potvrđuje točnost modela. Dulja eksponencijalna konstanta odgovara fluorescenciji iz S_1 stanja što je potvrđeno mjerenjima vremena života fluorescencije molekule DCM-a u metanolu gdje iznosi otprilike 1ns [84]. Važno je ponoviti kako korištenim postavom nije moguće točno odrediti konstante dulje od otprilike 400ps što uz korištenje različitog otapala objašnjava razlike u vrijednostima dulje konstante. Dobivene eksponencijalne konstante, spektri i kinetički profili u potpunosti opisuju proces otapanja DCM molekule u pobuđenom stanju otopljene u vodi, nakon pobude pumpnim pulsom valne duljine 267nm. U odnosu na analizu pojedinih valnih duljina, globalna analiza daje kompletniju sliku fotoinduciranog procesa jer uključuje i spektre pojedinih stanja prisutnih u evoluciji sistema i točnije određene globalne vremenske konstante promatranog procesa.



Slika 2.8: Rezultati globalne analize TA mjerenja DCM-a. Rezultati pokazuju međusobno pomaknute spektre (B) te kinetičke profile (C). Dobivene konstante rata su dane su dane na slici (A) uz prikaz korištenog modela.

Poglavlje 3

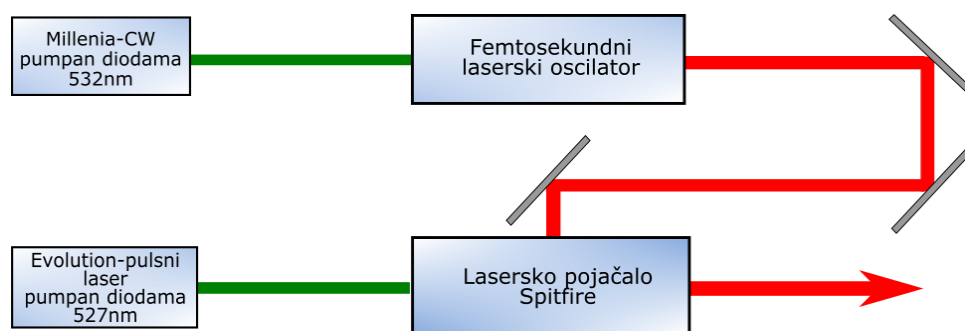
Eksperimentalni postav

3.1 Postav za ultrabrzu tranzijentnu apsorpciju

Eksperimentalni postav za mjerenje ultrabrze tranzijentne apsorpcije izgrađen je u laboratoriju za femtosekundnu spektroskopiju na Institutu za fiziku u Zagrebu. Postav je kontinuirano nadograđivan te je postepeno integrirana nova eksperimentalna oprema. Neke od značajki postava su mogućnost variranja valne duljine pumpnog pulsa u spektralnom rasponu 500-670nm pomoću NOPA-e uz vremensko trajanje pulsa od otprilike 50fs. Stvaranjem drugog i trećeg harmonika fundamentalne zrake moguće je stvoriti pumpne pulseve valne duljine 400nm i 267nm, no u tom slučaju vremenska rezolucija iznosi 150fs ali su pulsevi stabilniji što za posljedicu ima i veći omjer signala i šuma tijekom TA mjerenja. Važno je napomenuti kako je upravo ta metoda stvaranja drugog i trećeg harmonika korištena za mjerenja prikazana u ovoj disertaciji. Spektralni probnog pulsa prostire se od 320-620nm dok je puls trajanja otprilike 2ps. Protočni sustav postava sastoji se od mikrozapčaste pumpe, cjevčica te protočne kivete. Sustav za detekciju se sastoji od prizme i fotodiodnog senzora te posjeduje mogućnost detekcije svakog pojedinog pulsa. Kako bi se osiguralo da molekule uzorka i otapala ne reagiraju sa materijalom od kojeg je izrađen protočni sustav potrebno je obratiti pažnju na odabir cjevčica. Korištene su se teflonske cijevčice koje ne reagiraju s agresivnim otapalima poput acetonitrila i sl. Nadalje, potrebno je obratiti pažnju na odabir materijala kivete jer su pumpni pulsevi u UV dijelu spektra. Iz tog razloga koristile su se kvarcne protočne kivete. U nastavku će detaljno biti opisan cjelokupni postav, od laserskog sustava do sustava za detekciju.

3.1.1 Laserski sustav

Osnovni dijelovi laserskog sustava su femtosekundni laserski oscilator (Tsunami, Spectra-Physics) i femtosekundno lasersko pojačalo (Spitfire, Spectra-Physics) (slika 3.1). Kao pumpni laser za femtosekundni laserski oscilator koristi se CW laser (laser konstantne izlazne snage u vremenu, eng. continuous wave) Millenia, Spectra-Physics, maksimalne izlazne snage od 5W na valnoj duljini od 532nm. Kao pumpa za samu Milleniju koriste se diode koje emitiraju svjetlost infracrvenih valnih duljina snage 40W. Izvor laseriranja u Milleniji je kristal Nd:YVO₄ čija je izlazna valna duljina od 1064nm udvostručena na 532nm pomoću LBO nelinearnog kristala unutar rezonatora.



Slika 3.1: Shematski prikaz laserskog sustava. Preuzeto iz [38]

Femtosekundni oscilator unutar svog rezonatora pasivno ali i aktivno spreže modove odnosno stvara laserske pulseve. Zbog svojeg širokog emisijskog spektra koji se proteže od 670nm do 1000nm sa maksimumom na 780nm, kao laserski medij koristi se Ti:safir kristal (titanom dopiran safir). Raspon unutar kojeg je moguće varirati centralnu valnu duljinu izlaznih pulseva jest 700-900nm. Podešavanje valne duljine omogućeno je sistemom prizama i pukotine. Četiri prizme koriste se za spektralno razlaganje i kasnije sažimanje laserske zrake u prostoru dok se pukotina koristi za odabir željenog spektralnog pojasa. Aktivno sprezanje modova omogućeno je AOM-om (akusto-optičkim modulatorom) dok je pasivno moguće zbog samofokusiranja unutar Ti-safir kristala koje se javlja zbog Kerr efekta [85],[86]. Detaljniji opis pasivnog sprezanja dan je u diplomskom radu [38]. Izlazni pulsevi oscilatora su vremenskog trajanja od 80fs. U eksperimentima je centralna valna duljina iznosila 800nm dok je spektralna širina pulseva iznosila 12nm što je davalo Fourier ograničene pulseve. Frekvencija repeticije iznosi 80MHz što daje 12.5ns kao period repeticije dok je prosječna izlazna snaga oscilatora 800mW.

Lasersko pojačalo radi na CPA principu (eng. chirped pulse amplification) [87] za koji je dodijeljena Nobelova nagrada iz fizike 2018. godine. Pojačalo se sastoji od dijela za vremensko

produljenje i komprimiranje (stretcher i kompresor) pulsa te dijela za pojačanje pulsa. Stretcher i kompresor sastoje se od sustava zrcala i 2 difrakcijske rešetke od kojih se jedna koristi za produljivanje pulseva, a druga za komprimiranje. Dio za pojačanje pulseva sastoji se od rezonatora s Ti:safir kristalom. Zbog efekta samofokusiranja, pojačanje je nemoguće izvršiti direktno pulsevima iz femtosekundnog pojačala jer bi došlo do oštećenja Ti:safir kristala. Stoga se ulazni pulsevi prvo produlje u vremenu pomoću stretchera kako bi im se smanjio intenzitet nakon čega dolaze do rezonatora unutar kojega se vrši regenerativno pojačanje pulseva efektom stimulirane emisije u Ti:safir kristalu koji je pumpan pulsni laserom Evolution (objašnjeno u nastavku). Nakon pojačanja pulsevi odlaze do kompresora koji ih komprimira na vrijednost vremenskog trajanja prije pojačanja (120fs). Na taj način pulsevi su pojačani preko 10^6 puta. Frekvencija repeticije iznosi 1kHz, a vršna snaga 10^{10} W. Centralna valna duljina pulseva ostaje nepromijenjena i iznosi 800nm. Više detalja o laserskom sustavu i principima rada pojedinog elementa dano je u diplomskom radu[38].

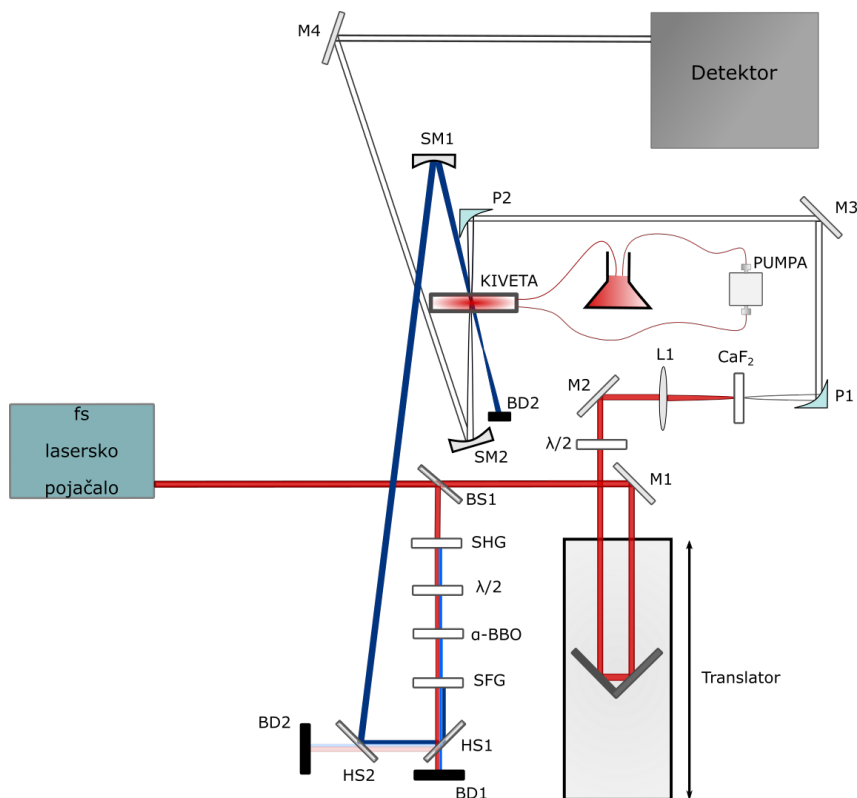
Kao pumpni laser za lasersko pojačalo koristi se Evolution, Spectra-Physics. Evolution je pulsni laser čiji su izlazni pulsevi valne duljine 527nm, a prosječna snaga pulseva iznosi 6W. Frekvencija repeticije usklađena je s frekvencijom repeticije laserskog pojačala i iznosi 1kHz. Laserski medij je kristal Nd:YLF koji je pumpan diodama i laserira na valnoj duljini od 1054nm. Kao što je to slučaj kod Millenije, i u slučaju Evolutiona je valna duljina udvostručena pomoću LBO kristala smještenog u rezonatorskoj šupljini. Nakon udvostručanja, valna duljina postaje 527nm.

3.1.2 Postav tranzijentne apsorpcije

3.1.2.1 Pumpna zraka

Djeliteljem zrake (eng. beam splitter) fundamentalna zraka prvo je podijeljena na dio koji odlazi prema dijelu za stvaranju trećeg harmonika (pumpna zraka) i na dio u kojem se stvara bijela svjetlost (probna zraka, slika 3.2). Treći harmonik stvara se kolinearno pomoću zbrajanja frekvencija u β -BBO kristalu tipa 1. U prvom koraku, fundamentalni, vertikalno polarizirani pulsevi ulaze u β -BBO kristal (kutevi rezanja: $\theta = 29.3^\circ$, $\phi = 0^\circ$) gdje se stvara drugi harmonik valne duljine 400nm horizontalne polarizacije. Zatim je pomoću kvarcne $\lambda/2$ pločice polarizacija preostalog dijela fundamentalnih infracrvenih pulseva orijentirana također horizontalno zbog potrebe miješanja drugog harmonika i fundamentalnih infracrvenih pulseva ($\lambda/2$ pločica za 800nm, a λ pločica za 400nm). Nakon $\lambda/2$ pločice nalazi se α -BBO kristal debljine 3.0mm (kutevi rezanja: $\theta = 66^\circ$, $\phi = 0^\circ$) koji služi kao retardant fundamentalnih pulseva. S obzirom da se zbog disperzije grupne brzine prolaskom pulseva različitih valnih duljina kroz prvi BBO

kristal i $\lambda/2$ pločicu stvara vremenski razmak između njih potrebno ih je retardantom preklopiti u vremenu. Računanjem se može dobiti kako za kristale debljine 0.5mm kašnjenje u BBO kristalu iznosi 104fs, dok kašnjenje u $\lambda/2$ pločici iznosi 78fs što čini ukupan vremenski razmak od 184fs.



Slika 3.2: Postav za ultrabrznu tranzijentnu apsorpciju korišten u eksperimentu. Oznake: BS - djelitelji snopa, L - leće, M - zrcala, S - prekidači zrake, HS - separatori harmonika

Nakon α -BBO kristala pulsevi su preklopljani u vremenu te jednake polarizacije. Na kraju postava za stvaranje trećeg harmonika nalazi se drugi β -BBO kristal (kutevi rezanja: $\theta = 44.5^\circ$, $\phi = 0^\circ$) u kojem se zbrajaju frekvencije fundamentalnih pulseva i pulseva drugog harmonika te se kao rezultat dobivaju pulsevi valne duljine 267nm što je jednako trećem harmoniku ulaznih pulseva valne duljine 800nm. Nakon posljednjeg β -BBO kristala nalaze se 2 separatora harmonika. Separatori harmonika su posebna dielektrična zrcala čija svojstva refleksije osiguravaju refleksiju pulseva trećeg harmonika, a transmisiju fundamentalnih pulseva i pulseva drugog harmonika. Separatori harmonika osiguravaju pobudu uzorka isključivo pulsevima valne duljine 267nm. Korištena su dva identična separatora harmonika kako bi se što efikasnije razdvojili pulsevi različitih valnih duljina, tj. kako bi reflektirana zraka dominantno sadržavala pulseve

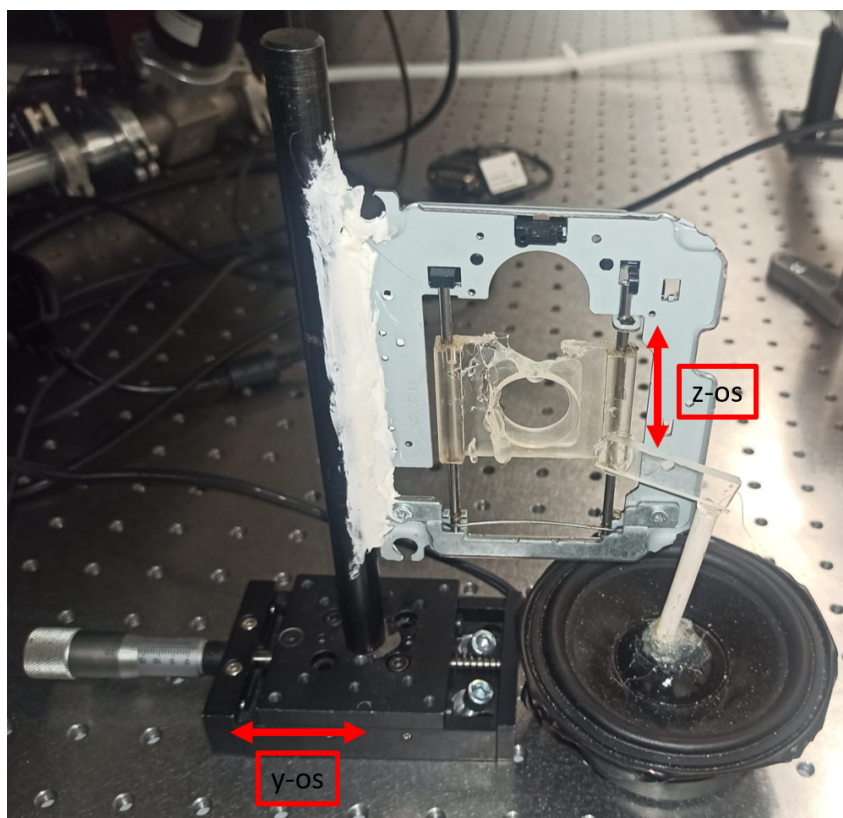
na 267nm. Ako se iz postava za stvaranje pumpne zrake eliminiraju svi elementi osim prvog BBO kristala tada je kao pumpne pulseve moguće koristiti drugi harmonik na 400nm uz odabir odgovarajućih separatora harmonika. Nakon postava za stvaranje pumpne zrake, pulsevi su usmjereni prema mehaničkom prekidaču svjetlosti koji osigurava *pump on* i *pump off* situaciju i prema varijabilnom filtru koji omogućava precizno podešavanje energije pumpnih pulseva što je od presudne važnosti za točnost i kvalitetu mjerenja. Dodatna potreba za korištenjem varijabilnog filtra dolazi zbog toga što bez filtra energija pulseva valne duljine 267nm doseže i do preko $5\mu\text{J}$. Pulsevi navedenih energija uzrokovali bi štetu na protočnim ćelijama i neželjene efekte u uzorku. Prekidač zrake je postavljen na frekvenciju od 500Hz kako bi blokirao svaki drugi puls pumpne zrake, a fazno je usklađen s 1 kHz frekvencijom rada laserskog pojačala pomoću izlaznog TTL signala lasera. Za mjerenja u poglavljima 6, 7 i 8 koristile su se energije po pulsu u rasponu od $0.1\mu\text{J}$ do otprilike $5\mu\text{J}$. Za usmjeravanje pumpne zrake ultraljubičaste valne duljine potrebno je koristiti aluminijska zrcala kako bi se osigurala visoka reflektivnost. Stoga je pumpna zraka usmjerena prema aluminijskom konkavnom zrcalu koje fokusira pulseve prema kiveti s uzorkom.

3.1.2.2 Probna zraka

Uz pumpnu zraku, drugi dio fundamentalne zrake djeliteljem snopa biva odvojen za stvaranje probne zrake. Probna zraka prvo je usmjerena prema računalno kontroliranom optičkom translatoru na kojem se nalazi retroreflektor. Retroreflektor reflektiranoj zraci osigurava smjer paralelan ulaznoj zraci. Nakon refleksije sa retroreflektora probna zraka usmjerena je prema $\lambda/2$ pločici koja služi za manipulaciju polarizacijom probne zrake. Polarizacija probne zrake se u većini slučajeva postavlja na magični kut u odnosu na polarizaciju pumpne zrake kako bi se, kao što je već spomenuto, u mjerenjima eliminirali doprinosi rotacijske difuzije. Zatim se na smjer probne zrake postavljaju varijabilni filter i iris koji osiguravaju precizno podešavanje snage i profila zrake koja dolazi na kristal za stvaranje bijele svjetlosti.

Nakon filtra i irisa zraka se lećom fokalne udaljenosti 5cm fokusira u CaF_2 kristal debljine 3mm koji je odrezan tako da je smjer optičke osi kristala usmjeren u smjeru propagacije probne zrake (eng. c-cut) kako bi se eliminirali efekti dvoloma. CaF_2 je odabran s obzirom da su molekule u istraživanju pokazivale ultrabrznu fotodinamiku u UV području elektromagnetskog spektra dok je debljina od 3mm odabrana jer se u praksi pokazalo kako je bijela svjetlost stvorena u kristalu od 3mm stabilnija nego ista stvorena u tanjim kristalima dok bi korištenjem još debljih kristala povećali cvrkut superkontinuuuma. Leća za fokusiranje u CaF_2 je postavljena na translator kako bi se fokus probne zrake mogao pomicati po debljini kristala kako bi se lakše odabrala najkvalitetnija bijela svjetlost. U praksi se pokazalo kako je za najstabilniju

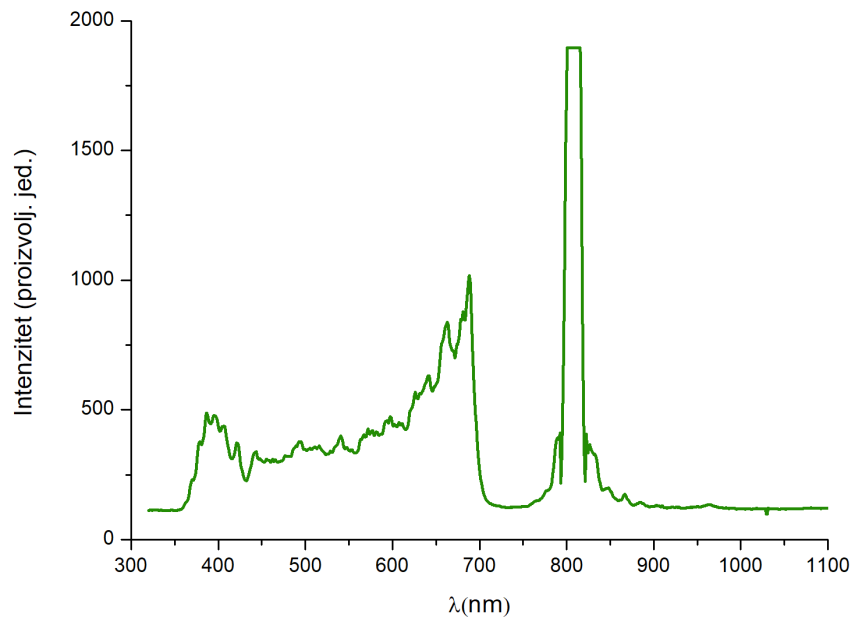
i najkvalitetniju bijelu svjetlost potrebna leća što manje fokalne udaljenosti te položaj fokusa probne zrake u prvoj polovici kristala za stvaranje bijele svjetlosti. Također, energija fundamentalnih pulseva od $1\mu\text{J}$ se pokazala optimalnom za stvaranje bijele svjetlosti. Kako spektralni oblik, stabilnost i kvaliteta zrake bijele svjetlosti ovise o položaju leće, otvorenosti irisa te ulaznoj snazi fundamentalne zrake, proces stvaranja kvalitetnog superkontinuuma zahtjeva preciznost i strpljenje. Za sprječavanje oštećenja CaF_2 kristala isti je montiran na ručno izrađeni y-z translator koji je prikazan na slici 3.3.



Slika 3.3: Translator CaF_2 kristala. Sastoji se od postolja za laser CD čitača, zvučnika spojenog na H-most kojime upravlja arduino te linearnog translatora.

Zvučnik je spojen na arduino koji na izlazu daje trokutasti signal te pomiče membranu zvučnika linearno u z smjeru. Kristal je nalijepljen na postolje od lasera iz CD-čitača. Postolje posjeduje mogućnost klizanja po jednoj osi (vertikalna z os). Na zvučnik je nalijepljen plastični štapić koji je drugim krajem postavljen na postolje na koje je nalijepljen kristal te se tako kristal pomicao po z osi. Cijeli sustav postolja i kristala pričvršćen je na y-translator sa ručnim vijkom kako bi se između svakog mjerenja ostvario mali pomak u y smjeru. Naime, u idealnoj situaciji kristal bi se kontinuirano translirao u ravnini okomitoj na propagaciju zrake, no ta situacija

zahtjeva korištenje dva motorizirana translatora što je u planu budućih nadogradnji postava. Spektar bijele svjetlosti stvorene u CaF_2 kristalu debljine 3mm prikazan je na slici 3.4. Spektar se proteže od 325nm do 620nm. Bijela svjetlost se zapravo proteže i na valne duljine dulje od 620nm, ali je odrezana filtrom korištenim za eliminaciju fundamentalne zrake od 800nm.



Slika 3.4: Spektar bijele svjetlosti stvorene u CaF_2 kristalu debljine 3mm. Kao pumpna valna duljina korišteni su pulsevi valne duljine 800nm energije $1\mu\text{J}$ čiji je nefiltrirani ostatak također spektralno razlučen.

Nakon CaF_2 kristala probna zraka kolimirana je paraboličnim zrcalom (MPD129-F01; Thorlabs) i usmjerena prema filtru koji filtrira preostalih fundamentalnih 800nm. Spomenuti filter je zapravo dielektrično zrcalo na kvarcnom supstratu (Eksma Optics 042-0800-i0) sa ispoliranom stražnjom površinom koja osigurava visoku refleksiju za valnu duljinu 800nm, a transmisiju za kraće valne duljine. Nakon filtra probna zraka fokusirana je u kivetu s uzorkom također pomoću paraboličnog zrcala (MPD169-F01; Thorlabs). Radijus probne zrake u fokusu iznosio je otprilike $60\mu\text{m}$. Parabolična zrcala korištena su kako bi se eliminirala sferna aberacija koja je inače prisutna prilikom fokusiranja konkavnim zrcalom. Zatim je probna zraka sfernim zrcalom postavljenim iza kivete kolimirana te usmjerena prema niže opisanom sustavu za detekciju. Bitno je napomenuti kako su zrcala na putu probne zrake aluminijska kako bi se osigurala maksimalna refleksivnost ultraljubičastog dijela probne zrake.

3.1.2.3 Uzorak

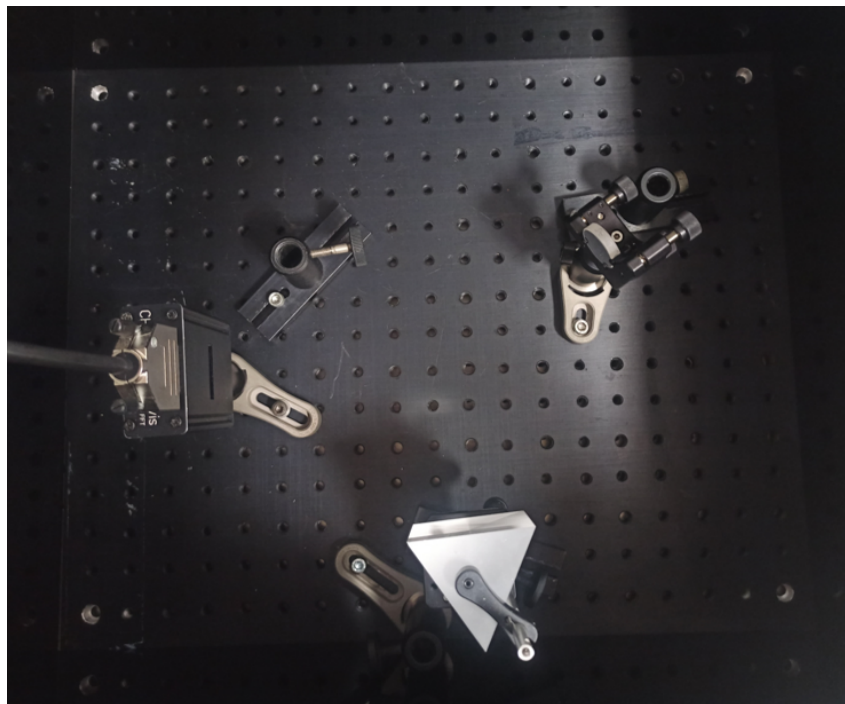
Kivete korištene u mjerenjima su protočne kivete optičkog puta 1mm ili 0.5mm (slika 3.5). Prozori kivete su izrađeni od kvarca kako bi se osigurala potpuna propusnost za UV valne duljine do otprilike 200nm. Teflonske cijevčice kivete spojene su na mikrozupčastu pumpu koja osigurava protok uzorka kroz kivetu te svjež uzorak za svaki pumpni puls. Sa slike 3.5 jasno je vidljivo kako kiveta u središnjem području posjeduje tanje prozore i upravo na tom dijelu se preklapaju pumpna i probna zraka. Kiveta je postavljena na translator koji omogućava translaciju kivete u smjeru propagacije probne zrake kako bi se lakše osigurali najbolji uvjeti preklapanja pumpne i probne zrake. Kako bi se spriječila oštećenja kivete i uzorka pumpna zraka je najčešće fokusirana u prostoru nakon kivete, a ne direktno u kivetu. Nakon kivete pumpna zraka se blokira kako bi se izbjeglo da dio raspršene svjetlosti velikog intenziteta dođe do detektora.



Slika 3.5: Protočna kiveta optičkog puta 0.5mm korištena u mjerenjima.

3.1.2.4 Sustav za detekciju

Sustav za detekciju je spektrometar kućne izrade koji se sastoji od kvarcne prizme vršnog kuta od 60° te CCD detektora zasnovanog na Hamamatsu S7030-1006 senzoru uz modificiranu i nadograđenu elektroniku (Etwicklungsbuero Stresing, Berlin, Njemačka) sa mogućnošću snimanja repetitivom $>1\text{kHz}$ i 16-bitnom AD konverzijom. Spektrometar je prikazan na slici 3.6. S obzirom na mogućnost snimanja repetitivom $>1\text{kHz}$, spektar probne zrake je sniman u *single-shot* režimu, odnosno sniman je spektar svakog pojedinog pulsa. Detektor posjeduje opciju okidanja, a kao okidač koristi se izlazni TTL signal laserskog pojačala, analogno okidanju prekidača svjetlosti. Fotodiodni linearni senzor sadrži 1024 piksela, a za kalibraciju valnih duljina koriste se koristi se kombinacija optičkih filtera koji pokazuju oštre vrhove u transmisijskoj krivulji (Thorlabs - FGB67, SCHOTT - BG20). Sustav za detekciju postavljen je unutar potpuno zatvorene plastične kutije kako bi se eliminirali doprinosi zalutale svjetlosti iz laboratorija. Kutija posjeduje rupicu kroz koju probna zraka dolazi na prizmu. Detektor je softverski integriran u Labview kodove za mjerenja te su se mjerenja vršila u programskom okruženju Labview dok se za obradu podataka koristio MatLab.



Slika 3.6: Sustav za detekciju kućne izrade.

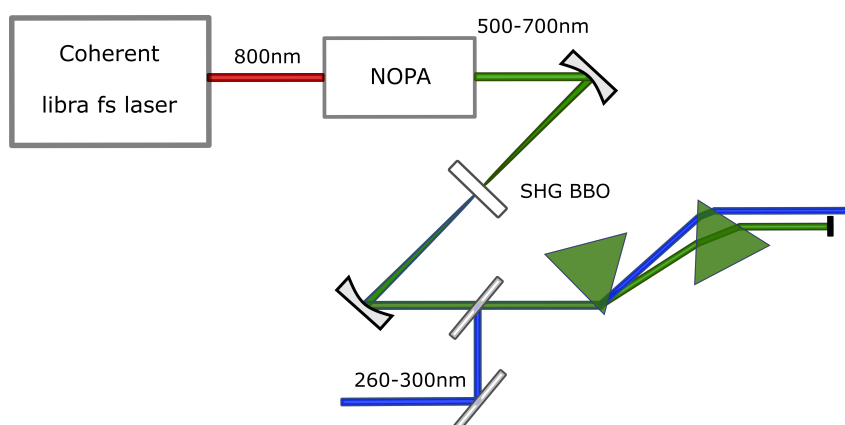
3.1.3 TA postav visoke vremenske rezolucije

Uz opisan postav za TA koji je izgrađen u Zagrebu sa vremenskom rezolucijom ≈ 220 fs, zbog dodatnog eksperimentalnog proširenja istraživanja, u suradnji sa znanstvenicima sa Politecnico di Milano provedena su dodatna mjernja na eksperimentalnom postavu za TA izgrađenim u Milanu sa vremenskom rezolucijom od ≈ 50 fs. Više o eksperimentalnom postavu dano je u [88] dok je ovdje dan pregled eksperimentalnog postava s obzirom da je riječ samo o različitoj izvedbi iste tehnike. Najveća razlika između postava je u načinu stvaranja pumpnih pulseva. U ovom TA postavu pumpna zraka stvara se pomoću <20 fs NOPA-e koja emitira pulseve u UV spektralnom području. NOPA posjeduje mogućnost stvaranja pulseva promjenjive valne duljine (najčešće u gotovo u cijelom vidljivom spektru) čije trajanje može biti bitno kraće od trajanja pulseva femtosekundnog lasera. NOPA je bazirana na SFG nelinearnom efektu gdje se kao pumpni puls koristi drugi harmonik izlaznih pulseva iz lasera dok je puls koji se pojačava dio bijele svjetlosti, odnosno superkontinuum. Variranjem vremenskog razmaka između pumpnog pulsa i bijele svjetlosti moguće je postići optičko parametarsko pojačanje različitih dijelova superkontinuum čime je ostvarena mogućnost variranja izlazne valne duljine. Takve pulseve koji su spektralno širi od ulaznih ali im je trajanje dulje od iznosa koji određuju Fourier transformacije moguće je skratiti pomoću kompresora pulseva (npr. koristeći prizme). Kao laser u drugom TA postavu koristio se Ti:safir laser (Coherent Libra) sa izlaznom valnom duljinom od 800nm i frekvencijom repeticije od 1kHz. Kao pumpna zraka za NOPA-u koristio se drugi harmonik na 400nm stvoren u BBO kristalu dok je probna zraka NOPA-e bio superkontinuum stvoren u safirnoj pločici. U NOPA-i se često bira safir jer je bijela svjetlost stvorena safirnom pločicom stabilnija od iste stvorene u CaF_2 , a sam kristal ne zahtijeva kontinuiranu translaciju u ravnini okomitoj na smjer prostiranja pulseva. Kao rezultat NOPA-e dobivaju se pulsevi vremenskog trajanja <20 fs sa mogućnošću variranja valne duljine u području 500-700nm. Kako proučavane organske molekule apsorbiraju u UV dijelu elektromagnetskog spektra, izlazni pulsevi NOPA-e su frekventno udvostručeni u BBO kristalu debljine $20\mu\text{m}$ te se kao krajnji rezultat dobivaju <20 fs pulsevi sa mogućim variranjem valne duljine u rasponu 260-290nm. Shematski prikaz stvaranja pumpne zrake pomoću NOPA-e prikazan je na slici 3.7.

Kao i u prvom TA postavu, manji dio izlazne zrake iz lasera ($35\mu\text{J}$) usmjeren je prema optičkom translatoru nakon kojega se nalazi postav za stvaranje bijele svjetlosti sličan onome kod prvog TA postava. Energija pulseva za stvaranje bijele svjetlosti podešena je na $1\mu\text{J}$, dok se za dobivanje superkontinuum koristio CaF_2 postavljen na x-y translator (Zaber Technologies, Vancouver, Canada). Translator je podešen za pomicanje CaF_2 kristala prateći spiralnu krivulju. Pumpna i probna zraka su fokusirane na protočnu ćeliju s uzorkom pod kutem od otprilike 5° pomoću dva aluminijska zrcala fokalnih duljina 250mm i 200mm za pumpnu odnosno probnu

zraku. Promjer zrake u fokusu iznosi $120\mu\text{m}$ za pumpnu zraku i $80\mu\text{m}$ za probnu zraku. Energijski tok (eng. fluence) pumpne zrake energije 113nJ (korištene u jednom od mjerenja) stoga iznosi 1mJ cm^{-2} .

Eksperimentalni postav omogućava kraći maksimalni vremenski razmak od dvadesetak ps između pumpnog i probnog pulsa te se koristio samo za istraživanje rane fotodinamike uzoraka. S obzirom da su karakteristična vremena rotacijske difuzije otprilike reda veličine par desetaka ps polarizacije su postavljene na paralelne jer rotacijska dinamika na toj vremenskoj skali nema značajan utjecaj. Protočna kiveta i protočni sustav su identični onom u prvom TA postavu. Nakon uzorka, probna zraka je fokusirana na ulaznu pukotinu spektrometra (SP2300 Princeton Instruments, Acton, MA, USA) opremljenim sa CCD detektorom. Spektralna rezolucija spektrometra iznosi 0.5nm dok je elektronika (Entwicklungsbuero EB Stresing, Berlin, Germany) omogućavala *single-shot* mjerenja kao i u prvom postavu. Za moduliranje pumpne zrake također je korišten fazno usklađen optički prekidač podešen na frekvenciju od 500Hz.



Slika 3.7: Stvaranje pumpne zrake u drugom TA postavu.

3.2 Postav za ultrabrza vremenski razlučiva mjerenja fluorescencije

U poglavlju 6 - *Fotogeneracija QM-a iz adamantan fenola u ultrabrzoj reakciji fotodehidracije* dan je opis fotokemije stvaranja kinon metida iz adamantan fenola u reakciji fotodehidracije[32]. Jedna od metoda korištenih za proučavanje spomenute fotokemijske reakcije je i metoda mjerenja vremenski razlučive fluorescencije. Korišteni eksperimentalni postav izgrađen je na Institutu za primijenjenu fiziku u Bernu (Institute of Applied Physics, University of Bern),

a baziran je na postavu N. Ernstinga [89]. Kao izvor fundamentalnih pulseva repeticijske frekvencije 8kHz, vremenskog trajanja 80fs korišten je Ti:safir laser LIBRA, Coherent Inc. Pulsevi su podijeljeni u dvije grane energije jednake $250\mu\text{J}$. Jedna grana služi kao pumpa za NIR laser koji stvara pulseve za uzorkovanje. Na izlazu NIR lasera, koji je zapravo OPA sa dvostrukim prolaskom, dobivaju se pulsevi za uzorkovanje energije $29\mu\text{J}$ na 1250nm. Druga grana služi kao ulazna zraka u NOPA-u kućne izrade koja se sastoji od dva stupnja, a izlazni pulsevi su komprimirani zrcalima za kompenzaciju disperzije i zatim frekventno udvostručeni u β -BBO nelinearnom kristalu. Frekventno udvostručeni NOPA pulsevi koriste se kao pumpni pulsevi za pobuđivanje uzorka koji posljedično tome fluorescira. Pumpni pulsevi poslani su na optički translator koji osigurava mogućnost kontrole vremenskog pomaka između pulsa za uzorkovanje i fluorescencije. Maksimalan vremenski pomak postava iznosi 50ps. Nakon optičkog translatora, pumpni pulsevi fokusirani su na kivetu sa uzorkom debljine $200\mu\text{m}$ spojenu na protočni sustav temeljen na peristaltičkoj pumpi. Fluorescencija je prikupljena *off-axis* Schwarzschild objektivom te usmjerena i fokusirana u nelinearni β -BBO kristal tipa 2. Fluorescencija i puls za uzorkovanje dolaze do β -BBO kristala gdje dolazi do SFG tj. konverzije fluorescencije pod kutem od 21° jer se većim kutem smanjuju pozadinski signali raspršene svjetlosti NIR lasera i pumpne zrake. Nakon β -BBO kristala većina pumpne zrake eliminirana je optičkim filterom. Tijekom mjerenja, snaga pulsa za uzorkovanje iznosila je $8.8\mu\text{J}$, a SFG signal je nakon BBO kristala pomoću jedno-modnog optičkog vlakna promjera jezgre od 0.7mm doveden do spektrometra. Spektri su snimani Andor CCD kamerom, a serija od 20 mjerena je snimljena kako bi se djelomično eliminirao šum uzrokovan nestabilnošću lasera. Vremenska rezolucija mjerena je pomoću molekule anisola (standard za mjerenja rezolucije, uzorak bez anizotropije) i iznosila je 700fs, što je nešto lošije od maksimalne rezolucije postava. Naime, postav je tijekom mjerenja fotokemije adamantan fenola podešen na mjerenje fluorescencije oko 330nm što nije optimalno za dostupni BBO kristal u postavu stoga je rezolucija veća nego što je to očekivano. Također, zbog BBO kristala polarizacije zraka su bile pod kutem različitim od magičnog kuta što je opisano u poglavlju 6 - *Fotogeneracija QM-a iz adamantan fenola u ultrabrzoj reakciji fotodehidratacije*.

Poglavlje 4

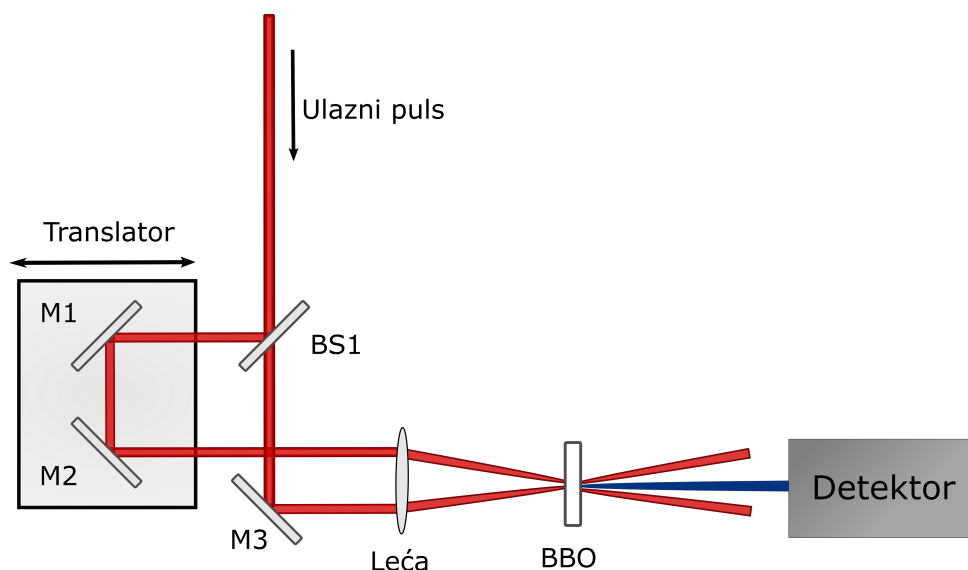
Rezultati karakterizacije postava

4.1 Rezultati karakterizacija postava TA

4.1.1 Vremenska karakterizacija pulseva

Kod femtosekundnih pulseva, zbog fundamentalnih ograničenja odziva elektroničke instrumentacije potrebno je priskočiti optičkim metodama mjerenja vremenskog trajanja i oblika intenziteta pulsa. Neke od najčešće korištenih metoda su intenzitetska autokorelacija FROG (eng. Frequency Resolved Optical Gating) [90], SPIDER (eng. Spectral Phase Interferometry for Direct Electric-field Reconstruction) [91] i ostale. U našem slučaju intenzitet pulseva u vremenu mjeren je SHG-FROG metodom koja je bazirana na mjerenju autokorelacije laserskih pulseva tijekom procesa stvaranja drugog harmonika u nelinearnom mediju. Za razliku od klasičnih autokorelacijskih mjerenja, korištenjem FROG metode mjerena autokorelacija je dodatno spektralno razlučena. FROG metodom moguće je odrediti električno polje pulsa iz čega je lako dobiti intenzitet te spektar pulsa odnosno potpuno karakterizirati puls u vremenskoj i spektralnoj domeni.

Ekperimentalna izvedba FROG metode prikazana je na slici 4.1. Puls čije se električno polje želi odrediti podijeljen je u dvije grane djeliteljem snopa. Jedna grana zbog optičkog translatora ima promjenjivu, a druga fiksnu duljinu optičkog puta te se zatim obje zrake fokusiraju u istoj točki BBO kristala čime se postiže vremensko i prostorno preklapanje pulseva. BBO kristal odrezan je pod kutem koji omogućava frekventno udvostručavanje za ulazni puls, odnosno SHG proces. Zbog očuvanja impulsa, u smjeru koji odgovara zbroju impulsa fotona iz različitih zraka, između svake pojedine zrake također nastaje zraka drugog harmonika nastala procesom zbroja frekvencija (SFG) čiji se spektar mjeri u ovisnosti o vremenskom pomaku među upadnim



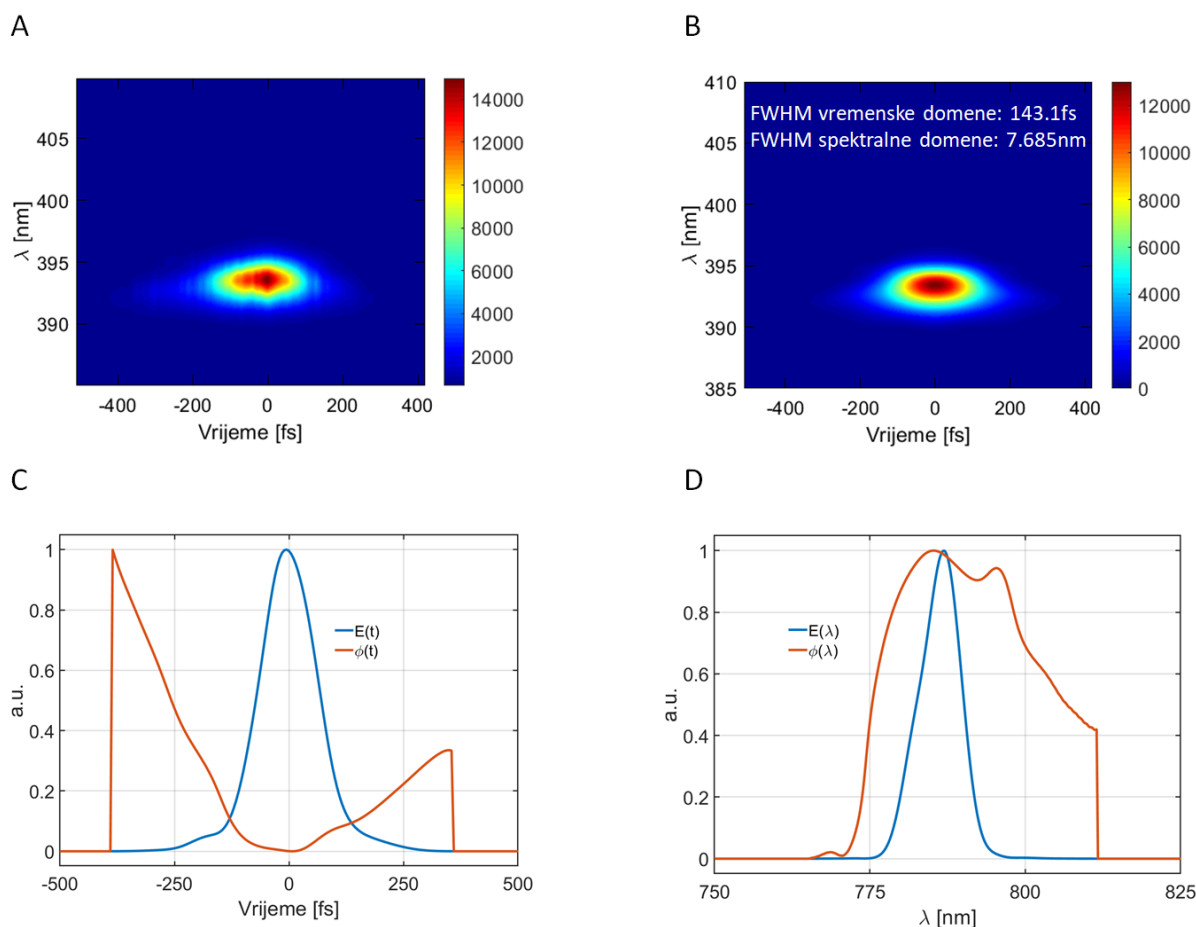
Slika 4.1: Shema FROG metode. Ulazna zraka dijeli se na dvije identične koje se pod kutem fokusiraju u BBO nelinearni kristal gdje dolazi do SHG procesa. Zbog očuvanja impulsa između ulaznih zraka dolazi do stvaranja SHG zrake.

zrakama kako bi se dobila spektralno razlučiva autokorelacija. FROG mjerenje je podijeljeno u vremenske korake od kojih svaki korak odgovara drugačijem položaju optičkog translatora te se tako ostvaruje vremensko prebrisavanje pulseva koji su fokusirani na β -BBO kristal. Kao rezultat dobiva se spektrogram koji ovisi o vremenu i o valnoj duljini:

$$I_{FROG}(\omega, \tau) = \left| \int_{\text{inf}}^{\text{inf}} E(t)E(t - \tau)e^{-i\omega t} dt \right|^2. \quad (4.1)$$

Spektrogram predstavlja spektralno razlučenu autokorelaciju i opisuje intenzitet zračenja u ovisnosti o vremenu kašnjenja τ i frekvenciji ω . Korištenjem tzv. *2D phase retrieval* algoritama moguće je odrediti fazu i amplitudu električnog polja čime je ostvaren potpun opis električnog polja.

FROG mjerenje izlaza iz laserskog pojačala Spitfire prikazano je na slici 4.2 A). Na slici B) prikazan je rezultat prilagodbe softwareom FROG 3.1.1 Femtosoft Technologies. Kao vremensko trajanje pulsa dobiva se 143.1fs dok se za spektralnu širinu dobiva 7.7nm. Slika C) prikazuje intenzitet električnog polja (zeleno) i pripadnu fazu (crveno), a spektralna amplituda (zeleno) i spektralna faza (crveno) prikazane su na slici D).

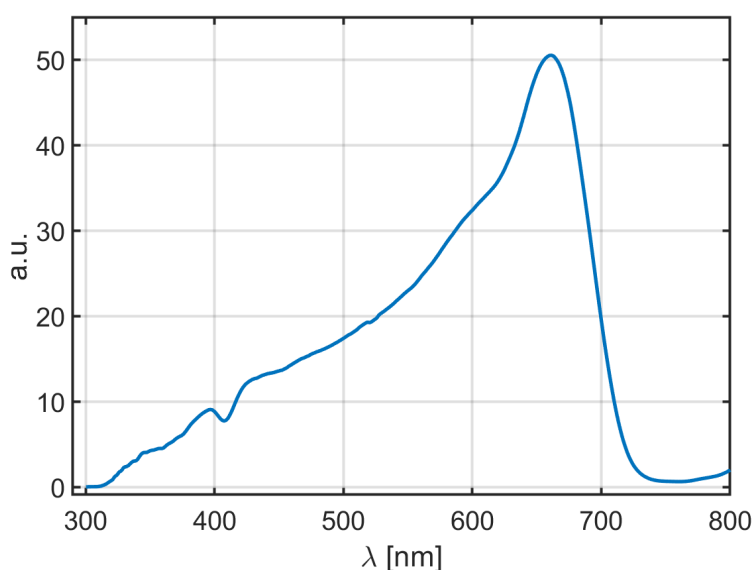


Slika 4.2: A) FROG spektrogram i B) rezultat prilagodbe na eksperimentalne rezultate. C) intenzitet električnog polja (plava linija) i pripadna faza (crvena linija). D) spektralna amplituda (plava linija) te pripadna spektralna faza (crvena linija).

4.1.2 Spektralna karakterizacija probnog pulsa

Bijela svjetlost stvarana je u CaF_2 kristalu debljine 3mm koji je transliran u ravnini okomitoj na smjer propagacije laserskih zraka, kao što je već spomenuto. CaF_2 je odabran jer posjeduje mogućnost stvaranja bijele svjetlosti na valnim duljinama kraćim od 400nm što je pogodno s obzirom da je kod svih proučavanih organskih molekula tranzijentna apsorpcija dobrim dijelom smještena u UV dijelu elektromagnetskog spektra. Spektar superkontinuum, koji se proteže u rasponu 320-730nm je prikazan na slici 4.3. Za sam oblik spektra zaslužni su nelinearni efekti prilikom stvaranja bijele svjetlosti, a djelomično i optički elementi poput zrcala i prizama koji se koriste nakon kristala za stvaranje bijele svjetlosti. Uz spomenuto, krivulja osjetljivosti korištenih CCD detektora također utječe na oblik spektra bijele svjetlosti. Sa slike je također vidljivo kako na valnim duljinama oko 800nm spektar ne iščezava. Razlog tome je nesavršenost filtra

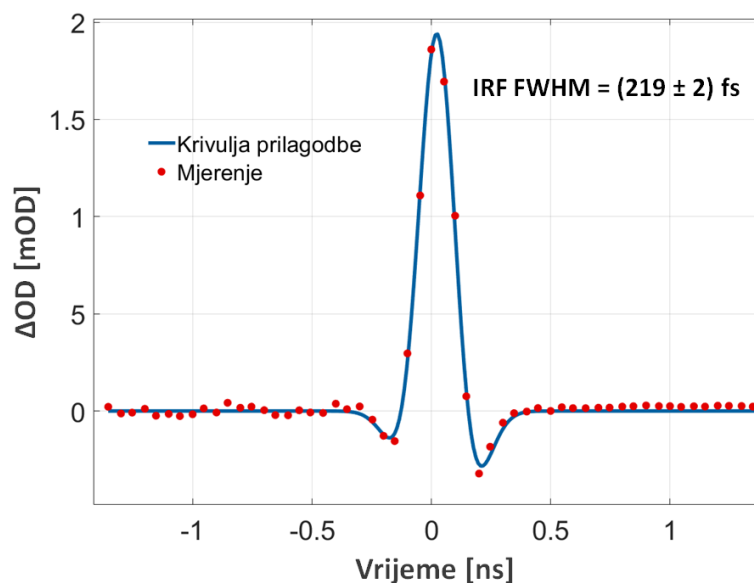
za filtriranje fundamentalne valne duljine koja se koristi za stvaranje bijele svjetlosti (800nm) te djelomično propuštanje spomenute laserske zrake. Šum bijele svjetlosti je od presudne važnosti za TA mjerenja te je stoga prilikom podešavanja bijele svjetlosti vrlo bitno pratiti njen šum u stvarnom vremenu. Šum je mjereno kao frekventno ovisna TRMS (end. true root mean square) fluktuacija uzastopnih pulseva. S obzirom da je spektar najvećeg intenziteta na crvenim valnim duljinama, tamo je TRMS najnižeg iznosa dok je u UV dijelu najvećeg iznosa što dodatno otežava mjerenje u UV dijelu elektromagnetskog spektra. Kod optimalnog postava za bijelu svjetlost, korištenog tijekom mjerenja, u UV dijelu šum je iznosio oko 2.5% dok je u crvenom dijelu spektra iznosio otprilike 0.5%. Glavni izvor šuma su neizbježne fluktuacije u izlaznoj snazi lasera koje se pojačavaju nelinearnim efektima unutar CaF_2 kristala. Oštećenja CaF_2 kristala, odstupanje ravnine translacije od okomitosti na smjer propagacije laserske zrake te vibracije translatora kućne izrade također doprinose šumu. Prisutnim šumom te spomenutim tehnikama usrednjavanja moguće je mjeriti TA signale sa osjetljivošću od otprilike 0.5mOD. Uz šum bijele svjetlosti (probna zraka), šum pumpnih pulseva također igra značajnu ulogu u osjetljivosti mjerenja.



Slika 4.3: Spektar bijele svjetlosti stvorene u CaF_2 kristalu debljine 3mm. Iznad 730nm intezitet slabi zbog korištenja filtera za filtriranje fundamentalne zrake.

4.1.3 Vremenska rezolucija postava

Vremenska rezolucija postava određena je prilagodbom konvolucije gausijana i pripadnih derivacija sa IRF-om (također gausijan) na vremenski profil TA mjerenja čistog otapala koje kao signal posjeduje samo artefakt. Kao što je prethodno opisano, FWHM IRF-a predstavlja vremensku rezoluciju eksperimentalnog postava. Kao primjer određivanja vremenske rezolucije odabrana su mjerenja XPM artefakta u mješavini destilirane vode i acetonitrila (1:3) (slika 4.4). Zbog činjenice da su artefakti izraženiji na nižim valnim duljinama za prikaz je odabran vremenski profil na valnoj duljini od 322nm. Mjerenja su uzimana u koracima od 50fs. Pumpna zraka je treći harmonik (267nm) fundamentalne laserske zrake jer je ta valna duljina pumpe korištena u svim opisanim mjerenjima tranzijentne apsorpcije, a izvršeno je usrednjavanje po 12 mjerenja dok je na svakom koraku uzimano 100 *pump on* i *pump off* pulseva. Parametar u krivulji prilagodbe koji se tiče vremenske rezolucije je FWHM IRF-a. U ovom slučaju vremenska rezolucija iznosi 219 ± 2 fs što je potvrđeno promatranjem vremena rasta signala prilikom TA mjerenja derivata naftola te promatranjem FWHM vrijednosti TPA artefakta.



Slika 4.4: Vremenski profil XPM artefakta na 322nm u mješavini destilirane vode i acetonitrila (1:3). Plavom bojom prikazana je krivulja prilagodbe 2.1 dok je mjerenje prikazano crvenim točkama. Krivulja prilagodbe je konvolucija gausijanske funkcije i pripadnih derivacija sa IRF funkcijom koja je modelirana također gausijanskom funkcijom. Kao FWHM vrijednost IRF-a (rezolucija postava) dobila se vrijednost 219 ± 2 fs. Snaga pumpne zrake iznosila je $200 \mu W$ odnosno energija po pulsu iznosila je 0.2 nJ .

Poglavlje 5

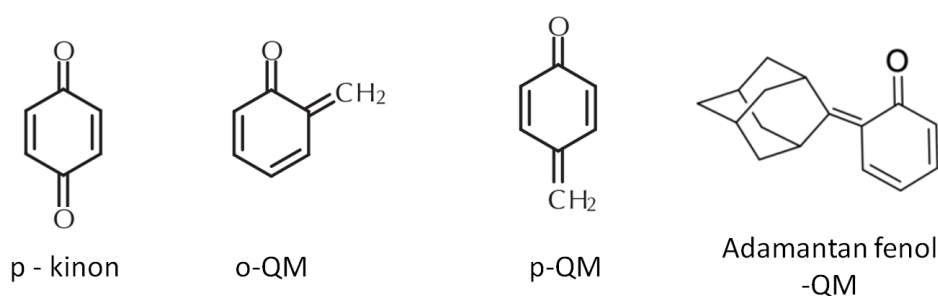
Fotokemija proučavanih međuprodukata

5.1 Kinon metidi

Naziv kinon metid (QM) prvi put se u literaturi pojavio 1942. godine prilikom opisivanja molekule analogne kinonu u kojemu je jedan od karbonilnih kisika zamijenjen metilenskom skupinom (slika 5.1). No, usprkos ranom otkrivanju, većina znanstvenih grupa nije opazila rasprostranjenost QM-a te njihovu potencijalnu primjenu sve do 1960-tih godina. Naime, s obzirom da su QM-i reaktivni i kratko-živi međuprodukti, nisu bili u fokusu istraživanja zbog (tadašnjih) ograničenja u rezoluciji vremenski razlučive spektroskopije. No, spoznajom važnosti QM-a te razvojem eksperimentalne opreme, isti se sve češće spominju u literaturi i istraživanjima. Kao primjer moguće je navesti kako je već 1960. godine opažena važna uloga QM-a u bioformaciji lignina [17], polifenolnog polimera koji ne sadrži ugljikohidrate koji je veoma važan u formaciji staničnih stijenki, posebice u drvu i kori drveta.

Kroz godine, QM-i su postali važni međuprodukti u kemiji i fotokemiji fenola [17], njima srodnih spojeva te u organskoj kemiji općenito. QM-i su izrazito polarne molekule što ih čini veoma reaktivnima i kratkoživućima. Reaktivniji su od kinona, ali manje reaktivni od kinondimetana u kojem su oba karbonilna kisika zamijenjena metilenskim skupinama. Njihova struktura omogućava im veoma brzu reakciju s elektrofilima, nukleofilima, s otapalom ili sa drugim QM-ima u reakcijama samokondenzacije. Vremena života QM-a bilježe se od <1 ns do nekoliko sekundi ili minuta [17],[18]. Njihova važnost temelji se na biološkoj aktivnosti [19],[20],[21] i sve većoj primjeni u organskoj sintezi [22],[23],[24],[92], a također se koriste i u modifikacijama površina [25]. Reaktivna priroda i spomenuta kratka vremena života onemogućuju njihovu izolaciju i skladištenje te se stoga identificiraju metodama ultrabrze spektroskopije ili analizom produkata reakcije QM-a sa ostalim spojevima. No ipak, u nekim slučajevima ih je moguće izolirati, ali samo pod kontroliranim uvjetima poput kombinacije veoma razrijeđenih otopina

i kriogenih temperatura [93]. Slika 5.1 prikazuje općenitu strukturu QM-a odnosno orto-QM (o-QM) i para-QM (p-QM) koji se sastoje od cikloheksadienskog skeleta na kojem su vezane metilenska i karbonilna skupina. U literaturi, naziv QM nije ograničen na prikazane molekule već se mnoštvo derivata i molekula strukture slične o-QM i p-QM koje sadrže metilensku i karbonilnu skupinu nazivaju QM-ima. Kao primjer može se navesti adamantan fenol - QM nastao u fotokemijskoj reakciji fotodehidratacije adamantan fenola, također prikazan na slici 5.1. Kvantni prinos kemijskih i fotokemijskih reakcija nastajanja QM-a jako ovisi o supstituentu karbonilnog kisika na cikloheksadienski skelet.



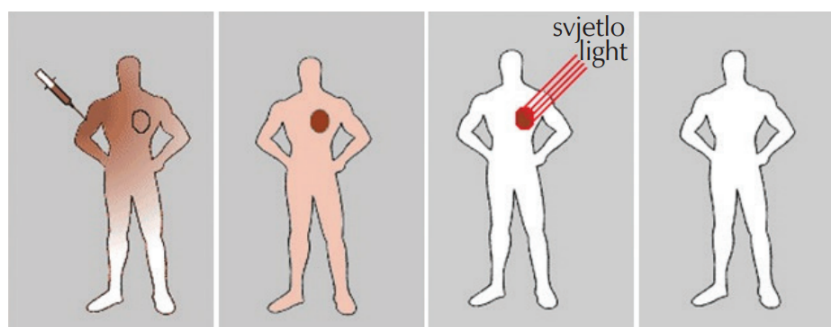
Slika 5.1: Struktura para-kinona (p-kinon) te općenita struktura QM (orto-QM, para-QM) i primjer molekule adamantan fenol-QM-a koji ne posjeduje općenitu strukturu.

QM-i se mogu dobiti termičkim putem - zagrijavanjem prekursora, te fotokemijskim putem - pobudom prekursora svjetlošću određene valne duljine. Kao primjer prekursora nastajanja QM-i mogu se navesti derivati fenola, naftola i antrola. Valja napomenuti da iako je većina QM-a vrlo reaktivna i kratko živeća, u prirodi postoji relativno mali broj stabilnih QM-a. Jedan od primjera stabilnih QM-a je mikotoksin citrinin, sekundarni produkt metabolizma plijesni štetan za ljude i životinje koji se može naći u hrani kao posljedica prerade onečišćenih žitarica.

5.1.1 Biološka važnost QM

QM-i imaju brojne biološke i medicinske primjene: kao antimalarici [26], inhibitori mitohondrijske respiracije [27], inhibitori glukuronidaze [28], u detekciji fiziološki važnih tiola [29] te mnoge druge. Također, QM-i su vrlo rasprostranjeni i u prirodi: jedan od primjera je takson[94] koji je pronađen u ružmarinu i također posjeduje i antibakterijsku[95], antioksidativnu[96], antifungalnu[97] i insekticidnu[98] aktivnost. QM-i se također mogu upotrebljavati i za obilježavanje proteina u istraživanjima protein-ligand ili protein-protein interakcija [99],[100]. Uz navedeno, vjeruje se da su QM-i fundamentalni međuprodukti u bioformaciji

lignina [101] koji je također i sporedni proizvod u proizvodnji papira. Međutim, potencijalno najvažnija biološka aktivnost QM-a temelji se na križnom spajanju DNA lanaca odnosno antiproliferativnom (sprječavanje razmnožavanja tumorskih stanica) djelovanju zbog čega su primjenjivi u fotokemoterapiji te su jedni od najvažnijih međuprodukata u mehanizmu djelovanja raznih lijekova protiv raka te antitumorskih antibiotika [30],[25],[31].

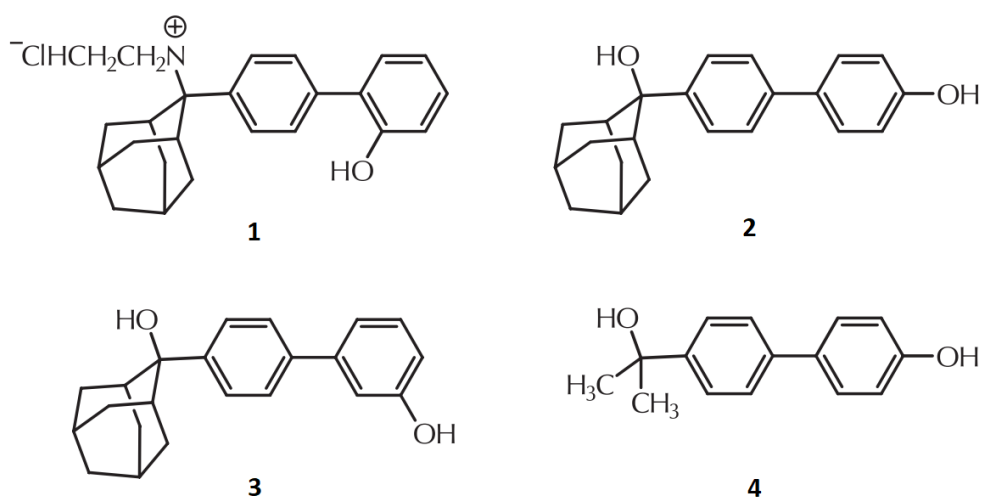


Slika 5.2: Osnovni princip djelovanja fototerapeutika. Preuzeto iz [94].

Fotokemoterapija (slika 5.2) je terapijska metoda koja uključuje ubrizgavanje agensa (prekursora) koji sam po sebi nije biološki aktivan, a poželjno je i da ima sposobnost akumuliranja u tumorskom tkivu. Nakon ubrizgavanja, željeni dio tijela pacijenta osvjetli se svjetlošću određene valne duljine koja pokreće fotokemijsku reakciju koja producira i stvara željene molekule kao produkte ili međuprodukte (QM). Spomenuti produkti ili međuprodukti antiproliferativno djeluju na tumorsko tkivo nakon čega se ono smanjuje, a na kraju i odumire. Jedan od problema fotokemoterapije je pronalazak prekursora koji apsorbira svjetlost valne duljine bliže vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra (prema 650nm) nego ultraljubičastom jer fotone ultraljubičastih valnih duljina apsorbiraju biološki važne molekule poput DNA i RNA. Upravo zbog procesa poput fotokemoterapije koji koriste biološku aktivnost QM-a od presudne važnosti je istraživanje puta fotokemijske reakcije na ultrabrzim vremenskim skalama u potpunosti od prekursora (reaktanata) do QM-a (željenih međuprodukata). S obzirom da je tijekom fotokemijske reakcije moguće stvoriti razne međuprodukte na putu do QM-a, ti produkti potencijalno mogu imati neželjene i negativne učinke na biološki važne procese i biološki važne molekule. Stoga je potrebno detaljno identificirati sve međuprodukte i njihovo vrijeme života te fotokemiju na putu do stvaranja biološki aktivnih QM-a. Za rasvjetljavanje mehanizma fotokemijskih reakcija i proučavanje kratko živućih međuprodukata poput QM-a uz ostale tehnike vremenski razlučive spektroskopije kao što je laserska pulsna fotoliza koriste metode ultrabrze spektroskopije koje zajedno pokrivaju vremensku skalu od par femtosekundi do par mikrosekundi ili čak sekundi.

Na slici 5.3 prikazani su neki od prekursora QM sa zabilježenom antiproliferativnom aktiv-

nošću[102],[103]. Pri istraživanju aktivnosti određenih spojeva, kao pokazatelj antiproliferativnosti koristi se vrijednost IC_{50} koja je jednaka iznosu koncentracije potrebne da bi se inhibirao (usporio) određeni biološki proces (u ovom slučaju razvoj stanica karcinoma) za 50%. Tvari na kojima je mjerena inhibicija, odnosno veličina IC_{50} bile su čovječje stanične linije karcinoma debelog crijeva, karcinoma dojke i karcinoma pluća. Mjerenja su vršena sa i bez ozračivanja svjetlošću valne duljine 300nm u periodu od 3 dana u navratima od 1 minute po danu. Iako svaki prekursor osim **2** pokazuje antiproliferativnu aktivnost i bez ozračivanja, IC_{50} vrijednost u prisutstvu ozračivanja je znatno manja što je direktan dokaz antiproliferativnosti QM-a nastalih iz prikazanih prekursora. Kao primjer najvećeg povećanja antiproliferativne aktivnosti prilikom ozračivanja može se navesti djelovanje prekursora **2** na stanične linije karcinoma debelog crijeva. Bez ozračivanja vrijednost IC_{50} za **2** na staničnim linijama karcinoma debelog crijeva iznosi $>100 \mu\text{mol dm}^{-3}$ dok u prisutstvu ozračivanja iznosi $9 \mu\text{mol dm}^{-3}$ što je promjena IC_{50} vrijednosti od $\sim 90\%$.

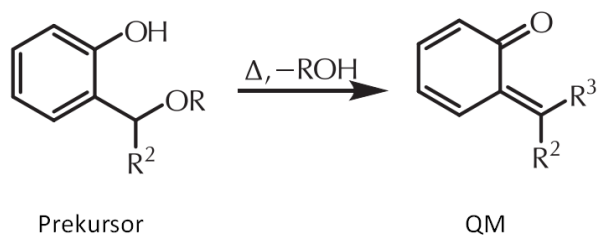


Slika 5.3: Prekursori QM koji pokazuju antiproliferativnu aktivnost.

5.1.2 Sinteza QM

Kao što je već spomenuto, zbog svoje polarne strukture koja ih čini vrlo reaktivnima i s elektrofilima i s nukleofilima, QM-i su u većini slučajeva kratko živući zbog čega se ne mogu pohraniti u svrhu daljnjeg istraživanja nego moraju biti stvoreni *in situ*. Postoje dvije metode stvaranja QM-a: termičkim ili fotokemijskim putem. Ova disertacija usmjerena je na sintezu QM-a fotokemijskim putem stoga će biti ovdje dane samo osnove stvaranja QM-a termičkim putem.

Prilikom termičkog stvaranja QM-a, prekursor istih se zagrijava nakon čega dolazi do kemijske reakcije u kojoj nastaju QM-i. Kao primjer termičkog stvaranja QM-a moguće je navesti oksidaciju fenola, eliminaciju vode [104] te pirolizu dimera QM-a [105]. Slika 5.4 prikazuje stvaranje kratko živućeg i reaktivnog QM-a termičkim putem odnosno zagrijavanjem prekursora te eliminacijom skupine ROH sa spomenutog prekursora.



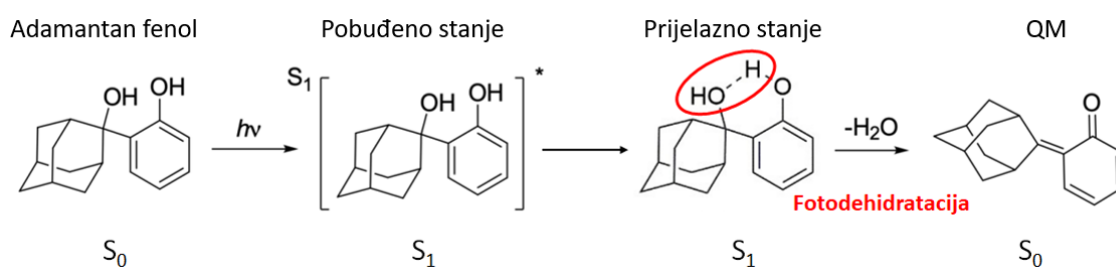
Slika 5.4: Nastajanje QM termičkim putem: zagrijavanje te eliminacija skupine ROH sa prekursora.

5.1.2.1 Sinteza QM fotokemijskim putem

Drugi način stvaranja QM-a je fotokemijskim putem gdje se umjesto zagrijavanja prekursora isti osvjetli svjetlošću valne duljine potrebne za pobuđivanje u pobuđena elektronska stanja nakon čega prekursor postaje nestabilan te dolazi do fotokemijske reakcije koja na putu do konačnog produkta sadrži QM kao međuprodukt ili kao produkt u reverzibilnoj reakciji.

Određene molekule u pobuđenom elektronskom stanju posjeduju potpuno drugačiju raspodjelu elektrona, dipolni moment i kuteve između jezgara atoma što im daje potpuno drugačija kemijska svojstva od istih molekula u osnovnom elektronskom stanju te ih se može smatrati potpuno drugačijim molekulama. Kao najčešći prekursori fotokemijskog stvaranja QM-a upotrebljavaju se spojevi koji podliježu β -cijepanju poput derivata fenola i fenilnih etera [94]. Prvi primjer fotokemijske reakcije nastajanja QM-a opisan je 1913.[106] gdje je primjećeno kako hidroksibenzilfenol u krutom ili tekućem stanju izložen sunčevoj svjetlosti postaje žut. Kasnije je promjena boje objašnjena nastankom QM-a u reakciji fotodehidratacije. Kao primjer fotokemijskog stvaranja QM-a ovdje je navedena fotodehidratacija derivata fenola, reakcija o kojoj će detaljnije biti riječi u poglavlju 6 - *Fotogeneracija QM-a iz adamantan fenola u ultrabrznoj reakciji fotodehidratacije*. Slika 5.5 prikazuje fotokemijsku reakciju fotodehidratacije adamantan fenola (prekursor QM-a) te nastajanje odgovarajućeg QM-a. Nakon pobude adamantan fenola laserskim pulsom valne duljine 267nm dolazi do pobude prekursora u S_1 elektronsko stanje nakon čega dolazi do stvaranja vodikove veze (isprekidana linija) između vodika i kisika na koji je vezan vodikov atom iz druge OH skupine. Stvorena vodikova veza zapravo tvori mo-

lekulu H₂O koja biva eliminiranom u otapalo (50-50 mješavina vode i acetonitrila) te se zbog postojanja konusnog presjeka kao rezultat dobiva molekula adamantan fenol QM-a u osnovnom stanju. Nakon nekoliko stotina ms [32], stvoreni nestabilni i reaktivni QM reagira s molekulama otapala te na sebe vraća molekulu vode iz otapala čime se ponovno dobiva početna molekula adamantan fenola što je jedan od primjera reverzibilne reakcije. Prikazana reakcija je detaljno istražena u disertaciji te predstavlja jedan od temeljnih rezultata istraživanja i bit će detaljnije objašnjena u idućem poglavlju. Općenito, fotokemijske metode stvaranja kinon metida imaju veliku prednost nad termičkim zbog pružanja prostorne i vremenske mogućnosti kontrole njihovog stvaranja. Uz spomenuto, prednost reverzibilnih fotokemijskih reakcija leži u sačuvanju početnog materijala (prekursora). Prilikom ireverzibilnih fotokemijskih reakcija stvoreni QM najčešće nepovratno reagiraju sa otapalom gdje dolazi do gubitka početnog materijala.



Slika 5.5: Fotokemijsko stvaranje QM-a iz adamantan fenola. Pobudom adamantan fenola laserskim pulsem valne duljine 267nm u S_1 elektronsko stanje dolazi do eliminacije molekule H₂O u reakciji fotodehidratacije i stvaranja QM u S_0 osnovnom elektronskom stanju.

Poglavlje 6

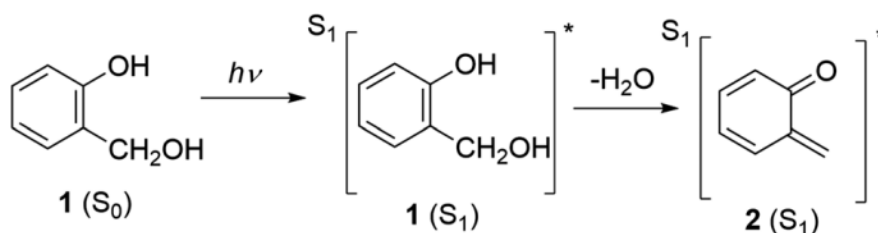
Fotogeneracija QM-a iz adamantan fenola u ultrabrzoj reakciji fotodehidratacije

6.1 Uvod i motivacija

Za primjenu QM-a u biološkim sistemima potrebno je potpuno poznavanje puta fotokemijske reakcije od reaktanata do produkata odnosno potrebno je identificirati sve međuprodukte stvorene od trenutka fotoaktivacije do stvaranja QM-a s obzirom da biološki važne molekule mogu interagirati sa međuproduktima i time mijenjati tok reakcije. Temeljni rezultat ovog poglavlja je potpuno rasvjetljavanje fotokemijske reakcije nastajanja QM-a iz adamantan fenola u ultrabrzoj reakciji fotodehidratacije.

Najčešća metoda stvaranja QM-a u biološkim sistemima je fotodeaminacija pogodno supstituiranih fenola[107] što je proučavano pomoću više eksperimentalnih metoda kao što su: tehnika laserske fotolize (LFP, eng. laser flash photolysis)[s¹Ńkalamera2015photodeamination], računski[109] te pomoću ultrabrzih TA mjerenja[21]. Kao temeljni rezultat proučavanja zaključeno je kako se fotodeaminacija odvija adijabatski tijekom ultrabrze fotokemijske reakcije na S_1 potencijalnoj plohi te se kao fotoprodukt stvaraju QM-i u svom pobuđenom stanju bez dodatnih međuprodukata[21]. No, jedna od negativnih strana reakcija fotodeaminacije je što reakcijom QM-a s vodom dolazi do smanjenja broja prekursorskih molekula [110][111]. Odnosno, takve reakcije nisu reverzibilne jer se reakcijom $QM+H_2O$ ne dobiva početna molekula prekursora.

Stoga su reakcije fotodehidratacije ($-H_2O$) bolji izbor za stvaranje QM-a u biološkim sustavima. U spomenutim reakcijama QM nastaje eliminacijom molekule vode sa prekursora. Daljnjom reakcijom QM-a sa molekulom vode prisutnom u otapalu dobiva se ponovno molekula prekursora te stoga ne dolazi do smanjenja koncentracije prekursora [31][112]. Proučavanjem



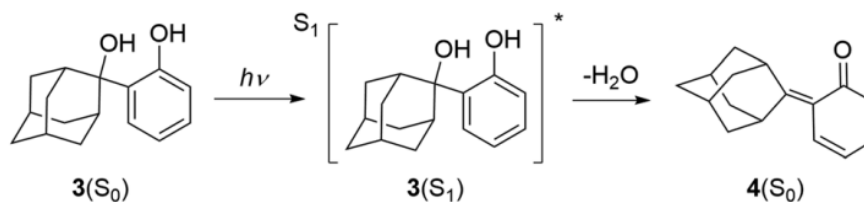
Slika 6.1: Fotodehidracija *o*-hidroksimetilfenola (**1**) i dobivanje QM u pobuđenom stanju (**2**).

reakcija fotodehidracije u kombinaciji sa proučavanjem antiproliferativne aktivnosti fotogeneriranih QM-a zaključeno je kako neki derivati antracena (prekursor QM-a) mogu služiti kao moćna sredstva protiv matičnih stanica raka[113].

Reakcija fotodehidracije prethodno je temeljito istražena na *o*-hidroksimetilfenolu[114] (**1** na slici 6.1), molekuli koja posjeduje kromoforu jednaku onoj kod adamantan fenola (**3** na slici 6.2). U radu je pokazano kako je odgovarajući QM međuprodukt (**2** na slici 6.1) generiran u ultrabrzoj adijabatskoj reakciji koja se odvija na S₁ plohi potencijalne energije te se kao međuprodukt dobiva QM u pobuđenom S₁ stanju. No, iako *o*-hidroksimetilfenol i adamantan fenol posjeduju istu kromoforu i daju QM kao međuprodukte u reakciji fotodehidracije, nije nužno da se reakcije odvijaju identičnim putem. Stvaranje QM-a može uključivati derivate benzokseta kao međuprodukata[112] ili se može odvijati preko fenoksil radikala u reakciji homolitičkog cijepanja alkoholne OH grupe[115].

Što se adamantan fenola tiče (**3** na slici 6.2), prethodna fotokemijska istraživanja su pokazala kako **3** podliježe dehidraciji efikasnije ($\Phi_R = 0.51$)[116] nego **1** ($\Phi_R=0.23$)[112] zbog čega je moguće naslutiti kako se fotokemijska reakcija stvaranja QM-a **4**, njen mehanizam i karakteristična vremenska skala razlikuju od reakcije stvaranja **2**. Proučavanje fotoreaktivnosti derivata adamantan fenola je izuzetno bitno s obzirom da odgovarajući QM općenito pokazuju bolju antiproliferativnu aktivnost nego ne-supstituirani QM-i[103],[116],[117],[115]. U sklopu ove disertacije objavljen je rad[32] u kojem su sadržana kombinirana eksperimentalna i teorijska istraživanja mehanizma reakcije fotodehidracije derivata adamantan fenola **3**. Vremenski ovisni DFT (TD-DFT eng. time dependent - density functional theory) računi podupiru eksperimentalne rezultate dobivene fs-TA i fs-FLUC mjerenjima. Kao dodatna provjera toka reakcije na duljim vremenskim skalama (od nekoliko desetaka ns do stotina ms) koristila su se mjerenja laserske fotolize. Glavni rezultat rada je kako **1** i **3** ne podliježu istom fotokemijskom putu. Za razliku od **1**, fotodehidracija molekule **3** je neadijabatska reakcija koja se odvija preko konusnog presjeka (CI, eng. conical intersection) dok odgovarajući QM **4** nastaje u svom osnovnom stanju **4**(S₀). Rezultati rada pokazuju kako promjene u molekularnoj strukturi koje kromoforu ostavljaju nepromijenjenom ipak mogu rezultirati kompletnom promjenom fotokemijske reak-

tivnosti i fotokemijskog puta.



Slika 6.2: Fotokemijsko stvaranje QM-a 4(S₀).

6.2 Priprema uzorka i metode

6.2.1 Eksperimentalne metode

Promatranje fotokemije adamantan fenola uključivalo je prethodno opisana dva fs-TA eksperimentalna postava, jedan sa vremenskom rezolucijom od 220fs i maksimalnim vremenskim razmakom između pulseva od 1.3ns korišten za promatranje fotokemijske reakcije u duljem vremenskom prozoru i drugi sa vremenskom rezolucijom od 50fs korišten za promatranje najranijih trenutaka fotokemije adamantan fenola. Uz spomenuto, koristila se i FLUC metoda do vremena od 50ps čiji je postav također prethodno opisan. FLUC metoda koristila se kako bi se razlučili doprinosi pobuđenih stanja adamantan fenola koji podliježe fluorescenciji te QM-a koji nisu fluorescentne molekule. Za proučavanje fotoinducirane dinamike na puno duljim skalama koje su se protezale do milisekundi koristila se LFP tehnika koju je najlakše opisati kao TA u kojoj se kao izvori svjetlosti koriste laseri nanosekundnih pulseva ili lampe. Vremenski razmak između pulseva svjetlosti u slučaju korištenja lampi varira se elektronički sve kasnijim paljenjem bijele lampe (proba) u odnosu na UV lampu (pumpa). Za LFP mjerenja korišten je LP980 Edinburgh Instruments spektrometar koji pokriva vremensko područje od nekoliko stotina ns do nekoliko ms. Kao pumpni laser korišten je četvrti harmonik Quantel Nd:YAG lasera valne duljine 266nm te pulseva vremenskog trajanja 6ns, a frekvencije repeticije 10Hz. Energija pulsa postavljena je na 20mJ. Kao proba koristila se Xe lampa s mogućnošću rada u pulsnom modu. Sustav za detekciju sastoji se od fotomultiplikatora i monokromatora te pokriva spektralno područje od 200nm do 800nm. Pumpna i probna zraka geometrijski su postavljene pod kutem od 90°. Tijekom mjerenja uzorak se nalazio u kiveti koja nije protočna uz česte izmjene uzorka kako bi se eliminirali efekti čiji su uzrok fotoproducti. Uz spomenuto, mjerili su se i vremenski profili fluorescencije na duljim vremenskim skalama u rasponu do 20ns. Mjerena

su izvršena TC-SPC metodom (eng. time correlated-single photon counting) na spektrometru Edinburgh Instruments FS5 opremljenim pulsni LED izvorom svjetlosti valne duljine 280nm. Vremensko trajanje pulsa iznosilo je ≈ 800 ps. Vremenski profili fluorescencije mjereni su na valnoj duljini 310nm preko 1023 kanala sa vremenskim prozorom od ≈ 20 ps po kanalu. Signali su mjereni dok se nije postiglo 3000 kao vrijednost u kanalu maksimalnog iznosa. Emisijski spektri su također mjereni pobudom na 280nm.

6.2.2 Priprema uzorka

Sinteza uzorka **3** opisana je u radu [116]. Za mjerenja na prvom TA postavu na duljim vremenskim skalama **3** je otopljen u $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (1:1) u koncentraciji od $c=5.0 \times 10^{-4}$ M. Apsorbancija na valnoj duljini 267nm mjerena u kiveti optičke duljine 1cm iznosila je 0.7. Prilikom mjerenja na drugom TA postavu kraće vremenske rezolucije **3** je također otopljen u $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (1:1) dok se koncentracija morala podići na $c=5.0 \times 10^{-3}$ M jer je energijski tok izlaznih pulseva NOPA-e bio niži od energijskog toka pumpnih pulseva u prvom TA postavu. Prilikom LFP mjerenja otapalo je ostalo isto dok je koncentracija iznosila $c=2.0 \times 10^{-4}$ M, a apsorbancija na valnoj duljini 266nm mjerena u kiveti optičke duljine 1cm iznosila je 0.3. Prije mjerenja otopina je bila pročišćena mlazom argona ili kisika na 20 minuta. Kod TC-SPC mjerenja **3** je otopljen u istom otapalu koncentracije $c=5.0 \times 10^{-5}$ M, a apsorbancija na 280nm iznosila je 0.07 u kiveti optičke duljine 1cm. Prije mjerenja otopina je pročišćena mlazom dušika na 20 minuta. Kod svih mjerenja acetonitril je bio HPLC čistoće dok je korištena voda mQ H_2O (Millipore). Sva mjerenja izvršena su na sobnoj temperaturi (22 C).

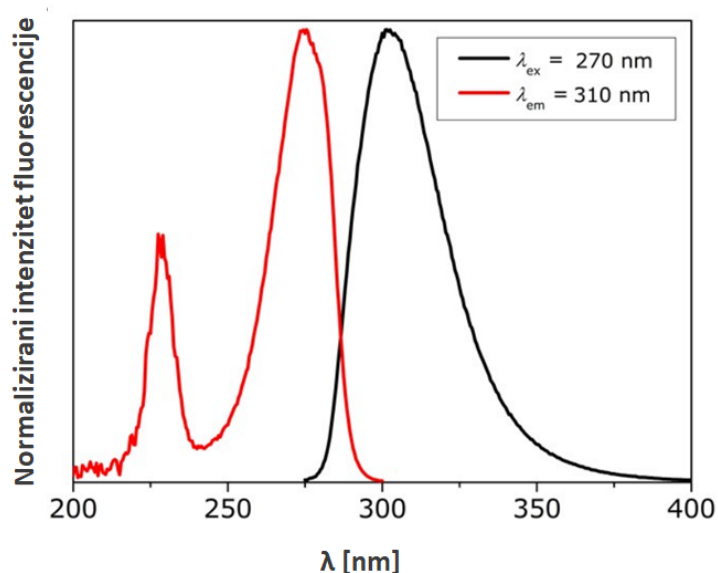
6.2.3 Računske metode

Teorijski izračuni i geometrijske optimizacije vršene su u programu GAUSSIAN16[118] koristeći nivo teorije PCM(water)/ ω B97XD/6-311++G(d,p)[119],[120], a dobiveni minimumi su potvrđeni računanjem frekvencija. Za optimiziranje pobuđenog stanja te računanje energija vertikalnih pobuđenja za 20 energijski najnižih singletnih elektronskih stanja koristio se nivo teorije PCM(water)/TD- ω B97XD/6-311++G(d,p). Valjanost korištene teorije potvrđena je u radovima Šekutor i Basarića gdje su teorijski izračuni potvrđeni usporedbom sa eksperimentalnim podacima [21][114]. Optimizacija konusnog presjeka za stvaranje QM 4(S_0) izvršena je na istom nivou teorije korištenjem programa ORCA 4.2.0.[121],[122].

6.3 Eksperimentalni rezultati

6.3.1 Apsorpcija uzorka

Na slici 6.3 prikazan je apsorpcijski i emisijski spektar adamantan fenola **3** u u CH₃CN-H₂O (1:1) za optičku duljinu 1mm. Koncentracija korištena za mjerenje apsorpcijske krivulje $c=5.0 \times 10^{-3}M$ korištena je u fs-TA mjerenjima na oba postava. Sa apsorpcijske krivulje je vidljivo kako **3** posjeduje prvi spektralni apsorpcijski maksimum na otprilike 275nm. Spomenuti apsorpcijski maksimum odgovara prijelazu $S_0 \rightarrow S_1$. Drugi apsorpcijski maksimum koji se nalazi oko 220nm moguće je pripisati prijelazima u viša pobuđena elektronska stanja. Kako je valna duljina pumpnih pulseva u svim eksperimentima $\approx 267nm$ jasno je kako se uzorak pobuđuje u prvo pobuđeno S_1 elektronsko stanje.

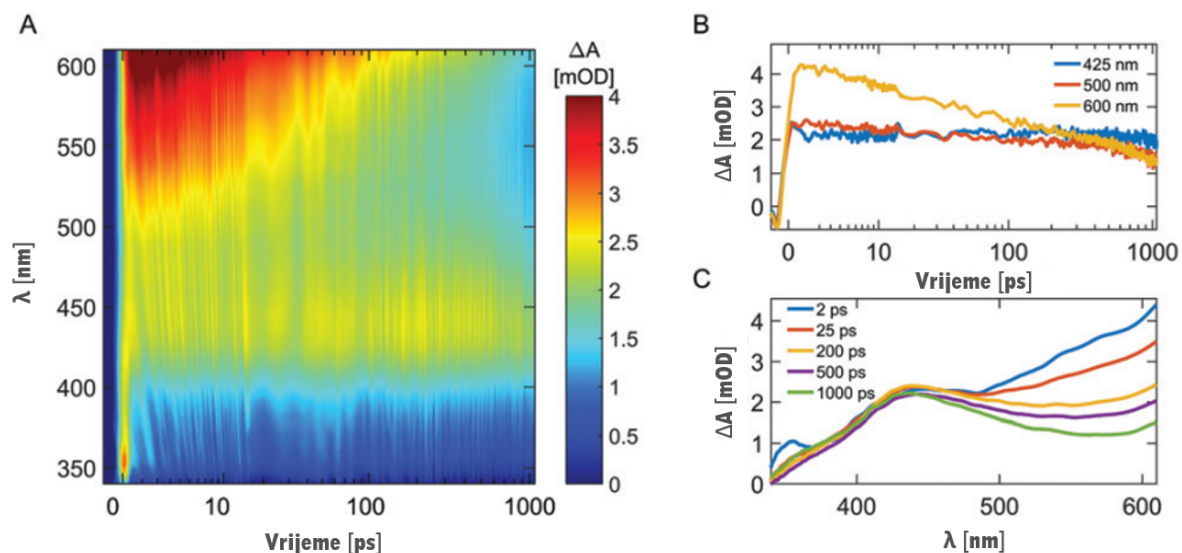


Slika 6.3: Normalizirani ekscitacijski (crveno) i emisijski (crno) spektri molekule **3** u CH₃CN-H₂O (1:1). Naznačene su emisijska i ekscitacijska valna duljina.

6.3.2 Fs-TA rezultati

Rezultati dobiveni metodom ultrabrze tranzijentne apsorpcije bit će podijeljeni u dva dijela od kojih svaki odgovara jednom eksperimentalnom postavu TA. Iako je u poglavlju 4.1 - *Karakterizacija postava* navedena vremenska rezolucija postava od 220fs, mjerenja reakcije fotodehidracije adamantan fenola izvršena su na ranijoj verziji postava gdje su korišteni deblji (0.5mm)

BBO kristali za stvaranje trećeg harmonika odnosno pumpne zrake što je posljedično dovelo do nešto lošije vremenske rezolucije od 500fs. Rezultati mjerenja prikazani su na slici 5.8.



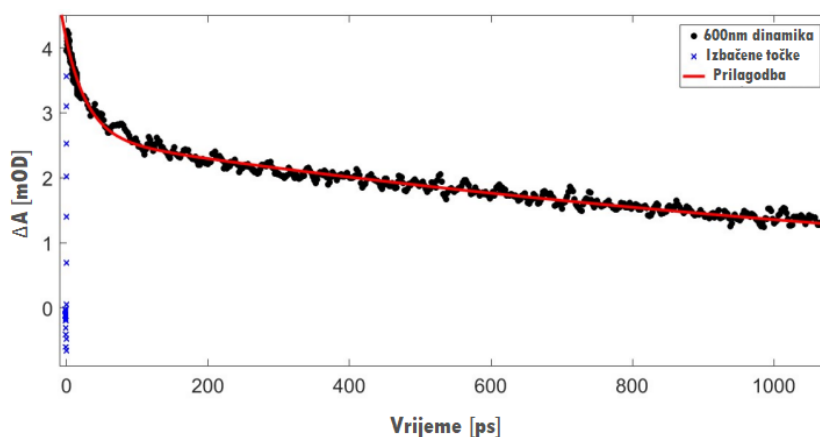
Slika 6.4: (A) TA spektrogram fotokemije molekule **3** u $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (1:1) dobiven korištenjem prvog postava za fs-TA (pumpni puls = treći harmonik). (B) Kinetički profili za odabrane, karakteristične valne duljine i (C) spektri za odabrane vremenske trenutke. Vrijeme je dano na logaritamskoj skali.

U početnim vremenima moguće je primijetiti koherentni artefakt TPA snažnog intenziteta koji je izraženiji na kraćim valnim duljinama (340-400nm) dok mu vrijednost postepeno pada prema infracrvenim valnim duljinama. Na slici 6.4(C) na spektru koji odgovara vremenu od 2ps na valnim duljinama oko 350nm moguće je vidjeti spektralni potpis TPA koherentnog artefakta. Kako je uz prvi TA postav postojao i drugi, kraće vremenske rezolucije, ovdje nije bilo potrebe za eliminiranjem artefakta zbog čega informacije o dinamici u prvoj pikosekundi reakcije ovdje nisu pouzdane. Bitno je uočiti pozitivan signal koji je na nanosekundnoj skali gotovo konstantnog iznosa, a centriran je na 425nm (slika 6.4 (B)). Dodatno, u mjerenjima je izražen i pozitivan signal koji se proteže do infracrvenih valnih duljina, a koji trne na nanosekundnoj skali. Zbog različitih vremenskih dinamika ispravno je zaključiti kako ove spektralne promjene odgovaraju različitim fotokemijskim procesima. Vrijeme rasta oba signala je gotovo jednako vremenskoj rezoluciji postava (500fs). Nedostatak negativnog signala u spektrogramu mjerenja može se objasniti time što **3** apsorbira na kraćim valnim duljinama od valnih duljina prisutnih u bijeloj svjetlosti (<300nm) stoga GSB nije vidljiv u mjerenjima. Drugi mogući izvor negativnog signala je stimulirana emisija iz S_1 stanja molekule **3** te u ovom slučaju nedostatak negativnog signala pripisujemo preklapanju sa jačim signalom apsorpcije ili eksponencijalnoj

konstanti sa vremenom života na razini ispod jedne ps.

Kao najlogičniji izbor za dodjelu stanja signalu na 425nm ističe se vibracijski relaksirano S_1 stanje molekule **3**. Ta tvrdnja provjerena je računskim metodama gdje su izračunati ESA spektri za $\mathbf{3}(S_1)$ koji odgovaraju prijelazima $S_1 \rightarrow S_n$. U vidljivom dijelu spektra pronađeno je nekoliko prijelaza, no sa zanemarivim oscilatorskim jakostima (slika 6.14). Analiziranjem dobivenog ESA spektra moguće je zaključiti kako se u apsorpcijskom spektru molekule $\mathbf{3}(S_1)$ ne očekuje prijelaz na valnim duljinama duljim od 350nm stoga tvrdnja kako signal na 425nm odgovara vibracijski relaksiranom $\mathbf{3}(S_1)$ stanju otpada. Iako je izračun ESA spektara TD-DFT metodama poprilično neprecizan, u ovom slučaju se pokazao dovoljnim za eliminaciju prethodno izrečene tvrdnje što se analizom ostalih podataka pokazalo ispravnim. Za točnu asignaciju stanja signalu na 425nm potrebno je prvo objasniti prirodu signala na infracrvenim valnim duljinama. Snažni signal na infracrvenim valnim duljinama može doći od otopljenih elektrona. Otopljeni elektroni su elektroni nastali ionizacijom molekule otapala ili uzorka koji nakon što su okruženi polarnim molekulama otapala (najčešće vode) tvore sustav koji apsorbira elektromagnetsko zračenje sa maksimumom na infracrvenim valnim duljinama ($\approx 700nm$). S obzirom da je gornja granica spektralnog prozora prvog fs-TA postava $\approx 600nm$ zbog korištenja drugog tipa filtera, u mjerjenjima nije prisutan apsorpcijski maksimum potpisa otopljenog elektrona nego samo porast signala prema infracrvenim valnim duljinama. S obzirom na spomenuto i na prijašnje rezultate [115], signal na infracrvenim valnim duljinama pripisan je otopljenim elektronima. Tranzijenti dodijeljeni otopljenim elektronima imaju kraća karakteristična vremena života nego signal na 425nm, a uz to vremenskoj dinamici najbolje odgovara prilagodba bi-eksponencijalne funkcije. Iz bi-eksponencijalne prilagodbe na eksperimentalne podatke za spomenuti spektralni raspon dobiva se da početnu dinamiku opisuje karakteristično vrijeme od 28ps nakon čega slijedi sporija dinamika s karakterističnim vremenom od oko 1.5ns (slika 6.5). S obzirom na puno dulja karakteristična vremena dinamike signala od vremena rasta i trajanja artefakta, izbacivanjem prvih nekoliko točaka uključujući rast signala i koherentne artefakte i prilagodbom čistih eksponencijalnih funkcija bez konvoluiranja sa IRF-om nije došlo do smanjenja točnosti prilagodbe. Valja ponovno napomenuti kako vremenske konstante dulje od otprilike $T_{max}/3$ gdje je T_{max} maksimalan vremenski razmak između pulseva (zadnja vremenska točka na spektrogramu) nije moguće potpuno točno odrediti. Usporedba dobivenih rezultata sa proučavanjima fotokemije otopljenih elektrona u drugim otapalima nije jednostavna s obzirom da u našem slučaju imamo mješavinu dva otapala (voda i acetonitril) i uzorka. Bitno je napomenuti kako se ionizacijom bilo kojeg od dva otapala ili molekula uzorka dobiva signal otopljenog elektrona centriran na infracrvenim valnim duljinama što dodatno komplicira proučavanje otopljenih elektrona u ovom slučaju. No, u prijašnjim istraživanjima pokazano je kako u čistom acetonitrilu, višak elektrona

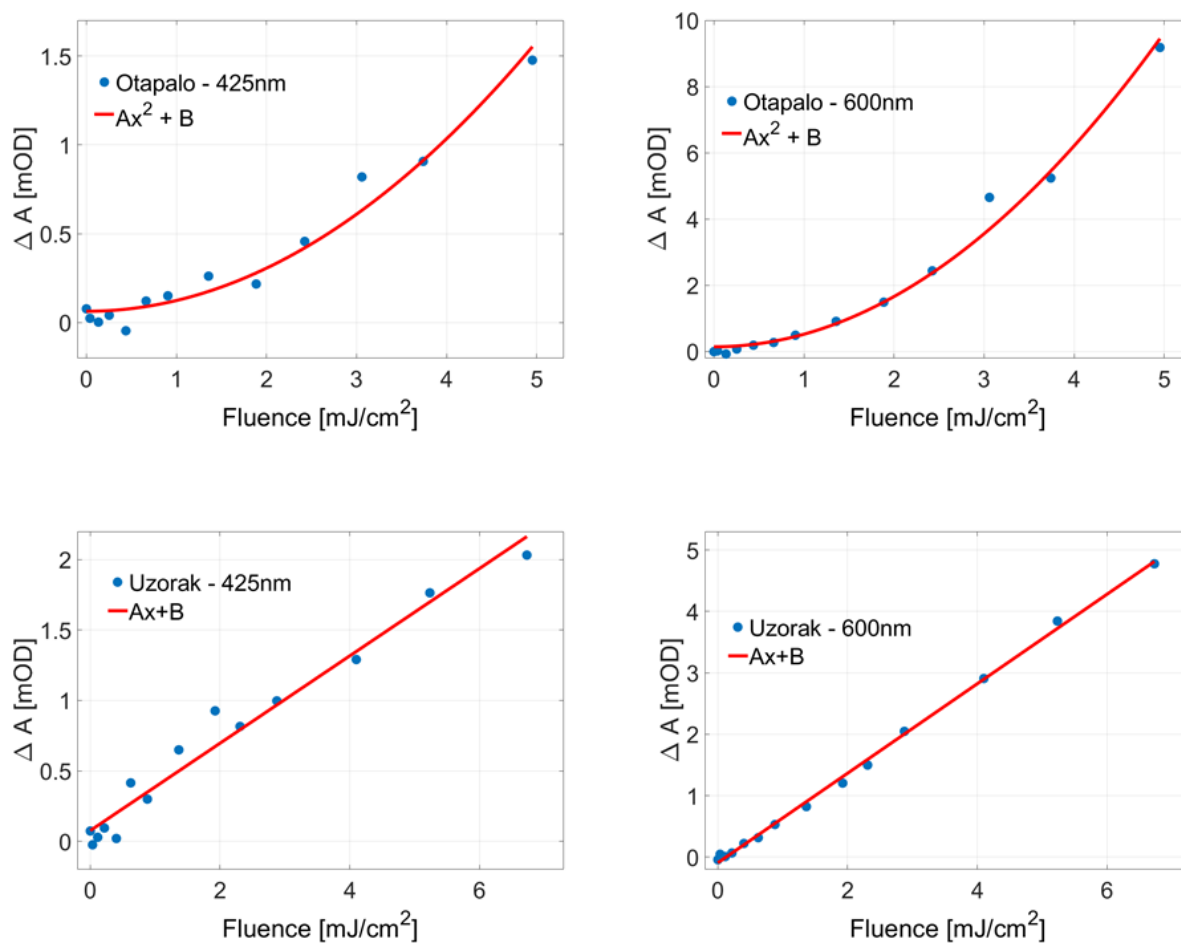
poprimaju dva moguća oblika - otopljene elektrone ili otopljene molekularne anione - koji su u ravnoteži jedni s drugima [123]. Poznato je kako je vremenska skala potrebna za konverziju otopljenih elektrona u osnovnom stanju u otopljene dimere aniona otprilike 80ps [124] što povežujemo s 28.5ps konstantom iz prilagodbe fs-TA podataka na 600nm. Spomenuta dva oblika imaju različitu dinamiku i apsorpcijske spektre što bi u našem slučaju moglo biti dodatno modificirano prisutnošću vode i molekula uzorka **3**.



Slika 6.5: Bi-eksponencijalna prilagodba na vremensku dinamiku otopljenog elektrona na 600nm. Prilagodbom su dobivena karakteristična vremena od 28.5ps i 1.5ns. S obzirom na puno dulja vremena od brzine rasta signala i trajanja artefakta, izbacivanjem prvih nekoliko točaka, uključujući i rast signala nije došlo do smanjenja točnosti prilagodbe.

Kako bi se objasnio proces nastajanja otopljenih elektrona mjerena je ovisnost jačine signala (ΔOD) o energiji pumpnog pulsa po površini (energijski tok) i u slučaju otapala i u slučaju uzorka za valne duljine 425nm (valna duljina još neobjašnjenog signala) i 600nm (otopljeni elektron) (slika 6.6). U slučaju linearne ovisnosti možemo zaključiti kako dolazi do jednofotonske ionizacije te posljedičnom stvaranju otopljenih elektrona dok u slučaju kvadratne ovisnosti govorimo o dvo-fotonskoj ionizaciji. Ovisnost signala o energiji pumpnih pulseva za otapalo pokazuje kvadratnu ovisnost što ima smisla s obzirom da apsorpcijska krivulja otapala u vidljivom i bliskom UV dijelu elektromagnetskog spektra (do otprilike 200nm) posjeduje zanemarive vrijednosti stoga je logično kako u primjeru otapala ionizacija mora biti dvofotonska s obzirom da jedan foton pumpnog pulsa (267nm) ne posjeduje dovoljno energije za ionizaciju molekula otapala. Važno je napomenuti kako je kvadratna ovisnost prisutna na obje valne duljine prilikom mjerenja čistog otapala. U slučaju uzorka u otapalu situacija je drugačija, ovisnost je linearna i na 425nm i na 600nm. Apsorpcijska krivulja uzorka (slika 6.3) posjeduje maksimum na 275nm stoga je jedno-fotonsko stvaranje otopljenih elektrona moguće. S obzi-

rom da je ovisnost linearna, jasno je kako u slučaju uzorka dolazi do jedno-fotonske ionizacije molekula uzorka **3** te posljedično do stvaranja para otopljenih elektrona i radikal kationa (**3** → radikal kation + elektron) sa zanemarivim doprinosom dvo-fotonske ionizacije otapala jer većinu laserskih pulseva apsorbira uzorak, a ne otapalo. Stoga možemo zaključiti kako signal koji se proteže do infracrvenih valnih duljina (500nm na više) potječe najvećim dijelom od otopljenih elektrona uzrokovanih ionizacijom molekula uzorka **3** dok manjim dijelom potječe od elektrona uzrokovanih dvo-fotonskom ionizacijom otapala.

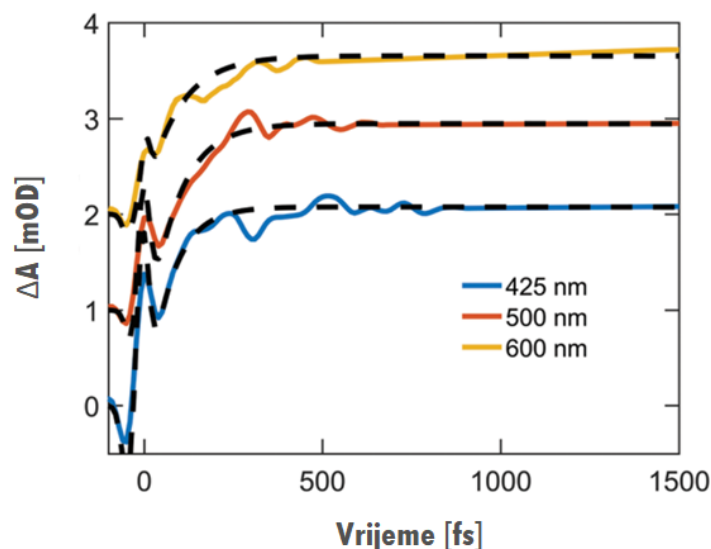


Slika 6.6: Ovisnost jačine signala o energijskom toku pumpe u otapalu i uzorku na fiksnom vremenskom razmaku od 10ps. Otapalo (gornji red) pokazuje kvadratnu ovisnost za odabrane valne duljine 425nm i 600nm dok uzorak (donji red) pokazuje linearnu ovisnost za iste valne duljine.

S obzirom da je pokazano kako prilikom mjerenja uzorka **3** dolazi do ionizacije uzorka, posljedično dolazi do stvaranja radikal kationa. Iz navedenog jasno slijedi kako je jedan od mogućih uzroka pozitivnog signala na 425nm apsorpcija radikal kationa molekule **3**. U vodenim

otapalima fenolni radikal kationi se deprotoniraju do fenoksil radikala[125] koji se vraćaju u početnu molekulu **3** unutar 260-420 μ s što je potvrđeno LFP mjerenjima. U nastavku će biti dodatne rasprave o prirodi pozitivnog signala na 425nm.

Analizom prethodno objavljenih TA spektara QM-a **4**[116] moguće je zaključiti kako dodatan doprinos signalu na 425nm dolazi od apsorpcije osnovnog stanja QM-a, što je potkrijepljeno i teorijskim izračunima. TD-DFT simulacije otkrivaju odgovarajući apsorpcijski vrh fotoproducta **4** centriran na 368nm (slika 6.15). Kao što je već spomenuto, s obzirom da su TD-DFT izračuni neprecizni te se često ne poklapaju s eksperimentalnim podacima (ovdje 368nm naspram 425nm) zbog same prirode TD-DFT metode, kvalitativno poklapanje je u našem slučaju dovoljno za pripisivanje apsorpcije **4**(S₀) fotoproducta signalu na 425nm. Zasad je signalu na 425nm pripisana kombinacija apsorpcije radikal kationa molekule **3** i apsorpcije fotoproducta QM **4**S₀. S obzirom da na prikazanim mjerenjima signali rastu unutar vremena rezolucije postava i da nema potpisa kratko-živućeg stanja koje bi odgovaralo početno populiranom Frank-Condon stanju prekursora **3** ili pobuđenom stanju QM fotoproducta **4**(S₁) potrebno je analizirati i mjerenja drugog fs-TA postava sa kraćom vremenskom rezolucijom iznosa otprilike \approx 50fs koristeći sub-20fs UV NOPA pumpne pulseve (slika 6.7). Naime, iskorištena je činjenica kako je Institut za fiziku dio Laserlab konzorcija te je prijavljen projekt s ciljem mjerenja TA adamantan fenola i drugih uzoraka uz puno bolju vremensku rezoluciju na Politecnico di Milano. Zbog kratkoće pumpnih pulseva, u mjerenju su vrlo izraženi koherentni artefakti (XPM i TPA) vidljivi oko nultog vremena. Iako su ranije spomenute metode za eliminaciju artefakata, u konkretnom slučaju njihova primjena nije davala zadovoljavajuće rezultate što je uvelike kompliciralo analizu rane dinamike. Stoga je provedena analiza tranzijenata s prisutnim artefaktima koristeći funkcije prilagodbe koje su u mogućnosti opisati i artefakte, u konkretnom slučaju pomoću modela koji artefakte opisuje kao dvije gaussijanske funkcije različitog predznaka. Prvotna analiza pokazuje kako u vremenskom prozoru nevidljivom za prvi fs-TA eksperiment (<500fs) ne postoji potpis dodatnog međuproducta. Također, čak ni prilikom korištenja drugog harmonika valne duljine 400nm kao pumpne zrake za CaF₂, čime se spektar superkontinuum proširio u UV dio elektromagnetskog spektra potpis međuproducta, dodatnog pobuđenog stanja ili stimulirane emisije nije opažen. U spomenutom slučaju vidljiv je samo GSB u spektralnom rasponu 265-285nm. Nedostatak SE signala unatoč postojanju stabilne emisije molekule **3** potvrđuje dominaciju apsorpcije u cjelokupnom signalu (najvjerojatnije zbog ne-emisivne molekule - QM-a) te je zahtijevalo da se za potrebe istraživanja fotokemije adamantan fenola provedu mjerenja vremenski razlučive fluorescencije na femtosekundnoj skali. Naime, FLUC mjerenjima moguće je izolirati doprinos pobuđenih stanja adamantan fenola ukupnom signalu s obzirom da je produkt reakcije - QM ne-emisivna molekula.



Slika 6.7: Ultrabrza dinamika molekule **3** za tri odabrane valne duljine, mjerena drugim fs-TA postavom sa vremenskom rezolucijom 50fs koristeći sub-20fs UV NOPA pulseve kao pumpne pulseve. **3** je otopljen u CH₃CN-H₂O (1:1). Isprekidane crne linije predstavljaju prilagodbu eksponencijalnih funkcija konvoluiranih sa IRF-om uz modelirane artefakte.

U svrhu detaljnije analize ultrabrze dinamike molekule **3**, na kinetičke profile prilagođen je, uz dio koji opisuje artefakt, zbroj dvije eksponencijalne funkcije konvoluirane sa IRF-om. Prva eksponencijalna funkcija odnosi se na vrijeme rasta signala dok je druga, koja se odnosi na trnjenje signala, zbog očitog odsustva bilo kakve brze dinamike na skali od nanosekunde fiksirana na vrijednost 1ns. Na taj je način ostvarena kvalitetna analiza koja je usmjerena na ranu dinamiku rasta signala uz korištenje najmanjeg broja slobodnih parametara što uvelike olakšava i poboljšava prilagodbu. Vremena rasta za tri odabrane valne duljine dana su u tablici 6.1. Jasno je vidljivo kako su vremena rasta za sve 3 valne duljine većeg iznosa od vremena rezolucije drugog fs-TA postava. Naime, dobiveno vrijeme rasta dulje od vremenske rezolucije postava dodatno ide u prilog pripisivanju signala na 425nm QM-u(S₀) s obzirom da tranzijent ne nastaje trenutačno nego iz S₁ stanja molekule **3** koje je u TA mjerenjima nevidljivo. Dodatno, u svrhu smanjenja šuma kinetičkih profila TA signal je dodatno integriran po valnim duljinama u spektralnom rasponu koji odgovara apsorpciji QM-a (400-500nm). Opravdanost ovog postupka leži u činjenici kako nije opažen potpis ultrakratko-živućeg međuprodukta u tom spektralnom rasponu, a također utjecaj otopljenih elektrona u tom spektralnom prozoru je manji nego na duljim valnim duljinama. Također, integracijom je dodatno potvrđeno vrijeme rasta dulje od vremena rezolucije drugog fs-TA postava. Vrijeme rasta dobiveno integracijom iznosi 110fs (tablica 6.1) te je u dobrom slaganju sa vremenima rasta dobivenima prilagodbom na kinetičke

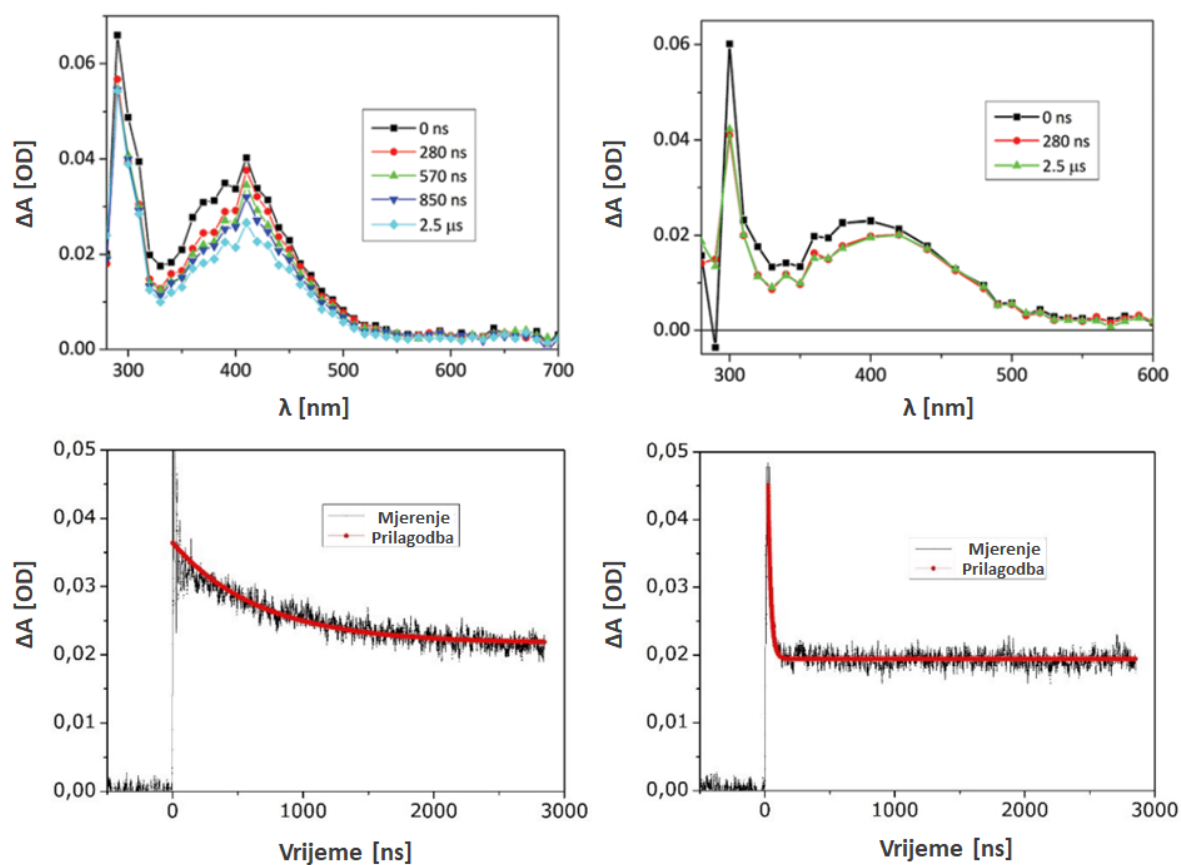
profile triju karakterističnih valnih duljina.

| Valna duljina [nm] | Vrijeme rasta [fs] |
|--------------------|--------------------|
| 425 | 78 ± 4 |
| 500 | 82 ± 6 |
| 600 | 125 ± 10 |
| 400-500 | 110 ± 6 |

Tablica 6.1: Vrijednosti dekonvoluiranih vremena rasta signala na tri valne duljine karakteristične za TA mjerenja molekule **3**. Vremena rasta odnose se na fs-TA mjerenja drugim TA postavom. Zadnji redak odnosi se na prilagodbu na signal integriran u rasponu 400-500nm.

6.3.3 LFP rezultati - μ s skala

Kako bi se dodatno provjerila vjerodostojnost pripisivanja signala na 425nm QM-u i potvrdila odsutnost bilo kakvih prethodnih međuprodukata obavljena su mjerenja nanosekundne tranzijentne apsorpcije (LFP) pokrivajući širok vremenski prozor od nekoliko stotina ns sve do stotina milisekundi. Nanosekundna TA mjerenja prikazana su na slici 6.8 u slučaju propuhivanja mlazom Ar (lijevo) i O₂ (desno). U oba slučaja **3** je otopljen u CH₃CN-H₂O (1:1) koncentracije $c = 2.0 \times 10^{-4}M$. Mjerenja otkrivaju dodatan tranzijent koji apsorbira u spektralnom rasponu 300-500nm. U slučaju propuhivanja Ar, a prilagodbom mono-eksponencijalne funkcije sa fiksnim vertikalnim pomakom koji odgovara milisekundnoj eksponencijalnoj konstanti na kinetički profil na 400nm dobiva se eksponencijalna konstanta $\tau = 750 \pm 30$ ns (kasnije će ovaj rezultat biti komentiran i uspoređen sa već objavljenom vrijednošću $\tau = 3\mu s$)[117]). Kinetički profili na 400nm i funkcije prilagodbe prikazani su u donjem redu slike 6.8. Propuhivanjem otopine mlazom O₂ spomenuti tranzijent biva prigušen te se u tom slučaju prilagodbom mono-eksponencijalne funkcije i odmakom dobiva eksponencijalna konstanta $\tau = 30 \pm 10$ ns. U okvirima ultrabrze spektroskopije općepoznato je kako O₂ prigušuje tripletna stanja. Razlog tome je što je osnovno stanje molekule kisika O₂ tripletno stanje te stoga sudarima molekula kisika sa molekulama uzorka u tripletnom stanju dolazi do pražnjenja tripletnih stanja uzorka te posljedično do smanjenja vremena života odgovarajućeg tranzijenta. Propuhivanje argonom služi suprotnoj svrsi od propuhivanja kisikom, u toj situaciji argon uklanja molekule O₂ iz otopine te je na taj način moguće mjeriti stvarno vrijeme života tranzijenta koji odgovara tripletnom stanju molekule. S obzirom da se propuhivanjem uzorka kisikom dobilo znatno manje vrijeme života za tranzijent na 400nm ($\tau = 30 \pm 100$ ns naspram $\tau = 750 \pm 30$ ns), tom tranzijentu se pripisuje tripletno pobuđeno stanje molekule **3**.

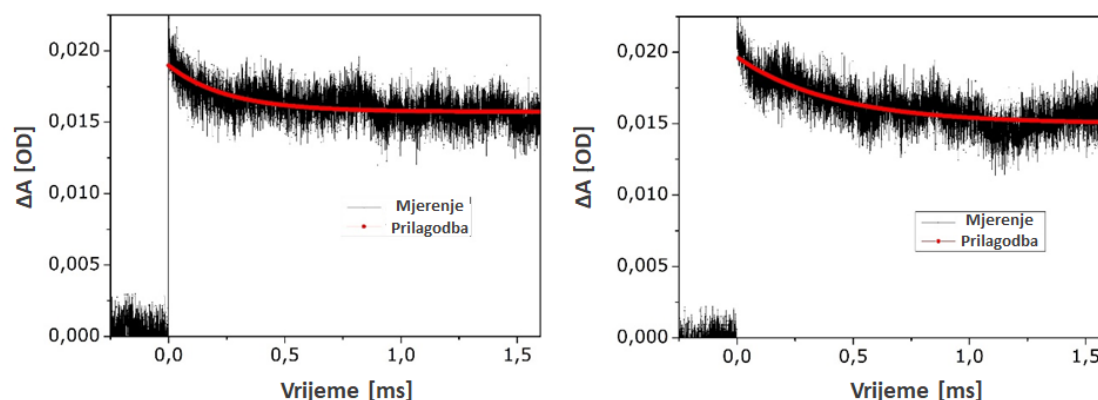


Slika 6.8: ns-TA (LFP) mjerenja molekule **3** otopljene u $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (1:1) koncentracije $c = 2.0 \times 10^{-4} \text{M}$. Prikazani su spektri u vremenu i prilagodba mono-eksponencijalne funkcije na kinetički profil na 400nm. Lijevo - mjerenja uzorka propuhanog mlazom argona i desno - uzorak propuhan mlazom O_2 . Energija laserskog pulsa valne duljine 266nm podešena je na 17mJ po pulsu.

6.3.4 LFP rezultati - ms skala

Na duljoj vremenskoj skali do nekoliko sekundi opažena su 2 tranzijenta. Tranzijent sa kraćim vremenom života (slika 6.9) apsorbira u spektralnom rasponu od 350-400nm i trne eksponencijalnom konstantom od $\tau = 260 \pm 10 \mu\text{s}$ u otopini pročišćenju Ar, dok u otopini propuhanoj O_2 trne eksponencijalnom konstantom $\tau = 420 \pm 20 \mu\text{s}$. Kako tranzijent nije prigušen propuhivanjem kisikom, usporedbom sa već objavljenim spektrom fenoksil-radikala prekursorske molekule [125] spomenutom tranzijentu je pripisana molekula fenoksil-radikala. Kao što je prije spomenuto, radikal kation može biti stvoren jedno-fotonskom ionizacijom što dodatno objašnjava pojavu otopljenih elektrona, a deprotonacijom radikal kationa dolazi do pojave fenoksil-radikala. No, kako u fs-TA mjerenjima nije opažen potpis stvaranja fenoksil radikala, puno je vjerojatnije kako radikal kation trne u reakciji povratnog transfera elektrona dok fenoksil radi-

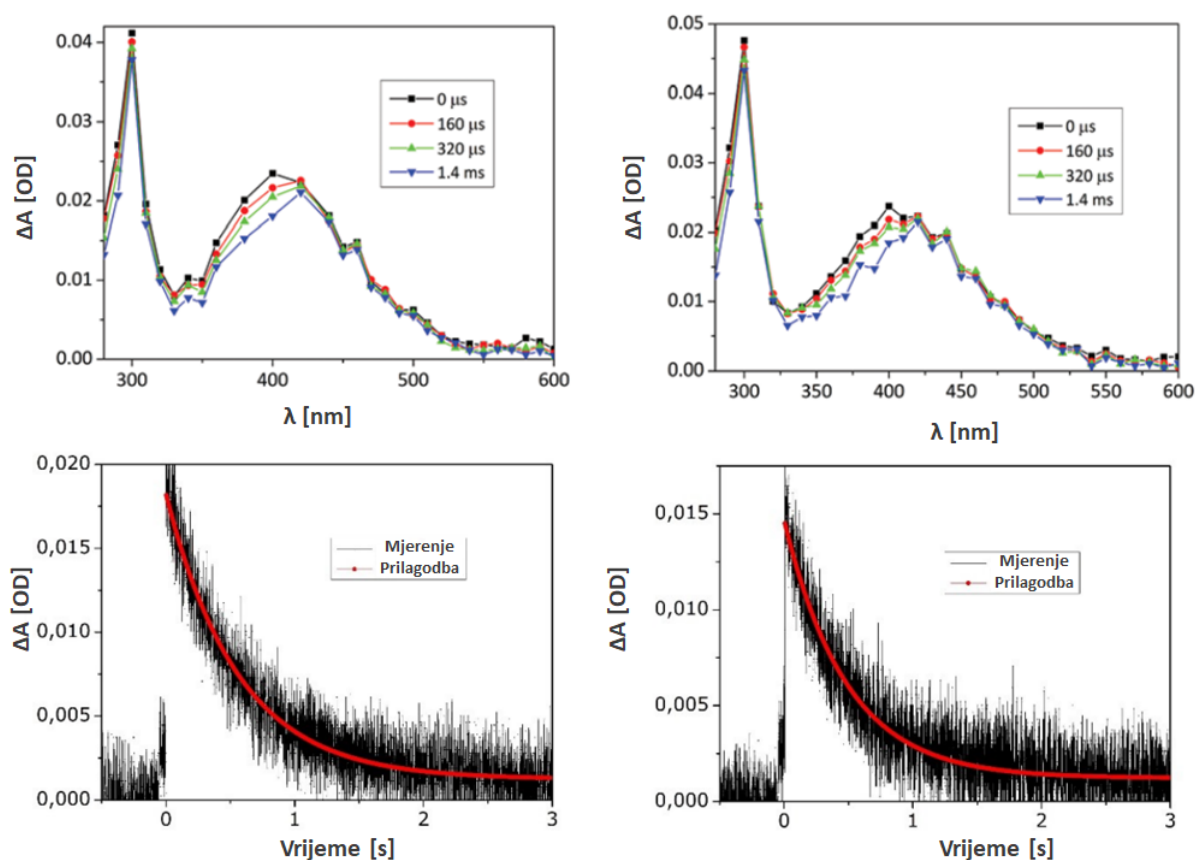
kal može biti stvoren direktno u reakciji prijenosa vodika za koju je poznato kako se odvija na duljim, nanosekundnim vremenskim skalama [126]. Takva interpretacija objašnjava nedostatak potpisa stvaranja fenoksil-radikala u fs-TA mjerenjima unutar prve nanosekunde ili u LFP mjerenjima koja pokrivaju vremensku skalu od desetak i više nanosekundi.



Slika 6.9: ms-TA (LFP) mjerenja molekule **3** otopljene u $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (1:1) koncentracije $c = 2.0 \times 10^{-4} \text{M}$. Prikazana je prilagodba mono-eksponencijalne funkcije na kinetički profil na 400nm. Lijevo - mjerenja uzorka propuhanog mlazom argona i desno - uzorak propuhan mlazom O_2 . Energija laserskog pulsa valne duljine 266nm podešena je na 17mJ po pulsu.

Tranzijent duljeg vremena života (slika 6.10) posjeduje apsorpcijski maksimum na $\approx 420\text{nm}$ te trne eksponencijalnom konstantom $\tau = 600 \pm 50 \text{ms}$ u otopini propuhanoj Ar i eksponencijalnom konstantom $\tau = 470 \pm 20 \text{ms}$ u otopini propuhanoj O_2 što je prikazano u donjem redu slike 6.10. Na temelju prethodnih istraživanja[116] gdje je mjereno vrijeme života i spektar QM(S_0) taj tranzijent pridružen je QM(S_0). Mjerenja jasno pokazuju kako je QM stvoren unutar laserskog pulsa (10ns) s obzirom da je vrijeme rasta signala jednako vremenskoj rezoluciji nanosekundnih mjerenja i s obzirom da na duljim valnim duljinama (500nm) nije opažen rast signala.

LFP mjerenja otkrivaju kako signal na 425nm u fs-TA mjerenjima (slika 6.4) sadrži doprinose tripletnog pobuđenog stanja molekule **3** i radikal kationa čija je dinamika prespora za opažanje u femtosekundnim, ultrabrzim mjerenjima. Unatoč tome, spomenuti signal koji je prisutan u širokom vremenskom prozoru od par desetaka fs do nekoliko stotina ms također sadrži i doprinos QM-a u osnovnom stanju no ne i od S_1 prvog singletnog pobuđenog stanja molekule **3** koje bi trebalo radijativno trnuti nanosekundnom eksponencijalnom konstantom. Rezultati vremenski razlučive spektroskopije te usporedba s ranije istraženim relevantnim foto-



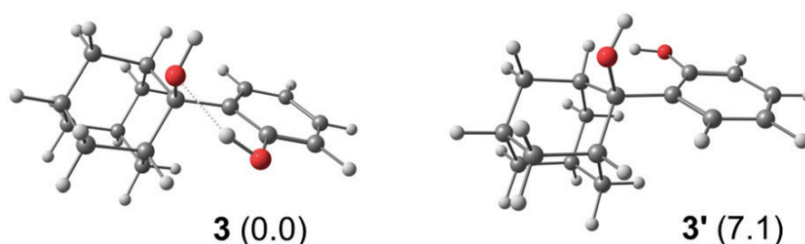
Slika 6.10: ms-TA (LFP) mjerenja molekule **3** otopljene u $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (1:1) koncentracije $c = 2.0 \times 10^{-4} \text{ M}$. Prikazani su spektri u vremenu i prilagodba mono-eksponencijalne funkcije na kinetički profil na 400nm. Lijevo - mjerenja uzorka propuhanog mlazom argona i desno - uzorak propuhan mlazom O_2 . Energija laserskog pulsa valne duljine 266nm podešena je na 17mJ po pulsu.

kemijskim procesima ukazuju kako QM najvjerojatnije nastaje u svom osnovnom singletnom stanju u ultrabrznoj reakciji dehidratacije. No, za konačnu potvrdu potrebna su i mjerenja vremenski razlučive fluorescencije na ultrabrznoj vremenskoj skali te teorijske simulacije.

6.3.5 Mjerenja vremenski razlučive fluorescencije

Na prvi pogled odsutnost S_1 stanja molekule **3** u vidu ESA ili SE je u suprotnosti sa nezanemaljivim kvantnim prinosom fluorescencije $\Phi_F = 0.13$. No, važno je napomenuti kako molekula prekursora **3** može u svom osnovnom stanju postojati u dvije različite konformacije. Ti konformeri su energetski veoma različiti (slika 6.11). Teorijski izračuni pokazuju kako je konformer koji tvori intramolekularnu vodikovu vezu između dvije alkoholne grupe (**3**) za $7.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ stabilniji (niže energije) od konformera koji ne tvori spomenutu vezu (**3'**). Najvjerojatnije je

konformer koji tvori vodikovu vezu (**3**) reaktivan te ulazi u ultrabrznu reakciju stvaranja QM-a i na taj način skraćuje vrijeme života fluorescencije na skalu od stotinjak fs. S druge strane, manje stabilni konformer **3'** nije reaktivan i odgovoran je za mjereni kvantni prinos fluorescencije. Valja napomenuti kako, iako izolirane molekule **3** i **3'** posjeduju energetska razliku od $7.1 \text{ kcal mol}^{-1}$, ta razlika se može promijeniti u vodenom otapalu koje samo po sebi stvara vodikove veze. U okruženju vode postoji mogućnost da **3'** postane stabilniji konformer upravo zbog vodikovih veza molekula vode koje mogu parirati intramolekularnim vodikovim vezama uzorka te stoga utjecati na energetska stabilnost i povećati efikasnost fluorescencije, što je već demonstrirano ranije [116]. U prilog izloženoj teoriji idu i mjerenja fluorescencije molekule **3** TC-SPC metodom u $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (1:1) koju dobro opisuje bi-eksponencijalna funkcija sa konstantama od $\tau_1 = 0.20 \pm 0.03 \text{ ns}$ i $\tau_2 = 3.26 \pm 0.01 \text{ ns}$. Opažanje dvije bitno različite vremenske konstante je u dobrom slaganju sa teorijom postojanja oba konformera, reaktivnog **3** i nereaktivnog **3'**. Važno je napomenuti kako je kraća eksponencijalna konstanta neprecizno izmjerena jer je usporediva sa vremenskom rezolucijom eksperimenta.

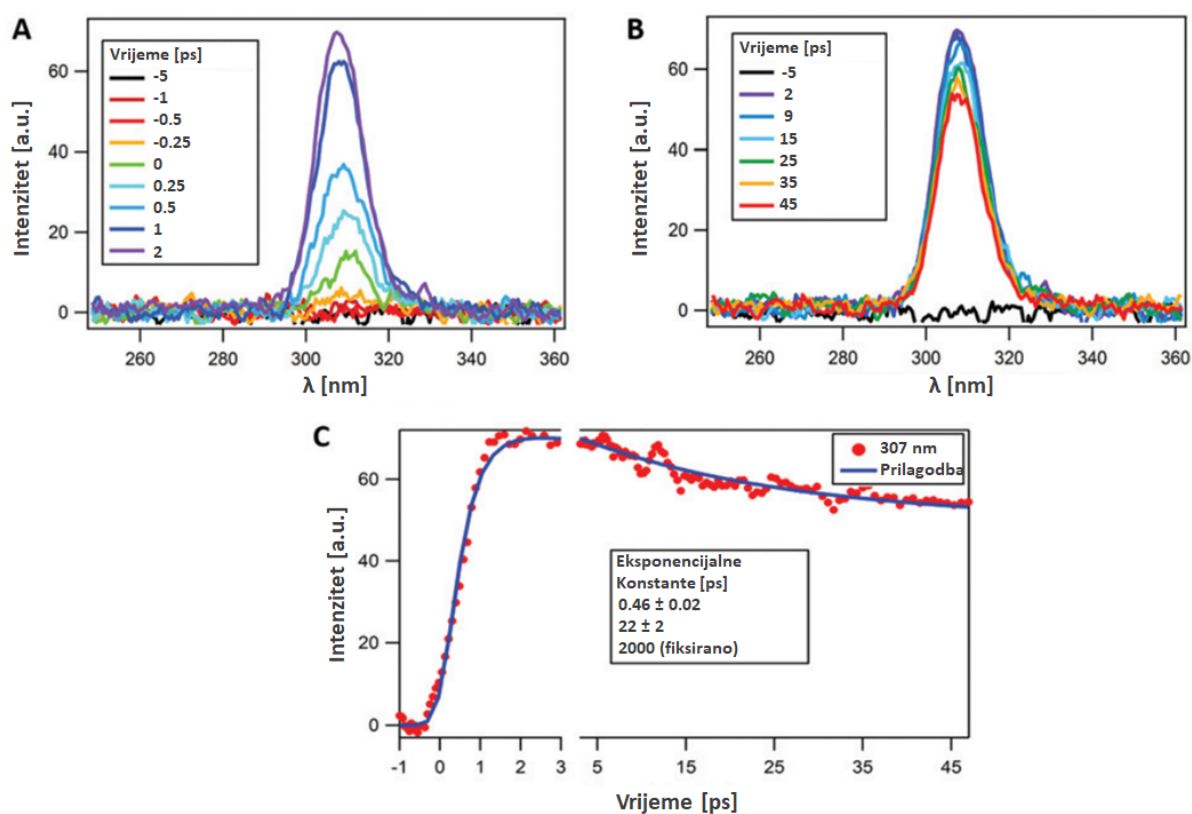


Slika 6.11: Dvije optimizirane strukture (**3** i **3'**) molekule adamantan fenola dobivene na nivou teorije PCM(water)/ ω B97XD/6-311++G(d,p). Relativne energije dane su u kcal mol^{-1} i naznačene su u zagradama. Intramolekularna vodikova veza označena je isprekidanom linijom u slučaju konformera **3**.

Što se fluorescencije tiče, očekivano je kako bi ista trebala biti detektirana na malo duljim valnim duljinama od maksimuma apsorpcije molekule **3**, odnosno oko 310nm (slika 6.3), što je i potvrđeno vremenski razlučivim mjerenjima fluorescencije na fs vremenskoj skali. I dok kod fs-TA mjerenja u bliskom UV i vidljivom dijelu spektra valne duljine na kojima je opažena fluorescencija nisu bile dostupne, najvjerojatniji uzrok za nedostatak SE signala u tom rasponu valnih duljina prilikom UV-fs-TA mjerenja (CaF_2 pumpan sa drugim harmonikom na 400nm pri čemu je pokriveno područje 200-400nm) je preklap slabog SE signala sa jačim signalom apsorpcije.

FLUC mjerenjima (slika 6.12) kao što je i očekivano, dobivene su dodatne informacije o fotoreakciji adamantan fenola u singletnom pobuđenom stanju S_1 . Mjerenjima je opažen spek-

tralni maksimum centriran oko 307nm koji trne bez ikakvih promjena u spektralnom obliku duž cijelog vremenskog prozora dostupnog u mjerenju (50ps). Dobiveni spektar u jako je dobrom slaganju sa izmjerenim stacionarnim emisijskim spektrom molekule **3** (slika 6.3). Na FLUC mjerenjima krilo spektra fluorescencije na duljim valnim duljinama nije opažen zbog uvjeta faznog usklađivanja koji su bili podešeni za maksimum emisije na 310nm. Fluorescencija je najvećim dijelom pripisana nereaktivnom konformeru **3'** koji je odgovoran za mjereni kvantni prinos fluorescencije adamantan fenola **3** i eksponencijalno trne konstantom od 3.26ns. Analizom FLUC mjerenja dobiva se vrijeme rasta signala od 460fs i dvije eksponencijalne konstante koje opisuju trnjenje signala. Prva, kraća $\tau_1 = 22 \pm 2$ ps i druga, sporija na nanosekundnoj skali koju nije moguće razlučiti FLUC mjerenjima u vremenskom prozoru do 50ps.

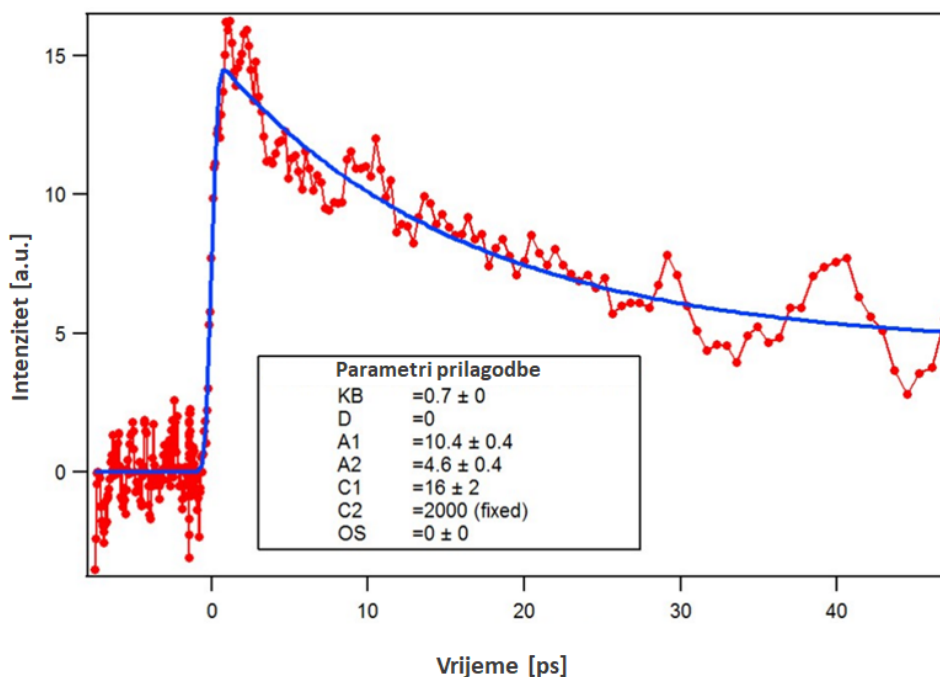


Slika 6.12: (A) i (B) - Vremenska evolucija spektra fluorescencije molekule **3** ($c = 5.0 \times 10^{-4}$ M u $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (1:1)). (C) Vremenski profil fluorescencije na 307nm i bi-eksponencijalna funkcija prilagodbe konvoluirana sa IRF-om poluširine 630fs. Druga eksponencijalna konstanta fiksirana je na 2ns jer je vremenski prozor mjerenja ograničen na 50ps. Uz trnuće eksponencijalne funkcije, dodana je eksponencijalna funkcija koja odgovara porastu signala.

U svrhu pojašnjenja vremena rasta fluorescencije izvršena su FLUC mjerenja na mole-

kuli anizola u acetonitrilu što se može smatrati modelom molekule koja nije foto-reaktivna (slika 6.13). Mjerenjima je potvrđeno kako vrijeme rasta FLUC signala kod adamantan fenola (0.46ps) nije eksperimentalni artefakt jer kod anizola rast signala odgovara IRF-u postava. Kako nisu opažene promjene u spektralnom obliku vremenski razlučive fluorescencije, mehanizam čiste vibracijske relaksacije odnosno preraspodjele energije hlađenjem molekule može biti eliminiran. Umjesto toga, rast signala bez ikakve spektralne promjene ukazuje na mehanizam indirektna populacije određenog stanja što najvjerojatnije potječe od konformacijske promjene s obzirom da kod jednostavne fenolne kromofore apsorpcijski i emisijski dipoli prijelaza trebaju biti kolinearni. S obzirom na dostupne informacije vezane uz fotokemiju **3**, najvjerođostojnije objašnjenje za vrijeme rasta signala prilikom FLUC mjerenja je rotacija oko C-C jednostruke veze koja spaja adamantan i fenol, čime se **3'** mijenja u **3** i obrnuto. Uz spomenuto, moguća je i rotacija fenolne OH grupe što rezultira drugačijoj prostornoj raspodjeli dviju OH grupa. Oba konformera, **3** i **3'** su prisutni u otopini u trenutku laserske pobude. Pretpostavlja se kako pobuđeni reaktivni konformer **3** podliježe ultrabrznoj fotodehidraciji te stvara QM **4** (unutar 100fs, kako je pokazano fs-TA eksperimentom), ali isto tako dolazi do manje efikasne konverzije u emitivni **3'** sa vremenskom konstantom 460fs (vrijeme rasta FLUC signala). Spomenuta razlika u dinamikama je također u skladu s razlikom u kvantnom prinosu dehidracije ($\Phi_R = 0.51$) i fluorescencije ($\Phi_F = 0.13$) kod adamantan fenola [116]. S druge strane postoji mogućnost konverzije emitivnog konformera **3'** u **3** sa vremenskom konstantom od 200ps što bi objasnilo dualnu prirodu fluorescencije adamantan fenola (200ps i 3.26ns) opaženu prilikom TC-SPC mjerenja.

Nakon objašnjenja vremena rasta FLUC signala slijedi objašnjenje trnućih komponenti. Spori pad signala koji je fiksiran na 2ns je pripisan nereaktivnom emitivnom konformeru **3'** što je u skladu s kvantnim prinosom fluorescencije ($\Phi_F = 0.13$) [116]. Čak ako bi se u analizi spomenuta eksponencijalna konstanta i fiksirala na vrijednost 3.26ns koliko je dobiveno u TA mjerenjima, jedini efekt bi bio u promijenjenom relativnom odnosu amplituda dvije trnuće eksponencijalne funkcije, dok je efekt na iznos eksponencijalnih konstanti zanemariv. Interpretacija kraće vremenske konstante od 22ps nije tako trivijalna. U ovom slučaju nemoguće je iz rasprave isključiti utjecaj anizotropne relaksacije s obzirom da FLUC mjerenja zbog tehničkih ograničenja nije bilo moguće izvršiti pod uvjetom magičnog kuta. Činjenica kako je u referentnom sustavu anizola pronađena eksponencijalna konstanta bliska spomenutoj (16ps kod anizola naspram 22ps kod adamantan fenola) potvrđuje da dinamika potječe od rotacijske difuzije i isključuje pripisivanje te konstante konformacijskoj promjeni uzorka (**3'** u **3**). Zaključno, vremensku evoluciju fluorescencije moguće je opisati konverzijom između dva konformera **3** i **3'**

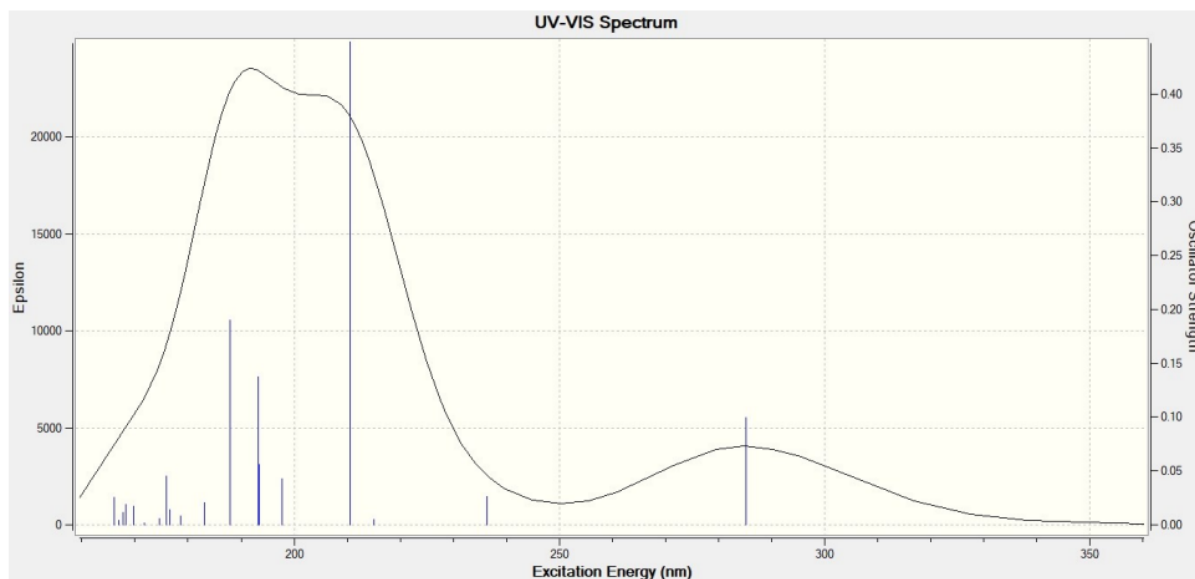


Slika 6.13: Fluorescencijski intenzitet FLUC mjerenja molekule anizola otopljene u acetonitrilu. Molekula anizola korištena je kao primjer ne-reaktivne molekule kod koje rast signala odgovara vremenskoj rezoluciji eksperimenta. IRF funkcija je predstavljena parametrom KB dok su slovom A označene amplitude eksponencijalnih funkcija, C su eksponencijalne konstante, OS označava odmak, a D vremenski pomak.

koji se pojavljuju na drugačijim vremenskim skalama bez potrebe dodavanja bilo koje dodatne molekule u reakcijsku shemu.

6.3.6 Rezultati teorijskih simulacija

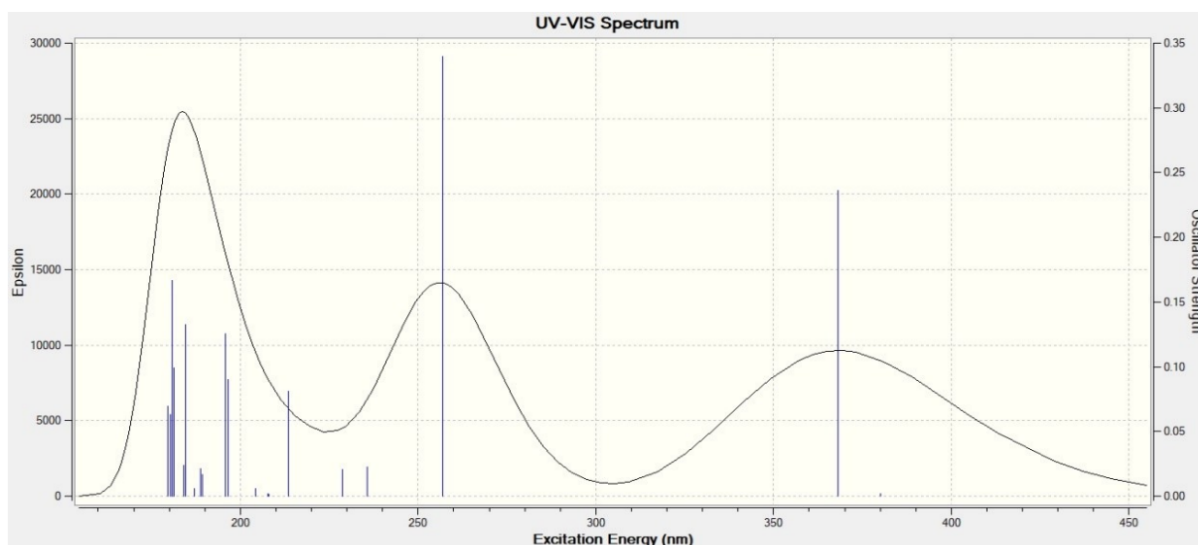
Uz već predstavljene rezultate izvršene su i TD-DFT simulacije u svrhu dodatnog rasvjetljavanja i potvrđivanja eksperimentalno određene fotokemije nastajanja QM iz adamantan fenola. Uz pomoć TD-DFT izračuna pokušao se dodatno objasniti i nedostatak potpisa međuproducta u fotokemijskoj reakciji stvaranja QM-a $4S_0$ (slika 6.2). TD-DFT metodama su izračunate stacionarne točke molekula **3** i **4** u osnovnom i prvom pobuđenom stanju koristeći programski paket Gaussian16 na nivou teorije PCM(water)/(TD-) ω B97XD/6-311++G(d,p). Stacionarna točka predstavlja geometriju molekule pri kojoj je derivacija njene energije jednaka nuli s obzirom na pomake svih jezgara sadržanih unutar iste. Odnosno, lokalni minimum energije predstavlja stacionarnu točku gdje bilo koji pomak vodi do povećanja energije te molekule. Izračunate energije



Slika 6.14: ApSORpcijski spektar prvog pobuđenog elektronskog stanja (ESA) molekule **3** dobiven TD-DFT računskom metodom.

za konformer **3**, sa vodikovom vezom i za QM **4** su u skladu sa prijašnjim istraživanjima QM-a [21]. Na slici 6.16 prikazani su rezultati TD-DFT simulacija sa izgledima stacionarnih točaka molekula te relativnim energijama vertikalnih prijelaza $S_0 \rightarrow S_1$ za **3** i **4**. **TS** označava prijelazno stanje (eng. transition structure) za koje je bitno napomenuti kako prilikom adijabatskih računa nije pronađen minimum za S_1 stanje nego je dostupna samo energija prijelaza $S_0 \rightarrow S_1$. Prijelazno stanje predstavlja strukturu molekule u kojoj je vodik sa fenolnog dijela molekule prebačen na adamantanski dio te je vezan za kisik čime čini molekulu H_2O koja reakcijom fotodehidracije biva eliminiranom u otapalo te nastaje QM. Bitno je naglasiti kako **TS** ne predstavlja međuprodukt nego prijelaznu strukturu (deformaciju) molekule usred fotokemijske reakcije dehidracije.

Kako rezultati fs-TA mjerenja sugeriraju nastajanje **4**(S_0) direktno iz **3**(S_1) bez ikakvog međuprodukta, najvjerojatniji put fotokemijske reakcije je putem konusnog presjeka. U prilog tome ide i činjenica da za prijelazno stanje molekule (**TS**) nije bilo moguće adijabatski optimizirati **TS**(S_1) s obzirom da TD-DFT metode općenito nailaze na problem kod računanja geometrija u blizini konusnog presjecanja. Nova implementacija u programu Orca 4.2.0 [122] omogućava simultanu optimizaciju osnovnog i prvog pobuđenog stanja željene strukture na način koji olakšava pristup području konusnog presjeka te je u mogućnosti potvrditi put reakcije prema konusnom presjeku. U svrhu skeniranja plohe potencijalne energije adamantan fenola **3** i potvrđivanja konusnog presjeka na spomenut način izvršena je optimizacija za osnovno i prvo

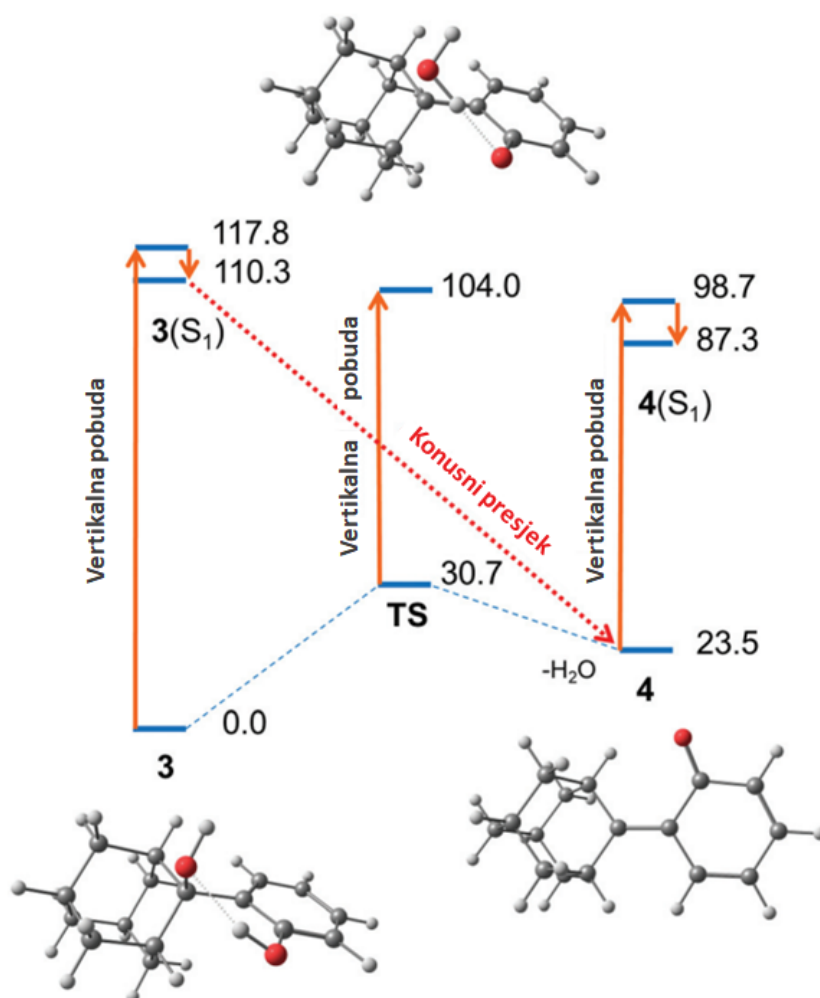


Slika 6.15: Apsorpcijski spektar osnovnog elektronskog stanja (ESA) molekule **4** dobiven TD-DFT računskom metodom.

pobuđeno stanje. Pronađena je razlika u energijama od samo $3.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ što je dovoljno mali iznos za potvrdu konusnog presjeka.

6.4 Diskusija

U svrhu detaljnog rasvjetljavanja mehanizma fotoinduciranog procesa stvaranja QM-a iz prekursora adamantan fenola u ultrabrzoj reakciji fotodehidracije korišteno je nekoliko metoda vremenski razlučive laserske spektroskopije. Spajanjem rezultata različitih metoda dobiveni su podaci o spomenutom procesu na različitim vremenskim skalama, od femtosekundi do sekundi. Kako bi se razjasnio početni dio reakcije korišten je fs-TA postav sa pumpnim pulsevima trajanja sub-20fs te vremenskom rezolucijom od $\approx 50\text{fs}$. Na duljoj vremenskoj skali do 1ns obavljena su fs-TA mjerenja korištenjem postava u kojem se pumpni puls generira kao treći harmonik osnovne valne duljine lasera s rezolucijom od oko 500fs. U ultrabrzim mjerenjima nije opažen potpis međuproducta pobuđenog stanja adamantan fenola $\mathbf{3}(S_1)$, a ni potpis pobuđenog stanja fotoproducta QM-a $\mathbf{4}(S_1)$. Nedostatak potpisa $\mathbf{3}(S_1)$ u tranzijentnim spektrima moguće je opisati vrlo slabom apsorpcijom pobuđenog stanja koja se najvjerojatnije nalazi na kraćim valnim duljinama od onih dostupnih korištenim fs-TA postavima. S druge strane, nedostatak potpisa pobuđenog stanja fotoproducta $\mathbf{4}(S_1)$ objašnjen je rezultatima teorijskih simulacija koji pokazuju kako se fotokemijska reakcija odvija putem konusnog presjeka izbjegavajući pobuđeno



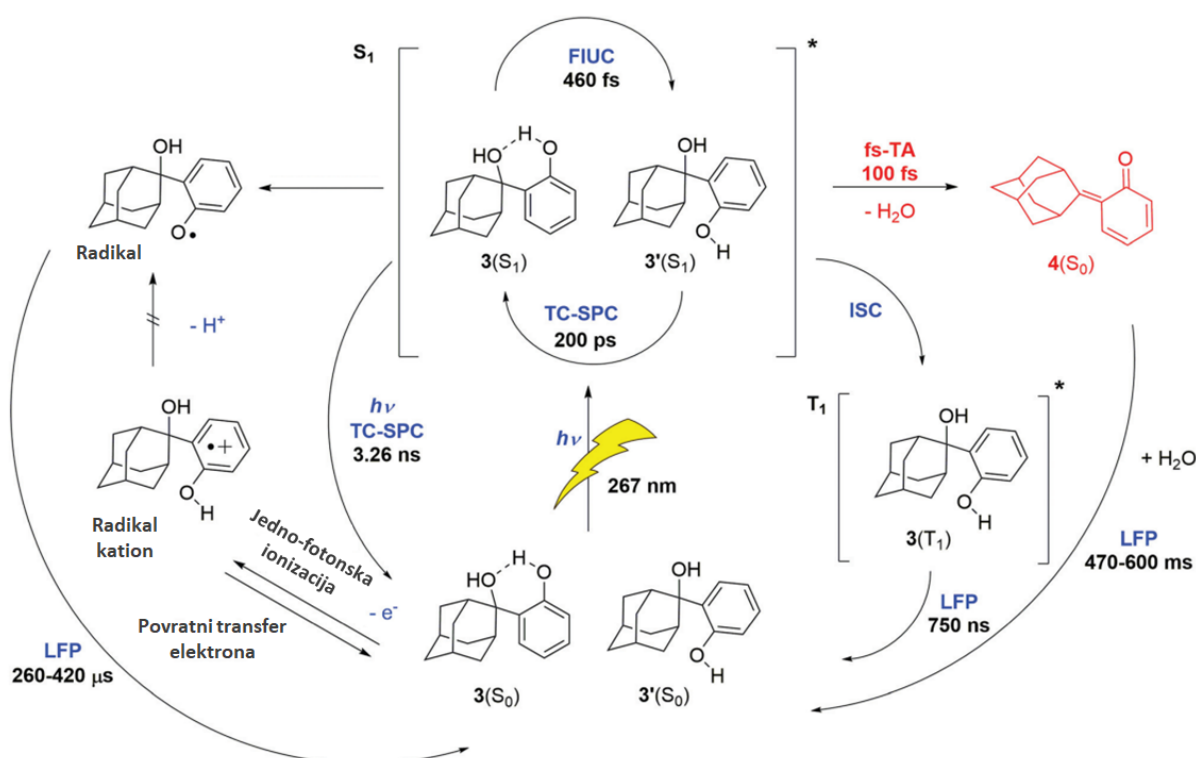
Slika 6.16: Rezultati TD-DFT simulacija. Izračunate su stacionarne točke za osnovno i prvo pobuđeno stanje molekula **3** i **4** na nivou teorije PCM(water)/(TD-)ωB97XD/6-311++G(d,p). Relativne energije su dane u kcal mol⁻¹. Vertikalna pobuda S₀ → S₁ odgovara 243nm za **3** i 380nm za **4**.

stanje fotoproducta QM-a. Spomenuti reakcijski put je u suprotnosti sa prethodno istraženim mehanizmom reakcije fotodehidratacije *o*-hidroksimetilfenola gdje QM nastaje adijabatski u pobuđenom stanju.

Štoviše, prijelaz valnog paketa stvorenog u Franck-Condon točki potencijalne plohe **3**(S₁) prema osnovnom stanju fotoproducta **4**(S₀) opažen je indirektno prilagodbom kinetičkih profila na nekoliko odabranih valnih duljina. Vrijeme rasta signala na odabranim valnim duljinama duže je (≈ 100fs) od vremenske rezolucije postava (≈ 50fs). Vrijeme rasta signala odgovara vremenu prijelaza valnog paketa preko konusnog presjeka do osnovnog stanja fotoproducta QM. U svrhu proučavanja pobuđenog stanja prekursora **3**, nevidljivog u fs-TA mjerenjima, obavljena

su mjerenja femtosekundne vremenski razlučive fluorescencije (FLUC). FLUC mjerenjima otkriven je nereaktivni konformer adamantan fenola **3'** čija se vremenska evolucija razlikuje od vremenske evolucije i dinamike reaktivnog konformera **3** koji je uključen u stvaranje QM-a. Teorijski računi potvrđuju postojanje dva konformera adamantan fenola. Pojavljivanje QM-a nije moguće pratiti FLUC mjerenjima s obzirom da je QM ne-emitivan, ali nedostatak bilo kakve promjene signala tijekom vremena (vezane uz fotokemijsku reakciju) prilikom FLUC mjerenja i TA mjerenja sugeriraju kako je QM stvoren izravno u osnovnom stanju. Dodatno, LFP mjerenjima je praćena apsorpcija osnovnog stanja QM-a od nanosekundi sve do nekoliko stotina milisekundi te je tako dodatno potvrđena interpretacija fs-TA rezultata. Izloženi rezultati te kompletna slika fotokemijske reakcije stvaranja QM-a reakcijom fotodehidratacije adamantan fenola sažeti su na slici 6.17.

Rezultati daju novi pogled na fotokemijsku reaktivnost fenola. Pokazano je kako promjene molekularne strukture bez mijenjanja kromofore ipak mogu promijeniti put fotokemijske reakcije. Spomenuto načelo potrebno je uzeti u obzir prilikom sintetiziranja molekula za određenu reakcijsku shemu. Rezultati su 2022. objavljeni u znanstvenom radu [32].



Slika 6.17: Sažetak rasvijetljenog puta fotokemijske reakcije stvaranja QM-a iz adamantan fenola uz naznačene karakteristične vremenske konstante dobivene pomoću različitih metoda vremenski razlučive laserske spektroskopije potkrijepljene teorijskim simulacijama. Proces rotacijske difuzije (22ps iz FLUC mjerenja) nije prikazan na slici s obzirom da proces nije nužno bitan za fotokemijsku reakciju.

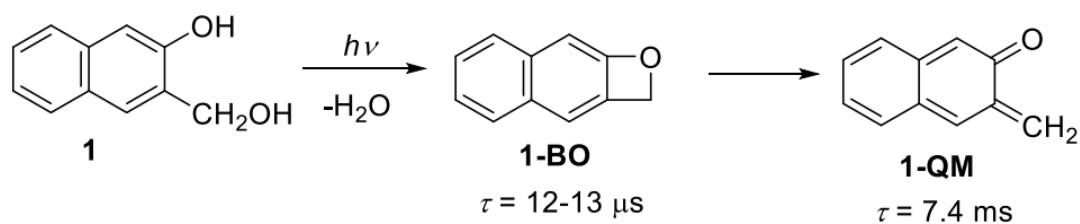
Poglavlje 7

Mehanizmi stvaranja QM-a fotodehidratacijom derivata 2-naftola

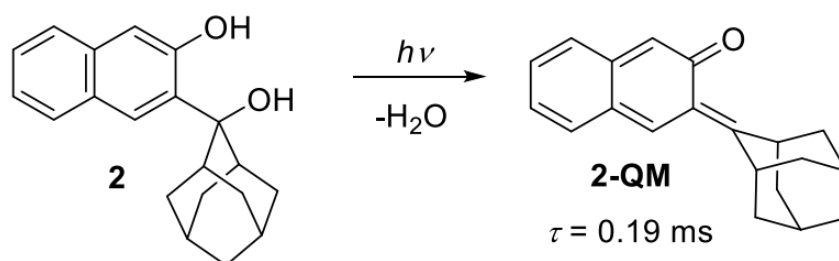
7.1 Derivati 2-naftola

Stvaranje QM-a iz dva derivata naftola: 3-hidroksimetil-2-naftol (**1** na slici 7.1) i 3-(2-hidroksi-2-adamantan)-2-naftol (**2** na slici 7.2) proučavano je fs-TA tehnikom opisanom u prošlom poglavlju. U međuvremenu je postav za ultrabrzu tranzijentnu apsorpciju koji kao pumpnu zraku koristi treći harmonik osnovne valne duljine lasera nadograđen tanjim BBO kristalima ($0.2 \mu\text{m}$) te su tako dobiveni nešto kraći pulsevi, a vremenska rezolucija postava sada iznosi 250fs. I ovdje je za praćenje reakcija na femtosekundnoj skali korišten fs-TA postav vremenske rezolucije $\approx 50\text{fs}$ čija je pumpna zraka izlazna zraka NOPA-e, kao što je već spomenuto. Dinamika fotokemijskih reakcija i ovdje je praćena i na duljim vremenskim skalama korištenjem LFP tehnike.

Motivacija za proučavanje QM-a već je ranije spomenuta, a u slučaju derivata 2-naftola reakcije fotodehidratacije i stvaranja QM-a već su proučavane na duljim vremenskim skalama [112]. U radovima Popika i suradnika je pokazano kako su QM-i stvoreni iz naftola primjenjivi u florescentnom označavanju proteina [99] kao i u litografiji te prilikom modifikacija površina [127], [128], [129], [130]. Također, pokazano je kako se fotodehidratacija 2-naftol derivata **1** odvija preko derivata benzokseta **1-BO** kao međuprodukta koji na mikrosekundnoj vremenskoj skali podliježe reakciji otvaranja prstena što posljedično daje **1-QM** (slika 7.1). S druge strane, dehidratacija adamantanskog derivata 2-naftola se odvija puno brže (slika 7.2) i odgovarajući **2-QM** je stvoren unutar nekoliko nanosekundi [117]. Može se zaključiti da dodavanje adamantanskog dijela na kromoforu derivata 2-naftola mijenja fotofizikalna svojstva i fotokemijsku reaktivnost kao što je to slučaj u radu opisanom u prošlom poglavlju [32].



Slika 7.1: Fotokemijsko stvaranje **1-QM** sa derivatom benzokseta (**1-BO**) kao međuproduktom koji ulazi u reakciju otvaranja prstena.[112]



Slika 7.2: Fotodehidratacija molekule **2** i stvaranje odgovarajućeg **2-QM**. [117]

Već je ranije objašnjeno kako je za primjenu QM-a od nužne važnosti je karakterizacija i identifikacija svih međuprodukata u fotokemijskim reakcijama njihovog stvaranja. S obzirom da su prethodna istraživanja molekula **1** i **2** izvršena na vremenskim skalama koje kreću od nekoliko nanosekundi prema duljim vremenima, rad u kojem su objavljena istraživanja prezentirana u nastavku bavi se fotodehidratacijom **1** i **2** na ultrabrzim skalama pomoću fs-TA metode i dodatnim LFP mjerenjima s nanosekundnom rezolucijom kako bi se otkrili dosad neotkriveni detalji mehanizma ovih važnih fotokemijskih reakcija. Eksperimentalna opažanja potkrijepljena su teorijskim simulacijama (TD-DFT metode). Iako slični, derivati 2-naftola pokazuju bitno različite fotokemijske reakcije stvaranja QM. U radu je objašnjen alternativni mehanizam stvaranja **1-QM** koji uključuje fenoksil radikale kao međuprodukte. Suprotno tome, rezultati pokazuju kako se fotodehidratacija **2** odvija bez dodatnih međuprodukata, a fotoprodukt **2-QM** biva stvoren izravno iz pobuđenog singletnog stanja molekule **2** preko konusnog presjeka.

7.2 Metode

7.2.1 Priprema uzoraka

Sinteza oba derivata 2-naftola prethodno je opisana u radovima [117],[112]. Derivat **1** je otopljen u CH₃CN-H₂O (1:1) pri koncentraciji $c = 1.07 \times 10^{-3}$ M koja odgovara apsorbanciji $A = 3$ na valnoj duljini pobude od 267nm i optičkoj duljini puta od 1 cm. Za drugi set mjerenja, pomoću drugog fs-TA postava sa sub-20fs pumpnim pulsevima koncentracija je povećana na $c = 5.00 \times 10^{-3}$ M kako bi se dobio željeni intenzitet TA signala s obzirom da je energijski tok pumpne zrake bio niži. Derivat **2**, koji je manje topiv u vodi nego **1** je otopljen u CH₃CN-H₂O (3:1) pri koncentraciji od $c = 3.02 \times 10^{-4}$ M što odgovara apsorbanciji od $A = 0.9$ na valnoj duljini od 267nm i optičkoj duljini puta od 1 cm. Mjerenja su izvršena na sobnoj temperaturi (22-25°C).

Za LFP mjerenja **1** i **2** otopljeni su u CH₃CN-H₂O (1:1, u prisutnosti natrij-fosfatnog pufera, 50mM, pH 7.0) pri koncentraciji $c = 9.40 \times 10^{-5}$ M odnosno 7.09×10^{-5} M. Navedene koncentracije odgovaraju apsorbanciji $A = 0.30$ na 266nm. Prije mjerenja otopine su propuhane mlazom argona ili kisika tijekom 20 min. Mjerenja su izvršena na 25C u ne-protočnim kivetama koje su često izmjenjivane kako bi se eliminirao utjecaj fotoprodukata na mjerenje. U svim mjerenjima korišten je acetonitril HPLC čistoće, a korištena voda je ultračista mQ voda (Millipore).

7.2.2 Eksperimentalne metode i parametri

Za eksperimentalna mjerenja koristili su se eksperimentalni postavi opisani u prethodnom poglavlju, stoga će ovdje biti navedeni samo najvažniji eksperimentalni parametri koji su prilagođeni spektroskopskim svojstvima promatranih uzoraka. Prilikom mjerenja ultrabrze dinamike uzorka **1** prvim fs-TA postavom energija pumpnih pulseva podešena je na 260 nJ dok je kod uzorka **2** energija pumpnih pulseva iznosila 200 nJ. Promjer pumpne zrake u fokusu iznosio je 150 μ m što rezultira energijskim tokom od 1.13 mJ cm⁻² za **1** i 1.47 mJ cm⁻² za **2**. Uzorci su smješteni u protočnu kivetu debljine 0.5mm spojenu na protočni sustav opisan u prethodnim poglavljima. Za stvaranje superkontinuumu u probnoj zraci koristio se CaF₂ debljine 3mm, a kao filter za 800nm koristilo se dielektrično zrcalo za 800nm na kvarcnom supstratu i sa ispoliranom zadnjom plohom čime je ostvarena funkcija kratkopropusnog optičkog filtera (Eksma Optics 042-0800-i0). Probna zraka fokusirana je u kivetu sa uzorkom na promjer od 60 μ m. Nakon filtriranja korisni pojas valnih duljina superkontinuumu u probnoj zraci iznosio je 325nm-660nm. Nakon kivete probna zraka usmjerena je prema već opisanom spektrometru kućne izrade. Drugi fs-TA postav identičan je onom već opisanom. Mjerenja na prvom fs-TA postavu izvršena su

pod uvjetima magičnog kuta kako bi se eliminirao doprinos rotacijske difuzije dok su mjerenja na drugom fs-TA postavu izvršena pod paralelnim polarizacijama pumpne i probne zrake.

Za LFP mjerenja se koristio također već opisani LFP uređaj LP980 Edinburgh Instruments. Kao pumpna zraka korišten je četvrti harmonik Nd:YAG lasera Qsmart Q450 Quantel na valnoj duljini 266nm. Energija pumpnih pulseva podešena je na 7 odnosno 15 mJ.

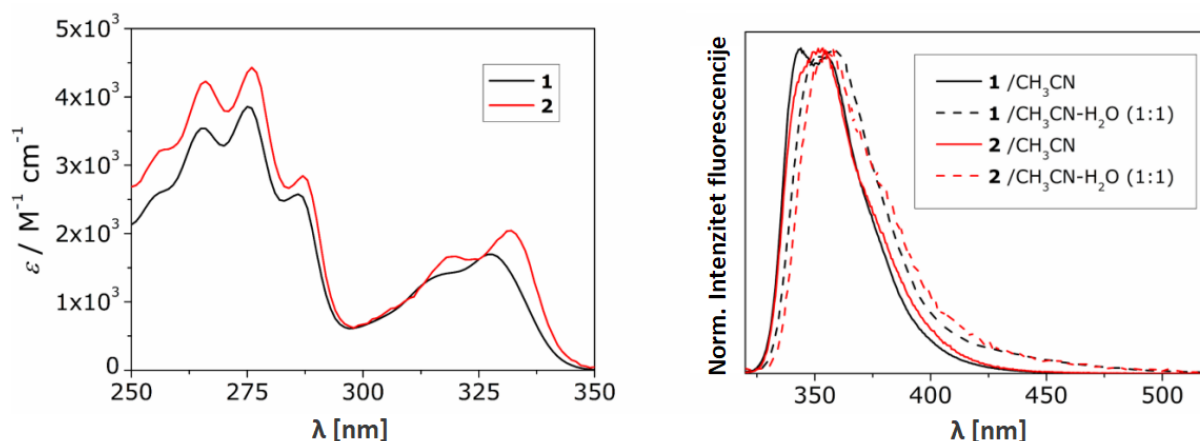
7.2.3 Računske metode

Kao i u prošlom radu, računске simulacije izvršene su programskim paketom GAUSSIAN16[118] koristeći nivo teorije PCM(water)/ ω B97XD/6-311++G(d,p)[119],[120]. Dobiveni energijski minimumi potvrđeni su i frekvencijskim računima. Isti nivo teorije korišten je za optimizaciju i računanje energija vertikalnih prijelaza za 20 energetski najnižih stanja. Točnost korištenih TD-DFT metoda potvrđena je u prethodnim radovima [114], [32], [21]. Optimizacijsko skeniranje za pronalazak konusnog presjeka za stvaranje **1-QM(S₀)** i **2-QM(S₀)** izvršeno je na istom nivou teorije koristeći ORCA 4.2.0.[121],[122].

7.3 Eksperimentalni rezultati

7.3.1 Apsorpcija i fluorescencija uzorka

Oba uzorka posjeduju dva široka, strukturirana apsorpcijska pojasa (slika 7.3 lijevo) na ≈ 275 i 325nm koji odgovaraju pobudama u S_2 odnosno S_1 pobuđena stanja. Pobudom laserskim pulsevima valne duljine 267nm molekule prelaze u S_2 pobuđeno stanje. Emisijski spektar (slika 7.3 desno) je zrcalna slika najnižeg apsorpcijskog pojasa te posjeduje maksimum na $\approx 355\text{nm}$. Suprotno poznatom, dvostrukom emisijskom spektru 2-naftola u vodenom otapalu zbog prijenosa protona u pobuđenom stanju (ESPT, eng. excited state proton transfer) i stvaranju naftolata u S_1 , dodavanje protičnog otapala otopini molekula **1** i **2** ne donosi značajne spektralne promjene te se na $\approx 400\text{nm}$ može opaziti samo koljeno koje je pripisano emisiji naftolata. S obzirom na spomenuto, prijenos protona sa **1** i **2** na molekule otapala je u ovom slučaju zanemariv. Prethodno istražena karakteristična vremena života singletnih pobuđenih stanja su 7ns za **1**[112] i 3.0 odnosno 6.1 ns za **2**[117].



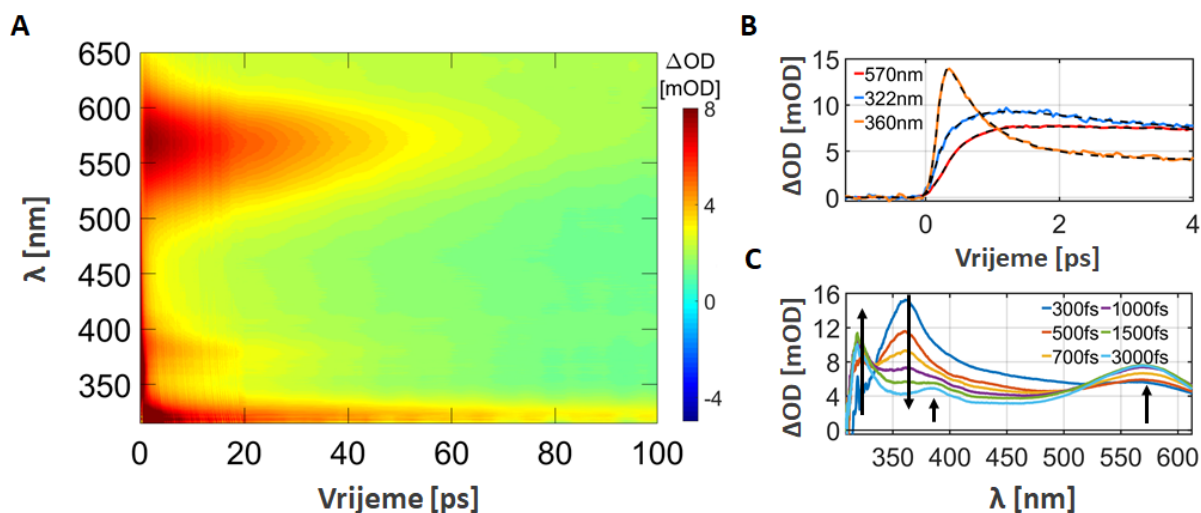
Slika 7.3: Apsorpcijski spektri (lijevo) derivata naftola **1** i **2** u CH₃CN i normalizirani emisijski spektri (desno) u CH₃CN i CH₃CN-H₂O (1:1) uz pobudu na $\lambda = 310\text{nm}$.

7.3.2 Fs-TA rezultati

7.3.2.1 Naftol - 1

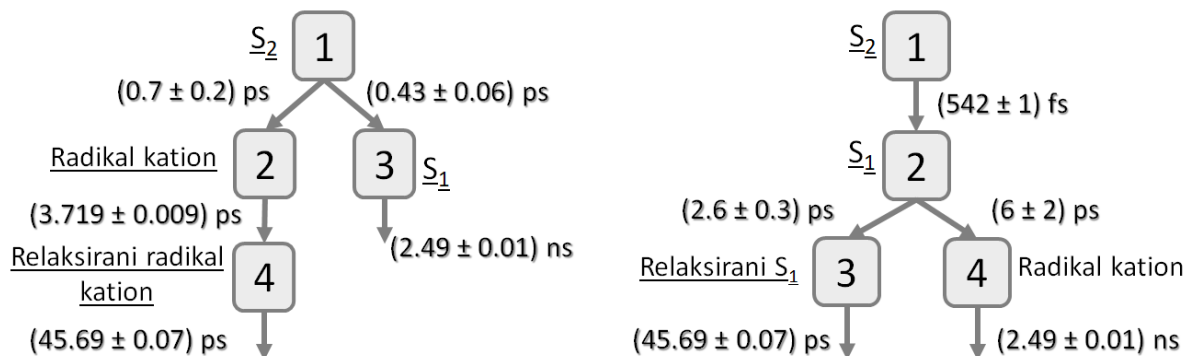
Na slici 7.4 prikazani su 2D TA spektrogram uzorka, vremenska dinamika sa odgovarajućim prilagodbama te spektri u vremenu sa naznačenim smjerom spektralne evolucije. Na svim valnim duljinama probne zrake opaža se pozitivan signal koji odgovara apsorpciji pobuđenog stanja ili apsorpciji međuprodukta/fotoprodukta. Prilagodba je izvršena na način opisan u poglavlju 2.1 - *Analiza signala pojedinih valnih duljina* gdje je koherentni artefakt modeliran gausijanskom funkcijom te njenim derivacijama dok je dinamika uzorka modelirana konvolucijom IRF-a i eksponencijalnih funkcija. Na slici je prikazana vremenska dinamika nakon oduzimanja doprinosa koherentnih artefakata. Uz analizu pojedinih valnih duljina izvršena je i globalna analiza. S obzirom da se fluorescencija uzorka **1** proteže od 330nm do 500nm sa kvantnim prinosom fluorescencije od $\Phi_F = 0.23$ [112], u mjerenjima se očekivalo opažanje potpisa stimulirane emisije (negativni signal). Nedostatak iste moguće je objasniti preklapom slabijeg signala SE sa snažnijim, pozitivnim signalom apsorpcije.

Prije globalne analize mjerenja su analizirana analizom pojedinih valnih duljina iz čega su izvučeni ključni podaci za kreiranje modela globalne i target analize, kao npr. potreban broj eksponencijalnih funkcija za zadovoljavajuću kvalitetu prilagodbe na određenoj valnoj duljini i sl. Testirano je nekoliko modela od kojih su dva davala najbolju kvalitetu prilagodbe (slika 7.5). Važno je napomenuti kako bi i sekvencijalni model koji odgovara reakciji $S_2 \rightarrow S_1 \rightarrow \text{RK} \rightarrow \text{FR} \rightarrow \text{QM}$ (gdje su RK - radikal kation, FR - fenoksil radikal) davao jednako kvalitetnu pril-



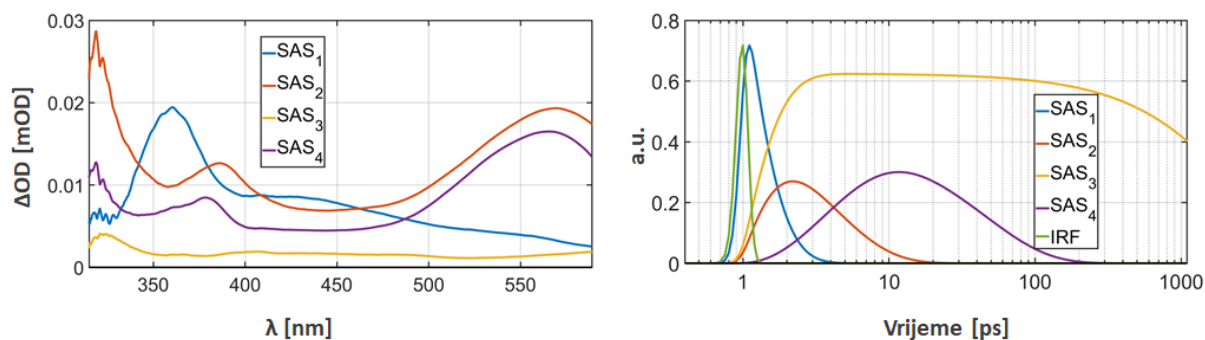
Slika 7.4: A) 2D TA spektrogram uzorka **1**, B) odgovarajuća vremenska dinamika zajedno s rezultatima prilagodbe (isprekidane linije) na 3 odabrane valne duljine sa oduzetim koherentnim artefaktom. C) TA spektri prikazani za odabrana vremena. Strelice ukazuju na smjer spektralne evolucije u vremenu.

godbu no odbačen je zbog neslaganja sa mjerenim vremenima života fluorescencije (model daje vrijeme života od 45ps za S_1 stanje što je, usporedbom s prethodnim istraživanjima, prekratko).

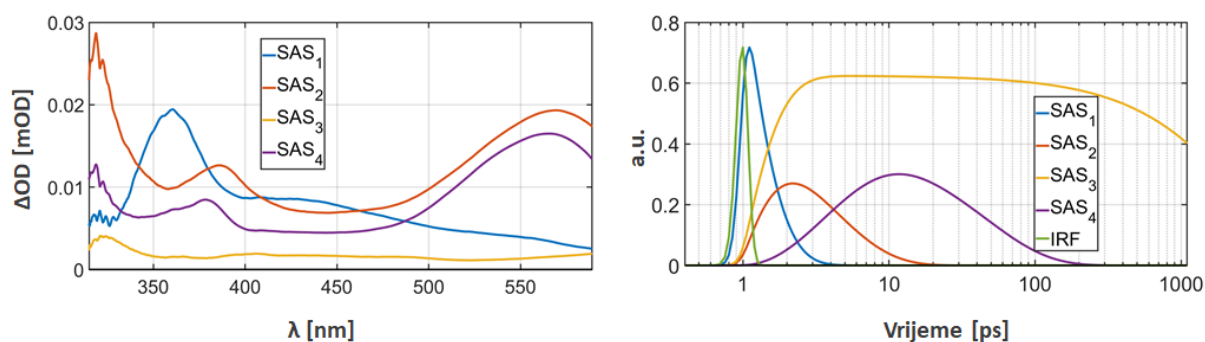


Slika 7.5: Dva modela korištena prilikom globalne i target analize rezultata fs-TA mjerenja uzorka **1** koji su davali najbolju kvalitetu prilagodbe.

Model 1 (slika 7.6) kao početno stanje ima $1(S_2)$ iz kojeg paralelno nastaju radikal kation (720fs) i kroz internu konverziju (IC) stanje $1(S_1)$ (430fs). Signal na 322nm raste sporije od vremenske rezolucije eksperimenta i trne na nanosekundnoj vremenskoj skali te je stoga pripisan ESA-i iz stanja $1(S_1)$. Nadalje, signal na 570nm pripisan je radikal kationu molekule **1**



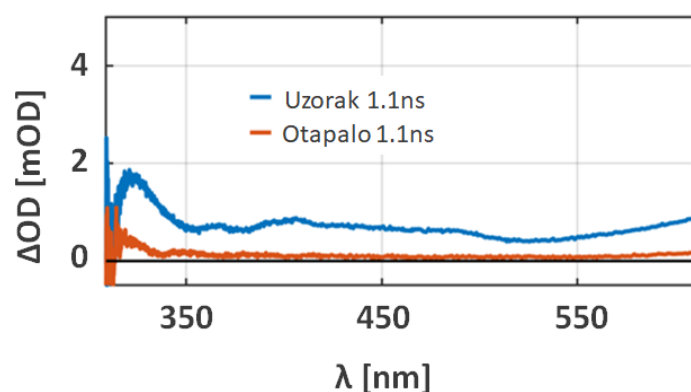
Slika 7.6: Rezultati target analize za naftol **1** dobiveni korištenjem modela 1 sa četiri kinetičke konstante. Na slici su prikazani SAS spektri (lijevo) i vremenski profili kojima je opisana evolucija odgovarajućih SAS-ova prikazana na logaritamskoj skali.



Slika 7.7: Rezultati target analize za naftol **1** dobiveni korištenjem modela 2 sa četiri kinetičke konstante. Na slici su prikazani SAS spektri (lijevo) i vremenski profili kojima je opisana evolucija odgovarajućih SAS-ova prikazana na logaritamskoj skali.

formiran fotoionizacijom. Detekcija radikal kationa utemeljena je na prethodno objavljenom spektru radikal kationa 2-naftola sa vremenom života od $1.5\mu\text{s}$ formiranom pulsnom radiolizom u butil-kloridu [131]. Na 380nm opaža se apsorpcijski pojas tek nakon nekoliko ps i isti posjeduje pomak prema plavim valnim duljinama te je, bazirano na spomenutom istraživanju, tom signalu također pripisan radikal kation. Radikal kation podliježe vibracijskoj relaksaciji sa eksponencijalnom konstantom od 3.7 ps nakon čega trne sa eksponencijalnom konstantom od 45ps. Deprotonacija radikal kationa inače se odvija na duljim vremenskim skalama od otprilike 0.1 - 1 ns [132], no nažalost takva vremenska konstanta se nije mogla dobiti globalnom analizom naftola **1** te je opaženo vrijeme trnjenja radikal kationa bilo brže. Dobivena kraća vremenska konstanta može se objasniti redukcijom radikal kationa sa otopljenim elektronima što rezultira povratnim prijenosom elektrona i stvaranjem početne molekule **1** u osnovnom S_0 stanju. S druge strane, populacija u $1(S_1)$ stanju trne puno sporije, sa eksponencijalnom vre-

menskom konstantom od 2.5ns. Spomenuta vremenska konstanta je 3 puta kraća od izmjenenog vremena života fluorescencije, a odstupanje se može objasniti već spomenutom nemogućnošću točnog određivanja duljih vremenskih konstanti zbog maksimalne duljine vremenskog prozora fs-TA postava od 1ns. SAS spektar stanja $\mathbf{1}(S_2)$ označen je kao SAS₁ na slici 7.6 i sastoji se od apsorpcijskog pojasa sa maksimumom na 360nm koji nastaje unutar vremenske rezolucije eksperimentalnog postava. Vibracijska relaksacija radikal kationa očituje se u plavom pomaku spektra SAS₂ (vibracijski vrući radikal kation) naspram spektra SAS₄ (vibracijski relaksirani radikal kation). Stanje $\mathbf{1}(S_1)$ je označeno kao SAS₃ te posjeduje apsorpcijski maksimum centriran oko otprilike 320nm i vidljiv potpis otopljenih elektrona na valnim duljinama duljim od 500nm (slično kao kod adamantan fenola). S obzirom na vrlo sporu dinamiku stanja $\mathbf{1}S_1$ i otopljenih elektrona, u analizi nije bilo moguće razdvojiti doprinose ta dva stanja u posebne SAS spektre. Također, bitno je napomenuti kako niti jedan od vidljivih apsorpcijskih maksimuma ne odgovara triplet-triplet apsorpciji molekule $\mathbf{1}$ s obzirom da je ista kod 2-naftola centrirana oko 430nm [133] gdje prikazana mjerenja ne pokazuju izražene spektralne značajke. U prilog izrečenoj tvrdnji o stvaranju radikal kationa ide i povećana koncentracija otopljenih elektrona u slučaju uzorka u odnosu na mjerenja čistog otapala (slika 5,28). Naime, na slici je prikazana usporedba TA spektara otapala i uzorka izmjerenih u identičnim uvjetima u vremenskom trenutku 1.1ns nakon pobude(zadnja moguća vremenska točka postava). Na valnim duljinama većim od 500nm jasno je vidljiva povećana apsorpcija u slučaju uzorka što je također znak stvaranja radikal kationa. Naime, kao što je spomenuto, elektroni u vodenom otapalu tvore sustav koji apsorbira na valnim duljinama duljim od 500nm.



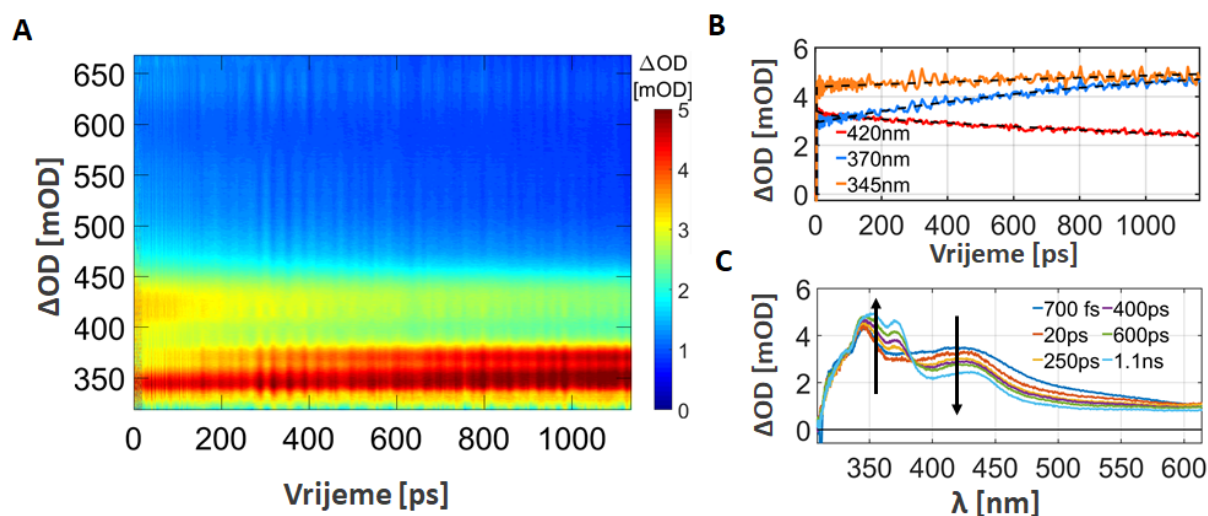
Slika 7.8: Usporedba TA spektara uzorka $\mathbf{1}$ (plavo) i otapala (narančasto) u zadnjoj dostupnoj vremenskoj točki (1.1ns). Povećana apsorpcija uzorka na duljim valnim duljinama (>500nm) ukazuje na povećanu koncentraciju otopljenih elektrona u otopini uzorka što ukazuje na stvaranje radikal kationa.

Model 2 (slika 7.7) opisuje ultrabrzu internu konverziju stanja $\mathbf{1}(S_2)$ u vibracijski pobuđeno stanje $\mathbf{1}(S_1)$ (542fs) koje se zatim paralelno vibracijski relaksira i stvara radikal kation sa vremenskim konstantama od 2.63ps odnosno 6.35ps. Relaksirano $\mathbf{1}(S_1)$ stanje zatim trne sa eksponencijalnom konstantom od 45.7ps dok je vrijeme trnjenja radikal kationa znatno sporije te iznosi 2.49ns. Slično kao i kod modela 1, vibracijska relaksacija očituje se pomakom spektra SAS₃ u odnosu na SAS₂ prema kraćim valnim duljinama. Suprotno modelu 1, SAS₄ koji odgovara radikal kationu sastoji se od apsorpcijskog maksimuma centriranog oko 320nm i pozitivnog apsorpcijskog pojasa na valnim duljinama duljim od 500nm. Međutim, dobiveno vrijeme života stanja $\mathbf{1}(S_1)$ od 45.7ps ne slaže se sa prethodno dobivenim puno duljim vremenom života fluorescencije tog stanja (7ns) [112]. Stoga možemo zaključiti kako je model 1 fizikalno realniji prikaz fotokemije naftola **1** i odbaciti model 2.

7.3.2.2 Adamantan-naftol - 2

Na prvi pogled, s obzirom da je jedina razlika u strukturi molekula **1** i **2** adamantanski dio kod adamantan-naftola **2** očekivali bi se slični TA spektri odnosno slična fotoreaktivnost molekula. Iznenadujuće, rezultati mjerenja se uvelike razlikuju. Rezultati fs-TA mjerenja uzorka **2** prikazani su na slici 7.9. Nakon pobude, u početnim trenucima u mjerenjima su vidljiva dva apsorpcijska maksimuma, na 345nm i 420nm koji se s vremenom sužavaju i pomiču prema plavim valnim duljinama te u konačnici nakon 20ps poprimaju oblik spektra prikazanog crvenom linijom na slici 7.9C. Nakon nekoliko stotina ps opaža se rast spektra koji posjeduje apsorpcijski maksimum na 350nm i 370nm sa jasno izraženom izosbestičnom točkom na 385nm. Izosbestična točka je definirana kao točka konstantnog iznosa signala ΔOD prilikom spektralne evolucije. Također, izosbestična točka ukazuje na vezanost dva stanja prisutna u mjerenju. Npr. u fotokemijskim mjerenjima ukoliko jedan dio apsorpcijskog pojasa trne u vremenu dok drugi dio raste, a između njih se nalazi izosbestična točka, ona ukazuje na to da se stanje koje raste nastaje iz stanja koje trne. Apsorpcijski maksimumi na 350nm i 370nm rastu unutar cijelog dostupnog vremenskog raspona eksperimenta (1.1ns). Uz spomenute maksimume, na 432nm se može primjetiti pojava novog apsorpcijskog pojasa koji se jasno razlikuje od onog na 420nm koji se pojavljuje odmah nakon pobude. Što se fluorescencije uzorka **2** tiče, ona se također proteže od 330nm do 500nm (slika 7.3) sa kvantnim prinosom $\Phi_F = 0.18$ u CH₃CN-H₂O (1:4)[117]. Kao i u slučaju naftola **1**, nedostatak opažene SE u mjerenjima moguće je objasniti preklapom iste sa puno jačim pozitivnim apsorpcijskim pojasom.

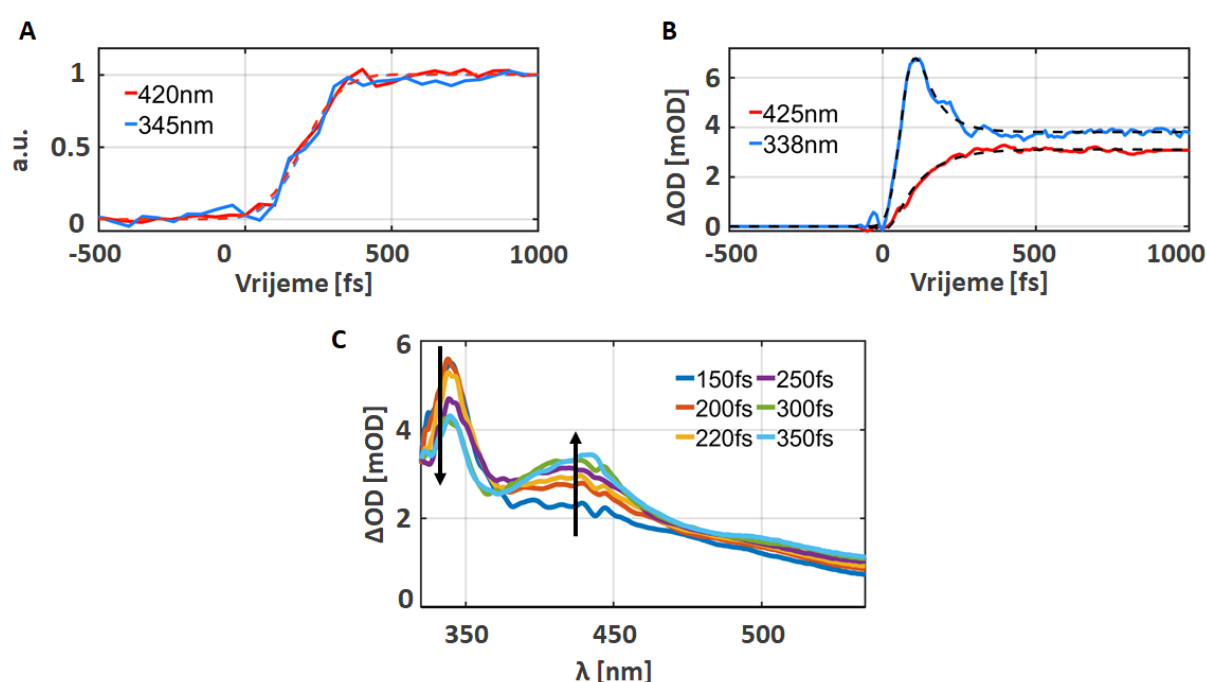
Na slici 7.10A prikazana je rana dinamika apsorpcijskih maksimuma koji se pojavljuju u početnim trenucima nakon pobude (420nm i 345nm) nakon oduzimanja doprinosa koherentnih



Slika 7.9: fs-TA mjerenja uzorka **2** otopljenog u $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (3:1). A) spektrogram mjerenja. B) Kinetički profili na 3 karakteristične valne duljine sa rezultatima prilagodbe (isprekidane linije) i C) TA spektri za razne vremenske trenutke. Smjer spektralne evolucije označen je strelicama.

artefakata. Sa isprekidanim linijama označeni su rezultati prilagodbe. Za dobivanje prilagodbe željene kvalitete nije bilo potrebno dodavati članove koji opisuju rast funkcije te se može zaključiti kako signali rastu vremenom jednakim vremenskoj rezoluciji fs-TA postava ili kraćim. FWHM IRF-a dobiven prilagodbom iznosio je 248fs na 420nm i 246fs na 345nm što je u dobrom slaganju sa vremenskom rezolucijom dobivenom mjerenjima u čistom otapalu. Kao i u slučaju naftola **1** pumpnim pulsom molekule bivaju pobuđene u S_2 stanje te je za očekivati ultrabrzi pad TA signala na valnim duljinama koje odgovaraju internoj konverziji iz S_2 stanja u S_1 stanje. No, kako su mjerenjima prvim fs-TA postavom dobiveni signali čiji je rast u vremenu jednak vremenskoj rezoluciji postava, a ultrabrzi pad signala nije opažen, zaključeno je kako je prvim fs-TA postavom nemoguće razlučiti i opaziti spomenutu internu konverziju. Iz tog razloga su provedena dodatna mjerenja na postavu veće vremenske rezolucije te je napravljena usporedba rane dinamike koja odgovara ESA-i iz S_2 stanja naftola **2**, a rezultati su prikazani na slici slici 7.10B (vremenska dinamika) i slici 7.10C (vremenska evolucija spektara). Fs-TA mjerenja bolje vremenske rezolucije pokazuju ultrabrzi pad signala na 338nm te komplementaran, sporiji porast signala na 425nm. Takva dinamika jasno ukazuje na internu konverziju iz S_2 stanja u S_1 stanje. Također, lako je zaključiti kako ESA iz stanja **2**(S_2) doprinosi više na kraćim valnim duljinama (338nm) te je stoga na toj valnoj duljini opažen izraženiji ultrabrzi pad signala. Prilagodbom na prikazane rezultate dobivaju se eksponencijalne konstante od 56fs za ultrabrzi pad signala na 338nm i 96fs za vrijeme rasta signala na 420nm. Na 338nm nije bilo potrebno dodavati član za kompenzaciju vremena rasta signala što ukazuje na to kako se

signal pojavljuje unutar IRF-a (<50fs). S obzirom na to kako oba fs-TA postava koriste spektrometre kućne izrade, postoji djelomično neslaganje u kalibraciji valnih duljina, pogotovo na kraćim valnim duljinama zbog izraženije disperzije valnih duljina prizmenog spektrometra što kao posljedicu daje neslaganje valnih duljina apsorpcijskih maksimuma (345nm u prvom fs-TA postavu naspram 338nm na drugom fs-TA postavu). Nakon što je korištenjem postava veće vremenske rezolucije razlučena početna interna konverzija iz S_2 u S_1 , zaključeno je kako se početnim apsorpcijskim maksimumima vidljivima u mjerenjima prvim fs-TA postavom (345nm i 420nm) može pripisati ESA stanja $2(S_1)$.

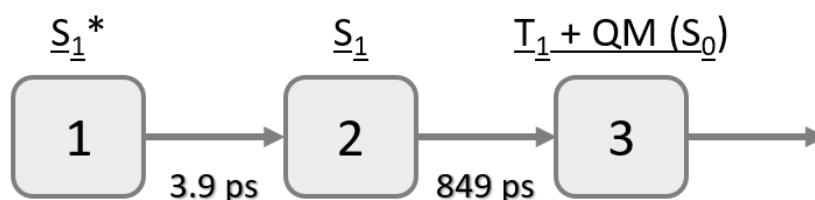


Slika 7.10: Kinetički profili sa rezultatima prilagodbe (isprekidane linije) na karakterističnim valnim duljinama za uzorak **2**. A) Normalizirani kinetički profili dobiveni prvim fs-TA postavom vremenske rezolucije 250fs. B) Dinamika na karakterističnim valnim duljinama i C) početni TA spektri mjereni drugim fs-TA postavom vremenske rezolucije <50fs. Smjer spektralne evolucije označen je strelicama. Na A) i B) prethodno su oduzeti koherentni artefakti.

Nakon interne konverzije u S_1 stanje dolazi do trnjenja apsorpcijskog maksimuma na 420nm i rasta signala na 370nm. Temeljeno na prethodnim istraživanjima [117] te LFP mjerenjima (*vide infra*) signalu na 370nm pripisano je stanje **2-QM**(S_0). No, nasuprot očekivanom, vrijeme rasta signala na 370nm se ne slaže sa eksponencijalnom konstantom dobivenom za trnjenje signala na 420nm, a spomenute bi trebale biti otprilike jednake ukoliko dolazi do transfera populacije iz jednog stanja u drugo. Eksponencijalna konstanta na 420nm iznosi 3.9ns dok je

konstanta dobivena na 370nm puno kraća te iznosi 1.4ns. Bitno je još jednom napomenuti kako konstante koje su iznosa usporedivog sa dostupnim vremenskim prozorom eksperimenta (1.1ns) nisu precizno određene. Stoga možemo zaključiti kako je neslaganje navedenih eksponencijalnih konstanti najvjerojatnije prenatglušeno. Također, dodatno objašnjenje neslaganju eksponencijalnih konstanti dolazi od preklapanja maksimuma na 425nm sa apsorpcijskim maksimumom centriranim oko $\approx 432\text{nm}$ čije se pojavljivanje tek nagovještuje fs-TA mjerenjima, a vidljivo je u rezultatima globalne analize. Dodatno, opaženi spori rast na 345nm gdje se očekuje pad ESA signal stanja $2(S_1)$ može se objasniti preklapanjem sa puno jačim apsorpcijskim pojasom koji odgovara apsorpciji QM-a na 350nm.

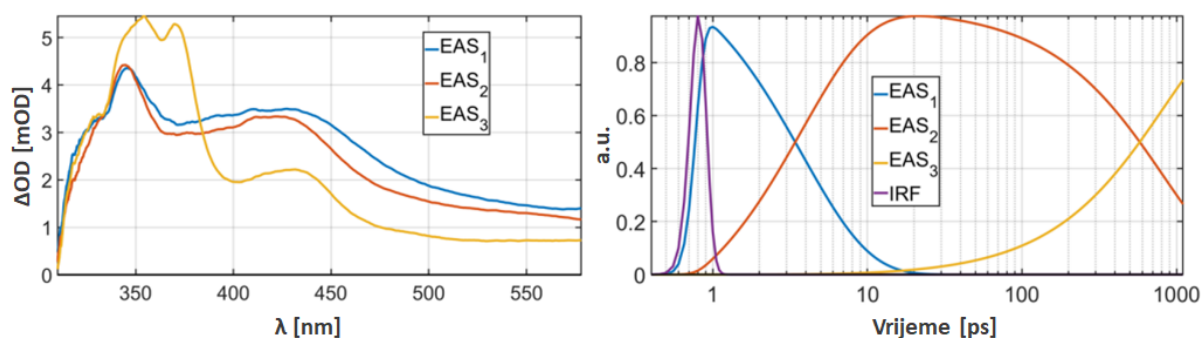
Još ostaje razrješiti pitanje opaženog apsorpcijskog vrha na 432nm koji se počinje pojavljivati u fs-TA mjerenjima. Jedna od mogućnosti je da spomenuti apsorpcijski maksimum dolazi od ESA-e tripletnog stanja molekule **2** te je u početnim trenucima prekriven jačim signalom ESA-e iz $2(S_1)$ stanja. Tripletno pobuđeno stanje molekule **2** prethodno je opaženo u acetonitrilu propuhanom N_2 te CH_3CN-H_2O mješavini na valnim duljinama 430-450nm. Vrijeme života tripletnog stanja molekule **2** mjeri se u mikrosekundama te se prigušuje pročišćivanjem sa O_2 [117]. Ovo objašnjenje u skladu je sa prethodnim istraživanjima tripletnog pobuđenog stanja molekule 2-naftola gdje je apsorpcija istog opažena na valnim duljinama oko 430nm [133], [134], [135].



Slika 7.11: Skvencijalni model korišten prilikom globalne analize fs-TA mjerenja uzorka **2**.

U svrhu globalne analize testirani su razni modeli, no, za razliku od naftola **1** jednostavan skvencijalni model sa 3 kinetička parametra pokazao se najkvalitetnijim za globalnu prilagodbu (7.11). Rezultati globalne analize mjerenja prikazanih na slici 7.9, spektri evolucije - EAS te pripadni kinetički profili prikazani su na slici (7.12). Prvi EAS posjeduje dva apsorpcijska maksimuma (345nm i 420nm) koji su prethodno pripisani ESA-i iz stanja $2(S_1)$. Prvi EAS evoluira u drugi EAS koji je u odnosu na prvi spektralno sužen i pomaknut prema kraćim valnim duljinama, a dobivena eksponencijalna konstanta iznosi 3.9ps. Pomak spektra prema kraćim valnim duljinama moguće je objasniti procesom otapanja i reorijentacije molekula otapala oko polarne molekule uzorka. Također, doprinos pomaku spektra prema plavom dolazi i od

vibracijske relaksacije vrućeg S_1 stanja molekule **2** nakon interne konverzije S_2 u S_1 razlučene drugim fs-TA postavom. S druge strane, sužavanje spektra pojavljuje se samo zbog vibracijskog hlađenja molekule. Oba efekta javljaju se na podjednakim vremenskim skalama te ih je nemoguće razdvojiti jednog od drugog te stoga globalna analiza kao rezultat daje jednu eksponencijalnu konstantu umjesto dvije. Nakon vibracijskog hlađenja i otapanja EAS_2 evoluira u EAS_3 sa eksponencijalnom konstantom od 848ps. Apsorpcijski maksimumi posljednjeg EAS-a centrirani oko kraćih valnih duljina (370nm i 350nm) pripisani su apsorpciji **2-QM** (S_0) dok je apsorpcijski maksimum na 435nm pripisan apsorpciji tripletnog stanja prekursora **2**. Iako globalna analiza kao rezultat daje potpise tripletnog stanja prekursora i **2-QM**(S_0) na istom EAS-u, njihova dinamika zapravo nije jednaka no to nije moguće razlučiti fs-TA postavom u kojem je širina vremenskog prozora ograničena na 1.1ns. Stoga se umjesto dva EAS-a od kojih jedan odgovara apsorpciji tripletnog pobuđenog stanja prekursora, a drugi apsorpciji fotoprodukta **2-QM**(S_0) dobiva jedan EAS- koji sadrži potpise oba stanja. Treća vremenska konstanta koju ćemo ovdje samo spomenuti, a određena je iz LFP mjerenja iznosi 0.19ms te je pripisana vremenu života **2-QM**(S_0) [117].



Slika 7.12: Evolucijski spektri (EAS) sekvencijalnog modela globalne analize sa 3 kinetičke konstante (lijevo) i pripadni kinetički profili na logaritamskoj skali (desno).

Zaključno može se reći kako je prvotnim apsorpcijskim pojasevima vidljivima u fs-TA mjerenjima (350nm i 420nm) pripisana ESA iz **2**(S_1) stanja do koje je došlo internom konverzijom na ultrabrznoj skali (≈ 50 fs) iz S_2 stanja. U prilog spomenutim činjenicama ide i spora dinamika spomenutih apsorpcijskih pojaseva na nanosekundnoj vremenskoj skali. Nadalje, apsorpcijski maksimumi koji se pojavljuju nakon nekoliko stotina pikosekundi (350nm i 370nm) odgovaraju apsorpciji **2-QM**(S_0) stanja stvorenog izravno iz **2**(S_1) preko konusnog presjeka. Pripisivanje **2-QM**(S_0) stanja spomenutim apsorpcijskim maksimumima podupiru teorijske simulacije (poglavlje 7.4.1). Uz apsorpciju **2-QM**(S_0) stanja na kasnijim vremenskim skalama se pojavljuje i apsorpcijski maksimum na 432nm koji odgovara triplet-triplet apsorpciji **2**(T_1) stanja u više

tripletno stanje. $2(T_1)$ stanje je stvoreno prijelazom iz singletnog $2(S_1)$ stanja u tripletno $2(T_1)$ stanje.

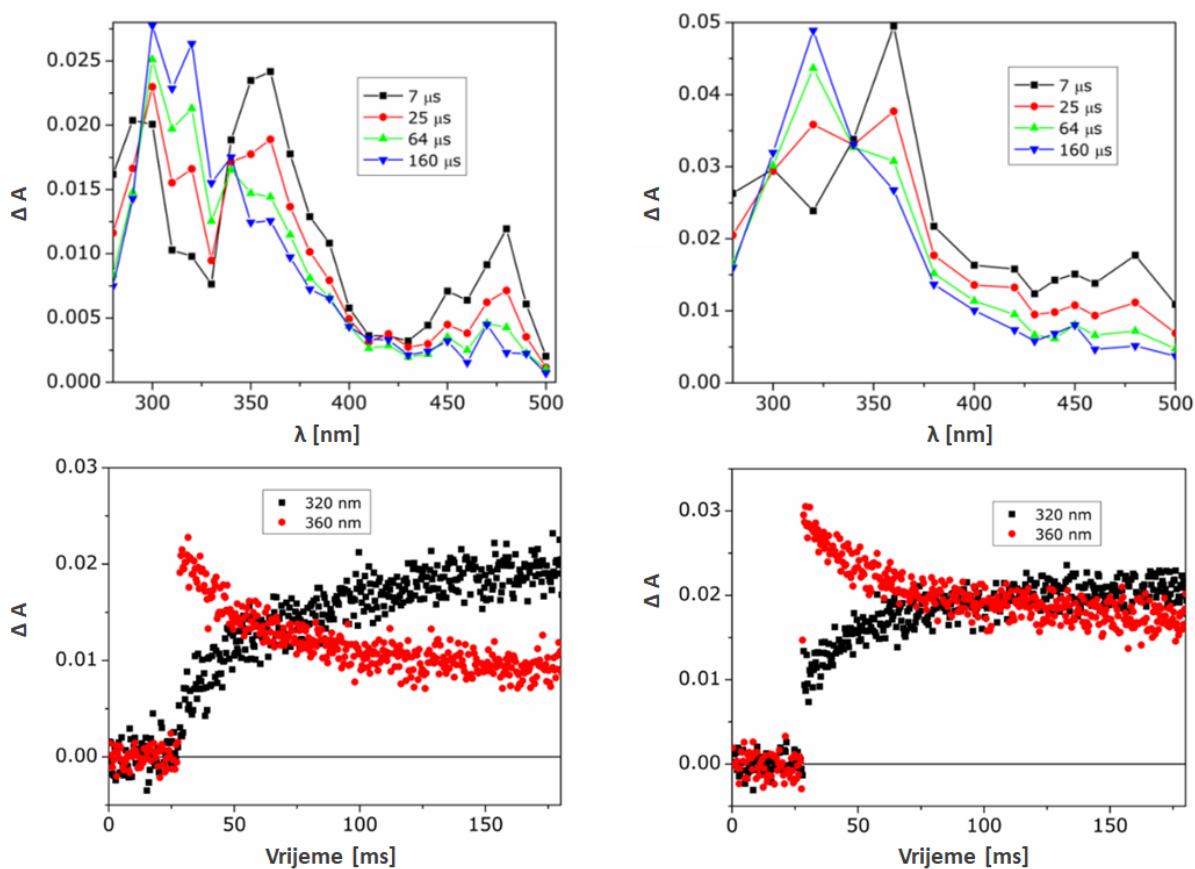
7.3.3 LFP rezultati

7.3.3.1 Naftol - 1

Rezultati mjerenja fotokemije uzorka **1** u čistom acetonitrilu te mješavini CH_3CN-H_2O (1:1) LFP metodom (slika 7.13) prirodno se nastavljaju na rezultate mjerenja fs-TA metodom. Analizom signala na karakterističnim valnim duljinama pokazuje se kako signal na 360nm trne eksponencijalnom konstantom $40 \pm 5 \mu s$ (za oba otapala) dok sa istom eksponencijalnom konstantom dolazi do rasta signala na 320nm kojemu je u prethodnim istraživanjima pripisano stanje **1-QM**(S_0)[112]. Odgovarajući kinetički profili prikazani su u donjem redu slike 7.13.

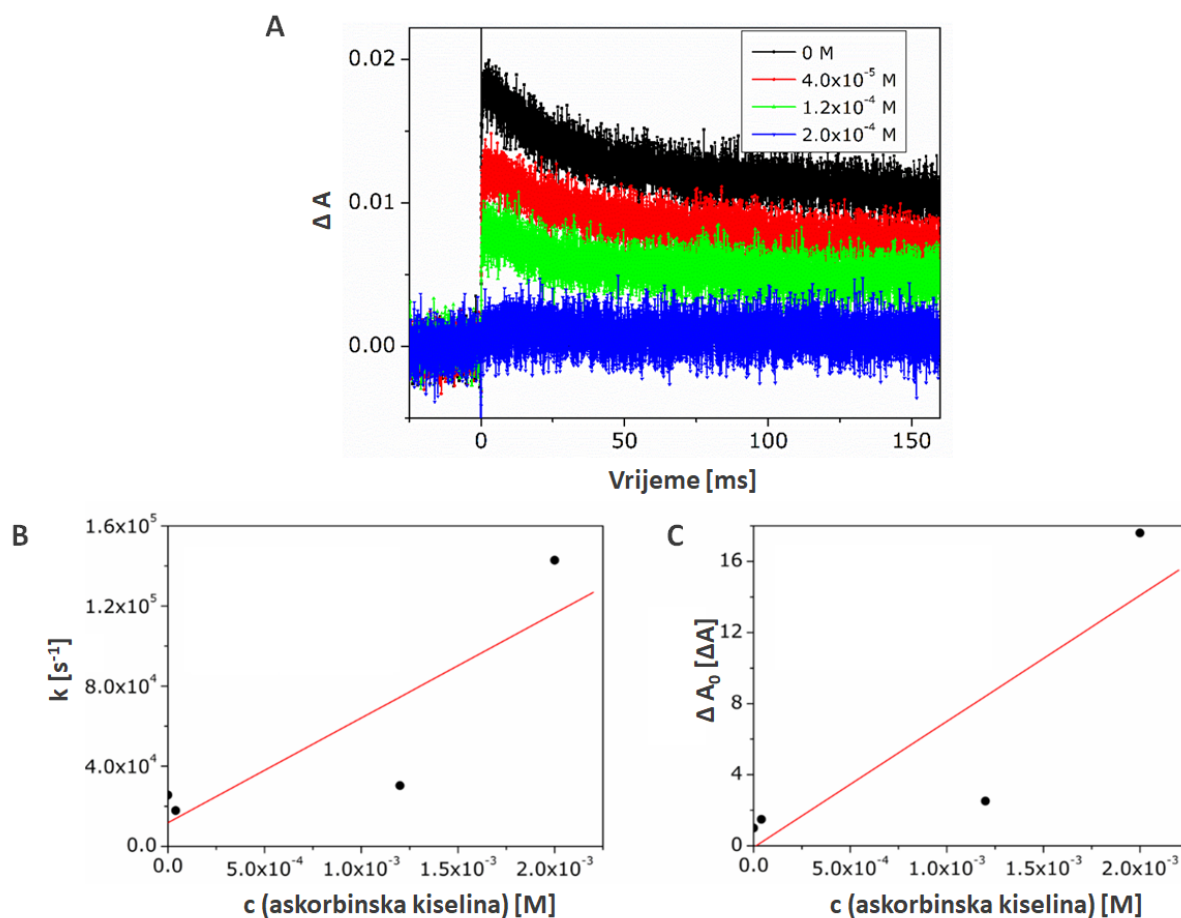
S obzirom da je u fs-TA eksperimentu opažen potpis radikal kationa, stanju koje odgovara signalu na 360nm moguće je dati alternativan opis u odnosu na [112] gdje je signalu pripisan doprinos benzokseta. Naime, spomenutom signalu, prekursoru QM-a moguće je pripisati fenoksil radikal. Poznato je kako se radikal kationi fenola u otapalu koje sadrži vodu deprotoniraju do fenoksil radikala [125] sa vremenskom eksponencijalnom konstantom $\approx 0.5-5 \times 10^8 s^{-1}$ [132]. Navedena konstanta odgovara trajanju nanosekundnog pulsa korištenog prilikom LFP mjerenjima što posljedično znači kako je reakciju deprotonacije nemoguće razlučiti LFP mjerenjima. Također, reakciju deprotonacije je nemoguće razlučiti fs-TA mjerenjima s obzirom da je maksimalna širina vremenskog prozora fs-TA eksperimenta tek nešto dulja od 1ns. Međutim, globalnom analizom fs-TA mjerenja uzorka **1** dobiveno je puno kraće vrijeme života radikal kationa (<50ps) što navodi na zaključak kako je radikal kation reduciran otopljenim elektronima što rezultira stvaranjem početne molekule **1**. No usprkos tome, fenoksil radikali mogu biti stvoreni na nanosekundnoj vremenskoj skali preko reakcije transfera vodika [126]. Kako bi se potvrdilo pripisivanje apsorpcije fenoksil radikala signalu na 360nm izvršena su mjerenja prigušivanja signala koji odgovara prekursoru QM-a dodavanjem askorbinske kiseline u otopinu. Naime, poznato je kako askorbinska kiselina guši otopljene fenoksil radikale [136].

Rezultati su prikazani na slici 7.14. Jasno je vidljivo kako dodavanje sve veće koncentracije askorbinske kiseline ne samo da skraćuje vrijeme života signala na 350nm nego i smanjuje njegov intenzitet što znači kako askorbinska kiselina uz prigušivanje signala na 350nm prigušuje i njegov prekursor. Uz spomenuto izvršeni su i eksperimenti prigušivanja fluorescencije dodavanjem askorbinske kiseline, a rezultati su prikazani na slici 7.15. Vidljivo je kako dodava-



Slika 7.13: LFP mjerenja uzorka **1** otopljenog u CH_3CN nakon propuhivanja mlazom O_2 (lijeva strana) i u mješavini $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (1:1) (desna strana). Gornji red prikazuje spektralnu evoluciju dok donji red prikazuje kinetičke profile na valnim duljinama 320nm i 360nm. Jasno je vidljivo kako trnjenje signala na 360nm odgovara rastu signala na 320nm koji je pripisan QM-u. Kako do stvaranja QM-a dolazi tek na mikrosekundnoj skali, nemoguće ga je opaziti u fs-TA eksperimentima.

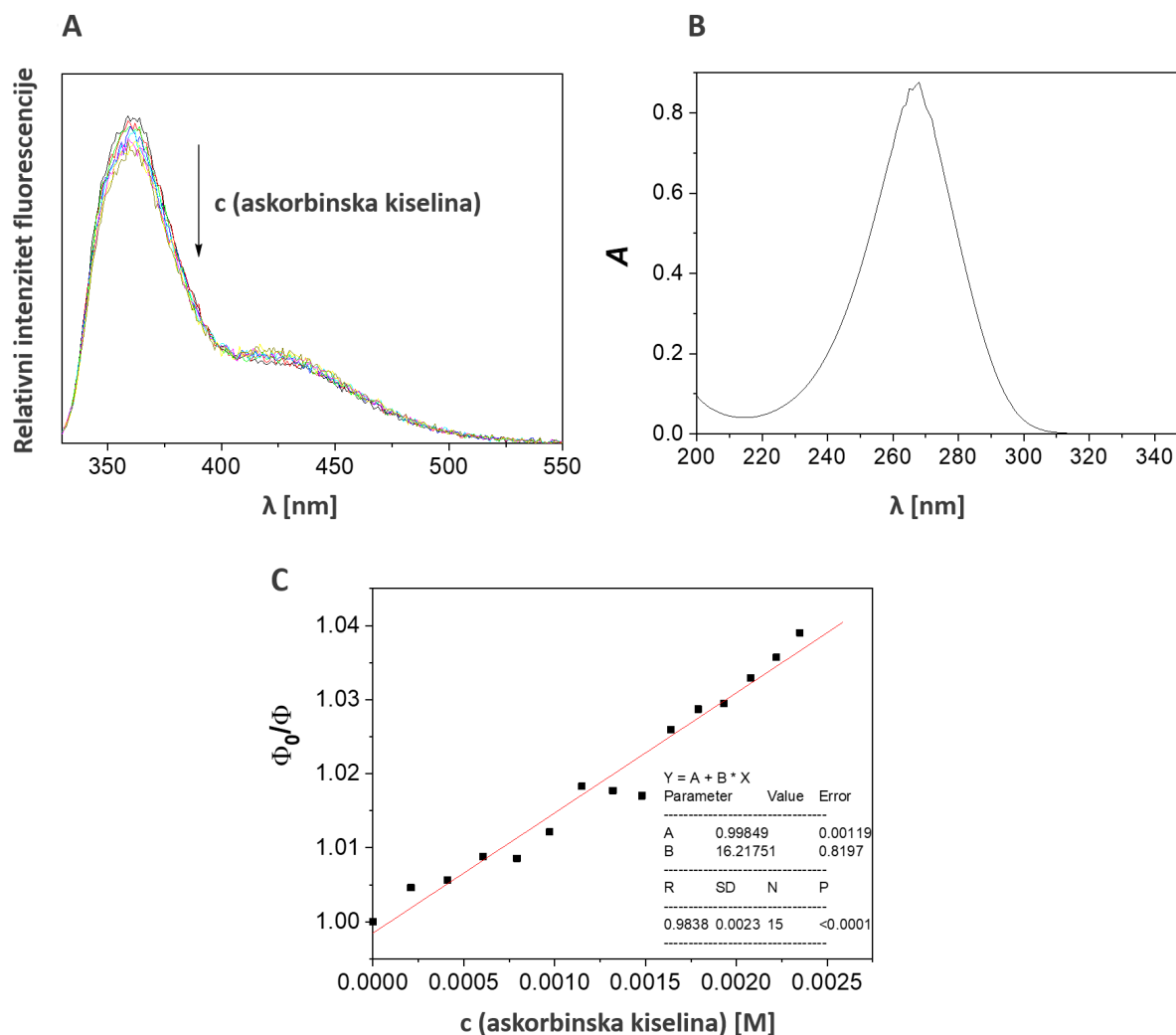
njem askorbinske kiseline dolazi do prigušivanja fluorescencije molekule **1**. Valja napomenuti kako askorbinska kiselina apsorbira na 267nm što je glavni razlog slabijem signalu prilikom fs-TA mjerenja. S obzirom da je razumno pretpostaviti kako askorbinska kiselina nema utjecaj na benzokset, prikazani rezultati ukazuju na alternativnu asignaciju prekursora QM, odnosno, signalu na 360nm pripisuje se fenoksil radikal koji eliminacijom $\text{OH}\cdot$ stvara **1-QM**. Važno je napomenuti kako je opisani mehanizam već predložen kod formacije QM-a iz antrola [115], i 2,6-supstituiranih naftola[117].



Slika 7.14: LFP mjerenja uzorka **1** otopljenog u mješavini $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (1:1) propuhanoj mlazom O_2 u prisutnosti natrij-fosfatnog pufera (pH 7.0, 50mM) i askorbinske kiseline. A) Kinetički profili signala na 350nm za razne koncentracije askorbinske kiseline. Vidljivo je kako se dodavanjem askorbinske kiseline skraćuje vrijeme života signala i njegov intenzitet. B) Linearna prilagodba na graf ovisnosti konstante brzine reakcije o koncentraciji askorbinske kiseline i C) linearna prilagodba ovisnosti razlike intenziteta signala od maksimalnog naspram koncentracije askorbinske kiseline.

7.3.3.2 Adamantan-naftol - 2

Ranije provedena LFP mjerenja uzorka **2** znatno se razlikuju[117] od LFP mjerenja naftola **1**. Mjerenja ukazuju kako u vremenskom prozoru koji nije pokriven fs-TA i LFP mjerenjima (otprilike 1-10ns) nije stvoren niti jedan međuprodukt, odnosno da su sva stanja fotokemijske reakcije opažena korištenjem fs-TA i LFP metode. U LFP mjerenjima uzorka **2** otopljenog u mješavini $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (1:1) propuhanoj mlazom N_2 ili O_2 vidljiv je izražen apsorpcijski pojas centriran oko 370nm sa spektralnim koljenom na 470nm (slika 7.16). Spomenuti apsorpcijski pojas trne na ms vremenskoj skali i poklapa se sa onim opaženim u fs-TA eksperimentu

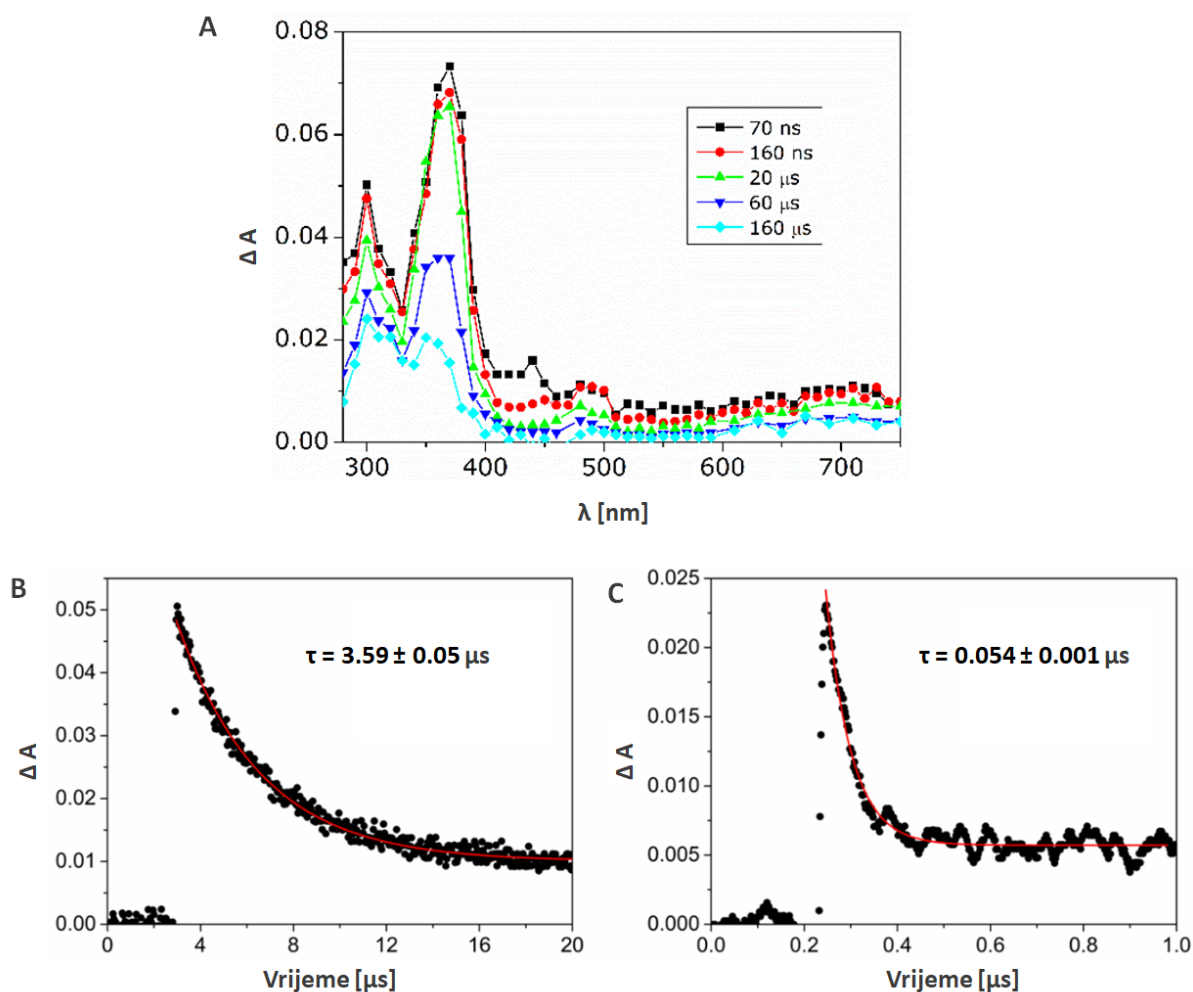


Slika 7.15: A) Fluorescencijski spektar naftola **1** u $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (1:1) u prisutnosti natrij-fosfatnog pufera (50mM, pH 7.0) pri različitim koncentracijama askorbinske kiseline. B) apsorpcijski spektar askorbinske kiseline ($c=5.22 \cdot 10^{-5}\text{M}$) u prisutnosti natrij-fostaftog pufera (50mM, pH 7.0). C) Linearna prilagodba na graf omjera fluorescencijskog maksimuma bez dodane askorbinske kiseline i sa dodanom askorbinskom kiselinom u ovisnosti o njoj koncentraciji.

gdje je pripisan **2-QM(S₀)**. Zbog smanjene spektralne razlučivosti LFP mjerenja, nije vidljiva dupla struktura spomenutog apsorpcijskog maksimuma opažena u fs-TA mjerenjima. Signalu na 430nm u fs-TA mjerenjima pripisana je triplet-triplet apsorpcija, a isti signal također je vidljiv u LFP mjerenjima u najkraćim vremenskim trenucima (70ns). Signal je moguće prigušiti propuhivanjem otopine mlazom O_2 (slika 7.16C) što dodatno potvrđuje da je uzrok signala triplet-triplet apsorpcija. Naime, u otopini propuhanoj mlazom N_2 za vrijeme života spomenutog stanja dobivena je konstanta $3.59 \pm 0.05 \mu\text{s}$ dok je u slučaju propuhivanja otopine mlazom O_2

vrijeme života znatno kraće te iznosi $0.054 \pm 0.001 \mu\text{s}$ [117].

Zaključno, moguće je reći kako je u slučaju uzorka **2** stvaranje QM-a opaženo fs-TA eksperimentom dok je trnjenje istog opaženo prilikom LFP mjerenja. Nasuprot toga, u slučaju uzorka **1** stvaranje QM-a opaženo je tek u LFP mjerenjima na mikrosekundnim vremenskim skalama.



Slika 7.16: LFP mjerenja uzorka **2** otopljenog u mješavini $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (1:1). A) Spektralna evolucija u otopini propuhanoj mlazom O_2 . Signali na 370nm i 470nm, pripisani QM-u trnu na mikrosekundnim skalama bez dodatnih međuprodukata. B) i C) Vremenska dinamika na 440nm (triplet-triplet apsorpcija). B) otopina propuhana mlazom N_2 i C) otopina propuhana mlazom O_2 . Signal je prigušen u slučaju C) što podupire asignaciju triplet-triplet apsorpcije signalu na 440nm. Rezultati su preuzeti iz [117].

7.4 Rezultati teorijske analize

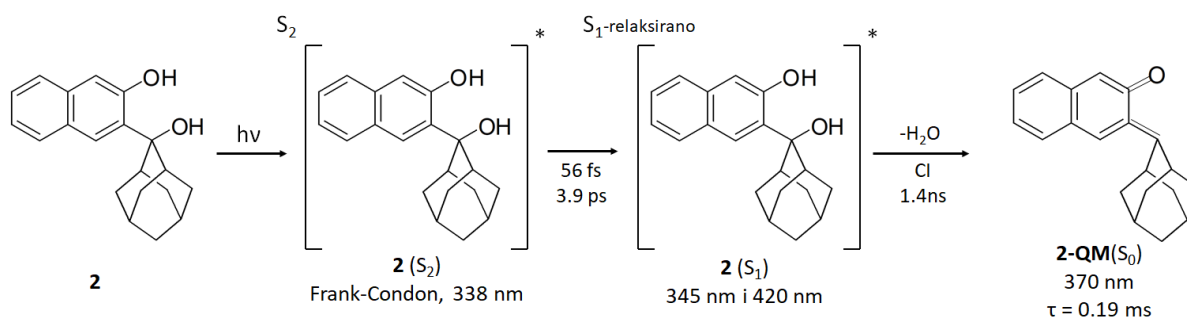
7.4.1 Naftol - 1

Energetski dijagram (slika 7.20) i put fotokemijske reakcije stvaranja **QM** iz prekursora **1** je nešto kompliciraniji nego što je to slučaj kod **2**. Teorijski računi potvrđuju tvrdnju kako benzokset ne sudjeluje u fotokemijskoj reakciji fotodehidracije prekursora **1**. Naime, sa energetskog dijagrama vidljivo je kako benzokset **1-BO(S₁)** energetski leži izvan dohvata fotokemijske reakcije koja se odvija preko **1(S₁)** stanja naftola **1**. Energetska razlika **1(S₁)** stanja i **1-BO(S₁)** iznosi ≈ 30 kcal mol⁻¹ dok energetska razlika između osnovnog i prvog pobuđenog stanja benzokseta iznosi otprilike 100 kcal mol⁻¹ što odgovara valnoj duljini 285nm. Navedena valna duljina je uvelike izvan dosega eksperimentalnog postava što čini benzokset nemogućim za opažanje pomoću fs-TA postava. Teorijske simulacije također ukazuju na mogući put fotokemijskog stvaranja QM iz fenoksil radikala **1-R** čija je stacionarna točka izračunata već spomenutim nivoom teorije. Fenoksil radikal **1-R** relativne energije 88.7 kcal mol⁻¹ leži ≈ 4 kcal mol⁻¹ ispod energetske razine **1(S₁)** što ga čini vrlo vjerojatnim međuproduktom prilikom stvaranja QM-a. Stoga, uzimanjem u obzir eksperimentalnih podataka i rezultata teorijskih simulacija dolazi se do zaključka kako je mogući put fotokemijske reakcije preko fenoksil radikala kao međuprodukta u stvaranju **1-QM** iz **1** što je predloženo u radu [33].

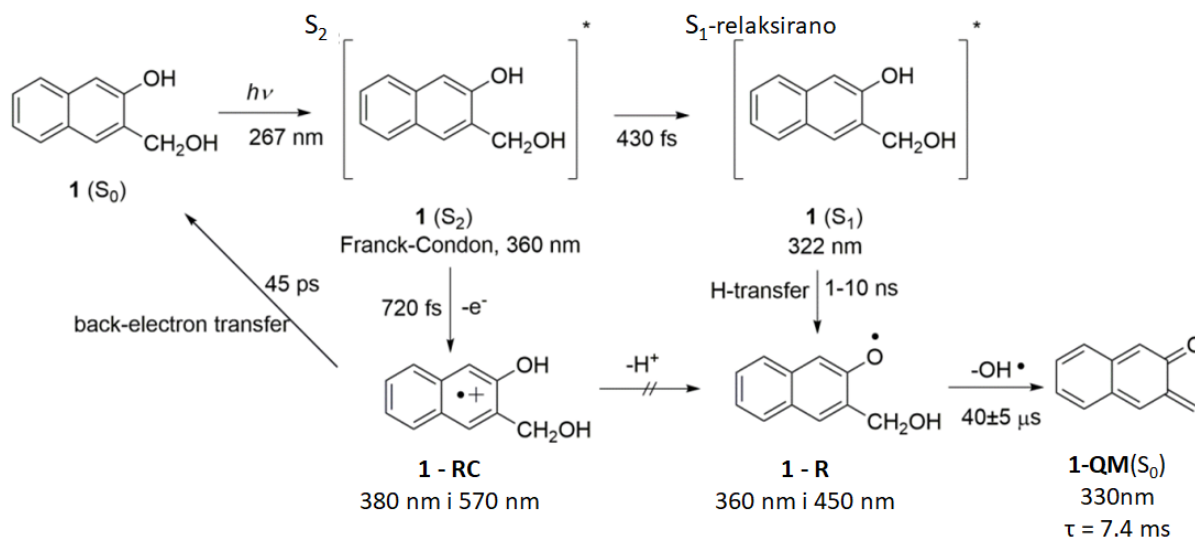
Na temelju svih dobivenih informacija o fotokemiji dva derivata naftola predložena su dva različita reakcijska puta stvaranja QM. Adamantan-naftol **2** podliježe neadijabatskom intramolekularnom transferu protona u pobuđenom stanju vezanom sa dehidracijom preko konusnog presjeka što rezultira stvaranjem QM-a (Shema 7.17). U reakciji fotodehidracije naftola **1** (Shema 7.18), nakon početne ultrabrze interne konverzije molekule **1**, odgovarajući radikal kation biva reduciran sa otopljenim elektronima rezultirajući povratnim transferom elektrona te ponovnim stvaranjem početne molekule naftola **1**. U tom slučaju QM-i su dobiveni iz fenoksil radikala koji su stvoreni u reakciji transfera vodika nakon eliminacije OH[•].

7.4.2 Adamantan-naftol - 2

Kao što je spomenuto, te po uzoru na prošli rad eksperimentalni rezultati upotrijebljeni su teorijskim TD-DFT simulacijama stvaranja QM iz **1** i **2**. Teorijskim putem izračunate su programskim paketom GAUSSIAN16 [118] stacionarne točke za osnovno i prvo pobuđeno stanje za obje molekule na nivou teorije PCM(water)/(TD-)ωB97XD/6-311++G(d,p), a shematski prikaz



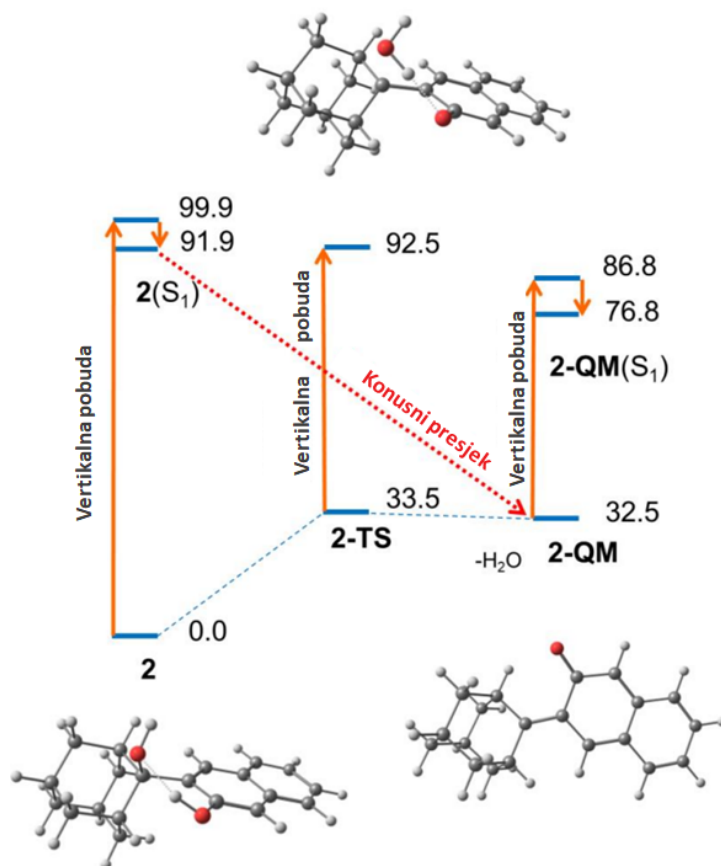
Slika 7.17: Shema mehanizma fotokemijske reakcije dehidracije adamantan-naftola **2** koja rezultira stvaranjem **2-QM**(S₀) preko konusnog presjeka. Konstanta od 56fs predstavlja internu konverziju S₂ stanja u S₁ stanje te radi jednostavnosti prikaza nije popraćena grafičkim prikazom. Konstanta od 3.9ps predstavlja vibracijsku relaksaciju S₁ stanja.



Slika 7.18: Shema mehanizma fotodehidracije naftola **1** preko fenoksil radikala **1-R** kao međuproducta u stvaranju QM-a.

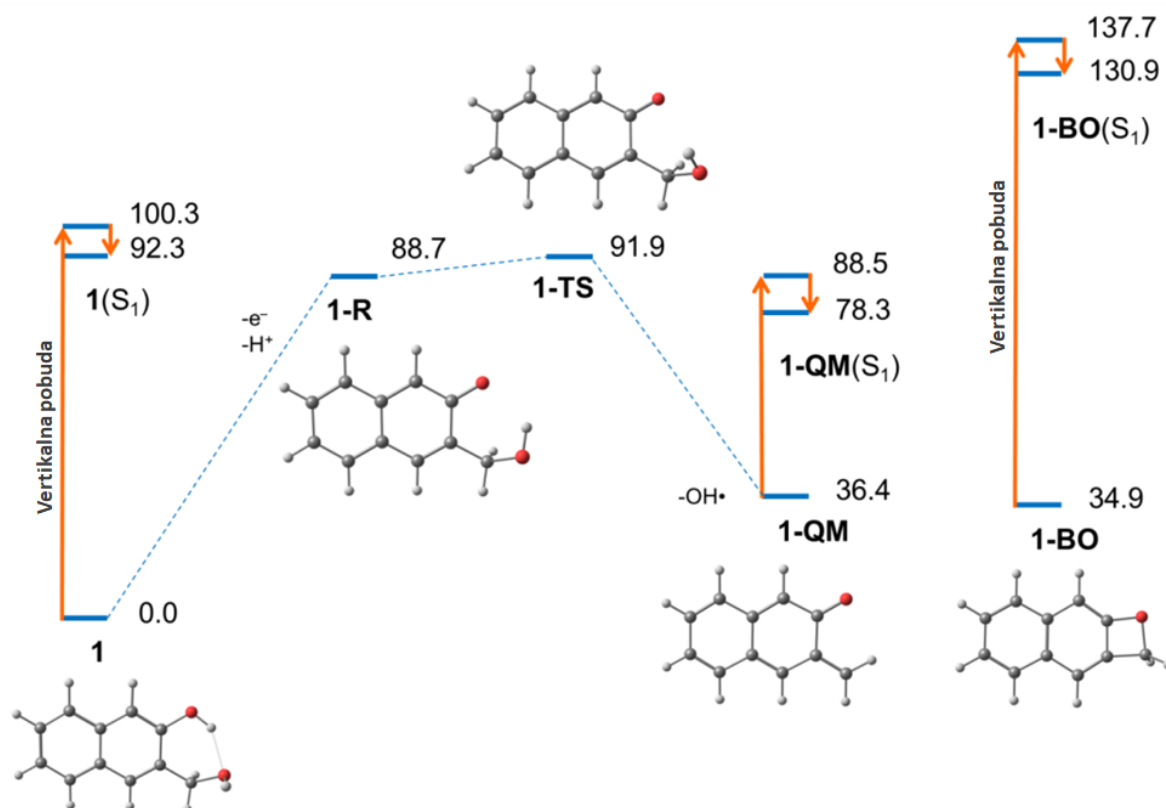
rezultata nalazi se na slikama 7.19 i 7.20. Rezultat za **2** sličan je onom dobivenom za fotodehidraciju adamantan fenola (slika 6.16). Na temelju fs-TA rezultata može se zaključiti da se **2-QM** stvara izravno iz **2**(S₁) stanja bez međustanja, te je stoga najvjerojatniji put fotokemijske reakcije preko konusnog presjeka. Teorijski rezultati također ukazuju na postojanje konusnog presjeka zbog nemogućnosti adijabatskog optimiziranja prijelaznog stanja **2-TS**(S₁). Naime, kao što je ranije spomenuto, TD-DFT metode nailaze na probleme u blizini geometrija konusnog presjeka. Korištenjem programa ORCA 4.2.0[121],[122] izvršila se optimizacija konusnog presjeka za stvaranje **2-QM**(S₀). Pronađena je razlika energija od samo 1.0 kcal mol⁻¹ za **2** i 3.4 kcal mol⁻¹ za **1**. Razlika energija između različitih geometrija za **2** je dovoljno malog iz-

nosa kako bi se sa sigurnošću moglo tvrditi da se fotokemijska reakcija odvija preko konusnog presjeka, odnosno da dolazi do nastajanja **2-QM**_{S₀} izravno iz **2-QM**_{S₁} bez stvaranja međuprodukata.



Slika 7.19: Rezultat TD-DFT teorijskih simulacija stvaranja QM-a iz uzorka **2**. Stacionarne točke osnovnog i prvog pobuđenog stanja izračunate su na nivou teorije PCM(water)/(TD-)ωB97XD/6-311++G(d,p). Relativne energije dane su u kcal mol⁻¹. Razlika energija koja odgovara konusnom presjeku iznosi 1.0 kcal mol⁻¹. Teorijski izračunata vertikalna pobuda iz S₀ u S₁ za **2** odgovara 286nm dok za **2-QM** odgovara 526nm.

Slika 7.21 prikazuje apsorpcijski spektar **2-QM**(S₀) stanja dobiven teorijskim simulacijama. Apsorpcijski maksimumi centrirani oko 315nm i 530nm potencijalno su odgovorni za strukturu duplog maksimuma prilikom fs-TA mjerenja (350nm i 370nm) s obzirom da je poznato kako TD-DFT metode nisu precizne prilikom računanja apsorpcijskih spektara. Spomenuti maksimumi također mogu pokrivati i apsorpcijski pojas centriran oko 470nm vidljiv u LFP mjerenjima na mikrosekundnim skalama. Rezultat se može smatrati kvalitativno sukladnim eksperimen-

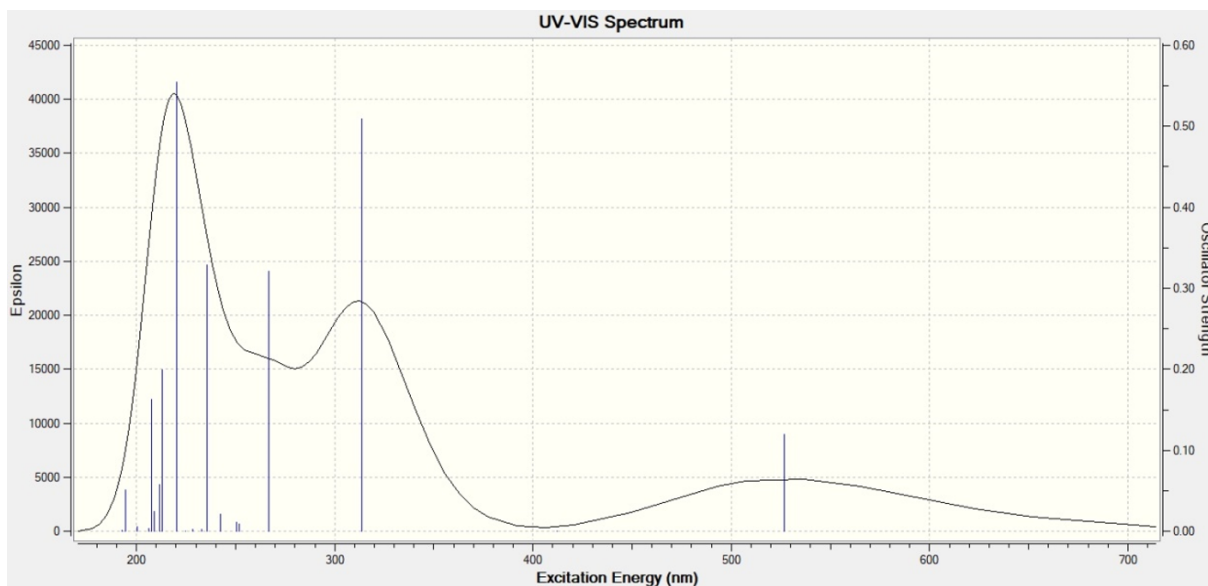


Slika 7.20: Rezultat TD-DFT teorijskih simulacija za fotokemijsku reakciju stvaranja QM-a iz uzorka **1**. Stacionarne točke osnovnog i prvog pobuđenog stanja izračunate su na nivou teorije PCM(water)/(TD- ω B97XD/6-311++G(d,p)). Relativne energije dane su u kcal mol⁻¹. Teorijski izračunata vertikalna pobuda iz S₀ u S₁ za **1** odgovara 285nm dok za **1-QM** odgovara 549nm.

mentalnim mjerenjima s obzirom da dobiveni spektar posjeduje dva apsorpcijska maksimuma od kojih je onaj na duljim valnim duljinama slabijeg intenziteta, kao i kod eksperimentalnih mjerenja.

7.5 Diskusija o mehanizmu reakcija

Kao i u slučaju prethodnog rada, fotokemijske reakcije se uvelike razlikuju iako **1** i **2** dijele istu kromoforu. Nakon apsorpcije ultrakratkog UV pulsa, adamantan-naftol **2** podliježe neadijatskom intramolekularnom transferu protona u pobuđenom stanju (ESIPT) vezanom sa dehidratacijom preko konusnog presjeka što posljedično rezultira stvaranjem QM-a unutar prvih nekoliko nanosekundi. S druge strane, kod naftola **1** u fs-TA mjerenjima na nanosekundnoj

Slika 7.21: Rezultat računskih simulacija apsorpcijskog spektra stanja **2-QM**(S_0).

vremenskoj skali, uz internu konverziju pobuđene molekule prekursora opaženo je samo stvaranje i brzo trnjenje radikal kationa. Pošto se deprotonacija radikal kationa inače odvija na vremenskim skalama od nekoliko stotina pikosekundi do nekoliko nanosekundi [132], opaženo trnjenje eksponencijalne konstante $<50\text{ps}$ na karakterističnim valnim duljinama (380nm i 570nm) ukazuje na to kako je radikal kation reduciran otopljenim elektronima što rezultira početnom molekulom naftola **1** u osnovnom stanju. S obzirom na spomenuto, zaključeno je kako procesi fotoionizacije i stvaranja radikal kationa vode do kompetitivnih procesa koji nisu izravno vezani sa fotokemijskom reakcijom stvaranja QM-a. S druge strane, fenoksil radikal (apsorpcijski pojas centriran oko 360nm u LFP mjerenjima) koji je identificiran kao prekursor QM-a može biti stvoren u reakciji transfera vodika za koju je poznato kako evoluira na nanosekundnoj vremenskoj skali [126]. U tom slučaju, stvaranje fenoksil radikala nije bilo moguće razlučiti fs-TA mjerenjima koja pokrivaju nanosekundni vremenski prozor, a ni u LFP metodom u kojoj se za pobudu koriste pulsevi vremenskog trajanja 10ns. Fenoksil radikal nakon stvaranja podliježe eliminaciji $\text{OH}\cdot$ skupine rezultirajući QM-om kao što je to u slučaju adamantan-naftola **2** ali u procesu koji se odvija na puno sporijoj, mikrosekundnoj vremenskoj skali.

U znanstvenom radu rasvjetljen je mehanizam stvaranja QM-a fotokemijskim putem te je demonstrirano kako promjene u molekularnoj strukturi, ostavljajući kromoforu netaknutom dovode do značajnih promjena u tijeku i putu fotokemijske reakcije. U ovom slučaju dodavanje jednostavnog alkila (adamantana) naftolnoj kromoforu smanjuje energetska razliku između S_1 i S_0 potencijalnih ploha omogućavajući smjer fotokemijske reakcije preko konusnog presjeka. U slučaju naftola **1** bez adamantana, isti podliježe fotodehidrataciji ali preko puno sporijeg procesa

koji uključuje fenoksil radikale kao međuprodukte na putu do nastajanja QM-a.

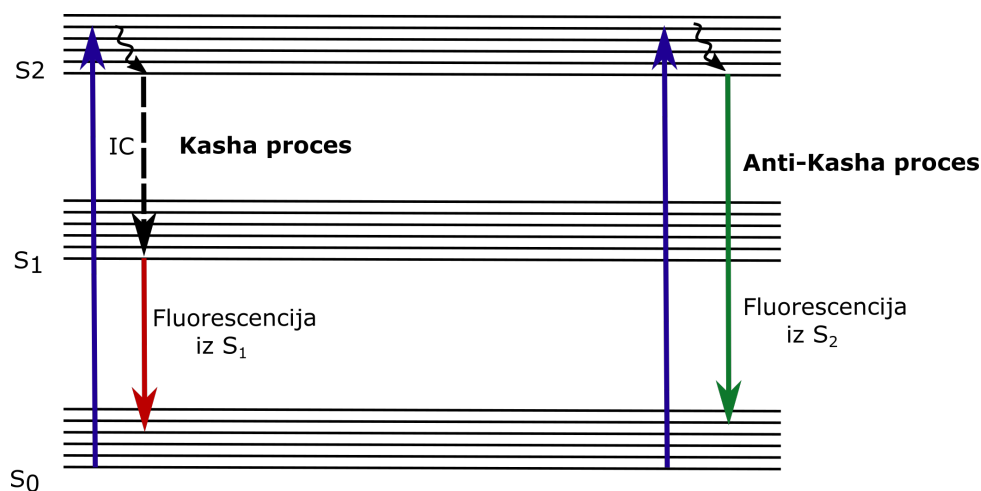
Poglavlje 8

Anti-Kasha fotokemija BODIPY-fenola

8.1 Anti-Kasha fizika

Kashino pravilo govori kako je emitirajuće stanje molekule ono energetski najniže za dani multiplicitet. U principu, zbog Kashinog pravila fluorescencijski spektar molekule ne ovisi o valnoj duljini pobude (slika 8.1). Kashino pravilo stoji zbog toga što se kod viših energetskih stanja nekolicina neradijativnih relaksacijskih procesa poput interne konverzije odvija na skalama puno bržima od fluorescencije. Iz spomenutog razloga fluorescencija (iz viših stanja) nije kinetički konkurentan proces nakon pobude u viša elektronska stanja i jako rijetko je opažena. Općenito, vjerojatnost (a posljedično i brzina) interne konverzije ovisi o energetskoj razlici određenih stanja na način da je vjerojatnija što je energetska razlika manja. Iz tog razloga prilikom pobude u viša stanja koja su energetski manje udaljena jedna od drugih dolazi do (ultra)brze interne konverzije i vibracijske relaksacije, a ne do fluorescencije. S_1 i S_0 stanje su u principu udaljenija od bilo koja druga dva uzastopna elektronska stanja te iz tog razloga nakon populacije S_1 stanja (npr. internom konverzijom) dolazi do fluorescencije u osnovno S_0 stanje s obzirom da u slučaju populiranog S_1 stanja fluorescencija postaje kinetički konkurentan proces. U slučaju tripletnih stanja proces je identičan te Kashino pravilo vrijedi i za tripletna stanja.

Kashino pravilo slijede gotovo sve molekule, ali postoje i iznimke. Najpoznatija iznimka je molekula azulena kod koje se uočava fluorescencija prilikom prijelaza $S_2 \rightarrow S_0$. Uzrok kršenja Kashinog pravila u slučaju azulena je neuobičajeno velika energetska razlika S_2 i S_1 stanja što usporava proces interne konverzije te dovodi do fluorescencije iz S_2 stanja [137]. U slučajevima sličnima navedenom u kojima dolazi do kršenja Kashinog pravila kažemo da imamo anti-Kasha fotokemiju.

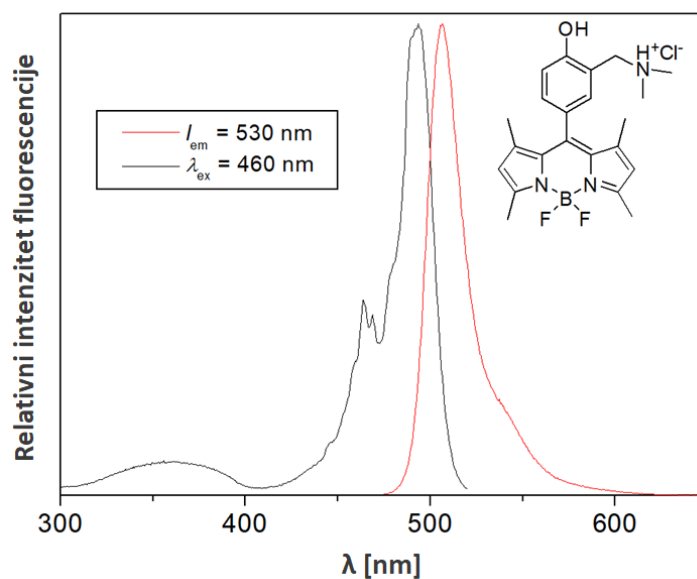


Slika 8.1: Prikaz kršenja Kashinog pravila. U anti-Kasha procesu dolazi do fluorescencije iz S_2 elektronskog stanja molekule. IC = interna konverzija.

8.2 BODIPY-QM

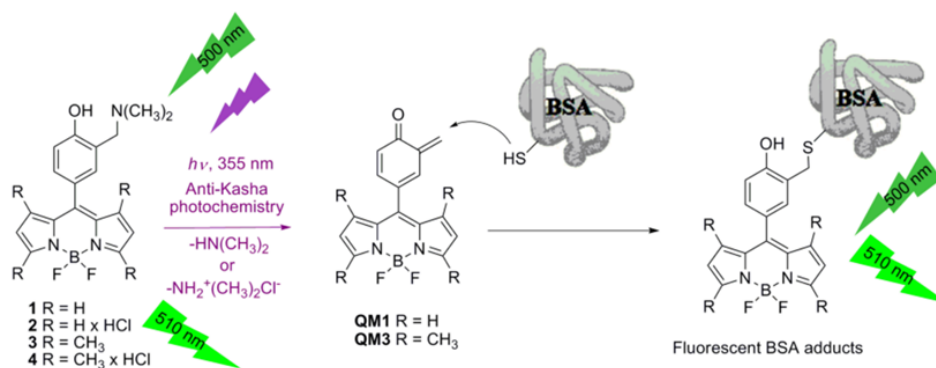
Molekula BODIPY-a često je korištena u kemiji i biologiji zbog svojih zanimljivih spektroskopskih i fotofizičkih svojstava. Za razliku od molekula navedenih u prošlim poglavljima - derivata fenola i naftola, emisijski spektar kromofore BODIPY-a lociran je u vidljivom dijelu spektra (slika 8.2) oko 510nm i karakteriziran je velikim kvantnim prinosom fluorescencije od 61% u etanolu [138] te relativno uskim oblikom. Dodatno, BODIPY je karakteriziran visokim koeficijentom molarne apsorpcije osnovnog stanja ($\epsilon > 50\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) i malim kvantnim prinosom međusustavnog križanja (eng. intersystem crossing) [139] [140] što također ide u prilog intenzivnoj fluorescenciji s obzirom da je fosforescencija zanemariva. S obzirom na spomenute karakteristike BODIPY-a, isti se koristi kao laserska boja odnosno aktivni medij u laserima varijabilne valne duljine [141]. Također, lako je sintetski modificirati derivate BODIPY-a čime je moguće dodatno varirati njihova optička svojstva, a uz to su i fotokemijski i kemijski stabilni i u tekućem i u čvrstom stanju.

Molekula BODIPY-a ima svoju primjenu u kemiji kao pH senzor [140], u sastavu OLED-a, solarnim koncentradorima i dr., no u zadnje vrijeme primjena BODIPY-a usmjerena je prema biološkom označavanju određenih reagensa. BODIPY boje su pogodne za biološko označavanje zbog velikog apsorpcijskog koeficijenta i visokog kvantnog prinosa fluorescencije, nanosekundnog vremena života pobuđenog stanja te relativne neosjetljivosti na promjene u polarnosti i pH vrijednosti okoline [142] [143]. Jako nizak kvantni prinos tripletnih stanja BODIPY-a zaslužan je za sprječavanje fotodegradacije zbog minimiziranog stvaranja singletnog kisika O_2 .



Slika 8.2: Apsorpcijski i emisijski spektar BODIPY-fenola u $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (1:9). U kutu grafa se nalazi shematski prikaz molekule.

Uz navedene važne činjenice o BODIPY molekuli, ona najbitnija za ovu disertaciju je da dodavanjem fenolne skupine kromofori BODIPY-a novonastala molekula postaje prekursor fotokemijskog stvaranja QM-a u anti-Kasha procesima. Basarić i suradnici pokazali su kako je fotokemijsko označavanje proteina pomoću BODIPY-QM-a vrlo elegantno i jednostavno [143]. Za razliku od izravnog označavanja proteina određenim molekulama, u slučaju BODIPY-fenola moguće je postići fotokemijsku aktivaciju označavanja proteina što će biti objašnjeno u nastavku. U pravilu, sama molekula BODIPY-fenola ne posjeduje svojstvo vezanja za proteine i stabilnog je S_1 stanja iz kojeg je opažena fluorescencija zahvaljujući kromofori BODIPY-a. No, nakon pobude u više elektronsko stanje dolazi do fotodeaminacije BODIPY-fenola te posljedično i do stvaranja BODIPY-QM-a. Takav QM posjeduje svojstvo vezanja za proteine ali i svojstvo izražene fluorescencije zbog i dalje prisutne kromofore BODIPY-a. Stoga je na taj način u slučaju mješavine određenih proteina i BODIPY-fenola moguće fotokemijski aktivirati označavanje proteina ukoliko se isti pobudi u više elektronsko stanje i dođe do stvaranja BODIPY-QM-a koji se vežu za protein. U suprotnom slučaju, ako dođe samo do pobude u S_1 stanje, kao posljedicu imamo samo fluorescenciju BODIPY kromofore bez vezanja za protein. Nakon stvaranja QM-a i vezanja za protein, pobudom BODIPY-QM-a u S_1 stanje dolazi do jake fluorescencije, a kako su isti vezani na protein, lako je identificirati proteine. Spomenuti proces prikazan je na slici 8.3.



Slika 8.3: Označavanje proteina BSA (eng. bovine serum albumin) BODIPY-QM-ima. Preuzeto iz [143].

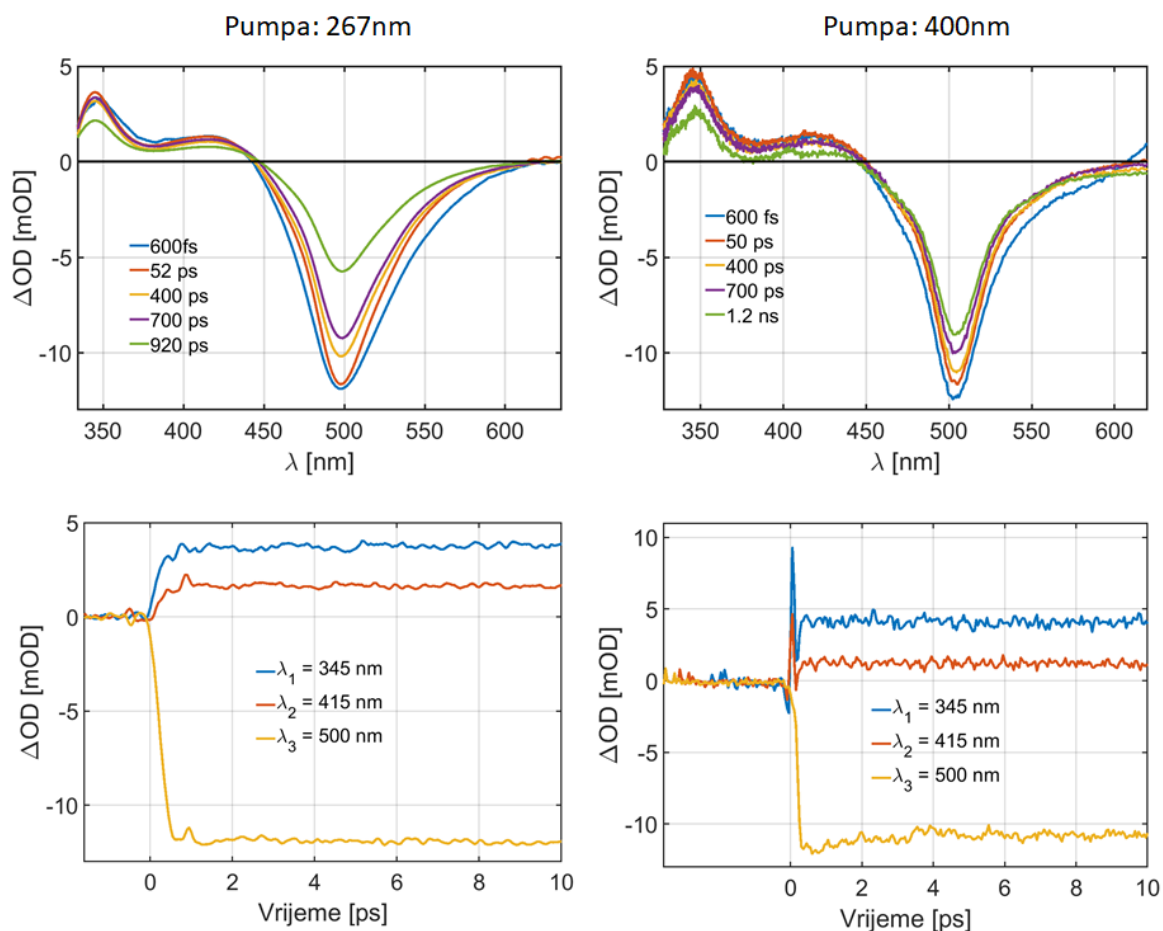
8.3 Eksperimentalni rezultati

8.3.1 fs-TA mjerenja

Cilj istraživanja metodama ultrabrze spektroskopije bilo je potvrđivanje anti-Kasha fizike i potpuno rasvjetljavanje procesa odnosno određivanje najdulje pobudne valne duljine pri kojoj dolazi do odvijanja fotokemijske reakcije stvaranja fotoprodukata. Time se zapravo određuje iznos energetske barijere koju je potrebno premostiti kako bi došlo do fotodeaminacije. Mjerenjima vremenski razlučive apsorpcije i fluorescencije na ultrabrznoj vremenskoj skali nije bilo moguće u potpunosti pratiti fotodeaminaciju BODIPY-fenola jer BODIPY-QM nastaje na mikrosekundnim skalama. Stoga je fokus istraživanja bio usmjeren na razlike u mjerenjima prilikom mijenjanja valnih duljina pobude odnosno na opažanje bilo kojeg međuprodukta koji ne nastaje prilikom pobude u S_1 stanje.

Fs-TA mjerenja izvršena su već opisanim postavima, prvim sa nanosekundnim vremenskim prozorom i drugim sa sub-50fs pumpnim pulsevima. Drugi postav koji se kao i ranije koristio za promatranje dinamike u vremenskom prozoru kraćem od 200fs. Prvim postavom kao pobudne valne duljine odabrani su treći harmonik na 267nm i drugi harmonik na 400nm. Ukoliko pobudom na 267nm dolazi do aktivacije anti-Kasha procesa u kojem dolazi do stvaranja međuprodukta, isti će posjedovati potpis u spektrogramu te će se spektrogram razlikovati od onoga koji odgovara pobudi na 400nm. Mjerenja su prikazana na slici 8.4. Prikazana je evolucija spektara u vremenu te vremenska dinamika za 3 karakteristične valne duljine. Kao otapalo je korištena mješavina CH₃CN-H₂O (1:1). Na slici 8.5 prikazana je usporedba GSB i SE doprinosa signalu. Valja napomenuti kako je u prikazanim mjerenjima jasno vidljiv i razlučen negativan signal od pozitivnog, za razliku od mjerenja u prethodnim poglavljima gdje je pozitivan signal nadjačao

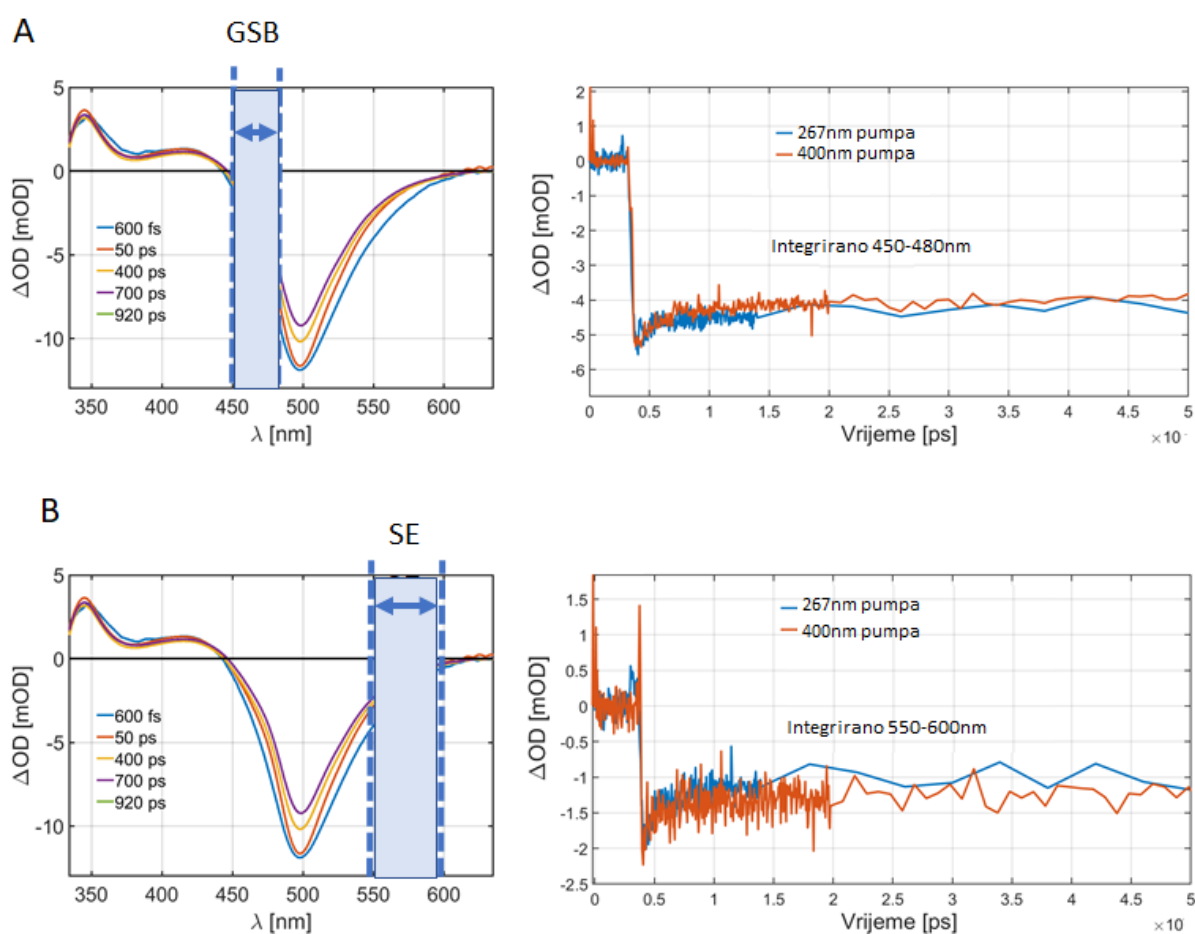
negativan. Naime, promatrajući apsorpcijski i emisijski spektar BODIPY-fenola (slika 8.2) moguće je opaziti kako na valnim duljinama duljima od 530nm doprinosi samo SE dok na valnim duljinama manjima od 480nm postoji samo GSB doprinos. Stoga, integriranjem spomenutih spektralnih prozora dolazi do smanjenja šuma te točnije usporedbe mjerenja za različite valne duljine pumpnih pulseva.



Slika 8.4: Dinamika spektrara u vremenu i vremenski profili na karakterističnim valnim duljinama za BODIPY-fenol prilikom pobude na 267nm (lijevi stupac) i 400nm (desni stupac). Koherentni artefakt prilikom kod pobude na 400nm je izraženiji zbog kraćih pumpnih pulseva u spomenutom slučaju.

Nažalost, nije uočena razlika između TA mjerenja sa pobudom na 267nm i na 400nm što može značiti kako nijedan međuprodukt nastao anti-Kasha procesom unutar vremenskog prozora od 1ns ne posjeduje spektralni potpis u rasponu valnih duljina dostupnih u probnoj zruci ili u tom vremenskom prozoru još nije nastao niti jedan fotoprodukt. Isto tako moguće je kako čak i valna duljina od 400nm pokreće anti-Kasha reakciju te stoga nema razlike između mjerenja.

Na mjerjenjima je vidljiv jak negativan pojas centriran oko 500nm čiji je uzrok GSB. Pogledom na vremensku evoluciju spektara moguće je vidjeti kako je dinamika negativnog pojasa spora te se odvija na nanosekundnim skalama. Dinamika GSB-a u skladu je sa prethodno objavljenim SPC mjerjenjima gdje je dobivena nanosekundna eksponencijalna konstanta fluorescencije na 510nm koja je iznosila 3.57ns [143]. Detaljnijom usporedbom signala na 500nm zaključeno je kako nema razlike u dinamici prilikom pobude trećim ili drugim harmonikom.



Slika 8.5: Usporedba integriranog signala TA mjerenja BODIPY-fenola. U slučaju A) GSB doprinosa i u slučaju B) SE doprinosa vremenska dinamika signala je otprilike identična.

Uz negativan GSB signal vidljiv je i pozitivan ESA signal strukturiran kao apsorpcijski vrh sa dva maksimuma centrirana oko 345nm i 415nm. S obzirom da se dvostruki pozitivan signal pojavljuje u mjerjenjima pri pobudi na 267 i 400nm moguće je kako se ESA signal ne odnosi na međuprodukt nastao anti-Kasha fizikom. S druge strane, u slučaju da valna duljina od 400nm pokreće anti-Kasha reakciju pozitivni vrhovi mogu odgovarati nekom međuproduktu nastalom

u anti-Kasha procesu.

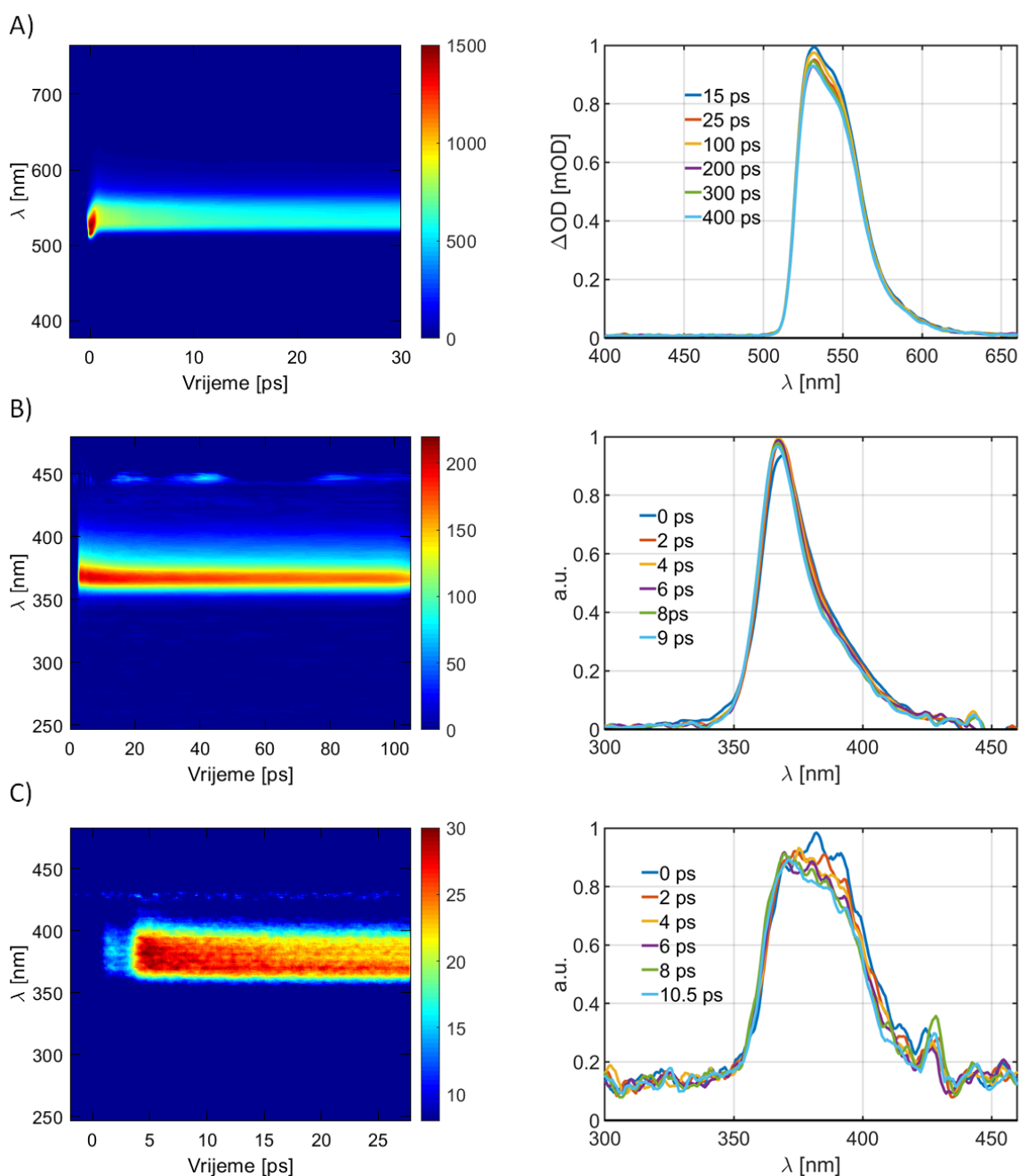
Na slici 8.4 vidljivo je kako je vremenska dinamika gotovo identična za obje valne duljine i za oba doprinosa (GSB i SE). Početno naglo smanjenje apsolutne vrijednosti signala unutar 1ps je prisutno u svim slučajevima, a moguća interpretacija je postojanje tamnih stanja molekule BODIPY ([144]) u kombinaciji sa rotacijskom difuzijom jer mjerenja nisu izvršena pod uvjetima magičnog kuta.

Mjerenja drugim fs-TA postavom, vremenske rezolucije ≈ 50 fs izgledaju identično mjerenjima prikazanim na slici 8.5 stoga nisu prikazana. Vrijeme rasta signala otprilike je jednako vremenskoj rezoluciji postava, no, zbog kraćih pulseva snažni koherentni artefakti superponirani su na signal te onemogućuju kvalitetnu prilagodbu u svrhu određivanja vremena rasta signala. Kako bi se pokušalo dodatno rasvijetliti ultrabrze fotokemijske procese i selektivno pratiti dinamiku populacije pojedinih pobuđenih stanja organizirana su i mjerenja ultrabrze vremenski razlučive fluorescencije.

8.3.2 FLUC mjerenja

S obzirom da fs-TA mjerenjima nije potvrđena anti-Kasha fizika prilikom stvaranja BODIPY-QM-a izvršila su se i FLUC mjerenja BODIPY-fenola. U svrhu potvrđivanja anti-Kasha procesa za valnu duljinu pobude odabrane su: 495nm, 335nm i 272nm. Naime, odabrane valne duljine odgovaraju pobudi u različita stanja BODIPY-fenola, pri čemu je na temelju ranijih istraživanja očekivano da će pomicanjem pobude od 400nm na niže valne duljine biti izraženija anti-Kasha fotokemija. Mjerenja su prikazana na slici 8.6. Prilikom pobude valnom duljinom 495nm (8.6 A) u mjerenjima je vidljiva samo fluorescencija spore dinamike centrirana oko 500nm koja odgovara fluorescenciji iz S_1 stanja kao što je i očekivano. U tom režimu ne dolazi do anti-Kasha fizike s obzirom da pobudna valna duljina ne posjeduje dovoljno energije za promoviranje molekula u stanje više od S_1 . Vidljivo je kako se pobudom od 335nm u mjerenjima opaža potpuno novi fluorescencijski pojas centriran oko 370nm koji nije prisutan prilikom pobude na 495nm (8.6 B). Novo-opaženi fluorescencijski pojas koji nije prisutan prilikom pobude u S_1 stanje dokazuje prisutnost anti-Kasha procesa kod molekule BODIPY-fenola. Identična situacija prisutna je i prilikom mjerenja sa pobudnom valnom duljinom od 272nm gdje se također uočava fluorescencijski pojas većeg intenziteta centriran oko 370nm.

Analizom vremenske dinamike mjerenja sa pobudom na 335nm i 272nm zaključeno je kako anti-Kasha fluorescencijski vrh posjeduje i pomak prema kraćim valnim duljinama. Spomenuti pomak u slučaju pobudne valne duljine od 335nm odvija se na vremenskoj skali od otprilike 15ps. Razlog pomaka prema plavom može biti intramolekularna relaksacija ili rotacija. Naime,



Slika 8.6: FLUC spektrogrami i kinetički profili mjerenja BODIPY-fenola. A) pobuda na 495nm. U mjerenjima je vidljiva samo fluorescencija iz S_1 stanja na 500nm koja posjeduje sporu dinamiku. B) pobuda na 335nm, u mjerenjima postaje vidljiva fluorescencija na 370nm. C) pobuda na 272nm, u mjerenjima je jasno vidljiva i potvrđena fluorescencija na 370nm.

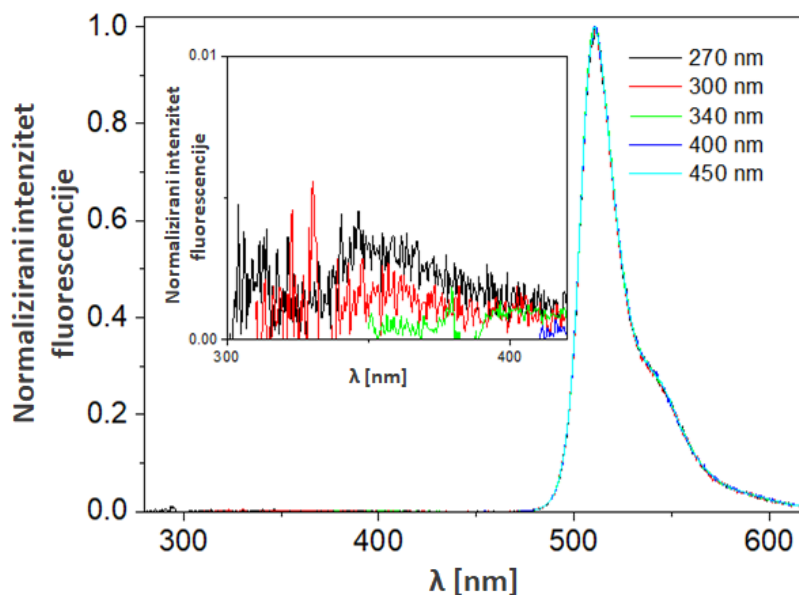
ukoliko bi postojao pomak fluorescencije prema crvenom, istom bi uzrok moglo biti otapanje molekule u pobuđenom stanju i već spomenuto snižavanje energije pobuđenog stanja zbog

reorijentacije molekula otapala. No, u slučaju pomaka prema plavom uzrok može biti intramolekularna relaksacija koja efektivno podiže energiju stanja u kojem se molekula nalazi. U slučaju pobudne valne duljine od 272nm plavi pomak odvija se na otprilike istoj vremenskoj skali od otprilike 15ps. Bitno je napomenuti kako na slici 8.6A) nije prikazano područje valnih duljina kraćih od 380nm zbog toga što je malo vjerojatno nakon pobude valnom duljinom od 495nm opaziti fluorescenciju na kraćim valnim duljinama. Iako, bitno je naglasiti kako spomenuti proces nije nemoguć. Naime, dvofotonskom apsorpcijom moguće je pobuditi molekulu u više stanje koje zatim fluorescira na valnim duljinama kraćim od 495nm.

8.3.3 Dodatna analiza fluorescencije BODIPY-fenola

Na slici 8.7 prikazana su mjerenja fluorescencije tehnikom brojanja pojedinačnih fotona (SPC) nakon pobude BODIPY-fenola sa raznim valnim duljinama. Osnovni fluorescencijski pojas nastao prijelazom iz S_1 u osnovno stanje vidljiv je prilikom pobude sa bilo kojom valnom duljinom te je centriran oko 530nm što odgovara emisijskom spektru (slika 8.2). Spomenuti, najizraženiji maksimum čak i prilikom pobude u viša elektronska stanja javlja se zbog neradijativnih procesa kojima se molekule BODIPY-fenola relaksiraju u S_1 stanje. U svrhu opažanja fluorescencijskog anti-Kasha pojasa opaženog u FLUC mjerenjima, na grafu je prikazan dodatak sa uvećanim spektralnim rasponom od 300-400nm. Jasno je vidljivo kako je fluorescencijski pojas opažen u FLUC mjerenjima centriran oko 370nm prisutan i u stacionarnim mjerenjima nakon pobude valnim duljinama kraćima od 400nm. Intenzitet relativno slabe fluorescencije na rubu detekcije u ovom spektralnom području raste pobudom s kraćim valnim duljinama. Mogući razlog spomenutog efekta je pobuda molekula u više stanje pomoću kraćih valnih duljina i otvaranje dodatnih kanala za populaciju stanja koje fluorescira na 370nm te stoga posljedično i veću populaciju tog stanja. U tablici 8.1 dani su rezultati prilagodbe eksponencijalnih funkcija na anti-Kasha spektralni pojas i na fluorescencijski maksimum za različite valne duljine pobude. Primjećuje se kako na svim valnim duljinama postoje 2 eksponencijalne konstate od kojih jedna ima mnogo veću amplitudu eksponencijalnog trnjenja. U svakom od navedenih slučajeva kraća konstanta iznosi nekoliko desetaka ps dok dulja iznosi nekoliko nanosekundi.

U svrhu rezimiranja moguće je reći kako je u uzorku opažena anti-Kasha fluorescencija iz višeg pobuđenog stanja ali kako QM nije identificiran, najvjerojatnije jer nastaje na vremenskim skalama duljima od dostupnih nanosekundnih. U tijeku su simulacije vremenske dinamike pobuđenih stanja BODIPY-fenola koji će dodatno rasvijetliti reakciju fotodeaminacije iz viših pobuđenih stanja BODIPY-fenola.



Slika 8.7: Normalizirani fluorescencijski spektri BODIPY-fenola otopljenog u CH₃CN-H₂O (1:1) mjereni pobudom na različitim valnim duljinama. Umetak: Uvećani prikaz spektralnog raspona valnih duljina 300-400nm. Vidljivo je kako se mjereni anti-Kasha fluorescencijski pojas pojačava smanjivanjem valne duljine pobude te kako je u dobrom slaganju sa spektrima dobivenima vremenski razlučivim FLUC mjerenjima.

| λ_{pobuda} [nm] | $\lambda_{emisija}$ [nm] | τ (%) |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 280 | 360 | 79ps (16%) i 5.5ns (84%) |
| | 510 | 30ps (5%) i 3.86ns (95%) |
| 340 | 360 | 77ps (92%) i 4.8ns (8%) |
| | 510 | 67ps (6%) i 3.9ns (94%) |
| 450 | 510 | 65ps (6%) i 3.91ns (94%) |

Tablica 8.1: Vrijednosti eksponencijalnih konstanti dobivenih prilagodbom na SPC mjerenja BODIPY-fenola otopljenog u CH₃CN-H₂O (1:1). Uz eksponencijalne konstante dani su relativni omjeri pripadnih eksponencijalnih amplituda.

Poglavlje 9

Diskusija

Istraživanja u sklopu disertacije bila su usmjerena prema proučavanju fotokemije kratkoživućih i vrlo reaktivnih međuprodukata kinon metida metodama ultrabrze spektroskopije. Glavni dio mjerenja izvršen je postavom za ultrabrznu tranzijentnu apsorpciju koji je izgrađen na Institutu za fiziku. Eksperimentalni postav posjeduje mogućnost odabira pumpne valne duljine između 267nm (najčešće korišteno), 400nm i 800nm dok spektar probnog pulsa prekriva spektralni prozor od 320nm do preko 660nm. Postepenim uvrštavanjem nove eksperimentalne opreme te pažljivim podešavanjem postava postignuta je vremenska rezolucija od 220fs.

U šestom poglavlju detaljno je opisana i rasvijetljena fotogeneracija QM-a iz adamantan fenola u ultrabrzoj reakciji fotodehidracije. U svrhu detaljnog istraživanja spomenute reakcije ostvarena je međunarodna suradnja sa dvije eksperimentalne grupe od kojih je jedna rezultirala uspješnim TA mjerenjima na postavu vrlo visoke vremenske rezolucije (Milano, Italija), a druga femtosekundnim vremenski razlučivim mjerenjima fluorescencije (Bern, Švicarska). Povezivanjem i analizom rezultata TA mjerenja uočeno je kako nakon pobude adamantan fenola dolazi do stvaranja otopljenih elektrona i dugoživućeg apsorpcijskog pojasa položenog oko 425nm čija je brzina nastajanja (rasta) razlučena u mjerenjima na TA postavu vrlo visoke vremenske rezolucije (50fs). Analizom mjerenja, teorijskim izračunima te dodatnim LFP mjerenjima na nanosekundnim i milisekundnim skalama otkriveno je kako spomenuti apsorpcijski pojas sadrži doprinose od nekoliko različitih molekula - radikala i tripletnog stanja prekursorske molekule te kinon metida u osnovnom elektronskom stanju. Uz spomenuto, teorijskim računima i FLUC mjerenjima pokazano je kako prekursorska molekula u osnovnom i pobuđenom stanju posjeduje 2 konformera: reaktivni i ne-reaktivni. Spomenuto otkriće riješilo je naizgled zbunjujuću činjenicu postojanja dugoživuće fluorescencije adamantan fenola i ultrabrzog nastajanja kinon metida. Analizom početne dinamike adamantan fenola pokazano je kako kinon metid nastaje u svom osnovnom stanju sa vremenskom konstantom od ≈ 100 fs. Kako je nastajanje kinon me-

tida ultrabrzo, na temelju teorijskih izračuna zaključeno je kako se ono odvija preko konusnog presjeka nakon pobude adamantan fenola u prvo pobuđeno elektronsko stanje. S obzirom da postoje slučajevi stvaranja kinon metida iz fenolnih prekursora bez prisutnosti konusnog presjeka, provedeno istraživanje pokazalo je kako promjene molekularne strukture bez mijenjanja kromofore mogu potpuno promijeniti put fotokemijske reakcije.

Sedmo poglavljesadrži opis istraživanja mehanizma stvaranja QM-a fotodehidratacijom dva derivata 2-naftola. Adamantan-naftol nakon apsorpcije ultrakratkog UV pulsa podliježe neadijabatskom intramolekularnom transferu protona u pobuđenom stanju vezanom s dehidratacijom. Spomenuti fotoinducirani procesi odvijaju se preko konusnog presjeka što rezultira stvaranjem kinon metida unutar prvih nekoliko nanosekundi. TA eksperimentima opaženo je nastajanje kinon metida i trnjenje prekursorskih stanja dok je u LFP eksperimentima potvrđeno vrijeme života kinon metida. Kod drugog derivata naftola dolazi do bitno sporijeg stvaranja kinon metida, a fotokemijska reakcija posjeduje kompliciraniji put. Naime, u TA eksperimentima opažena je interna konverzija pobuđene molekule prekursora u S_1 elektronsko stanje te stvaranje i brzo trnjenje radikal kationa. Brzo trnjenje radikal kationa sugerira kako je isti reduciran otopljenim elektronima što rezultira početnom molekulom derivata naftola u osnovnom stanju bez stvaranja kinon metida. U radu je izložen mogući tijek stvaranja kinon metida preko fenoksil radikala koji nastaje iz prvog pobuđenog stanja derivata naftola u reakciji transfera vodika. Eliminacijom $\text{OH}\cdot$ skupine sa fenoksil radikala dobiva se kinon metid u svom osnovnom stanju. Rad pokazuje kako dodavanjem jednostavnog alkila (adamantana) naftolnoj kromofori dolazi do smanjivanja energetske razlike između S_1 i S_2 potencijalnih ploha omogućavajući fotokemijskoj reakciji put preko konusnog presjeka.

U osmom poglavlju opisana je anti-Kasha fizika BODIPY-fenola, također prekursora kinon metida. Kako je BODIPY laserska boja velikog iznosa kvantnog prinosa fluorescencije, BODIPY-kinon metidi imaju potencijalnu veliku primjenu u fotoaktivnom označavanju proteina. Cilj istraživanja bio je rasvijetliti fotokemijsku reakciju nastajanja kinon metida te odrediti energetske granice anti-Kasha procesa. U tu svrhu izvršena su TA i FLUC mjerenja sa nekoliko različitih pobudnih valnih duljina. Prilikom TA mjerenja odabrane valne duljine iznosile su 400nm i 267nm, no detaljnom analizom vremenske dinamike te spektralne evolucije nisu opažene razlike u mjerenjima koje bi sugerirale na aktivaciju anti-Kasha procesa. Nasuprot tome, opažene su razlike u fluorescenciji pobuđene molekule prilikom FLUC mjerenja. Za FLUC mjerenja odabrane pobudne valne duljine iznosile su 495nm, 335nm, 272nm. Prilikom pobude sa 335nm i 272nm, za razliku od pobude sa 495nm u mjerenjima je vidljiva prisutnost novog apsorpcijskog pojasa položenog oko 370nm. S obzirom da prvo pobuđeno stanje BODIPY-fenola apsorbira na otprilike 460nm, zaključeno je kako novo-opaženi apsorpcijski pojas dokazuje pri-

sutnost anti-Kasha procesa kod molekule BODIPY-fenola. Uz spomenuto, također je uočen i pomak anti-Kasha fluorescencijskog vrha prema kraćim valnim duljinama što sugerira kako je moguće da nakon pobude dolazi do intramolekularne relaksacije ili rotacije. Za potvrdu aktivacije anti-Kasha procesa izvršena su i fluorescencijska mjerenja sa različitim pobudnim valnim duljinama. Kao što je i očekivano, nakon pobude valnim duljinama <340nm pojavljuje se fluorescencijski anti-Kasha pojas.

Važnost kinon metida i vrlo velik broj njihovih potencijalnih primjena su već dobro poznati, no sama primjena određenih kinon metida je otežana, a nekada čak i nemoguća bez rezultata detaljnih istraživanja njihovog nastajanja što najčešće podrazumijeva praćenje spektralne dinamike na femtosekundnoj vremenskoj skali. Eksperimentalnim rezultatima i radovima objavljenima u okviru ove disertacije dobivene su veoma značajne informacije o ultrabrzim fotokemijskim reakcijama stvaranja kinon metida. Za nekoliko ultrabrzih fotokemijskih reakcija nastajanja kinon metida identificirani su svi međuprodukti na putu do željenih produkata - kinon metida. Izrada eksperimentalnog postava za ultrabrznu tranzijentnu apsorpciju na Institutu za fiziku otvara mogućnosti za daljnje proučavanje ultrabrze fotokemije raznih molekula kao i za istraživanje velikog broja zanimljivih fotoinduciranih procesa važnih u kemiji, biologiji i medicini. Dodatno unaprijeđenje eksperimentalnog postava moguće je započeti povezivanjem NOPA-e kućne izrade s ostatkom postava. Na taj način dobiva se dodatna mogućnost odabira pobudne valne duljine s mogućim rasponom od UV preko cijelog vidljivog dijela spektra uz bitno kraće trajanje pulseva od otprilike 50fs. Korištenje NOPA pulseva u ulozi pumpnih pulseva poboljšalo bi vremensku rezoluciju postava za faktor ≈ 2 . Nadalje, nadogradnjom translatora kristala za stvaranje bijele svjetlosti dodatno bi se smanjio šum bijele svjetlosti te bi se na taj način poboljšala detekcija slabih tranzijenata i smanjila duljina trajanja eksperimenta zbog smanjene potrebe za usrednjavanjem. Uz spomenuto, kompresijom bijele svjetlosti došlo bi do smanjenja intenziteta koherentnih artefakata što bi uvelike olakšalo analizu i obradu podataka. Također, kao predmet budućih istraživanja moguće je uz otopljene molekule u protočnim ćelijama koristiti i fotoaktivne materijale koji imaju potencijalnu primjenu u izgradnji solarnih ploča te općenito istražiti razne zanimljive fotoinducirane procese u području fizike kondenzirane materije. Uz dodatnu eksperimentalnu opremu eksperimentalni postav moguće je preoblikovati u postav za 2D elektronsku spektroskopiju čime se spektar mogućih istraživanja uvelike proširuje.

Literatura

1. Abraham, H. & Lemoine, J. Disparition instantanée du phénomène de Kerr. *CR Acad. Sci. Hebd Seances Acad. Sci. D* **129**, 206–208 (1899.).
2. Norrish, R. G. W. & Porter, G. Chemical reactions produced by very high light intensities. *Nature* **164**, 658–658 (1949.).
3. Dods, R., Båth, P., Morozov, D., Gagnér, V. A., Arnlund, D., Luk, H. L., Kübel, J., Maj, M., Vallejos, A., Wickstrand, C. *i dr.* Ultrafast structural changes within a photosynthetic reaction centre. *Nature* **589**, 310–314 (2021.).
4. Ullah, N., Chen, S. & Zhang, R. Adenine ultrafast photorelaxation via electron-driven proton transfer. *Physical Chemistry Chemical Physics* **23**, 23090–23095 (2021.).
5. Berera, R., van Grondelle, R. & Kennis, J. T. Ultrafast transient absorption spectroscopy: principles and application to photosynthetic systems. *Photosynthesis research* **101**, 105–118 (2009.).
6. Hargrove, L., Fork, R. L. & Pollack, M. Locking of He–Ne laser modes induced by synchronous intracavity modulation. *Applied Physics Letters* **5**, 4–5 (1964.).
7. Valdmanis, J. & Fork, R. Design considerations for a femtosecond pulse laser balancing self phase modulation, group velocity dispersion, saturable absorption, and saturable gain. *IEEE journal of quantum electronics* **22**, 112–118 (1986.).
8. Reid, G. D. & Wynne, K. Ultrafast laser technology and spectroscopy. *Encyclopedia of Analytical chemistry* **35** (2000.).
9. Krausz, F. & Ivanov, M. Attosecond physics. *Reviews of modern physics* **81**, 163 (2009.).
10. Zewail, A. *The Chemical bond: structure and dynamics* (Elsevier, 1992.).
11. Holzzapfel, W., Finkle, U., Kaiser, W., Oesterhelt, D., Scheer, H., Stolz, H. U. & Zinth, W. Initial electron-transfer in the reaction center from Rhodospirillum rubrum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 5168–5172 (1990.).
12. Arlt, T., Schmidt, S., Kaiser, W., Lauterwasser, C., Meyer, M., Scheer, H. & Zinth, W. The accessory bacteriochlorophyll: a real electron carrier in primary photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 11757–11761 (1993.).
13. Fron, E., Flors, C., Schweitzer, G., Habuchi, S., Mizuno, H., Ando, R., De Schryver, F. C., Miyawaki, A. & Hofkens, J. Ultrafast excited-state dynamics of the photoswitchable protein Dronpa. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 4870–4871 (2007.).

14. Changenet-Barret, P., Loukou, C., Ley, C., Lacombar, F., Plaza, P., Mallet, J.-M. & Martin, M. M. Primary photodynamics of a biomimetic model of photoactive yellow protein (PYP). *Physical Chemistry Chemical Physics* **12**, 13715–13723 (2010.).
15. Ishibashi, Y., Fujiwara, M., Umesato, T., Saito, H., Kobatake, S., Irie, M. & Miyasaka, H. Cyclization reaction dynamics of a photochromic diarylethene derivative as revealed by femtosecond to microsecond time-resolved spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C* **115**, 4265–4272 (2011.).
16. Kadakkuzha, B. M., Zhao, L. & Xia, T. Conformational distribution and ultrafast base dynamics of leadzyme. *Biochemistry* **48**, 3807–3809 (2009.).
17. Rokita, S. E. Reversible alkylation of DNA by quinone methides. *Quinone Methides*, 297–327 (2009.).
18. Wan, P., Brousmiche, D. W., Chen, C. Z., Cole, J., Lukeman, M. & Xu, M. Quinone methide intermediates in organic photochemistry. *Pure and Applied Chemistry* **73**, 529–534 (2001.).
19. Freccero, M. Quinone methides as alkylating and cross-linking agents. *Mini-Reviews in Organic Chemistry* **1**, 403–415 (2004.).
20. Wang, P., Song, Y., Zhang, L., He, H. & Zhou, X. Quinone methide derivatives: important intermediates to DNA alkylating and DNA cross-linking actions. *Current medicinal chemistry* **12**, 2893–2913 (2005.).
21. Ma, J., Šekutor, M., Škalamera, Đ., Basarić, N. & Phillips, D. L. Formation of Quinone Methides by Ultrafast Photodeamination: A Spectroscopic and Computational Study. *The Journal of organic chemistry* **84**, 8630–8637 (2019.).
22. Van De Water, R. W. & Pettus, T. R. o-Quinone methides: intermediates underdeveloped and underutilized in organic synthesis. *Tetrahedron* **58**, 5367–5406 (2002.).
23. Pathak, T. P. & Sigman, M. S. Applications of ortho-quinone methide intermediates in catalysis and asymmetric synthesis. *The Journal of organic chemistry* **76**, 9210–9215 (2011.).
24. Singh, M. S., Nagaraju, A., Anand, N. & Chowdhury, S. ortho-Quinone methide (o-QM): a highly reactive, ephemeral and versatile intermediate in organic synthesis. *RSC advances* **4**, 55924–55959 (2014.).
25. Peter, M. G. Chemical modifications of biopolymers by quinones and quinone methides. *Angewandte Chemie International Edition in English* **28**, 555–570 (1989.).
26. Sharma, A., Santos, I. O., Gaur, P., Ferreira, V. F., Garcia, C. R. & Da Rocha, D. R. Addition of thiols to o-quinone methide: new 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl [1, 4] naphthoquinones and their activity against the human malaria parasite Plasmodium falciparum (3D7). *European Journal of Medicinal Chemistry* **59**, 48–53 (2013.).
27. Thompson, D. C. & Perera, K. Inhibition of mitochondrial respiration by a para-quinone methide. *Biochemical and biophysical research communications* **209**, 6–11 (1995.).

28. Azoulay, M., Chalard, F., Gesson, J.-P., Florent, J.-C. & Monneret, C. 2-Nitro and 4-nitro-quinone-methides are not irreversible inhibitors of bovine β -glucuronidase. *Carbohydrate Research* **332**, 151–156 (2001.).
29. Huang, S.-T., Ting, K.-N. & Wang, K.-L. Development of a long-wavelength fluorescent probe based on quinone–methide-type reaction to detect physiologically significant thiols. *Analytica chimica acta* **620**, 120–126 (2008.).
30. Wan, P., Barker, B., Diao, L., Fischer, M., Shi, Y. & Yang, C. 1995 Merck Frosst Award Lecture Quinone methides: relevant intermediates in organic chemistry. *Canadian journal of chemistry* **74**, 465–475 (1996.).
31. Diao, L., Yang, C. & Wan, P. Quinone methide intermediates from the photolysis of hydroxybenzyl alcohols in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society* **117**, 5369–5370 (1995.).
32. Forjan, M., Zgrablić, G., Vdović, S., Šekutor, M., Basarić, N., Kabacinski, P., Frey, H.-M., Cannizzo, A., Cerullo, G. *in dr.* Photogeneration of Quinone Methide from Adamantylphenol in an Ultrafast Non-adiabatic Dehydration Reaction. *Physical Chemistry Chemical Physics* (2022.).
33. Forjan, M., Vdović, S., Šekutor, M., Škalamera, Đ., Kabacinski, P. & Cerullo, G. Photodehydration mechanisms of quinone methide formation from 2-naphthol derivatives. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 114171 (2022.).
34. Okamoto, H. & Yoshihara, K. Femtosecond time-resolved coherent Raman scattering from β -carotene in solution. Ultrahigh frequency (11 THz) beating phenomenon and sub-picosecond vibrational relaxation. *Chemical physics letters* **177**, 568–572 (1991.).
35. Fickenscher, M. & Laubereau, A. High-precision femtosecond CARS of simple liquids. *Journal of Raman spectroscopy* **21**, 857–861 (1990.).
36. Leonhardt, R., Holzapfel, W., Zinth, W. & Kaiser, W. Terahertz beats of vibrational modes studied by femtosecond coherent Raman spectroscopy. *Revue de physique appliquée* **22**, 1735–1741 (1987.).
37. Eichler, H. Laser-induced grating phenomena. *Optica Acta: International Journal of Optics* **24**, 631–642 (1977.).
38. Forjan, M. *Ultrabrza tranzijentna apsorpcija fotokemijskih reakcija* disertacija (University of Zagreb. Faculty of Science. Department of Physics, 2018.).
39. Boyd, R. W. *Nonlinear optics, 2nd edn San Diego* 2003.
40. Saghaei, H. & Ghanbari, A. White light generation using photonic crystal fiber with sub-micron circular lattice. *Journal of Electrical Engineering* **68**, 282 (2017.).
41. Skupin, S. & Bergé, L. Supercontinuum generation of ultrashort laser pulses in air at different central wavelengths. *Optics communications* **280**, 173–182 (2007.).
42. Dharmadhikari, J., Steinmeyer, G., Gopakumar, G., Mathur, D. & Dharmadhikari, A. Femtosecond supercontinuum generation in water in the vicinity of absorption bands. *Optics letters* **41**, 3475–3478 (2016.).

43. Liu, W., Kosareva, O., Golubtsov, I., Iwasaki, A., Becker, A., Kandidov, V. & Chin, S. Femtosecond laser pulse filamentation versus optical breakdown in H₂O. *Applied Physics B* **76**, 215–229 (2003.).
44. Fang, X.-J. & Kobayashi, T. Evolution of a super-broadened spectrum in a filament generated by an ultrashort intense laser pulse in fused silica. *Applied Physics B* **77**, 167–170 (2003.).
45. Bradler, M., Baum, P. & Riedle, E. Femtosecond continuum generation in bulk laser host materials with sub- μ J pump pulses. *Applied Physics B* **97**, 561–574 (2009.).
46. Dharmadhikari, J. A., Deshpande, R. A., Nath, A., Dota, K., Mathur, D. & Dharmadhikari, A. K. Effect of group velocity dispersion on supercontinuum generation and filamentation in transparent solids. *Applied Physics B* **117**, 471–479 (2014.).
47. Kohl-Landgraf, J., Nimsch, J.-E. & Wachtveitl, J. LiF, an underestimated supercontinuum source in femtosecond transient absorption spectroscopy. *Optics Express* **21**, 17060–17065 (2013.).
48. Birk, P., Stooß, V., Hartmann, M., Borisova, G. D., Blättermann, A., Heldt, T., Bartschat, K., Ott, C. & Pfeifer, T. Attosecond transient absorption of a continuum threshold. *Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics* **53**, 124002 (2020.).
49. Ajdarzadeh, A., Consani, C., Bräm, O., Tortschanoff, A., Cannizzo, A. & Chergui, M. Ultraviolet transient absorption, transient grating and photon echo studies of aqueous tryptophan. *Chemical physics* **422**, 47–52 (2013.).
50. Diels, J.-C. & Rudolph, W. *Ultrashort laser pulse phenomena* 404–407 (Elsevier, 2006.).
51. Kimura, Y., Alfano, J. C., Walhout, P. & Barbara, P. F. Ultrafast transient absorption spectroscopy of the solvated electron in water. *The Journal of Physical Chemistry* **98**, 3450–3458 (1994.).
52. Dey, D. & Tiwari, A. K. Controlling Chemical Reactions with Laser Pulses. *ACS omega* **5**, 17857–17867 (2020.).
53. Lorenc, M., Ziolk, M., Naskrecki, R., Karolczak, J., Kubicki, J. & Maciejewski, A. Artifacts in femtosecond transient absorption spectroscopy. *Applied Physics B* **74**, 19–27 (2002.).
54. Ziolk, M., Lorenc, M. & Naskrecki, R. Determination of the temporal response function in femtosecond pump-probe systems. *Applied Physics B* **72**, 843–847 (2001.).
55. Rasmusson, M., Tarnovsky, A. N., Åkesson, E. & Sundström, V. On the use of two-photon absorption for determination of femtosecond pump-probe cross-correlation functions. *Chemical physics letters* **335**, 201–208 (2001.).
56. Baldeck, P., Ho, P. & Alfano, R. R. *The Supercontinuum Laser Source* 117–183 (Springer, 1989.).
57. Agrawal, G. P., Baldeck, P. & Alfano, R. Temporal and spectral effects of cross-phase modulation on copropagating ultrashort pulses in optical fibers. *Physical Review A* **40**, 5063 (1989.).

58. Slavov, C., Hartmann, H. & Wachtveitl, J. Implementation and evaluation of data analysis strategies for time-resolved optical spectroscopy. *Analytical chemistry* **87**, 2328–2336 (2015.).
59. Millar, D., Shah, R. & Zewail, A. Picosecond saturation spectroscopy of cresyl violet: rotational diffusion by a “sticking” boundary condition in the liquid phase. *Chemical Physics Letters* **66**, 435–440 (1979.).
60. Weiner, A. *Ultrafast optics* 437 (John Wiley & Sons, 2011.).
61. Chen, Z., Zhu, M., Ren, T., He, J., Loh, K. P. & Xu, Q.-H. Transient Reflection Spectroscopy on Ultrafast Interlayer Charge Transfer Processes in a MoS₂/WSe₂ van der Waals Heterojunction. *The Journal of Physical Chemistry C* **125**, 26575–26582 (2021.).
62. Kawato, S. & Kinoshita Jr, K. Time-dependent absorption anisotropy and rotational diffusion of proteins in membranes. *Biophysical Journal* **36**, 277–296 (1981.).
63. Kühne, T. & Vöhringer, P. Transient anisotropy and fragment rotational excitation in the femtosecond photodissociation of triiodide in solution. *The Journal of Physical Chemistry A* **102**, 4177–4185 (1998.).
64. Potma, E. O., De Boeij, W. P. & Wiersma, D. A. Femtosecond dynamics of intracellular water probed with nonlinear optical Kerr effect microspectroscopy. *Biophysical Journal* **80**, 3019–3024 (2001.).
65. Fee, R. & Maroncelli, M. Estimating the time-zero spectrum in time-resolved emission measurements of solvation dynamics. *Chemical Physics* **183**, 235–247 (1994.).
66. Gustavsson, T., Baldacchino, G., Mialocq, J.-C. & Pommeret, S. A femtosecond fluorescence up-conversion study of the dynamic Stokes shift of the DCM dye molecule in polar and non-polar solvents. *Chemical physics letters* **236**, 587–594 (1995.).
67. Jimenez, R., Fleming, G. R., Kumar, P. & Maroncelli, M. Femtosecond solvation dynamics of water. *Nature* **369**, 471–473 (1994.).
68. Albrecht, C. *Joseph R. Lakowicz: Principles of fluorescence spectroscopy* 2008.
69. Hof, M., Hutterer, R. & Fidler, V. *Fluorescence spectroscopy in biology: advanced methods and their applications to membranes, proteins, DNA, and cells* (Springer Science & Business Media, 2004.).
70. Xu, J. & Knutson, J. R. Ultrafast fluorescence spectroscopy via upconversion: applications to biophysics. *Methods in enzymology* **450**, 159–183 (2008.).
71. Cannizzo, A., Bräm, O., Zgrablic, G., Tortschanoff, A., Oskouei, A. A., van Mourik, F. & Chergui, M. Femtosecond fluorescence upconversion setup with broadband detection in the ultraviolet. *Optics letters* **32**, 3555–3557 (2007.).
72. Chosrowjan, H., Taniguchi, S. & Tanaka, F. Ultrafast fluorescence upconversion technique and its applications to proteins. *The FEBS Journal* **282**, 3003–3015 (2015.).
73. Fuller, F. D., Wilcox, D. E. & Ogilvie, J. P. Pulse shaping based two-dimensional electronic spectroscopy in a background free geometry. *Optics Express* **22**, 1018–1027 (2014.).

74. Brida, D., Manzoni, C. & Cerullo, G. Phase-locked pulses for two-dimensional spectroscopy by a birefringent delay line. *Optics letters* **37**, 3027–3029 (2012.).
75. Brixner, T., Stiopkin, I. V. & Fleming, G. R. Tunable two-dimensional femtosecond spectroscopy. *Optics letters* **29**, 884–886 (2004.).
76. Cowan, M., Ogilvie, J. & Miller, R. Two-dimensional spectroscopy using diffractive optics based phased-locked photon echoes. *Chemical Physics Letters* **386**, 184–189 (2004.).
77. Cho, M., Brixner, T., Stiopkin, I., Vaswani, H. & Fleming, G. R. Two dimensional electronic spectroscopy of molecular complexes. *Journal of the Chinese Chemical Society* **53**, 15–24 (2006.).
78. Pommeret, S., Gustavsson, T., Naskrecki, R., Baldacchino, G. & Mialocq, J.-C. Femtosecond absorption and emission spectroscopy of the DCM laser dye. *Journal of molecular liquids* **64**, 101–112 (1995.).
79. Mataga, N., Kaifu, Y. & Koizumi, M. Solvent effects upon fluorescence spectra and the dipole moments of excited molecules. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **29**, 465–470 (1956.).
80. Lippert, E. Dipolmoment und Elektronenstruktur von angeregten Molekülen. *Zeitschrift für Naturforschung A* **10**, 541–545 (1955.).
81. Lippert, E. v. Spektroskopische Bestimmung des Dipolmomentes aromatischer Verbindungen im ersten angeregten Singulettzustand. *Zeitschrift für Elektrochemie, Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **61**, 962–975 (1957.).
82. Boldrini, B., Cavalli, E., Painelli, A. & Terenziani, F. Polar dyes in solution: A joint experimental and theoretical study of absorption and emission band shapes. *The Journal of Physical Chemistry A* **106**, 6286–6294 (2002.).
83. Snellenburg, J. J., Liptonok, S. P., Seger, R., Mullen, K. M. & van Stokkum, I. H. M. Glotaran: a Java-based Graphical User Interface for the R-package TIMP. *Journal of Statistical Software* **49**, 1–22. http://www.jstatsoft.org/v49/%5C_%5C_i03/ (2012.).
84. Meyer, M., Mialocq, J. & Rougee, M. Fluorescence lifetime measurements of the two isomers of the laser dye DCM. *Chemical physics letters* **150**, 484–490 (1988.).
85. Belanger, P.-A. & Pare, C. Self-focusing of Gaussian beams: an alternate derivation. *Applied Optics* **22**, 1293–1295 (1983.).
86. Salin, F., Squier, J. & Piché, M. Mode locking of Ti: Al₂O₃ lasers and self-focusing: a Gaussian approximation. *Optics letters* **16**, 1674–1676 (1991.).
87. Strickland, D. & Mourou, G. Compression of amplified chirped optical pulses. *Optics communications* **55**, 447–449 (1985.).
88. Borrego-Varillas, R., Ganzer, L., Cerullo, G. & Manzoni, C. Ultraviolet transient absorption spectrometer with sub-20-fs time resolution. *Applied Sciences* **8**, 989 (2018.).
89. Schanz, R., Kovalenko, S., Kharlanov, V. & Ernsting, N. Broad-band fluorescence upconversion for femtosecond spectroscopy. *Applied Physics Letters* **79**, 566–568 (2001.).

90. Trebino, R., DeLong, K. W., Fittinghoff, D. N., Sweetser, J. N., Krumbügel, M. A., Richman, B. A. & Kane, D. J. Measuring ultrashort laser pulses in the time-frequency domain using frequency-resolved optical gating. *Review of Scientific Instruments* **68**, 3277–3295 (1997.).
91. Iaconis, C. & Walmsley, I. A. Spectral phase interferometry for direct electric-field reconstruction of ultrashort optical pulses. *Optics letters* **23**, 792–794 (1998.).
92. Bai, W.-J., David, J. G., Feng, Z.-G., Weaver, M. G., Wu, K.-L. & Pettus, T. R. The domestication of ortho-quinone methides. *Accounts of chemical research* **47**, 3655–3664 (2014.).
93. Dyall, L. & Winstein, S. Nuclear magnetic resonance spectra and characterization of some quinone methides. *Journal of the American Chemical Society* **94**, 2196–2199 (1972.).
94. Škalamera, Đ., Husak, A. & Šumanovac Ramljak, T. Kinon-metidi (II. dio): Fotokemijsko generiranje i razvoj primjene u fotokemoterapiji (2017.).
95. Bajpai, V. K., Na, M. & Kang, S. C. The role of bioactive substances in controlling foodborne pathogens derived from *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Food and Chemical Toxicology* **48**, 1945–1949 (2010.).
96. Kolak, U., Kabouche, A., Öztürk, M., Kabouche, Z., Topçu, G. & Ulubelen, A. Antioxidant diterpenoids from the roots of *Salvia barrelieri*. *Phytochemical analysis* **20**, 320–327 (2009.).
97. Kusumoto, N., Ashitani, T., Murayama, T., Ogiyama, K. & Takahashi, K. Antifungal abietane-type diterpenes from the cones of *Taxodium distichum* Rich. *Journal of chemical ecology* **36**, 1381–1386 (2010.).
98. Kusumoto, N., Ashitani, T., Hayasaka, Y., Murayama, T., Ogiyama, K. & Takahashi, K. Antitermitic activities of abietane-type diterpenes from *Taxodium distichum* cones. *Journal of chemical ecology* **35**, 635–642 (2009.).
99. Arumugam, S., Guo, J., Mbuja, N. E., Friscourt, F., Lin, N., Nekongo, E., Boons, G.-J. & Popik, V. V. Selective and reversible photochemical derivatization of cysteine residues in peptides and proteins. *Chemical science* **5**, 1591–1598 (2014.).
100. Jiang, J., Zeng, D. & Li, S. Photogenerated quinone methides as protein affinity labeling reagents. *ChemBioChem* **10**, 635–638 (2009.).
101. Leary, G. Quinone methides and the structure of lignin. *Wood Science and Technology* **14**, 21–34 (1980.).
102. Basarić, N., Cindro, N., Bobinac, D., Mlinarić-Majerski, K., Uzelac, L., Kralj, M. & Wan, P. Sterically congested quinone methides in photodehydration reactions of 4-hydroxybiphenyl derivatives and investigation of their antiproliferative activity. *Photochemical & Photobiological Sciences* **10**, 1910–1925 (2011.).
103. Basarić, N., Cindro, N., Bobinac, D., Uzelac, L., Mlinarić-Majerski, K., Kralj, M. & Wan, P. Zwitterionic biphenyl quinone methides in photodehydration reactions of 3-hydroxybiphenyl derivatives: laser flash photolysis and antiproliferation study. *Photochemical & Photobiological Sciences* **1**, 381–396 (2002.).

104. Asakawa, Y. & Herz, W. Progress in the chemistry of organic natural products (1995.).
105. Qiao, G. G., Lenghaus, K., Solomon, D. H., Reisinger, A., Bytheway, I. & Wentrup, C. 4, 6-Dimethyl-o-quinone methide and 4, 6-dimethylbenzoxete. *The Journal of Organic Chemistry* **63**, 9806–9811 (1998.).
106. Gomberg, M. ON TRIPHENYLMETHYL. XXIII. TAUTOMERISM OF THE HYDROXY-TRIPHENYL CARBINOLS. *Journal of the American Chemical Society* **35**, 1035–1042 (1913.).
107. Modica, E., Zanaletti, R., Freccero, M. & Mella, M. Alkylation of amino acids and glutathione in water by o-quinone methide. Reactivity and selectivity. *The Journal of organic chemistry* **66**, 41–52 (2001.).
108. Škalamera, Đ., Bohne, C., Landgraf, S. & Basaric, N. Photodeamination reaction mechanism in aminomethyl p-cresol derivatives: different reactivity of amines and ammonium salts. *The journal of organic chemistry* **80**, 10817–10828 (2015.).
109. Yang, Y., Ma, Y., Zhao, Y., Zhao, Y. & Li, Y. Theoretical investigation of the reaction mechanism of photodeamination induced by excited-state intramolecular proton transfer of cresol derivatives. *The Journal of Physical Chemistry A* **122**, 1011–1018 (2018.).
110. Chiang, Y., Kresge, A. J. & Zhu, Y. Kinetics and mechanisms of hydration of o-quinone methides in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society* **122**, 9854–9855 (2000.).
111. Chiang, Y., Kresge, A. & Zhu, Y. Flash Photolytic Generation of o rtho-Quinone Methide in Aqueous Solution and Study of Its Chemistry in that Medium. *Journal of the American Chemical Society* **123**, 8089–8094 (2001.).
112. Arumugam, S. & Popik, V. V. Photochemical generation and the reactivity of o-naphthoquinone methides in aqueous solutions. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 11892–11899 (2009.).
113. Takaishi, N., Inamoto, Y., Fujikura, Y., Aigami, K. & Goričnik, B. Kata Mlinarić-Majerski–List of Publications.
114. Škalamera, Đ., Antol, I., Mlinarić-Majerski, K., Vančik, H., Phillips, D. L., Ma, J. & Basarić, N. Ultrafast Adiabatic Photodehydration of 2-Hydroxymethylphenol and the Formation of Quinone Methide. *Chemistry–A European Journal* **24**, 9426–9435 (2018.).
115. Škalamera, Đ., Mlinaric-Majerski, K., Martin Kleiner, I., Kralj, M., Oake, J., Wan, P., Bohne, C. & Basaric, N. Photochemical formation of anthracene quinone methide derivatives. *The Journal of Organic Chemistry* **82**, 6006–6021 (2017.).
116. Basaric, N., Zabcic, I., Mlinaric-Majerski, K. & Wan, P. Photochemical formation and chemistry of long-lived adamantylidene-quinone methides and 2-adamantyl cations. *The Journal of Organic Chemistry* **75**, 102–116 (2010.).
117. Veljković, J., Uzelac, L., Molcanov, K., Mlinaric-Majerski, K., Kralj, M., Wan, P. & Basaric, N. Sterically congested adamantyl-naphthalene quinone methides. *The Journal of Organic Chemistry* **77**, 4596–4610 (2012.).

118. Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Li, X., Caricato, M., Marenich, A. V., Bloino, J., Janesko, B. G., Gomperts, R., Mennucci, B., Hratchian, H. P., Ortiz, J. V., Izmaylov, A. F., Sonnenberg, J. L., Williams-Young, D., Ding, F., Lipparini, F., Egidi, F., Goings, J., Peng, B., Petrone, A., Henderson, T., Ranasinghe, D., Zakrzewski, V. G., Gao, J., Rega, N., Zheng, G., Liang, W., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Throssell, K., Montgomery Jr., J. A., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M. J., Heyd, J. J., Brothers, E. N., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Keith, T. A., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A. P., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Millam, J. M., Klene, M., Adamo, C., Cammi, R., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Farkas, O., Foresman, J. B. & Fox, D. J. *Gaussian~16 Revision C.01* Gaussian Inc. Wallingford CT. 2016.
119. Chai, J.-D. & Head-Gordon, M. Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom–atom dispersion corrections. *Physical Chemistry Chemical Physics* **10**, 6615–6620 (2008.).
120. Tomasi, J., Mennucci, B. & Cammi, R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chemical reviews* **105**, 2999–3094 (2005.).
121. Neese, F. Wiley interdiscip. *Rev.: Comput. Mol. Sci* **2**, 73–78 (2012.).
122. Neese, F. Software update: the ORCA program system, version 4.0. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* **8**, e1327 (2018.).
123. Doan, S. C. & Schwartz, B. J. Nature of excess electrons in polar fluids: Anion-solvated electron equilibrium and polarized hole-burning in liquid acetonitrile. *The journal of physical chemistry letters* **4**, 1471–1476 (2013.).
124. Doan, S. C. & Schwartz, B. J. Ultrafast studies of excess electrons in liquid acetonitrile: revisiting the solvated electron/solvent dimer anion equilibrium. *The Journal of Physical Chemistry B* **117**, 4216–4221 (2013.).
125. Siano, G., Crespi, S. & Bonesi, S. M. Direct Irradiation of Phenol and Para-Substituted Phenols with a Laser Pulse (266 nm) in Homogeneous and Micro-heterogeneous Media. A Time-Resolved Spectroscopy Study. *The Journal of Organic Chemistry* **85**, 14012–14025 (2020.).
126. Land, E. & Porter, G. Primary photochemical processes in aromatic molecules. Part 7.—Spectra and kinetics of some phenoxy derivatives. *Transactions of the Faraday Society* **59**, 2016–2026 (1963.).
127. Arumugam, S. & Popik, V. V. Light-induced hetero-Diels- Alder cycloaddition: a facile and selective photoclick reaction. *Journal of the American Chemical Society* **133**, 5573–5579 (2011.).
128. Arumugam, S. & Popik, V. V. Patterned surface derivatization using Diels–Alder photoclick reaction. *Journal of the American Chemical Society* **133**, 15730–15736 (2011.).

129. Arumugam, S. & Popik, V. V. Attach, remove, or replace: Reversible surface functionalization using thiol–quinone methide photoclick chemistry. *Journal of the American Chemical Society* **134**, 8408–8411 (2012.).
130. Arumugam, S., Orski, S. V., Locklin, J. & Popik, V. V. Photoreactive polymer brushes for high-density patterned surface derivatization using a Diels–Alder photoclick reaction. *Journal of the American Chemical Society* **134**, 179–182 (2012.).
131. Mohan, H., Hermann, R., Naumov, S., Mittal, J. & Brede, O. Two channels of electron transfer observed for the reaction of n-butyl chloride parent radical cations with naphthols and hydroxybiphenyls. *The Journal of Physical Chemistry A* **102**, 5754–5762 (1998.).
132. Gadosy, T., Shukla, D. & Johnston, L. Generation, characterization, and deprotonation of phenol radical cations. *The Journal of Physical Chemistry A* **103**, 8834–8839 (1999.).
133. Carmichael, I. & Hug, G. L. Triplet–triplet absorption spectra of organic molecules in condensed phases. *Journal of physical and chemical reference data* **15**, 1–250 (1986.).
134. Kleinman, M. H., Flory, J. H., Tomalia, D. A. & Turro, N. J. Effect of protonation and PAMAM dendrimer size on the complexation and dynamic mobility of 2-naphthol. *The Journal of Physical Chemistry B* **104**, 11472–11479 (2000.).
135. Pretali, L., Doria, F., Verga, D., Profumo, A. & Freccero, M. Photoarylation/alkylation of bromonaphthols. *The Journal of organic chemistry* **74**, 1034–1041 (2009.).
136. Neta, P. & Grodkowski, J. Rate constants for reactions of phenoxy radicals in solution. *Journal of physical and chemical reference data* **34**, 109–199 (2005.).
137. Del Valle, J. Catalán J. Kasha's rule: A reappraisal. *Phys. Chem. Chem. Phys* **21**, 10061–10069 (2019.).
138. Zhu, S., Zhang, J., Vegesna, G., Luo, F.-T., Green, S. A. & Liu, H. Highly water-soluble neutral BODIPY dyes with controllable fluorescence quantum yields. *Organic letters* **13**, 438–441 (2011.).
139. Loudet, A. & Burgess, K. BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties. *Chemical reviews* **107**, 4891–4932 (2007.).
140. Ulrich, G., Ziessel, R. & Harriman, A. The chemistry of fluorescent bodipy dyes: versatility unsurpassed. *Angewandte Chemie International Edition* **47**, 1184–1201 (2008.).
141. Shah, M., Thangaraj, K., Soong, M.-L., Wolford, L. T., Boyer, J. H., Politzer, I. R. & Pavlopoulos, T. G. Pyrromethene–BF₂ complexes as laser dyes: 1. *Heteroatom Chemistry* **1**, 389–399 (1990.).
142. Karolin, J., Johansson, L. B.-A., Strandberg, L. & Ny, T. Fluorescence and absorption spectroscopic properties of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY) derivatives in liquids, lipid membranes, and proteins. *Journal of the American Chemical Society* **116**, 7801–7806 (1994.).
143. Zlatic, K., Antol, I., Uzelac, L., Mikecin Dražić, A.-M., Kralj, M., Bohne, C. & Basarić, N. Labeling of Proteins by BODIPY-Quinone Methides Utilizing Anti-Kasha Photochemistry. *ACS Applied Materials & Interfaces* **12**, 347–351 (2019.).

144. Yan, Y., Sukhanov, A. A., Bousquet, M. H., Guan, Q., Zhao, J., Voronkova, V. K., Escudero, D., Barbon, A., Xing, Y., Gurzadyan, G. G. *in* *dr*: Does Twisted π -Conjugation Framework Always Induce Efficient Intersystem Crossing? A Case Study with Benzo [b]-and [a] Phenanthrene-Fused BODIPY Derivatives and Identification of a Dark State. *The Journal of Physical Chemistry B* **125**, 6280–6295 (2021.).

Životopis

Mateo Forjan rođen je 25.4.1994. u Zagrebu. 2013. godine završio je opći smjer gimnazije u Srednjoj školi Čazma. 2018. diplomirao je fiziku, smjer istraživački na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu (PMF) Sveučilišta u Zagrebu te steče zvanje *mag.phys.* U studenom 2018. započinje rad u Laboratoriju za femtosekundnu spektroskopiju na Institutu za fiziku (IF) u Zagrebu na mjestu asistenta. Iste godine upisuje doktorski studij fizike na PMF-u u Zagrebu, smjer atomska i molekularna fizika. Rad na IF-u usmjeren je prema izgradnji eksperimentalnog postava za ultrabrznu tranzijentnu apsorpciju te proučavanju i analiziranju ultrabrze dinamike međuprodukata sa potencijalnom primjenom u biologiji i kemiji. Tijekom doktorskog studija i rada na IF-u objavljuje 2 rada u časopisima s međunarodnom recenzijom gdje je glavni autor te sudjeluje na nekoliko međunarodnih skupova gdje pridonosi predavanjima ili posterima.

Popis objavljenih radova

Radovi u časopisima s međunarodnom recenzijom

1. Forjan, M., Zgrablić, G., Vdović, S., Šekutor, M., Basarić, N., Kabacinski, P., Pashaki, M.N.H., Frey, H.M., Cannizzo, A. and Cerullo, G., 2022. Photogeneration of quinone methide from adamantylphenol in an ultrafast non-adiabatic dehydration reaction. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 24(7), pp.4384-4393.
2. Forjan, M., Vdović, S., Šekutor, M., Škalamera, Đ., Kabaciński, P. and Cerullo, G., 2022. Photodehydration mechanisms of quinone methide formation from 2-naphthol derivatives. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 433, p.114171.

Sažeci u zbornicima skupova

1. Forjan, Mateo; Vdović, Silvije; Basarić, Nikola Ultrafast Photogeneration of Quinone Methides from Naphthol Derivatives // Book of Abstract : EGAS52 Virtual Conference /

- Buhin, Danijel (ur.). Zagreb, 2021. str. 119-119
2. Forjan, Mateo; Vdović, Silvije; Basarić, Nikola; Šekutor, Marina; Kabacinski, Piotr; Cerrullo, Giulio Ultrafast Transient Absorption of Phenolic and Adamantyl Compounds // CECF 2020 “Central European Conference on Photochemistry” - Book of Abstracts / Chauvin, Jérôme ; Cibulka, Radek ; D’Auria, Maurizio ; Kumpulainen, Tatu ; Strehmel, Bernd (ur.). Bad Hofgastein, Austrija, 2020. str. 68-68
 3. Forjan, Mateo; Vdović, Silvije; Basarić, Nikola; Šekutor, Marina; Kabacinski, Piotr; Cerrullo, Giulio Ultrafast Transient Absorption of Phenolic and Adamantyl Compounds // Laserlab-Europe User Meeting / Arnaut, Luis (ur.). Coimbra, Portugal, 2019. str. 18-18
 4. Forjan, Mateo; Šekutor Marina; Basarić, Nikola; Vdović, Silvije Ultrafast Transient Absorption of Adamantyl-Phenol // Ultrafast Optics 2019: Abstract Book / Jovanović, Igor ; Resan, Bojan ; Osvay, Károly ; Coslovich, Giacomo (ur.). Bol, Hrvatska: SPIE, 2019. str. 502-504
 5. Brusar, Vedran; Forjan, Mateo; Vdović Silvije; Basarić, Nikola; Alešković Marija Ultrafast Transient Absorption of Diazoalkanes // 28th PhotoIUPAC 2022 - Book of Abstracts / Amsterdam, Nizozemska, 2022. str. 233