

# Fluoreszenzspektroskopie

## Vorausgesetzte Kenntnisse

Aufbauprinzipien von Atomen und Molekülen, Absorption und Emission von Licht, Grundaufbau optischer Spektrometer, Absorptionsspektroskopie, Lambert-Beersches Gesetz, Jablonski-Diagramm.

## Literatur

- [1] M. Zander, "Fluorimetrie", Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1981
- [2] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, "Instrumentelle pharmazeutische Analytik", Wiss. Verlagsgesellschaft. Stuttgart, 2. Aufl., 1992
- [3] Landoldt- Börnstein, Zahlenwerte und Tabelle, Neue Serie, Gruppe II, Band 3, "Lumineszenz organischer Substanzen", Springer- Verl. Berlin-Heidelberg-New York 1967

## Ziel des Versuches

Mit dem Versuch sollen Kenntnisse über apparative Grundlagen und über Anwendungen der Fluoreszenzspektroskopie vermittelt werden. Das Prinzip der Fluoreszenzspektroskopie und der Zusammenhang zwischen Absorption und Fluoreszenz wird durch qualitative Untersuchungen mit Hilfe einer einfachen Messapparatur studiert.

Mit einem modernen Fluoreszenzdetektor wird eine Standardsubstanz (Chininsulfat) fluoreszenzspektroskopisch charakterisiert, die Beeinflussung der Fluoreszenz durch Fremdstoffe demonstriert und die Nachweisgrenze der Methode abgeschätzt.

## Einführung und Meßmethode

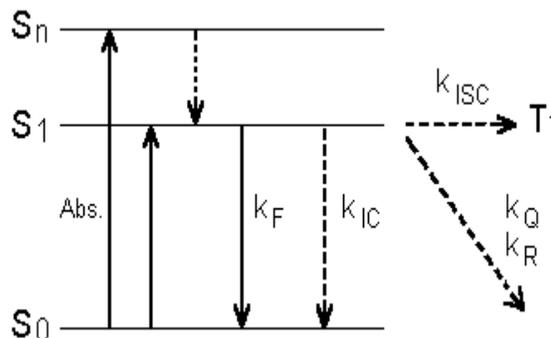
### 1. Jablonski- Diagramm

Bei einer großen Zahl organischer Verbindungen, insbesondere bei ungesättigten Kohlenwasserstoffen, kann man nach Einstrahlung in deren Absorptionsbande eine Emission von Licht, die Fluoreszenz, beobachten.

Fluoreszenzemission und strahlungslose Desaktivierungsprozesse organischer Verbindungen lassen sich mit dem Jablonski- Diagramm beschreiben:

Bei Zimmertemperatur befinden sich die meisten Moleküle im niedrigsten Schwingungszustand des Elektronengrundzustandes ( $S_0$ ). Absorption von Licht führt in einem Elektronenschwingungsübergang zu einem angeregten Singulettzustand  $S_n$  einer Energie entsprechend der des absorbierten Photons.

Innerhalb von  $10^{-13}$  s bis  $10^{-11}$  s relaxiert das Molekül zum niedrigsten angeregten Elektronenzustand  $S_1$ , der eine Lebensdauer in der Größenordnung von  $10^{-9}$  s (Nanosekunden) hat. Von diesem Zustand aus erfolgen die Fluoreszenz (Kasha- Regel) und strahlungslose Prozesse wie die Rückkehr in den Elektronengrundzustand  $S_0$  (internal conversion (IC)), der Übergang in das Triplettssystem (intersystem crossing (ISC)), Fluoreszenzlöschung (Q) durch Elektronen-, Protonen- oder Energietransfer sowie photochemische Reaktionen (R).



Die Lebensdauer des  $S_1$ -Zustandes wird durch die Geschwindigkeitskonstanten der beteiligten Desaktivierungsprozesse entsprechend Gl.(1) bestimmt.

$$\tau = \frac{I}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} + \dots} \quad (1)$$

Die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F$  lässt sich mit den Geschwindigkeitskonstanten durch Gl.(2) ausdrücken:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} + \dots} \quad (2)$$

## 2. Messgrößen der Fluoreszenz

Nach Anregung einer fluoreszierenden Probe mit Licht der Intensität  $I_0(\lambda')$  der Wellenlänge  $\lambda'$  wird ein Teil der absorbierten Energie wieder in Form von Strahlung der Intensität  $I_F(\lambda, \lambda')$  bei der Wellenlänge  $\lambda$  emittiert, die Informationen über die Eigenschaften der Probe enthält.

Die Messgrößen der Fluoreszenzspektroskopie sind folgende:

### a) Fluoreszenzintensität

Sie wird im wesentlichen durch die Konzentration und den Extinktionskoeffizienten (bei  $\lambda'$ ) des fluoreszierenden Stoffes, seine Fluoreszenzquantenausbeute und die Anregungsenergie bestimmt. Die Fluoreszenzquantenausbeute lässt sich über die Messung der Zahl der emittierten ( $N_F$ ) und der Zahl der absorbierten ( $N_A$ ) Photonen bestimmen:  $\Phi_F = N_F / N_A$ , ( $0 \leq \Phi \leq 1$ ).

Tabelle 1 enthält die Werte für die Fluoreszenzquantenausbeuten einiger bekannter Verbindungen.

Tabelle 1:

Fluoreszenzquantenausbeuten  $\Phi_F$ , Fluoreszenzlebensdauer und Geschwindigkeitskonstanten der Fluoreszenz  $k_F$  ausgewählter Verbindungen in verdünnter Lösung bei Raumtemperatur

Verbindung, Lösungsmittel	$\Phi_F$	$\tau$ / ns	$k_F / 10^6 \text{s}^{-1}$
Benzen / Cyclohexan	0.058	29	2
Naphthalen / Cyclohexan	0.19	96	2
Anthracen / Cyclohexan	0.30	4.9	61
p-Terphenyl / Cyclohexan	0.77	0.95	810
Chininsulfat / 0.1n H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.55	20	27
Fluorescein / 0.1n NaOH	0.95	3.6	260

### b) Fluoreszenzspektrum

Fluoreszenzspektren werden durch Auftragung der Fluoreszenzintensität über der Wellenlänge (Wellenzahl) dargestellt (Bild 1). Spektrenform und Lage sind charakteristisch für das emittierende System und enthalten Informationen über die energetische Lage der beteiligten Zustände.

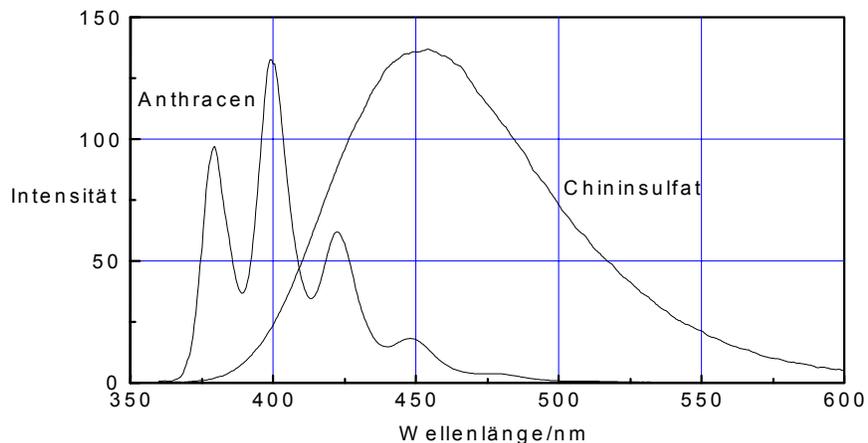


Bild 1: Fluoreszenzspektren verdünnter Lösungen ( $10^{-5}$  molar) von Anthracen (1) in Cyclohexan und von Chininsulfat (2) in  $0.1\text{N H}_2\text{SO}_4$

### c) Fluoreszenzlebensdauer

Sie gibt einen Einblick in die Zeitskala der Prozesse im angeregten Zustand und bestimmt den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität nach Impulsanregung entsprechend Gleichung (3) (Bild 2).

$$I_F(t) = I_F(0)e^{-t/\tau} \quad (3)$$

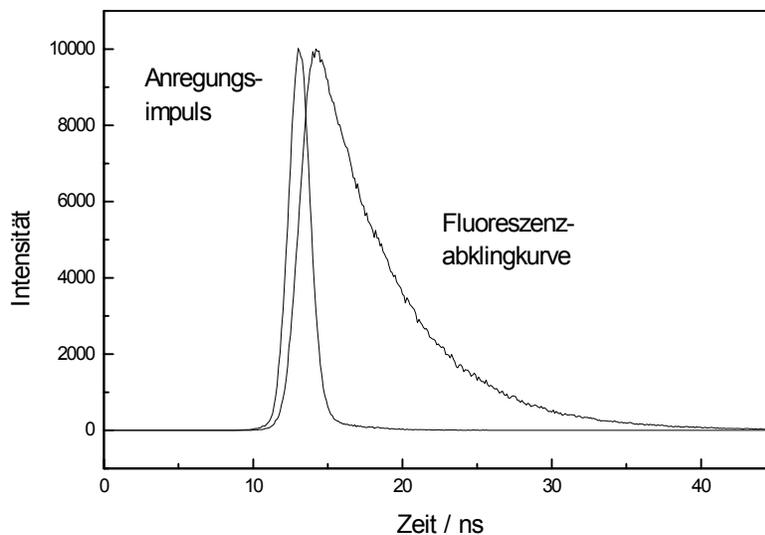


Bild 2: Anregungsimpuls (1) (Stickstofflaser,  $\lambda' = 337\text{ nm}$ ) und Fluoreszenzabklingkurve (2) ( $\lambda = 400\text{ nm}$ ) von Anthracen in Cyclohexan.

#### d) Fluoreszenzpolarisation

Sie liefert Informationen über Rotationsprozesse im angeregten Zustand bzw. der Mikroumgebung des fluoreszierenden Moleküls und ermöglicht die Trennung von Übergängen unterschiedlicher Orientierung im Absorptionsspektrum.

### 3. Aufbau eines Spektralfluorimeters

Der Aufbau eines Spektralfluorimeters ist schematisch in Bild 3 dargestellt. Es enthält folgende Elemente:

- eine Lichtquelle, die im UV/VIS-Bereich emittiert,
- Monochromatoren zur Selektion der Anregungswellenlänge bzw. zur Analyse des Fluoreszenzlichtes,
- den Probenraum,
- optische Elemente zur Beleuchtung der Probe und zur Abbildung des Fluoreszenzlichtes,
- einen photoelektrischen Empfänger,
- Elektronik und Rechentechnik zur Signalverarbeitung, Speicherung und Darstellung.

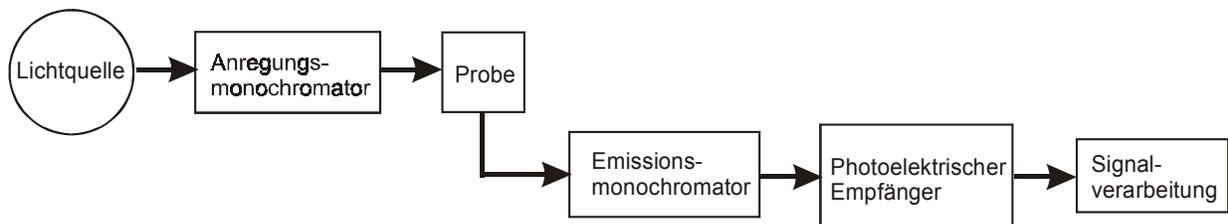


Bild 3: Aufbau eines Spektralfluorimeters

Als Anregungslichtquellen werden häufig Quecksilber- und Xenondampflampen eingesetzt.

Quecksilberdampflampen emittieren ein Linienspektrum mit hohen Intensitäten in den Linien (bei 254, 313, 365/66, 405, 546, 577, 630 nm ...) über einem intensitätsschwachen kontinuierlichen Untergrund.

Xenonlampen haben ein kontinuierliches Emissionsspektrum, dessen Intensität im UV-Bereich allerdings abnimmt.

Wichtige Eigenschaften von Monochromatoren sind ihre Lichtstärke, die spektrale Spaltbreite sowie die Streulichtfreiheit. In modernen Geräten werden abbildende holographische Gitter verwendet. Alle optischen Elemente wie Linsen, Gitter, Spiegel und Strahlteiler beeinflussen durch ihre spektrale Charakteristik die Intensität und Polarisation der reflektierten und transmittierten Strahlung in Abhängigkeit von der Wellenlänge.

Als Photometer werden i.a. Photovervielfacher eingesetzt, die auf Grund ihrer hohen Verstärkung ( $10^6$  bis  $10^8$ ) auch die Messung geringster Lichtintensitäten bis zum Nachweis einzelner Photonen ermöglichen. In Abhängigkeit vom Material der Photokathode unterscheiden sich verschiedene Typen von Photoempfängern in ihrer absoluten und spektralen Empfindlichkeit. Die Verstärkung des Photovervielfachers hängt von der angelegten Spannung ab.

#### 4. Messung von Fluoreszenzspektren und Fluoreszenzanregungsspektren

Das Messsignal  $M(\lambda, \lambda')$  der Apparatur, das bei Messung der Fluoreszenz  $I_F(\lambda, \lambda')$  erhalten wird ( $\lambda'$ : Anregungswellenlänge,  $\lambda$ : Emissionswellenlänge), lässt sich wie folgt darstellen:

$$M(\lambda, \lambda') \approx S(\lambda) \cdot I_F(\lambda, \lambda') \quad (4)$$

mit

$$I_F(\lambda, \lambda') = \Phi_F \cdot f(\lambda) \cdot I_{abs}(\lambda') \quad (5)$$

und

$$I_{abs}(\lambda') = I_0(\lambda') \cdot (1 - 10^{-A(\lambda')}) \quad (6)$$

- $I_0(\lambda')$  - spektrale Intensitätsverteilung des Anregungslichtes
- $I_{abs}(\lambda')$  - absorbierte Intensität
- $A(\lambda')$  - Absorbanz der Probe bei der Anregungswellenlänge
- $S(\lambda)$  - spektrale Empfindlichkeit des Photoempfängers
- $f(\lambda)$  - Fluoreszenzspektrum
- $\Phi_F$  - Fluoreszenzquantenausbeute

Für das gemessene Fluoreszenzspektrum ( $\lambda'$  und  $I_{abs}(\lambda') = \text{const.}$ ) gilt:

$$M(\lambda) \approx f(\lambda) \cdot S(\lambda) \cdot \phi_F \quad (7)$$

Es handelt sich um ein Spektrum, das für Konzentrationsbestimmungen, Untersuchungen zur Fluoreszenzlöschung, Polarisation u.a.m. herangezogen werden kann.

Für die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute oder den quantitativen Vergleich mit Literaturdaten muss das Spektrum bezüglich der wellenlängenabhängigen apparativ bedingten Einflüsse korrigiert werden:

$$M_{\text{korr}}(\lambda) \approx \frac{M(\lambda)}{S(\lambda)} \approx f(\lambda) \cdot \Phi_F \quad (8)$$

Außer durch apparative Einflüsse können gemessene Intensität und Spektrenform auch durch Absorptionen in der Probe selbst verändert werden (Filtereffekte). Minimale Verfälschungen erhält man bei der Messung an optisch dünnen Lösungen ( $A(\lambda') \leq 0.05$ ). Hier gilt außerdem

$$I_{abs}(\lambda') = I_0(\lambda') \cdot (1 - 10^{-A(\lambda')}) = I_0(\lambda') \ln 10 A(\lambda') \quad (9)$$

d.h. die absorbierte Intensität und damit die Fluoreszenzintensität sind eine lineare Funktion der Absorbanz und damit der Konzentration der Probe. Die gemessene Fluoreszenzintensität (integral oder spektral aufgelöst) wird in Spektren oft in relativen Einheiten (z.B. relative Photonenzahl bzw. relative Photonenzahl pro Nanometer) angegeben.

Die Bestimmung von  $\Phi_F$  erfolgt i.a. relativ zu einem Standard bekannter Quantenausbeute  $\Phi_{F,s}$  mit (10), wobei die Fluoreszenzmessung an optisch dünnen Lösungen bei der gleichen Anregungswellenlänge  $\lambda'$  durchgeführt wird.

$$\Phi_F = \Phi_{F,s} \cdot \frac{A(\lambda')_s}{\int M_{\text{kor}}(\lambda)_s d\lambda} \cdot \frac{\int M_{\text{kor}}(\lambda) d\lambda}{A(\lambda')} \quad (10)$$

Die Integration erfolgt über die korrigierte Fluoreszenzbande von Probe und Standard.

Als Fluoreszenzanregungsspektrum bezeichnet man ein Spektrum, bei dem die Fluoreszenzintensität bei einer konstanten Emissionswellenlänge in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge gemessen wird. Mit den Beziehungen (4) bis (6) ( $\lambda$  konstant,  $\lambda'$  variabel) gilt

$$M(\lambda') \approx I_0(\lambda') \cdot (1 - 10^{-A(\lambda')}) \quad (11)$$

Für optisch dünne Lösungen ( $E_{\text{max}} < 0.05$ ) ergibt sich mit (9)

$$M(\lambda') \approx \Phi_F \cdot f(\lambda) \cdot I_0(\lambda') \cdot A(\lambda') \quad (12)$$

Bei Berücksichtigung der Wellenlängenabhängigkeit von  $I_0$  erhält man ein korrigiertes Fluoreszenz-Anregungsspektrum, das in seiner Form dem Absorptionsspektrum der fluoreszierenden Verbindung entspricht.

$$\frac{M(\lambda')}{I_0(\lambda')} \approx \Phi_F \cdot f(\lambda) \cdot A(\lambda') \approx A(\lambda') \quad (13)$$

Die Übereinstimmung des Fluoreszenz-Anregungsspektrums mit dem Absorptionsspektrum ist ein wichtiges Kriterium für die Reinheit fluoreszierender Substanzen.

## 5. Nachweisempfindlichkeit

Die Nachweisempfindlichkeit der Fluoreszenzmethode hängt sowohl von der verwendeten Apparatur, als auch vom nachzuweisenden Stoff bzw. der vorliegenden Probe ab. Bedingungen für eine hohe Empfindlichkeit der Apparatur sind hohe Anregungsintensität, Detektorempfindlichkeit und Streulichtfreiheit der Monochromatoren. Für die Probe ist neben einer großen Fluoreszenzquantenausbeute vor allem die Reinheit des Lösungsmittels wichtig. Fluoreszierende Verbindungen können mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie bis zu drei Größenordnungen empfindlicher nachgewiesen werden als mit der Absorptionsspektroskopie.

## 6. Fluoreszenzlöschung

Wechselwirkung und Reaktionen der angeregten, fluoreszierenden Verbindung mit nichtangeregten Molekülen der gleichen Verbindung oder mit Fremdstoffen können zur Löschung der Fluoreszenz, d.h. zur Abnahme der Fluoreszenzintensität führen (dynamische Löschung). Für die Fluoreszenzquantenausbeute ergibt sich aus (1) bei Berücksichtigung des zusätzlichen von der Konzentration des Lösers abhängigen Desaktivierungsprozesses  $k_Q[Q]$

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_Q[Q]} \quad (14)$$

Division von (2) durch (14) führt unter Verwendung von (1) zur Stern- Volmer- Gleichung (15) mit der Löschkonstante  $K_{sv}$ .

$$\frac{\Phi_F[O]}{\Phi_F[Q]} = 1 + \tau \cdot k_Q[Q] = 1 + K_{sv}[Q] \quad (15)$$

## **Aufgaben**

### **1. Fluoreszenzmethodik**

- 1.1. Untersuchung der Abhängigkeit der Fluoreszenz einer konzentrierten und einer verdünnten Lösung von Natrium- Fluoreszein in 0.1n NaOH von der Anregungswellenlänge. Beschreiben und erklären Sie die beobachteten Effekte!
- 1.2. Messung von Fluoreszenzspektren  
Messen Sie das Fluoreszenzspektrum der verdünnten Lösung von Natrium- Fluoreszein in 0.1n NaOH. Überprüfen Sie die Gültigkeit der Regel von Kasha.
- 1.3. Messung von Fluoreszenz-Anregungsspektren  
Messen Sie das Fluoreszenz-Anregungsspektrum der Natrium- Fluoreszeinlösung bei zwei verschiedenen Emissions-Wellenlängen.  
Wodurch wird die Form des Fluoreszenz- Anregungsspektrums bestimmt?  
Welche Informationen enthalten Fluoreszenz-Anregungsspektren?

### **2. Fluoreszenz von Chininsulfat**

- 2.1. Messung des Fluoreszenz- Anregungs- und Emissionsspektrums von Chininsulfat in 0.1n  $H_2SO_4$  mit dem Fluoreszenzdetektor RF-551.
- 2.2. Nachweis der Löschung der Fluoreszenz von Chininsulfat durch Halogenid-Ionen. Welche Veränderungen treten in den Spektren auf, wie sind sie zu erklären?
- 2.3. Abschätzung der Nachweisgrenze des Fluoreszenzdetektors RF-551 für Chininsulfat.

## **Versuchsdurchführung**

### **zu 1.1) Wellenlängenabhängigkeit**

Stellen Sie aus der Stammlösung (Absorbanz ca. 2) eine verdünnte Lösung (Absorbanz ca. 0.05) her. Setzen Sie die Küvette mit der Probenlösung in den Probenhalter des oben geöffneten Probenraumes ein und beobachten Sie visuell die auftretenden Effekte bei Veränderung der Anregungswellenlänge (Anregung mit Wolframlampe) im Bereich von 700 nm bis 350 nm.

Achten Sie auf folgende Effekte:

- Intensität und Farbe der Fluoreszenz
- räumliche Verteilung der Fluoreszenz in der Probe
- Streueffekte
- Intensität des Anregungslichtes vor und nach Durchstrahlung der Probe (Beobachtung auf der Mattscheibe mit und ohne Probe).

### **zu 1.2) Fluoreszenzspektrum**

Messen Sie das Fluoreszenzspektrum (Anregungswellenlänge konstant, Emissionswellenlänge variabel) bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen (z.B. im Absorptionsmaximum und in der kurzwelligen Flanke).

Die Einstellung günstiger Messbedingungen erfolgt, indem man

- den Anregungsmonochromator auf die gewünschte Anregungswellenlänge einstellt,
- den Emissionsmonochromator auf eine Wellenlänge 10 bis 50 nm längerwellig als das Absorptionsmaximum einstellt,
- den Messbereich am Schreiber (z.B. 2) und die Hochspannung am Photoempfänger-Netzgerät (maximal 1.5 kV) so wählt, dass ein Zeigerausschlag erscheint, der Fluoreszenzlicht anzeigt  
(Überprüfung durch Schließen und Öffnen des Verschlusses am Anregungs- bzw. Emissionsmonochromator),
- den Emissionsmonochromator auf das Fluoreszenzmaximum einstellt,
- Messbereich und Hochspannung so wählt, dass der Zeigerausschlag im letzten Drittel der Skala liegt.

Die Messung des Fluoreszenzspektrums erfolgt, indem man die Fluoreszenzintensität (in Skalenteilen) in Abhängigkeit von der Emissionswellenlänge (Messung punktweise,  $\Delta\lambda = 5$  nm), beginnend bei der Anregungswellenlänge, ermittelt.

### **zu 1.3) Fluoreszenz-Anregungsspektrum**

Messung der Fluoreszenz-Anregungsspektren (Emissionswellenlänge konstant, Anregungswellenlänge variabel) der verdünnten Lösung bei zwei verschiedenen Emissionswellenlängen (z.B. im Maximum der Fluoreszenzbande und in der langwelligen Flanke). Die Einstellung der Messbedingungen erfolgt analog zu der bei der Messung eines Fluoreszenzspektrums; anstelle des Emissionsmonochromators wird bei konstanter gewählter Emissionswellenlänge der Anregungsmonochromator auf maximale Intensität eingestellt.

Die Messung des Anregungsspektrums erfolgt im Bereich des Absorptionsspektrums.

### **zu 2.1) Fluoreszenz von Chininsulfat**

Stellen Sie aus der Stammlösung eine Lösung der Absorbanz von ca. 0.025 (bei 346 nm) her. Messen Sie das Fluoreszenzspektrum und das Fluoreszenz- Anregungsspektrum.

- Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge im Absorptions- bzw. Fluoreszenzmaximum
- Bedienung des RF-551 entsprechend der Kurzanleitung am Gerät.

**zu 2.2) Fluoreszenzlöschung**

Geben Sie nacheinander einige Kristalle NaCl zur Probenlösung.  
Messen Sie die Fluoreszenz- und Fluoreszenzanregungsspektren.

**zu 2.3) Konzentrationsabhängigkeit und Nachweisgrenze**

Stellen Sie 4 Lösungen mit Absorbanzen zwischen 0.025 und 0.0001 her.

Messen Sie die Fluoreszenzintensität im Maximum der Fluoreszenzbande bei Anregung im Absorptionsmaximum.

Tragen Sie die Fluoreszenzintensität gegen die Konzentration der Lösung auf und schätzen Sie aus dem linearen Teil der Kurve und der gemessenen Emission des Lösungsmittels die Nachweisgrenze ab!

Diskutieren Sie Kurvenverlauf und Nachweisgrenze!

**Anhang:**

$$\Phi_F = \frac{N_F}{N_A}$$

$$N_F = \Phi_F \cdot N_A$$

Für die Zahl der absorbierten Quanten gilt nach Lambert- Beer:

$$\begin{aligned} N_A &= N_0 - N \\ &= N_0 - N_0 10^{-A} \\ &= N_0 (1 - 10^{-A}) \end{aligned}$$

Üblicherweise wird das Lambert- Beersche Gesetz für Intensitäten  $I$  angegeben:

$$A = \lg \frac{I_0}{I}$$

Mit  $I = N \cdot \frac{h \cdot c}{\lambda} \cdot \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{F}$  gilt analog:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \lg \frac{N_0}{N} \quad \text{daraus folgt:}$$

$$N = N_0 10^{-A}$$