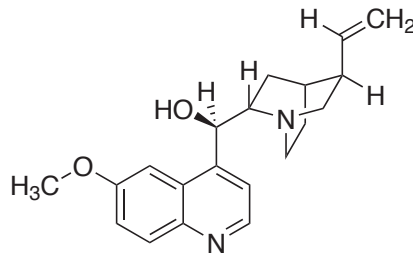


# Fluoreszenz

## 1.1 Einleitung

Das Phänomen der Fluoreszenz wurde erstmals im Jahr 1845 von Sir John Frederick William Herschel für eine saure Lösung von Chinin beschrieben<sup>1</sup>. **Chinin**, ein Alkaloid aus der Rinde des China-Baums (vgl. Abb. 1.1), wurde in größerem Umfang zuerst in den englischen Kolonien als Heil- und Prophylaxemittel gegen Malaria eingesetzt. Weil Chinin im Sauren auch in noch sehr hoher Verdünnung blau fluoresziert, kann es sehr gut fluorometrisch nachgewiesen werden.



**Abbildung 1.1: Strukturformel von Chinin.** Es handelt sich um ein Alkaloid aus der Rinde des China-Baumes (daher der Name), das ursprünglich als Malaria-Mittel verwendet wurde und uns heute im Alltag u.a. in Tonic Water (wegen seines bitteren Geschmacks) begegnet.

Wegen ihrer hohen Empfindlichkeit und Selektivität spielt die Fluoreszenzspektroskopie heute eine wichtige Rolle in vielen Bereichen.

## 1.2 Aufgabenstellung

Am Beispiel des Chinins werden wichtige Aspekte und Methoden der Fluoreszenzspektroskopie untersucht: Anregungsspektrum, Emissionsspektrum, Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität, fluorometrische Konzentrationsbestimmung, dynamische Fluoreszenzlöschung, instrumentelle Nachweisgrenze.

---

<sup>1</sup>J. F. W. Herschel: „On a case of superficial colour presented by a homogeneous liquid internally colourless“, Philosophical Transactions of the Royal Society of London 135:143–145, 1845.

## 1.3 Theorie

Durch die Absorption von Licht gehen Moleküle in einen energiereichen „angeregten“ Zustand über. Diese zusätzliche Energie kann anschließend auf verschiedenen Wegen wieder abgegeben werden:

- **Thermische Deaktivierung:** Energie wird in Bewegungsenergie (Wärme) umgewandelt, strahlungslos
- **Strahlungsemission durch Fluoreszenz bzw. Phosphoreszenz:** Energie wird als Licht abgestrahlt
- **Photochemische Reaktionen:** Energie wird für chemische Reaktionen verwendet, z.B. in der Photosynthese, strahlungslos
- **Energietransfer:** Energie wird auf ein anderes Molekül übertragen, strahlungslos

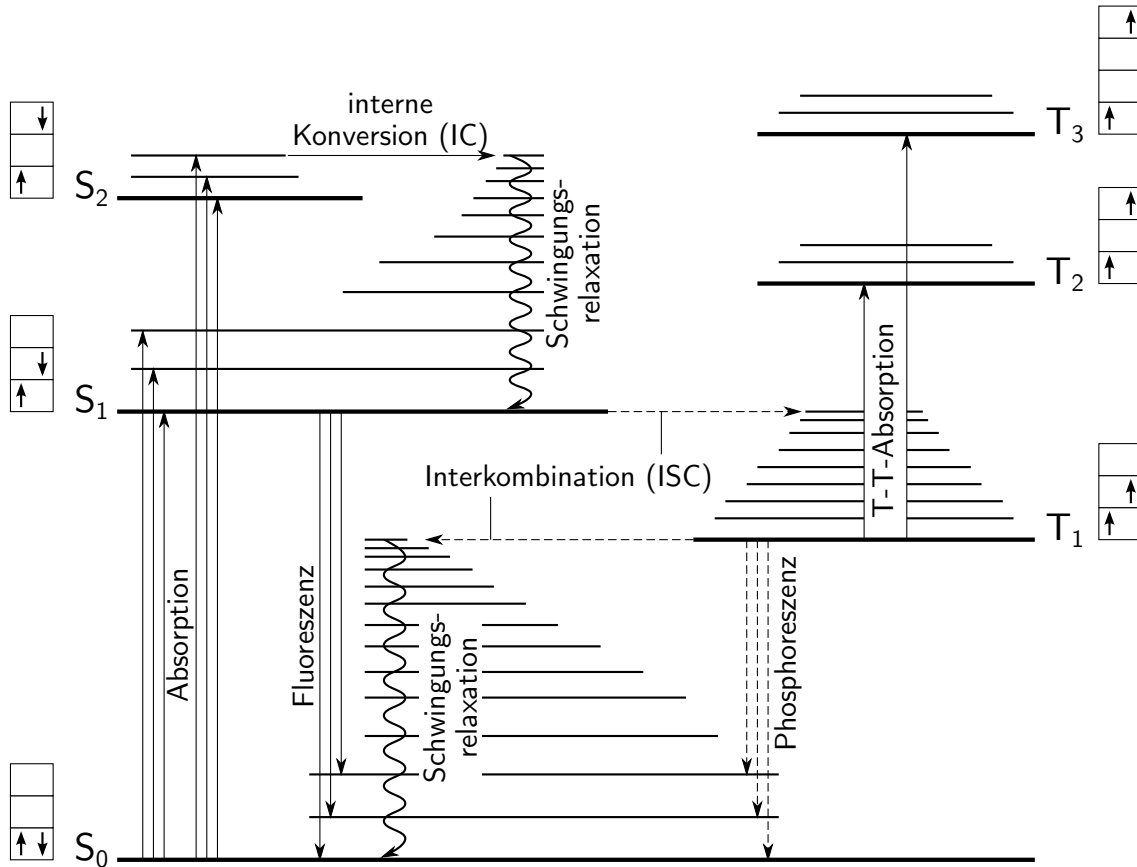
In diesem Versuch untersuchen wir die Absorption von Licht durch das Molekül Chinin und die anschließende Strahlungsemission durch Fluoreszenz in Lösung und bei Raumtemperatur.

Die prinzipiellen Zusammenhänge bei der Absorption und Emission von Strahlung lassen sich gut am **Jabłoński-Termschema** erklären, das nach dem polnischen Wissenschaftler Aleksander Jabłoński benannt ist, der es in den 1930er Jahren erstmals aufstellte, um Phänomene der Absorption und Emission von Materie zu erklären<sup>2</sup>. Es gibt unzählige Varianten dieses Schemas, je nachdem, welche Phänomene erklärt werden sollen. Ein Beispiel ist in Abb. 1.2 gezeigt. Die elektronischen Zustände unterschiedlicher Spinmultiplizität — Singulett,  $S_n$  (mit  $n \geq 0$ ), und Triplett,  $T_n$  (mit  $n \geq 1$ ), jeweils mit ihrer Elektronenspinconfiguration im einfachen Vektorbild — und deren Schwingungszustände  $v$  sind ebenso gezeigt wie die wichtigsten strahlenden und nichtstrahlenden Prozesse. Die Lage der Energieniveaus ist nicht maßstäblich, aber in korrekter relativer Anordnung zueinander wiedergegeben. Die einzelnen Übergänge werden nachfolgend beschrieben.

**Absorption:** Bei Raumtemperatur und in Lösung befinden sich die meisten Moleküle im Schwingungsgrundzustand  $v = 0$  des elektronischen Grundzustandes ( $S_0$ ). Die Absorption von Licht überführt die Moleküle in einen angeregten elektronischen Zustand ( $S_n$  mit  $n \geq 1$ ). Dieser Vorgang ist so schnell ( $10^{-15}$  s), dass während dieser Zeit die Molekülgeometrie aufgrund der Trägheit der Atomkerne praktisch unverändert bleibt. Die wahrscheinlichsten (intensivsten) Übergänge sind zwischen den Schwingungszuständen der jeweiligen Niveaus zu erwarten, deren Wellenfunktionen am besten überlappen

---

<sup>2</sup>A. Jabłoński: „Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes“, Nature 131:839–840, 1931

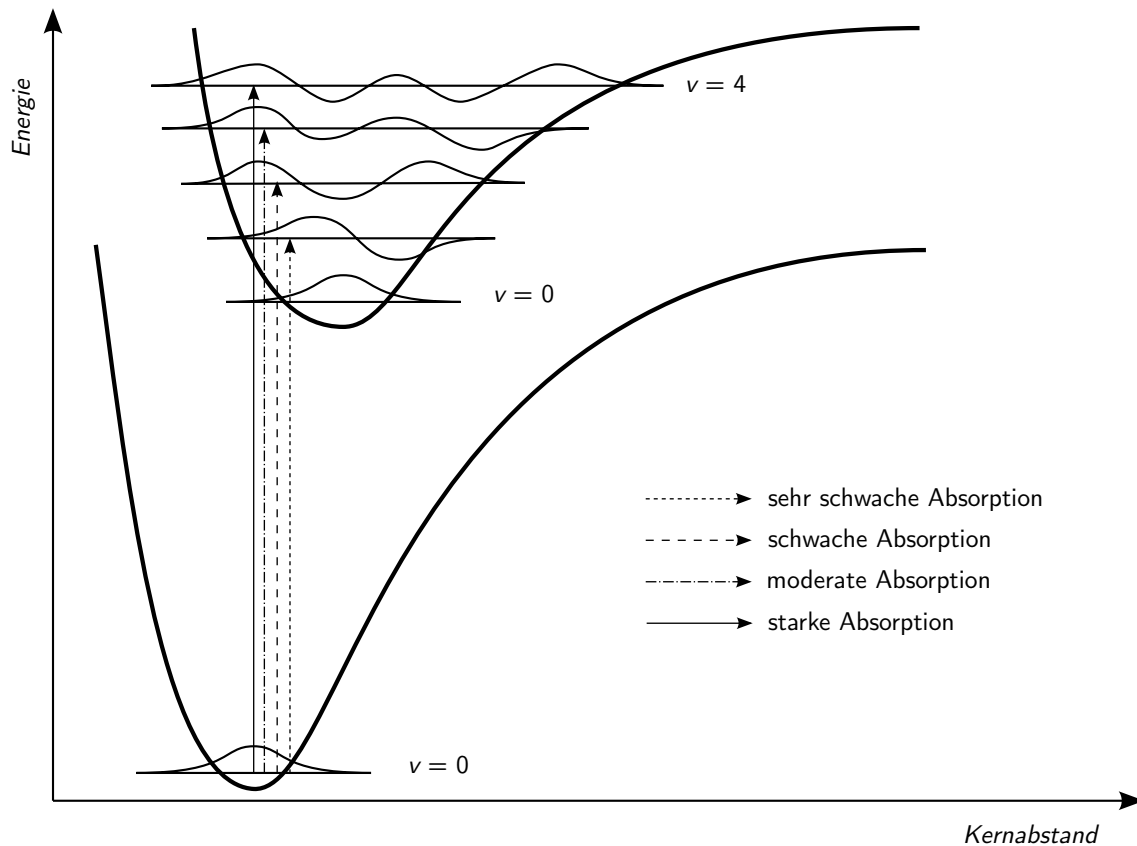


**Abbildung 1.2: Jablonski-Termschema zur Erklärung der wichtigsten strahlenden und strahlungslosen Prozesse in einem Molekül.** Eine erste, sehr einfache Form dieses Schemas wurde von Aleksander Jablonski in den 1930er Jahren entwickelt, um Fluoreszenzphänomene zu erklären. Für die Zeitskalen der einzelnen hier gezeigten Prozesse und weitere Details vgl. den Text. Verändert nach Haken und Wolf (2006).

(**Franck-Condon-Prinzip**, vgl. Abb. 1.3). In diesem Fall sind das also jene Schwingungszustände höher angeregter elektronischer Niveaus  $S_n$ , deren Wellenfunktionen am besten mit der Wellenfunktion des Schwingungsgrundzustandes  $v = 0$  des elektronischen Grundzustandes  $S_0$  überlappen. *Das Absorptionsspektrum charakterisiert deshalb in erster Näherung die Schwingungsstruktur der angeregten elektronischen Zustände.*

**Schwingungsrelaxation** und **interne Konversion** (internal conversion, IC) sind schnelle, strahlungslose Übergänge ( $10^{-13}$ – $10^{-12}$  s) aus angeregten Zuständen in energetisch tiefer liegende Zustände, bei denen Energie in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben wird. Schwingungsrelaxation baut *innerhalb eines elektronischen Zustandes* Schwingungsenergie bis auf den Schwingungsgrundzustand  $v = 0$  ab. Interne Konversion ist ein strahlungsloser *Übergang zwischen elektronischen Zuständen*, von einem angeregten elektronischen Niveau in das darunterliegende elektronische Niveau derselben Spinmultiplizität.

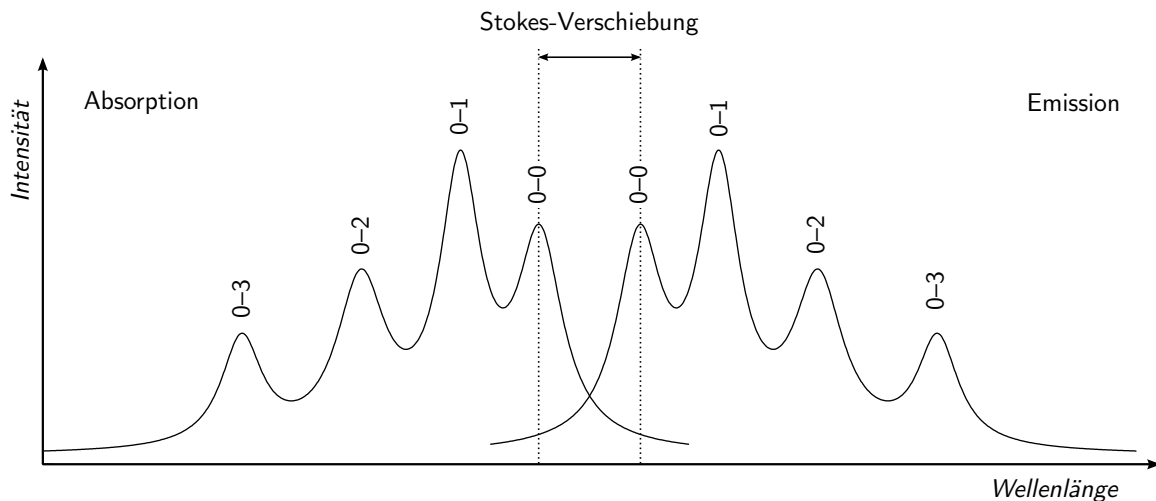
**Fluoreszenz:** Manche Moleküle – oftmals Aromaten mit größeren Doppelbindungssys-



**Abbildung 1.3: Schematische Illustration des Franck-Condon-Prinzips.** Das Franck-Condon-Prinzip besagt, dass die wahrscheinlichsten elektronischen Übergänge zwischen Zuständen mit ähnlicher Kernkonfiguration und ähnlichem Schwingungsverhalten stattfinden. Es beruht darauf, dass die elektronischen Anregung so schnell ist, dass sich während dieses Prozesses der Kernabstand nicht verändert. Quantenmechanisch ist die Größe des Überlappintegrals der Schwingungs-Wellenfunktionen in den beiden elektronischen Zuständen die entscheidende Größe für die Wahrscheinlichkeit des elektronischen Überganges. Verändert nach Turro et al. (2010).

temen – sind in der Lage, innerhalb von  $10^{-9}$ – $10^{-5}$  s aus dem Schwingungsgrundzustand  $v = 0$  des ersten angeregten elektronischen Zustandes  $S_1$  heraus in eines der Schwingungsniveaus des elektronischen Grundzustandes  $S_0$  unter Aussendung von (Fluoreszenz-)Licht überzugehen. Auch hier gilt das Franck-Condon-Prinzip, dem zufolge die wahrscheinlichsten (intensivsten) Übergänge zu denjenigen Schwingungszuständen des  $S_0$ -Zustandes erfolgen, deren Wellenfunktionen am besten mit der Wellenfunktion des Schwingungsgrundzustandes  $v = 0$  des  $S_1$ -Niveaus überlappen. Die Form des Fluoreszenzspektrums ist unabhängig von der Wellenlänge des absorbierten Lichtes (die Mindestenergie für den  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang muss natürlich überschritten werden). *Das Fluoreszenzspektrum charakterisiert im Prinzip die Schwingungsstruktur des elektronischen Grundzustandes.* Falls elektronischer Grundzustand ( $S_0$ ) und erster angeregter elektronischer Zustand ( $S_1$ ) eine ähnliche Schwingungsstruktur haben, ist das *Fluoreszenzspektrum in etwa spiegelbildlich zum Absorptionsspektrum* (vgl. Abb. 1.4).

**Phosphoreszenz:** Aus dem  $S_1$ -Schwingungsgrundzustand heraus kann es im Prinzip in-

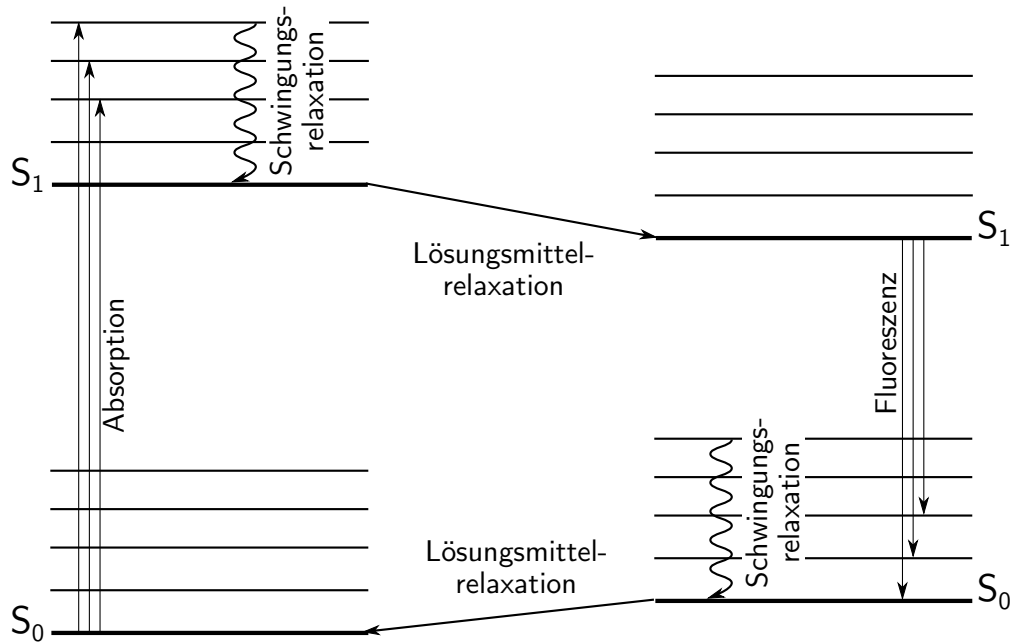


**Abbildung 1.4: Idealisiertes Absorptions- und Fluoreszenzspektrum zur Demonstration der Stokes-Verschiebung und des Bandenmusters.** Die Stokes-Verschiebung (Emission bei relativ zur Anregung längeren Wellenlängen) und die Bandenmuster lassen sich anhand des Jabłoński-Diagrammes (Abb. 1.2) erklären.

nerhalb von  $10^{-9}$ – $10^{-6}$  s auch zu einem (spinverbotenen) Übergang in einen Triplett-Zustand kommen. Diesen Vorgang nennt man Interkombination (**Intersystem Crossing, ISC**). Es handelt sich hierbei um einen strahlungslosen Übergang zwischen verschiedenen angeregten elektronischen Zuständen verschiedener Spinmultiplizität. Der Übergang in den langlebigen Schwingungsgrundzustand  $v = 0$  des ersten angeregten elektronischen Triplettzustandes  $T_1$  erfolgt wieder durch schnelle strahlungslose Schwingungsrelaxation. Aus dem Schwingungsgrundzustand des  $T_1$ -Niveaus heraus kann dann auf einer Zeitskala von typischerweise  $10^{-5}$ – $10^2$  s Phosphoreszenz stattfinden, ein spinverbotener und daher unwahrscheinlicher strahlender Übergang in den elektronischen Grundzustand  $S_0$  (unwahrscheinlich = lange Lebensdauer).

**Stokes-Verschiebung:** Auf den ersten Blick könnte man erwarten, dass die Absorptionswellenlänge beim Übergang zwischen den Zuständen  $S_0 \rightarrow S_1$  und die Emissionswellenlänge beim umgekehrten Übergang  $S_1 \rightarrow S_0$  übereinstimmen. Tatsächlich beobachtet man aber eine Verschiebung des Fluoreszenzspektrums zu längeren Wellenlängen, die man Stokes-Verschiebung (Rotverschiebung) nennt (vgl. Abb. 1.4). Dieser Energieverlust kommt dadurch zustande, dass nach der Absorption in der Regel eine strahlungslose Relaxation in den Schwingungsgrundzustand des angeregten elektronischen Zustandes stattfindet. Deshalb erfolgt die Emission (bei Raumtemperatur und in Lösung) *immer aus dem Schwingungsgrundzustand* des angeregten elektronischen Zustandes (**Kasha-Regel**, vgl. das Jabłoński-Termschema, Abb. 1.2).

Zusätzlich tritt manchmal der Effekt der **Lösungsmittelrelaxation** auf (vgl. Abb. 1.5), der auf die Änderung des Dipolmomentes des Fluorophors zurückgeführt werden kann. Vor der Absorption sind die Lösungsmittelmoleküle energetisch günstig in Bezug auf das



**Abbildung 1.5: Jabłoński-Diagramm zur Erklärung der Lösungsmittelrelaxation.** Da die Fluoreszenz gegenüber der Absorption von Licht auf einer deutlich langsameren Zeitskala abläuft, bleibt dem Molekül ausreichend Zeit, die Lösungsmittelmoleküle in seiner direkten Umgebung, die zunächst aufgrund des geänderten Dipolmomentes des Fluorophors energetisch ungünstig angeordnet sind, umzuordnen, was zu einer energetischen Absenkung des angeregten Zustandes des Fluorophors führt. Gleiches gilt für die Situation nach der Emission.

Dipolmoment des Grundzustandes des Fluorophors angeordnet. Während des sehr schnellen Absorptionsprozesses ( $10^{-15}$  s) ordnen sich die Elektronen des Moleküls im angeregten Zustand sehr schnell um. Die Lösungsmittelmoleküle haben keine Zeit zur Reorientierung. Erst nach einiger Zeit (ns) ordnen sich die Lösungsmittelmoleküle entsprechend dem geänderten Dipolmoment um das Molekül herum an, was zu einer Energieabsenkung des angeregten Zustandes führt. Nach der Emission des Fluoreszenzphotons ist das Lösungsmittel zunächst wiederum energetisch ungünstig bezüglich der Ladungsverteilung im elektronischen Grundzustand  $S_0$  angeordnet, was zu einer Energieanhebung des Grundzustandes führt.

Beide Effekte, die Kasha-Regel und die Lösungsmittelrelaxation, reduzieren also den Energieunterschied zwischen den Niveaus, zwischen denen Fluoreszenz stattfindet. Deshalb ist das *Fluoreszenzlicht langwelliger als das Anregungslicht*.

Die Fluoreszenz eines Fluorophors ist keine isolierte Eigenschaft, sondern hängt empfindlich von seiner Nahumgebung ab. Eine entsprechende Betrachtung gilt auch für Fluorophore im Inneren von Biomolekülen. Hier spielt die molekulare Umgebung die Rolle des Lösungsmittels. Dabei bestimmt die Umgebung entscheidend mit über die Quantenausbeute  $\Phi_F$  der Fluoreszenz als auch über die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_F$ . Messungen dieser Parameter (die im Rahmen dieses Praktikumsversuches nicht durchgeführt werden kön-

nen) erlauben entsprechend Rückschlüsse auf die Nahumgebung eines Fluorophors, das so zur Sonde seiner molekularen Umgebung wird.

In der Fluoreszenzspektroskopie unterscheidet man zwei Arten von Spektren:

**Anregungsspektrum** Intensität der Fluoreszenzemission bei einer festen Emissionswellenlänge in Abhängigkeit von der Wellenlänge des anregenden Lichtes

*Es entspricht in Form und Lage dem Absorptionsspektrum.* Dies gilt allerdings nur für Ein-Fluorophor-Systeme und für Absorptionswerte kleiner 0,05. Es ist aber kein Absorptionsspektrum im klassischen Sinn, da hier tatsächlich gemessen wird, wie gut das anregende Licht in der Lage ist, Fluoreszenzlicht zu erzeugen (also die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F$  als Funktion der Anregungswellenlänge  $\lambda_A$ ).

**Emissionsspektrum** Spektrum des emittierten Fluoreszenzlichtes bei fester Wellenlänge des anregenden Lichtes

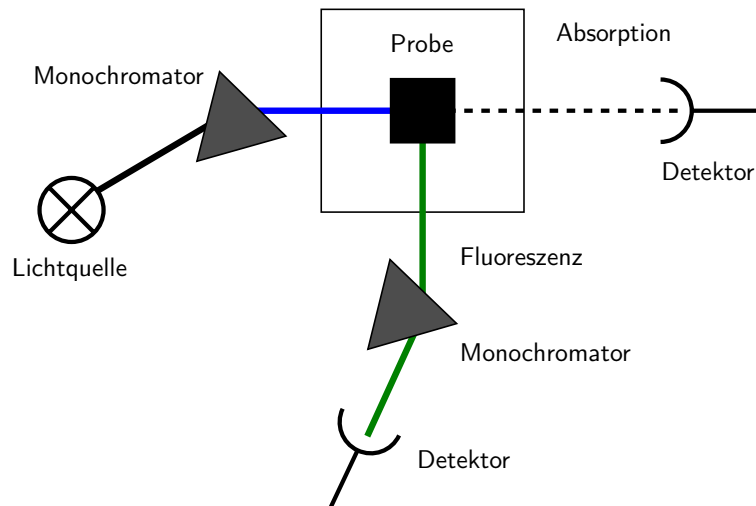
Die Form des Emissionsspektrums (nicht aber die Intensität) ist unabhängig von der Wellenlänge des Anregungslichtes (solange die eingestrahelte Energie ausreicht, um den  $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang zu treiben).

## 1.4 Messtechnisches zur Fluoreszenzspektroskopie

Absorptions- und Fluoreszenzspektrometer weisen einige Gemeinsamkeiten, aber auch entscheidende Unterschiede auf. Der messtechnische Unterschied zwischen einem üblichen UV-Vis-Absorptionsspektrometer und einem Fluoreszenzspektrometer läßt sich folgendermaßen verdeutlichen:

- In der Absorptionsspektroskopie misst man das Verhältnis der Lichtintensitäten zwischen Eintritt in die und Austritt aus der Küvette bei einer hohen Intensität: Es muss die Differenz großer Zahlen ausgewertet werden, was eine relativ geringe Empfindlichkeit zur Folge hat.
- In der Fluoreszenzspektroskopie ist die gemessene Fluoreszenzintensität klein. Hier werden geringe Lichtintensitäten mit hoher Genauigkeit erfasst, was eine sehr hohe Empfindlichkeit ermöglicht.

Aus diesem Grund ist auch die Messelektronik beider Spektrometertypen sehr unterschiedlich. Die Nachweisgrenze für Fluoreszenzmessungen hängt i. A. nicht von den Spektrometerkomponenten, wie z.B. dem Detektor (Fotoverstärker), ab, sondern von der Intensität des Hintergrundsignals.



**Abbildung 1.6: Prinzipieller Aufbau eines Fluoreszenz-Spektrometers.** Ein entscheidender Aspekt (und ein großer Unterschied zu Absorptions-Spektrometern) ist die Detektion senkrecht zur Anregung.

Der prinzipielle Aufbau eines Fluoreszenz-Spektrometers ist in Abb. 1.6 gezeigt. Das emittierte Licht wird im  $90^\circ$ -Winkel zum anregenden Licht detektiert. Außerdem befindet sich sowohl zwischen Lichtquelle und Probe als auch zwischen Probe und Detektor (für die Fluoreszenz) ein Monochromator. Der Referenzdetektor kontrolliert die Intensität des Anregungslichtes und ermöglicht so Fluoreszenzmessungen, die unabhängig von Intensitätsschwankungen der Lichtquelle sind.

Häufig treten in der Fluoreszenzspektroskopie **Streulichtbanden** auf (besonders bei Suspensionen und trüben Proben), die zu einer Verfälschung des Emissionsspektrums führen. Deshalb ist es wichtig, Streulichtbanden eindeutig zu identifizieren. Hierzu wiederholt man die Messung des Emissionsspektrums mit einer 10 oder 20 nm verschobenen Anregungswellenlänge. Dabei bleiben die Form und die Position der Fluoreszenzemission erhalten, während Streulichtbanden „wandern“.



## 1.5 Hinweise zur Versuchsdurchführung

### 1.5.1 Lösungen für den Versuch

Die im Versuch verwendeten Lösungen können Tab. 1.1 entnommen werden.

### 1.5.2 Umgang mit den Fluoreszenzküvetten

Die Küvetten sind aus Quarz, und alle vier Seiten sind transparent und planparallel. Sie sind sehr teuer und **es ist wichtig, sie sorgsam zu behandeln**. Alle Mischungen, die im Rahmen dieses Versuches herzustellen sind, werden mit den einstellbaren Pipetten **direkt in den Küvetten angesetzt**. Das erspart nicht nur Zeit, sondern auch Chemikalien, und produziert bedeutend weniger Abfall. Vor dem Ansetzen jeder neuen Lösung wird die Küvette gespült, indem man sie zweimal nacheinander halb mit Wasser füllt, zuschraubt, schüttelt (Küvette mehrfach um  $180^\circ$  drehen) und wieder ausgießt. Es verbleibt in der Küvette nur wenig Flüssigkeit (ca.  $6 \mu\text{L}$ ), die fast nur aus Wasser besteht und die als Konzentrationsfehler der neuen Lösung vernachlässigt werden kann.

### 1.5.3 Umgang mit den einstellbaren Pipetten

Die einstellbaren Pipetten sind sorgfältig zu behandeln. Die Handhabung ist im Kapitel „Gebrauch von Mikroliter-Pipetten“ des Praktikumsskriptes erklärt. **Lassen Sie sich den richtigen Gebrauch** der einstellbaren Pipetten **vom Versuchsbetreuer zeigen!**

**Die Pipettenspitzen** haben eine sehr glatte und wasserabweisende Oberfläche. Bei richtiger Handhabung haften keine Flüssigkeitsreste an ihnen, und sie **brauchen im Rahmen dieses Versuchs nicht gewechselt zu werden**.

**Tabelle 1.1: Im Versuch verwendete Lösungen und ihre Zusammensetzung.**

Lösung	Bemerkung
Schwefelsäure 0,1 N	
Chinin-Standard 10 ppm	1 mL dieser 0,1 N Schwefelsäure enthält $10 \mu\text{g}$ freie Chininbase ( $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$ , $M = 324,41 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) ( <i>lichtempfindlich und nicht sehr stabil</i> )
Chinin-Standard 0,1 ppm	1 mL dieser 0,1 N Schwefelsäure enthält $0,1 \mu\text{g}$ freie Chininbase
NaCl-Lösung	200 mg NaCl ( $M = 58,44 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) in 100 mL 0,1 N $\text{H}_2\text{SO}_4$
NaBr-Lösung	360 mg NaBr ( $M = 102,89 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) in 100 mL 0,1 N $\text{H}_2\text{SO}_4$

### 1.5.4 Versuchsdurchführung

Lassen Sie sich **vor Versuchsbeginn** vom Versuchsbetreuer die Handhabung des Spektrometers und der Spektrometer-Software zeigen. Notieren Sie sich handschriftlich zu jedem aufgenommenen Spektrum die wichtigsten Daten wie Dateiname, Küvetteninhalt, Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge, registrierter Spektralbereich usw. Vergeben Sie **für jede Messung einen neuen Dateinamen, wobei sich eine Namensgebung aus Versuchsteilnummer und laufender Messnummer empfiehlt**. Um die Spektren mit nach Hause nehmen zu können, sollten Sie einen **USB-Speicher-Stick** verwenden (bringen Sie bitte einen eigenen mit!).

### 1.5.5 Nach Versuchsende

Räumen Sie Ihren Arbeitsplatz auf. Spülen Sie die Küvette(n) mehrmals (mindestens 3×) sorgfältig mit Wasser und legen Sie sie in die Aufbewahrungsbox zurück. Hängen Sie die Pipetten in die entsprechende Halterung.

### 1.5.6 Auswertung

Zur Auswertung einiger Aufgabenteile wird ein Computer verwendet. Die auf dem Messrechner erzeugten Spektrendaten müssen ggf. noch exportiert werden, wenn sie als Binärdateien abgelegt wurden. Der Versuchsbetreuer zeigt Ihnen, wie Sie nach dem Ende der Messungen diese Dateien in ASCII-Textdateien konvertieren und auf Ihren Datenträger kopieren können. Kopieren Sie alle von Ihnen erzeugten Dateien auf den Datenträger. Zur Darstellung der Spektren in Ihrem Protokoll mit einem Programm wie z.B. **Origin** oder **Gnuplot** müssen Sie die Daten von Ihrem Speichermedium importieren. Unter Umständen ist es dabei erforderlich, die Kopfzeilen aus den Textdateien (sie enthalten Apparateinstellungen) zu entfernen oder vorübergehend das Dezimaltrennzeichen auf Ihrem Computer von „Komma“ auf „Punkt“ umzustellen.

## 1.6 Aufgaben

### 1.6.1 Bestimmung des Emissions- und Anregungsmaximums von Chinin

Für die fluorometrische Untersuchung einer Substanz ist es unabdingbar, deren Anregungs- und Emissionscharakteristik zu kennen. Deshalb werden zunächst ein Anregungs- und mehrere Emissionsspektren (als Funktion der Anregungswellenlänge) aufgenommen.

Pipettieren Sie 3210  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,1 N) und 290  $\mu\text{L}$  der 0,1-ppm-Standardlösung in eine Fluoreszenzküvette, schrauben Sie den Deckel zu, durchmischen den Küvetteninhalt, wischen die Küvettenfenster (mit einem Papiertuch) sauber und setzen Sie die Probe in das Fluoreszenzspektrometer ein. Stellen Sie den *Emissionsmonochromator* auf 500 nm ein und nehmen Sie im Bereich 270–400 nm ein Anregungsspektrum auf, aus dem die Wellenlänge  $\lambda_{\text{Amax}}$  der stärksten Fluoreszenzemission (Anregungsmaximum) bestimmt wird.

Stellen Sie nun den *Monochromator für das Anregungslicht* auf  $\lambda_{\text{Amax}}$  ein und nehmen Sie ein Emissionsspektrum im Bereich 380–580 nm auf. Nehmen Sie das Emissionsspektrum im gleichen Bereich noch viermal auf, mit den Anregungswellenlängen  $(\lambda_{\text{Amax}} + 10)$  nm,  $(\lambda_{\text{Amax}} - 10)$  nm,  $(\lambda_{\text{Amax}} - 20)$  nm und  $(\lambda_{\text{Amax}} - 30)$  nm.

Stellen Sie in einem Diagramm das Anregungsspektrum dar und heben Sie  $\lambda_{\text{Amax}}$  hervor. Stellen Sie in einem weiteren Diagramm die aufgenommenen Emissionsspektren dar.

Was fällt auf? Welchen Vorteil bietet die Verwendung der zuletzt eingestellten Anregungswellenlänge? Was bedeutet das für die generelle Herangehensweise bei der Fluoreszenzspektroskopie, insbesondere wenn der Fluorophor vorher nicht bekannt ist?

### 1.6.2 Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Konzentration

Wir messen die Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität von Chinin bei 448 nm. Dazu werden nacheinander die Mischungen entsprechend der Tab. 1.2 in der Fluoreszenzküvette angesetzt und das Emissionsspektrum im Bereich 380–580 nm gemessen. Anregungswellenlänge ist 320 nm.

Man entnehme aus den Spektren die Fluoreszenzintensität bei 448 nm, korrigiere sie durch Abziehen der Intensität der Blindprobe (Probe 1) bei 448 nm und trage sie in einem Diagramm gegen die Konzentration an freier Chininbase (in  $\text{mol L}^{-1}$ ) auf.

Wenn eine Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität gemäß Gl. (1.5) besteht, so sollten die Messpunkte in guter Näherung auf einer Kurve vom Typ  $y = a(1 - 10^{-bx})$  liegen. Bestimmen Sie numerisch die Parameter  $a$  und  $b$  einer solchen Kurvenanpassung

**Tabelle 1.2: Lösungen für Versuchsteil 2 zum Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Konzentration.** Alle Lösungen werden direkt in den Küvetten angesetzt. Bitte beachten Sie, dass Sie die konzentrierte Chinin-Standardlösung nur in diesem Versuchsteil und nur für drei Ansätze benötigen.

Probe	0,1-ppm-Chinin-Standardlösung	0,1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1	0	3210 µL
2	290 µL	3210 µL
3	600 µL	2900 µL
4	900 µL	2600 µL
5	1200 µL	2300 µL
6	1500 µL	2000 µL
7	2000 µL	1500 µL
8	3000 µL	500 µL
10-ppm-Chinin-Standardlösung		
9	40 µL	3000 µL
10	50 µL	3000 µL
11	60 µL	3000 µL

und lassen Sie sich die berechnete Kurve gemeinsam mit den Messpunkten ausgeben. Berechnen Sie außerdem unter Verwendung der ersten vier Messpunkte den Parameter  $c$  einer Regressionsgeraden  $y = cx$  und zeichnen Sie die Gerade ebenfalls in das Diagramm ein.

Welche praktische Relevanz haben die hier rechnerisch ermittelten Zusammenhänge für die Messung von Fluoreszenzspektren?

Zur Berechnung der Regressionsgeraden, insbesondere jedoch für die Anpassung der nicht-linearen Kurve, empfiehlt sich die Verwendung entsprechender Programme zur Datenauswertung und Analyse wie z.B. **Gnuplot**, **Origin**, **Matlab** oder **R** (aber *nicht* Excel). Sie sind nicht auf ein bestimmtes Programm festgelegt, sollten sich aber mit einem dieser Programme näher auseinandersetzen, da Ihnen relevante Fragestellungen, für deren Beantwortung Sie solche Programme benötigen, noch häufiger (nicht nur in der Physikalischen Chemie) begegnen werden.

**Gnuplot:** Eine detaillierte Anleitung inkl. Beispiel für diesen Versuch finden Sie im Kapitel „Gnuplot“ am Anfang des Praktikumsskriptes.

**Origin:** Sie können alternativ zu Gnuplot auch das Programm Origin verwenden, das für Studenten über eine Campus-Lizenz verfügbar ist. Hinweise zu seiner Verwendung gibt es ebenfalls im vorderen Teil des Praktikumsskriptes.

### 1.6.3 Bestimmung des Chiningehaltes von Tonic Water

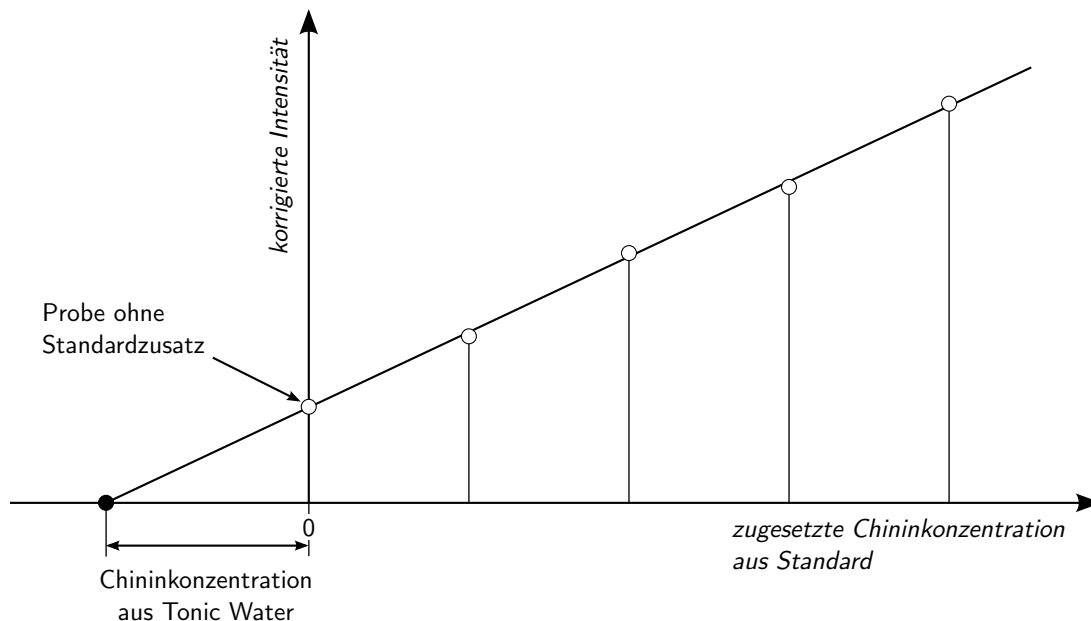
Tonic Water gehört zu den chininhaltigen Erfrischungsgetränken. Zur fluorometrischen Bestimmung der Chininkonzentration von Tonic Water verwenden wir die **Methode der Standardaddition**. Hierbei handelt es sich um einen Spezialfall der Kalibrierung, der insbesondere dann zur Anwendung kommt, wenn das Messsignal durch andere Bestandteile der zu vermessenden Lösung stark beeinflusst, d.h. entweder verstärkt oder unterdrückt wird. Vielfach ist die exakte Zusammensetzung der vermessenen Lösung (wie in unserem Fall wegen des Tonic Waters) gar nicht bekannt. Die Methode der Standardaddition umgeht dieses Problem dadurch, dass äquivalente Probevolumen mit einer steigenden, klar definierten Menge an Analyt (hier Chinin) aus Standardlösungen versetzt wird (vgl. Abb. 1.7). Eine wesentliche Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieser Kalibriermethode ist, dass die Addition innerhalb des linearen Messbereiches erfolgt. Die Methode der Standardaddition hat mehrere Vorteile:

- Die Zusammensetzung des Lösungsmittels ist in allen chininhaltigen Proben identisch. Dies verhindert Fehler, die u.a. durch Fremdstoff-Fluoreszenzlöschung zustande kommen können.
- Das Resultat bekommt durch die Mittelung über mehrere Messungen (Regressionsgerade) eine höhere Genauigkeit als eine Einzelmessung.

Das Tonic Water wird zunächst um den Faktor 400 verdünnt: 250  $\mu\text{L}$  der Probe werden in einem 100-mL-Messkolben mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Jetzt werden nacheinander in der Fluoreszenzküvette die Mischungen entsprechend der Tab. 1.3 angesetzt und jeweils ein Emissionsspektrum im Bereich 380–580 nm bei der Anregungswellenlänge 320 nm gemessen.

**Tabelle 1.3: Lösungen für Versuchsteil 5 zur Bestimmung des Chiningehaltes von Tonic Water.** Alle Lösungen werden direkt in den Küvetten angesetzt. Achten Sie darauf, das Tonic Water vor Gebrauch wie angegeben um den Faktor 400 zu verdünnen.

Probe	Beschreibung	Tonic-Water-Verdünnung	Chininstandard (0,1 ppm)	0,1 N $\text{H}_2\text{SO}_4$
1	Lösungsmittelblindprobe	0	0	3360 $\mu\text{L}$
2	ohne Standardzusatz	140 $\mu\text{L}$	0	3360 $\mu\text{L}$
3	einfacher Standardzusatz	140 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$	3110 $\mu\text{L}$
4	zweifacher Standardzusatz	140 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	2860 $\mu\text{L}$
5	dreifacher Standardzusatz	140 $\mu\text{L}$	750 $\mu\text{L}$	2610 $\mu\text{L}$
6	vierfacher Standardzusatz	140 $\mu\text{L}$	1000 $\mu\text{L}$	2360 $\mu\text{L}$



**Abbildung 1.7: Prinzip der graphischen Auftragung für die Konzentrationsbestimmung nach der Methode der Standardaddition.** Wichtig ist die Verlängerung der Regressionsgeraden über die  $x$ -Achse hinaus bis zum Schnittpunkt mit der  $y$ -Achse, um die gewünschte Konzentration zu bestimmen.

Aus den Spektren wird die Intensität der Fluoreszenzemission bei 448 nm entnommen und jeweils mit der Intensität der Blindprobe bei der gleichen Wellenlänge korrigiert. Diese korrigierten Intensitätswerte werden auf der  $y$ -Achse gegen die zugesezte Konzentration (in  $\text{molL}^{-1}$ ) an freier Chininbase aus Standardlösung auf der  $x$ -Achse aufgetragen und eine lineare Regression berechnet. Die Regressionsgerade geht nicht durch den Nullpunkt und wird bis zum Schnittpunkt mit der Konzentrationsachse extrapoliert. Der  $x$ -Achsenabschnitt zwischen Ursprung und Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der  $x$ -Achse entspricht der Chininkonzentration, die in der zugegebenen Tonic-Water-Verdünnung enthalten ist (vgl. Abb. 1.7). Unter Berücksichtigung der Gesamtverdünnung kann der Chiningehalt im unverdünnten Tonic Water berechnet werden. Vergleichen Sie mit Literaturwerten.

#### 1.6.4 Dynamische Fluoreszenzlöschung nach Stern-Volmer

In diesem Aufgabenteil wird der Einfluss von Chlorid- bzw. Bromidionen auf die Fluoreszenz von Chinin untersucht. Halogenidionen sind für ihre Eigenschaft bekannt, die Fluoreszenz zu löschen.

Setzen Sie nacheinander die Mischungen entsprechend der Tab. 1.4 unter Verwendung der NaCl-Lösung in der Fluoreszenzküvette an und messen Sie das Emissionsspektrum im Bereich von 380–580 nm bei einer Anregungswellenlänge von 320 nm. Die Messreihe wiederholen Sie anschließend mit den gleichen Zugabemengen an NaBr-Lösung.

**Tabelle 1.4: Lösungen für Versuchsteil 6 zur dynamischen Fluoreszenzlöschung nach Stern-Volmer.** Alle Lösungen werden direkt in den Küvetten angesetzt. Achten Sie darauf, dass Sie alle Lösungen einmal für NaCl und ein zweites Mal für NaBr ansetzen müssen.

Probe	Chininstandard (0,1 ppm)	0,1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaCl- bzw. NaBr-Lösung
1	0	2200 µL	0 µL
2	800 µL	2200 µL	0 µL
3	800 µL	2100 µL	100 µL
4	800 µL	2000 µL	200 µL
5	800 µL	1900 µL	300 µL
6	800 µL	1800 µL	400 µL
7	800 µL	1700 µL	500 µL

Aus den Spektren entnehmen Sie wieder die Intensität der Fluoreszenzemission bei 448 nm und ziehen zur Korrektur davon jeweils die Intensität der Blindprobe (Probe 1) bei der gleichen Wellenlänge ab. Zur Auswertung tragen Sie jeweils die normierte Fluoreszenzintensität  $I_{F0}/I_F$  ( $y$ -Achse) gegen die Konzentration  $c_Q$  des Löschermoleküls NaCl bzw. NaBr (in mol L<sup>-1</sup>,  $x$ -Achse) auf. Die jeweiligen Halogenidionen-Konzentration berechnen Sie aus den Angaben in Tab. 1.1. Berechnen Sie die Regressionsgeraden für beide Messungen und geben Sie die Löschkonstanten  $K_{NaCl}$  und  $K_{NaBr}$  an. Beachten Sie bitte, dass die Regressionsgeraden *nicht durch den Ursprung* gehen, aber die  $y$ -Achse bei 1 schneiden (vgl. Abb. 1.9 im Anhang).

Welche der beiden Substanzen ist der effektivere Fluoreszenzlöcher? Welchen Kurvenverlauf erwarten Sie für eine statische Fluoreszenzlöschung? Welchen Versuch schlagen Sie vor, um dynamische und statische Fluoreszenzlöschung voneinander zu unterscheiden?

### 1.6.5 Bestimmung der instrumentellen Nachweisgrenze von Chinin

Die Angabe einer instrumentellen Nachweisgrenze  $c_N$  ist für die vergleichende Charakterisierung analytischer Methoden gebräuchlich. Dabei handelt es sich um die kleinste gerade noch feststellbare Konzentration der nachzuweisenden Substanz (des Analyten) in der Probe. Hier soll die **Leerwertmethode** (siehe Abschnitt 1.9.3) verwendet werden.

Füllen Sie 3000 µL der 0,1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in eine Küvette und nehmen Sie hintereinander zehn Spektren bei einer Anregungswellenlänge von 320 nm über einen Bereich von 380–580 nm auf. Entnehmen Sie den aufgenommenen Spektren jeweils die Intensität bei 448 nm (Leerwert) und berechnen Sie daraus die Standardabweichung  $\sigma_U$  nach Gl. (1.8).

Entnehmen Sie des Weiteren den Spektren der Proben 2–5 aus Versuchsteil 2 ebenfalls jeweils die Intensität bei 448 nm, tragen Sie die erhaltenen Werte gegen die Konzentration an freier Chininbase (in mol L<sup>-1</sup>) auf und berechnen Sie die lineare Regression ( $y = a + bx$ ) dieser Messwerte (*ohne Abziehen der Intensität der Blindprobe!*).

Die so erhaltenen Werte für  $\sigma_U$  und  $b$  setzen Sie in Gl. (1.7) bzw. (1.9) ein und bestimmen so die instrumentelle Nachweisgrenze  $c_N$  bzw. die Bestimmungsgrenze  $c_B$  für Chinin für den gegebenen Versuchsaufbau. Für Details vgl. den Anhang, insbesondere Abb. 1.10.

Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  für Chinin bei 348 nm beträgt  $\epsilon_{348} \approx 5700 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ . Gehen Sie davon aus, dass Sie mit einem normalen UV-Vis-Spektrometer bestenfalls eine Absorbanz von  $10^{-2}$  messen können. Berechnen Sie daraus die minimale über Absorption detektierbare Chininkonzentration und vergleichen Sie mit dem obigen Ergebnis für die Nachweisgrenze der fluorometrischen Bestimmung der Chininkonzentration.

## 1.7 Weiterführende Literatur

- Joseph R. Lakowicz: Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed., Springer, NY, 2006 (online verfügbar) → erstes Kapitel
- Peter Atkins, Julio de Paula: Physikalische Chemie, Wiley VCH

## 1.8 Themen für das Kolloquium

- Jabłoński-Termschema
- Franck-Condon-Prinzip
- Stokes-Verschiebung
- Absorptions-, Emissions- und Anregungsspektren
- Fluoreszenz/Phosphoreszenz
- Fluoreszenzintensität als Funktion der Konzentration
- Dynamische und statische Fluoreszenzlöschung
- Stern-Volmer-Gleichung
- Vorteile und Einsatzbereiche von Fluoreszenzmessungen
- Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers



## 1.9 Anhang

### 1.9.1 Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität

Strahlungsintensität,  $I$ , und Photonenzahl,  $N$ , sind proportional zueinander und über die Größen Energie,  $E$ , Zeit,  $t$ , und Fläche,  $A$ , miteinander verknüpft:

$$I = \frac{E}{tA} = \frac{N}{tA} h\nu = \frac{N}{tA} \frac{hc}{\lambda} \quad [I] = \text{W cm}^{-2}. \quad (1.1)$$

Dabei ist  $h$  die Planck-Konstante,  $\nu$  die Frequenz,  $c$  die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum und  $\lambda$  die Wellenlänge.

Die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F$  ist das Verhältnis von emittierter,  $I_F$ , zu absorbierter,  $I_A$ , Intensität:

$$\Phi_F = \frac{I_F}{I_A}. \quad (1.2)$$

Da die absorbierte Intensität  $I_A$  die Differenz der Intensitäten vor ( $I_0$ ) und hinter ( $I$ ) der Küvette ist, ergibt sich für die Intensität  $I_F$  emittierter Strahlung:

$$I_F = \Phi_F I_A = \Phi_F (I_0 - I). \quad (1.3)$$

Für die Absorbanz,  $A$ , gilt nach dem **Lambert-Beerschen Gesetz** mit der Konzentration,  $c$ , der Schichtdicke,  $d$ , und dem dekadischen Extinktionskoeffizienten,  $\epsilon_{10}$ :

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon_{10} dc \quad \Rightarrow \quad I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon_{10} dc}. \quad (1.4)$$

Setzen wir  $I$  in Gleichung (1.3) ein, ergibt sich für die Fluoreszenzintensität:

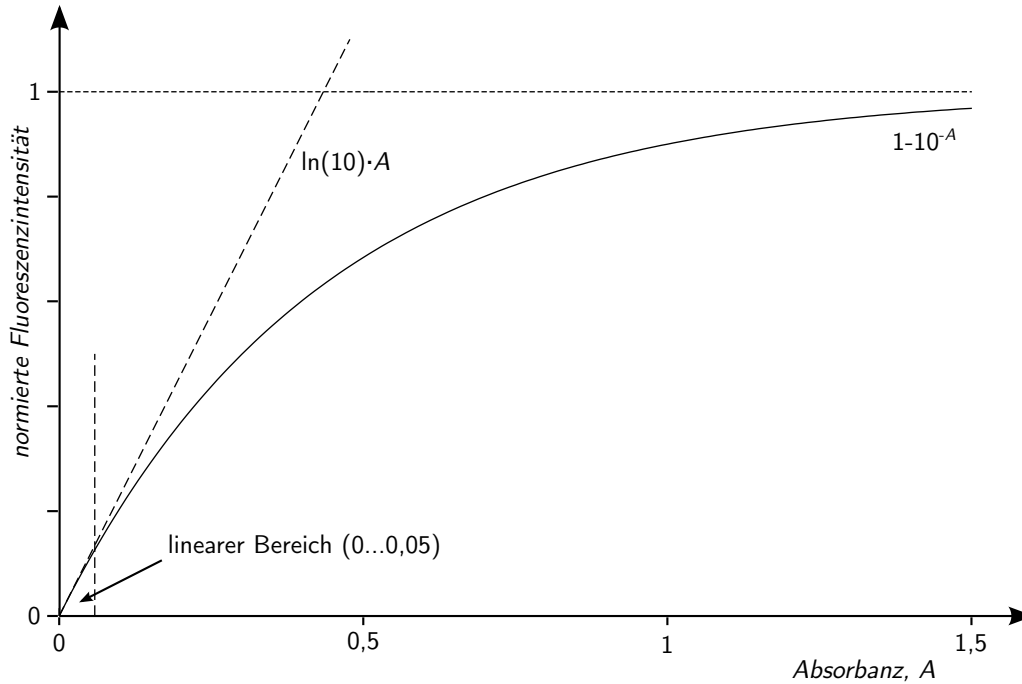
$$I_F = \Phi_F (I_0 - I_0 \cdot 10^{-\epsilon_{10} dc}) = \Phi_F I_0 (1 - 10^{-\epsilon_{10} dc}). \quad (1.5)$$

Daraus ist ersichtlich, dass die Intensität der Fluoreszenzemission nicht linear von der Konzentration des fluoreszierenden Stoffes abhängt. Wenn die Gleichung etwas umgestellt und statt  $\epsilon_{10} dc$  die Absorbanz  $A$  verwendet wird, ergibt sich die normierte Darstellung

$$\frac{I_F}{\Phi_F I_0} = 1 - 10^{-A},$$

deren Auftragung in Abb. 1.8 zu sehen ist.

Man erkennt, dass für kleine Absorbanzwerte mit einem linearen Verlauf der Fluores-



**Abbildung 1.8: Fluoreszenzintensität als Funktion der Absorbanz des Fluorophors.** Die lineare Näherung ist nur für sehr kleine Absorbanzwerte gültig. Deshalb ist es wichtig sicherzustellen, dass die Messungen in der Regel nur in diesem Bereich durchgeführt werden.

zenzintensität gerechnet werden kann. Wir können die Gleichung für diesen linearen Bereich berechnen, indem wir die Funktion in eine Potenzreihe an der Stelle  $A_0 = 0$  entwickeln (**Taylor-Reihenentwicklung**) und diese nach dem Linearglied abbrechen:

$$\begin{aligned}
 f(A) &= f(A_0) + \frac{f'(A_0)}{1!}(A - A_0) + \frac{f''(A_0)}{2!}(A - A_0)^2 + \dots \\
 f(A) &= 1 - 10^{-A} \\
 &\Rightarrow f(A_0) = 0 \\
 f'(A) &= \frac{d}{dA}(1 - 10^{-A}) = \ln(10) \cdot 10^{-A} \\
 &\Rightarrow f'(A_0) = \ln(10) \\
 f(A) &\approx \ln(10) \cdot A \\
 &\Rightarrow I_F \approx \Phi_F I_0 \cdot 2,303 \cdot \epsilon_{10} dc.
 \end{aligned}$$

Die Fluoreszenzintensität  $I_F$  ist proportional zur Konzentration  $c$  des Fluorophors, wenn die folgenden Bedingungen erfüllt sind:

1. Die Eintrittsintensität  $I_0$  des anregenden Lichtes ist konstant (wird automatisch vom Spektrometer mit Hilfe des Referenzkanals nachgeregelt).

2. Der dekadische Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{10}$  ist konstant (was bei konstanter Wellenlänge  $\lambda_A$  des anregenden Lichtes gegeben ist).
3. Die Quantenausbeute  $\Phi_F$  ist konstant (was bei festgehaltener Wellenlänge  $\lambda_F$  des emittierten Lichtes gegeben ist).
4. Die Küvettendicke (Schichtdicke)  $d$  ist konstant (normalerweise gegeben).
5. Für die Absorbanz  $A$  der Probenlösung gilt  $A \leq 0,05$  (vgl. Abb. 1.8).

Für alle praktischen Belange den Praktikumsversuch betreffend können Sie davon ausgehen, dass die oben aufgeführten Kriterien erfüllt sind.

### 1.9.2 Fluoreszenzlöschung

Unter **Fluoreszenzlöschung (Quenching)** versteht man die strahlungslose Deaktivierung des angeregten Zustands des Fluorophors, wobei die Absorption des anregenden Lichtes unverändert bleibt. So ist z.B. der Absorptionskoeffizient von Chinin in Schwefelsäure der gleiche wie in Salzsäure, die Fluoreszenzintensität dagegen unterscheidet sich stark. Löschen kann durch verschiedene Prozesse erfolgen, z.B. durch Stöße, Energietransfer, chemische Reaktionen im angeregten Zustand.

Grundsätzlich lassen sich in Lösung zwei Mechanismen für die Fluoreszenzlöschung unterscheiden:

**dynamische Fluoreszenzlöschung** diffusionskontrollierte Kollisionen zwischen angeregten Fluorophormolekülen und Löschmolekülen, auch als Stoßlöschung bezeichnet

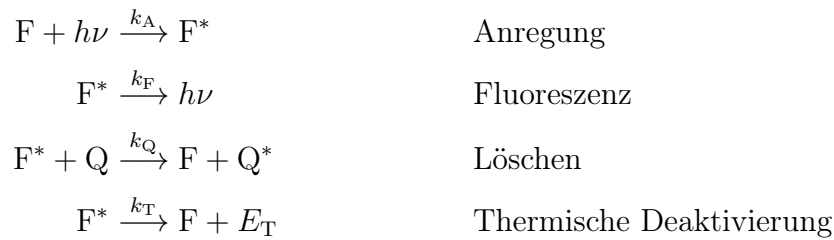
**statische Fluoreszenzlöschung** Komplexbildung des Fluorophors mit Löschmolekülen

Beide Prozesse hängen von der Konzentration der löschenden Moleküle ab und erfordern den direkten Kontakt zwischen Fluorophor und Löscher. Untersuchungen der Fluoreszenzlöschung können deshalb Aufschluss über die Zugänglichkeit eines Fluorophors (z.B. in einem Protein oder einer Membran) oder über die Diffusionsgeschwindigkeit des Löschers geben.

Bekannte wirksame Fluoreszenzlöscher sind z.B. Halogenidionen, Sauerstoff, Acrylamid usw.

Bei der **dynamischen Fluoreszenzlöschung** konkurrieren im wesentlichen vier Prozesse miteinander, denen jeweils eine eigene Ratenkonstante  $k$  zugewiesen werden kann. Im Folgenden sei F der Fluorophor, Q der Löscher,  $h\nu$  ein Photon und  $E_T$  die thermische

Energie. Angeregte Zustände sind mit einem Stern gekennzeichnet.



Alle vier Prozesse beeinflussen die Konzentration des angeregten Fluorophors,  $[F^*]$ , woraus sich die folgende Gleichung für die Reaktionsgeschwindigkeit ergibt:

$$\frac{d[F^*]}{dt} = k_A[F]I_0 - k_F[F^*] - k_Q[F^*]c_Q - k_T[F^*]$$

Wir nehmen eine optisch „dünne“ Lösung an, so dass die Anregung mit annähernd konstanter Lichtintensität  $I_0$  über die gesamte Schichtdicke erfolgt.

Im stationären Zustand ist die Summe aller vier Geschwindigkeitsbeiträge null, d.h.

$$\frac{d[F^*]}{dt} = 0.$$

Die dann vorliegende Konzentration an angeregtem Fluorophor sei

$$[F^*]^{stat} = \frac{k_A[F]I_0}{k_F + k_Q[Q] + k_T}$$

und mit

$$k_A[F]I_0 = I_A$$

folgt

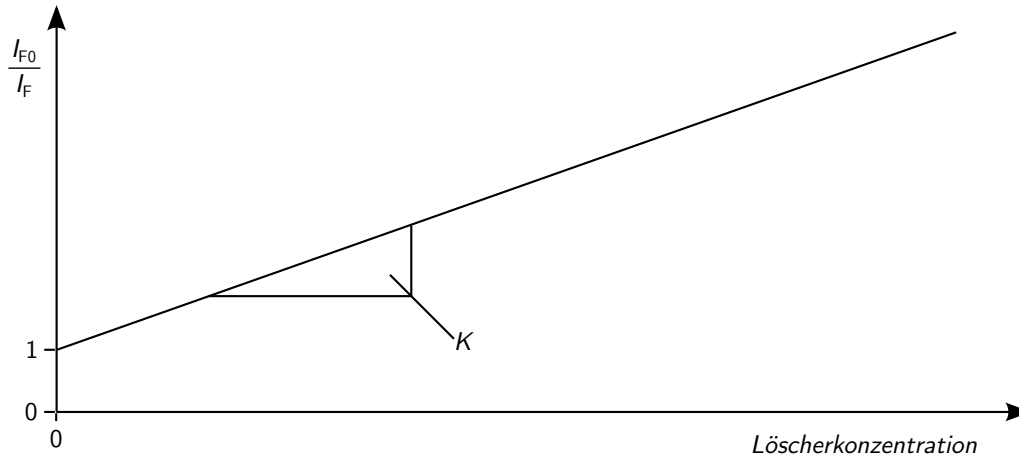
$$[F^*]^{stat} = \frac{I_A}{k_F + k_Q[Q] + k_T}.$$

Für die Intensität der Fluoreszenzemission,  $I_F$ , ergibt sich:

$$I_F \propto -\frac{d[F^*]}{dt} = k_F[F^*]$$

Im stationären Zustand ist also die Fluoreszenzintensität  $I_F$  proportional zu  $k_F[F^*]$  und somit gilt bei Anwesenheit von Fluoreszenzlöschern

$$I_F \propto \frac{k_F I_A}{k_F + k_Q[Q] + k_T}.$$



**Abbildung 1.9: Stern-Volmer-Auftragung zur Untersuchung der Fluoreszenzlöschung.** Aufgetragen wird die Löscherkonzentration gegen die normierte Fluoreszenzintensität. Beachten Sie, dass die Kurve die  $y$ -Achse zwingend bei 1 schneidet, vgl. Gl. (1.6). Im Falle eines linearen Zusammenhanges kann die Stern-Volmer-Konstante  $K$  durch lineare Regression ermittelt werden.

In Abwesenheit von Fluoreszenzlöschern,  $[Q] = 0$ , gilt für die Intensität der Fluoreszenzemission entsprechend

$$I_{F_0} \propto \frac{k_F I_A}{k_F + k_T}.$$

Für das Verhältnis der Intensitäten ohne und mit Fluoreszenzlöschern erhält man schließlich:

$$\frac{I_{F_0}}{I_F} = \frac{k_F + k_Q[Q] + k_T}{k_F + k_T} = 1 + \frac{k_Q}{k_F + k_T}[Q]$$

Mit

$$K = \frac{k_Q}{k_F + k_T}$$

ergibt sich die **Stern-Volmer-Gleichung**

$$\frac{I_{F_0}}{I_F} = 1 + K[Q], \quad (1.6)$$

die häufig bei der Auswertung von Fluoreszenzlöschungsexperimenten verwendet wird. Die zugehörige Auftragung ist in Abb. 1.9 schematisch gezeigt. Die Größe  $K$  wird Löschkonstante oder Stern-Volmer-Konstante genannt und hängt sowohl von der Temperatur als auch von der Viskosität des Lösungsmittels ab.

Ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen den aufgetragenen Größen im Stern-

Volmer-Diagramm, liegt nur eine Klasse von Fluorophoren vor, deren Moleküle alle gleichermaßen für den Fluoreszenzlöcher zugänglich sind. Liegen mindestens zwei Klassen von Fluorophoren vor<sup>3</sup>, die unterschiedliche Zugänglichkeiten für den Fluoreszenzlöcher aufweisen, ergeben sich nichtlineare, nach unten gekrümmte Kurven in der Stern-Volmer-Auftragung.

Das Phänomen der Fluoreszenzlöschung insbesondere durch kleine Moleküle eröffnet einen breiten Anwendungsbereich. So lassen sich z.B. Fluoreszenzsonden auf Makromolekülen lokalisieren oder die Durchlässigkeit von Proteinen oder Membranen für Löschermoleküle untersuchen. Die intrinsische Fluoreszenz von Tryptophan, einer in Proteinen vorkommenden Aminosäure, dient u.a. der Untersuchung der Proteinfaltung.

### 1.9.3 Instrumentelle Nachweisgrenze

Die instrumentelle Nachweisgrenze  $c_N$  ist definiert als die kleinste mit einem gegebenen Spektrometer gerade noch feststellbare Konzentration einer zu untersuchenden Substanz (Analyt) in der Probe. Wird die Konzentration des Analyten weiter verringert, wird das gemessene Signal so klein, dass es nicht mehr von der Fluktuation des Untergrundsignals oder des Blindwertes unterschieden werden kann.

Es gibt mehrere Methoden, die instrumentelle Nachweisgrenze zu bestimmen. Hier kommt die **Leerwertmethode** zum Einsatz, die auf der direkten Messung der Streuung des Leerwertes, d.h. der Intensitätsstreuung einer Probe mit einer Konzentration  $c_A = 0$  des Analyten, in unserem Fall Chinin, beruht. In der Praxis kann der Leerwert z.B. zehnmal hintereinander gemessen werden, um daraus die Standardabweichung  $\sigma_U$  zu berechnen. Außerdem wird eine Kalibrierkurve im linearen Bereich aufgenommen und die Steigung  $b$  (analytische Empfindlichkeit) anhand der linearen Regression der Form  $y = a + bc_A$  bestimmt.

Eine verbreitete Art der statistischen Definition der Nachweisgrenze  $c_N$  spektrometrischer Verfahren, die hier verwendet werden soll, beruht auf der Berechnung nach

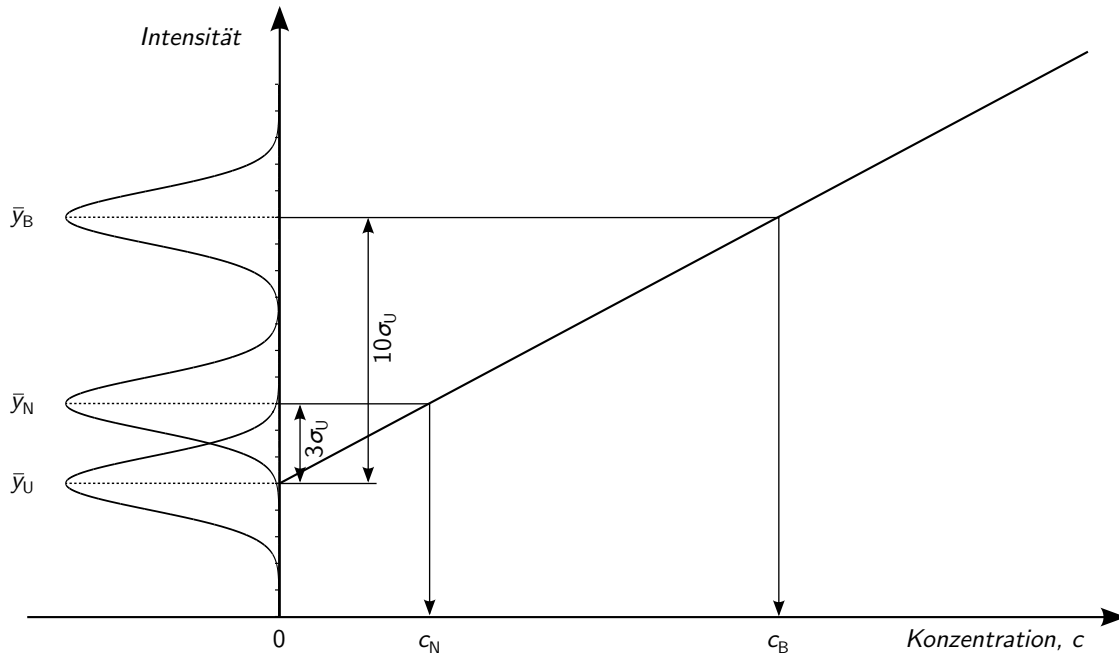
$$c_N = \frac{3 \cdot \sigma_U}{b}. \quad (1.7)$$

Die Standardabweichung  $\sigma$  für  $n$  Messwerte wird aus den quadrierten Abweichungen der Einzelwerte  $x_i$  vom Mittelwert  $\bar{x}$  der Einzelresultate berechnet:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}. \quad (1.8)$$

---

<sup>3</sup>Dabei kann es sich chemisch um die gleiche Substanz handeln. Ein Beispiel wären zwei Tryptophan-Reste in einem Protein, von denen einer oberflächenexponiert und damit für den Löcher leicht zugänglich ist, ein anderer nicht, da er tief im Protein liegt.



**Abbildung 1.10: Statistische Bedeutung der durch die Leerwertmethode bestimmten instrumentellen Nachweisgrenze.** Die instrumentelle Nachweisgrenze wird aus dem Mittelwert des Untergrundsignales  $\bar{y}_U$  für  $c = 0$  bestimmt. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen entsprechen der interpolierten Konzentration von Messwerten, die durch Addition des dreifachen ( $\bar{y}_N$ ) bzw. zehnfachen ( $\bar{y}_B$ ) Wertes der Streuung zum Mittelwert des Untergrundsignales  $\bar{y}_U$  erhalten werden. Nach Kläntsch et al. (1996), verändert.

Der Faktor 3 in Gl. (1.7) lässt sich unter Annahme einer Normalverteilung der einzelnen Messwerte der Untergrundmessung wie folgt erklären: Bei einer Normalverteilung liegen 99,7% der Werte in einem Bereich um den Mittelwert, der durch den dreifachen Wert der Standardabweichung  $\sigma$  bestimmt wird.

In der Praxis ist die Bestimmungsgrenze  $c_B$  oft von größerer Bedeutung als die Nachweisgrenze. Durch den Einbezug eines Sicherheitsfaktors liegt die Bestimmungsgrenze höher als die Nachweisgrenze und ist im Routinebetrieb die realistischere erreichbare untere Grenze für die Konzentrationsbestimmung des Analyten. Die Bestimmungsgrenze  $c_B$  wird häufig definiert als:

$$c_B = \frac{10 \cdot \sigma_U}{b} \quad (1.9)$$

Im Gegensatz zur Nachweisgrenze wird hier also die zehnfache Standardabweichung als Sicherheit angesetzt (vgl. Abb. 1.10).

Nachweis- und Bestimmungsgrenze sind beides Schätzwerte, da sie ihrerseits der Streuung bei der Messung unterliegen. Trotzdem sind sie von großem Wert für vergleichende Betrachtungen und deshalb wichtige Kenngrößen einer Analysemethode.

## Literaturverzeichnis

- P. W. Atkins und J. de Paula. *Physikalische Chemie*. Wiley-VCH, Weinheim, 4. Auflage, 2006.
- H. Haken und H. C. Wolf. *Molekülphysik und Quantenchemie*. Springer, Heidelberg, 5. Auflage, 2006.
- N. Kläntschi, P. Lienemann, P. Richner, und H. Vonmont. *Elementaranalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1996.
- J. R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, New York, NY, 3<sup>rd</sup> edition, 2006.
- N. J. Turro, V. Ramamurthy, und J. C. Scaiano. *Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules*. University Science Books, Sausalito, CA, 2010.

Letzter Bearbeiter: Till Biskup  
Letzte Bearbeitung: 26. Juli 2016