

Christian Terhorst

Spektrofluorimetrische Untersuchung der
maximalen Anregung und Fluoreszenz
Emission ausgewählter Verbindungen.
Ermittlung des Linearbereiches der
Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der
Konzentration.

Inhaltverzeichnis:

Thema:

- 1 Aufgabenstellung
- 2 Theoretische Grundlagen
 - 2.1 Definition der Fluoreszenz und Phosphoreszenz
 - 2.2 Betrachtung der verschiedenen Strahlungsarten
 - 2.3 Auswirkungen auf die Materie
 - 2.4 Fluoreszenzerscheinungen
 - 2.4.1 Fluoreszenz in organischen Verbindungen
 - 2.4.2 Fluoreszenz in der Natur
 - 2.5 Technische Bedeutung der Fluoreszenz
 - 2.6 Herleitung der Auswerteformeln
 - 2.6.1 Messtechnik
 - 2.6.2 Wellenlänge
 - 2.6.3 Störungen
 - 2.7 Aufbau des Spektrofluorimeters
- 3 Praktischer Teil
 - 3.1 Geräte und Chemikalien
 - 3.2 Messwerte
 - 3.2.1 Ermittlung der maximalen Anregungswellenlänge
 - 3.2.2 Ermittlung der maximalen Emissionswellenlänge
 - 3.2.3 Messung der Verdünnungsreihe
 - 3.2.4 Messung der Kalibrierreihe
 - 3.3 Diskussion
- 4 Literaturverzeichnis
- 5 Anhang (Ausdrucke)

1 Aufgabenstellung

- Aufnahme der Fluoreszenzspektren vorgegebener fluoreszierender Stoffe
- Auffinden der maximalen Anregungswellenlänge
- Auffinden der maximalen Emissionswellenlänge
- Auffinden des linearen Bereichs der Fluoreszenz durch Auftragen der Intensität der fluoreszierenden Strahlung in Abhängigkeit von der Konzentration des fluoreszierenden Stoffes in der Lösung
- Erstellung einer Kalibriergeraden für den Linearbereich unter Anwendung der Linearregression, Korrelationskoeffizient (Funktionsgleichung)

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Definition der Fluoreszenz und Phosphoreszenz

Fluoreszenz ist ein optisches Phänomen, bei dem ein Atom oder Molekül ein Photon absorbiert und später ein Photon mit niedrigerer Energie (d.h. größerer Wellenlänge) emittiert. Die Energiedifferenz der Photonen wird in Wärme umgewandelt. Das Phänomen ist eine besondere Art der Lumineszenz (kaltes Leuchten) und wurde nach dem fluoreszierenden Mineral Fluorit (Flussspat, Calciumfluorid, CaF_2) benannt. Im Unterschied zur Fluoreszenz folgt bei der Phosphoreszenz die Emission nicht unmittelbar auf die Absorption, d.h. innerhalb von 10^{-8} sec, sondern erst nach Millisekunden, Stunden oder gar Tagen.

Gemäß der Stokesschen Regel muss die Wellenlänge des emittierten Photons mindestens gleich oder größer sein als die des absorbierten Photons. Bei exakt gleichen Wellenlängen spricht man auch von Resonanzfluoreszenz.

Eine Ausnahme der Stokesschen Regel stellt die Zwei-Photonen-Fluoreszenz dar. Hier kann die Wellenlänge des emittierten Photons kleiner sein, als die der beiden absorbierten Photonen, solange das den Energieerhaltungssatz nicht verletzt. Normalerweise stellt die halbe Wellenlänge der beiden absorbierten Photonen die Untergrenze für die Wellenlänge des emittierten Photons dar.

Phosphoreszenz ist eine besondere Form der Lumineszenz, die sich von der Fluoreszenz darin unterscheidet, dass die Abklingzeit wesentlich länger ist. Meist ist die Abklingzeit $>10^{-4}$ sec und erfolgt aus einem Energieniveau, welches spinverboten ist. Häufig sind die phosphoreszenten Übergänge die, die aus einem Triplett in einen Singulett-Zustand erfolgen. Ein Stoff der gute Phosphoreszenz zeigt ist z.B. ZnS mit Spuren von Schwermetallsalzen. Auch wenn es der Begriff Phosphoreszenz nahe legt: Elementarer, weisser Phosphor phosphorisiert gar nicht: Hierbei handelt es sich um eine besondere Form der Chemolumineszenz.

2.2 Betrachtung der verschiedenen Strahlungsarten

Bei Absorptionsvorgängen in einem Atom/Molekül kann Energie auf unterschiedliche Weise aufgenommen werden. Je nach Anregung unterscheidet man die Art der Strahlung.

Im Gegensatz zur Temperaturstrahlung eines heißen Körpers, hervorgerufen durch die Bewegungsenergie von Atomen und Molekülen, versteht man unter Lumineszenz Strahlungserscheinungen, die Strahlung bei der verschiedenen Stoffen nach einer vorangegangenen Anregung ohne Abgabe thermischer Energie auftreten. Man unterscheidet je nach Art der Anregung, d.h. der Art der Energiezufuhr, verschiedener Lumineszenzprozesse.

- Radiolumineszenz : Anregung durch energiereiche Partikel- oder Gammastrahlung radioaktiver Prozesse
- Elektrolumineszenz : Anregung durch elektrische Wechselfelder.
- Tribolumineszenz : Schwache Leuchterscheinungen bei mechanischer Einwirkung auf spezielle Kristalle
- Galvanolumineszenz : Lumineszenzerscheinung bei Elektrolysevorgängen
- Thermolumineszenz : Bei Erwärmung auf max. 150°C wird Lumineszenz ausgelöst (Abgabe gespeicherter Energie, z.B. infolge der Einwirkung radioaktiver Strahlung)
- Chemolumineszenz : Anregung infolge chemischer Reaktionen (Umkehrung photochemischer Vorgänge)
- Biolumineszenz : Sonderfall der Chemolumineszenz als Folge biologisch-chemischer Vorgänge
- Photolumineszenz : Energiezufuhr durch Absorption von ultraviolettem Licht (UV), sichtbarem Licht (VIS) oder infrarotem Licht (IR)

Aus dieser Reihe von Lumineszenz Erscheinungen ist für die chemische Analytik vor allem die Photolumineszenz für qualitative und quantitative Analysen von Bedeutung. Man unterscheidet je nach Dauer des Abstrahlungsvorganges (der Emission) innerhalb der Photolumineszenz zwischen Fluoreszenz und der Phosphoreszenz. Trägt man die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Wellenlänge auf, erhält man das Fluoreszenzspektrum. Man unterscheidet das Anregungs- und wichtiger – das Emissionsspektrum. Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität bei fester Anregungswellenlänge von der Emissionswellenlänge bezeichnet man als Fluoreszenz – Emissionsspektrum (kurz Fluoreszenzspektrum). Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität bei fester Emissionswellenlänge von der Anregungswellenlänge als Fluoreszenz – Anregungsspektrum. Als Fluorophore werden die Moleküle bezeichnet, bei denen Energieumwandlungen mit Fluoreszenzerscheinungen verbunden sind.

Unter Quencheffekte versteht man Störeffekte, die eine Fluoreszenzminderung oder gar eine Fluoreszenzlöschung durch Wechselwirkung zwischen dem Fluorophor und einer anderen Substanz im System zur Folge haben.

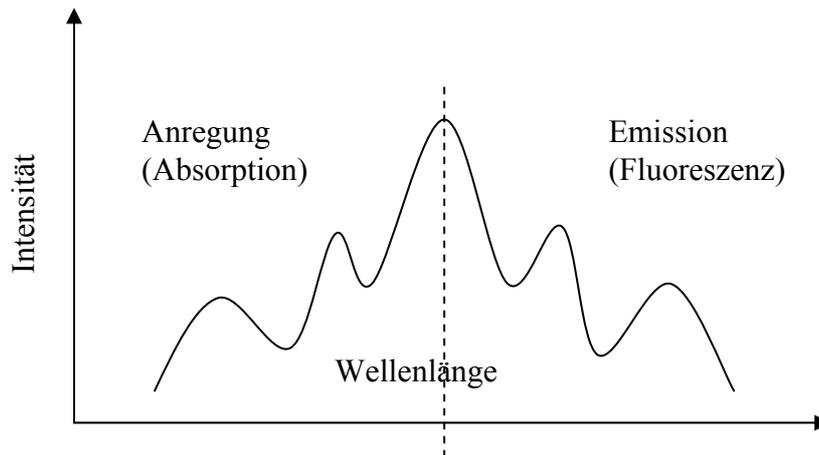


Abb1.: Idealisiertes Anregungs-(Absorptions-) und Emissions-Fluoreszenz-Spektrum

2.3 Auswirkungen auf die Materie

Die Prozesse, die von der Absorption von Anregungslicht zur Emission von Fluoreszenzlicht führen, werden oft mit Hilfe von Energiediagrammen dargestellt, die nach dem polnischen Physiker Alexander Jablonski benannt sind, dem Begründer der modernen Fluoreszenzspektroskopie. Ein Jablonski-Diagramm zeigt die Energien der Elektronenübergänge, die bei Absorption und Emission von Photonen auftreten.

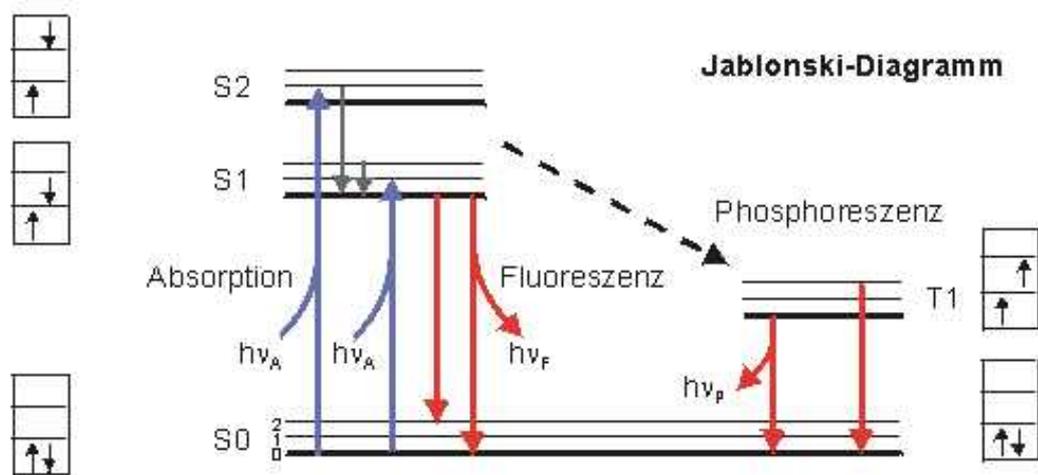


Abb 2.: Jablonski-Diagramm: Elektronenübergänge, Absorption, Emission, Elektronenspinrichtung

Durch Energieaufnahme (Absorption von Licht) können Moleküle, die sich bei Raumtemperatur meist im untersten Schwingungsniveau des Grundzustandes S_0 (Singulett-Zustand) befinden, einen elektronisch angeregten Zustand S_n , z.B. den ersten angeregten Zustand S_1 oder höhere Zustände erreichen. Die angeregten Zustände haben nur eine geringe Lebensdauer. Die höheren Schwingungszustände gehen nach etwa $1 \cdot 10^{-12}$ s in den jeweils niedrigsten Schwingungszustand über. Der

angeregte Elektronenzustand S_1 als ganzes ist etwas längerlebig : der Übergang $S_1 \rightarrow S_0$ erfolgt meist erst nach etwa 10^{-8} s.

Jedem Singulett Zustand lassen sich eine Anzahl Schwingungsniveaus zuordnen, welche weiterhin in feinere Rotationsniveaus unterteilt sind. Ähnlich wie bei der Emission sollten also zahlreiche Absorptionslinien im UV/VIS Spektrum auftreten, die den einzelnen Schwingungszuständen von S_1 zukommen. Bei Gasen lassen sich diese auch gut beobachten. In Flüssigkeiten sind die Moleküle eng benachbart und üben starke Wechselwirkungen aufeinander aus. Diese führen dazu, dass statt der scharf definierten Schwingungsniveaus ein breiter, kontinuierlicher Energieverbrauch auftritt. Die Schwingungsstruktur der einzelnen Elektronenzustände S_0 und S_1 wird verwischt, und man erhält häufig nur breite, kontinuierliche Absorptionsbanden, die dem Übergang zwischen zwei Elektronenzuständen entsprechen.

Wird ein Molekül z.B. auf ein höheres Singulett-Energieniveau S_2 angeregt, so verliert es innerhalb von weniger als 0,1 ns durch Molekülstöße den Überschuss an Schwingungsenergie, der zwischen den Singulett-Zuständen S_2 und S_1 , besteht, und fällt damit auf das niedrigste Energieniveau des angeregten Zustandes, auf S_1 , zurück. Dieser innere Übergang erfolgt strahlungslos.

2.4 Fluoreszenzerscheinungen

Fluoreszenzerscheinungen sind außerordentlich häufig, entgehen aber im gewöhnlichen Tageslicht zumeist der Beobachtung. Besonders oft wird die von der Sonne oder von künstlichen Lichtquellen ausgestrahlte unsichtbare Ultraviolettstrahlung absorbiert und als sichtbares, längerwelliges Licht ausgestrahlt. Beispielsweise emittieren die Leuchtstoffröhren im Verlaufe der Gasentladungs-Reaktionen einen beträchtlichen Prozentsatz ultravioletten Lichtes, das erst durch die im Innern der Röhren aufgedampften Leuchtstoffe in sichtbares Licht umgewandelt werden muss. Die Zahl der anorganischen Stoffe mit deutlicher Fluoreszenz ist verhältnismäßig klein; hierher gehören neben dem Flussspat einige Uran-Verbindungen, die Salze von Seltenerdmetallen und die Dämpfe von Quecksilber, Natrium, Kalium, Rubidium, Jod usw.. Viel häufiger sind fluoreszierende organische Stoffe; vor allem finden sich Fluoreszenzerscheinungen bei Benzol-Derivaten aller Art. Benzol selbst zeigt kräftige ultraviolette Fluoreszenz, d.h. es absorbiert kurzwelliges Ultraviolett (230–270 nm) und strahlt längerwelliges, aber immer noch unsichtbares Ultraviolett (260–300 nm) aus. Sind mehrere Benzol-Kerne kondensiert, so kann das Fluoreszenzlicht in den sichtbaren Bereich des Spektrums rücken. Auf Substitutionen in den Benzolmolekülen reagiert das Fluoreszenzspektrum hinsichtlich Lage und Intensität der Linien ähnlich empfindlich wie das gewöhnliche Absorptionsspektrum. Führt man in den Benzol-Kern die Nitro-Gruppe (Nitrobenzol, Nitrotoluol) ein, so verschwindet die Fluoreszenz völlig; dagegen wird sie durch Einführung von Alkyl-Gruppen verstärkt und zwar tritt bathochrome Verschiebung (nach längerwelligem Rot) ein; ähnlich wirken die eingeführte CN- od. $H_2C=CH$ -Gruppe, während Halogene im Benzol-Moleküle nur eine geringe Verschiebung der Fluoreszenz unter gleichzeitiger Schwächung der Intensität bewirken.

2.4.1 Fluoreszenz in organischen Verbindungen

Die Fluoreszenz verschiedener organischer Verbindungen kann man sehr schön unter „Schwarzlicht“, also Licht mit einem hohen Anteil an nicht sichtbarem UV Licht, beobachten. Dieses Licht besitzt nur einen geringen Teil an sichtbarem Licht, weshalb sie Fluoreszenz sehr gut zu sehen ist. Einige Substanzen sind aber auch schon mit normalem Tageslicht als fluoreszent zu identifizieren.

Fluorophor	Farbe der Fluoreszenz
Fluorescein	Gelb-Grün
Rhodamin B	Rot
Eosin	Orange
DPA	Blau

Tab 1: Farbigkeit von Fluorophoren

Nun stellt sich die Frage, wie die Fluoreszenz verursacht wird.

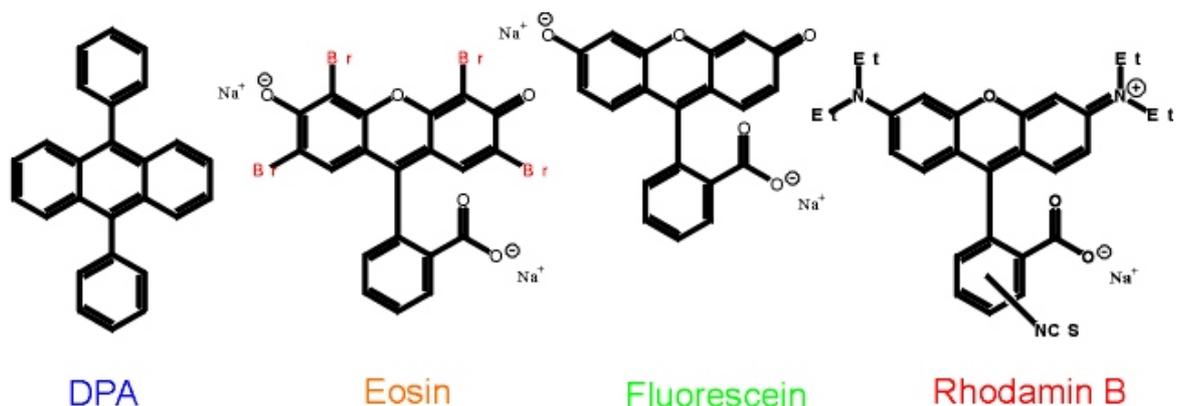


Abb. 3: Strukturformeln einiger Fluorophore

Betrachtet man die Strukturen der Fluorophore, so erkennt man jeweils eine große Anzahl an delokalisierten π -Elektronen. Diese Stoffe sind allesamt sehr gut mesomeriestabilisiert. Interessant ist, dass wenn man bei den sehr ähnlichen Stoffen Fluorescein, Eosin und Rhodamin B die Sauerstoffbrücke im zweiten Ring entfernt, diese Stoffe ihre Fähigkeit zur Fluoreszenz im Bereich des sichtbaren Lichts verlieren. Dies kann daran liegen, dass die Starrheit der Moleküle reduziert wird und somit die Energieabgabe durch Schwingungen erleichtert wird.

2.4.2 Fluoreszenz in der Natur

Bei Pflanzen ist die dunkelrote Chlorophyll-Fluoreszenz am besten untersucht. Daneben gibt es auch die in letzter Zeit stärker untersuchte Blau-Grün-Fluoreszenz, die von phenolischen Substanzen der Epidermis gemessen wird. Da intakte Pflanzen die Energie, die sie bei der Lichtabsorption von Chlorophyll aufnehmen auch in die Photosynthese umsetzen können, kann man aus der Höhe der

Fluoreszenz auf die Intensität der Photosynthese schließen. Der in erster Näherung reziproke Zusammenhang zwischen Chlorophyllfluoreszenz und Photosynthese ist schon vor fast 70 Jahren von H. Kautsky untersucht worden. Die Änderung der Chlorophyllfluoreszenz eines Blattes beim Übergang vom Dunkeln ins Licht gibt Informationen über die Photosyntheseaktivität, die wesentlich einfacher zu erzielen sind als mit den üblichen Photosynthesemethoden.

Wird die Fluoreszenz spektral aufgelöst, so kann man aus dem gemessenen Fluoreszenz-Emissionsspektrum auf die Farbstoffzusammensetzung einer Probe schließen. Die Fluoreszenz des Chlorophylls liegt zwischen 650 und 800 nm mit Maxima bei 690 nm (dunkelrot) und 740 nm (nahes infrarot). Die Fluoreszenz von phenolischen Substanzen liegt zwischen 350 und 600 nm mit Maxima bei 440 nm (blau) und 540 nm (grün). Das messbare Fluoreszenzemissionsspektrum eines Blattes wird wesentlich beeinflusst durch die Absorption der Farbstoffe, die ein Teil des innerhalb des Blattes emittierten Fluoreszenzlichtes re-absorbieren. Aus der Reabsorption kann man aber auch auf die Farbstoffkonzentration schließen. Das Emissionsspektrum der Chlorophyllfluoreszenz eines intakten Blattes ändert sich beim Übergang vom Dunkeln ins Licht. Mit einem Spektrometer, das Spektren innerhalb weniger Millisekunden aufzeichnet, konnte 1981 erstmals gezeigt werden, dass dabei die Position der Fluoreszenzmaxima gleich bleibt jedoch die Relation des Maximum von 690 nm zu dem bei 740 nm absinkt.

In jüngster Zeit wird Fluoreszenzbildanalyse von Pflanzen durchgeführt. Dabei wird die Fluoreszenz von Pflanzen mit hochempfindlichen Videokameras aufgezeichnet. Aus der Verteilung der Fluoreszenzintensität kann man auf Farbstoffzusammensetzung und eventuell auf Photosyntheseaktivität schließen. Fluoreszenzbilder mit mehreren tausend Bildelementen sind viel aussagekräftiger als die sonst üblichen Fluoreszenzmessungen nur an einem Punkt der Probe. Außerdem können aus der Musterverteilung der Fluoreszenzsignale weitere Schlüsse gezogen werden, z.B. verschiedene Stress-Typen.

2.5 Technische Bedeutung der Fluoreszenz

Die Fluoreszenz wird unter Anderem verwendet in der Spektroskopie zur Untersuchung und Detektion von Atomen und Molekülen (Fluoreszenzspektroskopie), wobei neben Lampen zur Anregung zunehmend Laser (Gaslaser, Festkörperlaser, Farbstofflaser) eingesetzt werden (LIF, laserinduzierte Fluoreszenz, Laserspektroskopie). Die Fluoreszenz ist die Basis für eine Reihe von analytischen Methoden in Chemie, Biochemie und Klinischer Chemie; beispielsweise benutzt man fluoreszenzfähige Moleküle für spezifische Nachweismethoden in der sog. Fluoreszenzanalyse und als sog. Fluoreszenzsonden zur spezifischen Markierung in der Immunologie. Da hierbei die Fluoreszenz von Fluorochrom „mitgebracht“ wird, spricht man von sekundärer Fluoreszenz. Fluorogene dienen zur Untersuchung von Enzymen und Proteinen, die im Tageslicht und/oder im UV-Licht stark fluoreszieren, können zur Herstellung von fluoreszierenden Briefmarken, von Reklamedrucken im Siebdruckverfahren, ferner zum Anfärben von Kunststoffen und Lacken verwendet werden. Geeignete Fluoreszenzfarbstoffe für Tagesleuchtfarben gehören den Acridinen, Xanthenen (z.B. Fluorescein, Rhodamin), Thioxanthenen, Pyrenen und anderen Klassen an. Die Einfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen kann den Wirkungsgrad von Solarkollektoren verbessern. Die Fluoreszenz wird auch ausgenutzt in den optischen Aufhellern (Weißtöner), die Textilien, Waschmitteln, etc. beigegeben werden.

2.6 Herleitung der Auswerteformeln

Die Größe, die in am einfachsten zu verändern ist, ist die Konzentration c , die der Intensität I_F proportional ist. Da das emittierte Licht maximal so energiereich sein kann, wie das absorbierte Licht, folgt daraus:

$$I_F \leq I_{\text{abs}} \text{ und } I_F = K \cdot I_{\text{abs}}, \text{ wobei } K \leq 1$$

Da nicht die gesamte Lichtintensität absorbiert wird, sondern nur ein Teil, gilt $I_{\text{abs}} = I_0 - I$. Der absorbierte relative Anteil muss dann folgendermaßen lauten:

$$I_{\text{abs}} / I_0 = (I_0 - I) / I_0 = 1 - (I / I_0)$$

Für $(I_0 - I)$ gilt nach dem Lambert – Beer'schen Gesetz:

$$I / I_0 = 10^{-\epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d} \text{ oder } E = \log I / I_0 = -\epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

Also folgt daraus:

$$I_{\text{abs}} / I_0 = (I_F / K) / I_0 = 1 - 10^{-\epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d}$$

$$I_F = K \cdot I_0 (1 - 10^{-\epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d})$$

Die Intensität ist also nicht linear, sondern nähert sich mit wachsender Konzentration c einem Grenzwert an (siehe auch Abb. 4).

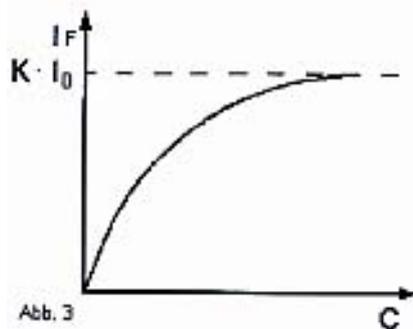


Abb. 4: Die Fluoreszenzintensität I_F in Abhängigkeit der Konzentration c

Mit Hilfe einer Taylor Reihe kann man den obigen Ausdruck nach Logarithmierung mit kleinen Werten von $-\epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$ folgendermaßen ausdrücken:

$$I_F = K \cdot I_0 \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

I_F verhält sich bei kleinen Konzentrationen also nahezu linear mit c . Da die Werte von c klein sind, macht man I_0 groß, um trotzdem eine relativ hohe Intensität I_F zu erhalten. Folglich muss man eine intensive Lichtquelle nutzen, um die Emission zu erhöhen.

Das im Inneren der Probe emittierte Licht kann auf seinen Weg nach draußen allerdings wieder absorbiert werden. Dadurch wird die gemessene Intensität I_F geringer und zwar relativ zu hohen Konzentrationen, was auch zu den nicht-linearen Verlauf in Abb. 4 beiträgt. Dieser Vorgang ist analog zur Selbstabsorption in der Flammenphotometrie.

2.6.1 Messtechnik

Um eine genügend hohe Messempfindlichkeit zu erreichen, wird das Gerät normiert, indem man mit einer hoch konzentrierten bekannten Kalibrierlösung einen Vollausschlag an der Skala einstellt. Die Gestalt der Fluoreszenzspektren ist auch abhängig von dem jeweiligen Gerätetyp, braucht aber in diesen Fall nicht weiter berücksichtigt werden.

2.6.2 Wellenlänge

Um nachvollziehbare Messwerte zu erhalten, muss die Probe in einem Spektralbereich angeregt werden, indem sie einen merklichen Extinktionskoeffizienten hat. Das Anregungsspektrum ergibt sich, wenn man mit konstanter Emissionswellenlänge misst, und dabei die Anregungswellenlänge verändert. Dieser Vorgang ist vergleichbar mit dem Absorptionsspektrum in der Photometrie. Bei konstant gehaltener Absorptionswellenlänge misst man die spektrale Verteilung des emittierten Lichts, indem man den 2. Monochromator verändert. Das Spektrum, welches man dadurch erhält, nennt man Fluoreszenz- oder Emissionsspektrum.

2.6.3 Störungen

Die von der Konzentration abhängige Intensität I_F ist ausserdem noch von der Temperatur und vom Lösungsmittel abhängig. Wenn das benutzte Reagenz keine genügende Spezifität aufweist, können auch andere, störende Stoffe fluoreszieren und mitgemessen werden, was einen Fehler nach sich zieht. Dieser Fehler lässt sich wie in der Photometrie aber teilweise durch eine Blindprobe kompensieren. Teilweise entstehen aber auch Störungen durch Begleitstoffe, die die Fluoreszenz reduzieren oder ganz auslöschen.

2.7 Aufbau eines Spektrofluorimeters

Das Fluorimeter ist ähnlich aufgebaut wie ein Photometer, mit dem Unterschied, dass man bei einem Spektralfluorimeter 2 Monochromatoren benötigt. Je einen für die Absorptionswellenlänge und einen für die Emissionswellenlänge. Die vier wesentlichen Bestandteile eines Spektralfluorimeters sind :

- Die Lichtquelle zur Anregung
- Die Monochromatoren (oder Filter) für die Selektion von Anregungs- und Emissionswellenlänge
- Die Messküvette
- Der Photomultiplier als Detektor

Durch die enorme Geräteempfindlichkeit zählt die Fluorimetrie zu der spektroskopischen Methode mit der man die geringsten Konzentrationen messen kann. Mit den heutigen Fluorimeter lassen sich Konzentrationen im ppt – Bereich noch nachweisen. Durch die hohe Intensität der Fluorophore lassen sich auch

einzelne Moleküle nachweisen. Dies ist besonders auf dem Gebiet der Spurenanalytik von sehr großer Bedeutung. Eine Grenze setzt nur der sogenannte Dunkelstrom. Darunter versteht man das Signal welches bei vollkommen abgeblendetem Empfänger abgegeben wird und dessen Größe temperaturabhängig ist.

Bei diesem Versuch wurde das Spektrofluorimeter RF1501 der Firma Shimadzu verwendet. Das Gerät kann sowohl zur Konstitutionsaufklärung und Identifizierung fluoreszierender Stoffe, als auch für die quantitative Bestimmung fluoreszierender Substanzen genutzt werden.

Im folgenden Bild ist der Strahlengang des Fluorimeters zu sehen.

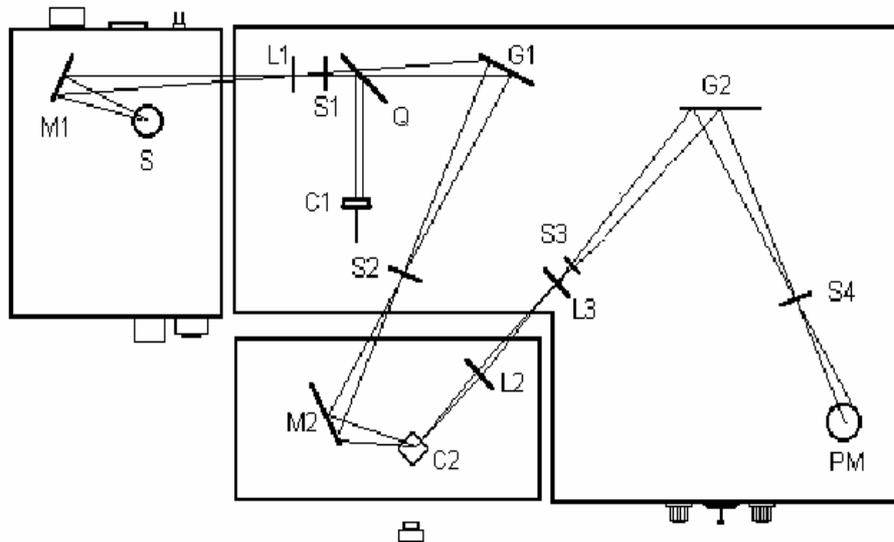


Abb. 5: Strahlengang eines Spektralfluorimeter

- S = Lichtquelle
- M1 = elliptischer Spiegel
- L1 = Eingangslinse für den Anregungsmonochromator
- S1 = Eintrittsspalt für den Anregungsmonochromator
- Q = Quarzstreifen
- C1 = Referenzzelle
- G1 = konkaves holographisches Gitter (Anregungsmonochromator)
- S2 = Austrittsspalt des Anregungsmonochromators
- M2 = Torroid-Spiegel
- C2 = Probenküvette
- L2 = Sammellinse
- L3 = Eingangslinse für den Emissionsmonochromator
- S3 = Eingangsspalt für den Emissionsmonochromator
- G2 = konkaves holographisches Gitter (Emissionsmonochromator)
- S4 = Austrittsspalt für den Emissionsmonochromator
- PM = Photomultiplier

3 Praktischer Teil

3.1 Geräte und Chemikalien

Spektralfluorimeter Shimadzu RF 1501
100 ml Messkolben (braunes Glas)
1 l Messzylinder
Probenküvette aus Quarz für fluorimetrische Bestimmungen
10 ml Vollpipette
Eppendorfpipette

Vorbereitende Arbeiten:

Herstellung einer Pufferlösung:

611 ml	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	[177,99 g/mol]
389 ml	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	[137,99 g/mol]

Stammlösung: Na- Fluorescein 10⁻³ mol/L → 376,29 g/mol

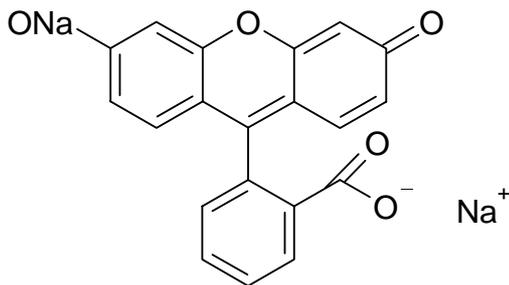


Abb.5: Struktur von Na- Fluorescein

Herstellen der Messreihe:

1.)	10ml Stammlösung	+ 90 ml Pufferlösung →	10 ⁻⁴ mol/L
2.)	10ml Lösung 1.)	+ 90 ml Pufferlösung →	10 ⁻⁵ mol/L
3.)	10ml Lösung 2.)	+ 90 ml Pufferlösung →	10 ⁻⁶ mol/L
4.)	10ml Lösung 3.)	+ 90 ml Pufferlösung →	10 ⁻⁷ mol/L
5.)	10ml Lösung 4.)	+ 90 ml Pufferlösung →	10 ⁻⁸ mol/L
6.)	10ml Lösung 5.)	+ 90 ml Pufferlösung →	10 ⁻⁹ mol/L

Herstellen der Kalibriergerade im linearen Bereich:

1.)	10 ⁻⁷ mol/L (siehe auch „Herstellen der Messreihe“ 4.))
2.)	2 ml Lösung 10 ⁻⁷ + 8 ml Pufferlösung → 2 · 10 ⁻⁷ mol/L
3.)	4 ml Lösung 10 ⁻⁷ + 6 ml Pufferlösung → 4 · 10 ⁻⁷ mol/L
4.)	6 ml Lösung 10 ⁻⁷ + 4 ml Pufferlösung → 6 · 10 ⁻⁷ mol/L
5.)	8 ml Lösung 10 ⁻⁷ + 2 ml Pufferlösung → 8 · 10 ⁻⁷ mol/L
6.)	10 ⁻⁶ mol/L (siehe auch „Herstellen der Messreihe“ 3.))

3.2 Messwerte

Die Anregungs- und Emissionswellenlänge wurde mit der 10^{-6} mol/L Lösung aufgenommen.

3.2.1 Ermittlung der maximalen Anregungswellenlänge

In den folgenden Tabellen sind die Messwerte dokumentiert. Die original Mitschriften aus dem Labor befinden sich im Anhang. In Tabelle 2 sind die Messwerte der Bestimmung der Anregungswellenlänge mit Wellenlänge und Intensität nach steigender Messnummer dokumentiert. Der unterstrichene Wert stellt das Maximum dar.

Wellenlänge λ	Intensität
440	89,572
445	117,629
450	152,237
455	191,223
460	221,998
465	265,620
470	308,368
475	382,150
480	496,124
485	593,996
<u>490</u>	<u>623,560</u>
495	559,562
500	420,087
505	260,261
510	138,847
515	66,082
520	29,806
525	11,765
530	4,718
535	2,318
540	1,634

*Tab.2 : Wellenlänge und Intensität
des Anregungsspektrums*

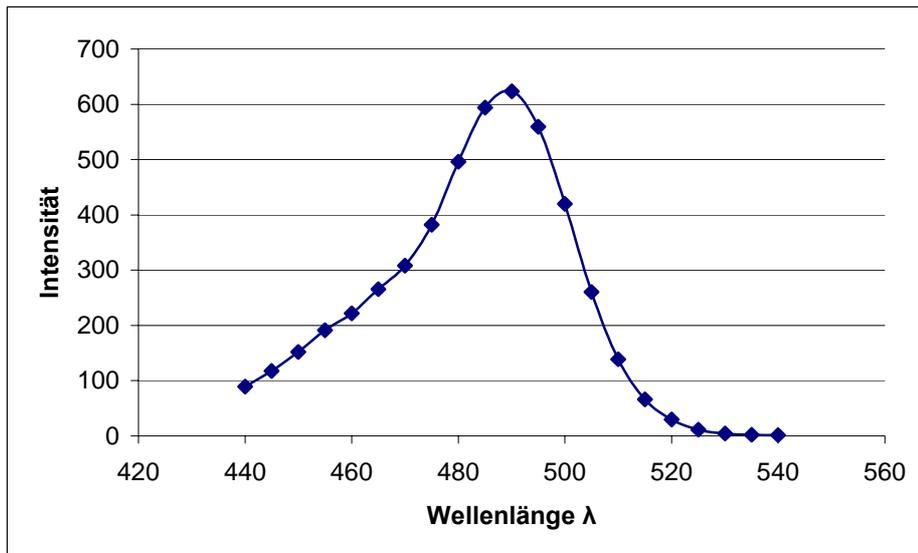


Diagramm 1: Absorptionsspektrum, Wellenlänge λ in Abhängigkeit von der Intensität

Bei der Wellenlänge $\lambda = 490$ nm hat die Kurve ein Maximum.

3.2.2 Ermittlung der maximalen Emissionswellenlänge

In der Tabelle 3 ist die Wellenlänge λ und die Intensität zur Bestimmung der Emissionswellenlänge dokumentiert.

Wellenlänge λ	Intensität
460	0,286
465	0,738
470	1,881
475	4,819
480	11,749
485	26,335
490	51,795
495	86,371
500	117,137
505	133,294
510	127,797
515	114,295
520	96,899
525	80,911
530	69,531
535	60,170
540	51,689
545	43,297
550	36,448
555	29,403
560	22,873

Tab.3 : Wellenlänge und Intensität des Emissionsspektrums

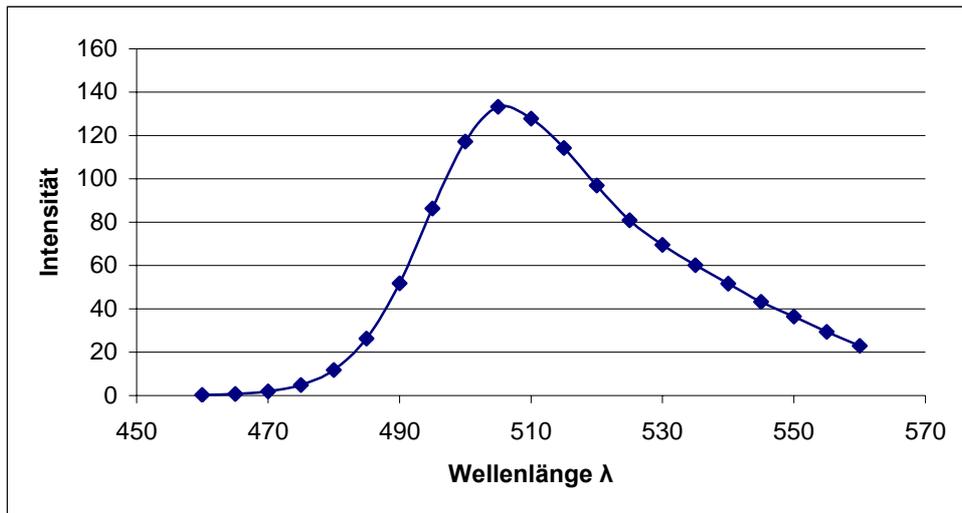


Diagramm 2: Emissionsspektrum, Wellenlänge λ in Abhängigkeit von der Intensität

Das Maximum der Kurve liegt bei ca. $\lambda = 505$ nm. Die genaue Wellenlänge geht aus dem Messprotokoll hervor, welches im Anhang zu finden ist.

3.2.3 Messung der Verdünnungsreihe

Konzentration in mol/L	Intensität
10^{-9}	10,998
10^{-8}	7,466
10^{-7}	71,514
10^{-6}	768,994
10^{-5}	1015,529
10^{-4}	433,973

Tab. 4: Intensität der verschiedenen Lösungen

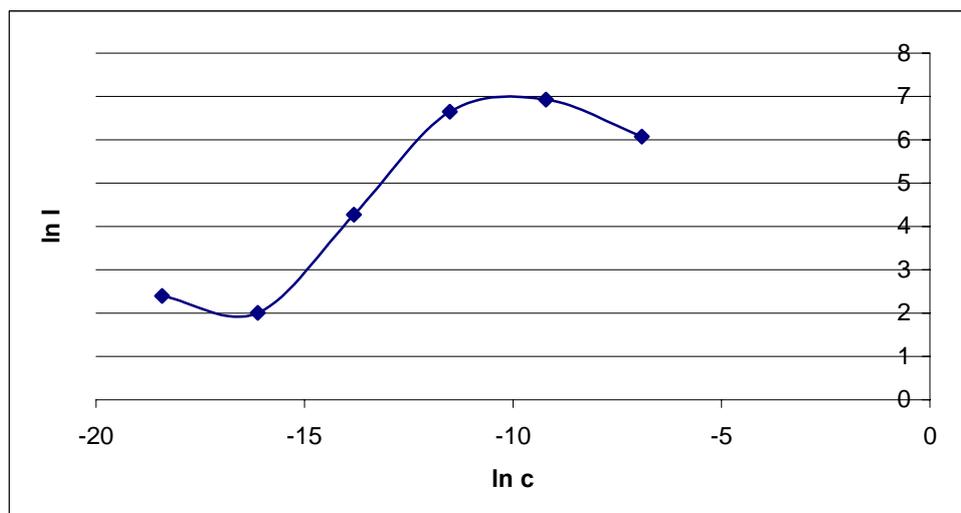


Diagramm 3: $\ln c$ gegenüber von $\ln I$

3.2.4 Messung der Kalibrierreihe

Die Messung wurde vorgenommen bei EX= 490nm und EM= 505nm. Diese Reihe deckt den linearen Bereich der Verdünnungsreihe ab.

Konzentration in mol/L	Intensität
10^{-7}	71,884
$2 \cdot 10^{-7}$	128,788
$4 \cdot 10^{-7}$	252,436
$6 \cdot 10^{-7}$	372,948
$8 \cdot 10^{-7}$	489,249
10^{-6}	599,839

Tab 5: Intensitäten der Kalibrierreihe

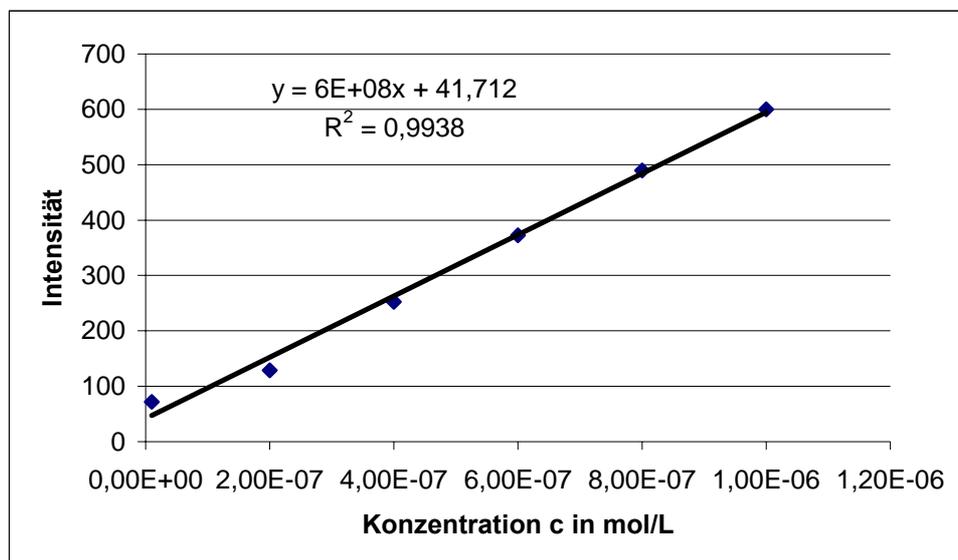


Diagramm 3: Die Konzentration c in Abhängigkeit von der Intensität des Linearen Bereiches

Man könnte mit Hilfe der Geradengleichung nun eine X-Probe bestimmen.

3.3 Diskussion

Alle Messungen wurden sorgfältig nach den Versuchsvorschriften durchgeführt. Die Spektren, bzw. die Ausdrücke des Druckers, der Anregung / Emission zeigen deutlich die erwünschten Maximalwerte auf.

Beim Auftragen der Konzentrationen über der Intensität wurde der Linearbereich sehr deutlich sichtbar. Der Linearbereich ist bei zu hohen und zu niedrigen Konzentrationen nicht gültig. Zum einen lag das an der Selbstabsorption bei zu hohen Konzentrationen zum anderen an der Bestimmungsgrenze bei zu niedrigen Konzentrationen.

Um mehr Punkte für die Kalibriergerade zu erhalten wurden 5 zusätzliche Konzentrationen hergestellt und vermessen.

Die Kalibriergerade, mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9938 ist hinreichend genau. Fehler sind auf ungenaues Arbeiten zurückzuführen.

4 Literaturverzeichnis

- [1] Skript APCL
- [2] Römpp: Chemielexikon
 Thieme Verlag
 1989-92 9.Auflage
- [3] P. W. Atkins Physikalische Chemie
 WILEY-VCH Verlag GmbH
 2001, Dritte, korrigierte Auflage
- [4] Peter Pringsheim Fluoreszenz und Phosphoreszenz im Lichte der
 neuen Atomtheorie
 Verlag von Julius Springer 1923 Berlin
 zweite verbesserte Auflage
- [5] Internet: www.chemie.uni-marburg.de/~butenuth/642/LumiDateien/Fluor.htm
www.scanalyzer.de/fluoreszenz.htm