

## F73 Fluoreszenzlöschung von Fluorescein

### Aufgabe

Es sind die Absorptions- und Emissionsspektren von Natrium-Fluorescein (Uranin) aufzunehmen und zu untersuchen. Mit Hilfe verschiedener Proben ist die Stern-Volmer-Konstante für die dynamische Fluoreszenzlöschung zu bestimmen und daraus die bimolekulare Löschungskonstante  $k_q$  zu berechnen.

### Hinweise zur Gefährdungsbeurteilung

Verwendete Chemikalien: Natrium-Fluorescein, 0,1 M NaOH, Ethanol, NaBr, NaI (→ Entsorgung?)

Verwendete Geräte: Verschiedene Glasgeräte, Spektrometer, Lichtwellenleiter, verschiedene Leuchtdioden, Deuteriumlampe, Computer

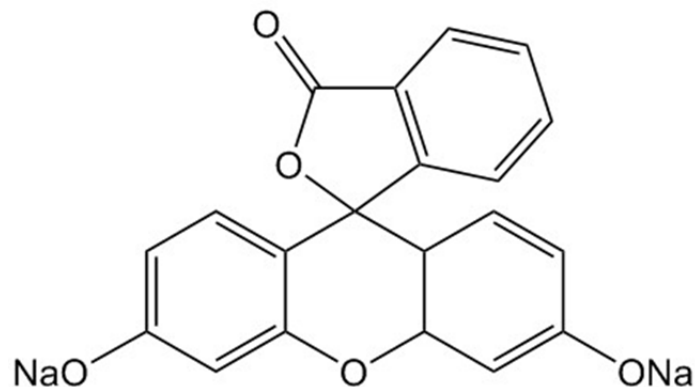


Abbildung 1: Natrium-Fluorescein

## Grundlagen

### Absorption

Atome und Moleküle besitzen die Fähigkeit, durch Lichtabsorption photochemische Prozesse einzugehen. Nach dem Franck-Condon-Prinzip erfolgen elektronische Übergänge ohne Änderung der Kernkoordinaten während der Anregung. Zur Untersuchung solcher Übergänge wird das Übergangsdipolmoment  $M_{v',v}$  zwischen dem Schwingungsgrundzustand und angeregten Zuständen betrachtet. Das Dipolmoment  $\mu$  eines Moleküls hängt jeweils vom Ort und der Ladung der Elektronen ( $r_i$  und  $e$ ) und der Kerne ( $R_I$  und  $Z_I e$ ) ab:

$$\mu = -e \sum_i r_i + e \sum_I Z_I R_I = \mu_e + \mu_N \quad (1.1)$$

$e$  Elementarladung,  $Z_I$  Kernladungszahl,  $\mu_e, \mu_N$  Dipolmomente der Elektronen und Kerne

Mit Hilfe der Born-Oppenheimer-Näherung kann man die vollständigen Wellenfunktionen des Grund- und angeregten Zustandes als Produkt der elektronischen und vibronischen Wellenfunktionen schreiben. Die vollständige Wellenfunktion für einen elektronischen Zustand  $\varepsilon$  im Schwingungszustand  $\nu$  ist demnach  $\Psi_\varepsilon(r; R)\Psi_\nu(R)$ , wobei  $\Psi_\varepsilon$  nur noch parametrisch von  $R$  abhängt. Für die Anregung  $\varepsilon, \nu \rightarrow \varepsilon', \nu'$  lautet das Übergangsdipolmoment:

$$\begin{aligned} M_{v',v} &= \langle \varepsilon' \nu' | \mu | \varepsilon \nu \rangle = \int \Psi_{\varepsilon'}^*(r; R) \Psi_{\nu'}^*(R) (\mu_e + \mu_N) \Psi_\varepsilon(r; R) \Psi_\nu(R) d\tau_e d\tau_N \\ &= \int \Psi_{\nu'}^*(R) \left\{ \int \Psi_{\varepsilon'}^*(r; R) \mu_e \Psi_\varepsilon(r; R) d\tau_e \right\} \Psi_\nu(R) d\tau_N \\ &\quad + \int \Psi_{\nu'}^*(R) \mu_N \left\{ \int \Psi_{\varepsilon'}^*(r; R) \Psi_\varepsilon(r; R) d\tau_e \right\} \Psi_\nu(R) d\tau_N \end{aligned} \quad (1.2)$$

Das Integral über die Koordinaten der Elektronen im zweiten Term (in der geschweiften Klammer) ist null, da die Elektronenzustände unabhängig vom gewählten Kernparameter zueinander orthogonal sind. Das noch verbleibende Integral über die Elektronenkoordinaten im ersten Term ist das Dipolmoment für den

Elektronenübergang bei konstantem  $R$ . Zusammengefasst kann man das Übergangsdipolmoment schreiben:

$$M_{\nu'\nu} = \langle \varepsilon' \nu' | \mu | \varepsilon \nu \rangle = \mu_{\varepsilon' \varepsilon} \int \Psi_{\nu'}^*(R) \Psi_{\nu}(R) d\tau_N = \mu_{\varepsilon' \varepsilon} S(\nu', \nu) \quad (1.3)$$

$S(\nu', \nu)$  ist hierbei das Überlappungsintegral zwischen den beiden Schwingungswellenfunktionen. Je besser die Schwingungswellenfunktionen bei einem Übergang überlappen, desto größer ist somit das Übergangsdipolmoment und damit auch die Intensität des Übergangs.

Einen weiteren Zusammenhang zwischen einfallender Lichtintensität und Extinktionskoeffizient liefert das Lambert-Beer'sche Gesetz. Danach gilt für die optische Dichte (Absorbanz):

$$OD = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (1.4)$$

$d$  optische Weglänge,  $\varepsilon$  molarer dekadischer Extinktionskoeffizient

Der Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  ist abhängig von der Wellenlänge  $\nu$  und bestimmt somit das Absorptionsspektrum eines Stoffes. Um die Gesamtintensität eines Übergangs zu betrachten, wird häufig der integrierte Absorptionskoeffizient  $\mathcal{A}$  angegeben:

$$\mathcal{A} = \int \varepsilon(\nu) d\nu \quad (1.5)$$

Den Zusammenhang zwischen der makroskopischen Größe des Extinktionskoeffizienten und dem quantenmechanischem Übergangsdipolmoment erfolgt über die Oszillatorstärke  $f$ :

$$f = \frac{4\pi m_e \nu}{3e^2 \hbar} |\vec{\mu}|^2 = \frac{4\varepsilon_0 m_e c^2 \ln 10}{N_A e^2} \cdot \mathcal{A} \quad (1.6)$$

Für erlaubte Elektronenübergänge ist  $f \approx 1$  und erfüllt damit die Thomas-Reiche-Kuhn-Summenregel.

## Fluoreszenz

Moleküle können durch Absorption eines Photons in energetisch angeregte Zustände überführt werden. Von dort kann es nach Schwingungsrelaxation zu einem strahlenden Übergang zwischen angeregtem und elektronischem Grundzustand kommen. Man kann je nach Übergang zwischen zwei Arten von Emissionen unterscheiden, der Phosphoreszenz und der Fluoreszenz.

Als Fluoreszenz werden Strahlungsübergänge bezeichnet, die aus einem angeregten Singulettzustand in den Grundzustand erfolgen. Die Fluoreszenzspektren sind häufig im Vergleich zu den Absorptionsspektren zu größeren Wellenlängen verschoben (Stokes-Verschiebung). Die Emission erfolgt dabei in der Regel aus dem Schwingungsgrundzustand des angeregten Zustandes (Kashas Regel). Die häufig beobachtbare Spiegelbildsymmetrie zwischen Absorptions- und Emissionsspektrum ist darauf zurückzuführen, dass Moleküle im angeregten Zustand etwas größere Bindungsabstände besitzen als im Grundzustand, was dazu führt, dass die entsprechenden Potentialflächen zu längeren Werten verschoben sind.

Ein Maß für die Effizienz der Fluoreszenz liefert die Quantenausbeute  $\Phi$ . Sie beschreibt das Verhältnis zwischen der Anzahl der absorbierten und emittierten Photonen.

$$\Phi = \frac{N_{\text{emittierte Photonen}}}{N_{\text{absorbierte Photonen}}} = \frac{N_e}{N_a} \leq 1 \quad (2.1)$$

In Konkurrenz zur Fluoreszenz können strahlungslose Prozesse auftreten wie die innere Konversion oder die Interkombination („intersystem crossing“ – ISC). Während bei der inneren Konversion der Übergang zu einem energetisch niedrigeren Zustand ohne Spinumkehr abläuft, kommt es bei der Interkombination zu einem Übergang zwischen Singulett- und Triplettzustand, der mit einer Änderung der Multiplizität verbunden ist.

### Fluoreszenzlöschung nach Stern-Volmer

Wird durch externe oder interne Einflüsse die Quantenausbeute verringert, spricht man von Fluoreszenzlöschung oder Quenching. Typische Arten von Fluoreszenzlöschung sind zum einen die Eigenlöschung, die dann auftritt, wenn das fluoreszierende Molekül in hoher Konzentration vorliegt und zum anderen die Fremdlöschung, die durch andere Moleküle erfolgt. Untersucht man die Fluoreszenz bei konstanter Temperatur und hinreichend geringer Konzentration des Fluorophors, ist die Fremdlöschung vorherrschend. Innerhalb der Fremdlöschung kann man zwischen zwei Arten der Löschung unterscheiden:

- Die statische Fluoreszenzlöschung: das fluoreszierende Molekül bildet mit dem Löschermolekül ein nichtfluoreszierendes Addukt.
- Die dynamische Fluoreszenzlöschung: die Energie des angeregten Fluorophors wird durch Kollision mit einem Löschermolekül strahlungslos abgeben.

Bei dynamischen Fluoreszenzlöschungen wird die Energie des angeregten Fluorophors strahlungslos abgeben. Dieser Prozess hat somit direkten Einfluss auf die Quantenausbeute und die Intensität der Fluoreszenz. Betrachtet man nun ein Molekül im angeregten Zustand ergeben sich verschiedene Möglichkeiten, wie dieses wieder in den Grundzustand zurückgelangt.



$F^*$  sei hierbei das angeregte Fluorophor,  $Q$  das Löschermolekül,  
 $Q^*$  das angeregte Quencher (Löscher-)molekül,  
 $k_f, k_w, k_q$  sind die Geschwindigkeitskonstanten der jeweiligen Prozesse

Da in a) die Anregungsenergie durch Emission eines Photons wieder abgeben wird, ist die Anzahl der emittierten Photoen abhängig von diesem Reaktionsweg mit

$$N_e = k_f \cdot [F^*] \tag{2.2}$$

Analog lässt sich die Anzahl der absorbierten Photonen aus der Konzentration  $[F]$  des Fluorophors und der Geschwindigkeitskonstante  $k_a$  (Geschwindigkeitskonstante der

Absorption) bestimmen. Die oben genannten Prozesse a), b), c), beschreiben alle eine mögliche Abgabe der Absorptionsenergie des Fluorophors, welches somit wieder in den Grundzustand zurückkehrt. Im Gleichgewicht sind die zwei Prozesse Absorption und Verlust der Anregungsenergie äquivalent:

$$N_a = k_a \cdot [F] = k_f \cdot [F^*] + k_w \cdot [F^*] + k_q \cdot [F^*][Q] \quad (2.3)$$

Mit (1.4) und (2.2) folgt dann für die Fluoreszenzquantenausbeute:

$$\Phi = \frac{N_e}{N_a} = \frac{k_f}{k_f + k_w + k_q[Q]} \quad (2.4)$$

In Abwesenheit des Quenchers  $[Q] = 0$  ändert sich der obige Ausdruck mit:

$$\Phi_0 = \frac{k_f}{k_f + k_w} \quad (2.5)$$

Der Quotient aus (2.4) und (2.5) liefert dann den Ausdruck der Stern-Volmer-Gleichung für dynamische Fluoreszenzlöschung:

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{k_f + k_w + k_q[Q]}{k_f + k_w} = 1 + \frac{k_q}{k_f + k_w}[Q] = 1 + K_S[Q] \quad (2.6)$$

Wegen der Proportionalität der Quantenausbeute  $\Phi$  zur Intensität der Fluoreszenz folgt:

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{I_0}{I} = 1 + K_S[Q] \quad (2.7)$$

$K_S$  ist die Stern-Volmer-Konstante.

Da die dynamische Fluoreszenzlöschung einen Prozess darstellt, der direkt Einfluss auf die angeregten Zustände des Fluorophors nimmt, kann man die Fluoreszenzlebensdauer mit Hilfe der Geschwindigkeitskonstanten aus a), b) und c) darstellen.

Für die Lebensdauer  $\tau$  ergeben sich somit zwei Ausdrücke, einmal in Abwesenheit und in Anwesenheit des Quenchers.

$$\tau_0 = \frac{1}{k_f + k_w}$$

$$\tau = \frac{1}{k_f + k_w + k_q[Q]}$$

Setzt man nun den Ausdruck für  $\tau_0$  in Gleichung (2.6) ein, so erhält man einen abgewandelten Ausdruck der Stern-Volmer-Gleichung

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{I_0}{I} = 1 + \tau_0 k_q [Q] \quad (2.8)$$

$\tau_0$  Fluoreszenzlebensdauer in Abwesenheit des Quenchers

$k_q$  bimolekulare Löschkonstante

## Durchführung

### Vor dem Versuch

Bitte machen Sie sich vor dem Versuch mit der gegebenen Literatur vertraut.<sup>[1],[2]</sup>

- Berechnung der Einwaage an Fluorescein für eine 250 ml Standardlösung. Diese sollte so konzentriert sein, dass die Absorbanz der Lösung einen Wert  $\leq 1$  hat. Die optische Weglänge der verwendeten Fluoreszenzküvetten beträgt 1 cm.

Aus der Standardlösung werden verschiedene Lösungen hergestellt, die sich in ihrer Halogenidkonzentration unterscheiden. Dazu werden in jedem Schritt 5 ml Fluorescein-Standard mit 5 ml Halogenidlösung gemischt.

- Berechnung der Volumina der NaI-Standardlösung (0,5 M) zur Herstellung von Lösungen (5ml) mit Iodid-Konzentrationen: 0 M, 0,01 M, 0,025 M, 0,05 M, 0,075 M, 0,1 M.
- Berechnung der Volumina der NaBr-Standardlösung (4 M) zur Herstellung von Lösungen (5ml) mit Bromid-Konzentrationen: 0 M, 0,5 M, 1 M, 1,5 M, 2 M.

**Bitte bringen Sie zu Beginn des Versuchs ihre Berechnungen mit.**

### Spektrenaufnahme

Die Messungen werden mit einem modular aufgebauten Fluoreszenzspektrometer durchgeführt, mit welchem auch Absorptionsspektren aufgenommen werden können.

- Nehmen Sie ein Absorptionsspektrum der Natrium-Fluorescein-Lösung auf und entscheiden Sie nach der Lage der Bande, mit welchen Wellenlängen die Fluoreszenz angeregt wird.
- Führen Sie Fluoreszenzmessungen bei fünf verschiedenen Anregungswellenlängen (violette, blaue, grüne, orange, rote LED) durch und nehmen Sie zusätzlich die Spektren der für die Anregung verwendeten LEDs auf.
- Um den Einfluss von Fremdionen auf die Fluoreszenzintensität zu untersuchen, werden nacheinander die Fluoreszenzspektren verschiedener Proben (gemäß den oben vorgegebenen Konzentrationen) gemessen, denen jeweils Bromid- und Iodidionen zugesetzt wurden.
- Nehmen Sie zum Schluss noch ein Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von Fluorescein in Ethanol auf.

### Software

Die Spektren werden mit der Software *SpectraWiz* aufgenommen. Die Daten aus dem Programm können zur Analyse in Datenverarbeitungsprogramme (z.B. Origin, Gnuplot) eingelesen werden. Bevor Sie mit den Messungen beginnen, erstellen Sie im Verzeichnis **► Fluoreszenzspektroskopie ► F73** einen neuen Ordner mit aktuellem Datum und ihrer Gruppennummer. Sie können während des Experiments ihre Daten in diesem Ordner ablegen.

Öffnen Sie das Programm *SpectraWiz* und bereiten Sie die Apparatur so vor, dass ein Absorptionsspektrum aufgenommen werden kann.

### Absorptionsspektren

Bevor Sie das Absorptionsspektrum aufnehmen können, müssen Sie eine Dunkel- und eine Referenzmessung durchführen. Stellen Sie dazu im Verzeichnis **► View** das Programm auf **► Scope** und wählen Sie dann unter **► Setup ► Detector integration time**



(Abbildung 2) eine Belichtungsdauer des Sensors aus (Werte um 70, achten Sie darauf, dass das Signal nicht gesättigt ist). Für die weiteren Messungen darf der Wert der Belichtungsdauer nicht mehr verändert werden, da ansonsten alle Schritte wiederholt werden müssen! Führen Sie nun einen **Dark Scan** durch, d.h. ohne Probe und ohne Licht (Abbildung 3).

Bringen Sie nun die Küvette mit dem Lösungsmittel in die Halterung ein und nehmen Sie einen **Reference Scan** auf (Abbildung 4). Wechseln Sie unter ► **View** ► **Absorbance** die Ansicht, um das Absorptionsspektrum der Probe aufzunehmen. Sie können die Daten unter ► **File** ► **Save** ► **Sample** in ihrem zuvor angelegten Ordner abspeichern.

### Fluoreszenzspektren

Bauen Sie die Apparatur so um, dass Sie ein Fluoreszenzspektrum aufnehmen können. Wie schon bei der Absorptionmessung müssen zuvor ein Dunkel- und ein Referenzspektrum aufgenommen werden. Jedoch sollte vor dem Aufnehmen der Referenzmessungen und des Fluoreszenzspektrums eine neue ► **Detector integration time** eingestellt werden (Werte um 700, achten Sie darauf, dass das Signal nicht gesättigt ist). Lassen Sie zum Messen des Fluoreszenzspektrums den ► **Scope-Mode** die ganze Zeit eingestellt.

Speichern Sie das Spektrum in ihrem angelegten Ordner und übertragen Sie die Dateien nach dem Experiment auf ihren mitgebrachten USB-Stick.

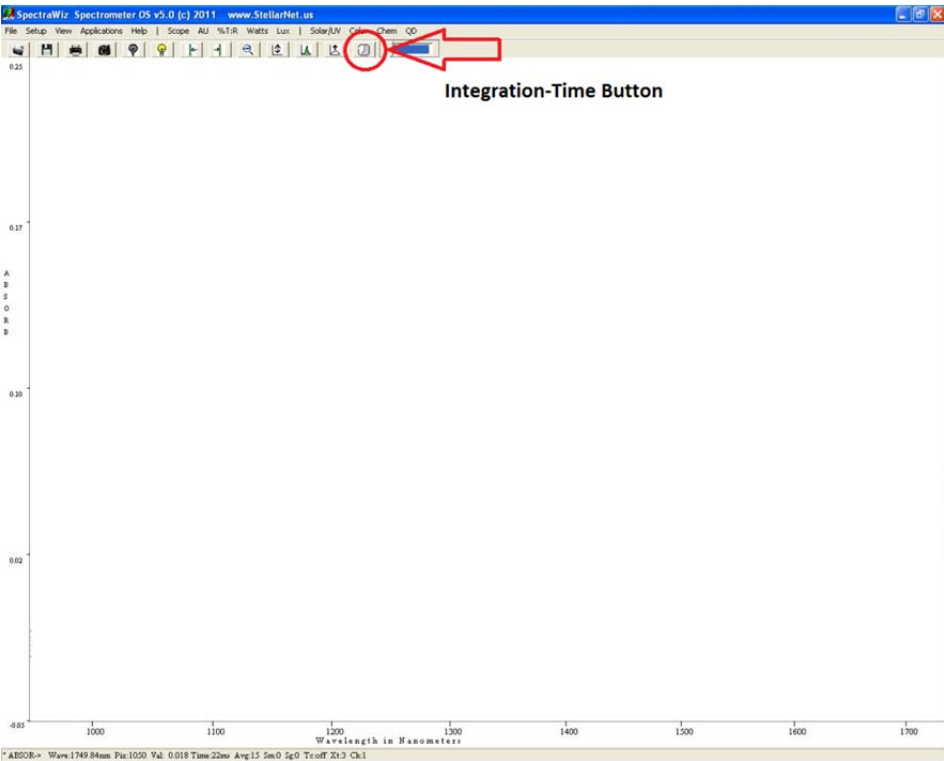


Abbildung 2: Integration Time ändern

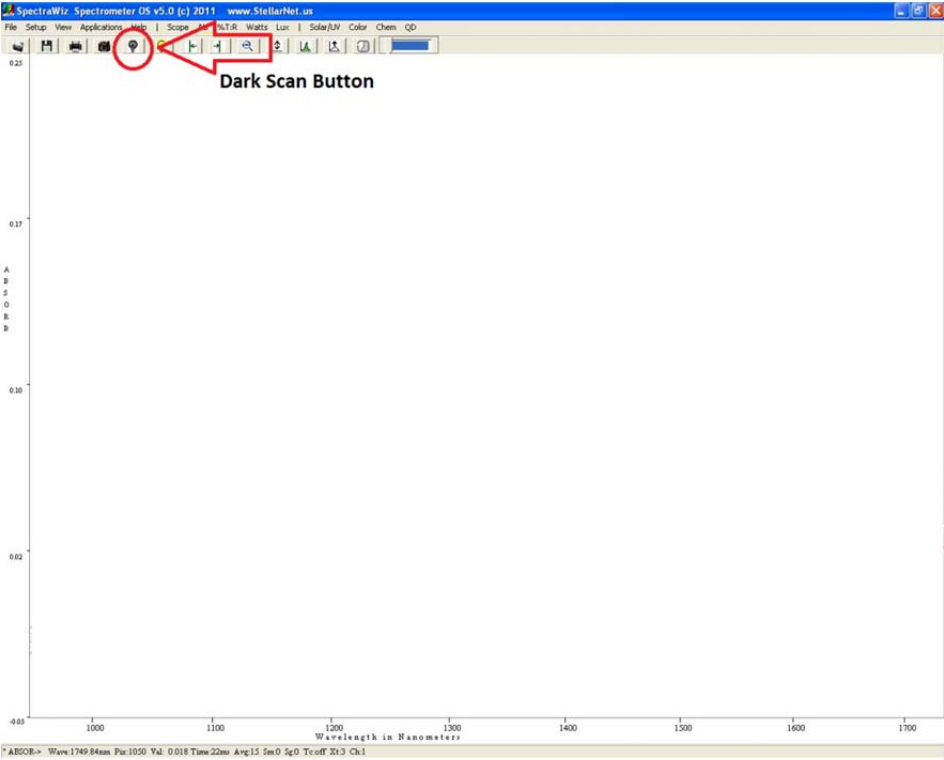


Abbildung 3: Dark-Scan aufnehmen

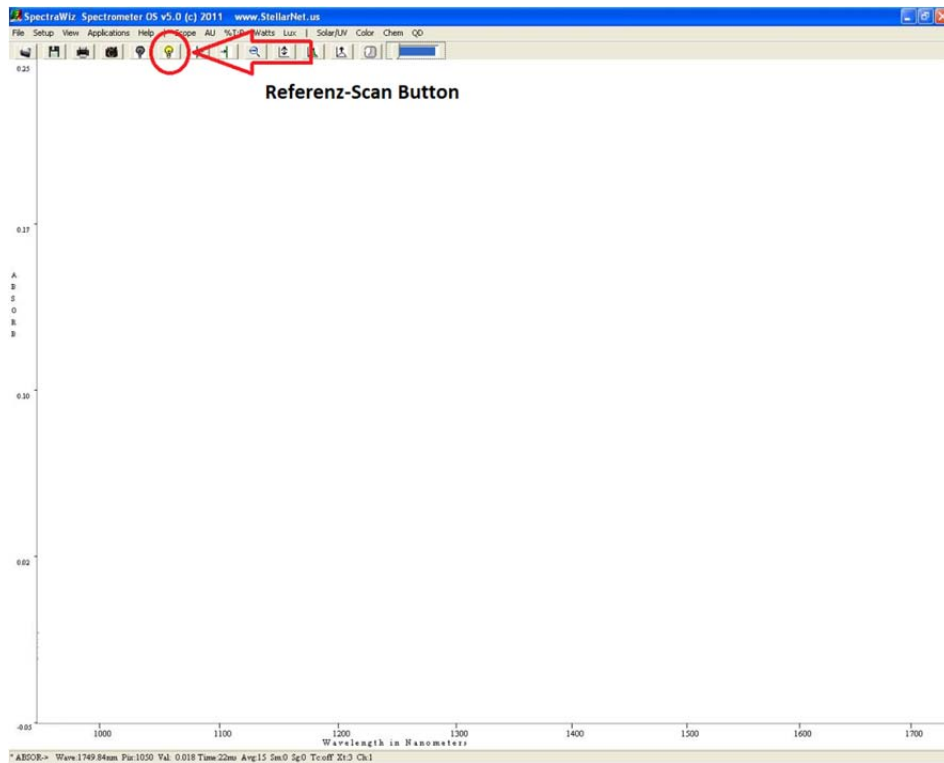


Abbildung 4: Referenz-Scan aufnehmen

Fertigen Sie zu ihrem Protokoll einen Theorieteil an, in welchem Sie auf die verschiedenen Übergänge aus dem angeregten Zustand eingehen. Skizzieren Sie hierzu ein Jabłoński-Termschema und erläutern Sie anhand dessen die unterschiedlichen Prozesse (Stichworte: Schwingungsrelaxation, Fluoreszenz, Phosphoreszenz, IC, ISC).

### Auswertung und Diskussion

Skizzieren Sie den Aufbau des Spektrometers zur Aufnahme eines Absorptions- sowie eines Fluoreszenzspektrums.

1. Erstellen Sie ein gemeinsames Diagramm für das Absorptions- und das Fluoreszenzspektrum von Fluorescein (in NaOH) in Abhängigkeit der Wellenlänge (in nm) und in Abhängigkeit der Energie (in eV) und diskutieren Sie qualitativ den Verlauf der Spektren.

(Stichworte: Lage der Maxima, Stokes-Verschiebung, Spiegelbildsymmetrie)

Bestimmen Sie die Verschiebung (in nm und eV) der Maxima des Absorptions- und des Fluoreszenzspektrums.

*Hinweis: Normieren Sie zuvor ihre Messdaten.*

2. Tragen Sie in einem Diagramm die Fluoreszenzspektren von Natrium-Fluorescein bei verschiedenen Anregungswellenlängen auf und diskutieren Sie ihre Beobachtungen. Nehmen Sie zudem die aufgenommenen LED-Spektren mit in ihr Diagramm auf.
3. Stellen Sie in einem Diagramm die Fluoreszenzspektren von Natrium-Fluorescein in Ethanol und in NaOH gegenüber und diskutieren Sie ihre Beobachtungen.
4. Erklären Sie, wie der Begriff „Wärme“ aus Reaktionsgleichung b) zu verstehen ist. Berücksichtigen Sie insbesondere, wie Moleküle nach Lichtabsorption die Energie wieder abgeben können.
5. Erklären Sie mit Hilfe eines Jabłoński-Termschemas den Begriff „Quenchen“ und erläutern Sie dabei die Rolle der Halogenidionen.
6. Ermitteln Sie graphisch unter Zuhilfenahme der Stern-Volmer-Gleichung die Stern-Volmer-Konstante für die dynamische Fluoreszenzlöschung für Bromid und Iodid und berechnen Sie daraus die bimolekulare Löschungskonstante  $k_q$ , indem Sie nach einem geeigneten Wert für die Fluoreszenzlebensdauer von Fluorescein recherchieren.  
Geben Sie eine Größenordnung der Stern-Volmer-Konstanten für Fluorid und Chlorid im Vergleich zu den ermittelten Konstanten von Bromid und Iodid an und erläutern Sie ihre Überlegungen.
7. Führen Sie eine Fehlerrechnung für  $k_q$  durch und diskutieren Sie die wichtigsten Fehlerquellen.

### **Was man wissen sollte**

Absorption, Franck-Condon-Prinzip, -Übergänge und -Faktoren, Zusammenhang zwischen Überlappungsintegral und Extinktionskoeffizient, Oszillatorstärke, Thomas-Reiche-Kuhn-Summenregel, Lambert-Beer'sches Gesetz, Fluoreszenz, strahlende und strahlungslose Prozesse, Kashas Regel, Vavilov-Regel, Quantenausbeute, Stokes'sche Verschiebung, dynamische und statische Fluoreszenzlöschung.

*Dieser Versuch wurde u.a. mit Hilfe des Preisgeldes aus dem KIT-Fakultätslehrpreis 2014, mit welchem die Dozenten des Physikalisch-Chemischen Anfängerpraktikums ausgezeichnet wurden, finanziert.*

### **Literatur zur Versuchsdurchführung**

- [1] OTTOLENGHI, GOLDSCHMIDT, POTASHNIK; Intersystem crossing in the charge – transfer quenching of molecular fluorescence; Journal of Physical Chemistry, April 1971, 75(8)
- [2] SJÖBACK, NYGREN, KUBISTA; Absorption an Fluorescence Properties of Fluorescein; Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy, June 1995, 51(6)

### **Weiterführende Literatur**

- [3] ATKINS, DE PAULA; Physikalische Chemie, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, 5. Auflage, 2013
- [4] LAKOWICZ; Principles of fluorescence spectroscopy, Springer Science + Business Media, third edition, 2006
- [5] JAMESON; Introduction to fluorescence, CRC Press Taylor & Francis, 2014
- [6] BRACKMANN; Lambdachrome Laser Dyes, Lambda Physik GmbH, 2<sup>nd</sup> edition, 1994
- [7] ATKINS; FRIEDMANN; Molecular quantum mechanics, Oxford University Press, 5<sup>th</sup> edition