

# Lumineszenz-Spektroskopie (LUM)

## Messung des Fluoreszenzsignals von 1-Pyrenbuttersäure in Abhängigkeit der Fluorophor-Konzentration sowie der Einflüsse von Kaliumiodid und Gasen als Quenching-Agents

**Simon Breitler**, Studiengang Chemie, 5. Semester, brsimon@student.ethz.ch

**Matthias Geibel**, Studiengang Chemie, 5. Semester, mgeibel@student.ethz.ch

**Daniel A. Frick**, Studiengang Chemie, 5. Semester, frickd@student.ethz.ch

**Assistentin:** Zohra Guennoun

### Team 4

*Abstract:* Für die Laborarbeit in Lumineszenz wurden wesentliche Eigenschaften der Fluoreszenz gemessen und analysiert. Als Fluorophor kam 1-Pyrenbuttersäure in verschiedenen Lösungsmitteln (DMSO, H<sub>2</sub>O, EtOH) und Gemische daraus zum Einsatz. Die Absorptionsmaxima  $\lambda_{\text{ex}}$  des Fluorophors in DMSO/ H<sub>2</sub>O lagen bei 317 nm, 329 nm und 345 nm, wobei bei letzterer Wellenlänge am stärksten absorbiert wurde. Die dazugehörigen Fluoreszenzmaxima  $\lambda_{\text{em}}$  wurden bei 377 nm, 397 nm und 417 nm, mit dem absoluten  $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$  bei 377 nm. In einem zweiten Experiment wurde der lineare Bereich des Detektors in Abhängigkeit der Photomultiplier-Spannung abgeschätzt, welcher zwischen 300 V und 450 V bei  $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$  liegt. Des Weiteren wurde die Abhängigkeit der Fluorophor-Konzentration in EtOH/DMSO auf die Fluoreszenzintensität ermittelt. Es zeigte sich ein linearer Anstieg der Intensität bei schwacher Absorption. Nach Durchlaufen eines Maximums bei ca. 0.1 mM fiel die Intensität, aufgrund der hohen Absorption der konzentrierteren Lösung, wieder stark ab. Im letzten Teil des Experiments wurde das Fluoreszenz-Quenching untersucht. Dazu wurden mittels unterschiedlicher Konzentrationen eines Quenching-Agents (Kaliumiodid) ein Stern-Volmer-Plot erstellt und daraus die dynamische Quenchingkonstante  $K_D = 183 \pm 3 \cdot M^{-1}$  bestimmt. Daraus ergibt sich eine Quenchinggeschwindigkeit von  $k_Q = 1.83 \pm 0.03 \cdot 10^9 M^{-1} s^{-1}$  für die verwendete Lösung. Abschliessend wurde der Einfluss von Sauerstoff und Stickstoff auf eine Fluorophor-Lösung in DMSO/ H<sub>2</sub>O ermittelt. Während Stickstoff die Fluoreszenzintensität erhöht, wirkt molekularer Sauerstoff als Quencher, die Intensität nimmt mit zunehmender O<sub>2</sub>-Sättigung ab.

Zürich ZH, 03. Dezember 2007

Simon Breitler

Matthias Geibel

Daniel A. Frick

# 1. Einleitung

Lumineszenz ist der Überbegriff für sämtliche photochemischen Prozesse bei welchen Moleküle nach Anregung mittels Photon Licht aussenden. Dazu gehören auch die bekannten Eigenschaften Fluoreszenz sowie Phosphoreszenz. In diesem Versuch wird auf das Phänomen der Fluoreszenz eingegangen, welches auftritt wenn ein angeregtes Molekül unter Photonemission in den Grundzustand relaxiert.

## 2. Theorie [1][2]

### 2.1 Grundlagen der Lumineszenz

Wird ein beliebiges Molekül mit elektromagnetischen Wellen bestrahlt, kann das Molekül durch Absorption eines Photons molekülspezifischer Wellenlänge angeregt werden. Das elektronisch angeregte Molekül kann nun eine Reihe verschiedener Prozesse eingehen, welche eine Relaxation in den Grundzustand zur Folge haben.

Eine Möglichkeit ist die Emission eines Strahlungsquants. Dieser Prozess wird Lumineszenz genannt. Nach der Absorption befindet sich das Molekül in einem der Energie des absorbierten Photons entsprechenden angeregten Zustand. Daraufhin kann das System über Internal Conversion genannte Prozesse strahlungsfrei in den ersten angeregten Zustand zurückfallen. Zusätzlich dazu kann durch Intersystem Crossing eine Spin-Umkehr vom Singlett- zum Triplettzustand erfolgen. Der Prozess der Relaxation vom ersten angeregten Zustand in den Grundzustand wird Lumineszenz genannt. Dabei wird zwischen der Relaxation aus einem angeregten Singlett- und Triplett-Zustand unterschieden. Der Singlett-Übergang wird Fluoreszenz genannt, der Triplett-Übergang mit nachfolgendem Spin-Umkehr-Prozess (emissionslos) heißt Phosphoreszenz (siehe Fig. 1). Die Lebensdauer eines angeregten Moleküls liegt im Bereich von 0.01 bis einige hundert Nanometer und hängt wesentlich von verschiedenen externen Faktoren wie Temperatur, Lösungsmittel und Struktur des Moleküls ab.

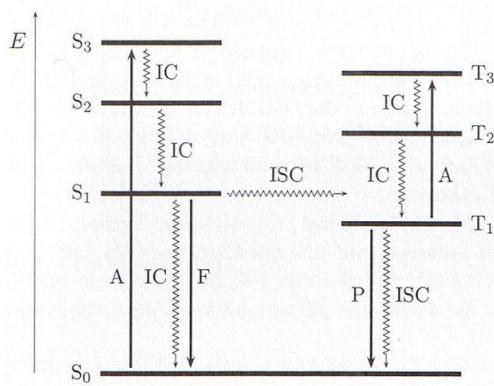
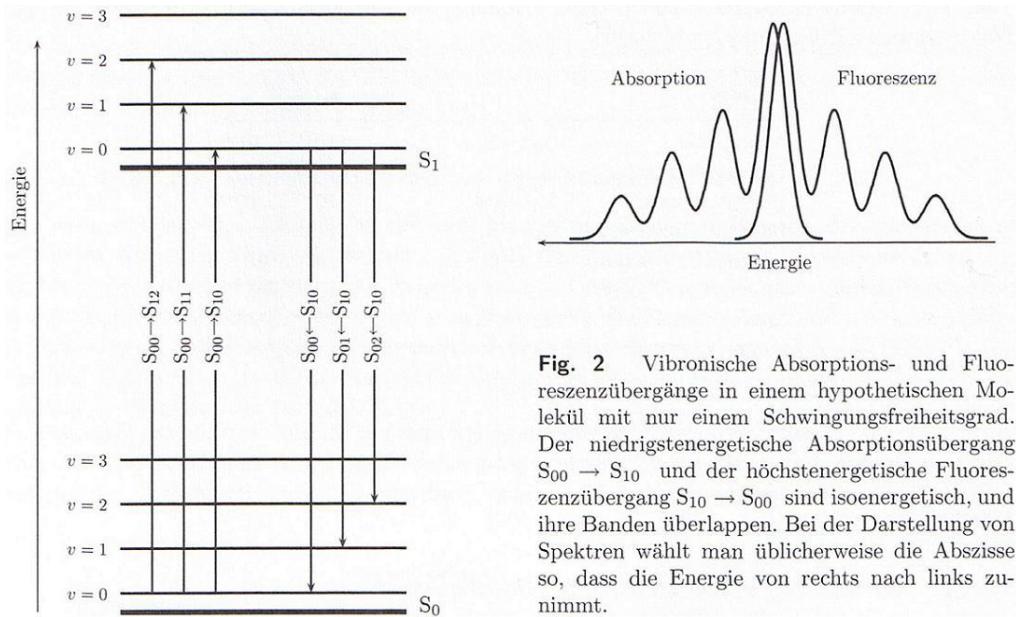


Fig. 1 Jablonski-Diagramm der elektronischen Zustände in einem organischen Molekül. Die Bezeichnungen sind:  $S_0$ : elektronischer (Singulett-)Grundzustand;  $S_i$  und  $T_i$ : elektronisch angeregte (Singulett- und Triplett-)Zustände. Die fett gezeichneten Pfeile bezeichnen Prozesse, die mit der Absorption oder Emission von Photonen verknüpft sind (F: Fluoreszenz; P: Phosphoreszenz; A: Absorption). Die wellenförmigen Pfeile bezeichnen strahlungsfreie Prozesse (IC: Internal Conversion; ISC: Intersystem Crossing).

Fig. 1: Jablonski-Diagramm [1]

Durch die bei normalen Temperaturen vorhandene kinetische Energie entstehen, durch Aufspaltung der elektronischen Zustände, energetisch verschiedene vibronische Zustände innerhalb eines elektronischen Levels. Da die vibratorische Relaxation zur Schwinungsquantenzahl mit niedrigster Energie innerhalb eines elektronischen Zustandes strahlungslos verläuft, werden die Absorptions-, Fluoreszenz- bzw. Phosphoreszenzübergänge bei unterschiedlichen Energien erfolgen. Dies führt dazu, dass das Absorptions- und Fluoreszenzspektrum in etwa spiegelverkehrt erscheinen, wobei die Fluoreszenzbanden stets längerwellig als ihre Absorptionsgegenstücke sind (Stokes-Shift).



**Fig. 2** Vibronische Absorptions- und Fluoreszenzübergänge in einem hypothetischen Molekül mit nur einem Schwingungsfreiheitsgrad. Der niedrigstenergetische Absorptionsübergang  $S_{00} \rightarrow S_{10}$  und der höchstenenergetische Fluoreszenzübergang  $S_{10} \rightarrow S_{00}$  sind isoenergetisch, und ihre Banden überlappen. Bei der Darstellung von Spektren wählt man üblicherweise die Abszisse so, dass die Energie von rechts nach links zunimmt.

**Fig. 2: Vibronische Absorptions- und Fluoreszenzübergänge für ein Molekül mit einem Schwingungsfreiheitsgrad [1]**

Weil die Relaxationen (vibratorisch als auch elektronisch) innerhalb der angeregten Zustände viel schneller ablaufen als die Emission eines Photons, welches zum Grundzustand zurückführt, akkumulieren sich die im  $S_1$  befindlichen Systeme in der Gesamtpopulation mit folgender Rate:

$$\left( \frac{dc_M}{dt} \right) = B_{mn} \rho(\tilde{\vartheta}_{mn}) c_M \quad (1)$$

mit  $B_{mn} = \frac{1}{N_A h n_{mn}} \ln(10) \int \frac{\varepsilon_M(\tilde{\vartheta}_{mn}) d\tilde{\vartheta}}{\tilde{\vartheta}}$  (Einstein-Koeffizient für induzierte Absorption) und der spektralen Strahlungsdichte  $\rho(\tilde{\vartheta}_{mn})$ .

Die Zerfallskinetik ist 1. Ordnung bezüglich der Konzentration angeregter Moleküle,

$$\left( \frac{dc_{M^*}}{dt} \right) = -k_F^0 c_{M^*} = -\frac{1}{\tau_F^0} c_{M^*} \quad (2)$$

wobei  $k_F^0$  die Fluoreszenz-Strahlungsrate und  $\tau_F^0$  die Strahlungslebenszeit darstellen.

Dies führt zu einer Gesamtkinetik von:

$$\left( \frac{dc_{M^*}}{dt} \right) = B_{mn} \rho(\tilde{\vartheta}_{mn}) c_M - \sum k_i c_{M^*} \quad (3)$$

wobei  $\sum k_i$  die Summe aller an der Desaktivierung beteiligten Prozesse darstellt. Dieser Term impliziert erneut, dass nicht nur die Fluoreszenz an der Relaxation eines Moleküls beteiligt ist. Um herauszufinden, welcher Teil der Desaktivierung über die Fluoreszenz erfolgt, wird die Fluoreszenzquantenausbeute bestimmt:

$$\Phi_F = \frac{k_F^0}{\sum k_i} = \frac{k_F^0}{k_F^0 + \sum k_{nF}} \quad (4)$$

$\sum k_{nF}$  steht für sämtliche nicht-fluoreszierenden Relaxationsprozesse.

## 2.2 Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenz

Die Konzentration des Fluorophors in einer Lösung hat entscheidenden Einfluss auf die Fluoreszenzstärke. Dabei laufen jedoch zwei Effekte gegeneinander. Auf der einen Seite nimmt die Fluoreszenz-Intensität mit der Anzahl in der Lösung vorhandenen Moleküle zu, auf der anderen Seite nimmt aber die Eindringtiefe des Anregungsstrahls ab, was zu dazu führt, dass nur noch ein kleiner Teil der Moleküle überhaupt durch den Anregungsstrahl aktiviert wird.

Das Lambert-Beer Gesetz besagt:

$$I_{ex}(z) = I_{ex}(0) \cdot 10^{-\varepsilon_M c_M z} \quad (5)$$

während die lokale Fluoreszenzintensität bei der Schichtdicke  $\delta I_{em}(\delta)$  proportional sowohl zur entsprechenden  $I_{ex}(\delta)$  als auch zur Quantenausbeute  $\Phi_F$  ist.

Dies ergibt:

$$I_{em} = f \Phi_F \delta I_{ex}(0) \varepsilon_M c_M \cdot 10^{-\varepsilon_M c_M z} \quad (6)$$

Für schwache Absorption ( $\varepsilon_M c_M z \ll 1$ ) ergibt sich daraus eine lineare Konzentrationsab-

hängigkeit der Fluoreszenzintensität. Ist die oben genannte Bedingung nicht mehr erfüllt, beispielsweise durch höhere Fluorophorkonzentration, wird die Intensität wieder schwächer.

## 2.3 Fluoreszenzquenching

Bewirkt eine Veränderung der externen Bedingungen des Fluorophors eine Abnahme der Fluoreszenzintensität, wird diese Veränderung als Quenching bezeichnet. Eine Möglichkeit ist die Zugabe eines Stoffes. Dies kann grundsätzlich durch zwei Mechanismen geschehen:

### 2.3.1 Dynamisches Quenching

Dabei wird der Lösung ein Stoff zugesetzt, welcher durch Stöße mit dem angeregten Fluorophormolekül eine emissionsfreie Relaxation bewirkt. Die Relaxationsenergie wird dabei nicht als Licht sondern als Wärme frei. Dieser Prozess ist diffusionskontrolliert. Der Quencher muss innerhalb der Lebenszeit eines angeregten Moleküls mit diesem kollidieren.

Die Quenchingrate ist bimolekular und hängt sowohl von der Fluorophorkonzentration als auch von der Quencherkonzentration ab:

$$\left( \frac{dc_{M^*}}{dt} \right) = -k_Q c_Q c_{M^*} \quad (7)$$

Dieser Prozess steht in Konkurrenz zur Fluoreszenz und gehört zum  $\sum k_{nF}$  aus Gleichung (4). Dadurch wird die Fluoreszenzquantenausbeute kleiner

$$\Phi_F = \frac{k_F^0}{k_F^0 + \sum k_{nF} + k_Q c_Q} \quad (8)$$

Wird die Fluoreszenzquantenausbeute ohne Quencher als  $\Phi_F^0 = (4)$  bezeichnet ergibt sich für eine linearisierte Form

$$\frac{\Phi_F^0}{\Phi_F} = \frac{\tau_{F,0}}{\tau_F} = 1 + \tau_{F,0} k_Q c_Q = 1 + K_D c_Q \quad (9)$$

$K_D = \tau_{F,0} k_Q$  (10) wird als dynamische Quenchingkonstante bezeichnet und kann direkt aus der linearisierten Darstellung der Messdaten (Stern-Volmer-Plot) erhalten werden.

### 2.3.2 Statisches Quenching

Beim statischen Quenching wird die Fluoreszenz eines Moleküls durch Veränderung der Molekülelektronik unterbunden. Durch Zugabe eines Quenchers bilden sich Komplexe der Form  $M + Q \rightarrow MQ$ , welche nichtfluoreszierend sind. Deshalb sind nunmehr weniger Fluorophormoleküle zur Anregung vorhanden, wodurch die Intensität schwindet.

### 3. Experimentelles [1][3]

#### 3.1. Verwendete Geräte

Spektrofluorometer: AMINCO-BOWMAN AB-2

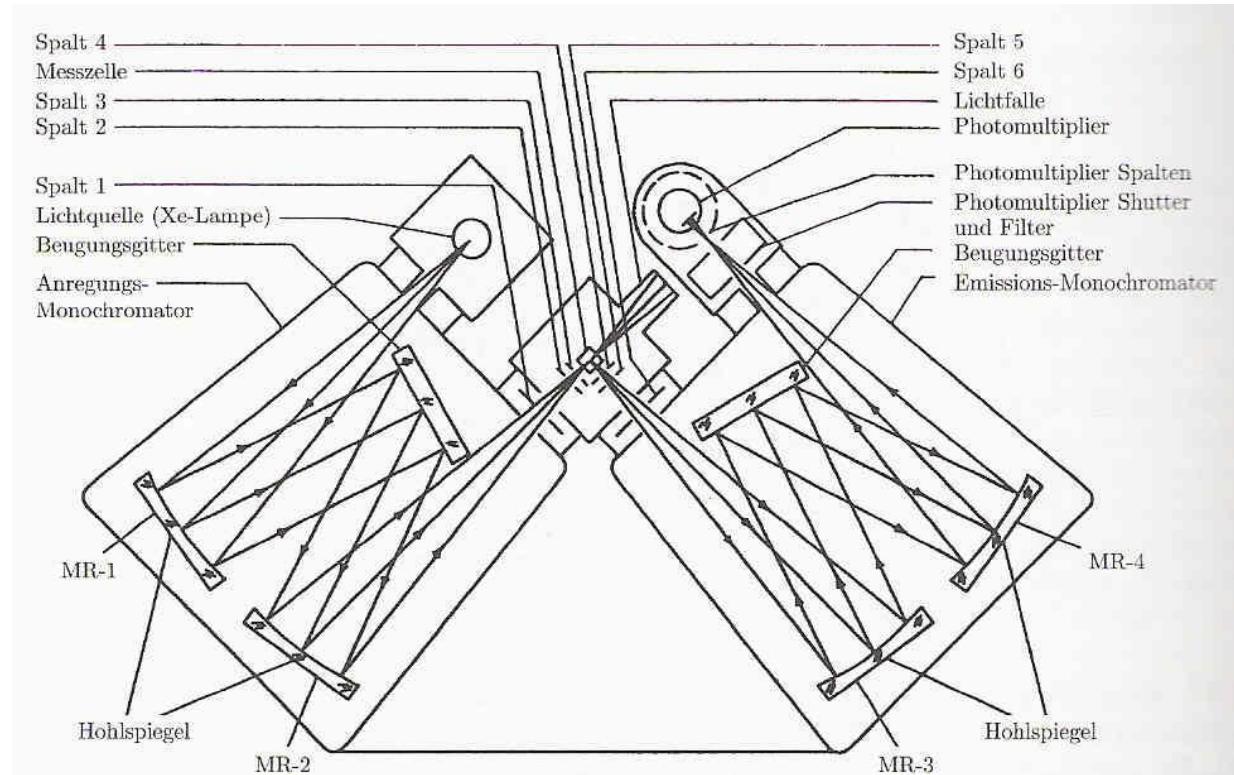


Fig. 3: Schematischer Aufbau eines AMINCO-BOWMAN-Spektrofluorometers [1]

#### 3.2. Verwendete Substanzen

Substanz:	1-Pyrenbuttersäure	Kaliumiodid	Dimethylsulfoxid
Struktur:		-	
Formel:	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	KI	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS
Molmasse:	288.34 g/mol	166.00 g/mol	78.12 g/mol
Sicherheit:	Xi R36/37/38 S26,37/39	- Xi R36/38 S24/25	S26

### 3.3. Versuchsdurchführung

#### 3.3.1. Fluoreszenz- und Anregungsspektrum

Nach dem Starten des Geräts wurde eine Stammlösung des Fluorophors 1-Pyrenbuttersäure hergestellt. Dazu wurden 26.3 mg der Substanz in ca. 95 ml Wasser gelöst. Aufgrund der überaus schlechten Löslichkeit von 1-Pyrenbuttersäure wurden ca. 5 ml DMSO zugegeben. Trotz dieser Massnahme liess sich der Feststoff nicht komplett lösen. Von dieser Lösung wurden je 1.0159 g (Lösung 1) und 1.0736 g (Lösung 2) in ein 25 ml-Messkolben gegeben und mit DMSO aufgefüllt.

Mit Lösung 1 wurde eine Quarz-Küvette (Schichtdicke  $d = 1 \text{ cm}$ ) gefüllt und ein Absorptionsspektrum zwischen 200 und 500 nm gemessen (PM-Spannung: 445 V). Danach wurde mit derselben Lösung je ein Emissionsspektrum für die drei gefundenen Anregungswellenlängen  $\lambda_{\text{ex}} = 315, 329$  und  $345 \text{ nm}$  aufgenommen (PM-Spannung: 465 V, 465 V und 450 V).

#### 3.3.2. PM-Spannung und Messsignal

Um den Einfluss der Photomultiplier-Hochspannung auf die detektierte Intensität zu untersuchen, wurde dieselbe Lösung aus dem vorherigen Versuch verwendet. Der Excitation Shutter wurde auf das Absorptionsmaximum  $\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$  gesetzt, der Emission Shutter war auf das Fluoreszenzmaximum  $\lambda_{\text{em}} = 377 \text{ nm}$  getunt.

Danach wurde, mittels der zum Spektrometer gehörenden Software AB2, die PM-Spannung in 10 V – Schritten von 250 V bis 470 V erhöht. Die Intensität wurde dabei vom Status-Window der Software abgelesen und notiert.

#### 3.3.3. Konzentrationsabhängigkeit des Fluoreszenzsignals

Für diesen Versuch wurde eine neue Lösung von 1-Pyrenbuttersäure in DMSO/Ethanol hergestellt. Dazu wurden 13.5 mg des Fluorophors in 25 ml DMSO gelöst. Danach wurde diese Lösung mit verschiedenen Volumina an Ethanol verdünnt, um eine Reihe von unterschiedlichen Konzentrationen zu messen (siehe Tab. 1).

Stammlösung: 1.873 mM

Gemisch DMSO:EtOH	Konzentration Fluorophor / mM
1:1	0.937
1:2	0.624
1:3	0.468
1:4	0.375

1:8	0.208
1:10	0.1703
1:16	0.1102
1:20	0.0892
1:24	0.0749
1:32	0.0568
1:50	0.0367
1:70	0.0264
1:100	0.0185
1:140	0.0133
1:200	0.0093
1:500	0.0037
1:1000	0.0019

Tab. 1: Gemessene Fluorophorkonzentrationen

Anschliessend wurden von sämtlichen Mischungen Emissionspektren aufgenommen. Die PM-Spannung lag bei 525 V, eingestrahlt wurde bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums  $\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$ . Die Geräteparameter blieben während des gesamten Versuches konstant.

### 3.3.4. Fluoreszenz-Quenching mit Kaliumiodid

Für diesen Versuch wurde die anfangs hergestellte Lösung 2 (aus Versuch 3.3.1) benutzt. Die Lösung wurde in ein 50 ml – Erlenmeyer-Kolben gegeben und ein Teil davon benutzt, um ein Emissionsspektrum der reinen Lösung zu erhalten.

Anschliessend wurde der Küvetteninhalt wieder in den Erlenmeyer-Kolben gegeben und ca. 10 mg Kaliumiodid zur Lösung gegeben. Nach vollständiger Auflösung des KI wurde erneut ein Teil der Lösung benutzt um ein neues Emissionsspektrum aufzunehmen, bevor der Küvetteninhalt wieder zurückgeschüttet wurde. Erneute Zugabe von ca. 10 mg und Wiederholen aller Schritte führte zu 13 aufgenommenen Spektren mit KI-Konzentrationen zwischen 0 und 30 mM (siehe Tab. 2).

Zugabe KI / mg	Konzentration KI / mM
0	0
9.0	0.002
18.1	0.004
29.8	0.007
38.9	0.009
50.8	0.012
61.2	0.015
70.9	0.017
81.4	0.020
92.9	0.022

103.7	0.025
115.2	0.028
128.1	0.031

Tab. 2: Gemessene Quencher-Konzentrationen

### 3.3.5. Fluoreszenz-Quenching mit Gasen

Zum Schluss wurde der Einfluss verschiedener Gase auf die Fluoreszenz-Aktivität von 1-Pyrenbuttersäure untersucht. Dazu wurde Lösung 1 (aus Versuch 3.3.1) verwendet. Die Lösung wurde im 25 ml – Messkolben mittels eines gasgefüllten Ballons mit Pasteurpipette für je ca. 3 min erst mit N<sub>2</sub>, dann mit O<sub>2</sub> und schliesslich mit Atemluft durchflutet. Da die erste Messung bei zu hoher PM-Spannung durchgeführt wurden, welche zur Detektorsättigung bei N<sub>2</sub> führte, musste für den Atemluft-Versuch der Ballon durch eine Person aufgeblasen werden. Daraufhin wurde die Lösung erneut geflutet. Nach jeder Flutung wurde jeweils ein Emissionsspektrum mit einer PM-Spannung von 430 V aufgenommen.

## 4. Resultate [4]

### 4.1. Fluoreszenz- und Anregungsspektrum

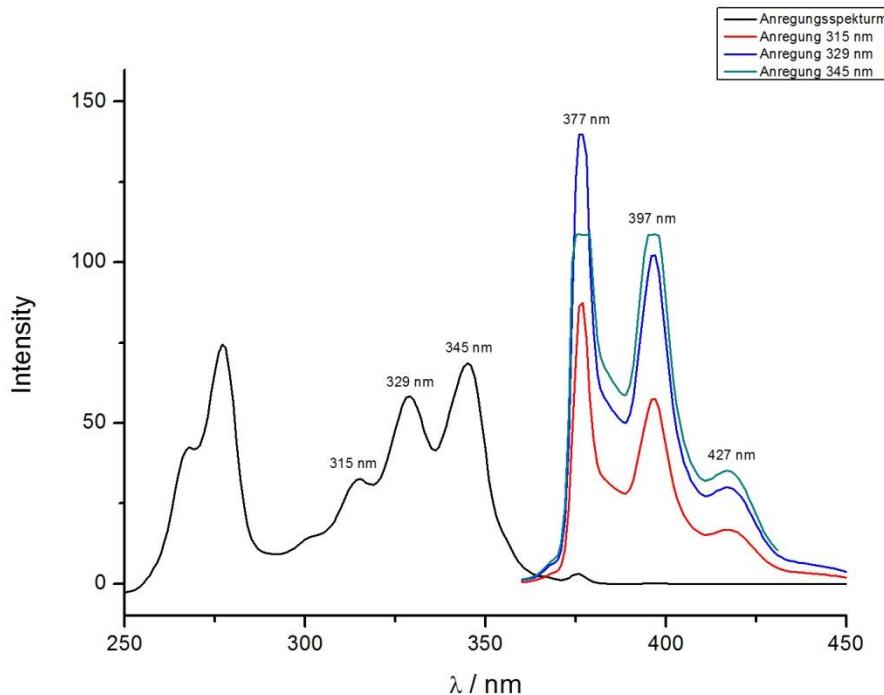


Fig. 4: Anregungs- und Emissionsspektrum von 1-Pyrenbuttersäure. Das Emissionsspektrum wurde insgesamt dreimal für jedes angegebene Anregungsmaximum aufgenommen.

Im Anregungsspektrum sind drei Anregungsmaximas zwischen 300 und 350 nm zu sehen:

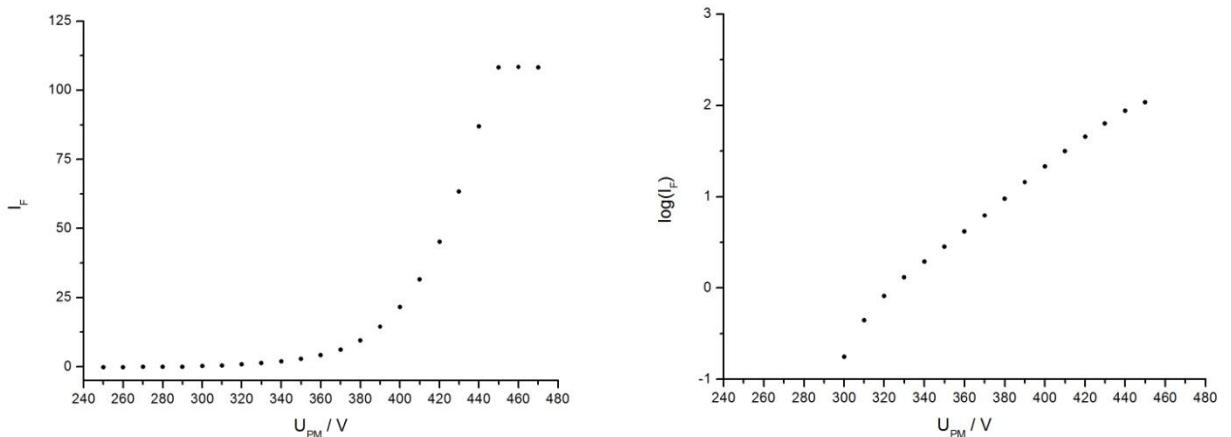
$$\lambda_{ex}^{max} = 315 \text{ nm} / 329 \text{ nm} / 345 \text{ nm}$$

Für jede dieser  $\lambda_{ex}$  wurde ein Emissionsspektrum aufgenommen. Dabei wurden die drei entsprechenden Fluoreszenzmaximas gefunden:

$$\lambda_{em}^{max} = 377 \text{ nm} / 397 \text{ nm} / 417 \text{ nm}$$

Dabei ist zu sehen, dass mit einer Anregungswellenlänge von 345 nm die höchste Fluoreszenzintensität erhalten wird.

## 4.2. PM-Spannung und Messsignal



**Fig. 5: Erhaltene Intensitätswerte des Detektors bei steigender PM-Spannung. Links: lineare Auftragung  $I_F$  gegen  $U_{PM}$ ; Rechts: logarithmische Auftragung  $\log(I_F)$  gegen  $U_{PM}$ .**

Die Auftragung der gemessenen Detektor-Intensitäten gegenüber der eingestellten PM-Spannung zeigt einen linearen Bereich zwischen 300 und 450 V. Unter 300 V ist kein Signal sichtbar, ab 450 V tritt eine Sättigung des Detektors ein.

### 4.3. Konzentrationsabhängigkeit des Fluoreszenzsignals

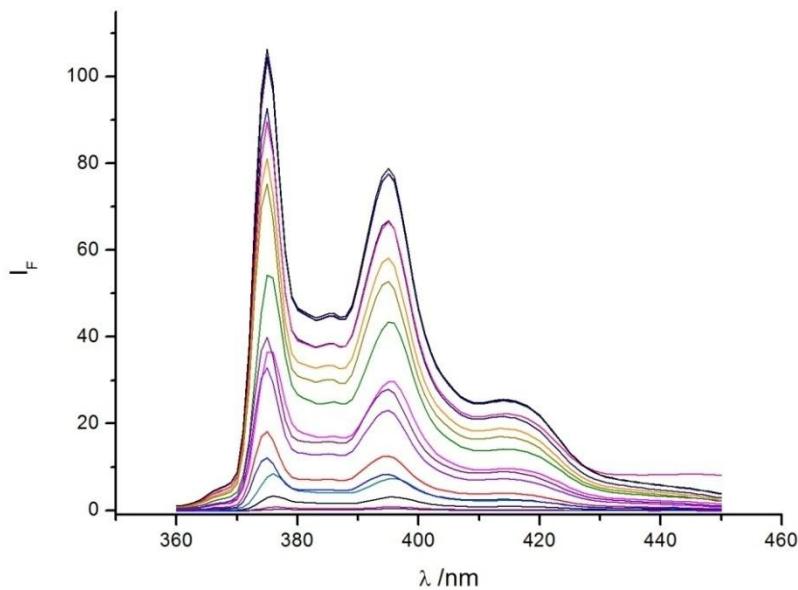


Fig. 6: Emissionsspektren aller hergestellten Fluorophorkonzentrationen (siehe Tab. 1)

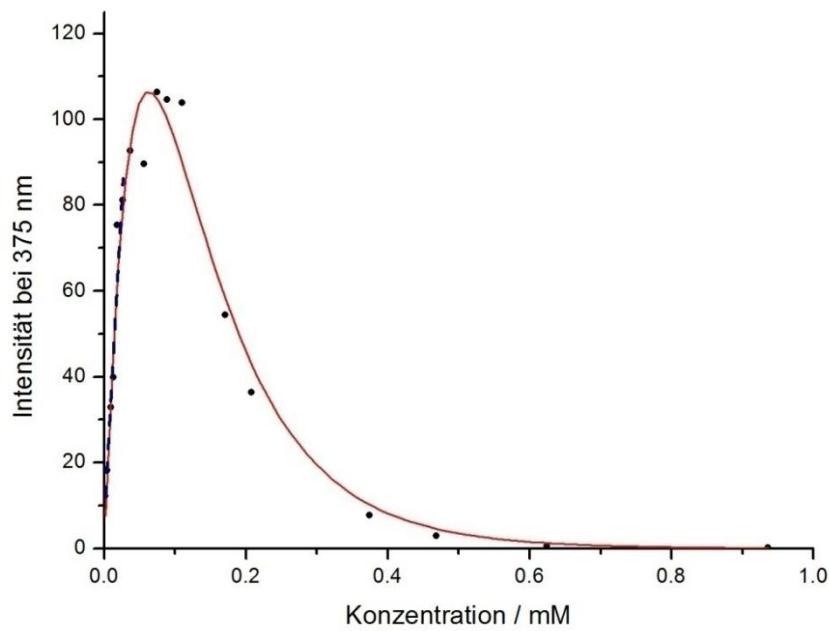


Fig. 7: Auftragung der Intensitäten gegen die Fluorophorkonzentrationen im Fluoreszenzmaximum  $\lambda_{em}^{max} = 375 \text{ nm}$ , einer gefitteten Freundlich-EXT-Funktion (rote Linie) sowie der linearen Approximation (gestrichelte blaue Gerade) bei kleinen Konzentrationen.

In Fig. 5 ist zu erkennen, wie die Intensität bei schwacher Absorption (kleine Konzentration) linear zunimmt (blau gestrichelte Gerade), für höhere Konzentrationen jedoch nach Durchlaufen einer Intensitätsmaxima aufgrund der konzentrationslimitierten Anregungstiefe wieder stark einbricht.

Die Kurve (rote Linie) wurde mittels FreundlichEXT-non-linear-curve-fit (Origin Pro 8) angepasst und ergab:

$$y = a \cdot x^{b \cdot x^{-c}} \quad a = 0.07 \pm 0.05 \quad (11)$$

$$b = -7.1 \pm 0.7$$

$$c = 0.362 \pm 0.006$$

Die lineare Regression für schwache Absorption ergab:

$$y = a + b \cdot x \quad a = 6 \pm 5 \quad (12)$$

$$b = 3027 \pm 372$$

#### 4.4. Fluoreszenz-Quenching mit Kaliumiodid

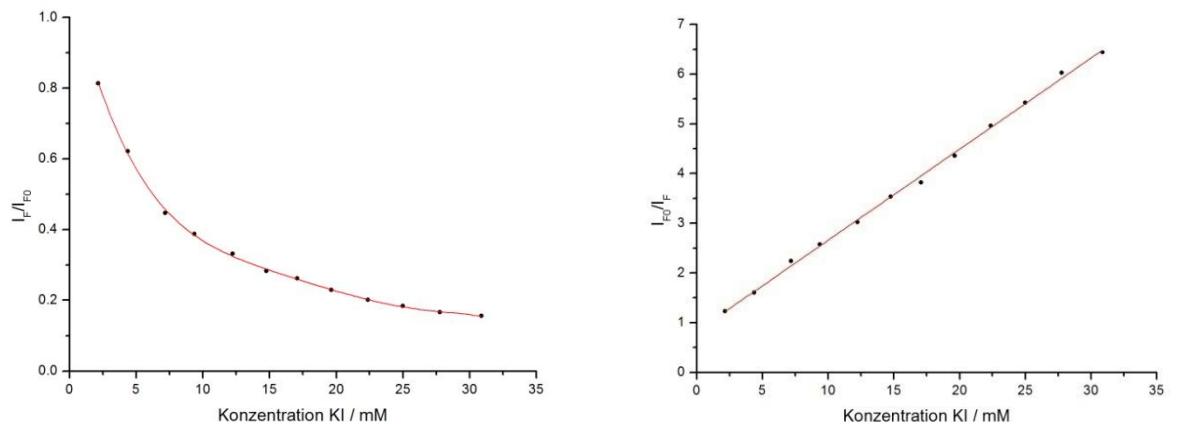


Fig. 8: Stern-Volmer-Plot für Fluoreszenz-Quenching mit Kaliumiodid

Der Stern-Volmer-Plot zeigt eine gute lineare Abhängigkeit der von  $I_{F,0}/I_F$  gegenüber der Konzentration. Aus der Steigung der linearen Regression ( $R = 0.998$ ) wird folgende  $K_D$  erhalten:

$$K_D = 183 \pm 3 \cdot M^{-1} \quad (13)$$

Mit einer ungefähren Fluoreszenzlebenszeit  $\tau_F$  von 100 ns für „air equillibrated water“ [2] ergibt sich mittles (10) eine Quenchingrate von:

$$k_Q = 1.83 \pm .03 \cdot 10^9 M^{-1} s^{-1} \quad (14)$$

#### 4.5. Fluoreszenz-Quenching mit Gasen

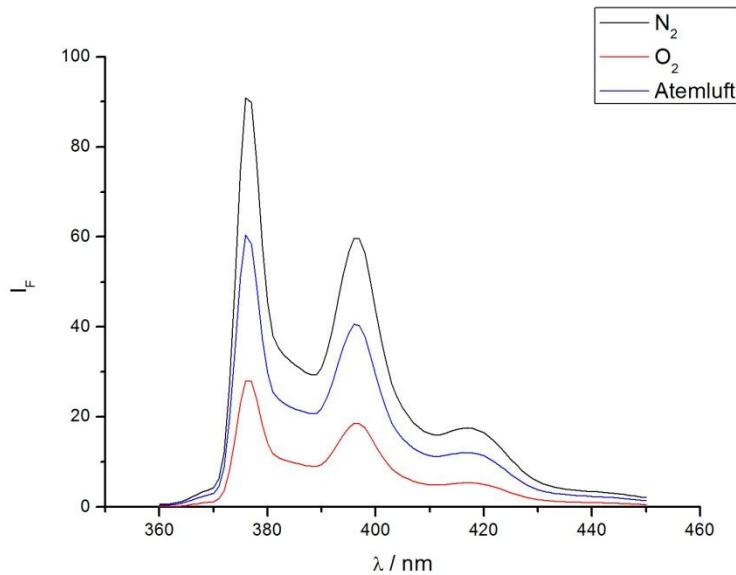


Fig. 9: Emissionspektren der Lösung 1 (Kap. 3.3.1) nach Fluten mit  $N_2$ ,  $O_2$  und Atemluft

Zu sehen ist eine Erhöhung der Fluoreszenz-Intensität durch gelösten Stickstoff, während gelöster molekularer Sauerstoff als Fluoreszenzquencher für 1-Pyrenbuttersäure agiert.

### 5. Diskussion [1][2]

#### 5.1. Fluoreszenz- und Anregungsspektrum

Die aufgenommenen Spektren für Anregung und Emission entsprachen den Erwartungen. Das Fluoreszenzspektrum ist in guter Näherung spiegelverkehrt zum Anregungsspektrum. Zu sehen ist, dass für die höchste Absorptionswellenlänge auch das intensivste Fluoreszenzsignal erscheint.

#### 5.2. PM-Spannung und Messsignal

Gut sichtbar war der lineare Bereich des Detektors. Für PM-Spannungswerte ab 450 V war der Detektor gesättigt ( $I_F \approx 108$ ), es konnte keine weitere

Signalverstärkung erreicht werden. Für zu kleine PM-Spannungen (unter 300 V) konnte selbst im Emissionsmaximum kein Signal gemessen werden, die Intensitätswerte waren negativ. Für die nachfolgenden Experimente war die Kenntnis des linearen Bereiches des Detektors notwendig.

### 5.3. Konzentrationsabhängigkeit des Fluoreszenzsignals

Die Auftragung der Intensitäten im Fluoreszenzmaximum der Spektren (Fig. 7) zeigt das erwartete Verhalten. Bei kleinen Fluorophorkonzentrationen (bis ca. 0.05 mM, schwacher Absorption) kann die Zunahme der Intensität linear angenähert werden. Nach dem Durchlaufen eines Maximums bei ca. 0.1 mM nimmt die Intensität aufgrund zu starker Absorption der Lösung wieder stark ab. Bei einer Konzentration von über 0.7 mM ist aufgrund der hohen Konzentration praktisch keine Fluoreszenz mehr auszumachen. Die kleine Schicht  $\delta$ , welche noch durch das Primärlicht angeregt werden kann, fluoresziert zwar intensiv, jedoch wird diese Fluoreszenz ihrerseits bis zur Detektion im rechten Winkel dazu durch die konzentrierte Lösung absorbiert.

Der Versuch musste mehrere Male neu gestartet werden, aufgrund der hohen Konzentration zu Beginn der Verdünnungsreihe. Erste Messungen wurden mit den hochkonzentrierten Lösungen durchgeführt. Da kaum ein Signal zu sehen war, wurde die PM-Spannung stark angehoben (über 800 V). Dies führte zu einer Sättigung des Detektors bei unwesentlich tieferen Konzentrationen.

Auch die aufgenommene Spektrenreihe ist mit Vorsicht zu genießen. Obwohl keine Flat-Tops in den einzelnen Spektren sichtbar sind und die maximalen Werte für die Intensitäten nie den Sättigungswert von ca. 108 annahmen, enthielten drei der Spektren Werte über 100. Es muss daher angenommen werden, dass der Bereich um das Maximum der Regression durch Detektor-Sättigung verfälscht ist. Für die quantitative Aussage sind die Messungen jedoch nichtsdestotrotz brauchbar.

### 5.4. Fluoreszenz-Quenching mit Kaliumiodid

Das Fluoreszenz-Quenchen von 1-Pyrenbuttersäure mittels KI ergab eine sehr gute Linearität im Stern-Volmer-Plot. Die mittels linearer Regression bestimmte dynamische Quenchingkonstante ergab eine Quenchinggeschwindigkeit  $k_Q$  in der Größenordnung von  $10^9 M^{-1}s^{-1}$ . Verglichen mit einer bimolekularen Reaktionskonstante  $k_{diff}$  einer diffusionskontrollierten Reaktion (im Bereich von  $10^9 - 10^{10} M^{-1}s^{-1}$  für die herrschenden Bedingungen [1]) zeigt, dass das dynamische Quenchen von 1-Pyrenbuttersäure mit Kaliumiodid ein

diffusionslmiterter Prozess ist. Dies lässt darauf schliessen, dass die Relaxation des Fluorophors am Quencher wesentlich kürzer als die Lebensdauer eines angeregten Moleküls ist.

## 5.5. Fluoreszenz-Quenching mit Gasen

Die von der mit verschiedenen Gasen gespülten Lösung aufgenommenen Spektren zeigten eine Intensivierung der Fluoreszenz-Emission nach Spülen der Lösung mit Stickstoff im Gegensatz zur selben Lösung welche mit normalem Luft-Gemisch geflutet wurde.

Der Befund von [2], nach welchem molekularer Sauerstoff als Fluoreszenz-Quencher auf 1-Pyrenbuttersäure wirkt, konnten bestätigt werden, die Fluoreszenz-Intensität nahm signifikant ab.

Die Zunahme der Intensität nach Durchspülen mit Stickstoff dürfte darauf zurückzuführen sein, dass in einer mit der Umgebung equilibrierten Lösung durch den atmosphärischen Sauerstoff bereits Sauerstoff gelöst ist. Dieser wird durch Spülen der Lösung mit Stickstoff verdrängt, es befindet sich dadurch kein O<sub>2</sub> mehr in der Lösung.

# 6. Appendix

## 6.1. Bibliographie

- [1] E. Meister, Grundpraktikum Physikalische Chemie, 2. Aufl., vdf Hochschulverlag an der ETH Zürich, 2006.
- [2] W.M. Vaughan, G. Weber, Oxygen Quenching of Pyrenebutyric Acid Fluorescence in Water. A Dynamic Probe of the Microenvironment, *Biochemistry* **9** (1970) 464.
- [3] [www.inventory-loc.ethz.ch](http://www.inventory-loc.ethz.ch) (01.12.2007)

## 6.2 Anhang

- Kopien des Laborjournals (S. 34-37)
- Aufgabenstellung