

## Versuch Fluoreszenz-Quenching

Zielstellung:

- 1.) Aufnahme des UV-Vis-Spektrums eines Fluoreszenzfarbstoffes
- 2.) Aufnahme der Kennlinie des verwendeten Photon-Counting-Moduls (PCM) im Bereich von 1,9 – 2,9 kV
- 3.) Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer durch Löschung nach Stern-Volmer

Grundlagen:

Werden Moleküle auf eine geeignete Weise, z.B. durch Licht, in den angeregten Zustand versetzt, so dauert dieser nur einige Picosekunden, da dieser aus energetischer Sicht sehr instabil ist. Innerhalb dieser sehr kurzen Zeitdauer wird die eingebrachte Energie wieder abgegeben. Dies geschieht meistens durch sogenannte strahlungslose Übergänge, bei denen die angeregten Moleküle durch molekülinterne Schwingungen und/oder Translationsbewegungen (und damit einhergehenden Stößen), die Energie thermisch abgeben. Sind Moleküle jedoch nicht in der Lage, die komplette Anregungsenergie thermisch abzubauen, so kommt es auch zur Abgabe eines Lichtquants. Die Wellenlänge dieses Lichtquants ist bezüglich der Wellenlänge des Anregungslichts rotverschoben.

Es werden zwei mögliche Strahlungsprozesse unterschieden: 1) die Fluoreszenz, bei der die Lebensdauer sehr kurz (ns) ist und 2) die Phosphoreszenz, bei der die Lebensdauer im Bereich von  $\mu\text{s}$  bis s liegt.

Die Molekülanregung und die unterschiedlichen Prozesse der Energieabgabe können im JABLONSKI-Termschema (Abb. 1) dargestellt werden.

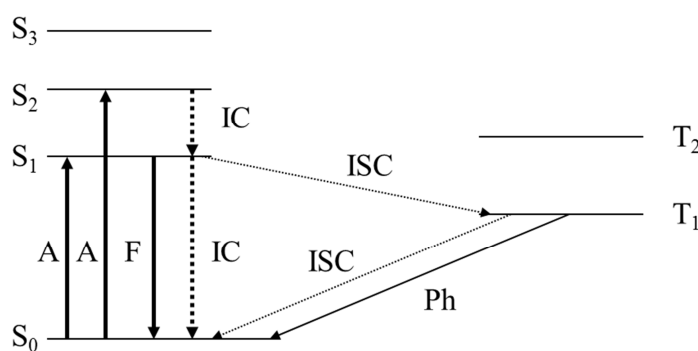


Abb. 1: Jablonski-Termschema

$S$  = Singulett-Zustände;  
 $T$  = Triplett-Zustände;  
 $A$  = Energieabsorption;  
 $F$  = Fluoreszenz;  
 $Ph$  = Phosphoreszenz;  
 $IC$  = internal conversion;  
 $ISC$  = intersystem crossing

$S_0$  stellt dabei den Grundzustand dar, aus dem die Anregung des Moleküls erfolgt und in den das Molekül auch wieder relaxiert. Die Anregung geschieht durch Absorption von Energie.  $S_{n \neq 0}$  sind hierbei angeregte Singulett-Zustände, d.h. angeregte Zustände, bei denen keine Spinumkehr stattfindet. Innerhalb dieser Zustände gibt es strahlungslose Übergänge, die als internal conversion (*IC*) bezeichnet werden, und bei denen die Energie thermisch durch Schwingungen und Rotationen abgebaut wird, indem das angeregte System von höheren Schwingungszuständen  $\nu_i$  und Rotationszuständen  $J_i$  auf niedrigere Zustände fällt (Abb. 2). Diese fein abgestuften Zustände existieren für alle *S*- und *T*-Zustände. Die strahlungslosen Übergänge erfolgen dabei innerhalb von  $10^{-12}$  s und enden immer beim  $S_1$ -Zustand. Kann das Molekül, wie oben beschrieben, nicht alle Anregungsenergie thermisch abgeben, erfolgt eine Strahlungsemission. Findet diese zwischen dem angeregten  $S_1$ - und dem Grundzustand statt, wird das als Fluoreszenz bezeichnet. Da dabei der Gesamtspin des Systems erhalten bleibt, sind diese Strahlungsübergänge sehr kurzlebig ( $10^{-9}$  s).

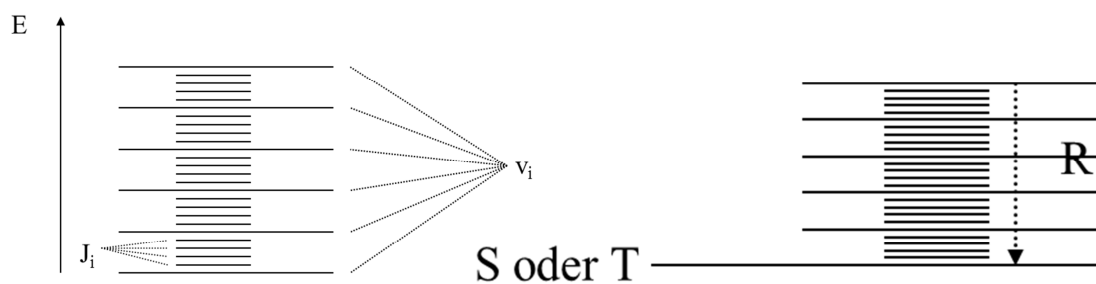


Abb. 2: Darstellung der Schwingungs- ( $\nu_i$ ) und Rotationszustände ( $J_i$ ) eines Energieniveaus; *R* beschreibt die strahlungslose Schwingungsrelaxation und ist ein *IC*-Übergang.

*T* sind Triplett-Zustände. Bei diesen Zuständen ist der Gesamtspin des Moleküls verschieden vom Grundzustand. Daher muss eine Spinumkehr erfolgen, um den Grundzustand zu erreichen. Diese spinverbotenen Zustände werden durch einen Übergang mit Spinumkehr aus einem höher gelegenen *S*-Zustand in einen energetisch etwas tiefer liegenden *T*-Zustand erreicht. Diesen ebenfalls strahlungslosen Übergang bezeichnet man als intersystem crossing. Der Übergang vom  $T_1$ -Zustand in den Grundzustand kann ebenfalls per Strahlungsübergang erfolgen und wird dann als Phosphoreszenz bezeichnet. Da dies eigentlich ein "verbotener" Übergang ist, ist die Dauer der Relaxation im Vergleich zur Fluoreszenz deutlich erhöht.

Wichtige Größen und Begriffe:

1) Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi$

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

$$\Phi = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}} \leq 1 \quad (2)$$

Gleichung 2 gilt nur, wenn die Deaktivierung des angeregten *SI*-Zustandes über Fluoreszenz (*F*) sowie *IC*- und *ISC*-Übergängen mit den entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten erfolgt. ( $\Phi = 0,95$  für Natriumfluorescein im basischen Milieu). Müssen weitere Mechanismen (wie z.B. die Fluoreszenzlöschung) berücksichtigt werden, ergibt sich Gl. 3.

$$\Phi = \frac{k_F}{\sum_i k_i} \leq 1 \quad (3)$$

2) Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_F$

$$\tau_F = \frac{1}{\sum_i k_i} \quad (4)$$

Die Fluoreszenzlebensdauer beschreibt die Zeitdauer, innerhalb der die Deaktivierung des *SI*-Zustandes in den Grundzustand erfolgt. Diese Lebensdauer wird allgemein durch die Geschwindigkeitskonstanten *k* der beteiligten Deaktivierungsprozesse bestimmt (Gl. 4). Neben den üblichen Prozessen (*F*, *IC*, *ISC*) können auch Löschprozesse durch sogenannte Löschermoleküle *L*, die Fluoreszenzlebensdauer beeinflussen (Gl. 5).

$$\tau_F = \frac{1}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_L[L]} \quad (5)$$

3) Fluoreszenzlöschung – STERN-VOLMER-Gleichung

Unter Fluoreszenzlöschung ist die Verringerung der maximal möglichen Fluoreszenzausbeute zu verstehen. Viele Einflüsse der umgebenden Materie eines zur Fluoreszenz befähigten Moleküls können die Deaktivierung durch Strahlung hemmen. Typische Arten der Fluoreszenzlöschung sind 1.) die Eigenlöschung, die dann auftritt, wenn das fluoreszierende Molekül in hoher Konzentration vorliegt, 2.) die Fremdlöschung, die durch andere Moleküle

(L) erfolgt und 3.) die Temperaturlöschung durch Temperaturerhöhung. Betrachtet man die Fluoreszenz bei konstanter Temperatur und hinreichend geringer Konzentration der fluoreszierenden Moleküle, ist die Fremdlöschung vorherrschend. Zwei Arten von Fremdlöschung existieren:

- die statische Fremdlöschung, wenn das fluoreszierende Molekül mit dem Löschermolekül ein nichtfluoreszierendes Addukt bildet und
- die dynamische Fremdlöschung, auch als Stoßlöschung bezeichnet, wenn das Fluorophor im angeregten Zustand mit dem Löschermolekül kollidiert und so abgeregt wird, sodass keine Strahlungsabgabe erfolgt.

Die Fluoreszenzausbeute bei dynamischer Fremdlöschung  $\Phi_L$  berechnet sich nach Gl. 6.

$$\Phi_L = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_L[L]} \quad (6)$$

Aus dem Verhältnis der Fluoreszenzausbeute ohne Löschung (Gl. 2) und der mit Löschung (Gl. 6) kann die Stern-Volmer-Gleichung (Gl. 7) für die dynamische Fremdlöschung hergeleitet werden.

$$\frac{\Phi}{\Phi_L} = 1 + k_L \tau_F [L] \quad (7)$$

Da bei der dynamischen Fremdlöschung die Anzahl der Kollisionen des Löschermoleküls mit dem Fluorophor von der Diffusionsgeschwindigkeit des Löschermoleküls abhängt, liegt die Quenchgeschwindigkeitskonstante  $k_L$  in derselben Größenordnung wie die diffusionskontrollierte Geschwindigkeitskonstante  $k_D$ . Die Größenordnungen liegen bei 25 °C im Bereich von  $k_D = 10^9$  bis  $10^{10} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (z. B.  $k_D = 7,4 \times 10^9 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für reines  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $k_D = 6,0 \times 10^9 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für eine 1 molare NaCl-Lösung).

Die Intensität  $I$  der Fluoreszenz eines Fluorophors hängt direkt proportional mit der Fluoreszenzausbeute zusammen. Daher gelten auch die Gleichungen 8 bzw. 9 für die dynamische Fluoreszenzlöschung.

$$\frac{I}{I_L} = 1 + k_L \tau_F [L] \quad (8)$$

$$\frac{I}{I_0} - 1 = k_L \tau_F [L] \quad (9)$$

Versuchsdurchführung:

- 1) Nehmen Sie von der vorhandenen und vorher mit 0,1 molarer NaOH-Lösung verdünnten Na-Fluorescein-Lösung ein Absorptionsspektrum auf.
- 2) Kalibrieren Sie nach der Versuchseinweisung und unter der Vorgabe der betreuenden Person das Photon-Counting-Modul mit reinem Wasser. Nehmen Sie die Kennlinie des Moduls grafisch auf. Bestimmen Sie die Arbeitsspannung!
- 3) Stellen sie jeweils 3 mit 0,1 molarer NaOH-Lösung verdünnte Na-Fluorescein-Lösungen her, die jeweils 3 verschiedene Quencherkonzentrationen (KI mit  $0,5 \text{ mol}^{-1}$ ,  $0,25 \text{ mol}^{-1}$  und  $0,125 \text{ mol}^{-1}$ ) enthalten.
- 4) Vermessen Sie jeweils die Fluorophor enthaltenen Lösungen zuerst ohne und danach mit Quencher im Photon-Counting-Modul. Erfassen Sie die Anzahl der Counts.

Auswertung:

Ermitteln sie grafisch unter Zuhilfenahme der Stern-Volmer-Gleichung die Fluoreszenzlebensdauer für die 3 verschiedenen Na-Fluorescein-Konzentrationen. Schätzen Sie dazu die Quenchgeschwindigkeitskonstante  $k_L$  ab, indem Sie die diffusionskontrollierte Geschwindigkeitskonstante  $k_D$  mit der Gleichung  $k_D = \frac{8RT}{3\eta}$  bestimmen. Recherchieren Sie dazu die Werte für die dynamische Viskosität  $\eta$  von wässrigen KI-Lösungen im verwendeten Konzentrationsbereich.

Welche Fehlerquellen beeinflussen die Messungen bzw. die Ergebnisse?

**Bei allen Arbeiten sind Schutzbrille, Kittel und Schutzhandschuhe zu tragen.**

**Alle Chemikalienabfälle sind in die dafür vorgesehenen Abfallbehälter zu geben.**