Praktikum: Instrumentelle Bioanalytik

Fluoreszenzspektroskopie

Im folgenden Versuch soll die Chininkonzentration in Tonic Water und Bitter Lemon anhand einer Kalibriergeraden bestimmt werden. Hierzu müssen zunächst verschiedene Kalibrier- und Probelösungen hergestellt werden. Anschließend werden diese im Fluoreszenzspektrometer vermessen und die Kalibriergerade erstellt. Diese Kalibriergerade zeigt (unter gewissen Umständen) einen linearen Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzintensität und der Konzentration des Fluorophors (Chinin) und kann daher auch zur Bestimmung der Chininkonzentration in den Getränken verwendet werden.

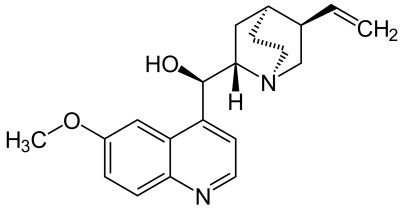

Abbildung 1: Strukturformel von Chinin.

1 Theoretische Grundlagen

In der Fluoreszenzspektroskopie wird eine Probe durch elektromagnetische Strahlung angeregt und die Fluoreszenz (spontane Emission) beobachtet. Im Gegensatz zur Absorption wird die Fluoreszenz senkrecht zur Einstrahlrichtung gemessen (siehe Abbildung 2). Ein Monochromator vor der Probe selektiert die eingestrahlte Anregungswellenlänge und ein zweiter vor dem Detektor bestimmt die Wellenlänge der gemessenen Fluoreszenz.

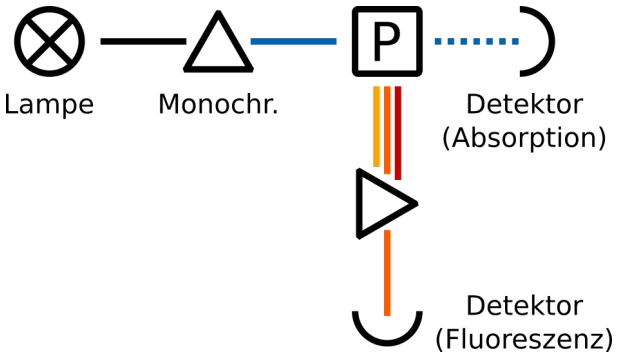

Abbildung 2: Aufbau eines Absorptions- und Fluoreszenzspektrometers.

1.1 Jabłoński-Termschema

Das Jabłoński-Termschema (Abbildung 3) beschreibt die elektronische Anregung eines Fluorophors und durch welche Prozesse die anschließende Abregung in den elektronischen Grundzustand erfolgen kann. Die Anregung erfolgt zunächst durch Absorption elektromagnetischer Strahlung und das Fluorophor wird vom elektronischen Singulett-Grundzustand (S_0) in einen elektronisch angeregten Zustand (hier S_1) angehoben. Dabei kann eine elektronische Anregung in verschiedene Schwingungszustände des S_1 erfolgen (siehe **Franck-Condon**). Da die nachfolgende **vibronische Relaxation** (VR) in der Regel um Größenordnungen schneller ist als die spontane Emission, erfolgt die Fluoreszenz aus dem Schwingungsgrundzustand (**Kasha-Regel**). Die emittierte Strahlung ist folglich energieärmer als die zuvor absorbierte Strahlung (siehe **Stokes Verschiebung**). Unter bestimmten Umständen kann das Fluorophor durch **Intersystem Crossing** (ISC) in den Triplettzustand (T_1) übergehen. Die spontane Emission aus dem Triplettzustand erfolgt erneut unter Spin-Umkehr und wird Phosphoreszenz genannt. Ein weiterer Übergang von S_1 in den elektronischen Grundzustand S_0 erfolgt strahlungslos und wird **Internal Conversion** genannt. In diesem Prozess wird die absorbierte Strahlung vollständig in thermische Energie umgewandelt.

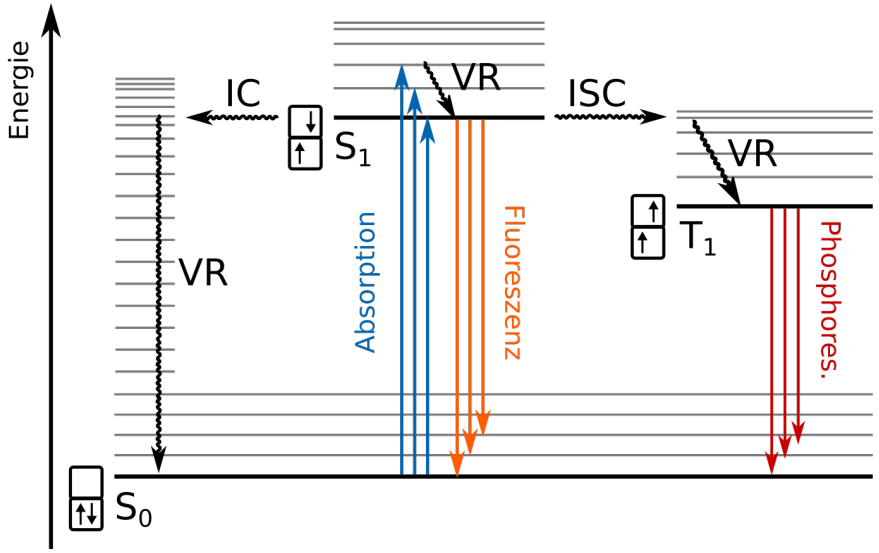

Abbildung 3: Es wird das Jabłoński-Termschema gezeigt mit folgenden Abkürzungen: Elektronischer Grundzustand (S_0), erster angeregter Singulettzustand (S_1), Triplettzustand (T_1), vibronische Relaxation (VR), Internal Conversion (IC), Intersystem Crossing (ISC). Die grauen Linien repräsentieren Schwingungszustände der jeweiligen elektronischen Zuständen.

1.2 Franck-Condon-Prinzip

Das Franck-Condon-Prinzip beschreibt, welchen Einfluss Molekülschwingungen auf die elektronische Anregung haben. Da die Anregung des Fluorophors sehr schnell erfolgt (ca 1 fs), ändert sich währenddessen der Kernabstand nicht (eine Schwingung ist um ca 2 Größenordnungen langsamer). In Abbildung 4 ist diese Anregung von S_0 in S_1 deshalb als senkrechter Pfeil gezeichnet - der Kernabstand bleibt während der Anregung konstant. Eine solche Anregung kann jedoch nur dann erfolgen, wenn bei einem konstanten Kernabstand sowohl der Anfangs- als auch der Endzustand eine gewisse Zustandswahrscheinlichkeit besitzen. Demnach ist ein Übergang zwischen zwei Zuständen umso wahrscheinlicher, je besser deren Schwingungswellenfunktionen überlappen.

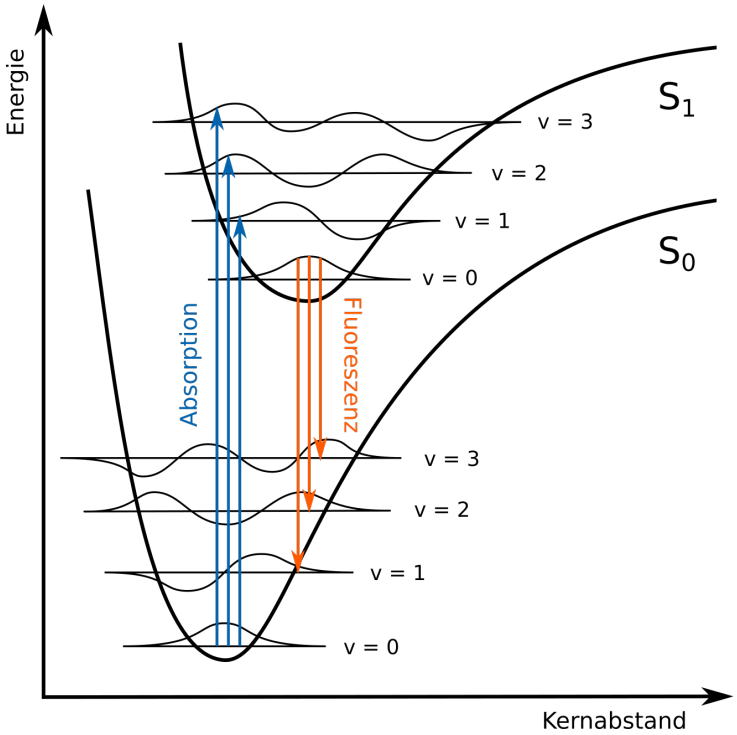

Abbildung 4: Schematische Darstellung des Franck-Condon-Prinzips. Der Molekülschwingung wird der anharmonische Oszillator zu Grunde gelegt und es sind die ersten Schwingungszustände von S_0 und S_1 gezeigt.

1.3 Stokes Verschiebung

Es ist zunächst verwunderlich, dass die Energie der emittierten Strahlung nicht der Energie der absorbierten Strahlung entspricht. Es wurde festgestellt, dass das emittierte Licht eine höhere Wellenlänge besitzt also energieärmer ist als das zuvor absorbierte. Hier werden zwei Prozesse angeführt, die zu der sogenannten Stokes Verschiebung beitragen.

Vibronische Relaxation

Wie in Abbildung 3 gezeigt, kann sowohl die Absorption als auch die Fluoreszenz in einen angeregten Schwingungszustand erfolgen. Dadurch wird zum einen die benötigte Energie der absorbierten Strahlung erhöht, sowie die Energie der emittierten Strahlung vermindert. Beides führt dazu, dass die Emission bei einer höheren Wellenlänge stattfindet als die Absorption.

Lösungsmittel Relaxation

Durch die Anregung des Fluorophors in einen elektronisch angeregten Zustand ändert sich auch dessen Ladungsverteilung. Dies führt dazu, dass die Lösungsmittelmoleküle, die zunächst energetisch günstig um das Fluorophor orientiert waren, nach Anregung energetisch ungünstig orientiert sind (Abbildung 5, links). Die Anregung erfolgt so schnell (analog zu Franck-Condon), dass sich das Lösungsmittel erst im Anschluss reorientiert und einen energetisch günstigeren Zustand einnimmt. Bei anschließender Fluoreszenz ist erneut eine Reorientierung des Lösungsmittel notwendig (Abbildung 5, rechts). Auch hier führen beide Effekte zu einer Stokes Verschiebung.

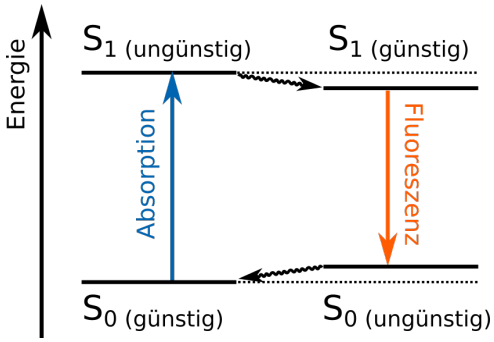

Abbildung 5: Es wird die Relaxation durch Reorientierung des Lösungsmittels veranschaulicht. Es ist zu beachten, dass eine günstige Anordnung der Lösungsmittelmoleküle stets zu einer energetischen Absenkung des Zustands führt.

1.4 Zerfall des angeregten Zustands S_1

Im folgenden Abschnitt soll der Zerfall des angeregten Zustands S_1, welcher im Jabłoński-Termschema (Abbildung 3) qualitativ zusammenfasst ist, genauer betrachtet werden. Nach der Absorption von Licht lässt sich die zeitliche Entwicklung des S_1 typischerweise durch eine Kinetik erster Ordnung beschreiben. Folglich ist dessen Population n zum Zeitpunkt t gegeben durch

$$n(t) \;=\; n_0 \cdot \exp\{-k_{S_1} \cdot t\}.$$

Dabei ist k_{S_1} die Ratenkonstante, welche die Geschwindigkeit des Zerfalls bestimmt. Sie setzt sich aus weiteren Raten zusammen, deren konkurrierende Prozesse (Fluoreszenz, Internal Conversion, Intersystem Crossing) aus dem Jabłoński-Termschema bekannt sind:

$$k_{S_1} \;=\; k_F + k_{IC} + k_{ISC}. \tag{1.1}$$

Aus k_{S_1} lässt sich die Lebensdauer τ_{S_1} des angeregten Zustands wie folgt berechnen:

$$\tau_{S_1} \;=\; \frac{1}{k_{S_1}}$$

1.5 Fluoreszenzquantenausbeute

Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F ist definiert als das Verhältnis von emittierter zu absorbierter Strahlung. Sie kann ebenfalls durch die entsprechenden Raten dargestellt werden:

$$\Phi_F \;=\; \frac{\text{emittierte Photonen}}{\text{absorbierte Photonen}} \;=\; \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}}$$

Ein weiterer Prozess der zur Abregung des S_1 führt, wird als Fluoreszenzlöschung (Quenching) bezeichnet und wird im folgenden Kapitel genauer beschrieben.

1.6 Fluoreszenzlöschung

In Anwesenheit eines sogenannten *Quenchers* gibt es weitere Prozesse, die einen Zerfall des S_1 hervorrufen und Gleichung (1.1) muss um einen Term erweitert werden:

$$k_{\mathrm{S}_1} = k_{\mathrm{F}} + k_{\mathrm{IC}} + k_{\mathrm{ISC}} + k_{\mathrm{Q}} \cdot [Q]. \tag{1.2}$$

Dabei ist $[Q]$ die Konzentration des Quenchers und k_Q die zugehörige Rate des Quenchprozesses. Man unterscheidet zwischen zwei Prozessen des Quenchens, der dynamischen und der statischen Fluoreszenzlöschung. Im Fall des dynamischen Quenchens wird die Energie des angeregten Fluorophors durch einen Stoß auf den Quencher übertragen und es wird daher auch vom Kollisions-Quenching gesprochen. Folgende Gleichung beschreibt den Prozess des dynamischen Quenchens:

$$\mathrm{F}^* + \mathrm{Q} \xrightarrow{\mathrm{k}_Q} \mathrm{F} + \mathrm{Q}^*.$$

Dahingegen bildet bei der statischen Fluoreszenzlöschung das Fluorophor und der Quencher einen Komplex, welcher nicht oder weniger fluoresziert. Dies wird durch folgende Gleichung veranschaulicht:

$$\mathrm{F} + \mathrm{Q} \rightleftharpoons \mathrm{FQ}.$$

Ein Quenchprozess lässt sich mit Hilfe der **Stern-Volmer Gleichung** quantifizieren. Sie beschreibt die Fluoreszenz eines Farbstoffes in Abhängigkeit von der Konzentration eines Quenchers $[Q]$. Sie ist gegeben als

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\Phi_0}{\Phi} = 1 + k_{\mathrm{SV}} \cdot [Q].$$

Dabei ist F die Fluoreszenzintensität mit und F_0 ohne Quencher, sowie Φ die Quantenausbeute mit und Φ_0 ohne Quencher. Die Stern-Volmer-Konstante k_{SV} bestimmt die Steigung der Geraden.

2 Durchführung

Zunächst werden die Kalibrier- und Probelösungen aus den Stammlösungen hergestellt und im späteren Verlauf am Fluoreszenzspektrometer vermessen.

2.1 Herstellung der Stammlösungen

Folgende Stammlösungen werden im Labor im 4.Stock hergestellt:

- 500 ml einer 0,5M H_2SO_4-Lösung (M = 98,08 g/mol, ρ = 1,84 g/cm^3, ursprüngliche Konzentration: 98 %)
- 46-50 ml Chinin-Lösung der Konzentration 0.1 g/l (in H_2SO_4-Stammlösung). Ggfs. abweichende Konzentration muss notiert und für weitere Berechnungen verwendet werden!

2.2 Herstellung der Kalibrierlösungen

Zur Herstellung der Kalibrierlösungen werden jeweils 10 ml der 0,5M H_2SO_4-Lösung mit Hilfe einer Vollpipette vorgelegt und anschließend das entsprechende Volumen der Chinin Stammlösung zugegeben. Um einen systematischen Fehler zu vermeiden, soll im Versuchsprotokoll die tatsächliche Chinin Konzentration zur Auswertung berechnet und verwendet werden.

	$V_{gewünscht}$ [ml]	$c_{gewünscht}$ [mg/l]	Zugabe Chinin-Lösung [μl]	V_{gesamt} [ml]	$c_{tatsächlich}$ [mg/l]
1	10	0.05			
2	10	0.10			
3	10	0.15			
4	10	0.20			
5	10	0.30			
6	10	0.40			
7	10	0.50			
8	10	0.60			
9	10	0.70			
10	10	0.80			
11	10	0.90			
12	10	1.00			

2.3 Herstellung der Probelösungen

Um den *inner filter*-Effekt zu vermeiden, muss vor der Messung eine verdünnte Probenlösung (1:199) hergestellt werden. Diese Verdünnung muss bei der späteren Auswertung berücksichtigt werden.

- 10 ml einer Verdünnung von Tonic Water in 0,5M H_2SO_4-Lösung
- 10 ml einer Verdünnung von Bitter Lemon in 0,5M H_2SO_4-Lösung

Kohlensäure in Tonic Water / Bitter Lemon kann zu Pipettierfehlern führen und sollte daher durch wiederholtes Schütteln entfernt werden.

2.4 Optimierung der Messparameter für Chinin

Um sinnvolle Messungen zu erhalten, muss zunächst der relevante Emissionsbereich sowie die optimale Anregungswellenlänge bestimmt werden.

1. Es soll ein Übersichtsfluoreszenzspektrum einer Chinin-haltigen Lösung aufgezeichnet werden. Dazu wird eine Einstrahlwellenlänge von 300 nm gewählt und die Emission in einem Wellenlängenbereich von 200 bis 800 nm gemessen.
   Erklären sie die auftretenden Signale und bestimmen sie den relevanten Emissionsbereich.

2. Um die optimale Anregungswellenlänge zu finden wird ein Anregungsspektrum gemessen. Dazu wird die Anregungswellenlänge von 275 bis 375 nm variiert.
   Bestimmen sie das Optimum.

2.5 Messung am Fluoreszenzspektrometer

Nun sollen die erstellten Kalibrier- und Probelösungen mit den optimierten Messparametern am Spektrometer vermessen werden. Es ist zu beachten, dass Rückstände vorheriger Proben in der Küvette die Messung verfälschen können. Deshalb wird ein Spülen vor jeder Messung empfohlen. Zum Spülen sollte die zu messende Probe verwendet werden, um den Fehler zu minimieren.

1. Um später eine Hintergrundkorrektur durchzuführen, wird zunächst eine Blank-Messung der reinen 0,5M H_2SO_4-Lösung durchgeführt.

2. Für jede Kalibrierlösung wird anschließend ein Fluoreszenzspektrum gemessen.

3. Für die verdünnten Lösungen von Tonic Water / Bitter Lemon wird ein Fluoreszenzspektrum gemessen.

4. Um die Reproduzierbarkeit des Spektrometers zu ermitteln, sollen Mehrfachmessungen einzelner Proben durchgeführt werden. Diese können später in der Fehlerdiskussion verwendet werden.

5. Zu einer Chinin-haltigen Probe sollen wenige μl einer gesättigten NaCl-Lösung zugegeben werden. Welche Änderungen können beobachtet werden?

3 Auswertung

- Die Daten werden in Excel/Origin importiert.
- Damit können Grafiken für den Ergebnisteil erstellt werden.
- Kalibriergerade: Von allen Spalten wird die Blank-Spalte abgezogen. Die Chinin-Peaks werden integriert. Die Integrale werden nun gegen die berechneten Chinin-Konzentrationen aufgetragen. Ein linearer Fit wird durchgeführt und die Standardabweichung der Steigung notiert.
- Mithilfe der Kalibriergerade wird nun die Chinin-Konzentration der beiden Getränke bestimmt.
- Fehlerrechnung: Aus der Mehrfachmessung wird die Standardabweichung des Integrals bestimmt. Daraus und aus dem Fehler der Steigung soll der Gesamtfehler auf die ermittelten Konzentrationen berechnet werden. Es soll angenommen werden, dass die Standardabweichung des Integrals direkt proportional zur Größe des Integrals ist (und somit auch für die andere Probe berechnet werden kann).

- Zusätzlich zur Fehlerrechnung sollen weitere Fehlerquellen kurz erläutert werden.

Themen zum Kolloquium

Der Theorie-Teil dieses Skripts erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit, weshalb auch externe Quellen zur Vorbereitung verwendet werden sollten. Folgende Themen können Bestandteil des Kolloquiums sein:

- Aufbau eines Absorptions- bzw. Fluoreszenzspektrometers
- Lambert-Beer'sches Gesetz
- Jabłoński-Termschema
- Kasha-Regel
- Franck-Condon Prinzip
- Stokes-Verschiebung
- *Inner filter*-Effekt
- Fluoreszenzquantenausbeute
- Fluoreszenzlöschung
- Temperaturabhängigkeit der statischen / dynamischen Fluoreszenzlöschung