

Fluoreszenz

+ *KRÜ-Fragen & Recap*

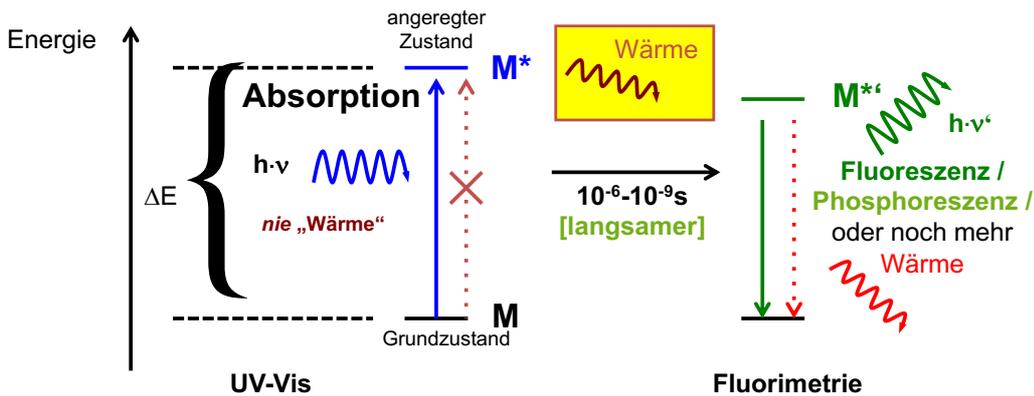
Instrumentelle Analytik

Dr. Oliver Thorn-Seshold
C1.059 (Fr 12-13) / oliver.thorn-seshold@cup.lmu.de

Ziele

- Recap:
- Fluorimetrie
 - Jablonski
 - Anregungs- & Fluoreszenzspektren
 - Fluoreszenzintensität <-> Struktur
 - Messbedingungen, Anwendungen
- KRÜ

Lichtabsorption & -emission bei organischen Molekülen



Absorption eines Photons:
Die gesamte Energie eines Photons wird auf ein Atom/Molekül übertragen. Übertragung von Teilbeträgen der Energie findet **nie** statt.

$$\Delta E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} = h \cdot c \cdot \tilde{\nu}$$

Emission eines Photons:
Die **restliche** ΔE wird auf ein Photon übertragen.

$$\Delta E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} = h \cdot c \cdot \tilde{\nu}$$

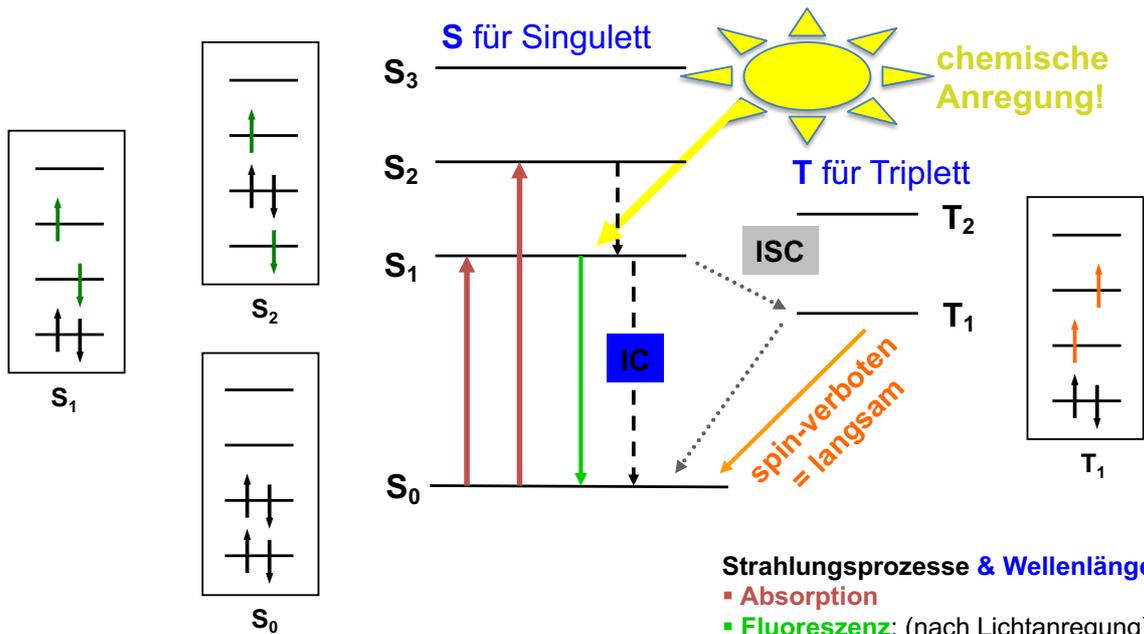
3

Fluoreszenz

- *Lumineszenz*: Emission von Licht nach Energieabsorption
- *Photolumineszenz* (Fluoreszenz und Phosphoreszenz): Emission von Licht nach Lichtabsorption
- Fluorimetrie:
 - hohe Empfindlichkeit (ppb-Bereich; 10^{-9})
 - großer linearer Bereich
 - hohe Selektivität
 - aber nur wenig Moleküle fluoreszieren gut genug
- Auch möglich:
 - Tribolumineszenz: Anregung durch mechanische Vorgänge (Zucker)
 - Elektrolumineszenz: elektrische (LED)
 - Radiolumineszenz: radioaktiven Strahlen (ZnS-Detektor)
 - Chemo- bzw. Biolumineszenz

4

vereinfachtes Jablonski-Termschema



Chemolumineszenz: chemische Anregung vor Emission
Fluoreszenz: innerhalb von $< 10^{-5}$ s
Phosphoreszenz: ISC (Änderung des Elektronenspins) innerhalb von 10^{-5} s liefert Triplet-Zustand; dann Abregung innerhalb 10^{-4} s bis > 10 s (Stunden!)

Strahlungsprozesse & Wellenlängen:

- **Absorption**
- **Fluoreszenz:** (nach Lichtanregung)
- **Phosphoreszenz**

Strahlungslose Prozesse:

- IC internal conversion - - ->
- ISC intersystem crossing>

5

Fluoreszenz im Alltag

- Fluo-rohr lampe: UVB/UVA zu Vis



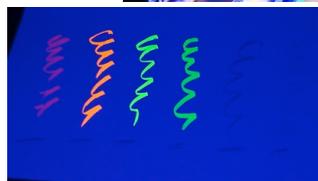
- Schöne Schuhe & Weißes Papier: 360-400 zu Blau



- Natürliche Zähne: 340 zu Grün



- Highlighter: alles zu Gold*



*fast

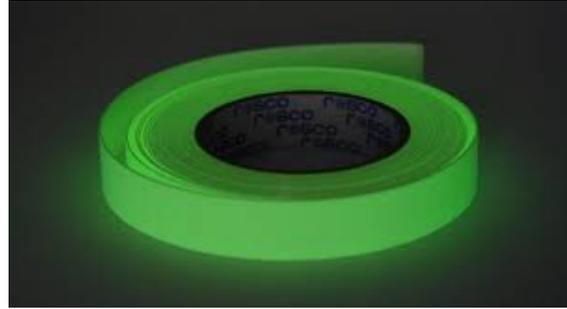
6

Phosphoreszenz im Alltag

- am meistens,
Lanthanid-sälze (Eu...)



ZnS:Ag ;
ZnS:Cu,Al oder ZnS:Ag,Cu,Al ;
Y₂O₂S:Eu³⁺

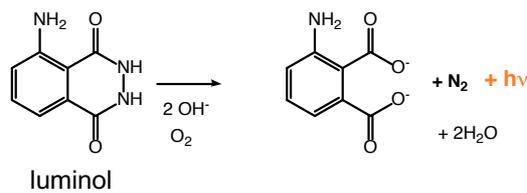


7

Chemolumineszenz im Alltag

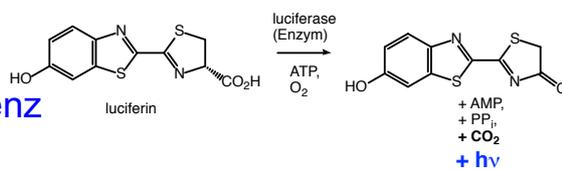
Moleküle im angeregten Zustand entstehen durch chemische Reaktionen

- Rave-Parties

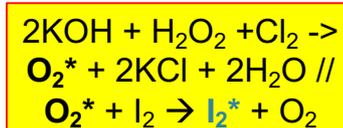


- Insektensex

- Biolumineszenz

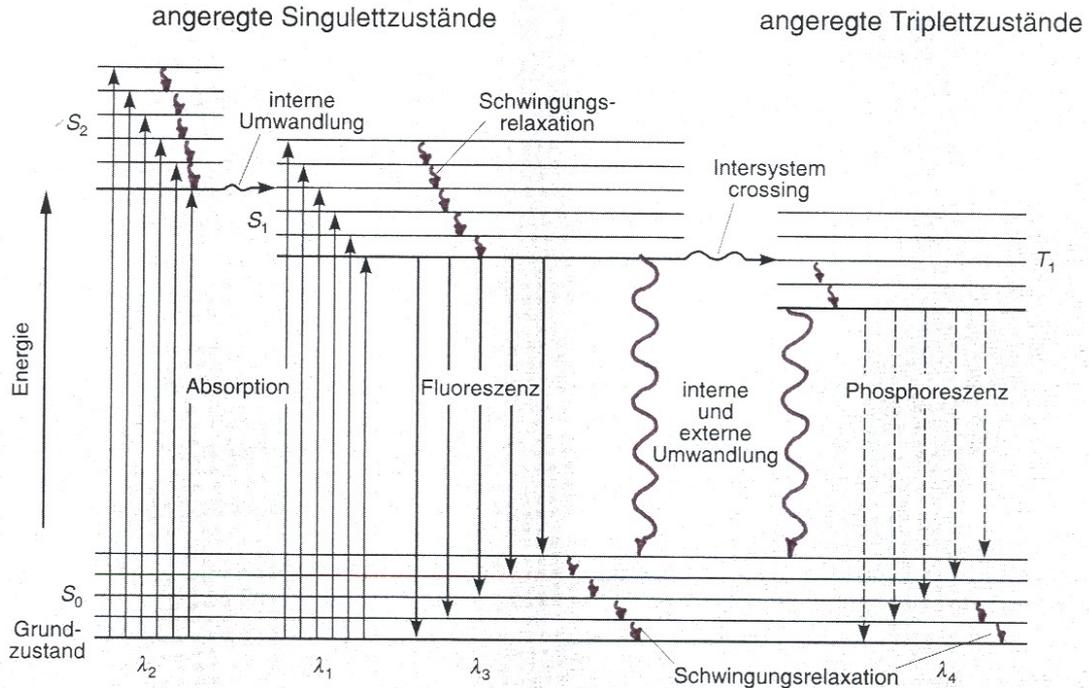


- Raumschiffwaffen



8

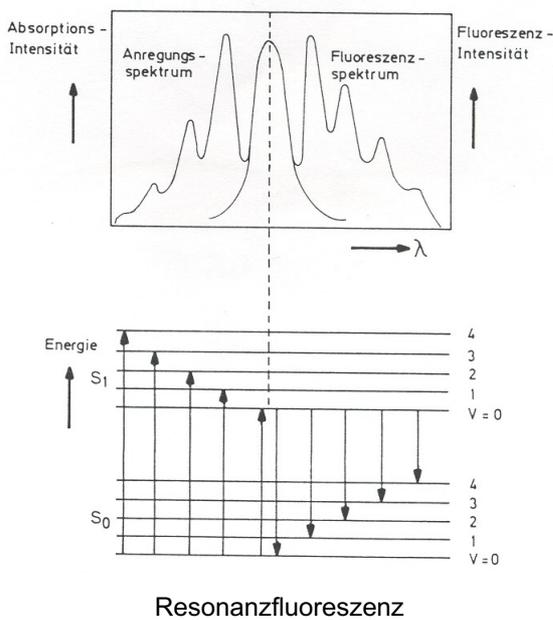
Jablonski-Termschema



π*-π Übergang schneller (kann mit anderen Vorgängen konkurrieren):
 weniger intersystem crossing
 die meisten Fluorophor sind auf konjugierten π-Systeme basiert

9

Anregungs- und Fluoreszenzspektrum



Anregungsspektrum („ex“)

(~ Absorptionsspektrum)

- Fluoreszenzemissionswellenlänge konstant
- Anregungswellenlänge wird variiert

Fluoreszenzspektrum („em“)

- Anregungswellenlänge konstant
- wellenlängenabhängige Aufzeichnung der Fluoreszenzemission

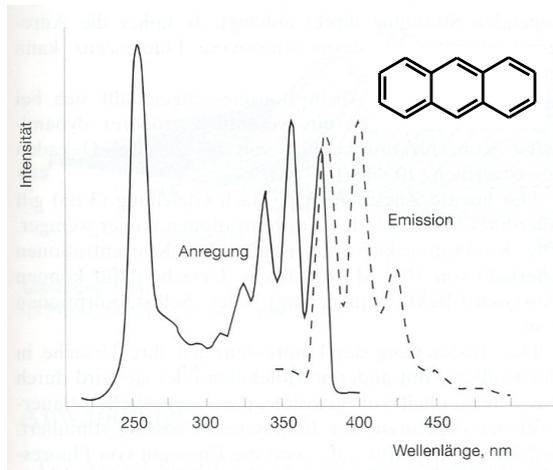
Stokes-Verschiebung:

Verschiebung der Fluoreszenzbande eines gegebenen Elektronenübergangs zu **größeren** Wellenlängen relativ zur Absorptionsbande. Ursache: Energieverlust innerhalb S₁-Zustand, vor Rückkehr nach S₀.

Normalerweise nur ~20 nm. Wenn signifikant größer, Patent sofort melden: _____

10

Anregungs- und Fluoreszenzspektrum



Anregungsspektrum („ex“)

- Anregungswellenlängenabhängige Aufzeichnung der Fluoreszenzintensität

Fluoreszenzspektrum („em“)

- Emissionswellenlängenabhängige Aufzeichnung der Fluoreszenzemission

Stokes-Verschiebung:

Normalerweise nur ~20 nm

11

Fluoreszenzintensität

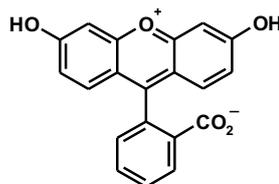
$$I_{\lambda} \sim \varepsilon \cdot I_0 \cdot Q_F$$

- I_{λ} : Intensität des Fluoreszenzlichtes einer Substanzlösung bestimmter Konzentration
 ε : molarer Absorptionskoeffizient
 I_0 : Intensität des Anregungslichtes
 Q_F : Quantenausbeute
alles mal ein Proportionalitätskonstant fürs Gerät

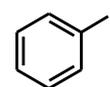
Quantenausbeute: $Q_F = \frac{\text{Zahl der fluoreszierenden Moleküle}}{\text{Zahl der angeregten Moleküle}}$

z.B.

Fluorescein
 $Q_F \rightarrow 1$



nicht fluoreszierende Verbindung
 $Q_F \rightarrow 0$



$$I_{\lambda} \sim c$$

- I_{λ} : Intensität des Fluoreszenzlichtes
 c : Konzentration der emittierenden Spezies

für $Abs < 0.02...$ vgl zum gültigkeit von Lambert-Beer!

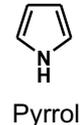
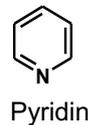
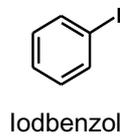
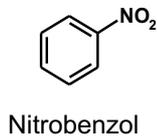
12

Fluoreszenzintensität / Quantenausbeute: Einflüsse

$$I_{\lambda} \sim \varepsilon \cdot I_0 \cdot Q_F$$

- **effektive** Q_F stark abhängig vom
 - „Umgebung“:
 - Lösungsmittel selbst (nichtpolar, polar, H-Brücke): _____
 - Nachbar-Moleküle (DNA-basen - Ethidium Bromid): _____
 - perfekte Löslichkeit (kein Aggregate): _____
 - **Verunreinheiten** (oft: I⁻ und metalle): _____

nicht fluoreszierende Verbindungen z.B.



13

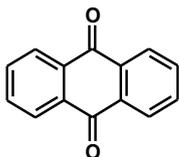
Fluoreszenz und Struktur

Übergangstypen $\pi^* \rightarrow \pi$
 $\pi^* \rightarrow n$

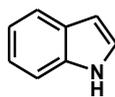
Wirkungsgrad der Quantenausbeute ist für $\pi^* \rightarrow \pi$ Übergänge größer da:
 größere molare Absorptionskoeffizienten ε
 (10^3 - 10^5 vs. 10^2 - 10^3) \Rightarrow
 kürzere Lebensdauer des angeregten Zustands
 (10^{-7} - 10^{-9} s vs. 10^{-5} - 10^{-7} s)

Allgemeine Strukturmerkmale:

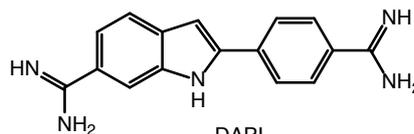
- hochkonjugierte Doppelbindungen
- aromatische Kohlenwasserstoffe
- kondensierte Heterocyclen, wie Chinolin, Isochinolin, Indole



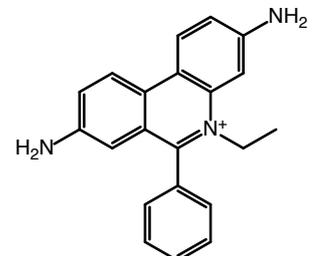
Anthrachinon



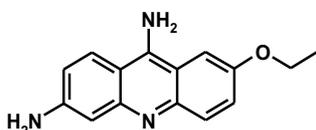
Indol



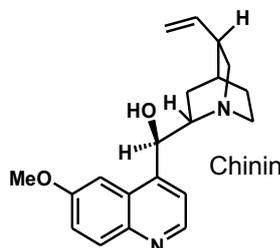
DAPI
360 / 460 [im DNA]



Ethidium (bromide)
/ [im DNA]



Ethacridin



Chinin



Morin

14

Fluoreszenz und Struktur

Übergangstypen $\pi^* \rightarrow \pi$

$\pi^* \rightarrow n$

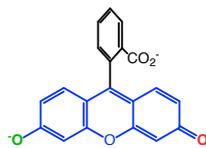
Wirkungsgrad der Quantenausbeute ist für $\pi^* \rightarrow \pi$ Übergänge größer da:

größere molare Absorptionskoeffizienten ϵ
(10^3 - 10^5 vs. 10^2 - 10^3) \Rightarrow

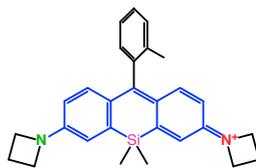
kürzere Lebensdauer des angeregten Zustands
(10^{-7} - 10^{-9} s vs. 10^{-5} - 10^{-7} s)

Allgemeine Strukturmerkmale:

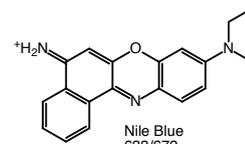
- hochkonjugierte Doppelbindungen
- aromatische Kohlenwasserstoffe
- kondensierte Heterocyklen, wie Chinolin, Isochinolin, Indole
- „donor-acceptor“ Systemen - Cyanine, Fluoreszein usw



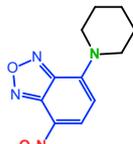
fluorescein
495 / 518



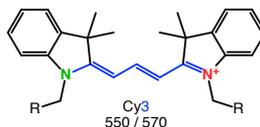
silarhodamine
646 / 661



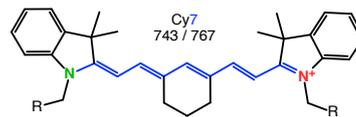
Nile Blue
633/672



NBD
460 / 530



Cy3
550 / 570

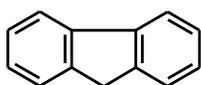


Cy7
743 / 767

15

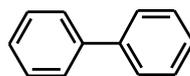
Aufbau eines gutes Fluorophors

- Gute Chromophore versorgt für gute Anregung
 - mindestens 2 durch Konjugation verbundene aromatische Ringe; lange Polyene...
 - niederenergetischem $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang
 - polarisierung & „push-pull“ manchmal favoriert für fluorophoren in Wasser-Lösungen
- Dann kein Energieverlust in Triplett oder Wärme (= Gute QF)
 - Fluoreszenzemission muß deutlich schneller (favorisierter) sein als die konkurrierender [Abregungs]prozesse:
 - strahlungslose Desaktivierung (internal conversion zu Wärme):
 - starres System: **minimiert Rotationen und Schwingungen, die Energie an die Umgebung abgeben**

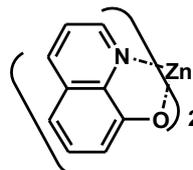


Fluoren
 $Q_F \sim 1$

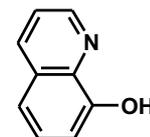
Rigidisierung



Biphenyl
 $Q_F \sim 0.2$



Q_F (Komplex)



Q_F (8-Hydroxychinolin)

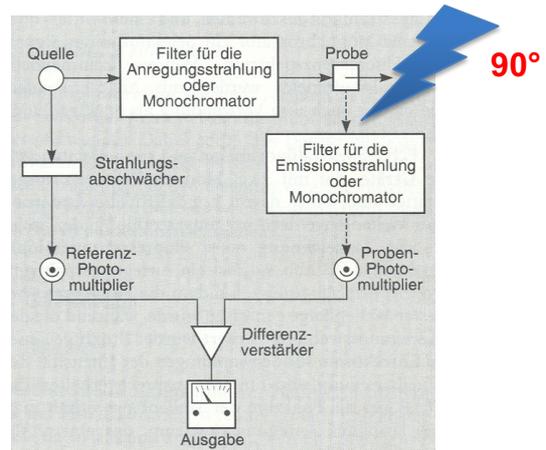
Q_F (Komplex) > Q_F (8-Hydroxychinolin)

- Intersystem Crossing (zu Triplett-Zustand):

- Lage der S & T zustände möglichst energetisch verschieden -> "Zufall"

16

Fluorimeter



- Strahlungsquelle** Anforderungen: hohe und konstante Intensität
höhere Anregungsintensität (I_0) → höhere Empfindlichkeit
- Hochdruck-Xenon-Bogenlampe (Kontinuum von 250-600 nm)
 - Quecksilberdampflampe (Linienspektrum)
- Detektor** geringe Intensität des Fluoreszenzlichtes ⇒
- Photomultiplier (Sekundärelektronenvervielfacher)
 - Photodiodenarrays

17

Fluorimetrie - Messbedingungen

Lösungsmittel

(z.B. Cyclohexan,
EtOAc, MeCN,
EtOH, Wasser)

- keine Eigenabsorption
- keine Eigenfluoreszenz
- photostabil
- hohe Reinheitsanforderungen
frei von Fluoreszenzlöschende Verunreinigungen:
zB Schweratomen (z.B. Brom, Iod)

Entgasung (O_2 starker Fluoreszenzlöschler)

Temperatur

mit zunehmender Temperatur nimmt die Quantenausbeute ab
(externe Konversion)

Viskosität

mit zunehmender Viskosität nimmt die Quantenausbeute zu

18

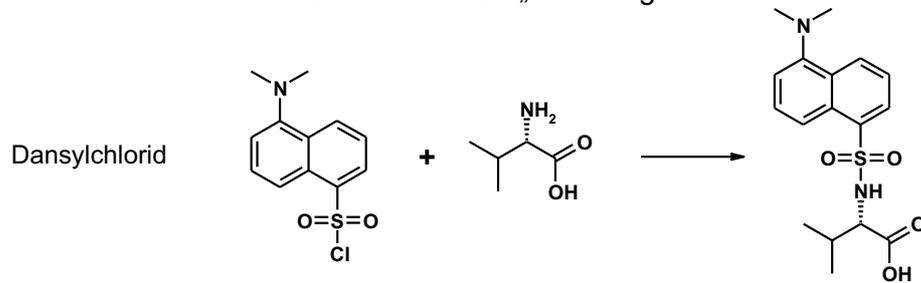
Fluorimetrie - Gehaltsbestimmungen 1: org. Verbindungen

„Direkte Methode“

Messung der **Eigenfluoreszenz** einer Substanz

„Chemische Methode“

Fluoreszenzmessung **nach Derivatisierung** mit fluoreszierendem bzw. „Hilfs“reagenz



Auswertung:

- Eichkurve
- Vergleichslösung: $\frac{C_x}{C_v} = \frac{I_x}{I_v}$

Fluorimetrische Gehaltbestimmungen:

- niedrige Bestimmungsgrenzen (ppb: 1 mg / kg)
- oft 100-1000 mal niedriger als UVVis
- hohe Selektivität weil Selektivität: nur wenige Verbindungen zeigen Eigenfluoreszenz;
- Bestimmungen in komplexer Matrix möglich

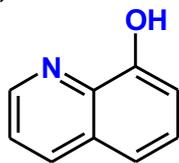
19

Fluorimetrie - Gehaltsbestimmungen 2: anorg. Kationen

Bestimmung von **Kationen** (Hauptgruppenelemente) nach Chelatbildung mit fluoreszierenden Liganden.

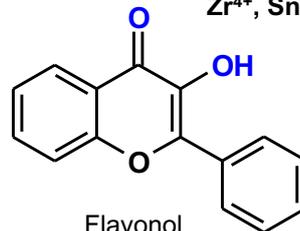
z. B.

Al^{3+} , Be^{2+}



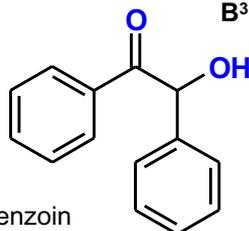
8-Hydroxychinolin

Zr^{4+} , Sn^{4+}



Flavonol

B^{3+} , Zn^{2+} , Ge^{4+} , Si^{4+}



Benzoin

Übergangsmetalle

Paramagnetische Eigenschaften → höhere Wahrscheinlichkeit f. ISC

Vielzahl dicht liegender Energieniveaus → höhere Wahrscheinlichkeit f. ISC

→ T_1

→ T_1

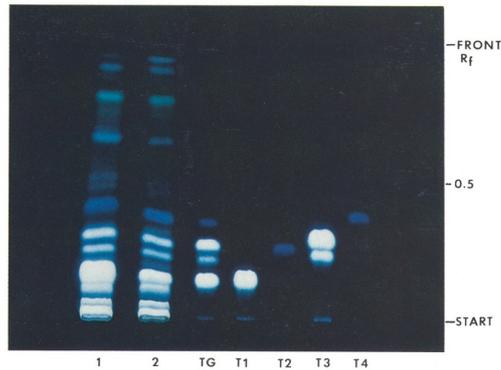
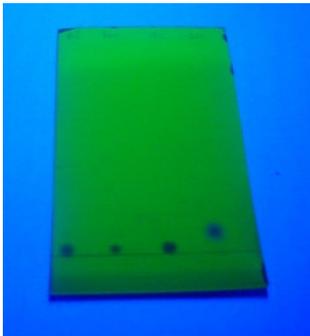
} **Fluoreszenz ↓**

20

Fluorimetrie im Ph. Eur. 5. Ausgabe

Identitätsprüfung

- Beobachtung der Eigenfluoreszenz
z.B. Chinidinsulfat, Chinin-Salze (H_2SO_4 -Zusatz), Ethacridinlactat)
- Chemische Reaktionen u.a. auf der DC, die zur Fluoreszenz führen
z.B. Hydrocortison (Reaktion mit H_2SO_4)
- **DC, Beobachtung von Eigenfluoreszenz (365 nm)_____**
bzw. Fluoreszenzlöschung (254 nm)_____



21

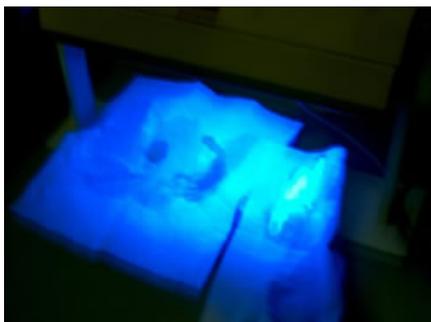
Fluorimetrie im Ph. Eur. 5. Ausgabe

Reinheitsprüfung

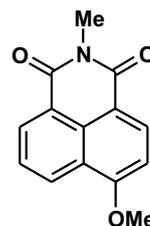
Nachweis von Verunreinigungen aufgrund ihrer Eigenfluoreszenz
z.B. Verbandmaterialien auf optische Aufheller

Verbandwatte aus Baumwolle

„**Fluoreszenz:** Die Verbandwatte wird in einer Schicht von etwa 5 mm Dicke im ultravioletten Licht bei 365 nm geprüft. Sie darf nur eine schwach-bräunlich violette Fluoreszenz und einige gelbe Partikel zeigen, darf jedoch, mit Ausnahme einzelner Fasern, nicht intensiv blau fluoreszieren“



z.B.



N-Methyl-4-methoxy-naphthalimid

22

12.8 Grundlagen der Fluorimetrie

12.8.1 Prinzip

Absorption von Strahlung (s. 12.7.1); Vorgänge bei Lumineszenz (Fluoreszenz, Phosphoreszenz; verzögerte Fluoreszenz); Beziehungen zwischen Struktur und Fluoreszenz, Fluorophore; Beziehungen zwischen Absorptions- und Fluoreszenzspektren; Einflüsse der Matrix, Fluoreszenzlöschung; Beziehung zwischen Intensität des Anregungslichtes, Konzentration, Quantenausbeute und Fluoreszenzintensität

12.8.2 Messmethodik und instrumentelle Anordnung

Prinzipieller Aufbau und Funktionsweise von Fluorimetern, Fluorimeter nach Arzneibuch; Anregungsquellen, Anregungs- und Emissionsmonochromator, Detektoren; Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

12.8.3 Pharmazeutische Anwendungen, insbesondere nach Arzneibuch

Gehaltsbestimmungen, Identitäts- und Reinheitsprüfungen, Fluoreszenzmarkierung

- Fluorimetrie *nach Arzneibuch*:
 Applikationslisten / Bestimmungsgrenzen
 – in Rücker am besten dargestellt

Jablonski-Termschema: Ein Gesamtes Wissenschaftliches Bild



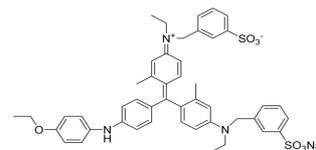
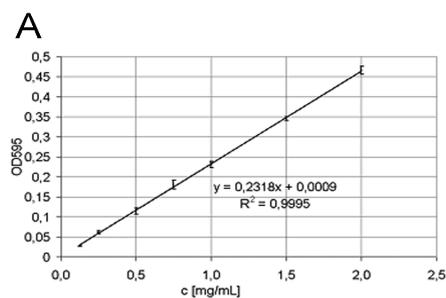
Zusammenfassung: Chromophore

Chromophor	Beispiel	Excitation	λ_{\max} [nm]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	Lösungs- mittel
<u>C=C</u>	Ethen	$\pi \rightarrow \pi^*$	171	15000	Hexan
<u>CC</u>	1-Hexin	$\pi \rightarrow \pi^*$	180	10000	Hexan
Aromat	Benzol	$\pi \rightarrow \pi^*$	254 198 184	230 8000 60000	
<u>C=O</u>	Ethanal	$n \rightarrow \pi^*$ $\pi \rightarrow \pi^*$	290 180	15 10000	Hexan
„ <u>N=O</u> “ [falsch]	Nitro- methane	$n \rightarrow \pi^*$ $\pi \rightarrow \pi^*$	275 200	17 5000	Ethanol
<u>I-CH₃</u>	Methyl- iodid	$n \rightarrow \sigma^*$	255	360	Hexan

25

Praktische Anwendung 1: Quantifizierung von Proteinen nach Bradford

- Coomassie Blau
 - verändert bei Komplexierung durch Protein sein Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm
 - Quantifizierung von Proteinen mit Eichgerade
 - Anfärben in Elektrophoresegelelen

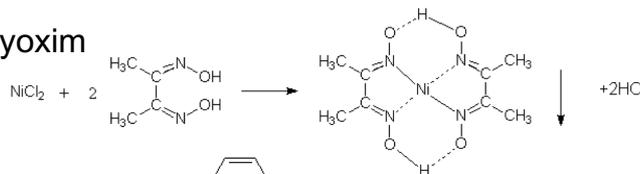


26

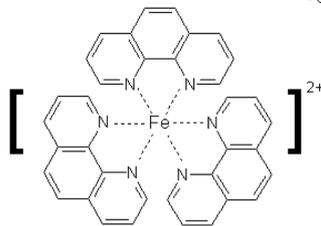
Übergangsmetalle als Chromophore

- Einbeziehung der d-Orbitale in koordinative Bindungen führt zu deren Aufspaltung nach der *Ligandenfeldtheorie*
- Elektronenübergänge innerhalb der d-Orbitale hängen stark von der Koordinationschemie des Metalls ab
- Ursprung der Farbe von Schwermetalsalzen (Ni, Cu, ...)
- Häufiger Gebrauch in spektroskopischen *Nachweisreaktionen durch Komplexbildung*

- Ni²⁺ - Dimethylglyoxim



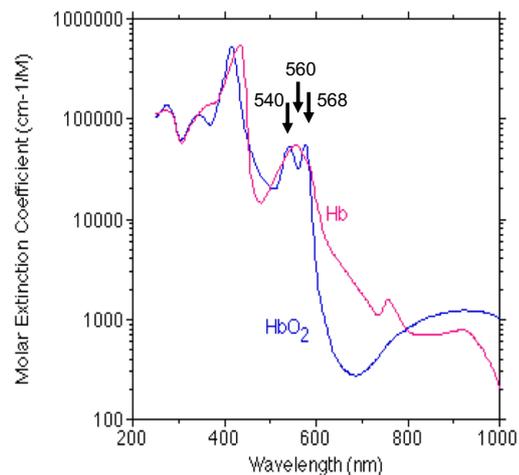
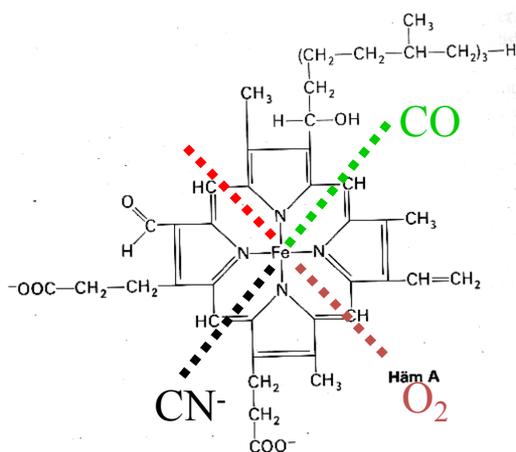
- Fe²⁺ - Phenanthrolin



Tri-1,10-phenanthrolin-eisen(II)-Ion (rot)

27

Praktische Anwendung 2: Häm



Ohne koordinierten Liganden: met-Hb

Normale Funktion: Koordination von Sauerstoff HbO₂

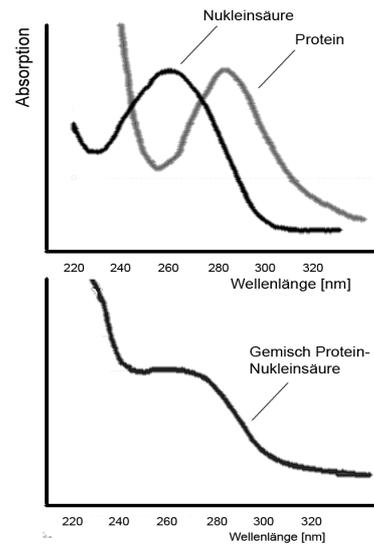
Vergiftung durch Kohlenmonoxid oder Cyanid

kann spektroskopisch nachgewiesen werden

28

Mehrkomponentenanalyse 1

- Absorption im Gemisch der Stoffe 1 und 2 :
 $A_{\text{gesamt}, \lambda_1} = \varepsilon_{\lambda_1}^1 \cdot c^1 \cdot d + \varepsilon_{\lambda_1}^2 \cdot c^2 \cdot d$ bei Wellenlänge λ_1
 $A_{\text{gesamt}, \lambda_2} = \varepsilon_{\lambda_2}^1 \cdot c^1 \cdot d + \varepsilon_{\lambda_2}^2 \cdot c^2 \cdot d$ bei Wellenlänge λ_2
- Zwei Messwerte ($A_{\lambda_1}, A_{\lambda_2}$)
- Zwei Gleichungen
- > zwei Unbekannte (c^1, c^2) können ermittelt werden

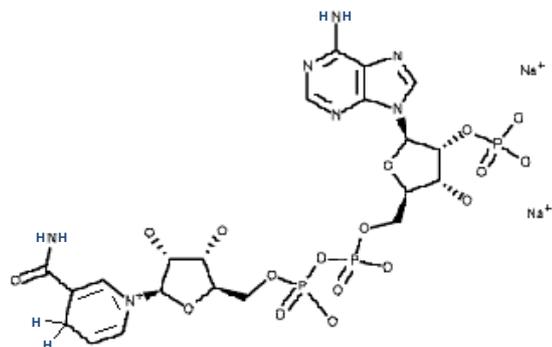
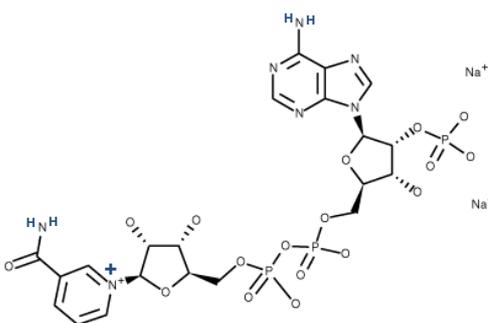
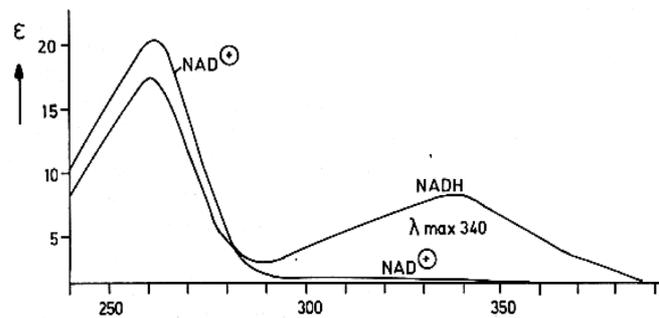


Praktische Anwendung: Proteine und Nukleinsäuren im Gemisch

29

Praktische Anwendung 3: NAD⁺ / NADH

- „Optischer“ / „UV“ - Test
- NADH Maximum bei 340 nm, NAD⁺ nicht



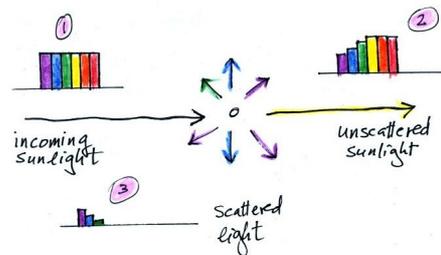
30

BONUSFOLIEN

31

Erweiterung: Wechselwirkungen Licht/Materie

- Streuung (**Scattering**)
 - Umlenkung von Licht durch dessen Wechselwirkung mit Materie. Streuung kann mit und ohne Energietransfer stattfinden, d.h. die Streustrahlung kann, (muss aber nicht) eine leicht veränderte Wellenlänge gegenüber der ursprünglichen Strahlung haben.



am Sonnenauf/
untergang
rote Himmel

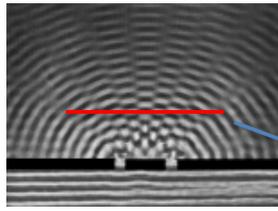
am Mittag/
blaue Himmel

ray model		<i>Advantage:</i> Simplicity.
wave model		<i>Advantage:</i> Color is described naturally in terms of wavelength. <i>Required</i> in order to explain the interaction of light with material objects with sizes comparable to a wavelength of light or smaller.
particle model		<i>Required</i> in order to explain the interaction of light with individual atoms. At the atomic level, it becomes apparent that a beam of light has a certain graininess to it.

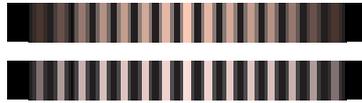
32

Optische Phänomene

Diffraction im Gitter



(a) Double-slit diffraction.



(d) A double-slit diffraction pattern (top), and a triple-slit pattern (bottom).

Spiegeln: „Metallische“..... & „normale oberflächige“



33

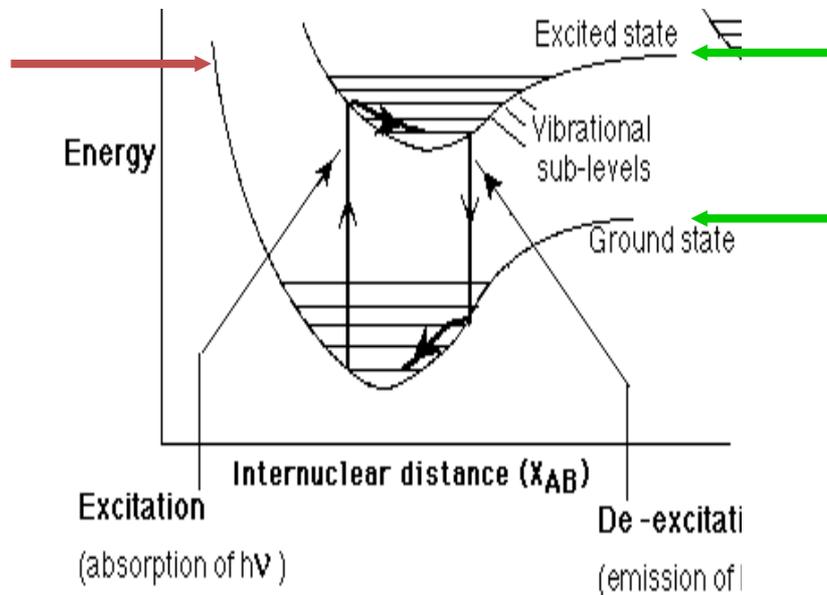
Was ist „UV“

UV – Spektrum	Wellenlänge [nm]	Eigenschaften
UV-A	„315“ – 400	Langwellig ist auch im Sonnenlicht enthalten. Sie bewirkt photochemische Prozesse und nur leicht pigmentierende Wirkung (Sonnenbrand)
UV-B	280 – „315“	Mittelwellig zeigt stärker pigmentierende Wirkung. Diese Strahlung wird sehr häufig für therapeutische Zwecke angewendet. UV-B bildet im Menschen das Provitamin D.
UV-C	100 – 280	kurzwellig hat stark keimtötende Wirkung. Sie verursacht Hautrötungen. UV-C Strahlung wird z.B. durch Hg-Niederdruckstrahler erzeugt. Erst unter 200nm Wellenlänge entsteht Ozon.

34

Formänderung bei excitation?

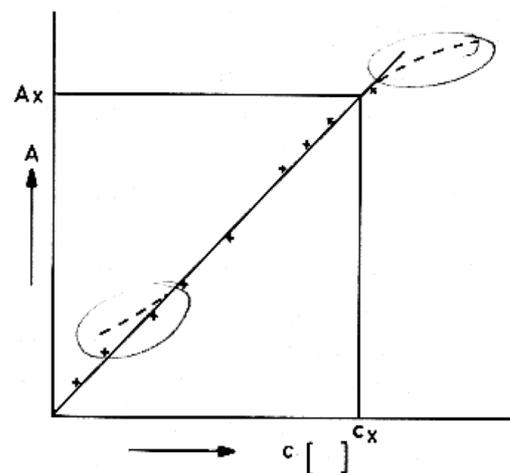
- Nach dem *Franck-Condon* Prinzip ändert das Molekül **nur sehr langsam** die Positionen seine Atomkernen (“schwer”) nach ein elektronische Anregung; die Elektronwolken wird aber **immediat** neu geteilt (“leicht” = schneller Bewegung).



35

Wdh: Eichkurve

- Standardlösungen bekannter Konzentration werden vermessen
- Die Absorptionsmessung einer Probe erlaubt Konzentrationsbestimmung durch Ablesen in der Grafik oder durch lineare Regression
- Wird eingesetzt wenn
 - Extinktionskoeffizienten
 - Nicht bekannt sind
 - Durch Lösungsmittel u.ä, gestört sind
 - Der optische Weg
 - Nicht bekannt ist (Küvettedicke)
 - Allgemein wenn hohe Präzision benötigt wird
- Konzentration \propto Absorption (wenn und wo Lambert-Beer gilt)



36

Wdh: Standardadditionsverfahren

- Standardlösungen bekannter Konzentration werden zur Probe gegeben
- Es entsteht eine verschobene Eichkurve deren Abszisse der ursprünglichen Konzentration in der Probe entspricht

