

## Aufnahme eines Fluoreszenzspektrums mit einem Spektrometer

### Versuchsziele

- Den Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein untersuchen.
- Das Prinzip der Fluoreszenz begreifen.
- Die Stokes-Verschiebung kennenlernen.
- Den Zusammenhang zwischen Wellenlänge und Energie erkennen.
- Die Wechselwirkung von Photonen mit absorbierenden Substanzen verstehen.

### Grundlagen

Fluoreszenz beschreibt das Phänomen, dass bestimmte Farbstoffe, sogenannte Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluorophore zeigen. Werden sie mit Licht bestrahlt, so leuchten sie intensiv mit. Sie absorbieren also nicht nur Licht, um in einer charakteristischen Farbe zu erscheinen, sondern emittieren zusätzlich Licht einer bestimmten Wellenlänge.

Bei der Bestrahlung mit Licht nehmen bestimmte Elektronen des Fluorophors die Energie aus den Photonen auf. Dabei nehmen sie nur Photonen bestimmter Wellenlängen auf. Die Elektronen gelangen so in einen angeregten Zustand. Das angeregte Molekül kann dieses Energieniveau jedoch nicht halten und gibt die aufgenommene Energie rasch (innerhalb von ca.  $10^{-6}$  Sekunden) wieder ab. Diese Energieabgabe wird auch Dissipation genannt.

Die Dissipation kann dabei strahlend oder nichtstrahlend erfolgen. Bei der Energieabgabe über einen nichtstrahlenden Übergang wird ein Teil der überflüssigen Energie im Molekül durch Schwingungs-Relaxation an andere Bindungen im Molekül abgegeben. So erniedrigt sich das angeregte Energieniveau.

Bei der zweiten Möglichkeit erfolgt die Energieabgabe über einen strahlenden Übergang. Dabei gibt das Molekül durch die Aussendung von Photonen die restliche Energie ab und gelangt so in den Grundzustand. Diese Abgabe von Photonen wird Emission genannt.

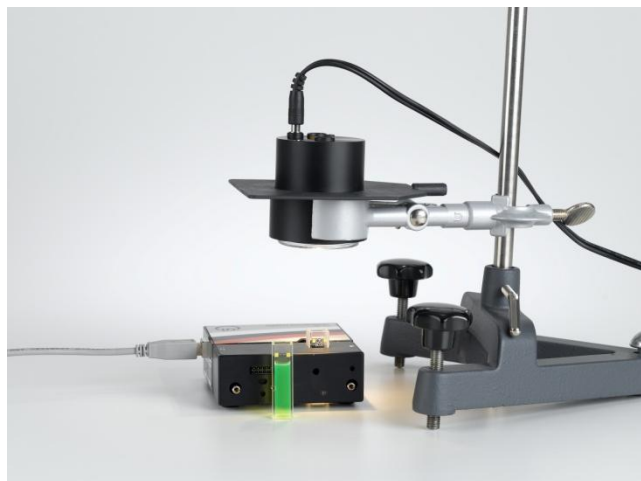


Abb. 1: Versuchsausrüstung zur Aufnahme von Fluoreszenzspektrums mit einem Kompaktspektrometer.



Bei der Fluoreszenz wird die Energie immer strahlend und nichtstrahlend abgegeben. Daher enthält das emittierte Photon eine geringere Energie als das vorher absorbierte. Fluorophore können nur Licht von ganz bestimmten Wellenlängen (Energien) aufnehmen und strahlen daher auch nur Photonen von definierten Wellenlängen (Energien) ab. Die Energiedifferenz zwischen Absorption und Emission wird als Stokes-Differenz bezeichnet. Diese Energiedifferenz äußert sich auch in einer Verschiebung der Wellenlänge hin zu längerwelligerem Licht. Diese Verschiebung der Wellenlänge zwischen Absorption und Emission wird Stokes-Verschiebung genannt.

In diesem Versuch wird die Fluoreszenz am Beispiel von Fluorescein untersucht. Dafür werden Transmissions- und Absorptionsspektren aufgenommen. Die Ergebnisse werden mit einem nicht fluoreszierenden Farbstoff verglichen.

### Gefährdungsbeurteilung

Fluorescein sollte nicht in die Augen gelangen.

Das Lösungsmittel Ethanol ist leicht entzündlich und sollte daher nicht in die Nähe von heißen Oberflächen oder offenen Flammen gestellt werden.

<b>Fluorescein</b>	
 <b>Signalwort:</b> Achtung	<b>Gefahrenhinweise</b> H319: Verursacht schwere Augenreizung.  <b>Sicherheitshinweise</b> P305+P351+P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
<b>Ethanol</b>	
 <b>Signalwort:</b> Gefahr	<b>Gefahrenhinweise</b> H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.  <b>Sicherheitshinweise</b> P210 Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.

### Geräte und Chemikalien

1	Kompakt-Spektrometer USB, komplett	467 252
2	Rechteckküvette opt. Glas, 10 x 10 mm	664 470
1	Halogenstrahler 12 V/20 W	458 100
1	Steckernetzgerät (Netzteil) 12 V AC	562 791
1	Stativfuß V-förmig, klein	300 02
1	Stativstange 25 cm, 10 mm Ø	301 26
1	Muffe mit Klemme	301 11
1	Mikro-Doppelspatel Stahl, 150 mm	604 5672
2	Becherglas, Boro 3.3, 100 ml, nF	602 022
2	Becherglas, Boro 3.3, 250 ml, nF	664 130
1	Messzylinder 100 ml, Kunststofffuß	665 754
1	Messpipette 5 ml	665 996
1	Pipettierball (Peleusball)	666 003
3	Tropfpipetten aus Satz 10	665 953
3	Pipettenhütchen aus Satz 10	665 954
1	Färbemittel, rot, 10 g	309 42
1	Fluorescein, 25 g	672 0110
1	Ethanol, Lösungsmittel, 250 ml	671 9740
1	Wasser, rein	675 3400

zusätzlich erforderlich:

Computer mit Windows XP, Vista, 7 oder 8

### Versuchsaufbau und -vorbereitung

#### Ansetzen der Lösungen

**Ansetzen einer Fluoresceinlösung:** 45 ml Wasser und 5 ml Ethanol mit Messzylinder bzw. Messpipette abmessen und in einem Becherglas (100 ml) mischen. Den Spatel in das Fluorescein-Pulver tauchen und das Fluorescein, das am Spatel haften geblieben ist, in der Wasser-Ethanolmischung lösen. Die Lösung gut rühren, bis sich der Farbstoff gelöst hat.

**Hinweis:** Die Lösung sollte 30 min vor der Messung angesetzt werden, da der Farbstoff Zeit benötigt, um sich vollständig zu lösen. Das Ethanol verbessert dabei die Löslichkeit von Fluorescein in Wasser.

**Ansetzen einer roten Farbstofflösung:** Eine kleine Spatelspitze des Färbemittels (rot, ungiftig) wird für eine rote Lösung in ein Becherglas (250 ml) gegeben und mit 100 ml Wasser (Messzylinder verwenden) aufgefüllt. Die Lösung wird gut gerührt, bis sich der Farbstoff vollständig gelöst hat. Anschließend werden 10 ml Lösung abgenommen und mit 90 ml Wasser im zweiten Becherglas (250 ml) verdünnt. So werden 100 ml einer Farbstofflösung erhalten.

**Ansetzen der Referenzlösung:** In ein 100 ml Becherglas werden zu 45 ml Wasser mit Hilfe einer Messpipette 5 ml Ethanol gegeben. Die Lösung wird kurz geschwenkt und kann direkt zur Messung des Referenzspektrums verwendet werden.

#### Aufbau der Apparatur

Aus Kompakt-Spektrometer mit Küvettenhalter, Lampe mit Netzwerkstecker und einem Stativ mit Muffe und Klemme wird eine Apparatur zur Aufnahme von Spektren von Fluoreszenzfarbstoffen mit der Software SpectraLab aufgebaut (siehe Abb. 1).

**Hinweis:** Beim Aufbau sollte darauf geachtet werden, dass die Lampe so über dem Küvettenhalter platziert wird, dass die Küvette gut von oben beleuchtet wird. Nur so kann im Transmissionsspektrum die Fluoreszenz gut aufgenommen werden.

### Versuchsdurchführung

1. Das Netzkabel einstecken und die Software SpectraLab starten. Darauf achten, dass die Lampe ausgeschaltet ist.

2. Nun wird die Integrationszeit mit  $\ominus$  und  $\oplus$  so angepasst, dass die maximale Intensität um 50% liegt.

**Hinweis:** Die gewählte Integrationszeit sollte während des Versuchs nicht geändert werden, um eine Vergleichbarkeit der Messwerte zu gewährleisten.

3. Die Darstellung Offset I0 wird bei diesem Versuch nicht geöffnet.

**Hinweis:** Die Darstellung Offset I0 wird nicht geöffnet, da ansonsten einige Werte im Referenzspektrum auf 0 sinken. Dann ist die Berechnung der Transmission dieser Werte nicht mehr möglich, da durch 0 geteilt werden müsste.

4. Eine Küvette mit der Referenzlösung füllen (Tropfpipette verwenden). In die Darstellung Referenz I2 wechseln und die Referenzküvette in den Küvettenhalter des Kompakt-Spektrometers stellen. Das Spektrum mit „Pause“ anhalten. Dieses Spektrum wird nun als Referenzspektrum verwendet.

**Hinweis:** Diese Darstellung sollte während der gesamten Messung nicht mehr geöffnet werden, da es beim erneuten Anhalten der Messung überschrieben wird.

5. Zur Darstellung Transmission T wechseln. Die Transmission sollte nun überall bei 100 % liegen.

6. Eine Küvette mit einer Pipette mit der Fluoresceinlösung füllen. Anschließend die Küvette mit der Fluoresceinlösung im Küvettenhalter platzieren.

7. Unterschiede zur Transmission der Referenzlösung notieren.

8. In die Darstellung Extinktion E wechseln. Hier wird die Extinktion (optische Dichte) berechnet und angezeigt.

**Hinweis:** Die Lösungen sollten nicht zu kräftig sein, da die Extinktion über einem Wert von 2 nicht hinreichend dargestellt werden.

9. Die Messung einzeln für Fluorescein unter „Datei speichern“ speichern. Es gibt auch die Möglichkeit mehrere Messungen mit „Anhalten“ in einer Datei abzuspeichern. Auf die gleiche Weise die rote Farbstofflösung messen und speichern.

### Beobachtung

Es wird zunächst das Referenzspektrum von Wasser mit Ethanol dargestellt. Anschließend werden die Transmissions- und Extinktionsspektren vom Fluorescein und Farbstoff rot betrachtet und erläutert.

#### Die Spektren von Wasser mit Ethanol

Für das Referenzspektrum wurde eine Mischung aus Wasser und Ethanol hergestellt. Das Referenzspektrum entspricht in etwa dem Spektrum der verwendeten Lampe.

Für die Transmissionsspektren wird in SpectraLab Transmission  $T$  [%] berechnet und gegen die Wellenlänge  $\lambda$  aufgetragen. Das Transmissionsspektrum der Referenzlösung zeigt überall 100 % an (siehe Abb. 2). Hierbei handelt es sich um die maximale Lichtmenge, die die Lampe bei dieser Wellenlänge abstrahlt.

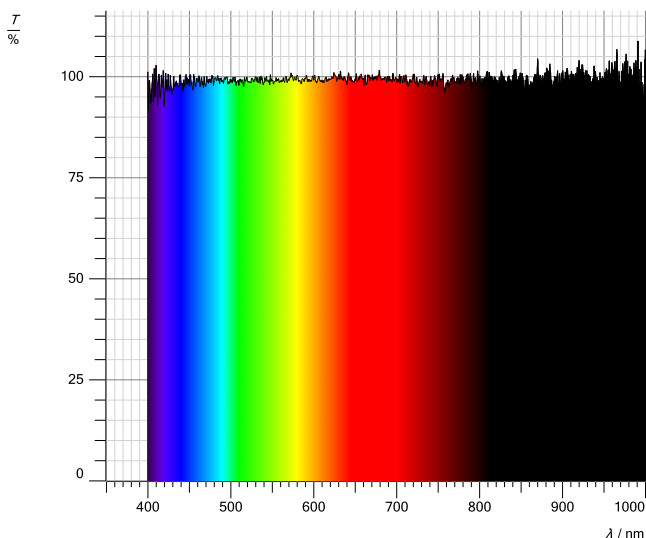


Abb. 2: Transmissionsspektrum der Referenzlösung.

### Die Spektren der Fluoresceinlösung

Das Transmissionsspektrum der Fluoresceinlösung enthält ein Maximum und ein Minimum. Das Transmissionsminimum liegt bei ca. 480 nm. Zusätzlich ist ein Transmissionsmaximum von über 100 % bei ca. 520 nm zu erkennen. Dabei handelt es sich um die Fluoreszenz (siehe Abb. 3).

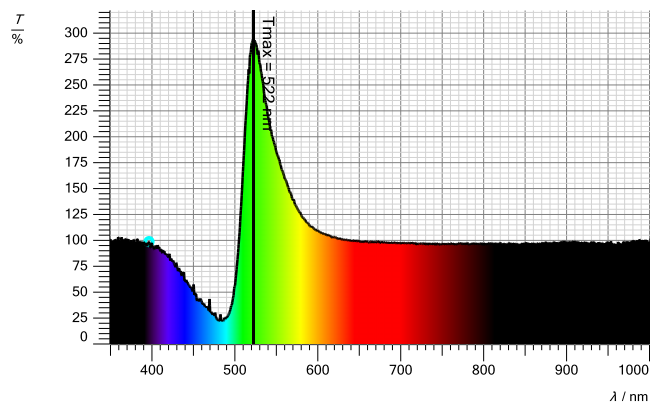


Abb. 3: Transmissionsspektrum einer Fluoresceinlösung.

Im Extinktionsspektrum von Fluorescein ist ein Maximum bei ca. 480 nm zu erkennen (siehe Abb. 4). Dies entspricht dem Minimum im Transmissionsspektrum. Die Lösung erscheint orange-gelb, leuchtet aber an den Kanten grün.

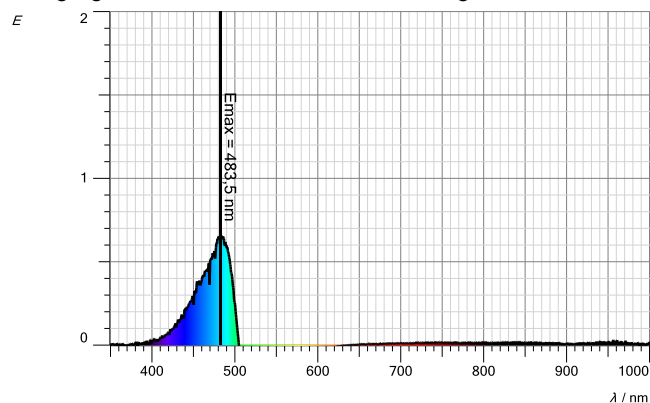


Abb. 4: Extinktionsspektrum einer Fluoresceinlösung.

### Die Spektren der roten Farbstofflösung

Das Transmissionsspektrum der roten Farbstofflösung zeigt kein Maximum, sondern nur ein Minimum bei ca. 500 nm –

600 nm (siehe Abb. 5). Im Extinktionsspektrum liegt das Maximum der Extinktion im gleichen Bereich. Die Lösung erscheint rot.

Befindet sich eine rote Farbstofflösung in der Küvette, so ist im Transmissionsspektrum 100 % Transmission der Wellenlängen 600 – 1000 nm also im Bereich von gelb bis rotem Licht sichtbar. Im Bereich von 500 – 350 nm steigt die Transmission kontinuierlich zu 100% an. Bei 600 nm – 400 nm hingegen wird vor allem die Wellenlänge des grünen Lichts absorbiert (siehe Abb. 3).

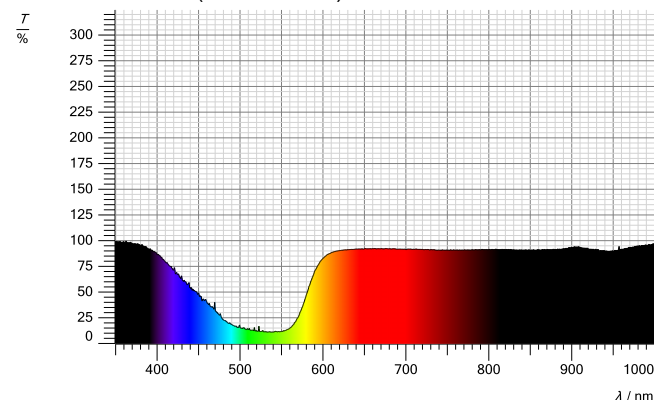


Abb. 5: Transmissionsspektrum einer roten Farbstofflösung.

Wird das Extinktionsspektrum einer roten Farbstofflösung betrachtet, so ist zu erkennen dass die Extinktion im Bereich von 400 nm – 600 nm liegt. Die dazugehörigen Farben des Lichts sind blau bis gelb. Das Extinktionsmaximum liegt bei 538 nm und entspricht grünem Licht. Da grün die Komplementärfarbe von rot ist, erscheint die Lösung rot (siehe Abb. 6).

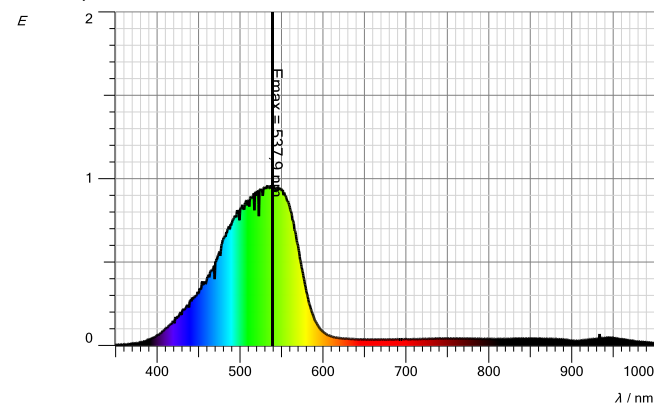


Abb. 6: Extinktionsspektrum einer roten Farbstofflösung.

### Auswertung

Die Transmissionsspektren von Fluorescein und dem roten Farbstoff unterscheiden sich deutlich. Beide enthalten ein Transmissionsminimum bei Wellenlängen in der Komplementärfarbe zu der Farbe der Lösungen. Beide Farbstoffe können also Lichtenergie aus dem Spektrum absorbieren (aufnehmen).

Das Spektrum von Fluorescein enthält jedoch zusätzlich ein Maximum von fast 300 %. Bei diesen Wellenlängen wird also mehr Licht detektiert, als zuvor von der Lampe abgestrahlt wurde. Diese zusätzliche Lichtmenge entsteht durch die Fluoreszenz. Fluorescein ist also in der Lage, die aufgenommene Lichtenergie nicht nur über strahlungslose, sondern auch über strahlende Übergänge wieder abzugeben. Es strahlt die Energie als Licht einer Wellenlänge von ca. 520 nm ab.

In den Extinktionsspektren kann das Extinktionsmaximum der Farbstoffe bestimmt werden. Es liegt für Fluorescein bei ca. 484 nm. Fluorescein absorbiert also Licht der Wellenlänge von ca. 484 nm und emittiert Licht bei ca. 520 nm, das dann weniger Energie enthält. Dieser Wellenlängenunterschied wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet. Bei Fluorescein beträgt sie damit ca. 40 nm.

absorbiertes Licht		transmittiertes Licht
Wellenlänge	Farbe	beobachtete Farbe
730 nm	purpur	grün
640 nm	rot	blaugrün
590 nm	orange	blau
550 nm	gelb	violett-blau
530 nm	gelbgrün	violett
510 nm	grün	purpur
490 nm	blaugrün	rot
450 nm	blau	orange
425 nm	violett-blau	gelb
400 nm	violett	gelbgrün

Tab. 1: Zuordnung des absorbierten Lichts zum transmittierten Licht.

Der Farbeindruck der Fluoresceinlösung setzt sich damit aus zwei Effekten zusammen. Zunächst wird Licht der Wellenlängen um 480 nm absorbiert. Damit ergibt sich nach Tabelle 1 ein orange-roter Farbeindruck. Zusätzlich wird jedoch gelbes Licht emittiert, so dass die Lösung deutlich gelber erscheint.

### Ergebnis

Der Vergleich des roten Farbstoffes mit Fluorescein zeigt die besonderen Eigenschaften von Fluorescein. Fluorescein ist ein Fluorophor. Es kann nicht nur Licht absorbieren, sondern emittiert es bei einer längeren Wellenlänge wieder. Die dadurch entstehende Stokes-Verschiebung beträgt bei Fluorescein ca. 40 nm.

### Reinigung und Entsorgung

Die rote Farbstofflösung kann in den Abguss geschüttet werden. Die Fluoresceinlösung wird in einen Kanister für flüssige organische Abfälle ohne Halogene gegeben.