

Bestimmung partieller photochemischer Quantenausbeuten über kombinierte Absorptions- und Fluoreszenzmessung

R. Frank und G. Gauglitz

Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Universität Tübingen

Z. Naturforsch. 36a, 57–61 (1981); eingegangen am 30. September 1980

On the Determination of Partial Photochemical Quantum Yields by Combined Absorbance and Fluorescence Measurement

A combined automatic set up for the measurement of fluorescence and absorbance is described. The absorbance at irradiation wavelength E' and a fluorescence reaction spectrum are measured continuously and simultaneously. Even for solutions with high concentrations up to $E' > 1$, the fluorescence intensity can be corrected for. By this method the photodegradation of fluorescent dyes was examined. Because only a few of the degradation products fluoresce, the determination of kinetic parameters is easier than from absorbance measurements. The method gave good results for laser dyes using even high concentrations ($E' > 1$), with less calculatory expenditure and smaller standard deviation in comparison to the evaluation of absorbance measurements only.

Einleitung

Bei komplizierten thermischen bzw. photochemischen Reaktionen ist es häufig schwierig, die einzelnen Teilreaktionen zu erkennen und ihre kinetischen Konstanten zu bestimmen. Da selten alle Reaktionspartner fluoreszieren, erweitert die Aufnahme und Auswertung eines Fluoreszenzreaktionsspektrums [1] die Möglichkeiten, den Reaktionsverlauf kinetisch zu untersuchen. Allerdings sollten folgende Voraussetzungen erfüllt sein: (a) das Signal-Rausch-Verhältnis muß vergleichbar mit Absorptionsmessungen sein, (b) die Fluoreszenzanregungslampe darf innerhalb der Registrierzeit des Spektrums keine merkliche Photoreaktion verursachen, und (c) während des gesamten Reaktionsverlaufes müssen die Anteile der gemessenen Fluoreszenzintensität direkt proportional zu den Konzentrationen der jeweiligen Reaktionspartner sein.

Sind die Fluoreszenzquantenausbeuten der Reaktionspartner klein und die Reaktionsprodukte instabil, so können die ersten beiden Voraussetzungen nur dadurch erfüllt werden, daß nicht mehr in hoch verdünnten Lösungen gemessen wird. Für die Extinktion bei der Bestrahlungswellenlänge λ' gilt dann $E' \gg 0,02$. In diesem Fall können Störungen durch Fluoreszenzlösung und durch Änderung der Abbildung des Fluoreszenzlichtes auf dem Detektor auftreten, weil E' von der Zeit abhängt.

Reprint requests to Dr. G. Gauglitz, Auf der Morgenstelle 8, D-7400 Tübingen.

Diese Änderungen von $E'(t)$ können sowohl durch den fluoreszierenden Stoff selbst als auch durch nicht fluoreszierende Stoffe, die an der Reaktion beteiligt sind, verursacht werden. Darüber hinaus hängt die Fluoreszenzintensität nicht mehr linear von der Konzentration ab. Dies ist nur für $E' \leq 0,02$ mit einem Fehler kleiner als 2% näherungsweise erfüllt [2–4].

Sind die Intensitätsdiagramme [3] linear bzw. zeigen diese graphischen Darstellungen auch bei der Kombination von weit auseinander liegenden Wellenlängen lineare Bereiche, so kann Reabsorption ausgeschlossen werden. In diesem Fall kann durch Eichung der Meßanlage über die Messung von E' und der Fluoreszenzintensität I_α^F bei mehreren Beobachtungswellenlängen α ein Korrekturfaktor ermittelt werden, so daß über I_α^F die Konzentration des fluoreszierenden Stoffes bestimmt werden kann. Solche Korrekturfaktoren sind von verschiedenen Autoren für analytische Zwecke ermittelt worden [5–7].

Die Photoreaktionen von Umbelliferon sind bei verschiedenen Reaktionsbedingungen kompliziert [8, 9], und die gebogenen Extinktionsdiagramme weisen auf mehrere linear unabhängige Reaktionsschritte hin [9]. So wurden auch verschiedene Reaktionsmechanismen vorgeschlagen [8–10], aber bisher nur einige Reaktionskonstanten bzw. partielle photochemische Quantenausbeuten bestimmt [9]. Da Umbelliferon als Laserfarbstoff [11] gut fluoresziert, wurde eine kombinierte Absorptions- und Fluoreszenzintensitäts-Meßanlage mit Hilfe dieser

0340-4811 / 81 / 0100-0057 \$ 01.00/0. — Please order a reprint rather than making your own copy.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Photoreaktion getestet. Es wurden der Korrekturfaktor bestimmt, über kinetische Fluoreszenzintensitätsmessungen verschiedene Reaktionskonstanten ermittelt und mit denjenigen verglichen, die über die formale Integration [12] aus reinen Absorptionsmessungen erhalten werden konnten [9].

Meßapparatur und Bestimmung des Korrekturfaktors

In der in [1] beschriebenen Anlage zur automatischen Registrierung von Fluoreszenzspektren wird anstelle des kommerziellen Küvettengehäuses eine selbstkonstruierte Einrichtung mit drei Meßpositionen gesetzt (Abbildung 1). Das Licht eines St 41-Hg-Hochdruckbrenners, das gleichzeitig die Fluoreszenzanregung und die Photoreaktion bewirkt, fällt entweder auf einen Fluoreszenzstandard ST, die gerührte Probe P oder eine Vergleichsküvette mit Lösungsmittel V. Um die Lichtintensität I_0 möglichst stabil zu halten, wird die Lampe über eine Heinzinger Gleichspannungsnetzversorgung auf eine Drift von weniger als 1%/h stabilisiert. Durch Rückkopplung einer Photodiode (auf die ca. 5% der Lichtintensität ausgespiegelt werden) mit der Netzstabilisierung, können die Kurzzeitsschwankungen, bedingt durch Plasmasprünge, ebenfalls besser als 1% gehalten werden. Durch den Uranylglassstandard ST können für jede Anregungswellenlänge reproduzierbare Werte für die Parameter Spaltbreite von M1, Meßsignalverstärkung am DMR 21 und maximale Fluoreszenzintensität bei

535 nm eingestellt werden. Daher werden trotz des Einstrahlverfahrens die für verschiedene Versuche erhaltenen Meßwerte vergleichbar.

Während der Messung steht die Probe P im gekreuzten Strahlengang, und nur in größeren zeitlichen Abständen wird mit dem Vergleich V der 100%-Wert für die Extinktionsmessung nachgeeicht. Neben der Aufnahme der spektralen Verteilung der Fluoreszenz zu ausgewählten Bestrahlungszeiten wird über den zweiten Monochromator M2 bei der Bestrahlungswellenlänge kontinuierlich E' auf einem Schreiber aufgezeichnet, der an die PMQ II-Verstärkerinheit angeschlossen ist. Wie in [1] beschrieben ist, können neben dem Intensitätsspektrum bei ausgewählten Beobachtungswellenlängen die Meßwerte zusammen mit der Bestrahlungszeit auf einen Datenträger ausgegeben werden. Liegt nur ein einziger fluoreszenzfähiger Stoff vor, so gilt für die beobachtete Fluoreszenzintensität [2, 13]

$$I_{\alpha}^F = \int_{l_1}^{l_2} I(E') \eta_A f_{\alpha A} I_A(z) dz, \quad (1)$$

wobei

$\Gamma(E')$ die Geometrie der Meßanordnung,
 η_A die Fluoreszenzquantenausbeute des Ausgangsproduktes,
 $f_{\alpha A}$ seine spektrale Verteilung bei der Beobachtungswellenlänge,
 l die seitliche Länge des Küvettenfensters und
 $l_2 - l_1$ die Länge des beobachteten Küvettenfenstersteiles sind.

Bei der gewählten Anordnung wird die Fensterbreite l der Küvette durch den Küvettenhalter technisch bedingt auf ca. 8 mm = $l_2 - l_1 < l =$ 10 mm eingeengt. Die Breite des Spaltes vor der Linse L im Emissionsstrahlengang beträgt allerdings 10 mm. Die absorbierte Lichtmenge (Einstein/Liter Sek) innerhalb eines unter 90° seitlich beobachteten Volumenelementes ist gegeben durch

$$I_A(z) = 1000 \varepsilon'_A a(t) \cdot I_0 \exp \left\{ - \int_{l_1}^{l_2} \sum \varepsilon_i a_i dz \right\} r(E'). \quad (2)$$

Dabei sind ε'_A der natürliche Extinktionskoeffizient bei λ' , a die Konzentration von A, ε'_i , a_i die entsprechenden Größen für die absorbierenden Stoffe und $r(E')$ der Reflexionsfaktor, der die Mehrfachreflexion berücksichtigt.

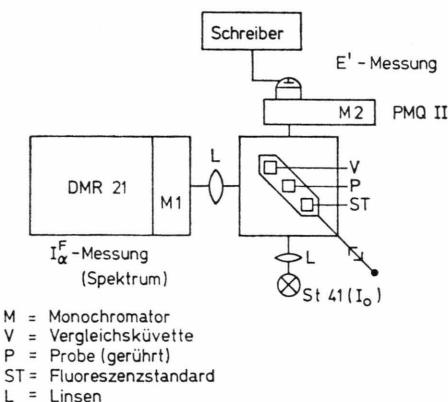


Abb. 1. Kombinierte Meß- und Bestrahlungsanordnung zur gleichzeitigen Erfassung von Fluoreszenzspektren und der Extinktion E' bei der Bestrahlungswellenlänge.

Wird durch Rühren die Lösung homogen, so gilt [2, 12, 13]

$$I_{\alpha}^F(t) = \Gamma(E') r(E') f_{\alpha A} \cdot \eta_A 1000 I_0 \varepsilon'_A a(t) K \quad (3)$$

oder

$$I_{\alpha \text{corr}}^F(t) = I_{\alpha}^F(t) K^{-1} = K_F a(t), \quad (4)$$

wobei

$$K = \frac{\exp\{-l_1 \sum \varepsilon'_i a_i\} - \exp\{-l_2 \sum \varepsilon'_i a_i\}}{\sum \varepsilon'_i a_i (l_2 - l_1)} \quad (5)$$

und

$$K_F = \Gamma(E') r(E') f_{\alpha A} \eta_A 1000 I_0 \varepsilon'_A \quad (6)$$

sind. Es wird vorausgesetzt, daß in einem Konzentrationsbereich gearbeitet wird, in dem $\Gamma(E')$ und $r(E')$ noch als konstant angenommen werden können. Abbildung 2 zeigt die gemessene und mit zwei verschiedenen Werten $l_2 - l_1$ korrigierte Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der durch E' gegebenen Konzentration. Wird die durch die Küvettenhalterung technisch bedingte Spaltbreite $l_2 - l_1 < 1$ angenommen, so ergibt sich bei der Auswertung nach Gl. (5) eine gekrümmte Kurve (Δ). Der Zusammenhang wird aber linear, wenn die eigentliche Spaltbreite l vor der Linse L eingesetzt wird und mit dem entsprechenden Korrekturfaktor

(5a)

$$K' = \frac{1 - \exp\{-l \sum \varepsilon_i a_i\}}{l \sum \varepsilon_i a_i} = \frac{1 - e^{-E'}}{E'} = [F(E')]^{-1}$$

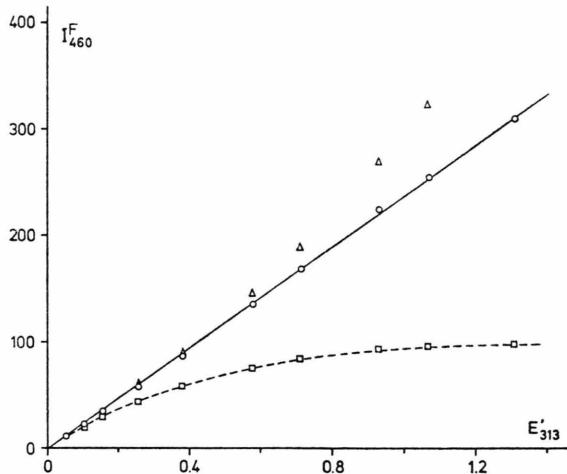


Abb. 2. Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität bei der Beobachtungswellenlänge 460 nm von der Konzentration des fluoreszierenden Stoffes. (□) gemessene Werte, (△) nach der Korrektur mit Gl. (5) und (○) mit Gleichung (5a).

gerechnet wird. In diesem Fall geht K in K' über, und K' entspricht dem reziproken photokinetischen Faktor. Wie Kurve (o) zeigt, hängt dann bei dieser Anordnung $I_{\alpha \text{corr}}^F$ bis zu Extinktionen $E' \approx 1,2$ linear von der Konzentration ab. Diese experimentell gefundene effektive Spaltbreite konnte durch Simulation der optischen Strahlengänge (Anregungs- und Emissionsseite) mit dem Tischrechner gestützt werden und ist durch den nicht parallelen Emissionsstrahlengang zu erklären. Um den entscheidenden Einfluß der Gesamtextinktion zu prüfen, wurden zu einer konstanten Menge Umbelliferon ($E' = 0,1$) steigende Mengen eines nur absorbierenden Stoffes (p-Hydroxybenzophenon) hinzugegeben. Die korrigierte Fluoreszenzintensität bleibt bis zur Gesamtextinktion $E' = 1,2$ konstant.

Kinetische Untersuchungen

Die Intensitätsdiagramme für die Photozersetzung von Umbelliferon in Wasser sind im Gegensatz zu den Extinktionsdiagrammen [9] linear, daher kann der vereinfachte Mechanismus $A^F \xrightarrow{h\nu} P$ angenommen werden. Für $E' \leq 0,02$ gilt [2, 12]

$$I_{\alpha}^F(t) = K_F a(t) \quad (7)$$

oder für größere Konzentrationen nach Gl. (4) als gemessenes $I_{\alpha}^F(t)$ für die benutzte Meßanordnung

$$I_{\alpha}^F(t) = K_F a(t) K'. \quad (7a)$$

Für den linearen Anfangsbereich des Extinktionsdiagrammes gilt

$$\dot{a} = -R a(t) [F(E')]^{-1}, \quad (8)$$

wobei

$$R = 1000 I_0 \varphi_1^A \varepsilon'_A \quad (9)$$

ist. Bei der Zersetzung von Laserfarbstoffen interessiert besonders dieser primäre photochemische Zersetzungsschritt mit seiner photochemischen Quantenausbeute φ_1^A .

Da sich zwar K_F experimentell als zeitlich konstant erweist (Abb. 2), aber $K' = [F(E')]^{-1}$ eine reaktionszeitabhängige Funktion ist, muß die Ableitung von (7a) entsprechend gebildet und in Gl. (8) eingesetzt werden

$$\dot{I}_{\alpha}^F(t) = K_F (\dot{a} K' + K' \dot{a}(t)). \quad (10)$$

Diese aufwendige Ableitung kann durch Einsetzen von

$$I_{\alpha\text{corr}}^F(t) = I_{\alpha}^F(t) K'^{-1} = K_F \alpha(t)$$

bzw. abgeleitet

$$\dot{I}_{\alpha\text{corr}}^F = K_F \dot{\alpha}$$

und in Gl. (8) eingesetzt:

$$\begin{aligned}\dot{I}_{\alpha\text{corr}}^F &= - R I_{\alpha\text{corr}}^F(t) [F(E')]^{-1} \\ &= - R I_{\alpha}^F(t).\end{aligned}$$

Durch formale Integration erhält man

$$\begin{aligned}I_{\alpha\text{corr}}^F(t) - I_{\alpha\text{corr}}^F(t=0) &= - 1000 \varphi_1^A I_0 \varepsilon_A \int_0^t I_{\alpha}^F dt.\end{aligned}\quad (12)$$

Ergebnisse

Gleichung (12) wurde für Umbelliferon bei ca. 50 Meßzeiten t numerisch ausgewertet. Abbildung 3 zeigt, daß $I_{\alpha\text{corr}}^F(t)$ linear von $\int_0^t I_{\alpha}^F dt$ abhängt.

Aus der Steigung kann die gesuchte partielle photochemische Quantenausbeute in wäßriger Lösung zu

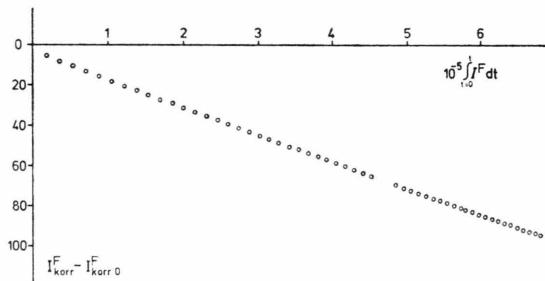


Abb. 3. Primärer Zersetzungsschritt von Umbelliferon. Die nach Gl. (7a) korrigierte Fluoreszenzintensität wird zu einzelnen absoluten Bestrahlungszeiten gegen das Integral über die gemessene Fluoreszenzintensität aufgetragen. Nach Gl. (12) erhält man aus der Steigung φ_1^A .

(4a) $\varphi_1^A = 2,0 \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$ bei Bestrahlung mit $\lambda' = 313 \text{ nm}$ ($p_H = 6,5$ und 298 K) ermittelt werden. Der Wert stimmt innerhalb der Fehlgrenzen mit dem aus Absorptionsmessungen mit wesentlich größerem rechnerischen Aufwand ermittelten Wert von $\varphi_1^A = 1,80 \pm 0,25 \cdot 10^{-3}$ überein [9].

Da nach diesem neuen Verfahren nicht die Differentialgleichung für den Gesamtmechanismus gelöst werden muß, sind (a) die Standardabweichungen der erhaltenen Eigenwerte der Differentialgleichung geringer, (b) muß nicht der richtige Eigenwert der Lösung dem ersten Reaktionsschritt zugeordnet werden [12], und (c) müssen nicht die Extinktionskoeffizienten der Photozersetzungprodukte bekannt sein. Die partiellen photochemischen Quantenausbeuten einiger Laserfarbstoffe sind in Tab. 1 für verschiedene Bestrahlungswellenlängen angegeben. Es zeigt sich bei Cumarin 1 eine starke Abhängigkeit der partiellen Quantenausbeute vom Sauerstoffgehalt der Lösung und von der Bestrahlungswellenlänge. Diese Ergebnisse stimmen mit den in l.c. [17] gemachten qualitativen Angaben und den beschriebenen zwei Reaktionswegen über eine Photooxidation der 4-Methylgruppe bzw. der Abspaltung der N-Äthylgruppen überein. In sauerstofffreier Lösung entfallen beide Reaktionswege bei langwelliger Bestrahlung. Der gefundene Wert entspricht der Grenze der Meßgenauigkeit der Anlage. Die Abhängigkeit dieser Ergebnisse von den Reaktionsbedingungen hat große Bedeutung für die Optimierung der Pumpbedingungen von Laserfarbstoffen, bei denen häufig nur die Ausgangsfarbstoffe fluoreszieren, der Photozersetzungsmechanismus nur wenig untersucht ist und daher die Extinktionskoeffizienten dieser Produkte unbekannt sind.

Farbstoff	Lösungs-mittel	Bestrahlungs-wellenlänge	Quanten-ausbeute
Umbelliferon	H ₂ O (O ₂)	313 nm	$2,0 \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$
	MeOH (O ₂)	313 nm	$1,7 \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$
Cumarin 1	MeOH (O ₂)	254 nm	$1,1 \pm 0,1 \cdot 10^{-4}$
		365 nm	$1,1 \pm 0,1 \cdot 10^{-4}$
Cumarin 2 [15]	MeOH (N ₂)	254 nm	$9,0 \pm 0,5 \cdot 10^{-3}$
		365 nm	$5,0 \pm 2,0 \cdot 10^{-6}$
Stilben-1 [14]	MeOH (O ₂)	365 nm	$1,4 \pm 0,1 \cdot 10^{-3}$
	MeOH (O ₂)	313 nm	$8,0 \pm 0,2 \cdot 10^{-2}$
Ethylen- glykol (N ₂)		365 nm	$1,1 \pm 0,05 \cdot 10^{-1}$
		365 nm	$2,2 \pm 0,1 \cdot 10^{-2}$
Stilben-3 [16]	MeOH (O ₂)	365 nm	$1,9 \pm 0,05 \cdot 10^{-2}$
		365 nm	$4,5 \pm 0,3 \cdot 10^{-3}$

Tab. 1. Photochemische Quantenausbeute des primären Zersetzungsschrittes für einige Laserfarbstoffe in sauerstofffreien (N₂) oder sauerstoffhaltigen (O₂) Lösungen

Dank

Wir danken Herrn Professor Dr. H. Mauser für wertvolle Anregungen, der Deutschen Forschungs-

gemeinschaft für finanzielle Unterstützung und Frau Dipl.-Chem. M. Sastrawan und Frau Dipl.-Chem. E. Scheerer für Messungen.

- [1] G. Gauglitz u. A. Reule, Z. Anal. Chem. **276**, 97 (1975).
- [2] C. A. Parker, Photoluminescence of Solutions. Elsevier, London 1968.
- [3] G. Gauglitz, Z. Phys. Chem. Frankfurt **88**, 193 (1974).
- [4] R. J. Lukasiewicz u. J. M. Fitzgerald, Anal. Chem. **45**, 511 (1973).
- [5] C. A. Parker, Nature London **182**, 1002 (1958).
- [6] S. Udenfriend, Fluorescence Assay in Biology and Medicine, Academic Press, New York 1969.
- [7] J. F. Holland, R. E. Teets u. A. Timnick, Anal. Chem. **45**, 1451 (1973).
- [8] D. W. Fink u. W. R. Köhler, Anal. Chem. **42**, 990 (1970).
- [9] R. Frank, Dissertation, Tübingen 1978.
- [10] C. E. Wheelock, J. Amer. Chem. Soc. **81**, 1348 (1959).
- [11] O. S. Wolfbeis, Z. Naturforsch. **32a**, 1065 (1977).
- [12] H. Mauser, Formale Kinetik, Bertelsmann Universitätsverlag, Düsseldorf 1974.
- [13] G. Gauglitz, Z. Phys. Chem. (Wiesbaden) **113**, 217 (1978).
- [14] E. Scheerer, Diplomarbeit, Tübingen 1980.
- [15] M. Sastrawan, Diplomarbeit, Tübingen 1980.
- [16] A. Lorch, Dissertation, Tübingen 1980.
- [17] B. H. Winters, H. I. Mandelberg u. W. B. Mohr, Appl. Phys. Lett. **25**, 723 (1974).