

Messung von Fluoreszenzabklingzeiten mit einem Fluorometer mit variablem Lichtweg

Von A. SCHARMANN

Aus dem Physikalischen Institut der Justus-Liebig-Hochschule, Gießen

(Z. Naturforsch. 11 a, 398—402 [1956]; eingegangen am 21. Februar 1956)

Herrn Prof. P. PRINGSHEIM zum 75. Geburtstag gewidmet

An mit Trypaflavin angefärbten Polyvinylalkoholfolien, Pseudoisocyanin und Anthracen-Polyestrol-Präparaten wurden Abklingzeit und in einigen Fällen der Polarisationsgrad der Fluoreszenz gemessen.

Die Trypaflavinfolien zeigen ein ähnliches Verhalten wie Trypaflavinlösungen.

Für Pseudoisocyanin wird eine neue obere Grenze für die Abklingzeit angegeben, die eine Zehnerpotenz unter der bisher gemessenen liegt.

Durch Messung der Abklingzeiten an Anthracen-Polystyrolpräparaten unter verschiedenen Bedingungen können Aussagen über den Einbau von Anthracen in Polystyrol gemacht werden. Diese Präparate zeigen denselben Dickeneffekt in bezug auf die Abklingzeit wie Anthracenkristalle.

Die Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften organischer Moleküle ist deshalb von Interesse, weil man mit ihrer Hilfe Aussagen über den Energieabsorptions- und -fortleitungsmechanismus machen kann. Neben Absorptions- und Emissionsspektrum, Quantenausbeute und Polarisationsgrad ist gerade die Abklingzeit der Fluoreszenz ein wichtiges Charakteristikum der angeregten Moleküle. Deshalb werden im folgenden einige organische Substanzen im Hinblick auf ihre Abklingzeit untersucht.

Die Meßanordnung

Zur Messung der Fluoreszenzabklingzeiten wurde ein Fluorometer mit variablem Lichtweg aufgebaut, wie es ähnlich schon von anderen Autoren früher benutzt wurde¹⁻³. Alle Fluorometer zur Bestimmung der Abklingzeit bei UV-Anregung haben folgendes gemeinsame Prinzip: Sie besitzen eine Vorrichtung zur Amplitudenmodulation des anregenden Lichtes, den Modulator, und eine Einrichtung zur Messung der Phasenverschiebung des Fluoreszenzlichtes gegen das anregende Licht, den Analysator. Das Prinzip der benutzten Anordnung zeigt Abb. 1. Die Lichtquelle beleuchtet über den Kondensor K den Spalt Sp₁. Das System Sp₁—L₁—Ultraschallwelle—L₂—Sp₂ ist der Modulator. Die stehende Schallwelle repräsentiert ein ν -mal in der Sekunde entstehendes und verschwindendes Gitter, wobei ν die doppelte Schallfrequenz ist. Der Spalt Sp₂ lässt nur Licht der nullten Ordnung des Beugungsbildes durch. Das anregende, mit der Frequenz ν amplitudenmodulierte Licht gelangt über den veränderlichen Lichtweg zu der zu untersuchenden Substanz bzw. zum Streukörper. Das Fluoreszenzlicht (bzw. das Streulicht)

wird dann über den Analysator Sp₃—L₇—Schallwelle—L₈—Sp₄ noch einmal derselben Modulation unterworfen. Modulator und Analysator wirken wie zwei synchrone Verschlüsse. Die von Spalt Sp₄ durchgelassene Lichtintensität ist eine periodische Funktion des Lichtweges zwischen Modulator und Analysator. Die Messung geschieht durch Aufnahme einer Kurve für Streulicht zur Festlegung des Nullpunktes und einer für das Fluoreszenzlicht. Aus der gegenseitigen Verschiebung der beiden Kurven kann man — exponentielles Abklingen der Fluoreszenz vorausgesetzt — die durch die Abklingzeit bedingte Phasenverschiebung φ und damit auch die Abklingzeit $\tau = \frac{1}{2 \pi \nu} \operatorname{tg} \varphi$ bestimmen⁴.

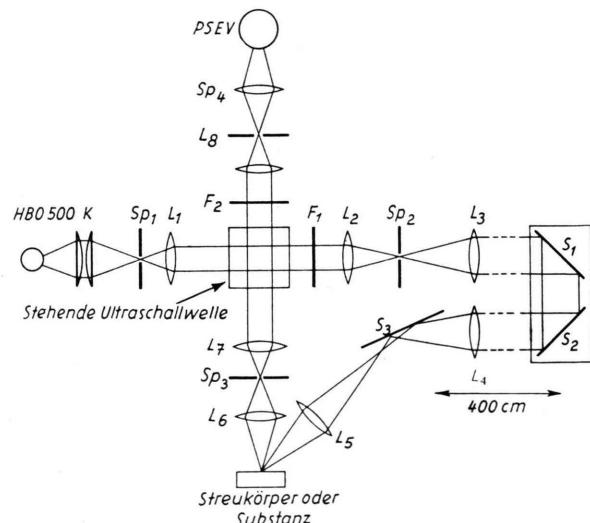


Abb. 1. Fluorometer mit variablem Lichtweg.

¹ O. MAERCKS, Dissertation Jena 1938.

² L. A. TUMERMANN u. V. SZYMANOWSKI, C. R. Acad. Sci. URSS 15, 323 [1937].

³ M. D. GALANIN, Dissertation, Akad. Wiss. USSR [1948].

⁴ W. HANLE, O. KOTSCHEK u. A. SCHARMANN, Z. Naturforsch. 6 a, 202 [1951].



Als Lichtquelle diente eine Quecksilberhochdrucklampe HBO 500. Die stehende Schallwelle wurde mit Schwingquarzen mit Eigenfrequenzen von 10 und 15 MHz in einem Flüssigkeitstrog erzeugt. Früher war als Schallträger Toluol benutzt worden, das ständig über einen Thermostaten durch den Ultraschalltrog gepumpt werden mußte, weil schon bei Temperaturänderungen von einigen Zehntel Grad wegen der Temperaturabhängigkeit der Schallgeschwindigkeit die Bedingung für eine stehende Schallwelle nicht mehr erfüllt ist⁴. Um den Thermostaten und das Durchpumpen zu umgehen, wurde das Toluol durch eine Mischung von Wasser und Äthylalkohol (rund 17 Gew.-% Alkohol im Gemisch) ersetzt, deren Schallgeschwindigkeit temperaturunabhängig ist⁵. Da die Schallwelle nie sehr lange eingeschaltet wurde, war die Temperaturkonstanz der Anordnung völlig zufriedenstellend. Außerdem stand zur Erzeugung der stehenden Ultraschallwelle ein großer Piezokeramik (30 × 30 × 20 mm³), der in einer hohen Oberschwingung erregt wurde, zur Verfügung. Dabei wurde der Quarz selbst durchstrahlt und damit die Tatsache ausgenutzt, daß sich in einem schwingenden Quarz eine stehende Schallwelle ausbildet.

Der Lichtweg konnte durch Verschieben eines kleinen Rollwagens mit zwei zueinander senkrecht stehenden Spiegeln Sp_1 und Sp_2 auf einer 4 m langen optischen Bank variiert werden. Die Linse L_3 hatte eine Brennweite von 100 cm, damit das Lichtbündel nicht zu stark divergiert; L_4 hatte einen Durchmesser von 15 cm, weil von der Öffnung dieser Linse die Lichtstärke stark abhängt. Als Lichtempfänger dienten Photosekundärelektronenvervielfacher der Typen 931 A, 1 P 21 und 1 P 22. Der Photostrom wurde mit einem Lichtmarkengalvanometer gemessen.

Die Messung setzt eine konstante Lichtquelle voraus. Um Intensitätsschwankungen auszuschalten, wurde daher mehrmals rasch hintereinander mit und ohne Modulation abgelesen. Außerdem können Verfälschungen der Abklingzeit durch Streulicht hervorgerufen werden. Deshalb wurde nur mit „gekreuzten“ Filtern F_1 und F_2 gearbeitet. Um die Abklingzeit aus der Phasenverschiebung zu berechnen, ist sinusförmige Modulation des Lichtes Voraussetzung, was bei nicht zu großen Schallintensitäten hinreichend erfüllt ist³.

Die Meßgenauigkeit hängt von der Intensität der Fluoreszenz ab. Der günstigste Meßbereich liegt zwischen 10^{-9} und 10^{-8} sec. Der Meßfehler beträgt rund $2 \cdot 10^{-10}$ sec und nimmt für größere Abklingzeiten zu. Die untere Meßgrenze liegt um $2 \cdot 10^{-10}$ sec.

Der Vorteil des Fluorometers mit variablem Lichtweg gegenüber einem Fluorometer mit rein elektrischer Phasenmessung⁶ ist der relativ einfache Aufbau und die Möglichkeit der Variation der Frequenz, verbunden allerdings mit einer sehr schwierigen Justierung. In der Meßgeschwindigkeit und -empfindlichkeit sind die elektrischen Phasenmeßmethoden eindeutig überlegen.

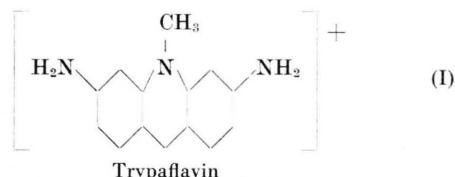
⁵ A. GIACOMINI, J. Acoust. Soc. Amer. **19**, 701 [1947].

⁶ A. SCHMILLEN, Z. Phys. **135**, 294 [1953].

Meßergebnisse

A. Trypaflavin-Folien

Vor einiger Zeit hat SCHMILLEN⁶ Messungen an Trypaflavinlösungen veröffentlicht. Die Versuche wurden wiederholt mit Polyvinylalkoholfolien, die durch Lösungen von Trypaflavin (I) in Methanol angefärbt wurden. Zuerst wurde versucht, das handelsübliche Trypaflavin, das sich nach Mitteilung der Herstellerfirma aus dem Chlorid, dem Hydrochlorid und einer Füllmasse zusammensetzt, durch Umkristallisation zu reinigen. (Versuche einer chromatographischen Reinigung schlugen fehl.) Wie sich später durch Vergleichsmessungen herausgestellt hat, waren aber die Unterschiede des „gereinigten“ vom handelsüblichen Trypaflavin so gering, daß bei späteren Experimenten auf eine Reinigung verzichtet wurde.



Die Folien wurden durch 24-stündiges Baden in Lösungen verschiedener Konzentration von Trypaflavin in Methanol präpariert. Die wirkliche Konzentration des Farbstoffes in der Folie ist unbekannt. Die Bestimmung der Konzentration durch Messung der Lichtabsorption erlaubt keine eindeutige Aussage, weil die Konzentration eine Funktion der Ein dringtiefe ist. Die Meßergebnisse zeigt Abb. 2 a. Angeregt wurde wie bei allen folgenden Versuchen mit UV-Licht der Wellenlänge 3650 Å. Der Verlauf der Abklingzeit der Trypaflavinfluoreszenz der Lösung entspricht den Messungen von SCHMILLEN. Das Maximum der Kurve kann erklärt werden durch Sekundärfluoreszenz. Das Fluoreszenzlicht kann auf seinem Wege zur Oberfläche der Lösung mehrmals absorbiert und reemittiert werden und dadurch eine Vergrößerung der Abklingzeit hervorrufen. Der Abfall der Kurve bei hohen Konzentrationen ist durch Löschprozesse bestimmt. Die Abklingzeit der Trypaflavinfluoreszenz der Folien ist etwas größer als die der Lösung, zeigt aber denselben qualitativen Verlauf. Das Maximum und der Abfall der Abklingzeit liegen bei höheren Konzentrationen, weil hier durch die Fixierung der Moleküle in der Folie Löschprozesse erst bei einem kleineren Abstand der Farbmoleküle einsetzen. Bei einsetzender Sekundär-

fluoreszenz nimmt der Polarisationsgrad der Fluoreszenz erwartungsgemäß ab *.

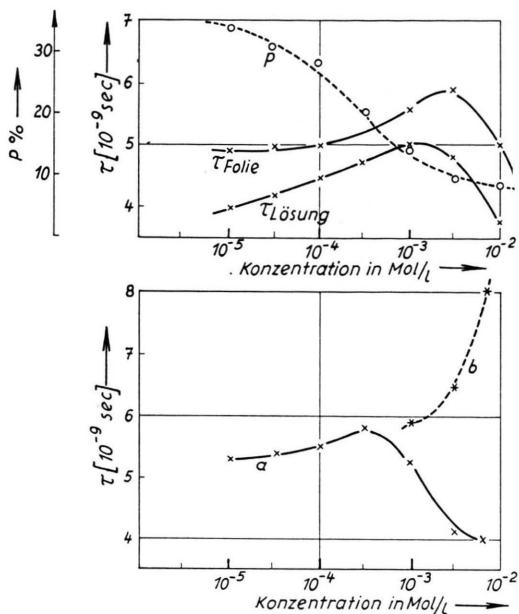
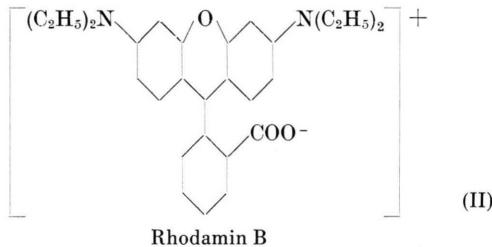


Abb. 2. Abklingzeit von Trypaflavin in Methanolösung (a) und von mit Trypaflavin angefärbten Polyvinylalkoholfolien (b). Für die Folien ist als Abszisse die Konzentration des Färbebades angegeben. P = Polarisationsgrad.

Abb. 2b zeigt Meßergebnisse an Polyvinylalkoholfolien, die in gleichmolaren Lösungen von Trypaflavin und Rhodamin B (II) in Methanol angefärbt wurden. Das anregende Licht (3650 Å) wird überwiegend vom Trypaflavin absorbiert. Deshalb fluo-

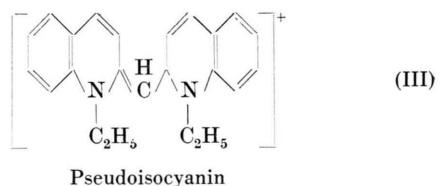


reszieren die Folien bei geringen Farbstoffkonzentrationen grün (Trypaflavinfluoreszenz). Die Abklingzeit entspricht den nur mit Trypaflavin angefärbten Folien. Bei höheren Konzentrationen fluoreszieren die Folien gelb-rot. Auch in diesem Fall wird das anregende Licht überwiegend vom Trypa-

flavin absorbiert. Die Anregungsenergie wird dann über größere Abstände hinweg auf das Rhodamin übertragen. FÖRSTER⁷ hat diesen Vorgang näher untersucht mit dem Ergebnis, daß bei genügender Überdeckung des Emissionspektrums der einen Substanz mit dem Absorptionsspektrum der anderen die Anregungsenergie strahlungslos über Abstände von der Größenordnung 100 Å übertragen werden kann. Bei größeren Abständen erfolgt die Energieübertragung durch Reabsorption. Das zeigt deutlich die Kurve für die Abklingzeit der Trypaflavin-fluoreszenz. Das Maximum der Kurve bei einer Konzentration des Farbbades von $3 \cdot 10^{-4}$ Mol/l ist durch Sekundärfluoreszenz bedingt, der im Vergleich zu Abb. 2 a frühere Abfall bei höheren Konzentrationen durch die strahlungslose Energieübertragung auf das Rhodamin, die ja eine Lösung für die Trypaflavinfluoreszenz bedeutet. Das Ansteigen der Abklingzeit des Rhodamins ist wahrscheinlich auf Sekundärfluoreszenz zurückzuführen.

B. *Pseudoisocyanin* (III)

Die Fluoreszenzeigenschaften des Pseudoisocyanins wurden eingehend von SCHEIBE und Mitarb.⁸ untersucht. Löst man Pseudoisocyanin in Wasser, dann tritt bei einer bestimmten, temperaturabhängigen Konzentration Polymerisation ein. Makroskopisch beobachtet man bei dieser Konzentration, die bei Zimmertemperatur ungefähr bei $0,7 \cdot 10^{-2}$ Mol/l



liegt, daß die Lösung gelatiniert. Die Polymerisation findet nur in einer Dimension statt (Fadenmolekül), sie geschieht nur in wäßriger Lösung und ist reversibel. Das Einsetzen der Polymerisation wird von einer neuen, ganz schmalen Absorptionsbande bei 5730 Å begleitet. Gleichzeitig erscheint eine schmale Fluoreszenzbande, die fast an derselben Stelle wie die Absorptionsbande liegt. Die Fluoreszenz kann auch durch Einstrahlung in die normalen, kürzerwelligen Absorptionsbanden erregt werden. Richtet

* Der Polarisationsgrad wurde mit Hilfe eines Glasplattensatzes eines rotierenden Polarisationsfilters und eines PSEVs mit Selektivverstärker gemessen.

⁷ Th. FÖRSTER, Z. Elektrochem. **53**, 93 [1949]; Z. Naturforschg. **4a**, 321 [1947].

⁸ G. SCHEIBE, Z. Elektrochem. **52**, 283 [1948], dort weitere Literatur.

man die Fadenmoleküle aus, dann werden Absorption und Fluoreszenz anisotrop. Aus diesen Ergebnissen und aus der Tatsache, daß schon Fremdmoleküle in Konzentrationen von 10^{-6} pro Molekül Pseudoisocyanin merkliche Lösung hervorrufen, schließt man, daß sich viele tausend Farbstoffmoleküle zu einem Riesenfadenmolekül zusammenschließen.

Das Pseudoisocyanin ist deswegen interessant, weil es die einzige bekannte organische Substanz ist, bei der Energieübertragung der Anregungsenergie durch Excitonen geschieht⁹. Im Falle starker Kopplung der Moleküle, auf die beim Pseudoisocyanin die neue schmale Absorptionsbande hinweist, kann die Energie nicht mehr einem einzigen Molekül zugeschrieben werden, sondern wandert schnell über eine große Zahl von Bausteinen. Die Energie verbleibt bei einem Einzelmolekül nur eine Zeitspanne, die kurz ist gegen die Atomschwingungen. Die Übergangszeit wurde von FÖRSTER¹⁰ überschlägig zu 10^{-14} sec berechnet.

KIRCHHOFF¹¹ konnte mit einem Fluorometer vom Typ HANLE-MAERCKS feststellen, daß die Abklingzeit der Fluoreszenz des Pseudoisocyanins kleiner als 10^{-9} sec ist. Rechnet man die Abklingdauer aus der Halbwertsbreite der Fluoreszenzbande aus, so erhält man einen Wert in der Größenordnung 10^{-13} sec. In diesem Fall ist diese Rechnung aber sicher nicht erlaubt, weil die Halbwertsbreite der Fluoreszenzbande nicht durch die Strahlungsdämpfung gegeben ist. Für mehrere Präparate wurde für die Abklingzeit des Pseudoisocyanins folgende obere Grenze bestimmt: $\tau < 1,5 \cdot 10^{-10}$ sec.

Damit ist Pseudoisocyanin die Substanz mit der kürzesten Abklingzeit. Diese obere Grenze läßt bei einer Übergangszeit von 10^{-14} sec von Molekülbaustein zu Molekülbaustein immer noch zu, daß die Anregungsenergie über einige tausend Moleküle wandern kann.

C. Anthracen eingelagert in Polystyrol

Anthracen eingelagert in Polystyrol ist ein sogenannter „plastischer Leuchtstoff“. Diese Leuchtstoffe sind in bezug auf ihre Fluoreszenzeigenschaften ein Mittelding zwischen Kristall und Lösung. Über ihre Herstellung ist in der letzten Zeit öfter

berichtet worden¹². Als Ausgangsmaterial diente Styrol der BASF ohne Stabilisator, welches ganz schwach blau fluoreszierte, was auf Beimengungen von Benzaldehyd zurückzuführen ist¹³. Bei der Beurteilung der Meßwerte ist zu beachten, daß sie nur eine Auswahl einer ganzen Reihe von Messungen darstellen. Die Meßwerte von Proben, die aus Styrol verschiedener Lieferungen hergestellt wurden, streuen, der qualitative Verlauf der Meßkurven ist aber derselbe.

Herstellung der Proben:

Anthracen eingelagert vor der Polymerisation: Das Anthracen wird in Ampullen von 8 cm Höhe und 3 cm Durchmesser eingewogen und dann das Styrol zugegeben. Die Ampullen werden abgepumpt, einmal weil Styrol empfindlich gegen Oxydation ist, zum anderen, weil gelöste Luft zur Blasenbildung führt. Das Präparat wird in flüssiger Luft gekühlt und abgeschmolzen. Zur Polymerisation werden die Ampullen 10 bis 20 Tage lang in einem Ofen auf $110 - 115^\circ\text{C}$ gebracht. Nach langsamem Abkühlen wird das Glas abgeschlagen und die Proben durch mechanische Bearbeitung auf die gewünschte Größe gebracht. Dünne Folien kann man durch Lösen dieser Proben in Xylol und Ausgießen auf eine Glasplatte herstellen.

Anthracen eingelagert nach der Polymerisation: Festes, nach dem oben beschriebenen Verfahren hergestelltes Polystyrol wird in Xylol gelöst, im selben Lösungsmittel gelöstes Anthracen zugegeben, und die Lösung auf eine Glasplatte ausgegossen.

Der augenfälligeste Befund bei der Herstellung der Proben war, daß bei der Einlagerung von Anthracen vor der Polymerisation bis zu 10 g Anthracen pro 100 g Styrol eingelagert werden können, ohne daß Anthracen ausfällt, dagegen bei der Einlagerung nach der Polymerisation diese Grenze bei 3 g Anthracen/100 g Styrol liegt. Diese Tatsache und die Untersuchung des Spektrums führten HINRICH¹⁴ zu dem Schluß, daß das Anthracen bei der Einlagerung vor der Polymerisation chemisch mit den wachsenden Styrolketten reagiert. Dabei bleibt das Anthracengerüst ungeändert, wie man aus dem Fluoreszenzspektrum schließen kann. Abb. 3 a zeigt das Ergebnis der Abklingzeitmessungen. Kurve a gibt die Abhängigkeit der Abklingzeit von dünnen Proben mit vor der Polymerisation eingebautem Anthracen als Funktion der Konzentration wieder, Kurve b von Proben mit nach der Polymerisation eingebautem Anthracen. Bestrahlt man nun die Proben der Kurve b

⁹ z. B. W. HANLE, Phys. Bl. **10**, 565 [1954].
¹⁰ Th. FÖRSTER, Naturwiss. **33**, 166 [1946].
¹¹ W. KIRCHHOFF, Z. Phys. **116**, 115 [1940].

¹² z. B.: W. L. BUCK u. R. K. SWANK, Nucl. **11**, Nov. S. 48, 1953.

¹³ H. HINRICH^s, Diplomarbeit Gießen 1952.

¹⁴ H. HINRICH^s, Dissertation Gießen 1954.

mit Elektronen (45 kV, 2 sec, 10^{-5} A/cm² sec), dann nimmt die Abklingzeit zu (Kurve c). Durch den Elektronenbeschuß werden Vernetzungsreaktionen ausgelöst, durch die das Anthracen in das Polystyrol eingebaut wird, so, als ob es vor der Polymerisation eingebaut worden wäre. Genauer zeigt das Abb. 3 b. Hier ist für Proben derselben Konzentration die Abhängigkeit der Abklingzeit von dem

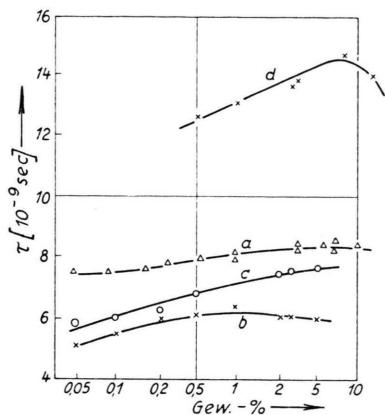


Abb. 3 a. Abklingzeit von Anthracen eingelagert in Polystyrol.
 a Anthracen eingelagert vor der Polymerisation,
 b Anthracen eingelagert nach der Polymerisation,
 c Anthracen eingelagert nach der Polymerisation nach
 Elektronenbeschuß (45 kV, 2 sec, 10^{-5} A/cm² sec),
 d Anthracen eingelagert vor der Polymerisation, 5 mm dicke
 Präparate.

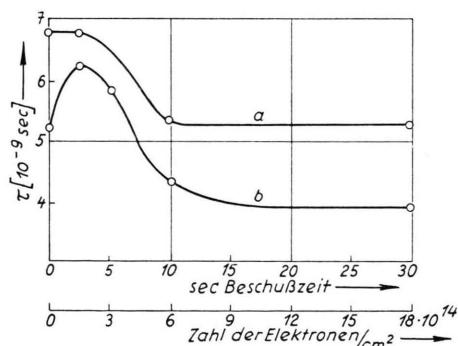


Abb. 3 b. Abklingzeit von Anthracen in Polystyrol bei Elektronenbeschuß (45 kV). Konzentration: 2 g Anthracen/100 g Styrol.

- a Einlagerung vor der Polymerisation,
 b Einlagerung nach der Polymerisation.

Elektronenbeschuß wiedergegeben. Die Abklingzeit der Probe mit vor der Polymerisation eingelagertem Anthracen nimmt wegen der zunehmenden Zerstörung ab (Kurve a). Die Abklingzeit der Probe mit nach der Polymerisation eingebautem Anthracen nimmt zuerst zu in Richtung der Werte der Kurve a, weil das Anthracen durch die Vernetzungsreaktionen chemisch eingebaut wird. Mit zunehmender Bestrahlung fällt dann die Abklingzeit wegen der in Konkurrenz stehenden Zerstörung.

Die Polystyrolpräparate zeigen in bezug auf die Fluoreszenzabklingzeit ein ähnliches Verhalten wie die Anthracenkristalle. BIRKS und LITTLE¹⁵ haben die Abklingzeit von Anthracenkristallen verschiedener Größe bestimmt und fanden für einen Kristall von 1 mm Dicke: $\tau = 14 \cdot 10^{-9}$ sec, für einen „Mikrokristall“: $\tau = 3,5 \cdot 10^{-9}$ sec. Man kann die Zunahme der Abklingzeit mit der Kristallgröße durch zunehmende Sekundärfluoreszenz erklären. Kurve d in Abb. 3 a gibt die Meßergebnisse an Polystyrolpräparaten von 5 mm Dicke wieder. Sie zeigen deutlich, analog zu den oben erwähnten Meßergebnissen an Kristallen, eine Zunahme der Abklingzeit im Vergleich zu den dünnen, 0,1 – 0,2 mm dicken Proben der Kurve a. Durch Spektralaufnahmen konnte festgestellt werden, daß die Sekundärfluoreszenz mit wachsender Probendicke zunimmt. Messungen des Polarisationsgrades zeigten, auch bei -180°C , daß das Fluoreszenzlicht selbst bei geringen Anthracenkonzentrationen unpolarisiert ist. Einerseits geht bei der Energiewanderung durch das Präparat die Vorezugsrichtung verloren, andererseits können feine Inhomogenitäten in der Folie an der Depolarisation teilhaben.

Für viele wertvolle Ratschläge und sein ständiges Interesse bin ich Herrn Prof. Dr. W. HANLE zu großem Dank verpflichtet. Herrn Dr. A. SCHMILLEN danke ich für Diskussionen, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Gewährung eines Stipendiums und den Firmen E. Leitz, Wetzlar, und A. Pfeiffer, Wetzlar, für Zuwendungen.

¹⁵ I. B. BIRKS u. W. A. LITTLE, Proc. Roy. Soc., Lond. A **66**, 921 [1953].