

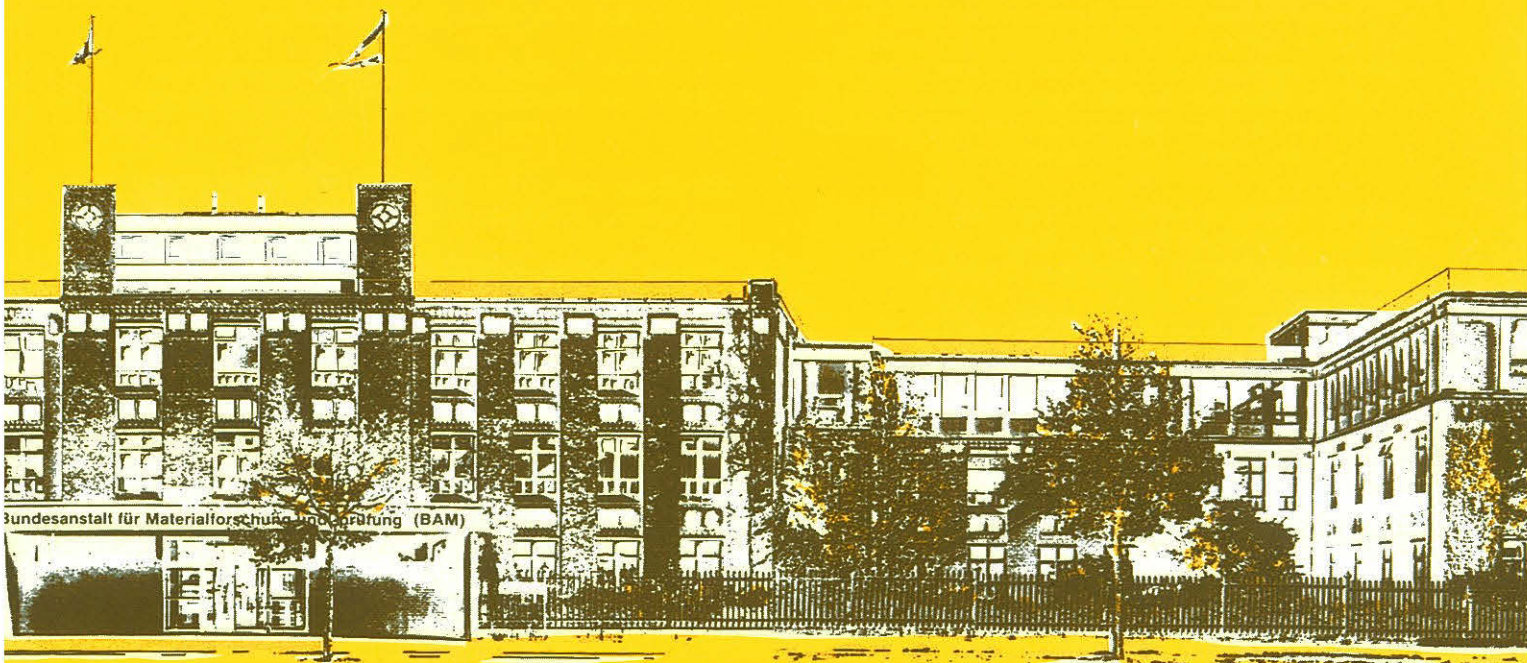
BAM Bundesanstalt für
Materialforschung und -prüfung

Forschungsbericht 212

Lasergestützte Diagnostik und Prüfverfahren

**Analytische Grundlagenuntersuchungen zur
Laserimpulsfluorometrie im ultravioletten Spektralbereich**

von Prof. Dr. Siegfried Dähne



Berlin 1996

Aufgaben der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM)

Die Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung ist technisch-wissenschaftliche Bundesoberbehörde im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Wirtschaft und Nachfolgeinstitution des Staatlichen Materialprüfungsamtes und der Chemisch-Technischen Reichsanstalt. Sie hat dementsprechend die Funktion einer material-technischen und chemisch-technischen Bundesanstalt.

Die BAM hat gemäß ihrem Gründungserlaß „die Entwicklung der deutschen Wirtschaft zu fördern“. Sie ist im Aufgabenverbund Material – Chemie – Umwelt – Sicherheit zuständig für:

- Hoheitliche Funktionen zur öffentlichen technischen Sicherheit, insbesondere im Gefahrstoff- und Gefahrgutrechtsbereich
- Mitarbeit bei der Entwicklung entsprechender gesetzlicher Regelungen, z. B. bei der Festlegung von Sicherheitsstandards und Grenzwerten
- Beratung der Bundesregierung, der Wirtschaft sowie der nationalen und internationalen Organisationen im Bereich der Materialtechnik und Chemie
- Entwicklung und Bereitstellung von Referenzmaterialien und Referenzverfahren, insbesondere der analytischen Chemie und der Prüftechnik
- Unterstützung der Normung und anderer technischer Regeln für die Beurteilung von Stoffen, Materialien, Konstruktionen und Verfahren im Hinblick auf die Schadens-

vermeidung bzw. Schadensfrüherkennung, den Umweltschutz und den Erhalt volkswirtschaftlicher Werte.

Unter der Leitlinie Sicherheit und Zuverlässigkeit in Materialtechnik und Chemie ist die BAM in folgenden Bereichen tätig:

- **Forschung und Entwicklung** auf den Gebieten des Aufgabenverbundes Material – Chemie – Umwelt – Sicherheit
- **Prüfung, Analyse, Zulassung** von Stoffen, Materialien und technischen Produkten auf der Basis von Gesetzen, Verordnungen oder technischen Regeln
- **Beratung und Information** von Bundesministerien, Wirtschaftsverbänden, Industrieunternehmen und Verbraucherorganisationen sowie Mitwirkung in nationalen und internationalen Gremien und Normenausschüssen. Daneben ist sie in die internationale und technische Zusammenarbeit eingebunden und im Bereich Meßwesen-Normung-Prüftechnik-Qualitätssicherung (MNPQ) nationale Institution für die Prüftechnik.

Mit ihren Aufgaben und Tätigkeiten verfolgt die BAM die Ziele:

- Leistungssteigerung der Wirtschaft
- Erweiterung der technisch-wissenschaftlichen Erkenntnisse
- Sicherung und Verbesserung der Lebensbedingungen.

Forschungsbericht 212

Lasergestützte Diagnostik und Prüfverfahren

Analytische Grundlagenuntersuchungen zur Laserimpulsfluorometrie im ultravioletten Spektralbereich

von Prof. Dr. Siegfried Dähne

80 Seiten, 86 Abbildungen, 23 Tabellen

Laufzeit des Projektes: 01.01.1992 - 31.12.1994

Zuwendungsempfänger: Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM)
12200 Berlin

Projektverantwortlicher: Prof. Dr. Siegfried Dähne
Labor 10.14 "Zeitaufgelöste Spektroskopie"

Wesentlich beteiligte Mitarbeiter:

Dr. Ute Resch, wiss. Angestellte der BAM
Dr. Uwe Stahl, chem.-wiss. Angestellter der BAM
Ing. Giesela Zschommler, techn. Angestellte der BAM
Monika Spieles, techn. Angestellte der BAM

Dr. Mathias Senoner, wiss. Projektmitarbeiter
Dipl.-Chem. Susanne Thiele, wiss. Projektmitarbeiterin
Staatl. gepr. Lebensmittelchemiker Knut Rurack, wiss. Projektmitarbeiter
TA Gerlinde Fritzsche, techn. Projektmitarbeiter

Herausgegeben von der
Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM)
Unter den Eichen 87, 12205 Berlin
☒ 12200 Berlin
Telefon (030) 81 04-0
Telefax (030) 811 20 29

Copyright © 1996 by Wirtschaftsverlag NW
Verlag für neue Wissenschaft GmbH, Bremerhaven

Herstellung und Verlag:
Wirtschaftsverlag NW
Verlag für neue Wissenschaft GmbH
Bürgermeister-Smidt-Str. 74-76
27568 Bremerhaven
Postfach 10 11 10, 27511 Bremerhaven
Telefon (0471) 945 44-0
Telefax (0471) 945 44 77/88

ISSN 0938-5533
ISBN 3-89429-974-6

Zusammenfassung

Für die bisher kaum zugängliche Analytik von farblosen Substanzen mittels der zeitaufgelösten Fluorometrie wurden anwendungsorientierte Laserimpulsfluorometer entwickelt: für den Nanosekundenbereich auf der Basis eines Stickstofflaser-gepumpten Farbstofflasers mit Frequenzverdopplung (SHG) in Verbindung mit Echtzeit-, Sampling- und Boxcar-Meßtechnik, für den Picosekundenbereich auf der Basis eines Argonionenlaser-gepumpten Titan-Saphirlasers mit Frequenzvervielfachung in Verbindung mit zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung.

Die neue Meßtechnik wurde zur Analytik von niedermolekularen Aromaten (BTX) in Wasser, von umweltrelevanten Metallionen in Wasser mittels neu entwickelter Fluoreszenzmarker, von Farbstoff-dotierten Polymermaterialien und von Luminophoren in Leuchtstofflampen zwecks Erkennung von Seltenerdkomponenten eingesetzt. Weitere Anwendungsbeispiele wurden in Kooperation mit in- und ausländischen Wissenschaftseinrichtungen aufgezeigt.

Auf Grund ihrer hohen Nachweisempfindlichkeit, der Möglichkeit zur Untersuchung kinetischer Vorgänge bis in den Femtosekundenbereich, der Möglichkeit von *in situ* Untersuchungen über große Entfernungen und die ausschließlich mittels Laser realisierbare NLO-Analytik stellen die laserimpulsspektrometrischen Methoden ein erfolgversprechendes Zukunftspotential dar.

Abstract

In order to analyze colorless substances by time-resolved laser fluorometry, which has been difficult to realize in the past, application-oriented laser pulse fluorometers have been developed. For the nanosecond time domain a nitrogen laser-pumped dye laser with second harmonic generation (SHG) in combination with real-time, sampling, and boxcar techniques is used, for the picosecond time domain the setup is based on argon ion laser-pumped titanium sapphire laser with 2nd, 3rd, and 4th harmonic generation combined with time-correlated single photon counting.

The new techniques have been applied to analyze (i) fluorescent single-ring hydrocarbons (BTX), (ii) polluting metal ions in water by fluorescence labels, (iii) polymeric media containing fluorescing dyes, and (iv) inorganic luminophores in order to detect valuable rare earth components during the recycling of fluorescent lamps. Further examples of applications have been realized in cooperation with domestic and foreign partner institutions. Because of the high sensitivity, the possibility to analyze kinetic processes down to femtoseconds, the possibility of *in situ* investigations over large distances, and the unique advantage of lasers for using nonlinear optical methods in analytical chemistry, the laser analytical methods have become an important tool for future applications.

1.	Kurze Darstellung des Vorhabens	7
2.	Methodik der Laserimpulsfluorometrie	9
2.1.	Laserimpulsfluorometer mit Nanosekunden-Zeitauflösung	9
2.1.1.	Anregungsquellen der Fluoreszenz	9
2.1.2.	Optische Wechselwirkungseinheit	10
2.1.3.	Empfänger	10
2.1.4.	Nachweiselektronik	12
2.2.	Laserimpulsfluorometer mit Pikosekunden-Zeitauflösung	13
2.2.1.	Fluoreszenzanregung	13
2.2.2.	Optische Wechselwirkungseinheit	15
2.2.3.	Meßprinzip der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung	15
2.2.4.	Vergleich der getesteten Elektronikkomponenten	17
2.2.5.	Leistungsnachweis des Meßsystems	19
2.2.6.	Multiplex-Verfahren in der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie	24
2.3.	Methodischer Ablauf von Messung und Auswertung	26
2.3.1.	Messung	26
2.3.2.	Daten und Software	27
2.3.3.	Numerische Analyse von Fluoreszenzabklingkurven	28
2.4.	Qualitativer und quantitativer Nachweis von Substanzen durch Messung der zeitaufgelösten Fluoreszenz	30
2.4.1.	Meßgrößen der Impulsfluorometrie zur Bestimmung von Stoffkonzentrationen	30
2.4.2.	Qualitativer Nachweis – die untere Meßgrenze	30
2.4.3.	Quantitativer Nachweis – die Eichkurve	34
2.5.	Literatur	35
3.	Anwendungen der Laserimpulsfluorometrie in der Wasseranalytik	37
3.1.	Analyse von BTX	38
3.1.1.	Ablauf der Messungen	38
3.1.2.	Spektroskopische Meßtechnik	38
3.1.3.	Numerische Analyse	39
3.1.4.	Ergebnisse der BTX-Analyse	39
3.1.5.	Einordnung der Ergebnisse	39
3.2.	Analyse von Metallionen	40
3.3.	Komplexbildner für die Fluorometrie	41
3.3.1.	Chemischer Aufbau von Fluoreszenzmarkern	42
3.3.2.	Lumineszenzverhalten von bekannten, „einfachen“ Fluoreszenzmarkern	43
3.3.3.	Lumineszenzverhalten von Fluorophor-Rezeptor-Systemen	43
3.3.4.	Fluoreszenzmarker für den Nachweis von Alkali- und Erdalkalimetallionen	44
3.3.5.	Neue Fluoreszenzmarker auf der Basis von <i>N</i> -Acylthioharnstoffen	44
3.3.6.	Entwicklung neuer Fluorophor-Rezeptor-Systeme mit makrozyklischen Rezeptoren	45
3.3.7.	Synthese von Fluorophor-Rezeptor-Systemen mit makrozyklischen Liganden	46
3.4.	Fluoreszenzspektroskopischer Nachweis von Metallionen	47
3.5.	Fluoreszenzmarker 2,2'-Bipyridyl-3,3'-diol	47
3.5.1.	Absorptionsverhalten in wäßrigen Lösungen	48
3.5.2.	Fluoreszenzverhalten in wäßrigen Lösungen	48
3.5.3.	Einfluß des pH-Wertes	49
3.5.4.	Nachweis von Cd ²⁺ und Zn ²⁺	50
3.5.5.	Nachweis von Cu ²⁺ , Co ²⁺ und Ni ²⁺	52
3.5.6.	Nachweis von Mn ²⁺ , Pb ²⁺ , Hg ²⁺ und Ag ⁺	53
3.6.	Fluoreszenzmarker 2,2'-Bipyridyl-3-ol und o-(2-Pyridino)-phenol	53
3.7.	Offenkettiges Fluorophor-Rezeptor-System APTA	54
3.8.	Offenkettiges Fluorophor-Rezeptor-System AMBT	56
3.9.	FRS auf Basis anderer <i>N</i> -Acylthioharnstoffe	57
3.10.	Makrozyklisches Fluorophor-Rezeptor-System NBO-crown	57
3.11.	Fluorophor-Rezeptor-Systeme mit verschiedenen Styryl-Fluorophoren	58
3.12.	Einsatzmöglichkeiten der Fluoreszenzmarker in der Metallionenanalytik	60
3.13.	Literatur	61

4.	Analytik von Luminophoren	63
4.1.	Detektierung von seltenerdhaltigen Leuchtstofflampen im Lampenrecyclingprozeß	63
4.1.1.	Problemstellung	63
4.1.2.	Ergebnisse zur Erkennung des Lampentyps	63
4.1.3.	Grundlagen eines Verfahrens und einer Vorrichtung zur Erkennung der seltenerdhaltigen Dreibandenlampen während des Recyclingprozesses	65
4.2.	Grundlagenuntersuchungen am $(Y_{1-x}Eu_x)_2O_3$ - Leuchtstoffsystem	66
4.2.1.	Problemstellung	66
4.2.2.	Ergebnisse	66
4.3.	Literatur	69
5.	Ergänzende spektroskopische Untersuchungen	70
5.1.	Farbstoffe in Polymermatrix als Referenzmaterialien für die Fluoreszenzkinetik	70
5.2.	Fluoreszenzuntersuchungen an Reinstwasser	70
5.2.1.	Vergleich von "subboiling"-H ₂ O und "Milli-Q"-H ₂ O	71
5.2.2.	Einfluß des Gefäßmaterials auf die Reinheit von "Milli-Q"-Wasser	71
5.2.3.	Einfluß der Standzeit im Quarzgefäß auf die Reinheit von „Milli-Q“- und „subboiling“-Wasser	71
5.2.4.	Einfluß der Standzeit in der Fluoreszenzküvette auf die Reinheit von „Milli-Q“-Wasser	72
5.3.	Literatur	73
6.	Veröffentlichungen	73
6.1.	Vorträge und Poster	73
6.2.	Erfolgte Veröffentlichungen	74
6.3.	Geplante Veröffentlichungen	74

1. Kurze Darstellung des Vorhabens

Im Rahmen des BMFT-Förderschwerpunktes „Lasersforschung und Lasermeßtechnik“ sollten mit dem Projekt neue analytische Anwendungsgebiete der Laserimpulsfluorometrie in Industrie und Technik erschlossen werden.

Dazu waren methodische und apparative Verbesserungen und Erweiterungen der Laserimpulsfluorometrie im Nanosekunden(ns)- und Picosekunden(ps)-Bereich für die Analytische Chemie zu erarbeiten. Insbesondere sollten die Anregungswellenlängen vom sichtbaren Spektralbereich in den UV-Bereich bis etwa 200 nm ausgedehnt werden, um ausschließlich im UV-Bereich absorbierende Substanzen mit hoher Nachweisempfindlichkeit impulsfluorometrisch analysieren zu können.

Als Anwendungsfelder sollten zum einen der qualitative und quantitative Nachweis von fluoreszierenden Kontaminationen in Oberflächengewässern und Industrieabwässern erschlossen werden. Zum anderen sollten die in der Lampenindustrie üblichen Luminophore impulsfluorometrisch charakterisiert werden mit dem Ziel, methodische Grundlagen für ein Analysenverfahren zur Optimierung, Gütekontrolle und zum Recycling von Luminophoren zu entwickeln.

Das Anfang 1991 beantragte Vorhaben war noch vor der Umstellung der DDR-Forschung nach der Wiedervereinigung Deutschlands geprägt. Zu Beginn wurden im wesentlichen die Erfahrungen auf dem Gebiet der Laserspektroskopie eingebracht, die mit veralteten Geräten unter räumlich sehr eingeschränkten Bedingungen im Analytischen Zentrum der ehemaligen Akademie der Wissenschaften der DDR bearbeitet worden waren. Das Projekt wurde ab Februar 1992 von der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) übernommen. In der neu gegründeten Abteilung „Analytische Chemie; Referenzmaterialien“ der BAM wurde unter anderen auch das „Laboratorium für Zeitaufgelöste Spektroskopie“ neu geschaffen. Zum Abschluß des BMFT-Projektes steht jetzt ein modern eingerichtetes Laboratorium mit Laserimpulsfluorometern für den Nanosekunden- und Picosekundenbereich mit neuen Geräten, neuen Räumen und zum Teil neuen Mitarbeitern zur Verfügung. Zu dieser erfolgreichen Entwicklung haben die Arbeiten an dem vorliegenden Projekt wesentlich beigetragen.

Bearbeitungsablauf:

- UV-Erweiterung durch Frequenzverdopplung bei einem vorhandenen Laserimpulsfluorometer für den Nanosekundenbereich auf der Basis eines stickstofflasergepumpten Farbstofflasers in Verbindung mit Echtzeit-, Sampling- und Boxcar-Meßtechniken (siehe Kap. 2.1.),
- Entwicklung und Aufbau eines Picosekunden-Laserimpulsfluorometers mit Anregungswellenlängen zwischen 205 und 900 nm auf der Basis eines argonionenlasergepumpten Titan-Saphir-Lasers (oder wahlweise modegelockten CW-Farbstofflasers) in Verbindung mit der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung, einschließlich

der Entwicklung von umfangreicher Steuer- und Auswertungs-Software (siehe Kap. 2.2., 2.3.),

- Entwicklung und Synthese neuer Fluoreszenzmarker und ihr Einsatz für die impulsfluorometrische Analytik von Metallionen, insbesondere von umweltgefährdenden Schwermetall- und Übergangsmetallionen in Oberflächengewässern und Industrieabwässern (siehe Kap. 3.),
- Entwicklung methodischer Grundlagen zur Detektion und Selektion von seltenenerdhaltigen Leuchtstofflampen im Lampenrecyclingprozess (siehe Kap. 4.),
- Untersuchungen organischer Polymermaterialien mittels der Picosekunden-Impulsfluorometrie (siehe Kap. 5.).

Stand der Methodik bei der Durchführung des Projektes

In der Literatur gab es zahlreiche Ansätze, die Laserimpulsspektralfluorometrie im sichtbaren Spektralbereich auf Probleme der Analytischen Chemie anzuwenden. Auf Grund der im Vergleich zu konventionellen Lichtquellen wesentlich höheren Lichtintensität, höheren Monochromasie, geringeren Impulsdauer und höheren Kohärenz der Laserstrahlung sind von laseranalytischen Methoden folgende Vorteile zu erwarten:

- höhere Nachweisempfindlichkeit bis in den ppt-Bereich
- höhere Zeitauflösung bis in den Femtosekundenbereich, wodurch erstmalig die Dynamik der photophysikalischen und photochemischen Primärprozesse und Elementarreaktionen einer direkten Untersuchung zugänglich werden
- *in situ* Untersuchungen in großen Entfernungen sowohl über Lichtleiterkabel (bis mehrere 100 m) als auch im freien Raum bis zu interstellaren Entfernungen
- Ausnutzung nichtlinearer optischer Effekte zur Struktur- und Konzentrationsanalytik, zum Beispiel mittels Frequenzverdopplungsexperimenten (SHG) an oberflächen-adsorbierten Molekülen.

Diese Entwicklung hat sich in den letzten Jahren international stark erweitert, wobei jedoch der Schwerpunkt weiterhin auf analytischen Untersuchungen im sichtbaren Spektralbereich lag, offensichtlich weil die Erzeugung und Anwendung ultravioletter Strahlung mittels Exzimerlaser oder frequenzvervielfachter Festkörper- und Flüssigkeitslaser bisher noch vorrangig eine Domäne der physikalischen Grundlagenforschung ist. Die Folge ist, daß sich die bisherigen Untersuchungen auf die Analytik von farbigen Verbindungen konzentrieren und daß die weitaus größere Anzahl von farblosen, im UV absorbierenden Verbindungen nicht erfaßt werden.

Das vorliegende Projekt hat wesentlich zur Schließung dieser Lücke beigetragen. Erstmals konnten auf der Basis von frequenzverdoppelter Farbstofflaserstrahlung und frequenzvervielfachter Titan-Saphirlaser-Strahlung auch im UV-Bereich anwendungsorientierte laserimpulsfluorometrische Untersuchungen durchgeführt werden. Auf der Basis von bekannten und neu entwickelten Fluoreszenzmarkern wurden neue Anwendungsmöglichkeiten der zeitaufgelösten

Laserimpulsfluorometrie für die Analytik von umweltrelevanten Schwer- und Übergangsmetallionen aufgezeigt. Besonders zukunftsreich erwies sich die Laserimpulsfluorometrie für die Analytik von organischen Polymermaterialien. Die prinzipielle Anwendbarkeit der Impulsfluorometrie zur Erkennung und Selektion von wertvollen Seltenerdkomponenten in gebrauchten Leuchtstofflampen in eventuell möglichen Recyclingverfahren wurde gezeigt.

Verwendete Fachliteratur

Entsprechend der Projektorientierung auf Arbeiten aus der Grundlagenforschung wurde die Literatur anhand von Hand- und Computerrecherchen der CHEMICAL ABSTRACTS (CA) und des INSPEC zu apparativen Entwicklungen sowie zur Fluorometrie von Wasserkontaminationen, fluorometrischen Referenzmaterialien, Polymermaterialien und Luminophoren verfolgt und bis 1994 fortlaufend ergänzt. Relevante Zitate sind im ausführlichen Textteil des Berichtes angegeben.

Folgende Kooperationen haben den Fortgang der Projektbearbeitung wesentlich gefördert:

- Fachgruppe 3.1 „Polymerwerkstoffe“ der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM), Erfahrungsaustausch zur Spektroskopie in komplexen Materialien
- Institut für Angewandte Chemie Adlershof (ACA), Dr. J. Caro, auf dem Gebiet der impulsfluorometrischen Analytik von in Zeolithen eingelagerten Molekülen
- WEREC GmbH, mittelständiger Betrieb für das Recycling speziell von Leuchtstofflampen
- Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Humboldt Universität zu Berlin, Prof. W. Rettig, auf dem Gebiet der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie von Fluoreszenzmarkern
- Institut für Organische Chemie der Ukrainischen Akademie der Wissenschaften, Kiew, Prof. A. I. Tolmachev, für die Synthese von Fluoreszenzmarkern
- Institut für Physik der Ukrainischen Akademie der Wissenschaften, Kiew, Dr. O. V. Przhonska, für die Analytik von Polymermaterialien
- Bundesamt für Gewässerkunde, Außenstelle Berlin, Informationen über umweltrelevante Gewässerschadstoffe und ihre Analysenmöglichkeiten.

Da das Picosekunden-Laserimpulsfluorometer mit UV-Anregung bisher das einzige mit der Möglichkeit der Erzeugung der vierten Harmonischen bis 203 nm in Berlin ist (bis 240 nm gibt es mittlerweile eine Apparatur bei der BiosQuant GmbH), wurden andere Forschungsvorhaben durch Messungen der Fluoreszenzkinetik unterstützt, zum Beispiel:

- das Teilprojekt B11 „Photophysikalische Primärpro-

zesse in Farbstoffaggregaten“ des DFG-Sonderforschungsbereichs 337 „Energie- und Ladungstransfer in molekularen Aggregaten“

- das Laser Labor Adlershof LLA e. V., methodische Arbeiten zur Multiplexspektroskopie und zum Einsatz von Referenzmaterialien in der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie
- die Technische Universität Berlin, Fachbereich Physik, Institut für Optik, Erprobung von Diodenlasern für die zeitaufgelöste Spektroskopie
- das Institut für Organische Chemie (AG Prof. D. N. Reihoudt), Universität Twente, Enschede, Niederlande, zur spektroskopischen Charakterisierung von neutralen uranylhaltigen Anionen-Rezeptoren
- die Abteilung „Zentrale Analytik“, BASFAG, Ludwigshafen, zur statischen und zeitaufgelösten Fluorometrie von Tensiden in Oberflächenwasser und
- das Geoforschungszentrum GFZ, Potsdam, zur Erprobung von zeitauflösenden Photoempfängern für Laser-Laufzeitmessungen.

Darüber hinaus wurden erste Kontakte zur chemischen Industrie (BAYER AG, Leverkusen; BASFAG, Ludwigshafen) geknüpft, um Möglichkeiten für den Einsatz der im Rahmen des Projektes entwickelten laserimpulsfluorometrischen Methoden zu erkunden.

Schließlich wurde im Rahmen der Fördergemeinschaft Laserverbund Berlin-Brandenburg e. V. die Gründung eines Anwenderkreises „Laseranalytik“ initiiert, dem derzeit etwa 200 Wissenschaftler aus 16 Arbeitsgruppen von Hochschul- und anderen Forschungseinrichtungen der Öffentlichen Hand sowie sieben Arbeitsgruppen von Industriebetrieben angehören. Als Vorsitzender wurde der Leiter des vorliegenden Projektes gewählt.

Der Nutzen des vorliegenden Projektes liegt insbesondere auf dem prinzipiellen Nachweis, daß die Laserimpulsfluorometrie heute routinemäßig auch mit UV-Laserstrahlung durchgeführt werden kann. Potentielle Anwendungen bei der Analytik von umweltgefährdenden Schwermetall- und Übergangsmetallionen in Oberflächengewässern und Industrieabwässern wurden aufgezeigt. Auf diesem Gebiet sollte unbedingt ein Nachfolgeprojekt zur Kopplung der Laserimpulsfluorometrie mit chromatographischen (z. B. HPLC) und elektrophoretischen Verfahren aufgenommen werden. Weitere Anwendungen lassen sich bei der Analytik von niedermolekularen Aromaten (BTX) in Wasser sowie bei der Untersuchung der Struktur und Relaxationsdynamik von organischen Polymermaterialien absehen. Es wurden methodische Grundlagen für die Entwicklung einer Schnellmethode zur Erkennung und Sortierung von wertvollen Seltenerden in zu entsorgenden Leuchtstofflampen entwickelt.

2. Methodik der Laserimpulsfluorometrie

Es gibt kein Meßsystem, das geeignet ist, allen möglichen Anforderungen an spektrale und zeitliche Meßbereiche und Auflösungen gerecht zu werden. Aus diesem Grund wurden von uns drei Meßsysteme mit unterschiedlicher Zeitauflösung eingesetzt.

Für die Untersuchung der Kinetik der Lumineszenz mit Zeitkonstanten von Stunden bis Sekunden (z. B. zur Untersuchung der Photostabilität von Farbstoffen) wurde ein konventionelles Fluoreszenzspektrometer Perkin-Elmer LS50B mit repetierender Aufzeichnung der Spektren benutzt. Für Zeitaufösungen von Sekunden bis Millisekunden ließ sich dieses Gerät als Blitzlampen-Phosphorimeter betreiben.

Für höhere Zeitaufösungen beziehungsweise speziellere Anforderungen wurden zwei unikale Meßsysteme mit unterschiedlichem Leistungsprofil aufgebaut oder weiterentwickelt. Das erste System im Nanosekundenlabor überdeckt den Bereich der Zeitauflösung von Millisekunden bis sub-Nanosekunden. Die zweite Apparatur schließt daran an mit Zeitaufösungen von Nanosekunden bis Pikosekunden.

2.1 Laserimpulsfluorometer mit Nanosekunden-Zeitauflösung

In unserer Arbeitsgruppe stand eine funktionsfähige Apparatur für die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie im Nanosekundenbereich zur Verfügung. Dieses Meßsystem mußte jedoch für die Erfüllung der Anforderungen der analytischen Grundlagenuntersuchungen im UV-Spektralbereich weiterentwickelt werden.

2.1.1 Anregungsquellen der Fluoreszenz

Die Laserimpulsfluorometrie benötigt Anregungsquellen der Fluoreszenz, deren Impulshalbwertsbreite (FWHM – Full Width at Half Maximum) nicht wesentlich größer als die geforderte Zeitauflösung sein darf. Eine weitere Bestimmungsgröße ist die Folgefrequenz, die als Periodendauer die Größenordnung der längsten meßbaren Zeit bestimmt. Da mit Hilfe dieser Apparatur die Fluoreszenzkinetik im Bereich von Milli- bis Nanosekunden untersucht werden sollte, ist eine Impulshalbwertsbreite unter 1 Nanosekunde bei Folgefrequenzen von 1 bis 100 Hz erforderlich. Zum Überdecken eines weiten Spektralbereiches wird ein System aus Pump- und Farbstofflaser sowie eine Frequenzverdopplung benötigt.

Excimerlaser als Pumpquellen kamen auf Grund ihrer Impulsbreite von 5 bis 20 ns nicht in Frage. Systeme auf der Basis eines frequenzvervielfachten Neodym-YAG-Lasers besitzen zwar gute technische Parameter, wie kurze Impulse hoher Leistung, sind aber für die geforderte Aufgabe zu teuer und technisch zu aufwendig.

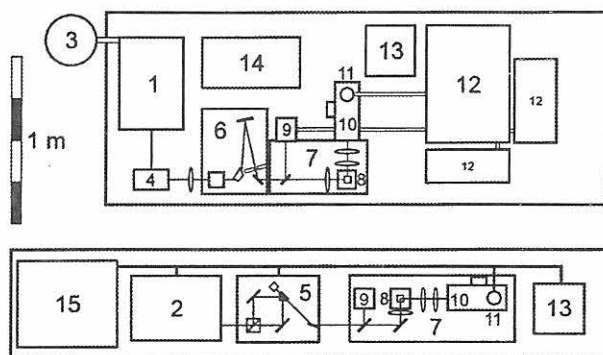


Abb. 2.1

Experimentelle Aufbauten der Laserimpulsfluorometer mit Nanosekunden-Zeitauflösung

- 1 Stickstoff-Impuls laser MSG 800, 800 kW, 0,8 ns, 0 - 40 Hz
- 2 Stickstoff-Impuls laser MSG 350, 350 kW, 0,8 ns, 0 - 40 Hz
- 3 Reinstgas-Versorgung für Stickstofflaser
- 4 Farbstofflaser UDL 100, Littmann-Typ
- 5 computergesteuerter Farbstofflaser ULA 100 „Amethyst“
- 6 SHG-Einheit mit BBO-Kristall und Wellenlängentrennung (Pellin-Broca-Prisma)
- 7 Wechselwirkungseinheit
- 8 temperierbarer Probenhalter TSK 200
- 9 Triggerdiode, SI-PIN WF SP 102
- 10 Monochromator Lambda-Scanner, ZWG
- 11 Photomultiplier Hamamatsu R4703
- 12 digitales Sampling- und Boxcar-Oszilloskop MFA 105
- 13 Stromversorgung für Photomultiplier und Trigger
- 14 analoges Sampling- und Boxcar-Oszilloskop BCI 280
- 15 Computer mit Meßsystem TRANSMAX

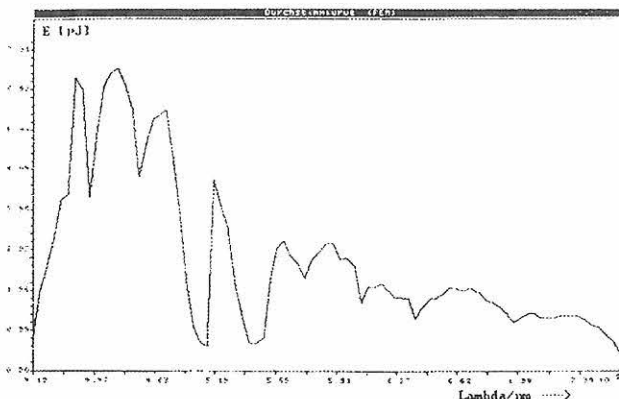


Abb. 2.2

Spektraler Energieverlauf des automatisierten DFB-Farbstofflasers „Amethyst“

Aus diesen Gründen wurde das bestehende System auf der Basis von Stickstofflasern als Anregungsquelle weiterentwickelt. Bei Projektbeginn waren ein Stickstofflaser MSG-350 (350 kW bei 0,8 ns FWHM) der Firma LTB Laser Technik Berlin GmbH und ein automatisierter DFB-Farbstofflaser ULA 100 „Amethyst“, produziert in Minsk, modifiziert und vertrieben über das Zentrum für Wissenschaftlichen Gerätebau ZWG, vorhanden. Wie in Abb. 2.2 gezeigt, ermöglicht dieser Farbstofflaser durch eine Mehrfach-Farbstoffküvette ein computergesteuertes Durchstimmen im Bereich von 400 nm bis 750 nm. DFB-Farbstofflaser (DFB - Distributed Feedback) besitzen keinen äußeren Resonator und sind daher besonders gut als Kurzpulslaser

einsetzbar – mit Mikroskop-Optiken zur Abbildung bis zu sub-Pikosekunden. Die verfügbare Ausgangsenergie von 2 bis 8 μJ ist jedoch für eine effiziente Frequenztransformation durch SHG in den UV-Bereich zu gering.

Deshalb wurde das System durch einen leistungsstärkeren Stickstofflaser, einen Farbstofflaser sowie durch Kristalle zur Erzeugung der zweiten Harmonischen (SHG) ergänzt, um eine UV-Anregung zu ermöglichen. Der Aufbau der neuen Komponenten erfolgte so, daß die bestehende Apparatur als zweiter, weitgehend unabhängiger Meßplatz für die Spektroskopie im sichtbaren Spektralbereich weiter genutzt werden konnte (Abb. 2.1).

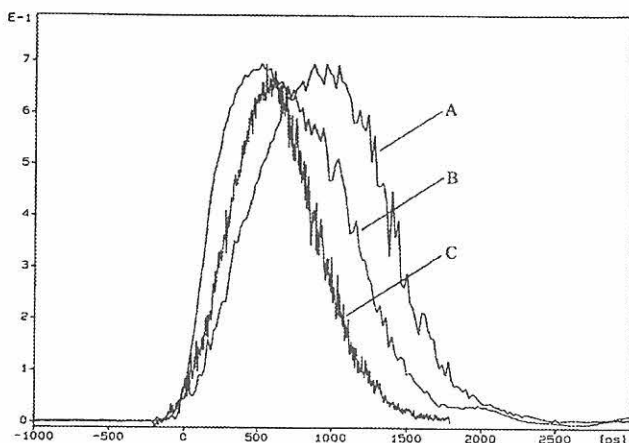


Abb. 2.3 Normierte Darstellung der Impulsform der Fluoreszenzanregungsquellen (A) Stickstofflaser MSG 800, (B) Farbstofflaser "Amethyst" und (C) FSL UDL 200, aufgenommen mit einer 1.5 Ghz Photodiode HamamatsuR4753 und einem 6 Ghz Sampling Oszilloskop Tektronix TDS 820

Der neue Stickstofflaser MSG-800 von der Firma LTB Laser Technik Berlin leistet zirka 800 kW bei einer Impulsbreite von 0.8 ns und einer Pulsenergie von etwa 600 μJ . Der Farbstofflaser besitzt einen abstimmbaren Resonator mit einem Gitter im streifenden Einfall (Littmann-Typ). Durch diese Bauform werden nicht solche Impulsverkürzungen wie in einem DFB-Typ möglich. Die Impulsdauer des Pumplasers von 0.8 ns entspricht einer optischen Weglänge von 24 cm, weshalb es nicht möglich ist, mehrere Durchläufe der Laserstrahlung im Resonator zu erreichen. Daraus resultiert die etwas breitere Impulsform, der man die Reflektionen am vorderen und hinteren Ende des Resonators als sich überlagernde Banden ansieht (Abb. 2.3).

Die Ausgangsenergie von 20 bis 50 μJ bei Folgefrequenzen von 10 bis 20 Hz ist für eine nachfolgende SHG ausreichend. Für diese SHG wurden zwei BBO-Kristalle (β -Bariumborate) mit unterschiedlichen Schnittwinkeln für die Wellenlängenbereiche von 205 - 221 nm und 220 - 315 nm benutzt. Grund- und Oberwelle wurden mit einem Pellin-Broca-Prisma mit nachfolgender Spaltblende getrennt.

2.1.2 Optische Wechselwirkungseinheit

Um die Strahlung der Anregungslichtquelle auf die Probe und die Fluoreszenz auf den Empfänger abzubilden, wurde eine vorhandene Wechselwirkungseinheit des Systems LIF 200 modifiziert. Neben Linsen zur Fluoreszenzabbildung enthält diese Einheit Neutralfilter zur Abschwächung der Laseranregung, Kantenfilter, Aperturbledern, einen Strahlteiler um einen Teil der Anregungsintensität auf eine Triggerdiode zu lenken sowie einen Probenhalter mit Peltier-Thermostat. Eine variable Abbildungsgeometrie erlaubt Messungen der Fluoreszenz in 90° oder 0° zur Anregungsrichtung.

Zur wellenlängendispersiven Fluoreszenzmessung wurden drei verschiedene lichtstarke Monochromatoren vom Typ Lambda-Scanner vom ZWG benutzt. Die Monochromatoren sind mit verschiedenen Gittern mit Blazewellenlängen von 270, 500 und 750 nm ausgestattet. Mit optischen Schnellverschlüssen ist so eine schnelle Anpassung der Monochromatoren an die Meßaufgabe möglich. Je nach Gitter beträgt die spektrale Spaltbreite 6 bis 12 nm/mm und die maximale Auflösung etwa 1.5 nm. Zur Messung schwacher Fluoreszenz wurden alternativ zu den Monochromatoren Interferenz- und Kantenfilter benutzt.

2.1.3 Empfänger

Da die vorhandene Meßtechnik dem zu DDR-Zeiten verfügbaren technischen Stand entsprach, waren auch auf dem Gebiet der Empfängertechnik Weiterentwicklungen nötig. Bis zum Projektbeginn wurde ein Photomultiplier 18 ELU FM aus russischer Produktion genutzt. Dieser Typ entspricht in etwa dem international Mitte der achtziger Jahre gebräuchlichen Modell XP2020 von Philips. Mit ihm erreicht man eine Halbwertsbreite der Systemfunktion (IRF) von ca 2.8 ns (Tab. 2.1).

Empfänger	Anstiegszeit in ns	Halbwertsbreite in ns	relative Empfindlichkeit	Größe und Gewicht des Empfängers	Hochspannungsversorgung
18 ELU FM	1.25	2.75	1	\varnothing 140 x 270 mm, 4 kg	4kV, 1 mA, Masse 20 kg
R4703	0.85	1.25	25	\varnothing 40 x 150 mm, 0.4 kg	1.2kV, 0.1 mA, Masse 2 kg
H5783-01	1.05	1.65	20	\varnothing 25 x 50 mm, 0.1 kg	integriert, Masse 0 kg
WF SP 104	0.6	1.1	0.03	\varnothing 50 x 30 mm, 0.1 kg	150 V, 1 mA, Masse 5 kg

Tabelle 2.1 Übersicht über Zeitauflösung und technischen Aufwand der verschiedenen Photoempfänger des Nanosekunden-Laserimpulsfluorometers

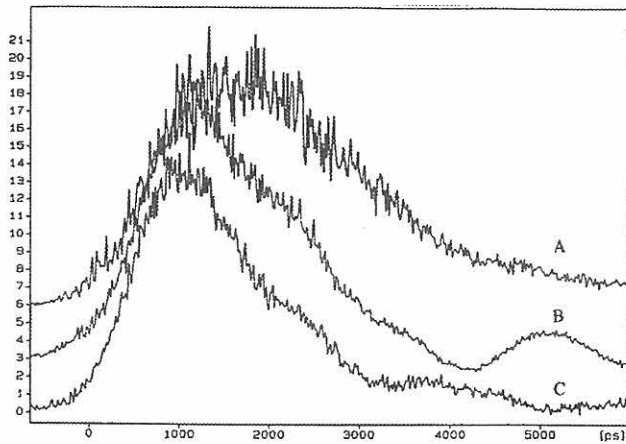


Abb. 2.4
Skalierte Darstellung der Instrument Response Funktion IRF des Nanosekunden-Impulsfluorometers, aufgenommen mit dem Sampling-Oszilloskop MFA 105 und verschiedenen Photomultipliern: (A) 18 ELU FM, (B) Hamamatsu H5783-01 und (C) Hamamatsu R4703

Durch einen kompakten drei Achtel Zoll Photomultiplier Hamamatsu R4703 konnte die Halbwertsbreite der Systemfunktion auf 1.25 ns verbessert werden. Durch seine Multi-alkali-Kathode mit Quarzfenster wurde der nutzbare Spektralbereich auf 200 bis 800 nm erweitert, die Empfindlichkeit um etwa den Faktor 25 erhöht und das Rauschen deutlich vermindert, wie Abb. 2.4 zeigt. Zur Optimierung der Betriebsbedingungen wurde der Einfluß der Hochspannung am PMT R4703 auf die Impulsbreite und das Rauschen systematisch untersucht. Die Messungen ergaben, daß sich die Halbwertsbreite der Systemfunktion, gemessen mit dem Stickstofflaser, von 2.8 ns bei 850 V bis auf 1.85 ns bei 1250 V verringert. Das Rauschen ist bei 1250 V relativ zur Signalhöhe etwa doppelt so groß wie bei 850 V.

Gleichzeitig mit der Verbesserung der technischen Parameter wurde die Handhabbarkeit der Empfängertechnik deutlich verbessert. Geringe Ausmaße und einfache Handhabung von Empfänger und Hochspannungsversorgung sind insbesondere vor dem Hintergrund einer analytischen oder sensortechnischen Applikation von großem Interesse. Aus diesem Grund wurde 1994 ein neu entwickelter Miniatur-Photomultiplier von Hamamatsu getestet. Das Empfängermodul H5783-01 besteht aus einem Multi-alkali-Photomultiplier in einem TO-8 „Transistorkopf“ mit nur 10 mm Länge und 16 mm Durchmesser. Das Gehäuse von 22 x 22 x 50 mm Größe enthält außerdem noch die komplette Hochspannungsversorgung. Das Impulsverhalten zeigt eine sehr hohe Anstiegszeit sowie ein leichtes Nachschwingen (Abb. 2.4), was auf noch fehlende Feinarbeit bei der elektronischen Anpassung oder eine ungünstige Exemplarstreuung deutet. Dennoch belegen diese Daten eine sehr gute Eignung für sensortechnische Applikation mit hoher Empfindlichkeit und Zeitauflösung.

Speziell für Messungen mit einer besseren Zeitauflösung und einem geringeren Rauschen wurde eine Empfänger-Variante mit einer Silizium-Avalanche-Photodiode (Typ WF SP104) aufgebaut. Abb. 2.5 zeigt am Beispiel des Stick-

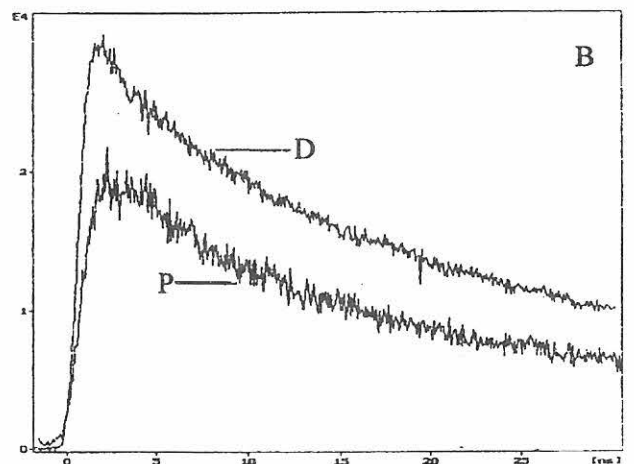
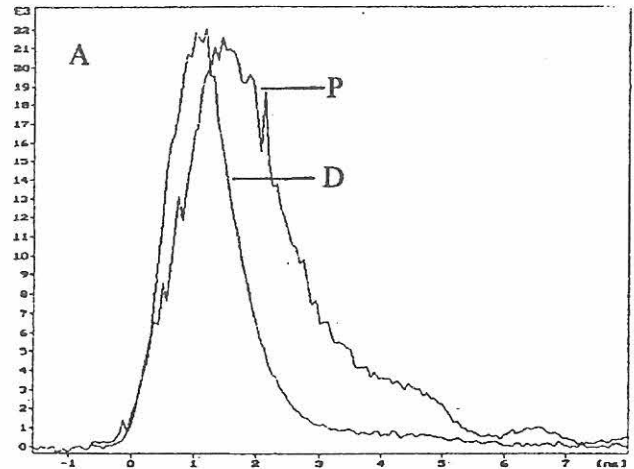


Abb. 2.5
Vergleich von Zeitauflösung und Rauschen eines Photomultipliers R4703 (P) und einer Avalanche-Diode WF SP-104 (D), gemessen mit dem Nanosekunden-Laserimpulsfluorometer. Messung der Systemfunktion (A) und der Abklingkurve (B) eines festen Fluoreszenzstandards (LIF 200, ZWG).

stofflaserimpulses (A) und der Fluoreszenz eines festen Fluoreszenzstandards (B) die Vorteile der Diode gegenüber dem PMT R4703. Die Impulsbreite des Stickstofflasers beträgt bei der Messung mit der Diode 1.2 ns und mit dem Photomultiplier 1.85 ns. Das unter gleichen Bedingungen um den Faktor 3 kleinere Rauschen der mit der Diode gemessenen Kurve ist durch die Impulshöhenschwankungen des Stickstofflasers hervorgerufen.

Der Nachteil der Diode ist, verglichen mit dem SEV, die wesentlich geringere Empfindlichkeit, die durch die geringe Verstärkung (10^2 gegenüber 10^5 bis 10^6 beim PMT) und die kleine Fläche ($0,04 \text{ mm}^2$ gegenüber 60 mm^2 beim SEV) bedingt ist. Deshalb wurde die Avalanche-Photodiode nur für Messungen mit geringer spektraler Auflösung, d. h. ohne Monochromator verwendet. Auch für die Diode wurde der Einfluß der angelegten Spannung auf Empfindlichkeit und Zeitverhalten untersucht. Es zeigte sich, daß oberhalb der angegebenen Spannung U_{100} (Spannung bei der die Diode eine 100fache Verstärkung besitzt, wird für jede Diode individuell angegeben) der nichtlineare Bereich beginnt, der zu einer Verbreiterung der Impulsform führt und die Entfaltung verfälscht, da diese einen linearen Zusammenhang zwischen Anregungsintensität und Fluoreszenz voraussetzt.

2.1.4 Nachweiselektronik

Die Aufzeichnung des elektrischen Signals der Photoempfänger kann je nach geforderter Zeitauflösung mit unterschiedlichen elektronischen Methoden erfolgen. Es gibt kein (bezahlbares) elektronisches Gerät das in der Lage ist, den kompletten Signalverlauf eines schnellen Photomultipliers mit einer Schrittweite von unter 50 ps bei nur einem Impuls in Echtzeit aufzuzeichnen. Deshalb verwendet man bei hoher Zeitauflösung ein Verfahren, das je Laserimpuls immer nur einen Abschnitt beziehungsweise einen Meßpunkt aufzeichnet. Auf diese Weise ist bis zum nächsten Impuls genug Zeit, den vorigen Meßwert zu digitalisieren und zu speichern. Diese Methode bezeichnet man als Sampling-Verfahren. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses ist es üblich, die Werte für einen Meßpunkt über mehrere (8 bis 32) Impulse (Sample per Step) zu mitteln. Die Aufzeichnung eines typischen Zeitverlaufs der Fluoreszenzkinetik erfolgte über 512 Punkte mit 16 Mittelungen und dauert bei einer Folgefrequenz von 20 Hz zirka 400 Sekunden.

Bei mittleren Zeitaufösungen im Bereich von Mikro- oder Submikrosekunden kann das Boxcarverfahren verwendet werden, welches das Meßsignal auf eine dem Samplingverfahren ähnliche Weise sequentiell aufzeichnet. Dabei wird eine höhere Empfindlichkeit dadurch erzielt, daß im Gegensatz zum Samplingverfahren eine Torschaltung veränderlicher Integrationszeit benutzt wird. Die Grenzfrequenz und damit die maximale Zeitauflösung wird dabei von der Dauer der Integrationszeit und der Schrittweite bestimmt. Bei geringeren Zeitaufösungen im Bereich bis 10 Mikrosekunden kann mit schnellen Analog-Digital-Wandlern der Verlauf des Signals in Echtzeit bei nur einem Laserimpuls aufgezeichnet werden.

Im Zeitbereich zwischen zirka 0.5 bis 500 μ s bereiten die Anpassung von Photomultipliern und die Aufzeichnungsverfahren einige Probleme. Für Photomultiplier werden üblicherweise zwei verschiedene Varianten für die Beschaltung der Spannungsteiler angeboten: cw- und Impulsbetrieb. Die cw-Variante besitzt die zum Boxcarverfahren passende Impedanz von über 100 k Ω , aber eine zu geringe Grenzfrequenz für Anstiegszeiten im μ s-Bereich. Die Impulsbeschaltung erlaubt Anstiegszeiten von unter einer Nanosekunde führt aber durch den geringen Dauerstrom im Spannungsteiler zu einer geringen Empfindlichkeit und zu einem schlechten Signal-Rausch-Verhältnis im sub-Millisekundenbereich. Dieses Verhalten wird durch Signalverstärker mit Impedanzwandlung von 50 Ω auf 100 k Ω nicht entscheidend verbessert. Das beste Dynamikverhalten ohne Einschränkungen von Pico- bis Millisekunden bieten dagegen Photon-Counting Verfahren (siehe Abschnitt 2.2.5).

In der vorhandenen Apparatur wurde ein Gerät eingesetzt, daß je nach benötigter Zeitauflösung alle drei Meßverfahren ermöglicht. Das digitale Oszilloskop MFA 105 vom ZWG gestattet erstens den Betrieb als Sampling Oszilloskop mit einer oberen Grenzfrequenz von 1.2 GHz und einer minimalen Schrittweite von 15.6 ps, zweitens als Boxcar-

Integrator mit einer minimalen Torbreite von 300 ns und drittens als Echtzeit-Oszilloskop mit einer Schrittweite von 2 ms pro Meßpunkt. Dieses Gerät wurde auch für einen großen Teil der Messungen im Rahmen dieses Projektes genutzt. Die Meßdaten werden in einem CP/M verwandten hexadezimalen Format auf Diskette gespeichert und können mit einem speziellen Konvertierungsprogramm *MCON* zur Weiterverarbeitung an einen IBM-kompatiblen PC übertragen werden.

Zur Kalibrierung, für Referenzmessungen oder für eine maximale Zeitauflösung wurde ein digitales Sampling-Oszilloskop mit 6 GHz Grenzfrequenz eingesetzt. Dieses Gerät TDS 820 von Tektronix wurde im Rahmen des Projektes beschafft und wird in erster Linie im Pikosekundenlabor eingesetzt (Abschnitt 2.2.2). Es erfolgte die Entwicklung des Programms *TEKMAX*, um dieses Oszilloskop über dessen IEEE 488 Schnittstelle von einem PC aus zu steuern und die Daten aufzuzeichnen.

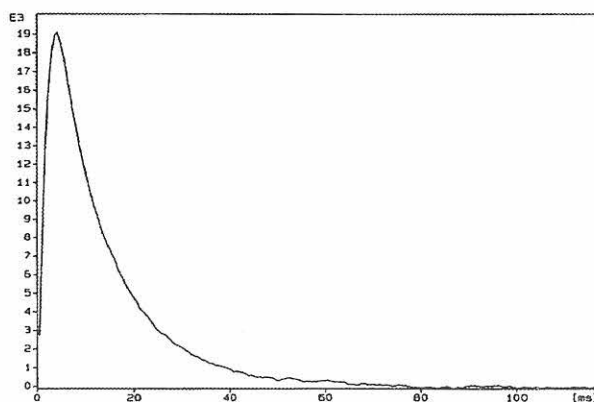


Abb. 2.6

Fluoreszenzkinetik einer intakten Leuchtstoffröhre bei äußerer Anregung mit einem Stickstofflaser mit 337 nm, registriert bei 615 nm mit dem Echtzeitmeßsystem *TRANSMAX*.

Insbesondere für Messungen an Luminophoren wurde das Meßsystem *TRANSMAX* für Echtzeitaufzeichnung mit μ s-Auflösung entwickelt. Es handelt sich dabei um einen digitalen Transientenrecorder mit 15 μ s Schrittweite auf Basis eines schnellen 12 bit AD-Wandlers vom Typ Bitzer 07-0-16. Das System ermöglicht Hard- und Softwaretriggerung sowie eine Pretriggerung (Aufzeichnung von Meßpunkten vor dem Triggerzeitpunkt) und eine Registrierung des Fluoreszenzsignals mit maximal 8192 Punkten mit 15 ms Schrittweite bei 12 bit Auflösung (siehe Abb. 2.6). Neben der Einzelschußaufzeichnung ist eine Akkumulation über eine beliebige Anzahl von Impulsen möglich. Eine on-line Darstellung der charakteristischen Abklingzeit ist möglich und wurde zur Charakterisierung von Leuchtstoffen angewandt (Kap. 4.1.).

Abb. 2.7 zeigt ein Meßbeispiel mit einem neuartigen Oszilloskop der Firma Hewlett Packard, Modell HP 54522A, daß im Herbst 1994 getestet wurde. Diese Gerät besitzt eine Grenzfrequenz von 500 MHz und kann eine Echtzeitaufzeichnung mit 10^9 Punkten pro Sekunde durchführen. Bei Schrittweiten unter 1 ns pro Meßpunkt arbeitet das Gerät als Sampling-Oszilloskop. Damit läßt sich eine Einzelschußmessung mit Zeitaufösungen im Bereich von

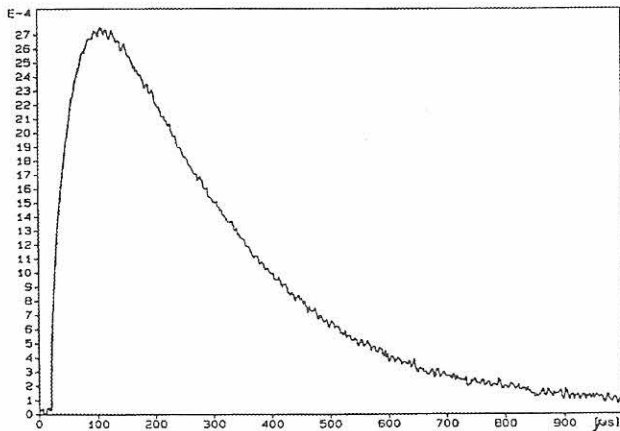


Abb. 2.7
Fluoreszenzkinetik eines europiumhaltigen Leuchtstoffes, gemessen mit einem Echtzeitoszilloskop Hewlett-Packard 54522A (Anregung 254 nm, Emission 413 nm).

einigen Nanosekunden durchführen. Diese Meßtechnik könnte in nächster Zeit für analytische Anwendungen von Fluoreszenzmarkern mit längeren Fluoreszenzlebensdauern interessant werden. Als zukünftige gerätetechnische Weiterentwicklung sind auch neuartige Multi-Stopp Scaler mit 0.5 ns Schrittweite (Fast ComTech Model 7886) in Kombination mit Photomultipliern im Photon-Counting Modus (z. B. der vorhandene Hamamatsu H5783) denkbar.

Auf der Basis dieser unterschiedlichen elektronischen Aufzeichnungsverfahren ist im Nanosekundenlabor möglich, den zeitlichen Verlauf von Fluoreszenzen oder Phosphoreszenzen mit Zeitauflösungen von 10^{-10} bis 10^{-1} Sekunden aufzuzeichnen.

Abb. 2.8 demonstriert die Ergebnisse von Referenzmessungen an einem gebräuchlichen Zeitstandard für Fluoreszenzkinetik. Als Übersicht über die in der Fluorometrie eingesetzten Referenzsubstanzen können die IUPAC-Empfehlungen dienen [19]. Diese Ergebnisse belegen die Funktionsfähigkeit des Nanosekunden-Laserimpulsfluorometers. Die Tabelle 2.2 zeigt die im Nanosekundenlabor einsetzbaren Meßverfahren mit ihren Zeitauflösungen, typischerweise nutzbaren Zeitbereichen, dem Signal-

Tabelle 2.2
Übersicht über die verschiedenen Meßverfahren im Nanosekundenlabor

Meßverfahren	Zeitauflösung, FWHM IRF	bestimmbare Abklingzeiten	Signal/Rausch-Verhältnis	Standardabweichung Abklingzeit
Sampling, TDS 820 mit PIN-Diode	0.6 ns	0.2 ns - 1 µs	100 - 250	2 %
Sampling, MFA 105 mit PMT	1.2 ns	0.5 ns - 1 µs	50 - 100	7 %
Boxcar, MFA 105 mit PMT	0.5 µs	1 µs - 10 ms	80 - 150	7 %
Echtzeit, Einzelschuß, TRANSMAX	50 µs	30 µs - 10 s	50 - 80	6 %
Echtzeit, akkumuliert, TRANSMAX	50 µs	30 µs - 10 s	100 - 250	3 %
Echtzeit, akkumuliert, HP 54522A	5 ns	5 ns - 10 s	200 - 300	3 %

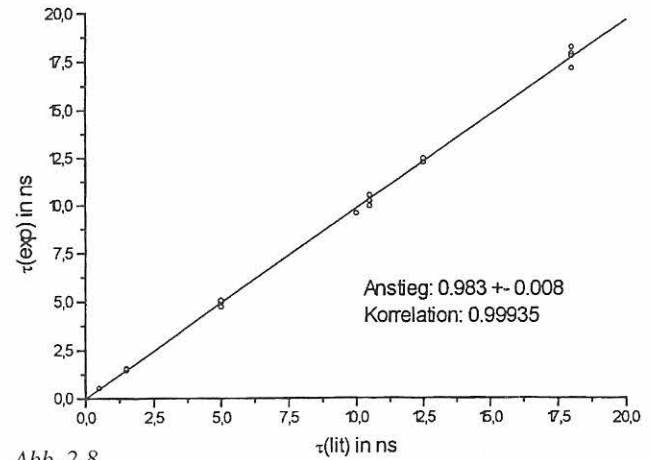


Abb. 2.8
Gegenüberstellung eigener Ergebnisse $t(exp)$ und Literaturwerte $t(lit)$ der Abklingzeiten von Chinisulfat bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen: [1] Ware und Baldwin, [2] Chen, [3] Lampert et al. und [4] Pant et al..

Rausch-Verhältnis sowie einer Angabe für die Standardabweichung einer zu bestimmenden Abklingzeit.

2.2 Laserimpulsfluorometer mit Pikosekunden-Zeitauflösung

2.2.1 Fluoreszenzanregung

Die gebräuchlichste Variante der durchstimmbaren Erzeugung von Laserimpulsen zur Fluoreszenzanregung mit Pikosekunden-Impulsen ist die Benutzung von modengekoppelten Farbstofflasern, gepumpt entweder mit einem Argon-Ionen-Laser oder mit einem frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser (Nd: YAG = Neodym: Yttrium-Aluminium-Granat). Zum Erreichen des UV-Spektralbereiches müssen die Ausgangsimpulse des Farbstofflasers, z. B. mit Rhodamin 6G betrieben, verdoppelt werden. Damit erreicht man aber nur den Bereich bis etwa 280 nm. Für eine Frequenzverdreifung in den Bereich unter 250 nm ist die Leistung von Farbstofflasern mit zirka 150 mW zu gering, es müßte ein zusätzlicher Verstärker benutzt werden. Dieser Weg der Generierung von UV-Impulsen ist damit technisch sehr aufwendig.

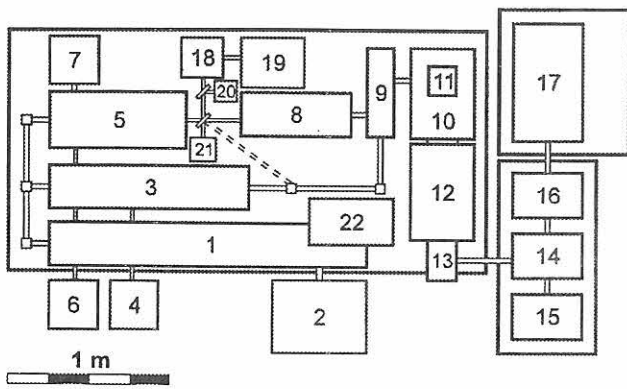


Abb. 2.9

Experimenteller Aufbau des Laserimpulsfluorometer mit Piko-sekunden-Zeitauflösung

- 1 Argon-Ionen Pump Laser Spectra Physics Model 2040E-15S
- 2 Stromversorgung des Argon-Ionen Pump Lasers
- 3 Farbstofflaser Spectra Physics Modell 3500
- 4 Pumpsystem für Farbstofflaser Model 2760
- 5 Titan-Saphir Laser Spectra Physics Tsunami Model 3950
- 6 Kristallkühlung für Tsunami
- 7 Steuerelektronik für Tsunami
- 8 Frequenzvervielfacher für Tsunami Spectra Physics Model 3981-3
- 9 Strahlführung mit Moden- und Graufiltern
- 10 Wechselwirkungseinheit, Probenraum
- 11 Probenhalter, Kryostat Oxford CF1204 optional
- 12 Subtraktiver Doppelmonochromator Amko 01-002S
- 13 Mikrokanal Photomultiplier Hamamatsu R3809U mit Kühlgehäuse
- 14 Versorgungssysteme für Multiplier, Verstärker, Monochromator usw.
- 15 Digitales Speicher Sampling Oszilloskop Tektronix TDS 820
- 16 Elektroniksystem zur zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung
- 17 Computersystem
- 18 Scanning Autokorrelator Spectra Physics Model 409-06
- 19 Oszilloskop für Autokorrelator
- 20 Referenzempfänger für Triggerzeitpunkt
- 21 Laser-Leistungsmesser Spectra Physics Model 405
- 22 Modelocker-Elektronik Spectra Physics Model 451

In der Zeit der Projektbeantragung wurden die ersten Exemplare von modengekoppelten Pikosekundenlasern mit einem aktiven Medium auf der Basis von Titan-Saphir-Einkristallen verfügbar. Gegenüber den bis dahin benutzten Lasern unter Verwendung organischer Farbstoffe in Lösungen erbrachten die neuen Titan-Saphir Laser einen enormen Qualitätssprung. Das Verstärkungsprofil des Titan-Saphir Laser reicht von zirka 690 nm bis 1050 nm und ist damit etwa 10 mal breiter als der eines konventionelle Farbstofflasers. Neben einem größeren Abstimmbereich ermöglicht die größere Anzahl von synchronisierbaren Moden auch eine Impulsverkürzung um eine Größenordnung gegenüber konventionellen Farbstofflasern auf etwa 80 Femtosekunden. Darüber hinaus besitzt der Titan-Saphir Laser eine ausgezeichnete Impulsstabilität und bietet mit seiner Ausgangsleistung von 1.5 W beste Voraussetzungen für eine nachfolgende Frequenzvervielfachung in den UV-Spektralbereich. Aus diesen Gründen wurde ein Titan-Saphir Laser für das Pikosekunden-Lasersystem ausgewählt, wobei der Hersteller Spectra Physics bevorzugt

wurde, weil zu diesem Zeitpunkt kein anderer Hersteller die Frequenzvervielfachung in den UV-Bereich anbieten konnte.

Das von Spectra Physics gelieferte Lasersystem umfasst die folgenden Komponenten:

- Argon-Ionen Laser Model 2040E-15S als Pumplichtquelle, cw 15 W all line, 1.5 W bei 514 nm mode locked, Modelocker Model 451
- Titan-Saphir Laser, TSUNAMI, Model 3950, 1.5 W, 720 - 840 nm, 1.5 ps, 82 MHz
- Frequenzvervielfacher Model 3981-3 für 2., 3. und 4. Harmonische, 2ω : 360-420 nm, 150 mW; 3ω : 240-280 nm, 50 mW; 4ω : 203-210 nm, 5 mW
- Kurzpulsfarbstofflaser Model 3500, 100 mW, 575 - 720 nm, 2 ps, 82 MHz
- Zubehör: Autokorrelator, Leistungsmesser, schwingungsgedämpfter Tisch.

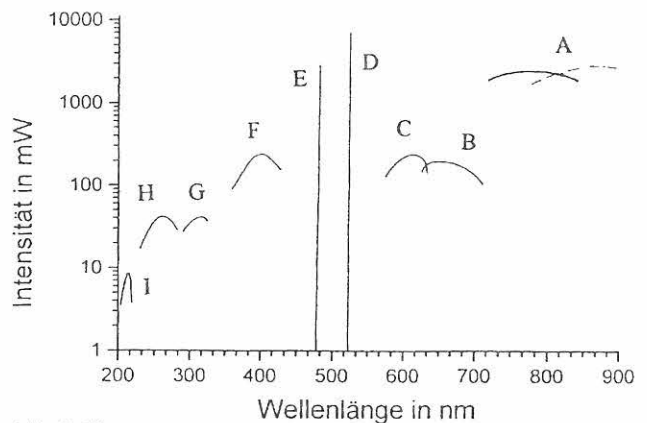


Abb. 2.10

Verfügbare Intensitäten zur Fluoreszenzanregung mit Picosekunden-Impulsen

- A - Grundwelle des Titan-Saphir-Lasers 720-840 nm und optionaler NIR-Spiegelsatz bis 960 nm
- B - Farbstofflaser mit Farbstoff DCM
- C - Farbstofflaser mit Farbstoff Rhodamin 6G
- D - Pumpwellenlänge des Argon-Ionen Lasers 514 nm, mode-locked mit 140 ps FWHM
- E - Pumpwellenlänge des Argon-Ionen Lasers 488 nm, mode-locked mit 200 ps FWHM
- F - Frequenzverdoppelte des Titan-Saphir Lasers
- G - Frequenzverdoppelte des Farbstofflasers mit Rhodamin 6G
- H - Frequenzverdreifachte des Titan-Saphir Lasers
- I - Frequenzvervierfachte des Titan-Saphir Lasers

Wie die Abb. 2.10 zeigt, ist es mit diesem Lasersystem möglich, im Spektralbereich von 203 bis 840 nm mit nur kleinen Lücken eine Fluoreszenzanregung mit Pikosekunden-Impulsen vornehmen zu können.

Durch bauliche Probleme, die in den Zwischenberichten bereits geschildert wurden, verzögerte sich der erste Abschnitt der Inbetriebnahme des Lasersystem bis April 1993. Die vollständige Nutzbarkeit aller Komponenten, einschließlich des gesamten UV-Bereichs, war im August 1993 erreicht. Die Beschaffung einer verbesserten Elektronik zur Einzelphotonenzählung (siehe 2.2.4) erfolgte durch eine Umwidmung von nicht in Anspruch genommenen Lohnmitteln. Diese optimale Elektronik-Konfiguration war ab März 1994 voll nutzbar.

2.2.2 Optische Wechselwirkungseinheit

Die Aufgabe der optischen Wechselwirkungseinheit besteht darin, die Laserimpulse zur Fluoreszenzanregung auf die Probe zu leiten sowie deren Fluoreszenz auf die Empfänger-systeme abzubilden. Bei der Verwendung von frequenz-vervielfachter Laserstrahlung ist es nötig, die nicht zur Fluoreszenzanregung benötigte und störende Grundwelle zu unterdrücken. Dies erfolgte mit einem speziellen Quarz-Dispersionsprisma (Typ Pellin-Broca), das die verschiedenen Wellenlängen räumlich trennt. Durch Drehen des Prismas wird der benötigte Spektralbereich ausgewählt und durch eine Spaltblende auf die Probe geleitet. Die Regelung der Anregungsintensität erfolgt über eine Strahl-schwächungseinheit nach einem Patent von Jasny. Dieses Gerät ermöglicht eine reproduzierbare Intensitätsver-stellung über etwa fünf Größenordnungen ohne Strahl-versatz, wie er durch Neutralfilter auftreten kann. Die Leistungsmessung wird mit einem thermoelektrischen Präzisionsleistungsmesser Spectra Physics Model 405 durchgeführt.

Die Abbildung des Lasers auf die Probe erfolgt mit einer kinematisch justierbaren Quarzlinse. Für Proben unter-schiedlicher Art werden verschiedene Probenhalter benutzt. Der modulare Probenraum ermöglicht die Untersuchungen an Mikroküvetten ebenso wie an ganzen Leuchtstoffröhren oder die Benutzung eines Heliumkryostaten zur Proben-temperierung.

Die Fluoreszenz der Probe wird über zwei justierbare Quarz-linsen ($f/4$) auf den Monochromator abgebildet. Im Bereich des Parallelstrahles zwischen den beiden Linsen können Kanten- oder Polarisationsfilter eingesetzt werden. Zur Unterdrückung der störenden Fluoreszenzdepolarisationseffekte auf die Fluoreszenzkinetik wird mit einem Analysator im magischen Winkel zur Polarisationsrichtung der Anregungsstrahlung gemessen. Zur Separation des Spektralbereiches für die Registrierung der Fluoreszenz werden zwei verschiedene Monochromatoren oder in Aus-nahmefällen Interferenzfilter benutzt. Auf die Besonderheiten der Nutzung der Monochromatoren wird in Abschnitt 2.2.5. eingegangen.

Bei analytischen Anwendungen der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie ist die Messung der Fluoreszenz eines Analyten gegenüber einer Referenz, z. B. dem reinen Lösungsmittel eine typische Aufgabe. Für diese Aufgabe wurde eine spezielle optische Wechselwirkungseinheit konstruiert (Abb. 2.11) und im Rahmen des Projektes hergestellt. Dieses System besteht aus zwei optisch identischen Strahlwegen mit identischen Probenhaltern (9). Von der Laserstrahlung wird mit einem Strahlteiler (1) ein geringer Teil auf die Triggerdiode (2) gelenkt. Die Anregungsintensität kann über einen Neutralfiltersatz (3) eingestellt werden. Durch ein rotierendes verspiegeltes Flügelrad (4) wird der Anregungslaser alternierend auf eine der beiden Proben geleitet. Mit den Graukeilen (5) erfolgt der Abgleich beider Wege auf gleiche Intensität. Mit einem justierbaren Quarz-Keilpaar (7) wird der Lichtweg und damit die Zeitachse beider Wege ausgeglichen. Das Fluoreszenzlicht wird

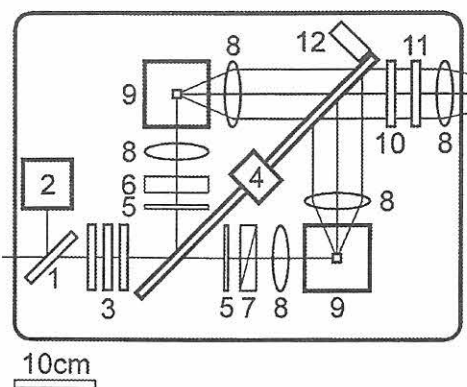


Abb. 2.11

Schema der Zweistrahlordnung der optischen Wechselwirkungseinheit

- | | |
|-----------------------|----------------------------|
| 1 Strahlteiler, | 2 Triggerdiode, |
| 3 Neutralfiltersatz, | 4 verspiegeltes Flügelrad, |
| 5 Neutralfilter-Keil, | 6 Quarz-Wegkompensator, |
| 7 Quarz-Wegsteiler, | 8 justierbare Quarzlinse, |
| 9 Probenhalter, | 10 Polarisationsfilter, |
| 11 Kantenfilter, | 12 Flügelrad-Trigger. |

über justierbare Linsen (8) und Filter (10,11) auf den Monochromator abgebildet. Eine Lichtschranke (12) liefert Triggersignale zur Erkennung des aktiven Lichtweges an die SPC-Elektronik. Auf diese Weise ist es möglich, Probe und Referenz quasi simultan messen zu können. Auf die Details des Ablaufs von Messung und Auswertung wird in Kapitel 2.3.1. eingegangen. Diese Zweistrahlordnung hat sich für viele analytische Anwendungen bewährt und soll auch für zeitaufgelöste Messungen mit hohem Proben-durchsatz und für zukünftige Automatisierungen der Meß-technik weiterbenutzt und weiterentwickelt werden.

Für Messungen mit maximaler Zeitauflösung oder Empfindlichkeit wurde ein einfacherer Aufbau mit nur einem Probenhalter benutzt. Dabei wurden Analyt und Referenz durch Wechseln der Küvette nacheinander gemessen. Die gegenüber der Einkanalordnung größere Anzahl optischer Elemente, wie Linsen, Filter und der rotierende Spiegel bei der Zweistrahlordnung vermindert die Zeitauflösung von 30 ps FWHM der IRF auf zirka 60 ps und verdoppelt den Streulichtanteil.

2.2.3 Meßprinzip der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung

Die resultierende Zeitauflösung, z. B. charakterisiert durch die Impulshalbwertsbreite FWHM, ergibt sich als Faltung der Impulshalbwertsbreiten der einzelnen Komponenten, wie Laser, Empfänger und Elektronik. In Näherung läßt sich die resultierende Halbwertsbreite T_R durch folgende Formel beschreiben: $T_R = (T_L^2 + T_P^2 + T_E^2)^{1/2}$, mit T_L als Halbwertsbreite des Lasers, T_P als Halbwertsbreite des Photomultipliers und T_E als Halbwertsbreite der Elektronik. Beim heutigen Stand der Technik sind Halbwertsbreiten der Laser unter 1 ps problemlos möglich. Sampling-Oszilloskope mit 20 GHz, entsprechend $T_E \approx 10$ ps, und mehr sind ebenfalls Stand der Technik. Demzufolge stellen bei diesem Meßprinzip die Photoempfänger den begrenzenden Faktor dar. Es gibt zwar sehr schnelle Photo-

dioden mit Halbwertsbreiten unter 40 ps (z. B. Antel AR-S5 oder Newport PX), aber durch ihre geringe Empfindlichkeit und insbesondere ihre kleine aktive Fläche von unter 25 x 25 mm sind sie für die Fluoreszenzspektroskopie nur sehr eingeschränkt verwendbar. Die Fluoreszenz räumlich ausgedehnter Proben, insbesondere nach Passieren eines Monochromators, läßt sich nur unter erheblichen Intensitätsverlusten auf so eine kleine Fläche abbilden.

In den letzten fünf bis zehn Jahren erfolgte eine beachtliche Weiterentwicklung von Photomultipliern in Richtung kürzerer Impulsbreiten und geringerer Wellenlängenabhängigkeit in Form von Mikrokanal Photomultipliern (MCP PMT- Microchannel Plate Photomultiplier Tube, Prinzip siehe [5]). Aber auch diese Photomultiplier erreichen nur Halbwertsbreiten von etwa 300 bis 500 ps.

Einen entscheidenden Fortschritt in der erzielbaren Zeitauflösung erbrachte die Methodik der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TC SPC), die inzwischen eine weite Verbreitung gefunden hat (zum Meßprinzip siehe [6, 7]). Man reduziert die Fluoreszenzintensität so weit, daß je Anregungsimpuls maximal ein einziges Photon vom Photomultiplier registriert wird. Der Zeitpunkt des Eintreffens des Photons in Relation zum Anregungsimpuls (Trigger) läßt sich sehr genau bestimmen. Diese Genauigkeit wird von den Flankensteilheiten sowie dem Jitter des Einzelphotonenimpulses des Photomultipliers und des Triggers bestimmt. Eine Statistik über eine große Anzahl von Perioden und Fluoreszenzphotonen ergibt den zeitlichen Verlauf des Fluoreszenzsignals. Da das Jitter der Vorderflanken der Impulse deutlich kleiner als deren Halbwertsbreite ist, läßt sich eine Verschmälerung der Halbwertsbreite der resultierenden Apparatefunktion (üblicherweise als IRF Instrument Response Function bezeichnet) um etwa eine Größenordnung erzielen (siehe Abb. 2.12.).

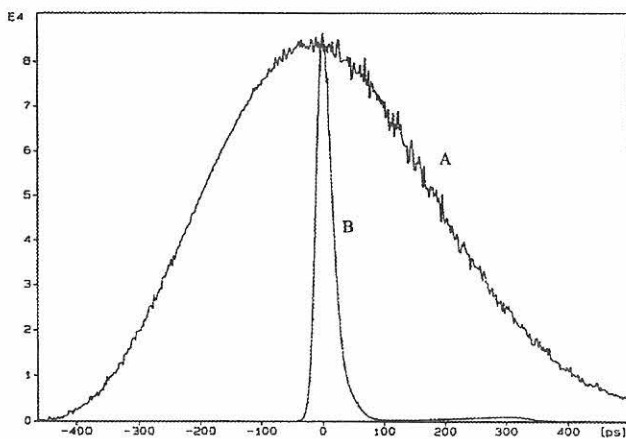


Abb. 2.12
Vergleich der Halbwertsbreite des Analogimpulses eines Mikrokanal Photomultipliers Hamamatsu R3809U mit der durch Einzelphotonenzählung meßbaren Systemfunktion. Beide Messungen erfolgten mit identischer Laseranregung (1.3 ps Halbwertsbreite bei 410 nm).

Lineare Darstellung, Impulshöhen normiert
A - Ausgangsimpuls des MCP R3809U, FWHM 428 ps, gemessen mit einem 6 GHz Sampling Oszilloskop TEK TDS 820
B - Instrument Response Funktion der Einzelphotonenzählung mit dem selben MCP, FWHM 30.4 ps

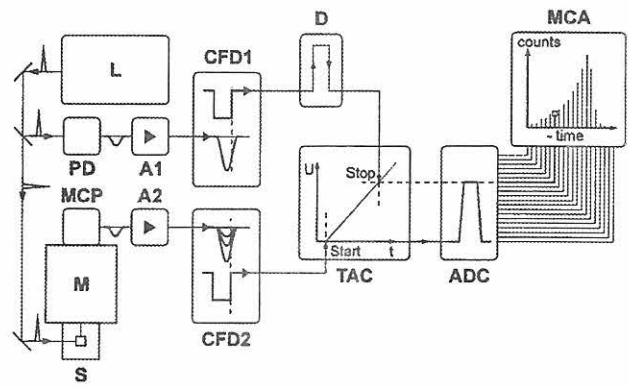


Abb. 2.13
Schema der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung

Komponente:	empfohlener Typ:
L Lasersystem	Spectra Physics Tsunami
PD Photodiode als Trigger	Hamamatsu S4753
A1 schnelle Verstärker 1	Hamamatsu C4890
A2 schneller Verstärker 2	Hamamatsu C4267
MCP Mikrokanal Photomultiplier	Hamamatsu R3809U
M Subtraktiver Doppelmonochromator	AMKO M01-002S
S Probenhalter, Kryostat	Oxford CF1204
CFD1 Constant-Fraction Discriminator 1	Tennelec TC454 modif.
CFD2 Constant-Fraction Discriminator 2	Tennelec TC454 modif.
D Verzögerungsleitung	Ortec 425A
TAC Zeit-Amplituden-Konverter	Tennelec TC864
ADC Analog-Digital Wandler	Ortec Spectrum ACE 4K
MCA Multikanalanalysator	Ortec Spectrum ACE 4K

Das Schema der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung ist in Abb. 2.13 dargestellt. Ein Teil des Anregungsimpulses des Lasers (L) gelangt auf eine Photodiode (PD), die als Trigger fungiert. Deren elektrisches Signal gelangt über einen Verstärker (A1) zu einem Constant-Fraction Discriminator (CFD1), der aus dem annähernd gaußförmigen Impuls der Diode einen definierten Schaltimpuls (Standard: negative fast NIM) erzeugt. Der Hauptteil des Laserimpulses gelangt auf die Probe (S). Deren Fluoreszenz wird über einen Monochromator (M) auf einen Mikrokanal Photomultiplier (MCP) abgebildet. Dessen Ausgangssignal wird verstärkt (A2) und ebenfalls in der Impulsform aufbereitet (CFD2). Das Fluoreszenzsignal von CFD2 startet im Zeit-Amplituden-Konverter (TAC) eine zeitlinear wachsende Spannung (z. B. 1 V pro 5 ns). Der Spannungsanstieg wird mit dem Triggersignal von CFD1 gestoppt. Die erhaltene Spannung wird mit einem Analog-Digital-Wandler (ADC) digitalisiert. In einem Vielkanalzähler (MCA) wird ein Ereignis (registriertes Fluoreszenzphoton) in dem, der Spannung entsprechenden, Kanal registriert. Nach einer entsprechenden Anzahl von Durchläufen entsteht im MCA ein Abbild des Zeitverlaufs des Fluoreszenzsignals.

Die negative Richtung der Zeitachse entsteht durch die formal vertauschte Reihenfolge von Start und Stop durch Trigger und Fluoreszenz. Das erfolgt, damit die Elektronik nur durch das Fluoreszenzphoton gestartet wird. Ein Start durch jeden Triggerimpuls würde viele Male umsonst erfolgen und die Totzeit der Elektronik erhöhen, da Fluoreszenzphotonen im Mittel nur von jedem hundertsten Anregungsimpuls registriert werden dürfen. Damit wird

garantiert, daß nicht zwei Photonen zusammen in eine Meßperiode fallen können (Wahrscheinlichkeit dafür kleiner als 10^{-4}), was das Meßverfahren erheblich beeinträchtigen würde. Die CFD schalten nur dann definiert, wenn der Eingangsimpuls nur von einem einzigen Photon stammt. Außerdem würde das zweite Photon einer Meßperiode für die Zählung verlorengehen und damit die Statistik der Verteilung der Photonen über die Zeit, das heißt die Abklingkurve, verfälschen.

2.2.4 Vergleich der getesteten Elektronikkomponenten

Nachdem im vorigen Abschnitt das Meßprinzip der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung beschrieben wurde, sollen nun die technischen Details der Gerätekomponenten sowie die Kriterien zu deren Auswahl und Zusammenstellung dargelegt werden. Dies erfolgt insbesondere vor dem Hintergrund, daß es nur wenige „schlüsselfertige“ technische Lösungen gibt und damit der Anwender oftmals gezwungen ist, sein Meßsystem aus Komponenten unterschiedlicher Hersteller selbst zusammenzustellen. *Abb. 2.13* gibt einen Überblick über das Gesamtsystem und enthält Empfehlungen für die Einzelkomponenten, die im weiteren spezifiziert werden.

Zu Beginn des Projektes befand sich bereits eine Elektronik zur TC-SPC in unseren Laboratorien in Betrieb, die in den Jahren 1990 bis 1991 innerhalb einer Nutzergemeinschaft auf der Basis von Entwicklungsarbeiten von Dr. W. Becker vom Zentralinstitut für Optik und Spektroskopie (ZOS) im Eigenbau entstand. Diese Elektronik war an den damals verfügbaren Stand der Technik von Lasern und insbesondere der Photomultiplier angepaßt und sollte im Rahmen der Arbeit im Projekt weiter genutzt werden. Es zeigte sich aber, daß es mit dieser Elektronik nicht möglich war, die Leistungsfähigkeit der inzwischen verfügbaren Mikrokanal Photomultiplier voll ausnutzen zu können. Aus diesem Grund wurde die Nachweiselektronik durch Leihgeräte anderer Arbeitsgruppen und verschiedener Gerätehersteller weiterentwickelt. Auf der Basis dieser umfangreichen Tests wurden aus umgewidmeten Finanzmitteln des Projektes die optimalen elektronischen Komponenten beschafft, um eine kontinuierliche Arbeit unter Ausnutzung der Leistungsgrenzen der Gesamtapparatur gewährleisten zu können.

1. Photodioden

Funktion: Optischer Empfänger als Quelle für elektrisches Triggersignal, liefert Referenz für die Bestimmung des Zeitpunktes des Eintreffens des Fluoreszenz-Photons,
Anforderungen: hohe Bandbreite (>1GHz), ausreichende Empfindlichkeit, geringer Dunkelstrom, gute Temperaturstabilität,
getestete Typen: Hamamatsu S4753 (Si-PIN, 1.5 GHz)

WF SP 102

(Si-Pin Diode, alte DDR-Produktion)

WF SP 104(Si-Avalanche-Diode,
alte DDR-Produktion)

Antel AR-S1 (Si-Avalanche-Diode)

Die PIN-Diode S4753 von Hamamatsu wurde mit einem Eigenbau Streifenleiter für die Stromversorgung und als BNC-Adapter versehen. Sie erreicht folgende Werte: 320-350 ps FWHM, negative Amplitude 300 bis 500 mV ohne Impulsverbreiterung, bei homogener Ausleuchtung mit Laser-Parallelstrahl (2 mm Durchmesser) ohne Streuscheibe. Diese Variante ist der beste Kompromiß im Preis-Leistungs-Verhältnis in Relation zu den fertig gekapselten Dioden (z. B. Antel) mit Preisen ab 3 500 DM aufwärts. Si-PIN Dioden sind gegenüber Avelanche-Dioden wegen der geringeren Betriebsspannungen einfacher zu handhaben und besitzen eine wesentlich geringere Temperatur- und Spannungsdrift der Impulsform. Zum Erreichen der besten Zeitauflösung ist nicht unbedingt die Diode mit der kürzesten Anstiegszeit am geeignetsten. Optimale Ergebnisse werden erzielt, wenn die Impulsform der Kompensationskennlinie des Diskriminators entspricht, so daß die Impulshöhenfluktuation optimal kompensiert werden kann (siehe auch 5.)

Empfehlung: Si-Pin-Diode mit 1-1.5 GHz

2. Signalverstärker für Photodioden

Funktion: Verstärkung der Ausgangsimpulse der Trigger-Photodiode

Anforderungen: Bandbreite (>1GHz),

Verstärkung etwa 20 dB

getesteter Typ: Hamamatsu C4890 (1.5 GHz, 20 dB)

In den meisten Anwendungsfällen war es möglich, eine genügende Lichtintensität für die Triggerdiode aufzubringen, um auf einen Verstärker verzichten zu können. Der Verstärker C4890 erwies sich ansonsten als sehr gut geeignet, sodaß auf Tests weiterer Verstärker verzichtet wurde.
Empfehlung: wenn möglich, ohne Verstärker

3. Photomultiplier (MCP)

Funktion: Empfindlicher Empfänger zum Nachweis einzelner Photonen

getestete Typen: 18 ELU FM

Hamamatsu R3809U

Bei dem 18 ELU FM handelt es sich um einen konventionellen Photomultiplier aus russischer Produktion. Dieser Typ war der zu DDR-Zeiten beste verfügbare Multiplier für die Zeitaufgelöste Spektroskopie und entspricht in seinem Leistungsvermögen etwa dem Mitte der achtziger Jahre international gebräuchlichen XP2020 von Philips [8]. Mit dem 18 ELU FM erreichten wir zu Testzwecken ohne Optimierung von Fokus und Dynodenspannung eine Halbwertsbreite der Systemfunktion (IRF) von 270 ps (*Abb. 2.16*). Ansonsten wurde nur mit dem im Rahmen dieses Projektes beschafften Mikrokanal Photomultiplier Hamamatsu R3809U gemessen, der seine Stellung als bester verfügbarer Typ bestätigte. Auf weitere meßtechnische Details wird im Abschnitt 2.2.5. eingegangen.

Empfehlung: Hamamatsu R3809U

4. Signalverstärker für Photomultiplier

Funktion: Bereitstellung der Eingangsimpulse in der notwendigen Impulshöhe,

getestete Typen: Ortec VT 120A (0.4 GHz, 24 dB)

Ortec Model 9306 (1.0 GHz, 38 dB)

- Hamamatsu C4267 (1.3 GHz, 28 dB,
7 dB Noise)
Hamamatsu C5594 (1.5 GHz, 36 dB,
5 dB Noise)

Die Höhe der Ausgangsimpulse der Photomultiplier beträgt typischerweise 10 - 50 mV, was an der unteren Grenze für die meisten Diskriminatoren liegt. Die optimale Eingangsspannung liegt bei etwa 0.3 bis 1 V. Zum Schutz des Verstärkers vor statischen Kabelaufladungen durch die Hochspannung ist zwischen MCP und Verstärker ein Attenuator dringend zu empfehlen (Impedanz 50 Ohm, Teiler 1:2 bis 1:5, Grenzfrequenz > 1GHz, z. B. HP8494B, TEK 015-1001-00). Für eine optimale Signalqualität sollten MCP, Attenuator und Verstärker möglichst direkt, ohne lange Kabel, über SMA-Steckverbinder gekoppelt werden. In Übereinstimmung mit theoretischen Berechnungen von Cova und Ripamonti [9] zeigte sich, daß eine optimale Zeitauflösung erreicht wird, wenn die Bandbreite des Verstärkers etwas geringer ist, als die des MCP. Eine noch höhere Bandbreite des Verstärkers hätte zwar eine etwas höhere Flankensteilheit des Eingangsimpulses für den CFD zur Folge. Aber bei steigender Bandbreite erhöht sich auch das Rauschen, was zu einem deutlich verstärkten Jitter der Impulsflanke und somit zu einer Verschlechterung der Zeitauflösung führt [10, 11]. Aus diesem Grunde erwies sich der Verstärker Hamamatsu C4267 mit 1.3 GHz als besser geeignet als der vergleichbare Typ mit 1.5 GHz. Darüber hinaus ist die Verstärkung des C5594 mit 36dB zu hoch, um mit dem verwendeten 1:2 Attenuator optimale Eingangsimpulse für den Diskriminator zu erzeugen.

Empfehlung: Hamamatsu C4267

5. Diskriminatoren (CFD)

Funktion: Erzeugen eines definierten Schaltimpulses hoher Flankensteilheit aus näherungsweise gaußförmigen Impulsen fluktuierender Höhe.

Getestete Typen: Canberra 233
Canberra 2128
Tennelec TC453
Tennelec TC454
Tennelec TC454 modif.
Ortec Model 9307

Ein Problem dieser Baugruppen besteht darin, daß sie für den Standardeinsatz in der Kernstrahlungsmeßtechnik technisch konzipiert sind [12]. Die Impulsbreite der modernen MCP ist aber mit etwa 500 ps deutlich kürzer als die der Kernstrahlungsdetektoren mit Zeiten zwischen 5 und 30 ns. Deshalb mußten gebräuchliche Typen, wie der TC454 für MCP's modifiziert werden. In Übereinstimmung mit theoretischen Arbeiten von Cova [11] zeigten Testmessungen mit Leihgeräten, daß ältere Modelle wie der TC453 bei Verwendung geeigneter langsamerer Vorverstärker durchaus gute Ergebnisse liefern können. Das erst seit Mitte 1994 verfügbare und noch sehr teure Modell 9307 von Ortec erwies sich im Betrieb mit MCP als zuverlässig, ohne daß bei einem eintägigen Test eine bessere Zeitauflösung als mit dem modifizierten TC454 erreicht wurde. Auf Fragen der störenden Interferenzen in Diskriminatoren wird im Abschnitt 2.2.5. noch detailliert eingegangen.
Empfehlung: Tennelec TC454 modif.

6. Verzögerungsleitung

Funktion: Anpassung der Länge der Signalwege von Trigger und Fluoreszenzimpuls, sodaß sie in ihrer Zeitdifferenz optimal im Arbeitsbereich des Zeit-Amplituden-Konverters liegen. Damit nicht ständig Kabel unterschiedlicher Länge umgesteckt werden müssen, sollte eine entsprechende NIM-Baugruppe verwendet werden. Ansonsten ist die Verzögerungsleitung unkritisch bezüglich der Leistungsparameter des Gesamtsystems.

Empfehlung; Tennelec TC412A oder Ortec 425A

7. Zeit-Amplituden-Konverter (TAC)

Funktion: Erzeugen einer Ausgangsspannung proportional zur Zeitdifferenz der Eingangssignale von Trigger und Fluoreszenz

Getestete Typen: Ortec Model 567
Ortec Model 457 (Bias)
Tennelec TC864 (Bias)

Die gegenwärtig verfügbaren TAC haben einen „schnellsten“ Meßbereich von 50 ns und erzeugen dabei eine Ausgangsspannung von 10 V, die an die gängigen ADC angepaßt ist. Für Messungen mit maximaler Zeitauflösung und damit Meßbereichen deutlich unter 50 ns wird die Auflösung des ADC (kleinster Meßbereich 10 V) nicht ausgenutzt. Deshalb empfehlen wir einen TAC mit integriertem Verstärker (BIAS), um die Ausgangsspannung des TAC optimal an die Auflösung von ADC und MCA anpassen zu können. Wenn nur mit geringerer Zeitauflösung (sub-Nanosekundenbereich) gemessen werden soll, ist ein TAC ohne BIAS (z. B. Ortec 457) ausreichend. Generell läßt sich feststellen, daß die beiden Marktführer Ortec und Tennelec technisch fast identische Produkte anbieten, wobei Tennelec einen teilweise deutlichen Preisvorteil besitzt.
Empfehlung: Tennelec TC864

8. Analog-Digital-Konverter und Multikanal-Analysator (ADC & MCA)

Funktion: Digitalisierung der Ausgangsspannung des TAC und Registrierung in einem Multikanal-Analysator. Meist werden beide Komponenten in einer Baugruppe zusammengefaßt, um sie optimal anzupassen. Es gibt auch kombinierbare Einzelbaugruppen.

Getestete Typen: Ortec Model 916A,
Spectrum ACE 4K. (ADC & MCA)
Intertechnique Model 7600 4K(ADC)
mit Interfast-C (MCA)

Neben der Auflösung (Kanalzahl), die typischerweise bei 10 bis 12 bit (1024 bis 4096 Kanäle) liegt, spielt die maximale Zählrate (Umsetzzeit des ADC) eine wesentliche Rolle. Für Standardanwendungen genügen preiswerte und kompakte Standardlösungen wie das Modell 916A von Ortec mit einer maximal nutzbaren Zählrate von etwa 25.000 cps. (siehe auch Abschnitt 2.2.5). Extrem schnelle Systeme, wie das von Intertechnique, mit einer Umsetzzeit von 0.7 µs erlauben Zählraten von über 500.000 cps. Diese Zählraten sind dann erforderlich, wenn photostabile Proben mit hoher Fluoreszenz-Quantenausbeute (z. B. bei Tieftemperaturmessungen) mit Lasern hoher Folgefrequenz (bei uns 82 MHz) in kurzer Zeit vermessen werden sollen. Als

Ergänzungen zu beiden von uns benutzten Varianten sind mehrere Modelle von Ortec oder Tennelec mit Zählraten bis 100.000 cps verfügbar und können, je nach Anwendungsfall, einen geeigneten Kompromiß zu den von uns getesteten Varianten darstellen. Da der MCA die Schnittstelle zwischen der Gesamtapparatur und dem Nutzer darstellt, trägt der Bedienungskomfort von dessen Software erheblich zum Gesamteindruck bei. Dabei kann Ortec mit einer technisch ausgereiften und sehr funktionellen Lösung überzeugen. Dieses hohe Niveau erreichte das neue Produkt von Intertechnique/InterPC noch nicht, es verlangt noch entsprechende Weiterentwicklungen.

Empfehlung - Standardanwendungen: Ortec Model 916A
Empfehlung - Flexibilität bei Grundlagenuntersuchungen Intertechnique/InterPC

Da, wie bereits erwähnt, die Elektronik der SPC (CFD, TAC, ADC/MCA) bislang oft nur eine Nebennutzung von Standardentwicklungen der Kernstrahlungsmeßtechnik darstellen, ergibt sich ein Bedarf an speziellen technischen Weiterentwicklungen für die Anwendung in der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie. Erste Entwicklungen in dieser Richtung liegen seit kurzem vor. Von der Firma Becker & Hickl GmbH gibt es seit Ende 1994 eine komplette TC-SPC auf einer PC-Slotkarte mit ausgezeichneten technischen Parametern, wie einer maximalen Zählrate von 10^6 cps bei Auflösungen von 10 oder 12 bit. Eine interessante Besonderheit besteht in der Fähigkeit der mehrkanaligen Verarbeitung der Signale über einen Routing-Eingang. Ein erster Test im September 1994 bestätigte auch die sehr gute Zeitauflösung von 30 ps (FWHM der IRF). Umfangreichere Erfahrungen konnten mit diesem Gerät im Projektzeitraum nicht mehr gewonnen werden. Unser Eindruck ist: wenn noch einige Verbesserungen, insbesondere der Alltags-tauglichkeit der Software erfolgen, könnte dieses Produkt die technisch beste gegenwärtig verfügbare Elektronik zur TC-SPC werden. Durch seine kompakte Bauform, ohne separate NIM-Baugruppen und „Kabelsalat“, stellt es eine hoffnungsvolle Entwicklung für breite analytische Anwendungen dar.

2.2.5 Leistungsnachweis des Meßsystems

Im Abschnitt 2.2.3 wurde gezeigt, daß die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung einen erheblichen Gewinn an Zeitauflösung im Vergleich mit der Aufzeichnung des Analogsignals Fluoreszenz ermöglicht. Aus der Tatsache des diskreten Zählens der Fluoreszenzphotonen ergibt sich weiterhin ein sehr großer Dynamikumfang und eine sehr hohe Linearität. Gleichzeitig ermöglicht die Technik des Zählens einzelner Photonen eine überragende Empfindlichkeit.

Wie bei jeder experimentellen Technik, gibt es jedoch Unterschiede zwischen dem idealen Meßverfahren und der realen technischen Umsetzung. Im Folgenden soll auf die Leistungsfähigkeit aber auch auf die potentiellen Störquellen des Pikosekunden- Laserimpulsfluorometers eingegangen werden. Die Fragen der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse werden im Abschnitt 2.3. behandelt.

1. Fluoreszenzanregung durch Laser

Die Impulsbreite des Titan-Saphir-Lasers kann je nach Justierung zwischen 1.3 und 1.6 ps liegen. Entsprechend liegen die Werte für die zweite Harmonische zwischen 1.0 und 1.3 ps und für die Dritte und Vierte zwischen 0.7 und 0.9 ps. Die Impulsbreite des Farbstofflasers liegt zwischen 1.5 und 2 ps. Da jedoch diese Zeiten klein gegenüber der Zeitauflösung der Elektronik der Einzelphotonenzählung sind, ist diese Schwankungsbreite ohne Folgen für die erzielbare Gesamt-Zeitauflösung.

2. Optische Komponenten

Beim optischen Strahlengang der Laseranregung ist sorgfältig darauf zu achten, daß störende Mehrfachreflektionen an optischen Elementen, wie Filtern, Spiegeln oder Linsen vermieden werden. Diese Reflektionen führen zu „Geisterimpulsen“ in den Abklingkurven. Durch den sehr großen Dynamikbereich der SCP können schwächste Reflektionen von unter 0.01 Prozent der Einfallintensität sichtbar werden. Bei der Verwendung von Neutralfiltern ist zu beachten, daß viele angebotene Filter, insbesondere bei UV-Anregung stark fluoreszieren und beim Ein- und Ausschwenken seitlichen Strahlversatz hervorrufen können. Zur Regelung der Strahlintensität hat sich ein Doppelprismen-Abschwächer nach einem Patent von J. Jasny bewährt. Dieses Gerät regelt die Intensität ohne Strahlversatz über fünf Größenordnungen, führt aber durch veränderte Weglängen im Inneren zu leichten zeitlichen Verschiebungen des Impulses von etwa 25 ps pro Größenordnung der Transmissionsänderung. Dieser Effekt läßt sich aber bei der Auswertung softwaremäßig kompensieren („Channel Shift“-Verfahren, siehe 2.3.3).

3. Probenraum und Küvette

Zu störenden Reflektionen kann es auch an den Wänden der Küvetten kommen. Es empfiehlt sich deshalb, die Oberflächen leicht aus der Senkrechten gegenüber dem Anregungsstrahl herauszudrehen um Mehrfachreflektionen zu verhindern. Dies gilt in besonderem Maße bei Tieftemperaturmessungen für die Fenster der Kryostaten. Auch ist darauf zu achten, daß keine reguläre Reflektion an der Probenoberfläche in die Linse der Fluoreszenzabbildung fällt. Auf Grund der hohen Zeitauflösung spielen Fragen der Laufzeit des Lichtes bei räumlich ausgedehnten Proben bereits eine spürbare Rolle. Bei Messungen in 10 x 10 mm Standardküvetten wird deshalb nur eine FWHM der IRF von 40 bis 45 ps erreicht, wogegen bei punktförmigen Fluoreszenzquellen die FWHM bei etwa 30 ps liegt – 1 ps entspricht einem Lichtweg von 0.3 mm. Aus diesem Grund wurden Systeme mit sehr kurzen Abklingzeiten in Mikroküvetten mit geringer Schichtdicke vermessen.

4. Spektralapparate

Die Aufgabe des Spektralapparates besteht darin, den gewünschten Spektralbereich der Fluoreszenz auszuwählen und störende Anteile wie die Anregungsstrahlung oder die Raman-Streuung möglichst gut zu unterdrücken. Als dispersive Elemente werden Prismen oder Beugungsgitter benutzt. Die Prismen oder Gitter führen dazu, daß unterschiedliche Wellenlängen auf unterschiedliche Orte abgebildet werden. Diese unterschiedlichen Orte bedeuten zu-

gleich unterschiedliche Wegstrecken und damit verschiedene Laufzeiten des Lichtes. Dieser Effekt, auch als „Color-Shift“ oder „Color-Delay“ bezeichnet, führt, in ähnlicher Weise wie der Color-Shift von Photomultipliern, zu einer wellenlängenabhängigen scheinbaren Verschiebung der Fluoreszenzabklingkurve. Dadurch ist es mitunter unmöglich, reale Änderungen der Lebensdauer von apparativen Meßfehlern unterscheiden zu können (als Überblick siehe [13]). Bei Gittermonochromatoren, die nicht speziell für die zeitaufgelöste Spektroskopie entwickelt wurden, kann die Laufzeitdispersion, je nach Brennweite und Öffnungsverhältnis in der Größenordnung von 3 - 10 ps pro nm liegen. Durch spezielle holografische Gitter kann dieser störende Effekt auf etwa 0.1 ps pro nm reduziert werden. Ein solcher Einfachmonochromator von der Firma IBH aus Glasgow wird bei uns für empfindliche Messungen mit geringeren Anforderungen an die Zeitauflösung eingesetzt. *Abb. 2.14* zeigt die zeitliche Verschiebung des Impulses als Funktion der Wellenlänge.

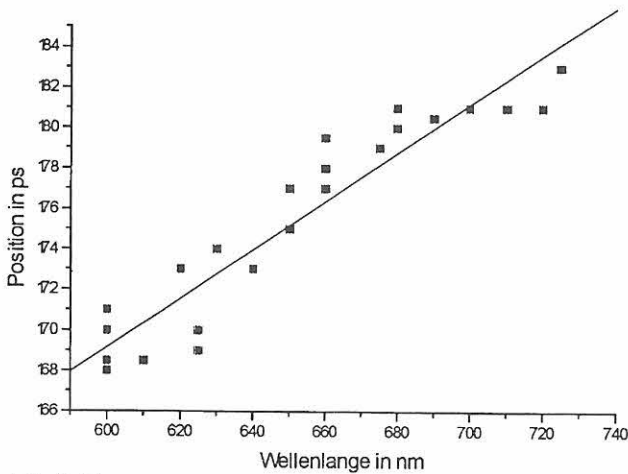


Abb. 2.14
Verschiebung des Fluoreszenzmaximums von Pinacyanol als Funktion der Emissionswellenlänge, gemessen mit einem Einfachmonochromator IBH-5M, Anregung 375 nm.

Die Laufzeitdispersion dieses Monochromators wurde an Hand der Fluoreszenz von Pinacyanol gemessen, das eine breitbandige homogene Bande mit konstanter Abklingzeit von 11 ps besitzt. Die Gültigkeit dieser Voraussetzung ergibt sich aus Literaturdaten [5, 14] und den nachfolgend beschriebenen eigenen Ergebnissen. Die einzelnen Wellenlängen wurden in zufälliger Reihenfolge vermessen, um eine Drift des Lasers ausschließen zu können. Die Anpassung der Meßwerte ergab eine Dispersion von (0.123 ± 0.009) ps/nm (Korrelation = 0.94). Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit den Herstellerangaben für den Monochromator IBH-5M von 0.13 ps/nm. Damit ist dieses Gerät für die Zeitaufösungen bis sub-Nanosekunden gut geeignet. Auf Grund seiner hohen Lichtstärke (Seya Namioka Anordnung, f/3) ist er insbesondere für den fluorometrischen Spurennachweis prädestiniert.

Zum Erreichen einer maximalen Zeitauflösung verwendet man subtraktive Doppelmonochromatoren, in denen der zweite Monochromator die Abbildungsfehler des ersten dadurch kompensiert, daß er in der Beugungsordnung -1, also rückwärts, durchlaufen wird. Bei dem von uns benutz-

ten Modell 01-002S von AMKO LTI (Czerny-Turner Anordnung, 2 mal 0.20 m Brennweite, f/4, 1200 L/mm, 4 nm/mm) konnte bei einer zur *Abb. 2.14* analogen Meßreihe im Rahmen der Meßgenauigkeit von ± 0.03 ps/nm keine Laufzeitdispersion festgestellt werden. Die *Abb. 2.15* zeigt im Gegensatz zu *Abb. 2.14* keine wellenlängenabhängige Verschiebung der Fluoreszenz von Pinacyanol. Die Lichtstärke des AMKO Doppelmonochromators beträgt bei 500 nm und gleicher spektraler Spaltbreite etwa ein Drittel des Einfachmonochromators von IBH.

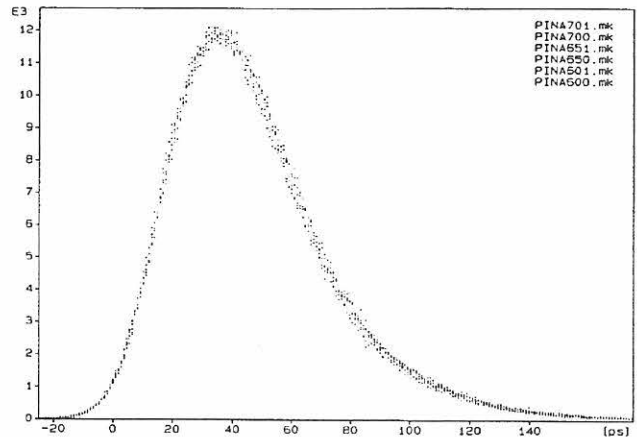


Abb. 2.15
Überlagerung der normierten Fluoreszenzabklingkurven von Pinacyanol bei 6 Emissionswellenlängen zwischen 600 und 700 nm, gemessen mit dem subtraktiven Doppelmonochromator AMKO 01-002S, Anregung 375 nm.

Es sollte auch beachtet werden, daß Abbildungsfehler von Monochromatoren bei großen Spaltbreiten und bei Doppelmonochromatoren auch bei zu kleinen Spaltbreiten (unzureichende Synchronität) zunehmen. Optimal im Sinne ungestörter Impulsformen und bester Zeitauflösung erwiesen sich Spaltbreiten zwischen 1 mm und 3 mm.

5. Photomultiplier

Photomultiplier zeigen auf Grund ihrer Bauart Abhängigkeiten in ihrer Impulscharakteristik von der Wellenlänge und der Anzahl der eintreffenden Photonen. Unterschiedliche Wellenlängen führen auf dem Wege des äußeren Photoelektrischen Effekts dazu, daß die primären Photoelektronen die Kathode mit unterschiedlicher kinetischer Energie und damit unterschiedlicher Geschwindigkeit verlassen. Daraus folgen unterschiedliche Laufzeiten und auch Impulsbreiten der Elektronenkaskade im PMT, im englischen als Transit-Time Spread (TTS) bezeichnet. So verändert sich zum Beispiel die Halbwertsbreite der IRF eines PMT XP2020 von 235 ps bei 585 nm auf 375 ps bei 292 nm [8]. Daneben führen hohe Zählraten zum Entstehen von Raumladungswolken an den Dynoden, die das Beschleunigungsfeld im PMT teilweise abschirmen und damit ebenfalls zu einer Impulsverbreiterung beitragen können.

Durch Erhöhen der Betriebsspannung und damit der elektrischen Feldstärke im PMT können diese Effekte in ihrer Quantität vermindert werden. Damit erhöht sich allerdings der Dunkelstrom des PMT extrem stark und führt so zu einer Verminderung des Signal-Rausch-Verhältnisses. *Abb. 2.16* zeigt diese Spannungsabhängigkeit für einen PMT 18 ELU

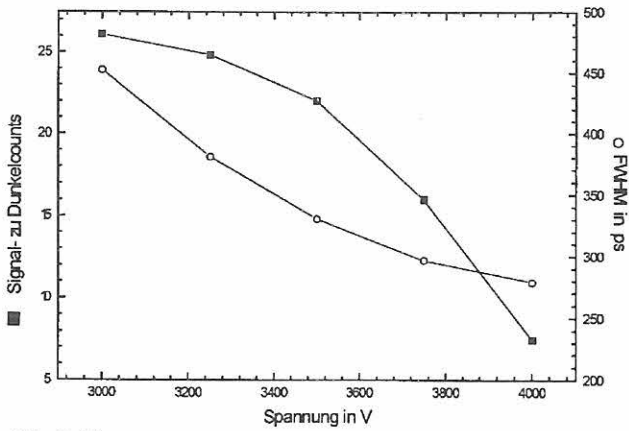


Abb. 2.16
Abhängigkeit von Impulshalbwertsbreite und Signal/Rausch-Verhältnis des Photomultipliers 18 ELU FM von der Betriebsspannung

■ Verhältnis Signal- zu Dunkelcounts
o Halbwertsbreite der Systemfunktion in ps

FM. Die Lichtstärke wurde so gewählt, daß die Zählrate bei 4000 V mit 16.000 cps im typischen Bereich einer Fluoreszenz-Zählrate lag. Unter diesen Bedingungen wird die beste Zeitauflösung erzielt. Aber der Dunkelstrom von über 2.000 cps verschlechtert das Signal/Rausch-Verhältnis.

Mit der Entwicklung von Mikrokanal Photomultipliern (Microchannel Plate Photomultiplier Tube - MCP PMT), die wesentlich höhere elektrische Feldstärken aufweisen, wurden diese Probleme deutlich vermindert. Damit erreichte die Empfängertechnik eine Qualität, die es ermöglicht, die Methoden der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie weiter zu verbreiten und auch für analytische Aufgaben einsetzen zu können (Überblick in [15]). Bei dem von uns eingesetzten MCP R3809U, dem neuesten Typ von Hamamatsu, konnte im Wellenlängenbereich von 250 nm bis 840 nm keine signifikante Veränderung der Systemfunktion (typische FWHM 33 ± 3 ps) festgestellt werden. Unsere Ergebnisse der besten erzielbaren Zeitauflösung von 27 ps FWHM der IRF liegen in guter Übereinstimmung mit den 25.4 ps in den Datenblättern von Hamamatsu und anderen Literaturwerten, z. B. Kume et al.[5]. Durch gezielte Selektion innerhalb der Exemplarstreuung und um-

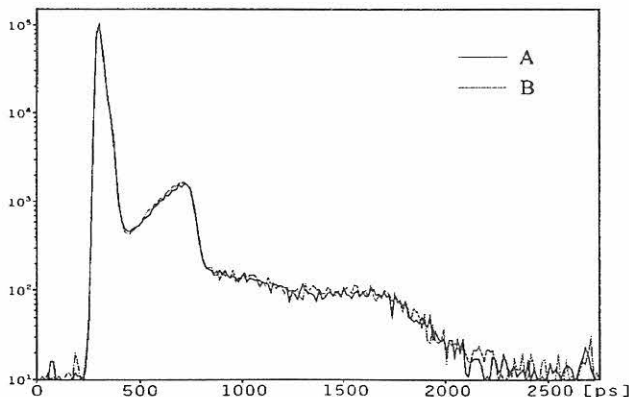


Abb. 2.17
Systemfunktion des Mikrokanal Photomultipliers R3809U bei unterschiedlichen Zählraten. (A) 5.000 cps, (B) 250.000 cps, Wellenlänge 414 nm, Einzelphotonenzählung PC-Slotkarte SPC 300 von Fa. Becker und Hickl GmbH

fangreiche Optimierungen sowie ohne Monochromator liegt der beste bisher gemessene Wert bei 18 ps [16]. Im Gegensatz zur ersten Generation der MCP (z. B. R1594U siehe Boens et al. [14]) zeigt Abb. 2.17, daß die Impulsform des R3809U bis zu Zählraten von 250.000 cps unabhängig von der Zählrate ist.

Ein weiterer wesentlicher Vorteil der MCP ist ihre geringe Dunkelzählrate und der damit verbundene große Signal-Rausch Abstand. Abb. 2.18 zeigt den geringen Dunkelstrom des R3809U von unter 20 cps bei Raumtemperatur und das in weiten Bereichen der Betriebsspannung nahezu konstante Signal/Rausch-Verhältnis. Für die Messung schwächster Signale kann die Dunkel-Zählrate des R3809U durch Kühlung auf -30 °C auf unter 0.1 cps reduziert werden.

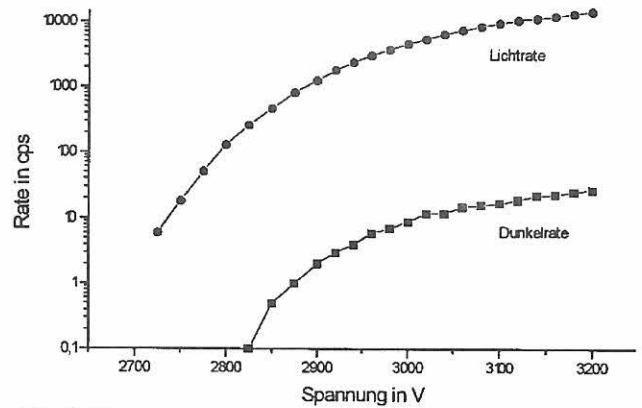


Abb. 2.18
Abhängigkeit von Signal- und Dunkel-Zählrate des MCP R3809U von der Betriebsspannung bei Raumtemperatur

6. Elektronisches System der SPC

Die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (SPC) ist ein Meßverfahren mit hervorragender Leistungsfähigkeit, man sollte aber, wie bei allen anderen Verfahren auch, die theoretischen Grenzen sowie die Unterschiede zwischen dem idealisierten Verfahren und der realen technischen Umsetzung beachten [15]. Aus diesem Grund sollten kritische Testmessungen, z. B. mit standardisierten Referenzsubstanzen (siehe IUPAC-Empfehlungen [19]), zur Inbetriebnahme jedes Meßsystems gehören. Führt man eine Testmessung durch, bei der zeitlich unkorrelierte Photonen, zum Beispiel abgeschwächtes Tageslicht, auf den Empfänger gelangen, ist eine über die Zeit konstante Signalhöhe zu erwarten. Reale Messungen zeigen Abweichungen der Counts pro Kanal, die je nach Art der verwendeten Elektronikbaugruppen zwischen 0.1 und 5 Prozent des Mittelwerts liegen können.

Quellen für diese Nichtlinearität können sein:

- Interferenzen der Trigger- und Signalkanäle des Diskriminators
- die differentielle Nichtlinearität der Kennlinie des Zeit-Amplituden-Converters (TAC) und des eventuell benutzten Differenzverstärkers (BIAS)
- Nichtlinearitäten des Analog-Digital-Wandlers (ADC).

Die jeweiligen Fehleranteile können durch Austausch einzelner Komponenten eingegrenzt und eventuell minimiert

werden. Häufig ist der Anteil der Diskriminatoren bestimmend. Liegen Trigger und Signal zeitlich eng benachbart, das heißt in der Größenordnung der Dauer des Schaltvorgangs des Diskriminators von zirka 5 ns, kommt es zum Beispiel über die gemeinsame Stromversorgung beider Kanäle zu störenden Interferenzen. Deshalb sollten unter Umständen zwei räumlich getrennte Diskriminatoren benutzt werden, insbesondere bei hohen Folgefrequenzen und damit geringen Zeitdifferenzen von Signal und Trigger. Diese Lösung ist allerdings mit zum Teil erheblichen Mehrkosten verbunden. Eine andere Möglichkeit besteht in der Korrektur der Abklingkurven mittels Division durch eine Referenzkurve eines unkorrelierten Signals. Abb. 2.19 zeigt die Welligkeit einer Abklingkurve vor und nach der Korrektur.

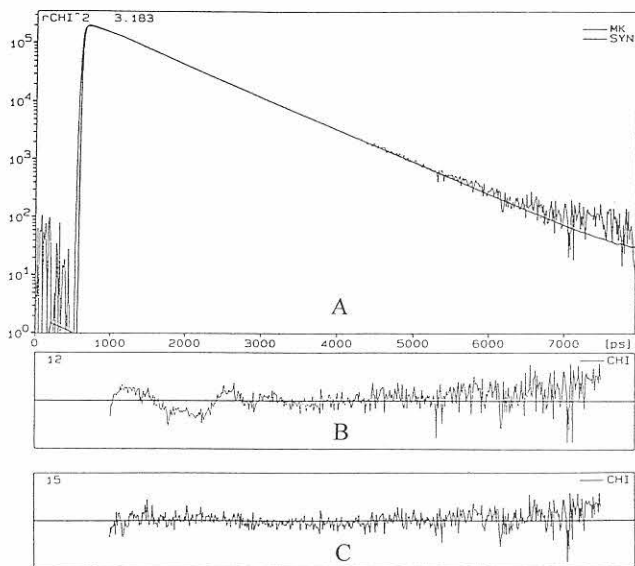


Abb. 2.19 Fluoreszenzabklingkurve von Cresylviolett (A) sowie die Residuen der numerischen Anpassung (B) vor und (C) nach der Korrektur der differentiellen Nichtlinearität des Elektronik-Systems der Einzelphotonenzählung, Anregung: 595 nm, Emission 635 nm

Ein begrenzender Faktor für Messungen ist die Umsetzzeit des Analog-Digital Wandlers (ADC). Der ADC benötigt eine feste Zeit, um die Ausgangsspannung des TAC zu messen. Diese Zeit, während der er für weitere Eingangsimpulse gesperrt ist, nennt man Totzeit. Um diese Zeit verlängert sich die Gesamtdauer einer Messung gegenüber der Meßzeit, in der das System aktiv ist, das heißt, in der das System eintreffende Fluoreszenzsignale verarbeiten könnte. Hohe Signalintensitäten führen aber nicht nur zu einer relativen Verlängerung der Gesamtmeßzeit sondern auch zu einer Beeinflussung der Halbwertsbreite der Systemfunktion. Tabelle 2.3 zeigt eine Meßreihe, bei der mit sieben verschiedenen Laserintensitäten jeweils so lange gemessen wurde, bis im Maximum der Systemfunktion eine Signalthöhe von 100.000 counts erreicht wurde. Benutzt wurde ein ADC/MCA vom Typ ORTEC 916A ACE 4K mit einer festen Umsetzzeit von 15 µs, was eines maximalen Zählrate von 67.000 cps entspricht.

Dabei zeigte sich, daß die IRF bei Zählraten von über 10.000 cps zunehmend verbreitert wird. Dieser Effekt beruht darauf, daß mit zunehmender Zählrate die Wahrschein-

Tabelle 2.3 Abhängigkeit der Halbwertsbreite der Systemfunktion der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung von der Zählrate

Zählrate in cps	Meßzeit in s	Totzeit in %	FWHM der IRF in ps
51767	7	75	36.29
21350	17	52	35.02
10093	35	27	34.13
5809	57	16	33.48
3617	90	11	32.10
1117	293	3	33.89
444	680	1	32.85

lichkeit dafür zunimmt, daß der nächste Impuls in die Totzeit fällt. Damit gehen vorrangig Ereignisse aus dem Maximum der Fluoreszenzverteilung verloren, was zu einer Abflachung führt, womit die FWHM der IRF von 32 ps auf 36 ps zunimmt. Es ist möglich, Totzeitfehler der Messung bis zu einem gewissen Grad im Anschluß numerisch zu korrigieren (pile up rejection). Sollten allerdings häufiger Messungen mit hoher Zählrate erfolgen, ist der Einsatz eines schnelleren ADC vorzuziehen. Wir benutzten in diesem Fall einen ADC mit einer Umsetzzeit von 0.6 µs (Intertechnique Modell 7600) oder die „single board“ SPC 300 von Becker und Hickl, mit dem Zählraten von 250.000 cps ohne Impulsdeformation gemessen werden konnten (Abb. 2.17).

7. Dynamik und Rauschen

Ein wichtiger Parameter für die Qualität eines Meßverfahrens ist das Signal/Rausch-Verhältnis (S/N). Aus der Quantenstatistik des Lichtes folgt, daß die Standardabweichung der Zählrate gleich der Wurzel der Zählrate ist (siehe Abb. 2.20). Die maximale Zählrate, die vom Gesamtsystem verarbeitet werden kann, ist etwa 10^6 cps. Bei einer typischen Meßzeit von 500 s für eine Abklingkurve aus 500 Punkten beträgt damit die mittlere Intensität eines Kanals 10^6 counts, was einer Standardabweichung von 10^3 counts und ein S/N von ebenfalls 10^3 bedeutet. Die numerische Analyse einer Abklingkurve ist in ihrem Verhalten

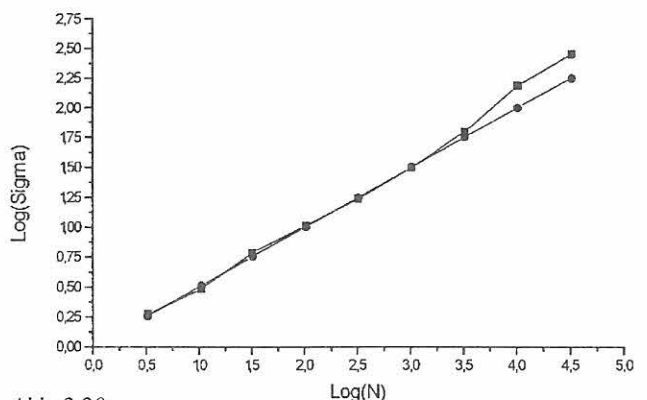


Abb. 2.20 Standardabweichung Sigma der Meßwerte der Einzelphotonenzählung als Funktion der Photonenzahlen N pro Kanal. Die Standardabweichungen wurden aus einer Meßserie einer Wolframbandlampe mit unterschiedlichen Akkumulationszeiten berechnet.

- gemessene Standardabweichung
- theoretische Werte $\text{Sigma} = N^{1/2}$

bezüglich der Standardabweichung der einzelnen Kanäle mit einer Mittelung zu vergleichen. Eine numerische Kurvenanpassung über 500 Meßkanäle führt zu einer Verbesserung des S/N für einen zu bestimmenden Kurvenparameter um den Faktor $500^{1/2}$ durch die Mittelung. Bei N zu bestimmenden Parametern vermindert sich das S/N für die Parameter um jeweils $N^{1/2}$. Werden zwei Parameter, eine Abklingzeit und eine Amplitude, aus einer einzigen Messung bestimmt, erhält man somit ein apparatives Signal/Rausch-Verhältnis von maximal 1.6×10^4 . Einen guten Überblick über die Problematik des Signal/Rausch-Verhältnisses bei unterschiedlichen spektroskopischen Techniken findet man bei Neumann [17].

Die Standardabweichung der Meßgrößen wird in erster Linie aber nicht durch diese prinzipiellen Grenzwerte des Meßverfahrens bestimmt, sondern durch die Reproduzierbarkeit aller relevanten Parameter. So wird die Standardabweichung der Amplitudenwerte in dominanter Weise vom Fehler der Anregungsintensität des Lasers bestimmt. Die Drift der Intensität kann innerhalb der zuvor angenommenen Meßzeit von 500 Sekunden 0.3 bis 1 Prozent, bei frequenzvervielfachter Strahlung 1 bis 5 Prozent, betragen. Durch einen Referenzkanal, z. B. mit der in 2.2.2. beschriebenen Zweistrahlordnung, kann dieser Fehler bis auf seinen Linearitätsfehler reduziert werden, der bei einer Referenzdiode mit Verstärker und AD-Wandler bei etwa 0.1 Prozent liegt. Der Linearitätsfehler der Intensitätsmessung bei einer Veränderung der Anregungsintensität liegt im Bereich von 0.5 Prozent. Die Standardabweichung des Absolutwertes der Intensität beträgt 2 Prozent (Leistungsmesser Spectra Physics Modell 405).

Abb. 2.20 belegt die Abhängigkeit der Standardabweichung von der Anzahl der counts pro Kanal. Die Messung erfolgte mit einer Wolframbandlampe mit zeitlich konstanter Intensität. Bei hohen Photonenzahlen gibt es eine leichte Abweichung von Wurzelgesetz, die auf den zusätzlichen systematischen Fehler der differentiellen Nichtlinearität

der SPC basiert. Diese relativen Fehler, die in Punkt 6 und in Abb. 2.20 beschrieben wurden, sind unabhängig von der Photonenzahl und übersteigen bei hohen Zahlen die statistischen Fluktuationen.

Die Standardabweichungen von Abklingzeiten werden auch von der Reproduzierbarkeit (Reinheit, Stabilität) der Probe bestimmt. Sie betragen bei einfachexponentiellen Systemen zwischen etwa 1 und 5 Prozent und können, wie Tabelle 2.4 zeigt, an der Grenze der Zeitauflösung auch 10 bis 20 Prozent erreichen. Auf Fragen der Analyse mehrfachexponentieller Systeme wird in Abschnitt 2.4.3. eingegangen.

Weil die Standardabweichung der counts eines Meßkanals intensitätsabhängig und damit nicht für alle Kanäle gleich ist, kann in einer Abklingkurve oder einer Serie von Abklingkurven ein Dynamikbereich von mehr als fünf Größenordnungen überdeckt werden. So beträgt im Maximum der obersten Kurve von Abb. 2.21 mit 7×10^5 counts pro Kanal die Standardabweichung 837 counts, wobei die unterste Kurve mit 7 ± 2.6 counts pro Kanal noch über der Nachweisgrenze liegt. Die numerische Anpassung der Abklingkurve ergab eine Amplitude von (7.05 ± 0.15) counts (siehe Abb. 2.22). Diese Verbesserung korrespondiert gut mit der oben gemachten Abschätzung, daß sich bei einer Anpassung der Amplitude über 3.5 ns mit zirka 270 Kanälen die Standardabweichung um etwa den Faktor $270^{1/2} \approx 16$ vermindern sollte. Die Amplitude der oberen Kurve in Abb. 2.21 mit einer 10^5 -fachen Meßzeit von 3160 s beträgt (699245 ± 15) counts. Die ermittelte Abklingzeit aller Kurven beträgt einheitlich (765 ± 5) ps.

Zu beachten ist, daß bei hohen Konzentrationen die Kinetik des Fluoreszenzabklings durch den Effekt der Reabsorption und Reemission verfälscht werden kann. Eine Erhöhung der Konzentration führt phänomenologisch zu einer Vergrößerung der gemessenen Abklingzeit und zu einer Zunahme nicht einfach-exponentieller Anteile. So

Substanz Lösungsmittel	eigene Messung Abklingzeit in ps	Literaturdaten	
		Abklingzeit in ps	Referenz
Pinacyanol Ethanol	12 ± 2	11 ± 2	Lois et al., 1988 [20]
		13 ± 1	Boens et al., 1990 [14]
		10.1	Kume et al., 1992 [5]
Cryptocyanine Azeton	50.5 ± 2.5	51 ± 3	Boens et al., 1990 [14]
		50.1	Kume et al., 1992 [5]
Cryptocyanine Ethanol	77 ± 3	81 ± 1	Boens et al., 1990 [14]
		74.4	Kume et al., 1992 [5]
Rose Bengal Wasser	162 ± 6	160 ± 10	Spears et al., 1978 [21]
Rose Bengal Ethanol	775 ± 15	760 ± 20	Spears et al., 1978 [21]
Rose Bengal i-Propanol	965 ± 20	980 ± 30	Spears et al., 1978 [21]
Rhodamine B Ethanol	2900 ± 35	2880 ± 60	Lampert et al., 1983 [3]
Cresylviolett Methanol	3170 ± 25	3200 ± 40	Ware et al., 1983 [22]

Tabelle 2.4
Übersicht der verwendeten Referenzsubstanzen im Vergleich mit ausgewählten Literaturdaten.

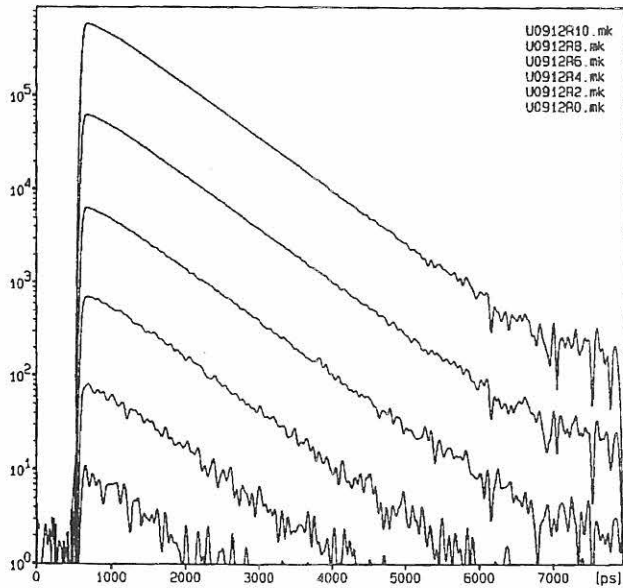


Abb. 2.21
 Meßserie der Fluoreszenz von Rose Bengal in Ethanol mit Meßzeiten von 32.6 ms bis 3160 s; Anregung 420 nm, 82 MHz, 1.5 ps, 0.5 mW, Fluoreszenz 575 nm, 600 Meßpunkte mit 13.3 ps Abstand

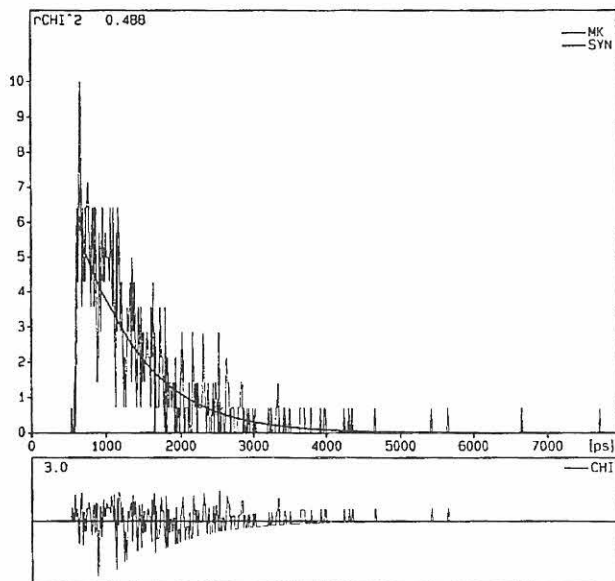


Abb. 2.22
 Numerische Anpassung der untersten Fluoreszenzabklingkurve aus Abb. 2.21 von Rose Bengal in Ethanol mit 31.6 ms Meßzeit und insgesamt 596 gezählten Photonen in linearer Darstellung.

muß für Farbstoffe wie Rhodamine B oder Cresylviolett, bei Konzentrationen über 10^{-4} M mit einem meßbaren Effekt gerechnet werden. Für Messungen in diesem Konzentrationsbereich wurde von Sakai et al. [18] eine numerische Modellierung der Abklingkinetik durch eine Reihenentwicklung angegeben.

8. Zeitauflösung

Die Zeitachse der Vielkanalanalysatoren (MCA) wurde routinemäßig mit Hilfe von elektrischen Verzögerungsleitungen (1 bis 64 ns) kalibriert, die vorher mit einem 6 GHz Sampling-Oszilloskop Tektronix TDS 820 ausgemessen wurden. Eine unabhängige optische Kalibrierung erfolgte mittels Mehrfachreflexionen des Laserstrahls in

einem Etalon bekannten Lichtweges. Die Richtigkeit des Gesamtvorgangs von Messung und Auswertung wurde mit verschiedenen Referenzsubstanzen bekannter Abklingzeit durchgeführt. Abb. 2.23 und Tabelle 2.4 (S. 35) zeigen die gute Übereinstimmung unserer Ergebnisse mit Literaturdaten. Als Übersicht über die in der Fluorometrie eingesetzten Standards können die IUPAC-Empfehlungen dienen [19].

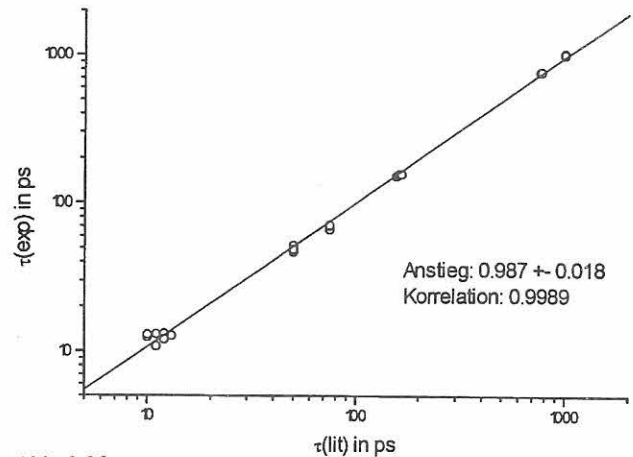


Abb. 2.23
 Grafische Gegenüberstellung eigener experimenteller Ergebnisse t (exp) der Abklingzeiten von verschiedenen Referenzsubstanzen mit ausgewählten Literaturwerten t (lit) von Tabelle 2.4 (S. 35).

2.2.6 Multiplex-Verfahren in der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie

Unter dem Begriff Multiplex-Verfahren versteht man die Messung der Fluoreszenz mit gleichzeitiger spektraler und zeitlicher Auflösung. Diese Meßtechnik gewann in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Auf dem Gebiet der photophysikalischen und photochemischen Grundlagenuntersuchungen liefert dieses Verfahren auf hervorragende Weise Informationen über Phänomene des Energie- und Ladungstransfers sowie über Relaxationsvorgänge und Konformationsänderungen in fluoreszierenden Systemen. Daneben liefern diese quasi-dreidimensionalen Daten interessante Ansatzpunkte für ihre analytische Applikation in Form eines „Fingerprints“ zur Identifizierung von Substanzen in komplexen Gemischen, wie zum Beispiel polyzyklische Aromaten in Oberflächengewässern [23].

Quasi-Multiplex Methode

Bei diesem Verfahren benutzt man eine konventionelle einkanalele Elektronik, vorzugsweise eine zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung, in Kombination mit einem automatisierten Fluoreszenzmonochromator. Die Abklingkurven werden sequentiell bei verschiedenen Emissionswellenlängen aufgezeichnet (siehe Abb. 2.24). Das von uns benutzte System mit Lasern hoher Folgefrequenz und einer extrem schnellen Elektronik mit einer maximalen Zählrate von 10^6 cps erlaubt Meßzeiten pro Wellenlänge im Bereich von 0.5 bis 30 Sekunden. Damit liegt die typische Gesamtzeit für eine Messung, in Abhängigkeit von spektraler und zeitlicher Auflösung sowie Quantenausbeute und Photostabilität der Probe, bei 10 bis 100 Minuten. Aus der Serie der Abklingkurven bei verschiedenen Wellenlängen lassen sich softwaremäßig quasi-dreidimensionale „Fin-

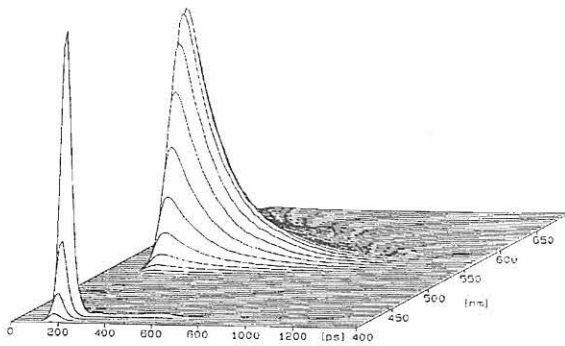


Abb. 2.24

Zeit- und spektralaufgelöste Messung eines Fluoreszenzstandards für die zeitaufgelöste Spektroskopie. Linke Bande: Fluoreszenz-anregungsimpuls bei 420 nm mit einer durch die Nachweiselektronik begrenzten Halbwertsbreite von 45 ps, rechte Bande: Fluoreszenzprofil von Rose Bengal 5×10^{-6} mol/l in Wasser mit der Abklingzeit von (162 ± 6) ps

gerprints“ oder auch zeitaufgelöste Spektren (DAS Decay Associated Spectra) erstellen.

Echte Multiplex-Methoden

Eine interessante Möglichkeit wird seit etwa einem Jahr von der Firma EuroPhoton angeboten. Dieses Verfahren basiert auf einem Patent der Firma ELDI aus St. Petersburg für einen zweidimensionalen Mikrokanal-Photomultiplier. Ein auf die Photokathode auftreffendes Photon erzeugt einen Impuls, der über eine vertikale und eine horizontale Elektrode durch spezielle Verzögerungsleitungen abgegriffen wird. Durch die Berechnung der Zeitdifferenzen und Summen beider Signale ist es möglich, Zeitpunkt und Auftreffort des Photons auf der Kathode zu bestimmen. Bildet man die Fluoreszenz mit einem Polychromator räumlich auf den Photomultiplier ab, erhält man eine simultane zeitliche und spektrale Auflösung [24]. Dieses System benötigt nur zwei handelsübliche Diskriminatoren und einen speziellen Zweikanal-Analog-Digital-Wandler, vorzugsweise mit integriertem Transputer zur Summen und Differenzberechnung im schnellen on line Betrieb. Die maximale Zeitauflösung beträgt zirka 90 ps [24]. Die Ortsauflösung von 100 mm gestattet bei einer Breite der aktiven Fläche von etwa 20 mm eine Unterteilung in 200 Wellenlängen-Kanäle. Die spektrale Auflösung ergibt sich aus der Wahl des Polychromators. Mit einer typischen Dispersion in der Größenordnung von 10 nm/mm für einfache Polychromatoren ergeben sich Werte um 1 nm pro Kanal und 200 nm Meßbereich.

Eine andere Konfiguration wird von den Firmen Edinburgh Instruments oder IBH Glasgow angeboten. Dort verwendet man ebenfalls einen Polychromator zur Abbildung der Fluoreszenz auf einen Photomultiplier mit mehreren diskreten elektrisch unabhängigen Kanälen (z. B. Mikrokanal-Photomultiplier mit einer linearen 16-Kanal-Zeile). Jeder Kanal benötigt einen separaten Diskriminator zur Impulsaufbereitung. Daran schließt sich ein „Routing Modul“ an, das die Signale an den nachfolgenden gemeinsamen Zeit-Amplituden-Wandler weiterleitet und dem zweidimensionalen Vielkanal-Analysator (Dimensionen: Zeit und Kanal=Wellenlänge) mitteilt, welchem Kanal das Signal zugeordnet wird.

Mit Photomultiplier Arrays (z. B. 10 x 10 MCP-Array Hamamatsu R4110U) sind auch Bildauswerteverfahren (Fluorescence Imaging) mit Zeitauflösung um 100 ps möglich, für die es in der Biochemie oder Zellphysiologie interessante Anwendungen gibt. Neben etablierten Herstellern wie Hamamatsu findet man solche Geräteentwicklungen auch bei kleinen spezialisierten Firmen, wie Becker & Hickl GmbH. Deren Einzelphotonenzählung bietet die Möglichkeit, mit einem speziellen Router und nur einem einzelnen Diskriminator arbeiten zu können, was im Vergleich zu Edinburgh Instruments oder IBH mit mehreren separaten Diskriminatoren erhebliche Hardwareeinsparungen bedeutet.

Vergleich der verschiedenen Methoden

Der Vorteil der beiden echten Multiplex-Verfahren ist, das im Prinzip alle Fluoreszenzphotonen des interessierenden Wellenlängenbereiches simultan ausgewertet werden können. Damit kann die Meßzeit bei n-Kanälen gegenüber der sequentiellen Messung um den Faktor n verkürzt werden. Dieser Vorteil kann aber nur bei Proben mit geringer Fluoreszenz oder bei Anregungsquellen mit geringer Folgefrequenz, z. B. Blitzlampen mit kHz-Folgefrequenz, genutzt werden. Bei der Benutzung von modengekoppelten Lasern mit hohen Folgefrequenzen (>70 MHz) wird die maximale Zählrate der Fluoreszenzphotonen in der Regel durch die von allen Kanälen gemeinsam genutzten ADC und MCA auf je nach Typ 10^4 bis 5×10^5 cps begrenzt. In diesem Fall ergibt sich keine wesentliche Verkürzung der Meßzeit gegenüber dem sequentiellen Verfahren.

Ein Vorteil des sequentiellen Verfahrens besteht in der wesentlich größeren Wahlfreiheit der spektralen Messung. Mit einem programmgesteuerten Monochromator können sowohl Wellenlängenbereich und Schrittweite als auch Auflösung (Spaltbreite) frei gewählt werden. Durch die Verwendung eines Polychromators (Spektrograph) bei den echten Multiplex-Verfahren ist die Wahl des Wellenlängenbereiches und der Auflösung nur durch einen Gitterwechsel möglich. Daneben ist die Anzahl der Kanäle hardwaremäßig fixiert. Die 200 Kanäle bei EuroPhoton sollten in der Regel ausreichend sein, während die 16 Kanäle bei IBH für eine echte Spektroskopie unzureichend sind. Ein weiterer Nachteil von echten Multiplex-Verfahren besteht darin, daß die notwendigerweise zu benutzenden Polychromatoren eine erheblich schlechtere Streulichtunterdrückung als Monochromatoren besitzen. Daneben wachsen die Hardwarekosten der Elektronik bei IBH mit ihren 16 oder auch möglichen 64 Diskriminatoren auf unverhältnismäßige Weise.

Auf der anderen Seite stellt das IBH-Baukastensystem eine sehr gute Lösung für zeitaufgelöste Messungen der Fluoreszenzanisotropie dar, bei der nur zwei optisch symmetrische Kanäle mit senkrechter und paralleler Polarisation mit zwei Monochromatoren und zwei Photomultipliern betrieben werden müssen. Der Ansatz der Firma EuroPhoton ist meßtechnisch sehr interessant und vielversprechend, da mit vertretbarem Aufwand gute spektrale und zeitliche Auflösungen erreicht werden können. Bei ersten gemeinsamen Testmessungen mit den Firmen EuroPhoton und dem Laser Labor Adlershof (LLA) im Herbst 1994 erwies sich das

System als technisch noch nicht ausgereift genug, um im jetzigen Stadium für eine breite Anwendung empfohlen werden zu können.

Generell läßt sich zusammenfassen, das die gegenwärtig kommerziell verfügbaren echten Multiplex-Methoden mit vertretbarem Aufwand entweder für ständig gleichbleibende Anwendungen mit geringerer Kanalzahl, zum Beispiel für Aufgaben der Prozeßkontrolle oder in etwas abgewandelter Form für die Polarisationspektroskopie von wachsendem Interesse sind. Für Applikationen, bei denen wechselnde spektrale Anforderungen gestellt und hauptsächlich Laser mit hohen Folgefrequenzen benutzt werden, ist das sequentielle Messen des Fluoreszenzabklingens bei verschiedenen, mit einem Monochromator frei wählbaren Wellenlängen und spektralen Auflösungen, die bessere, weil flexiblere und preiswertere Lösung.

2.3 Methodischer Ablauf von Messung und Auswertung

2.3.1 Messung

Die Durchführung einer Messung der zeitaufgelösten Laserimpulsfluorometrie ist ein komplexer Vorgang, bestehend aus einer Reihe von Einzelschritten. Die zu erwartenden Ergebnisse bestimmen im Rahmen von Vorüberlegungen die technische Auslegung der Apparatur in ihren Möglichkeiten verschiedener Varianten. Diese Überlegungen beginnen bei der Auswahl von Anregungswellenlänge und Intensität und der daraus folgenden Konfiguration der Anregungslaser (Kap. 2.2.1.). Es wird vorausgesetzt, daß Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Probe durch vorherige Messung mit üblichen statischen Spektrometern bekannt sind, sodaß ein optimaler Konzentrationsbereich und die Wellenlängen für Anregung und Emission vorher festgelegt werden können.

Fragen der notwendigen Zeitauflösung oder auch Probenmenge bestimmen zum Beispiel die Art der Küvette. Großvolumige Küvetten bedeuten mehr Analyt und damit eine höhere Signalintensität bzw. Empfindlichkeit aber auch eine etwas schlechtere Zeitauflösung (Kap. 2.2.5.3.). Ähnliches gilt für die optimale Auswahl des Monochromators und die einzustellende Kanalbreite (ps pro Kanal) sowie Kanalanzahl und damit Zeitauflösung der Elektronik (Kap 2.2.5.). Als Richtwert kann gelten, daß etwa 50 bis 100 Kanäle pro „Tau“ genügen, den Zeitverlauf gut abzubilden. Das bedeutet, bei einer Probe mit einer zu erwartenden Abklingzeit von $\tau = 1$ ns genügt eine Kanalbreite von etwa 10 ps ($1 \text{ ns} / 100$). Eine höhere Kanalzahl würde bei gleichbleibender Gesamtmeßzeit die Anzahl der Counts pro Kanal und damit das Signal/Rausch-Verhältnis unnötig vermindern.

Das registrierte Gesamtsignal einer Abklingkurve besteht nicht nur aus der Fluoreszenz des Analyten. Es enthält immer auch den Dunkelimpuls des Photomultipliers sowie möglicherweise Streulicht des Anregungslasers, Fluoreszenz der Matrix, z. B. Lösungsmittel und Reste des Um-

gebungslichtes. Zur Bestimmung der Fluoreszenz muß die Messung ohne Analyten, bei ansonsten gleichen Bedingungen wiederholt werden. In einzelnen Fällen, z. B. bei Proben mit starker Fluoreszenz und geringer Streuung, genügt auch eine Messung des reinen Dunkelsignals des Photomultipliers. Das Ergebnis der zweiten, der Untergrundmessung ist von der ersten Messung des Gesamtmeßsignals abzuziehen.

Da die Fluoreszenz des Analyten im Zeitbereich der Dauer des Anregungsimpulses von diesem beeinflusst, mit ihm gefaltet ist (Details siehe 2.3.3), muß der Anregungsimpuls der Fluoreszenz ebenfalls gemessen werden. Dabei ist mit größter Sorgfalt darauf zu achten, daß alle, die Zeitauflösung beeinflussenden Parameter, wie Probenort und -charakter, Abbildungsgeometrie und Spaltbreite des Monochromators, im Vergleich zur Messung der Fluoreszenz unverändert bleiben. Als Probe zur Messung der Systemfunktion IRF eignen sich nicht fluoreszierende, streuende Medien gleicher optischer Dichte bei der Anregungsintensität wie die der Analyt, wie zum Beispiel eine Dispersion von Glycogen (CAS-Nr. [9005-79-2]) in Wasser. Dabei ist die Tatsache zu beachten, daß die bei einer anderen Wellenlänge als die Fluoreszenz gemessene IRF apparative Fehler enthalten kann (z. B. „Color-Shift“ von Monochromatoren und Photomultipliern).

Eine andere Möglichkeit besteht in der indirekten Messung der IRF über eine Vergleichsprobe, von der man die Abklingzeit kennt oder zumindest weiß, daß ihr Abklingen einfachexponentiell ist. Dazu benötigt man eine Substanz, die bei den selben Wellenlängen angeregt wird und fluoresziert wie der Analyt. In diesem Fall kann aus der gemessenen Abklingkurve die Systemfunktion rekonstruiert werden oder implizit zur Analyse der unbekanntes Kinetik des Analyten herangezogen werden. Dieses Verfahren ist unter den Namen „reference convolution“ oder „delta function convolution“ bekannt [25, 26, 27]. Insbesondere bei photophysikalischen und photochemischen Grundlagenuntersuchungen mit maximaler Zeitauflösung konnte diese Methode mit Erfolg eingesetzt werden [14].

Das Verfahren wurde auch von uns getestet, wobei auch eine Programmierung des entsprechenden numerischen Verfahrens erfolgte. Auf Grund des hohen, oft kaum zu realisierenden Aufwandes, für jeden potentiellen Analyten eine geeignete Referenzsubstanz mit exakt monoexponentiellem und möglichst kurzem Fluoreszenzabklingen vorzuhalten, und der Tatsache, daß für analytische Anwendungen nur selten die ultimative Zeitauflösung benötigt wird, wandten wir im allgemeinen das konventionelle Verfahren der Messung des IRF mittels Lichtstreuung an. Dabei ist von Vorteil, daß die Wellenlängenfehler bei Nutzung von subtraktiven Doppelmonochromatoren und neuesten Mikrokanal-Photomultipliern so gering sind, daß sie softwaremäßig („Channel-Shift“-Verfahren) weitestgehend kompensiert werden können.

Auf Grund der differentiellen Nichtlinearität der Elektronik der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung ist es, wie in Kapitel 2.2.5.6. beschrieben, nötig die Meßkurven dies-

bezüglich zu korrigieren. Dazu wird bei identischer Einstellung der Elektronik, bei gleicher Wellenlänge und vergleichbarer Zählrate das Signal einer Lichtquelle zeitlich nicht korrelierter Photonen, z. B. Tageslicht oder cw-Halogenlampe, aufgezeichnet. Die Kurven der Fluoreszenz und der Systemfunktion werden im Anschluß durch diese, üblicherweise auf 1 normierte Korrekturkurve geteilt.

Zusammenfassend beinhaltet eine Messung die folgenden Einzelschritte:

- A - Messung des Gesamtsignals von Fluoreszenz und Untergrund *SIG*
- B - Messung des Untergrunds *UGR*
- C - Messung der Systemfunktion *SYS*
- D - Messung der Korrekturkurve *KOR*
- E - Berechnung der korrigierten Fluoreszenz $FLU = (SIG - UGR)/KOR$
- F - Berechnung der korrigierten Systemfunktion $IRF = (SYS - UGR)/KOR$
- G - Numerische Entfaltung von *FLU* und *IRF* zur Bestimmung der Parameter der Kinetik, Abklingzeiten TAU_i und Amplituden AMP_i des Fluoreszenz Analyten (Abschnitt 2.3.3.) TAU_i & $AMP_i = Entfaltung (FLU \& IRF)$.

Innerhalb von Meßserien brauchen der Untergrund *UGR*, die Korrekturkurve *KOR* und eventuell auch die Systemfunktion *SYS* nur jeweils einmal gemessen zu werden, was den Gesamtaufwand der Messungen verringert. Wie bereits zuvor erwähnt, kann man mit einer typischen Meßzeit einer Einzelmessung, z. B. *SIG*, von 1 bis 10 Minuten rechnen. Der angegebene Algorithmus gilt sowohl für Messungen mit der SPC im Pikosekundenlabor, als auch sinngemäß für Messungen im Nanosekundenlabor mit Sampling-, Boxcar- oder Echtzeitverfahren.

2.3.2 Daten und Software

Nachdem im vorigen Abschnitt der prinzipielle Ablauf von zeitaufgelösten Messungen und deren Auswertung gezeigt wurde, soll nun ein Überblick über die insgesamt eingesetzte und speziell entwickelte Software gegeben werden. Es war nötig, Software unter spezieller Berücksichtigung der Aufgaben des Projektes zu entwickeln. Die Vielzahl eingesetzter Meßverfahren und Geräte erforderte spezielle Programme zur Konvertierung der spektroskopischen Daten.

Für die nichtlineare numerische Modellierung der Fluoreszenzkinetik gibt es einige kommerzielle Programmpakete, die von Firmen zu ihren Komplett-Gerätesystemen angeboten werden (z. B. IBH Glasgow). Bei einem Einzelkauf der, in numerischen Details nicht nachvollziehbaren, Black-Box-Software, belaufen sich die Kosten auf deutlich über 10.000 DM. Da in der Arbeitsgruppe von Dr. Stahl bereits jahrelange Erfahrungen bei der Entwicklung und Anwendung derartiger Software vorlagen, wurden die bereits vorhandenen Programme insbesondere unter dem Aspekt der analytischen Anwendbarkeit weiterentwickelt. Neben der Transparenz der eingesetzten Numerik erwuchs daraus auch die Möglichkeit der ständigen Aktualisierung

und Modifikation der Software nach Nutzerwünschen. Vergleiche mit Programmen anderer Arbeitsgruppen im Raum Berlin ergaben gute Übereinstimmungen der Ergebnisse der Modellierung.

Programme zur numerischen Modellierung spektroskopischer Daten

DECAMAX: Programm zur Numerische Modellierung (Entfaltung) der Daten der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie, Bestimmung von Fluoreszenzabklingzeiten und Amplituden mit Methoden der nichtlinearen Optimierung, (genauerer siehe Abschnitt 2.3.3)
Beispiel: *Abb. 2.22*

APROMAX: Programm zur numerischen Modellierung von Fluoreszenz- oder Absorptionsspektren, Approximation von Spektren durch Banden unterschiedlicher spektraler Form (Gauß, Lorenz oder Mischformen) und Bestimmung von Position, Halbwertsbreite und Amplitude der Banden mit unterschiedlichen Optimierungsverfahren („Singular Value Decomposition“, Marquard-Levenberg, Polytop oder Simplex [36])
Beispiel: *Abb. 3.4*

Einfache Analyse und Präsentation

SHOWMAX: Präsentation und Kurvenarithmetik von Abklingkurven und Spektren, gemeinsame Auswertung und Darstellung auch bei unterschiedlichen Schrittweiten und Meßbereichen, Import der Datenformate der Meßsysteme der zeitaufgelösten Spektroskopie (MCA von Ortec, InterPC und Becker & Hickl, Oszilloskope von Tektronix, Hewlett Packard und ZWG); Beispiel: *Abb. 2.3*

DRAWMAX: Programm zur 3D-Darstellung von zeit- und spektralaufgelösten Messungen. Grafische Darstellung von Serien von Abklingkurven in Abhängigkeit vom Scharparameter Wellenlänge und deren Umwandlung in zeitaufgelöste Spektren (Decay Associated Spectra - DAS) sowie deren Präsentation. Anzahl der Meßpunkte pro Kurve 4000, Anzahl der Kurven pro Serie unbegrenzt, grafische Auflösung 25.600 x 19.200 Pixel
Beispiel: *Abb. 2.24*

Programme zur Gerätesteuerung

WAVEMAX: System zum Messen statischer Fluoreszenz- oder Transmissionsspektren mit dem Pikosekunden-Laserspektrometer. Schrittmotorsteuerung der Emissionsmonochromatoren sowie statische Einzelphotonenzählung. Zwischen statischen oder zeitaufgelösten Messungen kann rein softwaremäßig gewechselt werden. Messen von Serien von Abklingkurven mit veränderlicher Emissionswellenlänge, siehe *DRAWMAX*.

TRANSMAX: System zur Fluoreszenzspektroskopie mit ms-Zeitauflösung in Form eines Transientenrecorders zur Ergänzung der Nanosekunden-Laserapparatur. Das System basiert auf einem 12bit-Analog-Digital-Wandler mit 10 μ s Umsetzzeit. Die Steuerung erlaubt Hard- oder Softwaretriggerung sowie eine Pre-Trigger-Aufzeichnung. Die Messung kann im Einzelschuß oder akkumulierend erfolgen. Beispiel: *Abb. 2.6*

TEKMAX: Programm zur Kopplung des digitalen Sampling-Oszilloskopes Tektronix TDS 820 über den GPIB-Bus (IEEE-488.2) mit einem IBM-kompatiblen PC. Es erlaubt die Steuerung des Oszilloskopes sowie den Transfer der Meßdaten und deren Speicherung im Format DECA oder als ASCII-Tabelle. Das Programm basiert auf der Entwicklungsumgebung LabWindows für DOS von National Instruments. Beispiel: *Abb. 3.12*

Datenkonvertierung

CONMAX: Programm zum Lesen und Schreiben von Dateien der Formate: APRO, JCAMP, CP/M-Specord, ASCII-Tabelle, Excel, Origin und TechPlot. Konvertieren von Spektren mit Wellenlängen- und Wellenzahl-Skalen.

MCON: Programm zur Konvertierung der internen Datenfelder des digitalen Sampling-Oszilloskopes und Boxcar-Integrators MFA 105 im Nanosekundenlabor in eine DECA-Datei (Turbo Pascal unter CP/M).

Die Analyse der Spektren bezieht sich auf die Bestimmung von Form, Lage und Halbwertsbreite von Banden, Integration von Wellenlängenbereichen z. B. zur Bestimmung von Fluoreszenzquantenausbeuten. Der vereinfachte Idealfall sind isolierte Banden. Im Normalfall besteht ein Spektrum aus der Überlagerung verschiedener Komponenten, die jeweils auch aus mehreren Banden zum Teil unterschiedlicher Form bestehen können. Die quantitative Beschreibung dieser Spektren erfordert einen hohen numerischen Aufwand, der mit dem von Entfaltungsroutinen der Fluoreszenzkinetik vergleichbar ist.

Unterschiedliche Gerätehersteller benutzen unterschiedliche Datenformate zur Speicherung der gemessenen Spektren. Deshalb wurden Konvertierungsroutinen für das Programm *CONMAX* geschrieben, die die verschiedenen Datenformate importieren und exportieren können, sowie in ein gemeinsames Format *APRO* umwandeln. Auf dieses gemeinsame Spektrformat *APRO* können die Analyse- und Präsentationsprogramme *APROMAX*, *DRAWMAX* und *SHOWMAX* zugreifen (*siehe Abb. 2.25*). Eine vergleichbare Situation herrscht bei den Apparaturen zur Messung von Abklingkurven. Jeder Gerätehersteller benutzt spezielle Datenformate. Deshalb wurden Möglichkeiten geschaffen, diese Daten in ein gemeinsames Format *DECA* umzuwandeln. Dieses Format kann von den speziellen Analyse-

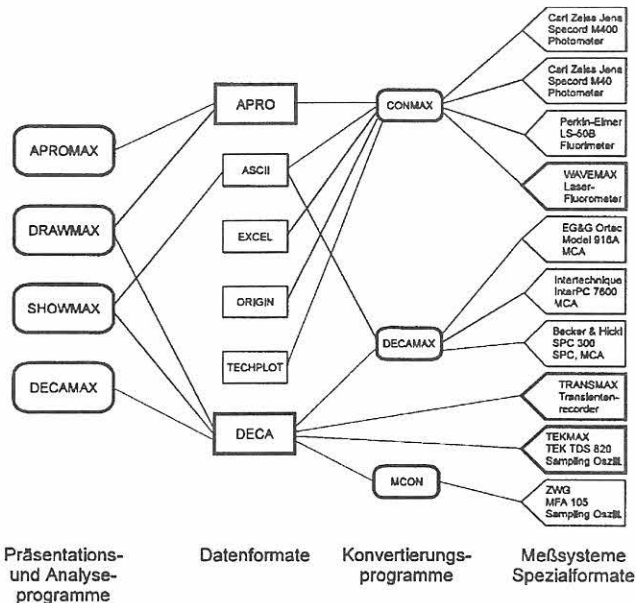


Abb. 2.25

Schema der benutzten Software und Datenformate (Eigenentwicklungen fett umrandet)

und Präsentationsprogrammen genutzt werden. Auf die Problematik der numerischen Modellierung von Abklingkurven wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

Alle Programme der *xyzMAX*-Serie sind in der Lage, Grafiken auf EPSON-kompatiblen Nadeldruckern, HP-kompatiblen Laserdruckern sowie HPGL-Plottern darzustellen oder als HPGL-File zur Weiterbearbeitung durch beliebige kommerzielle Grafikprogramme zu exportieren.

2.3.3 Numerische Analyse von Fluoreszenzabklingkurven

Die numerische Analyse von Fluoreszenzabklingkurven zur Bestimmung von analytisch (z. B. Konzentration) oder photophysikalisch (z. B. Fluoreszenzlebensdauer) relevanten Parametern ist ein sehr komplexes Problem, daß in diesem Rahmen nur in seinen fundamentalen Schritten behandelt werden kann.

Die gemessene Fluoreszenzabklingkurve $FLU(\lambda_{EM}, t)$ ist eine Funktion der Emissionswellenlänge λ_{EM} und der Zeit t . Sie entsteht aus der Faltung der Instrument-Respon-Funktion IRF (Anregung der Fluoreszenz und Charakterisierung der Apparatur) und der Fluoreszenz-Delta-Funktion FDF, die das Verhalten der Probe beschreibt.

$$FLU(\lambda_{EM}, t) = \int_0^t IRF(\lambda_{EX}, \lambda_{EM}, t') FDF(t-t') dt'$$

Die Instrument-Respon IRF ist eine Funktion der Anregungs- und Emissionswellenlängen λ_{EX} und λ_{EM} sowie der Zeit t . Die Fluoreszenz-Delta-Funktion FDF beschreibt die „Antwort“ der Probe auf eine ideale deltaförmige Anregung. Diese Funktion beschreibt das Verhalten der Probe und kann im einfachsten Fall eines isolierten Zwei-Niveau-Systems ein einfachexponentielles Abklingen sein.

$$\text{FDF}(t) = a \exp(-t / \tau)$$

Dabei ist τ die Strahlungslebensdauer des angeregten Zustandes und a eine Amplitude die mit der Anzahl bzw. der Konzentration der strahlenden Spezies korreliert. Reale Proben erfordern in der Regel kompliziertere Modellfunktionen. Das können bei nicht wechselwirkenden Mischungen Summen von Exponentialausdrücken sein.

$$\text{FDF}(t) = \sum_i a_i \exp(-t_i / \tau).$$

Komplexere Mehrniveausysteme erfordern jeweils spezielle Funktionsansätze [28, 15]. Neben diskreten Abklingzeiten oder Ratenkonstanten können auch stetige Verteilungsfunktionen von Parametern berechnet werden. Für die Analyse von Meßserien mit Scharparametern wie Emissionswellenlänge oder Temperatur, gibt es globale numerische Ansätze, die die Anzahl unabhängiger Parameter reduzieren [29, 30].

Die Meßgrößen IRF und FLU besitzen in Abhängigkeit des Meßprinzips zufällige Fehler mit unterschiedlichen Verteilungsfunktionen. Aus dem Prinzip des Photonenzählens folgt eine Poisson-Statistik, bei der die Standardabweichung s_i des Meßpunktes i gleich der Wurzel der gezählten Photonen ist, $\sigma_i = N_i^{1/2}$ (siehe Abb. 2.20). Bei anderen Meßverfahren, zum Beispiel Boxcar oder Sampling, liegt eine Gaußverteilung der Meßfehler vor. Die Kenntnis der Meßfehler ist von entscheidender Bedeutung zur Bewertung der Qualität der Ergebnisse der Gesamtauswertung.

Die Aufgabe der numerischen Verfahren besteht in der Entfaltung, das heißt in der Berechnung der Parameter der Modellfunktion FDF aus den Meßgrößen des Fluoreszenzabklings FLU und der Instrument-Response IRF. Dafür wurde eine Reihe verschiedener Methoden entwickelt. Die heute am weitesten verbreitete Methode ist die „Iterative Rückfaltung“. Daneben wurden auch die „Momentenmethode“ oder Laplace-Transformationen benutzt. Einen guten Überblick dazu findet man bei Demas [31] und O'Connor [32]. In den letzten Jahren wurde dazu noch das „Maximum Entropie Verfahren“ eingeführt [33, 34].

Das Prinzip der iterativen Rückfaltung besteht in der Optimierung der Parameter p der Modellfunktion, so daß die Abweichung von Meßfunktion FLU und synthetisch gefalteter Kurve SYN minimal wird

$$\text{SYN}(t,p) = \int_0^t \text{IRF}(\lambda_{\text{EX}}, \lambda_{\text{EM}}, t') \text{FDF}(t-t', p) dt'.$$

Die Bewertung der Übereinstimmung von SYN und FLU erfolgt nach dem Kriterium der kleinsten Fehlerquadrate und dem χ^2 -Test

$$\chi^2 = \sum_i \{ [1/\sigma_i]^2 [\text{FLU}(t_i) - \text{SYN}(t_i, p)]^2 \}.$$

Bei einer Globalanalyse wird die Summe der χ^2 -Werte jeder einzelnen Meßkurve innerhalb einer Kurvenschar minimiert.

Für die nichtlineare Optimierung der Parameter p für ein minimales χ^2 gibt es unterschiedliche mathematische Verfahren, die generell auch für andere nichtlineare Optimierungsaufgaben eingesetzt werden [35]. Wir benutzten den Polytop- oder Simplex-Algorithmus in einer Implementation aus [36]. Dieses Verfahren besitzt eine hohe Stabilität gegenüber lokalen Minima, erfordert keine analytische Ableitungen FDF und kann daher für beliebige komplexe Modellfunktionen angewandt werden. Daneben findet man häufig das Marquard-Levenberg-Verfahren [35, 37], das sich durch seine hohe Konvergenzgeschwindigkeit auszeichnet.

Ein entscheidendes Problem bei der Entfaltung von Fluoreszenzabklingkurven besteht darin, daß die Instrument-Response $\text{IRF}(\lambda_{\text{EX}}, \lambda_{\text{EM}})$ bei der Emissionswellenlänge λ_{EM} bestimmt werden müßte. Diese Größe ist im allgemeinen nicht meßbar, da dazu die Anregungsquelle (Laser) von der Anregungs- auf die Emissionswellenlänge umgestellt werden müßte, ohne dessen Impulsform zu verändern. Als Ersatz kann man die IRF bei der Anregungswellenlänge λ_{EX} messen. Durch die in Abschnitt 2.2.5 beschriebenen Effekte, wie den „Color-Shift“ des Empfängersystems ist jedoch $\text{IRF}(\lambda_{\text{EX}}, \lambda_{\text{EM}}) \neq \text{IRF}(\lambda_{\text{EX}}, \lambda_{\text{EX}})$. Zur Kompensation dieses Fehlers sind verschiedene Verfahren gebräuchlich [38, 13]. Bei geringer Wellenlängenabhängigkeit der Instrument-Response genügt oft das „Channel-Shift“-Verfahren. Für maximale Zeitauflösung bei Grundlagenuntersuchungen empfiehlt sich das Referenzfaltungsverfahren [14] (siehe auch Absatz 2.3.1.).

Zur Bewertung der Ergebnisse gibt es neben dem Wert von χ^2 weitere numerische und grafische Kriterien [38], wie den F-Test, den Durban-Watson-Test, den „Ordinary Run Test“ oder Autokorrelationsanalysen, auf deren Mathematik in diesem Rahmen nicht eingegangen werden kann.

Für die numerischen Modellierung der Meßwerte gibt es eine Reihe von leistungsfähigen Programmen von verschiedenen Geräteherstellern oder Arbeitsgruppen in Forschungseinrichtungen. Diese Programme wurden in der Regel für die Bearbeitung von photophysikalischen Grundlagenuntersuchungen entwickelt und besitzen eine hohe Komplexität und oftmals auch umständliche Bedienung, die auch für Spezialisten einen hohen Aufwand der Einarbeitung verlangt. Typische Vertreter dieser Kategorie sind die Software „Globals Unlimited“ vom Laboratory for Fluorescence Dynamics, University of Illinois at Urbana-Champaign, USA oder das Programmpaket der Firma IBH Consultants Limited, Glasgow, Großbritannien.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen des vorliegenden Projektes das Programmpaket *DECAMAX* von U. Stahl insbesondere unter dem Aspekt der Anwendung in der Analytik weiterentwickelt. Das Programm zur iterativen Rückfaltung basiert auf dem numerisch sehr zuverlässigen Polytop-Verfahren mit einer „Channel-Shift“-Technik sowie einer Untergrundkorrektur. Zur Analyse von Daten aus Meßsystemen mit hoher Folgefrequenz können zyklische Startwerte benutzt werden. In Abhängigkeit des Meßverfahrens kann eine Poisson- oder Gaußstatistik gewählt wer-

den. Der interaktive Charakter des Programms ermöglicht eine einfache Bedienung. Ein integriertes Archivsystem ermöglicht die Verwaltung analytisch relevanter Daten. Mehrere Vergleiche mit der oben genannten kommerziellen Software erbrachten eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse.

2.4 Qualitativer und quantitativer Nachweis von Substanzen durch Messung der zeitaufgelösten Fluoreszenz

2.4.1 Meßgrößen der Impulsfluorometrie zur Bestimmung von Stoffkonzentrationen

Bevor der Zusammenhang zwischen Meßgröße und Stoffkonzentration betrachtet wird, sollen zunächst die verschiedenen Meßgrößen der zeitaufgelösten Fluoreszenz, die zur Stoffkonzentration in Beziehung gesetzt werden können, diskutiert werden.

Die *einfachste Möglichkeit* ist die Summierung aller Photonen während des Fluoreszenzabklingens (Fläche unter dem Fluoreszenzimpuls). Diese Meßgröße kann in zwei Fällen zur Konzentration des Analyten in Beziehung gesetzt werden.

- Keine andere Substanz trägt zur Fluoreszenz oder Streuung bei. In diesem Fall ist die Meßgröße proportional zur Konzentration des Analyten, wenn keine konzentrationsabhängige Fluoreszenzlöschung auftritt.
- Die Fluoreszenz des Analyten ist durch ihre Abklingkinetik nicht von der Fluoreszenz anderer Substanzen zu unterscheiden. In diesem Fall ergibt sich eine Eichkurve mit einem Blindwert, der die Nachweisgrenze des Analyten wesentlich beeinflusst (siehe unten).

Die Summe aller Photonen entspricht der kontinuierlich (d. h. ohne Zeitauflösung) erfaßten Fluoreszenz. Der Vorteil einer zeitaufgelösten gegenüber einer kontinuierlichen Erfassung der Fluoreszenz besteht im höheren Signal-Rausch-Verhältnis. Dies resultiert aus der Tatsache, daß das Dunkelrauschen nur während des erfaßten Zeitbereiches registriert wird und damit (in Abhängigkeit von der Folgefrequenz des anregenden Lasers) deutlich unter dem Rauschen einer kontinuierlichen Messung liegt.

- Die *zweite Möglichkeit* ist die Summierung der Photonen in einem bestimmten Zeitintervall während des Fluoreszenzabklingens. Diese Variante ist dann sinnvoll, wenn die Fluoreszenz des Analyten eine deutlich unterschiedliche Abklingzeit besitzt als die Fluoreszenz und/oder Streuung anderer Substanzen. Das Zeitintervall wird so gewählt, daß einerseits der Anteil der Photonen von anderen Substanzen möglichst gering ist (kleiner Blindwert), andererseits aber noch möglichst viel von der Fluoreszenz des Analyten erfaßt wird (gro-

ßes Signal-Rausch-Verhältnis). Diese Methode wurde beispielsweise von Basile et al. [39] bei der Kalibrierung eines neuen zeitauflösenden Fluorometers benutzt.

- Die *dritte Möglichkeit* ist die Bestimmung der Amplitude einer Abklingkomponente durch Entfaltung der Meßkurve. Diese Amplitude ist, wenn bei der Entfaltung aller Meßkurven die gleichen Abklingzeiten vorgegeben werden, ein Maß für die Konzentration einer bestimmten Substanz. Diese Methode muß immer dann verwendet werden, wenn der Fluoreszenz des Analyten andere Fluoreszenzen mit längeren Abklingzeiten überlagert sind. Sie gestattet die quantitative Analyse von Vielkomponentengemischen, insbesondere auch wenn die einzelnen Komponenten sich nur wenig in ihren Spektren unterscheiden und somit spektral nicht getrennt werden können [40]. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, daß eine eventuell auftretende konzentrationsabhängige Fluoreszenzlöschung keine Rolle spielt, da diese sich nur in der Abklingzeit und nicht in der Amplitude niederschlägt. Im Abschnitt 3.1. ist dieses Vorgehen am Beispiel der Bestimmung von Mischungen niedermolekularer Aromaten (BTX) in Wasser beschrieben. Der Bestimmung von Amplituden sind dann Grenzen gesetzt, wenn mehrere Abklingkomponenten mit ähnlichen Abklingzeiten auftreten, so daß die Entfaltung keine eindeutigen Ergebnisse liefert.

2.4.2 Qualitativer Nachweis – die untere Meßgrenze

2.4.2.1 Definition und Einflußfaktoren:

Die untere Meßgrenze (auch kritischer Wert der Meßgrenze) bezeichnet die kleinste Konzentration eines Stoffes, die qualitativ nachgewiesen werden kann, d. h., daß der entsprechende Meßwert signifikant größer (üblicherweise um das halbe Prognoseintervall) als der Blindwert (Meßwert einer Probe, die den Analyten nicht enthält) ist. Dementsprechend wird die untere Meßgrenze durch die Größe und die Schwankungen des Blindwertes bestimmt. Bei Fluoreszenzmessungen resultiert der Blindwert aus der Fluoreszenz von Verunreinigungen, der Streuung (Rayleigh- und Raman-Streuung) an Lösungsmitteln und Verunreinigungen sowie dem Rauschen. Welche der drei Größen den Blindwert bestimmt, hängt sowohl von der zu bestimmenden Substanz als auch von den verwendeten Meß- und Auswertungsmethoden ab.

Verunreinigungen:

Bei entsprechend empfindlichen Nachweismethoden für die Fluoreszenz (zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung) wurde von uns in jedem (selber nicht fluoreszierenden) Lösungsmittel Fluoreszenz beobachtet. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Haugen und Lytle [41] überein. Da die Verunreinigung der Lösungsmittel mit rot fluoreszierenden Substanzen deutlich geringer ist als mit solchen, die im UV- oder blauen Spektralbereich fluoreszieren, ist es zweckmäßig, die apparativ bedingten Nachweisgrenzen im roten Spektralbereich zu untersuchen. Dazu haben wir

den Farbstoff Cresylviolett in Methanol verwendet, der auch als Fluoreszenzstandard ($\phi_F=0,54$) für den roten Spektralbereich vorgeschlagen wurde [42]. Selbst in diesem Spektralbereich zeigte sich, daß die untere Meßgrenze bei Messungen mit der Picosekunden-Apparatur durch die Fluoreszenz von Verunreinigungen des Lösungsmittels bestimmt wird (siehe Abb. 2.27).

Streuung:

Bei kleinen Analyt-Konzentrationen wurde sowohl Rayleigh- als auch Raman-Streuung beobachtet. Die beiden Arten der Streuung können nur durch ihre spektrale Verteilung und nicht durch den zeitlichen Verlauf unterschieden werden. Auch durch die Verwendung von Doppelchromatoren konnte die Streuung nicht völlig unterdrückt werden, da für den Nachweis sehr schwacher Fluoreszenzen mit relativ großen spektralen Bandbreiten gearbeitet werden muß (wir haben 18 und 24 nm Spaltbreiten benutzt). Abb. 2.26 zeigt das Verhältnis von Fluoreszenz und Streuung für zwei Konzentrationen von Cresylviolett, das mit Picosekunden-Impulsen angeregt wurde. In diesem Fall können Streuung (peak am Beginn der Meßkurve, Halbwertsbreite 35 ps) und Fluoreszenz (langsamer Abfall, $\tau=3,15$ ns) deutlich unterschieden werden, so daß die Streuung hier nicht die untere Nachweisgrenze bestimmt. Bei der Anregung mit Nanosekunden-Impulsen ist diese Unterscheidung schwieriger, weil dann die Fluoreszenzabklingzeit oft nicht viel länger als die Halbwertsbreite des Impulses ist. Da die Intensität der Rayleigh-Streuung mit der vierten Potenz der Frequenz zunimmt, stört sie im UV-Bereich am meisten.

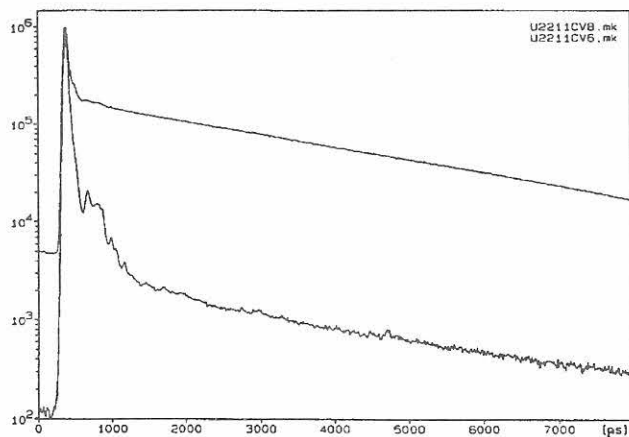


Abb. 2.26

Fluoreszenzabklingkurven von Cresylviolett bei 10^{-10} M und 10^{-12} M in Methanol und die deutlich sichtbare Streuung des Anregungslasers

Anregung: 595 nm, 50 mW, Emission: 635 nm, Akkumulation: 600 Sekundet

Rauschen:

Das Rauschen kann einen wesentlichen Einfluß auf die untere Meßgrenze haben [17] und hat verschiedene Ursachen.

1) Elektronisches Rauschen des Empfängers

Bei der Einzelphotonenzählung spielt das elektronische Rauschen fast keine Rolle, da die Photonen gezählt wer-

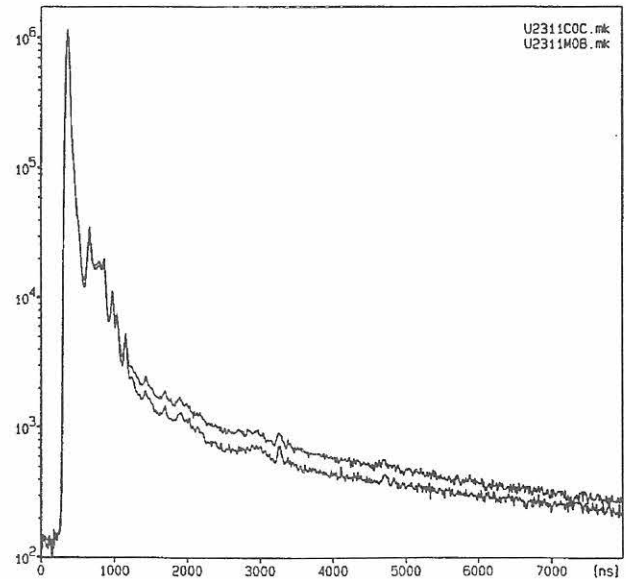


Abb. 2.27

Gegenüberstellung der zeitaufgelösten Fluoreszenz von 10^{-13} M Cresyl Violett in Methanol (obere Kurve) und der Fluoreszenz von Methanol.

Anregung: 594 nm, 50 mW, Emission: 635 nm, Akkumulation 1000 Sekunden

den und dieser Vorgang nicht durch Schwankungen der Signalhöhe beeinflusst wird. Das durch den Dunkelstrom des Empfängers verursachte Rauschen spielt bei modernen Mikrokanal-Photomultipliern nur eine geringe Rolle (ca 20 cps) und kann gegebenenfalls durch Kühlen (< 1 cps) weitgehend unterdrückt werden (siehe 2.2.5). Bei der elektronischen Abtastung von Impulsen (Boxcar- oder Samplingtechnik) beeinflusst das Empfängerrauschen wesentlich das Signal-Rausch-Verhältnis der Meßkurven. Dabei ist das Rauschen von Halbleiterempfängern kleiner als das Rauschen von Photomultipliern (siehe 2.1.3.).

2) Statistisches Rauschen

Mit diesem Begriff ist hier das Rauschen durch die Registrierung von Einzelereignissen in einem Vielkanalanalysator gemeint. Dieses Rauschen hängt nur von der Zahl der pro Kanal registrierten Photonen ab und bestimmt die benötigte Meßzeit (siehe Kap. 2.2.5.). Bei kleinsten Analytkonzentrationen (10^{-14} M Cresylviolett) wurden in Bezug auf das statistische Rauschen hinreichende Photonenzahlen (100 counts pro Kanal) in 1000 s erreicht.

3) Impulshöhenschwankungen

Impulshöhenschwankungen sind besonders stark bei „echten“ Impulslasern (im Gegensatz zu modegelockten cw-Lasern), z. B. Stickstofflasern (typisch 5-10 Prozent). Diese Schwankungen beeinflussen das Signal-Rausch-Verhältnis bei elektronischer Abtastung. Bei der zeitaufgelösten Einzelphotonenzählung spielen die geringfügigen Impulsschwankungen der dort verwendeten modegelockten Laser nur eine geringe Rolle. Die Schwankungen der Impulshöhe beeinflussen nur den Triggerzeitpunkt und damit die Zuordnung des Photons zum richtigen Kanal, aber dieser Effekt wird durch den Einsatz von „Constant-Fraction“ Diskriminatoren klein gehalten (2.2.3.).

2.4.2.2 Die untere Meßgrenze der Picosekunden-Apparatur

Wie bereits erläutert, ist es wegen der unvermeidbaren Verunreinigungen der Lösungsmittel günstig, die untere Nachweisgrenze eines Fluoreszenzmeßplatzes im roten Spektralbereich zu bestimmen. Dazu wurde Cresylviolett in Methanol (Reinheitsgrad „für die Spektroskopie“) mit einem Farbstofflaser (Rhodamin 6G) bei 595 nm mit einer zeitlich gemittelten Leistung von 50 mW angeregt. Die Fluoreszenz bei 630 nm wurde mit einer spektralen Spaltbreite von 18 bzw. 24 nm (Monochromator IBH 5M-01) mit einem Mikrokanalmultiplier (Hamamatsu R3809U) erfaßt.

Die Abklingzeit von Cresylviolett in Methanol (ermittelt bei 10^{-7} M bis 10^{-10} M) beträgt $(3,15 \pm 0,1)$ ns. Dieser Wert stimmt sehr gut mit den von Ware et al.[22] bestimmten Werten von 3,142 ns bzw. 3,161 ns für die senkrechte bzw. parallele Polarisation überein. Durch den großen Dynamikbereich der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung war es möglich, noch Fluoreszenzen nachzuweisen, die mehr als drei Größenordnungen unter dem Intensitätsmaximum der Streuung lagen (Abb.2.26 und 2.27). Um diese schwachen Fluoreszenzen unbeeinflusst von der Streuung quantitativ zu erfassen, wurde die Zahl der Photonen im Zeitbereich 2,0 bis 7,0 ns (auf der Zeitskala in Abb.2.26 bis 2.28) als Meßgröße herangezogen.

Messungen am Lösungsmittel (Reinheitsgrad „Für die Spektroskopie“, frisches Gebinde) ergaben, daß dessen Fluoreszenz deutlich über dem Dunkelrauschen von ca. 0,1 counts pro Kanal und Sekunde liegt, so daß unter diesen Bedingungen die Lösungsmittelfluoreszenz den Blindwert bestimmt. Bei allen Messungen mit der Konzentration 10^{-14} M lag die Fluoreszenz der Probe geringfügig, aber signifikant über der Fluoreszenz des Lösungsmittels. Bei

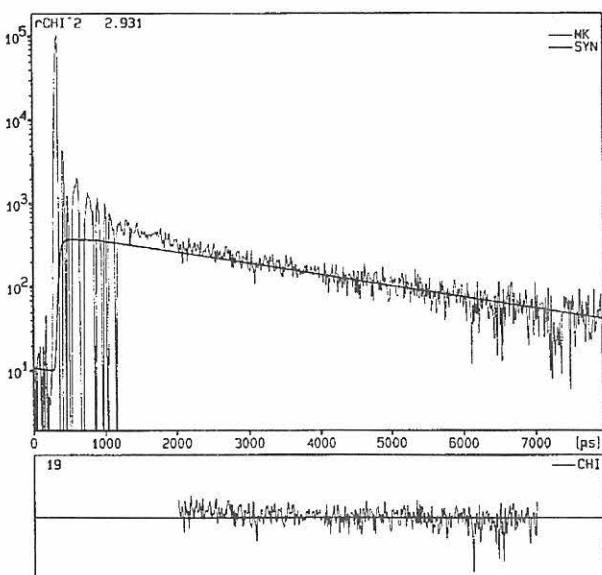


Abb. 2.28
Entfaltung der Fluoreszenz von 10^{-13} M Cresylviolett, Differenzkurve beider Abklingkurven aus Abb. 2.27. Die glatte Kurve ist die numerische Anpassung der Fluoreszenz im Bereich von 2 bis 7 ns mit der Abklingzeit von 3,2 ns. Die untere Kurve ist das Residuum aus Meßkurve und Anpassung.

einer Konzentration von 10^{-13} M war die Fluoreszenz der Probe deutlich größer als die des Methanols (Abb. 2.27), sodaß die Differenzkurve noch mittels Kurvenentfaltung ausgewertet werden konnte. Die Entfaltung ergab eine Abklingzeit von $3,2 \pm 0,1$ ns (Abb. 2.28). Die Differenzkurve enthält im Bereich von 2 bis 7 ns noch eine Gesamtanzahl von 54779 registrierten Photonen der Fluoreszenz von Cresylviolett.

Da die Lösungsmittelfluoreszenz durch Differenzbildung eliminiert werden kann, wird die untere Meßgrenze (definitionsgemäß) durch die Schwankung dieser Größe bestimmt. Um diese zu reduzieren, wurde folgendes Verfahren angewendet. Zuerst wurde die Fluoreszenz des Lösungsmittels gemessen. Dann wurde in die gleiche Küvette eine definierte Menge des Analyten zugegeben, die Fluoreszenz gemessen und durch Differenzbildung aus beiden Meßkurven die Fluoreszenz des Analyten ermittelt. Setzt man voraus, daß bei der Zugabe des Analyten keine weitere Verschmutzung erfolgt, so kann mit diesem Verfahren die untere Meßgrenze unter den durch die Schwankungen des Blindwertes (Fluoreszenz des Lösungsmittels) vorgegebenen Wert gesenkt werden.

Zusammenfassend bewerten wir die oben dargestellten Meßergebnisse so, daß für diesen Fall die untere Meßgrenze zwischen 10^{-14} M und 10^{-13} M Cresylviolett liegt. Diese Nachweisgrenze war durch Verunreinigungen des Lösungsmittels und fehlende Reinraumbedingungen bestimmt. Die apparativ bedingte untere Meßgrenze liegt bei 1000 s Meßzeit mindestens eine Größenordnung niedriger (um 10^{-15} M). Unsere experimentell bestimmte untere Meßgrenze stimmt gut mit einer Vorhersage von 1981 durch Haugen und Lytle [41] überein, die aus eigenen, methodisch vergleichbaren, zeitaufgelösten Messungen bis 10^{-12} M eine prinzipielle Nachweisgrenze für Rubren ($\phi_F=0,64$) von $1,2 \times 10^{-14}$ M extrapoliert haben. Eine Einordnung in Bezug auf aktuelle Ergebnisse des zeitaufgelösten fluoreszenzspektroskopischen Einzelmolekülnachweises erfolgt im Punkt 2.4.2.5.

2.4.2.3 Die untere Meßgrenze der Nanosekunden-Apparatur

Die untere Meßgrenze der Nanosekunden-Apparatur wurde ebenfalls für das Beispiel Cresylviolett in Methanol ermittelt. Die Anregung erfolgte mit einem stickstofflasergepumpten Farbstofflaser (Rhodamin 6G) bei 595 nm und einer Impulsenergie von 24 μ J. Die Fluoreszenz bei 630 nm wurde mit einer spektralen Bandbreite von 12 nm (Monochromator Lambda-Scanner) mit einem PMT R4703 (Hamamatsu) erfaßt.

Die Bestimmung der Abklingzeit durch Entfaltung ergab 3,0 ns bei 10^{-7} M, was gut mit dem an der Picosekundenapparat gemessenen Wert von 3,15 ns übereinstimmt. Die untere Meßgrenze wird hier durch das Dunkelrauschen des Empfängers bestimmt. Abb. 2.29 zeigt, daß die Fluoreszenz des Lösungsmittels unter diesen Bedingungen keine Rolle spielte. Bei 10^{-9} M ist auch mit dem Pikosekunden-system noch keine Fluoreszenz von Methanolverunrei-

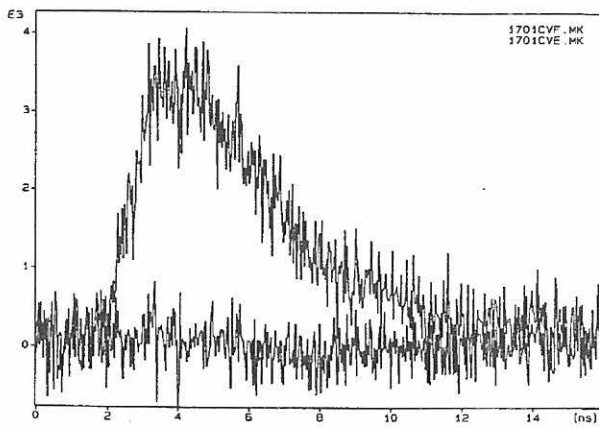


Abb. 2.29
Gegenüberstellung der zeitaufgelösten Fluoreszenz von 10^{-9} M Cresylviolett in Methanol (obere Kurve) und der Fluoreszenz von Methanol, gemessen am Nanosekunden-Laserimpulsfluorometer
Anregung: 595 nm, 20 Hz, 24 mJ, Emission: 625 nm, Akkumulation 32 Sample per Step, 800 s Dauer

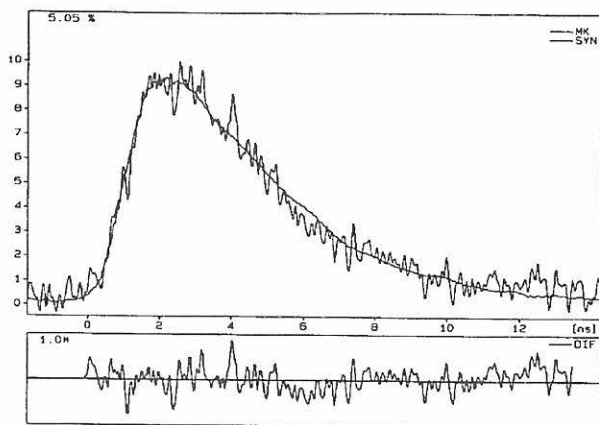


Abb. 2.30
Numerische Anpassung der Fluoreszenz von 10^{-9} M Cresylviolett, geglättete Differenz der beiden Kurven aus Abb. 2.29. Die glatte Kurve ist die numerische Anpassung der Fluoreszenz mit der Abklingzeit von 3.2 ns. Die untere Kurve ist das Residuum aus Messkurve und Anpassung.

nigungen erkennbar. Die Fluoreszenz von 10^{-9} M Cresylviolett konnte bei einer Messung mit 32 Abtastungen der 512 Meßpunkte (dies sind 800 s Meßzeit bei 20 Impulsen pro Sekunde) deutlich nachgewiesen werden. Das Signal-Rausch-Verhältnis kann durch eine numerische Glättung von 3:1 auf 10:1 verbessert werden. Daraus läßt sich eine untere Meßgrenze von 10^{-10} M Cresylviolett abschätzen.

2.4.2.4 Die untere Meßgrenze eines statischen Fluorometers

Um die hier ermittelte untere Meßgrenze für die zeitaufgelöste Fluorometrie mit der statischen Fluorometrie vergleichen zu können, wurde die untere Meßgrenze für Cresylviolett auch an einem konventionellem Fluorometer ermittelt. Die Messungen mit einem Fluorometer LS50B (Perkin Elmer) ergaben, das die untere Meßgrenze hier bei 10^{-11} M Cresylviolett liegt (Abb. 2.31). Begrenzend war hier nicht die Fluoreszenz des Lösungsmittels, die nicht nachgewiesen werden konnte, sondern die Überlagerung mit der Streuung und das elektronische Rauschen. Um Streu-

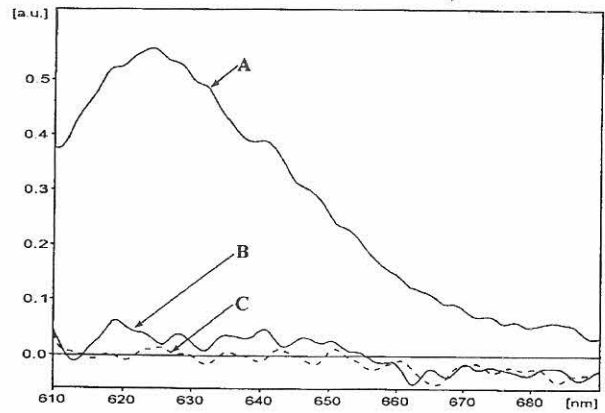


Abb. 2.31
Statische Fluoreszenzspektren von (A) 10^{-10} M und (B) 10^{-11} M Cresylviolett in Methanol sowie (C) das Vergleichsspektrum von Methanol, aufgenommen mit einer Meßzeit von jeweils 3000 Sekunden.

ung und Fluoreszenz zu trennen, konnte nicht mit den maximalen Spaltbreiten gemessen werden. Mit der optimalen Variante (Anregung 5 nm und Emission 15 nm Spaltbreite) mußte 3000 s lang gemessen werden, um ein Signal-Rausch-Verhältnis von ungefähr 1:1 bei 10^{-11} M Cresylviolett zu erreichen.

Die niedrigste bisher mit einem statischen Fluorometer nachgewiesene Konzentration liegt bei 5×10^{-14} M Fluorescein. Die Messung erfolgte mit einem Fluorolog-2 Modell F212 (SPEX), das auf der Methode der statischen Einzelphotonenzählung basiert (Firmeninformation). Das Meßprinzip der statischen Einzelphotonenzählung ermöglicht eine prinzipiell gleiche Empfindlichkeit wie die von uns in der Pikosekundenapparatur verwendete zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung. Die praktisch erzielte höhere Empfindlichkeit des SPEX-Fluorometers basiert auf zwei technischen Bedingungen. Erstens, die Monochromatoren eines statischen Spektrometers können einen höheren Lichtdurchsatz erzielen, als der von uns benutzte Typ, der unter dem Aspekt der Zeitauflösung optimiert wurde. Zum zweiten besitzt der in diesem statischen Fluorometer benutzte selektierte PMT (Hamamatsu R943-02 mit GaAs(Cs)-Kathode) eine höhere Empfindlichkeit (Luminosität der Kathode etwa 600 mA/lm), eine höhere Verstärkung (10^6) und eine größere aktive Fläche (100 mm^2) als der für maximale Zeitauflösung konzipierte MCP R3809U ($100 \mu\text{A/lm}$, 2×10^5 und 55 mm^2). Als Kriterium für die Lichtstärke eines Fluoreszenzspektrometers verwendet man oftmals die Intensität der Raman-Streuung von Wasser. Das Fluorolog-2 F212 von SPEX erreicht bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Spaltbreite von 5 nm etwa 550.000 Counts pro Sekunde (Firmenprospekt). Mit dem Pikosekunden-Laserimpulsfluorometer wird bei vergleichbaren Bedingungen (Anregung 375 nm, Doppelmonochromator, Spaltbreite 5 nm) eine Zählrate von 75.000 cps erzielt. Diese Relation bestätigt in etwa die bereits beschriebene Unterschiede in den Nachweisgrenzen.

2.4.2.5 Vergleich der Apparaturen

Vergleicht man die Apparaturen, so ergibt sich, daß bei Anregung mit Picosekundenimpulsen und Nachweis mit

zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung die apparativ bedingte untere Meßgrenze bei 10^{-14} M Cresylviolett oder etwas niedriger liegt und damit mindestens drei Größenordnungen kleiner als die von statischer Fluorometrie (ausgenommen Spezialfluorometer mit statischer Einzelphotonenzählung) und Nanosekunden-Fluorometrie ist. Der deutliche Vorsprung dieser Methode ist vor allem auf zwei Tatsachen zurückzuführen. Erstens kann durch das Zählen von Photonen und die Verwendung geeigneter Diskriminatoren das elektronische Rauschen sehr stark unterdrückt werden. Zweitens kann durch die hohe Folgefrequenz des modegelockten Lasers (10^8 Impulse pro Sekunde gegenüber 20 Impulsen pro Sekunde bei der Nanosekundenapparatur) in vertretbaren Meßzeiten (maximal 15 Minuten) eine große Zahl von Photonen registriert werden, so daß das statistische Rauschen ($\sim n^{1/2}$) klein ist. Begrenzend für die praktisch erreichbare untere Meßgrenze war im Fall der Picosekunden-Apparatur die Verschmutzung der Lösungsmittel, in den beiden anderen Fällen das elektronische Rauschen.

Der Vergleich der Leistungsfähigkeit von statischer und zeitaufgelöster Spektroskopie kann in einigen Fällen noch deutlicher in Richtung der zeitaufgelösten Spektroskopie ausfallen. Zum Beispiel bei schwachen Fluoreszenzen stark streuender Proben oder bei der Detektion von einzelnen Komponenten, deren Fluoreszenzabklingzeiten sich deutlich von einer eventuell auch sehr stark fluoreszierenden Matrix unterscheiden. Eine optimale analytische Bestimmung von komplexen Mischungen wird allerdings erst bei der Kombination von zeitlicher und spektraler Auflösung, einer sogenannten Multiplexmessung, erreicht (siehe 2.2.6).

Eine weitere Verbesserung der Nachweisgrenzen ist nur noch mit den Methoden des Einzelmolekülnachweises möglich. Im Gegensatz zu den bisherigen Betrachtungen, die sich auf Proben- oder Wechselwirkungsvolumen im Bereich von 10 μ l bis 10 ml bezogen, verwendet man beim Einzelmolekülnachweis erheblich kleinere Stoffmengen. Durch Fokussierung des anregenden Laserstrahls sowie durch Kapillaren mit hydrodynamischer Fokussierung erreicht man Probenvolumen von unter 0.5 μ l [43]. Bei Konzentrationen um 10^{-14} M ist die Wahrscheinlichkeit dafür, daß sich wenigstens ein Molekül des Fluorophors im Meßvolumen aufhält nur etwa 0.5 Prozent. Gelangt ein Fluorophormolekül in den aktiven Bereich, emittiert es durch Mehrfachanregung einen Burst von mehreren Photonen. Die Dauer des Aufenthalts im aktiven Bereich der Kapillare beträgt, je nach Strömungsgeschwindigkeit, zwischen 10 und 50 ms. In dieser Zeit emittiert dieses Molekül, in Abhängigkeit von Fluoreszenzlebensdauer und Photostabilität, mehrere hundert oder in Extremfällen bis zu 40 000 Photonen [44]. Die Photonen, die von einem einzelnen Molekül stammen, können durch die Autokorrelation ihrer Zeitabstände identifiziert werden. Dabei ist in diesem Moment die momentane, scheinbare Konzentration des fluoreszierenden Moleküls im Bereich von 10^{-12} M (1 Molekül in 0.5 μ l Volumen). Das ist eine Konzentration, bei der das Signal des Fluorophors deutlich über dem Hintergrund des Lösungsmittels liegt, wie auch von

unseren Messungen bestätigt wird (*Abb. 2.28 und 2.32*). Die Fluoreszenz von mehreren unabhängigen Lösungsmittelmolekülen ist dagegen zeitlich unkorreliert.

Aus einem Burst von 238 registrierten Photonen eines einzelnen Rhodamine 6G-Moleküls konnte von Soper et al. [45] sogar die Abklingzeit mit 4.4 ± 0.3 ns bestimmt werden. Vergleichbaren Bestimmungen der Fluoreszenzlebensdauer von Rhodamine 110-Einzelmolekülen wurden von Tellinghuisen et al. [46] mit Bursts von 5 bis 300 Photonen durchgeführt. Durch diese Methode der kleinsten Volumen und des Nachweises durch Autokorrelation des Timings der Fluoreszenzphotonen konnte eine Nachweisgrenze von 6×10^{-15} M Rhodamine 6G in Wasser erzielt werden [47].

2.4.3 Quantitativer Nachweis – die Eichkurve

Soll mittels einer Fluoreszenzmessung eine Stoffkonzentration bestimmt werden, so muß der Zusammenhang zwischen einer der in Abschnitt 1 erläuterten Meßgrößen und der Konzentration des zu bestimmenden Stoffes bekannt sein (Eichung). Dieser Zusammenhang wird durch die Messung einer Konzentrationsreihe des interessierenden Stoffes hergestellt. Da Stoffkonzentrationen über viele Größenordnungen variieren können, ist es günstig, wenn die Meßmethode einen großen Bereich von Konzentrationen erfassen kann und der Zusammenhang linear ist. Bei der Fluoreszenz ist beides in den meisten Fällen erfüllt. Die Linearität der Eichkurve wird in der Analytik oft gefordert, ist aber nicht zwingend notwendig, wenn hinreichend viele Eichpunkte im interessierenden Konzentrationsbereich bekannt sind. Bei Fluoreszenzmessungen gibt es Abweichungen von der Linearität sowohl bei hohen Konzentrationen als auch bei sehr kleinen Konzentrationen. Die bei hohen Konzentrationen auftretenden Abweichungen von der Linearität sind vor allem durch Reabsorption, den „inner-filter-effect“, Aggregationseffekte und Konzentrationslöschung der Fluoreszenz verursacht. Bei sehr kleinen Konzentrationen treten Abweichungen von der Linearität vor allem durch Verunreinigungen des Lösungsmittels auf, die sowohl zu Fluoreszenzzunahmen als auch zu Fluoreszenzabnahmen führen können.

Der Vorteil der Fluorometrie als Nachweismethode besteht in ihrer hohen Empfindlichkeit. Deshalb wird im Weiteren die Eichung am Beispiel Cresylviolett nur für den Bereich kleiner Konzentrationen behandelt. Dazu wurden im Rahmen einer Serie Lösungen mit den Konzentrationen 10^{-14} M bis 10^{-10} M gemessen. Als Maß für die Fluoreszenz wurde wie schon in Abschnitt 1.2. die Summe aller Photonen im Zeitbereich 2,0 bis 7,0 ns genommen (*Abb. 2.32*). Die doppelt logarithmische Darstellung der Fluoreszenz als Funktion der Konzentration (*Abb. 2.33*) zeigt unterhalb von 10^{-12} M eine deutliche Abweichung vom linearen Verlauf (die Fluoreszenz des Lösungsmittels wurde bereits abgezogen). Dieser nichtlineare Bereich wurde qualitativ in einer zweiten Meßserie bestätigt. Abweichungen von der Linearität der Eichkurve bei Konzentrationen von 10^{-11} M wurden auch von Basile et al. [39] für Chininsulfat und 4-Methoxy-2-amino-naphthalen beobachtet.

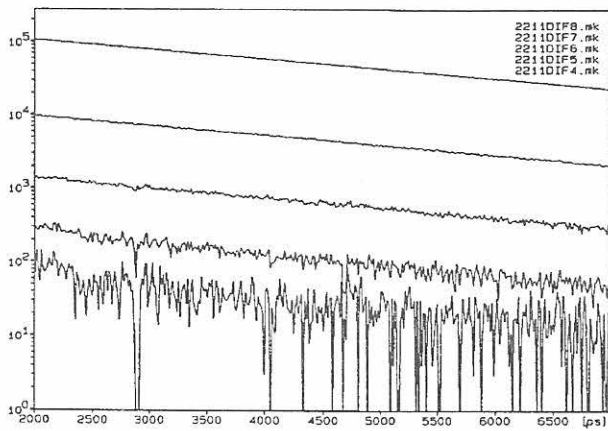


Abb. 2.32

Meßreihe der zeitaufgelösten Fluoreszenz von Cresylviolett zwischen 2 und 7 ns im Konzentrationsbereich von 10^{-10} M bis 10^{-14} M, Fluoreszenz des Lösungsmittels Methanol abgezogen.

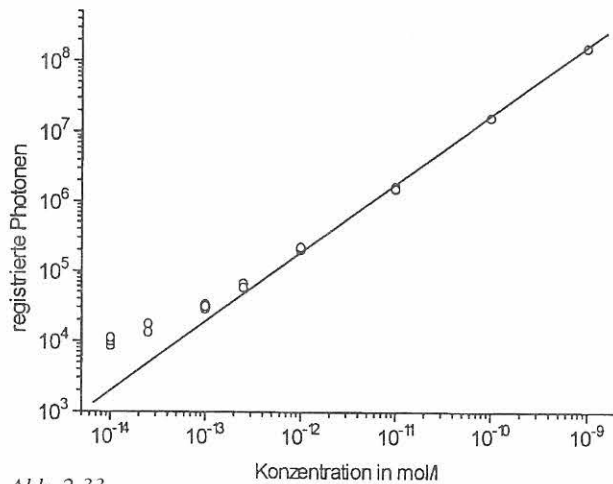


Abb. 2.33

Doppelt-logarithmische Eichkurve der Fluoreszenz von Cresylviolett, bestimmt aus der Intensität der zeitaufgelösten Messung im Zeitfenster von 2 bis 7 ns

Für die quantitative Bestimmung einer Substanz ist die Abweichung der Eichkurve vom linearen Verlauf kein grundsätzliches Problem. Begrenzend für die Genauigkeit der Eichkurve waren in unserem Falle die Ausreißer bei Konzentrationen unter 10^{-12} M. Diese Ausreißer (bis zu 200 Prozent Unterschied, nur nach oben) sind auf zusätzliche Verschmutzungen (neben der Verunreinigung des Lösungsmittels) beim Füllen der dampfdichten Küvetten zurückzuführen und lassen sich nur durch extreme Sauberkeit (Reinraumbedingungen) beim Herstellen und Einfüllen der Lösungen vermeiden. Für Cresylviolett lag oberhalb von 10^{-11} M die Genauigkeit der Eichkurve bei 5-10 Prozent. Diese Genauigkeit ist durch die Apparatur und das Meßverfahren vorgegeben und kann bei Meßzeiten bis 1000 s auf den Bereich kleinster Konzentrationen (10^{-13} M bei Cresylviolett) ausgedehnt werden, wenn es gelingt, zusätzliche Verschmutzungen zu vermeiden. Soll diese Genauigkeitsgrenze bei der Konzentrationsbestimmung unterboten werden, muß während der Messung die Intensität des anregenden Lasers über einen Referenzkanal erfaßt und als Korrekturfaktor bei der Bestimmung der Konzentration berücksichtigt werden. Damit könnte eine Genauigkeit von ca. 1 Prozent erreicht werden.

Die Bestimmungsgrenze, die bei der üblichen Definition an die Existenz einer linearen Eichkurve gebunden ist, kann unter den derzeitigen Bedingungen (kein Reinraum) für das Beispiel Cresylviolett zu 10^{-12} M (30 Prozent Genauigkeit) bzw. 10^{-11} M (10 Prozent Genauigkeit) abgeschätzt werden.

Substanz Lösungsmittel	eigene Messung Abklingzeit in ps	Literaturdaten	
		Abklingzeit in ps	Referenz
Pinacyanol Ethanol	12±2	11±2	Lois et al., 1988 [20]
		13±1	Boens et al., 1990 [14]
		10.1	Kume et al., 1992 [5]
Cryptocyanine Azeton	50.5±2.5	51±3	Boens et al., 1990 [14]
		50.1	Kume et al., 1992 [5]
Cryptocyanine Ethanol	77±3	81±1	Boens et al., 1990 [14]
		74.4	Kume et al., 1992 [5]
Rose Bengal Wasser	162±6	160±10	Spears et al., 1978 [21]
Rose Benga Ethanol	775±15	760±20	Spears et al., 1978 [21]
Rose Bengal i-Propanol	965±20	980±30	Spears et al., 1978 [21]
Rhodamine B Ethanol	2900±35	2880±60	Lampert et al., 1983 [3]
Cresylviolett Methanol	3170±25	3200±40	Ware et al., 1983 [22]

Tabelle 2.4 (siehe S. 24)
Übersicht der verwendeten Referenzsubstanzen im Vergleich mit ausgewählten Literaturdaten.

2.5 Literatur

- [1] Ware, W. R.; Baldwin, B. A. *J. Chem. Phys.* **40** (1964) 1703.
- [2] Chen, R. F. *Anal. Biochem.* **57** (1974) 593.
- [3] Lampert, R. A.; Chewter, L. A.; Phillips, D.; O'Connor, D. V.; Roberts, A. J.; Meech, S. R. *Anal. Chem.* **55** (1983) 68.
- [4] Pant, D.; Tripathi, H. B.; Pant, D. D. *J. Lumin.* **51** (1992) 223.
- [5] Kume, H.; Taguchi, T.; Nakatsugagawa, K.; Ozawa, K.; Suzuki, S.; Samuel, R.; Nishimura, Y.; Yamazaki, I. *Proc. SPIE* **1640** (1992) 440.
- [6] Demas, J. N., "Excited State Lifetime Measurements", Academic, New York, **1983**, Kap. 9, S. 156.
- [7] O'Connor, D. V.; Phillips, D. D., "Time-Correlated Single Photon Counting", Academic, New York, **1984**.
- [8] Bebelaar, D. *Rev. Sci. Instrum.* **57** (1986) 1116.
- [9] Cova, S.; Ripamonti, G. *Rev. Sci. Instrum.* **61** (1990) 1072.
- [10] Cova, S.; Ghioni, M.; Zappa, F.; Lacaita, A. *Rev. Sci. Instrum.* **64** (1993) 118.
- [11] Cova, S.; Lacaita, A.; Ripamonti, G., "Eighth International Workshop on Laser Ranging Instrumentation", NASA Conference Publication 3214, **1993**, S. 5-1.
- [12] ORTEC, EG&G Application Note **1992**, AN-42.
- [13] Demas, J. N., "Excited State Lifetime Measurements", Academic, New York, **1983**, Kap. 10 & 11, S. 174.
- [14] Boens, N.; Tamai, N.; Yamazaki, I.; Yamazaki, T. *Photochem. Photobiol.* **52** (1990) 911.
- [15] Boens, N., "Pulse Fluorometry" in Luminescence Techniques in Chemical and Biochemical Analysis (Hrsg.: Baeyens, W. R. G.; De Keukeleire, D.; Korkidis, K.), Marcel Dekker, New York, **1991**, Bd. 12, S. 21.
- [16] BiosQuant GmbH, persönliche Mitteilung, 1994
- [17] Neumann, W. *LaborPraxis* **9** (1994) 326.
- [18] Sakai, Y.; Kawahigashi, M.; Minami, T.; Inoue, T.; Hirayama, S. *J. Lumin.* **42** (1989) 317.
- [19] Eaton, D. F. / IUPAC *J. Photochem. Photobiol. B* **2** (1988) 523.
- [20] Louis, T.; Schatz, G. H.; Klein-Bölting, P.; Holzwarth, A. R.; Ripamonti, G.; Cova, S. *Rev. Sci. Instrum.* **59** (1988) 1148.
- [21] Spears, K. G.; Cramer, L. E.; Hoffland, L. D. *Rev. Sci. Instrum.* **49** (1978) 255.
- [22] Ware, W. R.; Pratinidhi, M.; Bauer, R. K. *Rev. Sci. Instrum.* **54** (1983) 1148.
- [23] Eisrum, N. H.; Lynggaard-Jensen, A. *Proc. SPIE* **1269** (1990) 167
- [24] Ainbund, M. R.; Buevich, O. E.; Kamalov, V. F.; Men'shikov, G. A.; Toleutaev, B. N. *Rev. Sci. Instrum.* **63** (1992) 3274.
- [25] Gaudochon, P.; Wahl, P. *Biosphys. Chem.* **8** (1978) 87.
- [26] Libertini, L. J.; Small, E. W. *Anal. Biochem.* **138** (1984) 314.
- [27] Zucker, M.; Szabo, A. G.; Bramall, L.; Krajcarski, D. T. *Rev. Sci. Instrum.* **56** (1985) 14.
- [28] Ross, J. B. A.; Laws, W. R. *Proc. SPIE* **1681** (1992) 98.
- [29] Knutsen, J. R.; Beechem, J. M.; Brand, L. *Chem Phys. Lett.* **102** (1983) 501.
- [30] Beechem, J. M.; Gratton, E. *Proc. SPIE* **909** (1989) 70.
- [31] Demas, J. N., "Excited State Lifetime Measurements", Academic, New York, **1983**, Kap. 8, S. 127.
- [32] O'Connor, D. V.; Ware, W. R.; Andre, J. C. *J. Phys. Chem.* **83** (1979) 1333.
- [33] Buck, B.; Macaulay, V. A., "Maximum Entropy in Action", Clarendon, Oxford, **1993**.
- [34] Pouget, J.; Mugnier, J.; Valeur, B. *J. Phys. E: Sci. Instrum.* **22** (1989) 855.
- [35] Bevington, R. P., "Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences", McGraw-Hill, New York, **1969**.
- [36] Press, W. H.; Flannery, B. P.; Teukolsky, S. A.; Vetterling, W. T., "Numerical Recipes in Pascal - The Art of Scientific Computing", Cambridge University, Cambridge, **1989**, Kap. 10 & 14, S. 309.
- [37] Marquardt, D. W. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* **11** (1963) 431.
- [38] Van den Zegel, M.; Boens, N.; Daems, D.; De Schryver, F. C. *Chem. Phys.* **101** (1986) 311.
- [39] Basile, F.; Cardamone, A.; Grinstead, K. D.; Miller, K. J.; Lytle, F. E.; Caprara, A.; Clark, C. D.; Heritier, J.-M. *Appl. Spectrosc.* **47** (1993) 207.
- [40] Love, L. J. C.; Upton, L. M. *Anal. Chem.* **52** (1980) 496.
- [41] Haugen, G. R.; Lytle, F. E. *Anal. Chem.* **53** (1983) 1554.
- [42] Magde, D.; Brannon, J. H.; Cremers, T. L.; Olmsted J. J. *J. Phys. Chem.* **83** (1979) 696.
- [43] Brooks Shera, E.; Seitzinger, N. K.; Davis, L. M.; Keller, R. A.; Soper, S. A. *Chem. Phys. Lett.* **174** (1990) 553.
- [44] Soper, S. A.; Nutter, H. L.; Keller, R. A.; Davis, L. M.; Brooks Shera, E. *Photochem. Photobiol.* **57** (1993) 972.
- [45] Soper, S. A.; Davis, L. M.; Brooks Shera, E. *J. Opt. Soc. Am.* **9** (1992) 1761.
- [46] Tellinghuisen, J.; Goodwin, P. M.; Ambrose, W. P.; Martin, J. C.; Keller, R. A. *Anal. Chem.* **66** (1994) 64.
- [47] Hahn, J. H.; Soper, S. A.; Nutter, H. L.; Martin, J. C.; Jett, J. H.; Keller, R. A. *Appl. Spectrosc.* **45** (1991) 743.

3. Anwendungen der Laserimpulsfluorometrie in der Wasseranalytik

Ziel der Wasseranalytik ist der Nachweis und die quantitative Bestimmung von chemischen Stoffen im Wasser sowie die Identifizierung von biologischen Spezies. Neben den natürlich im Wasser vorkommenden Substanzen ist vor allem der qualitative und quantitative Nachweis von Schadstoffen anthropogenen Ursprungs von großem Interesse. Hier ergibt sich ein weiteres und zukunftsträchtiges Anwendungsfeld der Laserimpulsfluorometrie aufgrund ihrer im Kap. 1. beschriebenen Vorteile gegenüber bisher angewendeten Analysemethoden. Im Rahmen dieses Projektes ist der Schwerpunkt der Untersuchungen auf die Analytik anthropogen emittierter Kontaminanten gelegt worden.

Für den Einsatz der Fluoreszenzspektroskopie in der Wasseranalytik können die betrachteten Stoffe in zwei Gruppen eingeteilt werden:

- Substanzen mit Eigenfluoreszenz und
- nicht fluoreszierende Substanzen, die mit spezifischen Reagenzien ein fluoreszierendes Produkt bilden, d. h., Fluoreszenz tritt erst nach Derivatisierung bzw. Umwandlung auf.

Die Analytik von Substanzen mit Eigenfluoreszenz beschränkt sich im allgemeinen auf solche Stoffe, die mindestens ein aromatisches oder heteroaromatisches Ringsystem enthalten. Viele dieser Substanzen kommen natürlicherweise nicht im Wasser vor, d. h., Haupteintragsquelle stellen anthropogene Emissionen, in der Regel Abwässer jeglicher Art dar. Da es sich meist um hydrophobe Verbindungen handelt, sind sie auch in Abwässern oft nur in geringen Mengen enthalten. Bei der Analytik von aromatischen Kontaminanten im Wasser spielt besonders der Nachweis und die Bestimmung der niedermolekularen Aromaten (Benzol-, Toluol- und Xylol-Derivate; BTX) und der kondensierten Polyaromaten (polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe; PAK) eine wichtige Rolle.

Bei der Substanzgruppe der PAK handelt es sich um etwa 200 Verbindungen, die u. a. bei unvollständiger Verbrennung entstehen und z. B. in Industrie- und Autoabgasen enthalten sind. Sie werden z. T. im lebenden Organismus metabolisiert, können sich aber in bestimmten Organismen, beispielsweise Muscheln, stark anreichern. Wegen ihres z. T. kanzerogenen und mutagenen Potentials verdienen sie besondere Beachtung. Ihr Vorhandensein im Wasser ist daher in Rechtsverordnungen durch Grenzwerte geregelt [1]. Die Bestimmung der PAK erfolgt heute in der Regel mittels Dünnschichtchromatographie (DC) mit UV-Absorptions- oder Fluoreszenzdetektion oder HPLC¹ mit Fluoreszenzdetektion [2]. Da es sich bei den PAK um in der Regel gut fluoreszierende Verbindungen mit Fluoreszenzlebensdauern im mittleren und hohen ns-Bereich handelt, sind die Untersuchungen zum fluorometrischen Nach-

weis dieser Verbindungen zahlreich in der Literatur beschrieben [3]. Auch Verfahren der zeitaufgelösten Fluorometrie werden z. T. schon routinemäßig in der Analytik der PAK eingesetzt (Impulsfluorometrie: [4, 5]; Phasenfluorometrie: [6, 7]; Kopplung mit der HPLC: [8, 9]). Weiterhin wurde die PAK-Analytik mittels Laserimpulsfluorometrie in der jüngsten Vergangenheit bereits in einem BMFT-Projekt, Kennzeichen 02 WT 9150, untersucht, so daß im Rahmen dieses Projektes die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) nicht eingehend untersucht worden sind [10, 11].

Die Arbeiten zum Nachweis von Substanzen mit Eigenfluoreszenz beschränkten sich daher auf die Substanzgruppe der BTX (vgl. Kap. 3.1.).

Zeigen Substanzen nach Lichtabsorption keine Eigenfluoreszenz, müssen sie für einen fluoreszenzspektroskopischen Nachweis mit geeigneten Reagenzien zu einem fluoreszierenden Produkt umgesetzt werden. Je nach Analyseverfahren kann diese Derivatisierung vor oder nach einer Trennung der Analyten oder direkt vor dem fluorometrischen Nachweis erfolgen, entscheidend ist die jeweilige Reaktionsdauer bzw. die Stabilität der gebildeten Derivate. Routinemäßig wird die Kopplung der (statischen) fluorometrischen Detektion mit den Trennverfahren DC, HPLC und Elektrophorese sowie immunochemischen Verfahren (Fluoroimmunoassays) bereits umfassend in der Analytik nicht fluoreszierender organischer Substanzen eingesetzt [12].

Potentielle Fluoreszenzmarker sind eigenfluoreszierende oder nicht fluoreszierende Reagenzien, die mit einem Analyten (und z. T. einem entsprechenden Co-Reagenz) fluoreszierende Derivate mit anderen spektroskopischen Eigenschaften bilden. Die Selektivität und Spezifität der Nachweisreaktionen lassen sich dabei gezielt über die Wahl des geeigneten Fluoreszenzmarkers steuern, die Reaktionspartner können z. B. kovalent gebundene Derivate, Ionenpaare oder Komplexe bilden.

Neben der Ausnutzung der hohen Empfindlichkeit der fluorometrischen Messung sind weitere Vorteile des Einsatzes von Fluoreszenzmarkern im Rahmen der Analytik von nicht fluoreszierenden Verbindungen die gezielte Änderung der optischen (Lage der Absorptions- bzw. Fluoreszenzbanden, Fluoreszenzintensität und -lebensdauer) und der chemischen Eigenschaften (hydrophiler Analyt gegenüber hydrophobem Derivat) dieser Substanzen durch die Derivatisierung.

Von den nicht fluoreszierenden Stoffen haben vor allem die Schwermetallionen eine besondere Bedeutung in der Wasseranalytik. Sie sind hervorragend wasserlöslich, z. T. hochtoxisch und stellen ubiquitäre Kontaminanten dar (Eingleitungen der chemischen Industrie, aus Abwässern der

¹ High Performance Liquid Chromatography = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

metallverhüttenden und metallveredelnden Industrie oder Eintrag aus schwermetallhaltigen Abfällen bzw. Altlasten). Für viele dieser Ionen sind außerdem in entsprechenden Rechtsverordnungen Grenzwerte festgelegt [1, 13]. Aufgrund vielfältiger Möglichkeiten zur Komplexbildung dieser Ionen mit fluoreszierenden Reagenzien standen Untersuchungen zum fluorometrischen Nachweis dieser Spezies im Vordergrund der im Rahmen des Projektes durchgeführten Arbeiten (vgl. Kap. 3.2. ff.).

3.1 Analyse von BTX

Die Verschmutzung von Oberflächenwasser und Grundwasser mit BTX tritt vor allem durch Kontaminationen bei der Gewinnung, dem Transport, der Lagerung und der Verarbeitung von Kraftstoffen und anderen raffinierten Ölprodukten (Heizöl, Motorenöl u. a.) und bei der Beseitigung von Altöl sowie als Folge von Emissionen des Kraftfahrzeugverkehrs auf. In Rechtsverordnungen werden für BTX in der Regel keine eigenen Grenzwerte angegeben, die Substanzen werden meist mit anderen niedermolekularen organischen Schadstoffen unter „Mineralöle und gelöste emulgierte Kohlenwasserstoffe“ zusammengefaßt (s. z. B. [1]).

Aufgrund der stark toxischen und relativ persistenten Eigenschaften der BTX ist der Nachweis und die genauere Charakterisierung dieser Kontaminanten in wäßrigen Proben von großer Wichtigkeit [14].

Insbesondere statische und zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen nach Anregung im UV-Bereich stellen geeignete Analysemethoden für die Untersuchung von Wasserverschmutzungen durch die im UV-Bereich absorbierenden BTX dar. Im Rahmen der folgenden Arbeiten sollen die Nachweisempfindlichkeiten und Bestimmungsgenauigkeiten der statischen und zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie verglichen werden.

3.1.1. Ablauf der Messungen

Die Fluoreszenzspektroskopie ist ein relatives Meßverfahren und benötigt eine Kalibrierung durch Referenzsubstanzen.

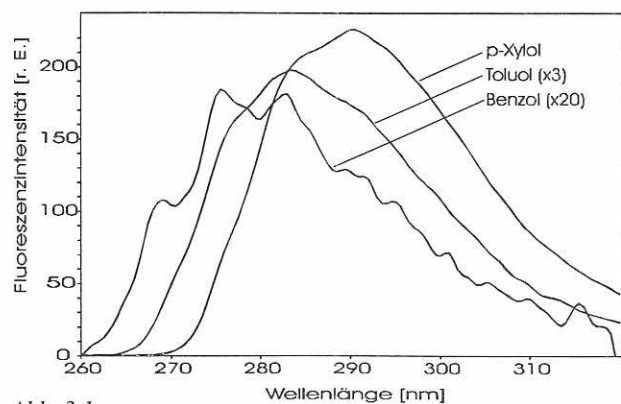


Abb. 3.1 Statische Fluoreszenzspektren von Benzol, Toluol und *p*-Xylol in Wasser ($c = 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, Anregungswellenlänge 255 nm, Meßbedingungen s. Kap. 3.1.2.)

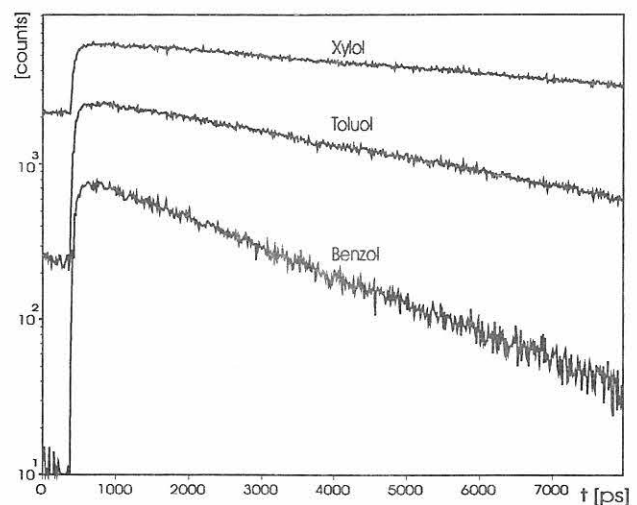


Abb. 3.2 Fluoreszenzabklingkurven von Benzol, Toluol und *p*-Xylol in Wasser ($c = 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, Anregungswellenlänge 255 nm, Meßbedingungen s. Kap. 3.1.2.)

zen. Deshalb wurden Referenzlösungen von 10^{-2} mol/l von Benzol (B), Toluol (T) und *p*-Xylol (X) in luftgesättigtem bidestilliertem Wasser in dampfdichten 10 x 10 mm Quarzküvetten statisch und zeitaufgelöst vermessen.

Abb. 3.1 zeigt die statischen Spektren der Fluoreszenz von Benzol, Toluol und *p*-Xylol, die sich sowohl spektral als auch stark in ihrer Intensität unterscheiden. Abb. 3.2 zeigt die entsprechenden Abklingkurven der Fluoreszenz in logarithmischer Darstellung.

Nach der Messung der Einzelkomponenten wurden acht synthetische Proben mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen hergestellt und vermessen. Dem Durchführenden der Analyse wurde die Zusammensetzung der Proben erst nach erfolgter Messung und numerischer Auswertung bekanntgegeben.

3.1.2. Spektroskopische Meßtechnik

Statische Fluoreszenzspektren:

Fluoreszenzspektrometer Perkin-Elmer LS50B
Anregung: 255 nm, spektrale Spaltbreite 2.5 nm,
Emission: 260 bis 320 nm, spektrale Spaltbreite 2.5 nm,
Scan-Geschwindigkeit 50 nm/min,
Datensatz besteht aus 121 Punkten

Fluoreszenzabklingkurven:

unikales Pikosekunden-Laserimpulsfluorometer (s. Kap. 2.2.)
Anregung: 255 nm (3. Harmonische des Titan-Saphir-Lasers), 5 mW, 0.9 ps, 82 MHz
Emission: 285 nm, spektrale Spaltbreite 5 nm, Subtraktiver Doppelmonochromator,
Akkumulation 300 Sekunden
Elektronik: Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung, Meßfenster 8 ns,
Datensatz besteht aus 600 Punkten

3.1.3. Numerische Analyse

Statische Fluoreszenzspektren:

Die Auswertung der Mischungsverhältnisse der Einzelkomponenten erfolgte mit dem Programm APROMAX mit einer linearen "Singular-Value Decomposition" [15]. Die Fluoreszenzspektren der drei Komponenten B, T und X wurden als Basisfunktionen zur Berechnung der Vorfaktoren und Standardabweichungen benutzt. Abb. 3.3 zeigt die spektrale Anpassung für die Mischung H aus Tab. 3.2.

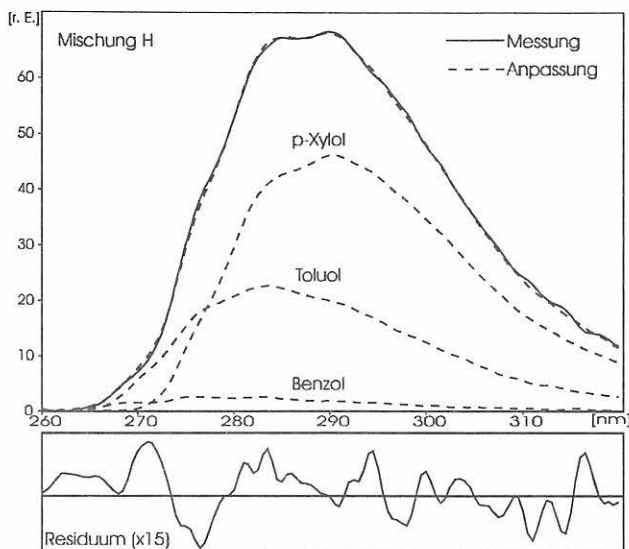


Abb. 3.3
Darstellung der Anpassung der statischen Fluoreszenzspektren der Komponenten B, T und X für die Mischung H

Fluoreszenzabklingkurven

Aus den Abklingkurven der Einzelkomponenten wurden die jeweiligen Abklingzeiten und Amplituden durch Entfaltung bestimmt (siehe Tabelle 3.1).

Die Analyse einer Mischung bestand in der Bestimmung der drei Amplituden der Komponenten mit den in Tab. 3.1 angegebenen Abklingzeiten mit dem Programm DECAMAX (s. Kap. 2.3.3.) und deren Umrechnung in Konzentrationen.

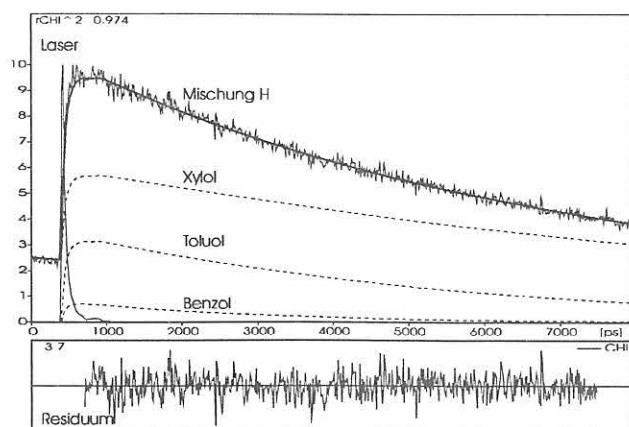


Abb. 3.4
Lineare Darstellung der Anpassung der Fluoreszenzabklingkurve der Mischung H und der Komponenten B, T und X

Tabelle 3.1
Übersicht über Abklingzeiten und Amplituden der Referenzproben in Wasser ($c = 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

Referenzsubstanz	Abklingzeit [ns]	Amplitude [r. E.]
Benzol	2.34	2.22
Toluol	4.95	7.02
p-Xylol	11.11	12.54

nen. Abb. 3.4 zeigt diese Anpassung am Beispiel von Mischung H. Die Fehlerabschätzung ergibt sich aus der Reproduzierbarkeit der numerischen Anpassungen, durch Wiederholungen mit verschiedenen Startwerten, und dem Fehler der Messung der Anregungsintensität der Fluoreszenz.

3.1.4. Ergebnisse der BTX-Analyse

Tabelle 3.2 zeigt eine Gegenüberstellung der Analyseergebnisse von statischer und zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie. Die mittlere Abweichung aller Einzelkonzentrationen vom wahren Wert von 19 Prozent für die zeitaufgelösten Messungen ist deutlich geringer als die der statischen Fluoreszenzspektroskopie mit 57 Prozent.

Obwohl sich die statischen Fluoreszenzspektren von B, T und X deutlich unterscheiden (Abb. 3.1), ist die Genauigkeit bei der Bestimmung von Mischungen anhand der Spektren signifikant schlechter als die der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie.

3.1.5. Einordnung der Ergebnisse

Die Genauigkeit der zeitaufgelösten Messungen kann noch erheblich erhöht werden, wenn die Impulsfolgefrequenz des Lasers zur Fluoreszenzanregung durch einen Puls picker, der uns gegenwärtig noch nicht zur Verfügung steht, herabgesetzt wird. Die jetzige Folgefrequenz von 82 MHz bedeutet einen Impulsabstand von 12.5 ns und ein Meßfenster von 8 ns. Um die Fluoreszenz von p-Xylol mit einer Fluoreszenzlebensdauer von 11 ns mit maximaler Präzision messen zu können, benötigt man ein Meßfenster von etwa 50 ns. Entsprechendes gilt für Toluol, dessen Fluoreszenz mit einer Abklingzeit von 5 ns einen Meßbereich von 25 ns benötigt. Damit wäre insbesondere die Bestimmung von Mischungsverhältnissen in einem größeren Konzentrationsbereich realisierbar (Steigerung der Dynamik um wenigstens eine Größenordnung).

Die zeitaufgelösten Messungen dieser Serie erfolgten ohne Optimierung der experimentellen Bedingungen im Hinblick auf maximale Nachweisempfindlichkeit. Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen wurde anstelle des ansonsten benutzten subtraktiven Doppelmonochromators ein lichtstarker UV-Einfachmonochromator (Lambda-Scanner) sowie eine Referenzprobe des Laboratorium 10.21 der BAM für die BTX-Analytik mittels HPLC benutzt. Die Probe enthielt Benzol, Toluol, Ethylbenzol, o-Xylol und m-Xylol mit ei-

Mix	Benzol [10^{-3} mol/l]	Toluol [10^{-3} mol/l]	p-Xylol [10^{-3} mol/l]
	Einwaagen Analyse statisch Analyse zeitaufgelöst	Einwaagen Analyse statisch Analyse zeitaufgelöst	Einwaagen Analyse statisch Analyse zeitaufgelöst
A	20	3	0
	12.6	4.7	0.04
	22.4	3.3	0.00
B	0	1	2
	2.2	4.7	1.8
	0.03	1.4	1.9
C	25	1	0
	14.4	1.28	0.02
	24.4	0.84	0.016
D	40	0	0.5
	18.2	0.32	0.08
	32.2	0.00	0.29
E	25	1	2
	13.4	1.25	0.67
	27.2	0.66	1.69
F	0	1	2
	4.1	1.1	2.5
	0.08	1.46	1.69
G	22	5	0.5
	27.0	2.3	0.09
	20.4	3.9	0.31
H	10	3.5	3.5
	5.8	3.45	2.05
	11.2	4.34	3.0
SIGMA	±	±	±
	± 2.1	± 0.6	± 0.03
	± 5%	± 8%	± 12%

Tabelle 3.2
Vergleich der Ergebnisse von
statischer und zeitaufgelöster
Fluoreszenzspektroskopie

ner Gesamtkonzentration von $5 \cdot 10^{-7}$ mol \cdot l $^{-1}$. Bei 5 mW Anregungsleistung und einer moderaten spektralen Spaltbreite von 4 nm konnte noch eine Fluoreszenzintensität von etwa 1800 counts pro Sekunde erzielt werden. Daraus ergibt sich eine Nachweisgrenze von 10^{-8} mol \cdot l $^{-1}$ für die Bestimmung einer einzigen Komponente oder von Summenparametern. Für die Bestimmung von Mischungsverhältnissen der Einzelkomponenten liegt die Grenze aufgrund des benötigten besseren Signal/Rausch-Verhältnisses bei einer Gesamtkonzentration von etwa 10^{-6} mol \cdot l $^{-1}$ und Meßzeiten von 10 bis 20 Minuten. Die generelle apparative Nachweisgrenze beträgt für Einzelsubstanzen mit guten Quantenausbeuten ($\phi_f > 0.25$) und in Abhängigkeit vom Wellenlängenbereich zwischen 10^{-10} und 10^{-13} mol \cdot l $^{-1}$ (s. Kap. 2.4.2.).

Letztere liegt beispielsweise für BTX absolut bei 2µg in der DC bzw. HPLC mit Fluoreszenzdetektion und bei 100ng in der Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektion [16]. Diese Substanzmengen werden bereits in den 10^{-3} -molaren Lösungen der Tab. 3.2 erfaßt, da die im Laserstrahl angeregte absolute BTX-Masse nur etwa 1mg beträgt [16]. Die Nachweisgrenze der Laserimpulsfluorometrie von 10^{-8} mol \cdot l $^{-1}$ in Mikrovolumen-Küvetten entspricht einer Probenmasse von etwa 10 Picogramm.

3.2. Analyse von Metallionen

Bei der Wasseranalytik spielt der Nachweis von Metallionen eine bedeutende Rolle. Viele der in der Regel nur in Spuren im Wasser vorkommenden Schwermetallionen (z. B. Cu $^{2+}$, Zn $^{2+}$, Co $^{2+}$ und Ni $^{2+}$) sind einerseits essentiell und müssen für aquatische Organismen in hinreichender Menge biologisch verfügbar sein, haben aber andererseits in über diesen optimalen Dosen liegenden Konzentrationen subtoxische oder toxische Wirkungen. Der Nachweis kleiner Schwermetallmengen ist daher bei Untersuchungen zum Kontaminationsgrad eines Wassers von großer Wichtigkeit. Die Bestimmung der Gehalte an Alkali- und Erdalkalimetallionen, die in deutlich höheren Konzentrationen im Wasser vorkommen, ist im Hinblick auf Aussagen über den Salzgehalt und die Wasserhärte, die wiederum maßgeblich die Artenvielfalt und -zusammensetzung aquatischer Lebensräume beeinflussen, von Interesse [17].

Metallionen können im Wasser in unterschiedlichen Oxidationsstufen vorkommen und unterscheiden sich je nach Oxidationsstufe deutlich in ihrer biologischen Verfügbarkeit und toxischen Wirkung. Von analytischem Interesse ist daher die getrennte Erfassung verschiedener ionischer Spezies eines Metalls, um detaillierte Aussagen über den

Bindungszustand und die Verteilung dieses Metalls in dem betreffenden Umweltmedium machen zu können (Speziation) [18].

Besonders bei der Bestimmung von Metallionen verschiedener Oxidationsstufen nebeneinander in einer Wasserprobe sollte möglichst schonend, d. h., möglichst ohne Aufarbeitung und Trennung analysiert werden, um (verfälschende) Redoxreaktionen zu vermeiden. Da es sich bei Metallionen in der Regel um nicht fluoreszierende Spezies handelt (Ausnahme: Uran und Selten-Erd-Metalle), kann die Fluorometrie als sogenanntes "kaltes" Analysenverfahren mit hoher Empfindlichkeit nur bei Einsatz geeigneter selektiver und spezifischer Komplexbildner, die selbst fluoreszieren oder mit dem Metallion einen fluoreszierenden Komplex bilden, vorteilhaft im Sinne einer "schonenden" Metallionenanalytik eingesetzt werden [12].

3.3. Komplexbildner für die Fluorometrie

Der fluorometrische Nachweis von nicht fluoreszierenden Metallionen erfordert den Einsatz eines Fluoreszenzmarkers, d. h. einer organischen Verbindung, deren Fluoreszenzverhalten sich bei Kationenkomplexierung möglichst spezifisch ändert. Dabei können sowohl kationen-induzierte Modifizierungen der spektralen Lage der Absorptions- und Emissionsbanden als auch der Fluoreszenzintensität, Fluoreszenzverstärkung oder Fluoreszenzlöschung, und der Fluoreszenzlebensdauer auftreten. Grundsätzlich lassen sich folgende Effekte beobachten [19, 20].

- Das Metallion wird durch einen nicht fluoreszierenden oder einen fluoreszierenden Komplexbildner, im folgenden Fluoreszenzmarker genannt, gebunden und bildet mit diesem einen, im ersten Fall, fluoreszierenden oder, im zweiten Fall, stärker fluoreszierenden Komplex. Hierbei sind mehrere Mechanismen zu unterscheiden:
 - Der Fluoreszenzmarker ist nicht fluoreszierend, und erst die Komplexbildung bewirkt ein "Anschalten" der Fluoreszenz ("switched-on fluorescence").
 - Der gebildete Komplex ist stärker fluoreszierend und emittiert bei der gleichen Wellenlänge wie der ungebundene Fluoreszenzmarker, d. h. in Abhängigkeit der Metallionkonzentration ist eine Zunahme der Intensität der Fluoreszenzbande, eine "chelation-enhanced fluorescence" (CHEF²), zu beobachten.
 - Der Komplex emittiert bei einer anderen Wellenlänge als der ungebundene Fluoreszenzmarker, d. h. bei Komplexbildung nimmt die Intensität der Emissionsbande des ungebundenen Fluoreszenzmarkers in gleicher Weise ab wie die Bande des Komplexes zunimmt. Es tritt eine Änderung des Intensitätsverhältnisses der beiden Banden auf, wodurch das meß-

bare Signal unabhängig von der Konzentration des Fluoreszenzmarkers wird.

- Das Metallion wird nach Reaktion mit einem fluoreszierenden Komplexbildner indirekt durch Löschung der Fluoreszenz dieser Verbindung nachgewiesen. Dieser Effekt wird in der Literatur als "chelation-enhanced quenching" (CHEQ) bezeichnet.

Alle Effekte lassen sich sowohl mit statischen als auch mit zeitaufgelösten fluoreszenzspektroskopischen Methoden messen. Nachweistechnische Vorteile ergeben sich aus zeitaufgelösten Messungen vor allem dann, wenn Komplexe eines Fluoreszenzmarkers mit mehreren Metallionen spektral nicht unterscheidbar, anhand ihrer unterschiedlichen Abklingzeiten aber separierbar sind [21]. Dieses Fluoreszenzverhalten läßt sich auch gezielt bei der Analytik mit sogenannten "Multiplex-Dyes"³ ausnutzen ([22], vgl. Kap. 3.3.3.). Von der meßtechnischen Seite her betrachtet, stellt dabei die Messung des ersten Effekts, die Bildung eines (stark) fluoreszierenden Komplexes, das sensitivere Verfahren dar, da das Signal/Rausch-Verhältnis bei der Messung größer ist und störende (zumeist kurzlebige) Untergrundfluoreszenzen (im Wasser z. B. Huminstoffe) eine geringere Rolle spielen. Bei den im Rahmen dieser Arbeiten eingesetzten Komplexbildnern handelt es sich vor allem um Verbindungen, die Fluoreszenzänderungen des ersten Typs zeigen.

Weiterhin sollten Fluoreszenzmarker für die Metallionenanalytik in wäßrigen Medien noch folgende Voraussetzungen erfüllen, um für einen Einsatz in der Routineanalytik geeignet zu sein.

- Die Komplexbildung sollte reversibel sein und die Gleichgewichtseinstellung möglichst schnell erfolgen.
- Sie sollten wasserlöslich oder in einem mit Wasser ausreichend mischbaren Lösungsmittel löslich sein.
- Sie sollten möglichst pH-Wert unabhängige Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften zeigen.
- Sie sollten redoxunempfindlich und ihre Fluoreszenzeigenschaften sollten unabhängig von der Konzentration des im Wasser gelösten Sauerstoffs sein.
- Sie sollten photochemisch stabil sowie im Fall der gekoppelten Fluoreszenzmarker (vgl. Kap. 3.3.3.) nicht hydrolysiert sein.

Aufgrund ihres elektronischen Aufbaus und der daraus resultierenden Fähigkeit, koordinative Bindungen einzugehen, lassen sich Schwermetallionen bzw. Ionen der Übergangsmetalle durch organische Liganden mit freien Elektronenpaaren leicht komplexieren. Seitens des Metallions hängt die Stabilität dieser Komplexe von der elektronischen Besetzung der Valenzschalen und dem Ionenradius ab. Auf der Seite des Komplexbildners spielen vor allem die sogenannte "Zähigkeit" des Liganden, d. h. die Anzahl der potentiellen Koordinationsstellen, die ein Ligand dem Metallion anbieten kann, die räumliche Anordnung dieser

² Chelation = Chelatbildung; besondere Art der Komplexbildung, wobei das Metallion von mindestens zwei Bindungsstellen des Liganden koordinativ gebunden wird.

³ "Multiplex-Dyes" sind strukturell sehr ähnliche Fluoreszenzfarbstoffe, die sich im Idealfall spektral nur minimal, in ihren Abklingzeiten aber deutlich unterscheiden. Analytisch anwendbare Systeme sind bislang nur für die Biodiagnostik (z. B. DNA-Sequenzierung) und für die Polymeranalytik bekannt [22].

Koordinationsstellen und deren chemische Natur ("Härte" nach dem Lewis'schen Säure/Base-Konzept, Protonierbarkeit/Deprotonierbarkeit) eine Rolle [23]. Offenkettige Liganden bilden vor allem dann stabile Komplexe, wenn eine Stabilisierung über den sogenannten "Chelateffekt" erfolgen kann, d. h. wenn die Bindung des Metallions durch einen Komplexbildner zur Ausbildung eines 5- oder 6-Ringes führt, was die Stabilität eines Komplexes in der Regel zusätzlich erhöht [24]. Geeignete offenkettige Liganden sind daher vor allem zweizählige Chelatbildner, deren Koordinationsstellen so angeordnet sind, daß es bei Komplexbildung zur Ausbildung von 5- bzw. 6-Ringen kommt. Bei makrozyklischen Liganden spielt neben der Art der Donoratome und deren Anordnung im Makrozyklus der sogenannte "makrozyklische Effekt"⁴ eine wesentliche Rolle bei der Stabilisierung bestimmter Komplexe [25].

3.3.1. Chemischer Aufbau von Fluoreszenzmarkern

Fluoreszenzmarker lassen sich nach ihrem chemischen Aufbau in zwei große Gruppen einteilen [20], wobei die erste und am längsten bekannte Gruppe von Verbindungen relativ einfache organische Moleküle sind, die potentiell fluoreszierend sind und die verschiedensten Metallionen binden können. Beispiele sind Morin, 8-Hydroxychinolin und einige Salicylsäurederivate [26]. Bei diesen Molekülen handelt es sich um Fluoreszenzmarker, bei denen der Analyt mit mindestens einer Bindungsstelle im Molekül, die Teil des π -Systems des Fluorophors ist, wechselwirkt. Sie werden als "intrinsische" Fluoreszenzmarker ("intrinsic fluorescence probes") bezeichnet [20].

Diese "einfachen" intrinsischen Fluoreszenzmarker sind aromatische Verbindungen, die zwei oder mehrere potentielle Komplexbildungsstellen im Molekül besitzen und mit verschiedenen Schwermetallionen fluoreszierende Komplexe bilden können (Abb. 3.5). Solche Moleküle besitzen in der Regel ein rein aromatisches oder heteroaromatisches Grundgerüst, das oft ein oder mehrere Substituenten mit freien Elektronenpaaren trägt (Tab. 3.3).

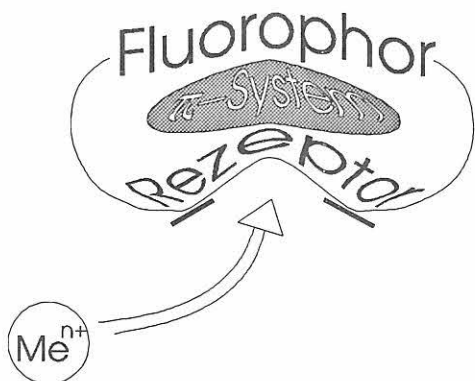


Abb. 3.5
Intrinsischer Fluoreszenzmarker
(π -System (grau), freie Elektronenpaare (schwarze Balken))

⁴ Komplexe mit makrozyklischen Liganden sind aus entropischen und enthalpischen Gründen in der Regel stabiler als Komplexe mit offenkettigen Liganden, vorausgesetzt, Metallionenradius und Hohlraumgröße des Liganden passen zueinander.

Tabelle 3.3
Bindungsstellen von Fluoreszenzmarkern

Bindungsstellen	
im heterozyklischen System	als Substituenten
$-\bar{O}-$	$-\bar{O}H$
$-\bar{S}-$	$-\bar{S}H$
$=\bar{N}-$	$-\bar{N}H_2$

Von diesen Substanzen eignen sich allerdings nur wenige, wie z. B. Calcein, zum spezifischen Nachweis eines bestimmten Kations (hier: Ca^{2+}). Die meisten dieser "einfachen" fluoreszierenden Liganden gehen mit vielen Metallionen unspezifische Reaktionen ein und bilden spektral und zeitaufgelöst meist nur schwer unterscheidbare lumineszierende Komplexe (z. B. Morin mit Be^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , In^{3+} , Cd^{2+} , Zr^{4+} und vielen anderen mehr) [26]. Für den Einstieg in dieses Arbeitsgebiet wurde von uns der Nachweis von Al^{3+} neben Ga^{3+} und In^{3+} durch Komplexbildung mit 8-Hydroxychinolinsulfonsäure mittels zeitaufgelöster Fluorometrie optimiert [27], wobei eine analytisch hinreichende Unterscheidung zwischen den Ga^{3+} - und In^{3+} -Komplexen anhand ihrer Abklingzeiten allerdings nicht möglich war. Daher ist der Einsatz von spezifischeren Fluoreszenzmarkern für den selektiven Nachweis von nicht fluoreszierenden Metallionen von besonderem Interesse.

Das Design und die Synthese von maßgeschneiderten Fluoreszenzmarkern für den Metallionennachweis, sogenannten Fluorophor-Rezeptor-Systemen, gewinnt deshalb seit den ersten Arbeiten von Sousa zur Anwendung makrozyklischer Fluoreszenzmarker beim Kationennachweis innerhalb der chemischen Analytik ständig an Bedeutung [28].

Bei dieser zweiten Gruppe der fluoreszierenden Komplexbilder, den Fluorophor-Rezeptor-Systemen (FRS), ist gezielt ein bestimmter Fluorophor kovalent an einen ausgewählten Rezeptor gekoppelt ("gekoppelte" Fluoreszenzmarker = "conjugated fluorescence probes"). Die FRS lassen sich nach ihrem chemischen Aufbau wiederum in zwei Gruppen unterteilen:

- Fluoreszenzmarker, bei denen der Fluorophor direkt an den Rezeptor gebunden ist. Das π -System des Fluorophors und die komplexierende Rezeptoreinheit sind dabei nicht vollständig elektronisch entkoppelt und können miteinander wechselwirken.
- Fluoreszenzmarker, bei denen der Fluorophor mit seinem π -System über einen Spacer, z. B. eine kurze gesättigte Alkylkette (σ -Spacer), an den Rezeptorteil des

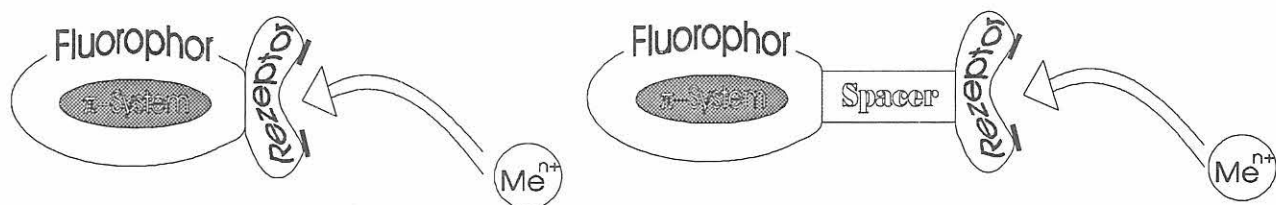


Abb. 3.6

Gekoppelter Fluoreszenzmarker ohne und mit Spacer (π -System (grau), freie Elektronenpaare (schwarze Balken))

Moleküls gebunden ist. Hier sind beide Molekülteile elektronisch vollständig entkoppelt, d. h., der Rezeptor kann die Fluoreszenzeigenschaften des Fluorophors nur durch weitreichende Kräfte wie beispielsweise Elektronentransfer beeinflussen.

Die Komplexierung des Rezeptors mit einem Kation bedingt eine möglichst analytischspezifische Änderung des Fluoreszenzverhaltens des Fluorophors, wobei je nach Aufbauprinzip der Verbindung spektrale Verschiebungen der Absorptions- und Emissionsbanden und/oder Änderungen der Fluoreszenzintensität und der Fluoreszenzlebensdauer auftreten können [29-31].

Die Selektivität von FRS wird insbesondere durch den Rezeptor bestimmt. Geeignete Rezeptoren sind daher chemische Strukturen, die nur bestimmte Metallionen möglichst stark und selektiv binden.

Häufig verwendete Rezeptoren sind stickstoffhaltige Moleküle, bei denen das Stickstoffatom einerseits an der Komplexierung des Metallions beteiligt ist und andererseits der Fluorophor kovalent direkt oder über einen Spacer (z. B. eine Methylengruppe) an dieses Stickstoffatom gebunden ist (Abb. 3.6). Bekannte Beispiele für solche Bindungsstellen sind (substituierte) Ethylendiamin-Einheiten, substituierte Diethanolamin-Einheiten und die oben bereits erwähnten stickstoffhaltigen Kronenetheranaloge [32].

Für das Design von FRS ist weiterhin wichtig, daß eine Kopplung der Fluorophore an die Rezeptormoleküle synthetisch mit moderatem Aufwand und in guter Ausbeute durchführbar ist.

Fluorophor-Rezeptor-Systeme wurden bislang vorwiegend für Protonen, Alkali- und Erdalkalimetallionen entwickelt [29-31, 33]. Analoge Verbindungen für Schwer- und Übergangsmetallionen sind dagegen kaum bekannt, aufgrund der zunehmenden ökotoxischen Relevanz dieser Kationen aber von großem analytischem Interesse [12, 31, 34].

In diesem Teilbereich des Projektes wurden zum Nachweis von Metallionen sowohl "einfache" Fluoreszenzmarker als auch FRS beider Bauprinzipien eingesetzt.

3.3.2. Lumineszenzverhalten von bekannten "einfachen" Fluoreszenzmarkern

Die optischen Eigenschaften der Metallionenkomplexe hängen stark von der Besetzung der d-Orbitale des Metallions ab, woraus sich je nach dem elektronischen Aufbau

des Ions, d. h. je nach der Besetzung der d-Orbitale mit Elektronen, verschiedene Anforderungen an einen Fluoreszenzmarker ergeben. Fluoreszierende Liganden ("einfache Fluoreszenzmarker") bilden mit Metallionen mit vollbesetzter d-Schale, diamagnetischen "closed-shell" Ionen, in der Regel Komplexe, die ebenfalls fluoreszieren und deren Emissionsspektren denen der freien Liganden ähneln [35]. Hier werden bei der Komplexierung die Energien der $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge des Liganden durch das Metallion im allgemeinen nicht beeinflusst. Eine weitere, in den meisten Komplexen diamagnetischer Ionen erfüllte Voraussetzung für dieses Verhalten ist, daß der spin-erlaubte ligandenzentrierte $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang energetisch niedriger liegt als der entsprechende metallzentrierte Übergang [35]. Bei diesem photochemischen Verhalten ist eine fluorometrische Detektion verschiedener Metallionen mittels statischer Fluorometrie ohne vorherige chromatographische oder naßchemische Trennung allerdings nicht möglich. Eine analytische Unterscheidung zwischen Komplexen verschiedener Metallionen mit demselben Liganden kann jedoch mittels zeitaufgelöster Fluorometrie durchgeführt werden, wenn der Schweratom-Effekt genutzt werden kann. Bei diesem Effekt wird die Rate für Singulett-Triplett-Übergänge ("intersystem crossing"), strahlungslose Konkurrenzprozesse zur Fluoreszenz, indirekt über die Spin-Bahn-Kopplungskonstante durch die Kernladungszahl des gebundenen Ions erhöht, was zu einer Änderung der Fluoreszenzlebensdauer führt. Sind die Lebensdauern der Komplexe eines Fluoreszenzmarkers mit verschiedenen Metallionen meßtechnisch hinreichend unterscheidbar, lassen sich Simultanbestimmungen durchführen [36].

Bei Komplexierung von Metallionen mit ungesättigter d-Schale, paramagnetischen "open-shell" Ionen, tritt oftmals eine Löschung der Fluoreszenz des Liganden auf, da diese Kationen die Ratenkonstanten von "intersystem crossing"-Übergängen durch den Paramagnetismus erhöhen können. Der Schweratom-Effekt verstärkt diese Tendenz noch [35]. In der Regel liegen auch die spin-erlaubten d-d-Übergänge der "open-shell" Metallionen energetisch niedriger als die $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge der Liganden. Dies führt in solchen Komplexen zu kleinen Ratenkonstanten der Fluoreszenz.

3.3.3. Lumineszenzverhalten von Fluorophor-Rezeptor-Systemen

Gekoppelte Fluoreszenzmarker, Fluorophor-Rezeptor-Systeme, sind im allgemeinen so konzipiert, daß im unkomplexierten System die Fluoreszenz des Farbstoffs durch intramolekularen lichtinduzierten Elektronentransfer (PET¹,



Abb. 3.7
Mechanismus der Fluoreszenzlöschung durch lichtinduzierten Elektronentransfer (PET)

Abb. 3.7) vom (als Elektronendonator fungierenden) Rezeptor partiell gelöscht ist. Bei Komplexierung des Rezeptors durch ein Kation ändert sich die Elektronendichte des Rezeptors bzw. seine Donorkapazität und damit sein Redoxpotential, was eine Verlangsamung des PET und damit eine Zunahme der Fluoreszenzintensität des Fluorophors bedingt. Da Elektronentransfer ein weitreichender Prozeß ist und über mehrere Bindungen erfolgen kann, treten solche Effekte sowohl in Systemen mit als auch ohne Spacer auf.

Fluorophor-Rezeptor-Systeme mit Spacer, bei denen die Bindungsstelle nicht direkt Bestandteil des fluorophoren π -Elektronensystems ist, sollten bei Komplexierung stets dann CHEF-Effekte zeigen, wenn bei der Bindung des Metallions das bzw. die freie/n Elektronenpaar/e des Donoratoms an der Bindungsbildung beteiligt ist bzw. sind. Allerdings ist hierbei auch der Einfluß des Schweratom-Effekts, je nach Art und Bindung des Metallions (z. B. π - oder σ -Komplex des Metallions mit dem Fluorophor) zu berücksichtigen. Entscheidend ist hier die räumliche Anordnung des Liganden um das Zentralion.

Bei Fluorophor-Rezeptor-Systemen, in denen ein solvatochromer Farbstoff kovalent an ein Heteroatom des Rezeptors gebunden ist, d. h. Fluorophor und Rezeptor direkt elektronisch wechselwirken (Rezeptor ist Teil des π -Elektronensystems des Fluorophors), treten neben Intensitätsänderungen auch kationenspezifische spektrale Verschiebungen bei Komplexierung des Rezeptors mit einem Kation auf. Diese kationeninduzierten Verschiebungen der spektralen Lage der Absorptions- und Emissionsbanden des solvatochromen Farbstoffs sind darauf zurückzuführen, daß sich die elektronische Umgebung des direkt an den Fluorophor gebundenen Heteroatoms durch das positiv geladene Metallion ändert [29]. Kationeninduzierte spektrale Verschiebungen werden beispielsweise bei Systemen, wie dem kommerziell erhältlichen Fluorophor-Diazakronenether-System SBF1, in denen ein solvatochromer Farbstoff direkt über ein Heteroatom wie Stickstoff an einen Sauerstoff-Stickstoff-Makrozyklus gebunden ist, beobachtet [29]. SBF1 wird in der medizinischen und der Bioanalytik bei der fluorometrischen Bestimmung der cytoplasmatischen Natriumkonzentration eingesetzt [33].

3.3.4. Fluoreszenzmarker für den Nachweis von Alkali- und Erdalkalimetallionen

Alkali- und Erdalkalimetallionen sind ebenfalls als diamagnetische "closed-shell" Ionen zu betrachten, unterscheiden sich von Schwer- bzw. Übergangsmetallionen aber insbesondere durch ihren anderen Lewis-Säure-Charakter. Die Ionen der ersten beiden Hauptgruppenelemente bevorzugen als harte Lewis-Säuren bei der Bindung an Liganden solche mit harten Lewis-Basen als Bindungsstellen (z. B. Sauerstoff gegenüber Stickstoff). Bei Alkali- und Erdalkalimetallionen lassen sich ebenfalls Chelat- und makrozyklischer Effekt beobachten [37]. Bei lumineszierenden Komplexen der Alkali- und Erdalkalimetallionen mit "einfachen" intrinsischen Fluoreszenzmarkern entspricht die Fluoreszenz immer der Emission des $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergangs des Liganden [38].

3.3.5. Neue Fluoreszenzmarker auf der Basis von N-Acylthioharnstoffen

Die gekoppelten Fluoreszenzmarker aus der Gruppe der N-Acylthioharnstoffe wurden zum fluorometrischen Nachweis von Schwermetallionen konzipiert und synthetisiert. Substituierte N-Acylthioharnstoffe (Abb. 3.8) besitzen ausgezeichnete Komplexierungseigenschaften gegenüber Ionen der Übergangsmetalle und Elementen der Platingruppe, sind präparativ leicht zugänglich und weisen in herkömmlich in der Chromatographie eingesetzten mobilen Phasen eine gute Löslichkeit auf [39, 40]. Die Kopplung der Fluorophore an die Thioharnstoff-Rezeptoreinheit konnte sowohl über einen Alkylspacer R' bzw. R'' als auch über einen Carbonylspacer erfolgen.

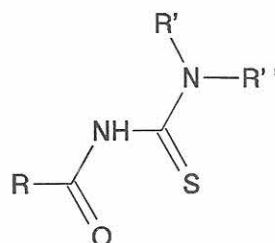


Abb. 3.8
Grundgerüst der substituierten N-Acylthioharnstoffe
(R = C-seitig, R' & R'' = N-seitig)

Als Fluorophore wurden Naphthalin- und Anthrazen-Einheiten eingesetzt, da ihre Fluoreszenzeigenschaften für analytische Anwendungen günstiger sind als die von (sub-

¹ PET = Photoinduced electron transfer

Verbdg. ⁶	R	R'	R''
DEBT	phenyl-	ethyl-	ethyl-
PCTB	phenyl-	pyrrolidinyl-	
AMBT	phenyl-	methyl-	anthrazen-9-ylmethyl-
DENT	1-naphthyl-	ethyl-	ethyl-
NPTA	1-naphthyl-	pyrrolidinyl-	
DEAT	9-anthryl-	ethyl-	ethyl-
APTA	9-anthryl-	pyrrolidinyl-	

Tabelle 3.4
Substitutionsmuster der synthetisierten
N-Acylthioharnstoffe

stituierten) Phenyl-Einheiten (längerwellige Emission, höhere Fluoreszenzquantenausbeuten und längere Fluoreszenzabklingzeiten). Verschiedene Derivate mit N- und C-seitig substituierten Fluorophoren wurden von uns hergestellt (Tab. 3.4, vgl. Kap. 3.7. bis 3.9.). Da vor allem bei der Synthese der anthryl-substituierten Verbindungen Probleme auftraten, wurden die Synthesewege und Reaktionsbedingungen zuvor anhand der Herstellung der phenylhaltigen Verbindungen DEBT und PCTB getestet.

Die Synthese von N-Acylthioharnstoffen ist seit den 30er Jahren bekannt und ausführlich in der Literatur beschrieben [41, 42]. Das in den letzten Jahren im wesentlichen eingesetzte und in der Literatur zitierte Verfahren ("Eintopf-Verfahren") zur Herstellung dieser Verbindungen geht auf HARTMANN und REUTHER zurück, die ausgehend von einem Carbonsäurederivat R-COOH (im Endmolekül = Rest R) über Bildung des Säurechlorids und nukleophile Substitution mit Natriumrhodanid Isothiocyanatderivate R-CO-NCS herstellten. Diese Isothiocyanate werden dann mit sekundären Aminen (enthalten die Reste R' und R'') zu den entsprechenden N-Acylthioharnstoffen umgesetzt [43]. Ausgehend von Benzoylchlorid und nach Reaktion mit Rhodanid wurden DEBT durch Umsetzung mit Diethylamin, PCTB durch Umsetzung mit Pyrrolidin und AMBT (vgl. Kap. 3.8.) durch Umsetzung mit Anthrazen-9-ylmethyl-methylamin (AMMA) erhalten. 1-Naphthoesäurechlorid, Natriumrhodanid und Diethylamin dienten als Ausgangssubstanzen für DENT, die ersten beiden Substanzen und Pyrrolidin als diejenigen für NPTA. Aus 9-Anthrazencarbonsäurechlorid und Natriumrhodanid wurde durch Reaktion mit Pyrrolidin APTA (vgl. Kap. 3.7.) präparativ erhalten, während die Synthese von DEAT aus 9-Anthrazencarbonsäurechlorid, Natriumrhodanid und Diethylamin nicht zufriedenstellend gelang. Bei der Herstellung der Fluoreszenzmarker, die Anthrazen als Fluorophor enthalten, mußte unter schonenden Reaktionsbedingungen⁷ gearbeitet werden, da sonst hauptsächlich polymere Anthrazenderivate entstanden.

⁶ Verbindungen: DEBT = 1,1-Diethyl-3-benzoylthioharnstoff, PCTB = N-(Pyrrolidin-1-carbothioyl)-benzamid, AMBT = 1-Anthrazen-9-ylmethyl-1-methyl-3-benzoylthioharnstoff, DENT = 1,1-Diethyl-3-(naphthalin-1-carbonyl)-thioharnstoff, NPTA = Naphthalin-1-carbonsäure-(pyrrolidin-1-carbothioyl)-amid, DEAT = 1,1-Diethyl-3-(anthrazen-9-carbonyl)-thioharnstoff, APTA = Anthrazen-9-carbonsäure-(pyrrolidin-1-carbothioyl)-amid.

⁷ Schonende Reaktionsbedingungen: Reaktionstemperatur <40 °C, Sauerstoff- und Feuchtigkeitsausschluß, Reaktion unter Lichtausschluß bzw. unter Rotlicht, um thermische und photochemische Zyklisierungen zu vermeiden.

Die Reinigung der Substanzen erfolgte säulenchromatographisch, eine Charakterisierung wurde anhand von massenspektrometrischen, ¹³C-NMR-spektrometrischen und C, H, N-elementaranalytischen Daten vorgenommen. Eine Prüfung auf Verunreinigungen wurde außerdem dünn-schichtchromatographisch durchgeführt.

3.3.6. Entwicklung neuer Fluorophor-Rezeptor-Systeme mit makrozyklischen Rezeptoren

Aufgrund ihrer guten Komplexierungseigenschaften und der möglichen gezielten synthetischen Steuerung des Aufbaus von FRS, die nach bestimmten, in Kap. 3.3.3. beschriebenen Mechanismen Änderungen in ihrem Lumineszenzverhalten zeigen, wurden von uns Fluorophor-Rezeptor-Systeme mit makrozyklischen Rezeptoren entwickelt. Als makrozyklische Rezeptoren können Polyoxa-, Polythia-, Polyaza-Makrozyklen oder Heteromakrozyklen, die verschiedene Kombinationen der Heteroatome Sauerstoff, Schwefel und Stickstoff enthalten, eingesetzt werden. Die Metallionenselektivität dieser makrozyklischen Liganden, die definierte 1:1-Komplexe mit Kationen bilden, hängt von der räumlichen Anordnung des Liganden und der Aufspaltung der d-Orbitale des Metalls ab und damit auch von den synthetisch steuerbaren Eigenschaften des Heteromakrozyklus wie Ringgröße und Anordnung der Heteroatome [44-49]. Dies bedingt eine höhere Selektivität gegenüber Kationen als bei Kronenethern [44]. Somit lassen sich gezielt Liganden entwickeln, die beispielsweise von einem Metall nur Ionen einer Oxidationsstufe komplexieren [45] und so im umweltanalytisch wichtigen Bereich der Speziation Verwendung finden können [12, 18]. Heteromakrozyklen haben gegenüber Kronenethern zudem den Vorteil, daß sie in der Regel um 5 bis 10 Zehnerpotenzen höhere Komplexierungskonstanten aufweisen [44, 45].

In Fluorophor-Rezeptor-Systemen wurden bislang ausschließlich Kronenether und ihre Mono- bzw. Diazaderivate als kationenspezifische Rezeptoren eingesetzt [29, 33]. Diese Rezeptoren komplexieren insbesondere "harte" Metallionen wie Alkali- und Erdalkalimetallionen. Solche Fluorophor-Rezeptor-Systeme können daher als Fluoreszenzmarker für Protonen, Alkali- und Erdalkalimetallionen eingesetzt werden [30, 31]. Demgegenüber bietet sich für die Konzipierung von Fluoreszenzmarkern für Schwer- und Übergangsmetallionen der Einsatz von schwefel- und stickstoffhaltigen heteromakrozyklischen Rezeptoren, die gerade diese Kationen binden, an.

Im Rahmen des Teilprojektes „Fluoreszenzmarker mit makrozyklischen Rezeptoren“ wurden zunächst makrozyklische Fluorophor-Rezeptor-Systeme mit unterschiedlichen Fluorophoren, die kovalent an kommerziell erhältliche Monoaza- und Diazakronenether mit bekanntem Komplexierungsverhalten gebunden wurden, synthetisiert. Hierbei wurden verschiedene synthetische Realisierungsmöglichkeiten der direkten Kopplung zwischen Fluorophor und Rezeptor untersucht und synthetische Erfahrungen bei der Monosubstitution von Makrozyklen, die zwei Stickstoffatome enthalten, gesammelt. Desweiteren wurde in diesen Systemen der Einfluß der Kationenkomplexierung auf das Fluoreszenzverhalten unterschiedlicher solvatochromer Farbstoffe untersucht, um so Vorstellungen zu gewinnen, welche Fluorophore für den Einsatz in kationensensitiven Fluorophor-Rezeptor-Systemen besonders geeignet sind, d.h. welche Strukturvoraussetzungen notwendig sind, um sowohl große spektrale Verschiebungen der Absorptions- und Emissionsbanden als auch eine starke Zunahme der Fluoreszenzintensität zu erzielen. Besonderes Interesse galt weiterhin der Entwicklung von Systemen mit Fluorophoren, die längerwellig als 600 nm absorbieren, so daß sie mit Laserdioden angeregt werden können. In diesem Zusammenhang wurden insbesondere Cyaninfarbstoffe eingesetzt und der Einfluß der Kationenkomplexierung auf die optischen Eigenschaften dieser neuen FRS untersucht (vgl. Kap. 3.11.). Außerdem wurden neu entwickelte FRS mit Diazakronenethern als Rezeptoren auf ihre Eignung als Fluoreszenzmarker für Schwer- und Übergangsmetallionen getestet (vgl. Kap. 3.10.).

Schließlich wurde ein Fluorophor-Rezeptor-System mit einem schwefelstickstoffhaltigen Heteromakrozyklus als Rezeptor synthetisiert und spektroskopisch untersucht. Hierzu wurde zuerst ein in der Literatur beschriebener Heteromakrozyklus mit bekanntem Komplexierungsverhalten hergestellt.

3.3.7. Synthese von Fluorophor-Rezeptor-Systemen mit makrozyklischen Liganden

a) Fluorophor-Rezeptor-Systeme mit Sauerstoff-Stickstoff-Makrozyklen als Rezeptoren

Die direkte Kopplung eines Fluorophors an ein Stickstoffatom eines Mono- oder Diazakronenethers kann auf drei verschiedene Arten synthetisch realisiert werden:

- Binden des Fluorophors an ein Stickstoffatom des Mono- oder Diazakronenethers: Die Kopplung erfolgt beispielsweise durch Reaktion einer NH-Gruppe des Mono- oder Diazakronenethers mit einem Fluorophor, der einen Halogensubstituenten trägt (nucleophile Substitution) [50].

Auf diesem Syntheseweg wurden der Fluoreszenzmarker 4-Nitro-7-(1,4,10-trioxa-7,13-diaza-cyclopentadec-7-yl)-benzo[1,2,5]oxadiazol (NBO-crown, vgl. Kap. 3.10.) und der Fluoreszenzmarker 2-(1,4,10-Trioxa-7,13-diaza-cyclopentadec-7-yl)-benzo[c,d]indol aus äquimolaren

Mengen von 1,4,10-Trioxa-7,13-diaza-cyclopentadecan und 4-Chlor-7-nitrobenzo[1,2,5]oxadiazol bzw. 2-Methylsulfanylmethylbenzo[c,d]indol in Dimethylformamid bzw. Dimethylformamid/Triethanolamin mit anschließendem Erwärmen hergestellt. Problematisch war hierbei die Synthese der monosubstituierten Verbindung, da bei der Reaktion trotz Variation der Reaktionsbedingungen auch immer die disubstituierte Verbindung entstand und chromatographisch oder durch Umkristallisation abgetrennt werden mußte. Es gelang auch, durch Reaktion von 9-Chloracridin bzw. von 9-Phenoxyacridin mit 1,4,7,10-Tetraoxa-13-azacyclopentadecan und mit 1,7,10-Trioxa-4,13-diaza-cyclopentadecan in Phenol, den Fluorophor Acridin an einen Mono- oder Diazakronenether zu binden:

- Binden des Fluorophors über eine 1,4-substituierte Phenylgruppe an ein Stickstoffatom des *N*-Phenyl-Monoazakronenethers: Die Kopplung erfolgt durch elektrophile Substitution (Fluorophor mit aktiviertem Kohlenstoff agiert als Elektrophil) in para-Stellung am *N*-Phenyl-Monoazakronenether [51].

Die in der Literatur beschriebene Reaktion von 10-Methylacridiniumjodid mit 13-(Phenyl)-1,4,7,10-tetraoxa-13-azacyclopentadecan, die zum Fluoreszenzmarker 9-[4-(1,4,7,10-Tetraoxa-13-aza-cyclopentadec-13-yl)-phenyl]-10-methylacridiniumjodid führt [51], konnte nachvollzogen werden. Hierbei wurde die Ausgangsverbindung 13-Phenyl-1,4,7,10-tetraoxa-13-aza-cyclopentadecan aus 1,8-Bis(*p*-toluolsulfonyloxy)-3,6-dioxaoctan, erhalten durch Reaktion von Triethylenglykol und *p*-Toluolsulfonsäurechlorid in Pyridin bei 0 °C, und *N,N*-Bis(2-hydroxyethyl)anilin in *t*-Butanol/Dioxan in Gegenwart von Natrium hergestellt [52]:

- Binden des Fluorophors über eine Doppelbindung an das mit einer *p*-Formyl-Gruppe substituierte Stickstoffatom des Mono- oder Diazakronenethers: Die Kopplung erfolgt durch Reaktion einer aktivierten Methylgruppe des Fluorophors mit der Aldehydfunktion des *p*-Formyl-substituierten Rezeptors unter Bildung einer Doppelbindung. Die Einführung der Aldehydfunktion in die para-Position des *N*-Phenyl-Azakronenethers erfolgt durch Formylierung nach Vilsmeier, d. h. durch Reaktion des in Dimethylformamid gelösten *N*-Phenyl-Azakronenethers mit Phosphoroxychlorid unter Feuchtigkeitsausschluß bei -10 °C [52]. Diese Reaktion konnte für 13-Phenyl-1,4,7,10-tetraoxa-13-azacyclopentadecan nachvollzogen werden. Der Versuch, durch Reaktion von 1,4,7,10-Tetraoxa-13-azacyclopentadecan mit 4-Fluorbenzaldehyd in Dimethylsulfoxid unter starkem Erwärmen (Kochen unter Rückfluß) 4-(1,4,7,10-Tetraoxa-13-aza-cyclopentadec-13-yl)-benzaldehyd zu erhalten, scheiterte.

Die Kopplung eines eine aktivierte Methylgruppe tragenden Fluorophors an die Aldehydfunktion von beispielsweise 4-(1,4,7,10-Tetraoxa-13-aza-cyclopentadec-13-yl)-benzaldehyd unter Ausbildung einer Doppelbindung ist aus der Literatur bekannt [53]. So wurde beispielsweise der Fluoreszenzmarker 7-Dimethylamino-3-{2-[4-(1,4,7,10-tetraoxa-13-aza-cyclopentadec-13-yl)-phenyl]-vinyl}-benzo[1,4]oxazin-2-on durch Kondensation von 7-Dimethyl-

amino-3-methyl-benzo[1,4]oxazin-2-on mit 4-(1,4,7,10-Tetraoxa-13-aza-cyclopentadec-13-yl)-benzaldehyd in Essigsäureanhydrid in Gegenwart von Natriumjodid unter starkem Erwärmen erhalten [53]. Dieser Reaktionsweg wurde verwendet, um verschiedene Hemicyanine mit aktivierter Methylgruppe, die sich sowohl im Heterozyklus als auch in der Anzahl der Doppelbindungen und ihrer sterischen Fixierung unterscheiden, an 4-(1,4,7,10-Tetraoxa-13-aza-cyclopentadec-13-yl)-benzaldehyd unter Ausbildung einer Doppelbindung zu binden.

b) Synthese von Fluorophor-Rezeptor-Systemen mit Heteromakrozyklen als Rezeptoren

Potentiell für die Schwer- und Übergangsmetallionenanalytik mittels Fluorometrie einsetzbare Verbindungen stellen Fluorophor-Rezeptor-Systeme dar, die im Rezeptorteil des Moleküls einen Sauerstoff-Schwefel-Stickstoff-Heteromakrozyklus enthalten, der diese Kationen möglichst selektiv und mit hohen Komplexierungskonstanten bindet. Die Synthese einer Vielzahl solcher Heteromakrozyklen und ihr Komplexierungsverhalten gegenüber Schwer- und Übergangsmetallionen sind in der Literatur beschrieben [44-49], sie wurden bislang allerdings noch nicht als Rezeptoren in Fluorophor-Rezeptor-Systemen eingesetzt. Für erste Untersuchungen an solchen Systemen wurde der Heteromakrozyklus 1,8-Dithia-4,12-diaza-cyclotetradecan (S_2N_2 -Makrozyklus) als Rezeptor ausgesucht. Dieser Ligand, der insbesondere die Übergangsmetallionen Ni^{2+} , Cu^{2+} und Cu^+ bindet [54, 55], wurde über eine in der Literatur beschriebene, vierstufige Synthese hergestellt [46, 47, 48] und dann kovalent an einen Farbstoff gebunden.

Für die Synthese von 1,8-Dithia-4,12-diaza-cyclotetradecan wurde 2-Aminoethanthiolhydrochlorid in Ethanol unter Stickstoffatmosphäre mit Natrium versetzt und unter Kochen 2-(2-Bromoethyl)-phthalimid, das durch Umsetzung von Phthalsäureanhydrid mit 2-Aminoethanol in Gegenwart von Phosphortribromid erhalten wurde [47], zugegeben [48]. Das gereinigte Produkt Bis(2-aminoethyl)-sulfid, ein braunes Öl, wurde anschließend mit dem durch Sulfochlorierung erhaltenen Säurechlorid von Bis(2-propansäure)-sulfid in Toluol unter Stickstoffatmosphäre in stark verdünnter Lösung cyclisiert [46]. Die beiden Ketogruppen des bei der Cyclisierung entstandenen festen Rohproduktes wurden anschließend mit Boran in Tetrahydrofuran unter Stickstoffatmosphäre zu Methylengruppen reduziert [46]. Der so hergestellte S_2N_2 -Makrozyklus wurde dann, wie beim entsprechenden Diazakronenetherderivat bereits ausprobiert, mit dem Fluorophor 4-Chlor-7-nitrobenzo[1,2,5]oxadiazol zum mono- und disubstituierten Fluoreszenzmarker umgesetzt.

Es wurde außerdem eine Vorstufe des *N*-Phenyl-Aza-Derivates vom S_2N_2 -Makrozyklus synthetisiert, das die gezielte Einführung nur eines Fluorophors über zwei Kopplungsreaktionen (vgl. Kap. 4.3.7. a) Punkte 2 und 3) ermöglichen sollte. Hierzu wurden zuerst beide Hydroxylgruppen von *N,N*-Bis(2-hydroxyethyl)anilin durch Reaktion mit Thioharnstoff in konzentrierter Salzsäure unter Erhitzen in Thiol-

gruppen überführt. Da bei dieser Umsetzung Probleme auftraten, wurden beide Hydroxylgruppen von *N,N*-Bis(2-hydroxyethyl)anilin durch Reaktion mit Phosphortribromid in Chloroform bei Raumtemperatur in Bromsubstituenten umgewandelt und anschließend mit Thioharnstoff in Ethanol unter Erwärmen zu *N,N*-Bis(2-mercaptoethyl)anilin umgesetzt. Daran sich anschließende Reaktionsschritte und die Fluorophorkopplung sowie die Synthese weiterer Fluorophore und Heteromakrozyklen konnten im Rahmen des BMFT-Projektes nicht mehr bearbeitet werden.

3.4. Fluoreszenzspektroskopischer Nachweis von Metallionen

Im Rahmen der in diesem Projekt durchgeführten Arbeiten wurden die in Kap. 3.3. genannten bekannten und neu entwickelten Fluoreszenzmarker für die in der aquatischen Toxikologie bedeutenden Schwermetallionen Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} und Pb^{2+} sowie für die in der Wasserchemie relevanten Alkali- und Erdalkalimetallionen Li^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} und Sr^{2+} hinsichtlich ihres Komplexierungs- und Fluoreszenzverhaltens untersucht. Als für den Nachweis meßbare Effekte sollten dabei möglichst eine Verstärkung der Ligandfluoreszenz (CHEF) oder eine neue, komplexspezifische Emissionsbande durch Komplexierung auftreten. Die fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung erfolgte anhand von statischen und ns- bzw. ps-zeitaufgelösten Messungen.

Einem Vorschlag von Z. R. Grabowski folgend wurden als intrinsische Fluoreszenzmarker zwei Derivate des 2,2'-Bipyridyls untersucht (vgl. Kapitel 3.5. und 3.6.). 2,2'-Bipyridyl und einige seiner Derivate sind als sehr gute Komplexbildner für Übergangs- und Schwermetallionen bekannt, und die Komplexe sowie ihr photochemisches und photophysikalisches Verhalten sind z. T. umfassend in der Literatur beschrieben [56-59]. Bei den in diesem Projekt eingesetzten Fluorophor-Rezeptor-Systemen handelt es sich um die o. g. substituierten *N*-Acylothioharnstoffe (vgl. Kap. 3.3.5. und Kap. 3.7. bis 3.9.), die ebenfalls als Komplexbildner bekannt sind [39, 40], sowie um FRS mit stickstoffhaltigen Kronenetheranaloge als metallionenspezifischen Rezeptoren [25] und verschiedenen Farbstoffen als Fluorophoren (vgl. Kap. 3.3.6. und 3.3.7. sowie Kap. 3.10. und 3.11.).

3.5. Fluoreszenzmarker 2,2'-Bipyridyl-3,3'-diol

Aufgrund seiner in der Literatur beschriebenen photochemischen und Komplexierungseigenschaften [60] sowie seiner kommerziellen Verfügbarkeit wurde 2,2'-Bipyridyl-3,3'-diol ($BP(OH)_2$, Abb. 3.9) als Komplexbildner für den fluorometrischen Nachweis von Schwer- und Übergangsmetallionen eingesetzt. $BP(OH)_2$ ist in sehr vielen unpolaren und polaren organischen Lösungsmitteln, vor allem aber auch in Wasser löslich; die Lösungen sind photochemisch

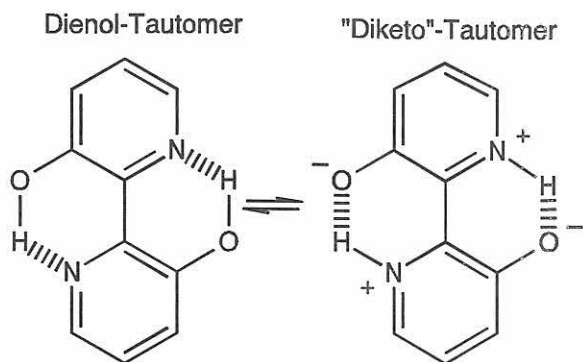


Abb. 3.9
BP(OH)₂: ESIDPT-Gleichgewicht

stabil [61, 62]. Die unkomplexierte Substanz fluoresziert in organischen Lösungsmitteln stark, in Wasser schwach, ist als Fluoreszenzstandard und Laserfarbstoff beschrieben und zeigt keine Phosphoreszenz [61, 63].

BP(OH)₂ liegt in allen verwendeten Lösungsmitteln im Grundzustand als planares Molekül vor, welches durch zwei intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxylgruppen und den Pyridyl-Stickstoffen stabilisiert wird (Abb. 3.9). Beim Übergang von organischen polaren zu wässrigen Lösungsmitteln werden die intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen partiell aufgebrochen und damit die planare Konformation des Moleküls gestört.

Für die Fluoreszenz verantwortlich ist der doppelte intramolekulare Protonentransfer im angeregten Zustand (ESIDPT = excited state intramolecular double proton transfer), bei dem das Molekül von der dienolischen Grundzustandsform im angeregten Zustand durch eine sehr

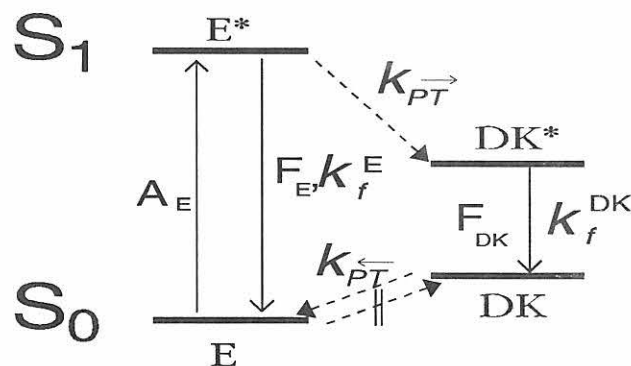


Abb. 3.10
BP(OH)₂: Absorptions- und Fluoreszenzprozesse
(E = Dienol-, DK = "Diketo"-Tautomer; A = Absorption, F = Fluoreszenz, k = Ratenkonstanten mit $k_{PT} \gg k_f^E$)

Tabelle 3.5
Absorptionsmaxima und molare Extinktionskoeffizienten von BP(OH)₂ in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	Absorptionsmaximum λ_{max} [nm]	Extinktionskoeff. $\epsilon_{\lambda_{max}}$ [cm ² *mmol ⁻¹]
Wasser	346 (Max.), 405 (2. Max.), 435 (Sch.)	10000
Ethanol	343 (Max.)	16622
Dichlormethan	342 (Max.)	17759
n-Hexan	342 (Max.)	16461

schnelle Reaktion (sub-ps Zeitskala) in die fluoreszierende, zwitterionische "Diketo"-Form übergeht (Abb. 3.9 und Abb. 3.10).

In allen organischen Lösungsmitteln tritt keine und in wässrigen Lösungen eine nur sehr geringe Überlappung zwischen Absorptions- und Fluoreszenzspektrum auf (großer Stokes Shift), weshalb die für eine Anwendung in der Fluorometrie störenden Reabsorptionseffekte weitgehend auszuschließen sind.

3.5.1. Absorptionsverhalten in wässrigen Lösungen

Die Form des Absorptionsspektrums und der molare Extinktionskoeffizient sind in den verschiedenen organischen Lösungsmitteln sehr ähnlich. Beim Übergang von alkoholischen zu wässrigen Lösungsmitteln sinkt dagegen der molare Extinktionskoeffizient des Absorptionsmaximums $\epsilon_{\lambda_{max}}$ deutlich ab, und im Absorptionsspektrum treten mehrere neue, längerwellig gelegene Banden auf (Tab. 3.5).

Eine direkte Zuordnung der einzelnen Unterbanden zu bestimmten protonierten oder deprotonierten Spezies ist aufgrund der komplexen Protonierungsgleichgewichte bisher nicht möglich (Abb. 3.11).

Das Absorptionsmaximum von BP(OH)₂ verschiebt sich bei steigendem pH-Wert offensichtlich infolge zunehmender Deprotonierung zu kürzeren Wellenlängen hin, und der molare Extinktionskoeffizient nimmt ab (Abb. 3.12, vgl. Kap. 3.5.3.).

Die Ionenstärke hat in wässrigen Lösungen dagegen keinen Einfluß auf das Absorptionsverhalten von BP(OH)₂.

3.5.2. Fluoreszenzverhalten in wässrigen Lösungen

Die Form des Fluoreszenzspektrums ist in den verschiedenen organischen Lösungsmitteln ebenfalls sehr ähnlich und zeigt keine vibronische Struktur. Während in allen organischen Lösungsmitteln die Lage der Absorptionsbanden nahezu unverändert bleibt, zeigt das Fluoreszenzspektrum in Abhängigkeit von der Polarität eine schwache hypsochrome Verschiebung mit steigender Polarität. In Wasser ist die Emissionsbande schließlich stark blauverschoben, die Form des Fluoreszenzspektrums aber unverändert (Tab. 3.6).

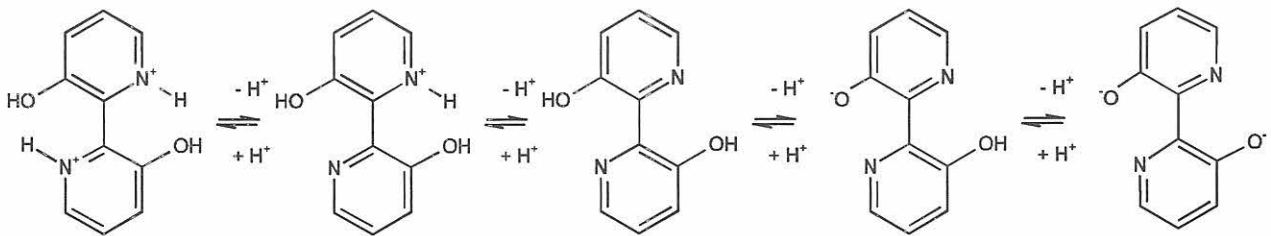


Abb. 3.11
Protonierungsgleichgewichte von $BP(OH)_2$

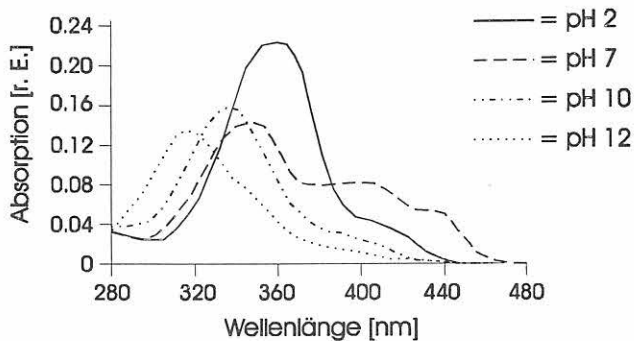


Abb. 3.12
pH-Abhängigkeit des Absorptionsspektrums von $BP(OH)_2$

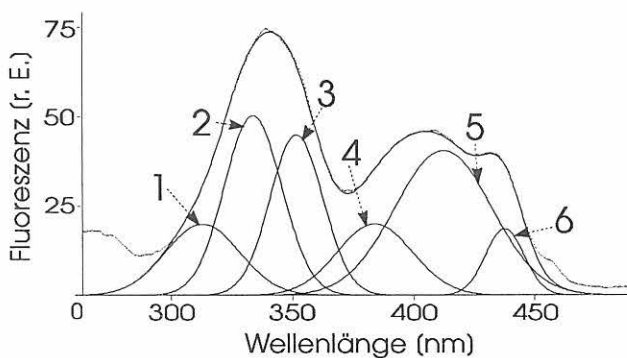


Abb. 3.13
Fluoreszenzanregungsspektrum von $BP(OH)_2$ in wäßriger Lösung (pH 7.6): Einzelbanden mit Maxima bei 313 nm (1), 334 nm (2), 352 nm (3), 384 nm (4), 412 nm (5) und 437 nm (6)¹²

Tabelle 3.6
Fluoreszenzmaxima, -quantenausbeuten und -abklingzeiten von $BP(OH)_2$ in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	Emissionsmaximum $\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ [nm]	Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_f^8	Fluoreszenzabklingzeit τ_f [ns] ⁹
Wasser	465	0.08	0.5
Ethanol	500	0.25	2.0
Chloroform ¹⁰	507	0.27	3.3
Cyclohexan	515	0.31	nicht bestimmt
3-Methylpentan ¹¹	515	0.32	3.2

⁸ $BP(OH)_2$ bezogen auf Chininsulfat, Anregungswellenlänge 340 nm, unkorrigierte Emissionsspektren, sowie vgl. [61, 62]

⁹ Messung mit ns-Laserapparat: Anregungswellenlänge 337 nm, Emissionswellenlänge 467 nm, Entfaltung mit DECMAX (variabler time-shift, bester Fit mit final $\chi^2 = 1.233$), sowie vgl. [61, 62]

¹⁰ Werte aus [62]

¹¹ Werte aus [61]

¹² Emissionswellenlänge 470 nm, korrigiertes Spektrum, Bandenzerlegung mit APROMAX (besten Fit mit final $\chi^2 = 1.078$)

Die Fluoreszenzquantenausbeuten von $BP(OH)_2$ in organischen aprotischen Lösungsmitteln unterscheiden sich nicht wesentlich, sind in alkoholischen Lösungsmitteln etwas geringer und betragen in Wasser lediglich nur noch ein Viertel des Wertes in aprotischen Lösungsmitteln. Ähnliches Verhalten läßt sich bei den Fluoreszenzlebensdauern beobachten (Tab. 3.6, [62, 63]).

Das Fluoreszenzanregungsspektrum und das Absorptionsspektrum stimmen für $BP(OH)_2$ im jeweiligen Lösungsmittel überein. Durch Bandenanalyse konnte nachgewiesen werden, daß sich das komplexe Absorptionsverhalten von $BP(OH)_2$ in Wasser durch eine Kombination aus sechs Einzelbanden beschreiben läßt. Das Verhältnis der Banden zueinander ist dabei unabhängig von der Emissionswellenlänge (Abb. 3.13).

3.5.3. Einfluß des pH-Wertes

Das Absorptions- und das Fluoreszenzverhalten von $BP(OH)_2$ in wäßrigen Lösungen sind stark pH-abhängig. Hier spielen vor allem die Protonierbarkeit der beiden Pyridyl-Stickstoffe und die Deprotonierbarkeit der beiden Hydroxylgruppen eine entscheidende Rolle. Protonierte Pyridyl-Stickstoffe sind nicht mehr zur Aufnahme eines Protons im angeregten Zustand und deprotonierte Hydroxylgruppen weder zur Abgabe eines Protons im angeregten Zustand noch zur Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen im Grundzustand fähig.

Diese pH-abhängigen Möglichkeiten der Protonierung und Deprotonierung spiegeln sich direkt im absorptionspektroskopischen Verhalten wider (vgl. Abb. 3.11 und Abb. 3.12). Das Absorptionsmaximum verschiebt sich dabei mit steigendem pH-Wert hypsochrom. In den Emissionsspektren macht sich ein steigender pH-Wert im Bereich von $\text{pH} < 8$ nur durch Intensitätsänderungen bemerkbar, die Form des Fluoreszenzspektrums bleibt unverändert ($\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} = 465 \text{ nm}$). Oberhalb von $\text{pH} 8$ sinkt die Fluoreszenzintensität der Bande bei 465 nm deutlich ab, und das Anwachsen einer zweiten Bande mit einem Maximum bei ca. 420 nm ist zu beobachten. Dieses Verhalten ist unabhängig von der Anregungswellenlänge. Aufgrund der komplizierten Protonierungsgleichgewichte (vgl. Abb. 3.11) konnte bisher die kurzweilig gelegene Emissionsbande keiner Spezies von $\text{BP}(\text{OH})_2$ eindeutig zugeschrieben werden.

Der pH-Wert spielt ebenfalls bei der Komplexbildung von $\text{BP}(\text{OH})_2$ durch Schwermetallionen eine wesentliche Rolle. Unterhalb von $\text{pH} 3$ findet mit den hier untersuchten Metallionen keine absorptions- und fluoreszenzspektroskopisch meßbare Komplexbildung statt.

Um bei Messungen einen konstanten und definierten pH-Wert der Lösung zu garantieren, werden in der Metallionenanalytik Puffer eingesetzt, die gleichzeitig die Ionenstärke der Lösung konstant halten. Bei den hier durchgeführten Versuchen wurden die Puffersysteme Glycin/Kochsalz, Citronensäure/Natronlauge, Borax/Salzsäure bzw. Borax/Natronlauge, Kaliumdihydrogenphosphat/Dinatriumhydrogenphosphat und Soda/Salzsäure eingesetzt.

Ein Einfluß auf das absorptions- und fluoreszenzspektroskopische Verhalten von $\text{BP}(\text{OH})_2$ wurde dabei nur im Fall der Borat-Puffer-Systeme beobachtet. Bei Anwesenheit von Borat-Ionen ändern sich sowohl die Form des Absorptionsspektrums als auch die Intensität der Fluoreszenz von $\text{BP}(\text{OH})_2$ deutlich.

Die Fluoreszenzintensität nimmt stark zu, und bei einem Borat-Überschuß von 10:1 tritt ein kurzweiliges zweites Maximum (bei 430 nm) und eine noch kurzweiligere Schulter auf (Abb. 3.14). Die relative Erhöhung der Fluoreszenz durch Borat gegenüber $\text{BP}(\text{OH})_2$ -Lösungen desselben pH-Wertes, die keine Borationen enthalten, beträgt, je nach pH-Wert, mehrere zehn Prozent (Abb. 3.15). Borax- bzw. Bo-

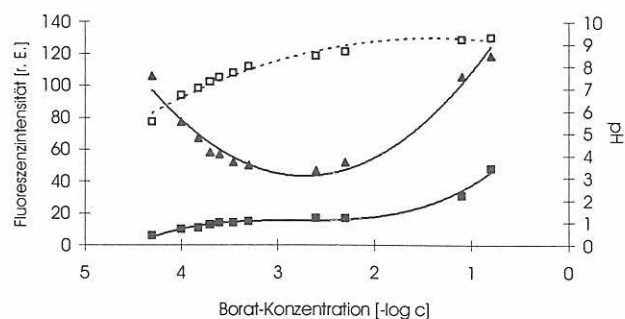


Abb. 3.14
Intensität der Emissionsbande von $\text{BP}(\text{OH})_2$ bei 430 nm (-■-) und 463 nm (-▲-) als Funktion der Borationen-Konzentration ($c_{\text{BP}(\text{OH})_2} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; ... □ ... = Verlauf des pH-Wertes, Anregungswellenlänge 337 nm)

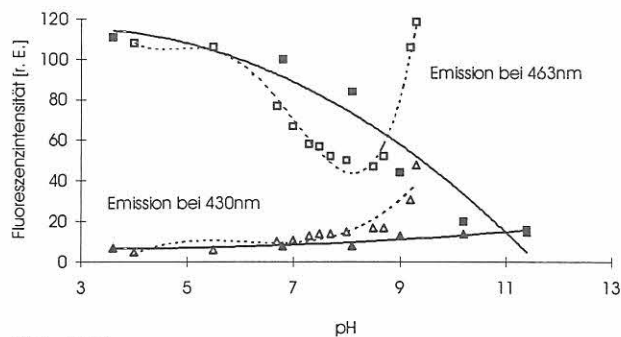


Abb. 3.15
Intensität der Emissionsbande von $\text{BP}(\text{OH})_2$ bei 430 nm (-▲-, ...△...) und 463 nm (-■-, ...□...) in Abhängigkeit vom pH-Wert mit (-·-) und ohne (-) Borat-Puffer ($c_{\text{BP}(\text{OH})_2} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, Anregungswellenlänge 337 nm)

rat-Puffergemische eignen sich daher nicht für einen Einsatz bei der spektroskopischen Analytik mit $\text{BP}(\text{OH})_2$.

Für die verschiedenen pH-Bereiche haben sich vor allem die Systeme Kaliumdihydrogenphosphat/Dinatriumhydrogenphosphat (pH-Bereich 5.4 - 8.0) und Soda/Salzsäure (pH-Bereich 10.0 - 11.4) als geeignet erwiesen. Aufgrund der pH-abhängigen Komplexbildungseigenschaften eignet sich ein auf $\text{pH} 7.6$ eingestellter Kaliumdihydrogenphosphat/Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer nach Sörensen (im folgenden als "Sö 7.6" abgekürzt) am besten für analytische Anwendungen von $\text{BP}(\text{OH})_2$. Durch konkurrierende Komplexbildungsreaktionen scheiden der Glycin/Kochsalz-Puffer (pH-Bereich < 3.4) und der Citronensäure/Natronlauge-Puffer (pH-Bereich < 6.4) für eine analytische Anwendung aus.

3.5.4. Nachweis von Cd^{2+} und Zn^{2+}

Die diamagnetischen d^{10} -Metallionen Cd^{2+} und Zn^{2+} beeinflussen das Absorptionsverhalten von $\text{BP}(\text{OH})_2$ unterschiedlich. Je nach Konzentration verschiebt sich das Absorptionsmaximum nur unwesentlich von 346 nm auf 350 bis maximal 360 nm . Bei Anwesenheit von Cd^{2+} ändert sich geringfügig die Form des Absorptionsspektrums, das zweite Maximum bei 405 nm und die Schulter bei 435 nm sind ebenfalls zu beobachten (vgl. Kurve $\text{pH} 7$ in Abb. 3.12).

In Gegenwart von Zn^{2+} -Ionen sind neben einer geringen Rotverschiebung des Absorptionsmaximums bei zunehmender Zn^{2+} -Konzentration sowohl eine Abnahme des zweiten Maximums bei 405 nm als auch eine Abnahme der Schulter bei 435 nm die Folge (Abb. 3.16). Es treten zwei isobestische Punkte bei 347 und 396 nm auf.

Die Anwesenheit von Zn^{2+} - und Cd^{2+} -Ionen führt zu einer Fluoreszenzverstärkung, die für analytische Anwendungen ausgenutzt werden kann. Außerdem tritt im Fluoreszenzspektrum eine kurzweilig gelegene Schulter bei 420 nm auf. Mit zunehmender Metallionenkonzentration nimmt der Anteil der kurzweiligen Bande an der gesamten Emissionsbande stark zu. Der Effekt ist bei Zn^{2+} deutlich stärker als bei Cd^{2+} , was sich ebenfalls in der Zunahme der Fluoreszenzquantenausbeute zeigt (Tab. 3.7). Die Fluoreszenz-

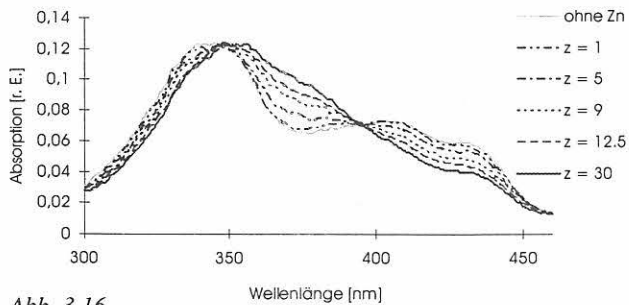


Abb. 3.16
Absorptionsspektren von $BP(OH)_2$ -Lösungen mit unterschiedlichen Zn^{2+} -Konzentrationen (Verhältnisse $BP(OH)_2 : Zn^{2+} = 1 : z$; wässrige Lösung; $c_{BP(OH)_2} = 2.4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

regungsspektren entsprechen nicht den Absorptionsspektren. Demzufolge müssen in den Lösungen unterschiedlich stark fluoreszierende Spezies vorhanden sein.

Während $BP(OH)_2$ ein monoexponentielles Fluoreszenzabklingverhalten mit einer Fluoreszenzlebensdauer $\tau_1 = 0.5 \text{ ns}$ (Komponente K_1) zeigt, unterscheiden sich die Fluoreszenzabklingkinetiken der Zn^{2+} - und Cd^{2+} -Komplexe durch das Auftreten einer zweiten Komponente K_2 mit einer langen Fluoreszenzlebensdauer τ_2 (bei Zn^{2+} 6.2 ns, bei Cd^{2+} 5.4 ns; Tab. 3.8).

Tabelle 3.7

Fluoreszenzquantenausbeuten ϕ_f für Zink- und Cadmium-Komplexe von $BP(OH)_2$ in wässriger Lösung¹³, Fluoreszenzmarker- Me^{2+} -Verhältnisse 1:1, 1:3 und 1:9 ($c_{BP(OH)_2} = 2.4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

$BP(OH)_2$	ohne Me	+ Zn^{2+} 1:1	+ Zn^{2+} 1:3	+ Zn^{2+} 1:9	+ Cd^{2+} 1:1	+ Cd^{2+} 1:3	+ Cd^{2+} 1:9
ϕ_f	0.079	0.102	0.132	0.205	0.078	0.082	0.092

Tabelle 3.8

Fluoreszenzabklingzeiten von $BP(OH)_2$ in Gegenwart der d^{10} -Metallionen Zn^{2+} und Cd^{2+} in Puffer Sö 7.6, $c_{BP(OH)_2} = 1.4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

	ohne Metallionen		mit Zn^{2+} , 4:1-Überschuß		mit Cd^{2+} , 4:1-Überschuß	
Meßaufbau	τ_1 [ns]	τ_2 [ns]	τ_1 [ns]	τ_2 [ns]	τ_1 [ns]	τ_2 [ns]
ns-Laser ¹⁴	0.4	(4.3) ¹⁵	0.5	6.2	0.5	5.4
BESSY ¹⁶	0.5	(2.3) ¹⁵	0.5	6.3	0.5	5.4

Tabelle 3.9

Fluoreszenzabklingverhalten von $BP(OH)_2$ - Zn^{2+} -Gemischen in Puffer Sö 7.6 ($c_{BP(OH)_2} = 1.4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)¹⁷ (Index 1 = Komponente K_1 ($t_1 = 0.5 \text{ ns}$), Index 2 = Komponente K_2 ($t_2 = 6.2 \text{ ns}$))

Substanz	Amplitude		Fluoreszenzintensität		
	a_1	a_2	I_1	I_2	I_{gesamt}
$BP(OH)_2$	47.5 ± 1.0	0.00	28.5 ± 0.5	0.0	28.5 ± 1.0
$BP(OH)_2 : Zn^{2+}$ (2:1)	41.0 ± 1.0	2.9 ± 1.0	24.6 ± 0.5	17.4 ± 0.3	42.0 ± 0.6
$BP(OH)_2 : Zn^{2+}$ (1:2)	30.5 ± 1.0	8.8 ± 0.5	18.3 ± 0.5	52.8 ± 3.0	71.1 ± 3.0

¹³ $BP(OH)_2$ und Komplexe bezogen auf Chinsulfat in 0.1 N Schwefelsäure, Anregungswellenlänge 340 nm Emissionsspektren unkorrigiert

¹⁴ Anregungswellenlänge 337 nm, Emission wellenlängenintegral mit Avalanche-Fotodiode, Entfaltung mit DECAMAX (variabler time-shift, bester Fit mit final $\chi^2 = 1.436$)

¹⁵ Die Abklingkurven der wässrigen $BP(OH)_2$ -Lösungen ließen sich monoexponentiell und biexponentiell mit einem relativen Anteil von <1% an τ_2 nahezu mit gleicher Güte anpassen.

¹⁶ BESSY = Berliner Elektronenspeicherring für Synchrotronstrahlung, Anregungswellenlänge 337 nm, Emissionswellenlänge 450 nm

¹⁷ Messung mit ns-Laserapparat: Anregungswellenlänge 337 nm, Emission wellenlängenintegral mit Avalanche-Fotodiode, Entfaltungen mit DECAMAX (variabler time-shift, beste Fits mit final χ^2 a) 1.122, b) 1.308 und c) 1.223)

Die bei BESSY durchgeführten zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen dienen dabei in erster Linie der Überprüfung der Leistungsfähigkeit der neu aufgebauten Laserimpulsfluorometer, wobei die mit dem Meßaufbau bei BESSY zu erzielende zeitliche Auflösung deutlich schlechter ist als die mit dem ps-Laserimpulsfluorometer. Daneben wurde ein Vorteil von BESSY als Strahlungsquelle, die Verfügbarkeit des gesamten UV/VIS-Wellenlängenbereiches zur Fluoreszenzanregung, für anregungswellenlängenabhängige Fluoreszenzmessungen ausgenutzt.

Anhand von emissionswellenlängenabhängigen Messungen der Fluoreszenzabklingkinetiken von Zn^{2+} - und Cd^{2+} -Komplexen mit $BP(OH)_2$ konnte nachgewiesen werden, daß das Auftreten der langlebigen Komponente K_2 mit dem Auftreten der kurzweilig gelegenen Emissionsbande bei 420 nm korreliert (Abb. 3.17).

Die Amplitude der Komponente K_2 nimmt sublinear mit der Metallionenkonzentration zu und korrespondiert mit einer Abnahme der Amplitude der kurzen Abklingkomponente K_1 . Da die Fluoreszenzquantenausbeuten und -lebensdauern sich deutlich unterscheiden ($f_r^{K_2} \gg f_r^{K_1}$ und $t_r^{K_2} \gg t_r^{K_1}$), ist bei steigender Metallionenkonzentration eine star-

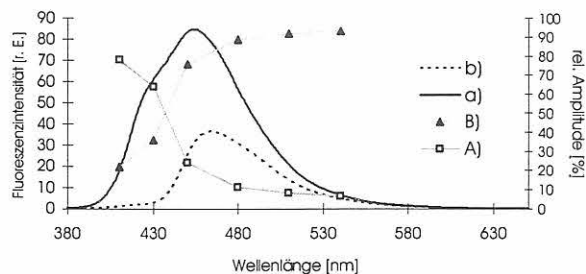


Abb. 3.17
Wellenlängenabhängigkeit der relativen Amplituden der beiden Abklingkomponenten von $\text{BP}(\text{OH})_2\text{-Cd}^{2+}$ -Gemischen in Puffer Sö 7.6¹⁸: Fluoreszenzspektren von a) $\text{BP}(\text{OH})_2\text{-Cd}^{2+}$ -Lösung (1:4), b) $\text{BP}(\text{OH})_2$ -Lösung ($c_{\text{BP}(\text{OH})_2} = 1.4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Globalanalyse der Fluoreszenzabklingkinetik: rel. Amplituden von A) K_1 mit $t_1 = 5.5 \text{ ns}$ und B) K_2 mit $t_2 = 0.5 \text{ ns}$

ke Zunahme der Fluoreszenz zu beobachten (Tab. 3.9, Abb. 3.18).

Diese unterschiedlichen Fluoreszenzquantenausbeuten von $\text{BP}(\text{OH})_2$ und den Metallionenkomplexen bedingen auch, daß Anregungs- und Absorptionsspektrum der Kationenkomplexe nicht übereinstimmen.

Die absorptionsspektroskopische Bestimmung der Stöchiometrie des Zn^{2+} -Komplexes mittels der Methode der kontinuierlichen Variation [64] ergab einen Komplex mit zwei $\text{BP}(\text{OH})_2$ -Liganden. Für Cd^{2+} konnte aufgrund identischer Absorptionsspektren von $\text{BP}(\text{OH})_2$ und Cd^{2+} -Komplex keine Komplexzusammensetzung auf spektroskopischem Wege ermittelt werden.

Die für eine einfache analytische Anwendung wichtige direkte Korrelation der Intensitätszunahme der Fluoreszenz mit steigender Metallionenkonzentration verläuft für $\text{BP}(\text{OH})_2\text{-d}^{10}\text{-Me}^{2+}$ -Mischungen nicht linear, ist aber bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 337 nm emissions-

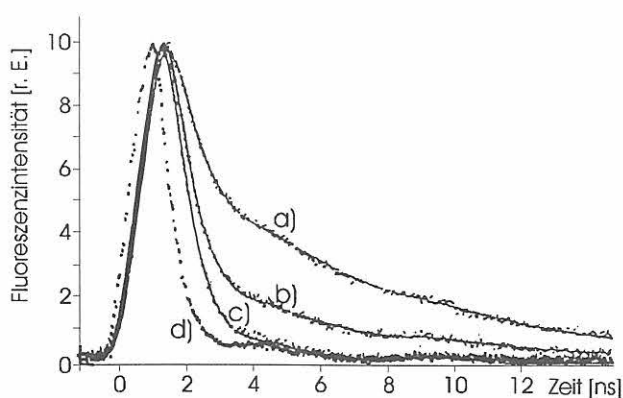


Abb. 3.18
Abklingkurven von $\text{BP}(\text{OH})_2\text{-Zn}^{2+}$ -Gemischen in wässriger Lösung (Puffer Sö 7.6): $\text{BP}(\text{OH})_2$: Zn^{2+} -Verhältnis a) 1:2, b) 2:1, c) ohne Zn^{2+} , d) Anregungsimpuls ($c_{\text{BP}(\text{OH})_2} = 1.4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)¹¹

¹⁸ Messungen bei BESSY, Anregungswellenlänge 337 nm, Emissionswellenlängen 410 nm, 430 nm, 450 nm, 480 nm, 510 nm und 530 nm, Entfaltung mit GLOBAL ANALYSIS (variabler time-shift und background, bester Fit mit final $\chi^2 = 1.111$)

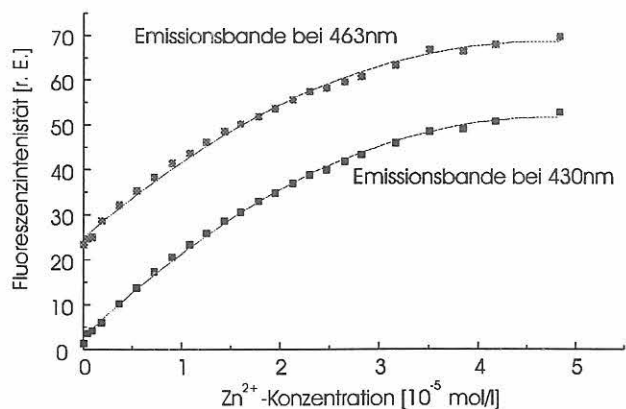


Abb. 3.19
Zunahme der Fluoreszenzintensität von $\text{BP}(\text{OH})_2$ als Funktion der Zn^{2+} -Konzentration in Puffer Sö 7.6, Anregungswellenlänge 337 nm ($c_{\text{BP}(\text{OH})_2} = 7 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

wellenlängenunabhängig und ergibt beispielsweise für Zn^{2+} die in Abb. 3.19 dargestellten Kalibrationskurven (statische Fluoreszenzmessungen).

3.5.5. Nachweis von Cu^{2+} , Co^{2+} und Ni^{2+}

Cu^{2+} , Co^{2+} und Ni^{2+} beeinflussen das absorptionsspektroskopische Verhalten von $\text{BP}(\text{OH})_2$ dahingehend, daß die Banden des $\text{BP}(\text{OH})_2$ in neutralen wässrigen Lösungen bei 346 und 405 bzw. 435 nm mit zunehmender Metallionenkonzentration abnehmen, und eine Bande bei 384 nm in gleichem Maße wächst. Bei $\text{Cu}^{2+}\text{-BP}(\text{OH})_2$ -Komplexen lassen sich daher beispielsweise in der langwelligsten Absorptionsbande (strukturierte Bande von 300-450 nm) zwei isobestische Punkte bei 358 und 418 nm beobachten (Abb. 3.20).

Nach der Methode der kontinuierlichen Variation nach VOSBURGH & COOPER [64] konnte von uns absorptionsspektroskopisch die Bildung eines $[\text{Cu}(\text{BP}(\text{OH})_2)_2]^{2+}$ -Komplexes nachgewiesen werden (Abb. 3.21). In ihrem absorptions- wie fluoreszenzspektroskopischen Einfluß unterscheiden sich Cu^{2+} , Co^{2+} und Ni^{2+} nicht wesentlich. Das Auftreten der Effekte wird hauptsächlich durch die unterschiedliche pH-Abhängigkeit der Komplexbildung der drei Ionen bedingt.

Im Emissionsspektrum von $\text{BP}(\text{OH})_2$ macht sich eine Komplexbildung von Cu^{2+} , Co^{2+} und Ni^{2+} durch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität bemerkbar (Abb. 3.22). Geringe spektrale Änderungen der Emissionsbande treten in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge auf (mit zunehmender Anregungswellenlänge verschiebt sich das Maximum der Emissionsbande leicht bathochrom: $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ z. B. 320 nm/471 nm bzw. 430 nm/480 nm). Das Fluoreszenzanregungsspektrum ist ebenfalls abhängig von der Emissionswellenlänge. Bei einem Gemisch von $\text{BP}(\text{OH})_2:\text{Cu}^{2+} = 3:1$ entspricht das Anregungsspektrum bei $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$ ungefähr der Form des Absorptionsspektrums eines Gemisches von $\text{BP}(\text{OH})_2:\text{Cu}^{2+} = 6:1$, bei $\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$ dem eines Gemisches von $\text{BP}(\text{OH})_2:\text{Cu}^{2+} = 4:1$. Am effektivsten löschen Cu^{2+} -Ionen die Fluoreszenz, wobei die Löschwirkung als

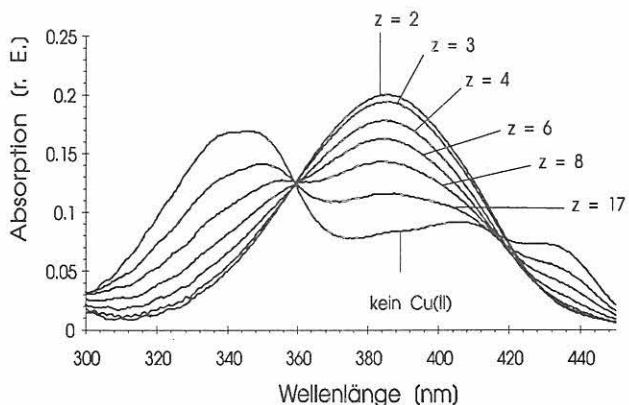


Abb. 3.20
Absorptionsspektren von $BP(OH)_2$ -Lösungen mit unterschiedlichen Cu^{2+} -Konzentrationen in Puffer Sö 7.6, Verhältnisse $BP(OH)_2 : Cu^{2+} = z : 1$ ($c_{BP(OH)_2} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

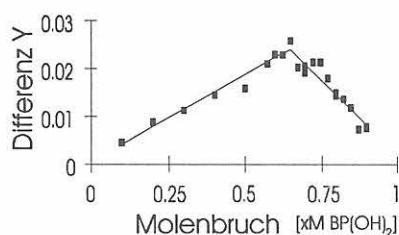


Abb. 3.21
Bestimmung der Komplexstöchiometrie mit der Methode der kontinuierlichen Variation ($c_{BP(OH)_2} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

Funktion des pH-Wertes mit steigendem pH-Wert von pH 3 bis pH 7 zunimmt. Zum einen bewirkt der steigende pH-Wert eine bessere Komplexbildung des Metallions und damit eine zunehmende Bindung der $BP(OH)_2$ -Moleküle in nicht oder nur schwach fluoreszierenden Komplexen, zum anderen nimmt die Fluoreszenzintensität der freien $BP(OH)_2$ -Moleküle in Lösung mit steigendem pH-Wert ab. Für den Nachweis von Cu^{2+} bietet sich daher die Messung von CHEQ in wässrigen Lösungen von pH ≤ 7 bei Anregung $\leq 340 \text{ nm}$ an. Die Fluoreszenzabklingzeiten und relativen Anteile der Einzelkomponenten am Abklingverhalten von $BP(OH)_2$ - Cu^{2+} -Mischungen ändern sich im Bereich von 1:1 bis 10:1 Mischungsverhältnis allerdings auch bei Anregung in der Absorptionsbande des Komplexes ($\lambda_{ex} = 384 \text{ nm}$) nur sehr wenig und lassen auf die Bildung eines nur sehr schwach fluoreszierenden Cu^{2+} -Komplexes schließen.

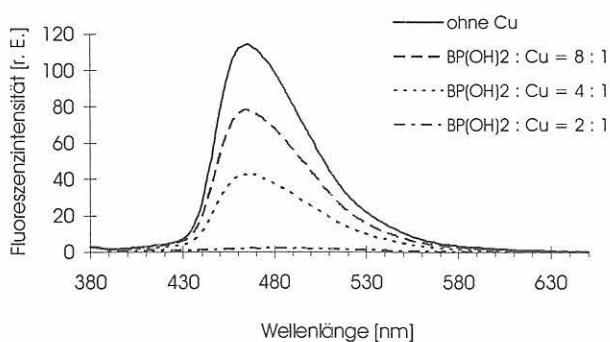


Abb. 3.22
Emissionsspektren von $BP(OH)_2$ - Cu^{2+} -Gemischen in Puffer Sö 7.6, Anregungswellenlänge 337 nm ($c_{BP(OH)_2} = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

3.5.6. Nachweis von Mn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} und Ag^+

Die Ionen Mn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} und Ag^+ haben keinen Einfluss auf das Absorptions- und auf das Fluoreszenzspektrum von $BP(OH)_2$, ihre Komplexbildung ist daher spektroskopisch nicht nachweisbar. Der Einsatz des Liganden für analytische Untersuchungen dieser Metallionen ist nicht möglich.

3.6. Fluoreszenzmarker 2,2'-Bipyridyl-3-ol und o-(2-Pyridino)-phenol

Die Komplexbildungseigenschaften von 2,2'-Bipyridyl-3-ol (BPOH) und o-(2-Pyridino)-phenol (oPP) gegenüber Schwermetallionen wurden untersucht, um einerseits das Komplexbildungsverhalten der eng verwandten Substanz $BP(OH)_2$ besser erklären zu können und um andererseits potentielle Anwendungsmöglichkeiten von BPOH in der Schwermetallanalytik zu suchen. Für oPP sind solche Anwendungsmöglichkeiten bereits in der Literatur beschrieben worden [65, 66].

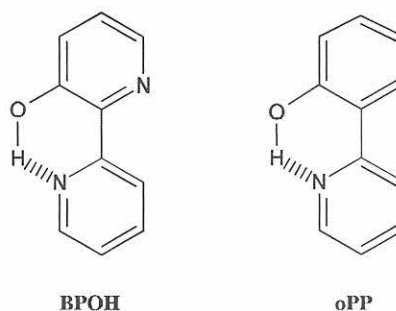


Abb. 3.23
2,2'-Bipyridyl-3-ol (BPOH) und o-(2-Pyridino)-phenol (oPP)

Beide hier beschriebenen Substanzen sind allerdings schlechter wasserlöslich als $BP(OH)_2$ und zeigen auch in organischen Lösungsmitteln eine deutlich schwächere Fluoreszenz [67]. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit der Modellsubstanzen wurden die Untersuchungen in Ethanol durchgeführt.

Die Absorptionsmaxima von BPOH und oPP sind gegenüber dem von $BP(OH)_2$ ca. 20 nm blauverschoben (Abb. 3.24).

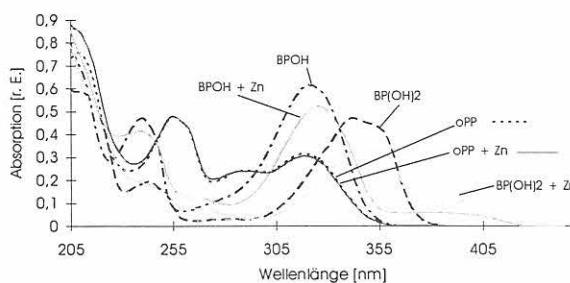


Abb. 3.24
Absorptionsspektren von $BP(OH)_2$, BPOH und oPP in Ethanol: $1 \cdot 10^{-5}$ molare Lösungen ("BP(OH)₂", "BPOH", "oPP") und in Gegenwart von 10:1-Überschuß Zn^{2+} ("...+Zn")

In Gegenwart von Zn^{2+} -Ionen zeigt oPP keine Änderung im Absorptionsspektrum, bei $BP(OH)_2$ und BPOH ist das Auftreten einer längerwellig gelegenen Schulter zu beobachten (Abb. 3.24).

Es ist bekannt, daß oPP in wäßrigen und ethanolisch-wäßrigen Lösungen besonders bei Komplexbildung durch Be^{2+} eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität zeigt, die allerdings stark vom pH-Wert abhängig ist [66]. Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} und Ni^{2+} haben hingegen keinen Effekt auf die Fluoreszenzeigenschaften von oPP, über einen Einfluß von Cu^{2+} werden in der Literatur keine Angaben gemacht [66]. Auch in ethanolischen Lösungen zeigt oPP in Gegenwart von Zn^{2+} keine deutlichen Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften. Beim Vergleich von oPP und einem oPP- Zn^{2+} -Gemisch im Verhältnis 1:10 sind in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge nur geringe Änderungen der Fluoreszenzintensität (nur bei 290 und 319 nm) mit nur geringen spektralen Veränderungen zu sehen.

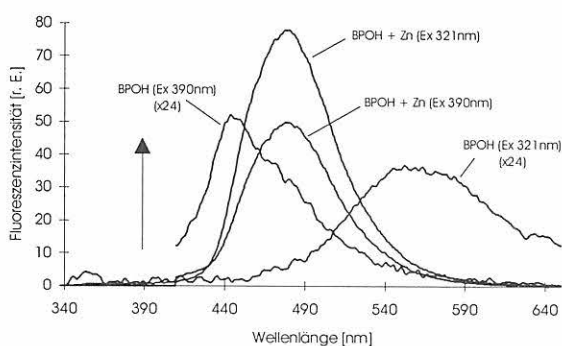


Abb. 3.25

Emissionsspektren von BPOH in Ethanol in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge ("Ex...") und der Anwesenheit von Zn^{2+} -Ionen im 10-fachen Überschuß ("...+Zn")

BPOH zeigt dagegen in Gegenwart von Zn^{2+} -Ionen eine drastische Fluoreszenzverstärkung und deutliche spektrale Verschiebungen der Emissionsbande (λ_{max}^{em} [BPOH, Ex 321 nm] = 553 nm, λ_{max}^{em} [BPOH, Ex 390 nm] = 444 nm, λ_{max}^{em} [BPOH + Zn^{2+}] = 478 nm Abb. 3.25). Bei $BP(OH)_2$ ist das fluoreszenzspektroskopische Verhalten in Ethanol in Anwesenheit von Zn^{2+} mit dem in Wasser vergleichbar, die Intensität der kurzwelligeren Bande allerdings deutlich höher (Abb. 3.26). Die Fluoreszenzverstärkung ist hier noch stärker von der Anregungswellenlänge abhängig als in wäßrigen Lösungen.

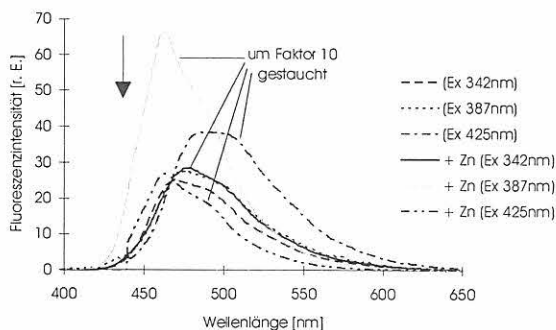


Abb. 3.26

Emissionsspektren von $BP(OH)_2$ in Ethanol in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge ("Ex =...") und der Anwesenheit von Zn^{2+} -Ionen im 10-fachen Überschuß ("...+Zn")

Ein Vergleich der Emissionsspektren von BPOH und $BP(OH)_2$ in Gegenwart von Zn^{2+} -Ionen macht deutlich, daß die emittierenden Spezies beider Komplexe strukturell ähnlich sind (Abb. 3.27). Der genaue Mechanismus der Komplexbildung und das damit zusammenhängende Gleichgewicht der emittierenden Spezies konnte bislang noch nicht geklärt werden.

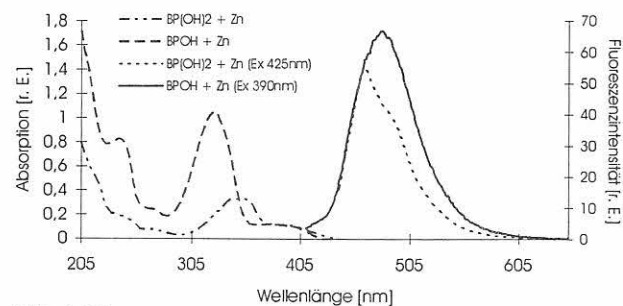


Abb. 3.27

Absorptions- und Emissionsspektren von BPOH- Zn^{2+} -Lösung (1:10), angeregt bei 321nm und $BP(OH)_2$ - Zn^{2+} -Lösung (1:10), angeregt bei 387 nm.

3.7. Offenkettiges Fluorophor-Rezeptor-System APTA

Im APTA ist der Anthrazen-Fluorophor über einen Carbonylspacer an den Thioharnstoff-Rezeptor gebunden, wobei der zweite Stickstoff Teil einer Pyrrolidringgruppe ist (Abb. 3.28).

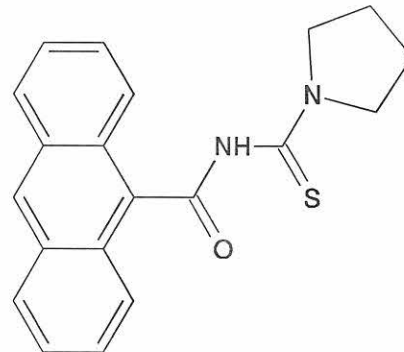


Abb. 3.28

APTA – Anthrazen-9-carbonsäure-(pyridin-1-carbothioyl)-amid

Die Substanz ist in den analytisch gebräuchlichsten organischen Lösungsmitteln wie Methanol, Ethanol und Acetonitril gut löslich, in Wasser besitzt APTA dagegen eine nur geringe Löslichkeit. Lösungen von APTA in Methanol und Acetonitril sind stabil und lassen sich ohne spektroskopische Veränderungen mehrere Tage in luftgesättigter Lösung aufbewahren.

Im ungebunden Zustand besitzt die Substanz in polaren organischen Lösungsmitteln wie Methanol und Acetonitril ein Absorptionsspektrum, welches dem von Anthrazen entspricht. Die Lage der einzelnen Schwingungsbanden des strukturierten Spektrums sind in Acetonitril gegenüber den vergleichbaren Banden des unsubstituierten Anthrazens leicht blauverschoben (Tab. 3.10).

Tab. 3.10

Absorptionsspektroskopische Daten von APTA, Anthrazen und 9-Anthrazencarbonsäure in Acetonitril

Substanz	Absorptionsmaximum $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ [nm] (Extinktionskoeff. ϵ_{\max} [$\text{cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$])
APTA	346 (6018), 364 (8781), 383 (8025)
Anthrazen	339, 356, 375
9-Anthrazencarbonsäure	346, 363, 383

Tab. 3.11

Fluoreszenzspektroskopische Daten von APTA, Anthrazen und 9-Anthrazencarbonsäure in Acetonitril

Substanz	Emissionsmaximum $\lambda_{\max}^{\text{em}}$ [nm]	Fluoreszenzquantenausbeute ¹⁹ ϕ_f	Fluoreszenzlebensdauer τ_f [ps]
APTA	428	$2.28 \cdot 10^{-3}$	$\tau_1 = 35, \tau_2 = 2800$
Anthrazen	379, 400, 423	0.26	4900 ²⁰
9-Anthrazencarbonsäure	432	0.3	2100 ²⁰

In seinem Fluoreszenzverhalten unterscheidet sich APTA deutlich von Anthrazen und 9-Anthrazencarbonsäure. Die Fluoreszenzquantenausbeute von APTA ist weitaus geringer ($\phi_f = 2.3 \cdot 10^{-3}$) als die von Anthrazen und 9-Anthrazencarbonsäure. Eine Gegenüberstellung der fluoreszenzspektroskopischen Daten der drei Anthrazenverbindungen erfolgt in *Tab. 3.11*.

Die spektroskopisch nachweisbaren Komplexierungseigenschaften von APTA sind lösungsmittelabhängig. Bei Zugabe der in Kap. 3.4. genannten Ionen findet entweder eine Verstärkung der Fluoreszenz statt oder die Anwesenheit des betreffenden Ions hat keine Auswirkungen auf Lage und Intensität des Fluoreszenzspektrum des freien Liganden. Dabei erfolgt eine Bindung der Schwermetallionen in Alkoholen deutlich langsamer als in Acetonitril. Die fluorometrische Untersuchung des Komplexierungsverhaltens von APTA mit Cu^{2+} -Ionen in Methanol und Acetonitril ergab, daß in Methanol die Zunahme der Fluoreszenzintensität erst nach ca. 28 Stunden beendet ist, während in Acetonitril ein stabiler Endwert innerhalb von Sekunden erreicht wird, d. h., daß die Gleichgewichtseinstellung augenblicklich erfolgt. Alkali- und Erdalkalimetallionen haben ebenfalls keinen Einfluß auf das Fluoreszenzverhalten von APTA.

Bei Untersuchungen zum Komplexierungs- und Fluoreszenzverhalten von APTA mit den oben genannten Schwermetallionen in Acetonitril konnten drastische Effekte nur

für die Komplexierung von Cu^{2+} -Ionen beobachtet werden, die selektiv zu einer ca. 1000fachen Verstärkung der Fluoreszenz von APTA führt. Absorptionsspektroskopisch macht sich die Bildung eines $[\text{Cu}^{\text{II}}\text{APTA}]^{2+}$ -Komplexes durch eine leichte Rotverschiebung und eine deutliche Abnahme des Extinktionskoeffizienten bemerkbar. Die spektrale Lage der Emissionsbande bleibt nahezu konstant, während die Schwingungsfeinstruktur sich ändert und in Gegenwart von Cu^{2+} der Schwingungsstruktur des unsubstituierten Anthrazens ähnelt. Eine vergleichbare Intensitätszunahme wurde für Cu^{2+} -Komplexe von strukturverwandten, substituierten *N*-Pyrenoylthioharnstoffen gefunden [34].

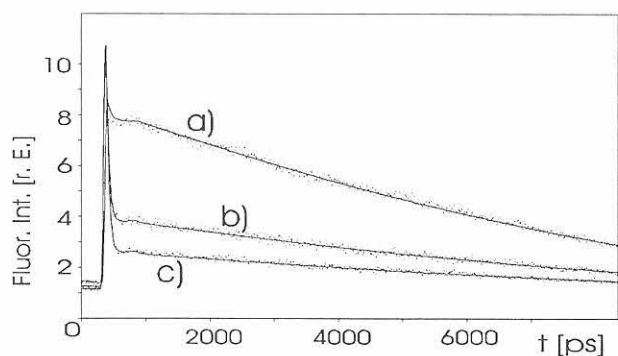


Abb. 3.29

Fluoreszenzabklingkurven von APTA- Cu^{2+} -Mischungen in Acetonitril²¹: a) 1.25:1, b) 5:1 und c) 10:1 Überschuss an APTA, gemessene Kurve (gepunktet) und angepaßte Kurve (durchgezogen)

Tab. 3.12

Spektroskopische Daten von APTA und $[\text{Cu}^{\text{II}}\text{APTA}]^{2+}$ ($\tau_1 = 35\text{ps}$)

Substanz	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ [nm] (ϵ_{\max} [$\text{cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$])	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ [nm]	ϕ_f ¹⁹	τ_f [ps]
APTA	346 (6018), 364 (8781), 383 (8025)	428	$2.3 \cdot 10^{-3}$	$\tau_2 = 2800$
$[\text{Cu}^{\text{II}}\text{APTA}]^{2+}$	364 (2101), 382 (2218), 402 (1590)	415, 435	0.5	$\tau_2 = 10300$

¹⁹ APTA bezogen auf Diphenylanthrazen, Anregungswellenlänge 350nm, unkorrigierte Emissionsspektren

²⁰ bestimmt in Ethanol als Lösungsmittel, Werte aus [68]

²¹ Messung mit ps-Laserapparat: Anregungswellenlänge 384nm, Emissionswellenlänge 438nm, Entfaltung mit DECAMAX (variabler time-shift, beste Fits mit final c2 a) 1.288, b) 1.142 und c) 1.210)

Für eine Bestimmung von Cu^{2+} -Ionen mittels zeitaufgelöster Fluorometrie sollte die Konzentration der Cu^{2+} -Ionen in der Meßlösung optimalerweise etwas geringer als die Konzentration an Fluoreszenzmarker in der Lösung sein (optimaler Arbeitsbereich: $1/10 \cdot c_{\text{APTA}} \leq c_{\text{Cu}^{2+}} \leq c_{\text{APTA}}$). Bei einer Konzentration von $9.8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ APTA ergeben sich für a) $7.84 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, b) $1.96 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ und c) $9.8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Cu^{2+} -Ionen die in Abb. 3.29 dargestellten Fluoreszenzabklingkurven.

In Gegenwart der anderen Metallionen, die keinen Einfluß auf die Fluoreszenzintensität von APTA haben, ändert sich auch das Abklingverhalten nur unwesentlich.

3.8. Offenkettiges Fluorophor-Rezeptor-System AMBT

Bei AMBT ist der Anthrazen-Fluorophor N-seitig kovalent über einen Methylenspacer an das Thioharnstoff-Grundgerüst gebunden, C-seitig trägt der Acylthioharnstoff einen Phenylsubstituenten (Abb. 3.30).

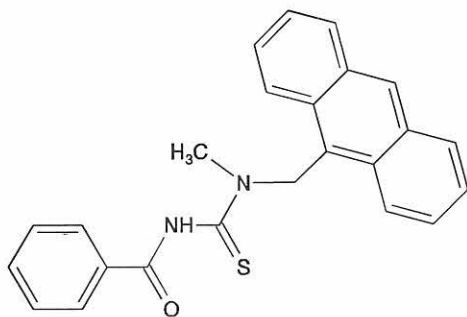


Abb. 3.30
AMBT – 1-Anthrazen-9-ylmethyl-1-methyl-3-benzoylthioharnstoff

In seinen Löslichkeitseigenschaften und seiner physikalisch-chemischen Stabilität gleicht AMBT APTA weitgehend.

Das Absorptionsspektrum von AMBT ist in polaren organischen Lösungsmitteln mit dem des unsubstituierten Anthrazens nahezu identisch.

Tab. 3.13
Spektroskopische Daten von AMBT, Anthrazen und AMMA¹ in Methanol

Substanz	$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$ [nm] ($\epsilon_{\lambda_{\text{max}}}$ [$\text{cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$])	$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$ [nm]	ϕ_f^{22}	τ_f [ns]
AMBT	350 (7013), 368 (10197), 388 (9434)	391, 414, 436	$3.2 \cdot 10^{-3}$	4.3^{23}
Anthrazen	338, 356, 375	378, 399, 422	0.24	4.9^{20}
AMMA	347, 365, 385	392, 415, 439	0.24	nicht best.

²² AMBT bezogen auf Anthrazen, Anregungswellenlänge 350 nm, unkorrigierte Emissionsspektren

²³ Die Abklingkurven von AMBT konnten hinreichend gut nur durch einen triexponentiellen Zerfall beschrieben werden (s. Tab. 3.14). Die Komponente K_3 mit der Abklingzeit $\tau_3 = 4.3 \text{ ns}$ wurde dabei der Anthrazenfluoreszenz zugeordnet. τ_3 bestimmt in Ethanol als Lösungsmittel, Werte aus [68]

²⁴ AMMA = Anthrazen-9-ylmethyl-methylamin

Das Fluoreszenzspektrum von AMBT ähnelt spektral ebenfalls dem von Anthrazen, die Fluoreszenzintensität ist allerdings deutlich geringer (Tab. 3.13).

Bei der Komplexierung von Schwermetallionen ist das kinetische Verhalten von AMBT nicht so lösungsmittelabhängig wie das von APTA. Die Gleichgewichtseinstellung erfolgt auch in Methanol innerhalb weniger Sekunden.

AMBT zeigt besonders mit den d^{10} -Metallionen Zn^{2+} , Cd^{2+} und Hg^{2+} eine Änderung des Fluoreszenzverhaltens. Bei allen drei Metallionen läßt sich CHEF beobachten, wobei spektrale Änderungen des Emissionsspektrums nicht auftreten (Abb. 3.31 und 3.32). Auch im Absorptionsspektrum treten keine spektralen und Intensitätsänderungen auf.

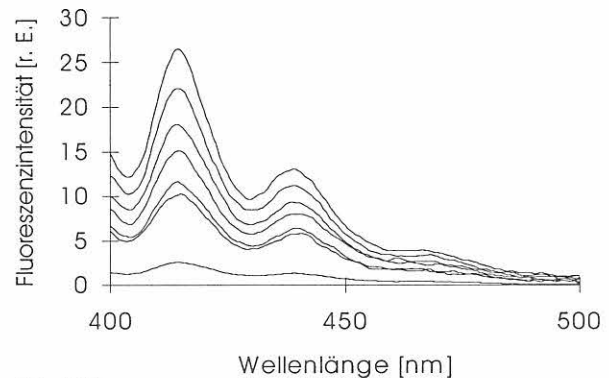


Abb. 3.31
CHEF von AMBT ($c_{\text{AMBT}} = 9 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) in Methanol als Funktion der Zn^{2+} -Konzentration ($c_{\text{Zn}} = 0, 4.1, 8.2, 16, 24, 37$ und $49 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, Kurven mit steigender Intensität, $\lambda_{\text{ex}} 390 \text{ nm}$)

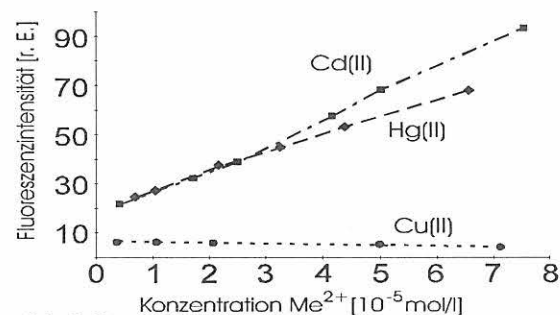


Abb. 3.32
Änderung der Fluoreszenzintensität von AMBT in Gegenwart von Cd^{2+} , Hg^{2+} und Cu^{2+} ($c_{\text{AMBT}} = 9 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, Bedingungen s. Abb. 3.31)

Tabelle 3.14

Fluoreszenzabklingverhalten von AMBT-Meⁿ⁺-Gemischen in Methanol ($c_{\text{AMBT}} = 3.5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)²⁵

Me ²⁺	Komponente K ₁			Komponente K ₂			Komponente K ₃			
	τ_1 [ps]	a_1	I_1 (*10 ²)	τ_2 [ps]	a_2	I_2 (*10 ²)	τ_3 [ns]	a_3	I_3 (*10 ³)	I_{ges}
—	47 ± 7	1.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1	346 ± 9	0.8 ± 0.1	2.9 ± 0.2	4.3 ± <0.1	0.5 ± 0.1	2.4 ± 0.2	27.6
Zn ²⁺	91 ± 14	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.3	398 ± 34	1.2 ± 0.1	4.7 ± 0.3	4.4 ± 0.2	0.9 ± 0.1	3.9 ± 0.4	44.8
Cd ²⁺	86 ± 25	1.3 ± 0.2	1.2 ± 0.5	406 ± 23	2.9 ± 0.1	11.6 ± 0.5	4.4 ± 0.2	0.8 ± <0.1	3.5 ± 0.3	47.8
Hg ²⁺	101 ± 7	2.7 ± 0.1	2.7 ± 0.1	295 ± 17	0.7 ± 0.1	2.2 ± 0.2	4.3 ± <0.1	1.6 ± 0.1	7.0 ± 0.4	74.9
Co ²⁺	77 ± 19	2.0 ± 0.1	1.6 ± 0.5	383 ± 23	2.5 ± 0.2	9.8 ± 0.6	4.7 ± 0.1	1.1 ± 0.1	5.2 ± 0.7	63.4
Ni ²⁺	42 ± 3	2.8 ± 0.1	1.2 ± 0.1	356 ± 27	1.4 ± 0.1	5.0 ± 0.4	4.2 ± 0.2	0.9 ± 0.1	3.8 ± 0.5	44.2
Cu ²⁺	266 ± 9	1.4 ± 0.1	3.7 ± 0.1	1577 ± 912	0.2 ± 0.1	3.3 ± 2.3	4.5 ± 0.1	1.0 ± 0.1	4.6 ± 0.4	53.0
Mn ²⁺	23 ± 4	5.1 ± 1.6	1.2 ± 0.2	331 ± 13	2.0 ± 0.1	6.7 ± 0.6	4.4 ± 0.1	1.2 ± 0.1	5.1 ± 0.4	58.9
Pb ²⁺	32 ± 1	5.2 ± 0.9	1.7 ± 0.3	342 ± 20	1.9 ± 0.1	6.7 ± 0.6	4.3 ± 0.2	1.1 ± 0.1	4.9 ± 0.5	57.4
Ag ⁺	23 ± 3	2.9 ± 0.6	0.6 ± <0.1	253 ± 6	2.1 ± 0.1	5.3 ± 0.3	4.4 ± 0.1	2.0 ± 0.1	8.8 ± 0.5	93.9

Die Anwesenheit von anderen Metallionen hat keinen oder nur einen geringen Einfluß auf das Emissionsverhalten von AMBT. In Gegenwart von Cu²⁺-Ionen ist eine geringe Abnahme der Fluoreszenzintensität zu beobachten (Abb. 3.32), Alkali- und Erdalkalimetallionen haben keinen Einfluß.

Mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzmessungen an AMBT-Schwermetallionen-Gemischen lassen sich allerdings keine eindeutigen Bestimmungen bzw. Nachweise der Metallionen führen. Alle Abklingkurven können nur unter Zuhilfenahme von drei Exponentialfunktion hinreichend gut beschrieben werden, wobei die Zuordnung der beiden kurzen Zeitkomponenten τ_1 und τ_2 zu bestimmten photochemischen Spezies bzw. photophysikalischen Prozessen nicht erfolgen konnte. An der gesamten Fluoreszenzintensität stellen beide Komponenten nur einen kleinen Anteil dar, die relative Quantenausbeute von τ_1 beträgt im allgemeinen weniger als 5% ($\phi_{\text{rel}} < 0.05$), die von τ_2 weniger als 15% ($\phi_{\text{rel}} < 0.15$). Die Änderungen der einzelnen Lebensdauerkomponenten folgen dabei keiner Regel, lassen sich beispielsweise nicht mit dem Schweratom-Effekt erklären. Die Hauptkomponente τ_3 , die der Anthrazenfluoreszenz zugeordnet werden kann, zeigt kaum Änderungen (Tab. 3.14).

3.9. FRS auf Basis anderer N-Acylthioharnstoffe

DEBT und PCTB wurden nur zur Erprobung des Syntheseweges und der präparativen Reaktionsbedingungen hergestellt. Aufgrund eines fehlenden größeren aromatischen π -Elektronensystems der Substituenten fluoreszieren diese Verbindungen nur schwach, so daß auch bei einer Komplexierung nur sehr geringe Fluoreszenzintensitäten zu erwarten sind. Die Verbindungen wurden daher von uns spektroskopisch nicht untersucht.

Die beiden N-Acylthioharnstoffe mit einer Naphthalin-Einheit als Fluorophor (DENT und NPAT) zeigen bei Kom-

plexierung nur geringe Änderungen der Fluoreszenzintensität, so daß ihr Einsatz in der fluorometrischen Metallionenanalytik ebenfalls nicht von Interesse ist.

3.10. Makrozyklisches Fluorophor-Rezeptor-System NBO-crown

NBO-crown, 4-Nitro-7-(1,4,10-trioxa-7,13-diaza-cyclopentadec-7-yl)-benzo[1,2,5]oxadiazol, ist ein Fluoreszenzmarker, bei dem Fluorophor und Rezeptor direkt aneinander gebunden sind. NBO-crown ist in den analytisch gebräuchlichsten organischen Lösungsmitteln, wie niedermolekularen Alkoholen und Acetonitril, gut löslich. In wäßrigen Medien nimmt die Löslichkeit dieses Fluoreszenzmarkers drastisch ab. Die Lösungen von NBO-crown sind stabil und zeigen in einem Zeitraum von Tagen keine spektroskopisch nachweisbaren Veränderungen.

Im Absorptionsspektrum, aufgenommen in Methanol, weist NBO-crown eine intensive Bande mit einem Maximum bei 476 nm ($\epsilon_{\lambda_{\text{max}}} = 16500 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$) auf. Wird eine metha-

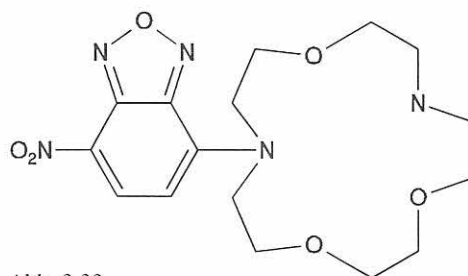


Abb. 3.33
NBO-crown

²⁵ Messungen mit ps-Laserapparatur: Anregungswellenlänge 380 nm, Emissionswellenlänge 420 nm, Entfaltung mit DECMAX (beste Fits mit final χ^2 im Bereich von 1.087 bis 1.451). Bei der Anpassung der Abklingkurven der AMBT-Cu²⁺-Mischungen bereitete K₂ Probleme, die Lebensdauer dieser Komponente ließ sich annähernd gleich gut mit Zeiten zwischen 700 und 2500 ps anpassen.

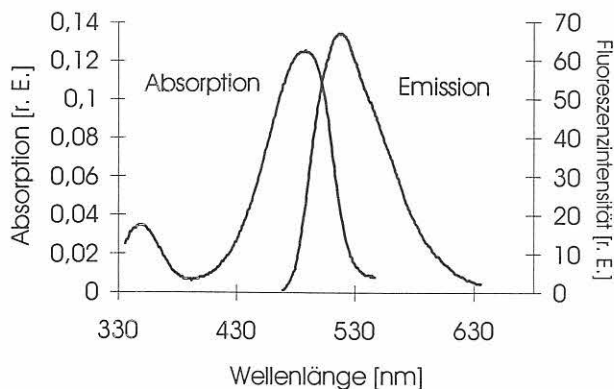


Abb. 3.34
Absorptions- und Fluoreszenzspektren von NBO-crown in Methanol ($c_{\text{NBO-crown}} = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, Anregungswellenlänge 475 nm)

nolische Lösung von NBO-crown in dieser Absorptionsbande angeregt, läßt sich unabhängig von der Anregungswellenlänge eine Emissionsbande mit einem Maximum bei 539 nm beobachten (Abb. 3.34). Die Fluoreszenzquantenausbeute beträgt $3.39 \cdot 10^{-2}$, die Fluoreszenzlebensdauer 0.45 ns.

Die Untersuchungen des spektroskopischen Verhaltens von NBO-crown in Gegenwart von Schwermetallionen wurden vor allem in Methanol durchgeführt, da in diesem Lösungsmittel von den im Kap. 3.4. aufgezählten Ionen nur Hg^{2+} einen deutlichen Einfluß auf das Fluoreszenzverhalten von NBO-crown hat. Bei nahezu gleichbleibender Lage der Emissionsbande ($\lambda_{\text{max}} = 537 \text{ nm}$) läßt sich für die Fluoreszenzintensität von NBO-crown bei Anwesenheit von Hg^{2+} -Ionen eine mit der Konzentration der Metallionen linear ansteigende Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachten (Abb. 3.35).

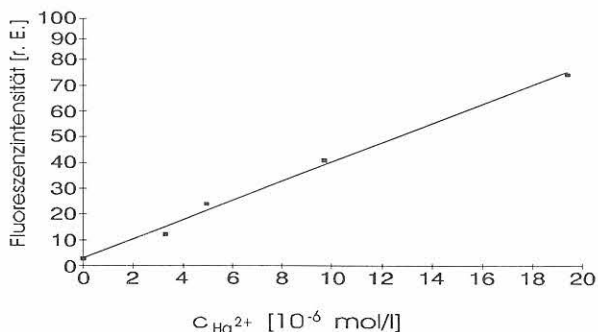


Abb. 3.35
Zunahme der Fluoreszenzintensität von NBO-crown in Methanol als Funktion der Hg^{2+} -Konzentration ($c_{\text{NBO-crown}} = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

Das Absorptionsspektrum von NBO-crown bleibt in Gegenwart von Hg^{2+} -Ionen nahezu unverändert, und auch der molare Extinktionskoeffizient ändert sich nur geringfügig ($\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}} = 475 \text{ nm}$, $\epsilon_{\lambda_{\text{max}}} = 15755 \text{ cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$).

Bei zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen²⁶ zeigt sich, daß sich bei Komplexbildung durch Schwermetallionen das Abklingverhalten von NBO-crown durch einen biexponentiellen Zerfall beschreiben läßt. Die längere Abklingzeit τ_2 der zusätzlich anwesenden Komponente hängt dabei vom

²⁶ Messungen bei BESSY, Anregungswellenlänge 475nm, Emissionswellenlänge 540nm, Entfaltungen mit DECAMAX

komplexierten Metallion ab. Das Fluoreszenzabklingen von NBO-crown- Cu^{2+} -Mischungen (1:1) läßt sich mit $\tau_1 = 0.5 \text{ ns}$ und $\tau_2 = 0.9 \text{ ns}$, das von NBO-crown- Hg^{2+} -Gemischen (1:1) mit $\tau_1 = 0.5 \text{ ns}$ und $\tau_2 = 2.5 \text{ ns}$ und das von NBO-crown- Pb^{2+} -Mischungen (1:1) mit $\tau_1 = 0.6 \text{ ns}$ und $\tau_2 = 5.1 \text{ ns}$ beschreiben. Für Hg^{2+} -Ionen, die als einzige der untersuchten Ionen einen deutlichen Einfluß auf das Fluoreszenzverhalten von NBO-crown haben, korreliert die Zunahme des relativen Anteils der Komponente mit $\tau_2 = 2.5 \text{ ns}$ mit der Hg^{2+} -Konzentration.

Wird statt des Makrozyklus 1,4,10-Trioxa-7,13-diazacyclopentadecan der analoge Monoazamakrozyklus 1,4,7,10-Tetraoxa-13-aza-cyclopentadecan an den Fluorophor 7-Nitrobenzo[1,2,5]oxadiazol gebunden, treten in Gegenwart der o. g. Schwermetallionen keine Änderungen des Absorptions- und Fluoreszenzverhalten des Farbstoffs auf, d. h., spektroskopisch läßt sich keine Komplexbildung nachweisen. Für diesen FRS wird CHEF vor allem bei Zugabe von Erdalkalimetallsalzen (z. B. Nitrate oder Perchlorate) beobachtet, wobei die Stärke der Intensitätszunahme der Fluoreszenz abhängig vom Wassergehalt des Lösungsmittels ist [50].

3.11. Fluorophor-Rezeptor-Systeme mit verschiedenen Styryl-Fluorophoren

Als Modellsysteme für FRS mit verschiedenen Styryl-Fluorophoren wurden sowohl die Fluoreszenzmarker Styryl crown 1 und Styryl crown 3 als auch deren rezeptorlose Derivate, die Fluoreszenzfarbstoffe Styryl DMA 1 und Styryl DMA 2 (Abb. 3.36) mit der statischen UV/VIS- und der Fluoreszenzspektroskopie untersucht. In den makrozyklischen Verbindungen 1a und 2a ist die Dimethylaminogruppe der freien Farbstoffe 1b und 2b in den bevorzugt Alkali- und Erdalkalimetallionen komplexierenden Rezeptor 1,4,7,10-Tetraoxa-13-aza-cyclopentadecan integriert.

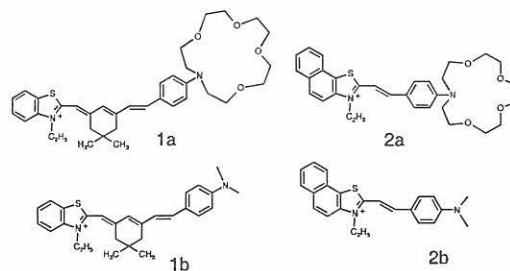


Abb. 3.36
Styrylverbindungen²⁷: 1a - Styryl crown 1, 1b - Styryl DMA 1
2a - Styryl crown 3, 2b - Styryl DMA 2

²⁷ Styryl crown 1 = 2-(5,5-Dimethyl-3-{2-[4-(1,4,7,10-tetraoxa-13-aza-cyclopentadec-13-yl)-phenyl]-vinyl}-cyclohex-2-enylidene)methyl-3-ethyl-benzothiazolium iodid

Styryl crown 3 = 2-{2-[4-(1,4,7,10-tetraoxa-13-aza-cyclopentadec-13-yl)-phenyl]-vinyl}-3-ethyl-naphtho[2,1-d]thiazolium perchlorat
Styryl DMA 1 = (4-{2-[3-(3-Ethyl-benzothiazolium-2-ylmethyl)-5,5-dimethyl-cyclohex-1-enyl]-vinyl}-phenyl)-dimethylamin iodid
Styryl DMA 2 = {4-[2-(3-Ethyl-naphtho[2,1-d]thiazolium-2-yl)-vinyl]-phenyl}-dimethylamin tosylat

Das Komplexierungsverhalten dieser Fluoreszenzmarker gegenüber den Kationen Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} und Sr^{2+} wurde absorptions- und fluoreszenzspektroskopisch in Acetonitril verfolgt. Die untersuchten Fluoreszenzmarker, die sich im kovalent gebundenen Heterozyklus und der Zahl der Doppelbindungen des Cyanin-Styryl-Farbstoffes unterscheiden, sollten dabei als Modellsysteme für Fluorophor-Rezeptor-Systeme mit langwellig absorbierenden und emittierenden Styryl-Farbstoffen dienen, um so Aussagen über die Eignung dieser Farbstoffe als Fluorophore zu gewinnen.

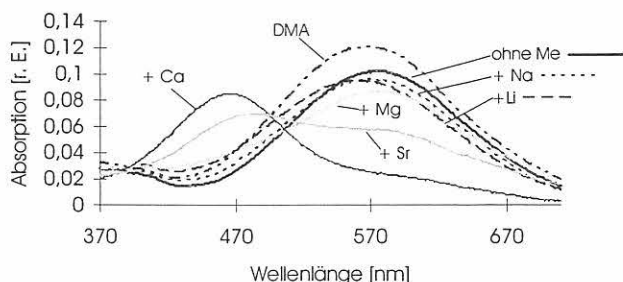


Abb. 3.37
Absorptionsspektren von Styryl crown 1, Styryl crown 1-Komplexen mit einigen Alkali- und Erdalkalimetallionen und Styryl DMA 1 in Acetonitril ($c_{\text{FRS}} = 2.5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

Styryl crown 1 hat im sichtbaren Spektralbereich in Acetonitril eine breite Absorptionsbande mit einem Maximum bei 575 nm (Abb. 3.37). Das Maximum der Fluoreszenzbande liegt unabhängig von der Anregungswellenlänge bei 783 nm, und die Fluoreszenzanregungs- und Absorptionsspektren stimmen überein.

Zugabe der Alkalimetallionen Li^+ , Na^+ und K^+ in tausendfachem Überschuß führt im Falle von Li^+ und Na^+ zu einer hypsochromen Verschiebung der Absorptionsbande (Li^+ : 559 nm; Na^+ : 571 nm; Abb. 3.37), für K^+ ist keine Verschiebung zu beobachten.

In Gegenwart der Erdalkalimetallionen Ca^{2+} und Sr^{2+} erscheint eine neue, stark blauverschobene Absorptions-

bande, und die Intensität der Absorptionsbande des unkomplexierten Fluoreszenzmarkers bei 575 nm nimmt deutlich ab. Für Ca^{2+} tritt bereits bei einem hundertfachen Kationenüberschuß diese zweite Absorptionsbande mit einem Maximum bei 465 nm auf, und bei Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration nimmt die Intensität dieser neuen Bande zu. Bei Sr^{2+} ist eine neue Absorptionsbande bei 482 nm erst bei einem tausendfachen Kationenüberschuß zu beobachten (Tab. 3.15, Abb. 3.37).

Fluoreszenzspektroskopisch hat die Komplexierung von Alkali- und Erdalkalimetallionen einen unterschiedlichen Einfluß auf das Emissionsverhalten von Styryl crown 1. Li^+ und Na^+ führen zu einer leichten Verstärkung der Fluoreszenz mit schwach hypsochromer Verschiebung des Emissionsmaximums. Mg^{2+} , Ca^{2+} und Sr^{2+} führen zu einer Abschwächung der Fluoreszenz, wobei der Effekt in der Reihe $\text{Mg}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Ca}^{2+}$ zunimmt. Die Bandenlage ändert sich ebenfalls (hypsochrome Verschiebung), Ca^{2+} zeigt hier wieder den größten Einfluß (Abb. 3.38). Die Anwesenheit von Metallionen in einer Lösung von Styryl DMA 1 hat keinen Effekt auf das Absorptions- und Fluoreszenzverhalten.

Die Emissions- und Anregungsspektren der Metallionenkomplexe wurden repräsentativ für die Kationen Li^+ und Ca^{2+}

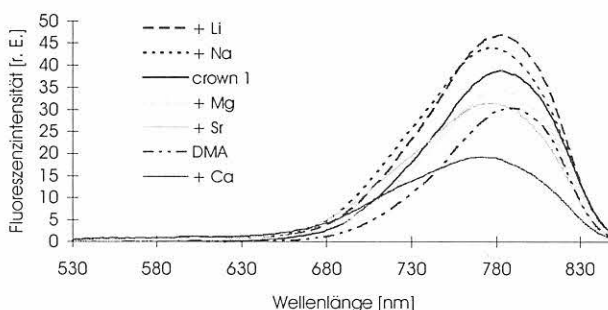


Abb. 3.38
Emissionsspektren von Styryl crown 1, Styryl crown 1-Komplexen mit einigen Alkali- und Erdalkalimetallionen und Styryl DMA 1 in Acetonitril ($c_{\text{FRS}} = 2.5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), Anregungswellenlänge = 510 nm

Tabelle 3.15
Spektroskopische Daten von Styryl crown 1, Styryl crown 1-Komplexen mit einigen Alkali- und Erdalkalimetallionen und Styryl DMA 1 in Acetonitril (1000facher Metallionenüberschuß, $c_{\text{FRS}} = 2.25 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

Styryl-Verbindung	Absorptionsmaximum $\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$ [nm]	Emissionsmaximum $\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ [nm]
crown 1	575	783
crown 1 + Li^+	559	777
crown 1 + Na^+	571	784
crown 1 + K^+	575 ²⁸	783 ²⁸
crown 1 + Ca^{2+}	465	763-785 ²⁹
crown 1 + Sr^{2+}	482	779
DMA 1	570	788

²⁸ Bei Zugabe von Kalium ist spektroskopisch keine Änderung zu beobachten.

²⁹ Die Emissionsspektren von Styryl crown 1- Ca^{2+} -Gemischen sind anregungswellenlängenabhängig ($I_{\text{ex}} / I_{\text{max}}^{\text{em}}$: 440 nm/763 nm, 510 nm/771 nm, 580 nm/780 nm und 650 nm/785 nm)

bei einem tausendfachen Kationenüberschuß gemessen. In Gegenwart von Li^+ ist die Fluoreszenzbande von Styryl crown 1 leicht blauverschoben (Maximum bei 779 nm) und nahezu unabhängig von der Fluoreszenzanregungswellenlänge; Fluoreszenzanregungs- und Absorptionsspektrum stimmen überein.

Bei einem tausendfachen Überschuß an Ca^{2+} hängt dagegen die spektrale Lage des Fluoreszenzmaximums stark von der Anregungswellenlänge ab. So liegt das Emissionsmaximum z. B. für eine Anregungswellenlänge von 440 nm bei 763 nm, während Anregung bei 510 nm zu einem Maximum bei 771 nm, Anregung bei 580 nm zu einem Maximum bei 780 nm und Anregung bei 650 nm zu einem Maximum bei 785 nm führt.

Für Ca^{2+} stimmen Fluoreszenzanregungs- und Absorptionsspektren nicht überein. Bei einer Emissionswellenlänge von 710 nm tritt im Fluoreszenzanregungsspektrum nur ein Maximum bei 475 nm auf, während bei den Emissionswellenlängen 760 nm und 810 nm zwei Maxima bei 475 nm und 550 nm zu beobachten sind (Abb. 3.39).

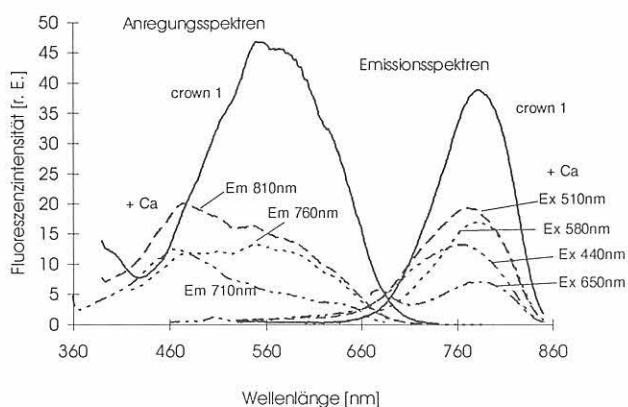


Abb. 3.39

Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektren von Styryl crown 1 und Styryl crown 1- Ca^{2+} -Komplex als Funktion der Emissions- (Em) bzw. Anregungs- (Ex) wellenlänge in Acetonitril ($c_{\text{FRS}} = 2.5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $c_{\text{Ca}} = 2.5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

Die Emissions- und Fluoreszenzanregungsspektren deuten auf das Vorliegen zweier emittierender Spezies hin, nämlich des unkomplexierten Liganden und des Ca^{2+} -Komplexes. Letzterer absorbiert und emittiert bei kürzeren Wellenlängen als der ungebundenen Fluoreszenzmarker (Tab. 3.15, Abb. 3.39). Das Verhalten des Ca^{2+} -Komplexes in den

Tabelle 3.16

Spektroskopische Daten von Styryl crown 3, Styryl crown 3-Komplexen mit Li^+ und Ca^{2+} und Styryl DMA 2 in Acetonitril (1000facher Metallionenüberschuß, $c_{\text{FRS}} = 2.7 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Mit den Kationen Na^+ , K^+ und Sr^{2+} sind keine Änderungen im Absorptions- und Fluoreszenzspektrum zu beobachten.

Styryl-Verbindung	Absorptionsmaximum $\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$ [nm]	Emissionsmaximum $\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ [nm]
crown 3	531	608
crown 3 + Li^+	529	605
crown 3 + Ca^{2+}	529	605
DMA 2	530	608

Fluoreszenzanregungs- und -emissionsspektren deutet ebenfalls darauf hin, daß der Komplex eine geringere Fluoreszenzquantenausbeute als das freie Styryl crown 1 besitzt.

Der sich nur im heteroaromatischen Gerüst und der Zahl der Doppelbindungen des kovalent gebundenen Cyanin-Styryl-Farbstoffes von Styryl crown 1 unterscheidende Fluoreszenzmarker Styryl crown 3 besitzt in Acetonitril im sichtbaren Spektralbereich eine breite Absorptionsbande mit einem Maximum bei 531 nm. Das Maximum der Fluoreszenzbande liegt bei 608 nm unabhängig von der Anregungswellenlänge, und die Fluoreszenzanregungs- und Absorptionsspektren stimmen nahezu überein. Im Gegensatz zu den für die Metallionenkomplexe von Styryl crown 1 beobachteten deutlichen Veränderungen der Absorptions- und Emissionsspektren des Fluoreszenzmarkers werden die optischen Eigenschaften von Styryl crown 3 durch Kationenkomplexierung nur unwesentlich verändert (Tab. 3.16). So führt die Zugabe der Alkali- und Erdalkalimetallionen Li^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} und Sr^{2+} in tausendfachem Überschuß nur für Li^+ und Ca^{2+} zu einer sehr leichten hypsochromen Verschiebung der Absorptionsbande um 3 nm und zu einer schwachen Abnahme ihrer Intensität. Die repräsentativ für einen tausendfachen Überschuß der Kationen Li^+ und Ca^{2+} gemessenen Emissionsspektren zeigen ebenfalls eine Blauverschiebung um 3 nm sowie eine leichte Zunahme (20-30 Prozent) der Fluoreszenzintensität (Tab. 3.16). Analog zu Styryl DMA 1 hat auch bei Styryl DMA 2 die Anwesenheit von Metallionen in der Lösung keinen Einfluß auf das spektroskopische Verhalten. Die Anregungsspektren bei Abwesenheit und Anwesenheit von Metallionen sind identisch. Bislang konnte das unterschiedliche Verhalten von Styryl crown 1 und Styryl crown 3 bei Kationenkomplexierung noch nicht geklärt werden.

3.12. Einsatzmöglichkeiten der Fluoreszenzmarker in der Metallionenanalytik

Die Einsatzmöglichkeiten von $\text{BP}(\text{OH})_2$ in der fluorometrischen Analytik der Schwermetallionen sind begrenzt. Da nicht alle Ionen, die von $\text{BP}(\text{OH})_2$ gebunden werden, eine spezifische Änderung der Absorptions- oder Fluoreszenzspektren hervorrufen und auch das Fluoreszenzabklingverhalten nicht spezifisch beeinflussen, ist die Substanz für

simultane Nachweise von Schwermetallionen in Mischungen nicht geeignet. Erst nach vorheriger Trennung (z. B. IEC³⁰) ließen sich die Ionen durch CHEF- oder CHEQ-Effekte nachweisen, wobei nach entsprechender Kalibrierung des Systems die Verwendung von BP(OH)₂ auch als Reagenz zur Derivatisierung und zum fluoreszenzspektroskopischen Nachweis der Metallionen Cu²⁺, Co²⁺ und Ni²⁺ ("CHEQ-Metallionen") möglich wäre. Die Vorteile, die sich bei der Ionenchromatographie durch den Einsatz der zeitaufgelösten Fluorometrie bieten würden, ließen sich mit BP(OH)₂ als Derivatisierungsreagenz allerdings nur begrenzt ausnutzen [12]. Ein zusätzlicher, zur Identifizierung der Spezies anwendbarer Parameter, eine ionenspezifische Fluoreszenzlebensdauer eines Komplexes, wäre nur im Fall von Zn²⁺ und Cd²⁺ beobachtbar und könnte dann als zweite, retentionszeitunabhängige Größe zur Identifizierung des Ions herangezogen werden.

Ein Einsatz von BPOH in der fluorometrischen Metallionenanalytik würde sich auf den Bereich der nicht wäßrigen Lösungsmittel beschränken, BPOH könnte hier analog zu BP(OH)₂ vor allem zur Bestimmung der diamagnetischen Übergangsmetallionen eingesetzt werden.

Die beiden *N*-Acylthioharnstoffe APTA und AMBT eignen sich unterschiedlich gut für den Nachweis von Metallionen. APTA könnte als selektiver Fluoreszenzmarker für Cu²⁺-Ionen eingesetzt werden. Bei AMBT beschränken sich potentielle Anwendungen dagegen auf einen Einsatz in der Chromatographie mit Fluoreszenzdetektion, da unterschiedliche Metallionen spektral und zeitlich analytisch nicht hinreichend unterscheidbare Veränderungen im spektroskopischen Verhalten von AMBT hervorrufen.

Von den hier untersuchten FRS mit makrozyklischen Rezeptoren eignet sich vor allem NBO-crown für die Schwermetallionenanalytik. Deutlich unterscheidbare Abklingzeiten der NBO-crown-Meⁿ⁺-Komplexe bei spektral sehr ähnlichem Verhalten lassen NBO-crown besonders für den analytischen Einsatz in der zeitaufgelösten Fluorometrie in Kopplung mit der Chromatographie als geeignet erscheinen. Von den makrozyklischen Cyanin-Styryl-Derivaten dürfte Styryl crown 1 als Fluoreszenzmarker für Ca²⁺ aufgrund des Auftretens einer zweiten Emissionsbande geeignet sein. Die langwellige Absorptionsbande bietet außerdem die Möglichkeit des Einsatzes von preisgünstigen Laserdioden als Anregungslichtquellen für die zeitaufgelöste Fluorometrie.

3.13. Literatur

- [1] Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe v. 05/12/1990 (BGBl. I S. 2612) i. d. j. g. F.
- [2] Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser-, und Schlamm-Untersuchung, VCH, Weinheim (24. Lieferung 1991).

³⁰ IEC = Ion Exchange Chromatography (Ionenaustauschchromatographie)

- [3] M. Zander; "Fluorimetrie", Springer Verlag, Berlin 1981.
- [4] Dickinson, Jr., R. B.; Wehry, E. L. *Anal. Chem.* **51** (1979) 778.
- [5] Perry, M. B.; Wehry, E. L.; Mamantov, G. *Anal. Chem.* **55** (1983) 1893.
- [6] Bright, F. V.; McGown L. B. *Anal. Chem.* **57** (1985) 55.
- [7] Bright, F. V.; McGown, L. B. *Anal. Chem.* **57** (1985) 2877.
- [8] Imasaka, T.; Ishibashi, K.; Ishibashi, N. *Anal. Chim. Acta* **142** (1982) 1.
- [9] Cobb, W. T.; McGown, L. B. *Appl. Spectr.* **43** (1989) 1363.
- [10] Jäger, E.; Lucht, H. *LaborPraxis* **16** (1992) 17.
- [11] Niessner, R.; Panne, U.; Schröder, H. *Anal. Chim. Acta* **255** (1991) 231.
- [12] Resch, U.; Rurack, K.; Senoner, M. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **42** (1994) 504.
- [13] Gesetz über Abgaben für das Einleiten von Abwasser in Gewässer i. d. F. d. Bek. v. 06/11/1990 (BGBl. I S. 2432).
- [14] "Lehrbuch der Ökologischen Chemie", (Hrsg.: F. Korte), Thieme Verlag, Stuttgart 1987.
- [15] W. H. Press, B. P. Flannery, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling, "Numerical Recipes in Pascal - The Art of Scientific Computing", Cambridge University Press, Cambridge, 1989, S. 309.
- [16] W. Fresenius, K. E. Quentin, W. Schneider, "Water Analysis", Springer Verlag, Berlin, 1988, S. 533.
- [17] E. Merian, "Metals and Their Compounds in the Environment", VCH, Weinheim, 1991.
- [18] Lieser, K. H. *GIT Fachz. Lab.* (1992) 293.
- [19] G. G. Guilbault, "Inorganic Substances" in Practical Fluorescence (Hrsg.: G. G. Guilbault), Marcel Dekker Inc., New York, 1990, S. 185.
- [20] A. W. Czarnik, "Supramolecular Chemistry, Fluorescence, and Sensing" in Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition (Hrsg.: A. W. Czarnik), ACS, Washington D. C., 1993, S. 1.
- [21] Hiraki, K.; Morishige, K.; Nishikawa, Y. *Anal. Chim. Acta* **97** (1978) 121.
- [22] Seeger, S.; Bachteler, G.; Drexhage, K. H.; Arden-Jacob, J.; Deltau, G.; Galla, K.; Han, K. T.; Müller, R.; Köllner, M.; Rumphorst, A.; Sauer, M.; Schulz, A.; Wolfrum, J. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **97** (1993) 1542.
- [23] "The Chemistry of the Coordination Compounds", (Hrsg.: J. C. Bailar jr., D. H. Busch), Reinhold Publishing, New York, 1956.
- [24] R. W. Parry, "Chelation and the Theory of Heterocyclic Ring Formation Involving Metal Ions" in The Chemistry of the Coordination Compounds (Hrsg.: J. C. Bailar jr., D. H. Busch), Reinhold Publishing, New York, 1956, S. 221.
- [25] L. F. Lindoy, "Mixed-donor Macrocycles: Solution and Structural Aspects of Their Complexation with Transition and Post-transition Ions" in Cation Binding by Macrocycles (Hrsg.: Y. Inoue, G. W. Gokel), Marcel Dekker Inc., New York, 1990, S. 599.
- [26] G. Schwedt, "Fluorimetrische Analyse", VCH, Weinheim 1981.

- [27] Hoffmann, K.; Stahl, U.; Dähne, S. *Anal. Chim. Acta* **286** (1994) 241.
- [28] Sousa, L. R.; Larson, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977) 307.
- [29] Löhr, H.-G.; Vögtle, F. *Acc. Chem. Res.* **18** (1985) 65.
- [30] Bissell, R. A.; de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Lynch, P. L. M.; Maguire, G. E. M.; Sandanayake, K. R. *A. S. Chem. Soc. Rev.* (1992) 187.
- [31] Czarnik, A. W. *SPIE* **1648** (1992) 164.
- [32] R. A. Bissell, A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, P. L. M. Lynch, G. E. M. Maguire, C. P. McCoy, K. R. A. S. Sandanayake, "Fluorescent PET (Photo-induced Electron Transfer) Sensors" in Photo-induced Electron Transfer V (Top. Curr. Chem.) (Hrsg.: M. J. S. Dewar, J. D. Dunitz, K. Hafner, S. Ito, J.-M. Lehn, K. N. Raymond, C. W. Rees, J. Thiem, F. Vögtle), Springer Verlag, Berlin, **1993**, Bd. 168, S. 223.
- [33] Minta, A.; Tsien, R. Y. *J. Biol. Chem.* **264** (1989) 19449.
- [34] Schuster, M.; Unterreitmaier, E. *Fresenius J. Anal. Chem.* **346** (1993) 630.
- [35] E. L. Wehry, "Effects of Molecular Structure in Fluorescence and Phosphorescence" in Practical Fluorescence (Hrsg.: G. G. Guilbault), Marcel Dekker, Inc., **1990**, S. 75.
- [36] Craven, T. L.; Lytle, F. E. *Anal. Chim. Acta* **107** (1979) 273.
- [37] H.-J. Buschmann, "Thermodynamic and Stereochemical Aspects of the Macrocyclic and Cryptate Effects" in Stereochemical and Stereophysical Behaviour of Macrocycles (Hrsg.: I. Bernal), Elsevier, Amsterdam, **1987**, S. 103.
- [38] Lytle, F. E. *Appl. Spectr.* **24** (1970) 319.
- [39] König, K.-H.; Pletsch, H.-J.; Schuster, M. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **325** (1986) 621.
- [40] Schuster, M. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **40** (1992) 682.
- [41] Douglas, J. B.; Dains, F. B. *J. Am. Chem. Soc.* **56** (1934) 1408.
- [42] Frank, R. L.; Smith, P. V. *Org. Synth. Coll.* **1** (1941) 89.
- [43] Hartmann, H.; Reuther, J. *J. Prakt. Chem.* **315** (1973) 144.
- [44] "Crown Compounds: Toward Future Applications", (Hrsg.: R. S. Cooper), VCH, Weinheim, **1992**.
- [45] B. Dietrich, B. Viout, J.-M. Lehn, "Synthetic Principles" in Macrocyclic Chemistry, VCH, Weinheim, **1993**, S. 3.
- [46] Siegfried, L.; Kaden, T. A. *Helv. Chim. Acta* **67** (1984) 29.
- [47] Gaudry, R. *Can. J. Chem.* **31** (1953) 1060.
- [48] Amundsen, A. R.; Whelan, J.; Bosnich, B. *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977) 6730.
- [49] Rosen, W.; Busch, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **91** (1969) 4694.
- [50] Street, K. W.; jr.; Krause, S. A. *Anal. Lett.* **19** (1986) 735.
- [51] Jonker, S. A.; van Dijk, S. I.; Goubitz, K.; Reiss, C. A.; Schuddeboom, W.; Verhoeven, W. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **183** (1990) 273.
- [52] Dix, J. P.; Vögtle, F. *Chem. Ber.* **113** (1980) 457.
- [53] Fery-Forgues, S.; Le Bris, M.-T.; Guetté, J.-P.; Valeur, B. *J. Phys. Chem.* **92** (1988) 6233.
- [54] Micheloni, M.; Paoletti, P.; Siegfried-Hertli, L.; Kaden, T. A. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1985) 1169.
- [55] Balakrishnan, K. P.; Kaden, T. A.; Siegfried, L.; Zuberbühler, A. D. *Helv. Chim. Acta* **67** (1984) 1060.
- [56] Irving, H.; Mellor, D. H. *J. Chem. Soc.* (1962) 5222.
- [57] Harriman, A. *J. Photochem.* **8** (1978) 205.
- [58] Henry, M. S.; Hoffman, M. Z. *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977) 5201.
- [59] Kotlicka, J.; Grabowski, Z. R. *J. Photochem.* **11** (1979) 413.
- [60] Siemanowski, W.; Witzel, H. *Liebigs Ann. Chem.* (1984) 1731.
- [61] Bulska, H. *J. Lumin.* **39** (1988) 293.
- [62] Eyal, M.; Reinfeld, R.; Chernyak, V.; Kaczmarek, L.; Grabowska, A. *Chem. Phys. Lett.* **176** (1991) 531.
- [63] Grabowska, A.; Kaczmarek, L. *Pol. J. Chem.* **66** (1992) 715.
- [64] Vosburgh, W. C.; Cooper, G. R. *J. Am. Chem. Soc.* **63** (1941) 437.
- [65] Johnston, W. D.; Freiser, H. *Anal. Chim. Acta* **11** (1954) 301.
- [66] Kabrt, L.; Holzbecher, Z. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **41** (1976) 540.
- [67] Bulska, H.; Grabowska, A.; Grabowski, Z. R. *J. Lumin.* **35** (1986) 189.
- [68] Werner, T. C.; Hercules, D. M. *J. Phys. Chem.* **73** (1969) 2005.

4. Analytik von Luminophoren

4.1 Detektierung von seltenerdhaltigen Leuchtstofflampen im Lampenrecyclingprozeß

4.1.1 Problemstellung

Stabförmige Leuchtstofflampen bestehen zu 90 Prozent aus wiederverwertbarem Glas. Weitere Bestandteile sind Metalle (geringe Mengen), Emitter (20 mg), Füllgas (2 mg), Quecksilber (5-20 mg) und Leuchtstoffe (5 g). Die Leuchtstoffe befinden sich als dünne Schicht auf der Innenseite des Glasrohres. Je nach Leuchtstoffart werden die stabförmigen Leuchtstofflampen in Halophosphatlampen und Dreibandlampen unterteilt. In Halophosphatlampen besteht die Leuchtstoffschicht hauptsächlich aus dotiertem Kalziumhalogenphosphat. Die innere Leuchtstoffschicht der Dreibandlampen setzt sich aus drei seltenerdhaltigen Leuchtstoffkomponenten, der Blau-, Grün- und Rotkomponente zusammen. Die Vorteile der Dreibandlampen gegenüber den Halophosphatlampen sind eine wesentlich höhere Lichtausbeute und eine viel bessere Farbwiedergabe. Ein erheblicher Nachteil der Dreibandlampen ist der Anteil an Seltenerdionen (Eu^{3+} , Eu^{2+} , Tb^{3+} und Ce^{3+}) in den drei Leuchtstoffkomponenten und deren hohe Kosten.

Wegen ihres Gehalts an Quecksilber, Antimon und evtl. Cadmium handelt es sich bei nicht mehr funktionsfähigen Leuchtstofflampen um Sondermüll. Im Zuge eines verstärkten Umweltbewußtseins sowie eines sparsamen Umgangs mit teuren Rohstoffen wurden Verfahren zur Aufarbeitung von Leuchtstofflampen entwickelt [1-4]. Von der WEREC GmbH wurde ein Verfahren zur Aufarbeitung von stabförmigen Leuchtstofflampen entwickelt und zur Anwendung gebracht. Dabei werden das Quecksilber sowie die Glas- und Metallbestandteile der Leuchtstofflampen fast vollständig einer Wiederverwertung zugeführt. Aus ökologischer und ökonomischer Sicht ist eine Aufarbeitung der seltenerdhaltigen Leuchtstoffe zur Rückgewinnung der Seltenen Erden notwendig. Voraussetzung für eine wirtschaftliche Aufarbeitung der Seltenerdleuchtstoffe ist ihre Erkennung und die anschließende Separation im Leuchtstofflampenrecyclingprozeß.

Auf Anregung durch die WEREC GmbH ergaben sich daraus folgende Aufgaben im Rahmen des BMFT-Projektes:

- Die Erkennung von seltenerdhaltigen Dreibandlampen unter Anwendung der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie.

Randbedingungen:

- Erkennung während des Recyclings der Lampen
- in der erforderlichen Taktgeschwindigkeit der Anlage von 4000 Messungen/Stunde
- vor dem Öffnen der Lampen, d. h. von außen durch die Glasgefäßwand

- Die Entwicklung der Grundlagen eines Verfahrens und einer Vorrichtung zur Erkennung der seltenerdhaltigen Dreibandlampen während des Recyclingprozesses

4.1.2 Ergebnisse zur Erkennung des Lampentyps

Die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie ist eine geeignete Untersuchungsmethode zur Erkennung seltenerdhaltiger Dreibandlampen im Leuchtstofflampenrecyclingprozeß. Eine Detektierung der charakteristischen Fluoreszenzeigenschaften der Rot- und/oder Grünkomponente gewährleistet die zuverlässige optische Erkennung des Lampentyps.

Der Anteil der Blaukomponente an der seltenerdhaltigen Leuchtstoffmischung ist oft sehr gering oder es erfolgt ihr vollständiger Ersatz durch die blaue Fluoreszenz der Quecksilberentladung. Eine Beimengung der Blaukomponente zur Halophosphatleuchtstoffmischung kann wesentlich die Farbwiedergabeeigenschaften der Halophosphatlampen verbessern und wird deshalb von einigen Lampenherstellern durchgeführt. Der Blaukomponentenanteil an der Halophosphatleuchtstoffmischung ist allerdings so gering, daß eine Wiederverwertung der Seltenen Erden aus diesen Lampen unwirtschaftlich ist. Aus diesen Gründen sollten die Fluoreszenzeigenschaften der Blaukomponente nur in Verbindung mit Eigenschaften der Rot- oder Grünkomponente zur Identifizierung seltenerdhaltiger Dreibandlampen genutzt werden.

Anregungswellenlängen oberhalb von 330 nm gestatten die Anregung der Lampenleuchtstoffschicht durch die Natron-Kalk-Glas-Gefäßwand hindurch. Somit ist die Bestimmung des Lampentyps vor dem Öffnen und Ausblasen der Lampen, d. h. im Recyclingprozeß realisierbar. Wellenlängen von 395 nm und 363 nm ermöglichen eine relativ gute Anregbarkeit der Fluoreszenz der Rot- bzw. Grünkomponente. Zur Detektierung der charakteristischen Fluoreszenzspektren der Rot- und Grünkomponente in Dreibandlampen sind Verzögerungszeiten von 50 μs bis zu 800 μs besonders günstig. In diesem Zeitfenster kann im Gegensatz zu den statischen Fluoreszenzmessungen eine Überlagerung der Fluoreszenzlinien der Rot- und Grünkomponente von den Fluoreszenzbanden der Blaukomponente und des Halophosphatleuchtstoffes nicht auftreten. Das zeigt ein Vergleich des statischen und zeitaufgelösten Fluoreszenzspektrums einer Dreibandlampe in *Abb. 4.1*. Um das schnelle Abklingen der BK-Fluoreszenz gerade noch zu erkennen, wurde ein Zeitbereich von 30 μs bis 50 μs zur Messung des zeitaufgelösten Fluoreszenzspektrums gewählt. Die Abklingzeit der BK-Fluoreszenz wird dabei durch die Abklingzeit der Anregungsquelle verfälscht.

Die Messungen der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren an der Lampenleuchtstoffschicht gestatten eine zuverlässige Detektierung der charakteristischen Fluoreszenzlinien der

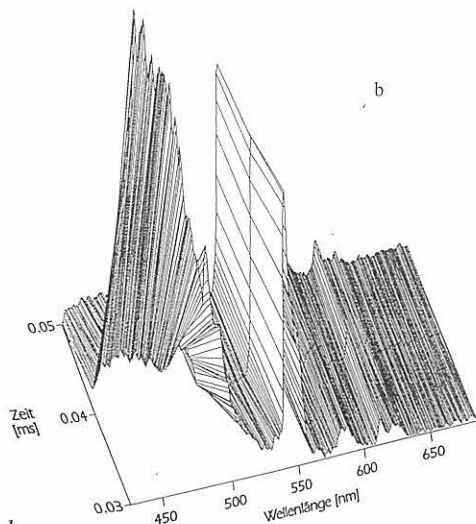
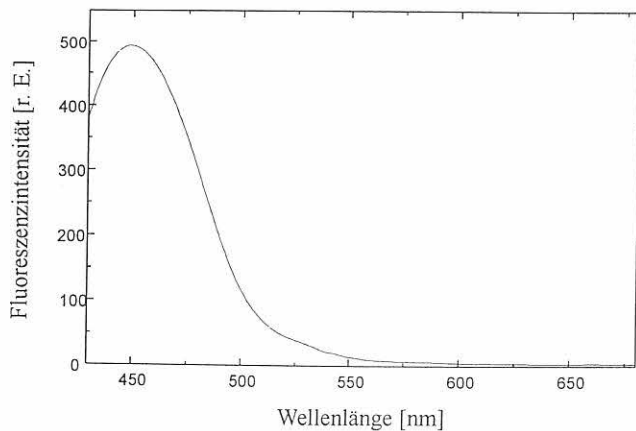
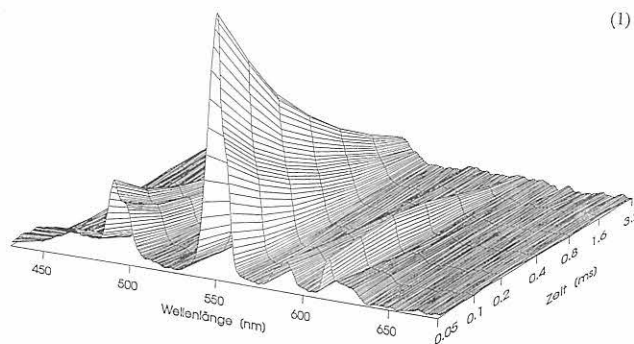


Abb. 4.1
Vergleich der Fluoreszenzspektren einer seltenerdhaltigen Dreibandlampe Anregungswellenlänge: 363 nm; a: statisch; b: zeit aufgelöst, Zeitbereich 30 μ s bis 50 μ s

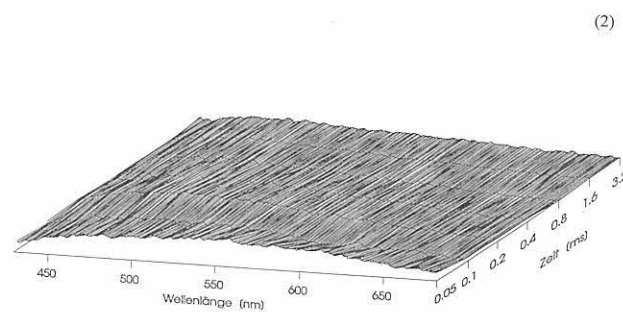
Rot- und/oder Grünkomponente und somit eine Unterscheidung der seltenerdhaltigen Dreibandlampen von den Halophosphatlampen. In Abb. 4.2 sind die Fluoreszenzspektren einer Dreiband- und einer Halophosphatlampe im Zeitbereich von 50 μ s bis 3.2 ms dargestellt. Die Detektierung der charakteristischen Fluoreszenzlinien der Grünkomponente ist unter 363 nm –Anregung möglich (Abb. 4.2a). Bei einer Anregungswellenlänge von 395 nm sind die Fluoreszenzlinien der Rotkomponente zu beobachten (Abb. 4.2b). Zur schnellen Erkennung der Dreibandlampen in der Leuchtstofflampenverwertungsanlage reicht in den meisten Fällen die Messung der Fluoreszenzabklingzeit einer charakteristischen Seltenerdfluoreszenzlinie aus.

Die charakteristische Abklingzeit der Fluoreszenzlinie der Rotkomponente bei 612 nm beträgt 1.0 ms. Der Wert für die Fluoreszenzabklingzeit der Grünkomponente bei 545 nm liegt, je nach Anregungswellenlänge bei 1.9 ms bzw. 2.9 ms.

Die Detektierung der charakteristischen Fluoreszenzabklingzeit der Rot- und/oder Grünkomponente (bei 612 nm bzw. 545 nm) im Bereich von 0.8 ms bis 3.0 ms ermöglicht eine schnelle und in der Taktgeschwindigkeit der Recyclinganlage, d. h. an jeder Lampe, durchführbare Erkennung der seltenerdhaltigen Dreibandlampen. Dabei wird durch die drei Kenngrößen: Anregungswellenlänge,

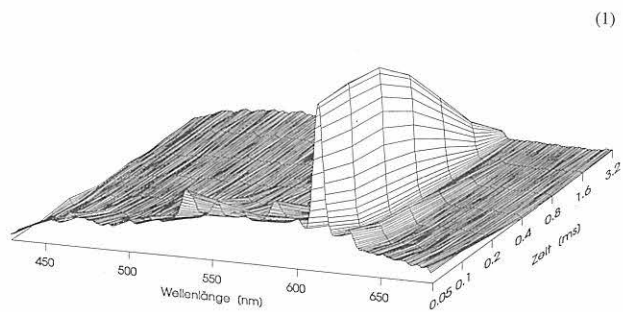


(1)

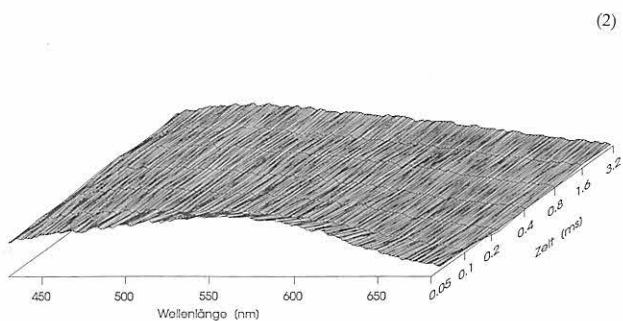


(2)

Abb. 4.2a
Vergleich der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren einer seltenerdhaltigen Dreibandlampe (1) und einer Halophosphatlampe (2) Anregungswellenlänge: 363 nm; Zeitbereich 0.05 ms bis 3.2 ms



(1)



(2)

Abb. 4.2b
Vergleich der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren einer seltenerdhaltigen Dreibandlampe (1) und einer Halophosphatlampe (2) Anregungswellenlänge: 395 nm; Zeitbereich 0.05 ms bis 3.2 ms

Wellenlänge und Kinetik des Fluoreszenzsignals eine hohe Selektivität und Störsicherheit der Erkennungsmethode erreicht.

4.1.3 Grundlagen eines Verfahrens und einer Vorrichtung zur Erkennung der seltenerdhaltigen Dreibandlampen während des Recyclingprozesses

Die Arbeiten zu dieser Thematik wurden von Dipl.-Chem. S. Thiele in Zusammenarbeit mit Dr. U. Stahl durchgeführt. Zunächst wurde im Labormaßstab ein Verfahren zur Identifizierung des Lampentyps entwickelt. Die Erkennung der seltenenerdhaltigen Dreibandlampen wird dabei durch die Detektierung der charakteristischen Fluoreszenzabklingzeit der Rot- und/oder Grünkomponente (RK und GK) ermöglicht.

Fluoreszenzanregung sowie Registrierung des Fluoreszenzsignals erfolgt bei diesem Verfahren von außen durch die Glasgefäßwand unter Anwendung geeigneter Meßparameter (siehe Abschnitt 4.1.2.).

Die Fluoreszenzabklingzeit wird bestimmt, indem die Intensität der Fluoreszenz zu zwei festen Zeitpunkten des Signalverlaufs (für die RK z. B. bei 1 ms und 2 ms) gemessen wird und anschließend der Logarithmus des Quotienten beider Werte ermittelt wird.

Die Meßwerte der Signalintensität der Fluoreszenz und die aus dem zeitlichen Intensitätsverlauf der Fluoreszenz bestimmte Abklingzeit werden mit den vorgegebenen Erwartungswerten für die RK bzw. GK verglichen. Eine Übereinstimmung oder Nichtübereinstimmung der ermittelten Fluoreszenzabklingzeit mit dem Erwartungswert für die RK und GK im Bereich von 0,8 ms bis 3,0 ms wird als Identifizierung bzw. Nichtidentifizierung der RK und/oder GK und somit der seltenerdhaltigen Dreibandlampe angezeigt. Das so bewertete Meßsignal kann als Steuersignal für z. B. die Separation des Seltenerdleuchtstoffes im Lampenrecyclingprozeß genutzt werden.

Die Erkennung des Lampentyps wird im Labormaßstab mit der im Folgenden beschriebenen Vorrichtung durchgeführt. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgt mit einem durchstimmbaren Farbstofflaser (Laserfarbstoff: Furan 2, gepumpt mit einem Stickstofflaser). Die Anregungsstrahlung wird mit einer Linse auf die Leuchtstofflampe fokussiert. Das erzeugte Fluoreszenzsignal gelangt durch eine zweite Linse auf den Eintrittsspalt eines Monochromators und anschließend auf einen Photomultiplier.

Die Auslösung des Meßvorganges und die Signalauswertung erfolgt auf der Basis eines PC-Systems, welches mit einer speziellen Steckkarte ergänzt wurde. Über einen digitalen Ausgang der PC-Steckkarte wird die Strahlungsquelle ausgelöst. Die erfolgte Aussendung des Anregungsimpulses wird über einen digitalen Eingang der PC-Steckkarte registriert und startet die Aufzeichnung der Ausgangsspannung des Photomultipliers. Die Aufzeichnung des Signals mit einem 12-bit-Analog-Digital-Wandler (ADC) ermöglicht eine Wiederholrate von 50 000 Messungen/Sekunde mit 500 Werten im Zeitbereich von 0 ms bis 10 ms. Als ungültig gilt ein Meßsignal wenn die erforderliche

Minimalintensität zur Auswertung nicht erreicht oder die zulässige Maximalintensität überschritten wird. Bei einem gültigen Signal erfolgt die Bestimmung der Fluoreszenzabklingzeit softwaremäßig. Liegt nach dem Vergleich eine Übereinstimmung der ermittelten Abklingzeit mit dem Erwartungswert für die RK bzw. GK vor, wird die Identifizierung der seltenerdhaltigen Dreibandlampe angezeigt. Eine Steuerung von optionalen Prozessen kann in Abhängigkeit vom Identifizierungsergebnis über digitale Ausgänge der PC-Steckkarte realisiert werden.

Eine Variante der oben beschriebenen Prinziplösung ermöglicht die Erkennung der seltenerdhaltigen Dreibandlampen während des Recyclingprozesses einer möglichen Leuchtstofflampenverwertungsanlage. Die dazu notwendige Vorrichtung ist in der Abb. 4.3 dargestellt.

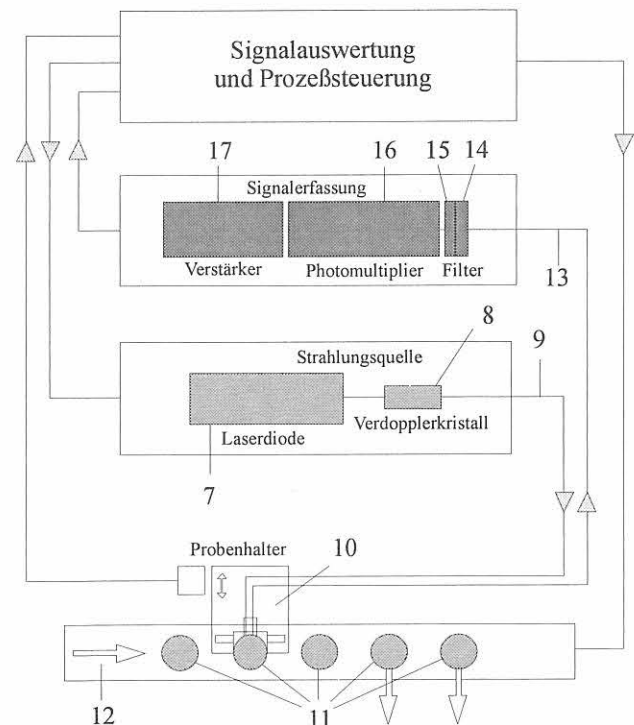


Abb. 4.3
Blockschaltbild einer Vorrichtung zur Erkennung der seltenerdhaltigen Dreibandlampen im Leuchtstofflampenrecyclingprozeß

In der Recyclinganlage erfolgt das Zerlegen der Lampen in der Kappentrennmaschine. Dabei werden die Leuchtstofflampen (11), deren Lampentyp bestimmt werden soll, auf einer Transportkette (12) bewegt. Die Feststellung des Lampentyps zur Abtrennung der Seltenerdleuchtstoffe muß auf der Transportkette, von außen durch die Glasgefäßwand und in der Taktzeit der Anlage von ca. 1,5 s erfolgen.

Zur Erkennung der Dreibandlampen dient die Detektierung der charakteristischen Abklingzeit der RK-Fluoreszenzlinie (bei 612 nm) im Zeitbereich von 0,8 ms bis 1,5 ms. Die Anregung der RK-Fluoreszenz erfolgt mit einer Laserdiode (7). Unter Anwendung eines Verdopplerkristalls (8) zur Frequenzverdopplung kann die benötigte Anregungswellenlänge von 395 nm erzeugt werden. Die Anregungsstrahlung wird in ein Lichtleiterbündel (9) eingekoppelt und erreicht so den Probenhalter (10) und somit die Leuchtstofflampe (11). Das erzeugte Fluoreszenzsignal gelangt

über ein Lichtleiterbündel (13) in die Signalerfassungseinheit. Die Selektion der charakteristischen RK-Fluoreszenzlinie bei 612 nm erfolgt mit einem schmalbandigen Interferenzfilter (14) und einem zusätzlichen IR-Sperrfilter (15). Den Nachweis des Meßsignals ermöglicht ein Photomultiplier (16) und ein nachfolgender Verstärker (17). Anschließend wird das elektrische Signal einer Signalauswertebaugruppe zugeführt. Die Signalauswertung und Prozeßsteuerung erfolgt durch eine Kombination von analogen und digitalen elektronischen Baugruppen.

Die Verwendung von Lichtleitern gestattet eine Unterbringung der Strahlungsquelle, der Signalerfassungs- und der Signalauswerteeinheit in einem kompakten, abgeschlossenen Gehäuse, das sich entfernt vom Probenhalter in bzw. außerhalb der Kappentrennmaschine befinden kann.

Im Rahmen dieses BMFT-Projektes konnte die methodische Grundlage für eine Separation der Seltenerdleuchtstoffe und damit die Möglichkeit einer wirtschaftlichen Aufarbeitung der Seltenen Erden geschaffen werden.

4.2 Grundlagenuntersuchungen am $(Y_{1-x}Eu_x)_2O_3$ - Leuchtstoffsystem

4.2.1 Problemstellung

Für die Leistungsfähigkeit von Leuchtstofflampen sind sowohl hohe Lichtausbeuten als auch gute Farbwiedergabeeigenschaften wesentliche Kriterien. In stabförmigen bzw. kompakten Dreibandleuchtstofflampen lassen sich diese Parameter in günstiger Weise verbinden.

Um das Dreibandprinzip zu verwirklichen, werden Leuchtstoffe benötigt, deren Fluoreszenzmaxima möglichst gut mit den Farbempfindlichkeitsmaxima des menschlichen Auges (465 nm, 545 nm, 610 nm) übereinstimmen. So werden derzeit $(Ce_{1-x}Tb_x)MgAl_{11}O_{19}$ als grünemittierender Leuchtstoff, $(Ba_{1-x}Eu_x)Mg_2Al_{16}O_{27}$ als Blaukomponente und als rotmittierender Leuchtstoff $(Y_{1-x}Eu_x)_2O_3$ verwendet.

Besonders hohe Anforderungen ergeben sich aus dem Dreibandprinzip für die Rotkomponente. Untersuchungen zur Spektrenoptimierung haben ergeben, daß die Fluoreszenzlinie in diesem Fall bei 611 nm liegen und sich durch eine geringe Halbwertsbreite auszeichnen sollte. Die Rotkomponente ist zu 67 Masseprozent an der Dreibandleuchtstoffmischung beteiligt und beeinflusst deshalb die Güte der Dreibandlampe wesentlich. Es gibt daher bereits seit längerer Zeit umfangreiche Untersuchungen zum $(Y_{1-x}Eu_x)_2O_3$ -Leuchtstoffsystem [5-15].

Arbeiten zur Reduzierung des relativ hohen Europiumanteils am $(Y_{1-x}Eu_x)_2O_3$ -Leuchtstoff bei gleichbleibenden oder besseren optischen Eigenschaften sind aus ökonomischen Aspekten von Interesse. Grundlagenuntersuchungen zu Energietransferprozessen im $(Y_{1-x}Eu_x)_2O_3$ -Leuchtstoff tragen zum besseren Verständnis des Gesamtsystems bei und erschließen somit neue Optimierungsmöglichkeiten.

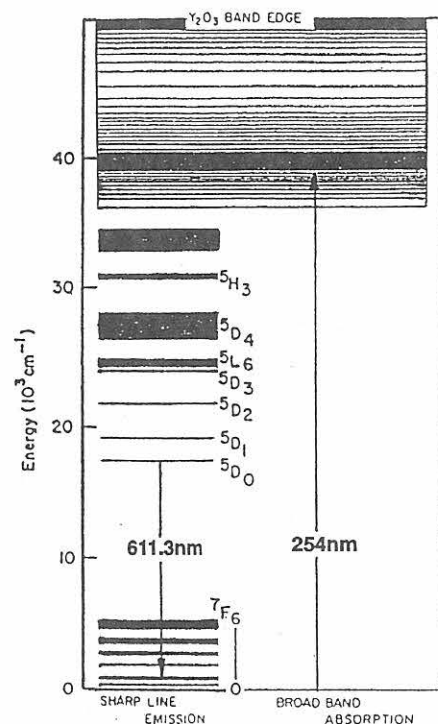


Abb. 4.4

Termschema vom Eu^{3+} -Ion im $(Y_{1-x}Eu_x)_2O_3$ -Leuchtstoff, aus [7].

Bekannt ist der Einfluß der Europiumkonzentration auf die Intensität der 5D_2 -, 5D_1 -, 5D_0 -, 7F_1 -Fluoreszenzübergänge im $(Y_{1-x}Eu_x)_2O_3$ -Leuchtstoff [16,17]. Gut untersucht sind ebenfalls die strahlungslosen Energietransferprozesse zwischen den 5D_2 -, 5D_1 -, 5D_0 -Zuständen in Abhängigkeit von der Aktivatorkonzentration und der Temperatur [18-37]. Nur in geringem Umfang wurden Ergebnisse zur Fluoreszenz und zum strahlungslosen Energietransfer vom 5D_3 - bzw. höher angeregten Zuständen publiziert [38-40].

Interessant ist daher die Untersuchung der Energietransferprozesse zwischen dem Charge-Transfer-Zustand und dem 5D_3 -Zustand (Abb. 4.4) im $(Y_{1-x}Eu_x)_2O_3$ -Leuchtstoffsystem. Bei der Charakterisierung strahlender und nichtstrahlender Prozesse von höher angeregten Zuständen sollte die Konzentrations- und Temperaturabhängigkeit berücksichtigt werden.

4.2.2 Ergebnisse

Für die Messungen stand eine Konzentrationsreihe des $(Y_{1-x}Eu_x)_2O_3$ -Leuchtstoffsystems mit $0.005 > x > 0.015$ zur Verfügung.

a. Statische Fluoreszenzspektren der $(Y_{1-x}Eu_x)_2O_3$ -Leuchtstoffe in Abhängigkeit von der Europiumkonzentration

Eine Änderung der Europiumkonzentration wirkt sich sehr stark auf das Fluoreszenzspektrum des $(Y_{1-x}Eu_x)_2O_3$ -Leuchtstoffes aus. Wie Abb. 4.5 zeigt, steigt die Intensität der Hauptfluoreszenz (5D_0 - 7F_1 -Übergang) im orangefarbenen und roten Spektralbereich (zwischen 575 und 650 nm) bei einer Erhöhung des Europiumgehalts von 0.5 Mol.%

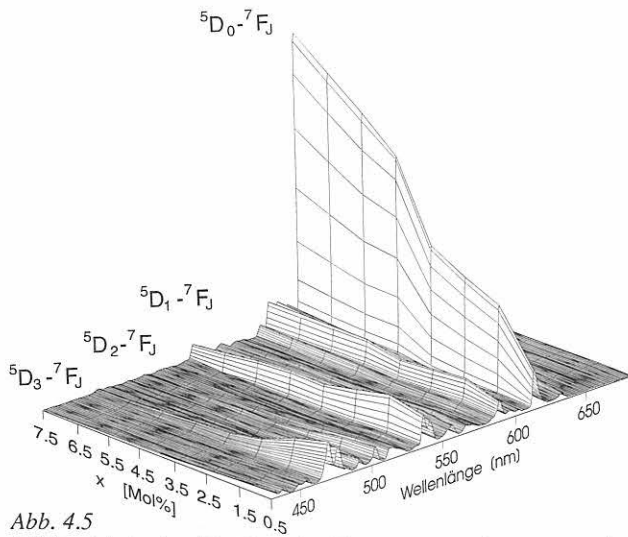


Abb. 4.5
Abhängigkeit des $(Y_{1-x}Eu_x)_2O_3$ -Fluoreszenzspektrums von der Europiumkonzentration, Anregungswellenlänge: 254 nm bei Raumtemperatur

auf 7.5 Mol.% stark an. Im Gegensatz dazu wird die Linien-
gruppe im Gelbgrünen um 550 nm ($^5D_1-^7F_J$ -Übergänge)
immer schwächer. Die 5D_2 -Linien im Grünen und die 5D_3 -
Fluoreszenz im Blauen verschwinden mit zunehmender Euro-
piumkonzentration vollständig.

Je höher angeregt ein Zustand ist, desto ausgeprägter ist
die Konzentrationslöschung. Ursache dafür sind die mit
steigendem Europiumgehalt wachsenden multipolaren
Wechselwirkungen. Diese führen durch den Übergang in
den 5D_0 -Zustand zur strahlungslosen Deaktivierung der 5D_3 -
 5D_2 - und teilweise der 5D_1 -Zustände. Auf Grund der gro-
ßen Energielücke zwischen dem 5D_0 und dem 7F_J -Grund-
zustand findet eine strahlungslose Deaktivierung des 5D_0 -
Zustandes erst bei Europiumkonzentrationen 15 Mol% statt.

**b. Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren der $(Y_{1-x}Eu_x)_2O_3$ -
Leuchtstoffe in Abhängigkeit von der Europiumkonzentration**

Zur Charakterisierung des zeitlichen Intensitätsverlaufes
der verschiedenen Fluoreszenzübergänge wurden die Fluor-
eszenzspektren der Leuchtstoffproben im Zeitbereich von
50 ms bis 3.2 ms gemessen. Die zeitaufgelösten Fluor-
eszenzspektren der untersuchten $(Y_{1-x}Eu_x)_2O_3$ -Leuchtstoffe
mit $0.005 > x < 0.015$ sind in Abb. 4.6 dargestellt. Für ei-
nen besseren Vergleich der Spektren wurde die Maximal-
intensität der Hauptfluoreszenzlinie bei 612 nm auf eine
relative Einheit normiert.

Wie aus Abb. 4.6 (siehe Seite 68) hervorgeht, ist bei einem
geringen Europiumgehalt von 0.5 Mol. % ein langsames
Anklingen der $^5D_0-^7F_J$ -Fluoreszenzübergänge zu beobach-
ten. Das bedeutet, daß eine strahlungslose Deaktivierung
der höher angeregten Zustände nur in geringem Umfang
erfolgt. Die Entleerung der angeregten 5D_3 -, 5D_2 - und 5D_1 -
Zustände erfolgt strahlend. Je höher die Europium-
konzentration wird, um so stärker werden die multipolaren
Wechselwirkungen zwischen den Aktivatorzentren, d.h. die
höher angeregten Zustände werden in immer stärkerem

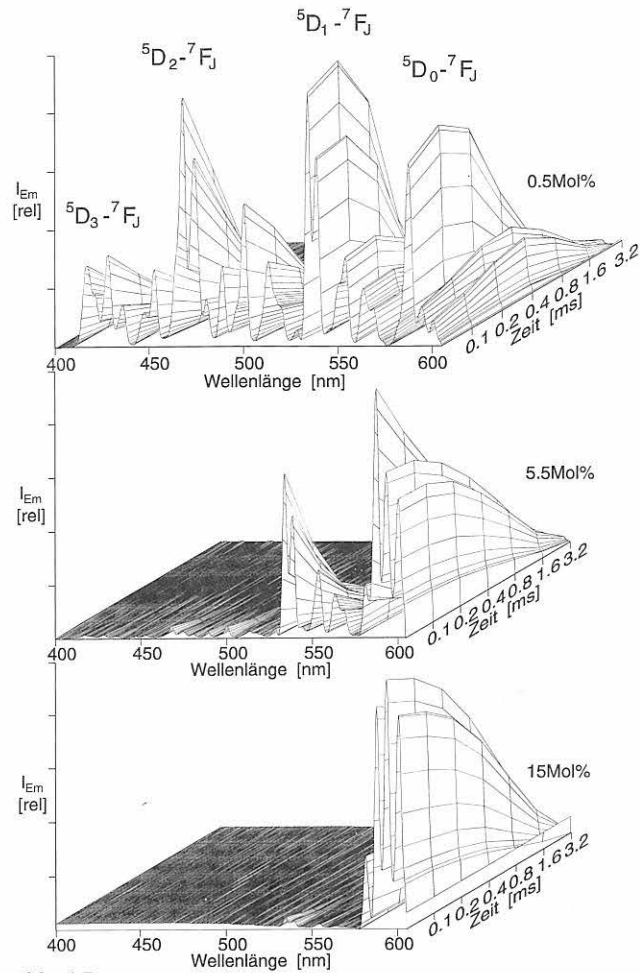


Abb. 4.7
Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren der $(Y_{1-x}Eu_x)_2O_3$ -Leuchtstoff-
proben in Abhängigkeit von der Europiumkonzentration; Anre-
gung: 254 nm, Zeitbereich: 50 μ s bis 3.2 ms, Temperatur: 77 K

Maße strahlungslos deaktiviert. Deshalb nimmt die Inten-
sität und die Abklingzeit der 5D_3 -, 5D_2 - und 5D_1 -Fluoreszenz-
übergänge mit steigender Aktivatorkonzentration drastisch
ab (Abb. 4.7). Die Anklingzeit der $^5D_0-^7F_J$ -Fluoreszenz
wird somit kleiner.

**c. Fluoreszenzlebensdauer der angeregten Zustände im
 $(Y_{1-x}Eu_x)_2O_3$ -Leuchtstoff in Abhängigkeit von der
Europiumkonzentration und der Temperatur**

Zur theoretischen Deutung der Energietransferprozesse
zwischen dem Charge-Transfer-Zustand und dem 5D_3 -Zu-
stand sind die Messungen der Fluoreszenzabklingzeit der
angeregten Zustände notwendig. Aus meßtechnischen
Gründen konnten nur die Fluoreszenzabklingzeiten der 5D_1 -
und 5D_0 -Zustände bestimmt werden. Eine zuverlässige
Messung der Abklingzeit der 5D_2 -, 5D_3 - und 5L_6 - Fluores-
zenz war bisher nicht möglich.

Abb. 4.8 veranschaulicht den Einfluß der Aktivatorkonzent-
ration und der Temperatur auf die Fluoreszenzlebensdauer
der 5D_1 - und 5D_0 -Zustände. Für die Fluoreszenzübergänge
der 5D_0 -Zustände zum 7F_J -Grundzustand läßt sich wegen
der großen Energielücke zwischen den beiden Zuständen
kaum eine Abhängigkeit der Fluoreszenzabklingzeit von
der Europiumkonzentration und der Temperatur feststel-

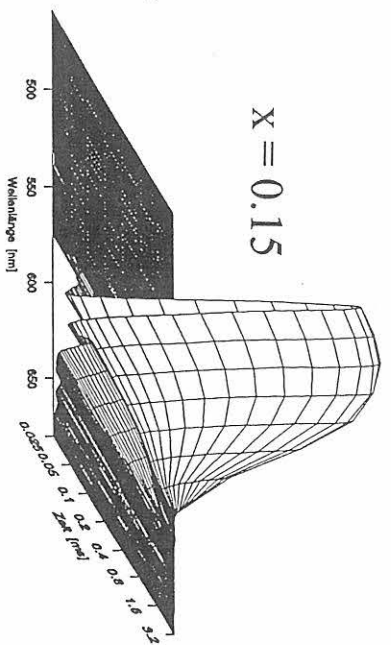
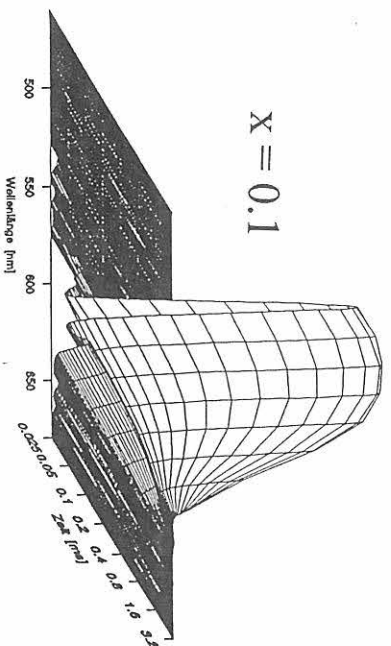
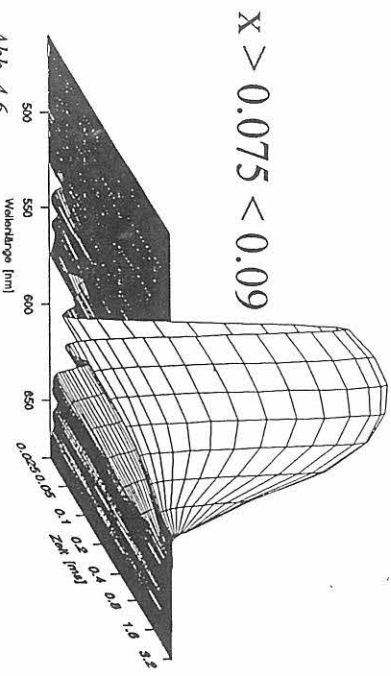
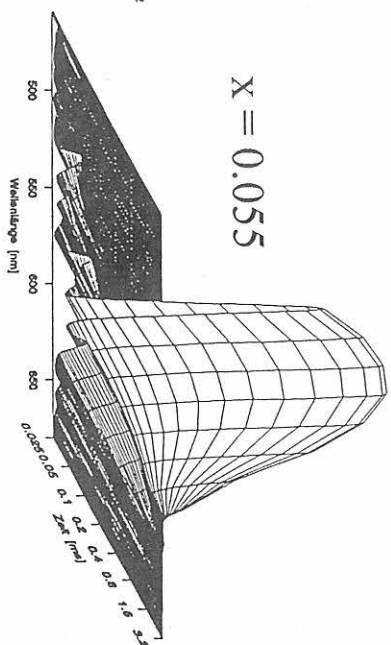
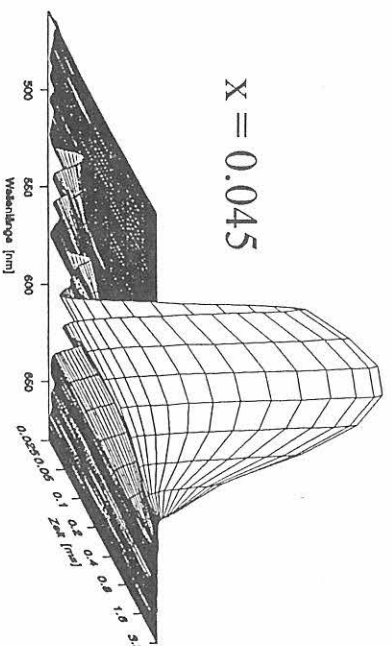
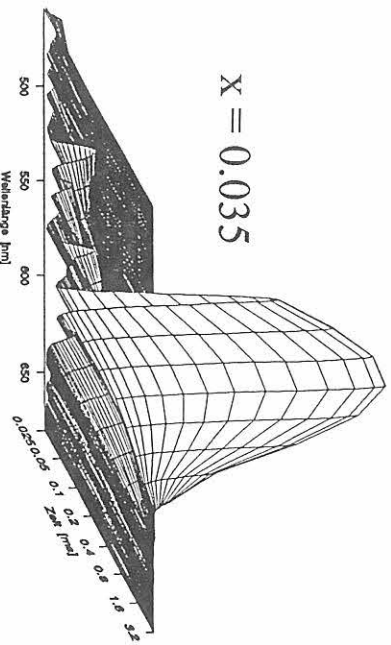
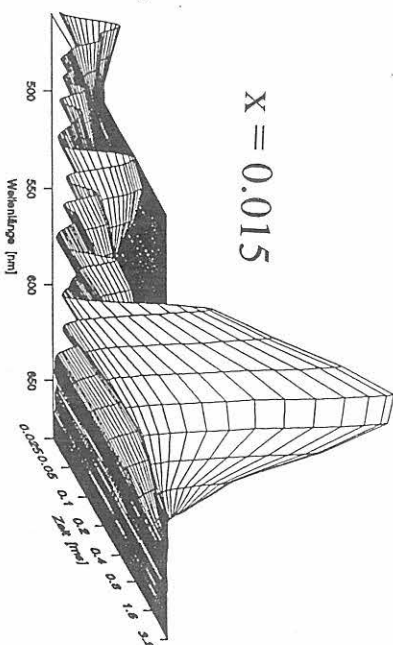
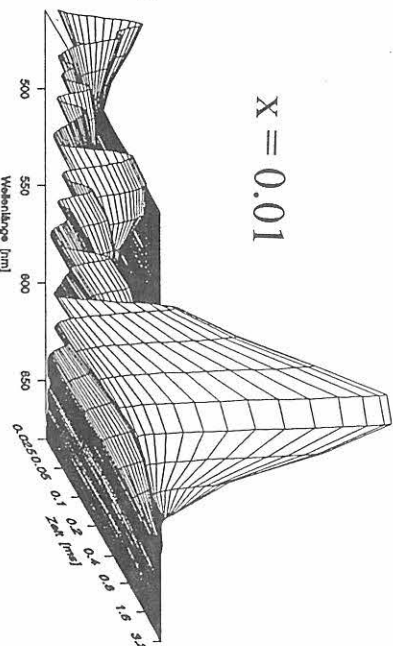
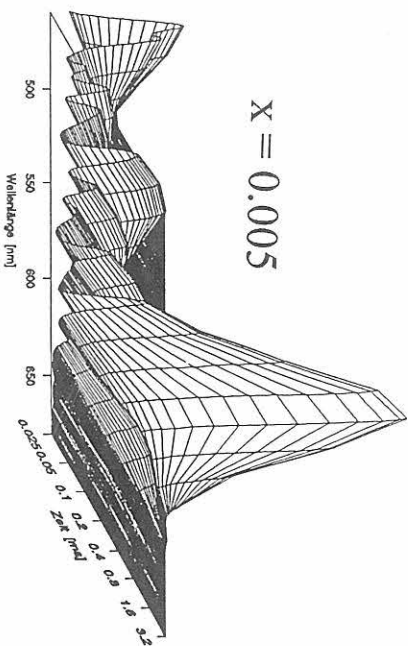


Abb. 4.6
 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren der $(Y_{1-x}Eu_x)_2O_3$ -Leuchtstoffproben, Anregung: 254 nm, Zeitbereich: 50 μs bis 3.2 ms, Temperatur: 77 K

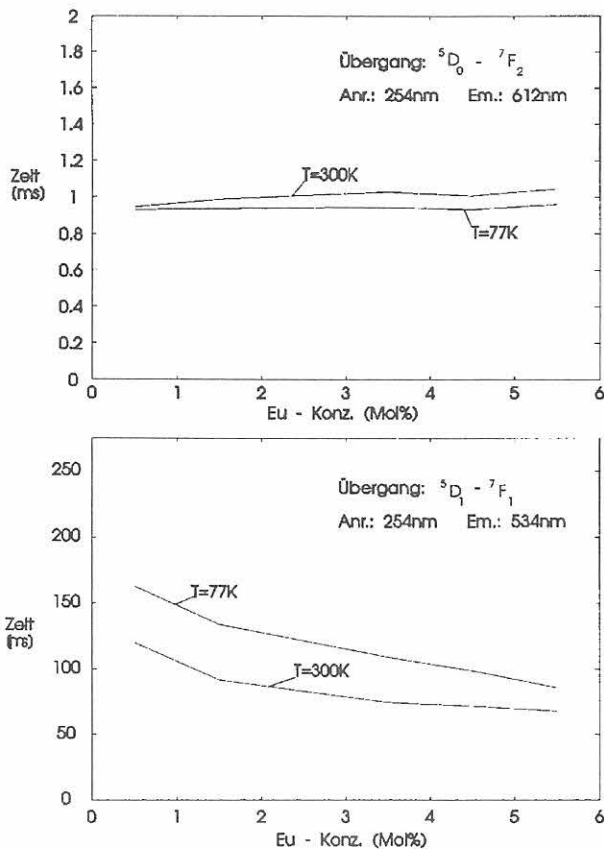


Abb. 4.8
Fluoreszenzlebensdauer der 5D_1 - und 5D_0 -Zustände im $(Y_{1-x}Eu_x)_2O_3$ -Leuchtstoff in Abhängigkeit von der Europiumkonzentration und der Temperatur

len. Im Gegensatz dazu ist die Fluoreszenzabklingzeit der 5D_1 -Zustände im $(Y_{1-x}Eu_x)_2O_3$ -Leuchtstoff relativ stark vom Europiumgehalt und von der Temperatur abhängig. Das Ansteigen der Fluoreszenzlebensdauer mit fallender Temperatur und mit der Verringerung der Europiumkonzentration läßt sich mit der Abnahme der multipolaren Wechselwirkungen zwischen den Aktivatorzentren erklären.

4.3 Literatur

- [1] Kühl, B. *Entsorgungs Praxis* **10** (1989) 484.
- [2] Tiltmann, K. O. *Recycling betrieblicher Abfälle* **1991**, Bd. 2.
- [3] DE-PS 41 25 417; DE-PS 39 32 772; DE-PS 39 09 380; EP-0 298 035; EP-0 248 198; DE-PS 36 10 355; DE-PS 36 18 434; DE-PS 34 12 767
- [4] DE-PS 41 31 974; DE-OS 40 30 732; EP-0 391 382; EP-0 429 690; DE-PS 39 11 395; DE-OS 38 42 888; EP-0 157 249; DE-OS 34 10 989
- [5] Chang, N. C. *J. Appl. Phys.* **34** (1963) 3500.
- [6] Axe, J. D.; Weller, P. F. *J. Chem. Phys.* **40** (1964) 3066.
- [7] Wickersheim, K. H.; Lefever, R. A. *J. Electrochem. Soc.* **111** (1964) 47.
- [8] Forest, H.; Ban, G. *J. Electrochem. Soc. Solid State Science* **116** (1969) 474.
- [9] Forest, H.; Ban, G. *J. Electrochem. Soc. Solid State Science* **118** (1971) 1999.
- [10] Benitez, E. L.; Husk, D. E.; Schnatterly, S. E.; Tarrío, C. *J. Appl. Phys.* **70** (1991) 3256.
- [11] Maestro, P.; Huguenin, D.; Seigneurin, A. *J. Electrochem. Soc.* **139** (1992) 1479.
- [12] Mayolet, A.; Krupa, J. C. *Mat. Chem. Phys.* **31** (1992) 107.
- [13] Mishra, K. C.; Berkowitz, J. K. *Phys. Rev. B* **45** (1992) 10902.
- [14] Van Schaik, W.; Blasse, G. *Chem. Mat.* **4** (1992) 410.
- [15] West, G. A.; Clements, N. S. *J. Lumin.* **54** (1992) 245.
- [16] Ozawa, L.; Forest, H.; Jaffe, P. M. *J. Electrochem. Soc. Sol. St. Scie.* **118** (1971) 482.
- [17] Kummer, F.; Dörr, H. *Mitt. Osram Gesellsch.* **12** (1986) 462.
- [18] Weber, M. *J. Phys. Rev.* **171** (1968) 283.
- [19] Heber, J.; Hellwege, K. H.; Köbler, U.; Murmann, H. *Z. Phys.* **237** (1970) 189.
- [20] Köbler, U. *Z. Phys.* **247** (1971) 289.
- [21] Köbler, U. *Z. Phys.* **250** (1972) 217.
- [22] Elmanharaway, M. S.; Eid, A. H. *Czech. J. Phys. B* **28** (1978) 1165.
- [23] Dexpert-Ghys, J.; Faucher, M. *Phys. Rev. B* **20** (1979) 10.
- [24] Elmanharaway, M. S.; Abdel-Kader, A. *Czech. J. Phys. B* **29** (1979) 460.
- [25] Chang, N. C.; Gruber, J.; Leavitt, R. P.; Morrison, C. A. *J. Chem. Phys.* **76** (1982) 3877.
- [26] Christensen, H. P.; Gabbe, D. R.; Jenssen, H. P. *Phys. Rev. B* **25** (1982) 1467.
- [27] Leavitt, R. P.; Gruber, J.; Chang, N. C.; Morrison, C. *J. Chem. Phys.* **76** (1982) 4775.
- [28] Steinberg, M.; Eyal, A. *Appl. Surface Science* **13** (1982) 367.
- [29] Brixner, L. H.; Chen, H. *J. Electrochem. Soc. Solid State Science* **130** (1983) 2435.
- [30] Morrison, C.; Leavitt, R. P.; Gruber, J.; Chang, N. C. *J. Chem. Phys.* **79** (1983) 4758.
- [31] Su Qiang; Barthou, C.; Denis, J. P.; Pelle, F.; Blanzat, B. *J. Lumin.* **28** (1983) 1.
- [32] Gruber, J.; Leavitt, R. P.; Morrison, C.; Chang, N. C. *J. Chem. Phys.* **82** (1985) 5373.
- [33] Hunt, R. B.; Pappalardo, R. G. *J. Lumin.* **33** (1985) 233.
- [34] Hunt, R. B.; Pappalardo, R. G. *J. Lumin.* **34** (1985) 133.
- [35] Pappalardo, R. G.; Hunt, R. B. *J. Electrochem. Soc. Sol. State Science* **132** (1985) 721.
- [36] Buijs, M.; Meyerink, A.; Blasse, G. *J. Lumin.* **37** (1987) 9.
- [37] Babbitt, W. R.; Lezama, A.; Mossberg, T. W. *Phys. Rev. B Cond. Mat.* **39** (1989) 1987.
- [38] Klaassen, D. B. M.; Van Ham, R. A. M.; Van Rijn, T. G. M. *J. Lumin.* **40/41** (1988) 651.
- [39] Klaassen, D. B. M.; Van Ham, R. A. M.; Van Rijn, T. G. M. *J. Lumin.* **43** (1989) 261.
- [40] Klaassen, D. B. M.; Van Rijn, T. G. M.; Vink, A. J. *Electrochem. Soc.* **136** (1989) 2732.

5. Ergänzende spektroskopische Untersuchungen

5.1 Farbstoffe in Polymermatrix als Referenzmaterialien für die Fluoreszenzkinetik

Im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Physik der Ukrainischen Akademie der Wissenschaften Kiew und eines dreimonatigen Berlin-Aufenthaltes von Frau Dr. Olga Przhonska wurden verschiedene organische Farbstoffe in Polymermatrix auf ihre Eignung als Referenzmaterialien für die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Die Arbeitsgruppe in Kiew besitzt umfangreiche Erfahrungen bei der Synthese von organischen Farbstoffen und deren Einbettung in Polymere. Die Haupttrichtungen der diesbezüglichen Arbeiten sind die Entwicklung von aktiven Lasermedien [1] sowie die Untersuchung der nichtlinearen optischen Eigenschaften von Polymermaterialien [2].

Organische Farbstoffe in Polymermatrix können aber auch als Referenzmaterialien in der Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt werden. Da die Fluoreszenzspektroskopie ein relatives Meßverfahren ist, besitzen Referenzmaterialien eine große Bedeutung. Sie werden zur Kontrolle und Kalibrierung von Anregungs- und Emissionsspektren und bei Fluoreszenzabklingmessungen benötigt [3]. Üblicherweise benutzt man dazu Farbstoffe in organischen Lösungsmitteln. Der Umgang mit diesen Lösungen erfordert eine hohe Sorgfalt sowie erheblichen Arbeitsaufwand, z. B. für die Einwaagen der Farbstoffe mit Mikro-Analysenwaagen. Die Nutzungsdauer derartiger Lösungen ist durch die geringe Stabilität sowohl im Dunkeln als auch im Licht nur eingeschränkt. Festkörper als Referenzmaterialien versprechen eine bessere Handhabung und Photostabilität. Aus diesem Grund wurde die Eignung von verschiedenen Dicarboxyanin-Farbstoffen in Polymermatrix als Abklingzeit-Standards getestet.

Verwendeter Farbstoff mit verschiedenen Resten R (siehe Tab. 5.1):

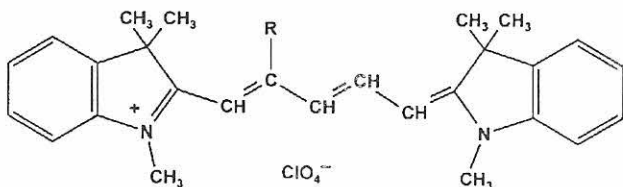


Tabelle 5.1

Übersicht über die Einsatzbedingungen von polymereingebetteten Dicarboxyanin-Farbstoffen als Referenzmaterialien für Fluoreszenzabklingzeiten

Farbstoff Nr.:	Farbstoff mit Rest R	Anregungswellenlänge in nm	Emissionswellenlänge in nm	Fluoreszenzabklingzeit in ns
1	N(CH ₃) ₂	320 - 550	580 - 600	4.52 ± 0.08
2	OCH ₃	500 - 575	615 - 625	3.25 ± 0.06
3	H	525 - 645	660 - 680	2.78 ± 0.02

Zum Verständnis der photophysikalischen Eigenschaften der Farbstoffe wurden systematische Untersuchungen in Lösung (Ethanol) sowie Polymermatrix (Polyurethan Acrylat) bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen (380 - 715 nm), Emissionswellenlängen (520 - 750 nm) und Temperaturen (10 - 295 K) mit den Methoden der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt.

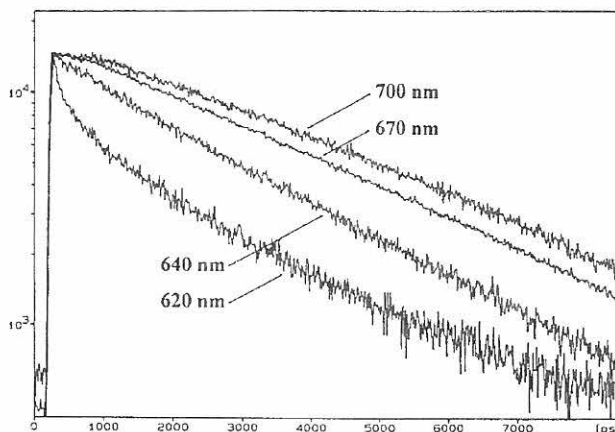


Abb. 5.1

Fluoreszenzabklingkurven des Farbstoffes Nr. 3 (siehe Tab. 5.1) in Polyurethan Acrylat bei Raumtemperatur und bei verschiedenen Emissionswellenlängen von 620 bis 700 nm, Anregung 381 nm

Auf Grund der photophysikalischen und photochemischen Relaxationsprozesse (z. B. cis - trans Isomerisation) der organischen Farbstoffe in der Polymermatrix nach erfolgter optischer Anregung ist die Fluoreszenzkinetik abhängig von der Emissionswellenlänge (siehe Abb. 5.1). Auf Details kann in diesem Rahmen nicht eingegangen werden. In einem begrenzten Bereich der Emissionswellenlänge zeigen die Proben aber ein monoexponentielles Abklingen. Aus diesem Grunde sind diese Proben als einfach zu handhabende und photostabile Referenzsubstanzen für die Fluoreszenzkinetik im unteren Nanosekundenbereich einsetzbar. In Tab. 5.1 sind die konkreten spektroskopischen Bedingungen dafür angegeben.

5.2 Fluoreszenzuntersuchungen an Reinstwasser

Im Abschnitt 2.4 wurde gezeigt, daß die Nachweisgrenzen des Pikosekunden-Laserimpulsfluorometers durch die stö-

rende Fluoreszenz von Verunreinigungen des Lösungsmittels begrenzt werden. Aus diesem Grund wurde die Fluoreszenz von Reinstwasser in Abhängigkeit vom Reinigungsverfahren sowie von der Art und Dauer der Aufbewahrung untersucht. Diese Fragestellungen sind für analytische Anwendungen von großer Wichtigkeit und werden leider oftmals nicht mit ausreichender Sorgfalt untersucht. Die speziellen Erfahrungen mit Reinstwasser sind in ihren Grundzügen auch für andere Lösungsmittel anwendbar. Prinzipiell ähnliche Verunreinigungen wurden auch in organischen Lösungsmitteln, insbesondere in Ethanol nach Lagerung in Polyethylen-Behältern beobachtet.

Es sei darauf hingewiesen, daß es sich bei der im folgenden beschriebenen Effekten um sehr schwache Fluoreszenzen handelt, die in den meisten Fällen der Fluoreszenzspektroskopie unterhalb der Meßgrenze liegen. Die Anfangsintensität der Fluoreszenz von „subboiling“ Wasser nach Entnahme aus dem Glas-Sammelbehälter (Abb. 5.3A) liegt in der Größenordnung der Fluoreszenz von 10^{-9} M Chininsulfat.

Die Fluoreszenzuntersuchungen an Reinstwasser wurden sehr stark von dem Effekt beeinflusst, daß die Fluoreszenz in offenen und auch in geschlossenen Küvetten mit der Zeit stark zunimmt. Dieser Effekt wird ausführlich unter Punkt 5.2.4 beschrieben. Trotzdem können Aussagen zur Reinheit (natürlich nur in Bezug auf fluoreszierende Substanzen) von Wasser aus verschiedenen Anlagen und zum Einfluß von Gefäßmaterial und Lagerungsdauer auf die Reinheit gemacht werden. Alle Messungen wurden am Fluoreszenzspektrometer LS-50B (Perkin Elmer) mit einer Anregungswellenlänge von 215 nm durchgeführt.

5.2.1 Vergleich von „subboiling“-H₂O und „Milli-Q“-H₂O

Reinstwasser aus der „Milli-Q“-Anlage und der „subboiling“-Anlage wurde unter vergleichbaren Bedingungen (ein Tag Aufbewahrung in einem Quarzgefäß, Messung unmittelbar nach dem Einfüllen in eine Quarzküvette, alle Einstellungen am Fluoreszenzspektrometer gleich) untersucht. Abb. 5.2 zeigt, daß die Konzentration fluoreszierender Sub-

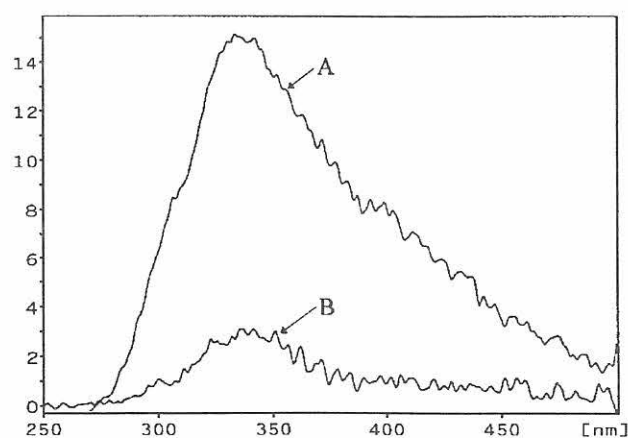


Abb. 5.2
Fluoreszenz von (A) „subboiling“- und (B) „Milli-Q“-Wasser, Anregung 215 nm

stanzen in „subboiling“-Wasser ungefähr fünf mal so groß ist, wie in „Milli-Q“-Wasser. Außerdem unterscheiden sich die Spektren etwas in ihrer Form, was bedeutet, daß sich auch die Zusammensetzung der Verunreinigungen in beiden Wasserarten unterscheidet.

5.2.2 Einfluß des Gefäßmaterials auf die Reinheit von „Milli-Q“-Wasser

„Milli-Q“-Wasser wurde aus der Anlage in Gefäße aus verschiedenen Materialien gefüllt. Nach einem Tag wurde die Fluoreszenz gemessen. Abb. 5.3 zeigt, daß das Wasser aus dem Polystyrolgefäß und das Wasser aus dem Polypropylengefäß eine deutlich höhere Fluoreszenz als das Wasser aus dem Quarzgefäß zeigen. Alle weiteren Untersuchungen wurden mit „Milli-Q“-Wasser aus dem Quarzgefäß durchgeführt.

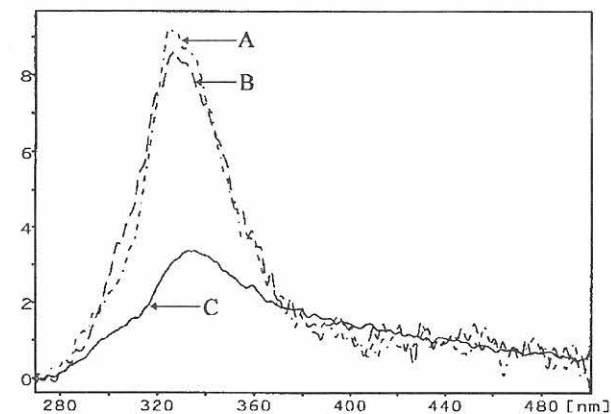


Abb. 5.3
Fluoreszenzspektren von „Milli-Q“-Wasser nach der Entnahme aus verschiedenen Gefäßen (A) Polystyrol, (B) Polypropylen und (C) Quarz

5.2.3 Einfluß der Standzeit im Quarzgefäß auf die Reinheit von „Milli-Q“- und „subboiling“-Wasser

Im folgenden werden Proben verglichen, die zu verschiedenen Zeiten nach dem Füllen aus dem Quarzgefäß in Küvetten umgefüllt und sofort vermessen wurden. Dabei muß beachtet werden, daß außer der Aufbewahrungszeit im Gefäß auch (durch mehrfache Probenentnahme) die Luftmenge im Gefäß zugenommen hat. Tab. 5.2 zeigt, daß für beide Wasserarten die Fluoreszenz mit der Standzeit im Gefäß geringfügig zunimmt. Dabei kann bisher nicht entschieden werden, in wieweit diese Zunahme durch das Eindringen von Luft (die eine wesentliche Rolle bei der Fluoreszenzzunahme spielt, siehe 5.2.4.) in das Gefäß bei der Probenentnahme bestimmt ist. Die Tatsache, daß die Fluoreszenz einer Probe (Messung vom 26.4, Tab. 5.2) aus einem 13 Tage verschlossenen Gefäß höher ist als die einer Probe aus einem anderen Gefäß nach einem Tag (Messung vom 14.5.) beweist noch nicht, daß hier wirklich eine Fluoreszenzzunahme stattgefunden hat. Die erhöhte Fluoreszenz könnte auch durch eine Verschmutzung des Gefäßes bedingt sein, was bei nicht mehrfach mit dem Analyten gespülten Küvetten beobachtet wurde.

Tabelle 5.2

Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Lagerungsdauer von Reinstwasser, * Gefäß 2 wurde zu diesem Zeitpunkt das erste mal geöffnet, Die Werte mit Fehlerangabe resultieren aus vier Messungen, alle anderen Werte basieren auf einer Messung.

Reinstwasser	Gefäß gefüllt am	Probe entnommen am	Maximalwert der Fluoreszenz in a. u.
Milli-Q	22.04.93	23.04.93	2.8
Milli-Q	22.04.93	30.04.93	3.7
Milli-Q	13.05.93, Gefäß 1	14.05.93	3.0 ± 0.2
Milli-Q	13.05.93, Gefäß 1	19.05.93	3.6 ± 0.5
Milli-Q	13.05.93, Gefäß 2	26.05.93 *	5.1 ± 0.4
Subboil	22.04.93	23.04.93	15
Subboil	22.04.93	26.04.93	19
Subboil	22.04.93	30.04.93	24

5.2.4 Einfluß der Standzeit in der Fluoreszenzküvette auf die Reinheit von „Milli-Q“-Wasser

Die im folgenden beschriebenen Effekte (in offenen Küvetten) wurden auch an „subboiling“-Wasser beobachtet, werden aber im folgenden nur für das „Milli-Q“-Wasser, das eine geringere Grundverunreinigung hat (siehe Punkt 5.2.1.), dargestellt. Zunächst wurde in offenen Fluoreszenzküvetten mit ca. 2 ml „Milli-Q“-Wasser eine schnelle Fluoreszenzzunahme auf das zwei- bis dreifache in einer Stunde beobachtet (Abb. 5.4). Daraufhin wurden dampfdichte Küvetten mit Teflonstopfen benutzt. In diesem Fall zeigte sich innerhalb einer Stunde keine signifikante Fluoreszenzerhöhung, was darauf hindeutet, dass die Fluoreszenzzunahme in offenen Küvetten durch einen Eintrag von Substanzen aus der Luft hervorgerufen wird. Bei längeren Standzeiten (mehrere Stunden bis mehrere Tage) wurde aber auch in dampfdichten Küvetten eine Zunahme der Fluoreszenz beobachtet (Abb. 5.4). Dieser Effekt, wenn

auch um den Faktor 2 bis 3 schwächer, wurde auch beobachtet, wenn die dampfdichten Küvetten nicht im Labor sondern in einem Büroraum standen.

Die Fluoreszenzzunahme trat sowohl bei Lagerung im Tageslicht als auch im Dunkeln auf. Die Fluoreszenzzunahme wurde auch nicht durch den Klebstoff der Küvetten verursacht, wie der Fluoreszenzanstieg in ungeklebten offenen Küvetten zeigt – dampfdichte ungeklebte Küvetten standen zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung.

Die Fluoreszenz nahm in verschiedenen Spektralbereichen mit verschiedenen Geschwindigkeiten zu. Dies zeigte sich besonders auffällig bei der offenen Küvette, wo die kurzwellige Fluoreszenz (280-300 nm) zunächst langsamer als die Hauptbande und später schneller als die Hauptbande bei 330 nm anwuchs. Der erstgenannte Effekt ist auch bei der dampfdichten Küvette zu beobachten (s. B in Abb. 5.5), der letztgenannte nicht. Die Folge ist, daß sich die Fluoreszenzspektren von beiden Küvetten in ihrer Form nach neun Tagen Standzeit deutlich unterscheiden (Abb. 5.5).

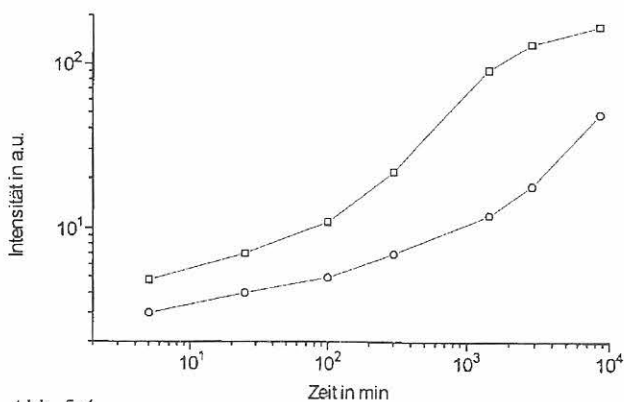


Abb. 5.4 Doppelt-logarithmische Darstellung der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Standzeit einer offenen Küvette (obere Kurve) und einer dampfdichten Küvette mit Teflon-Stopfen (untere Kurve).

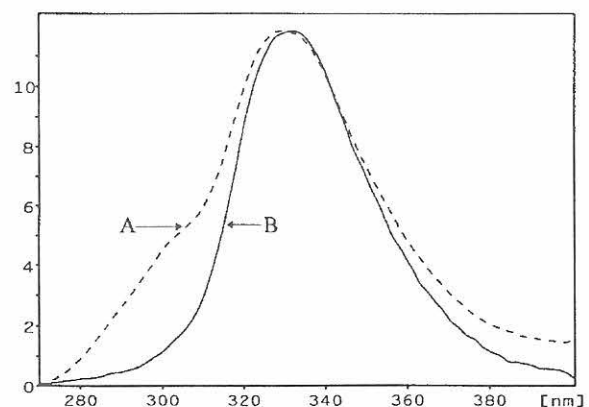


Abb. 5.5 Normierte Fluoreszenzspektren von „Milli-Q“-Wasser nach neun Tagen Standzeit in der Küvette; (A) offene Küvette, (B) dampfdichte Küvette mit Teflonstopfen

Bezüglich des zeitlichen Verlaufs des Fluoreszenzmaximums (330 nm) nimmt die Fluoreszenz zunächst linear mit der Standzeit der Küvette zu und wächst dann sublinear bis zu einem Sättigungswert an. Der lineare Bereich umfaßt bei der offenen Küvette 20 bis 30 h und bei der geschlossenen Küvette ungefähr sechs Tage. Bei der offenen Küvette wurde in einem Fall sogar eine Abnahme der Hauptbande beobachtet, während gleichzeitig die kurzwellige Schulter noch zunahm.

Alle beschriebenen Effekte deuten darauf hin, daß sowohl in offenen als auch in verschlossenen Küvetten verschiedene Substanzen mit verschiedenen Geschwindigkeiten gelöst werden. Für die Handhabung und Untersuchung von Reinstwasser ergeben sich daraus, was die Verunreinigung mit organischen Substanzen betrifft, folgende Konsequenzen:

1. Der Kontakt von Reinstwasser mit der Raumluft (auch in nicht überdurchschnittlich belasteten Räumen wie Büros) führt bereits im Zeitraum weniger Minuten (vielleicht sogar Sekunden) zu einer nachweisbaren Konzentrations-

erhöhung fluoreszierender organischer Substanzen. Ob die von uns direkt nach dem Füllen einer Küvette beobachtete „Grundverschmutzung“ aus der „Milli-Q“-Anlage stammt oder durch das Umfüllen des Wassers im Labor hervorgerufen wird, blieb ungeklärt.

2. Auch mit einem Teflonstopfen verschlossene „dampfdichte“ Küvetten nehmen Substanzen aus der Umgebungsluft auf. Ob diese Aufnahme durch die Öffnung mit dem Teflonstopfen oder die Klebstellen zwischen den einzelnen Wänden der Küvette erfolgt, konnte nicht festgestellt werden.

5.3 Literatur

- [1] Bezrodny, V.; Bondar, M. V.; Kozak, G.; Przhonska, O. V.; Tikhonov, E. *Zh. Prikl. Spektrosk.* **50** (1989) 711.
- [2] Bondar, M. V.; Przhonska, O. V.; Tikhonov, Y. A. *J. Phys. Chem.* **96** (1992) 10831.
- [3] Eaton, D. F. *J. Photochem. Photobiol. B* (1988) **2** 523.

6. Veröffentlichungen

6.1 Vorträge und Poster

- [1] Dähne, S.:
Application of Laser Pulse Spectroscopy.
Institute of Inorganic and Analytical Chemistry,
Hebrew University,
Jerusalem, Israel, 5.5.1993
- [2] Dähne, S.:
Development of Laser Spectroscopy and Applications in Solid State Physics and Chemistry.
Institute of Physics, National Centre for Scientific Research and Technology,
Hanoi, Vietnam, 28.10.93
- [3] Dähne, S.:
Application of Laser Spectroscopy in the Development of Analytical Chemistry of the Federal Institute for Materials Research and Testing.
Branch Division for Materials Testing, Hai Phong, Vietnam, 30.10.93
- [4] Resch, U.:
Redispersible CdS Colloids: New Fluorescence Probes for Both Hydrogen Bonds and Solvent Polarity.
Vth International Meeting on Quantitative Luminescence Spectrometry in Biomedical Sciences, Ghent, Belgium, 25.-27.5.1993
- [5] Resch, U.:
Darstellung, Eigenschaften und Anwendungen von Halbleiterkolloiden.
Kolloquium der BiosQuant GmbH, Berlin 13.7.1993
- [6] Resch, U. und Rurack, K.:
Anwendungen der Laserimpulsfluorometrie in der analytischen Chemie.
Laserverbund Berlin-Brandenburg, Berlin, 30.9.1993
- [7] Resch, U.:
Redispersible CdS Colloids as Fluorescence Probes for Both Hydrogen Bonds and Solvent Polarity.
EUROANALYSIS VIII, Edinburgh, UK, 5.-11.9.1993
- [8] Rurack, K., Resch, U., Dähne S.:
Neue Fluorophor-Rezeptor-Systeme für Schwer- und Übergangsmetallionen.
4. Berliner Optiktage „Optik 1994“, Berlin, 20.09.1994.
- [9] Resch, U. und Rurack, K.:
Applications of Laserimpulsfluorometrie in Analytical Chemistry.
Polish Academy of Science, Warschau, Poland, 3.11.1993
- [10] Rurack, K., Resch, U., Senoner, M. und Dähne, S.:
Changes of the Fluorescence of (2,2'-Bipyridyl)-3,3'-diol as a Function of Both pH and Complexed Metal Ion.
Polish Academy of Science, Warschau, Poland, 3.11.1993
- [11] Rurack, K., Resch, U., Senoner, M. und Dähne, S.:
A New Fluorescence Probe for Trace Metal Ions: Cation Dependent Spectroscopic Properties.
Third Conference on Methods and Application of Fluorescence Spectroscopy,
Prag, Tschechische Republik, 18.10.1993
- [12] Rurack, K., Resch, U., Senoner, M. und Dähne, S.:
Heavy Metal Complexes of 2,2'-Bipyridyl-3,3'-diol.
13. Vortragstagung GDCh-Fachgruppe Photochemie, Berlin, 17.-19.11.1993
- [13] Stahl, U., Hoffmann, K., Dähne, S.:
Time-resolved fluorescence analysis of Me(III)-chelates of 8-hydroxy-5-sulfo-quinoline.
13. Vortragstagung GDCh-Fachgruppe Photochemie, Berlin, 17.11.-19.11. 1993
- [14] Dähne, S., Glismann, A., Lindrum, A., Moll, J.:
Primary Photophysical Processes in J-Aggregates of Spectral Sensitizers.
Proc. of the East-West Symposium III, New Frontiers in Silver Halogenide Imaging, Maui, Hawaii, UAS, 15.11.1993
- [15] Resch, U.:
Anwendungen der zeitaufgelösten Laserimpulsfluorometrie in der Wasseranalytik.
BASF AG, Ludwigshafen, 1.12.1993
- [16] Resch, U.:
Anwendungen der zeitaufgelösten Laserimpulsfluorometrie in der Wasseranalytik.
BAYER AG, Leverkusen, 08.03.1994
- [17] Resch, U.:
Design and Spectroscopic Study of New Fluorescence Probes for Transition and Heavy Metal Ions.
Inst. of Organic Chemistry, Ukrainian Academy of Science,
Kiev, Ukraine, 30.09.94
- [18] Rurack, K., Resch, U.:
New Fluorophore-Receptor-Systems for the Fluorometric Detection of Transition and Heavy Metal Ions in Analytical Chemistry.
Joint Meeting of the French and German Groups of Photochemistry,
Straßburg, Frankreich, 17.09.1994.

6.2 Erfolgte Veröffentlichungen

- [1] Rurack, K., Resch, U., Senoner, M., and Dähne, S.: A New Fluorescence Probe for Trace Metal Ions: Cation Dependent Spectroscopic Properties. *J. Fluorescence* **3** (1993) 141-143
- [2] Moll, J., Lindrum, M., Glismann, A., and Dähne, S.: Energy Migration Phenomena in J-Aggregates. Part I. Fluorescence Lifetime Measurements and Hole-Burning Experiments on J-aggregates of a Benzimidocarbocyanine Dye. *Chem. Phys.* **178** (1993) 423-432
- [3] Marlow, F., Caro, J., Werner, L., Kornatowski, J., and Dähne, S.: Optical Second Harmonic Generation of DMABN Molecules Incorporated in the Molecular Sieve $\text{AlPO}_4\text{-5}$. *J. Phys. Chem.* **97** (1993) 11286-11290
- [4] Resch, U., Rurack, K. und Senoner, M.: Zeitaufgelöste Fluorometrie in der Wasseranalytik. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **42** (1994) 504-506
- [5] Hoffmann, K., Stahl, U., and Dähne, S.: Fluorescence lifetimes of Me(III)-chelates of 8-hydroxy-5-sulpho-quinoline and their modification by the internal heavy atom effect. *Anal. Chim. Acta.* **286** (1994) 241-246
- [6] Rurack, K., Senoner, M., Resch, U., and Dähne, S.: Heavy Metal Complexes of 2,2'-Bipyridyl-3,3'-diol. *J. Inf. Rec. Mats.* **21** (1994) 683-684

6.3 Geplante Veröffentlichungen

- Zu den folgenden Themen sind Publikationen in Vorbereitung:
- Analytik von niedermolekularen Aromaten (BTX) in Wasser (siehe Kap. 3.1.)
 - Neue Fluoreszenzmarker für Schwermetallionen: substituierte *N*-Acylothioharnstoffe (siehe Kap. 3.3.5)
 - Spektroskopische Untersuchungen an Komplexen von 2,2'-Bipyridyl-3,3'-diol mit den Metallionen Zn^{2+} , Cd^{2+} und Cu^{2+} (siehe Kap. 3.5)
 - Synthese, spektroskopische Eigenschaften und Komplexbildungsverhalten von makrozyklischen Cyanin-Styryl-Fluoreszenzmarkern (siehe Kap. 3.10. und 3.11.)
 - Zeitaufgelöste Fluoreszenzuntersuchungen an organischen Farbstoffen in Polymermatrix (siehe Kap. 5.1)

Bisher erschienene Forschungsberichte der BAM

Nr. 1/1968

Forschung und Entwicklung in der Bundesanstalt für Materialprüfung (BAM)
Rechenschaftsbericht für den Bundesminister für Bildung und Wissenschaft

Nr. 2/1970 (vergriffen)

G. Andreae
Zum Problem des Feuchtigkeitsschutzes von Dehnungsmeßstreifen und Halbleitern

Nr. 3/1970

J. Ziebs
Über das mechanische Verhalten von Aluminium-Stahl-Freileitungsseilen als Beispiel für Verbundbauteile

Nr. 4/1970 (vergriffen)

A. Burmester
Formbeständigkeit von Holz gegenüber Feuchtigkeit - Grundlagen und Vergütungsverfahren

Nr. 5/1971

N. Steiner
Die Bedeutung der Netzstellenart und der Netzwerkkettendichte für die Beschreibung der elastischen Eigenschaften und des Abbaus von elastomeren Netzwerken

Nr. 6/1971

P. Schneider
Zur Problematik der Prüfung und Beurteilung des Luftschallschutzes von Bauelementen bei unterschiedlichen Einbaubedingungen

Nr. 7/1971

H.-J. Petrowitz
Chromatographie und chemische Konstitution - Untersuchungen über den Einfluß der Struktur organischer Verbindungen auf das Verhalten bei der Dünnschicht-Chromatographie

Nr. 8/1971

H. Veith
Zum Spannungs-Drehungs-Verhalten von Baustählen bei Wechselbeanspruchung

Nr. 9/1971

K.-H. Möller
Untersuchung über die sichernde Wirkung poröser Massen in Acetylenflaschen

Nr. 10/1972

D. Aurich, E. Martin
Untersuchungen über die Korngrößenbestimmung mit Ultraschall zur Entwicklung einer für die Praxis geeigneten zerstörungsfreien Meßmethode

Nr. 11/1972

H.-J. Krause
Beitrag zur Kenntnis der Schnittriefenbildung und Schnittgütere beim Brennschneiden

Nr. 12/1972

H. Feuerberg
Über Veränderungen von Nylon-6-Fasern beim Texturieren

Nr. 13/1972

K.-H. Habig, K. Kirschke, W.-W. Maennig, H. Tischer
Festkörpergleitreibung und Verschleiß von Eisen, Kobalt, Kupfer, Silber, Magnesium und Aluminium in einem Sauerstoff-Stickstoff-Gemisch zwischen 760 und $2 \cdot 10^{-7}$ Torr

Nr. 14/1972

E. Fischer
Untersuchungen zur Amplitudenabhängigkeit der Ultraschalldämpfung in Metallen bei 20 kHz

Nr. 15/1972

H. Pohl
Studie und Probleme der chemischen Edelmetall-Analyse

Nr. 16/1972

E. Knublauch
Über Ausführung und Aussagefähigkeit des Normbrandversuches nach DIN 4102, Blatt 2, im Hinblick auf die Nachbildung natürlicher Schadenfeuer

Nr. 17/1972

P. Reimers
Aktivierungsanalyse mit schnellen Neutronen, Photonen und geladenen Teilchen

Nr. 18/1973

W. Struck
Das Sprödbruchverhalten des Baustahles R St 37-2 N in geschweißten Konstruktionen, dargestellt mit Hilfe der Methode des Temperaturvergleiches

Nr. 19/1973

K. Kaffanke, H. Czichos
Die Bestimmung von Grenzflächentemperaturen bei tribologischen Vorgängen

Nr. 20/1973

R. Rudolphi
Brandrisiko elektrischer Leitungen und Installationen in Wänden

Nr. 21/1973

D. Klaffke, W. Maennig
Die kontinuumsmechanische Erfassung des zeitlichen Ablaufs der elastisch-plastischen Dehnungen bei der Zerrüttung

Nr. 22/1973

R. Rudolphi, E. Knublauch
Untersuchungen für ein Prüfverfahren zur Bemessung der Brandschutzbekleidung von Stahlstützen

Nr. 23/1973

W. Ruske
Reichs- und preußische Landesanstalten in Berlin. Ihre Entstehung und Entwicklung als außeruniversitäre Forschungsanstalten und Beratungsorgane der politischen Instanzen

Nr. 24/1973

J. Stanke, E. Klement, R. Rudolphi
Das Brandverhalten von Holzstützen unter Druckbeanspruchung

Nr. 25/1973

E. Knublauch
Über das Brandgeschehen vor der Fassade eines brennenden Gebäudes unter besonderer Berücksichtigung der Feuerbeanspruchung von Außenstützen

Nr. 26/1974

P. Jost, P. Reimers, P. Weise
Der Elektronen-Linearbeschleuniger der BAM - Eigenschaften und erste Anwendungen

Nr. 27/1974

H. Wüstenberg
Untersuchungen zum Schallfeld von Winkelprüfköpfen für die Materialprüfung mit Ultraschall

Nr. 28/1974

H. Heinrich
Zum Ablauf von Gasexplosionen in mit Rohrleitungen verbundenen Behältern

Nr. 29/1974

P. Schneider
Theorie der dissipativen Luftschalldämmung bei einem Idealisotropen porösen Material mit starrem Skelet für senkrechten, schrägen und alleseitigen Schalleinfall

Nr. 30/1974 (vergriffen)

H. Czichos, G. Salomon
The Application of Systems Thinking and Systems Analysis to Tribology

Nr. 31/1975

G. Fuhrmann
Untersuchungen zur Klärung des Verhaltens thermoplastischer Kunststoffe bei Wechseldehnungsbeanspruchung

Nr. 32/1975

R. Rudolphi, B. Böttcher
Ein thermo-elektrisches Netzwerkverfahren zur Berechnung stationärer Temperatur- und Wärmestromverteilungen mit Anwendungsbeispielen

Nr. 33/1975

A. Wagner, G. Kieper, R. Rudolphi
Die Bestimmung der Temperaturleitfähigkeit von Baustoffen mit Hilfe eines nicht-stationären Meßverfahrens

Nr. 34/1976 (vergriffen)

H.-J. Deppe
Untersuchungen zur Vergütung von Holzwerkstoff

Nr. 35/1976

E. Limberger
Der Widerstand von Platten, die als Beplankungsmaterial leichter Wände verwendet werden, gegenüber dem Aufprall harter Körper - Vorschlag für ein Prüfverfahren -

Nr. 36/1976 (vergriffen)

J. Hundt
Wärme- und Feuchtigkeitsleitung in Beton unter Einwirkung eines Temperaturgefälles

Nr. 37/1976

W. Struck
Die stoßartige Beanspruchung leichter, nichttragender Bauteile durch einen mit der Schulter gegenprallenden Menschen - Vorschlag für ein Prüfverfahren -

Nr. 38/1976

K.-H. Habig
Verschleißuntersuchungen an gas-, bad- und ionitriertem Stahl 42 CrMo 4

Nr. 39/1976

K. Kirschke, G. Kempf
Untersuchung der viskoelastischen Eigenschaften von Flüssigkeiten (mit Nicht-Newton'schem Fließverhalten) insbesondere bei höherer Scherbeanspruchung

Nr. 40/1976

H. Hantsche
Zum Untergrundabzug bei energiedispersiven Spektren nach verschiedenen Verfahren

Nr. 41/1976

B. Böttcher
Optische Eigenschaften cholesterinischer Flüssigkeiten

Nr. 42/1976

S. Dietlen
Ermittlung der Mindestzündenergie brennbarer Gase in Mischung mit Luft

Nr. 43/1976

W. Struck
Das Sprödbruchverhalten geschweißter Bauteile aus Stahl mit zäh-sprödem Übergang im Bruchverhalten, dargestellt mit Hilfe der Methode des Temperaturvergleiches

Nr. 44/1976

W. Matthees
Berechnung von räumlichen, linear elastischen Systemen, die aus finiten Stab- und Balkenelementen zusammengesetzt sind, unter Verwendung des Programms "Stab-Werk"

- Nr. 45/1976
W. Paatsch
Untersuchung des Elektrodenverhaltens im Vakuum aufgedampfter Metallschichten
- Nr. 46/1977 (vergriffen)
G. Schickert, H. Winkler
Versuchsergebnisse zur Festigkeit und Verformung von Beton bei mehraxialer Druckbeanspruchung
Results of Test Concerning Strength and Strain of Concrete Subjected to Multiaxial Compressive Stresses
- Nr. 47/1977
A. Plank
Bautechnische Einflüsse auf die Tragfähigkeit von Kunststoffdübeln für Fassadenbekleidungen
- Nr. 48/1977
U. Holzlöhner
Setzung von Fundamenten infolge dynamischer Last, angewendet auf die Fundamente einer geplanten Schnellbahn
- Nr. 49/1977
G. Wittig
Untersuchungen zur Anwendung von Mikrowellen in der zerstörungsfreien Prüfung
- Nr. 50/1978 (vergriffen)
N. Czaika, N. Mayer, C. Amberg, G. Magiera, G. Andreae, W. Markowski
Zur Meßtechnik für die Sicherheitsbeurteilung und Überwachung von Spannbeton-Reaktordruckbehältern
- Nr. 51/1978
J. Sickfeld
Auswirkung von chemischen und physikalisch-technologischen Einflußfaktoren auf das Beständigkeitsverhalten von Oberflächenbeschichtungen auf der Basis von Reaktionsbeschichtungsstoffen
- Nr. 52/1978
A. Tomov
Zum Einfluß der Gleitgeschwindigkeit auf das tribologische Verhalten von Werkstoffen hoher Härte bei reiner Festkörperreibung
- Nr. 53/1978
R.-G. Rohrmann, R. Rudolphi
Bemessung und Optimierung beheizbarer Straßen- und Brückenbeläge
- Nr. 54/1978
H. Sander
Magnetisches Verhalten dünner Eisen-schichten bei mechanischer Wechselbeanspruchung
- Nr. 55/1978
D. Klaffke
Beobachtung und Orientierungsbestimmung der Oberflächenkristalle polykristalliner 99,999 %-Al-Proben bei Biegewechselbeanspruchung
- Nr. 56/1979
W. Brünner, C. Langlie
Stabilität von Sandwichbauteilen
- Nr. 57/1979
M. Stadthaus
Untersuchungen an Prüfmitteln für die Magnetpulverprüfung
Investigations on Inspection-Media for Magnetic Particle-Testing
- Nr. 58/1979
W. Struck
Ermittlung des Bauteilwiderstandes aus Versuchsergebnissen bei vereinbartem Sicherheitsniveau
- Nr. 59/1979
G. Plauk
Ermittlung der Verformungen biegebeanspruchter Stahlbetonbalken mit der Methode der Finiten Elemente unter besonderer Berücksichtigung des Verbundes zwischen Beton und Stahl
- Nr. 60/1979
H. Spreckelmeyer, R. Helms, J. Ziebs
Untersuchungen zur Erfassung der Kaltformbarkeit von Feinblechen beim Strecken
- Nr. 61/1979
K. Richter
Beschreibung von Problemen der höheren Farbmetrik mit Hilfe des Gegenfarbensystems
- Nr. 62/1979
W. Gerisch, G. Becker
Geomagnetobiologisch bedingter Zusammenhang zwischen der Fraßaktivität von Termiten und der Zahl der Sterbefälle
- Nr. 63/1979
E. Behrend, J. Ludwig
Untersuchungen an Stopfbuchsen von Ventilen und Schiebern für Gase
- Nr. 64/1980
W. Rücker
Ermittlung der Schwingungserregung beim Betrieb schienengebundener Fahrzeuge in Tunneln sowie Untersuchung des Einflusses einzelner Parameter auf die Ausbreitung von Erschütterungen im Tunnel und dessen Umgebung
- Nr. 65/1980
P. Schmidt, D. Aurich, R. Helms, H. Veith, J. Ziebs
Untersuchungen über den Einfluß des Spannungszustandes auf bruchmechanische Kennwerte
- Nr. 66/1980
M. Hattwig
Auswirkung von Druckentlastungsvorgängen auf die Umgebung
- Nr. 67/1980
W. Matthees
Beitrag zur dynamischen Analyse von vorgespannten und vorbelasteten Feder-Masse-Systemen mit veränderlicher Gliederung unter stoßartiger Beanspruchung
- Nr. 68/1980
D. Petersohn
Oberflächenmeßverfahren unter besonderer Berücksichtigung der Stereomeßtechnik. Entwicklung eines volleuzentrischen Präzisions-Goniometers
- Nr. 69/1980
F. Buchhardt, P. Brandl
Untersuchungen zur Integrität den Liners von Reaktorsicherheitschillen (Containments) in Stahlbeton- und Spannbetonbauweise
- Nr. 70/1980 (vergriffen)
G. Schickert
Schwellenwerte beim Betondruckversuch
- Nr. 71/1980
W. Matthees, G. Magiera
Untersuchungen über durch den Boden gekoppelte dynamische Wechselwirkungen benachbarter Kernkraftwerksbauten großer Masse unter seismischen Einwirkungen
- Nr. 72/1980
R. Rudolphi
Übertragbarkeit der Ergebnisse von Brandprüfungen am Beispiel von Stahl- und Holzstützen
- Nr. 73/1980
P. Wegener
Vergleichende Untersuchungen zum Tragverhalten von Klemmkupplungen für Stahlrohrgerüste nach bestehenden deutschen Prüfvorschriften und geplanten europäischen bzw. internationalen Prüfnormen
- Nr. 74/1980
R. Rudolphi, R. Müller
ALGOL-Computerprogramm zur Berechnung zweidimensionaler instationärer Temperaturverteilungen mit Anwendungen aus dem Brand- und Wärmeschutz
- Nr. 75/1980
H.-J. Heinrich
Beitrag zur Kenntnis des zeitlichen und örtlichen Druckverlaufs bei der plötzlichen Entlastung unter Druck stehender Behälter und Behälterkombinationen
- Nr. 76/1980
D. Klaffke, W.-W. Maennig
Deformationsverhalten von Rein- und Reinstaluminium sowie Cu 99,9 und St 37 bei Biegewechselbeanspruchung im Rasterelektronenmikroskop
- Nr. 77/1981
M. Gierloff, M. Mautzsch
Untersuchung des Verhaltens von Lagerzementen
- Nr. 78/1981
W. Rücker
Dynamische Wechselwirkung eines Schienen-Schwelensystems mit dem Untergrund
- Nr. 79/1981
V. Neumann
Ein Beitrag zur Untersuchung der wasserstoffbeeinflussten Kalttrißeignung höherfester niedriglegierter Feinkornbaustähle mit dem Implantversuch
- Nr. 80/1981
A. Plank, W. Struck, M. Tzschätzsch
Ursachen des Teileinsturzes der Kongreßhalle in Berlin-Tiergarten
- Nr. 81/1981
J. Schmidt
Graphisch-rechnerisches Verfahren zum Erfassen der Zündhäufigkeit zündbarer Stoffe; Anwendung auf Datenmaterial aus dem Bereich der Statistik
- Nr. 82/1982
R. Helms, H.-J. Kühn, S. Ledworuski
Zur werkstoffmechanischen Beurteilung des Kerbschlagbiegeversuches
Assessment of the mechanical behaviour of materials in the notched bar impact test
- Nr. 83/1982
H. Czichos, P. Feinle
Tribologisches Verhalten von thermoplastischen Kunststoffen - Kontaktdeformation, Reibung und Verschleiß, Oberflächenuntersuchungen -
- Nr. 84/1982
R. Müller, R. Rudolphi
Übertragbarkeit der Ergebnisse von Brandprüfungen im Kleinprüfstand (Vergleichsversuche)
- Nr. 85/ISBN 3-88314-231 -X/1982
H. Czichos
Technische Materialforschung und -prüfung - Entwicklungstendenzen und Rahmenvorschläge für ein EG-Programm "Basic Technological Research" Materials Research and Testing - Development Trends and Outline Proposals for a Community Programme "Basic Technological Research" -
- Nr. 86/ISBN 3-88314-232-8/1982
K. Niesel, P. Schimmelwitz
Zur quantitativen Kennzeichnung des Verwitterungsverhaltens von Naturwerksteinen anhand ihrer Gefügemerkmale
- Nr. 87/ISBN 3-88314-240-9/1982
B. Isecke, W. Stichel
Einfluß baupraktischer Umgebungsbedingungen auf das Korrosionsverhalten von Spannstählen vor dem Injizieren

- Nr. 88/ISBN 3-88314-254-9/1983
A. Erhard
Untersuchungen zur Ausbreitung von Longitudinalwellen an Oberflächen bei der Materialprüfung mit Ultraschall
- Nr. 89/ISBN 3-88314-263-8/1983
D. Conrad, S. Dietlen
Untersuchungen zur Zerfallsfähigkeit von Distickstoffoxid
- Nr. 90/ISBN 3-88314-264-6/1983
K. Brandes, E. Limberger, J. Herter
Kinetische Grenztragfähigkeit von stoßartig belasteten Stahlbetonbauteilen
Kinetic Load Bearing Capacity of Impulsively Loaded Reinforced Concrete Members
- Nr. 91/ISBN 3-88314-265-4/1983
M. Weber
Dreidimensionale Analyse von unbewehrtem Beton mit nichtlinear-elastischem Materialgesetz
- Nr. 92/ISBN 3-88314-266-2/1983
L. Auersch
Ausbreitung von Erschütterungen durch den Boden
- Nr. 93/ISBN 3-88314-283-2/1983
P. Studdt
Unterdrückung stick-slip-induzierter Kurvengeräusche schienengebundener Fahrzeuge durch eine physikalisch-chemische Oberflächenbehandlung der Schienen
- Nr. 94/ISBN 3-88314-284-0/1983
Xian-Quan Dong
Untersuchungen der Störschwingungen beim Kerbschlagbiegeversuch und deren Abschwächungen
- Nr. 95/ISBN 3-88314-289-1/1983
M. Römer
Über die Fokussierung des Schallfeldes von Ultraschall-Prüfköpfen mit Fresnelschen Zonenplatten
- Nr. 96/ISBN 3-88314-296-4/1983
H. Eifler
Verbundverhalten zwischen Beton und geripptem Betonstahl sowie sein Einfluß auf inelastische Verformungen biegebeanspruchter Stahlbetonbalken
- Nr. 97/ISBN 3-88314-297-2/1983
G. Fuhrmann, W. Schwarz
Typische Bruchflächenausbildung thermoplastischer Kunststoffe nach wechselnder mechanischer Beanspruchung
- Nr. 98/ISBN 3-88314-312-X/1983
E. Schnabel
Bestimmung des elastischen Verhaltens von Maschenwaren
- Stretch- und Erholungsvermögen -
- Nr. 99/ISBN 3-88314-317-0/1983
K. Brandes, E. Limberger, J. Herter
Kinetische Grenztragfähigkeit von stoßartig belasteten Stahlbetonbauteilen
Kinetic Load Bearing Capacity of Impulsively Loaded Reinforced Concrete Members
- Nr. 100/ISBN 3-88314-298-0/1984
G. Klamrowski, P. Neustupny
Untersuchungen zur Prüfung von Beton auf Frostwiderstand
- Nr. 101/ISBN 3-88314-327-8/1984
P. Reimers, J. Goebbels, H. Heidt, P. Weise, K. Wilding
Röntgen- und Gammastrahlen-Computer-Tomographie
- Nr. 102/ISBN 3-88314-335-9/1984
G. Magiera
Weiterentwicklung des hydraulischen Kompensationsverfahrens auf Druckspannungsmessung in Beton
- Nr. 103/ISBN 3-88314-328-6/1984
D. Schnitger
Radiographie mit Elektronen aus Metallverstärkerfolien
- Nr. 104/ISBN 3-88314-339-1/1984
M. Gierloff
Beeinflussung von Betoneigenschaften durch Zusatz von Kunststoffdispersionen
- Nr. 105/ISBN 3-88314-345-6/1984
B. Schulz-Forberg
Beitrag zum Bremsverhalten energieumwandelnder Aufsetzpuffer in Aufzugsanlagen
- Nr. 106/ISBN 3-88314-360-X/1984
J. Lehner
Setzung von Fundamenten infolge dynamischer Last
- Nr. 107/ISBN 3-88314-361-8/1984
W. Stichel, J. Ehreke
Korrosion von Stahlradiatoren
- Nr. 108/ISBN 3-88314-363-4/1984
L. Auersch
Durch Bodenerschütterungen angeregte Gebäudeschwingungen - Ergebnisse von Modellrechnungen
- Nr. 109/ISBN 3-88314-381-2/1985
M. Omar
Zur Wirkung der Schrumpfbehinderung auf den Schweißspannungszustand und das Spröbruchverhalten von unterpulvergeschweißten Blechen aus St E 460 N
- Nr. 110/ISBN 3-88314-382-0/1985
H. Walde, B. Kropp
Wasserstoff als Energieträger
- Nr. 111/ISBN 3-88314-383-9/1985
K. Ziegler
Über den Einfluß der Initiierung auf die detonative Umsetzung von Anfox-Sprengstoffen unter Berücksichtigung sicherheitstechnischer Gesichtspunkte
- Nr. 112/ISBN 3-88314-409-6/1985
W. Lützw
Zeitstandverhalten und strukturelle Veränderungen von vielfach wiederverarbeiteten Polyethylenen
- Nr. 113/ISBN 3-88314-410-X/1985
R. Helms, H. Henke, G. Oelrich, T. Saito
Untersuchungen zum Frequenzeinfluß auf die Schwingungskorrosion von Offshore-Konstruktionen
- Nr. 114/ISBN 3-88314-419-3/1985
P. Rose, P. Raabe, W. Daum, A. Szameit
Neue Verfahren für die Prüfung von Reaktorkomponenten mittels Röntgen- und Gammastrahlen
- Nr. 115/ISBN 3-88314-420-7/1985
K. Richter
Farbempfindungsmerkmal Elementaruntunton und Buntheitsabstände als Funktion von Farbart und Leuchtdichte von In- und Umfeld
- Nr. 116/ISBN 3-88314-460-6/1985
F.-J. Kasper, R. Müller, R. Rudolphi, A. Wagner
Theoretische Ermittlung des Wärmedurchgangskoeffizienten von Fensterkonstruktionen unter besonderer Berücksichtigung der Rahmenproblematik
- Nr. 117/ISBN 3-88314-468-1/1985
H. Czichos, G. Sievers
Materials Technologies and Techno-Economic Development
A Study for the German Foundation for International Development (Deutsche Stiftung für Internationale Entwicklung)
- Nr. 118/ISBN 3-88314-469-X/1985
H. Treumann, H. Andre, E. Blossfeld, N. Pfeil, M.-M. Zindler
Brand- und Explosionsgefahren explosionsgefährlicher Stoffe bei Herstellung und Lagerung - Modellversuche mit pyrotechnischen Sätzen und Gegenständen
- Nr. 119/ISBN 3-88314-472-X/1985
J. Herter, K. Brandes, E. Limberger
Kinetische Grenztragfähigkeit von stoßartig belasteten Stahlbetonbauteilen
Versuche an Stahlbetonplatten, Teil 1
Kinetic Load Bearing Capacity of Impulsively Loaded Reinforced Concrete Members
Tests on Reinforced Concrete Slabs, Part 1
- Nr. 120/ISBN 3-88314-514-9/1986
A. Hecht
Zerstörungsfreie Korngrößenbestimmung an austenitischen Feinblechen mit Hilfe der Ultraschallrückstreuung
- Nr. 121/ISBN 3-88314-530-0/1986
P. Feinle, K.-H. Habig
Versagenskriterien von Stahlgleitpaarungen unter Mischreibungsbedingungen; Einflüsse von Stahlzusammensetzung und Wärmebehandlung
- Nr. 122/ISBN 3-88314-521-1/1986
J. Mischke
Entsorgung kerntechnischer Anlagen
Sonderkolloquium der Bundesanstalt für Materialprüfung (BAM) am 10. 12. 1985 mit Beiträgen von B. Schulz-Forberg, K. E. Wieser und B. Droste
- Nr. 123/ISBN 3-88314-531-9/1986
D. Rennoch
Physikalisch-chemische Analyse sowie toxische Beurteilung der beim thermischen Zerfall organisch-chemischer Baustoffe entstehenden Brandgase
- Nr. 124/ISBN 3-88314-538-6/1986
H.-M. Thomas
Zur Anwendung des Impuls-Wirbelstromverfahrens in der zerstörungsfreien Materialprüfung
- Nr. 125/ISBN 3-88314-540-8/1986 (vergriffen)
B. Droste, U. Probst
Untersuchungen zur Wirksamkeit der Brandschutzisolation von Flüssiggas-Lagertanks
- Nr. 126/ISBN 3-88314-547-5/1986
W. Stichel
Korrosion und Korrosionsschutz von Metallen in Schwimmhallen
- Nr. 127/ISBN 3-88314-564-5/1986 (vergriffen)
E. Limberger, K. Brandes, J. Herter, K. Berner
Kinetische Grenztragfähigkeit von stoßartig belasteten Stahlbetonbauteilen
Kinetic Load Bearing Capacity of Impulsively Loaded Reinforced Concrete Members
Versuche an Stahlbetonbalken, Teil 1
Tests on Reinforced Concrete Beams, Part 1
- Nr. 128/ISBN 3-88314-568-8/1986 (vergriffen)
E. Limberger, K. Brandes, J. Herter, K. Berner
Kinetische Grenztragfähigkeit von stoßartig belasteten Stahlbetonbauteilen
Kinetic Load Bearing Capacity of Impulsively Loaded Reinforced Concrete Members
Versuche an Stahlbetonbalken, Teil 11
Tests on Reinforced Concrete Beams, Part 11
- Nr. 129/ISBN 3-88314-569-6/1980 (vergriffen)
K. Brandes, E. Limberger, J. Herter, K. Berner
Kinetische Grenztragfähigkeit von stoßartig belasteten Stahlbetonbauteilen
Kinetic Load Bearing Capacity of Reinforced Concrete Members under Impact Load
Zugversuche an Betonstahl mit erhöhter Dehngeschwindigkeit
Reinforcing Steel Tension Tests with high strain rates

- Nr. 130/ISBN 3-88314-570-X/1986
W. Struck
Einfache Abschätzung der Durchbiegung und der Energieaufnahme von Trägern aus duktilem Material
- Nr. 131/ISBN 3-88314-585-8/1986
E. Limberger, K. Brandes, J. Herter
Kinetische Grenztragfähigkeit von stoßartig belasteten Stahlbetonbauteilen
Kinetic Load Bearing Capacity of Reinforced Concrete Members under Impact Load
Versuche an Stahlbetonplatten, Teil 11
Tests on Reinforced Concrete Slabs, Part 11
- Nr. 132/ISBN 3-88314-595-5/1987
Chr. Herold, F.-U. Vogdt
Ermittlung der Ursachen von Schäden an bituminösen Dachabdichtungen unter besonderer Berücksichtigung klimatischer Beanspruchungen
- Nr. 133/ISBN 3-88314-609-9/1987 (vergriffen)
M. Woydt, K.-H. Habig
Technisch-physikalische Grundlagen zum tribologischen Verhalten keramischer Werkstoffe
- Nr. 134/ISBN 3-88314-615-3/1987
G. Andreae, G. Niessen
Über den Kernstrahlungseinfluß auf Dehnungsmeßstreifen
- Nr. 135/ISBN 3-88314-618-8/1987
J. Ludwig, W.-D. Mischke, A. Ulrich
Untersuchungen über das Verhalten von Tankcontainern für unter Druck verflüssigte Gase bei Fallbeanspruchungen
- Nr. 136/ISBN 3-88314-636-6/1987
H.-J. Deppe, K. Schmidt
Untersuchung zur Beurteilung von Brett-schichtverleimungen für den Holzbau
- Nr. 137/ISBN 3-88314-637-4/1987
D. Aurich
Analyse und Weiterentwicklung bruchmechanischer Versagenskonzepte auf der Grundlage von Forschungsergebnissen auf dem Gebiete der Komponentensicherheit
- Nr. 138/ISBN 3-88314-635-8/1987
M. Dogurike, F. Buchhardt
Zur geowissenschaftlichen Einordnung des Gebietes der Bundesrepublik Deutschland und einer sicheren Auslegung technischer Systeme gegen den Lastfall Erdbeben
- Nr. 139/ISBN 3-88314-658-7/1987
J. Olschewski, S.-P. Scholz
Numerische Untersuchung zum Verhalten des Hochtemperaturwerkstoffes Nimonic PE 16 unter monotoner und zyklischer Belastung bei Verwendung verschiedener plastischer und viskoplastischer Materialmodelle
- Nr. 140/ISBN 3-88314-643-9/1987
K. Brandes, E. Limberger, J. Herter
Kinetische Grenztragfähigkeit von stoßartig belasteten Stahlbetonbauteilen
Kinetic Load Bearing Capacity of Impulsively Loaded Reinforced Concrete Members
- Nr. 141/ISBN 3-88314-694-3/1987
F. Buchhardt, W. Matthees, G. Magiera, F. Mathiak
Zum Einfluß des Sicherheits- und Auslegungserdbebens auf die Bemessung von Kernkraftwerken
- Nr. 142/ISBN 3-88314-695-1/1987
H. Treumann, G. Krüger, N. Pfeil, S. von Zahn-Ullmann
Sicherheitstechnische Kenndaten und Gefährzahlen binärer Mischungen aus oxidierenden und verbrennlichen Substanzen
- Nr. 143/ISBN 3-88314-701-X/1987
K. Brandes, E. Limberger, J. Herter
Kinetische Grenztragfähigkeit von stoßartig belasteten Stahlbetonbauteilen
Kinetic Load Bearing Capacity of Impulsively
- Loaded Reinforced Concrete Members**
Experimentelle und numerische Untersuchungen zum Trag- und Verformungsverhalten von Stahlbetonbauteilen bei Stoßbelastung
Experimental and numerical Investigations concerning Load Bearing Behaviour of Reinforced Concrete Members under Impact Load
- Nr. 144/ISBN 3-88314-702-8/1987
F. Buchhardt, G. Magiera, W. Matthees, M. Weber, J. Altes
Nichtlineare dynamische Berechnungen zum Penetrationsverhalten des AVR-Reaktorgebäudes
- Nr. 145/ISBN 3-88314-711-7/1987
U. Holzlöhner
Untersuchung selbstständlicher Systeme zur Bestimmung von Materialeigenschaften von Reibungsböden
- Nr. 146/ISBN 3-88314 714-1/1987
W. Schon, M. Mallon
Untersuchungen zur Wirksamkeit von Wasserberieselungseinrichtungen als Brandschutzmaßnahme für Flüssiggas-Lagertanks
- Nr. 147/ISBN 3-88314-720-6/1987
H.-D. Kleinschrodt
Lösung dynamischer Biege- und Torsionsprobleme von Stabsystemen aus dünnwandigen elastischen Stäben mit offenem Querschnitt mittels frequenzabhängiger Ansatzfunktionen
- Nr. 148/ISBN 3-88314-774-5/1988
W. Müller
Theoretische Untersuchung von Variationsprinzipien für elastoplastisches Materialverhalten sowie Entwicklung und numerische Erprobung von Finite-Element-Verfahren für den ebenen Spannungszustand
- Nr. 149/ISBN 3-88314-775-3/1988
U. Holzlöhner
Bestimmung baugruddynamischer Kenngrößen aus der Untersuchung von Bodenproben
- Nr. 150/ISBN 3-88314-776-1/1988
M. Weber
VG3D Zeichenprogramm für vektorgraphische Darstellung dreidimensionaler Strukturen
- Nr. 151/ISBN 3-88314-785-0/1988
L. Auersch-Saworski
Wechselwirkung starrer und flexibler Strukturen mit dem Baugrund insbesondere bei Anregung durch Bodenerschütterungen
- Nr. 152/ISBN 3-88314-796-6/1988
G. Plauk, G. Kretschmann, R.-G. Rohrmann
Untersuchung des baulichen Zustandes und der Tragfähigkeit vorgespannter Riegel von Verkehrszeichenbrücken der Berliner Stadtautobahn
- Nr. 153/ISBN 3-88314-797-4/1988
H. Sander, W.-W. Maennig
Magnetisches Verhalten von Eisenproben bei mechanischer Wechselbeanspruchung
- Nr. 154/ISBN 3-88314-822-9/1988
K. Breikreutz, P.-J. Uttech, K. Haedecke
Druckgesinterte Stähle als zertifiziertes Referenzmaterial für die Spektrometrie
- Nr. 155/ISBN 3-88314-825-3/1988
L. Auersch
Zur Entstehung und Ausbreitung von Schienenverkehrerschütterungen: Theoretische Untersuchungen und Messungen am Hochgeschwindigkeitszug Intercity Experimental
- Nr. 156/ISBN 3-88314-887-3/1989
G. Klamrowski, P. Neustupny, H.-J. Deppe, K. Schmidt, J. Hundt
Untersuchungen zur Dauerhaftigkeit von Faserzementen
- Nr. 157/ISBN 3-88314-888-1/1989
E. Limberger, K. Brandes
Versuche zum Verhalten von Stahlbetonbalken mit Übergreifungsstößen der Zugbewehrung unter stoßartiger Belastung
- Nr. 158/ISBN 3-88314-889-X/1989
R. Wäsche, K.-H. Habig
Physikalisch-chemische Grundlagen der Feststoffschmierung - Literaturübersicht
- Nr. 159/ISBN 3-88314-890-3/1989
R. Müller, R. Rudolphi
Berechnung des Wärmedurchlaßwiderstandes und der Temperaturverteilung im Querschnitt von Hausschornsteinen nach DIN 18160, Teil 6
- Nr. 160/ISBN 3-88314-917-9/1989
W. Matthees
Entwicklung eines Makroelementes durch Kondensation am Beispiel der Lastfälle Flugzeugabsturz und Erdbeben bei Boden-Bauwerk-Wechselwirkung mit biegeweichen Fundamenten
- Nr. 161/ISBN 3-88314-920-9/1989
G. Mellmann, M. Maultzsch
Untersuchung zur Ermittlung der Biegefestigkeit von Flachglas für bauliche Anlagen
- Nr. 162/ISBN 3-88314-921-7/1989
W. Brünner
Untersuchungen zur Tragfähigkeit großer Glasscheiben
- Nr. 163/ISBN 3-88314-922-5/1989
W. Brünner, G. Mellmann, W. Struck
Biegefestigkeit und Tragfähigkeit von Scheiben aus Flachglas für bauliche Anlagen
- Nr. 164/ISBN 3-88314-934-9/1989
R. Helms, B. Jaenicke, H. Wolter, C.-P. Bork
Zur Schwingfestigkeit großer geschweißter Stahlträger
- Nr. 165/ISBN 3-88314-935-7/1989
P. Göbel, L. Meckel, W. Schiller
Untersuchung zur Erarbeitung von Kennwerten bei Einrichtungsmaterialien (Holzwerkstoffen, Möbeln und Textilien) hinsichtlich der Formaldehyd-Emission - Teil B: Textilien
- Nr. 166/ISBN 3-88314-936-5/1989
K. Breikreutz
Modelle für Stereologische Analysen
- Nr. 167/ISBN 3-88314-937-3/1989
A. Mitakidis, W. Rücker
Erschütterungsausbreitung im elastischen Halbraum bei transienten Belastungsvorgängen
- Nr. 168/ISBN 3-88314-958-6/1990
F.-J. Kasper, R. Müller, R. Rudolphi
Numerische Untersuchung geometriebedingter Wärmebrücken (Winkel und Ecken) unter Einsatz hochauflösender Farbgraphik bei Berücksichtigung der Tauwasserproblematik und des Mindestluftwechsels
- Nr. 169/ISBN 3-88314-959-4/1990
Chr. Kohl, W. Rucker
Integration der Untergruiddynamik in das Programmsystem MEDYNA, dargestellt am Beispiel des Intercity Experimental (ICE)
- Nr. 170/ISBN 3-88314-960-8/1990
P. Studt, W. Kerner, Tin Win
Untersuchung der mikrobiologischen Schädigung wassergemischter Kühlschmierstoffe mit dem Ziel der Verbesserung der Arbeitshygiene, der Minderung der Geruchsbelastung und der Menge zu entsorgender Emulsionen
- Nr. 171/ISBN 3-88314-997-7/1990
F. Buchhardt
Ein Operator zur Koppelung beliebig benachbarter dynamischer Systeme am Beispiel der Boden-Bauwerk-Wechselwirkung

- Nr. 172/ISBN 3-88314-998-5/1990
J. Vielhaber, G. Plauk
Grenztragfähigkeit großer Verbundprofilstützen
- Nr. 173/ISBN 3-88314-999-3/1990
B. Droste, J. Ludwig, B. Schulz-Forberg
Höherwertige Transporttechnik und ihre Konsequenzen für die Beförderung gefährlicher Güter
- Nr. 174/ISBN 3-88429-021-8/1990
D. Aurich
Analyse und Weiterentwicklung bruchmechanischer Versagenskonzepte
- Nr. 175/ISBN 3-88429-022-6/1990
W. Brocks, D. Klingbeil, J. Olschewski
Lösung der HRR-Feld-Gleichungen der elastisch-plastischen Bruchmechanik
- Nr. 176/ISBN 3-88429-035-6/1990
W. Matthees, G. Magiera
Iterative Dekonvolution der seismischen Basiserregung für den Zeitraum
- Nr. 177/ISBN 3-89429-090-0/1991
G. Schickert, M. Krause, H. Wiggenhauser
Studie zur Anwendung zerstörungsfreier Prüfverfahren bei Ingenieurbauwerken
- Nr. 178/ISBN 3-89429-429-9/1991
G. Andreae, J. Knapp, G. Niessen
Entwicklung und Untersuchung eines kapazitiven Hochtemperatur-Dehnungsaufnehmers für Einsatztemperaturen bis ca. 1000 °C
- Nr. 179/ISBN 3-89429-100-1/1991
H. Eifler
Die Drehfähigkeit plastischer Gelenke in Stahlbeton-Plattenbalken, bewehrt mit naturhartem Betonstahl BSt 500 S im Bereich negativer Biegemomente
- Nr. 180/ISBN 3-89429-101-X/1991
E. Klement, G. Wieser
Zur numerischen Übertragbarkeit von Prüfungsergebnissen an Hausschornsteinen auf Schornsteine mit anderen lichten Querschnitten
- Nr. 181/ISBN 3-89429-105-2/1991
H. Czichos, R. Helms, J. Lexow
Industrial and Materials Technologies Research and Development Trends and Needs
- Nr. 182/ISBN 3-89429-145-1/1992
M. Weber
Bestimmung von Wärmeübergangskoeffizienten im Bereich geometriebedingter Wärmebrücken
- Nr. 183/ISBN 3-89429-163-X/1992
F. Buchhardt
Zur Dekonvolution im Zeitbereich
- Nr. 184/ISBN 3-89429-164-8/1992
M. Maultzsch, W. Stichel, E.-M. Vater
Feldversuche zur Einwirkung von Auftaumitteln auf Verkehrsbauwerke (im Rahmen des Großversuchs "Umweltfreundlicheres Streusalz")
- Nr. 185/ISBN 3-89429-165-6/1992
Renate Müller
Ein numerisches Verfahren zur simultanen Bestimmung thermischer Stoffeigenschaften oder Größen aus Versuchen Anwendung auf das Heißdraht-Parallelverfahren und auf Versuche an Hausschornsteinen
- Nr. 186/ISBN 3-89429-211-3/1992
B. Löffelbein, M. Woydt, K.-H. Habig
Reibungs- und Verschleißuntersuchungen an Gleitpaarungen aus Ingenieurkeramischen Werkstoffen in wässrigen Lösungen
- Nr. 187/ISBN 3-89429-216-4/1992
Th. Schneider, E. Santner
Mikrotribologie: Stand der Forschung und Anwendungsmöglichkeiten. Literaturübersicht
- Nr. 188/ISBN 3-89429-243-1/1992
K. Mallwitz
Verfahren zur Vorausermittlung der Setzung von Fundamenten auf geständerten Strecken infolge zyklischer Beanspruchung
- Nr. 189/ISBN 3-89429-244-X/1992
W. Matthees, G. Magiera
Impedanzeigenschaften von Finiten Elementen Modellen bei Integration im Zeitraum
- Nr. 190/ISBN 3-89429-245-8/1992
G. Zachariev
Untersuchung des Versagens thermoplastischer Kunststoffe im Kurzzeit-Zugversuch und Retardations-Zugversuch
- Nr. 191/ISBN 3-89429-246-6/1992
H.-M. Bock, S. Erbay, J. With
Kritische Stahitemperatur als charakteristischer Kennwert für die Feuerwiderstandsdauer von Bauwerkssystemen aus Stahl
- Nr. 192/ISBN 3-89429-329-2/1993
D. Aurich
Analyse und Weiterentwicklung bruchmechanischer Versagenskonzepte; Lokales Rißwachstum, Ermittlung des Rißwiderstandsverhaltens aus der Kerbschlagarbeit
- Nr. 193/3-89429-291-1/1993
W. Gerisch, Th. Fritz, S. Steinborn
Statistical Consulting in the Frame of VAMAS. The Role of the Technical Working Arfea/Advisory Group. Statistical Techniques for Interlaboratory Studies and Related Projects (VAMAS Report No. 13)
- Nr. 194/ISBN 3-89429-330-6/1993
U. Krause
Ein Beitrag zur mathematischen Modellierung des Ablaufs von Explosionen
- Nr. 195/ISBN 3-89429-331-4/1993
U. Schmidtchen, G. Würsig
Lagerung und Seetransport großer Mengen flüssigen Wasserstoffs am Beispiel des "Euro-Québec Hydro-Hydrogen Pilot Projekts. Überblick über die in Deutschland anzuwendenden Gesetze, Verordnungen und technischen Regeln
- Nr. 196/ISBN 3-89429-362-4/1993
D. Lietze
Untersuchungen über das Anlaufen von Detonationen im Innern geschlossener Systeme
- Nr. 197/ISBN 3-89429-400-0/1993
A. Skopp
Tribologisches Verhalten von Siliziumnitridwerkstoffen bei Festkörpergleitreibung zwischen 22 °C und 1000 °C
- Nr. 198/ISBN 3-89429-421-3/1994
St. Meretz
Ein Beitrag zur Mikromechanik der Interphase in polymeren Faserverbundwerkstoffen
- Nr. 199/ISBN 3-89429-422-1/1994
W. F. Rücker, S. Said
Erschütterungsübertragung zwischen U-Bahntunneln und dicht benachbarten Gebäuden
- Nr. 200/ISBN 3-89429-423-X/1994
D. Arndt, K. Borchardt, P. Croy, E. Geyer, J. Henschen, C. Maierhofer, M. Niedack-Nad, M. Rudolph, D. Schaurich, F. Weise, H. Wiggenhauser
Anwendung und Kombination zerstörungsfreier Prüfverfahren zur Bestimmung der Mauerwerksfeuchte im Deutschen Dom
- Nr. 201/ISBN 3-89429-475-2/1994
U. Holzlöhner, H. August, T. Meggyes, M. Brune
Deponieabdichtungssysteme; Statusbericht
- Nr. 202/ISBN 3-89429-481-7/1994
J. Schmidt
Über eine Verteilungsfunktion mit Parametern für Median, Spannweite, Schiefe und Wölbung; Konzept und Anwendung
- Nr. 203/ISBN 3-89429-483-3/1994
B. Schulz-Forberg, J. Ludwig
Sicherheitsniveaus von Transporttanks für Gefährgut
- Nr. 204/ISBN 3-89429-484-1/1994
W. Struck, E. Limberger
Der Glaskugelsack als Prüfkörper für Beanspruchungen durch weichen Stoß - eine erweiterte Modellvorstellung
- Nr. 205/ISBN 3-89429-516-3/1995
P. Rose
Bestimmung charakteristischer Fehlermerkmale zur rechnergestützten Bildauswertung von Schweißnahtradiographien
- Nr. 206/ISBN 3-89429-517-1/1995
D. Lietze
Grenze der Flammendurchschlagsicherheit von Speerschichten aus Bandsicherungen bei Deflagrationen und bei einem Nachbrand
- Nr. 207/ISBN 3-89429-593-7/1995
W. Daum
Zur objektiven Beurteilung der Bildqualität industrieller Radioskopiesysteme
- Nr. 208/ISBN 3-89429-557-0/1995
G. Kalinka
Ein Beitrag zur Kristallisation gefüllter und ungefüllter Thermoplaste
- Nr. 209/ISBN 3-89429-594-5/1995
D. Hoffmann, K. Niesel
Zur Quantifizierung des Effekts von Luftverunreinigungen auf Putzmörtel
- Nr. 210/ISBN 3-89429-595-3/1995
F. Buchhardt, W. Matthees, G. Magiera
Zur Erfassung der hysteretischen Dämpfung im Zeitraum
- Nr. 211/ISBN 3-89429-973-8
G. Meier zu Köcker, K.-H. Habig
Steigerung der Lebensdauer und der Prozeßsicherheit durch beschichtungsgerechte Fertigung von Werkzeugen und Bauteilen
- Nr. 212/ISBN 3-89429-974-6
S. Dähne
Analytische Grundlagenuntersuchungen zur Laserimpulsfluorometrie im ultravioletten Spektralbereich

**Bundesanstalt für
Materialforschung und -prüfung (BAM)**

**Federal Institute for
Material Research and Testing**

**Institut Fédéral pour la
Recherche et l'Essai des Matériaux**

Unter den Eichen 87
D-12205 Berlin
☒ D-12200 Berlin

Telefon (0 30) 81 04-0
Telefax (0 30) 8 11 20 29
Telex 1 83 261 bamb d

- *Berichte*
- *Gutachten*
- *Zulassungen*
- *Zertifikate*
- *Tagungspapiere*
- *Prüfungszeugnisse*
- *Prüfstellenanerkennungen*



ISSN 0938-5533
ISBN 3-89429-974-6