



# Quantifizierung von Fluoreszenzmessungen im aquatischen Milieu

Diplomarbeit

Vorgelegt von: cand.-ing. Charlotte Goletz  
Studiengang, Jahrgang: Abfallwirtschaft und Altlasten, 2004  
Matrikel-Nr.: 3117820  
Einzureichen bis: 31. Dezember 2009

Betreuer: Dr. rer. nat. Wido Schmidt  
Dr. rer. nat. Heike Petzoldt

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. Peter Werner





## Aufgabenstellung für die Diplomarbeit



Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c.  
**Peter Werner**  
Professur für Grundwasser- und  
Bodensanierung

**Diplomand/in:** **Charlotte Goletz** **geb.: 27.07.1985**

**Thema:** **Quantifizierung von Fluoreszenzmessungen im aquatischen Milieu**

**Zielstellung:** Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie ist ein neues Verfahren zur Charakterisierung des aquatischen DOC. Diese Methode nutzt die Tatsache, dass in nahezu jeder natürlichen DOC-Fraktion und einer Vielzahl von Einzelverbindungen fluoreszierende Molekülgruppen enthalten sind. Wesentliche Vorteile des Verfahrens liegen in der Empfindlichkeit und Schnelligkeit.

Demgegenüber ist es schwierig die Fluoreszenzsignale zu quantifizieren. Dafür sind verschiedene Gründe anzuführen:

- 1) Fluoreszenzmessgeräte ungleicher Baureihen produzieren Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Intensität.
- 2) Die Linearität der Intensitäts-Konzentrationsbeziehung wird durch so genannte Innerfilter- und Quenchingeffekte gestört. Für Innerfiltereffekte gibt es Korrekturverfahren, deren Nutzen für die Berechnung der Konzentration aus Fluoreszenzintensitäten jedoch noch nicht bewertet wurde. Im Fall der Quenchingeffekte ist der Wissensstand noch lückenhafter.

Das Thema dieser sehr anspruchsvollen Diplomarbeit hat die Aufklärung der Kernfragen der Punkte 1 und 2 zum Inhalt. Anhand systematischer Messungen und mathematischer Modellvorstellungen soll der Weg zur zukünftigen Quantifizierung der Fluoreszenzsignale am TZW vorgezeigt werden.

**Betreuer:** Prof. Dr. Peter Werner (TU Dresden)  
Dr. Wido Schmidt (DGFZ)  
Dr. Heike Petzoldt (DGFZ)

**Ausgehändigt am:** 01.08.2009

**Einzureichen bis:** 31.12.2009

Prof. Dr. Dr. Peter Werner





## **Anlage zur Aufgabenstellung**

### Organisatorisches

Die Darstellungen und Untersuchungen sind in ihrem Umfang in Abhängigkeit von der zeitlichen Begrenzung der Arbeit so festzulegen, dass ein abgerundetes Ergebnis vorliegt.

Die textliche Abfassung ist konsequent in neuer deutscher Rechtschreibung auszuführen.

Die Arbeit ist (unbeschadet weiterer Exemplare, die mit den Betreuern vereinbart werden) in zweifacher Ausfertigung bei der TU Dresden einzureichen. Zusätzlich sind die Diplomarbeit und folgende Teile im Dateiformat einzureichen: Autorenreferat, Schlagwörter, Poster, Passfoto (JPG).

Die Ergebnisse der Arbeit sind in Thesen zusammenzufassen. Der Arbeit ist ein Poster mit den Außenmaßen  $H = 100 \text{ cm}$ ,  $B = 70 \text{ cm}$  beizufügen.

Während der Bearbeitung sind Konsultationen mit den Betreuern unerlässlich. Die Abschlussverteidigung erfolgt nach Vereinbarung.



# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
Autorenreferat	1
Abstract	3
<b>1 Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>2 Grundlagen</b>	<b>9</b>
2.1 Photolumineszenz . . . . .	9
2.1.1 Fluoreszenz . . . . .	9
2.1.2 Phosphoreszenz . . . . .	11
2.1.3 STOKES-Verschiebung . . . . .	11
2.2 Streuung . . . . .	12
2.2.1 RAYLEIGH-Streuung . . . . .	12
2.2.2 RAMAN-Streuung . . . . .	12
2.2.3 RAYLEIGH- und RAMAN-Streuung höherer Ordnung . .	13
2.3 Fluoreszenzspektrometer . . . . .	14
2.3.1 Aufbau und Funktionsweise . . . . .	15
2.3.2 Spektrenkorrektur . . . . .	18
2.3.3 Spektrennormierung . . . . .	21
2.4 Inner-Filter-Effekte . . . . .	23
2.4.1 Mathematische Korrekturverfahren . . . . .	24
2.4.2 Mathematisch-empirische Korrektur nach LARSSON . .	26
2.5 Quenching . . . . .	27
2.5.1 Dynamisches Quenching . . . . .	28

2.5.2	Statisches Quenching . . . . .	29
2.5.3	Darstellung und Interpretation . . . . .	29
2.5.4	Kombination statisches und dynamisches Quenching . . . . .	30
2.6	Aquatischer DOC . . . . .	30
2.6.1	Huminsäuren . . . . .	31
2.6.2	Aminosäuren . . . . .	32
2.6.3	Algenpigmente . . . . .	33
2.7	Statistische Verfahren und Bewertungsmethoden . . . . .	34
2.7.1	KOLMOGOROW-SMIRNOW-Test . . . . .	34
2.7.2	Bestimmtheitsmaß . . . . .	35
2.7.3	Erklärte Varianz . . . . .	36
<b>3</b>	<b>Durchführung der Versuche</b>	<b>37</b>
3.1	Fluoreszenzmessungen . . . . .	37
3.2	Absorptionsmessungen . . . . .	38
3.3	Vergleich der Fluoreszenzspektrometer . . . . .	38
3.3.1	Exzitationskorrektur . . . . .	39
3.3.2	Emissionskorrektur . . . . .	39
3.3.3	Normierung . . . . .	40
3.4	Bewertung der Inner-Filter-Effekt-Korrekturmethoden . . . . .	40
3.4.1	Korrektur nach LARSSON . . . . .	41
3.4.2	Linearität der Daten nach Inner-Filter-Effekt-Korrektur . . . . .	41
3.4.3	Betrachtungen zur Korrektur nach LARSSON . . . . .	42
3.5	Untersuchungen zum Quenching . . . . .	42
3.5.1	Korrektur der Ergebnisse der Quenchingversuche . . . . .	43
3.5.2	Modellierung . . . . .	43
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>45</b>
4.1	Vergleich der Fluoreszenzspektrometer . . . . .	45
4.1.1	Exzitationskorrektur . . . . .	45
4.1.2	Emissionskorrektur . . . . .	46
4.1.3	Normierung . . . . .	48
4.1.4	Fazit . . . . .	48
4.2	Bewertung der Inner-Filter-Effekt-Korrekturmethoden . . . . .	50
4.2.1	Linearität der Daten nach Inner-Filter-Effekt-Korrektur . . . . .	51
4.2.2	Betrachtungen zur Korrektur nach LARSSON . . . . .	52

---

4.2.3	Fazit . . . . .	57
4.3	Untersuchungen zum Quenching . . . . .	58
4.3.1	Absorptionsmessungen . . . . .	58
4.3.2	Rohdaten der Quenchingversuche . . . . .	63
4.3.3	Korrektur der Ergebnisse der Quenchingversuche . . . . .	65
4.3.4	Modellierung . . . . .	70
4.3.5	Bewertung des Modells . . . . .	72
4.3.6	Fazit . . . . .	74
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>77</b>
	<b>Thesen</b>	<b>83</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>XV</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>XIX</b>
<b>A</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>XXI</b>
<b>B</b>	<b>Vergleich der Fluoreszenzspektrometer</b>	<b>XXIII</b>
<b>C</b>	<b>Untersuchungen zum Quenching</b>	<b>XXIX</b>
<b>D</b>	<b>Anlagen auf CD</b>	<b>XXXVII</b>



# Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

## Abkürzungen

240/350 nm	Punkt innerhalb einer EEM bei $\lambda_{\text{ex}} = 240 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$
a.u.	willkürliche Einheit der Fluoreszenzintensität (arbitrary units)
Abb.	Abbildung
BAM	Bundesanstalt für Materialforschung
CAS	Chemical Abstracts Service
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff (dissolved organic carbon)
DVGW	Deutsche Vereinigung des Gas- und Wasserfaches e. V.
Gl.	Gleichung
IFE	Inner-Filter-Effekte
IHSS	International Humic Substances Society
LS-50	Fluoreszenzspektrometer LS-50 des Herstellers PERKIN ELMER
LS-55	Fluoreszenzspektrometer LS-55 des Herstellers PERKIN ELMER
mM	Milli-Molar
N	normal
ppb	Teile in einer Milliarde (parts per billion)
QSE	Chininsulfatäquivalente (Quinine Sulfate Equivalents)
RU	RAMAN-Unit
SRS	Suwannee River Standard
Tab.	Tabelle
TOC	totaler organischer Kohlenstoff (total organic carbon)
TZW	Technologiezentrum Wasser
UV	ultra-violett

## Summenformeln

-COOH	Carboxylgruppe
-------	----------------

-CO	Carbonylgruppe
-NH <sub>2</sub>	Aminogruppe
C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ·0.5H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	Chinin-hemisulfat Monohydrat
C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(S)-(-)-Tryptophan
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Ethanol
HClO <sub>4</sub>	Perchlorsäure
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di-Kaliumhydrogenphosphat
MgO	Magnesiumoxid
NaOH	Natriumhydroxid

### Symbole

$\alpha$	Signifikanzniveau eines statistischen Testes	
$\chi^2$	kritischer Wert des $\chi^2$ -Testes	
$\Delta\lambda$	Wellenlängendifferenz	[nm]
$\Delta\lambda_{\text{STOKES}}$	Wellenlängendifferenz zwischen anregendem und emittiertem Licht	[nm]
$\Delta E$	Energiedifferenz zwischen anregendem und durch RAMAN-Streuung gebrochenem Licht	[cm <sup>-1</sup> ]
$\lambda$	Wellenlänge	[nm]
$\lambda_{\text{RAMAN}, 2}$	Wellenlänge der RAMAN-Streuung 2. Ordnung	[nm]
$\lambda_{\text{RAMAN}}$	Wellenlänge der RAMAN-Streuung 1. Ordnung	[nm]
$\lambda_{\text{RAYLEIGH}, 2}$	Wellenlänge der RAYLEIGH-Streuung 2. Ordnung	[nm]
$\lambda_{\text{RAYLEIGH}}$	Wellenlänge der RAYLEIGH-Streuung 1. Ordnung	[nm]
$\lambda_{\text{em}}$	Emissionswellenlänge	[nm]
$\lambda_{\text{ex}}$	Exzitationswellenlänge	[nm]
$\nu_p$	Frequenz des eingestrahnten Photons	
$\tau_0$	Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors ohne Quencher	[s]
$\tau_{\text{F}}, \tau$	Fluoreszenzlebensdauer	[s]
$\varepsilon$	molekularer Extinktionskoeffizient	[l/(cm·mol)]
$h$	PLANCKsches Wirkungsquantum; $h \approx 6,626 \cdot 10^{-34}$ Js	
$c$	Konzentration	[mg/l]
$d$	Länge des Weges durch die Probe	[cm]

---

$d_1$	Weglänge des einfallenden Lichtes vom Küvettenrand bis zum Anregungs- und Emissionsort	[cm]
$d_2$	Weglänge des einfallenden Lichtes vom Anregungs- und Emissionsort bis zum Küvettenrand	[cm]
$d'_i, d''_i$	Differenzen an den Sprungstellen einer empirischen Funktion	
$E$	Energie	[J]
$EV$	Erklärte Varianz	[-]
$F$	Fluoreszenzintensität	[a.u.]
$F(x)$	Werte einer Stichprobe	
$F_0$	Fluoreszenzintensität ohne Quencher	[a.u.]
$F_0(x)$	Werte der gewählten Verteilung	
$F_{\text{corr}}$	Inner-Filter-Effekt-korrigierte Fluoreszenzintensität	[a.u.]
$F_{\text{obs}}$	gemessene Fluoreszenzintensität	[a.u.]
$F_{\text{max}}$	maximale Fluoreszenzintensität	[a.u.]
$I$	Strahlungsintensität nach dem Durchgang der Probe	
$I(\lambda)$	Intensität der Lampe	
$I_0$	Strahlungsintensität vor dem Durchgang der Probe	
$K_D$	STERN-VOLMER-Konstante für dynamisches Quenching	[-]
$k_q$	bimolekulare Quenchingkonstante	[-]
$K_S$	STERN-VOLMER-Konstante für statisches Quenching	[-]
$K_{\text{app}}$	offensichtliche Quenching-Konstante	[-]
$K_{\text{SV}}$	STERN-VOLMER-Konstante	[-]
$K_{n,1-\alpha}$	kritischer Wert des KOLMOGOROW-SMIRNOW-Testes	
$L(\lambda)$	relativer Photonenausstoß	
$m$	Anstieg der Regressionsgerade für $F(c_{\text{TRP}})$	
$n$	Schnittpunkt mit der $y$ -Achse der Regressionsgerade für $F(c_{\text{TRP}})$	
$n$	Stichprobenumfang	
$O$	Optische Dichte	[-]
$O_{\text{em}}$	Optische Dichte der Probe bei $\lambda_{\text{em}}$	
$O_{\text{ex}}$	Optische Dichte der Probe bei $\lambda_{\text{ex}}$	
$R^2$	Bestimmtheitsmaß	[-]
$r_{\text{BW}}$	RAMAN-Vektor der Blindprobe	
$r_{\text{obs}}$	RAMAN-Vektor der unkorrigierten Probe	
$S(\lambda)$	Sensitivität des Detektors	
$s_{\text{corr}}(\lambda_{\text{ex}})$	Inner-Filter-Effekt-korrigiertes Spektrum bei $\lambda_{\text{ex}}$	

$s_{\text{obs}}(\lambda_{\text{ex}})$	gemessenes Spektrum bei $\lambda_{\text{ex}}$	
$T$	statistische Testgröße	
$t$	Zeit	[s]
$w_1$	Breite des Bereiches in der Küvette, dessen Emission vom Detektor erfasst wird	[cm]
$w_2$	Breite des Bereiches in der Küvette, der durch die Lichtquelle angeregt wird	[cm]
[F]	Konzentration des Fluorophors	[mg/l]
[FQ]	Konzentration des Quencher-Fluorophor-Komplexes	[mg/l]
[HS]	Konzentration an Huminsäure SRS II	[mg/l]
[Q]	Konzentration des Quenchers	[mg/l]
[TRP]	Konzentration an Tryptophan	[ $\mu\text{g/l}$ ]
$c_L$	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum; $c_L \approx 2,998 \cdot 10^8$ m/s	
$H_0$	Nullhypothese	
$H_1$	Alternativhypothese	
$S_{0,1,2\dots}$	Singulett-Zustand von Elektronen	
$T_{1,2\dots}$	Triplett-Zustand von Elektronen	

# Abbildungsverzeichnis

2.1	JABŁOŃSKI-Diagramm . . . . .	10
2.2	Peaks in einem Spektrum . . . . .	14
2.3	Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers . . . . .	15
2.4	Aufbau des Exzitationsmonochromators . . . . .	17
2.5	Primäre und sekundäre Inner-Filter-Effekte . . . . .	24
2.6	Parameter für die Inner-Filter-Effekt-Korrektur . . . . .	25
2.7	Strukturformeln der Aminosäuren . . . . .	33
2.8	Strukturformeln der Algenpigmente . . . . .	34
4.1	Emissionskorrekturfunktionen . . . . .	46
4.2	Auswirkungen der Standardisierung bei Tryptophan . . . . .	49
4.3	Streupeaks bei Huminsäure SRS I . . . . .	54
4.4	Streupeaks bei Huminsäure SRS I, Fortsetzung . . . . .	55
4.5	RAMAN-Peak bei Tryptophan . . . . .	56
4.6	RAMAN-Peak bei Huminsäure SRS I . . . . .	57
4.7	Absorptionsspektren Tryptophan . . . . .	59
4.8	Absorptionsspektren Huminsäure SRS II . . . . .	60
4.9	Absorptionsspektren Huminsäure SRS II und Tryptophan . . . . .	62
4.10	Rohdaten Tryptophan-Peak 1 LS-50 . . . . .	63
4.11	Rohdaten Tryptophan-Peak 2 LS-50 . . . . .	64
4.12	Rohdaten Huminsäure-Peak LS-50 . . . . .	64
4.13	Korrigierte Daten Tryptophan-Peak 1 LS-50 . . . . .	65
4.14	Korrigierte Daten Tryptophan-Peak 2 LS-50 . . . . .	66
4.15	Korrigierte Daten Huminsäure-Peak LS-50 . . . . .	66
4.16	STERN-VOLMER-Plots LS-50 . . . . .	67
4.17	Fluoreszenzintensität bei verschiedenen Temperaturen . . . . .	68
4.18	STERN-VOLMER-Konstante LS-50 . . . . .	69
4.19	Modellierte Daten Tryptophan-Peak 1 LS-50 . . . . .	71

4.20	Modellierte Daten Tryptophan-Peak 2 LS-50 . . . . .	72
4.21	Residuen Tryptophan-Peak 1 LS-50 . . . . .	73
4.22	Residuen Tryptophan-Peak 2 LS-50 . . . . .	73
B.1	Auswirkungen der Standardisierung bei Chininsulfat . . . . .	XXIV
B.2	Auswirkungen der Standardisierung bei Huminsäure SRS II . . . . .	XXV
B.3	Auswirkungen der Standardisierung bei Phycocyanin . . . . .	XXVI
B.4	Auswirkungen der Standardisierung bei Phycoerythrin . . . . .	XXVII
C.1	Rohdaten Tryptophan-Peak 1 LS-55 . . . . .	XXX
C.2	Rohdaten Tryptophan-Peak 2 LS-55 . . . . .	XXX
C.3	Korrigierte Daten Tryptophan-Peak 1 LS-55 . . . . .	XXXI
C.4	Korrigierte Daten Tryptophan-Peak 2 LS-55 . . . . .	XXXI
C.5	Rohdaten Huminsäure-Peak LS-55 . . . . .	XXXII
C.6	Korrigierte Daten Huminsäure-Peak LS-55 . . . . .	XXXII
C.7	STERN-VOLMER-Plots LS-55 . . . . .	XXXIII
C.8	STERN-VOLMER-Konstante LS-55 . . . . .	XXXIII
C.9	Modellierte Daten Tryptophan-Peak 1 LS-55 . . . . .	XXXIV
C.10	Modellierte Daten Tryptophan-Peak 2 LS-55 . . . . .	XXXIV
C.11	Residuen Tryptophan-Peak 1 LS-55 . . . . .	XXXV
C.12	Residuen Tryptophan-Peak 2 LS-55 . . . . .	XXXV

# Tabellenverzeichnis

3.1	Substanzen für Vergleich der Fluoreszenzspektrometer . . . . .	39
3.2	Messbereich der Kit-Farbstoffe . . . . .	40
4.1	Bestimmtheitsmaß für Inner-Filter-Effekt-Korrekturmethode	51
4.2	STERN-VOLMER-Konstanten . . . . .	69
4.3	Werte der Koeffizienten für das Modell nach Gl. (4.1) . . . . .	71
4.4	Erklärte Varianz des Modells . . . . .	72



# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Sämtliche benutzten Informationsquellen sowie das Gedankengut Dritter wurden im Text als solche kenntlich gemacht und im Literaturverzeichnis angeführt. Die Arbeit wurde bisher nicht veröffentlicht und keiner Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dresden, 10. Dezember 2009



# Autorenreferat

In der Trinkwasseraufbereitung wird nach einer schnellen und kostengünstigen Analysemethode gesucht, mit der die Wasserqualität bestimmt werden kann. Dafür sollen Fluoreszenzmessungen zum Einsatz kommen.

Es gibt jedoch keine einheitliche Skala für die Fluoreszenzintensität, weil verschiedene Geräte unterschiedliche Werte für dieselbe wässrige Lösung detektieren. Ergebnisse verschiedener Geräte können erst nach einer Korrektur der gerätespezifischen Artefakte (Exzitations- und Emissionskorrektur) und anschließender Normierung miteinander verglichen werden. Bisher sind die verwendeten Normierungsmethoden sehr unterschiedlich, was ein Vergleichen der Ergebnisse verschiedener Geräte unmöglich macht. Im Rahmen dieser Arbeit wird eine Prozedur zur Standardisierung für zukünftige Messungen vorgestellt.

Das linear proportionale Verhältnis von Fluoreszenzintensität und Konzentration wird durch Inner-Filter-Effekte und Quenching-Effekte beeinflussen.

In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl an Korrekturmethode für Inner-Filter-Effekte entwickelt. Aufbauend auf der Arbeit von KORF [2009] werden drei davon für die Fluoreszenzanalytik bewertet.

Im Rahmen der Quenching-Versuche werden in dieser Arbeit für die Trinkwasseraufbereitung relevante Stoffgruppen wie Huminsäuren und Aminosäuren betrachtet. Dabei unterdrücken Huminsäuren die Fluoreszenz von Aminosäuren. Um das nicht-lineare Verhältnis zwischen Konzentration und Fluoreszenzintensität zu beschreiben, wird ein Modell vorgestellt.

**Schlagwörter:** Standardisierung, Exzitationskorrektur, Emissionskorrektur, Normierung, Inner-Filter-Effekte, Quenching, Modellierung



# Abstract

The research on effective and cheap methods for the analysis of drinking water quality is currently of high interest. In this work a method based on fluorescence measurements will be applied.

However, there is no unique scale for the fluorescence intensity, since different devices detect different values for identical aqueous solutions.

Results from different instruments can only be compared after correction of the instrument-specific artifacts (excitation- and emission-correction) and a subsequent normalization. The current normalization methods differ significantly making it impossible to compare results obtained from different instruments. In this work a possible standardization procedure for future measurements will be introduced.

Inner-filter and quenching effects affect the linear proportional relation between fluorescence intensity and concentration.

Numerous different correction methods for inner-filter effects were developed in the past. Based on the work of KORF [2009], three of them will be assessed for fluorescence analysis.

For quenching experiments, humic and amino acids, which are relevant substances in drinking water treatment, are considered in this work. Humic acids are supposed to quench the fluorescence of amino acids. A model describing the non-linear relation between fluorescence intensity and concentration of humic acid will be proposed.

**key words:** standardization, excitation correction, emission correction, normalization, inner-filter effects, quenching, model



# 1 Einleitung

Die Fluoreszenzmessung ist ein vergleichsweise junges Detektionsverfahren. Erstmals wurde die Fluoreszenz im Jahre 1845 von SIR JOHN FREDERICK WILLIAM HERSCHEL beobachtet und dokumentiert. Er bemerkte damals eine blaue Färbung in einer sonst farblosen Chininsulfatlösung, sobald sie vom Sonnenlicht bestrahlt wurde [HERSCHEL, 1845]. In den 1940er Jahren gelang es ALEKSANDER JABŁOŃSKI, die Vorgänge, die beim Fluoreszieren von Stoffen innerhalb ihrer Moleküle stattfinden, theoretisch zu erklären. Ein aus vielen Publikationen herausragendes Werk, der "LAKOWICZ", erschien erstmalig 1983 und wird seitdem regelmäßig in überarbeiteter Version neu aufgelegt [LAKOWICZ, 2006]. Parallel zu dem sich kontinuierlich verbessernden Wissensstand über die Fluoreszenz vieler Stoffe in unterschiedlichen Medien kam eine Vielzahl von Fluoreszenzspektrometern auf den Markt. Es handelt sich dabei um einfache Kleinmessgeräte, die für bestimmte Prüfungen an Materialien oder in der Medizin eingesetzt werden, bis hin zu Hochleistungsgeräten für den analytischen Laborbetrieb.

Seit vielen Jahren werden Fluoreszenzmessungen für die Analytik wässriger Proben eingesetzt. Im Bereich der Trinkwasseraufbereitung zählen sie jedoch zu den vergleichsweise jüngsten Untersuchungsmethoden [SCHMIDT UND PETZOLDT, 2008]. Da Messungen der Fluoreszenz vergleichsweise schnell und preiswert sind, sollen sie in einem Online-Verfahren zur Bewertung der Wasserqualität zum Einsatz kommen, das derzeit am Technologiezentrum Wasser (TZW) in Dresden entwickelt wird. Fluoreszenzsignale sind charakteristisch für Moleküle oder Molekülgruppen mit aromatischen Ringstrukturen oder Doppelbindungen. Diese Gruppen sind sowohl im natürlichen gelösten organischen Kohlenstoff (DOC, engl. dissolved organic carbon) von Wässern als auch in vielen anthropogenen Bestandteilen, beispielsweise in nichtindustriellen Abwässern, enthalten.

Ein Problem bei allen Fluoreszenzmessungen und speziell bei Analysen im aquatischen Milieu stellen aber immer noch zum Einen die Vergleichbarkeit von Messungen mit unterschiedlichen Geräten sowie zum Anderen die Auswertung und In-

terpretation von Messungen dar. Die Ursache für dieses Problem liegt darin, dass die Intensität der Fluoreszenz keine quantitative Größe ist. Das bedeutet, dass sie nicht von jedem Messgerät gleich detektiert wird, sondern je nach Charakteristika der Messgeräte unterschiedlich ausfällt. Auch gibt es keine vorgeschriebene Maßeinheit, um Fluoreszenzintensitäten zu messen. Häufig angewendet werden a.u. (arbitrary units)<sup>1</sup> oder RU (RAMAN units). Auch die Umrechnung in sogenannte Chininsulfatäquivalente (QSE<sup>2</sup>) ist in der Literatur zu finden [COBEL ET AL., 1998; MURPHY, 2008].

Sollen Fluoreszenzmessungen jedoch als Parameter für DOC-Charakterisierungen in Wässern jeglicher Herkunft einem breiten Anwenderkreis zugänglich gemacht und damit anerkannt werden, muss es möglich sein, die Signale von unterschiedlichen Geräten miteinander zu vergleichen. Dies kann mithilfe gezielter Korrekturen sowie durch eine Normierung der Signale erreicht werden. Der Grundgedanke besteht dabei darin, über korrigierte und normierte Fluoreszenzmessungen die Konzentration von fluoreszierenden Stoffen bzw. Stoffgruppen in einem Wasser zu bestimmen.

In einer Literaturrecherche wurde zunächst zusammengetragen, welche Möglichkeiten es hierfür gibt. Dabei fiel auf, dass es weder eine einheitliche Art der Korrektur noch eine einheitliche Normierung für Fluoreszenzmessungen gibt. Das bedeutet, dass auch Fluoreszenzintensitäten in RU oder QSE nicht zwingend durch dieselbe Methode erhalten werden und daher nicht miteinander vergleichbar sind.

Unter Berücksichtigung des aktuellen Wissensstandes wird klar, dass eine allgemein gültige Korrektur, Normierung und eine darauf aufbauende Kalibrierung der Fluoreszenzsignale nur als Ergebnis einer kontinuierlichen und systematischen Arbeit erreicht werden kann.

Die Hauptaufgabe dieser Diplomarbeit bestand darin, zwei am TZW Dresden befindliche Fluoreszenzspektrometer, LS-50 und LS-55, miteinander zu vergleichen, das heißt, ihre Messergebnisse zu korrigieren und zu normieren. Bei den Geräten handelt es sich um zwei unterschiedliche Modelle des Herstellers PERKIN ELMER, die mit ca. 20 Jahren Abstand produziert wurden. Obwohl sie sich im Aufbau sehr ähnlich sind, liefern sie dennoch bei den Messungen unterschiedliche Ergebnisse. Durch das Durchführen von geeigneten Korrekturen und Normierung-

---

<sup>1</sup>Angaben der Fluoreszenzintensität in a.u. beziehen sich zumeist auf Rohdaten.

<sup>2</sup>(engl.) Quinine Sulfate Equivalents

---

gen im Rahmen dieser Arbeit soll gezeigt werden, dass die Geräte bei Messungen identische Ergebnisse liefern.

Neben der Korrektur und Normierung von Fluoreszenzspektren besteht für die Auswertung der Signale ein weiteres grundlegendes Problem im nichtlinearen Zusammenhang zwischen der Konzentration einiger wichtiger organischer Wasserbestandteile und der Fluoreszenzintensität. Die Ursache für dieses Phänomen sind sogenannte Inner-Filter- und Quenching-Effekte. Bei Inner-Filter-Effekten kommt es durch die Absorption der anregenden und der als Fluoreszenz emittierten Strahlung zu einer Verminderung des Fluoreszenzsignals. Quenching-Effekte hingegen können beim Kontakt zweier Moleküle auftreten und haben zur Folge, dass mindestens eines von beiden anschließend nicht mehr fluoreszieren kann.

Für Inner-Filter-Effekte werden in der Literatur mehrere Korrekturmethode beschrieben, die in einer vorangegangenen Diplomarbeit am TZW Dresden bereits ausführlich erläutert wurden [vgl. KORF, 2009]. In der vorliegenden Arbeit soll, auf den Ergebnissen von KORF [2009] aufbauend, die Bewertung der Inner-Filter-Effekt-Korrekturmethode für das Berechnen von Konzentrationen aus Fluoreszenzintensitäten abgeschlossen werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zum Thema Quenching dienten zunächst vor allem dazu, das Grundverständnis der Prozesse beim Quenching von am TZW Dresden relevanten Stoffgruppen zu erweitern. Dies geschah vor dem Hintergrund, in Zukunft auch bei Quenching-belasteten Proben von der gemessenen Fluoreszenzintensität auf die Konzentration der Substanzen schließen zu können.

An dieser Aufgabenstellung orientiert sich die Gliederung der Arbeit. Im ersten Teil werden physikalisch, chemisch und technisch relevante Grundlagen dargestellt. Dabei liegt das Hauptaugenmerk auf der Beschreibung der am TZW Dresden verwendeten Fluoreszenzspektrometer sowie auf den Möglichkeiten zur Korrektur und Normierung von Messdaten. Es wird aber auch auf die Inner-Filter-Effekte mit drei exemplarisch ausgesuchten Korrekturverfahren [vgl. KORF, 2009] und die Quenching-Effekte eingegangen.

Anschließend wird beschrieben, wie die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Analysen und Versuche erfolgten. Dabei werden sowohl mathematische Bewertungsverfahren erläutert als auch die verwendeten Substanzen aufgeführt.

Die Ergebnisse werden im letzten Teil zusammengefasst und diskutiert. Darauf aufbauend werden Schritte für das weitere Vorgehen vorgeschlagen.



# 2 Grundlagen

## 2.1 Photolumineszenz

Unter Lumineszenz wird die Emission von Licht ausgehend von einem angeregten Molekül verstanden. Erfolgt die Anregung des Systems durch elektromagnetische Strahlung, also Photonen, wird von Photolumineszenz gesprochen. Sie wird in Abhängigkeit von der Zeitdauer zwischen Anregung und Emission, der sogenannten Lebensdauer, in zwei Kategorien unterschieden: Phosphoreszenz und Fluoreszenz. Hierbei ist die Lebensdauer der Fluoreszenz deutlich kürzer als die der Phosphoreszenz. [LAKOWICZ, 2006]

Ein Molekül, das fluoreszieren kann, wird als ein Fluorophor bezeichnet. Er absorbiert und emittiert Photonen. Das Verhältnis der Anzahl absorbierter Photonen zu emittierten wird als Quantenausbeute bezeichnet.

### 2.1.1 Fluoreszenz

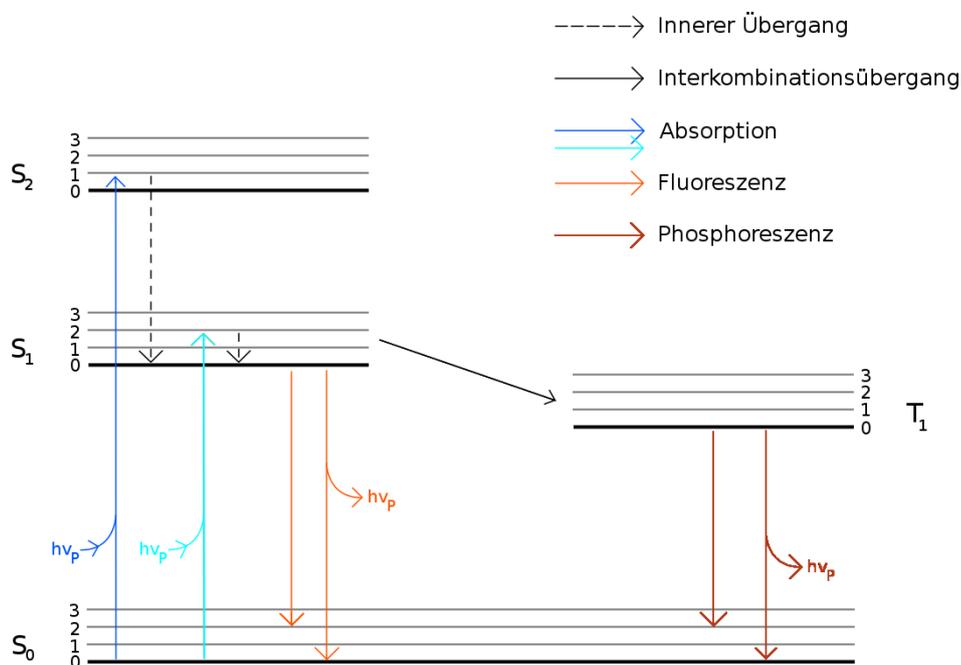
Die Vorgänge bei der Fluoreszenz können mithilfe des JABŁOŃSKI-Diagramms erklärt werden. ALEKSANDER JABŁOŃSKI war ein ukrainisch-polnischer Wissenschaftler, der mit seinen Forschungen einen entscheidenden Beitrag zur modernen Fluoreszenzspektroskopie leistete. Das JABŁOŃSKI-Diagramm wurde von ihm erstmals 1935 veröffentlicht. [LAKOWICZ, 2006]

Eine mögliche Darstellung des JABŁOŃSKI-Diagrammes ist in Abb. 2.1 zu sehen. Es zeigt die Energieniveaus des elektronischen Grundzustandes  $S_0$ , des ersten und zweiten elektronisch angeregten Singulett-Zustandes  $S_1$  und  $S_2$  und des ersten elektronisch angeregten Triplett-Zustandes  $T_1$ . Moleküle können in jedem dieser Zustände mehrere Vibrationszustände einnehmen. In der Abbildung sind diese als parallele äquidistante Linien dargestellt und mit 0, 1, 2 oder 3 gekennzeichnet. Die Energiedifferenzen zwischen den Vibrationszuständen sind jedoch nicht gleich, sondern verkleinern sich zu höheren Energien hin. Ebenso sind auch die

Energiedifferenzen zwischen  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$  und  $T_1$  nicht maßstabsgetreu dargestellt, da im Folgenden lediglich die relative Anordnung zueinander relevant ist [EISEL ET AL.].

Ein Übergang zwischen zwei Zuständen ist im Diagramm durch einen vertikalen Pfeil gekennzeichnet. Zeigt er nach oben, handelt es sich um einen Absorptionsvorgang, zeigt er nach unten, liegt Emission vor. Außerdem werden Strahlungsvorgänge mit durchgezogenen und strahlungsfreie Vorgänge mit gestrichelten Linien dargestellt.

Wird eine Probe elektromagnetischer Strahlung ausgesetzt, so werden die Fluorophore in der Lösung angeregt und auf ein höheres Vibrationsniveau des ersten oder zweiten Singulett-Zustandes ( $S_1$  oder  $S_2$ ) angehoben. Anschließend relaxie-



**Abb. 2.1:** JABŁOŃSKI-Diagramm nach LAKOWICZ [2006] zur Erklärung der Photoemission. Die Linien beschreiben den elektronischen Grundzustand  $S_0$ , den ersten und zweiten elektronisch angeregten Singulett-Zustand  $S_1$  und  $S_2$ , den ersten elektronisch angeregten Triplett-Zustand  $T_1$  sowie deren Vibrationszustände (durch 0, 1, 2, oder 3 gekennzeichnet). Absorptions- und Emissionsvorgänge sind durch vertikale Pfeile nach oben bzw. nach unten verdeutlicht. Bei Strahlungsvorgängen sind sie durchgezogen, bei strahlungsfreien Vorgängen gestrichelt. Der Parameter  $\nu_p$  beschreibt die Frequenz des eingestrahlichten Photons,  $h$  ist das PLANCKSche Wirkungsquantum.

ren sie auf das unterste Vibrationsniveau von  $S_1$ . Dieser Vorgang wird als Innerer Übergang (Internal Conversion) bezeichnet und ist strahlungsfrei. Die Fluoreszenz beginnt dann in der Regel vom untersten Vibrationsniveau des  $S_1$  aus. Beim Relaxieren eines Fluorophors in den Grundzustand  $S_0$  wird er in ein höheres Vibrationsniveau des Grundzustandes  $S_0$  versetzt. Dieser Vorgang ist Spin-erlaubt. Dabei wird elektromagnetische Strahlung vom Fluorophor emittiert, er fluoresziert. [LAKOWICZ, 2006]

### 2.1.2 Phosphoreszenz

Befindet sich ein Fluorophor im ersten angeregten Singulett-Zustand  $S_1$ , kann eine Spin-Umkehr und damit der Übergang in den ersten Triplett-Zustand  $T_1$  erfolgen. Es wird vom Interkombinationsübergang (Intersystem Crossing) gesprochen. Das Elektron im angeregten Orbital hat dabei die gleiche Spin-Richtung wie das Elektron im Grundzustand  $S_0$ . Eine Emission von diesem Zustand aus wird als Phosphoreszenz bezeichnet. Die Übergänge von  $S_1$  zu  $T_1$  und von  $T_1$  zu  $S_0$  sind Spin-verboten, das heißt, sie sind wesentlich unwahrscheinlicher als ein Übergang zwischen zwei Zuständen gleicher Multiplizität. [LAKOWICZ, 2006]

### 2.1.3 STOKES-Verschiebung

Im Jabłoński-Diagramm ist zu erkennen, dass die Energie der Emission immer kleiner ist als die der Absorption. Fluoreszenz tritt also bei einer größeren Wellenlänge als der des anregenden Lichtes auf. Im JABŁOŃSKI-Diagramm ist dies daran zu erkennen, dass die nach unten gerichteten durchgezogenen Pfeile immer kürzer sind als die nach oben gerichteten. Dieses Phänomen der Rotverschiebung wurde als erstes von SIR GEORGE GABRIEL STOKES beobachtet und wird daher auch als die STOKES-Verschiebung bezeichnet [LAKOWICZ, 2006]. Quantitativ lässt sie sich durch

$$\Delta\lambda_{\text{STOKES}} = |\lambda_{\text{ex}} - \lambda_{\text{em}}| \quad (2.1)$$

beschreiben. Dieser Verlust an Energie kann bei allen Fluorophoren beobachtet werden. Der Grund hierfür liegt darin, dass die Fluorophore zunächst auf das unterste Schwingungsniveau von  $S_1$  relaxieren, um dann weiterhin auf ein höhe-

res Vibrationsniveau des Grundzustandes  $S_0$  zu relaxieren. Die Energiedifferenz  $\Delta\lambda_{\text{STOKES}}$  wird zumeist in Wärme umgesetzt. [LAKOWICZ, 2006]

## 2.2 Streuung

Streuung beschreibt in der Physik die Ablenkung eines Objekts durch Wechselwirkungen mit einem Streuzentrum. Dabei wird zwischen elastischer und inelastischer Streuung unterschieden. Bei elastischer Streuung ist die Summe der kinetischen Energie nach dem Stoß genauso groß wie vorher. Bei inelastischer Streuung hingegen ändert sie sich und ein Teil der vorhandenen kinetischen Energie geht in Anregungsenergie, beispielsweise eines Atoms, über. [MESCHEDE, 2002]

Im Folgenden wird die Streuung von elektromagnetischer Strahlung, das heißt von Photonen, an Molekülen betrachtet.

### 2.2.1 RAYLEIGH-Streuung

Unter RAYLEIGH-Streuung wird die elastische Streuung von elektromagnetischer Strahlung an Teilchen verstanden, deren Durchmesser im Vergleich zur Wellenlänge klein sind. Im betrachteten Fall der Fluoreszenz handelt es sich um Photonen, die an Molekülen gestreut werden. Da die Summe der Energie vor und nach der Streuung identisch ist, hat das gestreute Licht dieselbe Wellenlänge  $\lambda$  wie das eindringende Licht [MESCHEDE, 2002]. In einem Emissionsspektrum bedeutet dies für die RAYLEIGH-Streuung, dass  $\lambda_{\text{RAYLEIGH}}$  der Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}}$  entspricht.

### 2.2.2 RAMAN-Streuung

RAMAN-Streuung ist im Gegensatz zur RAYLEIGH-Streuung inelastisch. Damit ist die Energie und auch die Frequenz der emittierten Photonen in der Regel kleiner als die der anregenden. Das Molekül befindet sich nach dem Streuvorgang auf einem höheren Energieniveau [LAKOWICZ, 2006]. Die Wellenlänge  $\lambda_{\text{RAMAN}}$  von RAMAN-gestreutem Licht ist immer größer als  $\lambda_{\text{ex}}$ . Bildlich lässt sich sagen, dass die RAMAN-Streuung in einem Emissionsspektrum immer nach der RAYLEIGH-Streuung auftritt.

In STEMLER [2004] und LARSSON ET AL. [2007] wird die Emissionswellenlänge des RAMAN-Peaks durch

$$\lambda_{\text{RAMAN}} = \frac{10^7}{\frac{10^7}{\lambda_{\text{ex}}} - \Delta E} \quad (2.2)$$

berechnet. Dabei ist  $\Delta E$  die Energiedifferenz zwischen anregendem und durch RAMAN-Streuung 1. Ordnung gebrochenem Licht. Sie beträgt zum Beispiel für Wasser  $3380 \text{ cm}^{-1}$  und für Methanol  $3090 \text{ cm}^{-1}$ .

Der Zusammenhang zwischen der Energie  $E$  eines Photons und seiner Wellenlänge  $\lambda$  wird durch

$$E = h \cdot \frac{c_L}{\lambda} \quad (2.3)$$

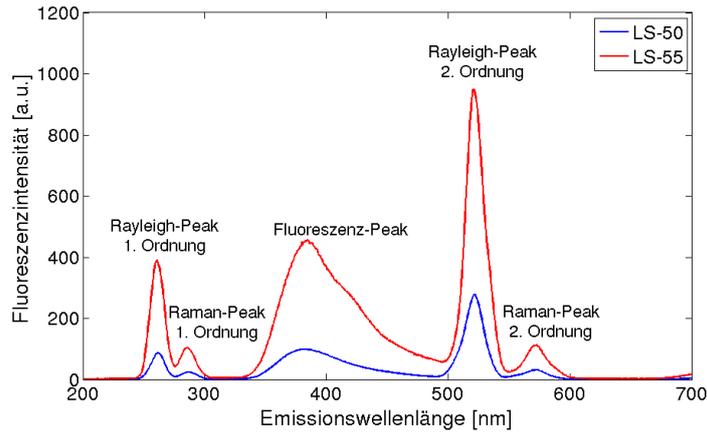
mit dem skalierten PLANKSchen Wirkungsquantum  $h$  und der Lichtgeschwindigkeit  $c_L$  beschrieben.

Bei der RAMAN-Streuung handelt es sich um ein sehr schwaches Phänomen. Daher ist die Intensität der RAMAN-Streuung um ein Vielfaches kleiner als die der RAYLEIGH-Streuung. Da sie durch die Streuung der Photonen am Lösungsmittel entsteht, hat bei wässrigen Proben nur Wasser eine ausreichend hohe Konzentration, um RAMAN-Streuung auszulösen [LARSSON ET AL., 2007]. Der Anteil des durch RAMAN-Streuung frequenzverschobenen Lichtes ist um einen Faktor  $10^3$  bis  $10^4$  geringer als der des durch RAYLEIGH-Streuung hervorgerufenen [LAKOWICZ, 2006].

### 2.2.3 RAYLEIGH- und RAMAN-Streuung höherer Ordnung

Durch Resonanzvorgänge treten sowohl RAYLEIGH- als auch RAMAN-Streuung nicht nur bei  $\lambda_{\text{ex}}$  sondern auch bei ganzzahligen Vielfachen davon auf. Man spricht dann von Streuung  $n$ -ter Ordnung [LAKOWICZ, 2006; MESCHÉDE, 2002].

Ebenso können in Spektren auch Streupeaks bei einem  $\lambda_{\text{em}}$  kleiner als  $\lambda_{\text{ex}}$  beobachtet werden. Für die RAMAN-Streuung bedeutet dies, dass das Molekül nach dem Anregungsvorgang auf einem niedrigeren Energieniveau ist als vorher und das emittierte Photon eine höhere Energie und damit höhere Frequenz besitzt als das anregende. Dieser Vorgang wird als Anti-RAMAN-Streuung bezeichnet [LAKOWICZ, 2006].



**Abb. 2.2:** Auftreten von Fluoreszenz- und Streupeaks in unkorrigierten Spektren, 0,1 mg/l Chininsulfat in MilliQ-Wasser, LS-50 und LS-55. Die Anregungswellenlänge beträgt 260 nm.

Aufgrund von Resonanzen kann zum Beispiel bei der Hälfte oder auch einem Viertel von  $\lambda_{\text{ex}}$  auch Anti-RAYLEIGH-Streuung auftreten.

Zur Verdeutlichung sind in Abb. 2.2 Beispielspektren der beiden Geräte LS-50 (blauer Graph) und LS-55 (roter Graph) zu sehen. Die Exzitationswellenlänge beträgt 260 nm, weshalb die Emissionswellenlänge des RAYLEIGH-Peaks 1. Ordnung bei ca. 260 nm und die des RAMAN-Peaks 1. Ordnung bei ca. 285 nm liegt. Auch die Streupeaks 2. Ordnung sind in der Abbildung zu sehen, ebenso wie der Fluoreszenz-Peak von Chininsulfat bei einem  $\lambda_{\text{em}}$  von etwa 383 nm.

## 2.3 Fluoreszenzspektrometer

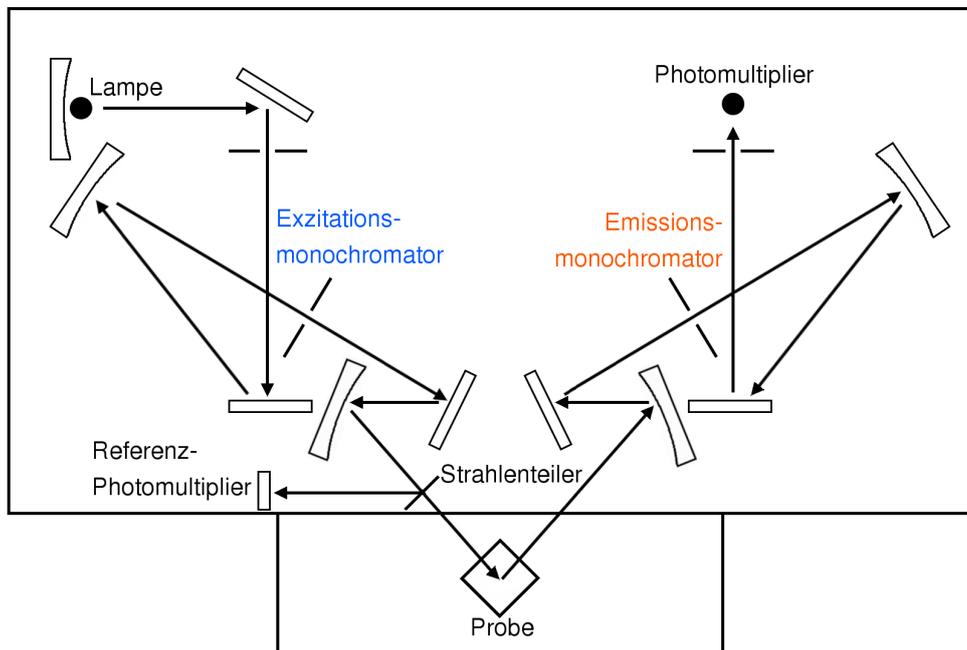
Um Fluoreszenzsignale zu detektieren, gibt es je nach Anwendungsbereich Messgeräte verschiedener Art und Größe. Im analytischen Bereich werden vor allem die Geräte der Hersteller LASTEK (Horiba JY Fluoromax), VARIAN (Cary Eclipse), PERKIN ELMER (LS-Reihe) und PHOTON TECHNOLOGY INTERNATIONAL (Quantum Master) genutzt [MURPHY, 2008]. Ihr Aufbau sowie die Funktionsweise sind sehr ähnlich. In diesem Abschnitt werden stellvertretend die Fluoreszenzspektrometer LS-50 und LS-55 des Herstellers PERKIN ELMER beschrieben.

Messungen mit einem Fluoreszenzspektrometer können in der Regel auf drei verschiedene Arten ausgeführt werden. Die erste und einfachste Variante ist die einer Punktmessung. Dabei werden sowohl  $\lambda_{\text{ex}}$  als auch  $\lambda_{\text{em}}$  auf einen konstanten,

aber durchaus unterschiedlichen Wert, eingestellt und die Intensität des Fluoreszenzsignals aufgenommen. Die zweite Variante stellt das Aufnehmen eines Emissionsspektrums dar, für das  $\lambda_{em}$  variiert und gleichzeitig  $\lambda_{ex}$  konstant gehalten wird. Analoges gilt für Exzitationspektren. Beim Verknüpfen mehrerer Emissionsspektren, die bei unterschiedlichem  $\lambda_{ex}$  aufgenommen wurden, wird als dritte Variante eine Exzitations-Emissions-Matrix erhalten.

### 2.3.1 Aufbau und Funktionsweise

Der schematische Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers ist in Abb. 2.3 zu sehen. Es besteht im Wesentlichen aus einer Lichtquelle, zwei Monochromatoren und zwei Photomultipliern. Als Lichtquelle dient eine gepulste Xenonlampe, deren Lichtstrahl durch den Exzitationsmonochromator läuft und nach dem Durchgang einen Strahlenteiler passiert, der einen Teil des Strahles zum Referenzphotomultiplier reflektiert und den anderen Teil auf die Probe fallen lässt. Dadurch wird die Probe angeregt und fluoresziert. Die Emission wird senkrecht zur Anregung gemessen. Die Emission wird senkrecht zur Anregung gemessen.



**Abb. 2.3:** Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers nach PERKIN ELMER [2007]. Die Pfeile weisen in die Richtung des Lichtstrahles.

Das emittierte Licht passiert den Emissionsmonochromator und wird vom Photomultiplier gemessen. Anschließend wird das Probensignal zum Signal des Referenzphotomultipliers ins Verhältnis gesetzt. Dies ist eine Form der Korrektur auf die in Abschnitt 2.3.2 näher eingegangen wird. Zunächst sollen jedoch die Bauteile der verwendeten Spektrometer beschrieben werden.

### **Lichtquelle**

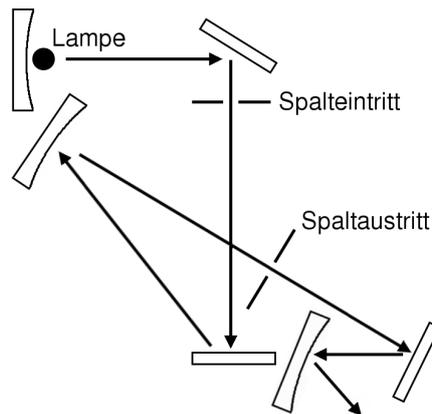
In beiden Geräten sorgt eine gepulste Xenon-Lampe für den nötigen Energieeintrag in Form von Strahlung [Perkin Elmer, 1989, 2007]. Es werden hohe Anforderungen, wie beispielsweise konstante Intensität, sowohl über den betrachteten Wellenlängenbereich als auch über die Lebensdauer, an sie gestellt. Gegenüber kontinuierlichen Lampen besitzen gepulste Xenon-Lampen ein strukturierteres Ausgangssignal, das zudem im UV-Bereich deutlich größere Intensitäten aufweist. Gepulste Lampen sind stromsparend und setzen weniger Energie in Wärme um. Nur in wenigen Fällen kann es durch die nicht kontinuierliche Strahlung zum Photoabbau von Proben kommen. [LAKOWICZ, 2006]

### **Monochromator**

Monochromatoren werden genutzt, um aus polychromatischem oder weißem Licht Anteile mit einer bestimmten Wellenlänge herauszufiltern. Dies wird durch den Einsatz von Prismen oder Beugungsgittern erreicht, wobei letztere in Fluoreszenzspektrometern häufiger zur Anwendung kommen [LAKOWICZ, 2006]. Abb. 2.4 zeigt den schematischen Aufbau eines Exzitationsmonochromators. Die gebogenen Elemente sind Spiegel, alle anderen Beugungsgitter.

Das einfallende Licht wird durch ein Beugungsgitter aufgefächert. Anschließend durchquert es eine Spaltblende, die nur den gewünschten Wellenlängenbereich durchlässt. Durch weitere Beugungsgitter wird das Licht zerlegt bis es zum Schluss eine zweite Spaltblende, den Austrittspalt, passiert und auf die Probe trifft. Analog dazu arbeitet der Emissionsmonochromator.

Die Intensität des vom Monochromator durchgelassenen Lichtes ist in etwa proportional zum Quadrat der Spaltbreite. Eine größere Spaltbreite hat daher ein stärkeres Lichtsignal zur Folge, jedoch auch ein höheres Signal-Rausch-Verhältnis. Geringere Spaltbreiten haben eine höhere Auflösung zur Folge, jedoch auch geringere Lichtintensitäten [LAKOWICZ, 2006]. Die Spaltbreiten der beiden Monochromatoren sind in der Regel manuell einstellbar.



**Abb. 2.4:** Schematischer Aufbau des Exzitacionsmonochromators mit Lampe nach PERKIN ELMER [2007]. Die gebogenen Elemente sind Spiegel, alle anderen Beugungsgitter. Der Spaltaustritt wird auch als Exzitacionsspalt bezeichnet und kann manuell eingestellt werden.

Am LS-50 ist ein Monochromator des Typs MONK-GILLIESON eingebaut [PERKIN ELMER, 1989]. Für den LS-55 konnten keine Angaben ermittelt werden.

### Photomultiplier

Mit Hilfe des Photomultipliers können schwache Signale von einzelnen Photonen detektiert werden. Er besteht aus einer Photokathode und einem nachgeschalteten Sekundärelektronenvervielfacher sowie einer Anode.

Treffen Photonen auf die Photokathode, schlagen sie dabei Sekundärelektronen aus deren Oberfläche. Diese werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und treffen auf weitere Elektroden, sogenannte Dynoden, aus denen wiederum Sekundärelektronen herausgeschlagen werden. Zwischen je zwei Dynoden liegt ein Bruchteil der Gesamtspannung an. Zum Schluss treffen die Elektronen auf die Anode und fließen zur Masse ab. Dabei wird ein Spannungsabfall über einem Widerstand erzeugt, der als Ausgangssignal dient.

Eine höhere Spannung hat zur Folge, dass eine größere Menge Sekundärelektronen herausgeschlagen wird und sich daher die Verstärkung des Signals erhöht. [LAKOWICZ, 2006]

Der Photomultiplier des LS-50 hat eine Torschaltung und eine modifizierte S5-Kathode. Er ist für einen Betrieb bis zu 650 nm ausgelegt. Das Gleiche gilt auch für den Referenzphotomultiplier [Perkin Elmer, 1989]. Am LS-55 konnten keine Angaben ermittelt werden.

## Optische Filter

Optische Filter werden zumeist eingesetzt, um das nicht-ideale Verhalten der Monochromatoren zu kompensieren. Sie bestehen aus farbigem Glas und lassen deshalb nur Licht mit einer höheren Wellenlänge als die ihrer Farbe durch. Sie schneiden also Licht einer bestimmten Wellenlänge ab und werden daher auch als Cutoff-Filter bezeichnet. [LAKOWICZ, 2006]

Am LS-55 kann über die Steuersoftware zwischen verschiedenen Filtern gewählt werden. Zur Standardeinstellung gehört ein 350 nm Kantenfilter, der ab einem  $\lambda_{\text{ex}}$  von über 410 nm in den Exzitationsstrahlengang eingebracht wird und dadurch die Streuung zweiter Ordnung reduziert [STEMMLER, 2004]. Dies ist laut PERKIN ELMER [2004] besonders dann wichtig, wenn die Streuung zweiter Ordnung von der Probe nicht absorbiert wird, im Referenzdetektor aber ein Signal erzeugt.

Am LS-50 ist ein solcher Filter nicht installiert.

### 2.3.2 Spektrenkorrektur

Beim Aufnehmen von Fluoreszenzspektren werden durch die Bauteile des Spektrometers, vor allem durch die Monochromatoren und die Lampe, Artefakte und somit Fehler eingetragen [STEMMLER, 2004]. Es sind zwar Spektren, die am selben Gerät gemessen wurden, miteinander vergleichbar, sie können jedoch nicht mit Spektren, die an anderen Geräten aufgenommen wurden, verglichen werden. Nicht korrigierte Spektren können im Vergleich zu korrigierten Spektren Verformungen der Peaks und Verschiebungen der Peak-Maxima aufweisen. Betrachtet werden hierbei nur die durch Fluoreszenz hervorgerufenen Peaks.

Es wird zwischen Exzitations- und Emissionskorrektur unterschieden. Dabei werden die Artefakte des Exzitationsmonochromators und der Lampe und die Artefakte des Emissionsmonochromators korrigiert.

Korrigierte Spektren werden jedoch nicht nur für den Vergleich von Messungen zweier Geräte benötigt, sondern auch, um zum Beispiel die Quantenausbeute einer Substanz zu bestimmen. [LAKOWICZ, 2006]

#### Exzitationskorrektur

Die Intensität der Lichtquelle ist sowohl wellenlängen- [LAKOWICZ, 2006] als auch zeitabhängig und auch der Exzitationsmonochromator weist eine Wellenlängenabhängigkeit in der Transmission von Licht auf. Daher wird ein Teil des

Lichtes, bevor es auf die Probe trifft, zum Referenzphotomultiplier geleitet (vgl. Abschnitt 2.3.1). Das dort gemessene Referenzsignal dient der Korrektur von Fehlern durch den Exzitationsmonochromator. [STEMMLER, 2004]

Der Referenzphotomultiplier selbst weist jedoch auch eine wellenlängenabhängige Empfindlichkeit auf. Diese wird durch einen Quantenzähler einmalig korrigiert, indem ein Exzitationskorrekturspektrum in der Regel vom Hersteller aufgenommen und für alle weiteren Proben zur Korrektur verwendet wird. In der Fachliteratur wird hierfür Rhodamin B in Ethylenglycol mit einer Konzentration von 3 g/l empfohlen [MELHUISE, 1962], da seine Quantenausbeute und das Emissionsmaximum im Bereich von 220 bis 600 nm vergleichsweise unabhängig von der Wellenlänge sind. Es können auch Chininsulfat (4 g/l in 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) oder Fluoreszin (2 g/l in 0,1 N NaOH) besonders für einen Bereich von 220 bis 340 nm verwendet werden [LAKOWICZ, 2006; MELHUISE, 1962].

Ein Quantenzähler emittiert unabhängig von der Wellenlänge aufgrund seiner hohen Konzentration durch jedes absorbierte Photon ein Photon. Sein Exzitationspektrum ist daher flach und konstant. Auftretende Unebenheiten sind Artefakte des Exzitationsmonochromators, da die Wellenlänge des Emissionsmonochromators bei der Aufnahme eines Exzitationsspektrums nicht verändert wird. Das erhaltene Spektrum wird als Exzitationskorrekturspektrum bezeichnet [LAKOWICZ, 2006]. Um anschließend aufgenommene Exzitations- oder Emissionsspektren einer Probe zu korrigieren, werden sie, nach Division durch das Referenzsignal, durch das Exzitationskorrekturspektrum dividiert.

An beiden Geräten, LS-50 und LS-55, wird eine Exzitationskorrektur mithilfe der vom Hersteller PERKIN ELMER in den Geräten hinterlegten Korrekturspektren durchgeführt. Diese wurden nach Angaben des Herstellers mit Rhodamin 101 aufgenommen. Am LS-55 gibt es zudem die Möglichkeit, die Exzitationskorrektur über die Steuersoftware abzuwählen. Dabei ist zu beachten, dass die dann gemessenen Spektren, falls keine andere Korrektur durchgeführt wird, in keiner Weise mit den an anderen Geräten aufgenommenen verglichen werden können.

### **Emissionskorrektur**

Ebenso wie durch den Exzitationsmonochromator werden aufgenommene Spektren auch durch den Emissionsmonochromator verzerrt. Ziel ist es daher, eine Emissionskorrekturfunktion zu bestimmen, die jedem  $\lambda_{em}$  einen Korrekturfaktor

zuordnet. Gemessene Spektren einer Probe werden dann durch Multiplikation mit dem entsprechenden Faktor korrigiert.

Für das Aufnehmen der Korrekturfunktion gibt es verschiedene Möglichkeiten, die im Folgenden beschrieben werden.

**Vergleich mit bekannten Emissionsspektren** Hierbei werden die aufgenommenen Spektren einer Substanz mit dem bekannten Standardspektrum dieser verglichen. Standardspektren sind für eine Reihe von Substanzen zum Beispiel in LAKOWICZ [2006] veröffentlicht und decken einen Emissionswellenlängenbereich von 300 bis 800 nm ab. Durch den Vergleich wird eine Korrekturfunktion erhalten, die zur Emissionskorrektur aller weiteren Proben verwendet werden kann.

Ein Beispiel für diese Art der Korrektur stellt das *Fluoreszenz Standard Kit* von FLUKA dar, das in Zusammenarbeit mit der Bundesanstalt für Materialforschung (BAM) 2005 entwickelt wurde. Hierbei handelt es sich um fünf von der BAM zertifizierte Farbstoffe, die unterschiedliche spektrale Eigenschaften besitzen. Durch das Messen dieser wird  $\lambda_{em}$  im Bereich von 300 bis 750 nm abgedeckt. Über das mitgelieferte Programm *LinkCorr* können die gemessenen Werte mit den zertifizierten Farbstoffspektren verglichen werden. Das Programm erstellt eine Korrekturfunktion, die jedem  $\lambda_{em}$  einen Korrekturfaktor zuordnet, mit dem die Fluoreszenzintensität einer Probe multipliziert werden muss [RESCH-GENGER ET AL., 2005].

Eine weitere Methode, die Korrekturfunktion für den Emissionsmonochromator zu erhalten, ist das Kalibrieren der im Gerät befindlichen Xenon-Lampe. Dafür wird die Gleichung

$$S(\lambda) = I(\lambda)/L(\lambda) \tag{2.4}$$

zugrunde gelegt, in der  $S(\lambda)$  die Sensitivität des Detektors,  $I(\lambda)$  die Intensität der Lampe, gemessen bei einem Synchron-Scan, und  $L(\lambda)$  der relative Photonenausstoß sind.

Der relative Photonenausstoß  $L(\lambda)$  wird mittels eines Quantenzählers<sup>1</sup> in der Messzelle ermittelt. Ein Streuer aus Magnesiumoxid (MgO) wird in den Probenhalter eingesetzt, der die von der Lampe emittierte Strahlung unabhängig von ihrer Wellenlänge direkt zum Detektor reflektiert. Anschließend wird ein Synchron-Scan

---

<sup>1</sup>Meist wird Chininsulfat in 0,1 N Perchlorsäure (HClO<sub>4</sub>) mit einer Konzentration zwischen ca. 0,04 und 0,98 mg/l verwendet.

des Exzitations- und des Emissionsmonochromators durchgeführt. Dabei sind beide Monochromatoren zu jeder Zeit auf die gleiche Wellenlänge eingestellt, während der Detektor die Intensität des Signals aufnimmt. Dadurch wird das Produkt aus  $L(\lambda)$  und der Sensitivität des Detektors  $S(\lambda)$  ermittelt. Nach Division durch  $L(\lambda)$  wird  $S(\lambda)$  erhalten, das Korrekturspektrum, durch das die zu korrigierenden Spektren dividiert werden müssen.

Obwohl diese Methode sehr einfach erscheint, beinhaltet sie laut LAKOWICZ [2006] einige Schwierigkeiten. So muss zum Beispiel das Magnesiumoxid frisch und frei von Verunreinigungen sein. Ebenso ist es schwierig, einen guten Quantenzähler zu finden. In PERKIN ELMER [1989] und damit für das Gerät LS-50 wird diese Art der Korrektur mit Chininsulfat in Perchlorsäure vorgeschlagen.

**Korrektur mit Standardlampe** Bei der Korrektur mithilfe einer Standardlampe wird das wellenlängenabhängige Messsignal einer kalibrierten Lichtquelle beobachtet. Hierzu dient zum Beispiel eine Wolframglühlampe, deren Verteilung der von ihr ausgestrahlten Wellenlänge durch die eines schwarzen Körpers bei gleicher Temperatur angenähert werden kann LAKOWICZ [2006]. Auch hier liegt das Verhältnis aus Gl. (2.4) zugrunde. Der relative Photonenausstoß  $L(\lambda)$  wird als Standardspektrum mit der Lampe zur Verfügung gestellt. Die Kalibrierung des Gerätes erfolgt dann, indem zunächst die Intensität  $I$  der Standardlampe in Abhängigkeit von der Wellenlänge  $\lambda$  gemessen wird. Anschließend kann die Sensitivität  $S(\lambda)$  des Gerätes bestimmt werden. Spektren werden korrigiert, indem sie durch den Sensitivitätsfaktor  $S(\lambda)$  dividiert werden.

Dieses Verfahren bedarf LAKOWICZ [2006] zufolge einer sehr genauen Temperaturkontrolle. Zudem variiert das Messsignal der Lampe mit ihrem Alter und Gebrauch.

### 2.3.3 Spektrennormierung

Da Fluoreszenz keine quantitative Größe darstellt, müssen Messdaten, die an unterschiedlichen Geräten aufgenommen wurden, nicht nur um die gerätespezifischen Eigenschaften korrigiert, sondern auch normiert werden, um die Fluoreszenzintensitätswerte miteinander vergleichen zu können. In der Literatur werden dafür viele unterschiedliche Verfahren angewendet, die nicht immer ineinander überführbar sind. Das liegt vor allem daran, dass die Fluoreszenzspektroskopie eine sehr neue Methode ist und bisher wenig Bedarf bestand, die Ergebnisse unterschiedlicher La-

bors oder Geräte miteinander zu vergleichen. Es gibt keine einheitliche Regelung und zum Teil wird in der Literatur nicht genau beschrieben, wie die Normierung der Messungen durchgeführt wurde, was ein eventuelles Vergleichen der Ergebnisse unmöglich macht.

Im Folgenden werden die Möglichkeiten vorgestellt, die sich in der jüngeren Literatur und Forschung durchzusetzen scheinen.

### **Raman-Normierung**

In der Literatur wird der Begriff RAMAN-Normierung für unterschiedliche Arten der Normierung verwendet. Allen gemeinsam ist, dass sie sich des RAMAN-Peaks 1. Ordnung bedienen (vgl. Abschnitt 2.2.2).

In älteren Quellen wird oft ein externer Standard, z. B. MilliQ-Wasser, bei  $\lambda_{\text{ex}} = 350$  nm gemessen und anschließend der RAMAN-Peak 1. Ordnung dieses Spektrums integriert [z. B. MATTHEWS ET AL., 1996 und DETERMANN ET AL., 1994]. Diese Fläche dient als Normierungsfaktor, durch den alle Werte einer Probenmatrix dividiert werden.

In der jüngeren Forschung überwiegen zwei andere Möglichkeiten. BAKER [2005] verwendet eine versiegelte Standardwasserküvette. Es wird das Intensitätsmaximum des RAMAN-Peaks bei  $\lambda_{\text{ex}} = 348$  nm und  $\lambda_{\text{em}} = 395$  bis 400 nm bei einer Spaltbreite von 5 nm ermittelt. Durch Multiplikation wird dieser Intensitätswert auf 20 a. u. eingestellt. Der dazu notwendige Faktor dient als Normierungsfaktor für alle weiteren gemessenen Proben. Messungen der Standardwasserküvette geben weiterhin die Möglichkeit, Veränderungen der Gerätebauteile, wie zum Beispiel die Alterung der Lampe, frühzeitig zu erkennen.

Die sogenannte Interne RAMAN-Normierung nimmt eine Zwischenposition zwischen der hier dargestellten RAMAN-Normierung und der im nächsten Abschnitt besprochenen Normierung auf Eins ein. Dabei wird die Intensität des RAMAN-Peaks bei einer bestimmten Wellenlängenkombination (z. B. 340/384 nm) als Normierungsfaktor verwendet, durch den alle Werte einer Probenmatrix dividiert werden. Dieses Vorgehen wird derzeit am TZW Dresden genutzt, um die Messwerte der zwei Geräte LS-50 und LS-55 miteinander zu vergleichen. Das Verfahren ist sehr einfach, bedarf keiner zusätzlichen Blindwertmessung und liefert bei Proben, die nicht oder nur geringfügig von Inner-Filter-Effekten beeinflusst sind, die gleichen Ergebnisse wie eine RAMAN-Normierung mittels Standardwasserküvette oder eine Normierung auf Eins.

### Normierung auf Eins

Hierbei wird der maximale Fluoreszenzintensitätswert einer Matrix ermittelt und als Normierungsfaktor verwendet, so dass das Maximum der Fluoreszenzintensitätsskala immer Eins beträgt. Diese Art der Normierung findet nach Auskunft der BAM bei verschiedenen Ringversuchen Anwendung.

### Normierung auf Chininsulfat-Äquivalente

Auch die Normierung auf QSE ist verbreitet [COBEL ET AL., 1998; MURPHY, 2008]. Dabei werden die Fluoreszenzintensitätswerte einer Probe umgerechnet in die Konzentration von Chininsulfat in  $\text{ppb}^2$ , die diesen Wert erzielen würde.

## 2.4 Inner-Filter-Effekte

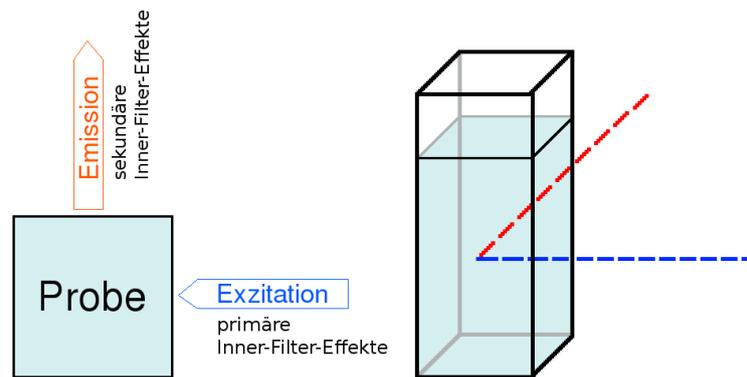
Die Fluoreszenzintensität einer Substanz kann durch sogenannte Inner-Filter-Effekte (IFE) reduziert werden. Dabei wird elektromagnetische Strahlung durch ein Chromophor<sup>3</sup> absorbiert. Dies betrifft sowohl das einfallende als auch das vom Fluorophor emittierte Licht. Die Inner-Filter-Effekte werden in primäre und in sekundäre Inner-Filter-Effekte unterteilt. Abb. 2.5 zeigt eine schematische Darstellung. Unter primären Inner-Filter-Effekten wird die Absorption der einfallenden Strahlung verstanden, in der Abbildung blau gekennzeichnet, so dass nur noch ein verringerter Teil dieser den Fluorophor erreicht und anregen kann. Sekundäre Inner-Filter-Effekte entstehen durch die Absorption der vom Fluorophor emittierten Strahlung, in der Abbildung rot.

Inner-Filter-Effekte werden durch die Konzentration der absorbierenden Stoffe in der Lösung und damit durch ihre Optische Dichte  $O$  beeinflusst. Sie wird beschrieben durch das LAMBERT-BEERSche Gesetz

$$O = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon cd. \quad (2.5)$$

<sup>2</sup>(engl.) parts per billion, Teile in einer Milliarde

<sup>3</sup>(griech.) Farbträger; bezeichnet einen Farbstoff, der einerseits Reflexion und Streuung seines Umgebungslichtes auslöst und andererseits Licht absorbiert. Ein Chromophor kann, muss aber nicht gleichzeitig ein Fluorophor sein.



**Abb. 2.5:** Schematische Darstellung der primären und sekundären Inner-Filter-Effekte. Primäre Inner-Filter-Effekte entstehen, wenn anregende Strahlung von der Lösung absorbiert wird, sekundäre wenn als Fluoreszenz emittierte Strahlung absorbiert wird. Beide haben zur Folge, dass die gemessene Fluoreszenzintensität verringert wird.

Hierbei sind  $I_0$  und  $I$  die Strahlungsintensitäten vor bzw. nach dem Durchgang der Probe,  $\varepsilon$  der molekulare Extinktionskoeffizient,  $c$  die Konzentration der absorbierenden Stoffe und  $d$  die Länge des Weges durch die Probe.

Laut ELIOT-LAIZE ET AL. [2008] können Inner-Filter-Effekte ab einer Optischen Dichte von ca. 0,01 bis 0,06 auftreten und sind bis zu einer Optischen Dichte von 2 korrigierbar.

Um eine Kalibrierung durchzuführen, wird angenommen, dass die Beziehung zwischen Konzentration und Fluoreszenzintensität linear-proportional verläuft. Inner-Filter-Effekte in einer Probe stören jedoch diese Beziehung und führen sogar dazu, dass ab einer bestimmten Konzentration an Chromophoren keine eindeutige Beziehung mehr zwischen Fluoreszenzintensität und Konzentration vorhanden ist. Um dies auszugleichen, wurden verschiedene Korrekturverfahren entwickelt. KORF [2009] beschreibt einige davon ausführlich. Im Folgenden werden die drei für diese Arbeit wichtigen Korrekturverfahren vorgestellt.

### 2.4.1 Mathematische Korrekturverfahren

Mathematische Korrekturverfahren versuchen, eine Korrekturgleichung auf Basis des Messsystems zu erstellen. Beide im weiteren Verlauf vorgestellten Verfahren bedienen sich der Messung einer weiteren Größe, der Optischen Dichte.

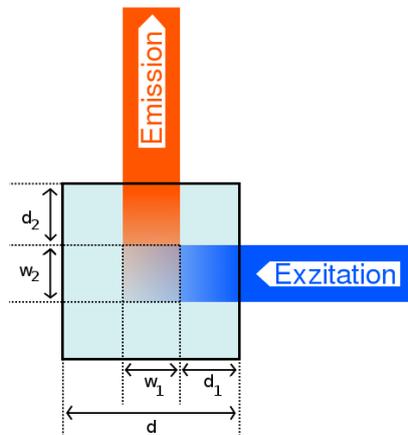
### Korrektur nach GAUTHIER

GAUTHIER ET AL. entwickelten ihr Korrekturverfahren 1986. Es ist eine Weiterentwicklung des Korrekturverfahrens nach PARKER UND BARNES [1957] und berücksichtigt sowohl primäre als auch sekundäre Inner-Filter-Effekte. Das Verfahren nach PARKER UND BARNES [1957] wird in dieser Arbeit nicht vorgestellt, da es lediglich primäre Inner-Filter-Effekte korrigiert [vgl. KORF, 2009].

Die Korrektur nach GAUTHIER wird durch

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \cdot \frac{2,3 \cdot d \cdot O_{\text{ex}}}{1 - 10^{-d \cdot O_{\text{ex}}}} \cdot 10^{d_2 \cdot O_{\text{em}}} \cdot \frac{2,3 \cdot w_2 \cdot O_{\text{em}}}{1 - 10^{-w_2 \cdot O_{\text{em}}}} \quad (2.6)$$

vorgenommen. Dabei sind  $F_{\text{corr}}$  und  $F_{\text{obs}}$  die korrigierten bzw. gemessenen Fluoreszenzintensitäten und  $O_{\text{ex}}$  sowie  $O_{\text{em}}$  die Optischen Dichten bei der Anregung sowie bei der Emissionswellenlänge. Alle weiteren geometrischen Parameter sind Abb. 2.6 zu entnehmen.



**Abb. 2.6:** Schematische Darstellung der Parameter für die Inner-Filter-Effekt-Korrektur nach GAUTHIER. Die Parameter  $d_1$  und  $d_2$  beschreiben die Weglänge des einfallenden Lichtes vom Küvettenrand bis zum Anregungs- und Emissionsort bzw. vom Anregungs- und Emissionsort bis zum Küvettenrand. Die innere Weite der Küvette wird mit  $d$  bezeichnet, während die Parameter  $w_1$  und  $w_2$  die Breite des Bereiches in der Küvette bestimmen, dessen Emission vom Detektor erfasst wird bzw. der durch die Lichtquelle angeregt wird.

**Korrektur nach LAKOWICZ**

Die mathematische Korrektur nach LAKOWICZ wurde 1983 entwickelt und wird mit folgender Gleichung vorgenommen:

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \cdot \exp\left(\frac{O_{\text{ex}} + O_{\text{em}}}{2}\right) \quad (2.7)$$

LAKOWICZ [2006] nimmt an, dass die Weglänge der anregenden Strahlung gleich der der emittierten Strahlung ist und mittelt somit die optischen Dichten. Für die verwendeten Messküvetten mit quadratischem Grundriss trifft dies zu.

**2.4.2 Mathematisch-empirische Korrektur nach LARSSON**

Die mathematisch-empirische Korrektur nach LARSSON ET AL. versucht das Einbeziehen einer weiteren Messgröße wie der Optischen Dichte zu umgehen. Das 2007 entwickelte Verfahren basiert auf der RAMAN-Streuung 1. Ordnung (vgl. Abschnitt 2.2.2). Sowohl RAYLEIGH- als auch RAMAN-Streuung sind abhängig von der Anzahl an Streuzentren in einer Lösung. Da die RAMAN-Streuung ein sehr schwaches Phänomen ist, das entweder sehr hohe Konzentrationen an Streuzentren oder eine starke Lichtquelle, z. B. einen Laser, benötigt, kann in einer wässrigen Lösung nur das Wassermolekül hinreichend viel RAMAN-Streuung erzeugen. Die anderen im Wasser gelösten oder suspendierten Substanzen tragen nur unwesentlich dazu bei. Unterschiede in der Intensität des RAMAN-Peaks sind daher nur auf Inner-Filter-Effekte in der Probe zurückzuführen. Das Korrekturverfahren ist damit nur sehr geringfügig von der Probenzusammensetzung abhängig [LARSSON ET AL., 2007].

Um eine Korrektur nach LARSSON durchzuführen, wird für jedes Emissionsspektrum einer Exzitations-Emissions-Matrix die Fläche unter dem RAMAN-Peak bestimmt und in einem Vektor  $r$ , dem sogenannten RAMAN-Vektor, gespeichert. Dies gilt sowohl für die Blindprobe (z. B. MilliQ-Wasser) als auch für die zu korrigierende Probe. Die Korrektur nach LARSSON wird dann mit folgender Gleichung durchgeführt.

$$s_{\text{corr}}(\lambda_{\text{ex}}) = s_{\text{obs}}(\lambda_{\text{ex}}) \cdot \frac{r_{\text{BW}}(\lambda_{\text{ex}})}{r_{\text{obs}}(\lambda_{\text{ex}})} \quad (2.8)$$

Dabei sind  $s_{\text{corr}}$  und  $s_{\text{obs}}$  das korrigierte bzw. das gemessene Spektrum und  $r_{\text{BW}}$  und  $r_{\text{obs}}$  die RAMAN-Vektoren der Blindprobe sowie der unkorrigierten Probe.

Treten bei der Probe keine Inner-Filter-Effekte auf, so gilt  $r_{\text{obs}} = r_{\text{BW}}$  und der Korrekturfaktor beträgt 1. Sobald jedoch Inner-Filter-Effekte auftreten, gilt  $r_{\text{obs}} < r_{\text{BW}}$ , so dass der Korrekturfaktor größer als 1 wird.

## 2.5 Quenching

Unter Quenching werden Vorgänge verstanden, die eine Verringerung der Fluoreszenzintensität oder Fluoreszenzlebenszeit zur Folge haben. Streng genommen können daher auch Inner-Filter-Effekte zu den Quenching-Effekten gezählt werden [LAKOWICZ, 2006]. In dieser Arbeit findet jedoch eine getrennte Betrachtung statt.

Für Quenching kann es vielerlei Gründe geben wie zum Beispiel Komplexbildung, interne Konversion, Reaktionen des angeregten Zustands oder Energieübertragung auf andere Moleküle. Es kommt jedoch immer vorher zum Kontakt zwischen dem Fluorophor und einem anderen Molekül, dem sogenannten Quencher. Der Mechanismus, der dem Quenching zugrunde liegt, ist abhängig von den chemischen Eigenschaften sowohl des Fluorophors als auch des Quenchers.

Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität  $F(t)$  kann bei einem Quenchingvorgang mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$F(t) = F_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_F}\right) \quad (2.9)$$

Dabei ist  $F_0$  die Fluoreszenzintensität direkt nach der Anregung bei  $t = 0$  und  $\tau_F$  die Fluoreszenzlebensdauer [FRIMMEL UND KUMKE, 1999]. Im Allgemeinen wird die Ordinate auf das Intensitätsmaximum gelegt, so dass  $F_{\text{max}} = F_0$  gilt.

Häufig auftretende Quencher sind molekularer Sauerstoff, Schwermetalle, Halogene und halogenierte Substanzen. Es gibt jedoch noch viele weitere Quencher, die zum Beispiel in LAKOWICZ [2006] aufgelistet werden. Im Rahmen der Trinkwasseraufbereitung ist vor allem das Quenching von Aminosäuren durch Huminstoffe relevant.

Wichtig ist, dass nicht alle Fluorophore von allen aufgezählten Substanzen gequenchet werden. Daher ist ein selektives Quenching eines bestimmten Fluorophors möglich.

Man unterscheidet zwischen zwei verschiedenen Quenchingprozessen, dem statischen und dem dynamischen Quenching. Statisches Quenching wird durch Komplexbildung zwischen Fluorophor und Quencher im Grundzustand hervorgerufen, während dynamisches Quenching durch deren Kollision im angeregten Zustand verursacht wird. Diese zwei Quenchingprozesse werden in den folgenden Abschnitten betrachtet.

Liegt nur eine Art von Quenching vor, lässt es sich mit der STERN-VOLMER-Gleichung

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (2.10)$$

beschreiben. Dabei sind  $F_0$  und  $F$  die Fluoreszenzintensitäten ohne bzw. mit Einfluss des Quenchers und  $[Q]$  die Konzentration des Quenchers.  $K_{SV}$  ist die STERN-VOLMER-Konstante (auch Quenchingkonstante) für dynamisches bzw. statisches Quenching<sup>4</sup>.

### 2.5.1 Dynamisches Quenching

Dynamisches Quenching wird durch die Kollision des Quenchers mit dem Fluorophor hervorgerufen. Befindet sich der Fluorophor dabei im angeregten Zustand, so geht er aus diesem in den Grundzustand über, ohne dass dabei Photonen emittiert werden. Die dabei freiwerdende Energie tritt als Wärme auf. Die Häufigkeit dieser Prozesse nimmt im Allgemeinen mit wachsender Temperatur zu [MESCHÉDE, 2002].

Bei dynamischen Quenchingprozessen kommt es zu einer Abnahme von sowohl Fluoreszenzintensität als auch -lebenszeit.

Die STERN-VOLMER-Konstante für dynamisches Quenching  $K_D$  wird durch

$$K_{SV} = K_D = k_q \tau_0 \quad (2.11)$$

beschrieben. Dabei ist  $k_q$  die bimolekulare Quenchingkonstante und  $\tau_0$  die Fluoreszenzlebenszeit des Fluorophors ohne Quencher [LAKOWICZ, 2006].

---

<sup>4</sup>Bei dynamischem Quenching wird die STERN-VOLMER-Konstante meist mit  $K_D$  bezeichnet, bei statischem mit  $K_S$ .

### 2.5.2 Statisches Quenching

Bei statischem Quenching kommt es vor der Anregung zur Komplexbildung zwischen dem Fluorophor im Grundzustand und einem Quencher. Dieser Komplex ist nicht fluoreszierend. Wenn er Licht absorbiert, relaxiert er sofort wieder in den Grundzustand, ohne dass Photonen emittiert werden [LAKOWICZ, 2006]. Diejenigen Fluorophore, die nicht in Komplexen gebunden sind, können jedoch durch elektromagnetische Strahlung angeregt werden und fluoreszieren. Beim statischen Quenching wird daher nur die Quantenausbeute verringert. Die Fluoreszenzintensität sinkt, nicht aber die Fluoreszenzlebenszeit [FRIMMEL UND KUMKE, 1999].

Die STERN-VOLMER-Konstante für statisches Quenching kann durch die Komplexbildungskonstante  $K_S$  des Komplexes aus Quencher und Fluorophor

$$K_{SV} = K_S = \frac{[\text{FQ}]}{[\text{Q}][\text{F}]} \quad (2.12)$$

beschrieben werden. Dabei sind  $[\text{FQ}]$  und  $[\text{F}]$  die Konzentrationen des Komplexes bzw. des Fluorophors. Die Anfangskonzentration des Fluorophors kann durch

$$[\text{F}]_0 = [\text{F}] + [\text{FQ}] \quad (2.13)$$

ausgedrückt werden. Da angenommen wird, dass der Komplex nicht fluoresziert, ist die resultierende Fluoreszenz des Gemisches allein durch die nicht im Komplex gebundenen Fluorophore zu erklären. Konzentration und Fluoreszenzintensität verhalten sich linear proportional zueinander, weshalb sie in Gl. (2.13) austauschbar sind. Einsetzen von Gl. (2.13) in Gl. (2.12) und anschließendes Umstellen ergeben die STERN-VOLMER-Gleichung (Gl. (2.10)).

### 2.5.3 Darstellung und Interpretation

Die Ergebnisse von Quenchingversuchen können in einem STERN-VOLMER-Plot durch das Auftragen von  $F_0/F$  gegen  $[\text{Q}]$  dargestellt werden, da sich  $F_0/F$  in der Regel linear proportional zur Konzentration des Quenchers verhält. Bei dieser Darstellung schneidet der Graph die Ordinate bei 1 und der Anstieg beschreibt die Konstante  $K_D$  oder  $K_{SV}$ . Ein linearer STERN-VOLMER-Plot zeigt, dass sich in der Lösung nur eine Klasse von Fluorophoren befindet, die dem Quencher alle gleichermaßen zugänglich sind. Wenn zwei deutlich verschiedene Klassen von Fluorophoren in der Lösung vorliegen, von der die eine dem Quencher nicht zu-

gänglich ist, erhält der Graph eine konkave Form. Ein konvexer STERN-VOLMER-Plot hingegen ist ein Hinweis darauf, dass sowohl dynamisches als auch statisches Quenching auftreten.

Um bei einem linearen STERN-VOLMER-Plot zwischen statischem und dynamischem Quenching zu unterscheiden, kann die Fluoreszenzlebensdauer der Fluorophore oder die Fluoreszenz bei verschiedenen Temperaturen der Lösung gemessen werden. Dabei wird ausgenutzt, dass Moleküle bei höheren Temperaturen mobiler sind und daher öfter miteinander kollidieren. Liegt dynamisches Quenching vor, ist die Fluoreszenzintensität bei höheren Temperaturen geringer als bei niedrigeren. Auf statische Quenchingprozesse jedoch hat die Temperatur keinen Einfluss.

### 2.5.4 Kombination aus statischem und dynamischem Quenching

In vielen Fällen wird die Fluoreszenzintensität des Fluorophors sowohl durch statisches als auch durch dynamisches Quenching verringert. Dies kann mit

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D[Q])(1 + K_S[Q]) \quad (2.14)$$

beschrieben werden. Für die Auswertung wird dann die offensichtliche Quenchingkonstante  $K_{app}$  gegen  $[Q]$  aufgetragen, wobei

$$K_{app} = \left( \frac{F_0}{F} - 1 \right) \frac{1}{[Q]} = K_D K_S [Q] + K_D + K_S. \quad (2.15)$$

Daraus resultiert ein linearer Graph mit dem Anstieg  $K_D K_S$  und einem Schnittpunkt mit der  $y$ -Achse von  $K_D + K_S$ . [LAKOWICZ, 2006]

## 2.6 Aquatischer DOC

Der aquatische DOC ist ein Summenparameter, der alle in Gewässern gelösten organischen Verbindungen umfasst. Dazu zählen zum Beispiel Huminstoffe, Proteine und deren Aminosäuren, aber auch organische Schadstoffe. Zu einem gewissen Grad können auch Mikroorganismen wie Bakterien und Algen zum DOC gerechnet werden, obwohl sie zumeist in Suspension vorliegen. Die Summe aller gelösten

und in Suspension vorliegenden organischen Verbindungen in Gewässern wird als totaler organischer Kohlenstoff (TOC, engl. total organic carbon) bezeichnet.

Für die Trinkwasseraufbereitung ist der DOC ein sehr wichtiger Parameter, da er eine schnelle quantitative und qualitative Aussage über Gewässer sowie über Aufbereitungsschritte zulässt.

In diesem Abschnitt werden die Substanzen, die für die Messungen der vorliegenden Arbeit relevant sind, vorgestellt.

### 2.6.1 Huminsäuren

Huminsäuren sind eine Untergruppe der Huminstoffe. Es sind hochmolekulare Verbindungen, die neben anderen Huminstoffen wie zum Beispiel Fulvinsäuren während der chemischen und biologischen Umsetzung von abgestorbenem Pflanzenmaterial zu Humus gebildet werden<sup>5</sup>. Sie kommen in humushaltigen Böden, in Torf und in Braunkohle vor [RÖMPP, 1990].

Ihre Zusammensetzung ist sehr vielfältig und vor allem von der Struktur ihrer Vorläufer abhängig. Huminsäuren bestehen aus einem polyzyklischen Kern und locker gebundenen Polysacchariden, Proteinen, einfachen Phenolen und chelatisierten Metall-Ionen, die über Carboxyl- (-COOH) oder Carbonylgruppen (-CO) an den Kern gebunden sind [RÖMPP, 1990]. Der Kern hat aromatischen Charakter, weshalb Huminsäuren fluoreszieren.

Wasser transportiert Huminstoffe durch den Boden, so dass sie in den Grundwasserleiter oder in Oberflächengewässer gelangen können. Bei der Aufbereitung dieser zu Trinkwasser werden Huminstoffe durch Aktivkohlefilter oder Membranverfahren entfernt, da sie einerseits eine unerwünschte Erniedrigung des pH-Wertes zur Folge haben und andererseits dem Wasser eine gelbliche Färbung geben. Huminsäuren haben zudem eine hohe Zehrung an Desinfektionsmittel und können in Verbindung mit diesem toxische Desinfektionsmittelnebenprodukte wie zum Beispiel Chloroform bilden [FETTIG UND STEINERT].

In der vorliegenden Arbeit werden Huminsäuren des Suwannee Rivers analysiert. Diese werden von der International Humic Substances Society (IHSS) nach einem von ihr ausgewiesenen Extraktionsverfahren hergestellt. Der Suwannee River entspringt dem Okefenokee-Sumpf im Süden Georgias und fließt südwestlich zum Golf von Mexiko. Er gilt als Schwarzwasserfluss, das heißt, er hat sehr hohe

---

<sup>5</sup>Dieser Vorgang wird daher als Humifizierung bezeichnet.

Gehalte an Huminstoffen und einen durchschnittlichen DOC von 25 bis 75 mg/l. Der pH-Wert liegt unterhalb von 4. Aus dem Suwannee River werden zwei Standards extrahiert, I und II (Huminsäure SRS I und SRS II). Für den Vergleich der Fluoreszenzspektrometer sowie für die Untersuchungen der Quenchingeffekte zwischen Huminsäuren und Aminosäuren werden Messungen der Huminsäure SRS II verwendet. Die Bewertung der Inner-Filter-Effekt-Korrekturverfahren wird auf der Grundlage von Messungen der Huminsäure SRS I vorgenommen.

Die Huminsäuren des Suwannee Rivers weisen mehrere charakteristische Fluoreszenz-Peaks in Abhängigkeit ihrer Konzentration auf. Die Emissionswellenlänge liegt jedoch immer im mittleren Wellenlängenbereich zwischen 400 und 550 nm. Bei geringen Konzentrationen um die 15 mg/l liegt ihr Peak bei 240/450 nm<sup>6</sup>, bei steigender Konzentration nimmt die Höhe dieses Peaks ab und zwei weitere bei 400/484 nm bzw. 460/518 nm werden sichtbar [vgl. KORF, 2009].

### 2.6.2 Aminosäuren

Als Aminosäuren werden Carbonsäuren mit einer oder mehreren Aminogruppen (-NH<sub>2</sub>) im Molekül bezeichnet. Aminosäuren, die als Bausteine für Proteine gelten, werden als proteinogene Aminosäuren bezeichnet. Von ihnen sind bisher 22 bekannt. Die Zahl der bekannten, natürlich vorkommenden, nicht-proteinogenen Aminosäuren liegt derzeit bei ca. 250. [RÖMPP, 1990]

Von den proteinogenen Aminosäuren fluoreszieren vier:

- Tryptophan
- Tyrosin
- Phenylalanin
- Histidin

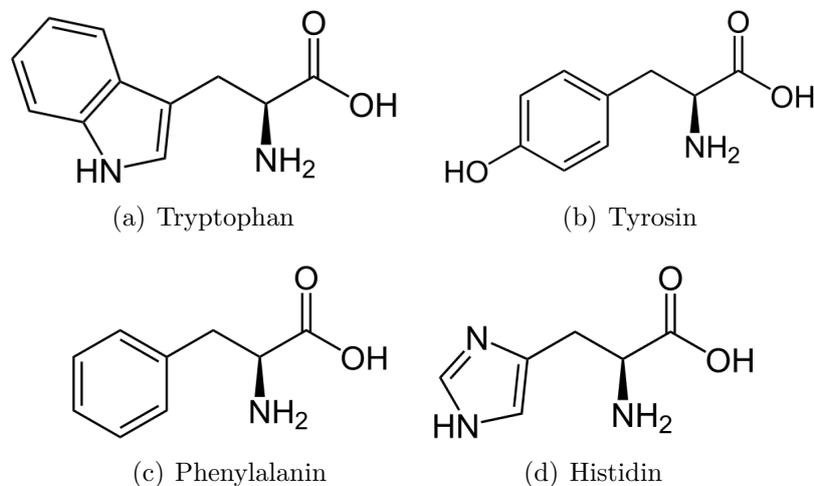
Ihre Strukturformeln sind in Abb. 2.7 dargestellt.

Als essentiell werden diejenigen Aminosäuren bezeichnet, die ein tierischer Organismus für das Leben benötigt, die aber nicht von ihm selbst hergestellt werden können. Zu ihnen gehören Tryptophan und Phenylalanin. Semi-essentielle Aminosäuren müssen nur in bestimmten Situationen vom Körper aufgenommen werden, zum Beispiel während der Wachstumsphase oder bei Mangelerscheinungen. Zu ihnen gehört zum Beispiel Histidin. Tyrosin gehört zur letzten Gruppe, den

---

<sup>6</sup>Bei dieser Schreibweise wird erst die Exzitationswellenlänge und dann die Emissionswellenlänge genannt.

nicht-essentiellen Aminosäuren. Diese werden zumeist vom Körper aus anderen Aminosäuren gebildet [RÖMPP, 1990].



**Abb. 2.7:** Strukturformeln der vier fluoreszierenden Aminosäuren

Ihre fluoreszierenden Eigenschaften verdanken die vier genannten Aminosäuren ihrer aromatischen Grundstruktur, weshalb sie auch als aromatische Aminosäuren bezeichnet werden. Die Intensität der Fluoreszenz ist bei Tryptophan am stärksten. Darauf folgen Tyrosin und Phenylalanin sowie Histidin.

Für die vorliegende Arbeit wird als Vertreter der Aminosäuren Tryptophan verwendet, das zwei Fluoreszenz-Peaks unabhängig von der Konzentration aufweist. Sie liegen bei 220/350 nm und 280/350 nm.

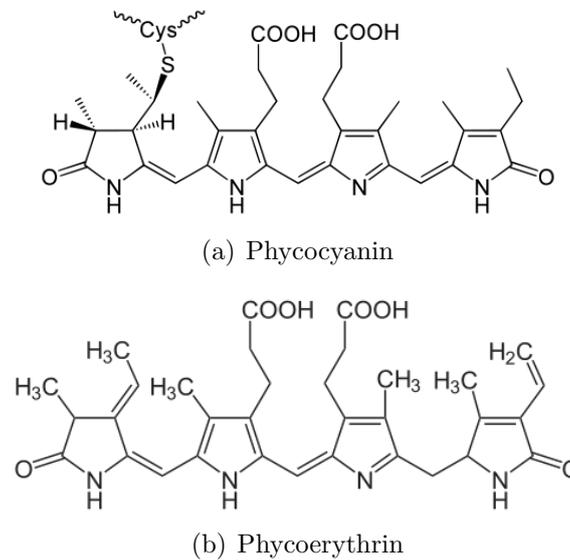
### 2.6.3 Algenpigmente

Wasser, das zu Trinkwasser aufbereitet werden soll, kann in Abhängigkeit seiner Herkunft auch Algen enthalten. Eine Möglichkeit, diese durch die Fluoreszenz zu analysieren, liefern die Eigenschaften der sogenannten akzessorischen Pigmente, die in geringerem Umfang auch gelöst in Wasser vorliegen können. Sie bestehen aus einem Proteinanteil und einer chromophoren Gruppe, was sie fluoreszieren lässt. Akzessorische Pigmente können Licht mit Wellenlängen absorbieren, das von Chlorophyll nicht mehr absorbiert werden kann [RÖMPP, 1990].

Für die vorliegende Arbeit sind Phycocyanin und Phycoerythrin<sup>7</sup>, akzessorische Pigmente von Blau- und Rotalgen, relevant. Phycocyanin ist purpur bis kobalt-

<sup>7</sup>von griech. phykos "Tang"

blau, während Phycoerythrin eine rote Farbe besitzt [RÖMPP, 1990]. Die Strukturformeln der chromophoren Gruppen von Phycoocyanin und Phycoerythrin sind in Abb. 2.8 abgebildet.



**Abb. 2.8:** Strukturformeln der chromophoren Gruppen der Algenpigmente

Sowohl Phycoocyanin als auch Phycoerythrin weisen sehr viele Fluoreszenz-Peaks im gesamten Bereich einer Exzitations-Emissions-Matrix auf. Charakteristisch sind jedoch ihre Peaks bei hohen Anregungs- und Emissionswellenlängen. Für Phycoocyanin liegt der Peak bei 620/645 nm, für Phycoerythrin bei 560/577 nm.

## 2.7 Statistische Verfahren und Bewertungsmethoden

### 2.7.1 KOLMOGOROW-SMIRNOW-Test

Mit Hilfe des KOLMOGOROW-SMIRNOW-Testes kann die Übereinstimmung von zwei Wahrscheinlichkeitsverteilungen geprüft werden. Es kann sowohl geprüft werden, ob zwei Zufallsvariablen die gleiche Verteilung besitzen, als auch ob eine Zufallsvariable einer zuvor angenommenen Wahrscheinlichkeitsverteilung, zum Beispiel der Normalverteilung, folgt [SPIEGEL UND STEPHENS, 1999; XU, 2007].

Die Nullhypothese  $H_0$  und die daraus resultierende Alternativhypothese  $H_1$  heißen dann

$$\begin{aligned} H_0 : F(x) &= F_0(x) \\ H_1 : F(x) &\neq F_0(x), \end{aligned} \tag{2.16}$$

wobei  $F(x)$  die Werte der Stichprobe und  $F_0(x)$  die Werte, die durch die gewählte Verteilung berechnet werden, bezeichnen.

Laut FRANZ [2006] genügt es für den Test, die Differenzen  $d'_i$  und  $d''_i$  an den Sprungstellen der empirischen Funktion, wie in Gl. (2.17) dargestellt, zu betrachten.

$$\begin{aligned} d'_i &= |F(x_{i-1}) - F_0(x_i)| \\ d''_i &= |F(x_i) - F_0(x_i)| \end{aligned} \tag{2.17}$$

Die Laufvariable  $i$  ist mit  $1 \leq i \leq n$  definiert, wobei  $n$  die Anzahl der Stichproben ist. Bei dieser vereinfachten Vorgehensweise berechnet sich die Testgröße  $T$  zu

$$T = d_n = \max(d'_i, d''_i). \tag{2.18}$$

Die Nullhypothese  $H_0$  wird abgelehnt, wenn  $T \geq K_{n,1-\alpha}$  gilt, wobei  $K_{n,1-\alpha}$  der kritische Wert mit dem Stichprobenumfang  $n$  und dem Signifikanzniveau  $\alpha$  ist.  $K_{n,1-\alpha}$  ist entsprechenden Tabellen in der Literatur [SPIEGEL UND STEPHENS, 1999; XU, 2007] zu entnehmen.

In dieser Arbeit findet der KOLMOGOROW-SMIRNOW-Test Anwendung, um eine Stichprobe auf Normalverteilung ihrer Werte zu prüfen. Im Gegensatz zum  $\chi^2$ -Test ist er einerseits wirksamer und andererseits auch für Stichproben mit einem kleineren Umfang geeignet [FRANZ, 2006].

### 2.7.2 Bestimmtheitsmaß

Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  ist für ein lineares Regressionsmodell definiert zu

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}. \tag{2.19}$$

Dabei ist  $i$  die Konzentration,  $n$  die größte, gemessene Konzentration,  $\hat{y}$  der durch die Regressionsgerade berechnete Messwert,  $y$  der Inner-Filter-Effekt-korrigierte

Messwert und  $\bar{y}$  der mittlere Inner-Filter-Effekt-korrigierte Messwert [BACKHAUS ET AL., 2003].

Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  ist ein geläufiger Parameter zur Bewertung der Güte einer Regressionsgerade. Es bewertet die Übereinstimmung eines Modells mit den Messwerten. In der vorliegenden Arbeit sind das die Inner-Filter-Effekt-korrigierten Werte.

Der Wertebereich von  $R^2$  liegt zwischen Null und Eins. Je näher der Wert an Eins liegt, desto besser ist das Modell. Ab einem  $R^2$  von 0,9 spricht man von einer guten Anpassung der Daten durch die Regressionsgerade.

### 2.7.3 Erklärte Varianz

Die Erklärte Varianz nach NASH UND SUTCLIFFE [1970] wird gemäß

$$EV = 1 - \frac{\sum_i \varepsilon_i^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} = 1 - \frac{\sum_i \varepsilon_i^2 - \frac{1}{n}(\sum_i \varepsilon_i)^2}{\sum_i x_i^2 - \frac{1}{n}(\sum_i x_i)^2} \quad (2.20)$$

berechnet. Dabei ist  $\varepsilon_i$  die Differenz zwischen Inner-Filter-Effekt-korrigiertem und durch ein Modell berechnetem Messwert ( $y_i - x_i$ ) bei einer Konzentration von  $i$ . Die Variablen  $x_i$  und  $\bar{x}$  stellen den Inner-Filter-Effekt-korrigierten Wert bzw. den mittleren Inner-Filter-Effekt-korrigierten Wert dar.

Die Erklärte Varianz ist ein vor allem in der Hydrologie verbreiteter Bewertungsmaßstab, der mit nur einem Wert die Güte von Modellen im Verhältnis zu den Messwerten<sup>8</sup> beschreibt. Sie liefert einen Wert zwischen  $-\infty$  und 1, wobei 1 bedeutet, dass die modellierten Daten mit den gemessenen übereinstimmen. Ab einer Erklärten Varianz von 0,4 kann ein Modell als gut akzeptiert werden [SCHÖNWIESE, 2006].

---

<sup>8</sup>Mit Messwerten werden die zu modellierenden Daten gemeint, in dieser Arbeit also die Inner-Filter-Effekt-korrigierten Daten.

# 3 Durchführung der Versuche

## 3.1 Fluoreszenzmessungen

Alle Fluoreszenzmessungen werden, wenn nicht anders vermerkt, an beiden Fluoreszenzspektrometern LS-50 und LS-55 des Herstellers PERKIN ELMER parallel durchgeführt. Als Messzelle dienen Quarzglasküvetten, die ca. 3,5 ml fassen und eine quadratische Grundfläche von 1 cm<sup>2</sup> aufweisen.

In Abhängigkeit von den Auswertungsmethoden werden Punktmessungen, Emissionsspektren und Exzitations-Emissions-Matrizen aufgenommen.

Die  $x$ -Achse einer Exzitations-Emissions-Matrix beschreibt die Emissionswellenlänge und die  $y$ -Achse die Exzitationswellenlänge. In der vorliegenden Arbeit beträgt der Bereich für  $\lambda_{\text{ex}}$  200 bis 620 nm mit einer Schrittweite von 20 nm und für  $\lambda_{\text{em}}$  200 bis 700 nm mit einer Schrittweite von 0,5 nm, wenn nicht anders gekennzeichnet. Die Fluoreszenzintensität wird farbig durch eine Skala von blau über grün und gelb zu rot dargestellt, wobei blau einer Fluoreszenzintensität von Null entspricht. Sie wird in a.u. angegeben. Eventuell durchgeführte Korrekturen und Normierungen werden vermerkt.

Vor dem Einfüllen der Probe wird die Küvette mehrere Male mit MilliQ-Wasser gespült. Wird als Lösungsmittel Ethanol verwendet, wird mit Ethanol gespült. Danach wird die Küvette mit der zu messenden Probe vorgespült, um enthaltene Reste an MilliQ-Wasser bzw. Ethanol zu entfernen. Die Probe wird in die Küvette eingefüllt und anschließend deren Seitenflächen abgetrocknet und von Staub sowie anderen Verunreinigungen gereinigt, bevor sie in das Gerät eingesetzt wird.

Die Küvetten werden bei Bedarf mit einer 2 %igen Lösung des Küvettenreinigungsmittels HELLMANEX der Firma HELLMA GmbH & Co. von außen und innen gereinigt.

Als Lösungsmittel werden MilliQ-Wasser, Phosphatpuffer und Ethanol verwendet. Um MilliQ-Wasser zu erhalten, wird am TZW Dresden destilliertes Wasser

mittels der Aufbereitungsanlage MilliQ<sub>plus</sub> der Firma MILLIPORE und einer Filtration über einen Filter mit Porenweite 0,2  $\mu\text{m}$  aufbereitet.

Phosphatpuffer wird in dieser Arbeit synonym mit 50 mM Phosphatpuffer verwendet. Er wird hergestellt, indem 10,64 g di-Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) und 5,29 g Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) in 1 l destilliertem Wasser gelöst werden. Anschließend erfolgt eine Filtration über einen Membranfilter mit Porenweite 0,2  $\mu\text{m}$  und ein erneutes Verdünnen der Lösung 1:2 mit destilliertem Wasser.

Ethanol wird als 96 %iges Reinstethanol von der Firma SIGMA-ALDRICH bezogen.

Alle Messungen werden, soweit nicht anders erwähnt, bei einer Exzitations- bzw. Emissionsspaltbreite von 10 nm und mit einer Messgeschwindigkeit von 1200 nm/min aufgenommen.

## 3.2 Absorptionsmessungen

Absorptionsspektren werden mit dem UV/VIS-Spektrometer Lambda 25 des Herstellers PERKIN ELMER aufgenommen. Der Wellenlängenbereich beträgt 200 bis 800 nm, die Spaltbreite liegt bei 1 nm und die Geschwindigkeit bei 480 nm/min.

Es wird mit einer Quarzglasküvette, die ein Volumen von ca. 3,5 ml und eine quadratische Grundfläche von 1  $\text{cm}^2$  hat, gemessen.

Um die Küvette zu reinigen, wird sie vor dem Messvorgang mehrmals mit MilliQ-Wasser gespült. Die darauffolgende erste Befüllung mit einer Probelösung wird verworfen, da sie durch Reste von MilliQ-Wasser nicht die gewünschte Konzentration aufweisen würde. Die Küvette wird abgetrocknet und in den Probenhalter eingesetzt.

Das Gerät führt einen Abgleich mit Luft durch. Anschließend werden der Blindwert sowie die Probenlösungen gemessen.

## 3.3 Vergleich der Fluoreszenzspektrometer

Es werden fünf unterschiedliche Substanzen für den Vergleich der Messergebnisse der beiden Fluoreszenzspektrometer herangezogen, die in Tab. 3.1 aufgelistet sind. Die Messungen wurden von KORF im Rahmen ihrer Arbeiten Anfang 2009 ausgeführt und nun im Hinblick auf ihre Vergleichbarkeit analysiert. Die Substanzen

sind so gewählt, dass ihre charakteristischen Peaks an verschiedenen Stellen einer Exzitations-Emissions-Matrix auftreten. Weiterhin sind sie für die Analysen am TZW Dresden auch zukünftig relevant.

**Tab. 3.1:** Substanzen für den Vergleich der Fluoreszenzspektrometer

Substanz	Konzentration [mg/l]	Fluoreszenz-Peak [nm]
Chininsulfat	0,01	220/383
Tryptophan	0,04	220/350 , 280/350
Huminsäure SRS II	10	240/450
Phycocyanin	0,5	620/645
Phycocerythrin	0,1	560/577

### 3.3.1 Exzitationskorrektur

Um bei Messwerten eine Exzitationskorrektur durchzuführen, wird die vom Hersteller PERKIN ELMER in den Geräten hinterlegte Standardkurve verwendet (vgl. Abschnitt 2.3.2). Diese Korrektur wird am TZW Dresden seit Inbetriebnahme der Geräte durchgeführt. Die so korrigierten Daten werden daher auch als Rohdaten bezeichnet.

### 3.3.2 Emissionskorrektur

Für das Aufnehmen der Emissionskorrekturfunktion wird das *Fluoreszenz Standard Kit* von FLUKA verwendet. Jeder Farbstoff sowie der dazugehörige Blindwert wird dabei 10-mal an beiden Geräten gemessen. Anschließend wird ein Mittelwert aus den zehn Messungen gebildet. Die so erhaltenen Daten werden in das Programm *LinkCorr* geladen und ausgewertet. Tab. 3.2 zeigt die Einstellungen von  $\lambda_{\text{ex}}$  und  $\lambda_{\text{em}}$  für die einzelnen Farbstoffe. Die Spaltbreite bei den Messungen beträgt an beiden Monochromatoren 10 nm. Der Cutoff-Filter ist ausgeschaltet, die Anregungskorrektur aktiviert, die Spannung liegt bei 775 V und die Messgeschwindigkeit beträgt 240 nm/min.

Da die Farbstoffe in ihrer Originalkonzentration an beiden Geräten den Messbereich überschreiten, muss eine Verdünnung gewählt werden. Um die Verdünnungsstufe zu ermitteln, wird Farbstoff C, der das größte Signal hervorruft, so

**Tab. 3.2:** Messbereiche für die Farbstoffe

Farbstoff	$\lambda_{\text{ex}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em}}$ [nm]
A	280	300 – 450
B	315	330 – 530
C	380	390 – 600
D	420	450 – 700
E	550	570 – 760

lange verdünnt, bis er im Messbereich liegt. Daraus resultiert eine Verdünnung von 1:40, die auf alle anderen Farbstoffe übertragen wird.

### 3.3.3 Normierung

Nach der Emissionskorrektur wird eine Normierung durchgeführt. Im Rahmen der Auswertung wird die Interne RAMAN-Normierung und die Normierung auf 1 durchgeführt und betrachtet.

Aufgrund der Einstellungen bei den Messungen wird die Intensität des RAMAN-Peaks bei 340/384 nm verwendet.

## 3.4 Bewertung der Inner-Filter-Effekt-Korrekturmethode

Im Rahmen der Betrachtung der Korrektur von Inner-Filter-Effekten werden mehrere Schritte durchgeführt. Zunächst wird die Methodik der LARSSON-Korrektur aufgearbeitet und gegenüber KORF [2009] verbessert sowie differenzierter betrachtet.

Anschließend wird eine Linearitätsbetrachtung aller Korrekturmethode durchgeführt. Dies beruht auf der Annahme, dass ein linear-proportionales Verhältnis zwischen Fluoreszenzintensität und Konzentration besteht. Es wird mittels des Bestimmtheitsmaßes  $R^2$  geprüft, wie linear die durch die Korrektur entstandene Kurve ist.

Anschließend wird diskutiert, warum die LARSSON-Korrektur für die betrachteten Probelösungen nicht geeignet ist.

### 3.4.1 Korrektur nach LARSSON

Aufgrund der Annahme, dass die Berechnung der Flächeninhalte für die Korrektur nach LARSSON in KORF [2009] nicht hinreichend genau durchgeführt wurde, werden sie in dieser Arbeit wiederholt. KORF [2009] hat die Berechnung der Fläche des RAMAN-Peaks durch die Anpassung zweier GAUSS-Kurven vorgenommen, wobei die zweite GAUSS-Kurve den vor dem RAMAN-Peak erscheinenden RAYLEIGH-Peak darstellt.

In der vorliegenden Arbeit werden zwei unterschiedliche Methoden für die Berechnung der Fläche des RAMAN-Peaks herangezogen. Zum einen wird der Flächeninhalt des RAMAN-Peaks der Originaldaten mithilfe der Trapezformel integriert und zum anderen wird eine Kurvenanpassung des RAMAN-Peaks mittels einer GAUSS-Kurve durchgeführt (ohne gleichzeitige Betrachtung des RAYLEIGH-Peaks), die dann wiederum integriert wird. Für die Kurvenanpassung wird einerseits das Programm *MatLab* (THE MATHWORKS, INC.) und andererseits eine am TZW sich in Entwicklung befindliche Software verwendet. Die Integrationsgrenzen für die Trapezformel werden als die Minima zwischen RAYLEIGH- und RAMAN-Peak bzw. zwischen RAMAN- und Fluoreszenz-Peak bestimmt. Für das Integrieren der GAUSS-Kurve liegen die Integrationsgrenzen bei  $\pm 3\sigma$ .

Ein Online-Messverfahren, wie es derzeit am TZW Dresden entwickelt wird, setzt eine weitgehende Automatisierung des Korrekturverfahrens voraus. Für die Berechnung der Stelle des RAMAN-Peaks findet daher Gl. (2.2) Anwendung.

### 3.4.2 Linearität der Daten nach Inner-Filter-Effekt-Korrektur

Grundlage hierfür sind die Messungen des Huminsäurestandards I des Suwannee Rivers. Es werden Konzentrationen von 1 bis 100 mg/l betrachtet, die von KORF Mitte März 2009 gemessen wurden.

Die vorgestellten Inner-Filter-Effekt-Korrekturverfahren werden nur für den Huminsäurepeak bei 240/450 nm angewendet, da er einerseits außerhalb des Streulichteinflusses liegt und andererseits davon auszugehen ist, dass die Analysen der anderen Fluoreszenz-Peaks keine abweichenden Ergebnisse liefern [vgl. KORF, 2009]. In der vorliegenden Arbeit wird eine lineare Regression als Bewertungsgrundlage für die Korrekturverfahren hinzugezogen, deren Güte mittels des Bestimmtheitsmaßes  $R^2$  angegeben wird. Diese Vorgehensweise bietet ein neutraleres

Kriterium als die von KORF [2009] *ad hoc* eingeführte Bewertung mittels einer angenommenen Kalibriergeraden.

Da absehbar ist, dass die einzelnen Korrekturmethode bei Einbeziehen höherer Konzentrationen an Huminstoffen weniger erfolgreich korrigieren, wird der Bereich der Konzentrationen für die Regression begrenzt. Die betrachteten Bereiche sind jeweils von 0 bis 100 mg/l, 60 mg/l, 40 mg/l, 30 mg/l, 20 mg/l und 10 mg/l.

#### **3.4.3 Betrachtungen zur Korrektur nach LARSSON**

Um den Einfluss der Konzentration auf die Streulichtpeaks, besonders den RAMAN-Peak, zu beurteilen, werden Analysen mit Messungen unterschiedlicher Konzentration an Tryptophan sowie Huminsäure SRS I betrachtet. Tryptophan dient dabei als Beispiel eines Stoffes, der keinen Inner-Filter-Effekten unterliegt wohingegen die Huminsäuren sehr starke Inner-Filter-Effekte hervorrufen. Die Analysen werden statistisch mittels des KOLMOGOROW-SMIRNOW-Testes ausgewertet.

### **3.5 Untersuchungen zum Quenching von Aminosäuren durch Huminsäuren**

Für die Untersuchungen zum Quenchingverhalten von Huminsäuren und Aminosäuren werden die Substanzen Huminsäure SRS II und Tryptophan in 50 mM Phosphatpuffer gelöst. Es ist zu erwarten, dass die Huminsäure die Fluoreszenz von Tryptophan auslöscht. Die zwei Substanzen werden sowohl einzeln als auch in Mischungen gemessen. Für die Huminsäure werden Konzentrationen zwischen 0,25 und 10 mg/l und für Tryptophan Konzentrationen zwischen 25 und 400  $\mu\text{g/l}$  gewählt. Dabei wird jede Konzentration Huminsäure mit jeder Konzentration Tryptophan kombiniert.

Betrachtet wird die Fluoreszenzintensität an den beiden Punkten 220/340 und 280/340 nm, die in dieser Arbeit auch als Tryptophan-Peak 1 und 2 bezeichnet werden. Sie sind beide so gewählt, dass sie Fluoreszenz-Peaks von Tryptophan sehr nahe kommen, aber nicht genau das Maximum darstellen. Diese Auswahl beruht auf der Tatsache, dass das Maximum nicht immer exakt bei demselben  $\lambda_{\text{em}}$  erscheint.

### 3.5.1 Korrektur der Ergebnisse der Quenchingversuche

Die Messwerte werden Emissions-korrigiert, Intern RAMAN-normiert und Inner-Filter-Effekt-korrigiert. Um die Korrektur der Inner-Filter-Effekte mit der Methode nach LAKOWICZ durchführen zu können, müssen Absorptionsspektren aufgenommen werden. Da einerseits nicht bekannt ist, wie der Einfluss von Tryptophan auf die Absorption von Huminsäure SRS II ausfällt, und andererseits über die Absorption von Tryptophan bei Konzentrationen über 200  $\mu\text{g/l}$  bisher keine Studien durchgeführt wurden, werden alle Verdünnungsstufen gemessen.

### 3.5.2 Modellierung

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Quenching zwischen Huminsäure SRS II und Tryptophan werden mittels eines Modells nachgebildet. Um die Güte des Modells zu bewerten, wird die Erklärte Varianz nach NASH UND SUTCLIFFE [1970] herangezogen.



# 4 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Untersuchungen dargestellt, analysiert und interpretiert. Zunächst wird eine Standardisierung<sup>1</sup> der Messergebnisse der beiden Fluoreszenzspektrometer durchgeführt, da die Vergleichbarkeit der Messungen als Voraussetzung für alle weiteren Untersuchungen gilt. Anschließend werden die Korrekturverfahren für Inner-Filter-Effekte bewertet sowie die Ergebnisse der Quenchingversuche dargestellt.

Für die Auswertung der Daten wird das Programm *MatLab* Version 7.4.0.R2007a (THE MATHWORKS, INC.) sowie eine am TZW Dresden entwickelte Software zum Bearbeiten von Exzitations-Emissions-Matrizen verwendet.

## 4.1 Vergleich der Fluoreszenzspektrometer

Am Beispiel von 40  $\mu\text{g/l}$  Tryptophan in 50 mM Phosphatpuffer werden die Messergebnisse der zwei Fluoreszenzspektrometer verglichen. Sie sind in Abb. 4.2 zu sehen. Die Exzitations-Emissions-Matrizen für weitere Substanzen befinden sich im Anhang B.

Obwohl alle Matrizen in einem Bereich von  $200 \text{ nm} \leq \lambda_{\text{em}} \leq 700 \text{ nm}$  aufgenommen wurden, wird aufgrund der Emissionskorrektur für die Auswertung nur der Bereich ab  $\lambda_{\text{em}} = 300 \text{ nm}$  herangezogen.

### 4.1.1 Exzitationskorrektur

Da der Hersteller PERKIN ELMER bereits ein Exzitationskorrekturspektrum in den Geräten hinterlegt hat, wird dieses für die Korrektur verwendet. Dies entspricht dem bisherigen Messvorgang am TZW Dresden. Für 40  $\mu\text{g/l}$  Tryptophan

---

<sup>1</sup>Als Standardisierung wird im Folgenden die Exzitations- sowie Emissionskorrektur und die Normierung von Daten bezeichnet. In dieser Arbeit wird eine Interne RAMAN-Normierung mit dem Punkt 340/384 nm vorgenommen.

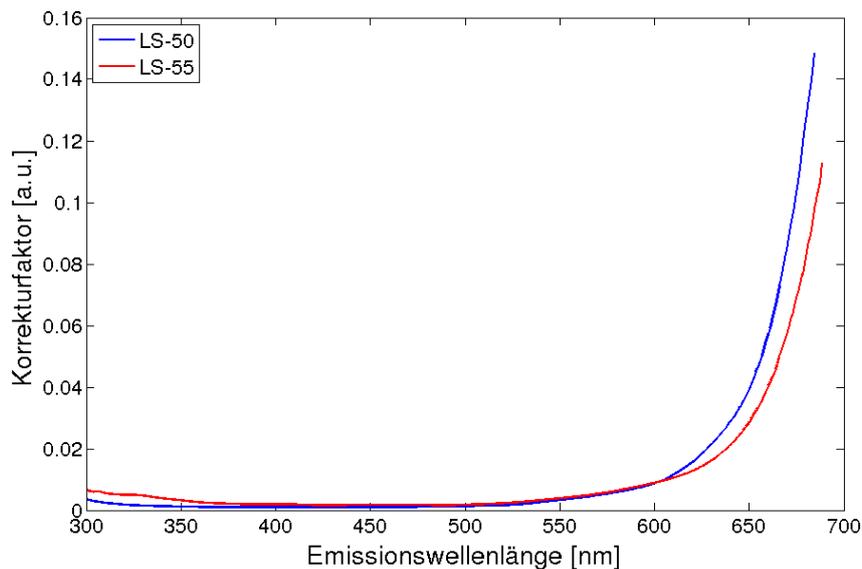
sind sie in den Abb. 4.2(a) und 4.2(b) zu sehen. Es sind große Unterschiede zwischen den beiden Exzitationas-Emissions-Matrizen zu erkennen, die vor allem in der detektierten Fluoreszenzintensität liegen. Am LS-50 werden Fluoreszenzintensitätswerte bis 200 a.u., am LS-55 sogar über 500 a.u. erreicht. Dadurch wirkt auch die Form der Peaks bei gleicher Skalierung sehr unterschiedlich. Es scheint, als seien die Fluoreszenz-Peaks am LS-50 kleiner als am LS-55.

Da jedoch keine weiteren Korrekturen vorgenommen wurden, sind diese zwei Abbildungen nur bedingt miteinander vergleichbar.

Leider gibt es keine Möglichkeit, den Verlauf der Korrekturfunktion der beiden Geräte einzusehen.

### 4.1.2 Emissionskorrektur

Die Emissionskorrekturfunktion wird mithilfe des FLUKA Fluoreszenz Standard Kits (siehe dazu Abschnitt 3.3.2) aufgenommen. Abb. 4.1 zeigt die Korrekturfunktionen der beiden Geräte. Es ist deutlich zu sehen, dass sie im Bereich zwischen



**Abb. 4.1:** Emissionskorrekturfunktionen der Geräte LS-50 und LS-55 am TZW Dresden. Bei  $300 \text{ nm} \leq \lambda_{\text{em}} \leq 600 \text{ nm}$  sind keine großen Unterschiede zwischen den Geräten zu erkennen. Die Graphen verlaufen nahezu konstant. Ab  $\lambda_{\text{em}} > 600 \text{ nm}$  ist ein starker Anstieg der Graphen zu verzeichnen und auch die Unterschiede zwischen den Geräten werden deutlicher. In diesem Bereich ist daher mit deutlichen Verformungen der Peaks im Vergleich zu Peaks bei kleineren Emissionswellenlängen zu rechnen.

300 und 600 nm Emissionswellenlänge einen sehr ähnlichen und fast konstanten Verlauf haben. Beim Betrachten von Spektren, die an einem Gerät gemessen wurden, ist die Verformung der Fluoreszenz-Peaks in diesem Bereich relativ gering. Gleiches gilt auch für den Vergleich von Spektren zwischen den beiden Geräten.

Im Bereich zwischen 600 und 700 nm Emissionswellenlänge steigen beide Korrekturfunktionen stark an. Auch der Unterschied zwischen den beiden Geräten wird größer. Das bedeutet, dass hier die Verformungen der Fluoreszenz-Peaks im Gegensatz zu den kleineren Wellenlängen sehr stark ausfallen und auch die Differenzen zwischen den beiden Geräten zunehmen. Die Fluoreszenz-Peaks der Algenpigmente in diesem Bereich werden durch eine Emissionskorrektur verbreitert und gewinnen gegenüber den Fluoreszenz-Peaks bei kleinerem  $\lambda_{em}$  an Intensität.

Diese Form der Emissionskorrektur lässt, wie auch alle anderen der in Abschnitt 2.3.2 aufgeführten Möglichkeiten, eine Korrektur erst ab 300 nm in der Emissionswellenlänge zu. Um zu klären, ob und wie auch bei einem kleineren  $\lambda_{em}$  eine Korrektur möglich ist, müssen die Methoden zum Aufnehmen der Korrekturfunktion eingehender untersucht werden. Eine Literaturrecherche dazu steht noch aus.

Es ist keine Aussage darüber möglich, wie der Verlauf der Korrekturfunktionen bei  $\lambda_{em} < 300$  nm aussieht. Bei kleiner werdenden Emissionswellenlängen driften die Korrekturfunktionen beider Geräte langsam auseinander. Der Bereich mit  $\lambda_{em} < 300$  nm ist in Spektren und Exzitations-Emissions-Matrizen daher kritisch zu betrachten. Für die Abbildungen in diesem Abschnitt wird dieser Bereich weggeschnitten und fließt nicht in die Betrachtung ein.

Die Auswirkungen, die die Emissionskorrektur auf die Spektren hat, sind visuell nur sehr schwach bis gar nicht zu erkennen. Die Fluoreszenz-Peaks verändern sich nur unwesentlich, da sie sich im konstanten Bereich der Korrekturfunktion befinden. Vor allem die Breite der Peaks vergrößert sich. Jedoch behalten sie ihre Hauptform und -ausprägung bei. Schwierigkeiten bei der Beurteilung bereiten immer noch die sehr unterschiedlich ausfallenden Fluoreszenzintensitätswerte. Dies ist deutlich in den Abb. 4.2(c) und 4.2(d) zu sehen. Auch nach diesem Schritt der Spektrenkorrektur sind Unterschiede zwischen den zwei Geräten immer noch hauptsächlich in den Fluoreszenzintensitätswerten auszumachen. Das Maximum liegt am LS-50 bei ca. 0,2 a.u. und am LS-55 bei über 1 a.u.

Vergleicht man Abb. 4.2(b) und 4.2(d) miteinander, so ist festzuhalten, dass der obere Peak, der sein Maximum bei ca. 280/250 nm hat, im Vergleich zum unteren

Peak bei ca. 220/350 nm an Intensität gewinnt. Farblich wird dies durch eine Verschiebung zu rot im Peak-Maximum deutlich. Durch die Emissionskorrektur wird also der obere Peak aufgewertet.

### 4.1.3 Normierung

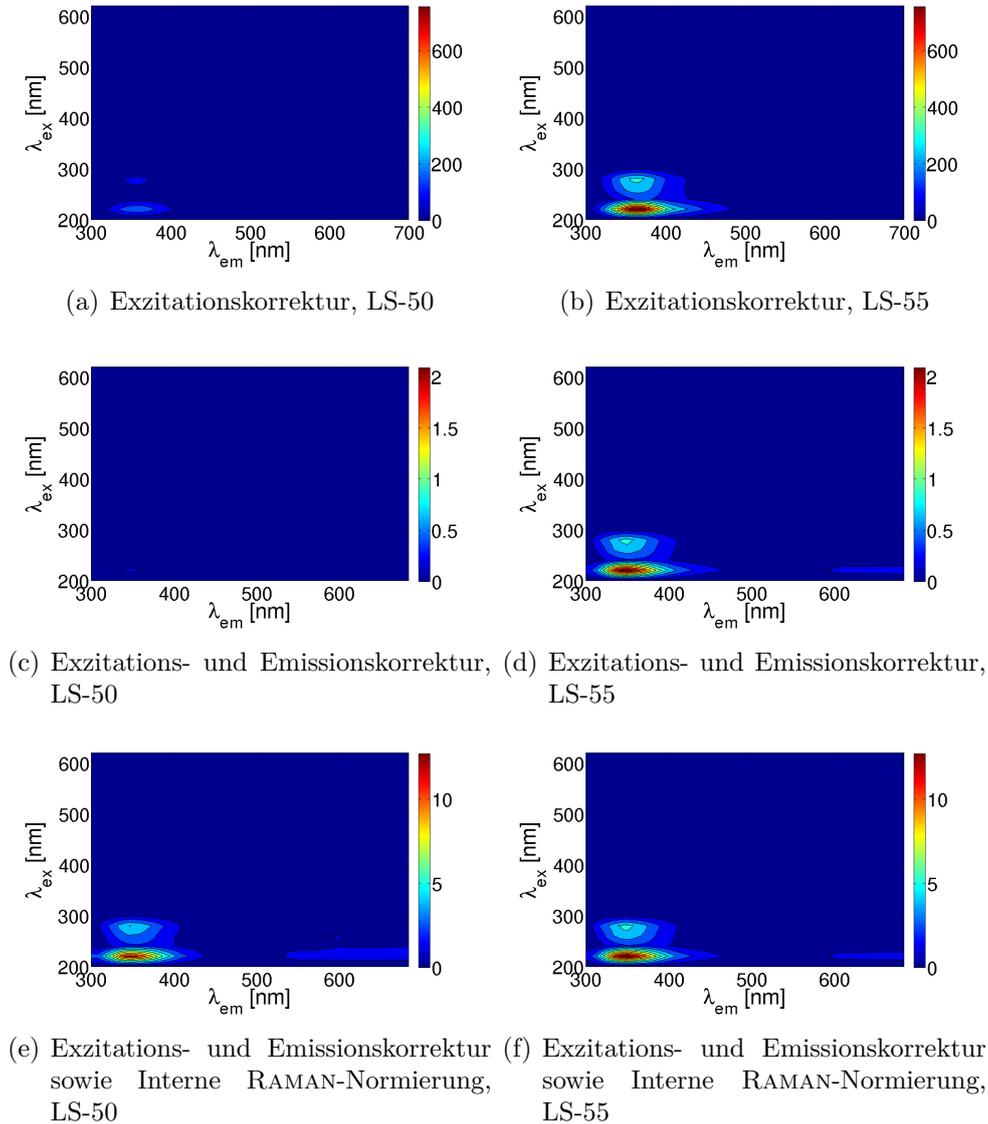
Nach dem Durchführen einer Internen RAMAN-Normierung sind die Messergebnisse einer Probe an zwei verschiedenen Geräten direkt miteinander vergleichbar. Dies liefert bei den durchgeführten Versuchen die gewünschten Ergebnisse. Die Matrizen des LS-50 und des LS-55 sind der Form und den Fluoreszenzintensitäten nach nahezu gleich. Die Abb. 4.2(e) und 4.2(f) zeigen dies für Tryptophan. Gleiches gilt auch für die anderen betrachteten Stoffe, deren Exzitations-Emissions-Matrizen im Anhang B zu finden sind.

### 4.1.4 Fazit

Die Substanzen für diese Untersuchung wurden so gewählt, dass ihre Maxima in verschiedenen Bereichen einer Exzitations-Emissions-Matrix auftreten. Durch das Durchführen von geeigneten Korrekturen sowie einer Normierung konnte gezeigt werden, dass die Messergebnisse der beiden Geräte LS-50 und LS-55 in allen betrachteten Bereichen der Exzitations-Emissions-Matrix identisch sind. Anders als bisher vermutet sind die Unterschiede in den Rohdaten auf bauteilbedingte Artefakte der Geräte zurückzuführen. Für die Vergleichbarkeit der Messergebnisse zweier Geräte ist es daher zwingend notwendig, sowohl Exzitations- und Emissions-Korrekturen als auch eine Normierung der Fluoreszenzintensitätswerte nach gleicher Methodik vorzunehmen.

Am Verlauf der Emissionskorrekturfunktionen ist zu erkennen, dass Fluoreszenz-Peaks ab einem  $\lambda_{em}$  von 600 nm durch die Emissionskorrektur stark an Intensität zunehmen. Die Verformungen in diesem Bereich sind im Vergleich zu  $\lambda_{em} < 600$  nm sehr stark. Dieses Verhalten ist anhand der Messungen der Algenpigmente Phycocyanin und Phycoerythrin gut zu erkennen (Abb. B.3 und B.4). Die charakteristischen Fluoreszenz-Peaks werden hervorgehoben.

Messungen im mittleren Wellenlängenbereich von  $\lambda_{ex}$  und  $\lambda_{em}$  sind nicht so stark von Verformungen betroffen und können daher in geringem Umfang ohne vorheriges Durchführen einer Emissionskorrektur miteinander verglichen werden. Eine Normierung bleibt dennoch Voraussetzung.



**Abb. 4.2:** Auswirkungen der Korrekturen und Normierung bei einer Lösung von  $40 \mu\text{g/l}$  Tryptophan in  $50 \text{ mM}$  Phosphatpuffer, Messung vom 11.03.2009, Fluoreszenz-Peaks bei  $220/350$ ,  $280/350$  nm. Die Bilder zeigen die Ergebnisse der Messung nach Exzitationskorrektur, nach zusätzlicher Emissionskorrektur und nach anschließender Normierung.

In dieser Arbeit wird lediglich die Interne RAMAN-Normierung verwendet, da keine Messungen der Standardwasserküvette vorliegen. Diese Form der Normierung ist sehr einfach, kann aber auch großen Schwankungen unterliegen, da der RAMAN-Peak innerhalb einer Probe vielen Einflüssen, zum Beispiel durch Verun-

reinigungen, unterliegt. Für eine schnelle Auswertung der Proben kann sie verwendet werden, sollte jedoch verifiziert werden.

Wird MilliQ-Wasser aus der hauseigenen Anlage als Standard für die RAMAN-Normierung verwendet, so haben Schwankungen der Anlage und des Rohwassers Einfluss auf die unter Umständen konstante Probe. Der RAMAN-Peak innerhalb der Probe jedoch unterliegt den gleichen Schwankungen wie die Probe selbst. Die Normierung auf Werte innerhalb einer Messung (Interne RAMAN-Normierung) ist daher der Normierung auf Werte externer Standards vorzuziehen, da diese Schwankungen unterliegen können.

Aus einer Normierung auf das Maximum innerhalb einer Probenmatrix, wie es bei einer Normierung auf Eins der Fall ist, resultiert immer die gleiche Skalierung. Dies hat zur Folge, dass zwar Messungen an zwei Geräten miteinander verglichen, aber Proben unterschiedlicher Konzentrationen nicht mehr voneinander unterschieden werden können. Um eine Kalibrierung durchzuführen, bei der jede Exzitations-Emissions-Matrix mit einer beliebigen anderen desselben Stoffes verglichen werden kann, ist diese Form der Normierung ungeeignet.

Unter der Annahme, dass die Standardwasserküvetten vom Hersteller PERKIN ELMER keinen äußeren Einflüssen unterliegen, liefern sie beim Messen konstante Werte, die lediglich durch die Geräteeigenschaften beeinflusst werden. Eine Normierung auf Messwerte der Standardwasserküvette ist daher jeder anderen Form der Normierung vorzuziehen, wenn ein hohes Maß an Vergleichbarkeit der Ergebnisse gefragt ist. Daher wird diese Form der Normierung für zukünftige Messungen am TZW Dresden als Standard vorgeschlagen.

## 4.2 Bewertung der Inner-Filter-Effekt-Korrekturmethode

In diesem Abschnitt wird für die Untersuchungen lediglich eine Inner-Filter-Effekt-Korrektur der Rohdaten durchgeführt. Das bedeutet nicht, dass Emissions-korrigierte sowie normierte Daten nicht Inner-Filter-Effekt-korrigiert werden können. Da es jedoch um eine Betrachtung der Vorgehensweise und Bewertung der verschiedenen Korrekturverfahren geht, werden die Schritte zur Standardisierung von Messergebnissen vernachlässigt.

### 4.2.1 Linearität der Daten nach Inner-Filter-Effekt-Korrektur

In Tab. 4.1 ist das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  für die einzelnen Inner-Filter-Effekt-Korrekturverfahren zu sehen. Die erste Spalte gibt dabei an, bis zu welcher Konzentration die Messwerte für den Huminsäure-Peak 240/450 nm bei der Regression einbezogen wurden. Je geringer dabei die maximale Konzentration ist, desto besser werden die Werte des Bestimmtheitsmaßes  $R^2$ . Dies gilt für alle Korrekturverfahren an beiden Geräten. Es bedeutet, dass die korrigierten Werte bei geringerer maximaler Konzentration näher an der Regressionsgeraden liegen als bei höheren Werten der maximale Konzentration.

**Tab. 4.1:** Bestimmtheitsmaß  $R^2$  für die Regressionsgeraden der Inner-Filter-Effekt-korrigierten Werten sowie der Messwerte bei Huminsäure SRS I. Für die Messwerte liegt  $R^2$  immer unterhalb der  $R^2$ -Werte der Korrekturverfahren.

Konzentration [mg/l]	Messwert	GAUTHIER	LAKOWICZ	LARSSON GAUSS	LARSSON Trapez
LS-50					
bis 100	0,3666	0,0238	0,4655	0,0269	0,1672
bis 60	0,0401	0,5424	0,9046	0,6840	0,8134
bis 40	0,1452	0,8164	0,9449	0,8842	0,9577
bis 30	0,4884	0,9282	0,9771	0,8017	0,9228
bis 20	0,7856	0,9662	0,9814	0,9779	0,9554
bis 10	0,9529	0,9938	0,9957	0,9941	0,9989
LS-55					
bis 100	0,0060	0,5618	0,9075	0,8505	0,1420
bis 60	0,3346	0,9615	0,9906	0,9521	0,8063
bis 40	0,6025	0,9815	0,9992	0,9888	0,9195
bis 30	0,7615	0,9893	0,9991	0,9803	0,9055
bis 20	0,9049	0,9940	0,9981	0,9884	0,9368
bis 10	0,9778	0,9994	0,9996	0,9909	0,9982

Gut zu sehen ist der große Unterschied bei hohen Konzentrationen zwischen dem Korrekturverfahren nach LARSSON und den Korrekturverfahren nach LAKOWICZ und GAUTHIER, wobei der Unterschied zwischen letzteren deutlich geringer ist. Dennoch sind die Werte für LAKOWICZ in fast allen Fällen die besseren. Das bedeutet letztendlich, dass die Methode nach LAKOWICZ von den drei betrachteten

am besten geeignet ist, um aus Inner-Filter-Effekt-beeinflussten Messungen einen linear-proportionalen Zusammenhang zu erhalten.

Beim Vergleich der zwei Methoden für die Korrektur nach LARSSON fällt auf, dass die Integration mittels Trapezformel bei geringeren Konzentrationen bessere Werte für  $R^2$  liefert als die Integration der GAUSS-Kurve. Die Integration mittels Trapezformel wird in auch in LARSSON ET AL. [2007] verwendet.

Durch die Verbesserung der Durchführung der Korrektur nach LARSSON gegenüber KORF [2009] konnten keine deutlich unterschiedlichen Ergebnisse im Rahmen der Bewertung erreicht werden. Auch KORF [2009] kommt zu dem Schluss, dass die Korrektur nach LAKOWICZ die am besten geeignete unter den betrachteten Korrekturen ist, und diese Aussage wird durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen bestätigt.

In KORF [2009] wird die Konzentration, bis zu der Inner-Filter-Effekte bei Huminsäure SRS I korrigierbar sind, mit 60 mg/l am LS-50 und 80 mg/l am LS-55 festgelegt. Dies wird auf den Punkt der Umkehrung zurückgeführt, ab dem es keine eindeutige Zuordnung mehr zwischen Fluoreszenzintensität und Konzentration gibt.

Die Korrektur erreicht den linearen Bereich, wenn der Wert des Bestimmtheitsmaßes  $R^2$  0,9 oder mehr beträgt. Das trifft am LS-50 bis zu einer Konzentration von 60 mg/l und am LS-55 bis zu einer Konzentration von 100 mg/l zu. Die Optischen Dichten betragen 2,0 bzw. 2,4. Die so ermittelten Konzentrationen unterscheiden sich nur am LS-55 von den von KORF [2009] ermittelten. Da die Optische Dichte bei 100 mg/l Huminsäure SRS I die maximale Optische Dichte von 2, bis zu der eine Korrektur von Inner-Filter-Effekten laut ELIOT-LAIZE ET AL. [2008] möglich ist, deutlich überschreitet, ist anzunehmen, dass die Grenze am LS-55 niedriger liegt als die hier ermittelte. Dies ist auf die gewählten Schrittfolge zurückzuführen.

Trotz der veränderten Durchführung der Korrektur nach LARSSON und des anderen Bewertungsverfahrens erreicht die Korrektur nach LAKOWICZ die beste Bewertung. Das Ausscheiden der Korrektur nach LARSSON wird daher im nächsten Abschnitt diskutiert.

#### **4.2.2 Betrachtungen zur Korrektur nach LARSSON**

Der große Vorteil einer Inner-Filter-Effekt-Korrektur nach LARSSON liegt im Hinblick auf die Erstellung eines Online-Messverfahrens darin, dass keine zusätzli-

chen Messungen (zum Beispiel Absorptionsmessungen) durchgeführt werden müssen und daher auch kein zusätzliches Messgerät gerätespezifische Fehler eintragen kann. Daher lohnt es sich, darüber nachzudenken, warum die Korrektur nach LARSSON sowohl in dieser Arbeit als auch in der vorangegangenen von KORF [2009] als ungeeignet bewertet wird.

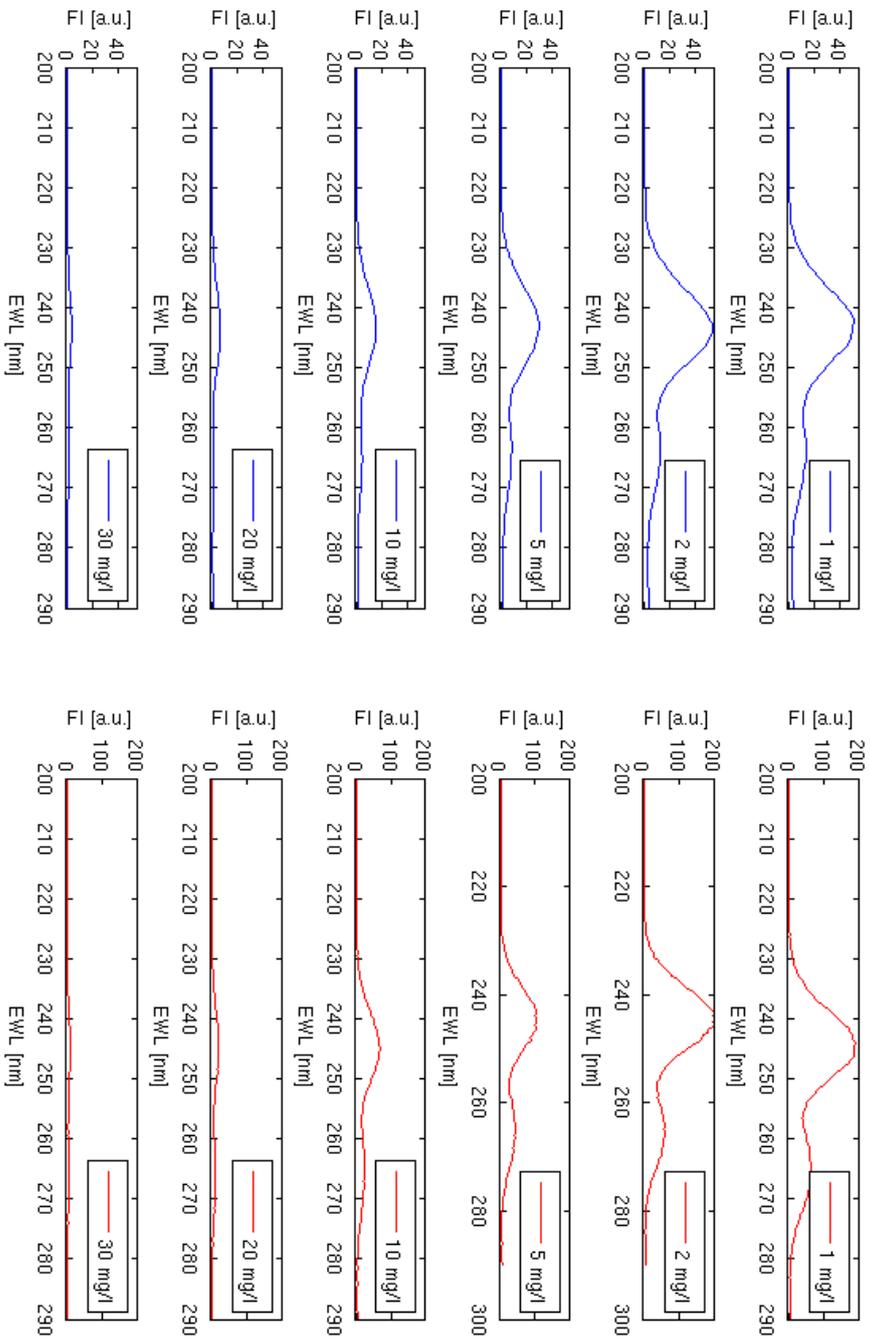
Da der RAMAN-Peak durch hohe Konzentrationen von Huminsäure und damit Inner-Filter-Effekten stark beeinflusst, das heißt verringert, wird und teilweise unter dem Fluoreszenz-Peak verschwindet, ist eine Anpassung mittels GAUSS-Kurve, aber auch jede andere Form der Berechnung des RAMAN-Peaks nicht möglich. In KORF [2009] wird das Ausscheiden der Korrektur nach LARSSON damit begründet, dass das gewählte Verfahren zur Berechnung des RAMAN-Peaks<sup>2</sup> falsche Ergebnisse liefert. Eine andere Form der Berechnung innerhalb der Korrektur nach LARSSON ist KORF [2009] zufolge nicht möglich, da das Berechnungsverfahren automatisch durchführbar sein muss. Jedoch weisen auch die im Rahmen dieser Arbeit gewählten Verfahren für die Durchführung der Korrektur nach LARSSON ein hohes Maß an Automatisierbarkeit auf, wie es ein Online-Messverfahren voraussetzt. Dass die Korrektur nach LARSSON falsche Werte liefert, liegt nicht an der Methode der Berechnung [KORF, 2009], sondern an den Messwerten, die zu korrigieren sind. Je größer die Konzentration von beispielsweise Huminstoffen ist, desto größer ist der Einfluss von Inner-Filter-Effekten und desto undeutlicher werden die Streulichtpeaks. Der RAMAN-Peak ist ab einer Konzentration von ca. 40 mg/l nicht mehr in den Rohdaten zu erkennen. Daher führen sowohl das Integrieren des RAMAN-Peaks mithilfe der Trapezformel als auch die Kurvenanpassung mit anschließender Integration der GAUSS-Kurve nicht zu den gewünschten Ergebnissen.

In den Abb. 4.3 und 4.4 sind für beide Geräte (LS-50 blau auf der rechten Seite, LS-55 rot auf der linken Seite) die Streulichtpeaks erster Ordnung bei verschiedenen Konzentrationen von Huminsäure bei einem  $\lambda_{\text{ex}}$  von 240 nm zu sehen. Die Kurve ist ab ca. 40 mg/l extrem verrauscht, was eine gute Kurvenanpassung erschwert. Der RAMAN-Peak ist bei Konzentrationen zwischen 20 und 30 mg/l kaum noch zu erkennen. Daher ist auch keine GAUSS-Anpassung des RAMAN-Peaks möglich und damit keine LARSSON-Korrektur.

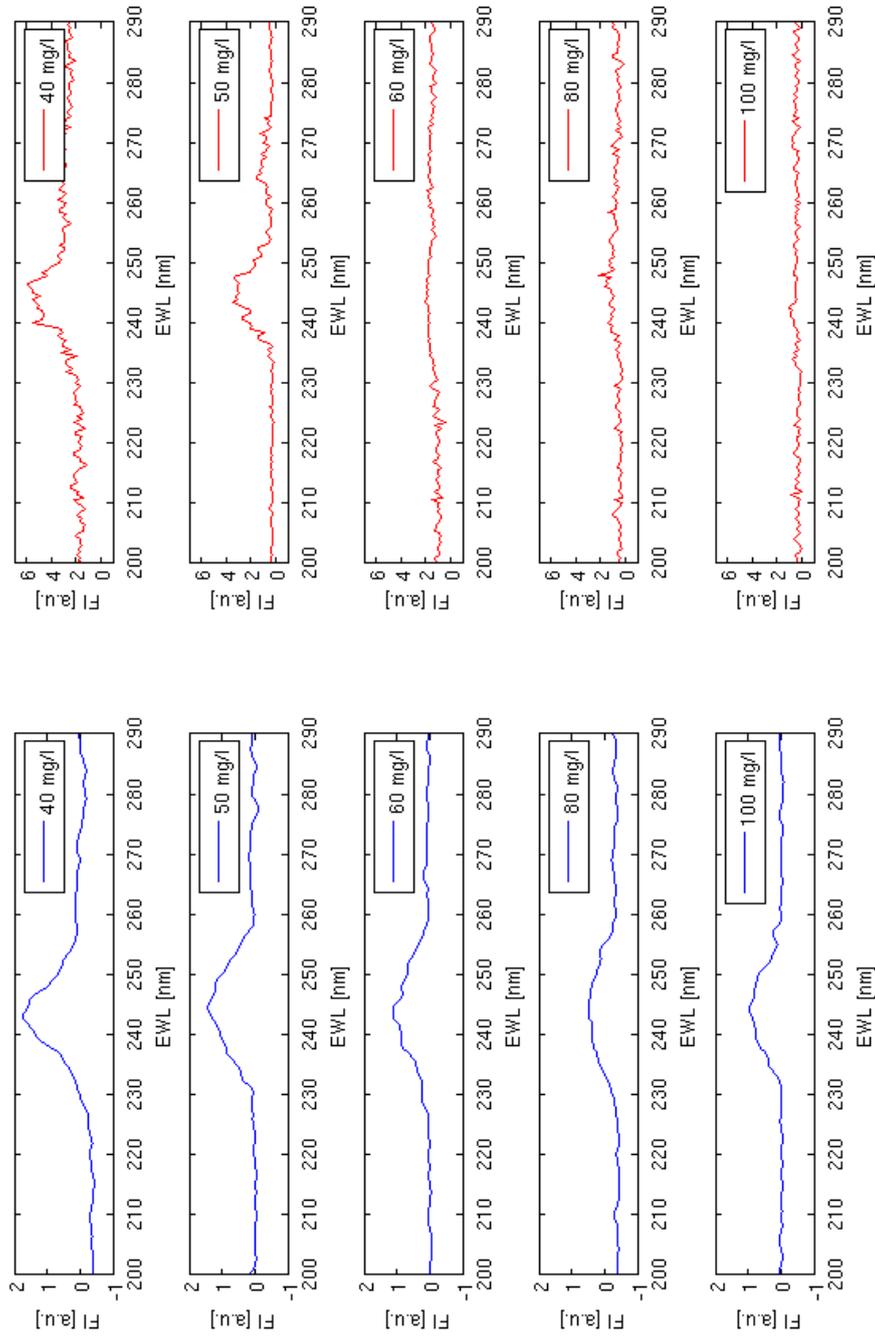
Die Analysen zum Verhalten des RAMAN-Peaks bei unterschiedlichen Substanzen erbrachten die erwarteten Ergebnisse. Das heißt, der RAMAN-Peak hat bei

---

<sup>2</sup>Der RAYLEIGH- sowie der RAMAN-Peak werden mittels zweier GAUSS-Kurven angepasst.



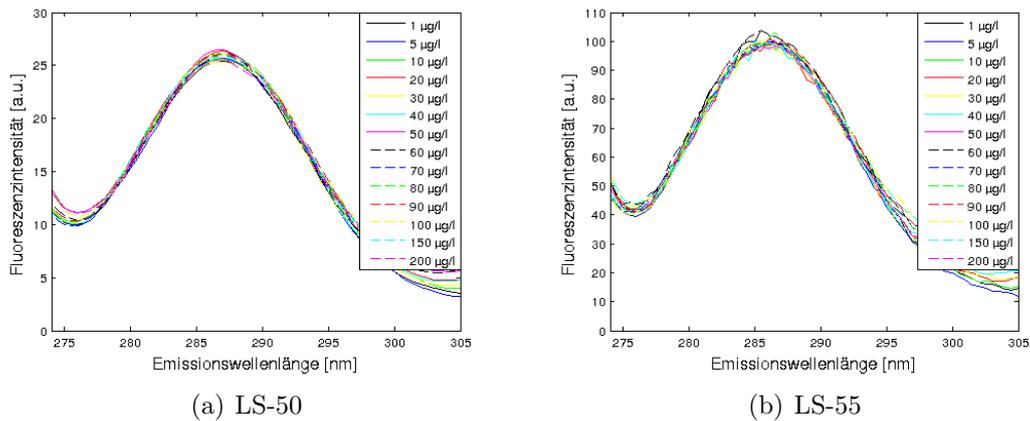
**Abb. 4.3:** RAYLEIGH- und RAMAN-Streupeak 1. Ordnung bei  $\lambda_{\text{ex}} = 240$  nm für 1 bis 30 mg/l Huminsäure SRS I. Die Graphen des LS-50 sind blau dargestellt (linke Seite), die des LS-55 rot (rechte Seite). Der RAMAN-Peak ist am LS-50 bei Konzentrationen ab 20 mg/l nicht mehr zu erkennen. Beim LS-55 liegt die Grenze bei 30 mg/l Huminsäure SRS I.



**Abb. 4.4:** RAYLEIGH- und RAMAN-Streupeak 1. Ordnung bei  $\lambda_{\text{ex}} = 240$  nm für 40 bis 100 mg/l Huminsäure SRS I. Die Graphen des LS-50 sind blau dargestellt (linke Seite), die des LS-55 rot (rechte Seite). Der RAMAN-Peak ist bei beiden Geräten nicht mehr zu erkennen. Zudem sind Kurven mit steigender Konzentration immer stärker verrauscht.

unterschiedlichen Konzentrationen von Tryptophan, von dem angenommen wird, dass es nicht durch Inner-Filter-Effekte beeinflusst wird, die gleiche Fluoreszenzintensität und erscheint auch bei der gleichen Emissionswellenlänge. Dieses Verhalten wird mittels des KOLMOGOROW-SMIRNOW-Testes statistisch abgesichert. Dabei kann die Nullhypothese  $H_0$ , dass einerseits die Werte der Emissionswellenlänge und andererseits die Intensitätswerte des RAMAN-Peaks normalverteilt seien, in keinem der betrachteten Fälle bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  abgelehnt werden.

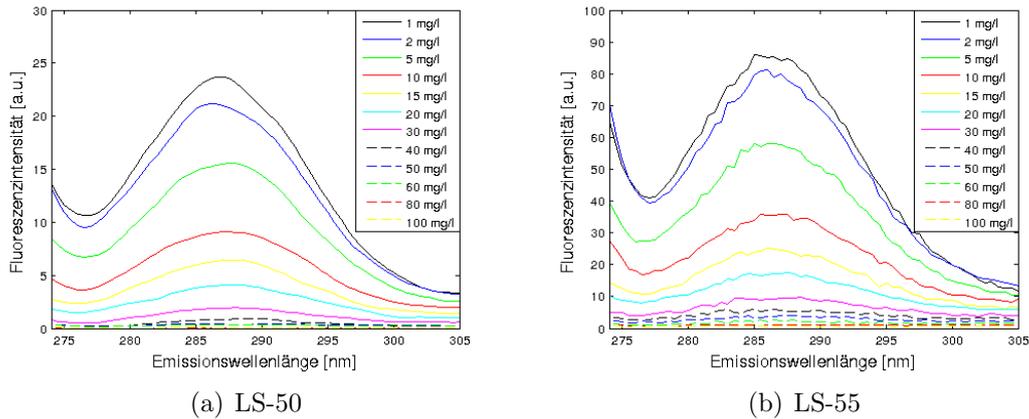
Abb. 4.5 zeigt den RAMAN-Peak verschiedener Konzentrationen von Tryptophan bei  $\lambda_{\text{ex}} = 260$  nm. Die Emissionswellenlänge  $\lambda_{\text{RAMAN}}$  liegt bei ca. 285 nm. Am LS-55 trifft dies zu, am LS-50 liegt jedoch eine leichte Rotverschiebung vor, allerdings für alle Konzentrationen. Es handelt sich dabei um ein Gerätespezifikum, das durch eine Emissionskorrektur ausgeglichen werden kann.



**Abb. 4.5:** RAMAN-Peak bei  $\lambda_{\text{ex}} = 260$  nm und verschiedenen Konzentrationen von Tryptophan. Der RAMAN-Peak tritt bei  $\lambda_{\text{RAMAN}} \approx 285$  nm auf. Die Konzentration hat offensichtlich keinen Einfluss auf die Intensität oder  $\lambda_{\text{RAMAN}}$ .

Bei den Huminsäuren wiederum ist ein deutlicher Einfluss der Konzentration auf die Intensität zu erkennen. Die entsprechenden Graphen sind in Abb. 4.6 zu sehen. Die Intensität sinkt mit steigender Konzentration. Die Emissionswellenlänge  $\lambda_{\text{RAMAN}}$  unterliegt an beiden Geräten einer leichten Rotverschiebung, die am LS-50 ein wenig stärker ausgeprägt ist. Daher wird angenommen, dass die gerätespezifische Verschiebung durch die Inhaltsstoffe der Lösung verstärkt wird.

Der Einfluss der Konzentration auf die Emissionswellenlänge bzw. auf die Fluoreszenzintensität wird statistisch mit dem KOLMOGOROW-SMIRNOW-Test geprüft, obwohl dies wegen des starken Einflusses der Konzentration sehr schwierig ist. Die



**Abb. 4.6:** RAMAN-Peak bei  $\lambda_{\text{ex}} = 260$  nm und verschiedenen Konzentrationen von Huminsäure SRS I IHSS. Der RAMAN-Peak tritt bei  $\lambda_{\text{RAMAN}} \approx 285$  nm auf. Es ist ein Einfluss der Konzentration auf die Intensität zu erkennen, nicht jedoch auf  $\lambda_{\text{RAMAN}}$ .

Nullhypothese  $H_0$ , dass die Werte der Emissionswellenlänge normalverteilt seien, kann an keinem der Geräte bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  abgelehnt werden. Dagegen kann die Nullhypothese  $H_0$ , dass die Intensitätswerte des RAMAN-Peaks normalverteilt seien, in allen betrachteten Fällen bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  abgelehnt werden. Die Konzentration hat demnach einen Einfluss auf die Intensität des RAMAN-Peaks, nicht aber auf die Emissionswellenlänge  $\lambda_{\text{RAMAN}}$ .

### 4.2.3 Fazit

Die Korrekturmethode nach LAKOWICZ ist die Vorzugsmethode für das Korrigieren von Inner-Filter-Effekten für am TZW Dresden gemessene Proben. Die Korrektur nach LARSSON wird von zu vielen Unsicherheitsfaktoren beeinflusst, so dass sie für den Einsatz in einem Online-Verfahren nicht geeignet ist. Probleme treten bei der Korrektur nach LARSSON auf, wenn die Konzentrationen der Substanzen sehr hoch sind und sie einerseits den RAMAN-Peak stark vermindern oder andererseits der Fluoreszenzpeak den RAMAN-Peak überdeckt. Da dies bei natürlichen Wässern nicht auszuschließen ist, wird für ein Online-Verfahren die Methode nach LAKOWICZ vorgeschlagen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen belegen jedoch nicht, dass das Verfahren nach LARSSON generell nicht anwendbar ist. Der Vorteil hierbei liegt vor allem darin, dass kein weiteres Messgerät benötigt wird, das zu Fehler-

einträgen führen kann. Lediglich die Substanzen und ihre hohen Konzentrationen, die im Rahmen dieser Arbeit betrachtet werden, weisen für eine Korrektur nach LARSSON ungeeignete Bedingungen auf. Sollte aber zum Beispiel die Korrektur von nur schwach Inner-Filter-Effekt-beeinflussten Wässern erforderlich sein, so bietet die Korrektur nach LARSSON eine gute Alternative.

In Deutschland haben Trinkwässer einen DOC von maximal 5 mg/l, EU-weit ist eine Grenze von 10 mg/l festgeschrieben. Können diese Werte in einem Wasser vorausgesetzt werden und sind Schwankungen über den Maximalwert hinaus auszuschließen, ist die Korrektur nach LARSSON anzuwenden, da sie in diesen Bereichen deutlich bessere Werte erzielt als die Korrektur nach LAKOWICZ. Die Methode zur Durchführung der Korrektur nach LARSSON hängt von den Gegebenheiten des Messsystems ab.

## 4.3 Untersuchungen zum Quenching von Aminosäuren durch Huminsäuren

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Quenchingversuche dargestellt und analysiert. Um später eine Inner-Filter-Effekt-Korrektur nach LAKOWICZ durchführen zu können, werden zunächst die Absorptionsmessungen der Lösungen betrachtet.

### 4.3.1 Absorptionsmessungen

#### Tryptophan

In Abb. 4.7 sind die Absorptionsspektren von verschiedenen Konzentrationen von Tryptophan zu sehen. Negative Werte sind dabei Artefakte des Messgerätes und finden in den weiteren Analysen keine Beachtung.

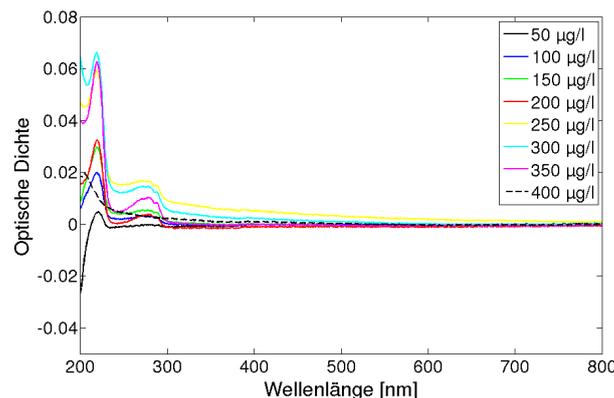
Bei einer Wellenlänge zwischen 300 und 800 nm ist bei keiner gemessenen Konzentration von Tryptophan eine signifikante Absorption zu erkennen. Dies wird auch belegt durch die farblosen Lösungen. Ein lokales Maximum befindet sich bei ca. 270 bis 280 nm und ein globales bei ca. 220 nm (vgl. auch KORF [2009]). Die größte Absorption der gemessenen Proben liegt also im ultravioletten Bereich. Hier ist mit Inner-Filter-Effekten zu rechnen. Die Werte für die Optische Dichte sind jedoch sehr gering.

Auffällig ist, dass die Werte der Maxima der Optischen Dichte ab einer Konzentration von  $300 \mu\text{g/l}$  Tryptophan rückläufig sind. Bei einer Konzentration von  $400 \mu\text{g/l}$  Tryptophan, der höchsten gemessenen Konzentration, erreicht die Optische Dichte bei einer Wellenlänge von ca.  $220 \text{ nm}$  nur noch einen Wert von ca.  $0,02$ .

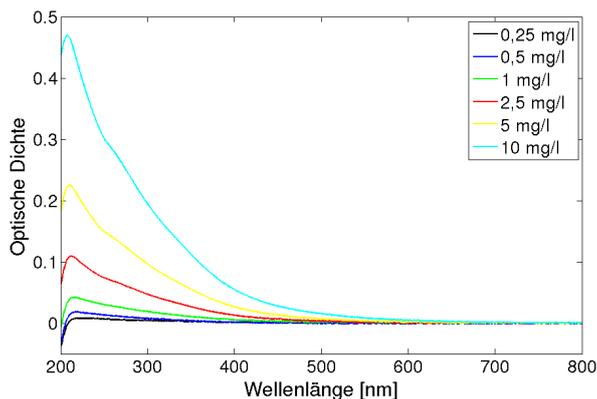
Die in ELIOT-LAIZE ET AL. [2008] zitierten Autoren geben verschiedene Werte für die Optische Dichte an, ab der Inner-Filter-Effekte auftreten und korrigiert werden müssen. In der vorliegenden Arbeit wird angenommen, dass ab einer Optischen Dichte von  $0,06$  mit Inner-Filter-Effekten zu rechnen ist. Bei einer Konzentration von  $300 \mu\text{g/l}$  Tryptophan wird ein Wert von  $0,06$  für die Optische Dichte knapp überschritten. Bei dieser Konzentration ist daher mit Inner-Filter-Effekten zu rechnen, wenn sie auch sehr klein ausfallen. Generell lässt sich festhalten, dass bei den gemessenen Konzentrationen von Tryptophan keine oder nur sehr schwache Inner-Filter-Effekte zu erwarten sind.

### Huminsäure Suwannee River Standard II

Im Gegensatz zur farblosen Flüssigkeit der Tryptophanlösungen weisen die Lösungen von Huminsäure SRS II eine deutlich gelb-braune Färbung auf. Die Absorptionsspektren der gemessenen Konzentrationen von Huminsäure SRS II sind in Abb. 4.8 zu sehen. Die Optischen Dichten liegen schon bei kleinen Konzentrationen in einem Bereich, in dem Inner-Filter-Effekte erzeugt werden. Das Maximum der Absorption liegt bei ca.  $205 \text{ nm}$  (vgl. auch KORF [2009]).



**Abb. 4.7:** Absorptionsspektren verschiedener Konzentrationen von Tryptophan bei einer Wellenlänge zwischen 200 und 800 nm. Die Absorptionsmaxima liegen bei ca.  $220 \text{ nm}$  und ca.  $270 \text{ bis } 280 \text{ nm}$ .



**Abb. 4.8:** Absorptionsspektren verschiedener Konzentrationen von Huminsäure SRS II bei einer Wellenlänge zwischen 200 und 800 nm. Das Absorptionsmaximum liegt bei ca. 205 nm.

Ab einer Wellenlänge von ca. 600 nm ist für keine der Verdünnungsstufen mit einer signifikanten Absorption zu rechnen. Hier gemessene Fluoreszenz ist weitestgehend frei von Inner-Filter-Effekten.

Bei Wellenlängen kleiner als 600 nm ist hingegen mit mittleren bis starken Inner-Filter-Effekten zu rechnen. Mit steigender Konzentration steigt auch die Optische Dichte und damit die Absorption. Bei einer Konzentration von 10 mg/l Huminsäure SRS II erreicht sie einen Wert von ca. 0,47. Erst ab einer Optischen Dichte von 2 liegen laut ELIOT-LAIZE ET AL. [2008] so starke Absorptionseffekte vor, dass Inner-Filter-Effekte nicht mehr korrigierbar sind. Die gemessenen Konzentrationen liegen jedoch deutlich unterhalb dieses Wertes, so dass eine Korrektur der Inner-Filter-Effekte problemlos durchgeführt werden kann.

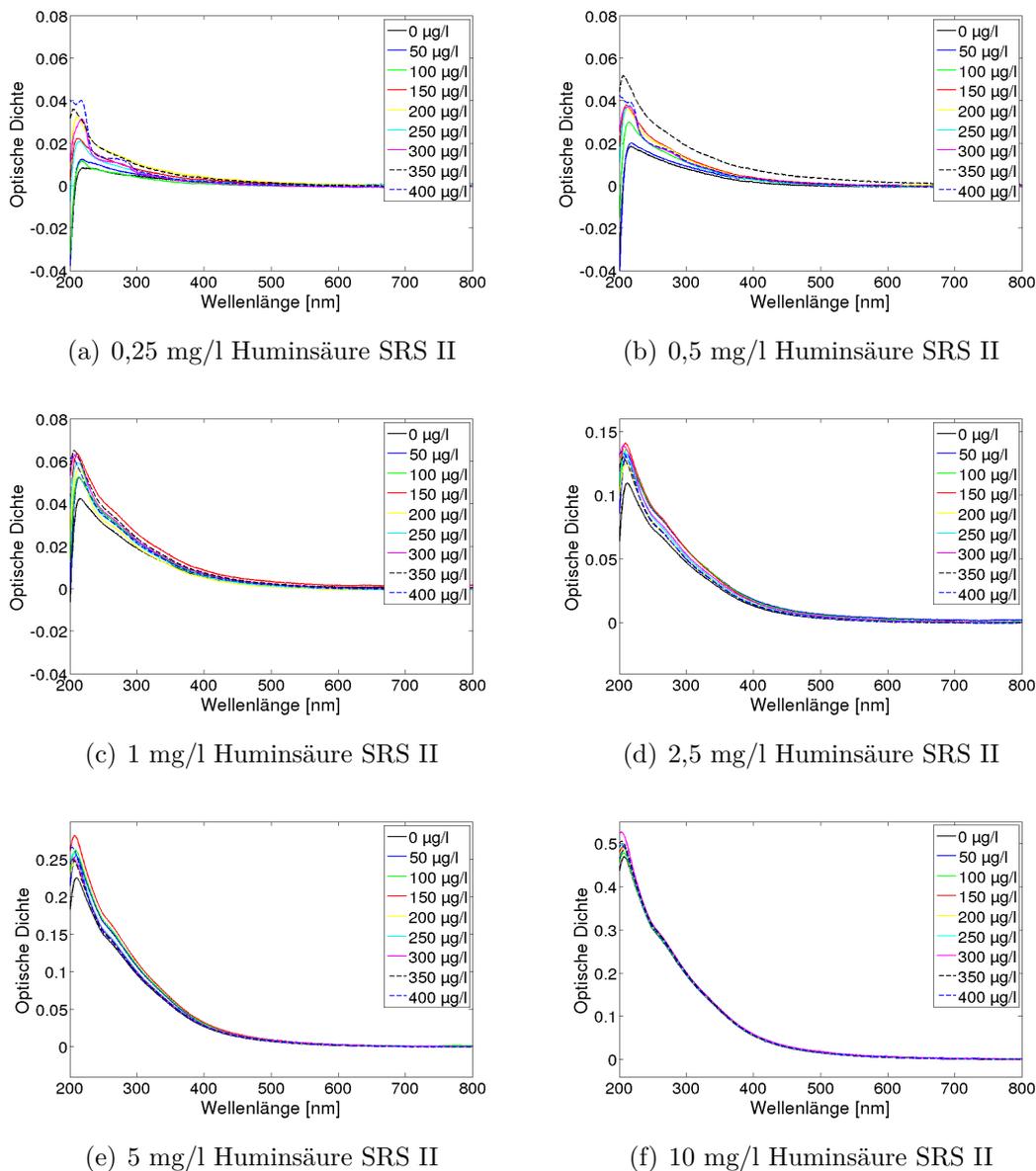
### Mischungen aus Tryptophan und Huminsäure SRS II

Die Mischungen der verschiedenen Konzentrationen von Huminsäure SRS II und Tryptophan weisen wie die Verdünnungsstufen der Huminsäure SRS II eine gelbbraune Färbung auf. Es ist also davon auszugehen, dass die Absorptionmessungen ähnliche Ergebnisse liefern wie die Messungen der Verdünnungsstufen von Huminsäure SRS II. Abb. 4.9 zeigt die Absorptionsspektren.

Es ist deutlich zu erkennen, dass bei allen Spektren die Absorptionscharakteristika von Huminsäure SRS II dominieren. Bei geringen Konzentrationen von Huminsäure SRS II (siehe Abb. 4.9(a) und 4.9(b)) ist das Absorptionsmaximum von Tryptophan bei ca. 270 bis 280 nm noch zu erkennen. Je höher jedoch die

Konzentration von Huminsäure SRS II wird, desto weniger Einfluss haben die Absorptionscharakteristika von Tryptophan, trotz hoher Konzentrationen von Tryptophan.

Bei geringen Konzentrationen von Huminsäure SRS II ist daher der Einfluss von Tryptophan zu beachten. Ab einer Konzentration von ca. 2,5 mg/l Huminsäure SRS II kann er vernachlässigt werden.

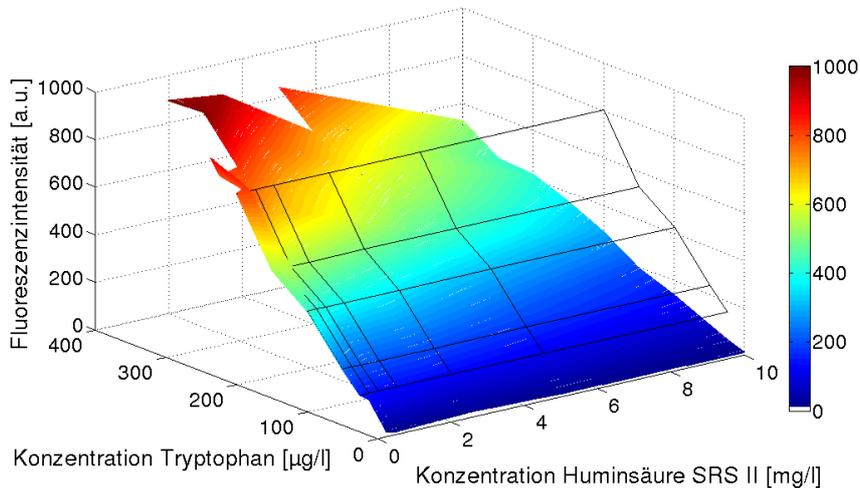


**Abb. 4.9:** Absorptionsspektren für Mischungen verschiedener Konzentrationen von Huminsäure SRS II und Tryptophan bei Wellenlängen zwischen 200 und 800 nm. Nur bei geringen Konzentrationen von Huminsäure SRS II (0,25 und 0,5 mg/l) hat Tryptophan einen Einfluss auf das Absorptionsspektrum der Mischung. Die Charakteristika der Absorptionsspektren von Huminsäure SRS II überwiegen ab einer Konzentration von 1 mg/l Huminsäure SRS II. Das Absorptionsmaximum liegt jeweils bei ca. 205 nm.

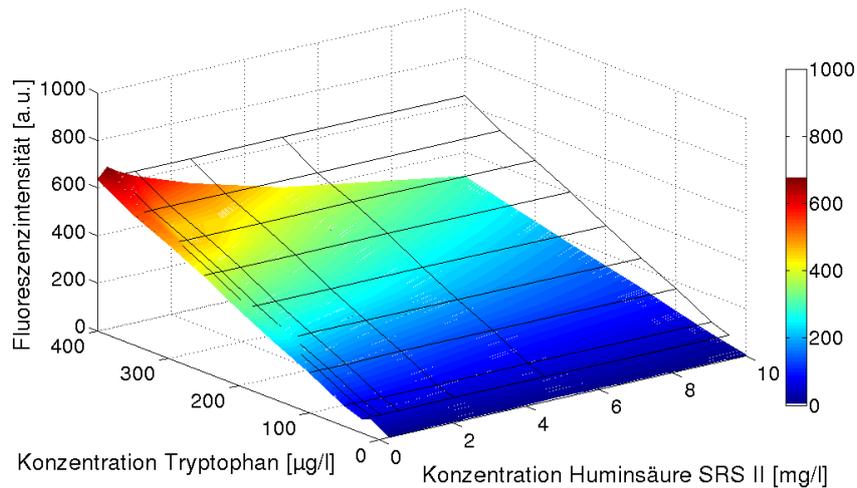
### 4.3.2 Rohdaten der Quenchingversuche

Im Folgenden werden die Rohdaten der Quenchingversuche dargestellt. Die Abbildungen der Messergebnisse des LS-55 befinden sich im Anhang C. Da am LS-55 bei einer Konzentration ab  $100 \mu\text{g/l}$  Tryptophan am Punkt  $220/340 \text{ nm}$  und ab  $300 \mu\text{g/l}$  Tryptophan am Punkt  $280/340 \text{ nm}$  die Fluoreszenzintensitäten den Messbereich überschreiten, werden in die Ergebnisdarstellung und -interpretation des LS-55 nur Werte, die im Messbereich liegen, einbezogen. Gleiches gilt am LS-50, bei dem der Messbereich am Punkt  $220/340 \text{ nm}$  bei einer Konzentration von  $250 \mu\text{g/l}$  Tryptophan überschritten wird.

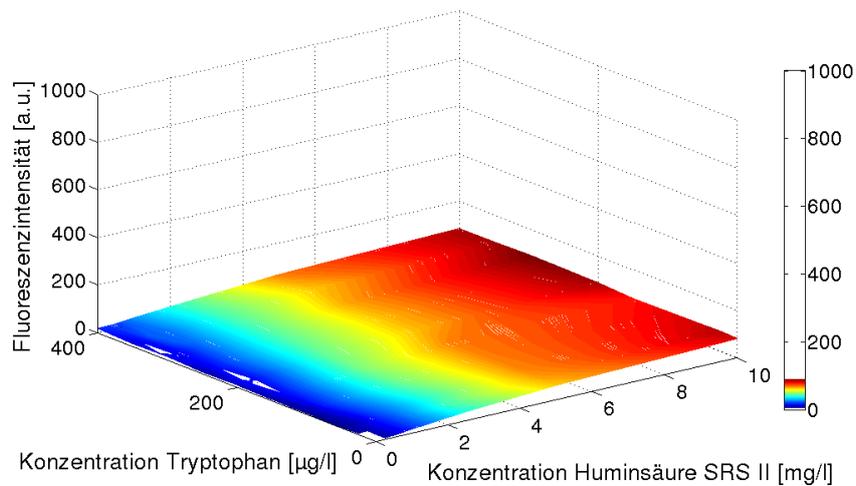
Die Abb. 4.10 und 4.11 (LS-55 Abb. C.1 und C.2) stellen die Fluoreszenzintensitäten am Punkt  $220/340 \text{ nm}$  und  $280/340 \text{ nm}$  der Mischungen aus Huminsäure SRS II und Tryptophan sowie der Lösungen mit jeweils nur einer Substanz dar. Als schwarzes Gitter sind die Fluoreszenzintensitäten von Tryptophan zu sehen. Dieses liegt mit steigender Huminsäure-Konzentration immer oberhalb der farbigen Ebene, was das Auslöschen der Tryptophan-Fluoreszenz durch Huminsäure SRS II graphisch belegt.



**Abb. 4.10:** Fluoreszenzintensitäten beim Quenching von Tryptophan durch Huminsäure SRS II am Punkt  $220/340 \text{ nm}$ , LS-50, Oktober 2009. Das schwarze Gitter zeigt die Fluoreszenzintensitäten von Tryptophan ohne Huminsäure SRS II an.



**Abb. 4.11:** Fluoreszenzintensitäten beim Quenching von Tryptophan durch Huminsäure SRS II am Punkt 280/340 nm, LS-50, Oktober 2009. Das schwarze Gitter zeigt die Fluoreszenzintensitäten von Tryptophan ohne Huminsäure SRS II an.



**Abb. 4.12:** Fluoreszenzintensitäten am Punkt 240/450 nm, LS50. Es ist keine Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration von Tryptophan zu erkennen.

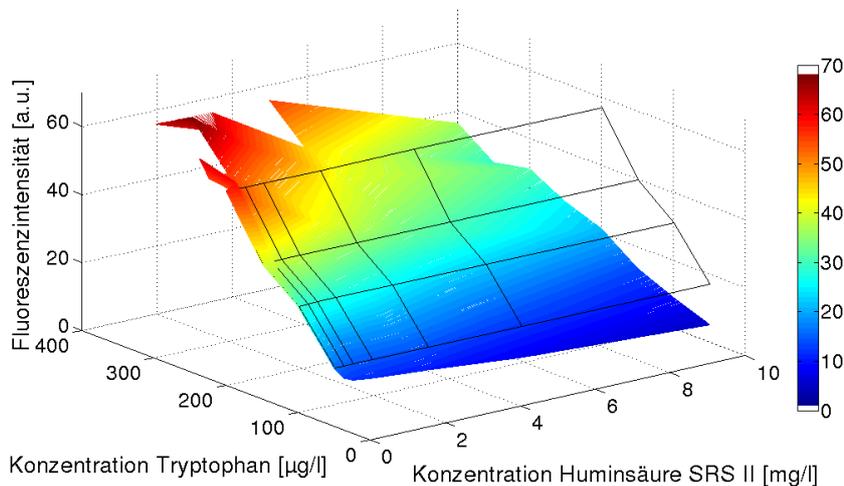
Um zu prüfen, ob Tryptophan die Fluoreszenzintensität von Huminsäure SRS II beeinflusst, wird der Fluoreszenz-Peak der Huminsäure bei 240/450 nm betrachtet. Die Messwerte sind in Abb. 4.12 (LS-55 Abb. C.5) zu sehen. Dabei ist zu erkennen, dass sich die Fluoreszenzintensität unabhängig von der Konzentration

von Tryptophan verhält. Ein Bestimmen der Konzentration von Huminsäure SRS II innerhalb einer Probelösung über den Fluoreszenz-Peak ist daher möglich.

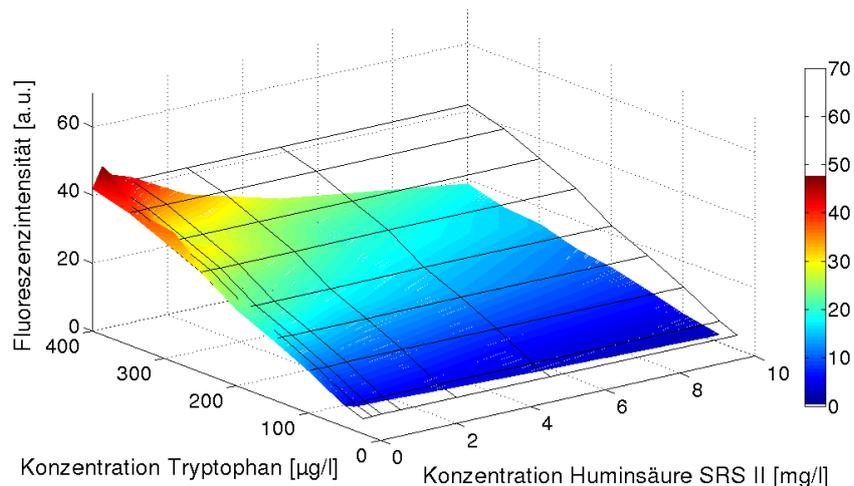
### 4.3.3 Korrektur der Ergebnisse der Quenchingversuche

Die Ergebnisse der Quenchingversuche werden standardisiert und Inner-Filter-korrigiert. Dafür wird die Korrektur nach LAKOWICZ verwendet. Eine Korrektur nach LARSSON wäre auch in diesem Fall nicht möglich, da der Fluoreszenz-Peak von Tryptophan im relevanten Bereich (nämlich bei  $\lambda_{\text{ex}}=280$  nm) den RAMAN-Peak überdeckt. Da der Spektren-interne RAMAN-Peak bei 340/384 nm nicht vom Fluoreszenzpeak von Tryptophan beeinflusst oder überdeckt wird, kann er ohne weiteres für die Normierung verwendet werden.

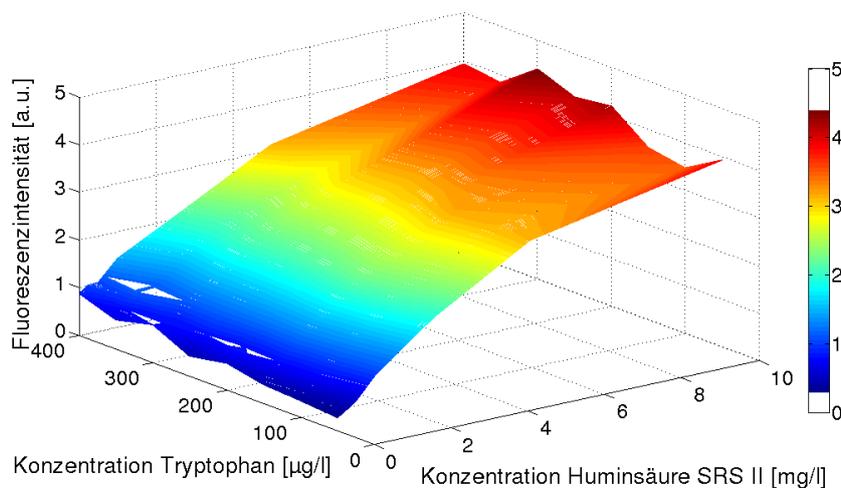
In Abb. 4.13 und 4.14 (LS-55 Abb. C.3 und C.4) sind die standardisierten und Inner-Filter-Effekt-korrigierten Werte zu sehen. Auch hier stellt das schwarze Gitter die Fluoreszenzintensitäten von Tryptophan dar. Die Unterschiede zu den Rohdaten fallen sehr gering aus. Das Durchführen der Standardisierung ist jedoch für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse unumgänglich.



**Abb. 4.13:** Fluoreszenzintensitäten beim Quenching von Huminsäure SRS II und Tryptophan am Punkt 220/340 nm, LS-50, Oktober 2009, standardisiert und Inner-Filter-Effekt-korrigiert. Das schwarze Gitter zeigt die Fluoreszenzintensitäten von Tryptophan ohne Huminsäure SRS II an.



**Abb. 4.14:** Fluoreszenzintensitäten beim Quenching von Huminsäure SRS II und Tryptophan am Punkt 280/340 nm, LS-50, Oktober 2009, standardisiert und Inner-Filter-Effekt-korrigiert. Das schwarze Gitter zeigt die Fluoreszenzintensitäten von Tryptophan ohne Huminsäure SRS II an.



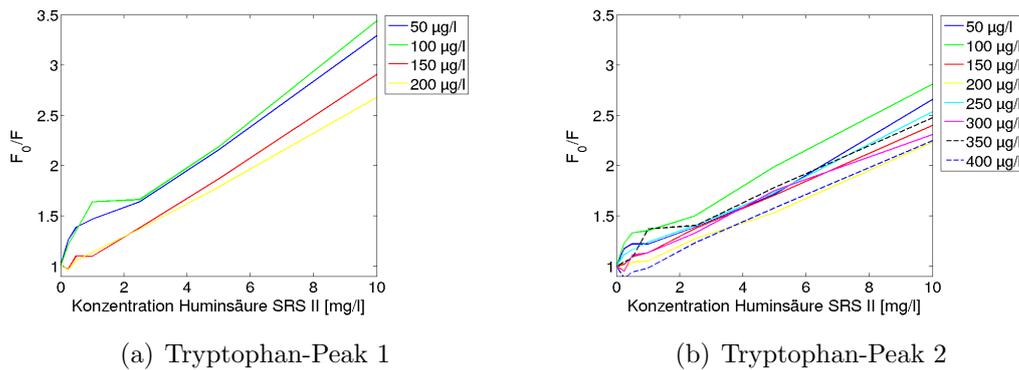
**Abb. 4.15:** Standardisierte und Inner-Filter-Effekt-korrigierte Fluoreszenzintensitäten am Punkt 240/450 nm, LS50.

Beide Flächen weisen Unebenheiten auf. Sie sind vor allem auf Fehler beim Herstellen der Lösungen zurückzuführen.

Abb. 4.15 (LS-55 Abb. C.6) zeigt die standardisierten und Inner-Filter-Effekt-korrigierten Daten des Huminsäure-Peaks 240/450 nm. Die Fläche stellt einen

Zylinderausschnitt dar, der leichte Unebenheiten aufweist. Diese sind auf Messungenauigkeiten sowie Ungenauigkeiten beim Herstellen der Lösungen zurückzuführen. Auch in diesen Abbildungen ist keine Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration von Tryptophan zu erkennen.

Abb. 4.16 (LS-55 Abb. C.7) zeigt die STERN-VOLMER-Plots für die verschiedenen Konzentrationen von Tryptophan an den zwei betrachteten Fluoreszenz-Peaks. Für die Berechnung werden die standardisierten und Inner-Filter-Effekt-korrigierten Daten zugrunde gelegt.



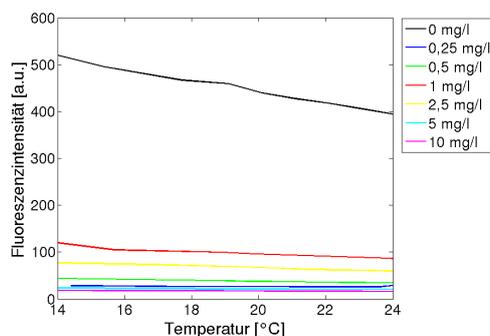
**Abb. 4.16:** STERN-VOLMER-Plots verschiedener Konzentrationen von Tryptophan in Abhängigkeit von der Konzentration von Huminsäure SRS II, LS-50. Als Grundlage dienen die standardisierten und Inner-Filter-Effekt-korrigierten Daten.

Dem STERN-VOLMER-Plot beider Geräte ist ein linearer Zusammenhang zwischen  $F_0/F$  und  $[Q]$  zu entnehmen, der ein Beleg dafür ist, dass nur eine Quenchingart, entweder statisch oder dynamisch, vorliegt.

Vor allem bei den kleineren Konzentrationen von Tryptophan aber auch bei den kleineren Konzentration von Huminsäure weist der STERN-VOLMER-Plot nicht immer einen linearen Verlauf auf. Dies ist auf einen größeren relativen Fehler beim Herstellen der Lösungen zurückzuführen und daher zu vernachlässigen.

Untersuchungen darüber, ob statisches oder dynamisches Quenching vorliegt, wurden nur am LS-50 durchgeführt, da angenommen wird, dass sich die Messergebnisse am LS-55 nicht wesentlich unterscheiden. Abb. 4.17 zeigt die Fluoreszenzintensitäten von Mischungen aus 200  $\mu\text{g/l}$  Tryptophan und Huminsäure SRS II in Abhängigkeit von der Temperatur. Dabei ist zu beachten, dass Tryptophan einem sehr starken Temperaturquenching unterliegt [BAKER, 2005]. Bei höheren Temperaturen nimmt daher die Fluoreszenzintensität auch ohne Zugabe

eines Quenchers stark ab. Dies zeigt der schwarze Graph in der Abbildung. Auch alle weiteren Graphen zeigen einen linearen Verlauf mit negativem Anstieg. Für weitere Interpretationen der Messungen wird in dieser Arbeit daher von dynamischem Quenching ausgegangen. Der negative Verlauf der Graphen ist jedoch kein Beleg dafür und kann auch durch das Temperaturquenching von Tryptophan hervorgerufen werden.

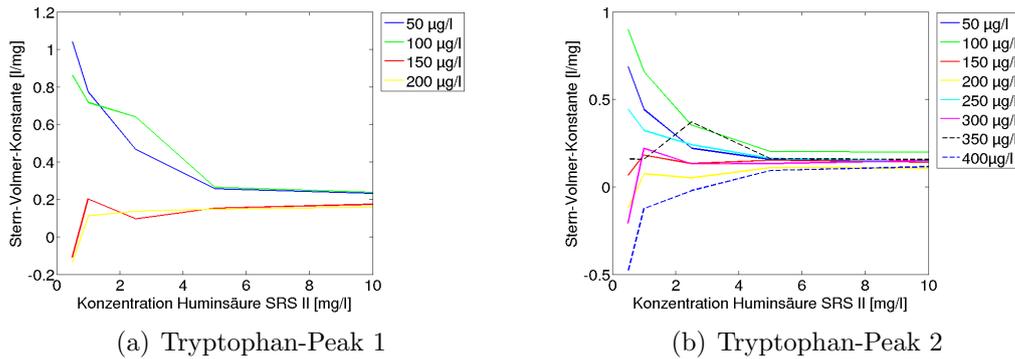


**Abb. 4.17:** Fluoreszenzintensität der Mischungen aus 200  $\mu\text{g/l}$  Tryptophan und verschiedenen Konzentrationen Huminsäure SRS II in Abhängigkeit von der Temperatur, LS-50, Rohdaten. Die Lösung von Tryptophan ohne Huminsäure SRS II weist ein sehr starkes Temperaturquenching auf [BAKER, 2005].

Wird angenommen, dass der Grund für den negativen Anstieg der Graphen das starke Temperaturquenching von Tryptophan ist, dann bedeutet das, dass nicht alle Tryptophanmoleküle in der Lösung der Huminsäure SRS II zugänglich sind bzw. es mehr Tryptophanmoleküle als Huminsäuremoleküle gibt.

Dies kann durch Messen von geringeren Konzentrationen Tryptophan und Huminsäure SRS II verifiziert werden. Generell werden für Untersuchungen der Quenchingart Messungen der Fluoreszenzlebensdauer empfohlen, die am TZW Dresden nur unter erhöhtem zeitlichen und technischen Aufwand durchführbar sind.

Anhand von Gl. (2.10) kann die STERN-VOLMER-Konstante für dynamisches Quenching  $K_D$  bestimmt werden. In Abb. 4.18 (LS-55 C.8) sind die STERN-VOLMER-Konstanten für verschiedene Konzentrationen Tryptophan in Abhängigkeit der Konzentration von Huminsäure SRS II für die zwei betrachteten Punkte dargestellt. Diese zeigen noch einmal deutlich, dass es eine hohe Variabilität im Bereich von kleinen Konzentrationen Huminsäure SRS II gibt. Die Graphen konvergieren jedoch an beiden Geräten zu einem Wert zwischen 0,24 und 0,27 am Punkt 220/340 nm und zu einem Wert zwischen 0,15 und 0,16 am Punkt 280/340 nm. Werden die Werte bei einer Huminsäurekonzentration bis zu 0,5 mg/l vernach-



**Abb. 4.18:** STERN-VOLMER-Konstante für verschiedene Konzentrationen von Tryptophan in Abhängigkeit von der Konzentration von Huminsäure SRS II, LS-50. Als Grundlage dienen die standardisierten und Inner-Filter-Effekt-korrigierten Daten.

lässigt, hat die STERN-VOLMER-Konstante die in Tab. 4.2 dargestellten Werte.

Es ist zu erkennen, dass die Werte der STERN-VOLMER-Konstante am LS-55 etwas größer ausfallen als die am LS-50. Auch liegen die Werte für den Punkt 220/340 nm deutlich über den Werten für den Punkt 280/340 nm. Das Quenching am Punkt 220/340 nm ist also größer als das am Punkt 280/340 nm. Eine Literaturrecherche zu diesem Verhalten ergab keine eindeutige Erklärung. Es ist jedoch bekannt, dass Tryptophan drei chromophore Komponenten besitzt, die in Abhängigkeit vom pH-Wert unterschiedliche Fluoreszenzlebensdauern  $\tau_F$  aufweisen und auch die Fluoreszenzintensität beeinflussen [GUDGIN ET AL., 1981; SKAMBRAKS, 2008]. Diese sind der Benzol-Ring, der Stickstoff-Heterozyklus von Cyclopentadien und die COOH-Gruppe. Zusammen bilden der Benzol-Ring und der Stickstoff-Heterozyklus von Cyclopentadien den Stoff Indol, der ein NSO-Heterozyklus von Inden ist, und beim Abbau von Tryptophan entstehen kann. Die Fluoreszenzeigenschaften von Indol wurden von KORF [2009] eingehend untersucht.

Da die STERN-VOLMER-Konstante für dynamisches Quenching  $K_D$  allein von  $\tau_F$  abhängt, ist zu vermuten, dass die großen Unterschiede der Werte für  $K_D$  durch

**Tab. 4.2:** STERN-VOLMER-Konstanten für die zwei betrachteten Punkte an beiden Geräten

Punkt [nm]	LS-50	LS-55
220/340	0,2369	0,2729
280/340	0,1553	0,1678

das Quenching der unterschiedlichen chromophoren Komponenten hervorgerufen wird. Demnach sind die zwei Fluoreszenz-Peaks von Tryptophan (220/350 nm und 280/350 nm) darauf zurückzuführen, dass an ihnen unterschiedliche chromophore Gruppen des Tryptophan-Moleküls fluoreszieren. Es ist zu vermuten, dass es sich hierbei um den Benzol-Ring und den Stickstoff-Heterozyklus von Cyclopentadien handelt, da die Exzitations-Emissions-Matrix von Tryptophan der von Indol sehr ähnlich ist [vgl. KORF, 2009].

MOCZ [1999] zufolge kann die Fluoreszenz an den unterschiedlichen Punkten aber auch auf Konformere von Tryptophan zurückgehen. Konformere sind Moleküle gleicher Konfiguration, die Unterschiede in der räumlichen Anordnung der drehbaren Bindungen aufweisen. Konformere von Tryptophan würden dann auch Unterschiede in der Fluoreszenzlebensdauer aufweisen. Dass Konformation die Fluoreszenz von Tryptophan beeinflusst, haben schon einige Autoren festgestellt [ALSTON ET AL., 2008; ANDERSON ET AL., 1983].

Es konnten keine Angaben in der Literatur dazu gefunden werden, dass das Auftreten der Fluoreszenz-Peaks von Tryptophan sowie die Unterschiede im Quenching-Verhalten an den beiden Peaks auch durch chromophore Gruppen, die nur bei bestimmten Konformeren fluoreszieren, zu erklären ist.

#### 4.3.4 Modellierung

Für das Modellieren der Fluoreszenzintensitäten von Mischungen aus Huminsäure SRS II und Tryptophan werden die standardisierten und Inner-Filter-Effekt-korrigierten Daten (Abb. 4.13, 4.14 und C.3, C.4) zugrunde gelegt.

Liegt nur eine Quenchingart vor, kann diese durch die STERN-VOLMER-Gleichung (Gl. (2.10)) beschrieben werden. Durch Umformen kann die verminderte Fluoreszenzintensität von Tryptophan durch das Quenching von Huminsäure durch

$$F = \frac{F_0}{1 + K_D \cdot [\text{HS}]} \quad (4.1)$$

beschrieben werden, wobei [HS] die Konzentration von Huminsäure in mg/l ist.

Wie die Abb. 4.10 und 4.11 (am LS-55 Abb. C.1 und C.2) erkennen lassen, liegt ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration Tryptophan ([TRP] in  $\mu\text{g/l}$ ) und der resultierenden Fluoreszenzintensität vor. Dies kann durch das Durchführen einer Kalibrierung am Punkt 280/340 nm bestätigt werden. Das Be-

stimmtheitsmaß  $R^2$  der Regressionsgerade liegt für die standardisierten und Inner-Filter-Effekt-korrigierten Werte bei 0,9928 (LS-50) bzw. 0,9933 (LS-55). Daher lässt sich die Fluoreszenzintensität  $F_0$  durch einen linearen Zusammenhang der Form

$$F_0 = m \cdot [\text{TRP}] + n \quad (4.2)$$

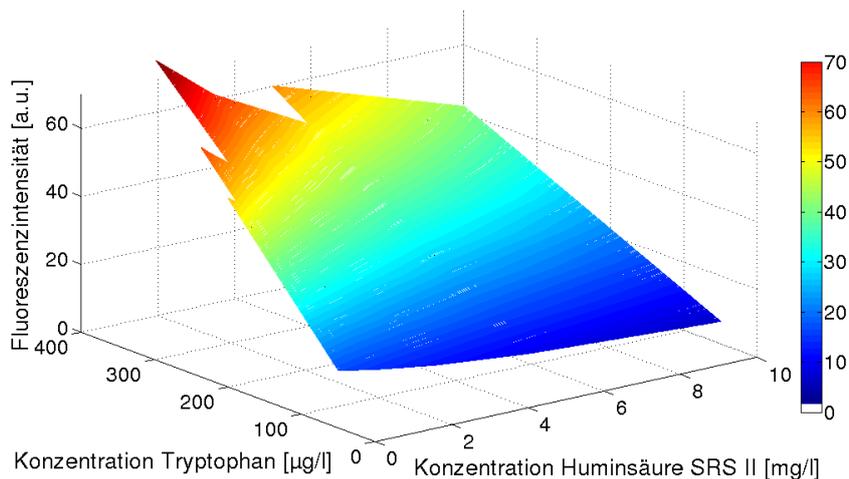
ausdrücken. Die Werte für  $m$  und  $n$  sind Tab. 4.3 zu entnehmen. Die STERN-

**Tab. 4.3:** Werte der Koeffizienten für das Modell nach Gl. (4.1)

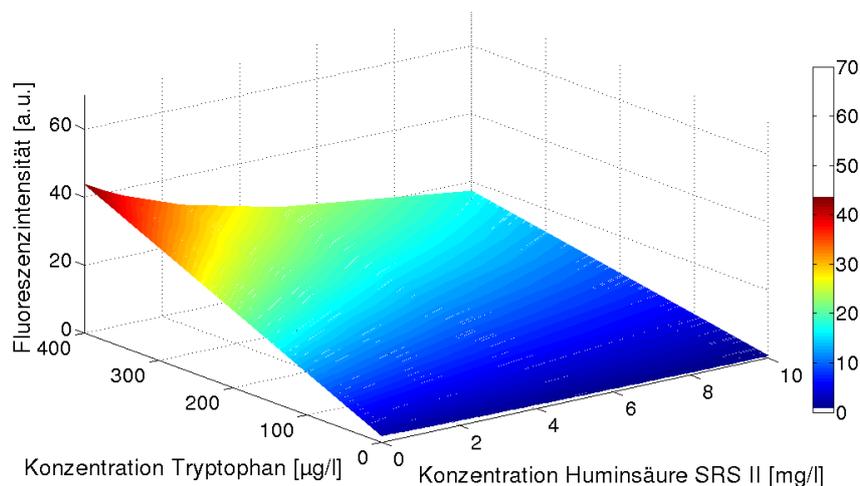
Punkt [nm]	LS-50		LS-55	
	$m$	$n$	$m$	$n$
220/340	0,2567	4,0873	0,1799	8,7775
280/340	0,1044	1,9325	0,1135	0,5877

VOLMER-Konstanten sind in Tab. 4.2 aufgelistet. Mithilfe dieses Modelles ist es nicht nur möglich, die gequenchten Fluoreszenzintensitäten vorauszusagen. Es ist auch möglich, von den gequenchten Fluoreszenzintensitäten auf die ungequenchten und damit auf die Konzentration von Tryptophan zu schließen unter der Voraussetzung, dass die Konzentration von Huminsäure SRS II bekannt ist.

Die mit Gl. (4.1) berechneten Fluoreszenzintensitäten sind in den Abb. 4.19 und 4.20 (LS-55 Abb. C.9 und C.10) zu sehen.



**Abb. 4.19:** Modellierte Fluoreszenzintensitäten, Tryptophan-Peak 1, LS-50



**Abb. 4.20:** Modellierte Fluoreszenzintensitäten, Tryptophan-Peak 2, LS-50

### 4.3.5 Bewertung des Modells

Für die Bewertung des gewählten Modells wird die Erklärte Varianz herangezogen. Weiterhin werden die Residuen betrachtet, das heißt, die Differenz der Messwerte<sup>3</sup> und der modellierten Werte.

In Tab. 4.4 sind die Werte für die Erklärte Varianz aufgelistet. Daraus lässt sich

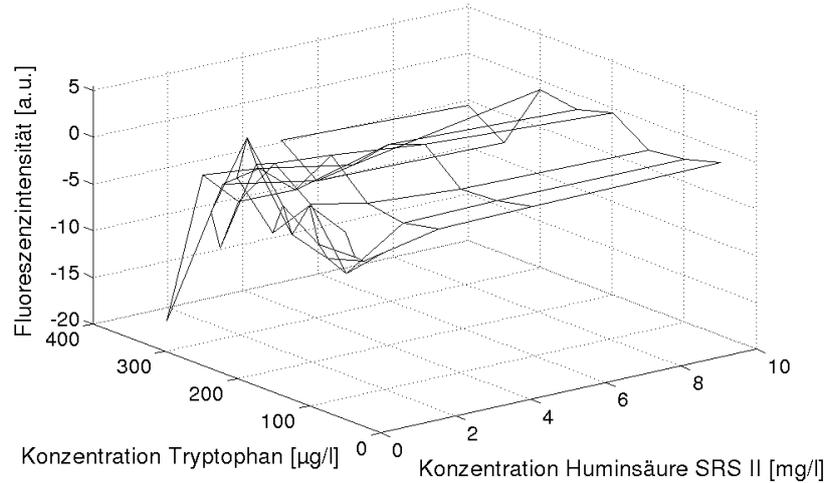
**Tab. 4.4:** Erklärte Varianz des Modells

Punkt [nm]	LS-50	LS-55
220/340	0,9513	0,8257
280/340	0,9817	0,9883

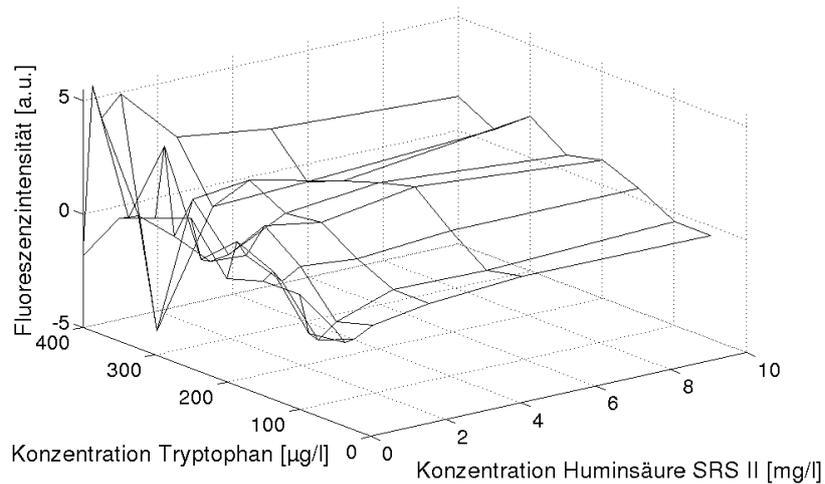
ableiten, dass das gewählte Modell die gemessenen Daten gut bis sehr gut modelliert. Die Abweichung der Erklärten Varianz für das Modell am Punkt 220/340 nm am LS-55 ist damit zu erklären, dass nur ca. zwei Drittel der Werte in Betracht gezogen werden, da der Rest den Messbereich des Gerätes überschreitet. Bei kleineren Konzentrationen ist hier eine Anpassung an den Wert des Gerätes LS-50 zu erwarten.

In Abb. 4.21 und 4.22 (LS-55 Abb. C.11 und C.12) sind die Residuen der Modelle beider Punkte zu sehen.

<sup>3</sup>hier die standardisierten und Inner-Filter-Effekt-korrigierten Werte



**Abb. 4.21:** Residuen des Modells, Tryptophan-Peak 1, LS-50. Vor allem bei geringen Konzentrationen von Huminsäure SRS II sind große Unterschiede zwischen den Messergebnissen und den berechneten Fluoreszenzintensitäten zu erkennen, die auf den größeren relativen Fehler beim Herstellen der Lösungen zurückzuführen sind. Ab ca. 2 mg/l Huminsäure SRS II betragen die Residuen ca. 0.



**Abb. 4.22:** Residuen des Modells, Tryptophan-Peak 2, LS-50. Vor allem bei geringen Konzentrationen von Huminsäure SRS II sind große Unterschiede zwischen den Messergebnissen und den berechneten Fluoreszenzintensitäten zu erkennen, die auf den größeren relativen Fehler beim Herstellen der Lösungen zurückzuführen sind. Ab ca. 2 mg/l Huminsäure SRS II betragen die Residuen ca. 0.

Für das LS-50 ist festzuhalten, dass die Residuen gerade im Bereich geringer Konzentrationen von Huminsäure SRS II stark schwanken. Ähnliches, aber in nicht ganz so hohem Ausmaß, ist auch am LS-55 zu beobachten. Es ist davon auszugehen, dass es sich nicht um ein Gerätespezifikum handelt, sondern um fehlerbehaftete Probelösungen. Je kleiner die Konzentration ist, desto größer ist auch der relative Fehler beim Herstellen der Lösung. Für eine höhere Genauigkeit sollten diese Versuche daher wiederholt werden.

Das unterschiedliche Ausmaß der Abweichungen der Residuen ist darauf zurückzuführen, dass am LS-55 nicht alle Werte in die Berechnung einbezogen werden konnten, da sie teilweise den Wertebereich überschritten.

Insgesamt ist festzustellen, dass die Residuen bei größeren Konzentrationen von Huminsäure SRS II nur wenig um Null schwanken. Die modellierten Werte weichen also in diesem Bereich nicht sehr stark von den Messwerten ab, so dass eine gute Vorhersage der Messwerte mittels des Modells gewährleistet ist.

#### 4.3.6 Fazit

Beim Quenching von Tryptophan durch Huminsäure SRS II liegt nur eine Quenchingart vor, deren STERN-VOLMER-Konstante am Punkt 220/340 nm zwischen 0,23 und 0,27 und am Punkt 280/340 nm zwischen 0,15 und 0,17 beträgt. Der Grund für die unterschiedlichen Werte konnte nicht ermittelt werden. Es ist jedoch festzuhalten, dass in verschiedenen Literaturstellen darauf hingewiesen wird, dass vor allem die Fluoreszenzlebensdauer von Tryptophan, und damit auch  $K_D$ , durch bis zu drei chromophore Komponenten des Moleküls beeinflusst werden. Dies könnte auch eine Ursache dafür sein, dass Tryptophan zwei recht weit voneinander entfernte Fluoreszenz-Peaks aufweist.

Eine andere Erklärung hierfür liegt in den von Tryptophan gebildeten Konformeren. Auch sie könnten für die unterschiedlichen Fluoreszenz-Peaks verantwortlich sein und so die verschiedenen Werte der STERN-VOLMER-Konstante erklären. Es ist durchaus denkbar, dass bestimmte chromophore Komponenten nur in bestimmten Konformeren Auswirkungen auf die Fluoreszenz haben.

Für weitere Untersuchungen ist es notwendig, zunächst die Quenchingart von Tryptophan und Huminsäure SRS II vollends zu klären. Anschließend kann untersucht werden, wie sich eine Veränderung des pH-Wertes der Lösungen auf das Quenching- und vor allem Fluoreszenz-Verhalten von Tryptophan auswirkt. Hier-

bei wird ausgenutzt, dass die drei chromophoren Komponenten von Tryptophan bei unterschiedlichen pH-Bereichen auftreten.

Bei natürlichen Wässern kommt es zu einer weitaus höheren Variabilität der Huminsäuren und der Aminosäuren. Um diese in einem Online-Messsystem zu berücksichtigen, sind weitere Messungen mit unterschiedlichen Kombinationen erforderlich.

Das gewählte Modell mit der Gl. (4.1) bildet die Messergebnisse an beiden Geräten sehr genau nach. Da für das Beschreiben des Modells keine gerätespezifischen Variablen verwendet werden, ist es übertragbar auf alle anderen Geräte. Auch die in dieser Arbeit bestimmten Variablen  $m$ ,  $n$  und  $K_{SV}$  sind auf die Ergebnisse anderer Messungen übertragbar, wenn mit standardisierten und Inner-Filter-Effekt-korrigierten Daten gearbeitet wird. Um ihre Werte jedoch genauer zu bestimmen, sind weitere Messungen erforderlich.



## 5 Zusammenfassung

Das Messen der Fluoreszenzintensität bestimmter Stoffe wird seit vielen Jahren für die Analysen wässriger Proben eingesetzt. Für die Trinkwasseraufbereitung birgt dieses Verfahren viele Vorteile. Messungen können schnell und kostengünstig durchgeführt werden, wodurch das Überwachen der Wasserqualität erleichtert und verbessert wird. So kann nicht nur das Rohwasser und das aufbereitete Trinkwasser kontrolliert werden, sondern auch die Qualität jedes Aufbereitungsschrittes.

Bis ein solch ausgereiftes Überwachungssystem konstruiert werden kann, müssen jedoch vor allem noch jene Faktoren untersucht werden, die auf die Fluoreszenzintensität von bestimmten relevanten Stoffgruppen eine verminderte Wirkung haben. Weiterhin muss sich eine international einheitliche Standardisierung von Messergebnissen etablieren, um Ergebnisse verschiedener Geräte und Labors miteinander vergleichen zu können.

Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag im Bereich der Standardisierung von Messergebnissen. Da die Intensität der Fluoreszenz keine quantitative Größe ist, müssen Daten um die gerätespezifischen Artefakte korrigiert werden. Dies wird durch eine Exzitations- und eine Emissionskorrektur erreicht, die jeweils spektrale Verformungen der Peaks entfernen. Für die Exzitationkorrektur wird von vielen Herstellern im Gerät ein Korrekturspektrum hinterlegt, durch das die Daten dividiert werden.

Die Möglichkeiten, eine Emissionskorrekturfunktion zu erstellen, sind sehr vielfältig. Sie lassen sich darauf reduzieren, dass bestimmte Substanzen gemessen werden und ihre Spektren anschließend mit Standardspektren der Substanzen verglichen werden. Eine sehr komfortable Möglichkeit hierzu bietet das Fluoreszenz Standard Kit von FLUKA, das aus fünf Farbstoffen besteht, die an unterschiedlichen Stellen ein Fluoreszenzmaximum aufweisen. Mit der so erstellten Korrekturfunktion können Spektren mit einer Emissionswellenlänge zwischen 300 und 750 nm korrigiert werden. Keine der in der Literatur beschriebenen Möglichkeiten zur Emissionskorrektur erfasst jedoch Emissionswellenlängen unterhalb von

300 nm. Gerade in diesem Bereich fluoresziert die für die Trinkwasseranalytik wichtige Stoffgruppe der Proteine. Messergebnisse bei  $\lambda_{em} < 300$  nm sind daher stets kritisch zu betrachten.

Nach dem Durchführen von Exzitations- und Emissionskorrektur müssen die Ergebnisse normiert werden, um auch die Intensitätswerte miteinander vergleichen zu können. Hier liegt das bisher größte Problem, denn in der Literatur werden sehr viele verschiedene Varianten verwendet. In dieser Arbeit werden drei Verfahren betrachtet, von denen jedoch nur eins zur Anwendung kommt. Dies liegt an der Datengrundlage, da Messungen der Standardwasserküvette im relevanten Zeitraum nicht durchgeführt wurden. Diese Arbeit kommt zu dem Schluss, dass das Verwenden eines einheitlichen Normierungs-Standards die beste Grundlage für die Vergleichbarkeit von Ergebnissen bildet. Dafür wird die Standardwasserküvette (PERKIN ELMER) in Verbindung mit einer RAMAN-Normierung vorgeschlagen. Für eine Normierung wird der RAMAN-Peak der Standardwasserküvette an einem bestimmten Punkt aufgenommen und als Faktor verwendet. Auch dieser Punkt sollte in Zukunft einheitlich festgelegt sein. Bis sich eine Form der Normierung etabliert hat, ist es erforderlich, die Art der durchgeführten Normierung sowie ggf. den Punkt anzugeben.

Die beschriebene Prozedur zur Standardisierung von Messungen wird für Messungen verschiedener Substanzen an den zwei Geräten LS-50 und LS-55 am TZW Dresden durchgeführt. Als Ergebnis einer Messung werden die Exzitations-Emissions-Matrizen betrachtet und visuell bewertet. Nach der Standardisierung der Matrizen sind Unterschiede nicht mehr zu erkennen. Damit lässt sich sagen, dass die Messungen der beiden Geräte nahezu identisch sind.

Prozesse, die die Fluoreszenzintensität mindern, stören das linear-proportionale Verhältnis von Fluoreszenzintensität zu Konzentration. Dazu zählen Inner-Filter-Effekte und Quenching-Effekte. Bei Inner-Filter-Effekten kommt es durch die Absorption der anregenden und der als Fluoreszenz emittierten Strahlung zu einer Verminderung des Fluoreszenzsignals. Quenching-Effekte hingegen können beim Kontakt zweier Moleküle auftreten und haben zur Folge, dass mindestens eines von beiden anschließend nicht mehr fluoreszieren kann.

Für die Inner-Filter-Effekte gibt es verschiedene Korrekturverfahren, die in KORF [2009] bereits zusammengetragen und bewertet wurden. Die Korrekturen nach LAKOWICZ und GAUTHIER benutzen Messungen der Optischen Dichte, um Inner-Filter-Effekte in einer Probe zu korrigieren. Die Korrektur nach LARSSON

---

hingegen bedient sich des RAMAN-Peaks, dessen Größe von der Konzentration der Inner-Filter-Effekt-hervorrufenden Substanz in einer Lösung abhängt.

Die Vorgehensweise bei der Korrektur nach LARSSON wird gegenüber KORF [2009] erweitert. Ebenso wird in der vorliegenden Arbeit eine lineare Regression als Bewertungsgrundlage für die Korrekturverfahren hinzugezogen. Diese Vorgehensweise bietet ein neutraleres Kriterium als die *ad hoc* eingeführte Bewertung mittels einer angenommenen Kalibrierungsgeraden. Es ist festzuhalten, dass für die verwendeten DOC-Konzentrationen trotz der verbesserten Prozedur für die Korrektur nach LARSSON und des anderen Bewertungsmaßstabes, die Korrektur nach LAKOWICZ die besten Ergebnisse liefert, dicht gefolgt von der Korrektur nach GAUTHIER.

Mit der verbesserten Prozedur für die Korrektur nach LARSSON gibt es zusätzlich zu der in KORF [2009] vorgestellten Möglichkeit zwei weitere Prozeduren, um eine Automatisierung durchzuführen, die für ein Online-Messverfahren erforderlich ist. Der Hauptgrund für das Ausscheiden der Korrektur nach LARSSON liegt darin, dass sie nicht zuverlässig bei höheren Konzentrationen arbeitet. Der RAMAN-Peak gilt als sehr schwach ausgeprägtes Phänomen und seine Größe kann bei hohen Konzentrationen von Inner-Filter-Effekt-auslösenden Substanzen so stark verringert sein, dass er in Spektren nicht mehr zu erkennen ist. Liegen die maximal zu erwartenden Werte des DOC jedoch unterhalb von 10 mg/l, kann die Korrektur nach LARSSON angewendet werden.

Bei den Quenching-Effekten wird zwischen statischem und dynamischem Quenching unterschieden. Bei statischem Quenching kommt es zur Komplexbildung zwischen Quencher und Fluorophor im Grundzustand, wobei der dabei entstehende Quencher-Fluorophor-Komplex nicht fluoresziert. Dynamisches Quenching hingegen tritt auf, wenn Quencher und Fluorophor zusammenstoßen. Der Fluorophor, der sich vorher im angeregten Zustand befand, relaxiert dabei sofort in den Grundzustand, ohne dass er Photonen emittiert.

Tritt nur eine Art von Quenching auf, lässt diese sich durch die STERN-VOLMER-Gleichung beschreiben. In der vorliegenden Arbeit wird das Quenching von Tryptophan als Vertreter der Aminosäuren durch Huminsäure SRS II betrachtet. Die Versuche lassen darauf schließen, dass die Fluoreszenzintensität von Tryptophan nur durch dynamisches Quenching beeinflusst wird. In den Versuchen liegt die STERN-VOLMER-Konstante  $K_D$  am Punkt 220/240 nm zwischen 0,24 und 0,27, am Punkt 280/340 nm zwischen 0,15 und 0,16. Die unterschiedlichen Werte

sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass an den beiden Punkte unterschiedliche chromophore Komponenten von Tryptophan fluoreszieren.

Durch Umstellen der STERN-VOLMER-Gleichung kann ein Modell mit der Form

$$F = \frac{m \cdot [\text{TRP}] + n}{1 + K_D \cdot [\text{HS}]} \quad (5.1)$$

entwickelt werden, das die gemessenen Fluoreszenzintensitäten sehr gut nachbildet. Die Variablen betragen am Punkt 220/340 nm  $m$  zwischen 0,2 und 0,3 und  $n$  zwischen 4,1 und 8,1 und am Punkt 280/340 nm  $m$  etwa 0,1 und  $n$  zwischen 0,6 bis 1,9. Die große Spanne für  $n$  ist auf Ungenauigkeiten der Messungen zurückzuführen. Um die Werte einzugrenzen, müssen weitere Versuche durchgeführt werden.

Es ist nicht auszuschließen, dass andere Quencher-Fluorophor-Paare aus den Humin- und Aminosäuren statischem Quenching oder sowohl dynamischem als auch statischem Quenching unterliegen.

In natürlichen Wässern können eine Vielzahl von Huminsäuren und Aminosäuren vorkommen. Von den Aminosäuren fluoreszieren nur vier, Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin und Histidin. Huminsäuren fluoreszieren hingegen immer und ihre Fluoreszenzintensität wird nicht durch die Anwesenheit von Aminosäuren beeinflusst. Die Struktur von Huminsäuren ist jedoch sehr komplex und uneinheitlich und wird hauptsächlich von der ihrer Vorgänger beeinflusst.

## Ausblick

Bezüglich der Exzitationskorrektur steht eine Untersuchung darüber aus, wie die einzelnen Hersteller das verwendete Korrekturspektrum aufnehmen und ob es zeitlich konstant ist oder in periodischen Abständen wiederholt gemessen werden muss.

Es ist zu untersuchen, ob und wie eine Emissionskorrektur auch unterhalb von  $\lambda_{\text{em}} = 300$  nm möglich ist.

Für weitere Untersuchungen im Bereich des Quenching ist es notwendig, zunächst die Quenchingart von Tryptophan und Huminsäure SRS II vollends zu klären. Anschließend kann untersucht werden, wie sich eine Veränderung des pH-Wertes der Lösungen auf das Quenching- und vor allem Fluoreszenz-Verhalten von Tryptophan auswirkt. Hierbei wird ausgenutzt, dass die drei chromophoren Kom-

---

ponenten von Tryptophan bei unterschiedlichen pH-Wert-Bereichen verschieden stark zur Gesamtfluoreszenzintensität beitragen.

Weiterhin ist das Quenching von anderen Aminosäure-Huminsäure-Paaren zu studieren. Die dabei entstehenden Modelle müssen miteinander verglichen und bewertet werden, ehe sie auf natürliche Wässer übertragen werden können.



# Thesen

## Vergleich der Fluoreszenzspektrometer

1. Die Fluoreszenzintensität ist keine quantitative Größe, weshalb sie an unterschiedlichen Geräten deutlich verschiedene Ergebnisse liefern kann.
2. Um Messungen von zwei Fluoreszenzspektrometern miteinander vergleichen zu können, müssen die Daten um gerätespezifische Artefakte korrigiert und normiert werden.
3. International muss sich ein Standardisierungsverfahren etablieren, das das Vergleichen von Messungen ermöglicht. Zur Standardisierung gehören Exzitations- und Emissionskorrektur sowie die Normierung der Daten.
4. Nach dem Durchführen einer Standardisierung konnte gezeigt werden, dass die Messungen der zwei Geräte am TZW Dresden identische Ergebnisse liefern.
5. Für weitere Veröffentlichungen wird die RAMAN-Normierung mittels Standardwasserküvette empfohlen, da sie in anderen Labors bereits durchgeführt wird und so das Vergleichen von Ergebnissen ermöglicht.
6. Es muss noch geklärt werden, wie das Exzitationskorrekturspektrum aufgenommen wird und ob es periodisch wiederholt werden muss und ob und wie eine Emissionskorrektur auch unterhalb von  $\lambda_{em} = 300$  nm möglich ist.

## Korrekturverfahren für Inner-Filter-Effekte

1. Inner-Filter-Effekte verringern die Fluoreszenzintensität durch Absorption der anregenden sowie der emittierten Strahlung. Dadurch wird das linear-proportionale Verhältnis zwischen Konzentration und Fluoreszenzintensität gestört.
2. Es gibt verschiedene Verfahren, um dieses linear-proportionale Verhältnis wieder herzustellen.
3. Das Korrekturverfahren nach LAKOWICZ ist im Vergleich zu den Verfahren nach GAUTHIER und LARSSON am besten dazu geeignet, eine linear-

- proportionale Beziehung zwischen Konzentration und Fluoreszenzintensität wiederzugeben.
4. Die Korrektur nach LARSSON bietet zwar viele Vorteile (keine zusätzlichen Messungen und Einträge von Fehlern durch zusätzliche Messgeräte). Die zu korrigierenden Daten müssen aber Voraussetzungen erfüllen, die bei einer Online-Messung nicht unbedingt vorausgesetzt werden können und das Messverfahren erschweren.
  5. Kann die Maximalkonzentration des DOC nicht bestimmt werden oder liegt sie über 10 mg/l, wird die Korrektur nach LAKOWICZ, andernfalls die Korrektur nach LARSSON empfohlen.

## Quenching von Huminsäure und Aminosäure

1. Huminsäuren quenchen die Fluoreszenz von Aminosäuren. Umgekehrt konnte kein Einfluss ermittelt werden.
2. Die gequenchten Fluoreszenzintensitäten können mit

$$F = \frac{m \cdot [\text{TRP}] + n}{1 + K_{\text{SV}} \cdot [\text{HS}]}$$

beschrieben werden.

3. Die STERN-VOLMER-Konstante für das Quenching von Tryptophan durch Huminsäure SRS II liegt am Punkt 220/340 nm zwischen 0,24 und 0,27 und am Punkt 280/340 nm zwischen 0,15 und 0,16.
4. Die Variablen betragen für standardisierte Messwerte am Punkt 220/340 nm  $m$  zwischen 0,2 und 0,3 und  $n$  zwischen 4,1 und 8,8, am Punkt 280/340 nm  $m$  etwa 0,1 und  $n$  zwischen 0,6 bis 1,9.
5. Die beiden Peaks von Tryptophan (220/350 nm und 280/350 nm) werden unterschiedlich stark gequench.
6. Gründe dafür könnten die chromophoren Komponenten oder Konformere von Tryptophan darstellen. Unter Umständen kommt eine Kombination von beiden infrage.
7. Es ist zu klären, welche Art von Quenching zwischen Tryptophan und Huminsäure SRS II unterliegen. Anschließend muss der Einfluss des pH-Wertes auf das Quenching von Tryptophan durch Huminsäure SRS II bestimmt werden. Die Versuche sind mit weiteren Aminosäure-Huminsäure-Paaren zu wiederholen.

# Literaturverzeichnis

- [Alston et al. 2008] ALSTON, Roy W. ; LASAGNA, Mauricio ; GRIMSLEY, Gerald R. ; SCHOLTZ, J. M. ; REINHART, Gregory D. ; PACE, C. N.: Peptid Sequence and Conformation Strongly Influence Tryptophan Fluorescence. In: *Biophysical Journal* (2008), März, S. 2280 – 2287. – DOI: 10.1529/biophysj.107.116921
- [Anderson et al. 1983] ANDERSON, Janet S. ; BOWITCH, Gary S. ; BREWSTER, Robert L.: Influence of Conformation on the Fluorescence of Tryptophan-Containing Peptids. In: *Biopolymers* 22 (1983), Nr. 11, S. 2549 – 2476. – DOI: 10.01002/bip.360221111
- [Backhaus et al. 2003] BACKHAUS, K. ; ERICHSON, B. ; PLINKE, W. ; WEIBER, R.: *Multivariate Analysemethoden*. 10. 2003. – Springer-Verlag. – ISBN 3-540-00491-2
- [Baker 2005] BAKER, Andy: Thermal Fluorescence Quenching Properties of Dissolved Organic Matter. In: *Water Research* 39 (2005), August, S. 4405 – 4412. – DOI: 10.1016/j.watres.2005.08.023
- [Cobel et al. 1998] COBEL, Paula G. ; DEL CASTILLO, Carlos E. ; AVRIL, Bernard: Distribution and Optical Properties of CDOM in the Arabian Sea during the 1995 Southwest Monsoon. In: *Deep-Sea Research Part II* 45 (1998), S. 2195 – 2223. – DOI: 10.1016/S0967-0645(98)00068-X
- [Determann et al. 1994] DETERMANN, S. ; REUTER, R. ; WAGNER, P. ; WILKOMM, R.: Fluorescent Matter in the Eastern Atlantic Ocean. Part 1: Method of Measurement and Near-Surface Distribution. In: *Deep-Sea Research Part I* 41 (1994), Nr. 4, S. 659 – 675. – DOI: 10.1016/0967-0637(94)90048-5
- [Eisel et al. ] EISEL, C. ; KORN, S. ; TAUSCH, M.: *Jablonski Diagramm – Erläuterungen zur Folie*. – URL <http://www.chemiedidaktik.uni-wuppertal>.

- de/alte\_seite\_du/material/farbe/jablonski/jablinfo.html. – Zugriffsdatum: 9. Juli 2009
- [Eliot-Laize et al. 2008] ELIOT-LAIZE, C. ; NADEN, P. S. ; OLD, G. H.: *Inner-Filterung Corrections for Fluorescence Measurements of Dissolved Organic Matter*. Oktober 2008. – URL <http://www.gees2.bham.ac.uk/research/fluoronet/membersonly/aguconference08>. – Vortrag bei der AGU Chapman Conference on Organic Matter Fluorescence, University Birmingham
- [Fettig und Steinert ] FETTIG, J. ; STEINERT, C.: *Huminstoffe und Trinkwasser – ein kleiner Ausschnitt aus dem globalen Kohlenstoffkreislauf*. – URL [http://www.hs-owl.de/fb8/fileadmin/download\\_verzeichnis/wassertechnologie/Huminstoffe.pdf](http://www.hs-owl.de/fb8/fileadmin/download_verzeichnis/wassertechnologie/Huminstoffe.pdf). – Zugriffsdatum: 17. November 2009
- [Franz 2006] FRANZ, Prof. Dr. J.: *Mitschriften der Vorlesung Statistik für Wasserwirtschaftler*. Mai 2006
- [Frimmel und Kumke 1999] FRIMMEL, Fritz H. ; KUMKE, Michael U.: Optische Parameter zur Stoffcharakterisierung vom Trinkwasser bis zum Abwasser. In: *Wiener Mitteilungen – Der spektrale Absorptionskoeffizient zur Bestimmung der organischen Abwasserbelastung* Bd. 156 (1999), S. 1 – 24. ISBN 3-85234-047-0
- [Gauthier et al. 1986] GAUTHIER, T. D. ; SHANE, E. C. ; GUERIN, W. F. ; SEITZ, C. L.: Fluorescence Quenching Method for Determining Equilibrium Constants for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Binding to Dissolved Humic Materials. In: *Environmental Science and Technology* (1986), S. 1162 – 1166
- [Gudgin et al. 1981] GUDGIN, Eva ; LOPEZ-DELGADO, Ricardo ; WARE, William R.: The Tryptophan Fluorescence Lifetime Puzzle. A Study of Decay Times in Aqueous Solution as a Function of pH and Buffer Composition. In: *Canadian Journal of Chemistry* 59 (1981), S. 1037 – 1044
- [Herschel 1845] HERSCHEL, John Frederick W.: On a Case of Superficial Colour presented by a Homogeneous Liquid internally colourless. In: *Philosophical Translation of the Royal Society of London* (1845)
- [Korf 2009] KORF, Nathalie: *Charakterisierung des aquatischen DOC mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie – Einfluss der Spektrenkorrektur*, Technische Universität Dresden, Diplomarbeit, Juni 2009

- [Lakowicz 2006] LAKOWICZ, Joseph R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third Edition. Baltimore, Maryland, USA : Springer, 2006. – ISBN 978-0-387-31278-1
- [Larsson et al. 2007] LARSSON, Tobias ; WEDBORG, Margareta ; TURNER, David: Correction of Inner-Filter Effect in Fluorescence Excitation-Emission Matrix Spectrometry using Raman Scatter. In: *Analytica Chimica Acta* (2007), Februar, Nr. 583, S. 357 – 363. – DOI: 10.1016/j.aca.2006.09.067
- [Matthews et al. 1996] MATTHEWS, B. J. H. ; JONES, A. C. ; THEODOROU, N. K. ; TUDHOPE, A. W.: Excitation-Emission-Matrix Fluorescence Spectroscopy applied to Humic Acid Bands in Coral Reefs. In: *Marine Chemistry* 55 (1996), März, S. 317 – 331. – DOI: 10.1016/S0304-4203(96)00039-4
- [Melhuish 1962] MELHUIH, W. H.: Calibration of Spectrofluorometers for Measuring corrected Emission Spectra. In: *Journal of the Optical Society of America* (1962), Nr. 52, S. 1256 – 1258
- [Meschede 2002] MESCHÉDE, Dieter: *Gerthsen Physik*. 21. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2002. – ISBN 978-3-54025-421-8
- [Mocz 1999] MOCZ, Gabor: *Intrinsic Fluorescence of Proteins and Peptides*. 1999. – URL <http://dwb4.unl/Chem/CHEM869N/CHEM869NLinks/pp99.cryst.bbk.ac.uk/projects/gmocz/fluor.htm>. – Zugriffsdatum: 19. November 2009
- [Murphy 2008] MURPHY, Kate: *CDOM Fluorescence Intercalibration Experiment – Preliminary Results*. Oktober 2008. – URL <http://www.gees2.bham.ac.uk/research/fluoronet/membersonly/aguconference08>. – Vortrag bei der AGU Chapman Conference on Organic Matter Fluorescence, University Birmingham
- [Nash und Sutcliffe 1970] NASH, J. E. ; SUTCLIFFE, J. V.: River Flow Forecasting through Conceptual Models. Part I – A Discussion of Principles. In: *Journal of Hydrology* 3 (1970), Nr. 10, S. 238 – 250. – DOI: 10.1016/0022.1694(70)90255-6
- [Parker und Barnes 1957] PARKER, C. A. ; BARNES, W. J.: Some Experiments with Spectrofluorimeters and Filter Fluorimeters. In: *The Analyst* 82 (1957), S. 606 – 618

- [Perkin Elmer 1989] PERKIN ELMER: *The Model LS 50 Luminescence Spectrometer User's Manual*. Beaconsfield, Buckinghamshire, England: , Januar 1989. – Part Number: L225 9040K
- [Perkin Elmer 2004] PERKIN ELMER: *FL WinLab Benutzerhandbuch*. 1. Ausgabe. Rodgau-Jügesheim: , Mai 2004. – Bestell-Nr.: FLW40HLP1
- [Perkin Elmer 2007] PERKIN ELMER: *LS 55 User's Guide*. Release C. Beaconsfield, United Kingdom: , March 2007. – Part Number: 09934436
- [Resch-Genger et al. 2005] RESCH-GENGER, U. ; PFEIFER, D. ; MONTE, C. ; PILZ, W. ; HOFFMANN, A. ; SPIELES, M. ; RURACK, K. ; HOLLANDT, J. ; TAUBERT, D. ; SCHÖNBERGER, B. ; NORDING, P.: Traceability in Fluorometry: Part II. Spectral Fluorescence Standards. In: *Journal of Fluorescence* 15 (2005), Mai, Nr. 3, S. 315 – 336. – DOI: 10.1007/s10895-005-2629-9
- [Römpp 1990] RÖMPP, Hermann: *Römpp Chemie Lexikon*. 9. Thieme-Verlag Stuttgart : Jürgen Falbe, Manfred Regitz (Hrsg.), 1990. – ISBN 3-13-734809-9
- [Schmidt und Petzoldt 2008] SCHMIDT, Wido ; PETZOLDT, Heike: *Einsatz von on-line Fluoreszenzmessungen zur Überwachung von Rohwässern und Wasseraufbereitungsprozessen aus algenbürtigen Wässern*. Dezember 2008. – Abschlussbericht, Förderkennzeichen 02WT 0642
- [Schönwiese 2006] SCHÖNWIESE, Christian-Dietrich: *Praktische Statistik für Meteorologen und Geowissenschaftler*. 4. Auflage. Stuttgart : Gebrüder Borntraeger, 2006. – ISBN 978-3-443-01057-7
- [Skambraks 2008] SKAMBRAKS, Anne-Katrin: *Früherkennung von Verunreinigungen in Roh- und Reinwässern – Einsatz von laserinduzierten Fluoreszenzmessungen*, Diplomarbeit, Juli 2008
- [Spiegel und Stephens 1999] SPIEGEL, Murry R. ; STEPHENS, Larry J.: *Statistik*. 3. Auflage. Frankfurt am Main : The McGraw-Hill Publishing Company, 1999. – ISBN 3-89028-948-7
- [Stemmler 2004] STEMMLER, Ivo: *Angewandte Fluoreszenz/Lumineszenz – Tutorial*. : PerkinElmer (Veranst.), 2004
- [Xu 2007] XU, Chongyu: *Statistical Methods in Hydrology*. 2007. – Lecture Notes, Uppsala University

# Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. Peter Werner für die Betreuung und Unterstützung meiner Diplomarbeit danken.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. rer. nat. Wido Schmidt und Frau Dr. rer. nat. Heike Petzold, die mich während meiner gesamten Zeit am TZW Dresden betreuten. Viele anregende Diskussionen und die angenehme Arbeitsatmosphäre haben es mir ermöglicht, diese Arbeit zu schreiben.

Ebenfalls sehr unterstützt haben mich Anika Grübel und Martin Wagner. Danke Euch für die aufmunternden Worte, für die gute und hilfreiche Kritik und das Aufweisen neuer Techniken und Möglichkeiten!

Herzlich möchte ich auch Frau Denise Georgi und Frau Jana Angermann für die sehr gute Betreuung im Labor danken. Es hat mir viel Freude bereitet, mit Euch im Labor zu arbeiten! Danke auch, dass Ihr Euch immer Zeit genommen habt für meine Fragen!

Auch meiner Vorgängerin Nathalie Korf möchte ich danken für die sehr gute, umfangreiche und differenzierte Vorarbeit. Es war ja nicht abzusehen, dass ich alles noch einmal aufrollen würde! Danke Dir für den Super-Tipp, am TZW Dresden mein Praktikum zu machen! Ich habe es keine Minute lang bereut.

Ich möchte auch meiner Familie danken für die Unterstützung während meines gesamten Studiums. Danke für das viele Korrekturlesen von Protokollen und Berichten und schlussendlich meiner Diplomarbeit, für anregende Diskussionen und die tolle gemeinsame Zeit!

Last but not least möchte ich auch meinem Mann Christoph Goletz danken. Ohne Dich und Deine guten Worte, ohne unseren wertvollen Gedankenaustausch und Deine konstruktive Kritik hätte ich diese Arbeit nicht beenden können.

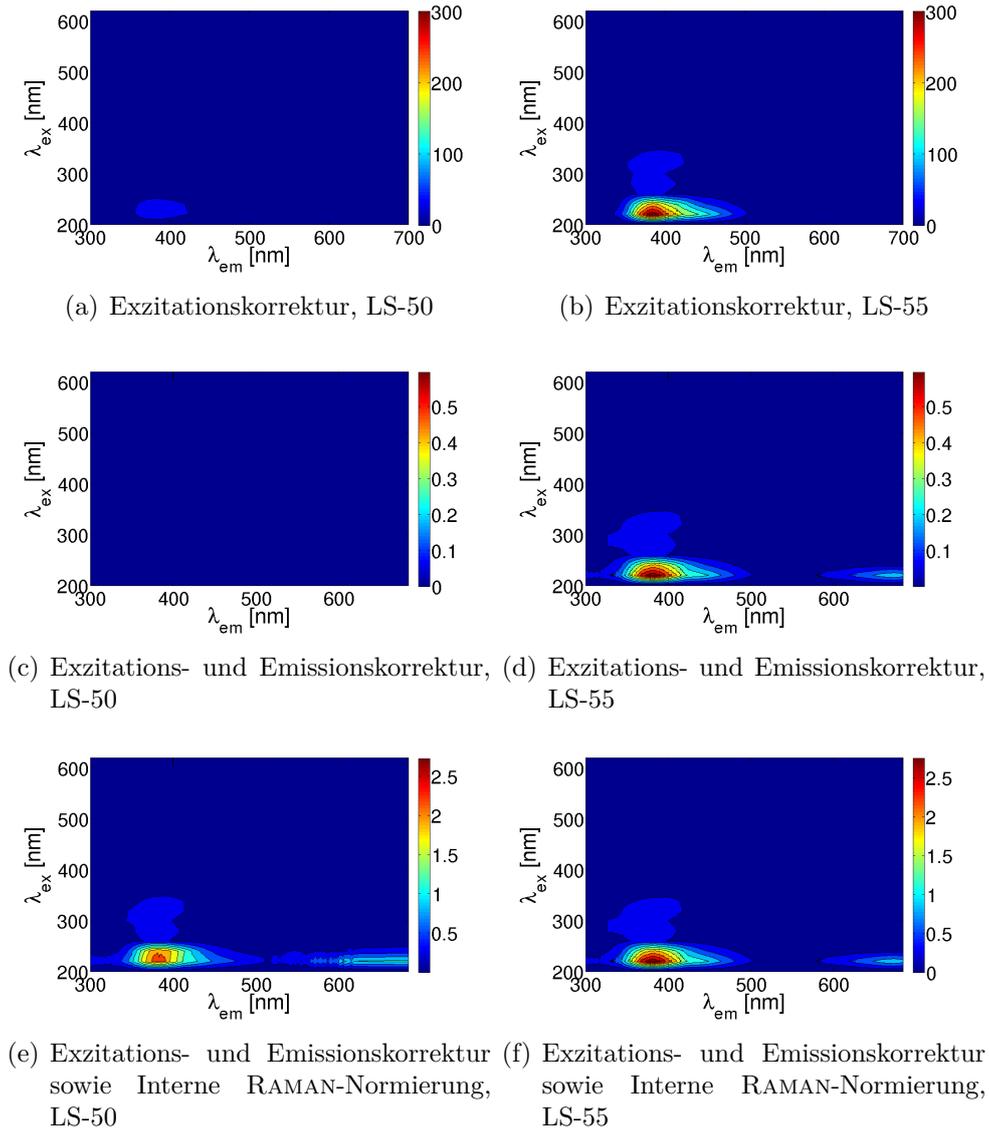


# A Chemikalien

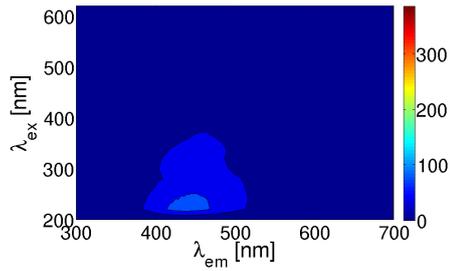
Substanz	Molare Masse	CAS
Chinin-hemisulfat Monohydrat	391,47 g/mol	804-63-7
(S)-(-)-Tryptophan	204,23 g/mol	54-12-6
Huminsäure (SRS I und II)		
C-Phycocyanin		11016-15-2
R-Phycoerythrin		11016-17-4
Ethanol	46,07 g/mol	64-17-5
di-Kaliumhydrogenphosphat	174,18 g/mol	7758-11-4
Kaliumhydrogenphosphat	136,09 g/mol	16068-46-5



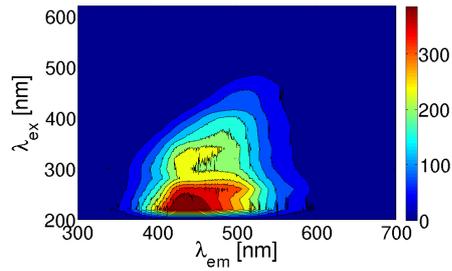
# B Vergleich der Fluoreszenzspektrometer



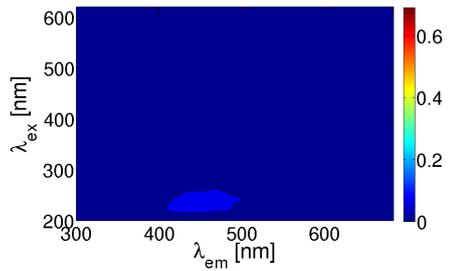
**Abb. B.1:** Auswirkungen der Korrekturen und Normierung bei einer Lösung von 0,01 mg/l Chininsulfat in MilliQ-Wasser, Messung vom 29.01.2009, Fluoreszenz-Peak bei 220/383 nm. Die Bilder zeigen die Ergebnisse der Messung nach Exzitationskorrektur, nach zusätzlicher Emissionskorrektur und nach anschließender Normierung.



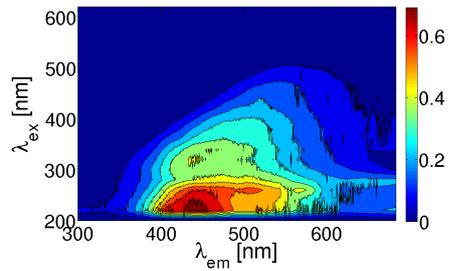
(a) Exzitationskorrektur, LS-50



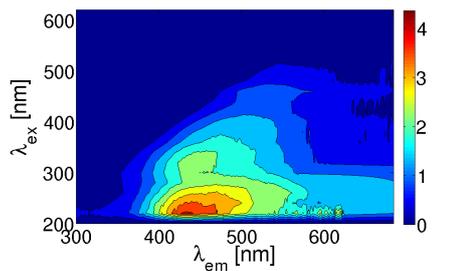
(b) Exzitationskorrektur, LS-55



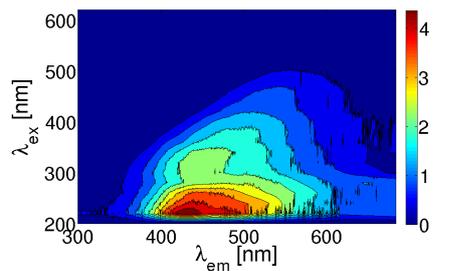
(c) Exzitations- und Emissionskorrektur, LS-50



(d) Exzitations- und Emissionskorrektur, LS-55

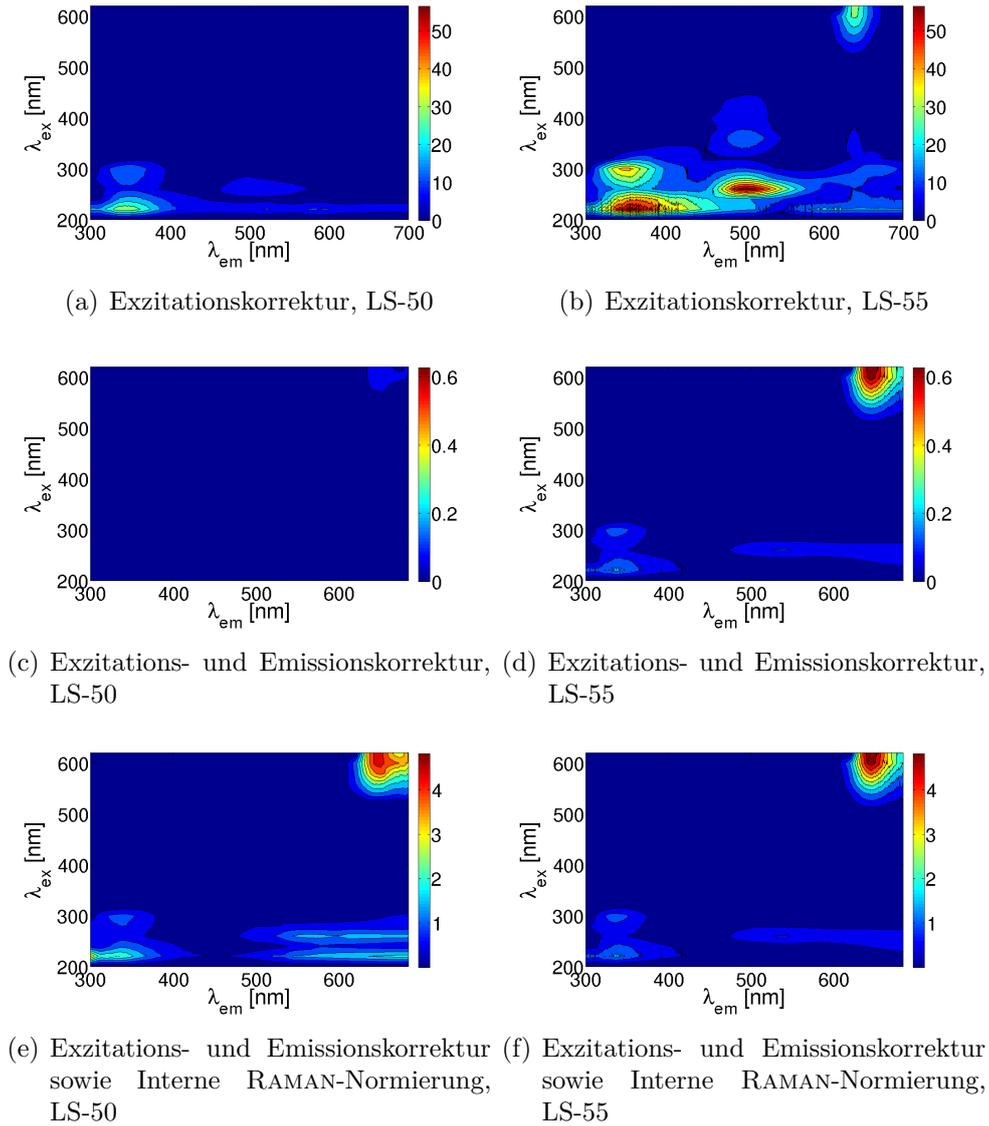


(e) Exzitations- und Emissionskorrektur sowie Interne RAMAN-Normierung, LS-50

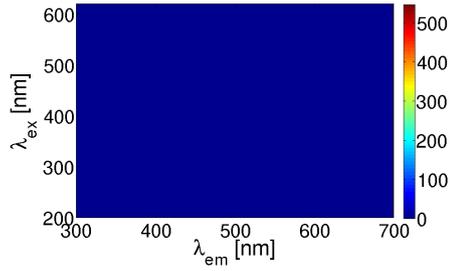


(f) Exzitations- und Emissionskorrektur sowie Interne RAMAN-Normierung, LS-55

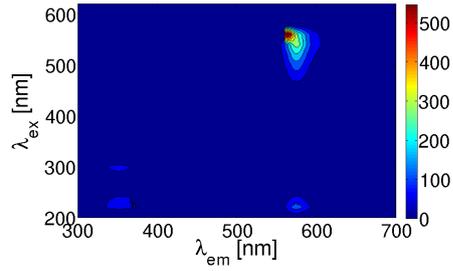
**Abb. B.2:** Auswirkungen der Korrekturen und Normierung bei einer Lösung von 10 mg/l Huminsäure SRS II in 50 mM Phosphatpuffer, Messung vom 18.09.2009, Fluoreszenz-Peak bei 240/450 nm. Die Bilder zeigen die Ergebnisse der Messung nach Exzitationskorrektur, nach zusätzlicher Emissionskorrektur und nach anschließender Normierung.



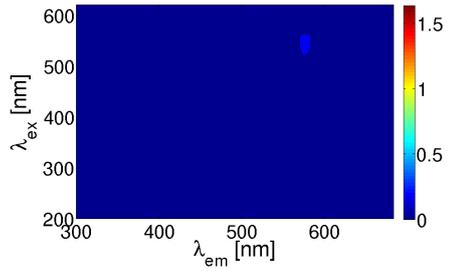
**Abb. B.3:** Auswirkungen der Korrekturen und Normierung bei einer Lösung von  $500 \mu\text{g/l}$  Phycocyanin in MilliQ-Wasser, Messung vom 16.07.2009, Fluoreszenz-Peak bei 620/645 nm. Die Bilder zeigen die Ergebnisse der Messung nach Exzitationskorrektur, nach zusätzlicher Emissionskorrektur und nach anschließender Normierung.



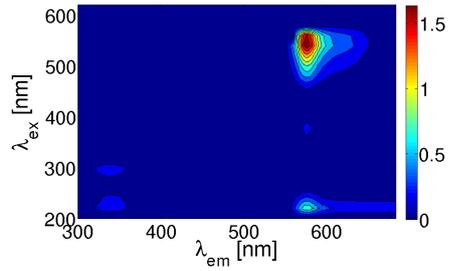
(a) Exzitationskorrektur, LS-50



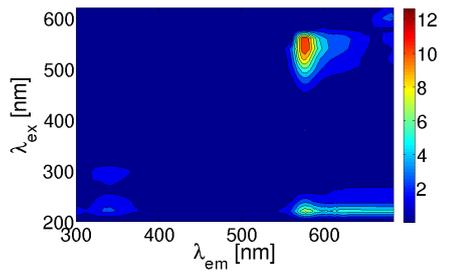
(b) Exzitationskorrektur, LS-55



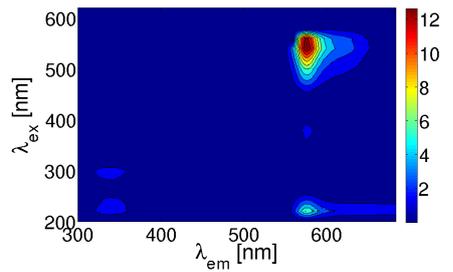
(c) Exzitations- und Emissionskorrektur, LS-50



(d) Exzitations- und Emissionskorrektur, LS-55



(e) Exzitations- und Emissionskorrektur sowie Interne RAMAN-Normierung, LS-50

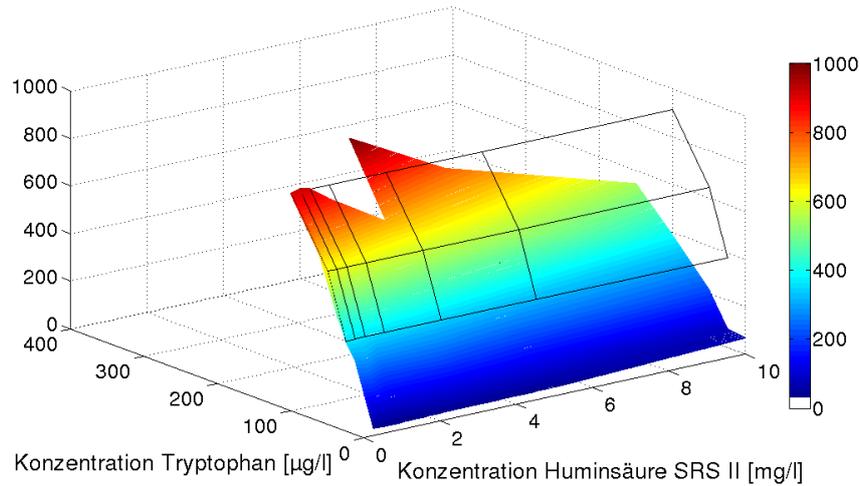


(f) Exzitations- und Emissionskorrektur sowie Interne RAMAN-Normierung, LS-55

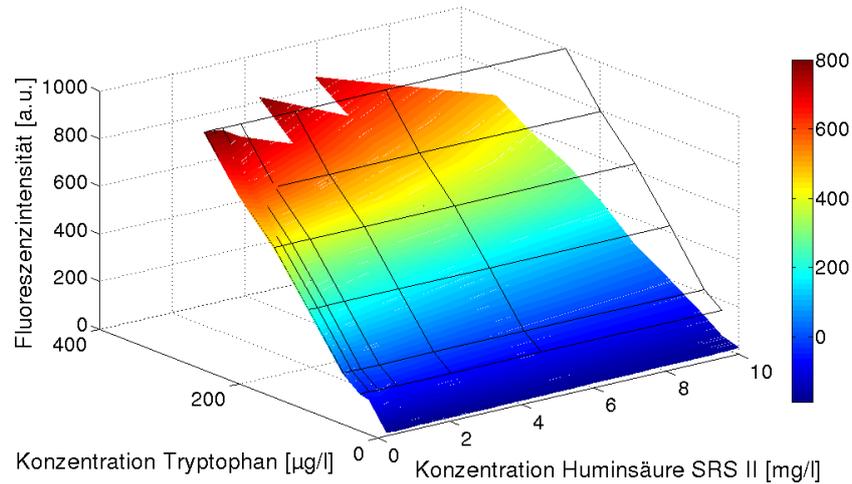
**Abb. B.4:** Auswirkungen der Korrekturen und Normierung bei einer Lösung von  $100 \mu\text{g/l}$  Phycoerythrin in MilliQ-Wasser, Messung vom 16.07.2009, Fluoreszenz-Peak bei 560/577 nm. Die Bilder zeigen die Ergebnisse der Messung nach Exzitationskorrektur, nach zusätzlicher Emissionskorrektur und nach anschließender Normierung.



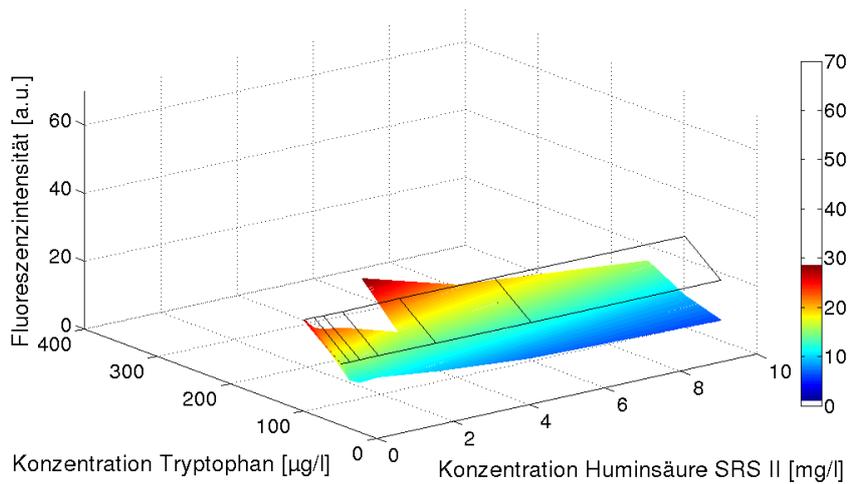
# C Untersuchungen zum Quenching



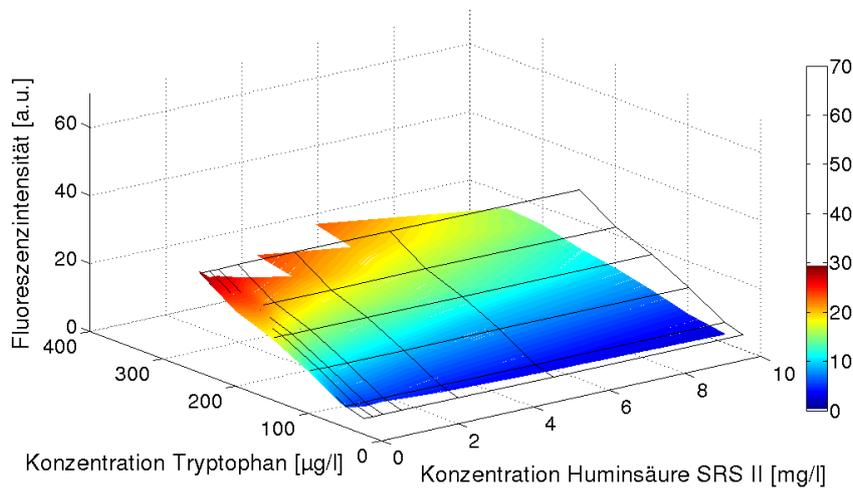
**Abb. C.1:** Fluoreszenzintensitäten beim Quenching von Tryptophan durch Huminsäure SRS II am Punkt 220/340 nm, LS-55, Oktober 2009. Das schwarze Gitter zeigt die Fluoreszenzintensitäten von Tryptophan ohne Huminsäure SRS II an.



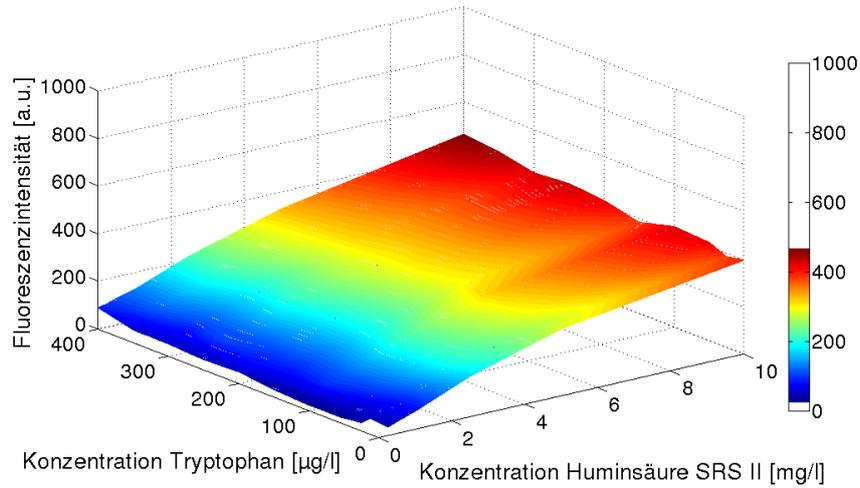
**Abb. C.2:** Fluoreszenzintensitäten beim Quenching von Tryptophan durch Huminsäure SRS II am Punkt 280/340 nm, LS-55, Oktober 2009. Das schwarze Gitter zeigt die Fluoreszenzintensitäten von Tryptophan ohne Huminsäure SRS II an.



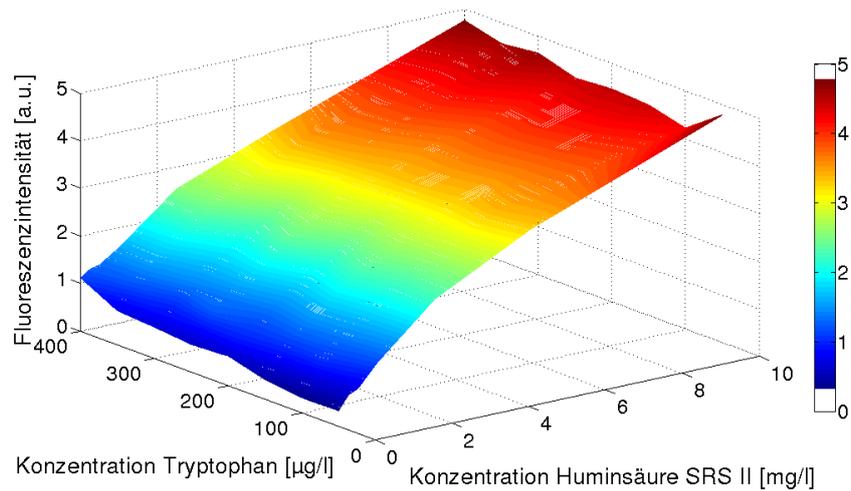
**Abb. C.3:** Fluoreszenzintensitäten beim Quenching von Huminsäure SRS II und Tryptophan am Punkt 220/340 nm, LS-55, Oktober 2009, standardisiert und Inner-Filter-Effekt-korrigiert. Das schwarze Gitter zeigt die Fluoreszenzintensitäten von Tryptophan ohne Huminsäure SRS II an.



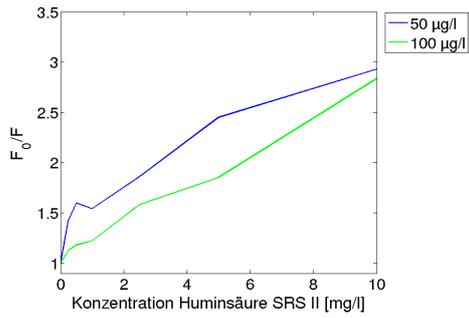
**Abb. C.4:** Fluoreszenzintensitäten beim Quenching von Huminsäure SRS II und Tryptophan am Punkt 280/340 nm, LS-55, Oktober 2009, standardisiert und Inner-Filter-Effekt-korrigiert. Das schwarze Gitter zeigt die Fluoreszenzintensitäten von Tryptophan ohne Huminsäure SRS II an.



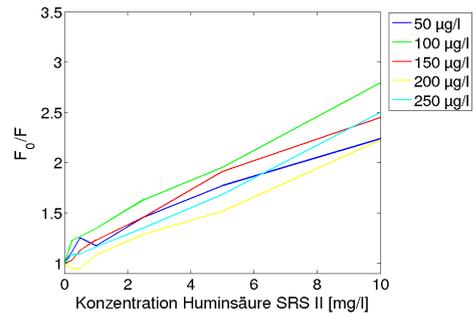
**Abb. C.5:** Fluoreszenzintensitäten am Punkt 240/450 nm, LS-55. Es ist keine Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration an Tryptophan zu erkennen.



**Abb. C.6:** Standardisierte und Inner-Filter-Effekt-korrigierte Fluoreszenzintensitäten am Punkt 240/450 nm, LS-55.

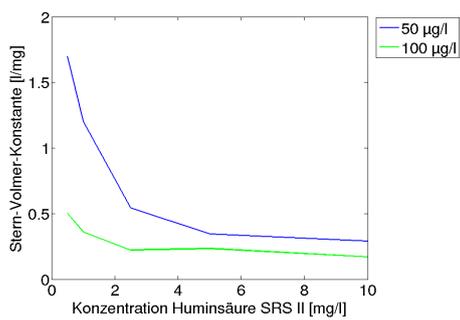


(a) Tryptophan-Peak 1

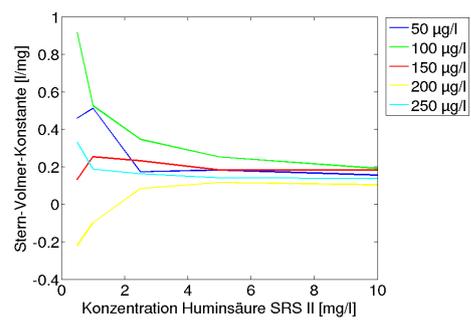


(b) Tryptophan-Peak 2

**Abb. C.7:** STERN-VOLMER-Plots verschiedener Konzentrationen von Tryptophan in Abhängigkeit von der Konzentration an Huminsäure SRS II, LS-55. Als Grundlage dienen die standardisierten und Inner-Filter-Effekt-korrigierten Daten. An beiden Peaks liegt ein weitestgehend linearer Verlauf vor.



(a) Tryptophan-Peak 1



(b) Tryptophan-Peak 2

**Abb. C.8:** STERN-VOLMER-Konstante für verschiedene Konzentrationen an Tryptophan in Abhängigkeit von der Konzentration von Huminsäure SRS II, LS-55. Als Grundlage dienen die standardisierten und Inner-Filter-Effekt-korrigierten Daten.

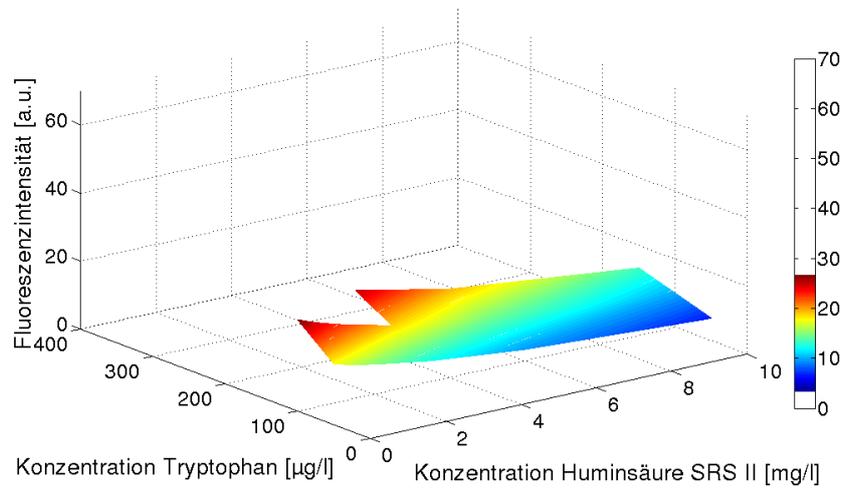


Abb. C.9: Modellierte Fluoreszenzintensitäten, Tryptophan-Peak 2, LS-55

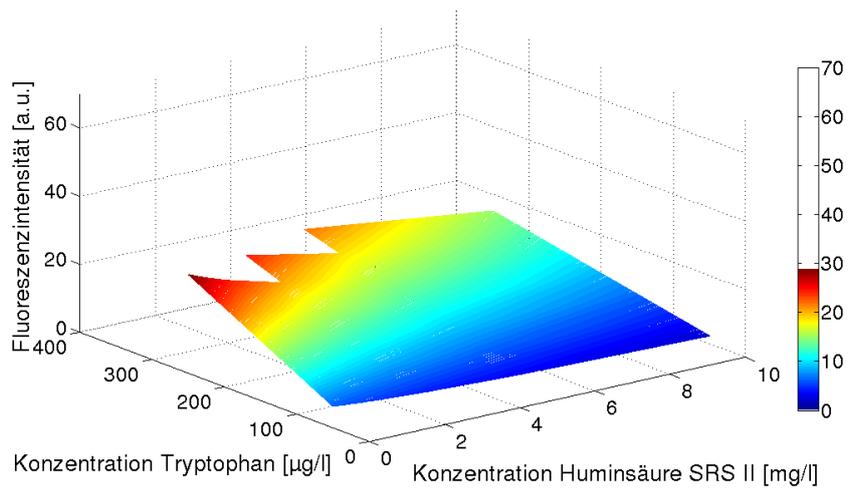
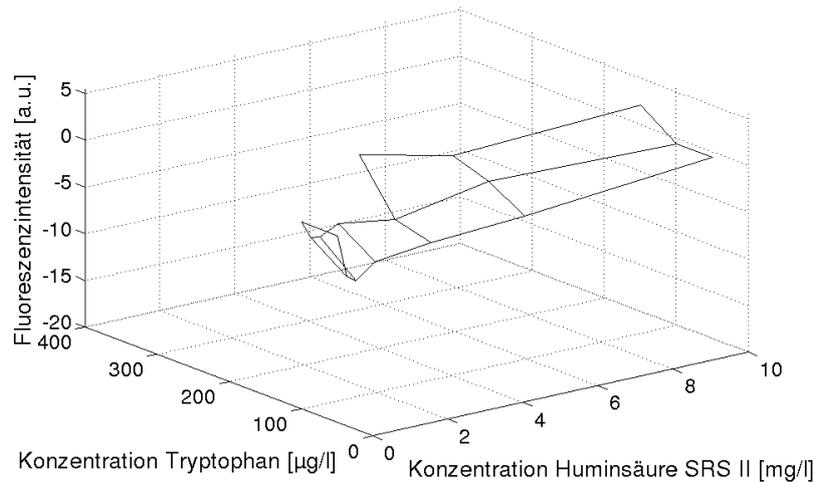
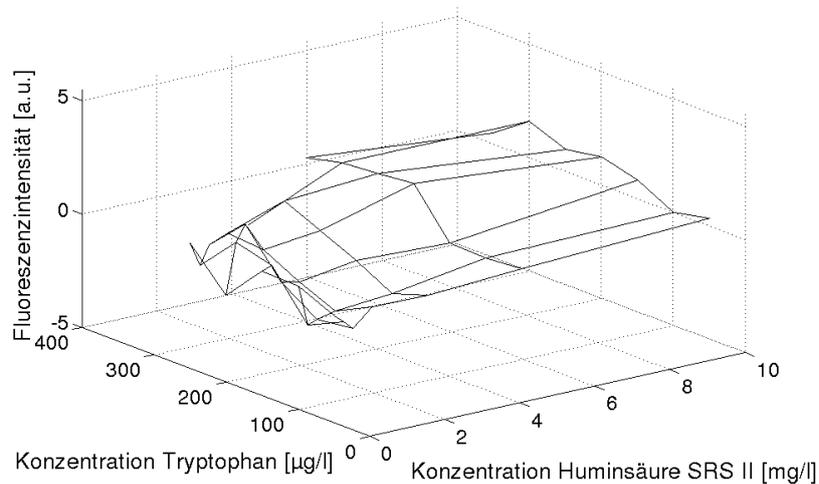


Abb. C.10: Modellierte Fluoreszenzintensitäten, Tryptophan-Peak 2, LS-55



**Abb. C.11:** Residuen des Modells, Tryptophan-Peak 1, LS-55. Vor allem bei geringen Konzentrationen von Huminsäure SRS II sind große Unterschiede zwischen den Messergebnissen und den berechneten Fluoreszenzintensitäten zu erkennen, die auf den größeren relativen Fehler beim Herstellen der Lösungen zurückzuführen sind. Ab ca. 2 mg/l Huminsäure SRS II betragen die Residuen ca. 0.



**Abb. C.12:** Residuen des Modells, Tryptophan-Peak 2, LS-55. Vor allem bei geringen Konzentrationen von Huminsäure SRS II sind große Unterschiede zwischen den Messergebnissen und den berechneten Fluoreszenzintensitäten zu erkennen, die auf den größeren relativen Fehler beim Herstellen der Lösungen zurückzuführen sind. Ab ca. 2 mg/l Huminsäure SRS II betragen die Residuen ca. 0.



# D Anlagen auf CD

- Diplomarbeit als \*.tex
- Diplomarbeit als \*.pdf
- Autorenreferat mit Schlagwörtern als \*.pdf
- Poster zur Diplomarbeit als \*.pdf
- Passfoto als \*.jpg