

Entwicklung ratiometrischer optischer Chemosensoren

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat
genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Chem. Michael Fritzsche
geboren am 03.11.1975 in Hannover

(2006)

Referent: Prof. Dr. T. Scheper
Institut für Technische Chemie
Universität Hannover

Korreferent: Prof. Dr. B. Hitzmann
Institut für Technische Chemie
Universität Hannover

Tag der Promotion: 21. Juni 2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2001 bis April 2006 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper angefertigt. Bei ihm möchte ich mich an dieser Stelle für die Betreuung meiner Arbeit und die fachliche Unterstützung bedanken.

Für die Übernahme des Korreferates danke ich Herrn Prof. Dr. Bernd Hitzmann.

Bei den Mitarbeitern der Mechanikwerkstatt und der Elektronikwerkstatt unseres Institutes bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die ständige Hilfsbereitschaft bei technischen Fragen oder Problemen.

Vielen Dank auch an Frau Cláudia Garcia Barreiro für die Mitwirkung an den Experimenten zur chemometrischen Spektralanalyse sowie an Herrn Prof. Dr. Hartmut Meyer und Herrn Rainer Dargel für die Hilfe bei der Untersuchung des Sauerstoffindikators.

Außerdem möchte ich allen Mitarbeitern des Institutes für das angenehme Arbeitsklima danken und für alle Anregungen und Tipps, die mir im Laufe meiner Promotion geholfen haben.

Schließlich bedanke ich mich bei der Stiftung Stipendien-Fonds des Verbandes der Chemischen Industrie für die zweijährige Förderung durch ein Chemiefonds-Stipendium.

Optische Chemosensoren, die auf Messungen der Lumineszenzintensität eines Indikatorfarbstoffes basieren, können durch Verwendung interner Referenzsignale unempfindlicher gegenüber Störungen werden. Durch die ratiometrische Messung bei zwei Wellenlängen werden Veränderungen der Signalintensität durch Ausbleichen des Farbstoffes oder mechanische Einflüsse kompensiert. Voraussetzung dafür ist ein Indikator, dessen Spektrum neben dem Messsignal einen Wellenlängenbereich enthält, der als interne Referenz geeignet ist.

Thema der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung derartiger ratiometrischer Messmethoden zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration, des pH-Wertes und der Temperatur.

Bei wässrigen Farbstofflösungen konnte unter bestimmten Bedingungen durch eine Konzentrationserhöhung der Informationsgehalt des Fluoreszenzspektrums erhöht werden. So führte die Erhöhung der Farbstoffkonzentration bei einer Lösung von Rhodamin B als Temperaturindikator zur Entstehung geeigneter Referenzsignale, während diese in verdünnter Lösung fehlen.

Als Alternative zur Quotientenbildung aus zwei Messwerten wurde am Beispiel des pH-Indikators Fluoresceinamin die Analyse des gesamten Spektrums diskutiert. Mit Hilfe chemometrischer Methoden konnte der pH-Wert unabhängig von der Temperatur oder der absoluten Fluoreszenzintensität bestimmt werden. Die Methode zeichnete sich gegenüber der ratiometrischen Messung bei zwei Wellenlängen durch einen breiteren Messbereich aus.

Auf der Grundlage eines Indikators aus Platin- und Zink-Octaethylporphyrin wurde ein Sensorsystem zur ratiometrischen Bestimmung der Sauerstoffkonzentration und der Temperatur entwickelt. Obwohl es sich bei dem Indikator um eine Mischung aus zwei Farbstoffen handelt, war das Signal dieses Sensors unempfindlich gegenüber Ausbleichen. Zur Temperaturmessung wurde der Indikator in Epoxidharz immobilisiert, zur Herstellung der Sauerstoffoptode dagegen in einer porösen Polysulfon-Membran. Da die Wellenlängen von Mess- und Referenzsignal in beiden Fällen gleich sind, kann die Messgröße durch einfaches Austauschen der Optode gewechselt werden. Bei Kombination beider Immobilisierungsverfahren konnte das Referenzsignal des Sauerstoffsensors zur Kompensation von Temperatureinflüssen genutzt werden. In diesem Fall ist mit dem Sensor eine temperaturunabhängige Sauerstoffmessung möglich.

Schlagworte: optische Chemosensoren; Photolumineszenz; interne Referenz

The signal of luminescence-based optical chemical sensors can be stabilized against disturbance by use of internal referencing. Measurement of the ratio of the intensity at two wavelengths is used to compensate for changes in the luminescence intensity resulting from photobleaching or mechanical influences. This method requires an indicator whose spectrum contains a region that can be used as an internal reference for the measurement signal.

The development of such ratiometric measurement techniques for the determination of the concentration of oxygen, of pH and of temperature is the subject of this thesis.

Under certain conditions the information content of the fluorescence spectra of dyes in aqueous solution could be increased when the concentration of the dye was raised. Raising the concentration in a solution of rhodamine B used as a temperature indicator resulted in the appearance of appropriate reference signals, and these were not found with a dilute solution.

As an alternative to forming the quotient of measurements at two wavelengths the entire luminescence spectrum can be analysed. This method was discussed for aminofluorescein as a pH indicator. Using chemometric methods the pH value could be determined independently of the temperature and the peak intensity. Compared with the ratiometric dual-wavelength method this procedure results in a wider measurement range.

On the basis of an indicator containing platinum octaethylporphyrin and zinc octaethylporphyrin a sensor system was developed for the ratiometric determination of oxygen concentration and of temperature. Even though the indicator was a mixture of two dyes, the signal from this sensor was insensitive to bleaching. For temperature measurement the indicator was immobilized in epoxy resin and for the oxygen optode in a porous polysulphone membrane. As the wavelengths of the measurement and reference signals are the same in both cases the quantity being measured can be changed by simply exchanging the optode. Combining both immobilization techniques the reference signal of the oxygen sensor could be used to compensate for temperature effects. In this way a temperature-independent measurement of oxygen can be made with the sensor.

Keywords: optical chemical sensors; photoluminescence; internal referencing

Inhalt

1. Theoretische Einführung	1
1.1 Die Funktionsweise optischer Sensoren	2
1.1.1 Dynamische Lumineszenzlöschung	2
1.1.2 Statische Lumineszenzlöschung	2
1.2 Der Aufbau optischer Sensoren	3
1.3 Stärken und Schwächen optischer Sensoren	4
1.3.1 Vorteile gegenüber elektrochemischen Methoden	4
1.3.2 Störungen des Lumineszenzsignals	5
1.4 Methoden zur Signalstabilisierung	6
1.4.1 Messung der Abklingzeit	6
1.4.2 Verwendung interner Referenzsignale	7
2. Zielsetzung	10
3. Durchführung der Lumineszenzmessungen	11
4. Versuche mit Fluorophoren in wässriger Lösung	13
4.1 Die Bedeutung von Farbstoffkonzentration und Messanordnung	13
4.2 Ausnutzung von Konzentrationseffekten zur Temperaturmessung	15
4.3 Spektralanalyse zur pH-Wert-Bestimmung	16
4.3.1 Messung bei zwei Wellenlängen	18
4.3.2 Berücksichtigung des gesamten Spektrums	19
4.3.3 Vergleich beider Messverfahren	21
4.4 Zusammenfassung	23
5. Sauerstoff- und Temperaturmessung mit Porphyrin-Komplexen	24
5.1 Die Lumineszenz des Porphyrin-Indikators	24
5.2 Immobilisierung des Indikators	26
5.2.1 Temperatursensor	26
5.2.2 Sauerstoffsensor	27
5.3 Die Sauerstoff- und Temperaturabhängigkeit der Lumineszenz	28
5.4 Ratiometrische Messungen von Temperatur und Sauerstoff	31
5.5 Zusammenfassung	32

6. Aufbau eines eigenständigen Sauerstoff- und Temperatursensors.....	34
6.1 Das optische System	34
6.2 Kalibrierung des Sensors	37
6.2.1 Temperaturoptode.....	37
6.2.2 Sauerstoffoptode	38
6.3 Überprüfung der Signalstabilität.....	41
6.3.1 Ausbleichen des Farbstoffes	41
6.3.2 Mechanische Störungen.....	42
6.4 Sauerstoffmessung in flüssiger Phase	43
6.5 Kombi-Sensor zur temperaturunabhängigen Sauerstoffmessung.....	44
6.6 Zusammenfassung	47
7. Diskussion und Ausblick	49
8. Literatur	51
9. Anhang.....	54
9.1 Versuchsbeschreibungen	54
9.1.1 Anbindung von Fluoresceinamin an Polyvinylalkohol.....	54
9.1.2 Fluoreszenzmessungen mit Fluoresceinamin/Polyvinylalkohol.....	54
9.1.3 Herstellung des Porphyrin-Indikators	55
9.1.4 Immobilisierung des Porphyrin-Indikators in Epoxidharz.....	56
9.1.5 Herstellung der sauerstoffsensitiven Membran	56
9.2 Abbildungen zur Entwicklung des Sensorsystems.....	57
9.2.1 Foto des Sensorsystems.....	57
9.2.2 Foto der optischen Komponenten	57
9.2.3 Schematische Darstellung der elektronischen Schaltung.....	58
9.3 Verwendete Chemikalien	59
9.4 Verwendete Geräte.....	59
9.5 Abkürzungen.....	60
9.6 Tabellarischer Lebenslauf.....	61

1. Theoretische Einführung

1968 stellte BERGMANN eine neuartige Methode zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration vor. Das Verfahren basierte auf der Sauerstoffabhängigkeit der Fluoreszenz eines immobilisierten Indikators. Seitdem ist eine Vielzahl optischer Sensoren für eine Reihe von Messgrößen entwickelt worden, beispielsweise zur Bestimmung des pH-Wertes, der Temperatur, der Konzentration von Kohlenmonoxid, Ammoniak oder bestimmter Metallionen [WOLFBEIS, 2000].

Optische Sensoren können im einfachsten Fall die spektroskopischen Eigenschaften des Analyten selbst detektieren, zum Beispiel wenn dieser in charakteristischer Weise fluoresziert. So kann etwa die Konzentration des Coenzym NADH in bestimmten Bioprocessen anhand dessen Fluoreszenz überwacht werden [WOLFBEIS, 2005]. Häufig muss jedoch wie bei Sauerstoff- oder pH-Sensoren auf geeignete Indikatoren zurückgegriffen werden, deren optische Eigenschaften von der Konzentration des Analyten abhängen. Dabei können unterschiedliche optische Messgrößen erfasst werden, zum Beispiel Photolumineszenz, Absorption oder Reflexion.

Steht für den Analyten kein geeigneter Indikator zur Verfügung, so kann die Messung in einigen Fällen indirekt erfolgen, indem ein optischer Sensor mit einem katalytischen System gekoppelt wird. Der Analyt wird dann chemisch umgesetzt, während mit der Reaktion verbundene Veränderungen – zum Beispiel des pH-Wertes oder der Sauerstoffkonzentration – mit dem entsprechenden Sensor detektiert werden. Handelt es sich bei dem Katalysator um eine biologische Komponente, wird ein solcher indirekter Sensor als optischer Biosensor bezeichnet. Mit derartigen Sensoren, die auf optischen Sauerstoff- oder pH-Messungen basieren, können unterschiedliche biologische Komponenten in Bioprocessen erfasst werden, wie zum Beispiel Glucose, Harnstoff oder Penicillin [SCHEPER et al., 1994].

Thema dieser Arbeit sind optische Sensoren der zweiten Kategorie, die auf der Lumineszenz von Indikatorfarbstoffen basieren und keine katalytische Reaktion voraussetzen. Dabei kann es sich entweder um Fluoreszenz oder um Phosphoreszenz handeln. Das Messprinzip ist in beiden Fällen identisch. Da die Lichtemission bei der Phosphoreszenz einen spinverbotenen Singulett/Triplett-Übergang erfordert, ist die Lebensdauer des angeregten Zustandes in diesem Fall länger als bei der Fluoreszenz [ATKINS, 2001]. Meist betragen die Abklingzeiten typischer Phosphoreszenzindikatoren jedoch nicht mehr als einige Millisekunden [WOLFBEIS, 2005], sodass sich dieser Unterschied bei einfachen Intensitätsmessungen in der Regel nicht bemerkbar macht. Die Funktionsweise des optischen Sensors ist prinzipiell unabhängig davon, ob es sich bei der Messgröße um Fluoreszenz oder Phosphoreszenz handelt. Als Bezeichnung für beide Phänomene

wird im Folgenden vereinfachend der Ausdruck Lumineszenz anstelle des präziseren Begriffes der Photolumineszenz verwendet.

1.1 Die Funktionsweise optischer Sensoren

Bei vielen Lumineszenzfarbstoffen wird die Lichtemission durch Wechselwirkung mit bestimmten Fremdmolekülen vermindert. Dieser Vorgang wird als Lumineszenzlöschung oder Quenching bezeichnet. Solche Farbstoffe können als Indikatoren zur Bestimmung der Konzentration der Löschermoleküle (Quencher) verwendet werden. Grundsätzlich wird zwischen statischer und dynamischer Lumineszenzlöschung unterschieden [SCHULMANN, 1977].

1.1.1 Dynamische Lumineszenzlöschung

Bei der dynamischen Lumineszenzlöschung tritt der Quencher mit dem angeregten Farbstoffmolekül in Wechselwirkung und bewirkt dessen strahlungslose Desaktivierung. Dies ist beispielsweise bei der Lumineszenzlöschung durch molekularen Sauerstoff der Fall. Bei der Kollision mit einem angeregten Farbstoffmolekül geht die Anregungsenergie auf den Sauerstoff über, ohne dass es zur Emission von Lumineszenzlicht kommt. Abhängig von der Konzentration des Quenchers $[Q]$ werden dadurch sowohl die Lumineszenzintensität I als auch die Lebensdauer τ des angeregten Zustandes vermindert. Diesen Zusammenhang beschreibt die Stern-Volmer-Gleichung:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] \quad \text{Gleichung 1-1}$$

I_0 und τ_0 bezeichnen die Lumineszenzintensität beziehungsweise Lebensdauer in Abwesenheit des Quenchers. K_{SV} ist die Stern-Volmer-Konstante der Reaktion. Sie gibt Auskunft über die Effizienz des Löschungsvorgangs und hängt von den Diffusionskoeffizienten von Farbstoff und Quencher ab [AMAQ, 2003]. Die Stern-Volmer-Gleichung wird häufig zur Beschreibung optischer Sauerstoffsensoren herangezogen. $[Q]$ bezeichnet dann in der Regel nicht die Sauerstoffkonzentration in der sensitiven Farbstoffschicht, sondern in dem sie umgebenden Medium.

1.1.2 Statische Lumineszenzlöschung

Wenn die Wechselwirkung des Quenchers mit dem Farbstoffmolekül in dessen elektronischen Grundzustand stattfindet, liegt statische Lumineszenzlöschung vor. Farbstoff und Quencher bilden einen Komplex, der nicht oder in anderer Weise luminesziert als der freie Luminophor. Dabei kann es sich zum Beispiel um eine Protonierung des Farbstoffes handeln, bei der Protonen als Quencher fungieren. Die

Intensität der ursprünglichen Lumineszenz wird auch hier mit steigender Konzentration der Löschermoleküle reduziert, aber im Gegensatz zum dynamischen Quenching bleibt die Lebensdauer des angeregten Zustandes davon unbeeinflusst. Die Effektivität der statischen Lumineszenzlöschung hängt von der thermodynamischen Stabilität des Komplexes aus Quencher und Luminophor ab [SCHULMANN, 1977].

1.2 Der Aufbau optischer Sensoren

Der Prozess der Lumineszenzlöschung kann zur Entwicklung optischer Sensoren genutzt werden, wenn Indikatorfarbstoffe zur Verfügung stehen, die von dem Analyten gequenchet werden. Dazu wird der Farbstoff in der Regel in einer Polymermatrix immobilisiert und durch Beleuchtung mit Licht geeigneter Wellenlängen angeregt. Das Lumineszenzsignal wird durch ein optisches System vom Anregungslicht getrennt und mit einem Photomultiplier oder einer Photodiode detektiert. Nach Kalibrierung des Sensors kann aus diesem Signal die Konzentration des Analyten berechnet werden.

Faseroptische Sensoren verwenden Lichtleiter zur Signalübertragung zwischen sensitiver Schicht und Detektoreinheit. Die Messung kann dann auch an mehrere Meter vom Gerät entfernten Orten durchgeführt werden, während durch den flexiblen Lichtleiter das Anregungslicht von der Lichtquelle zur Messstelle und das Emissionslicht zurück zum Detektor geleitet wird. Die Einheit aus Lichtleiter und darauf immobilisiertem Farbstoff wird als Optode bezeichnet.

Neben der Wahl des Lumineszenzfarbstoffes hat die Immobilisierungsmethode großen Einfluss auf die Eigenschaften des Sensors. Die Polymermatrix muss für den Analyten durchlässig sein, den Indikator aber sicher zurückhalten, damit dieser beim Einsatz in flüssigen Medien nicht ausgewaschen werden kann. Insbesondere bei pH-Sensoren, die eine hydrophile Matrix erfordern, ist die Gefahr des Auswaschens im wässrigen Medium groß. Deshalb wird der pH-Indikator häufig durch kovalente Anbindung an das Polymer fixiert, sofern er über geeignete funktionelle Gruppen verfügt und seine Funktion durch die Bindung nicht negativ beeinträchtigt wird. Eine andere Methode der kovalenten Immobilisierung besteht darin, zunächst eine polymerisierbare Gruppe an den Farbstoff zu binden und anschließend durch (Co-)Polymerisation ein lumineszierendes Polymer zu synthetisieren. Ein solches Verfahren wird bei AGAYN und WALT (1993) zur Immobilisierung von Fluoresceinamin beschrieben.

Durch Variation oder gezielte chemische Veränderung der Matrix können die Empfindlichkeit beziehungsweise der Messbereich des Sensors beeinflusst werden. AMAO et al. (1999) haben gezeigt, dass durch die Fluorierung einer Polystyrol-Matrix die Sauerstoffempfindlichkeit von darin eingebettetem Platin-Octaethylporphyrin ver-

vierfach werden kann. Bei Verwendung des extrem sauerstoffdurchlässigen Poly(1-trimethylsilyl-1-Propin) ist sogar der Aufbau eines Sensors für die Sauerstoff-Spurenanalytik mit Platin-Octaethylporphyrin als Indikator möglich (AMAO et al., 2000). Die Phosphoreszenz dieses Indikators wird darin etwa 50-mal effektiver gelöscht als in Polystyrol.

Die Eigenschaften einer Optode können demnach durch Veränderungen der Immobilisierungsmethode in gewissen Grenzen variiert werden, ohne den Indikator zu verändern. Diese Tatsache eröffnet die Möglichkeit, einen Sensor durch einfaches Auswechseln der Optode für verschiedene Anwendungen mit stark unterschiedlichen Anforderungen an Messbereich und Empfindlichkeit nutzbar zu machen, ohne dass Änderungen am optischen System vorgenommen werden müssen. Auch die Detektion eines anderen Analyten kann durch den Wechsel der Polymermatrix möglich werden, wenn deren Durchlässigkeit eine entsprechende Selektion erlaubt. Voraussetzung ist allerdings, dass die veränderten Wechselwirkungen zwischen Matrix und Indikator keine extremen Verschiebungen im Lumineszenzspektrum hervorrufen.

1.3 Stärken und Schwächen optischer Sensoren

Das gestiegene Interesse an optischen Sensoren hängt mit der Tatsache zusammen, dass optische Messverfahren eine Reihe von Vorteilen mit sich bringen. Andererseits kann das Lumineszenzsignal auch einigen störenden Einflüssen unterliegen.

1.3.1 Vorteile gegenüber elektrochemischen Methoden

Das sensitive Element eines optischen Sensors ist die Matrix aus Polymer und dem darin eingebetteten Indikatorfarbstoff. Diese Schicht ist meistens weniger als einen Millimeter oder sogar nur wenige Mikrometer stark. Die benötigte Fläche hängt von der Intensität der Lumineszenz, dem optischen System, der Empfindlichkeit des Detektors und dem Ausmaß von Fremdlichteinwirkungen ab, ist aber in der Regel klein gegenüber dem Durchmesser herkömmlicher Sauerstoff- oder pH-Elektroden. Dadurch eignen sich optische Sensoren ausgezeichnet zur Miniaturisierung, sodass die Messung der Sauerstoffkonzentration, des pH-Wertes oder der Temperatur mit hoher Ortsauflösung und in sehr kleinen Probenvolumina möglich ist [KLIMANT et al., 1997]. TAN et al. (1992) beschreiben pH-Sensoren von weniger als einem Mikrometer Durchmesser. Optoden dieser Größenordnung zeigen Ansprechzeiten im Millisekunden-Bereich und ermöglichen sogar intrazelluläre Messungen [LU und ROSENZWEIG, 2000].

Der Einsatz elektrochemischer Sonden in kleinen Volumina ist nicht nur wegen deren üblicher Größe problematisch, sondern wird auch durch die Tatsache erschwert,

dass der Analyt während der Messung verbraucht wird. Bei kleinen Proben oder in diffusionslimitierten Bereichen wird dessen Konzentration daher durch die Messung mit einer Elektrode verringert. Optische Sensoren haben dagegen keinen Einfluss auf die Konzentration des Analyten, da sie auf einem nicht-invasiven Messprinzip basieren, und können daher auch in diesen Fällen eingesetzt werden. Darüber hinaus benötigen sie keinen elektrischen Kontakt zur sensitiven Schicht, sodass die Messung auch kontaktfrei durch ein Fenster erfolgen kann. Ein solcher Aufbau kann beispielsweise in empfindlichen (Bio-)Prozessen von Vorteil sein, wenn das Risiko von Kontaminationen minimiert werden soll. Auch in explosionsgefährdeten Bereichen können Optoden wegen des Fehlens elektrischer Kontakte gefahrlos verwendet werden.

Ein weiterer Vorteil von Optoden besteht darin, dass diese im Gegensatz zu Elektroden kein Bezugselement benötigen [WOLFBEIS, 2005]. Da ihr Messprinzip unempfindlich gegenüber elektromagnetischen Feldern ist, sind optische Sensoren zudem selbst bei hohen Feldstärken wie zum Beispiel in NMR-Reaktoren einsetzbar [KÖNEKE et al., 1998].

Alte oder defekte Optoden können schließlich verhältnismäßig preiswert ersetzt oder mit einem neuen Messkopf versehen werden.

1.3.2 Störungen des Lumineszenzsignals

Bei der Entwicklung und Anwendung optischer Sensoren ist zu beachten, dass die gemessene Lumineszenzintensität nicht nur von der Konzentration des Analyten abhängt. Durch Ausbleichen des Farbstoffes oder mechanische Einwirkungen wie das Biegen oder Bewegen von Lichtleitern kann es zu Drift beziehungsweise Schwankungen des Messsignals kommen. Außerdem ist die Lumineszenz grundsätzlich temperaturabhängig, wodurch eine konstante Versuchstemperatur oder eine Neukalibrierung nach Veränderung der Temperatur nötig wird, sofern nicht die Temperatur selbst mit dem Sensor bestimmt werden soll. Die Temperatur kann sowohl die Lumineszenz in Abwesenheit des Quenchers beeinflussen als auch die Effizienz der Lumineszenzlöschung. In der Regel nimmt die Lumineszenzintensität mit steigender Temperatur ab [FÖRSTER, 1982], während bei der dynamischen Lumineszenzlöschung die Stern-Volmer-Konstante und damit das Quenching zunimmt [PAPKOVSKY, 1995]. Im Fall der statischen Lumineszenzlöschung hängt der Einfluss der Temperatur von der Thermodynamik der Komplexbildung aus Quencher und Farbstoff ab.

pH-Sensoren zeigen häufig eine gewisse Abhängigkeit von der Ionenstärke der Probe, da die für Protonen durchlässige Immobilisierungsmatrix auch Wechselwirkungen mit anderen Ionen zulässt. Auch Sauerstoffindikatoren können in wässriger Lösung von einigen Ionen beeinflusst werden, wenn diese als Quencher

für die Lumineszenz wirken [WOLFBEIS, 2005]. Diese Fehlerquelle kann jedoch durch die Verwendung hydrophober Matrices wie Silikon vermieden werden, die undurchlässig für Ionen in wässriger Lösung sind. Die Querempfindlichkeit vieler Sauerstoffindikatoren gegenüber Stickoxiden [PAPKOVSKY, 1995] spielt in der Praxis wegen des Fehlens dieser Gase in der Probe oft nur eine untergeordnete Rolle.

1.4 Methoden zur Signalstabilisierung

Unter den im vorherigen Kapitel beschriebenen Problemen optischer Sensoren ist insbesondere die Anfälligkeit von Lumineszenzmessungen für Intensitätsschwankungen und Ausbleichen des Farbstoffes von Bedeutung. Es sind daher verschiedene Verfahren entwickelt worden, um diese Fehlerquellen zu eliminieren. Die Drift des Sensors aufgrund des Ausbleichens lässt sich durch die Verwendung eines möglichst photostabilen Indikators verringern. Außerdem kann die photochemische Zerstörung des Farbstoffes verlangsamt werden, indem dieser nicht dauerhaft beleuchtet wird, sondern nur während der Aufzeichnung von Messwerten. Die Photostabilität des Indikators kann zudem durch dessen gezielte chemische Veränderung gesteigert werden. Insbesondere die Oxidationsempfindlichkeit gegenüber Singulett-Sauerstoff, welcher bei der dynamischen Lumineszenzlöschung in Sauerstoffsensoren entsteht, kann durch die Einführung elektronenziehender Substituenten verringert werden. LAI et al. (2004) beobachteten bei mehrfach fluorierten Platin-Porphyrinen ein 10 bis 20-mal langsames Ausbleichen als bei den unsubstituierten Farbstoffen.

Durch derartige Maßnahmen kann die Zerstörung des Indikators und die damit verbundene Drift des Sensors verlangsamt, aber nicht prinzipiell ausgeschlossen werden. Außerdem bleibt die Empfindlichkeit gegenüber sonstigen Schwankungen der Signalintensität davon unbeeinflusst. Besser ist es daher, wenn die Messung unabhängig von der absoluten Lumineszenzintensität durchgeführt werden kann. Dazu stehen grundsätzlich zwei verschiedene Verfahren zur Verfügung: die Messung der Lebensdauer der Lumineszenz und die Verwendung interner Referenzsignale.

1.4.1 Messung der Abklingzeit

Bei optischen Sensoren, die auf dynamischer Lumineszenzlöschung basieren, kann anstelle der Lumineszenzintensität die Lebensdauer des angeregten Zustandes als Messgröße erfasst werden. Diese wird durch den Quencher ebenso verringert wie die Intensität der Emission, ist aber prinzipiell unabhängig von der Zahl der angeregten Moleküle und der detektierten Lichtintensität. Die Drift des Sensors beim Ausbleichen des Farbstoffes kann durch Lebenszeitmessung gegenüber der einfachen Intensitätsmessung deutlich reduziert werden [LAM, 2002]. Die

Lebensdauer wird entweder aus dem Abklingen der Lumineszenzintensität nach dem Ausschalten der Lichtquelle bestimmt oder bei Modulation des Anregungslichtes aus der Phasenverschiebung der Lumineszenz errechnet [GRATTAN und ZHANG, 1994]. Die Lebenszeitmessung eignet sich für Farbstoffe mit relativ langen Abklingzeiten, wie sie bei vielen Sauerstoffindikatoren beobachtet werden. Bei Ruthenium-Diamin-komplexen beträgt die Lebensdauer der Fluoreszenz 1 bis 5 μs , während viele Fluorophore Lebenszeiten zwischen 0,1 und 100 ns besitzen [BECKER, 1969]. Noch langsamer klingt die Phosphoreszenz von Metallporphyrinen ab. Die Lebensdauer des angeregten Zustandes beträgt bei diesen Farbstoffen zwischen 0,1 und 50 ms [WOLFBEIS, 2005].

Der Einsatzbereich der Lebenszeitmessung ist auf dynamische Lumineszenzlöschung beschränkt, weil statisches Quenching keinen Einfluss auf die Lebensdauer des angeregten Zustandes hat. Diese Methode wird daher vor allem bei optischen Sauerstoffsensoren angewendet, ist technisch allerdings etwas aufwändiger als Intensitätsmessungen. Der störende Einfluss von Temperaturschwankungen kann durch die Messung der Abklingzeit grundsätzlich nicht eliminiert werden, da die Lebenszeit der Lumineszenz immer mehr oder weniger stark temperaturabhängig ist. Andererseits wird dieser Effekt zum Aufbau von Temperatursensoren ausgenutzt, die auf Lebenszeitmessungen basieren [GRATTAN und ZHANG, 1994].

1.4.2 Verwendung interner Referenzsignale

Um Lumineszenzmessungen von der absoluten Intensität unabhängig zu machen, ohne die Abklingzeit bestimmen zu müssen, kann neben dem eigentlichen Messsignal ein Referenzsignal verwendet werden, das im einfachsten Fall unabhängig von der Konzentration des Analyten ist. Mess- und Referenzsignal müssen sich in ihren Anregungs- und/oder Emissionswellenlängen ausreichend unterscheiden, damit sie durch eine entsprechende Optik getrennt und einzeln detektiert werden können. Der Quotient aus zwei Messungen bei diesen Wellenlängen stellt dann eine von der absoluten Intensität der Lumineszenz unabhängige Messgröße dar. Das Referenzsignal kann entweder vom Indikator selbst stammen oder durch Zusatz eines zweiten Farbstoffes erzeugt werden. Bei der Verwendung zwei verschiedener Farbstoffe können durch die Referenzmessung zwar Intensitätsschwankungen kompensiert werden, aber ein Ausbleichen des Indikators hat eine mehr oder weniger starke Drift des Sensors zur Folge, sofern nicht beide Farbstoffe die gleiche Photostabilität besitzen. Dieses Problem tritt nicht auf, wenn das Referenzsignal vom Indikator selbst erzeugt wird. Dazu muss dessen Lumineszenzspektrum Bereiche aufweisen, die unterschiedliche Abhängigkeiten von der Konzentration des Analyten haben.

Die größte Herausforderung bei der Entwicklung solcher ratiometrischer Sensoren

besteht im Auffinden beziehungsweise der Synthese geeigneter Indikatoren, da die Spektren der meisten Lumineszenzfarbstoffe keine entsprechenden Referenzsignale enthalten [SZMACINSKI und LAKOWICZ, 1994].

Interne Referenzmessungen werden vor allem bei optischen pH-Sensoren häufig verwendet [WOLFBEIS, 2005]. Die Spektren von pH-Indikatoren enthalten oft so genannte isosbestische Punkte, in denen sich die Kurven der Absorptionsbeziehungsweise Fluoreszenzspektren bei verschiedenen pH-Werten schneiden. Ein Beispiel für ein solches Fluoreszenzspektrum ist in Abbildung 1-1 gezeigt.

Das Auftreten solcher isosbestischer Punkte hängt mit der Anwesenheit zwei verschiedener absorbierender beziehungsweise lumineszierender Spezies zusammen, zwischen deren Konzentrationsänderungen ein linearer Zusammenhang besteht [RÖMPP, 1995]. In diesem Fall handelt es sich dabei um die protonierte und die deprotonierte Form des Indikators, deren Verhältnis sich bei Variation des pH-Wertes ändert. Die Fluoreszenz am isosbestischen Punkt kann in optischen pH-Sensoren als interne Referenz verwendet werden, da das Signal bei dieser Wellenlänge unabhängig vom pH-Wert ist [PARKER et al., 1993].

Bei den in Abbildung 1-1 gezeigten Spektren könnte die interne Referenzmessung auch an der Stelle des zweiten Emissionsmaximums erfolgen, welches eine entgegengesetzte pH-Abhängigkeit zeigt. Dadurch wird die Änderung des Signalquotienten mit dem pH-Wert und somit die Empfindlichkeit des Sensors entsprechend gesteigert.

Auch bei der optischen Temperaturmessung kommen interne Referenzmessungen zum Einsatz. Dabei werden die Emissionsbanden unterschiedlicher angeregter Zustände eines Lanthanoid-Fluorophors getrennt detektiert. Da diese Signale sich in ihrer Temperaturabhängigkeit unterscheiden, kann der Quotient aus beiden Intensitäten als Messgröße verwendet werden [GRATTAN und ZHANG, 1994].

Da optische Sauerstoffsensoren auf dynamischer Lumineszenzlöschung basieren, treten in den Spektren der verwendeten Indikatoren bei Variation der Sauerstoffkonzentration keine isosbestischen Punkte wie bei vielen pH-Indikatoren auf. Lange

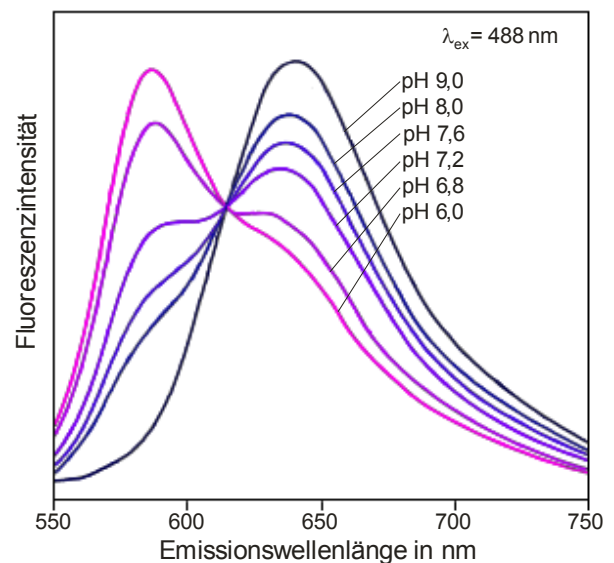


Abbildung 1-1: Fluoreszenzspektren von carboxy-SNARF-1, eines Seminafto-Rhodamin-Farbstoffes, bei verschiedenen pH-Werten [INVITROGEN CORPORATION, 2005].

Zeit waren keine Indikatoren bekannt, die sich für eine ratiometrische Sauerstoffmessung eignen. Zur Signalstabilisierung von Sauerstoffoptoden wird daher meist die Lebenszeitmessung verwendet oder ein zweiter Farbstoff als Referenz eingesetzt [WOLFBEIS, 2005; IM et al., 2005]. KOSTOV, HARMS, et al. (2000) haben jedoch gezeigt, dass interne Referenzmessungen auch bei der optischen Sauerstoffbestimmung möglich sein können. Dazu wurde ein neuartiger Lumineszenzfarbstoff aus der Familie der Platin-1,2-Endithiolate verwendet, welcher neben der sauerstoffabhängigen Phosphoreszenz ein Fluoreszenzsignal emittiert, das nicht durch Sauerstoff gequencht wird und somit als Referenz geeignet ist. Die Fluoreszenz dieses Farbstoffes wird im gleichen Spektralbereich angeregt wie die Phosphoreszenz. Die Maxima der Emissionsbanden liegen bei 570 beziehungsweise 680 nm, sodass eine optische Trennung und separate Detektion von Mess- und Referenzsignal mit zwei Detektoren möglich ist. Da sich die Wellenlängenbereiche der Fluoreszenz und Phosphoreszenz überschneiden, enthält das auf diese Weise gemessene Referenzsignal noch Anteile der sauerstoffabhängigen Phosphoreszenz und umgekehrt. Eine alternative Messmethode nutzt zur Unterscheidung der Signale die stark unterschiedlichen Abklingzeiten von 0,5 ns beziehungsweise 15 μ s [KOSTOV und RAO, 2003]. Dadurch wird eine bessere Trennung von Phosphoreszenz und Fluoreszenz ermöglicht. Außerdem können beide Signale mit nur einem Detektor gemessen werden. Bei diesem Verfahren wird das Anregungslicht mit unterschiedlichen Frequenzen moduliert. Während nach Anregung bei hohen Frequenzen die langlebige Phosphoreszenz im Gegensatz zur Fluoreszenz vollständig demoduliert ist, bleibt die Modulation beider Signale bei niedrigen Anregungsfrequenzen erhalten. Die Messung der Modulationen der Lumineszenzsignale bei einer hohen und einer niedrigen Anregungsfrequenz ermöglicht die Berechnung des Verhältnisses von Phosphoreszenz und Fluoreszenz. Diese Methode ist auch bei starker Überlappung der Wellenlängenbereiche von Phosphoreszenz und Fluoreszenz anwendbar.

Ein Spezialfall der internen Referenzierung bei faseroptischen Sauerstoffmessungen wird von JORGE et al. (2005) beschrieben. Dabei wird die Temperaturabhängigkeit der optischen Eigenschaften eines Langpassfilters zur Temperaturmessung genutzt. Der Filter ist in den Messkopf der Optode integriert und absorbiert einen Teil des zurück reflektierten Anregungslichtes. Dieses reflektierte Anregungslicht wird bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen detektiert, deren Intensitätsverhältnis von der Lage der Absorptionskante des Filters und somit von der Temperatur abhängt. Die auf diese Weise bestimmte Temperatur kann zur Korrektur des Sensorsignals verwendet werden, sodass ein temperaturunabhängiges Messergebnis erhalten wird.

2. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, optische Chemosensoren zu entwickeln, die auf Messungen der Lumineszenzintensität basieren und dennoch unempfindlich gegenüber Veränderungen des Messsignals durch mechanische Störungen oder Ausbleichen sind.

Anhand ausgewählter sauerstoff-, pH- oder temperatursensitiver Farbstoffe sollten Möglichkeiten aufgezeigt werden, diese Parameter unter Verwendung interner Referenzsignale zu messen, sodass das Ergebnis unabhängig von der absoluten Signalintensität ist.

Um den Informationsgehalt des Lumineszenzspektrums noch besser zu nutzen, kann anstelle der Quotientenbildung aus lediglich zwei Messwerten auch das gesamte Spektrum analysiert werden. Unter Anwendung geeigneter mathematischer Methoden wird somit ebenfalls ein von der absoluten Signalhöhe unabhängiger Ergebniswert erhalten. Diese Möglichkeit sollte am Beispiel einer pH-Messung untersucht werden.

Für die Sauerstoffmessung mittels interner Referenzen sollte ein eigenständiger, faseroptischer Sensor entwickelt werden, der bei Verwendung entsprechender Optoden auch zur Temperaturmessung eingesetzt werden kann.

Die Entwicklung dieses Sensorsystems erforderte zunächst die Auswahl und Charakterisierung einer geeigneten Farbstoff-Matrix-Kombination. Die Herstellung der Optoden musste in Hinblick auf die Signaleigenschaften und das Ansprechverhalten optimiert werden. Im nächsten Schritt war ein optisches System zu entwickeln, das Lumineszenzmessungen bei den entsprechenden Wellenlängen durch einen einzigen Lichtleiter ermöglicht. Dieses System sollte später zusammen mit einer Elektronik für die Ansteuerung der Lichtquellen und die Signalerfassung beziehungsweise -auswertung in einem portablen Gehäuse untergebracht werden. Der Sensor musste anhand von Sauerstoff- und Temperaturmessungen getestet und charakterisiert werden. Dabei war insbesondere die Signalstabilisierung durch die interne Referenzmessung zu überprüfen. Die mögliche Weiterentwicklung zu einem temperaturunabhängigen Sauerstoffsensor sollte den Abschluss dieser Arbeiten bilden. Dazu sollte geprüft werden, ob mit diesem Sensor eine von der Temperatur unabhängige Sauerstoffmessung möglich ist, indem das Referenzsignal zur Eliminierung des Temperatureinflusses verwendet wird.

3. Durchführung der Lumineszenzmessungen

Für alle Lumineszenzmessungen der folgenden Kapitel 4 und 5 wurde ein F-4500 Fluoreszenz-Spektrophotometer der Firma Hitachi verwendet.

Bei diesem Gerät wird mit Hilfe eines Gittermonochromators aus dem Anregungslicht einer Xenon-Lampe der gewünschte Wellenlängenbereich ausgesondert und das Licht anschließend in die Küvette mit der Probe fokussiert. Die Messung des Lumineszenzlichtes erfolgt rechtwinklig zur Anregung hinter einem zweiten Gittermonochromator mit einem Photomultiplier. Die Position beider Gitter kann zur Einstellung verschiedener Wellenlängenkombinationen verändert werden. Dadurch können zur Aufnahme eines Lumineszenzspektrums entweder die Anregungswellenlänge oder die Emissionswellenlänge oder auch beide variiert werden. Das Ergebnis stellt demnach das Anregungsspektrum, das Emissionsspektrum beziehungsweise das dreidimensionale Lumineszenzspektrum, kurz 3D-Spektrum der Probe dar. Letzteres wird in der Literatur häufig auch als 2D-Spektrum bezeichnet.

Die gemessene Intensität der Lumineszenz ist keine geräteunabhängige Größe. Sie wird von der Geometrie des Strahlengangs, den Einstellungen des Spektrophotometers, der Justierung der Anregungslichtquelle und der Schichtdicke der verwendeten Küvette nachhaltig beeinflusst. Deshalb werden die Intensitäten der in dieser Arbeit dargestellten Lumineszenzspektren in willkürlich relativen Einheiten angegeben. Die Lumineszenzintensitäten verschiedener Spektren innerhalb eines Diagramms wurden jeweils mit denselben Einstellungen aufgenommen und sind daher untereinander direkt vergleichbar.

Um Lumineszenzmessungen bei definierter Temperatur durchführen zu können, wurde für dieses Spektrophotometer ein temperierbarer Küvettenhalter konstruiert, der aus einem doppelwandigen Aluminiumblock besteht und von einer Temperierflüssigkeit durchspült wird. Der Aluminiumkörper umschließt die Küvette bis auf zwei Fenster für den Durchgang des Anregungs- beziehungsweise Emissionslichtes.

Lumineszenzspektren von Farbstoffen in festen Polymermatrizes wurden unter Einsatz eines V-förmigen Lichtleiterbündels ebenfalls mit dem F-4500 Spektrophotometer aufgenommen. Dazu wurden die beiden Arme des Faserbündels mit Hilfe einer Halterung so im Innenraum des Gerätes positioniert, dass das Anregungslicht über einen Spiegel in den einen Arm geleitet werden konnte, während die Stirnfläche des anderen sich im Fokus des Detektorstrahlengangs befand. Die andere Seite des Faserbündels wurde in einer dafür konstruierten Aluminium-Messkammer über dem auf einem Glasträger immobilisierten Farbstoff fixiert. Diese Kammer befand sich in einem temperierten Wasserbad und konnte für Sauerstoffmessungen mit entsprechenden Gasmischungen durchströmt werden.

Der Aufbau für Lumineszenzmessungen an festen Proben ist schematisch in Abbildung 3-1 dargestellt.

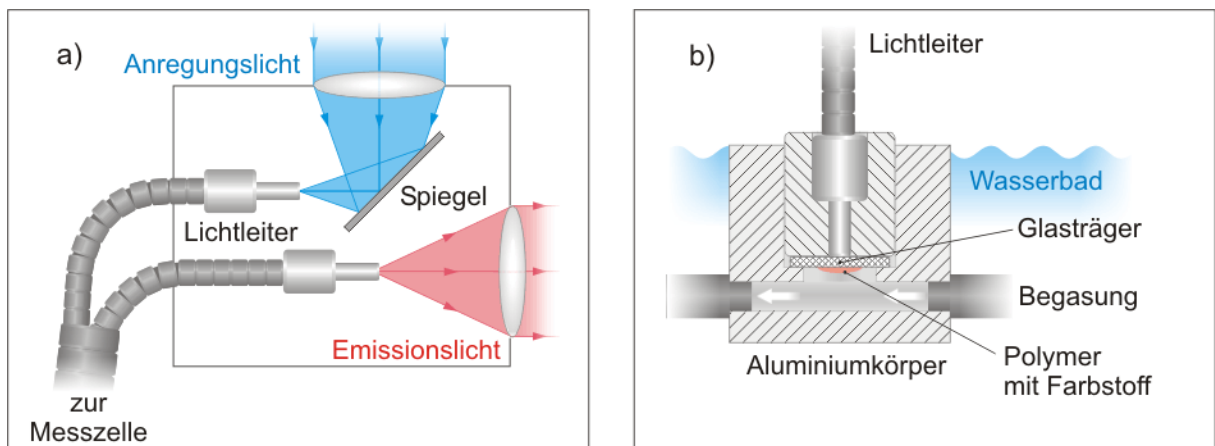


Abbildung 3-1: Messanordnung zur Lumineszenzspektroskopie an festen Proben mit dem F-4500 Spektrophotometer. **a)** Anschluss des Lichtleiters, **b)** Schnitt durch die Messkammer.

4. Versuche mit Fluorophoren in wässriger Lösung

Die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche zur optischen Messung von Temperatur und pH-Wert wurden mit wässrigen Lösungen der Fluoreszenzfarbstoffe im Spektrofluorometer durchgeführt. Sie stellen somit Voruntersuchungen dar, auf deren Grundlage gegebenenfalls optische Sensoren mit immobilisierten Indikatoren entwickelt werden können. Gegenstand dieser Arbeiten waren die Ausnutzung von Konzentrationseffekten zur Generierung interner Referenzsignale sowie die Analyse des gesamten Fluoreszenzspektrums zur Berechnung der Analytkonzentration.

4.1 Die Bedeutung von Farbstoffkonzentration und Messanordnung

In stark verdünnten Lösungen nimmt die Lumineszenz mit steigender Farbstoffkonzentration zu. Im Gegensatz zur Absorption durchläuft sie jedoch ein Maximum und nimmt bei weiterer Konzentrationserhöhung wieder ab. Der Grund dafür sind zunehmende Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffmolekülen, die eine Verminderung der Lumineszenz bewirken. Dieser als Konzentrationslöschung bezeichnete Effekt ist vor allem auf die Bildung von Farbstoffdimeren zurückzuführen. Neben der Verringerung der Lumineszenzintensität kann dadurch auch die Form des Spektrums verändert werden [SCHULMANN, 1977].

In vielen Spektrofluorometern wird die Lumineszenzemission senkrecht zum einfallenden Anregungslicht erfasst, sodass letzteres bis vor das Detektorfenster eine gewisse Weglänge durch die Probe zurücklegen muss. Bedingt durch diese Messanordnung kann bei genügend hohen Farbstoffkonzentrationen zusätzlich zu den oben beschriebenen Konzentrationseinflüssen der so genannte innere Filtereffekt das Spektrum verändern [RENDELL, 1987]. Dieser Effekt beruht auf der Tatsache, dass das Anregungslicht mit zunehmender Weglänge und Farbstoffkonzentration durch die Absorption der Lösung geschwächt wird. Bei Überlagerung von Emissions- und Absorptionsspektrum kann außerdem ein Teil des emittierten Lumineszenzlichtes reabsorbiert werden. Die Folge dieses inneren Filtereffektes ist eine Schwächung des detektierten Lumineszenzsignals, die bei den Wellenlängen am stärksten ausgeprägt ist, bei denen der Farbstoff am effektivsten absorbiert. Bei entsprechend hohen Farbstoffkonzentrationen wird dann bei Anregung in diesem Wellenlängenbereich kaum noch Lumineszenz gemessen, da das Anregungslicht beim Eintritt in die Küvette nahezu vollständig absorbiert wird. Die Lumineszenz findet folglich nur an dieser Stelle statt, und das emittierte Licht kann den Detektor nicht erreichen. Den Einfluss des inneren Filtereffektes auf das Lumineszenzsignal verdeutlicht Abbildung 4-1 am Beispiel von Fluoresceinamin, gebunden an Polyvinylalkohol (vergleiche dazu Kapitel 4.3).

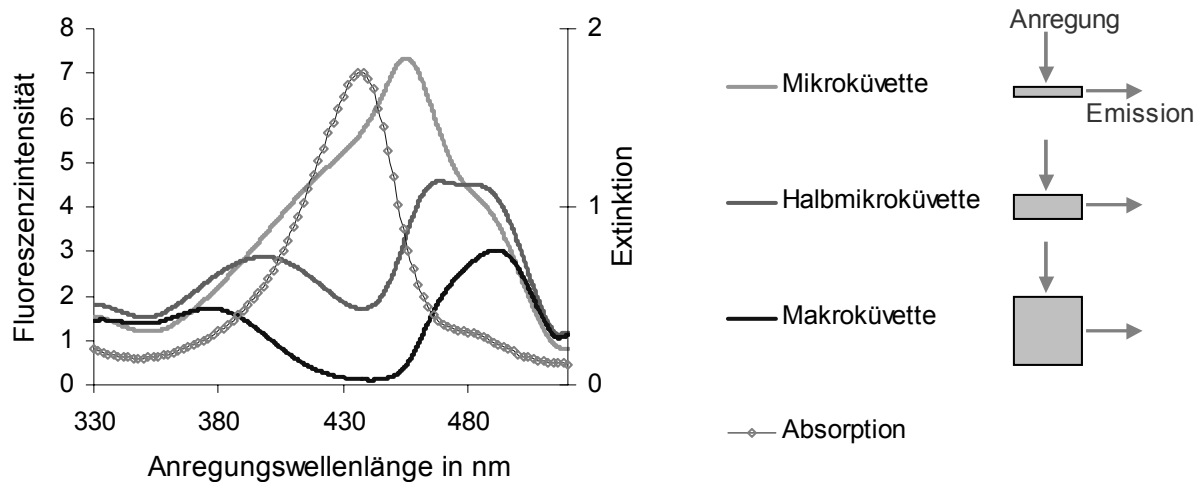


Abbildung 4-1: Fluoreszenz- und Absorptionsspektren einer 1 %igen wässrigen Lösung von Polyvinylalkohol/Fluoresceinamin in Küvetten verschiedener Größe; pH 2,2; $\lambda_{em}=520$ nm.

Dargestellt sind die Anregungsspektren der Fluoreszenz bei konstanter Emissionswellenlänge, die von derselben Probe in drei Küvetten unterschiedlicher Größe aufgenommen wurden. Das Anregungslicht legt dabei unterschiedliche Weglängen durch die Farbstofflösung zurück. Daneben enthält das Diagramm das Absorptionsspektrum der Lösung. Der Vergleich der Spektren zeigt deutlich, dass das Fluoreszenzsignal im Fall der Halbmikro- beziehungsweise Makroküvette im Bereich des Absorptionsmaximums geschwächt wird. Das mit der Mikroküvette aufgenommene Spektrum zeigt wegen des kürzeren Lichtweges durch die Lösung keinen inneren Filtereffekt.

Einen ähnlichen Einfluss wie die Verlängerung des Lichtweges durch die Lösung hat eine Erhöhung der Farbstoffkonzentration, wie in Abbildung 4-2 zu sehen ist.

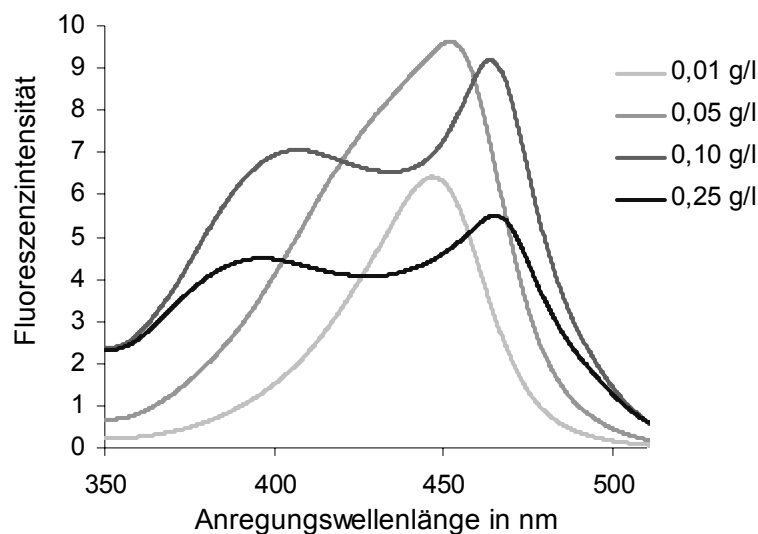


Abbildung 4-2: Fluoreszenzspektren wässriger Fluoresceinamin-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen; pH 2,2, $\lambda_{em}=520$ nm.

In diesem Fall ist jedoch mit zunehmender Farbstoffkonzentration eine Verschiebung des scheinbaren Fluoreszenzminimums zu kürzeren Wellenlängen zu erkennen. Möglicherweise beeinflussen hier zusätzlich zum inneren Filtereffekt bereits Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffmolekülen das Spektrum.

4.2 Ausnutzung von Konzentrationseffekten zur Temperaturmessung

Im vorherigen Kapitel wurde der starke Einfluss der Farbstoffkonzentration auf das Lumineszenzspektrum beschrieben. Hier soll nun gezeigt werden, dass sich diese Konzentrationseffekte unter bestimmten Umständen zur Generierung eines Referenzsignals ausnutzen lassen. Dazu wurde eine wässrige Lösung von Rhodamin B als Temperatursensor verwendet.

Die Anregungsspektren einer verdünnten Rhodamin B-Lösung bei verschiedenen Temperaturen in Abbildung 4-3a zeigen eine starke Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz. Eine Erhöhung der Temperatur von 0 °C auf 40 °C bewirkt einen Rückgang des Fluoreszenzsignals um etwa 65 %. Das Spektrum bietet aber keine Möglichkeit zur Messung einer internen Referenz, da keine Bereiche mit deutlich unterschiedlichen Temperaturabhängigkeiten vorhanden sind.

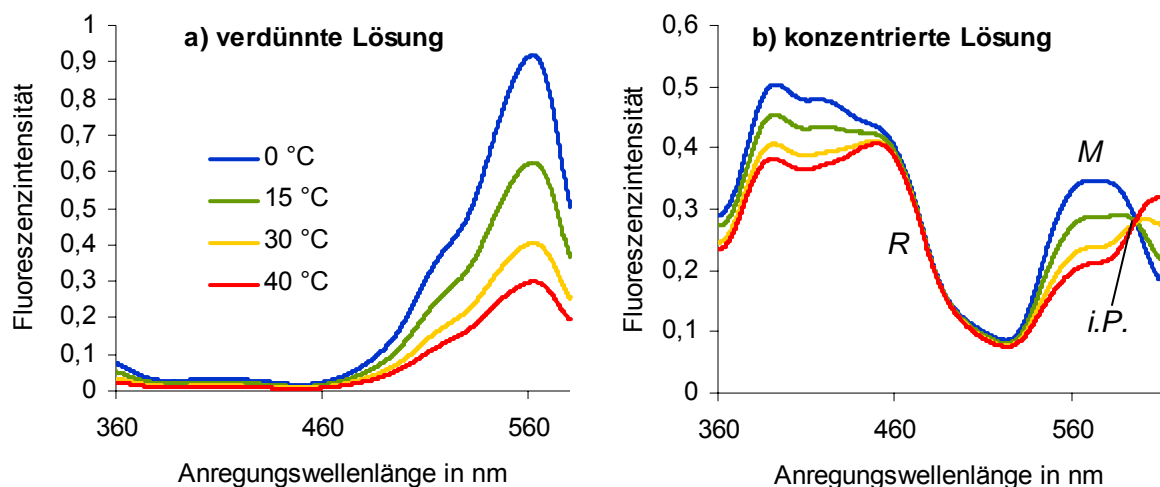


Abbildung 4-3: Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzspektren wässriger Rhodamin B-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen. **a)** $c=0,01$ g/l; $\lambda_{em}=580$ nm, **b)** $c=1$ g/l; $\lambda_{em}=630$ nm mit M =Messsignal, R =Referenzsignal und $i.P.$ =isosbestischer Punkt.

Wird jedoch die Konzentration des Fluorophors auf das 100-fache erhöht, verändert sich die Form des Spektrums grundlegend, wie in Abbildung 4-3b zu sehen ist. Da sich außerdem das Emissionsmaximum der Fluoreszenz durch die Konzentrationserhöhung verschiebt, wurden diese Spektren bei einer Emissionswellenlänge von 630 nm aufgenommen.

Die Fluoreszenz im kurzwelligen Bereich des Spektrums ist hier viel stärker ausge-

prägt als bei der verdünnten Lösung, und bei Anregung zwischen etwa 470 und 490 nm ist die Höhe des Fluoreszenzsignals unabhängig von der Temperatur. Bei einer Anregungswellenlänge von 598 nm ist ein isosbestischer Punkt zu erkennen, in dem sich die Kurven aller Temperaturen schneiden.

Für optische Temperaturmessungen könnte eine Fluoreszenzmessung in dem temperaturunabhängigen Spektralbereich um 480 nm als interne Referenz für das eigentliche Messsignal dienen. Der isosbestische Punkt bei 598 nm ist wegen des geringeren Abstandes zur Emissionswellenlänge dafür weniger geeignet.

Da diese Spektren in einem Spektrophotometer mit rechtwinkliger Messanordnung aufgenommen wurden (vergleiche Kapitel 3), haben bei hohen Farbstoffkonzentrationen innere Filtereffekte einen großen Einfluss. Tatsächlich waren keine temperaturunabhängigen Spektralbereiche im Anregungsspektrum vorhanden, wenn die Messung durch ein Faserbündel aus der gleichen Richtung erfolgte wie die Anregung. Die Änderungen im Spektrum bei Erhöhung der Konzentration werden hier offensichtlich durch das Zusammenwirken von inneren Filtereffekten und intermolekularen Wechselwirkungen der Farbstoffmoleküle hervorgerufen. Das Auftreten isosbestischer Punkte bei hohen Farbstoffkonzentrationen ist möglicherweise auf eine temperaturabhängige Bildung von Farbstoff-Dimeren zurückzuführen.

4.3 Spektralanalyse zur pH-Wert-Bestimmung

Bei der Verwendung einer internen Referenzwellenlänge zur Stabilisierung des Sensorsignals wird die Lumineszenz bei zwei unterschiedlichen Kombinationen aus Anregungs- und Fluoreszenzwellenlänge erfasst. In manchen Fällen wird der Informationsgehalt der Lumineszenz des Indikators durch die Messung von lediglich zwei Intensitäten jedoch nicht optimal genutzt. So kann beispielsweise eine Verschiebung der Lumineszenz-Maxima in Abhängigkeit von der Analytkonzentration dazu führen, dass nicht im gesamten Konzentrationsbereich bei den optimalen Wellenlängen gemessen wird. Außerdem können im Spektrum mehr als nur zwei Wellenlängenbereiche mit grundsätzlich unterschiedlichen Abhängigkeiten von der Messgröße enthalten sein.

Eine mögliche Alternative zur Quotientenbildung aus zwei Messwerten stellt daher die Analyse des gesamten Lumineszenzspektrums dar. Die Messung kann in diesem Fall mit einem Spektrosensor erfolgen, der in einem oder in mehreren Wellenlängenbereichen die spektrale Verteilung der Lumineszenzintensität detektiert. Nach einmaliger Kalibrierung des Systems kann aus dem Spektrum mit Hilfe geeigneter mathematischer Methoden die gesuchte Messgröße bestimmt werden. Das Ergebnis ist dann wie bei der Quotientenbildung aus Mess- und Referenzsignal von der Intensität der Lumineszenz unabhängig. Eine solche spektrale Analyse hat zudem

den Vorteil, dass der Informationsgehalt des Spektrums im untersuchten Wellenlängenbereich zur Bestimmung der Analytkonzentration auch dann optimal genutzt werden kann, wenn das Spektrum des Indikators eine komplexere Abhängigkeit von der Messgröße zeigt.

Im Fluoreszenzspektrum von Fluoresceinamin (FLA) zum Beispiel wird im Anregungsbereich um $\lambda_{ex}=450$ nm eine Zunahme der Fluoreszenz mit sinkendem pH-Wert beobachtet, während die Fluoreszenz im längerwelligen Teil der Spektrums bei höheren pH-Werten intensiver ist. Da beide Signale überlappen und sich die Lage der Maxima mit dem pH-Wert verschiebt, resultiert daraus die in Abbildung 4-4a dargestellte, relativ komplexe pH-Abhängigkeit des Spektrums.

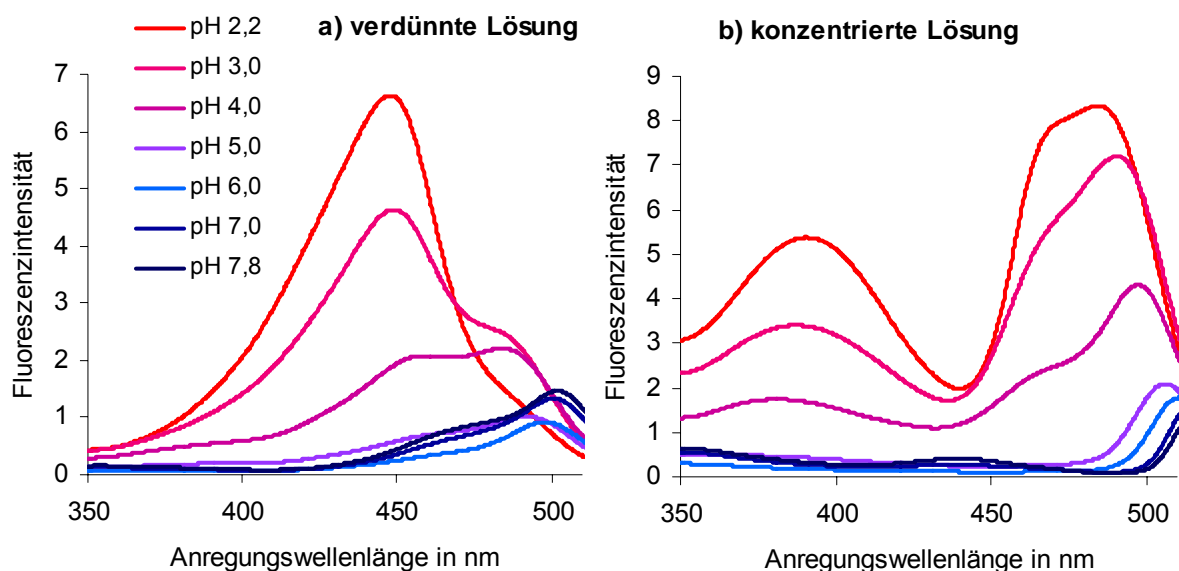


Abbildung 4-4: Anregungsspektren von Fluoresceinamin/Polyvinylalkohol bei unterschiedlichen pH-Werten; $\lambda_{em}=520$ nm, $T=0$ °C. **a)** 0,1 % FLA/PVA, **b)** 1 % FLA/PVA

Um eine gute Wasserlöslichkeit des Indikators im gesamten pH-Bereich zu erreichen, wurde dieser zuvor an Polyvinylalkohol (PVA) gebunden. Die Anbindung an dieses wasserlösliche Polymer erfolgte in Anlehnung an eine bei ZHUJUN et al. (1989) beschriebene Methode, die durch Veränderungen der Reaktionsbedingungen verbessert werden konnte. Eine detaillierte Beschreibung der Durchführung dieser Reaktion befindet sich im Anhang auf Seite 54.

Bei höheren Farbstoffkonzentrationen wird die Abhängigkeit des Spektrums vom pH-Wert durch das Auftreten von inneren Filtereffekten und intermolekularen Wechselwirkungen noch komplexer, wie in Abbildung 4-4b zu sehen ist.

4.3.1 Messung bei zwei Wellenlängen

Fluoresceinamin kann als Indikator für ratiometrische pH-Messungen verwendet werden, wenn die Fluoreszenz bei Anregungswellenlängen von 430 und 485 nm gemessen wird [AGAYN und WALT, 1993]. Abbildung 4-5 zeigt den Verlauf des Quotienten aus diesen Messwerten in Abhängigkeit des pH-Wertes bei verschiedenen Temperaturen. Um die Verwendung optischer Filter zu simulieren, wurde der Berechnung der Quotienten nicht die Signalintensität bei einzelnen Wellenlängen zugrunde gelegt, sondern die Summe aus den gemessenen Intensitäten in einem Fenster von 10 nm Breite.

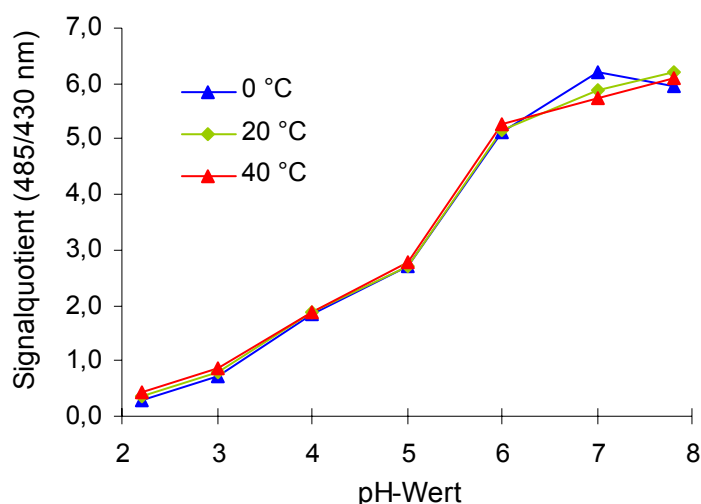


Abbildung 4-5: pH-Abhängigkeit des Quotienten aus den Fluoreszenzintensitäten bei $\lambda_{\text{ex}}=485$ nm und 430 nm einer wässrigen Lösung von 0,1 % FLA/PVA bei verschiedenen Temperaturen; $\lambda_{\text{em}}=520$ nm.

Der Signalquotient steigt bis etwa pH 7 stetig an und zeigt insbesondere bis pH 6 eine gute Empfindlichkeit. Bei höheren pH-Werten ist dagegen mit diesem Quotienten vor allem bei niedrigen Temperaturen keine pH-Wert-Messung mehr möglich. Das in Abbildung 4-4 dargestellte Fluoreszenzspektrum besitzt zwar auch in diesem Bereich noch eine signifikante Abhängigkeit vom pH-Wert, aber die Wellenlängenkombination für die ratiometrische Messung ist offensichtlich nur für einen Teil des untersuchten pH-Bereiches geeignet.

Im mittleren Messbereich zwischen pH 4 und pH 6, in dem der Indikator seine größte Empfindlichkeit besitzt, ist der Quotient sogar unabhängig von der Temperatur. Bei niedrigeren pH-Werten bewirkt eine Temperaturerhöhung um 40 °C einen Anstieg des Quotienten um etwa 30 %.

Zur Erklärung dieser Beobachtung zeigt Abbildung 4-6 den Einfluss der Temperatur auf das Fluoreszenzspektrum bei pH 2 und pH 7.

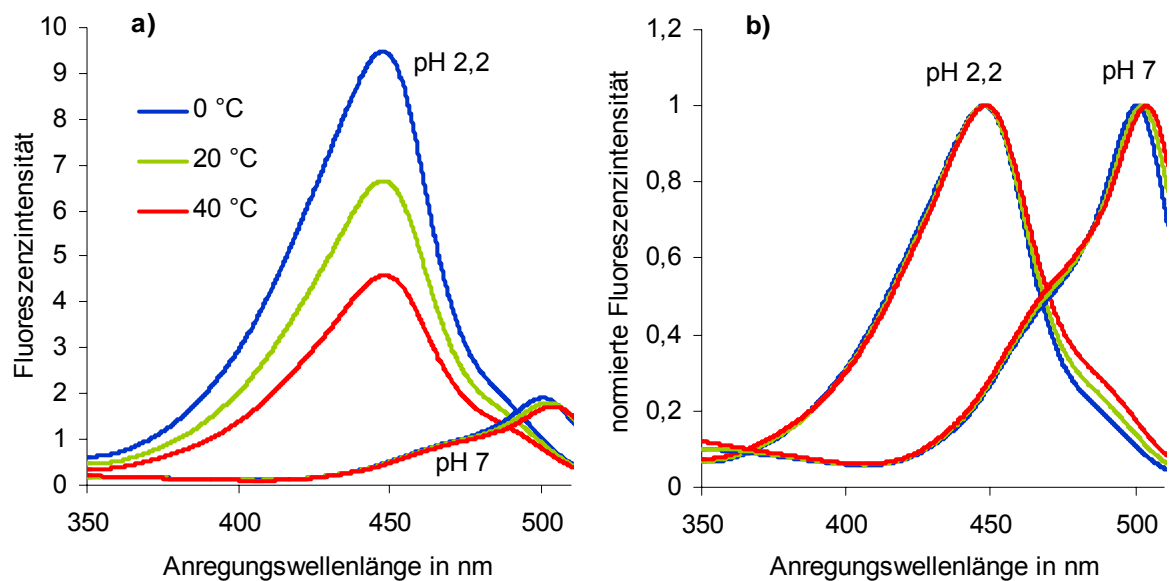


Abbildung 4-6: Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzspektren einer wässrigen Lösung von 0,1 % FLA/PVA bei pH 2,2 und pH 7,0. **a)** absolute Fluoreszenzintensitäten, **b)** normierte Fluoreszenzintensitäten.

Bei beiden pH-Werten nimmt die Fluoreszenzintensität mit steigender Temperatur ab. Im sauren Milieu ist dieser Temperatureinfluss sehr viel stärker ausgeprägt als bei neutralem pH-Wert. Die Normierung der Spektren in Abbildung 4-6b zeigt, dass bei pH 2,2 eine signifikante Temperaturabhängigkeit bei der Wellenlänge des Messsignals von 485 nm besteht. Das Fluoreszenzmaximum bei pH 7 verschiebt sich mit steigender Temperatur leicht zu höheren Wellenlängen. Aufgrund dieser Veränderungen der Form des Spektrums ist die ratiometrische pH-Messung nicht im gesamten Messbereich unabhängig von der Temperatur.

4.3.2 Berücksichtigung des gesamten Spektrums

Ansichts der oben beschriebenen Beobachtungen wurde getestet, ob die spektrale Analyse der Fluoreszenz zur Bestimmung des pH-Wertes bessere Ergebnisse liefert als die ratiometrische Methode. Im Einzelnen sollte untersucht werden, inwieweit eine temperaturunabhängige pH-Messung im gesamten pH-Bereich des verwendeten Puffers zwischen pH 2,2 und pH 7,8 möglich ist. Darüber hinaus war zu prüfen, ob die Temperaturabhängigkeit der Spektren gleichzeitig zur Temperaturmessung genutzt werden kann.

Dazu wurden die Fluoreszenzspektren des Indikators bei sieben verschiedenen pH-Werten und jeweils fünf Temperaturen zwischen 0 und 40 °C aufgenommen. Die Messung erfolgte bei einer Emissionswellenlänge von 520 nm und Anregung zwischen 350 und 510 nm, wobei alle 0,2 nm ein Messwert aufgezeichnet wurde. Um zu testen, ob ähnlich wie bei den in Kapitel 4.2 beschriebenen Versuchen durch eine

Konzentrationserhöhung der Informationsgehalt des Spektrums erhöht werden kann, wurden die Messungen mit der zehnfachen Indikatorkonzentration wiederholt. Weitere Details zur Durchführung dieses Experimentes sind im Anhang auf Seite 54 angegeben.

Zur spektralen Analyse der Messdaten wurden die Spektren normiert, sodass alle folgenden Untersuchungen unabhängig von der absoluten Fluoreszenzintensität waren.

Um aus den Fluoreszenzspektren den pH-Wert zu bestimmen, wurden chemometrische Methoden angewendet, insbesondere die Partial-Least-Squares-Methode (PLS). Die Hälfte der bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen gemessenen Spektren wurde zur Kalibrierung des chemometrischen Modells verwendet, die übrigen Spektren dienten zur Validierung. Um den Erfolg der Methode zu überprüfen, wurden die Standardabweichung der auf diese Weise bestimmten Werte von den tatsächlichen pH-Werten sowie die mittlere absolute Differenz berechnet. Diese Analyse der Fluoreszenzspektren wurde in Zusammenarbeit mit C.G. BARREIRO (2005) durchgeführt.

In Abbildung 4-7 sind die aus den Spektren berechneten pH-Werte gegen die tatsächlich eingestellten pH-Werte aufgetragen.

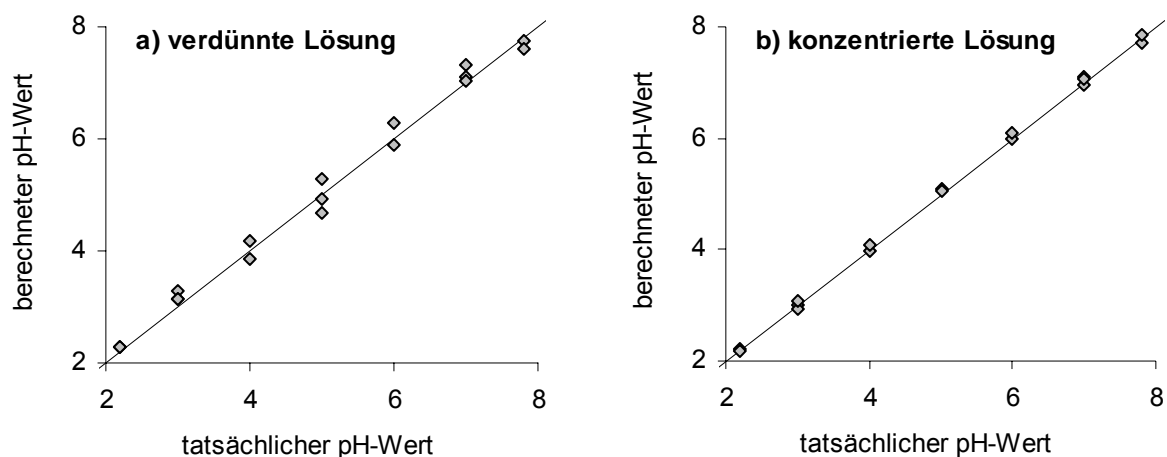


Abbildung 4-7: Berechnung des pH-Wertes von FLA/PVA-Lösungen unterschiedlicher Temperaturen durch Auswertung des gesamten Fluoreszenzspektrums. **a)** 0,1 % Indikator, **b)** 1 % Indikator.

Durch die Erhöhung des Indikatorgehaltes von 0,1 % auf 1 % konnte die Genauigkeit der Messung verbessert werden. Offensichtlich führt das Auftreten von inneren Filtereffekten oder intermolekularen Wechselwirkungen wie auch bei der in Kapitel 4.2 beschriebenen Temperaturmessung mit Rhodamin B zu einer Erhöhung des Informationsgehaltes der Fluoreszenzspektren.

In Hinblick auf mögliche praktische Anwendungen des Verfahrens wurde außerdem getestet, ob die Methode auch auf Spektren geringerer Auflösung anwendbar ist.

Dazu wurden lediglich die Fluoreszenzintensitäten im Abstand von 10 nm berücksichtigt, also bei 350, 360, 370 ... 510 nm. Auch in diesem Fall konnte der pH-Wert noch bis auf etwa 0,1 pH-Einheiten genau bestimmt werden.

Tabelle 4-1 fasst die Ergebnisse dieser Experimente zusammen.

Tabelle 4-1: Standardabweichung und mittlerer absoluter Fehler bei der Bestimmung des pH-Wertes durch Analyse des gesamten Fluoreszenzspektrums von FLA/PVA.

		Standardabweichung in pH-Einheiten	mittlere absolute Differenz in pH-Einheiten
0,1 %	Indikator	0,19	0,12
1 %	Indikator	0,07	0,05
1 %	Indikator, alle 10 nm	0,13	0,09

Die pH-Messung nach dieser Methode ist unabhängig von der Intensität der Fluoreszenz und von der Temperatur, da diese Informationen zur Berechnung nicht verwendet wurden.

Die Bestimmung der Temperatur bei unbekanntem pH-Wert war auf diese Weise dagegen nicht möglich (Standardabweichung: 4,8 °C). Offensichtlich sind die Änderungen der normierten Spektren in Abhängigkeit von der Temperatur zu gering, um diese daraus berechnen zu können.

4.3.3 Vergleich beider Messverfahren

Bezüglich des Messbereiches ist die spektrale Analyse der ratiometrischen pH-Messung überlegen. Im Bereich zwischen pH 7 und pH 7,8, in dem die ratiometrische Methode hier nicht mehr anwendbar ist, beträgt der absolute Fehler 0,07 bis 0,08 pH-Einheiten, wenn die höhere Indikatorkonzentration verwendet wird.

Bei niedrigen pH-Werten zeigt der Quotient der ratiometrischen Messung eine gewisse Abhängigkeit von der Temperatur. Der dadurch bedingte Fehler der pH-Messung wurde aus der in Abbildung 4-8 gezeigten graphischen Darstellung abgeschätzt. Das Diagramm stellt einen stark vergrößerten Ausschnitt aus dem Graphen in Abbildung 4-5 dar. Für jede Temperatur wurde der pH-Wert bei einem Signalquotienten von 0,6 abgelesen. Die Abweichungen dieser Werte von dem pH-Wert der mittleren Temperatur wurden anschließend gemittelt. Der auf diese Weise erhaltene mittlere Fehler des pH-Wertes beträgt etwa 0,08 pH-Einheiten.

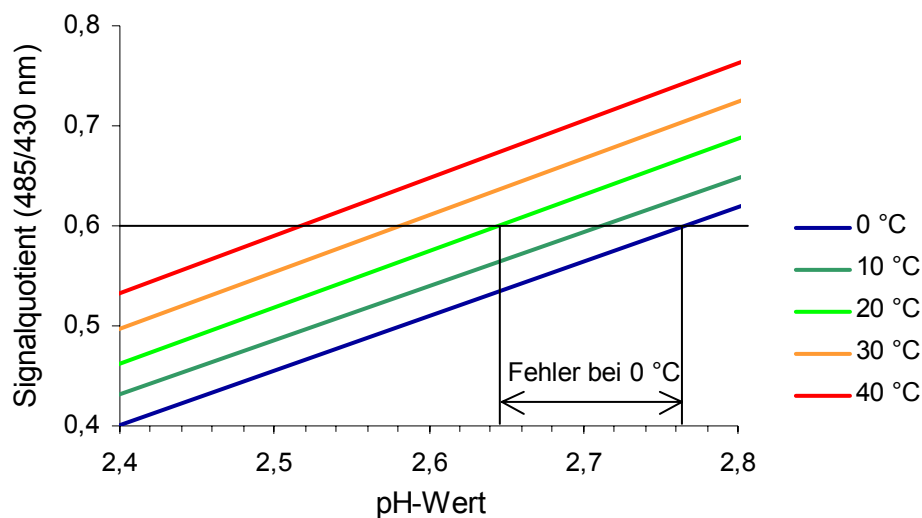


Abbildung 4-8: Abschätzung des Fehlers der ratiometrischen pH-Messung aufgrund der Temperaturabhängigkeit des Signalquotienten bei niedrigen pH-Werten; $\lambda_{em}=520$ nm, 0,1 % FLA/PVA.

Durch die Spektralanalyse werden in diesem pH-Bereich geringere Fehler von etwa 0,03 pH-Einheiten erhalten. Bei pH-Werten zwischen pH 4 und pH 6, bei denen der Signalquotient nahezu unabhängig von der Temperatur ist, sind die Verhältnisse dagegen umgekehrt: Hier weichen die Quotienten bei verschiedenen Temperaturen um durchschnittlich nur etwa 0,01 pH-Einheiten vom Mittelwert ab, während die Fehler der Spektralanalyse bei 0,06 Einheiten liegen.

Insgesamt liefern beide Verfahren vergleichbare Ergebnisse, wenn nur der Messbereich bis pH 6 betrachtet wird. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass für die Kalibrierung des ratiometrischen Sensors eine geeignete mathematische Funktion gefunden wird, welche die pH-Abhängigkeit des Quotienten optimal beschreibt.

Für eine temperaturunabhängige pH-Messung ist die Analyse des gesamten Fluoreszenzspektrums vorteilhaft, wenn ein möglichst großer Messbereich erfasst werden soll. Wenn die Messung dagegen nur in einem engen pH-Bereich am Umschlagspunkt des Indikators erfolgen soll, ist die einfachere Messung bei zwei Wellenlängen mit anschließender Quotientenbildung vorzuziehen.

4.4 Zusammenfassung

An einer wässrigen Rhodamin B-Lösung wurde gezeigt, dass die durch eine Konzentrationserhöhung hervorgerufenen Veränderungen im Fluoreszenzspektrum zur Entstehung von Wellenlängenbereichen führen können, in denen die Fluoreszenzintensität unabhängig von der Temperatur ist. Diese könnten beim Aufbau eines optischen Temperatursensors als interne Referenz zur Signalstabilisierung verwendet werden. Aufgrund der rechtwinkligen Anordnung von Anregungs- und Emissionsstrahlengang waren dabei neben intermolekularen Wechselwirkungen auch innere Filtereffekte von Bedeutung.

Anstelle der ratiometrischen Fluoreszenzmessung bei zwei Wellenlängen kann mit Hilfe chemometrischer Methoden auch das gesamte Spektrum zur Bestimmung der Messgröße ausgewertet werden. Dieses Verfahren wurde bei der pH-Wert-Messung mit Fluoresceinamin als Indikator angewendet und mit der ratiometrischen Methode verglichen. Aus den Spektren konnte der pH-Wert der Lösung unabhängig von Temperatur und Fluoreszenzintensität ermittelt werden. Gegenüber der Referenzmessung bei zwei Wellenlängen wurde durch diese Spektralanalyse der Messbereich des Indikators erweitert. Die Genauigkeit der Methode konnte durch die Ausnutzung von Konzentrationseffekten erhöht werden und ist mit derjenigen der ratiometrischen Methode vergleichbar.

5. Sauerstoff- und Temperaturmessung mit Porphyrin-Komplexen

Die Lumineszenz von Sauerstoffindikatoren ist grundsätzlich sowohl von der Sauerstoffkonzentration als auch von der Temperatur abhängig. Durch Immobilisierung in einer Matrix, die für Sauerstoff undurchlässig ist, lässt sich dessen Einfluss ausschließen, sodass die Lumineszenz des Farbstoffes nur noch von der Temperatur abhängt. Auf diese Weise kann eine Temperaturoptode hergestellt werden, deren Anregungs- und Emissionsbereiche mit denen der Sauerstoffoptode identisch sind, sofern der Wechsel der Immobilisierungsmatrix keine wesentlichen Verschiebungen im Spektrum bewirkt. Die Lumineszenz beider Optoden kann demnach mit demselben optischen System erfasst werden, sodass mit einem entsprechenden Gerät wahlweise die Temperatur oder die Sauerstoffkonzentration gemessen werden kann.

Ein geeigneter Indikator für einen solchen Sensor muss eine ausreichende Empfindlichkeit gegenüber der Sauerstoffkonzentration und der Temperatur besitzen. Wenn die Messung ratiometrisch erfolgen soll, muss außerdem ein Wellenlängenbereich im Spektrum vorhanden sein, der für beide Messgrößen als interne Referenz geeignet ist.

Diese Voraussetzungen wurden von Platin-Octaethylporphyrin erfüllt, welches Anteile von Zink-Octaethylporphyrin enthielt. Zur Synthese und Charakterisierung dieses Indikators vergleiche Seite 55 im Anhang. Der Zinkkomplex des Octaethylporphyrins gehört zu der Gruppe der fluoreszierenden Porphyrine, während es sich beim Platinkomplex um ein phosphoreszierendes Porphyrin handelt [KALYANASUNDARAM, 1992].

Der Signalquotient aus einer solchen Farbstoffmischung ist in der Regel nicht stabil gegenüber Ausbleichen, da beide Komponenten eine unterschiedliche Photostabilität besitzen können. Bei der vorliegenden Kombination von Platin-Octaethylporphyrin und Zink-Octaethylporphyrin blieb das ratiometrische Messsignal jedoch während des Ausbleichens konstant, wie weiter unten in Kapitel 5.4 beschrieben wird. Diese Indikator Mischung erfüllt demnach die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Signalstabilisierung durch interne Referenzmessung.

5.1 Die Lumineszenz des Porphyrin-Indikators

Abbildung 5-1 zeigt das 3D-Spektrum des Porphyrin-Indikators in Chloroform. Um Lumineszenzlöschung durch Sauerstoff zu vermeiden, wurde die Lösung vor der Aufnahme des Spektrums mit Stickstoff begast und die Küvette anschließend verschlossen.

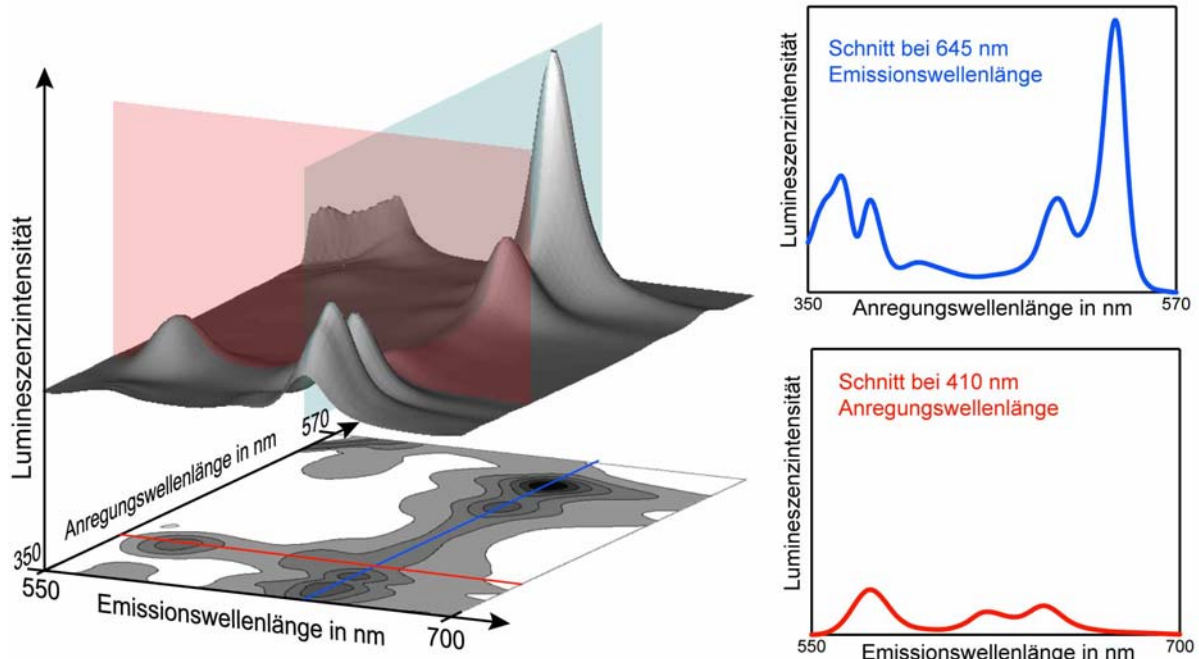


Abbildung 5-1: 3D-Lumineszenzspektrum von Platin/Zink-Octaethylporphyrin in Chloroform unter Stickstoff-Atmosphäre; $c=10$ mg/l.

Im linken Teil von Abbildung 5-1 ist die Intensität der Lumineszenz in Abhängigkeit der Anregungs- beziehungsweise Emissionswellenlänge als dreidimensionale Fläche dargestellt. Darunter befindet sich die Projektion des Spektrums in der x-y-Ebene. Auf der rechten Seite sind zwei Schnitte durch das 3D-Spektrum bei $\lambda_{\text{ex}}=410$ nm sowie $\lambda_{\text{em}}=645$ nm dargestellt. Die in den folgenden Kapiteln gezeigten Anregungs- beziehungsweise Emissionsspektren können als solche Schnitte durch das 3D-Spektrum bei konstanter Anregungs- beziehungsweise Emissionswellenlänge aufgefasst werden. Abhängig von der jeweiligen chemischen Umgebung des Farbstoffes kann die Form dieser Spektren leicht variieren und von dem hier gezeigten Spektrum in Chloroform dementsprechend abweichen.

Bei einer Emissionswellenlänge von etwa 645 nm tritt eine Reihe intensiver Signale auf, die der Phosphoreszenz des Platinkomplexes zuzuordnen sind und durch Sauerstoff stark gequencht werden. Die Lebensdauer dieser Phosphoreszenz dient in vielen optischen Sensoren als Messgröße zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration [WOLFBELIS, 2005]. Der große Unterschied zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge (Stokes-Shift) erleichtert die optische Trennung der Signale bei der Verwendung von Platin-Octaethylporphyrin als Sauerstoffindikator.

Neben der intensiven Phosphoreszenz des Platinkomplexes ist bei einer Emissionswellenlänge von etwa 575 nm das Fluoreszenzsignal des Zinkkomplexes zu sehen [KALYANASUNDARAM, 1992]. Die Fluoreszenz wird am effektivsten bei etwa 410 nm angeregt. Die Phosphoreszenzintensität ist dagegen bei dieser Anregungswellenlänge gering.

5.2 Immobilisierung des Indikators

Wenn mit dem Porphyrin-Indikator sowohl die Sauerstoffkonzentration als auch die Temperatur ratiometrisch gemessen werden soll, muss dieser dazu in zwei verschiedenen Matrices immobilisiert werden. Während die Polymermatrix des Sauerstoffsensors gasdurchlässig sein muss, erfordert der Temperatursensor eine sauerstoffundurchlässige Matrix, damit die Messung nicht durch Veränderungen der Sauerstoffkonzentration gestört werden kann. Der Temperatureinfluss auf den Sauerstoffsensor lässt sich dagegen nicht ausschließen, da die Gasdurchlässigkeit der Matrix, die Lumineszenzlöschung durch Sauerstoff und die optischen Eigenschaften des Indikators prinzipiell temperaturabhängig sind.

5.2.1 Temperatursensor

Für die Temperaturmessung wurde ein Zweikomponenten-Epoxidharz zur Immobilisierung des Indikators gewählt. Dieses Polymer ist mechanisch robust, glasklar und besitzt eine derart geringe Sauerstoffdurchlässigkeit, dass die Lumineszenz des darin eingeschlossenen Farbstoffes unabhängig von der Sauerstoffkonzentration in der Umgebung des Sensors ist. Die Durchführung der Immobilisierung ist im Anhang auf Seite 56 beschrieben.

Sowohl die Intensität der Lumineszenz als auch deren Temperaturabhängigkeit sind von der Konzentration des Indikators abhängig. Für den Temperatursensor wurde ein Farbstoffgehalt von 10 mg je Gramm Polymer gewählt, da bei dieser Konzentration ein intensives Lumineszenzsignal bei starker Temperaturabhängigkeit vorhanden ist.

Der in Epoxidharz immobilisierte Porphyrin-Indikator zeigt beim Einschalten der Anregungslichtquelle ein ungewöhnliches Verhalten. Innerhalb der ersten drei bis fünf Minuten nimmt die Lumineszenzintensität stetig zu, bevor sie einen konstanten Wert erreicht. Die in Abbildung 5-2 dargestellten zeitlichen Verläufe der Lumineszenzintensität nach dem Beginn der Beleuchtung zeigen, dass dieser Effekt nur nach längerer Verdunkelung des Farbstoffes auftritt. Zum Vergleich ist das Ansprechverhalten des Detektors des Spektrophotometers abgebildet.

Um eine Beeinflussung der Temperaturmessung durch dieses Verhalten zu vermeiden, sollte die Anregungslichtquelle demnach mindestens 5 min vor der Messung eingeschaltet werden. Unterbrechungen der Beleuchtung von weniger als 30 min spielen dagegen offensichtlich keine Rolle.

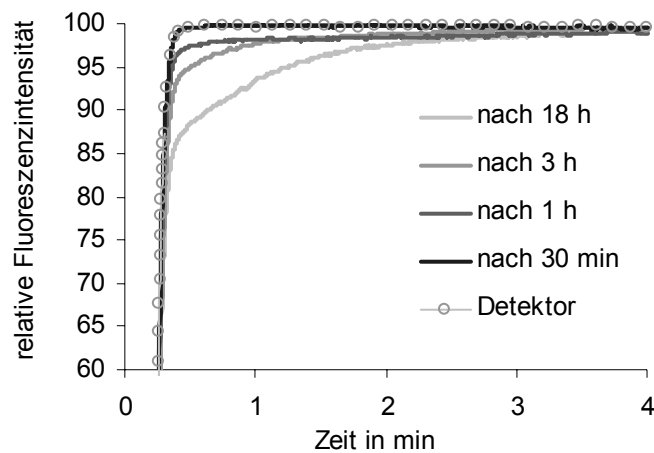


Abbildung 5-2: Zeitlicher Verlauf der Phosphoreszenzintensität des Porphyrin-Indikators in Epoxidharz zu Beginn der Beleuchtung nach unterschiedlich langen Verdunkelungen; $\lambda_{\text{ex}}=535$ nm, $\lambda_{\text{em}}=640$ nm.

5.2.2 Sauerstoffsensoren

Für optische Sauerstoffsensoren wird häufig Silikon als Immobilisierungsmatrix verwendet. Silikone besitzen eine sehr hohe Sauerstoffdurchlässigkeit und sind in großer Vielzahl kommerziell erhältlich. Allerdings sind viele Porphyrine in Silikon unlöslich [WOLFBEIS, 2005] und erfordern daher andere Matrices. In dieser Arbeit wurde Polysulfon (PSU) als Matrix für den optischen Sauerstoffsensoren eingesetzt. Dieses Polymer hat gegenüber dem für Platin-Octaethylporphyrin häufig verwendeten Polystyrol den Vorteil, aufgrund seiner Temperatur- und Hydrolysebeständigkeit zur Heißdampfsterilisation geeignet zu sein [WERKSTOFF-DATENBLÄTTER, 2006], was insbesondere bei Anwendungen in der Biotechnologie von Interesse ist.

Die Farbstoffkonzentration hat im Bereich zwischen 0,5 und 10 mg pro Gramm Polysulfon nur einen geringen Einfluss auf die Effizienz der Lumineszenzlöschung. Dagegen zeigt die Lumineszenzintensität eine starke Konzentrationsabhängigkeit mit einem Maximum bei etwa 5 mg/g.

Zur Herstellung der sensitiven Schicht können Farbstoff und Polymer im einfachsten Fall zusammen in Chloroform gelöst und auf dem Glasträger beziehungsweise Lichtleiter aufgebracht werden. Beim Verdampfen des Lösungsmittels bildet sich dann ein Film aus Polysulfon mit darin eingeschlossenem Indikator. Nachteilig ist, dass die so erzeugte sensitive Schicht relativ langsam auf Veränderungen der Sauerstoffkonzentration reagiert. Wesentlich kürzere Ansprechzeiten konnten durch die Herstellung poröser Sensormembrane erreicht werden. Dazu wurde die Lösung von Indikator und Polymer mit Ethanol versetzt und auf eine Trägermembran aus Polypropylen/Polyethylen-Vlies gegeben. Während das leichter flüchtige Chloroform verdampft, bildet das Polysulfon eine poröse Schicht, da Polymer und Indikator in

dem langsamer verdampfenden Ethanol unlöslich sind. Eine detaillierte Beschreibung dieses Verfahrens befindet sich im Anhang auf Seite 56.

Die so erhaltene poröse Sensormembran zeigt eine deutlich schnellere Reaktion auf einen Wechsel der Sauerstoffkonzentration als kompakte Filme aus Polysulfon von etwa 0,03 mm Stärke.

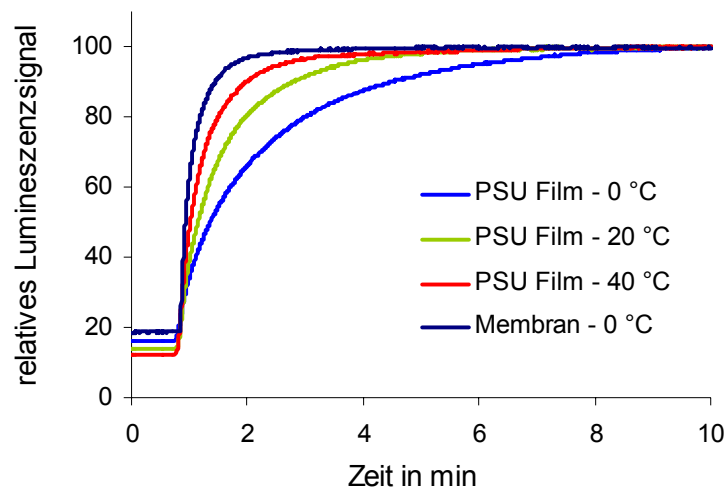


Abbildung 5-3: Ansprechverhalten des Phosphoreszenzsignals des Porphyrin-Indikators in Polysulfon auf einen Wechsel von Sauerstoff zu Stickstoff bei unterschiedlichen Temperaturen; $\lambda_{\text{ex}}=530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=640 \text{ nm}$.

Das in Abbildung 5-3 dargestellte Ansprechverhalten zeigt eine starke Abhängigkeit von der Temperatur. Die Ansprechzeit t_{90} , in der das Signal nach dem Wechsel von Sauerstoff zu Stickstoff 90 % seines Endwertes erreicht, beträgt für den PSU-Film 4,6 min bei 0 °C und verkürzt sich durch eine Temperaturerhöhung um 40 °C auf 2,1 min. Die poröse Membran besitzt dagegen auch bei der niedrigsten gemessenen Temperatur von 0 °C eine Ansprechzeit von lediglich 1,5 min. Durch weitere Optimierung des Herstellungsverfahrens wird diese Zeit möglicherweise noch verkürzt werden können.

Wird die Begasung umgekehrt von Stickstoff auf Sauerstoff umgestellt, sind die Ansprechzeiten im Allgemeinen deutlich kürzer. Dieser Effekt wird auch bei anderen Polymeren beobachtet [AMAQ et al., 2000].

5.3 Die Sauerstoff- und Temperaturabhängigkeit der Lumineszenz

Wenn der Porphyrin-Indikator in Epoxidharz immobilisiert wird, zeigen die Intensitäten der Phosphoreszenz und Fluoreszenz eine entgegengesetzte Temperaturabhängigkeit. Die Intensität des Fluoreszenzsignals steigt mit der Temperatur stark an, wie in Abbildung 5-4a zu sehen ist. Dagegen nimmt die Phosphoreszenz wie bei den meisten Luminophoren mit steigender Temperatur ab (Abbildung 5-4b). Bei einer Anregungswellenlänge von 410 nm findet neben der Fluoreszenz auch eine

verhältnismäßig schwache Anregung der Phosphoreszenz statt. Dieses Signal überschneidet sich mit der Fluoreszenz, sodass sich die entgegengesetzten Temperatureffekte hier nahezu kompensieren.

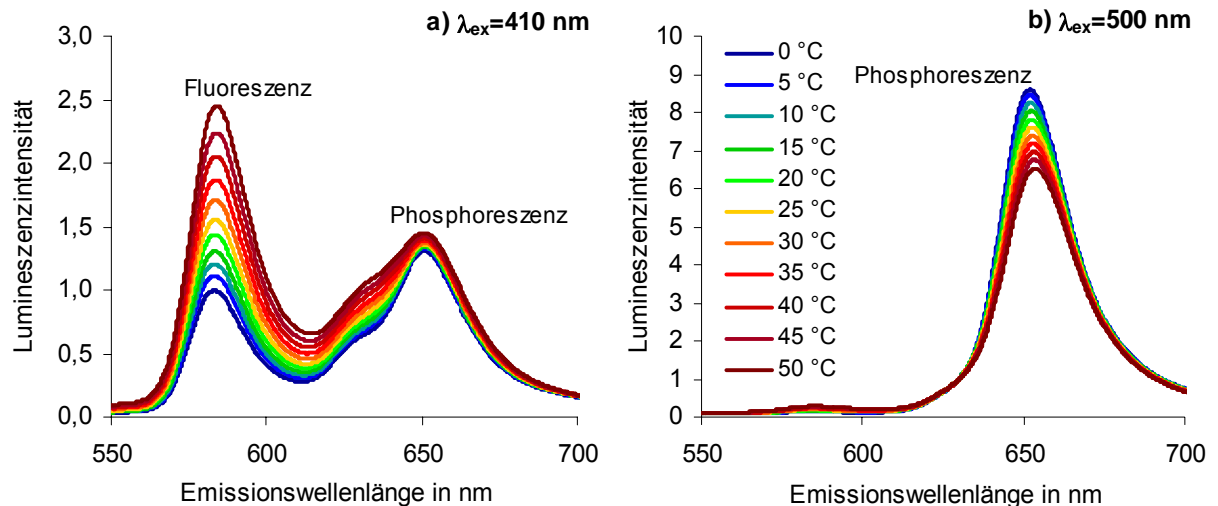


Abbildung 5-4: Temperaturabhängigkeit der Lumineszenz des Porphyrin-Indikators in Epoxidharz bei Anregung in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen. **a)** $\lambda_{\text{ex}}=410 \text{ nm}$, **b)** $\lambda_{\text{ex}}=500 \text{ nm}$.

Ein ähnlicher Temperatureinfluss auf die Lumineszenz wurde von LUPTON (2002) bei Platin-Octaethylporphyrin unter Helium-Atmosphäre beobachtet, wenn die Phosphoreszenz bei 650 nm durch einen Kurzpass-Filter geschwächt wurde.

In Polysulfon unter Stickstoff-Atmosphäre steigt die Fluoreszenzintensität ebenfalls mit der Temperatur an. In Anwesenheit von Sauerstoff dagegen zeigt die Fluoreszenz wie die Phosphoreszenz das normale Verhalten einer Intensitätsabnahme mit steigender Temperatur.

Auch die Sauerstoffabhängigkeit der beiden Signale in Polysulfon unterscheidet sich grundsätzlich. Die Intensität der Phosphoreszenz wird durch Sauerstoff gemäß der Stern-Volmer-Gleichung gequencht [AMAÖ et al., 1999]. Im Gegensatz dazu ist die Fluoreszenz nur bei geringer Sauerstoffkonzentration von dieser abhängig. In Gas-mischungen mit mehr als 1 % Sauerstoff bleibt sie dagegen nahezu konstant. Abbildung 5-5 zeigt die Sauerstoffabhängigkeit der Lumineszenz bei Anregungswellenlängen von 410 beziehungsweise 500 nm.

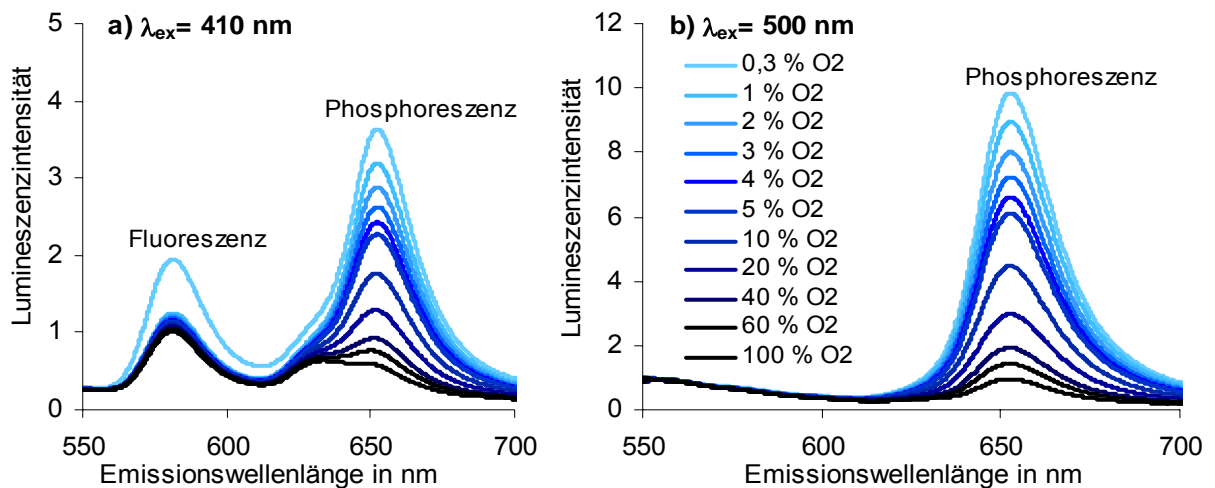


Abbildung 5-5: Lumineszenz des Porphyrin-Indikators in Polysulfon bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen; T=20 °C. a) $\lambda_{ex}=410 \text{ nm}$, b) $\lambda_{ex}=500 \text{ nm}$.

Das Fluoreszenzsignal setzt sich demnach aus zwei Anteilen zusammen, von denen einer nahezu sauerstoffunabhängig ist und mit steigender Temperatur abnimmt. Der andere Signalanteil wird bereits von niedrigen Sauerstoffkonzentrationen sehr effizient gequencht. Bei einer Temperaturerhöhung steigt die Intensität dieses Anteils so stark an, dass in Abwesenheit von Sauerstoff die Gesamtintensität der Fluoreszenz zunimmt. Zur Verdeutlichung dieses Sachverhaltes sind in Abbildung 5-6 die Fluoreszenzsignale in Stickstoff beziehungsweise Sauerstoff bei verschiedenen Temperaturen nebeneinander dargestellt. Unter Sauerstoff ist nur noch der sauerstoffunabhängige Signalanteil zu sehen, sodass die Intensität mit steigender Temperatur abnimmt. Dagegen setzt sich das Signal in Stickstoff-Atmosphäre aus beiden Anteilen zusammen, und die Intensität nimmt mit der Temperatur zu.

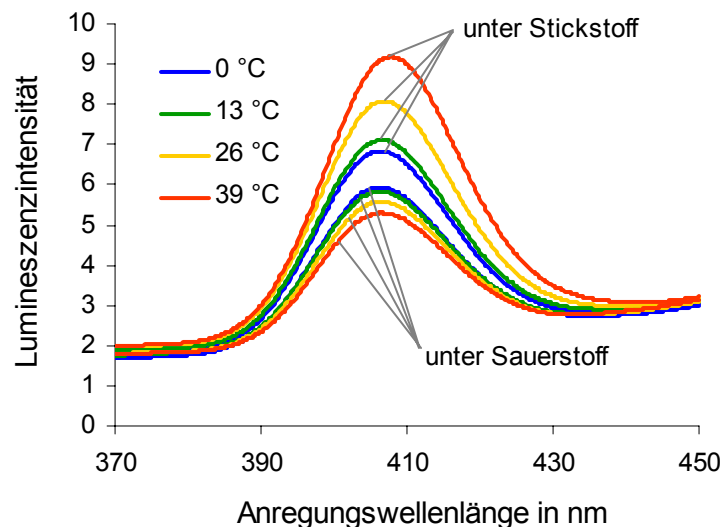


Abbildung 5-6: Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz des Porphyrin-Indikators in Polysulfon unter Stickstoff beziehungsweise Sauerstoff; $\lambda_{em}=570 \text{ nm}$.

Die Ursache für diese Beobachtungen ist vermutlich das Auftreten von verzögerter Fluoreszenz neben der kurzlebigen Fluoreszenz des Zink-Octaethylporphyrins. Verzögerte Fluoreszenz kann durch thermische Anregung des Luminophors aus dem Triplettzustand in das niedrigste Singulettniveau hervorgerufen werden und erscheint bei der gleichen Wellenlänge wie gewöhnliche Fluoreszenz, besitzt aber eine längere Lebensdauer [BECKER, 1969]. Die Intensität der verzögerten Fluoreszenz steigt mit der Temperatur stark an, was in Einklang mit den oben beschriebenen Beobachtungen steht. Möglicherweise wird das Auftreten von verzögerter Fluoreszenz hier durch Wechselwirkungen der Farbstoffmoleküle begünstigt. Dafür spricht die Tatsache, dass der oben beschriebene Temperatureffekt in Epoxidharz bei geringen Farbstoffkonzentrationen nicht beobachtet werden konnte. In diesem Fall bewirkte eine Temperaturerhöhung keinen Anstieg, sondern einen leichten Abfall der Fluoreszenzintensität.

5.4 Ratiometrische Messungen von Temperatur und Sauerstoff

Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass das bei etwa 580 nm emittierte Fluoreszenzsignal des Porphyrin-Indikators eine andere Abhängigkeit von Temperatur und Sauerstoffkonzentration besitzt als die bei 650 nm abgestrahlte Phosphoreszenz. Diese Tatsache ermöglicht ratiometrische Sauerstoff- und Temperaturmessungen, bei denen anstelle der absoluten Lumineszenzintensität der Quotient aus den Intensitäten von Phosphoreszenz und Fluoreszenz als Messgröße dient. Abbildung 5-7 zeigt die Sauerstoffabhängigkeit des Signalquotienten und der Einzelintensitäten des Indikators in Polysulfon.

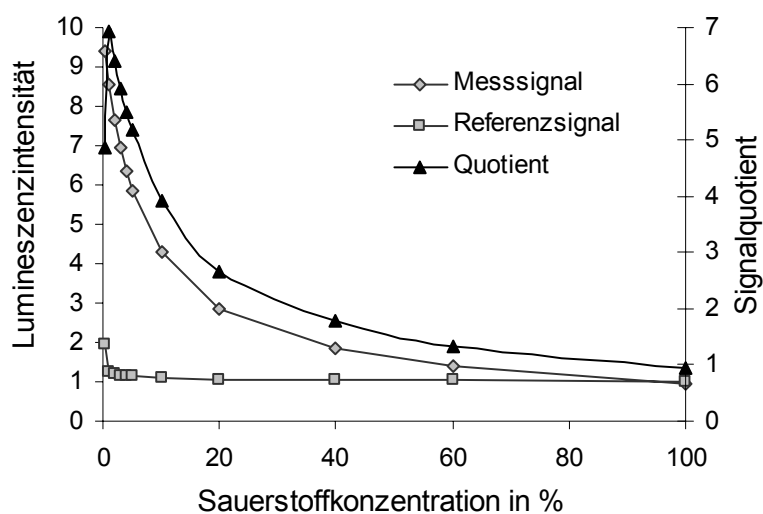


Abbildung 5-7: Sauerstoffabhängigkeit der Phosphoreszenzintensität (Messsignal, $\lambda_{\text{ex}}=500$ nm, $\lambda_{\text{em}}=650$ nm), der Fluoreszenzintensität (Referenzsignal, $\lambda_{\text{ex}}=410$ nm, $\lambda_{\text{em}}=580$ nm) und des Signalquotienten des Porphyrin-Indikators in Polysulfon.

Für Sauerstoffkonzentrationen von weniger als einem Prozent ist die Fluoreszenz als Referenz nicht geeignet, da sie einen Signalanteil enthält, der von geringen Sauerstoffkonzentrationen effizient gequenchet wird. Ab etwa 1 % Sauerstoffgehalt bleibt die Fluoreszenzintensität jedoch nahezu konstant, sodass ein entsprechender ratiometrischer Sensor im Messbereich zwischen 1 und 100 % Sauerstoff verwendet werden kann.

Der Quotient aus Mess- und Referenzsignal ist bei einer Mischung aus verschiedenen Farbstoffen nur dann unempfindlich gegen Ausbleichen, wenn die Signale beider Komponenten in der Mischung dadurch gleichermaßen vermindert werden. Zur Überprüfung der Stabilität des Signalquotienten wurde der Indikator in Epoxidharz eine Stunde lang bei 40 °C dem Anregungslicht von 415 nm ausgesetzt. Vor und nach dieser Bestrahlung wurden die Intensitäten der Phosphoreszenz und der Fluoreszenz bei verschiedenen Temperaturen gemessen. Wie das Diagramm in Abbildung 5-8 zeigt, bewirkte das Ausbleichen des Farbstoffes einen Intensitätsrückgang um etwa 10 %. Der Quotient aus beiden Signalen blieb dagegen stabil. Folglich kann das Referenzsignal dieses Porphyrin-Indikators zur Kompensation der Intensitätsabnahme beim Ausbleichen des Farbstoffes genutzt werden.

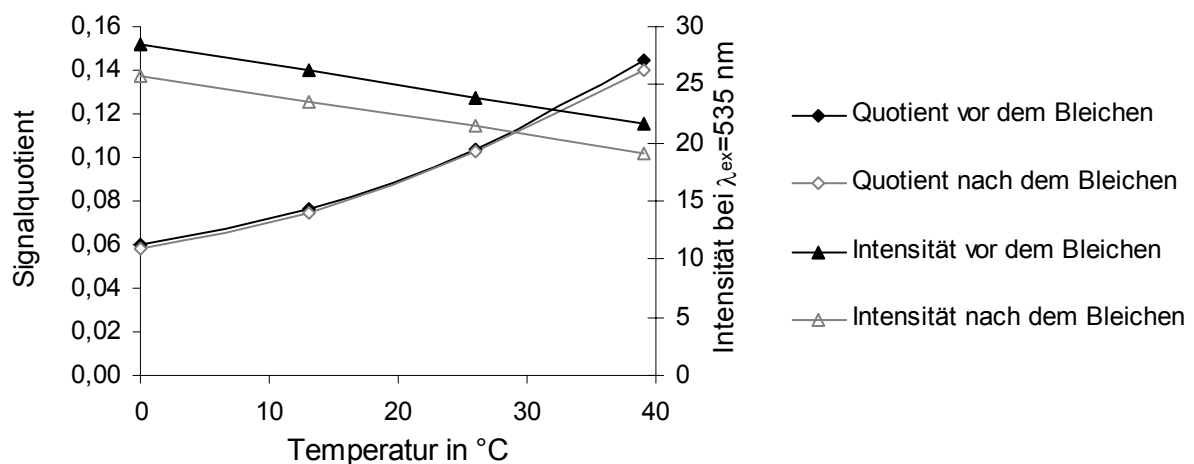


Abbildung 5-8: Temperaturabhängigkeit der Lumineszenzintensität des Porphyrin-Indikators in Epoxidharz sowie des Signalquotienten aus Phosphoreszenz ($\lambda_{em}=640$ nm) und Fluoreszenz ($\lambda_{em}=570$ nm) vor und nach dem Ausbleichen des Farbstoffes.

5.5 Zusammenfassung

Platin-Octaethylporphyrin wurde in Kombination mit Zink-Octaethylporphyrin als Indikator für ratiometrische Sauerstoff- und Temperaturmessungen getestet.

Diese Indikatormischung zeigt die stark sauerstoffabhängige Phosphoreszenz des Platinkomplexes bei einer Emissionswellenlänge von etwa 645 nm sowie ein Fluoreszenzsignal bei $\lambda_{em}=575$ nm, das auf den Zinkkomplex zurückzuführen ist. Die Fluoreszenz enthält einen Signalanteil, der bereits von geringen Sauerstoff-

konzentrationen nahezu vollständig gequenchet wird und dessen Intensität mit der Temperatur stark ansteigt. Dabei handelt es sich vermutlich um verzögerte Fluoreszenz. Bei Sauerstoffkonzentrationen von mehr als 1 % ist die Fluoreszenz dagegen nahezu sauerstoffunabhängig. Aufgrund dieser spektroskopischen Eigenschaften ist der Porphyrin-Indikator für ratiometrische Sauerstoff- und Temperaturmessungen geeignet, bei denen der Quotient aus den Intensitäten von Phosphoreszenz und Fluoreszenz als Messgröße dient. Von großer Bedeutung ist dabei die Tatsache, dass der Signalquotient auch beim Ausbleichen des Indikators konstant bleibt. Dadurch bietet diese Farbstoffkombination bei der ratiometrischen Messung die gleichen Vorteile bezüglich der Signalstabilisierung wie die Verwendung eines einzigen, ratiometrischen Indikators.

Das ratiometrische Messverfahren kann im Konzentrationsbereich zwischen 1 % und 100 % Sauerstoff angewendet werden. Die Temperaturmessungen wurden zwischen 0 °C und 50 °C durchgeführt.

Zur Temperaturmessung wurde Epoxidharz als sauerstoffundurchlässige Immobilisierungsmatrix verwendet. In diesem Polymer besitzen die Phosphoreszenz und die Fluoreszenz des Indikators eine entgegengesetzte Temperaturabhängigkeit, sodass der Signalquotient eine gute Empfindlichkeit gegenüber der Messgröße aufweist. Zu Beginn der Beleuchtung zeigte das Signal dieses Sensormaterials ein ungewöhnliches Sättigungsverhalten, das bei der Temperaturmessung berücksichtigt werden muss.

Im Fall des Sauerstoffsensors wurde der Porphyrin-Indikator in Polysulfon immobilisiert. Die Ansprechzeit auf Änderungen der Sauerstoffkonzentration konnte durch die Herstellung einer porösen Polymer/Indikator-Membran wesentlich verkürzt werden.

6. Aufbau eines eigenständigen Sauerstoff- und Temperatursensors

Die in Kapitel 5 beschriebenen Untersuchungen zur Verwendung einer Kombination aus Platin- und Zink-Octaethylporphyrin als Indikator für ratiometrische optische Sensoren wurden mit Hilfe des Fluoreszenz-Spektrophotometers durchgeführt. Aufbauend auf diesen Arbeiten wurde ein eigenständiges, tragbares Gerät zur faser-optischen Sauerstoff- und Temperaturmessung entwickelt. Die Spektralbereiche von Mess- beziehungsweise Referenzsignal sind für beide Messgrößen identisch. Deshalb kann das Gerät wahlweise sowohl zur Temperatur- als auch zur Sauerstoffbestimmung verwendet werden. Auch die Kombination von Temperatur- und Sauerstoffmessung zu einem temperaturunabhängigen Sauerstoffsensor ist möglich.

6.1 Das optische System

Das ratiometrische Messverfahren erfordert die Detektion der Lumineszenz in zwei unterschiedlichen Wellenlängenbereichen. Wenn die Messung durch einen einzigen Lichtleiter erfolgt, setzt sich das Messsignal aus Phosphoreszenz, Fluoreszenz und zurück gestreutem Anregungslicht zusammen. Die Trennung dieser Signalanteile könnte mit einem dichroitischen Strahlteiler erfolgen, dem zur Entfernung des Anregungslichtes ein Langpassfilter vorgeschaltet ist. Ein Nachteil dieser Methode besteht jedoch darin, dass zwei getrennte Detektoren zur Erfassung von Mess- und Referenzsignal benötigt werden. Um die ratiometrische Messung mit nur einem Detektor durchführen zu können, wurde hier daher die Eigenschaft des Indikators ausgenutzt, dass sich die Anregungsmaxima von Fluoreszenz und Phosphoreszenz bei unterschiedlichen Wellenlängen befinden. Bei einer Anregungswellenlänge von 410 nm wird überwiegend Fluoreszenz emittiert, während im Spektralbereich zwischen 500 und 540 nm fast ausschließlich Phosphoreszenz angeregt wird. Durch abwechselnde Anregung bei diesen Wellenlängen können die beiden Signale zeitlich getrennt werden. Die Detektion erfolgt in einem breiten Wellenlängenbereich, der die Emissionsmaxima von Fluoreszenz und Phosphoreszenz einschließt und lediglich das Anregungslicht abtrennt.

Als Lichtquellen wurden Leuchtdioden (LEDs) verwendet, deren Emission durch Interferenzfilter von 10 nm Halbwertsbreite gefiltert wurde. Die Anregung der Phosphoreszenz erfolgte im Bereich des Nebenmaximums bei 500 nm, und nicht im Hauptmaximum bei 535 nm (zum Spektrum des Indikators vergleiche Kapitel 5). Dadurch konnte eine handelsübliche blaue LED ($\lambda_{\text{max}}=470$ nm) als Lichtquelle verwendet werden, da diese auch bei 500 nm noch mit ausreichender Intensität emittiert. Außerdem vereinfacht der größere Abstand zum Lumineszenzsignal die

Trennung von Anregungs- und Emissionslicht.

Abbildung 6-1 zeigt schematisch den Aufbau des optischen Systems des Sensors.

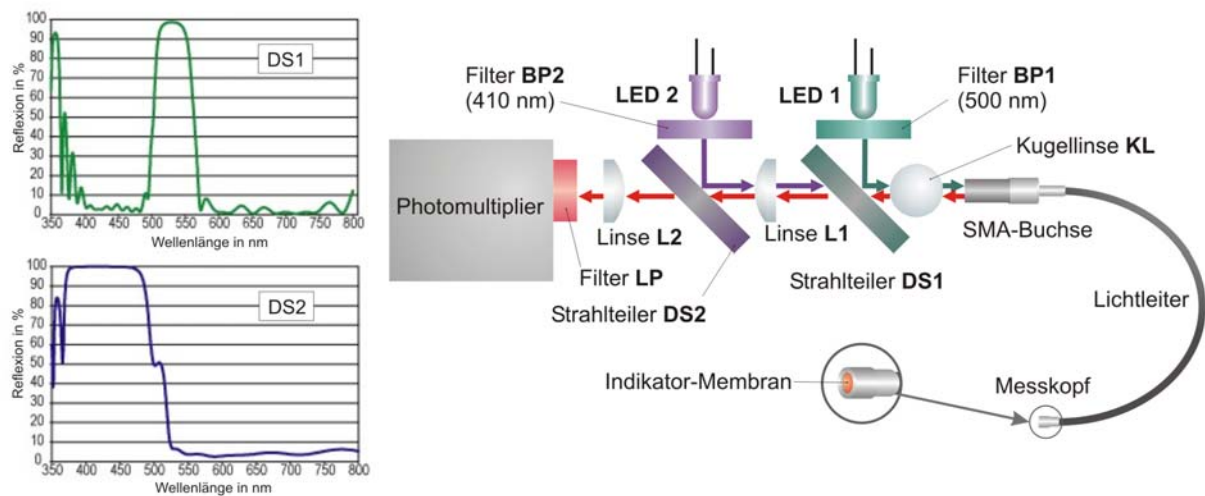


Abbildung 6-1: Schematische Darstellung der Optik für den Sauerstoff- und Temperatursensor. Links im Bild sind die Reflexionsspektren der verwendeten Strahlteiler dargestellt (Quelle: Edmund Optics GmbH, www.edmundoptics.com).

Zur Trennung der beiden Signale werden die LEDs abwechselnd für jeweils vier Millisekunden eingeschaltet. Zwischen jedem Wechsel liegen weitere vier Millisekunden, in denen keine Beleuchtung erfolgt. Die auf diese Weise gehoppten Messsignale können mit einem Lock-in-Verstärker von möglichen Störungen getrennt werden, sodass ein besseres Signal:Rausch-Verhältnis erreicht wird. Das Anregungslicht der LEDs wird an den dichroitischen Strahlteilern DS1 und DS2 reflektiert und mit Hilfe der Linsen L1 und KL in den Lichtleiter fokussiert. Wie die Reflexionsspektren der beiden dichroitischen Strahlteiler zeigen, ist DS2 für langwelliges Licht ab etwa 500 nm durchlässig, während das kurzwellige Anregungslicht in den Lichtleiter reflektiert wird. DS1 reflektiert dagegen nur im Bereich zwischen etwa 500 und 570 nm, in welchem die Anregung durch LED 1 erfolgt, und lässt das Anregungslicht von LED 2 durch. Beide Strahlteiler sind durchlässig für die Lumineszenzsignale, sodass diese ungehindert von dem Lichtleiter zum Detektor gelangen können. Um zu verhindern, dass gestreutes oder reflektiertes Anregungslicht in den PMT gelangt, befindet sich vor dessen aktiver Fläche ein zusätzlicher Langpassfilter mit einer Grenzwellenlänge von 550 nm. Durch die Linsen L1, L2 und KL werden die Signalverluste innerhalb der Optik reduziert.

Da die Empfindlichkeit des Detektors in einem weiten Bereich verändert werden kann, hängt die absolute Höhe des Messsignals von der jeweiligen Einstellung ab. Im Folgenden werden daher alle mit diesem Gerät gemessenen Signalintensitäten in willkürlich relativen Einheiten angegeben.

Zur Fixierung der einzelnen Komponenten wurde in der Mechanik-Werkstatt des Institutes ein Gehäuse aus schwarz eloxiertem Aluminium gefertigt, das zum Schutz vor Umgebungslicht mit einem Deckel verschlossen werden kann. Um ein möglichst intensives Lumineszenzsignal zu erreichen, waren zuvor die optimalen Positionen der optischen Komponenten ermittelt worden. Ein Foto dieses Aufbaus befindet sich im Anhang auf Seite 57.

Als Lichtleiter wurden Kunststofffasern von 2 mm Durchmesser (Edmund Optics GmbH) verwendet. Zur Herstellung der Sauerstoffoptode wurde die sauerstoff-sensitive Membran mittels einer speziellen Überwurfmutter vor der Stirnfläche der Faser fixiert, wie ebenfalls in Abbildung 6-1 gezeigt ist. Auf diese Weise kann die Membran bei Bedarf auf einfache Weise erneuert werden.

Die Funktion des optischen Systems wurde mit dem Fluoreszenz-Spektrophotometer überprüft. Dazu wurde das gefilterte Licht der LEDs durch den Lichtleiter in das Spektrophotometer geleitet. Auf diese Weise konnte die spektrale Verteilung des Anregungslichtes, das tatsächlich den Indikator erreicht, erfasst werden. Zur Messung der Lumineszenzspektren der Temperaturoptode wurde anstatt des PMT ein Lichtleiterbündel am Ausgang der Optik fixiert. Durch diesen Lichtleiter wurde das Emissionslicht zum Spektrophotometer geleitet. Wie Abbildung 6-2 zeigt, sind im Messsignal keine Anteile des Anregungslichtes zu erkennen. Folglich kann mit diesem optischen System eine sehr gute Trennung von Anregungs- und Lumineszenzlicht erreicht werden.

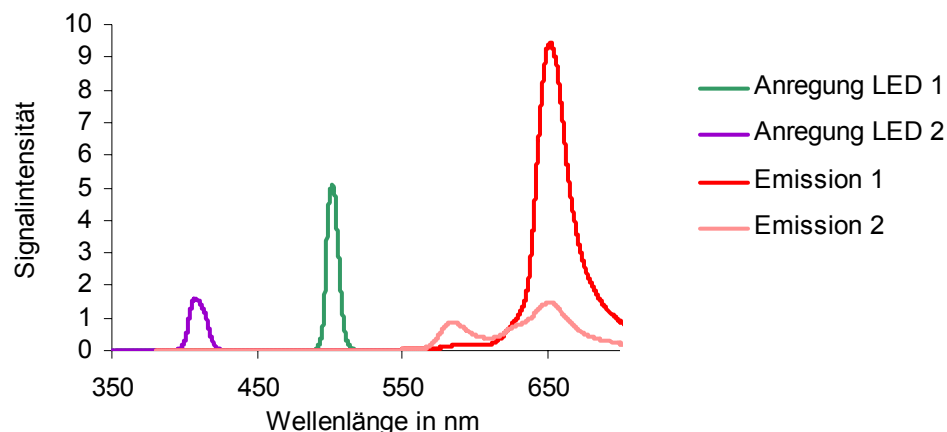


Abbildung 6-2: Spektrale Verteilung von Messsignal und Anregungslicht des Sensors. Zur Erzeugung des Lumineszenzsignals wurde die Temperaturoptode bei Raumtemperatur verwendet.

Das Spektrum des Lumineszenzsignals zeigt, dass sich dieses nach Anregung bei 410 nm aus Fluoreszenz und Phosphoreszenz zusammensetzt. Der Anteil der Phosphoreszenz stört die ratiometrische Messung prinzipiell nicht, bewirkt allerdings eine gewisse Verminderung der Empfindlichkeit des Sensors.

Die Steuerung des Sensorsystems erfolgt durch zwei Mikrocontroller. Das Gerät wird über vier Tasten bedient, der Messwert auf einem LCD-Display angezeigt. Die entsprechende Elektronik wurde in der Elektronikwerkstatt des Institutes entwickelt und zusammen mit den optischen Komponenten in ein portables Gehäuse integriert. Im Anhang befinden sich ein Schema der elektronischen Schaltung und ein Foto des kompletten Gerätes (Seite 57f).

6.2 Kalibrierung des Sensors

Zur Berechnung der Sauerstoffkonzentration beziehungsweise der Temperatur aus dem Messsignal des Sensors muss dessen Abhängigkeit von der Messgröße durch eine geeignete mathematische Funktion beschrieben werden. Diese Funktion sollte den tatsächlichen Zusammenhang möglichst gut beschreiben und gleichzeitig so wenige Parameter wie möglich enthalten. Dadurch wird die Kalibrierung der Optode vereinfacht, da die Zahl der mindestens benötigten Kalibrationsmessungen gleich der Anzahl der zu bestimmenden Parameter ist.

6.2.1 Temperaturoptode

Abbildung 6-3 zeigt den Signalverlauf des Temperatursensors zwischen 0 und 40 °C.

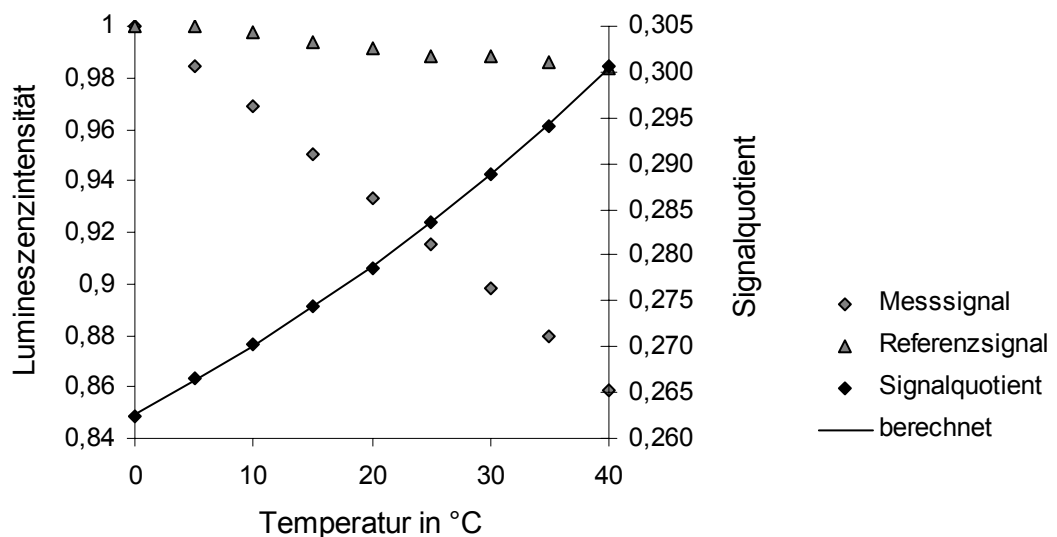


Abbildung 6-3: Temperaturabhängigkeit der Einzelsignale des Sensors und Näherung des Signalquotienten durch Gleichung 6-1 mit $a_1=0,0482$, $a_2=0,0144$ und $a_3=0,2144$. Die Einzelsignale bei $\lambda_{\text{ex}}=410$ nm beziehungsweise $\lambda_{\text{ex}}=500$ nm wurden zur graphischen Darstellung normiert.

Anders als bei den in Kapitel 5 beschriebenen Messungen, die mit dem Fluoreszenz-Spektrophotometer durchgeführt wurden, nimmt auch das bei 410 nm angeregte Referenzsignal mit steigender Temperatur leicht ab. Die Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchung des Porphyrin-Indikators lassen dagegen eine umgekehrte

Temperaturabhängigkeit erwarten. Offensichtlich wird neben der Fluoreszenz des Referenzsignals noch so viel Phosphoreszenz angeregt, dass deren negative Temperaturabhängigkeit den Anstieg der Fluoreszenz beim Erwärmen überkompensiert. Dadurch wird die Empfindlichkeit der Messung und somit die Genauigkeit des Messergebnisses entsprechend vermindert. Trotzdem ist mit dem Temperatursensor eine recht genaue Temperaturmessung möglich, wie die ebenfalls in Abbildung 6-3 gezeigte Auftragung des Quotienten aus den Signalen bei 410 und 500 nm zeigt. Die Abhängigkeit des umgekehrten Signalquotienten S' von der Temperatur T lässt sich durch eine Exponentialfunktion beschreiben:

$$S' = \frac{I_{410}}{I_{500}} = a_1 \cdot e^{a_2 \cdot T} + a_3 \quad \text{Gleichung 6-1}$$

Durch Umstellung dieser Gleichung nach T lässt sich aus dem gemessenen Signalquotienten die Temperatur bestimmen. Die Standardabweichung der auf diese Weise bestimmten Werte von den tatsächlichen Temperaturen beträgt 0,2 °C. Zur Bestimmung aller Parameter dieser Funktion ist eine Dreipunkt-Kalibrierung erforderlich. Eine lineare Näherung, die durch zwei Messpunkte kalibriert werden kann, erlaubt dagegen nur eine ungenaue Temperaturmessung mit einer Standardabweichung von 1,1 °C.

Als nachteilig erwiesen sich die in Kapitel 5.2 beschriebenen Effekte beim Einschalten der Lichtquelle. Bis zum Erreichen eines stabilen Messsignals vergingen hier etwa 30 min. Der Grund für diese langsamere Reaktion ist vermutlich die geringere Anregungsintensität des portablen Sensors im Vergleich zum Spektrophotometer. Daher sollte für zukünftige Anwendungen des Temperatursensors die Verwendung einer anderen sauerstoffundurchlässigen Matrix in Erwägung gezogen werden.

6.2.2 Sauerstoffoptode

Die Sauerstoffabhängigkeit der bei $\lambda_{\text{ex}}=500$ nm angeregten Phosphoreszenz lässt sich mit der Stern-Volmer-Gleichung beschreiben (vergleiche Kapitel 1.1). Das Referenzsignal bei $\lambda_{\text{ex}}=410$ nm setzt sich dagegen aus Fluoreszenz und Phosphoreszenz mit unterschiedlichen Sauerstoffabhängigkeiten zusammen. Aus diesen Überlegungen kann eine mathematische Gleichung für die Kalibrierung des Signalquotienten S ermittelt werden, die sich aus den Funktionen zur Beschreibung der einzelnen Signalanteile zusammensetzt. Für die praktische Anwendung des Sensors kann es jedoch sinnvoller sein, unabhängig von theoretischen Überlegungen eine möglichst einfache, empirische Kalibrationsgleichung zu suchen. Auf diese Weise konnte der Signalverlauf des ratiometrischen Sauerstoffsensors durch eine Funktion vom Typ

der einfachen Stern-Volmer-Gleichung (Gleichung 1-1) sehr gut beschrieben werden, wie Abbildung 6-4 zeigt.

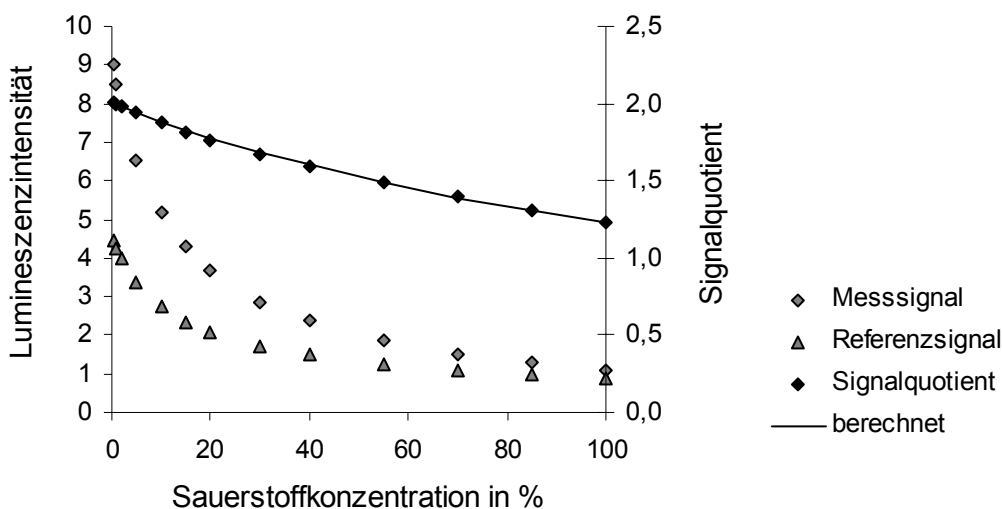


Abbildung 6-4: Sauerstoffabhängigkeit der Einzelsignale des Sensors und Näherung des Signalquotienten durch Gleichung 6-2 mit $b_1=2,0$ und $b_2=0,0063$; $T=20$ °C.

$$S = \frac{I_{500}}{I_{410}} = \frac{b_1}{1 + b_2 \cdot [O_2]}$$

Gleichung 6-2

Mit dieser Beziehung kann aus dem gemessenen Signalquotienten nach Umstellen der Gleichung die Sauerstoffkonzentration $[O_2]$ berechnet werden. Die Standardabweichung der so berechneten Werte von den eingestellten Sauerstoffkonzentrationen beträgt 0,8 Prozentpunkte Sauerstoff. Die verwendete Funktion entspricht zwar formal der Stern-Volmer-Gleichung, hat hier aber nicht deren physikalische Bedeutung bezüglich der Lumineszenzlöschung. Für die Parameter dieser Funktion werden daher nicht die Abkürzungen I_0 und K_{SV} , sondern die Bezeichnungen b_1 und b_2 verwendet.

Da die Sauerstoffempfindlichkeit von Optoden temperaturabhängig ist, muss der Sensor nach einem Wechsel der Versuchstemperatur prinzipiell neu kalibriert werden. Wenn häufig in Proben unterschiedlicher Temperatur gemessen werden soll, kann dadurch ein erheblicher zusätzlicher Arbeitsaufwand entstehen. Aus diesem Grund wurde eine alternative Methode zur Kalibrierung des Sensors entwickelt, die eine schnelle Anpassung an Temperaturänderungen ohne Neukalibrierung ermöglicht. Dazu wurde die Sauerstoffabhängigkeit des Signalquotienten für verschiedene Temperaturen zwischen 0 und 40 °C bestimmt. Für jede Versuchstemperatur wurde die Kalibrationsfunktion optimal an die Messwerte angepasst, um die Parameter b_1 und b_2 zu ermitteln. Anschließend wurden zwei möglichst einfache mathematische Funktionen ausgewählt, welche die Abhängigkeit der Parameter b_1

und b_2 von der Temperatur T beschreiben. Der Temperaturverlauf von b_1 konnte durch eine Gerade (Gleichung 6-3) beschrieben werden, während für b_2 eine Exponentialfunktion (Gleichung 6-4) verwendet wurde.

$$b_1 = c_1 \cdot T + c_2 \quad \text{Gleichung 6-3}$$

$$b_2 = c_3 \cdot e^{c_4 \cdot T} \quad \text{Gleichung 6-4}$$

Die Parameter b_1 und b_2 in der Kalibrationsgleichung (Gleichung 6-2) wurden durch diese Funktionen ersetzt, um die Abhängigkeit des Signalquotienten von der Sauerstoffkonzentration und der Temperatur zu erhalten.

$$S = \frac{I_{500}}{I_{410}} = \frac{c_1 \cdot T + c_2}{1 + c_3 \cdot e^{c_4 \cdot T} \cdot [O_2]} \quad \text{Gleichung 6-5}$$

In einem letzten Schritt wurde diese Funktion durch Variation der Parameter c_1 , c_2 , c_3 und c_4 an die Kurvenschar der Signalverläufe bei unterschiedlichen Temperaturen angepasst. In Abbildung 6-5 sind die gemessenen Signalquotienten sowie die nach Gleichung 6-5 aus der Versuchstemperatur berechneten Kalibrationskurven dargestellt.

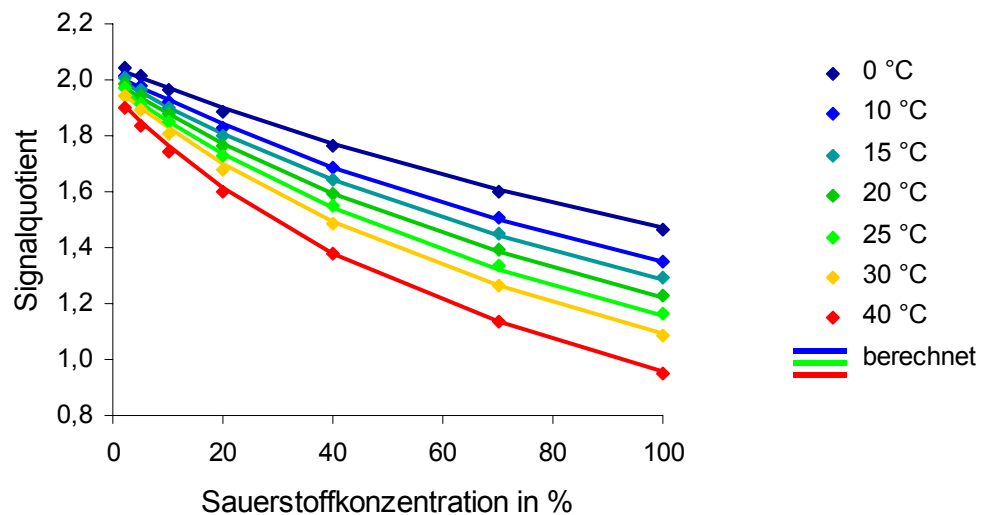


Abbildung 6-5: Sauerstoffabhängigkeit des Signalquotienten bei verschiedenen Temperaturen und Beschreibung der Messwerte durch Gleichung 6-5; $c_1=0,00243$, $c_2=2,0459$, $c_3=0,00388$ und $c_4=0,0244$.

Die mittlere Standardabweichung der aus den Messdaten nach Gleichung 6-5 berechneten Sauerstoffkonzentrationen von dem tatsächlich eingestellten Sauerstoffgehalt ist mit 1,0 Prozentpunkten Sauerstoff etwas höher als bei der Kalibrierung für eine feste Temperatur. Für die Bestimmung der Parameter c_1 , c_2 , c_3 und c_4 sind

außerdem vier Kalibrationsmessungen nötig. Dafür kann mit diesem Verfahren ohne Neukalibrierung bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen werden, wenn die jeweilige Temperatur bekannt ist.

6.3 Überprüfung der Signalstabilität

In Kapitel 5.4 wurde bereits anhand der optischen Temperaturmessung mit dem Spektrophotometer gezeigt, dass die hier verwendete Kombination aus Platin- und Zink-Octaethylporphyrin zur Signalstabilisierung durch Referenzmessung geeignet ist. Ergänzend zu diesen Untersuchungen sollte nun die Stabilität der Sauerstoffmessung mit dem eigenen Sensorsystem überprüft werden.

6.3.1 Ausbleichen des Farbstoffes

Um zu testen, ob das Ausbleichen des Indikators bei längerer Beleuchtung durch die Referenzmessung kompensiert werden kann, wurde die Optode bei einer Sauerstoffkonzentration von 20 % insgesamt 90 min lang dem Anregungslicht ausgesetzt. Vor dieser Beleuchtung und nach 30 min sowie nach 90 min wurden die Sauerstoffabhängigkeiten des Signalquotienten und des Sensorsignals bei $\lambda_{\text{ex}}=500$ nm aufgenommen. Das Experiment wurde bei 40 °C durchgeführt, da bei dieser Temperatur generell ein schnelleres Ausbleichen festgestellt werden konnte als bei Raumtemperatur. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 6-6 dargestellt.

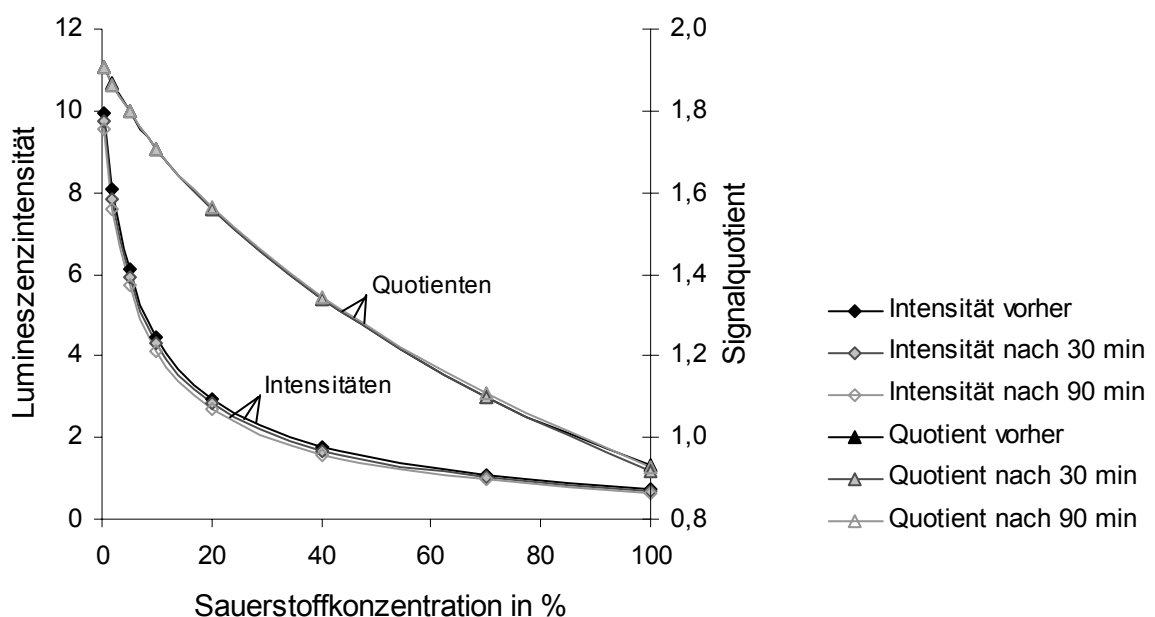


Abbildung 6-6: Sauerstoffabhängigkeit der Phosphoreszenzintensität und des Signalquotienten vor und nach der Beleuchtung des Indikators für 30 beziehungsweise 90 min; $T=40$ °C.

Die Intensität der Phosphoreszenz wird durch die Beleuchtung des Indikators erwartungsgemäß verringert. Wegen der verhältnismäßig geringen Lichtintensität ist das Ausmaß der Photozerstörung des Farbstoffes insgesamt gering. Die Phosphoreszenzintensität nahm durch das Ausbleichen um etwa 8 % ab, während der Signalquotient nahezu unverändert blieb. Die Langzeitstabilität des Sensorsignals konnte folglich durch die Referenzmessung wesentlich verbessert werden.

6.3.2 Mechanische Störungen

Um zu prüfen, ob die ratiometrische Messung auch den Einfluss mechanischer Störungen auf das Messsignal kompensiert, wurde die SMA-Steckverbindung zur Optode gelockert. Durch Bewegen des Lichtleiters wurden anschließend starke Schwankungen der Messsignale hervorgerufen, während die Intensität der Einzelsignale kontinuierlich bei konstanter Sauerstoffkonzentration aufgezeichnet wurde. Wie Abbildung 6-7a zeigt, bewirkten die mechanischen Störungen Veränderungen der Lumineszenzintensität von bis zu 60 % des Ausgangssignals. Der Signalquotient blieb deutlich stabiler und veränderte sich nur um etwa 4 %.

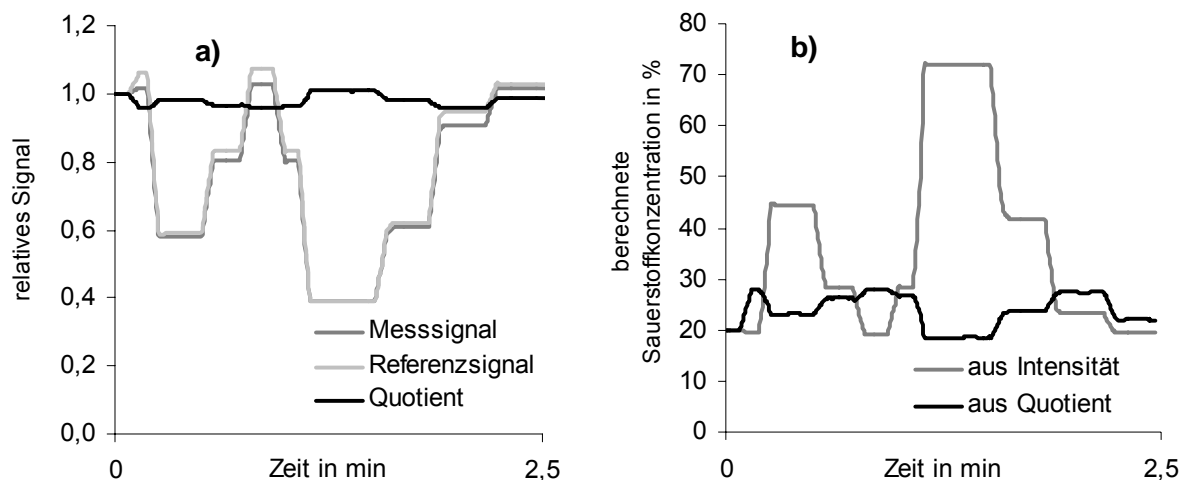


Abbildung 6-7: Einfluss mechanischer Störungen auf die Sauerstoffmessung bei gelockerter SMA-Verbindung. **a)** Darstellung der Lumineszenzintensität und des Signalquotienten, **b)** aus den Messwerten berechnete Sauerstoffkonzentrationen.

Durch die im Referenzsignal enthaltenen Phosphoreszenzanteile ist der Signalquotient als Messgröße weniger empfindlich für Sauerstoff als die Phosphoreszenzintensität. Dadurch wird die Wirksamkeit der Signalstabilisierung vermindert, wie die Auftragung der aus der Intensität beziehungsweise aus dem Quotienten berechneten Sauerstoffkonzentrationen in Abbildung 6-7b zeigt. Die Standardabweichung dieser Werte von der tatsächlichen Sauerstoffkonzentration beträgt im Fall der ratiometrischen Messung 5 Prozentpunkte und bei der reinen Intensitätsmessung 25 Prozentpunkte.

Die Tatsache, dass der Signalquotient nicht völlig unabhängig von mechanischen

Intensitätsveränderungen ist, hängt vermutlich damit zusammen, dass die optischen Eigenschaften des Lichtleiters, insbesondere die Verteilung der Moden, abhängig von der Wellenlänge sind. Möglicherweise können unter Verwendung von Lichtleiter-Bündeln aus dünneren Fasern daher noch bessere Ergebnisse bezüglich der Signalstabilität erzielt werden.

6.4 Sauerstoffmessung in flüssiger Phase

Alle Messungen mit dem Sauerstoffsensor wurden bisher aus praktischen Gründen in der Gasphase mit Mischungen aus Sauerstoff und Stickstoff durchgeführt. Um zu zeigen, dass der Sensor auch in wässrigem Medium eingesetzt werden kann, wurde zusätzlich die Sauerstoffabhängigkeit des Signalquotienten in Wasser aufgenommen.

Der Versuch wurde in einer Schraubflasche durchgeführt, deren Inhalt mit einem Magnetrührer durchmischt wurde. Durch Bohrungen im Deckel der Flasche wurden die Optode sowie die Zuleitung zur Begasung in die Lösung geführt. Zur Einstellung der Sauerstoffkonzentration wurde das Wasser mit Gasmischungen aus Sauerstoff und Stickstoff unterschiedlicher Zusammensetzungen gesättigt. Der in Abbildung 6-8 gezeigte Verlauf des Signalquotienten ähnelt den Ergebnissen aus der Messung in der Gasphase. Der Sensor ist demnach auch in wässriger Umgebung verwendbar.

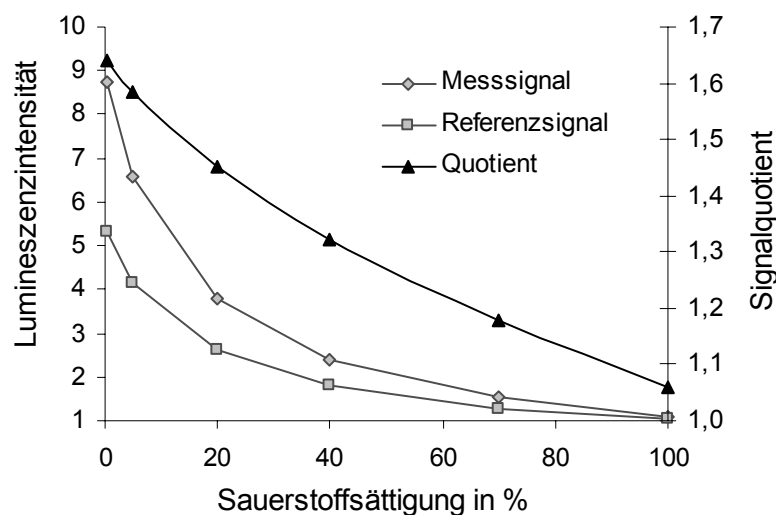


Abbildung 6-8: Sauerstoffabhängigkeit der Einzelsignale und des Signalquotienten in Wasser.

6.5 Kombi-Sensor zur temperaturunabhängigen Sauerstoffmessung

Bei allen bisher beschriebenen Arbeiten wurde das Referenzsignal der ratiometrischen Messungen zur Kompensation von Intensitätsveränderungen durch Ausbleichen oder mechanische Störungen verwendet. Im Folgenden sollte geprüft werden, ob mit dem Referenzsignal bei der Sauerstoffmessung alternativ der Einfluss der Temperatur kompensiert werden kann. Die Messung erfolgte weiterhin durch eine einzige Optode. Sie ist in diesem Fall nicht mehr unabhängig von der absoluten Lumineszenzintensität, dafür aber von der Temperatur. Dabei sollte der gleiche Porphyrin-Indikator verwendet werden wie bei den bisherigen Sauerstoffmessungen, um Veränderungen der Anregungs- oder Emissionswellenlängen zu vermeiden. Ein derartiges temperaturunabhängiges Messverfahren ist vor allem für solche Anwendungen von Interesse, bei denen die Temperatur der Probe nicht bekannt oder im Laufe der Messung veränderlich ist.

Am einfachsten wäre eine solche Temperaturkompensation mit einem Referenzsignal durchzuführen, das nur von der Temperatur und nicht von der Sauerstoffkonzentration abhängt. Bei dem hier vorgestellten Sensorsystem enthält jedoch auch das Referenzsignal Anteile der sauerstoffabhängigen Phosphoreszenz des Platin-Octaethylporphyrins. Folglich sind beide Einzelsignale mehr oder weniger stark sauerstoffabhängig. Um zu prüfen, ob aus einer gemessenen Kombination der beiden Signale die Sauerstoffkonzentration eindeutig bestimmt werden kann, ohne dass die Temperatur bekannt ist, wurden Mess- und Referenzsignal für sieben verschiedene Sauerstoffkonzentrationen und jeweils fünf verschiedene Temperaturen gemessen. Die Auftragung des Referenzsignals in Abhängigkeit des Messsignals zeigt Abbildung 6-9.

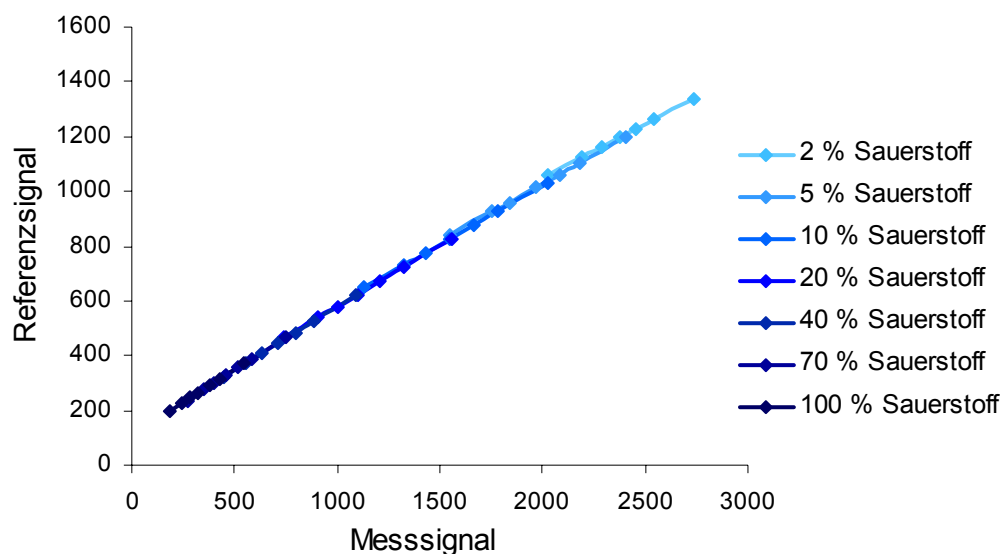


Abbildung 6-9: Zusammenhang zwischen Mess- und Referenzsignal der Sauerstoffoptode bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen und Temperaturen.

In dem Diagramm in Abbildung 6-9 wurden alle Datenpunkte, die bei gleicher Sauerstoffkonzentration gemessen wurden, in derselben Farbe dargestellt und durch eine Linie verbunden. Die Punkte liegen in dieser Auftragung alle auf einer Geraden, sodass sich die Datenreihen gleicher Sauerstoffkonzentration überschneiden. Eine Temperaturerhöhung kann demnach den gleichen Einfluss auf die Signale des Sensors haben wie eine Erhöhung der Sauerstoffkonzentration. Jedem Messpunkt könnten somit unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen beziehungsweise Temperaturen zugeordnet werden. Daher ist mit der Sauerstoffoptode eine eindeutige Bestimmung der Sauerstoffkonzentration aus dem Messergebnis ohne Kenntnis der Temperatur nicht möglich.

Durch eine Kombination der Immobilisierungsmethode der Sauerstoffoptode mit derjenigen des Temperatursensors konnte jedoch die temperaturunabhängige Sauerstoffmessung ermöglicht werden. Dazu wurde der Indikator sowohl in Epoxidharz als auch in Polysulfon immobilisiert und in beiden Polymeren nebeneinander vor der Stirnfläche des Lichtleiters fixiert. Die beiden Signale des Sensors enthalten dann jeweils einen sauerstoff- und temperaturabhängigen Signalanteil sowie einen Anteil, der ausschließlich von der Temperatur abhängt. Wie die Auftragung der Intensitäten in Abbildung 6-10 zeigt, überschneiden sich die Kurven gleicher Sauerstoffkonzentration nun nicht mehr, sodass aus jedem Wertepaar die entsprechende Konzentration bestimmt werden kann.

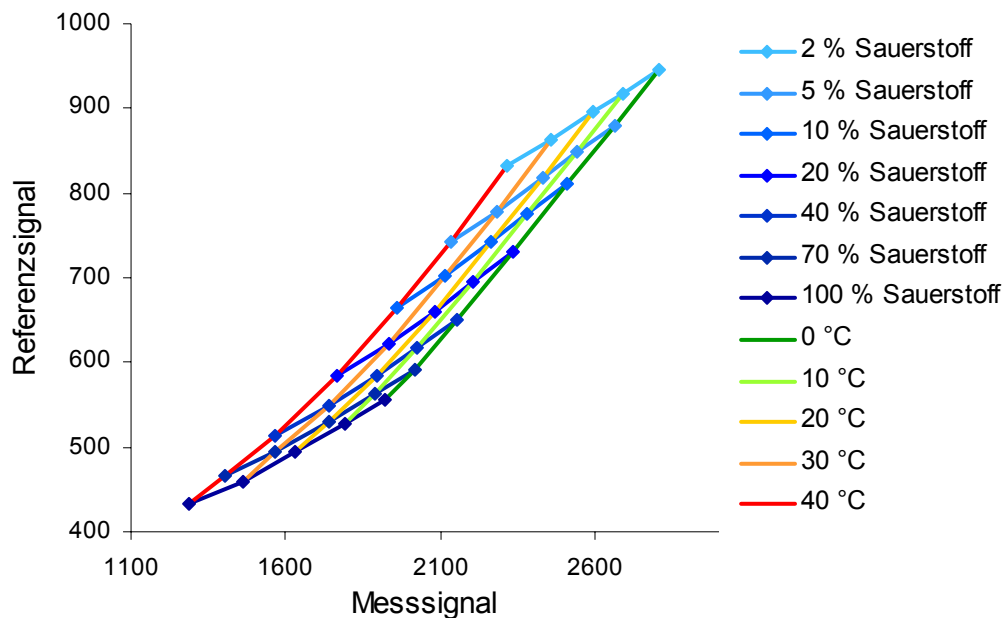


Abbildung 6-10: Zusammenhang zwischen Mess- und Referenzsignal der kombinierten Sauerstoff- und Temperaturoptode bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen und Temperaturen.

Zur Verdeutlichung des Temperatureinflusses wurden in dieser Auftragung alle Messwerte, die bei gleicher Temperatur aufgenommen wurden, mit einer Linie der

entsprechenden Farbe verbunden. Bei hohem Sauerstoffgehalt liegen die Kurven gleicher Sauerstoffkonzentration in Abbildung 6-10 sehr dicht zusammen. Die Sauerstoffempfindlichkeit dieser kombinierten Sauerstoff- und Temperaturoptode ist also in diesem Bereich gering.

Zur Kalibrierung der Optode wurde eine Kalibrationsfunktion für den Zusammenhang zwischen der Sauerstoffkonzentration $[O_2]$ und den Intensitäten des Messsignals I_{500} sowie des Referenzsignals I_{410} ermittelt. Dazu wurde zunächst I_{410} in Abhängigkeit von I_{500} für jede der Sauerstoffkonzentrationen durch eine lineare Funktion (Gleichung 6-6) genähert.

$$I_{410} = d_1 \cdot I_{500} + d_2 \quad \text{Gleichung 6-6}$$

Während der Parameter d_1 für alle Konzentrationen konstant gehalten werden kann, lässt sich die Sauerstoffabhängigkeit von d_2 durch Gleichung 6-7 beschreiben:

$$d_2 = \frac{e_1}{1 + e_2 \cdot [O_2]} + e_3 \quad \text{Gleichung 6-7}$$

Einsetzen dieser Beziehung in Gleichung 6-6 und Auflösen nach $[O_2]$ liefert die gesuchte Kalibrationsgleichung:

$$[O_2] = \frac{\frac{e_1}{I_{410} - d_1 \cdot I_{500} - e_3} - 1}{e_2} \quad \text{Gleichung 6-8}$$

Mit dieser Formel kann aus den Signalen der Optode die Sauerstoffkonzentration unabhängig von der Temperatur berechnet werden. Durch Anpassen der Funktion an die Messdaten wurden für die Funktionsparameter die folgenden Werte ermittelt:

$$d_1=0,239 \quad e_1=221,1 \quad e_2=0,083 \quad e_3=82,84$$

Zur Bestimmung der Parameter sind prinzipiell vier Kalibrationsmessungen nötig.

In Abbildung 6-11 sind die nach Gleichung 6-8 aus den Lumineszenzsignalen berechneten Sauerstoffkonzentrationen gegen die tatsächlich eingestellten Werte aufgetragen.

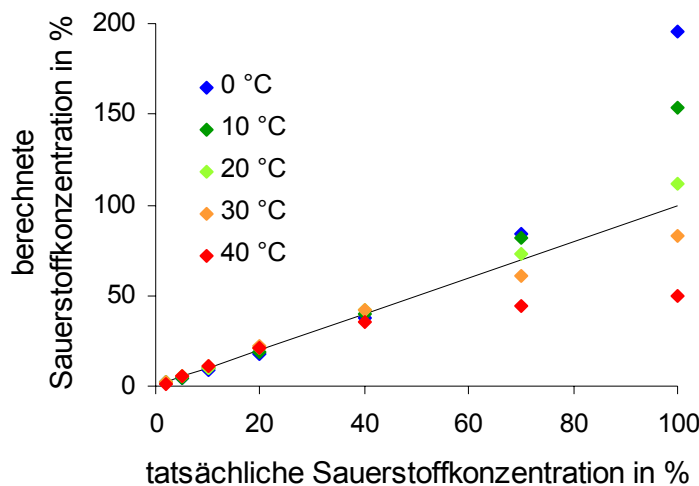


Abbildung 6-11: Berechnung der Sauerstoffkonzentration aus den Signalen des Kombi-Sensors nach Gleichung 6-8 bei unterschiedlichen Temperaturen.

Wie Abbildung 6-11 zeigt, ist mit dieser Kalibrationsfunktion eine temperatur-unabhängige Sauerstoffmessung im Konzentrationsbereich bis 40 % Sauerstoff möglich. Bei höheren Sauerstoffkonzentrationen zeigen die Ergebnisse dagegen eine zunehmende Abhängigkeit von der Temperatur. Die Messung ist bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen am genauesten. So beträgt die Standardabweichung der nach Gleichung 6-8 bestimmten Konzentrationen von dem eingestellten Sauerstoffgehalt bei 2 % Sauerstoff nur 0,2 Prozentpunkte, bei 40 % dagegen 2,5 Prozentpunkte. Die mittlere Standardabweichung im Messbereich zwischen 2 und 40 % Sauerstoff beträgt 1,2 Prozentpunkte.

6.6 Zusammenfassung

Für die ratiometrische Sauerstoff- und Temperaturmessung mit dem in Kapitel 5 beschriebenen Porphyrin-Indikator wurde ein eigenständiges, portables Sensorsystem entwickelt. Die Fluoreszenz und die Phosphoreszenz des Indikators werden darin durch das gefilterte Licht zweier zeitversetzt betriebener Leuchtdioden bei 410 beziehungsweise 500 nm angeregt. Die beiden Emissionssignale werden durch zwei dichroitische Strahlteiler vom Anregungslicht getrennt und in einem breiten Wellenlängenbereich gemeinsam mit einem Photomultiplier detektiert.

Mit diesem Sensorsystem kann bei Verwendung der entsprechenden Optoden sowohl die Sauerstoffkonzentration als auch die Temperatur gemessen werden. Die durch mechanische Störungen hervorgerufenen Signalschwankungen des ratiometrischen Sauerstoffsensors waren um Faktor fünf geringer als bei der einfachen Intensitätsmessung. Außerdem zeigte sich das Messsignal unempfindlich gegenüber Ausbleichen des Farbstoffes.

Im Referenzsignal bei $\lambda_{\text{ex}}=410$ nm sind außer der Fluoreszenz noch Anteile von

Phosphoreszenz enthalten, sodass dieses ebenfalls eine gewisse Sauerstoffabhängigkeit besitzt. Die Empfindlichkeit der Messung mit diesem Gerät ist daher geringer als im Fall einer vollständigen Trennung von Fluoreszenz und Phosphoreszenz.

Da das Signal des Sauerstoffsensors zusätzlich von der Temperatur abhängt, muss diese bei der Kalibrierung berücksichtigt werden. Als Alternative zur Kalibrierung bei der jeweiligen Versuchstemperatur wurde eine Methode vorgestellt, die eine Anpassung an die Temperatur ohne Neukalibrierung des Sensors ermöglicht.

Wenn der Farbstoff auf der Optode nebeneinander in Polysulfon und Epoxidharz immobilisiert wird, kann die Sauerstoffmessung sogar unabhängig von der Temperatur durchgeführt werden. Das Referenzsignal wird in diesem speziellen Fall nicht zum Ausgleichen von Intensitätsveränderungen, sondern zur Kompensation des Temperatureinflusses verwendet, sodass die Messung ohne Kenntnis der Temperatur der Probe durchgeführt werden kann. Für diese kombinierte Sauerstoff- und Temperaturoptode wurde eine Kalibrationsgleichung ermittelt, welche die Berechnung der Sauerstoffkonzentration aus den Einzelsignalen des Sensors im Messbereich zwischen 2 und 40 % Sauerstoff erlaubt. Bei höheren Konzentrationen lieferte diese Kalibrierung nur unbefriedigende Ergebnisse.

7. Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurden verschiedene Möglichkeiten erläutert, um die Temperatur, den pH-Wert oder die Sauerstoffkonzentration durch ratiometrische Lumineszenzmessungen zu bestimmen.

Anhand wässriger Indikatorlösungen konnte gezeigt werden, dass innere Filtereffekte und intermolekulare Wechselwirkungen bei hohen Farbstoffkonzentrationen eine Erhöhung des Informationsgehaltes im Lumineszenzspektrum bewirken können. Innere Filtereffekte werden jedoch nicht beobachtet, wenn die Detektion des Emissionslichtes aus derselben Richtung erfolgt wie die Anregung des Farbstoffes, wie zum Beispiel bei der Verwendung eines einzelnen Lichtleiters zur Signalübertragung. In der praktischen Anwendung ist daher zur Ausnutzung der Konzentrationseffekte ein spezieller Aufbau der Optode erforderlich. Abgesehen von dieser Einschränkung eröffnen sich durch diese Effekte interessante Möglichkeiten, insbesondere zur Generierung interner Referenzsignale bei Indikatoren, die ansonsten nicht für ratiometrische Lumineszenzmessungen geeignet sind.

Als Alternative zur ratiometrischen Messung von zwei Lumineszenzintensitäten wurde am Beispiel eines pH-Indikators das gesamte Spektrum analysiert. Wie der Vergleich beider Methoden zeigte, erlaubt die spektrale Analyse die Nutzung eines größeren Messbereiches. Die Messung und Auswertung der Fluoreszenz sind in diesem Fall jedoch aufwendiger als bei der Quotientenbildung aus lediglich zwei Lumineszenzintensitäten. Deshalb wird dieses Verfahren insbesondere für solche Anwendungen von Interesse sein, bei denen aufgrund der Komplexität des Spektrums die Messung bei zwei Wellenlängen nicht ausreicht, um die enthaltene Information optimal zu nutzen. Ein Beispiel dafür könnte die gleichzeitige Verwendung mehrerer pH-Indikatoren zur Erfassung eines sehr breiten Messbereiches sein, deren Lumineszenzsignale sich bei unterschiedlichen Wellenlängen befinden.

Für ratiometrische Sauerstoff- und Temperaturmessungen wurde ein Indikator aus Platin-Octaethylporphyrin und Zink-Octaethylporphyrin verwendet. Die spektroskopischen Eigenschaften und das Ausbleichverhalten dieses Indikators ermöglichten eine erfolgreiche Signalstabilisierung durch interne Referenzmessungen.

Zur praktischen Anwendung der ratiometrischen Sauerstoff- und Temperaturmessung wurde ein eigenständiges Messgerät entwickelt. Die Sauerstoffmessung mit diesem Sensorsystem kann auf unterschiedliche Weise erfolgen und somit flexibel an die Aufgabenstellung angepasst werden. Für Arbeiten bei konstanter Versuchstemperatur kann die Optode durch zwei Messpunkte kalibriert werden. Soll dagegen ohne Neukalibrierung bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen werden, ist nach einmaliger Vierpunkt-Kalibrierung eine einfache Anpassung an die

jeweilige Messtemperatur möglich. Wenn die Stabilisierung des Messsignals gegenüber Intensitätsveränderungen nicht benötigt wird, kann die Referenzmessung alternativ zur Kompensierung von Temperatureinflüssen verwendet werden. Die Sauerstoffmessung kann dann sogar bei unbekannter oder veränderlicher Proben-temperatur erfolgen. Die gleichzeitige Kompensation von Intensitäts- und Temperatureinflüssen auf den Sauerstoffsensor ist durch die Messung von zwei Lumineszenzintensitäten nicht möglich. Dazu würde prinzipiell ein weiteres Referenzsignal benötigt. Für faseroptische Sauerstoffmessungen, die unabhängig von Intensitätsveränderungen und gleichzeitig unabhängig von der Temperatur sind, könnten aber zwei ratiometrische Sensoren der hier vorgestellten Art kombiniert werden. In diesem Fall könnte die Sauerstoffkonzentration mit einer Sauerstoffoptode gemessen werden, während gleichzeitig mit einer Temperaturoptode die Temperatur bestimmt wird. Das Ergebnis der Sauerstoffmessung kann dann auf die in Kapitel 6.2 beschriebene Weise korrigiert werden, um Temperaturveränderungen zu kompensieren.

Bei einer möglichen Weiterentwicklung des Gerätes könnte insbesondere die Trennung von Fluoreszenz und Phosphoreszenz verbessert werden. Wenn durch entsprechende Veränderungen des optischen Systems der Anteil der Phosphoreszenz im Referenzsignal vermindert wird, kann die Empfindlichkeit der Messung für beide Messgrößen erhöht werden. Für eine weitere Optimierung der Sensoreigenschaften werden zunächst nähere Untersuchungen zum Mischungsverhältnis der beiden Farbstoffe sowie zu deren Wechselwirkungen erforderlich sein. Darüber hinaus bleibt zu prüfen, ob andere Porphyrinkomplexe mit ähnlichem Erfolg für ratiometrische Messungen miteinander kombiniert werden können.

Bei der Temperaturbestimmung stellte sich das Sättigungsverhalten der Optode zu Beginn der Messung als nachteilig heraus. Damit die optische Temperaturmessung mit diesem Sensor gegenüber etablierten Messmethoden konkurrenzfähig wird, ist die Auswahl eines anderen sauerstoffundurchlässigen Polymers sinnvoll, in welchem der Indikator diesen unerwünschten Effekt nicht zeigt.

8. Literatur

- Agayn VI and Walt DR, Fiber-optic sensor for continuous monitoring of fermentation pH, *Bio/Technology* 11, 726-729 (1993)
- Amao Y, Probes and polymers for optical sensing of oxygen, *Microchimica Acta* 43, 1-12 (2003)
- Amao Y, Asai K, Miyashita T, and Okura I, Novel optical sensing material: platinum porphyrin-styrene-pentafluorostyrene copolymer film, *Analytical Communication* 36, 367-369 (1999)
- Amao Y, Asai K, Okura I, Shinohara H, and Nishide H, Platinum porphyrin embedded in poly(1-trimethylsilyl-1-propyne) film as an optical sensor for trace analysis of oxygen, *Analyst* 125, 1911-1914 (2000)
- Atkins PW, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim (2001)
- Barreiro CG, Evaluation of fluorescence spectra for the measurement of pH and temperature, *Praktikumsarbeit*, Universität Hannover (2005)
- Becker RS, *Theory and interpretation of fluorescence and phosphorescence*, Wiley, New York (1969)
- Bergman I, Rapid-response atmospheric oxygen monitor based on fluorescence quenching, *Nature* 218(5139), 396 (1968)
- Förster T, *Fluoreszenz organischer Verbindungen*, Vandenhoeck und Ruprecht, Göttingen (1982)
- Grattan KTV and Zhang ZY, Fiber optic fluorescence thermometry, in: *Topics in fluorescence spectroscopy, vol.4: Probe design and chemical sensing*, Plenum Press, New York (1994)
- Im SH, Khalil GE, Callis J, Ahn BH, Gouterman M, and Xia Y, Synthesis of polystyrene beads loaded with dual luminophors for self-referenced oxygen sensing, *Talanta* 67, 492-497 (2005)
- Invitrogen Corporation, *The Handbook — A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, <http://probes.invitrogen.com/handbook/> (2005)
- Jorge PAS, Caldas P, Esteves da Silva JCG, Rosa CC, Oliva AG, Santos JL, and Farahi F, Luminescence-based optical fiber chemical sensors, *Fiber and Integrated Optics* 24, 201-225 (2005)
- Kalyanasundaram K, *Photochemistry of polypyridine and porphyrin complexes*, Academic Press, London (1992)
- Klimant I, Kühl M, Glud RN, and Holst G, Optical measurement of oxygen and temperature in microscale: strategies and biological applications, *Sensors and Actuators B* 38-39, 29-37 (1997)

- Kohls O, Optische Sauerstoffsensoren, Dissertation, Universität Hannover (1995)
- Köneke R, Comte A, Jürgens H, Kohls O, Lam HT und Scheper T, Faseroptische Sauerstoffsensoren für Biotechnologie, Umwelt- und Lebensmitteltechnik, *Chemie Ingenieur Technik* 70, 1611 – 1617 (1998)
- Kostov Y and Rao G, Ratio measurements in oxygen determinations: wavelength ratiometry, lifetime discrimination, and polarization detection, *Sensors and Actuators B* 90, 139-142 (2003)
- Kostov Y, Harms P, Pilato RS, and Rao G, Ratiometric oxygen sensing: detection of dual-emission ratio through a single emission filter, *The Analyst* 125, 1175-1178 (2000)
- Kostov Y, van Houten KA, Harms P, Pilato RS, and Rao G, Unique oxygen analyser combining a dual emission probe and a low-cost solid-state ratiometric fluorometer, *Applied Spectroscopy* 54(6), 864-868 (2000)
- Lai SW, Hou YJ, Che CM, Pang HL, Wong KY, Chang CK, and Zhu NY, Electronic spectroscopy, photophysical properties, and emission quenching studies of an oxidatively robust perfluorinated platinum porphyrin, *Inorganic Chemistry* 43(12), 3724-3732 (2004)
- Lam HT, Entwicklung und Einsatz von faseroptischem Chemo- und Biosensor in der Biotechnologie, Dissertation, Universität Hannover (2002)
- Lu J and Rosenzweig Z, Nanoscale fluorescent sensors for intracellular analysis, *Journal of Analytical Chemistry* 366, 569-575 (2000)
- Lupton JM, A molecular thermometer based on long-lived emission from platinum octaethyl porphyrin, *Applied Physics Letters* 81(13), 2478-2480 (2002)
- Papkovsky DB, New oxygen sensors and their application to biosensing, *Sensors and Actuators B* 29, 213-228 (1995)
- Parker JW, Laksin O, Yu C, Lau ML, Klima S, Fisher R, Scott I, and Atwater BW, Fiberoptic sensors for pH and carbon-dioxide using a self-referencing dye, *Analytical Chemistry* 65(17), 2329-2334 (1993)
- Rendell D, Fluorescence and phosphorescence – analytical chemistry by open learning, Wiley, New York (1987)
- Römpf Chemie-Lexikon, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1995)
- Scheper T, Müller C, Anders KD, Eberhardt F, Plötz F, Schelp C, Thordsen O, and Schügerl K, Optical sensors for biotechnological applications, *Biosensors and Bioelectronics* 9, 73-83 (1994)

- Schulman SG, Fluorescence and phosphorescence spectroscopy: physico-chemical principles and practice, Pergamon Press, Frankfurt (1977)
- Szmacinski H and Lakowicz JR, Lifetime-based sensing, in: Topics in fluorescence spectroscopy, vol.4: Probe design and chemical sensing, Plenum Press, New York (1994)
- Tan W, Shi ZY, and Kopelman R, Development of submicron chemical fiber optic sensors, *Analytical Chemistry* 64, 2985-2990 (1992)
- Werkstoff-Datenblätter, Technische Kunststoffe und deren Eigenschaften, www.kern-gmbh.de, 08.03.2006
- Wolfbeis OS, Fiber-optic chemical sensors and biosensors, *Analytical Chemistry* 72(12), 81R-89R (2000)
- Wolfbeis OS, Materials for fluorescence-based optical chemical sensors, *Journal of Materials Chemistry* 15, 2657-2669 (2005)
- Zhujun Z, Zhang Y, Wangbai M, Russell R, Shakhsher ZM, Grant CL, and Seitz WR, Poly(vinyl alcohol) as a substrate for indicator immobilization for fiber-optic chemical sensors, *Analytical Chemistry* 61, 202-205 (1989)

9. Anhang

9.1 Versuchsbeschreibungen

9.1.1 Anbindung von Fluoresceinamin an Polyvinylalkohol

ZHUJUN et al. (1989) beschreiben eine Methode zur kovalenten Bindung von Fluoresceinamin an Polyvinylalkohol, mit der hier jedoch nur unbefriedigende Ergebnisse erzielt werden konnten. Durch den Verzicht auf Wasser als Lösungsmittel konnte die Anbindung des Fluoresceinamins an das Polymer jedoch wesentlich verbessert werden. Dabei wurde nach der folgenden Vorschrift verfahren:

44 mg Cyanurchlorid werden in 3 ml Aceton gelöst und mit 264 mg Polyvinylalkohol (molare Masse = 72000 g/mol) versetzt. Die Suspension wird 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Polymer abzentrifugiert und dreimal mit je 3 ml Aceton gewaschen, um nicht gebundenes Cyanurchlorid zu entfernen. Nach Zugabe von 21 mg Fluoresceinamin in 2 ml Dimethylformamid wird 45 min bei 50 °C gerührt. Das Produkt wird abzentrifugiert und zweimal mit Aceton, einmal mit Dimethylformamid und schließlich noch einmal mit Aceton gewaschen. Zur weiteren Verwendung wird der Indikator in 5 ml Wasser gelöst (gegebenenfalls erwärmen), um eine 5 %ige Lösung zu erhalten.

9.1.2 Fluoreszenzmessungen mit Fluoresceinamin/Polyvinylalkohol

Zur Herstellung einer 0,1 %igen Lösung des Indikators bei definiertem pH-Wert wurden 20 mg einer 5 %igen Lösung von Fluoresceinamin/Polyvinylalkohol mit 1 ml eines 0,2 molaren Zitronensäure/Phosphatpuffers vermischt. Um eine 1 %ige Lösung zu erhalten, wurden 250 mg der Indikatorlösung je Milliliter Puffer eingesetzt. Auf diese Weise wurden Lösungen beider Konzentrationen bei folgenden pH-Werten hergestellt:

pH 2,2 – pH 3,0 – pH 4,0 – pH 5,0 – pH 6,0 – pH 7,0 – pH 7,8.

Die Fluoreszenzspektren dieser Lösungen wurden jeweils bei fünf verschiedenen Temperaturen gemessen (zum Messaufbau vergleiche Kapitel 3):

0 °C – 10 °C – 20 °C – 30 °C – 40 °C.

Vor jeder Messung wurde die Temperaturkonstanz mit der *timescan*-Funktion des Gerätes überprüft.

9.1.3 Herstellung des Porphyrin-Indikators

Der Indikator für die optische Sauerstoffmessung wurde nach folgender Vorschrift hergestellt [KOHLS, 1995]:

160 mg Platin(II)-chlorid werden mit 160 mg Octaethylporphyrin in 380 ml Propionsäure bei 165 °C unter Rückfluss erhitzt. Nach 45 min wird aus der dunkelroten Lösung die Propionsäure bei 190 °C abdestilliert. Der Rückstand wird in Chloroform aufgenommen und mehrmals mit destilliertem Wasser ausgeschüttelt. Zur Trocknung der organischen Phase wird Natriumsulfat verwendet. Die weitere Aufarbeitung erfolgt säulenchromatographisch mit Aluminiumoxid. Als Eluat wird Chloroform verwendet.

Das Platin-Octaethylporphyrin enthielt Beimengungen von Zink-Octaethylporphyrin bisher ungeklärter Herkunft, wobei das Platin:Zink-Verhältnis mittels Röntgenfluoreszenzanalyse auf etwa 10:1 geschätzt wurde. Das Röntgenfluoreszenzspektrum zum Nachweis des Zinks ist in Abbildung 9-1 dargestellt.

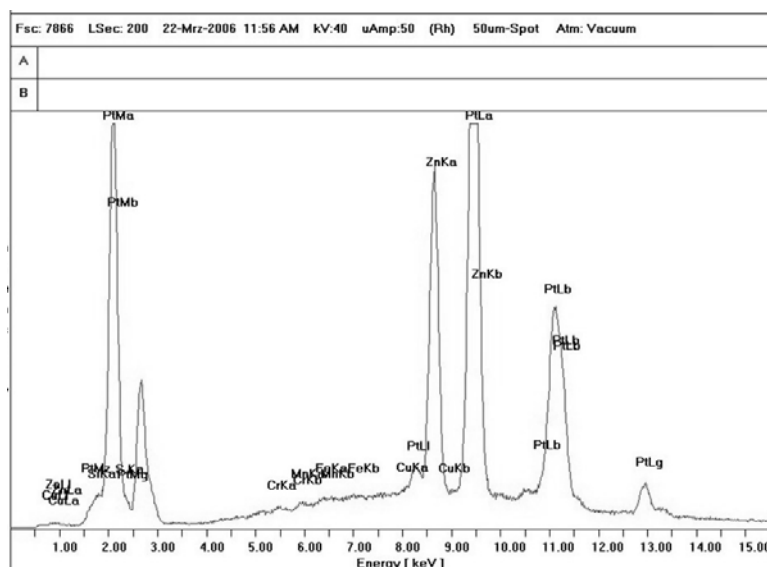


Abbildung 9-1: Röntgenfluoreszenzspektrum des Porphyrin-Indikators mit Zuordnung der Signale.

Einen Ausschnitt aus dem Massenspektrum des Farbstoffes zeigt Abbildung 9-2. Die beiden starken Signale bei 596 und 598 u sind den beiden häufigsten Isotopen des Zinks im Molekülpeak von Zink-Octaethylporphyrin zuzuordnen.

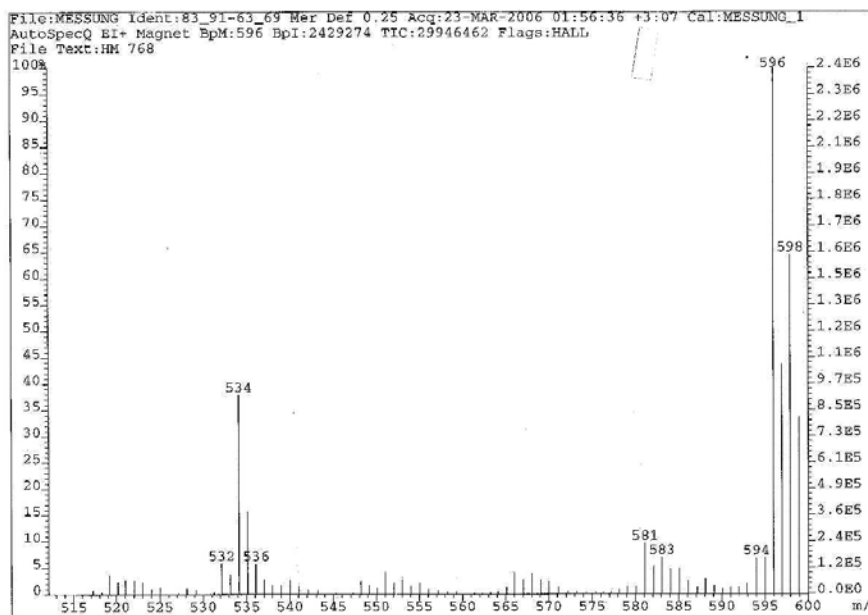


Abbildung 9-2: Ausschnitt aus dem Massenspektrum des Sauerstoffindikators zum Nachweis des Zink-Octaethylporphyrins.

9.1.4 Immobilisierung des Porphyrin-Indikators in Epoxidharz

1 mg des Indikators wird in möglichst wenig Chloroform gelöst und mit 100 mg des Epoxidharzes (71 mg Epoxidharz L und 29 mg Härter L) vermengt. Um die Bildung poröser Strukturen zu vermeiden, wird die Mischung zur Entfernung des Lösungsmittels auf einem Objektträger verteilt und etwa 15 min im Abzug stehen gelassen. Anschließend kann die benötigte Menge an Epoxidharz auf einen Glaträger oder die Stirnfläche eines Lichtleiters aufgebracht werden. Zur Aushärtung wird der Sensor über Nacht bei 50 °C gelagert.

9.1.5 Herstellung der sauerstoffsensitiven Membran

10 mg Polysulfon und 0,1 mg des Porphyrin-Indikators werden zusammen in 0,2 ml Chloroform gelöst und anschließend mit 0,04 ml Ethanol versetzt. 5 µl dieser Lösung werden auf ein kreisförmiges Stück Polypropylen/Polyethylen-Vlies von 5 mm Durchmesser gegeben. Nach dem Verdampfen der Lösungsmittel ist die Membran einsatzbereit.

9.2 Abbildungen zur Entwicklung des Sensorsystems

9.2.1 Foto des Sensorsystems

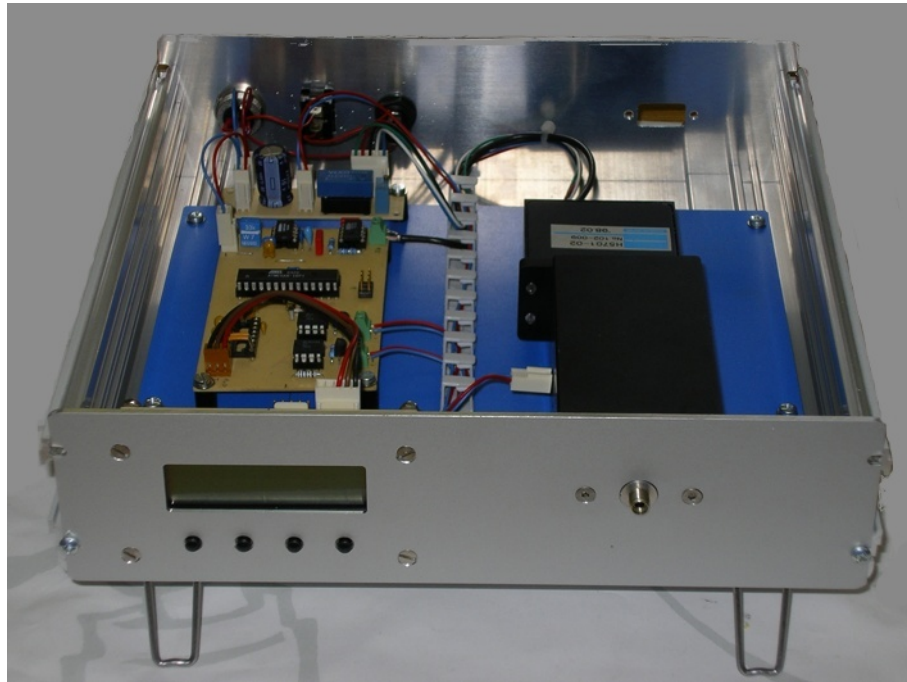


Abbildung 9-3: Foto des Sensorsystems zur faseroptischen Temperatur- und Sauerstoffmessung. Um die optischen und elektronischen Komponenten sichtbar zu machen, wurde der Deckel des Gehäuses entfernt.

9.2.2 Foto der optischen Komponenten

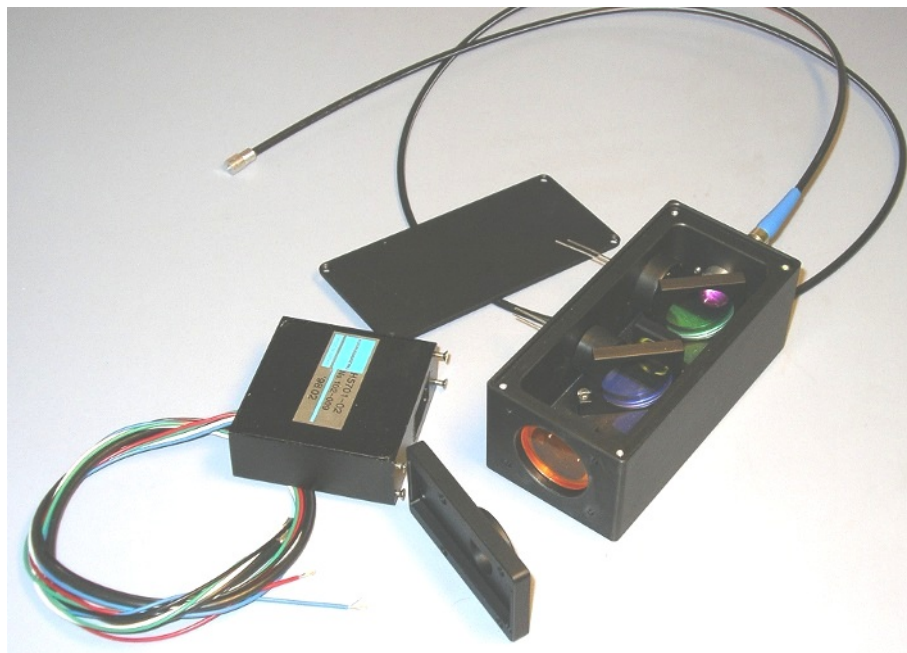


Abbildung 9-4: Foto der optischen Komponenten des Sauerstoff- und Temperatursensor-Systems.

9.2.3 Schematische Darstellung der elektronischen Schaltung

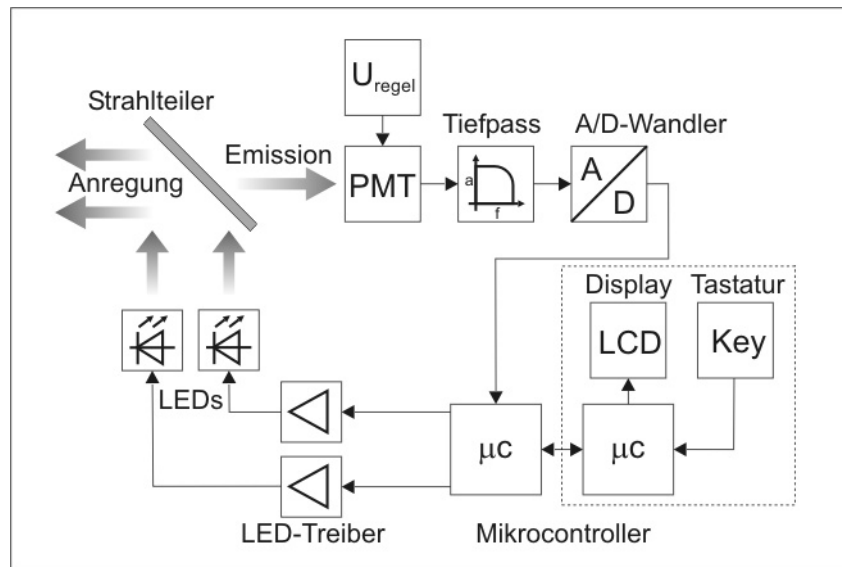


Abbildung 9-5: Schematische Darstellung der elektronischen Schaltung des Sauerstoff- und Temperatursensors.

9.3 Verwendete Chemikalien

Chloroform	Fluka 25690
Cyanurchlorid	Fluka 28620
Dimethylformamid	Merck 822275
Epoxidharz L	R&G
Fluoresceinamin	Fluka 07980
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka 71645
Octaethylporphyrin	Aldrich 25,240-9
Platin(II)-chlorid	Aldrich 206091
Polypropylen/Polyethylen-Vlies	Freudenberg
Polysulfon	Aldrich 42,830-2
Polyvinylalkohol	Merck 821038
Propionsäure	Aldrich P1386
Rhodamin B	Merck 7599
Zitronensäure	Fluka 27487

9.4 Verwendete Geräte

Floureszenzspektrophotometer	Hitachi, F-4500
Gasmischeinheit	Mättig, F-201C-FA-33-V und E-5752-AAA
Kolbenhubpipetten	Eppendorf
Magnetrührer	Jahnke & Kunkel, Ikamag® RET
pH-Meter	Mettler, Toledo MP 220
Photomultiplier	Hamamatsu, H5701-02
Temperiereinheit	Haake, K15 / Jürgens, DC1
Thermomixer	Eppendorf, 5437
Waage	Sartorius, Analytic AC 210S
Zentrifuge	Eppendorf, 5415D
Zweistrahphotometer	Kontron Instruments, Unikon Spektrometer 922

9.5 Abkürzungen

c	Konzentration
FLA	Fluoresceinamin
FLA/PVA	an Polyvinylalkohol gebundenes Fluoresceinamin
I	Intensität
I_0	Intensität in Abwesenheit des Quenchers
I_{410}	Lumineszenzsignal bei Anregung um 410 nm
I_{500}	Lumineszenzsignal bei Anregung um 500 nm
K_{SV}	Stern-Volmer-Konstante
LED	Leuchtdiode
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{ex}	Anregungswellenlänge
λ_{max}	Wellenlänge des Emissionsmaximums
$[O_2]$	Sauerstoffkonzentration
PLS	Partial-Least-Squares-Methode
PMT	Photomultiplier
PSU	Polysulfon
PVA	Polyvinylalkohol
$[Q]$	Konzentration des Quenchers
S	Signalquotient
S'	umgekehrter Signalquotient ($S'=1/S$)
T	Temperatur
τ	Lebensdauer
τ_0	Lebensdauer in Abwesenheit des Quenchers
t_{90}	Ansprechzeit, bis das Signal 90 % des Endwertes erreicht
u	atomare Masseneinheit

9.6 Tabellarischer Lebenslauf

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Michael Fritzsche
 Adresse: Leipziger Str. 35
 D-31303 Burgdorf
 Geburtstag: 03.11.1975
 Geburtsort: Hannover
 Familienstand: ledig



SCHULE UND AUSBILDUNG

1982 – 1986:
 Grundschule
 1986 – 1988:
 Orientierungsstufe
 1988 – 1995:
 Gymnasium (Gymnasium Burgdorf)
Abschluss: Abitur (Note: 1,0)
 September 1995 – September 1996:
 Zivildienst im Niedersächsischen Landesamt für Ökologie
 Oktober 1996 – August 2001:
 Chemiestudium an der Universität Hannover
Abschluss: Diplom (Note: 1,0 mit Auszeichnung)
 Thema der Diplomarbeit: *Denitrifikation von Molke*
 April 2000 – Juni 2000
 Schwerpunktpraktikum an der Universität Lund, Schweden,
 Prof. Bo Mattiasson
 Oktober 2001:
 Beginn der Promotion am Institut für Technische Chemie der
 Universität Hannover bei Prof. Dr. Thomas Scheper

BERUFSERFAHRUNG

Oktober 2001 – März 2002:
 wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Technische Chemie der
 Universität Hannover
 April 2004 – Juni 2005:
 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie
 der Universität Hannover

AUSZEICHNUNGEN UND STIPENDIEN

- *Karl-Schügerl-Preis 2003* für die Diplomarbeit
- Auszeichnungen der Leistungen im Diplom und Vordiplom durch die Universität Hannover
- Stipendium der *Stiftung Stipendien-Fonds des Verbandes der Chemischen Industrie (FCI)*, April 2002 – März 2004
- Stipendium der *Studienstiftung des deutschen Volkes* März 1999 – August 2001