

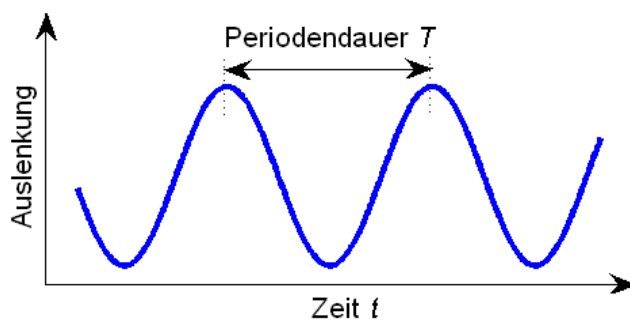
## Versuch 10: Spektralphotometrie

### 10.1 Grundlagen

#### 10.1.1 Eigenschaften von Wellen

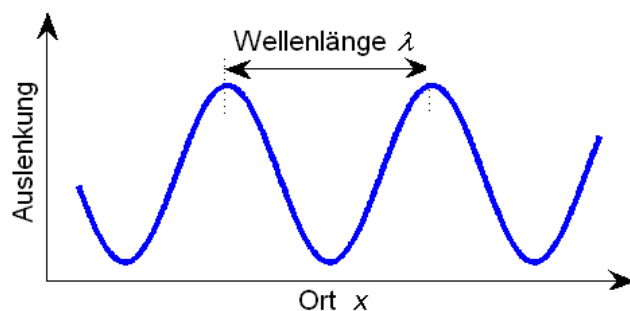
Wellen sind Phänomene in Raum und Zeit, die in der Regel harmonisch verlaufen, d.h., dass sie periodische Eigenschaften in Raum und Zeit besitzen. Im einfachsten Fall wird dies durch eine Sinusfunktion beschrieben, eine Überlagerung mehrerer Sinusfunktionen kann Wellen mit sehr viel komplizierterer Struktur ergeben.

Untersucht man an einem festen Ort den Vorbeigang einer sinusförmigen Welle und zeichnet die Auslenkung über die Zeit auf, so erhält man folgendes Bild:



Die Periodendauer  $T$  kennzeichnet den zeitlichen Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Maxima, ihre Einheit ist die Sekunde (s). Statt der Maxima könnte man auch die Minima oder zwei andere aufeinanderfolgende gleiche Werte der Auslenkung wählen. Das zeitliche Verhalten einer Welle wird oft auch durch die Frequenz  $f$  beschrieben, und es gilt  $f = 1/T$ . Die Frequenz wird in der Einheit Hertz (Hz) angegeben und es ist  $1 \text{ Hz} = 1/s$ .

Untersucht man die räumliche Struktur der Welle zu einem festen Zeitpunkt („Schnappschuss“), erhält man das folgende Bild:



Die Wellenlänge  $\lambda$  kennzeichnet den räumlichen Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Maxima, ihre Einheit ist das Meter (m).

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Wellen wird mit dem Symbol  $c$  bezeichnet. Für sie gilt:

$$c = f\lambda = \frac{\lambda}{T}$$

Diese Gleichung gilt für alle Wellen, z.B. Wasser- und Schallwellen, und für elektromagnetische Wellen.

### 10.1.2 Licht als Welle und Teilchen

Wenn Sie mit Licht experimentieren, ist die Deutung der Ergebnisse manchmal besonders einfach, wenn man dem Licht wellenartige Eigenschaften zuspricht. Hierzu gehören zum Beispiel die Experimente zur Beugung und Interferenz an Kanten, kleinen Öffnungen, Hindernissen und Spalten. Viele aneinandergereihte Spalte bilden ein optisches Gitter, bei dem die Beugungseffekte besonders von der Lichtwellenlänge abhängen. Ein Gitter wird in diesem Versuch zur Zerlegung des Lichts in sein Spektrum genutzt.

Bei anderen Experimenten scheint das Wellenmodell jedoch zu versagen. Beispielsweise wird die Absorption und Emission von Licht durch Atome und Moleküle erst mit dem Modell des Lichts als Teilchen, den Photonen, verständlich: die Elektronen der Elektronenhülle ändern ihre diskreten Energiewerte durch Auf- oder Abgabe diskreter Energien, d.h. durch Absorption oder Emission von Photonen. Dies erklärt alle lichtinduzierten chemischen Vorgänge, vom Sehvermögen des Auges bis zur Hautrötung durch Sonnenbrand.

Tatsächlich ist es nicht so, dass Licht *entweder* Wellen- *oder* Teilcheneigenschaften besitzt. Vielmehr liegt beides *gleichzeitig* vor, und je nach experimenteller „Präparation“ ist die eine oder die andere Eigenschaft offensichtlicher. Diese sogenannte Komplementarität von Welle und Teilchen ist für Objekte mit sehr kleinen Dimensionen charakteristisch. Sie trifft auch auf Elektronen, Atome und Moleküle zu und ist das Thema der Quantentheorie.

#### Aufgaben

Informieren Sie sich bitte über die Wellen- und Teilchennatur des Lichts in der empfohlenen Literatur<sup>1</sup>. Beantworten Sie die nachfolgenden Fragen im Protokoll:

1. Das Spektrum der elektromagnetischen Wellen wird in verschiedene Bereiche unterteilt, wie etwa Radiowellen, Infrarot, sichtbares Licht, Ultraviolett. Welche Größenordnung hat die Wellenlänge typisch in diesen Bereichen? Wie ist die Farbabfolge im sichtbaren Bereich, welche Wellenlängen gehören zu welchen Farben?
2. Wie lautet der Zusammenhang zwischen Wellenlänge, Frequenz und Geschwindigkeit elektromagnetischer Wellen?
3. Welcher Zusammenhang besteht zwischen der Wellenlänge bzw. Frequenz elektromagnetischer Wellen und der Energie sowie dem Impuls von Photonen?
4. In der Medizin führt man dem Gewebe mit Infrarotstrahlern Wärme zu mit dem Ziel einer besseren Durchblutung. Würde Strahlung im sichtbaren Bereich mit gleicher Leistung die gleiche Wärme übertragen? Weshalb wird in diesem Fall Infrarot bevorzugt?
5. Erkennt das Auge die Lichtfarbe an der Wellenlänge des Lichts? Oder sieht es stattdessen Photonen mit unterschiedlicher Energie? Wie kommt tatsächlich das Farbsehen zustande? Erzeugt ein Fotoapparat Farben so wie ein Auge? Was unterscheidet eine physiologisch wahrgenommene Farbe von einem physikalischen Spektrum?

<sup>1</sup> Siehe zum Beispiel auch das Kapitel *Licht und Strahlung* in [http://lms.seos-project.eu/learning\\_modules#7](http://lms.seos-project.eu/learning_modules#7)

### 10.1.3 Spektrometer

Spektrometer dienen der Analyse der Intensität von Licht und Strahlung in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Für die Farbzerlegung kann die Brechung an einem Prisma genutzt werden: mit zunehmender Wellenlänge wird die Brechzahl des Lichts und somit auch der Brechwinkel kleiner.

Gitter werden in Spektrometern wegen der wirkungsvolleren Farbzerlegung bevorzugt verwendet. Beim Gitter beruht die Farbzerlegung auf der konstruktiven Interferenz der an den Gitterlinien gebeugten Lichtwellen. Für verschiedene Wellenlängen ist diese Interferenz richtungsabhängig, wobei verglichen mit dem Prisma die Farbabfolge auf dem Schirm umgekehrt verläuft.

### 10.1.4 Das Photometer

Das im Versuch genutzte Photometer besteht aus

- einer Lichtquelle
- einer Küvette, die vom Licht der Lichtquelle durchstrahlt wird
- einem Spektrometer für die Zerlegung des aus der Küvette austretenden Lichts in seine spektralen Anteile
- einem Fotoempfänger für die Messung der Lichtintensität der interessierenden spektralen Anteile.<sup>2</sup>

Im Versuch wird eine Glühlampe verwendet, deren Licht mit einer Linse gebündelt wird und eine 1 cm lange Küvette durchläuft. Das austretende Licht wird mit einer weiteren Linse in einen Lichtleiter abgebildet und einem Spektrometer zugeführt. Das am Gitter spektral zerlegte Licht (das auf dem Gehäuse eingezeichnete Prisma hat nur symbolische Bedeutung) wird mit einem CCD-Array aus 2048 Elementen bei 2048 Wellenlängen gemessen und an einen PC übergeben.

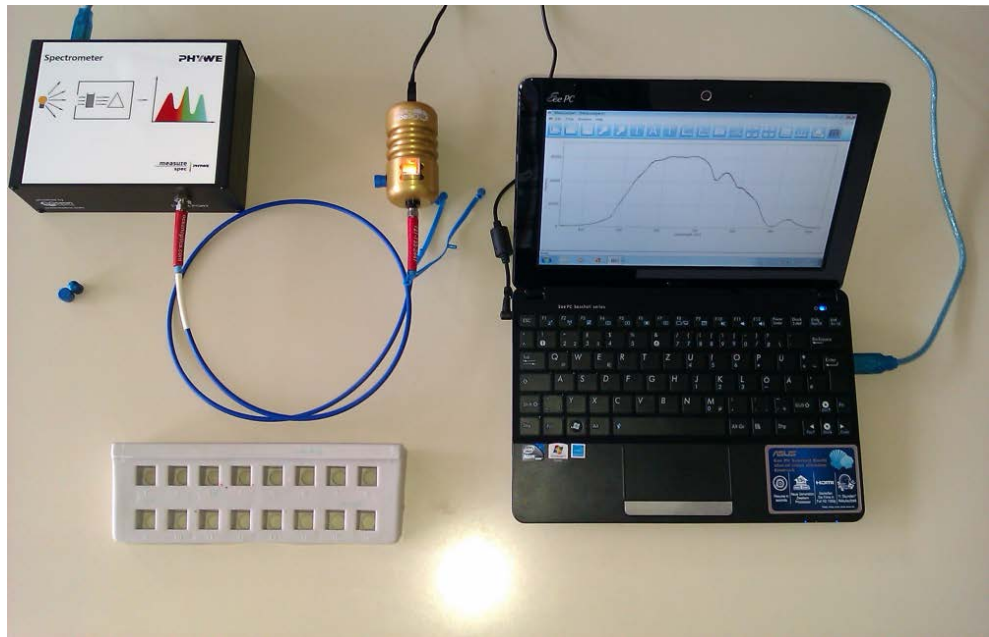
Weiterhin sind Küvetten, diverse Laborgläser, gereinigtes Wasser und Lösungsmittel, Pasteur- und Mikropipetten verfügbar. Bitte nutzen Sie ausschließlich saubere Komponenten und vermeiden Sie Fingerabdrücke auf den vom Licht durchstrahlten Küvettenoberflächen, da Verschmutzungen die Qualität der Messergebnisse erheblich beeinträchtigen.

**!** Der **Lichtleiter** zwischen dem Lampen- und Küvettenhalter und dem Spektrometer **darf keinesfalls stark gekrümmt werden**, da andernfalls seine Glasfasern brechen. Der kleinste zulässige Biegeradius beträgt 15 cm.

---

<sup>2</sup> Bei den meisten im chemischen Labor verwendeten Photometern wird das Licht der Lampe mit dem Spektrometer spektral zerlegt, bevor es die Küvette durchläuft, und unmittelbar hinter der Küvette die Intensität gemessen. Dies ändert jedoch nichts am Messprinzip.

## Versuch 10: Spektralphotometrie



*Der Messaufbau, bestehend aus dem Lampengehäuse mit Küvettenfach und Lichtleiteranschluss (oben Mitte), dem Spektrometer (oben links), einem PC für die Steuerung des Messablaufs und die Datenverarbeitung, und einem Küvettenständer. Der blaue Lichtleiter darf keinesfalls stark gekrümmt werden, da andernfalls seine Glasfasern brechen.*

### 10.1.5 Grundlagen der Photometrie

Elektromagnetische Wellen werden in Lösungsmitteln und durch gelöste Substanzen mehr oder weniger stark absorbiert. Schwebeteilchen streuen die Strahlung, können aber ebenfalls absorbieren. Diese Effekte sind von der Wellenlänge abhängig. Viele Lösungsmittel wie etwa Wasser und Äthanol, die im Versuch genutzt werden, sind im sichtbaren Bereich absorptionsarm (und daher für das Auge durchsichtig), im nahen Ultraviolett und Infrarot jedoch absorbierend.

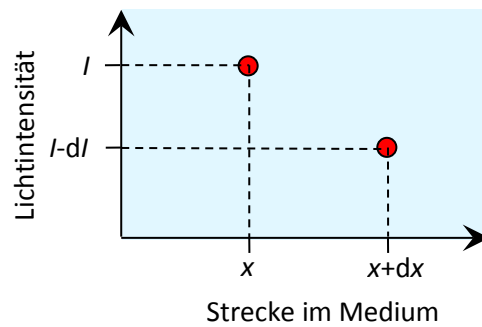
Rote Blutkörperchen absorbieren das sichtbare Licht mit Ausnahme des roten Anteils. Das in Grünpflanzen enthaltene Chlorophyll *a* absorbiert blaues und rotes Licht, nicht jedoch den grünen Anteil im Spektrum. Selektive Absorption bestimmter Wellenlängenbereiche erklärt die Farben dieser Stoffe.

Betrachtet man in einem bestrahlten Medium eine infinitesimal dünne Schicht  $dx$ , so nimmt längs dieser Strecke die Intensität  $I$  des Lichts um einen kleinen Wert  $dI$  ab. Die Abnahme  $dI$  ist proportional zu  $I$  und  $dx$ ,

$$-dI \sim I dx \quad (1)$$

und weiterhin von der Lichtschwächung im Medium infolge Absorption und Streuung abhängig. Kennzeichnet man diese stoffabhängige Eigenschaft mit dem **Attenuationskoeffizient  $k$** , wird aus der Proportionalität eine Gleichung:

$$dI = -k I dx \quad (2)$$



Bestrahlung eines Mediums von links nach rechts, und Intensitäten an zwei Positionen in einem infinitesimalen Abstand  $dx$

Der Attenuationskoeffizient hat die Dimension einer inversen Strecke und wird in der Einheit  $1/m$  angegeben. Er ist immer eine Funktion der Wellenlänge.

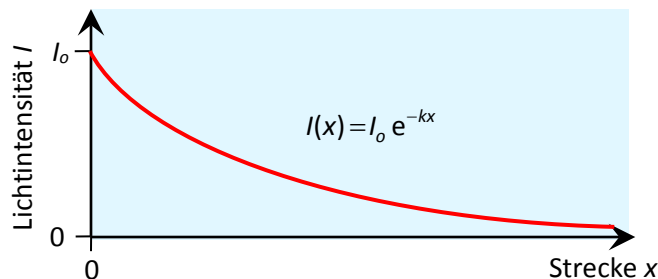
Geringfügig umgestellt wird aus Gl. (2)

$$\frac{dI}{dx} = -kI, \quad (3)$$

in Worten: die Ableitung von  $I$  nach  $x$  ergibt wiederum  $I$  mit einem Faktor  $-k$ . Eine Funktion, welche durch Ableiten sich wieder ergibt, ist die Exponentialfunktion. Das Integral dieser Gleichung ist daher eine Exponentialfunktion, die den Intensitätsverlauf auch über größere Strecken  $x$  beschreibt: das **Lambertsche Extinktionsgesetz**

$$I(x) = I_0 e^{-kx}, \quad (4)$$

in dem  $I_0$  die Intensität an der Stelle  $x=0$  ist.



Bestrahlung eines Mediums von links nach rechts, und Intensität über der Strecke  $x$  entsprechend Gl. (4)

### Aufgabe

Prüfen Sie die Gültigkeit der Gl. (4): Ableiten nach  $x$  sollte Gl. (2) ergeben.

Die **Durchsichtigkeit  $D$**  eines Mediums über eine Strecke  $x$  ist das Verhältnis

## Versuch 10: Spektralphotometrie

$$D = \frac{I(x)}{I_0} = e^{-kx} \quad (5)$$

Offenbar ist  $0 \leq D \leq 1$  oder  $0\% \leq D \leq 100\%$ .  $D$  wird auch oft (zum Beispiel in der Software des hier genutzten Spektrometers) als **Transmission  $T$**  bezeichnet.

In der Chemie wird das Lambertsche Extinktionsgesetz oft mit einer Exponentialfunktion zur Basis 10 statt zur Basis  $e$  geschrieben:

$$I(x) = I_0 10^{-\alpha x}, \quad (6)$$

mit dem **Extinktionskoeffizienten  $\alpha$** . Der Zusammenhang mit dem Attenuationskoeffizienten ist  $k = \alpha \ln 10 = 2,303\alpha$ .<sup>3</sup>

Weiterhin gebräuchlich ist die **Extinktion  $E$** :

$$E = \log \frac{I_0}{I(x)} \quad (7)$$

In der englischsprachigen Literatur (und in unserer Software) wird  $E$  als **Absorbance  $A$**  oder **optical density** bezeichnet. Wegen

$$\log \frac{I_0}{I(x)} = -\log \frac{I(x)}{I_0}$$

folgt nach Logarithmieren der Gl. (6):  $E = \alpha x$  (8)

$E$  (bzw.  $A$ ) ist eine Größe ohne Einheit. Die Angabe von Daten erfordert immer eine gleichzeitige Angabe der Strecke  $x$ , über die die Extinktion gemessen worden ist, da ein Zahlenwert für  $E$  oder  $A$  hierzu keine Auskunft gibt.

Wird die Strahlung durch eine reine Substanz geschwächt, deren **spezifischer Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$**  bekannt ist, dann lässt sich mit der Beziehung

$$\alpha = \varepsilon c \quad (9)$$

die **Substanzkonzentration  $c$**  bestimmen. Meist wird  $c$  in Mol/L angegeben. Da der Extinktionskoeffizient  $\alpha$  die Einheit 1/m hat, folgt für  $\varepsilon$  die Einheit L/(Mol·m). Gl. (8) schreibt sich dann:

$$E = \varepsilon c x \quad (10)$$

### 10.1.6 Zweistrahl-Photometrie

Möchte man nun eine der Gleichungen (4)-(10) anwenden, um mit dem Photometer aus Daten der Intensität  $I(x)$  (hinter der Küvette) den Attenuationskoeffizienten  $k$  (oder die Größen  $\alpha$  oder  $c$ ) zu berechnen, stößt man schnell auf ein Problem: das Lambertsche Extinktionsgesetz enthält eine weitere unbekannte Größe: die Intensität  $I_0$ , also die Intensität unmittelbar hinter dem Eintrittsfenster der Küvette.

Man könnte versuchen,  $I_0$  mit einer zweiten Messung zu bestimmen, bei der man die Küvette leer lässt oder ganz weglässt. Dies führt jedoch zu systematischen

---

<sup>3</sup> Dies folgt aus den Transformationsregeln für Logarithmen mit unterschiedlicher Basis → Mathematik-Formelsammlung. Solche fachspezifischen Definitionen sind sehr unpraktisch. Man sollte wissen, dass es sie gibt, um Daten aus der Literatur richtig zu verstehen.

Leider werden auch die Bezeichnungen ‚Attenuationskoeffizient‘ und ‚Extinktionskoeffizient‘ und die dafür genutzten Symbole nicht einheitlich verwendet. ... sehr verwirrend!

Messfehlern, denn das Ergebnis entspräche nur sehr näherungsweise der Intensität  $I_0$ , mit der die Probe beleuchtet wird.

### Aufgabe

Überlegen Sie sich bitte, wie dieser systematische Fehler zustande kommt, und weshalb er mit dem beschriebenen Vorgehen nicht vermieden werden kann.

Der Ausweg besteht aus zwei Messungen mit zwei Küvetten, die jeweils das reine Lösungsmittel und die zu untersuchende Probe enthalten. In Laborphotometern werden zu diesem Zweck zwei Teilstrahlen für eine Referenzküvette und eine Probenküvette erzeugt („Zweistrah-Photometer“).

Die hier genutzten Photometer weisen nur einen Strahl auf. Wenn man eine Messung zunächst mit der Referenzküvette und anschließend mit der Probenküvette durchführt und zwischenzeitlich die Einstellungen am Photometer nicht ändert, ist das Ergebnis jedoch vergleichbar. Mit Gl. (4) erhält man:

$$I_{ref}(x) = I_0 e^{-k_{ref}x} \quad I_{probe}(x) = I_0 e^{-k_{probe}x} \quad (11)$$

Durch Division kürzt sich die Intensität  $I_0$  heraus, die Intensität des Lampenspektrums und andere Effekte, welche den Wert von  $I_0$  beeinflussen, sind also ohne Bedeutung.

Nach Logarithmieren und Umformen erhält man:

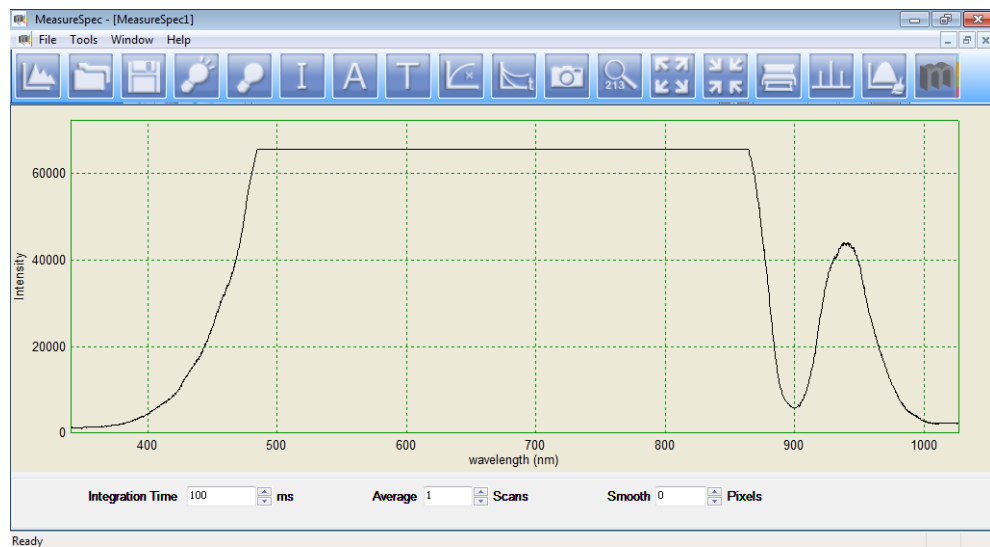
$$k_{probe} - k_{ref} = \frac{1}{x} \ln \frac{I_{ref}}{I_{probe}} \quad (12)$$

Dies bedeutet: es wird nicht der Attenuationskoeffizient einer Probe bestimmt, sondern die Differenz der Attenuationskoeffizienten zwischen Probe und Referenzmedium, zum Beispiel zwischen der Lösung eines Farbstoffs in Wasser und dem Wasser selbst; - also die Lichtschwächung der gelösten Farbstoffmoleküle.

### 10.1.7 Bedienung des Photometers

Das Spektrometer wird an einer USB-Schnittstelle des PC angeschlossen und durch Aufruf des Programms *MeasureSpec* in Betrieb genommen. Setzen Sie noch keine Küvette in den Küvettenhalter ein. Ist die Lampe eingeschaltet, sehen Sie im *MeasureSpec*-Bedienfenster das folgende Bild.

## Versuch 10: Spektralphotometrie

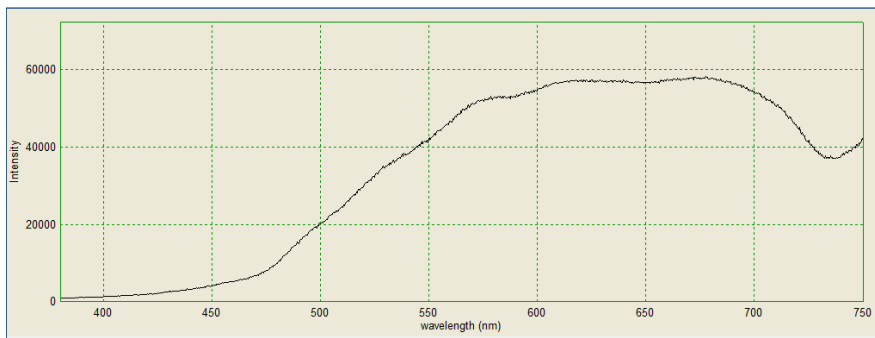


*MeasureSpec-Bedienfenster mit Menüleiste (oben), Grafik des fortlaufend neu gemessenen Spektrums (Mitte) und Statusleiste (unten).*



Machen Sie sich zunächst mit der Bedienung der Gerätefunktionen vertraut, die in der Menü- und Statusleiste aufgerufen und verändert werden können. Die wichtigsten Funktionen:

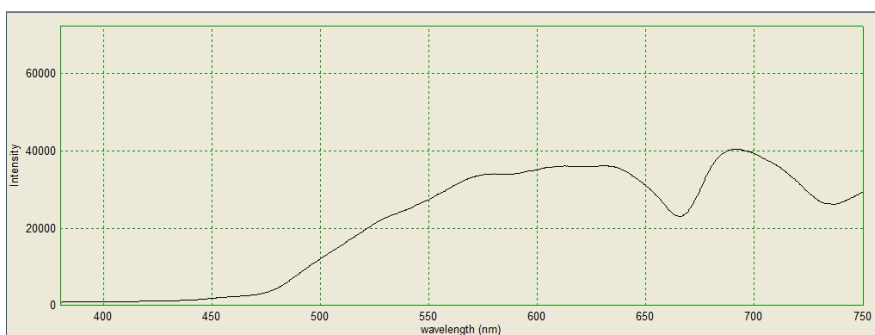
- Das oben gezeigte Spektrum ist offensichtlich übersteuert, da der Messbereich auf einen Wert um ca. 64000 begrenzt ist. Die Signalhöhe kann durch Ändern der Zeit, während der die Strahlung vom CCD-Array integriert wird, beeinflusst werden. Verringern Sie die Integrationszeit (Belichtungszeit) des CCD in der Statusleiste, bis das Spektrum nicht mehr „oben aneckt“.
- Das Spektrum erstreckt sich über alle vom Spektrometer erfassten 2048 Messpunkte bei Wellenlängen von 340 bis 1030 nm. Der dargestellte Wellenlängenbereich kann ebenso wie der Wertebereich der Intensitätsachse mit dem hier gezeigten Menüelement eingegrenzt werden.
- CCD-Arrays zeigen (wie fast alle Lichtsensoren) ein kleines Signal, auch wenn sie gar nicht beleuchtet werden. Dies wird als Dunkelspektrum bezeichnet. Dunkelspektren sollten – auch wenn sie verglichen mit lichterzeugten Spektren klein sind – von den gemessenen Spektren immer abgezogen werden. Mit dem gezeigten Menüelement wird das Dunkelspektrum gemessen und gespeichert. Die Lampe muss hierbei ausgeschaltet oder der Lichtweg im Küvettenhalter mit einer schwarzen Pappe blockiert sein!
- Schalten Sie die Lampe nun wieder ein. Sie sehen dann vermutlich ein Spektrum ähnlich dem hier gezeigten.





Dies ist allerdings nicht das „wahre“ Spektrum! Tatsächlich wächst das Spektrum einer Glühlampe monoton von kleinen nach großen Wellenlängen und zeigt etwa bei 1200 nm ein Maximum. Das gemessene Spektrum wird durch die wellenlängenabhängige Empfindlichkeit des CCD-Arrays verfälscht.

- Füllen Sie mit einer Pasteur-Pipette eine Küvette mit reinem Wasser (oder einem anderen reinen Lösungsmittel je nach Aufgabe) und stellen Sie sie in den Küvettenhalter. Das beiliegende rechtwinklige Blech muss dafür so in den Küvettenhalter gestellt sein, dass das Loch zur Stirnseite zeigt und sich vor der Bohrung für den Lichtaustritt befindet. Wegen der Reflexion der Strahlung an den Küvettenfenstern ist das Spektrum etwa 10% schwächer (und weiterhin verfälscht). Mit einem Klick auf das helle Lampensymbol wird ein Referenzspektrum gespeichert. Die spektrale Verfälschung ist nicht weiter störend, da sie bei der Messung mit der Probe in gleicher Weise auftritt. 
- Das Referenzspektrum kann im *MeasureSpec*-Format \*.spec oder im Excel-Format \*.csv für eine spätere Berechnung gespeichert werden. Dies gilt auch für alle anderen Spektren, die Sie weiter bearbeiten möchten. Wählen Sie hierfür einen sinnvollen Dateinamen und notieren Sie ihn!
- Entnehmen Sie der Küvette mit der Pasteur-Pipette die Referenzprobe. Hierfür sollte man die Küvette im Halter lassen, was eine Dejustage und somit Messfehler vermeidet. Lassen Sie aus dem gleichen Grund nach Möglichkeit den Lichtleiter so liegen wie bisher, da sich seine Transmission durch eine andere Biegung ebenfalls ändern kann. Füllen Sie eine Messprobe ein, und beobachten Sie die Änderung des Spektrums verglichen mit dem Referenzspektrum. Das Ergebnis könnte zum Beispiel wie folgt aussehen. 

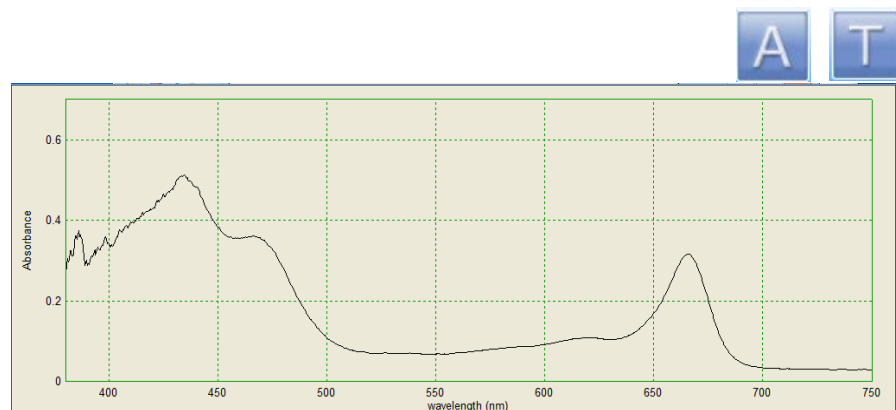


Die Intensität ist bei allen Wellenlängen geringer geworden: Es können

## Versuch 10: Spektralphotometrie

aber auch in engeren Spektralbereichen stärkere Abschwächungen vorliegen. Dies ist hier bei etwa 670 nm deutlich zu erkennen.

- Die Probe, mit der das gezeigte Spektrum gewonnen wurde, besteht aus Chlorophyll, das mittels Äthanol aus Pflanzenblättern extrahiert worden ist. Chlorophyll *a* besitzt eine blaue und eine rote Absorptionsbande, während grünes Licht nur wenig absorbiert wird. Berechnet man aus dem Referenz- und Probenspektrum nach Gl. (7) die Extinktion, erhält man das folgende Spektrum, in dem die beiden Absorptionsbanden deutlich zu erkennen sind.



- Spektren der Extinktion und Transmission können mit vorkonfigurierten Routinen automatisch registriert werden.

### Aufgabe

Machen Sie sich mit der Bedienung des Photometers vertraut. Führen Sie einige Testmessungen durch und prüfen Sie den Befund einschließlich der gespeicherten Datenfiles. Wenn alles ihren Erwartungen entspricht, können Sie sicher sein, dass die weiteren Messungen keine Probleme bereiten werden.

### 10.1.8 Fluoreszenz

Während Lichtstreuung eine Änderung der Ausbreitungsrichtung des Lichts bedeutet, wird bei Absorption die mit der elektromagnetischen Welle übertragene Energie auf den Absorber übertragen. Dies kann zu einer chemischen Reaktion oder zu Erwärmung führen. Manche Substanzen emittieren einen Teil der absorbierten Strahlung bei höheren Wellenlängen. Dieser Effekt wird als Lumineszenz bezeichnet. Geschieht die Lumineszenz erst nach etwa Millisekunden oder Sekunden, nennt man sie Phosphoreszenz. Fluoreszenz ist sehr viel schneller und tritt nach wenigen Nanosekunden auf. Die Form eines Fluoreszenzspektrums ist von der zur Absorption genutzten Wellenlänge unabhängig.

In der Biologie und Medizin wird Fluoreszenz zur Gewebeanalyse genutzt. So können Zellen mit fluoreszierenden Molekülen markiert und mit Fluoreszenzmikroskopen kontrastreich abgebildet werden. Da die Intensität und das Spektrum der Molekülfluoreszenz von der Struktur der Moleküle (z.B. der Faltung und Entfaltung von Proteinen) und der Umgebung (z.B. der Polarität und dem pH-Wert) beeinflusst wird, können auch Veränderungen der Zellstruktur auf Mikroskalen empfindlich analysiert werden.

Daten zur Absorption und Fluoreszenz biologisch relevanter Substanzen sind in Datenbanken auch im Internet verfügbar. Beispiele:

<http://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/index.html>

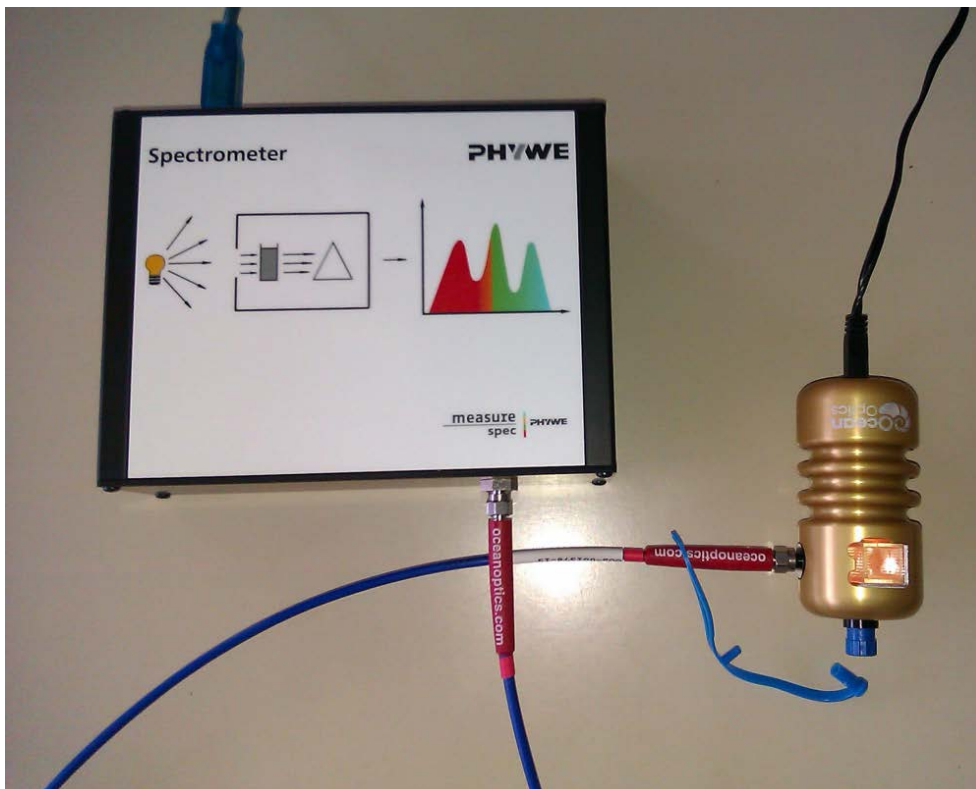
<http://www.fluorophores.tugraz.at/>

<http://spectra.arizona.edu/>

(letzter Zugriff: 27.3.2015)

### 10.1.9 Bedienung des Photometers für Fluoreszenzmessungen

- Die Fluoreszenz einer Probe ist verglichen mit der transmittierten Strahlung außerordentlich schwach; ein kleiner Fluoreszenzanteil ist in Transmission kaum nachweisbar. Daher muss Fluoreszenz so gemessen werden, dass das Licht der Glühlampe vom Spektrometer ferngehalten wird. Dies geschieht durch Montieren des Lichtleiters unter einem Winkel von  $90^\circ$  bezogen auf die Ausbreitungsrichtung des transmittierten Lichtstrahls. Verwenden Sie einen Lichtleiter mit einem großen Kerndurchmesser, mit dem möglichst viel Fluoreszenzlicht erfasst werden kann (→ Betreuer).



Konfiguration des Spektrometers für Fluoreszenzmessungen

- Für Fluoreszenzmessungen wird das rechtwinklige Blech so in den Küvetenschacht gestellt, dass das Loch den Weg zum unter  $90^\circ$  montierten

## Versuch 10: Spektralphotometrie

Lichtleiter freigibt und das nicht gelochte Blech die transmittierte Strahlung in die Küvette zurück reflektiert (wodurch die Beleuchtung der Probe erhöht wird).

- Das an Partikeln einer Probe entstehende Streulicht ist oft ebenfalls sehr viel intensiver als das Fluoreszenzlicht. Es kann daher günstig sein,
  - die Probe nur mit spektralen Anteilen zu beleuchten, die zur Absorption wesentlich beitragen (z.B. nur blaues Licht für die Absorption durch Chlorophyll, siehe oben),
  - und nur solche spektralen Anteile zum Spektrometer zu leiten, in denen die gesuchte Fluoreszenzemission vorliegt (z.B. rotes Licht, wenn ein Fluorophor im roten Bereich fluoresziert).

Zu diesem Zweck können dünne Filterfolien in den Küvettschacht eingelegt werden, die jeweils die gewünschten spektralen Anteile transmittieren und die unerwünschten Anteile absorbieren oder reflektieren. Messen Sie zunächst die Transmission der verfügbaren Filter photometrisch, um ihre Eigenschaften und Wirkung für eine spezielle Anwendung zu verstehen (Frage: welche Referenz nutzen Sie in diesem Fall?).

## 10.2 Aufgaben

### 10.2.1 Extinktion von Leitungswasser

Vergleichen Sie entionisiertes Reinstwasser (Referenz) mit Leitungswasser (Probe). Leitungswasser enthält veränderliche Mengen Huminstoffe. Dies sind organische Makromoleküle, die durch den bakteriellen Abbau organischen Materials in Gewässern gelangen. Da sie gesundheitlich unbedenklich sind, werden Sie aus dem Trinkwasser nicht entfernt. Sie absorbieren im blauen und ultravioletten Spektralbereich.

Registrieren Sie die Extinktion des Leitungswassers im Vergleich zu Reinstwasser bei Wellenlängen zwischen 350 und 600 nm, stellen Sie das Ergebnis grafisch dar und diskutieren Sie den Befund.

### 10.2.2 Extinktion von Hämoglobin

In Gegenwart von Luftsauerstoff ist das Hämoglobin des Blutes praktisch vollständig oxygeniert, d.h. mit Sauerstoff beladen. Eine unbehandelte Hämoglobinlösung ergibt also das Spektrum des Oxyhämoglobins. Die Absorptionseigenschaften unterscheiden sich. Dies erlaubt eine photometrische Messung der Sauerstoffsättigung, die sogenannte Oxymetrie.

Entnehmen Sie mit einer Mikropipette ein definiertes Volumen einer Blutprobe und verdünnen Sie die Probe definiert mit Reinstwasser, dem etwas Natriumcitrat ( $C_6H_5Na_3O_7$ ) zur Verhinderung der Gerinnung beigegeben ist, in einem verschließbaren Proberöhrchen auf ein Volumen von 10 ml. Bestimmen Sie die Extinktion der Lösung im Bereich 400 bis 700 nm.

Reduziertes Hämoglobin, das also keinen molekularen Sauerstoff enthält, ergibt sich durch Zugabe von etwas Natriumdithionit ( $Na_2S_2O_4$ ), einem starken Reduktionsmittel, das allen Sauerstoff bindet. Das Probenröhrchen muss nach der Zugabe des Natriumdithionits verschlossen werden.

Das Spektrum des reduzierten Hämoglobins wird in gleicher Weise aufgenommen. Beide Spektren sollen in einem Diagramm dargestellt werden; ein weiteres Fenster für eine zweite Grafik kann mit einem Klick auf das abgebildete Menüelement geöffnet werden.



Berechnen Sie nach Gl. (10) den spezifischen molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  von Oxyhämoglobin und reduziertem Hämoglobin. Hierfür kann von folgenden Annahmen ausgegangen werden: a) der durchschnittliche Hämoglobingehalt im Blut ist 150 g/L; b) das Molekulargewicht von Hämoglobin ist 64458 g.

### 10.2.3 Extinktion und Fluoreszenz von Chlorophyll a

Extrahieren Sie aus Pflanzenteilen (z.B. Blättern) das grüne Blattpigment mit Isopropanol (Chlorophyll ist nicht wasserlöslich). Hierzu werden die Pflanzenteile mechanisch gerieben und im Lösungsmittel geschüttelt, bis sie eine deutliche Grünfärbung der Lösung wahrnehmen. Behandeln Sie die Pflanzenteile mechanisch nicht zu intensiv, da andernfalls auch andere Zellbestandteile freigesetzt werden, die zu einer unerwünschten Trübung führen.

Nehmen Sie das Extinktionsspektrum des in Isopropanol gelösten Chlorophyll a im Bereich 400 bis 700 nm auf. Referenz ist reines Isopropanol.

Stellen Sie das Ergebnis grafisch dar. Vergleichen Sie den Befund mit Literaturspektren photosynthetisch aktiver Pigmente.

Ein Teil des vom Chlorophyll *a* absorbierten Lichts wird bei der Wellenlänge 685 nm mit etwa 15 nm Bandbreite als Fluoreszenz wieder emittiert. Messen Sie an der gleichen Probe mit der in 5.9 beschriebenen Konfiguration die Fluoreszenz im Bereich 600 bis 750 nm. Vergleichen Sie das Ergebnis mit der Literatur.

### 10.2.4 Extinktion und Fluoreszenz von Fluorescein

Fluorescein ( $C_{20}H_{12}O_5$ ) ist ein im blau-grünen Bereich absorbierender gelb-grün fluoreszierender organischer Farbstoff. Seine Quantenausbeute, d.h. das Verhältnis von Fluoreszenzphotonen zu absorbierten Photonen, ist etwa 0,9 und damit sehr hoch.

Messen Sie die Extinktion und die Fluoreszenz einer wässrigen Lösung von Fluorescein jeweils im Bereich 400 bis 700 nm. Die Extinktion wird wie in den anderen Teilaufgaben mit Reinstwasser als Referenzmedium bestimmt.

Tragen Sie beide Spektren in einem Diagramm ein und diskutieren Sie die Korrespondenzen und Unterschiede. Vergleichen Sie die Spektren mit Daten aus den oben genannten Datenbanken unter Beachtung des jeweils genutzten Lösungsmittels.