

Thema 15: Absorptionsspektroskopie/Labordiagnostik

1 Motivation

In diesem Versuch werden Grundlagen zu den Verfahren der Spektralanalyse und Photometrie erarbeitet. Diese Verfahren arbeiten in der Regel mit sichtbarem Licht, d.h. elektromagnetischen Wellen im Wellenlängenbereich von 380 nm („blau-violett“) bis 780 nm („rot“). Sie dienen der qualitativen und quantitativen Analyse verschiedener Substanzen, z.B. auch von Blutbestandteilen. Teilweise werden Untersuchungen im infraroten (IR) Bereich (Wellenlängen von 780 nm bis etwa 10 μm) und im ultravioletten (UV) Bereich (etwa 10 nm bis 380 nm) durchgeführt. Sie verwenden im Versuch ein Spektrometer, das die qualitative und quantitative Analyse im gesamten Bereich des sichtbaren Wellenlängenbereiches ermöglicht. Neben Spektrometern werden in der Labordiagnostik häufig Photometer zur quantitativen Analyse in kleinen Wellenlängenbereichen verwendet. Die zur Analyse gewählten Wellenlängenbereiche müssen der jeweiligen Fragestellung angepasst sein, so dass sich ein Photometer zwar einfacher aber weniger flexibel einsetzen lässt als ein Spektrometer. Mit Hilfe des Spektrometers können Sie im Versuch beispielsweise selbst ermitteln, in welchen Wellenlängenbereichen Photometer für bestimmte Einsatzbereiche sinnvollerweise arbeiten sollten. Die Grundlage aller Verfahren der Spektralanalyse und Photometrie ist die, dass das Absorptionsverhalten vieler Substanzen Aufschluss über deren Zusammensetzung geben kann. Es erscheint z.B. oxygeniertes arterielles Blut schon mit bloßem Auge „roter“ als desoxygeniertes venöses Blut. Für eine quantitative Analyse der O_2 -Sättigung reicht der Farbeindruck jedoch nicht aus, zumal bereits erste Vorversuche mit dem Spektrometer zeigen, dass eine eindeutige Zuordnung von (subjektiven) Farbeindrücken zu Wellenlängen nicht möglich ist. Die Zusammenhänge zwischen dem Farbeindruck und der Wellenlänge sollen Sie im ersten Versuchsteil untersuchen. Dabei bauen Sie das Spektrometer selbst sukzessive auf. Die Spektren (Abhängigkeit der Lichtintensität von der Wellenlänge) werden zum einen auf einem Schirm sichtbar und können dort subjektiv beurteilt werden. Zum anderen werden Sie mit einer Spezialkamera gemessen, am PC dargestellt und ggf. weiterverarbeitet. Ein Beispiel für den Einsatz eines Photometers stellt der Proteinnachweis mit der Biuret-Methode dar, mit der Proteinkonzentrationen im Blut und im Urin quantitativ bestimmt werden können. Im Biochemischen Praktikum werden Sie solche Bestimmungen quantitativ durchführen, hier lernen Sie zunächst den qualitativen Ablauf und die spektrometrischen Grundlagen des Verfahrens kennen. Als eine Anwendung werden abschließend die Transmissionsspektren von Pufferlösungen mit unterschiedlichen p_H -Werten und dem Indikator Methylrot untersucht. Mit Hilfe dieses Verfahrens können später beispielsweise Lösungen unbekannter Konzentration bestimmt werden.

2 Grundlagen

2.1 Brechung und Dispersion

Das Licht, das wir mit dem Auge wahrnehmen können, besteht in der Regel aus einem Gemisch von Licht verschiedener Wellenlängen, der gesamte sichtbare Bereich erstreckt sich von etwa 380 nm bis etwa 780 nm. Im sogenannten „weißen Licht“ wie es beispielsweise eine Halogenlampe aussendet, sind alle Wellenlängen des sichtbaren Bereichs enthalten.

Wenn ein schmales „weißes“ Lichtbündel auf die Grenzfläche zwischen Luft und Glas fällt, wird es an dieser Grenzfläche gebrochen. Der Zusammenhang zwischen Einfallswinkel α_1 und Brechungswinkel α_2 (vgl. Abb. 15.1) wird beschrieben durch das Snelliussche Brechungsgesetz:

$$n_1 \cdot \sin \alpha_1 = n_2 \cdot \sin \alpha_2. \quad (15.1)$$

Darin ist n_1 der Brechungsindex von Luft und n_2 der Brechungsindex des Glases.

Bei Glas, wie bei allen anderen transparenten Medien, ist dieser Brechungsindex von der Wellenlänge abhängig. Dieses Phänomen bezeichnet man als Dispersion. Bei Luft ist die Abhängigkeit vernachlässigbar gering: der Brechungsindex beträgt im gesamten sichtbaren Bereich etwa 1,00. Bei Flintglas, aus dem das im Versuch verwendete Prisma gefertigt ist, ist sie deutlich stärker: der Brechungsindex beträgt für Licht kleiner Wellenlängen („blaues Licht“) etwa 1,64 und für Licht großer Wellenlängen („rotes Licht“) etwa 1,60. Da der Brechungsindex für „blaues Licht“ größer ist, ergibt sich ein kleinerer Brechungswinkel, es wird stärker zum Einfallslot hin gebrochen als das „rote Licht“ (vgl. Abb. 15.1): $\alpha_{2,blau} < \alpha_{2,rot}$.

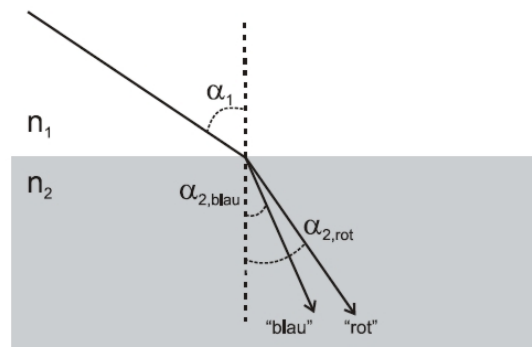


Abbildung 15.1: Dispersion durch Brechung (übertrieben dargestellt)

Für Licht jeder Wellenlänge ergibt sich so aus dem Brechungsgesetz ein anderer Brechungswinkel und eine andere Ausbreitungsrichtung im Glas. Man bezeichnet diese räumliche Trennung des Lichtes verschiedener Wellenlängen als spektrale Zerlegung des Lichtes. Beim Prisma wiederholt sich dieser Effekt, wenn das Licht an einer anderen Fläche wieder aus dem Glas in die Luft austritt. Durch die Anordnung der Prismenflächen wird die spektrale Zerlegung dabei verstärkt (vgl. Abb. 15.2)¹.

2.2 Farben, Spektren und Spektralfarben

Das spektral zerlegte Licht erzeugt auf dem Schirm ein farbiges Band, ein Spektrum. Die Farben, die Sie darin wahrnehmen, werden als Spektralfarben bezeichnet. Diese Farbeindrücke werden durch monochromatisches Licht, d.h. durch Licht einer Wellenlänge (bzw. aus einem sehr schmalen Wellenlängenbereich), hervorgerufen. Es ist also möglich, den Wellenlängen(bereichen), wenn sie im Spektrum räumlich getrennt sind, Spektralfarben zuzuordnen: mit zunehmender Wellenlänge wird Licht als Blau, Grün, Gelb, Orange bis hin zu Rot wahrgenommen.

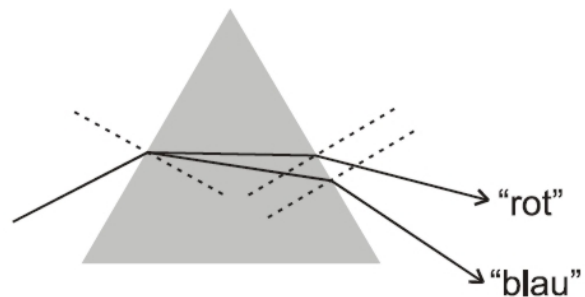


Abbildung 15.2: Spektrale Zerlegung durch ein Prisma

Dass diese Zuordnung umgekehrt nicht möglich ist, und aus dem Farbeindruck nicht eindeutig auf die spektrale Zusammensetzung des wahrgenommenen Lichtes zu schließen ist, ergibt sich bereits aus Ihren qualitativen Beobachtungen bei dem „Gelb“-Filter: Durch eine Mischung aller Spektralfarben außer „Blau“ wird der gleiche Farbeindruck hervorgerufen, wie durch monochromatisches „gelbes“ Licht. Erst die Zerlegung im Prisma zeigt die spektrale Zusammensetzung des „gelben“ Lichtes.

2.3 Abbildungsstrahlengang im Spektrometer

Weil hinter dem Prisma jede Wellenlänge eine andere Ausbreitungsrichtung hat, wird mit zunehmendem Abstand zwischen Schirm und Prisma die räumliche Trennung der Wellenlängen immer deutlicher. Mit der Entfernung nimmt jedoch auch die Intensität des Lichtes ab (Quadratisches Abstandsgesetz). Hinzu kommt, dass bei der einfachen Anordnung durch den zweiten Spalt nur ein schmales Bündel aus dem Licht ausgeblendet wird, das vom ersten Spalt ausgeht. Aus diesem Grund werden in Spektrometern Linsen eingesetzt, um das vom ersten Spalt ausgehende Licht möglichst vollständig auf den

¹Was geschieht, wenn das Licht statt durch ein Prisma schräg durch eine planparallele Glasplatte tritt?

Schirm (bzw. die CCD-Zeile) abzubilden:

Die erste Linse macht aus dem von Spalt ausgehenden divergenten Licht paralleles Licht (vgl. Abb. 15.3). Dazu muss der Spalt genau in der Brennebene der Linse stehen (d.h. in der Ebene senkrecht zur optischen Achse durch den Brennpunkt).

Dadurch tritt zum einen mehr Licht durch das Prisma, als ohne Einsatz der Linse, die Intensität wird erhöht. Zum anderen treffen so alle (parallelen) Lichtstrahlen unter dem gleichen Winkel auf das Prisma. Dadurch ist sichergestellt, dass das Licht jeder Wellenlänge das Prisma als Parallelbündel wieder verlässt, allerdings aufgrund der Dispersion für jede Wellenlänge unter einem anderen Winkel (vgl. Abb. 15.3). Aus dem Prisma treten also monochromatische Parallelstrahlbündel unter verschiedenen Winkeln aus.

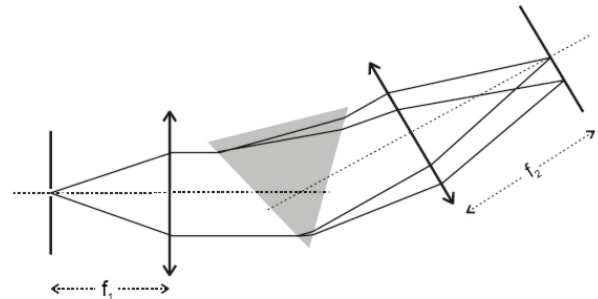


Abbildung 15.3: Abbildungsstrahlengang im Spektrometer

(f_1 : Brennweite der ersten Linse, f_2 : Brennweite der zweiten Linse)

Die zweite Linse dient dazu, jeweils parallele Lichtstrahlen wieder zu bündeln. Dazu muss der Schirm (bzw. die CCD-Zeile oder ein anderer Detektor) genau in der Brennebene positioniert sein. Jedes monochromatische Parallelstrahlbündel wird dann in einem Punkt der Brennebene fokussiert: Für Strahlen, die parallel zur optischen Achse einfallen, ist das der Brennpunkt. Bei anderen Einfallswinkeln werden die parallelen Strahlen ober- bzw. unterhalb der optischen Achse in der Brennebene gebündelt (vgl. Abb. 15.3). Sieht man zunächst von der Dispersion ab, so bildet die gesamte Anordnung aus beiden Linsen den Spalt auf den Schirm ab. Auf dem Schirm erscheint also ein reelles Bild des Spaltes. Durch die spektrale Zerlegung des Lichtes zwischen den Linsen entstehen dort unendlich viele farbige Bilder, für jede Spektralfarbe eines. Diese Bilder überlappen teilweise und bilden das auf dem Schirm sichtbare Spektrum. Durch den Einsatz der Linsen wird die Intensität des Spektrums gegenüber dem einfachen Aufbau deutlich erhöht.

2.4 Transmissions- und Absorptionsspektren

2.4.1 Phänomenologische Definition der Absorption

Die Einsatzmöglichkeiten von Spektrometern und Photometern in der Labordiagnostik beruhen auf substanzspezifischen Absorptionseigenschaften. Trifft Licht auf eine Substanz (z.B. einen Farbfilter, eine Küvette mit Farbstofflösung oder verdünntem Blut) so beobachtet man Reflexion, Transmission und Streuung (vgl. Abb. 15.4): Von der einfallenden Intensität I_0 wird

- ein Teil I_R an der Oberfläche reflektiert,
- ein Teil I_T transmittiert und tritt an der anderen Seite wieder aus,
- ein Teil I_S in der Substanz gestreut (d.h. die Ausbreitungsrichtung ändert sich) und tritt in allen Richtungen wieder aus.

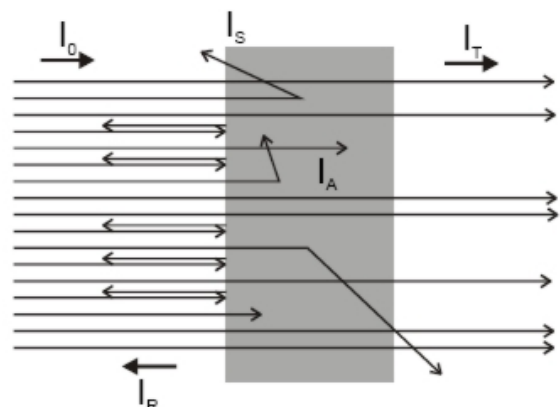


Abbildung 15.4: Reflexion, Transmission, Streuung und Absorption von Licht

Die Summe dieser drei Anteile ergibt nicht die ursprüngliche Intensität I_0 . Der „fehlende“ Anteil I_A ist in der Substanz absorbiert worden:

$$I_A = I_0 - I_R - I_T - I_S. \quad (15.2)$$

Die Absorption A , das Verhältnis von einfallender Intensität zu absorbierter Intensität, kann also nur indirekt über Differenzmessung bestimmt werden. Dabei misst man in der Regel die einfallende Intensität sowie den transmittierten und den reflektierten Anteil und vernachlässigt den Anteil des Streulichtes, das die Substanz wieder verlässt und nicht mit erfasst wird². Dann berechnet sich die Absorption aus den gemessenen Anteilen als:

$$A \simeq \frac{I_A}{I_0} = 1 - \frac{I_R}{I_0} - \frac{I_T}{I_0} \quad (15.3)$$

Für die reflektierte bzw. transmittierte Intensität bezogen auf die einfallende Intensität werden die Begriffe Reflexion $R = I_R/I_0$ bzw. Transmission $T = I_T/I_0$ eingeführt. Damit ergibt sich:

$$A = 1 - R - T. \quad (15.4)$$

Häufig werden die dimensionslosen Größen Absorption, Reflexion und Transmission in Prozent angegeben. Transmissionsmessungen haben Sie im Versuch mit dem Spektrometer durchgeführt. Als Referenzspektrum wurde dabei die einfallende Intensität gemessen und die transmittierte Intensität darauf bezogen. Dieses Verfahren bezeichnet man als Normierung.

2.4.2 Absorption als Elementarprozess

Die Definition und das Messverfahren für die Absorption gehen von einer phänomenologischen Beschreibung aus. Der Prozess der Absorption lässt sich jedoch auch mikroskopisch erklären. Dazu muss man jedoch ein anderes Modell zur Beschreibung von Licht verwenden: das Teilchenmodell. Bisher wurden hier sowohl das Wellenmodell (z.B. bei der Angabe der Wellenlängenbereiche) als auch die strahlenoptische Beschreibung verwendet (zum Gültigkeitsbereich der Strahlenoptik und zum Dualismus Welle/Teilchen bei der Beschreibung von Licht vgl. Vorlesung.). Im Teilchenmodell beschreibt man das Licht als Energiequanten, sogenannte Photonen.

Die Energie eines Photons ist $E = h \cdot \nu$, wobei $h = 6,62 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$ das Planksche Wirkungsquantum und ν die Frequenz des Lichtes ist. Frequenz und Wellenlänge λ sind über die Lichtgeschwindigkeit c gekoppelt: $c = \lambda \cdot \nu$. Photonen können in der Substanz enthaltene Moleküle bzw. Atome anregen. Ein Elektron des Atoms oder Moleküls nimmt dann die Energie des Photons vollständig auf und gelangt dadurch in ein höheres Energieniveau, das Photon wird dabei absorbiert.

Die möglichen Energieniveaus und die möglichen Übergänge sowie die Wahrscheinlichkeit, mit der ein möglicher Übergang stattfindet, sind charakteristisch für die Substanz. Nur Photonen mit „passender“ Energie können von der Substanz absorbiert werden, je nach Übergang mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit.

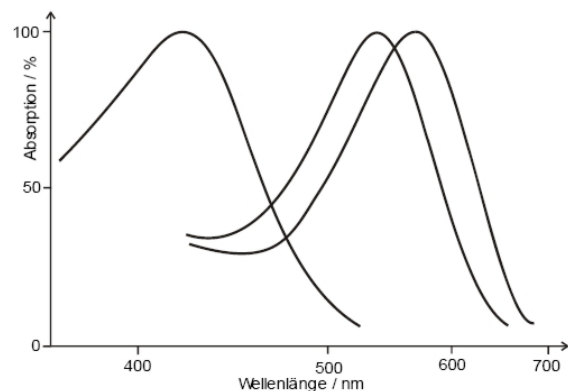


Abbildung 15.5: Absorptionskurven der Photopigmente der Zapfen [nach Klinke, R. & Silbernagl, S. (1996). Lehrbuch der Physiologie, Thieme Verlag]

²Der Fehler wird auch dadurch reduziert, dass ein Teil des Streulichtes in Transmission und Reflexion „fälschlicherweise“ mit gemessen wird und ein weiterer Teil nach der Streuung noch in der Substanz absorbiert wird.

Da Photonen, abhängig von von ihrer Wellenlänge (bzw. Energie, s.o.) mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit absorbiert bzw. transmittiert werden, entsteht ein Transmissions- bzw. Absorptionsspektrum, das für die Substanz charakteristisch ist. Einzelne Atome, die nicht gebunden sind erzeugen also einzelne klar definierte Spektren, während in Molekülen ein breites Spektrum erzeugt wird. Dies beruht auf den unterschiedlichen Bindungsarten im Molekül selber. Die festen σ -Elektronenbindungen zwischen den Atomen eines Moleküls haben die höchsten Bindungsenergien und absorbieren im UV-Bereich, die weniger festen π -Bindungen, die in sogenannten konjugierten Molekülsystemen auftreten absorbieren elektromagnetische Strahlung größtenteils im sichtbaren Bereich zwischen $200\text{nm} \leq \lambda \leq 700\text{nm}$. Sie sind daher für den Farbeindruck ausschlaggebend.

Auf dem Prozess der Absorption beruht beispielsweise auch der Transduktionsprozess in der Retina: Abb. 15.5 zeigt die Absorptionsspektren der drei verschiedenen, in den Zapfen der Retina enthaltenen Seh-Farbstoffe. Jeder der drei Farbstoffe zeigt ein breites Absorptionsmaximum in einem charakteristischen Wellenlängenbereich: Ein Zapfentyp absorbiert bevorzugt kurzwelliges, einer langwelliges und einer Licht im Bereich mittlerer Wellenlängen. Dadurch geschieht in den Rezeptoren eine grobe spektrale Analyse des einfallenden Lichtes, die die Grundlage der Farbwahrnehmung darstellt.

2.4.3 Anwendungsbereiche von Spektrometern und Photometern

Für viele Anwendungen wird das Spektrometer auf ein Spektralphotometer reduziert. Statt über das gesamte Spektrum werden dann nur in einem Wellenlängenbereich (oder einigen wenigen) die Intensitäten des transmittierten Lichtes gemessen. Je nach zu untersuchender Substanz eignen sich dazu unterschiedliche Wellenlängen. Für einen möglichst flexiblen Einsatz muss dazu im Spektralphotometer aus dem gesamten Spektrum alles bis auf den gewünschten Wellenlängenbereich ausgeblendet werden. Das kann durch einen geeigneten Filter geschehen, der im gewünschten Wellenlängenbereich maximale Transmission zeigt und in den übrigen Bereich möglichst stark absorbiert. Eine genauere und flexiblere Festlegung des Wellenlängenbereichs wird durch eine Blende erreicht, die am Ort des Spektrums in den Strahlengang gebracht wird. In einfachen Photometern mit klar definiertem Anwendungsbereich können auch geeignete monochromatische Lichtquellen, z.B. Leuchtdioden (LED's), eingesetzt werden, die nur im gewünschten Wellenlängenbereich Licht emittieren. Im Fall der Pulsoximetrie z.B. wird bei zwei festen Wellenlängen gearbeitet. Um zwischen oxygeniertem und desoxygeniertem Hämoglobin unterscheiden zu können, müssen sich deren Transmissionsspektren bei einer dieser beiden Wellenlängen möglichst stark unterscheiden, was z.B. im roten Spektralbereich der Fall ist. Die Transmission hängt dort stark von der O_2 -Sättigung des Hämoglobins ab. Da Carboxy-Hämoglobin (CO-Hb) in diesem Spektralbereich sehr ähnliche Transmissionseigenschaften besitzt wie oxygeniertes Hämoglobin, können deren Anteile allerdings nicht getrennt werden und die O_2 -Sättigung wird dementsprechend zu hoch bestimmt³.

Für die Proteinbestimmung mit der Biuret-Methode, wie Sie z.B. im Biochemischen Praktikum durchgeführt wird, wird ebenfalls ein Photometer eingesetzt und bei einer festen Wellenlänge von 546 nm gemessen. Die Auswertung erfolgt dabei nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz.

2.4.4 Extinktion und Lambert-Beersches Gesetz

Bei einer festen Wellenlänge (im Photometer) hängt die Transmission T einer Lösung ab von der Dicke d der durchstrahlten Schicht (in der Regel die Dicke der verwendeten Küvette) und der Konzentration c der Lösung: je dicker die durchstrahlte Schicht ist und je größer die Konzentration der Lösung ist, desto geringer ist die Transmission.

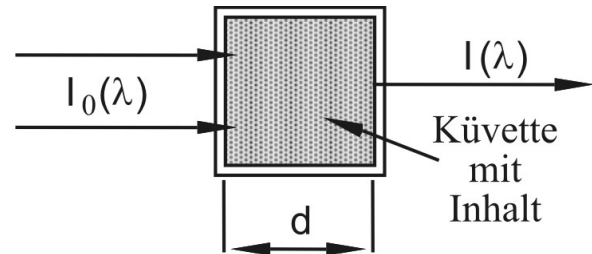
Quantitativ gilt für den Zusammenhang: $T = 10^{-\epsilon cd}$. Dabei ist ϵ der sogenannte Extinktionskoeffizient. Der Extinktionskoeffizient ist charakteristisch für die photometrierte Substanz und die verwendete Wellenlänge. Durch eine mathematische Umformung erhält man aus der (gemessenen) Transmission

³Gleiches gilt für Methämoglobin, oxidiertes (nicht oxygeniertes!) Hämoglobin mit einem dreiwertigen Eisen-atom. Das Pulsoximeter unterscheidet also streng genommen nur zwischen desoxygeniertem und restlichem Hämoglobin (oxygeniertes Hämoglobin, CO-Hb und Methämoglobin).

eine Größe, die direkt proportional zur Konzentration der Lösung ist, die sogenannte Extinktion E . Für diese gilt:

$$E = -\log(T) = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (15.5)$$

E : Extinktion, T : Transmission, d : Dicke der durchstrahlten Schicht (Küvettdicke), c : Konzentration der Lösung, ϵ : Extinktionskoeffizient (der untersuchten Substanz bei der verwendeten Wellenlänge)



Diese Gleichung bezeichnet man als das Lambert-Beer'sche Gesetz.

Abbildung 15.6: Prinzipskizze zum Lambert-Beer-Gesetz

Für die Restintensität $I(d)$ des Lichtstrahls hinter der Schichtdicke gilt:

$$I(d) = I_0 \cdot e^{-\alpha d} \quad (15.6)$$

(α = linearer Absorptionskoeffizient in cm^{-1})

Mit dekadischem Exponent schreibt man auch $I(d) = I_0 \cdot 10^{-\epsilon(\lambda)cd}$.

Alternativ kann man das Lambert-Beer-Gesetz anders formulieren als

$$A = E = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = -\lg(T) = \epsilon(\lambda) \cdot d \cdot c \quad (15.7)$$

Photometer messen die Transmission und zeigen als Ergebnis die daraus errechnete Extinktion E an. Bei bekannter Schichtdicke und bekanntem Extinktionskoeffizienten (für die untersuchte Substanz und die verwendete Wellenlänge) kann man aus daraus nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz die Konzentration der Lösung berechnen.

Es ist zu beachten, dass man die Konzentration der Lösung nicht zu hoch wählt. Unter der Bedingung, dass die Messbedingungen, wie z.B. die Temperatur, der pH-Wert oder das Lösungsmittel wohl definiert sind, ist der Extinktionskoeffizient nur von der absorbierenden Substanz und der Wellenlänge λ abhängig. Es zeigt sich, dass E und c linear voneinander abhängen. Diese Linearität wird bei zu hohen Konzentrationen aufgehoben und $\epsilon(\lambda)$ wird konzentrationsabhängig. Dies beruht auf der Wechselwirkung zwischen den Teilchen der absorbierenden Substanz, sowie der mit dem Lösungsmittel selbst. Hier verliert das Lambert-Beer-Gesetz seine Gültigkeit. Der Konzentrationsgrad, bei dem die Linearität verloren geht muss für jeden Stoff, bzw. für jedes Lösungsmittel empirisch ermittelt werden.

Die Extinktion ist (als Logarithmus einer dimensionslosen Größe) dimensionslos. Der molare Extinktionskoeffizient wird in der Regel angegeben in der Einheit $\frac{1}{\text{cm}} \cdot \frac{\text{dm}^3}{\text{mol}}$.

2.5 Chemische Grundlagen, Indikatoren

Indikatoren werden verwendet, um beispielsweise eine Lösung auf ihren pH -Wert zu untersuchen. Um die Wirkungsweise eines Indikators erklären zu können spielt das Massenwirkungsgesetz eine wichtige Rolle. Da Indikatoren selber schwache Säuren (oder Basen) sind, können sie H^+ -Ionen abgeben. Im dissoziierten Zustand liegen dann positive H^+ -Ionen und Anionen I^- vor. Die Konzentration des

Anions ist dann abhängig von der Gesamtkonzentration c der Substanz, der H_3O^+ -Ionenkonzentration und von der Dissoziationskonstanten K . Das Protolyse-Gleichgewicht sieht dabei wie folgt aus:



Die Dissoziationskonstante K ist durch das Massenwirkungsgesetz gegeben:

$$K = \frac{[I^-][H_3O^+]}{[HI]} \quad (15.9)$$

Die eckigen Klammern stehen für die molaren Konzentrationen. Die Konzentration des Wassers wird in die Konstante K des Wassers mit einbezogen. Setzt man die Definition des Dissoziationsgrads $\alpha = \frac{[I^-]}{c}$ und $1 - \alpha = \frac{[HI]}{c}$ ein ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$K = \frac{[H_3O^+]\alpha c}{(1 - \alpha)c} \quad (15.10)$$

und somit

$$\frac{K}{[H_3O^+]} = \frac{\alpha}{1 - \alpha} \quad (15.11)$$

Setzt man nun die Definition des p_H -Wertes $p_H = -\lg[H_3O^+]$ und $-\lg(K) = p_K$ ein, so folgt daraus:

$$p_H = p_K + \lg \left[\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right] \quad (15.12)$$

Ein Farbumschlag ist eben genau dann festzustellen, wenn die molare Konzentration der I^- -Anionen gleich der molaren Konzentration der Indikatorsäure HI ist. An diesem Punkt gilt also $[I^-] = [HI]$, bzw. $K = [H_3O^+]$.

Einfacher gesagt, liegt ein Farbumschlag genau dann vor, wenn der p_H -Wert den durch die Dissoziationskonstante K vorgegebenen Wert über- oder unterschreitet. Es ist dabei zu beachten, dass das menschliche Auge diese Farbveränderung erst zu einem späteren Zeitpunkt wahrnimmt, nämlich dann, wenn die Farbe in ca. zehnfachen Überschuss vorliegt. Das in diesem Versuch verwendete Methylrot besitzt Umschlagspunkte bei einem p_H -Wert von weniger 4,4 auf rot und bei mehr als 6,2 auf gelb. Bei Lösungen zwischen diesem Wert erscheint es orange. Der Farbumschlag von ausgewählten Indikatorlösungen kann sowohl zur (grobem) p_H -Bestimmung mit bloßem Auge, als auch zur photometrischen Präzisionsbestimmung von Substanzkonzentrationen in Lösungen und Dissoziationskonstanten eingesetzt werden.

3 Versuchsdurchführung und Aufgabenstellung

3.1 Der Grundaufbau

Für den Aufbau des Spektrometers steht Ihnen eine Grundplatte mit einer fest verschraubten optischen Bank zur Verfügung (vgl. Abb. 15.7). Auf der Bank sind 6 Reiter und ein Prismentisch montiert, die im Verlaufe des Versuches bestückt werden. Die Reiter dürfen mit Ausnahme von Reiter Nr. 1 für die Lampe nicht verschoben werden, weil sonst das Spektrometer nur mit erheblichem Zeitaufwand zu justieren ist!

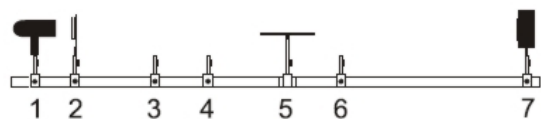


Abbildung 15.7: „Gerüst“ für den Aufbau des Spektrometers

In den Reitern befinden sich zu Beginn nur eine Lampe (1), ein Halter mit Mattscheibe und Spalt (2), ein Prismentisch (5) und eine Kamera (7). In diesem Zustand sollen Sie das Gerät auch am Ende des Versuches wieder abgeben.

3.2 Erweiterung zum Spektrometer

Im diesem Versuchsteil sollen Sie schrittweise ein Spektrometer aufbauen und dabei die Funktion der einzelnen Komponenten kennenlernen.

- Schalten Sie die Lampe an der Sicherung ein.
- Montieren Sie einen der beiden Filterhalter in Reiter Nr. 3, und setzen Sie dort den zweiten Spalt ein (in der gleichen Höhe wie den ersten).
- Stellen Sie das Glasprisma auf den Prismentisch.
- Stellen Sie die Höhe des Prismentisches so ein, dass er sich etwa in der Mitte des Spaltes befindet und Sie den Strahlverlauf auf dem Tisch verfolgen können.
- Positionieren Sie das Prisma so auf dem Prismentisch, dass das Spektrum etwa in der Mitte der weißen Frontplatte der Kamera erscheint.
- Montieren Sie den zweiten Filterhalter in Reiter Nr. 4 und setzen Sie dort Filter Nr. 1 ein. Handhaben Sie die Filter bitte vorsichtig und fassen Sie sie nur am Rand an!

Filter Nr. 1 lässt im Wesentlichen nur kurzwelliges Licht passieren. Das nun beobachtbare Spektrum ist das Transmissionsspektrum des Filters, weil es diejenigen Wellenlängenbereiche zeigt, die der Filter durchlässt (transmittiert). Um jedoch die Auswirkungen der Filter genauer beurteilen zu können, müssen Sie die Intensität des Spektrums erhöhen. Das geschieht durch den Einsatz von Linsen.

- Nehmen Sie den Filterhalter mit dem zweiten Spalt aus Reiter Nr. 3 und setzen Sie stattdessen dort die Linse mit der Brennweite 100 mm ein (mit der Beschriftung zum Prisma hin; die Brennweite ist auf dem Linsenhalter angegeben).
- Beobachten Sie den Strahlverlauf auf dem Prismentisch, nehmen Sie dazu ggf. kurz das Prisma weg.
- Setzen Sie nun die zweite Linse mit der Beschriftung zum Prisma orientiert in Reiter Nr. 6 ein, und stellen Sie das Prisma wieder so auf den Prismentisch, so dass das Spektrum auf der Blende erscheint. (Achten Sie dabei darauf, dass möglichst kein Licht am Prisma vorbeigeht.)
- Senken Sie nun den Prismentisch so weit ab, dass er sich nicht mehr im Strahlengang befindet und die Mitte des Prismas auf einer Höhe mit den Mittelpunkten der Linsen ist.
- Setzen Sie das Prisma wieder so auf den Prismentisch, dass Sie das Spektrum mittig auf der Blende sehen und zwar möglichst genau zwischen den eingezeichneten Grenzen.

Setzen Sie nun nacheinander auch die Filter Nr. 1 bis 3 in den Filterhalter und notieren Sie für diese und für das ungefilterte Lampenlicht den Farbeindruck (also vor dem Prisma) sowie die Zusammensetzung des Spektrums (also hinter dem Prisma) in der Tabelle. Die letzte Spalte bleibt für quantitative Angaben zunächst frei (vgl. Versuchsteil 3.3.1).

Filter	Farbeindruck vor dem Prisma	Spektrum qualitativ	Spektrum quantitativ
ohne			
Nr. 1			
Nr. 2			
Nr. 3			

Vergleichen Sie z.B. das Spektrum des „Gelb“-Filters mit dem Farbeindruck. Welchen Schluss können Sie daraus bezüglich des Zusammenhangs zwischen Farbeindruck und spektraler Zusammensetzung des

Lichtes ziehen? (Als spektrale Zusammensetzung bezeichnet man die Wellenlängen, die im Spektrum auftreten.)

Der subjektive Farbeindruck ist in erster Linie auf die Absorptionsspektren der verschiedenen Seh-Farbstoffe in den Zapfen der Retina zurückzuführen. Solche Absorptionsspektren können aus Transmissionspektren errechnet werden, die mit Spektrometern gemessen werden. Im folgenden Versuchsteil werden Sie den Aufbau so erweitern, dass damit quantitative Messungen von Transmissionspektren möglich sind. (Allerdings nicht an den Seh-Farbstoffen, sondern an anderen Beispielen).

3.3.1 Kalibrierung mit der Software

In der Aufgabe 3.2 konnten Sie das Spektrum mit dem Auge qualitativ beurteilen. Um es quantitativ zu vermessen, also für jede Wellenlänge (bzw. möglichst kleine Wellenlängenintervalle) die Intensität des Lichtes zu messen, benötigen Sie ein objektiveres Messinstrument als das Auge, in diesem Fall die Kamera, die bereits im Reiter Nr. 6 montiert ist.

- Wählen Sie mit dem Knopf MODE an der Oberseite der Kamera die Betriebsart INTENSITY 2048 (wird im Display der Kamera angezeigt).
- Schalten Sie den PC an.
- Starten Sie das Programm VIDEOCOM INTENSITÄTEN, indem Sie den Mauszeiger auf dem Bildschirm auf das entsprechende Symbol bewegen und dort mit der linken Maustaste doppelklicken. Auf dem Bildschirm sollte nun ein Diagramm erscheinen, bei dem auf der Ordinate (relative) Intensität in % und auf der Abszisse Pixel aufgetragen sind. Diese Pixel sind die Messpunkte der Kamera:
Das Spektrum fällt durch den Schlitz in der Frontblende in die Kamera, und dort auf eine CCD-Zeile, in der sich über die Breite des Spektrums verteilt 2048 Messpunkte (Pixel) für die Intensitätsmessung befinden. Diese CCD-Pixel arbeiten ähnlich wie die Stäbchen im menschlichen Auge: sie absorbieren das einfallende Licht und setzen es über Ladungstrennung in ein elektrisches Signal um. Wie die Stäbchen können auch die Pixel der CCD-Zeile nur zwischen verschiedenen Intensitäten und nicht zwischen verschiedenen Wellenlängenbereichen oder „Farben“ unterscheiden. Deshalb muss Licht der verschiedenen Wellenlängen vorher durch das Spektrometer räumlich getrennt werden.
- Klicken Sie das Symbol KAMERA II oben in der Menüleiste an.
Die für die einzelnen Pixel gemessenen Intensitäten werden jetzt in dem Diagramm als Kurve dargestellt. Die resultierende Intensitätsverteilung ist allerdings noch bezogen auf Pixel und noch nicht auf Wellenlängen.
- Drehen oder verschieben Sie langsam das Prisma und beobachten Sie den Einfluss auf die Intensitätsverteilung.
- Positionieren Sie das Prisma nun so, dass das Spektrum möglichst genau zwischen den eingezeichneten Markierungen auf der Frontblende liegt. Dann sollte die CCD-Zeile optimal ausgeleuchtet sein und das gesamte sichtbare Spektrum erfassen.
- Überprüfen Sie das, indem Sie eine Pappe oder ein Stück weißes Papier langsam vom roten bzw. blauen Ende ins Spektrum schieben und den Einfluss auf die Intensitätsverteilung beobachten. Sobald das rote bzw. blaue Ende des Spektrums von der Pappe abgeschirmt wird, sollte sich das unmittelbar im Spektrum bemerkbar machen. Andernfalls ist nicht das gesamte sichtbare Spektrum von der CCD-Zeile erfasst und Sie müssen das Prisma noch etwas verdrehen.

Kontrollieren Sie, ob im gesamten Bereich des sichtbaren Spektrums die Intensität zwischen 20 % und 95 % liegt und insgesamt möglichst hoch ist. Ist das nicht der Fall, so können Sie (**a**) die Intensität

insgesamt erhöhen bzw. absenken, indem Sie die Lampe etwas verschieben oder **(b)** durch leichtes Drehen (ggf. auch Verschieben) des Prismas die Intensitätsverteilung etwas verändern (ohne dabei die Enden des sichtbaren Spektrums aus dem Messbereich zu schieben).

Nun ist das Spektrometer für die weiteren Messungen justiert. Da diese Justierung sehr empfindlich von der Position der Lampe und des Prismas abhängt, schrauben Sie den Reiter der Lampe auf der optischen Bank fest und markieren Sie für das Prisma die Position zweier Kanten mit einem Klebestreifen auf dem Tisch (vorsichtig, ohne das Prisma dabei zu verschieben).

Die Darstellung der Intensitätsverteilung auf dem Bildschirm ist in der vorliegenden Form noch nicht sinnvoll zur quantitativen Analyse einsetzbar: Zum einen müssen den Pixelangaben auf der x -Achse noch Wellenlängenangaben zugeordnet werden (Wellenlängenkalibrierung), zum anderen ist jedoch der Übergang zu einer Transmissionsmessung sinnvoll.

3.3.2 Transmissionsmessungen

Die von der Kamera gemessene Intensität ist offensichtlich nicht über das gesamte Spektrum gleich. *Welche Faktoren könnten zu diesem Verlauf führen?* In welchem Bereich des Spektrums erscheint Ihnen die Intensität am größten (siehe Spektrum auf der Frontplatte)?

Aufgrund der wellenlängenabhängigen Intensität im gemessenen Spektrum ist der Einfluss verschiedener Filter schlecht miteinander zu vergleichen und erst recht nicht quantitativ zu beschreiben.

- Testen Sie das, indem Sie ein oder zwei Filter nacheinander in den Strahlengang halten. Es ist sinnvoller, eine Relativmessung bezogen auf die Intensitätsverteilung ohne Filter durchzuführen. Das wird dadurch erreicht, dass Sie die vorliegende Intensitätsverteilung (ohne Filter) als Referenz abspeichern und die weiteren Messungen darauf beziehen:
- Wählen Sie dazu das Register REFERENZ I2. Daraufhin wird die aktuelle Intensitätsverteilung als Referenz gespeichert und als blaue Kurve zusätzlich zur jeweils aktuell gemessenen dargestellt.
- Schalten Sie jetzt auf die Registerkarte INTENSITÄT I1.
- Halten Sie erneut einen beliebigen Filter in den Strahlengang. Dessen Wirkung sollte nun durch die Vergleichsmöglichkeit mit dem (blau dargestellten) Referenzspektrum bereits wesentlich einfacher zu beurteilen sein.
- Wählen Sie nun die Registerkarte TRANSMISSION. Dann wird vom Messprogramm für jeden dargestellten Messpunkt der Quotient aus der gespeicherten Referenzintensität (blau) und der aktuell gemessenen Intensität (schwarz) berechnet und als Transmission in % angegeben.

Welchen Wert sollte die Transmission besitzen, solange Sie keinen Filter oder ähnliches in den Strahlengang bringen? Durch welche Effekte können Abweichungen von diesem Wert auftreten?

Kontrollieren Sie zwischen den weiteren Messungen regelmäßig, ob die Transmission ohne Filter durchgängig den erwarteten Wert besitzt. Treten Abweichungen auf, so müssen Sie für die weiteren Spektren die Referenz neu festlegen (wie oben beschrieben).

3.3.3 Wellenlängenkalibrierung der x -Achse

Eine Wellenlängenkalibrierung ist notwendig, damit auf der x -Achse statt der Nummer des Pixels die Wellenlänge des Lichtes aufgetragen ist, das auf den jeweiligen Pixel fällt. Da mit Hilfe der CCD-Zeile die Wellenlänge nicht gemessen werden kann, müssen Sie diese Zuordnung mit Hilfe einiger bekannter Wellenlängen selbst durchführen. Eine grobe qualitative Zuordnung haben Sie bereits bei der Justierung durchgeführt, um festzustellen, bei welchen Pixeln das rote bzw. blaue Ende des Spektrums liegt.

Lassen Sie sich nun für eine vollständige Kalibrierung einen Spezialfilter von den Assistenten geben

und setzen Sie diesen in den Filterhalter. Dieser Filter sollte zwei deutlich ausgeprägte Flanken bei bekannten Wellenlängen im Spektrum zeigen. Die linke Flanke liegt bei einer Wellenlänge von 492 nm, die rechte Flanke bei 581 nm.

- Wählen Sie in der Werkzeuggeste das Schaltfeld KALIBRIERUNG. Es erscheint das Feld KALIBRIERUNG/THEORIEVERGLEICH. In der Registerkarte BEUGUNGSWINKEL stellen Sie nun für die effektive Brennweite 300 mm ein. Bestätigen Sie diese Eingabe mit OK.
- Klicken Sie im Spektrum zunächst auf die linke (absteigende) Flanke und zwar möglichst genau dort, wo die Intensität die Hälfte des Maximalwertes erreicht hat. Notieren Sie den zugehörigen x -Wert.
- Klicken Sie nun auf die rechte (aufsteigende) Flanke, wieder möglichst genau dort, wo die Intensität auf die Hälfte des Maximalwertes abgenommen hat. Notieren Sie wieder den zugehörigen x -Wert.

Mit diesen beiden Angaben errechnet das Programm eine vollständige Wellenlängenkalibrierung und beschriftet die Achse dementsprechend. Überprüfen Sie Ihre Kalibrierung noch einmal qualitativ, indem Sie gezielt Farben mit einem Blatt Papier, welches Sie vor die Kamera halten, ausblenden. Die Zuordnung der Wellenlängen mit diesem Verfahren ist für unsere Zwecke hinreichend genau. Eine exaktere Kalibrierung wäre nur durch Vorgabe weiterer bekannter Wellenlängen möglich. Wählen Sie wieder das Schaltfeld KALIBRIERUNG in der WERKZEUGLEISTE und tragen Sie unter der Registerkarte WELLENLÄNGEN Ihre x -Werte entsprechend der vorgegebenen Wellenlängen in die beiden mittleren Felder ein.

3.3.4 Filtertransmissionskurven

Ergänzen Sie die Tabelle weiter oben durch quantitative Angaben:

- Setzen Sie nacheinander noch einmal die Filter Nr. 1-3 in den Filterhalter. Vergleichen Sie beim Einsetzen und Herausnehmen möglichst gleichzeitig die Änderungen im Spektrum auf der Frontplatte bzw. auf dem Bildschirm.
- In der Transmissionskurve können Sie ablesen, wie viel Prozent des einfallenden Lichtes der jeweiligen Wellenlänge der Filter transmittiert. Tragen Sie in der Tabelle ein, in welchen Wellenlängenbereichen der jeweilige Filter mehr als 25 % transmittiert.

Kontrollieren Sie zwischendurch immer wieder, ob nicht die Referenz neu festgelegt werden muss (s.o.)!

3.4 Anwendungsbereiche der Spektralphotometrie

In diesem Versuchsteil sollen Sie verschiedene gepufferte Indikatorlösungen mit Hilfe des aufgebauten Spektrometers untersucht werden. Verwendung für dieses Verfahrens finden sich beispielsweise in der Konzentrationsbestimmung mittels Eichkurve, bzw. durch Vergleich mit bekannten Extinktionskoeffizienten bei bekannter Probensubstanz oder zur qualitativen Identifizierung einer Probe durch Messung des Absorptionsspektrums als Funktion der Wellenlänge wieder.

3.4.1 Spektrometrische Messungen

Sie erhalten Pufferlösungen mit unterschiedlichen p_H -Werten. Die Küvetten enthalten jeweils die selbe Indikatorsubstanz, wie z.B: Methylrot-Na bei gleicher Konzentration $c = 0,1 \frac{mmol}{l}$. Welche Bedingung ist an die Küvetten zu stellen, in denen sich die Lösung befindet?

- Setzen Sie die Küvette mit dem reinen Lösungsmittel in die passende Halterung hinter den Spalt im Reiter (2) und legen Sie deren Spektrum als neues Referenzspektrum fest. (Registerkarten REFERENZ, INTENSITÄT, TRANSMISSION wählen, s.o.)
- Setzen Sie nun eine der anderen Küvetten hinter den Spalt und nehmen Sie deren Transmissionspektrum auf: Gehen Sie dazu wie folgt vor: Klicken Sie auf die Registerkarte TRANSMISSION, klicken Sie mit der rechten Maustaste auf die Leiste der angezeigten Tabelle und kopieren Sie diese.
- Öffnen Sie eine neue Exceldatei und fügen Sie die kopierte Tabelle dort ein.
- Verfahren Sie nun mit den anderen Küvetten der gleichen Konzentration genauso und fügen Sie die jeweilig aufgenommenen Werte in die gleiche Excel Datei.
- Als letztes nehmen Sie nun die Küvette mit der Lösung unbekannter Konzentration und fügen auch diese in Excel ein.
- Erstellen Sie in Excel ein Diagramm mit den Transmissionskurven in Abhängigkeit von der Wellenlänge.
- Speichern Sie die Datei ab.

3.4.2 Bestimmung des Absorptionsspektrums einer Indikatorlösung

Beenden Sie während des folgenden Versuchsteils nicht das Programm SPEKTROMETER, damit Sie die Wellenlängenkalibrierung nicht verlieren!

- Welche Rückschlüsse lassen sich aus den Messkurven über die Färbung der dissoziierten bzw. nichtdissoziierten Lösungsbestandteile entnehmen?
- Bei welchen Wellenlängen finden Sie Absorptionsmaxima?
- Bei dieser Substanz wird eine Moleküldissoziation beobachtet. Dies ist daran zu erkennen, dass in den aufgenommenen Spektren der Lösungen gleicher Konzentration eine Wellenlänge auftritt, bei der die Transmission unabhängig von dem p_H -Wert der Lösung ist. Dort schneiden sie die Kurven. Bei welcher Wellenlänge finden Sie diesen Punkt?
- Dieser Punkt nennt sich isosbestischer Punkt. Notieren Sie sich die zwei Transmissionsraten der unterschiedlichen Lösungen. Sie können jetzt mithilfe dieser Werte und des Lambert-Beer-Gesetzes die unbekannte Konzentration bestimmen.

4 Stichworte zur Vorbereitung

Brechungsgesetz, Dispersion, Absorption, Linsengesetze, Geometrische Optik, Pulsoximetrie