

Seminar: Photometrie

G. Reibnegger und W. Windischhofer

(Teil II zum Thema Hauptgruppenelemente)

Ziel des Seminars:

- Theoretische Basis der Photometrie
- Lambert-Beer'sches Gesetz
- Rechenbeispiele

Start

Literatur:

Chemie für Mediziner

von Helmut Wachter, Arno Hausen, Gilbert Reibnegger
Walter de Gruyter Verlag; 8. Auflage

← zurück

weiter →

Seminar: Photometrie

Hauptgruppenelemente Teil II

1) Grundlagen der Photometrie:

Transmission und Extinktion

Lösungen gefärbter Moleküle erscheinen umso intensiver gefärbt, je höher die Konzentration der gefärbten Substanz ist. Die Farbempfindung kommt dadurch zustande, dass die gefärbte Substanz Licht ganz bestimmter Wellenlänge absorbiert. Das durchgehende und auf unser Auge treffende Licht erscheint unserem Gehirn in der Komplementärfarbe.

Tabelle: Lichtfarbe (absorbiertes Licht) und Komplementärfarbe (gesehene Farbe):

| Wellenlänge λ (nm) | absorbiertes Licht | Komplementärfarbe |
|----------------------------|--------------------|-------------------|
| < 380 | UV | farblos |
| 380 – 435 | Violett | Gelb |
| 435 – 490 | Blau | Orange |
| 490 – 560 | Grün | Rotviolett |
| 560 – 580 | Gelb | Blauviolett |
| 580 – 620 | Orange | Blau |
| 620 – 780 | Rot | Blaugrün |
| > 780 | Infrarot | farblos |

Start

zurück

weiter

Seminar: Photometrie

Hauptgruppenelemente Teil II

In der Photometrie (wörtlich \Rightarrow Lichtmessung) ist dieses Phänomen deshalb interessant, weil durch die Messung der absorbierten Lichtintensität eine quantitative Bestimmung der Konzentration der gefärbten Substanz ermöglicht wird.

Photometrie dient also der Konzentrationsbestimmung von Substanzen in Lösung!

Was passiert mit dem absorbierten Licht in der absorbierenden Substanz?

Licht mit einer bestimmten Wellenlänge λ (und entsprechender Frequenz $\nu=c/\lambda$, c ist die Lichtgeschwindigkeit) repräsentiert nach Max Planck ein bestimmtes Energiequantum ($E = h \cdot \nu$). Wenn diese Energie der Differenz zwischen einem besetzten und einem energetisch höher liegenden unbesetzten Energiezustand (Orbital) der Elektronen einer Substanz entspricht, kann das Lichtquantum absorbiert werden und ein Elektron der Substanz wechselt in den höheren „**angeregten**“ Zustand.

Start

zurück

weiter

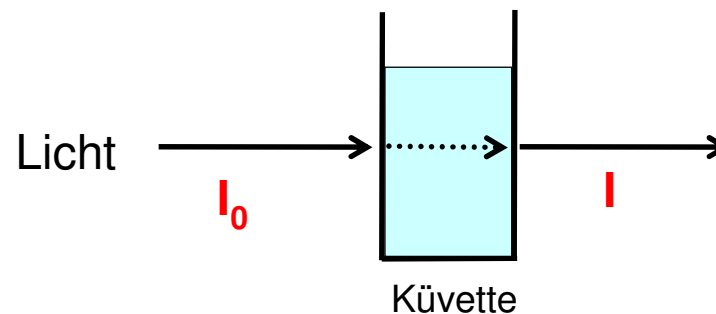
Seminar: Photometrie

Hauptgruppenelemente Teil II

Messprinzip: Licht mit bekannter Anfangsintensität (I_0) und einer bestimmten Wellenlänge wird durch die Probe geschickt. Durch Absorption nimmt die Lichtintensität ab und wird nach Durchgang durch die Probe gemessen (I). Je stärker diese Veränderung ist (d.h. je mehr Licht absorbiert wird), desto höher ist die Konzentration der gelösten Substanz. Das Verhältnis I/I_0 wird als Transmission T bezeichnet (T gibt die Durchlässigkeit an; meist als %-Wert angegeben).

I_0 = Anfangsintensität des Lichts

I = Lichtintensität nach Durchgang durch die Probe



Start

zurück

weiter

Seminar: Photometrie

Hauptgruppenelemente Teil II

Transmission: gibt an, wie viel der Lichtintensität nach Durchgang durch die Probe noch gemessen wird.

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Extinktion:

Von der Transmission leitet sich eine zweite, besonders wichtige Größe ab, die Extinktion. Die Extinktion E ist ein dimensionsloser Wert und wird direkt aus der Transmission berechnet. Meist ist das der Wert, welcher am Display des Photometers abgelesen.

$$E = -\lg T = \lg \frac{1}{T} = -\lg \left(\frac{I}{I_0} \right) = \lg \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

Start

zurück

weiter

Seminar: Photometrie

Hauptgruppenelemente Teil II

Die folgende Tabelle gibt einige Beispiele:

| I | Transmission | Durchlässigkeit | Extinktion | Deutung |
|------------|--------------|-----------------|------------|-------------------|
| I_0 | 1 | 100 % | 0 | Keine Absorption |
| $0,5 I_0$ | 0,5 | 50 % | 0,3 | Hälfte geht durch |
| $0,1 I_0$ | 0,1 | 10 % | 1 | 10 % gehen durch |
| $0,01 I_0$ | 0,01 | 1 % | 2 | 1 % geht durch |
| 0 | 0 | 0 % | ∞ | Totale Absorption |

Transmission und Extinktion sind stark abhängig von der Wellenlänge des eingestrahlten Lichts, da die gelöste Substanz nur Licht mit einer bestimmten Wellenlänge absorbiert (daher rührt auch die Farbe der Substanz). Erfasst man die Absorption in Abhängigkeit von der Wellenlänge in einem Diagramm, so erhält man ein Absorptionsspektrum. In der Praxis misst man bei der Wellenlänge, bei der die Substanz am stärksten absorbiert. Dieser Wellenlängenbereich ist auch der Bereich der größten analytischen Empfindlichkeit.

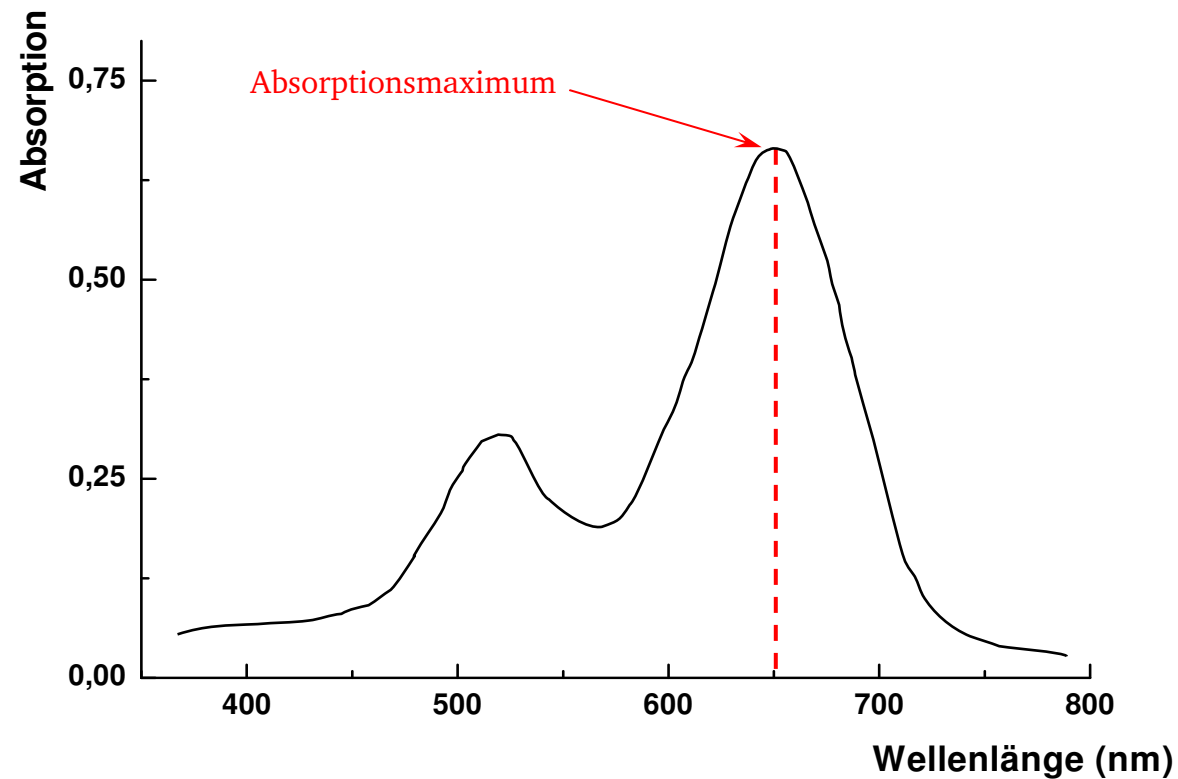
Start

← zurück

weiter →

Seminar: Photometrie

Hauptgruppenelemente Teil II



Start

zurück

Absorptionsspektrum einer Substanz über einen Wellenlängenbereich von etwa 350 nm – 780 nm. Das Absorptionsmaximum dieser Substanz liegt bei etwa 650 nm. Dies ist auch der Bereich der höchsten analytischen Empfindlichkeit für diese Substanz.

weiter

Seminar: Photometrie

Hauptgruppenelemente Teil II

Beispiel 1:

Wie groß ist die Extinktion einer Lösung, die 67 % der eingestrahlten Lichtintensität absorbiert?

Wenn 67 % absorbiert werden, so gehen 33 % der ursprünglichen Lichtintensität durch die Probe hindurch, d.h. $I = 0,33 I_0$

$$I = 0,33 I_0$$

$$T = 0,33 \approx \frac{1}{3}$$

$$E = -\lg\left(\frac{1}{3}\right) = \lg 3 \approx 0,5$$

Start

Werden 67 % der Anfangslichtintensität I_0 absorbiert, so kann man eine Extinktion von etwa 0,5 erwarten.

← zurück

weiter →

Seminar: Photometrie

Hauptgruppenelemente Teil II

Beispiel 2:

Wieviel % der eingestrahlten Lichtintensität wird absorbiert, wenn $E = 1,3$?

$$E = 1,3 = -\lg T$$

$$T = 10^{-1,3} = 10^{-1} * 10^{-0,3} = 0,1 * \frac{1}{2} = 0,05$$

Bei einer Extinktion von 1,3 gehen 5 % der ursprünglichen Lichtintensität durch die Probe durch, daher werden 95 % von der Anfangslichtintensität I_0 absorbiert.

Start

← zurück

weiter →

Seminar: Photometrie

Hauptgruppenelemente Teil II

2) Lambert-Beer'sches Gesetz:

Im medizinisch-chemischen Laboratorium interessieren uns die eingestrahlenen bzw. durchgelassenen Lichtintensitäten nur insoweit, als sie uns Aufschluss über die Konzentration der farbigen Substanzen geben sollen. Bei nicht allzu stark konzentrierten Lösungen gilt hier das Lambert-Beer'sche Gesetz: Die Extinktion ist proportional dem Produkt der Stoffmengen-Konzentration c und der Dicke d der absorbierenden Flüssigkeitsschicht:

$$E = \varepsilon * c * d$$

ε ist die Proportionalitätskonstante und wird als molarer Extinktionskoeffizient bezeichnet. Es ist eine vom jeweiligen Stoff abhängige Größe. Die Konzentration c wird wie üblich in der Einheit mol/L angegeben. Die Schichtdicke d beträgt bei den üblicherweise verwendeten Küvetten genau 1 cm. Die Extinktion E als logarithmisch definierte Größe ist dimensionslos (bzw. hat die Dimension 1). Daraus ergibt sich für die Dimension des Extinktionskoeffizienten:

$$\dim \varepsilon = \dim \left\{ \frac{1}{[(\text{mol/L}) * \text{cm}]} \right\} = \text{L} * \text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$$

Start

zurück

weiter

Seminar: Photometrie

Hauptgruppenelemente Teil II

Beispiel:

Wie groß ist die Konzentration einer Lösung, wenn bei einer Küvette mit $d = 1 \text{ cm}$ und $\epsilon = 2,2 \cdot 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ eine Extinktion $E = 0,55$ gemessen wird?

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

$$c = \frac{E}{(\epsilon \cdot d)}$$

$$c = \frac{0,55}{(2,2 \cdot 10^6 \cdot 1)}$$

$$c = 0,25 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L} = 0,25 \mu\text{mol/L}$$

Bei einer Extinktion von 0,55 beträgt die Konzentration dieser Lösung

0,25 $\mu\text{mol/L}$

Start

← zurück

weiter →

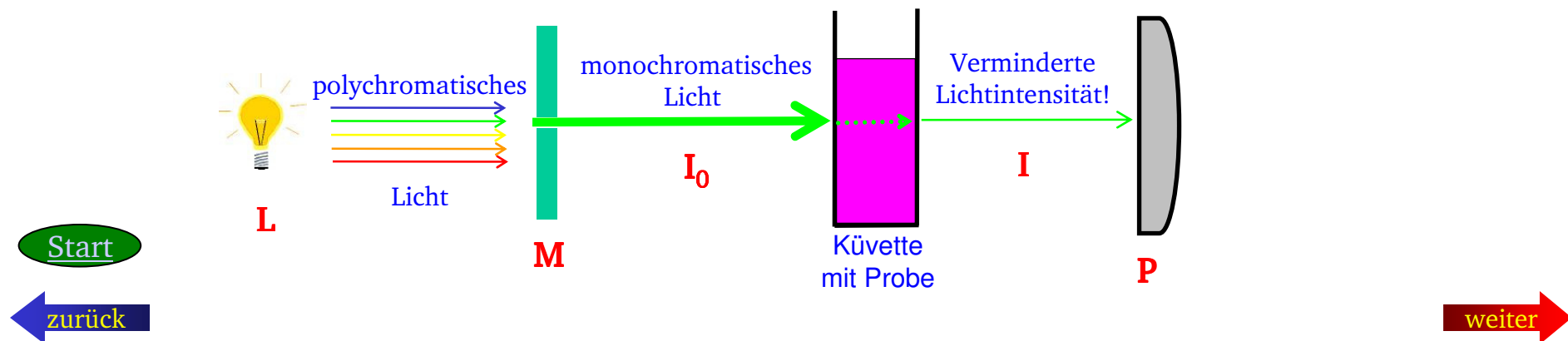
Seminar: Photometrie

Hauptgruppenelemente Teil II

3) Praktische Durchführung:

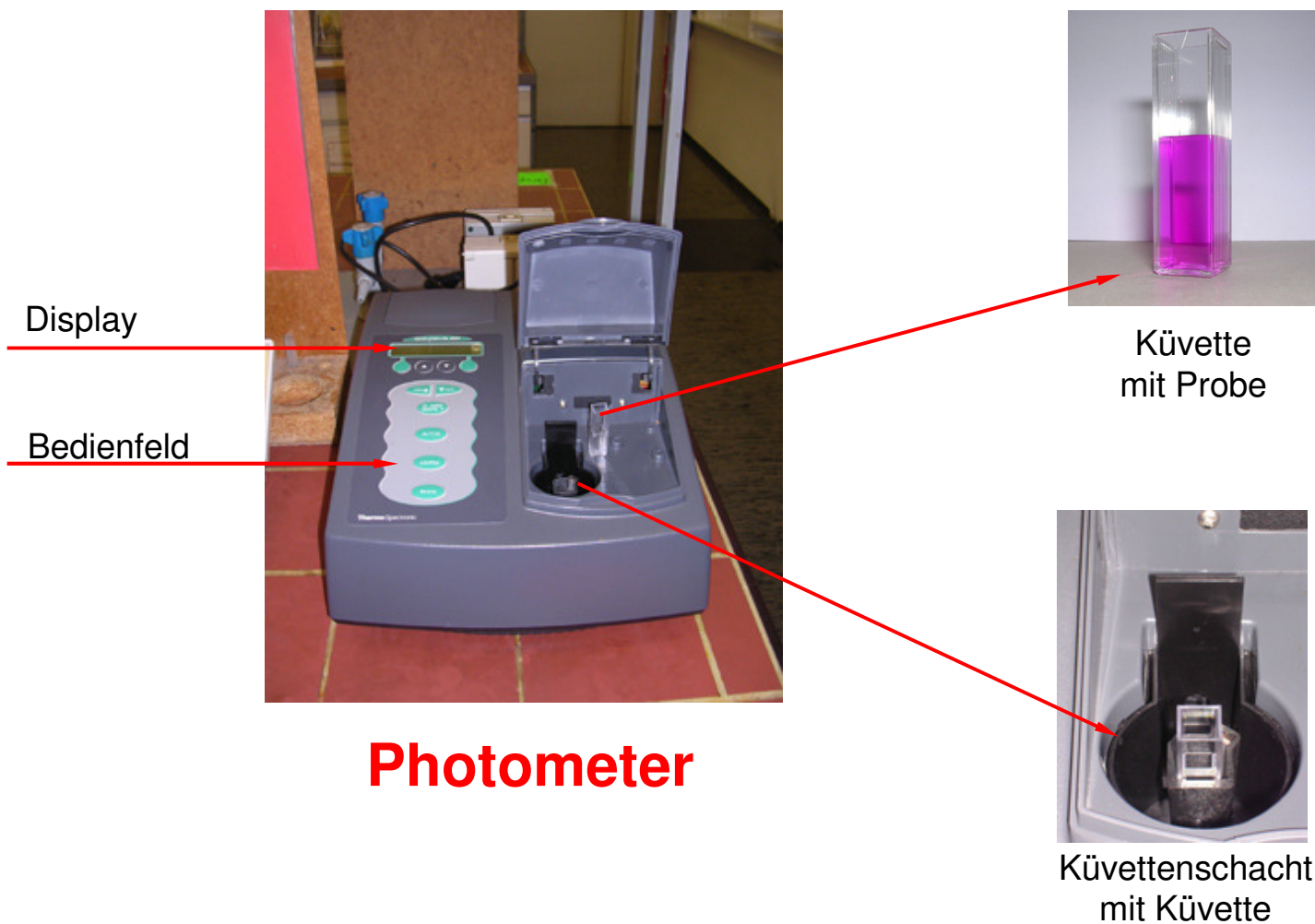
Das Photometer:

Wir verwenden zur Photometrie sogenannte **Photometer**. Diese Geräte bestehen aus einer **Lichtquelle (L)**, die meist polychromatisches Licht (= Licht mit vielen Wellenlängen) liefert. Dieses Licht passiert einen **Monochromator (M)**, eine Vorrichtung, die es gestattet, einen sehr engen Wellenlängenbereich (im Idealfall Licht mit nur einer einzigen Wellenlänge = monochromatisches Licht) aus dem polychromatischen Licht herauszufiltern. Dieses monochromatische Licht mit der Intensität I_0 wird nun durch die mit der Probe gefüllten Küvette durchgestrahlt und die durchgelassene Intensität I mittels einer **Photozelle (P)** gemessen. Am Messgerät wird üblicherweise bereits die Extinktion E abgelesen.



Seminar: Photometrie

Hauptgruppenelemente Teil II



Photometer

Start

zurück

weiter

Seminar: Photometrie

Hauptgruppenelemente Teil II

Konzentrationsbestimmung einer Substanz in Lösung:

Kennt man den molaren Extinktionskoeffizient ε , so kann man die Stoffmengen-Konzentration c nach dem Lambert Beer'schen Gesetz berechnen.

Wenn ε unbekannt ist, wird häufig eine sogenannte Eichgerade erstellt. Dabei wird eine Stammlösung der zu untersuchenden Substanz vorbereitet, von welcher die Konzentration bekannt ist. Diese Stammlösung wird weiterverdünnt, sodass man mehrere Aliquots (= Anteile) mit unterschiedlicher, jedoch bekannter Konzentration erhält. Diese Proben mit bekannter Konzentration (= Standards) werden photometrisch vermessen. Die erhaltenen Werte für die Extinktion E werden gegen die jeweilige Standardkonzentration in einem Diagramm aufgetragen. Anhand der Eichpunkte kann eine Ausgleichsgerade (= lineare Regressionsgerade) berechnet werden, wobei aus der Steigung der Geraden k die Konzentration von unbekanntem Proben errechnet werden kann. Alternativ kann der Messwert für die unbekannte Probe auch direkt in das Diagramm eingezeichnet und die Konzentration abgelesen werden.

Startzurückweiter

Theoretisch würde es genügen, eine einzige Standardlösung mit bekannter Konzentration herzustellen und entsprechend folgender Beziehung zu berechnen:

$$\frac{E_P}{E_S} = \frac{c_P}{c_S} \quad \text{bzw.} \quad c_P = \frac{E_P * c_S}{E_S}$$

E_S = Extinktion des Standards
 E_P = Extinktion der Probe
 c_S = bekannte Konzentration des Standards
 c_P = unbekannte Konzentration der Probe

In der Praxis ist dieses Verfahren allerdings zu ungenau. Daher erstellt man Eichgeraden mit mehreren Standardeichpunkten, um möglichst genaue Messergebnisse zu bekommen.

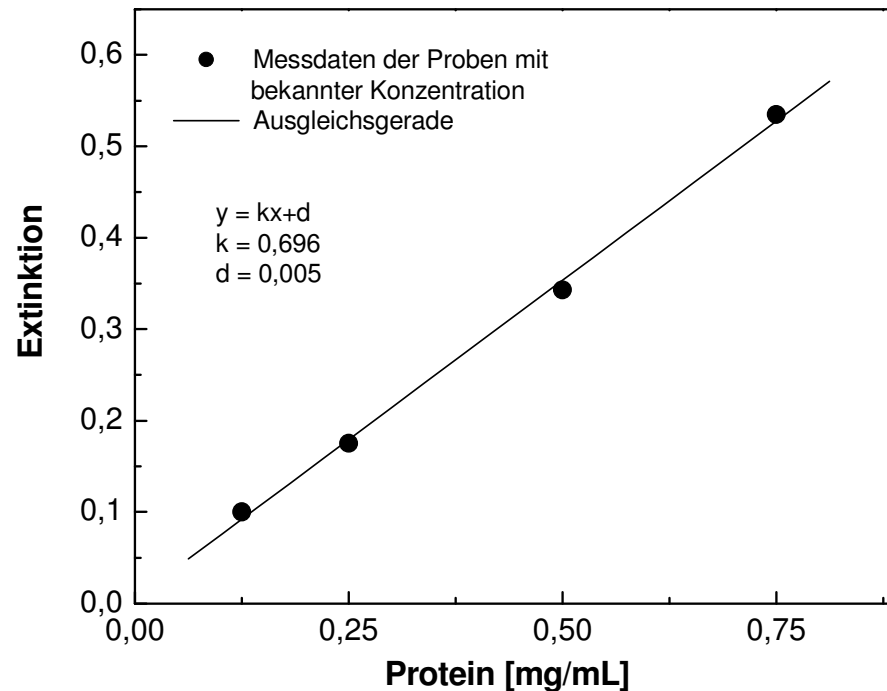
Start

← zurück

weiter →

Seminar: Photometrie

Hauptgruppenelemente Teil II



Eichgerade zur Bestimmung von Protein:

es wurden vier Standardproben mit **bekannter Konzentration** (0,125-0,750 mg/mL) photometrisch vermessen. Die Extinktionswerte werden in einem Diagramm aufgetragen und die Ausgleichsgerade berechnet. Anhand dieser Ausgleichsgerade kann mit der Geradengleichung $y = (k \cdot x) + d$ die Konzentration von unbekanntem Proben errechnet werden.

Start

zurück

weiter

Beispiel:

Anhand unserer Eichgerade für die Proteinbestimmung (s.o.) soll die Konzentration einer unbekanntes Proteinprobe bestimmt werden. Die Extinktion der unbekanntes Probe wurde mit $E = 0,406$ bestimmt.

Durch Berechnung der linearen Regressionsgerade kennen wir k ($= 0,696$) und d ($= 0,005$), wobei y = Extinktion und x = Konzentration [mg/mL].

$$y = (k * x) + d$$

$$x = \frac{(y - d)}{k}$$

$$x = \frac{(0,406 - 0,005)}{0,696}$$

$$x = 0,576 \text{ mg/mL}$$

Start

Die Konzentration der unbekanntes Proteinprobe beträgt 0,576 mg/mL

← zurück

weiter →