

GRUNDLAGEN DER SPEKTROPHOTOMETRIE

Materie erscheint uns farbig, wenn sie aus dem einfallenden weißen Licht einen bestimmten spektralen Teil absorbiert. Als Farbe nehmen wir den reflektierten Anteil des sichtbaren Spektrums (Komplementärfarbe) wahr. Bei Absorption wird ein bestimmter Energiebetrag ΔE aufgenommen, der von der Wellenlänge bzw. Frequenz der elektromagnetischen Strahlung abhängt.

$$\Delta E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (1)$$

h = Planck'sches Wirkungsquantum

ν = Frequenz der Strahlung

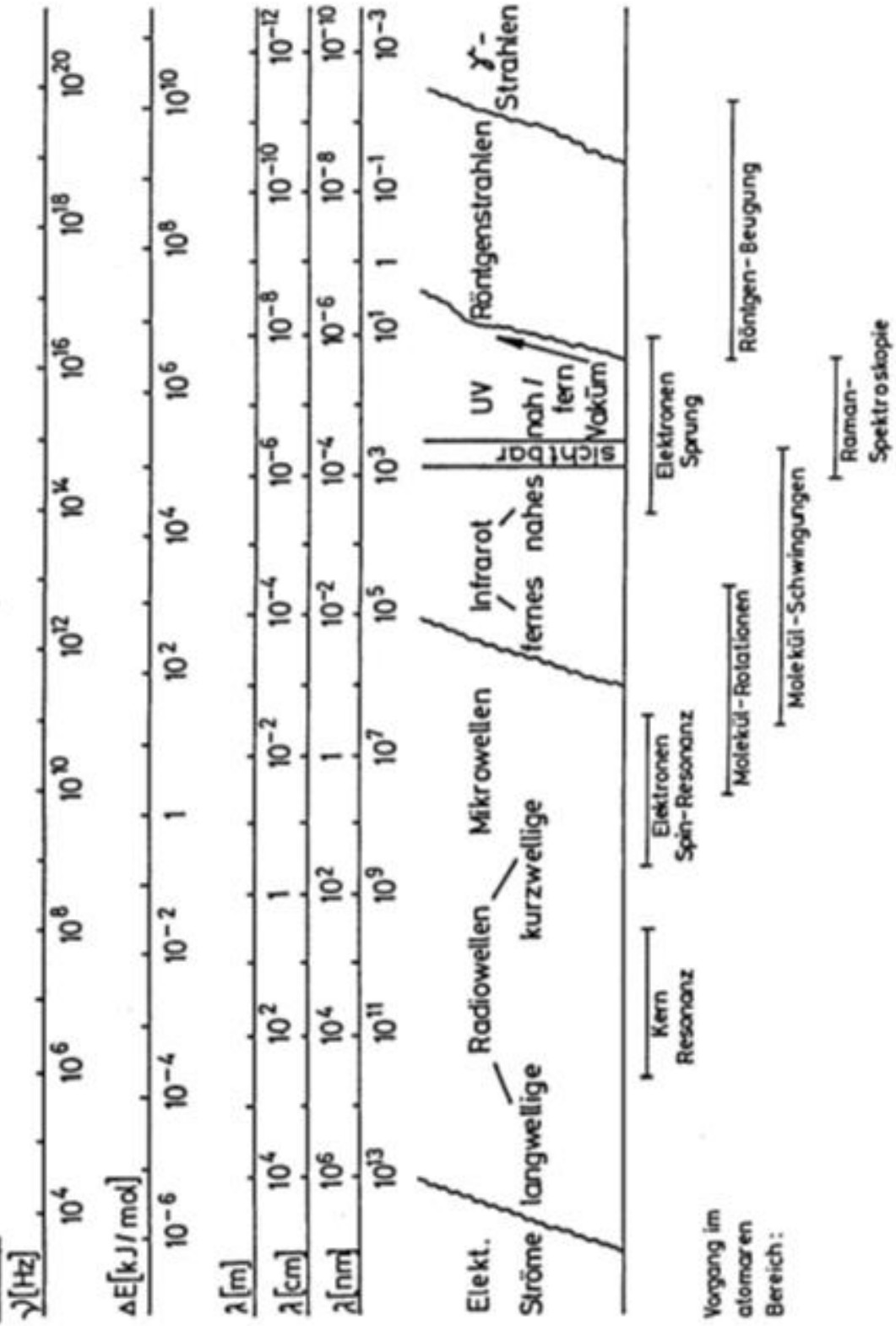
λ = Wellenlänge

c = Lichtgeschwindigkeit

In Abbildung 1 sind die gebräuchlichen Namen der Spektralbereiche des elektromagnetischen Spektrums, ihre Frequenzen (ν), Wellenlängen (λ) und die entsprechenden Energien ΔE zusammengestellt. In der Spalte unten sind die zugehörigen Vorgänge aufgeführt, die durch die Energie-Aufnahme bei den Molekülen oder Atomen ausgelöst werden. Man erkennt, dass den verschiedenen Spektralbereichen (= Energie-Bereichen) ganz bestimmte Vorgänge entsprechen. Ob und wie ein Molekül der elektromagnetischen Strahlung Energie und Elektronen-Sprünge, Schwingungen, Rotationen usw. entnehmen kann, hängt von der Struktur des Moleküls ab. Die Moleküle einer Sorte tragen deshalb die Absorption in Abhängigkeit von der Wellenlänge der elektromagnetischen Strahlung (Absorptionsspektrum der Molekül-Sorte) wie eine Identitätskarte mit sich, sodass umgekehrt Absorptionsspektren zur Identifizierung von Stoffen verwendet werden können. Wir beschränken uns im Folgenden auf eine kurze Besprechung der im Versuch angewandten Spektrometrie im sichtbaren Bereich, also zwischen 400 nm und 800 nm. Im Bereich der sichtbaren (und ultravioletten) Strahlung erfolgt Absorption durch Elektronen-Sprung (Elektronenanregung), d.h. durch Anheben von Elektronen aus einem tiefer gelegenen Energieniveau auf ein höheres. Nach der Quantentheorie sind diese Sprünge für jede Atomsorte nur zwischen bestimmten ("diskreten") Energieniveaus möglich. Die Wellenlänge λ , bei der Absorption erfolgt, ist nach Gleichung (1) ein Maß für den Abstand der Energiezustände vor dem Sprung und nach dem Sprung. Die größten Energiedifferenzen findet man bei der Anregung der fest gebundenen σ -Elektronen (UV-Bereich, 120 - 200 nm). Die weniger fest gebundenen π -Elektronen in konjugierten Systemen (das sind solche Molekülgerüste, in denen mehrere Doppelbindungen durch je eine Einfachbindung voneinander getrennt sind) absorbieren im Bereich zwischen 200 nm und 700 nm. Zahlreiche biologisch wichtige Substanzen absorbieren aufgrund ihrer konjugierten

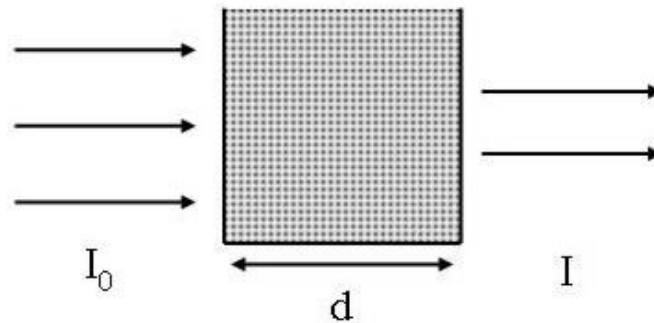
Doppelbindungen in diesem Spektralbereich. Im Gegensatz zu Atomen, deren Elektronen-Sprung-Spektren im Sichtbaren aus einzelnen Linien bestehen (Linien-Spektrum), zeigen Moleküle Absorption in breiten Banden (Banden-Spektrum). Die Ursache für diesen Unterschied ist, dass mit dem Elektronen-Sprung in Molekülen immer auch Änderungen des Schwingungs- und Rotationszustands der Moleküle auftreten. Die Absorptionsbanden von Molekülen bestehen also aus vielen dicht benachbarten Absorptionslinien, die vom Spektrometer wegen ihres geringen Abstands nicht einzeln aufgelöst, sondern als eine breite Bande wiedergegeben werden.

Abb.1 ELEKTROMAGNETISCHES SPEKTRUM, WECHSELWIRKUNG MATERIE - LICHT



QUANTITATIVE BEHANDLUNG DER ABSORPTION: LAMBERT-BEER'SCHES GESETZ

Ein monochromatisches Strahlenbündel hinreichender Querausdehnung mit der Ausgangsintensität I_0 durchdringe eine verdünnte Lösung der Dicke d eines absorbierenden Stoffes in einem nicht absorbierenden Lösungsmittel.



Die durchgelassene Lichtintensität

$$\text{Transmission} = \frac{I}{I_0}$$

nimmt exponentiell mit steigender Konzentration des gelösten Stoffes oder bei konstanter Konzentration mit zunehmender Schichtdicke der Küvette ab:

$$I = I_0 \cdot \exp(-\varepsilon \cdot d \cdot c)$$

Nach Logarithmieren und Umformen der Gleichung gilt:

$$2,3 \cdot \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot d \cdot c = E \quad (2)$$

Diese Gleichung drückt das **Lambert-Beer-Gesetz** aus, wobei

- I_0 : Intensität der Strahlung vor Eintritt in die Lösung
- I : Intensität der Strahlung nach Durchdringen der Schichtdicke d
- d : Schichtdicke der Lösung (z.B. Küvettenmaß) in cm
- c : Konzentration der absorbierenden Substanz in mol l^{-1}
- ε : molarer Extinktionskoeffizient in $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
- E : Extinktion

Die durch die Gleichung (2) definierte physikalische Größe ε wird molarer Extinktionskoeffizient der absorbierenden Substanz bei der Wellenlänge λ genannt und in der Einheit $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ angegeben. Im Idealfall ist ε eine unter definierten Messbedingungen (Temperatur, Lösungsmittel, pH usw.) nur von der absorbierenden Substanz und der Wellenlänge λ der monochromatischen Strahlung, nicht aber von c und d abhängige Konstante. Sie ist als Stoffkonstante für zahlreiche Substanzen tabelliert.

Die Tatsache, dass viele organische Stoffe hohe ε -Werte haben, ermöglicht die Bestimmung von extrem niedrigen Konzentrationen. Dieser physikalische Vorteil wird in der Biochemie ausgenutzt und bildet die Grundlage der Spektrophotometrie.

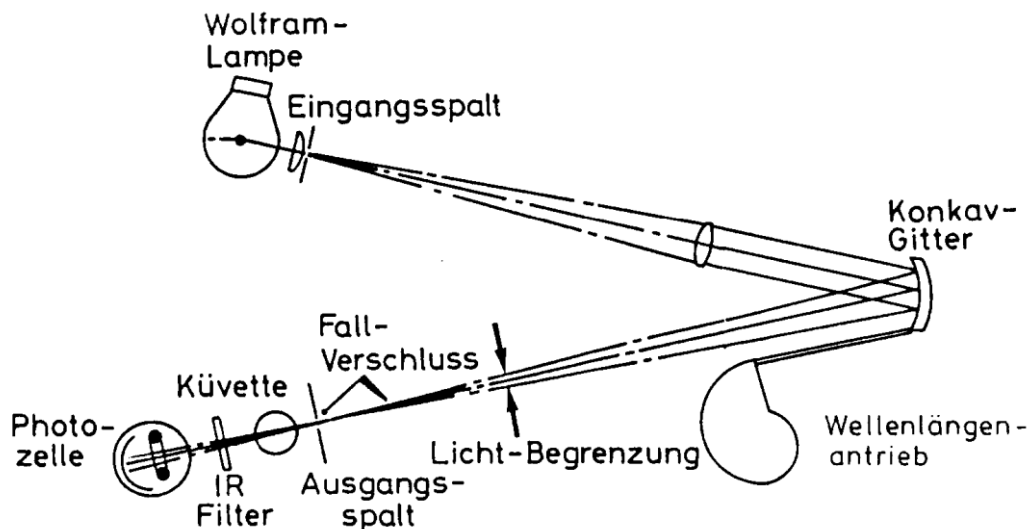
GÜLTIGKEIT DES LAMBERT BEER'SCHEN GESETZES:

- a) nur für monochromatische Strahlung, d.h. die zur Messung der Lichtabsorption in der Probe verwendete elektromagnetische Strahlung darf nur eine Wellenlänge haben,
- b) nur für verdünnte Lösungen. Bei höheren Konzentrationen des absorbierenden Stoffes treten bei allen Stoffen Abweichungen vom linearen Zusammenhang zwischen E und c auf; diese Kurven sind gekrümmt, d.h. E ist dann auch von c abhängig. Ursache dieses Verhaltens sind Wechselwirkungen zwischen den absorbierenden Teilchen (Aggregation, Dissoziation u.ä.), veränderte Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel (Solvationsgrad u.ä.).

Der Gültigkeitsbereich des linearen Zusammenhangs zwischen E und c muss im Einzelfall empirisch ermittelt werden.

Aufgrund der großen Empfindlichkeit, des geringen Zeitaufwandes und der breiten Anwendbarkeit gehört die Spektrophotometrie als Analysemethode zu den im biochemischen Labor am häufigsten benutzten Techniken. Den meisten Übungen im Praktikum liegen spektrophotometrische Messungen zugrunde. Das dabei benutzte Gerät ist das Spektrophotometer.

Abb. 2: Schematischer Aufbau eines Spektrophotometers



Das von einer Lampe erzeugte Licht wird durch eine Linse gesammelt und auf den Eingangsspalt fokussiert. Eine zweite Linse bildet den Eingangsspalt auf den Ausgangsspalt ab, nachdem die parallelen Lichtstrahlen am Konkav-Gitter gebeugt worden sind. Die Stellung des Gitters kann über eine Exzenter-Scheibe mit dem Wellenlängen-Transport verändert werden. Vor dem Ausgangsspalt befinden sich noch im Lichtweg eine Blende zur Intensitäts-

Begrenzung und ein Fallbügel, der den Lichtweg freigibt, wenn eine Küvette eingesetzt ist. Direkt hinter dem Ausgangsspalt durchstrahlt das Licht die Probe. Das dahinter befindliche im Infrarot-Teil des Spektrums durchlässige Filter hat die Aufgabe, die unerwünschte (Fehlmesung!) Aufheizung der Photozelle zu verhindern. Der durch den Lichteinfall in die Photozelle erzeugte Photostrom wird durch ein Galvanometer auf einer in % Transmission (= $100 \times T$) und Extinktion E (englisch: absorbance) geeichten Skala des Gerätes angezeigt.

Das Spektrophotometer ist somit ein Instrument, das Konzentrationsbestimmungen durch Messung der Lichtdurchlässigkeit bei verschiedenen Wellenlängen erlaubt. Je nach Art der Erzeugung der monochromatischen Strahlung im Gerät unterscheidet man Gitter- und Prismen-Spektrophotometer. In der Biochemie gebräuchliche Geräte erfassen den Spektralbereich zwischen 200 nm und 800 nm.

HAUPTANWENDUNGSBEREICHE DER SPEKTROPHOTOMETRIE SIND:

- a) Bestimmung der Absorption von Strahlung durch eine Probe in Abhängigkeit von der Wellenlänge (Absorptionsspektrum) zur **qualitativen Identifizierung** der Probe.
- b) **Bestimmung der Konzentration** einer absorbierenden Probe mittels Eich-Kurve oder bekanntem Extinktionskoeffizienten.

Die Extinktion E ist der Konzentration des absorbierenden Stoffes direkt proportional. Im Bereich der Gültigkeit des LAMBERT Beer'schen Gesetzes ergibt E, als Funktion von c aufgetragen, eine Gerade mit der Steigung $\varepsilon \cdot d$. Man benutzt diesen Zusammenhang, um mit Hilfe der Extinktions-Messungen nach Anlegen einer Eich-Geraden unbekannte Konzentrationen eines absorbierenden Stoffes zu bestimmen. Wenn ε für die zu untersuchende Substanz bekannt ist, lässt sich die Konzentration anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes sofort ermitteln:

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d}$$

Wenn die zu untersuchende Probe für die photometrischen Bestimmungen verdünnt werden muss, ist der Verdünnungsfaktor bei der Berechnung der Konzentration zu berücksichtigen.

- c) **Kinetische Messungen** durch Bestimmung der zeitlichen Änderung der Konzentration einer absorbierenden Probe. Wenn während der enzymatischen Reaktion die Absorptionsänderung eines Reaktionsteilnehmers erfolgt (z.B. bei Reaktionen wie die Oxidation - Reduktion, Protonierung - Deprotonierung usw.), kann die Reaktionsgeschwindigkeit durch Verfolgung der zeitlichen Änderung der Absorption bestimmt werden. Nach dem Lambert-Beer-Gesetz kann man sagen: E ist c proportional, also wird ΔE auch Δc proportional sein.

BEDIENUNG DES PHOTOMETERS HELIOS EPSILON

1. Gerät am Kippschalter auf der Rückseite einschalten
2. Mit den Druckknöpfen links und rechts vom Sonnensymbol die gewünschte Wellenlänge einstellen.
3. Die **geriffelten Seiten** der Küvette müssen beim Einsetzen in das Photometer nach rechts und links zur Seite zeigen.
4. Eine Küvette gegebenenfalls mit dem Leerwert in den Küvettenhalter stellen.
Anmerkung: Pfeilangabe für den Lichtweg beachten.
5. Küvettendeckel schließen und „Zero“ drücken. Der Leerwert wird auf 0.00 A gesetzt.
6. Die Küvette mit der Analyselösung in den Küvettenhalter stellen, Deckel schließen und die Absorptionen (Extinktionen) ablesen.