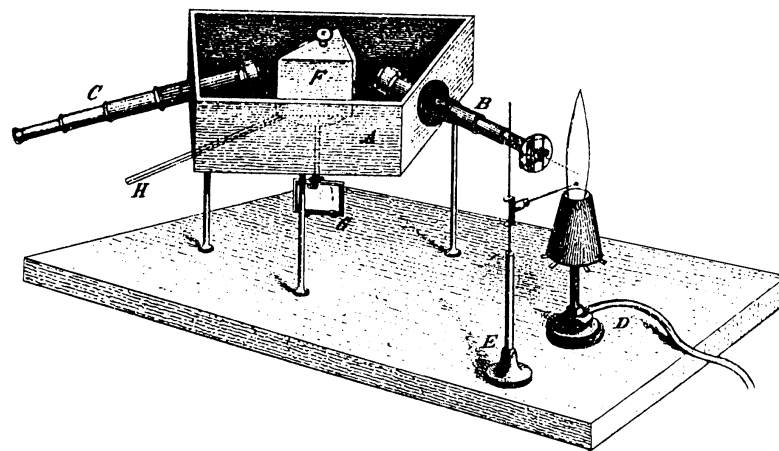


SPEKTRALPHOTOMETRIE



Prismenspektralapparat von Kirchhoff (ca. 1860)

SPEKTRALPHOTOMETRIE

Um eine fundierte Diagnose stellen zu können, werden oft Körperflüssigkeiten (Blut, Urin usw.) analysiert. Die mit Abstand am häufigsten angewandte Analysenmethode der klinisch-chemischen Laboratoriumsdiagnostik ist die Spektralphotometrie.

Der vorliegende Versuch soll mit den physikalischen Apparaten und mit den Anwendungen unter medizinischen und biologischen Aspekten vertraut machen. Sie können auch mit dem hier zur Verfügung stehenden Apparaten die Transmission Ihrer Sonnenbrille oder Ihres eigenen Blutes aufnehmen.

Die hier vermittelten Grundkenntnisse sind nicht nur für den Laborarzt von Interesse, sondern nahezu für jeden Mediziner oder Biologen, da zu einer sorgfältigen Beurteilung von Laborwerten die Kenntnis der angewandten Analyseverfahren gehört.

Bei diesem Versuch wird von Ihrem Betreuer besonders auf eine übersichtliche und saubere Versuchsdurchführung geachtet werden; die Gesamtbewertung der Versuchsauswertung wird von der Versuchsdurchführung abhängen.

Spitze Abfallgegenstände (Kanülen, Glasteile usw.) in speziellen Behältern deponieren.
Nicht in den normalen Abfalleimer werden!!!

1 Grundlagen

1.1 Begriffe

Sichtbares Licht ist der Bereich elektromagnetischer Strahlung, den wir mit dem Auge direkt wahrnehmen. Als Licht bezeichnen wir häufig auch noch solche Bereiche des elektromagnetischen Spektrums, die wir nicht sehen, wie das Ultraviolett- bzw. das Infrarotlicht, besser spricht man von UV- bzw. IR-Strahlung.

Zerlegt man weißes Licht beispielsweise mit einem Prisma, ergibt sich ein farbiges Spektrum mit folgenden Zuordnungen:

	Farbe	Wellenlänge nm
<i>Tabelle 1: Zuordnung Farbeindruck - Wellenlänge</i>		
	UV-Strahlung	<380
	violett	380-450
	blau	450-500
	grün	500-570
	gelb	570-590
	orange	590-620
	rot	620-780
	IR-Strahlung	>780

Je nach Anforderungen werden in der Spektralphotometrie sichtbares Licht bzw. UV- oder IR-Strahlen eingesetzt. Im folgenden ist die Rede von Licht bzw. Lichtintensität. Diese beiden Begriffe sind ganz gut verständlich, aber nicht eindeutig definiert. Streng genommen müßte man an ihre Stelle den Begriff Strahlungsfluß setzen, was aber für diese Arbeitsunterlagen keinen besonderen Gewinn bringt.

Fällt Licht auf ein optisch klares (d.h. nicht trübes) Medium, so wird es teilweise reflektiert, teils absorbiert, teils transmittiert. Bezeichnet man mit I_o das auffallende bzw. eingestrahlte Licht, mit I_{re} , I_{ab} und I_{tr} das reflektierte, absorbierte und transmittierte Licht, so muß aus Energiegründen gelten:

$$\text{Formel (1)} \quad I_o = I_{re} + I_{ab} + I_{tr}$$

Die in der Medizin sehr stark verwendete Absorptionsphotometrie beschäftigt sich damit, das in einem Medium (meist Lösung) absorbierte Licht zu bestimmen, indem das transmittierte Licht gemessen wird. Die Reflektionsphotometrie spielt z.B. in der Dermatologie eine gewisse Rolle, wenn es darauf ankommt, das von der Haut reflektierte Licht auszumessen.

Jede Substanz absorbiert oder reflektiert aufgrund ihrer Struktur Licht bestimmter Wellenlängenbereiche in einer ganz charakteristischen Weise. Das auf die Substanz fallende Licht regt die Atome bzw. Moleküle an; sie werden energiereicher. Die bei der Anregung aufgenommene Energie wird dann meist in Form von Wärme, manchmal auch wieder als sichtbare Strahlung (Fluoreszenz) abgegeben.

SPE

Strahlt man weißes Licht auf eine Substanz ein, die in bestimmten Wellenlängenbereichen absorbiert (sog. Absorptionsbanden), erscheint die Substanz farbig.

Der Farbeindruck kann dabei auf zweierlei Weise zustande kommen. Einmal kann eine rote Lösung deswegen rot erscheinen, weil sie nur rotes Licht (ca. 650 nm) durchläßt, sie kann aber auch rot aussehen, weil sie das dem roten komplementäre Licht (grünblau bei ca. 520 nm) absorbiert. Das durchgelassene Restlicht vermittelt den Gesamteindruck rot (vgl. Abb. 1).

Rot	(656 nm)	Grünblau	(520 nm)

Orange	(607 nm)	Eisblau	(490 nm)

Goldgelb	(574 nm)	Blau	(492 nm)

Gelb	(564 nm)	Indigoblau	(462 nm)

Grüngelb	(546 nm)	Violett	(<433 nm)

Blaugrün bis Gelbgrün	(500 nm bis 560 nm)	Purpur (Mischfarbe aus 2 Spek- tralfarben, z.B. Violett + Rot)	

Tabelle 2: Komplementärfarben nach Helmholtz

Trägt man die Transmission gegen die Wellenlänge auf, so erhält man ein sog. Transmissionspektrum. Für eine rot erscheinende Lösung können sich folgende Transmissionspektren ergeben:

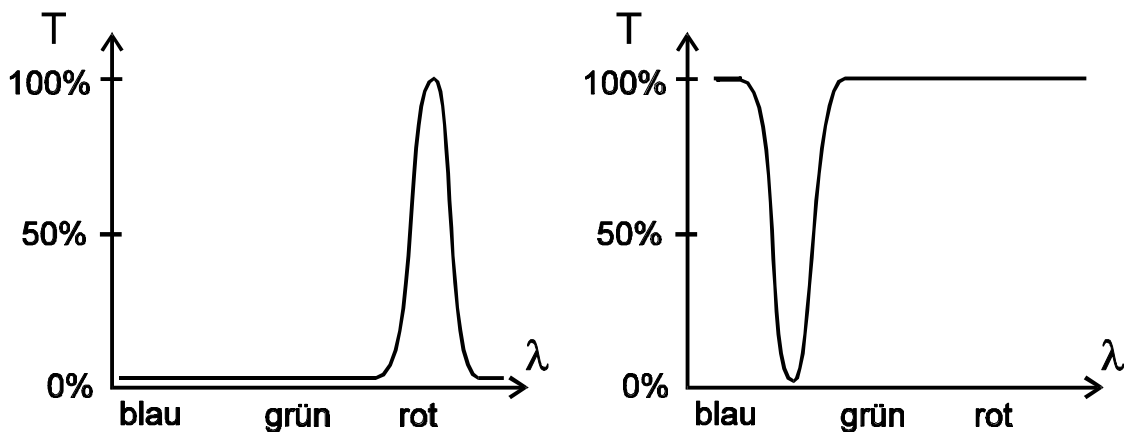


Abb. 1: Qualitatives Transmissionspektrum von rot erscheinenden Lösungen.

Die Bestimmung der Transmission einer Substanz als Funktion der Wellenlänge des eingestrahlt Lichts läßt also Rückschlüsse auf die Art der Substanz zu. Man spricht von einer qualitativen Analyse.

1.1.1 Präzisierung der Begriffe Transmission und Absorption

Streng definiert man die sog. Reintransmission τ als das Verhältnis des aus einem Medium austretenden Strahlungsflusses Φ_a zum eingedrungenen Strahlungsfluß Φ_e

$$\text{Formel (2)} \quad \tau(\lambda) = \frac{\Phi_a}{\Phi_e}$$

In der Spektralphotometrie gibt man meist die Transmission in Prozent an:

$$\text{Formel (3)} \quad T = \tau \cdot 100\%$$

Beachten Sie Unterschied in den Zahlenwerten zwischen T und τ (Faktor 100).

Als Reinabsorption α wird entsprechend das Verhältnis des in einem Medium absorbierten Lichts $\Delta\Phi = \Phi_e - \Phi_a$ zum eingedrungenen Licht Φ_e bezeichnet:

$$\text{Formel (4)} \quad \alpha(\lambda) = \frac{\Delta\Phi}{\Phi_e} = \frac{\Phi_e - \Phi_a}{\Phi_e} = 1 - \tau(\lambda)$$

Reintransmission und Reinabsorption ergänzen sich gerade zu eins. Die Reflexion spielt bei diesen Begriffen keine Rolle.

In der Umgangssprache wird unter absorbiertem Licht häufig die Summe aus reflektiertem und absorbiertem Licht verstanden, bzw. unter transmittiertem Licht das durch ein Medium hindurchgelassene Licht (unter Einbezug von Reflektions- und Absorptionsverlusten). Glücklicherweise ist der tatsächliche Unterschied zwischen beiden Transmissionsbegriffen meist ziemlich gering. Bei einer qualitativen Analyse würde sich im Spektrum die Form der Kurve kaum ändern.

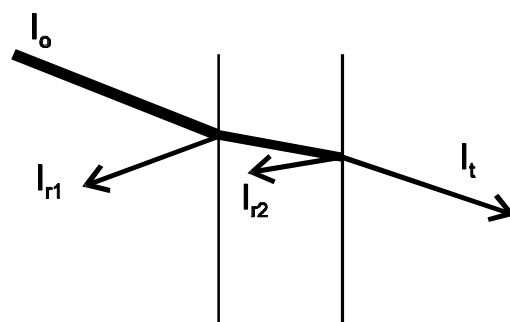
Darüberhinaus gibt es bequeme Meßverfahren, um die in der Wissenschaft und auch der medizinischen Diagnostik interessierende Reintransmission bzw. Reinabsorption einer Lösung zu erhalten.

1.2 Reflexion an Grenzflächen

Stellen Sie sich ein gefärbtes Sonnenbrillenglas vor, auf das ein Lichtstrahl auftrifft. Zur Verdeutlichung lassen wir den Lichtstrahl schräg auftreffen (Abb. 2). Es gilt Gleichung (1).

$$I_o = I_{re} + I_{ab} + I_{tr}$$

Abb. 2: Ein schräg auf ein Glas fallender Lichtstrahl wird an Vorder- und Hinterfläche reflektiert



An der ersten Grenzfläche zwischen Luft und Glas wird ein Teil I_{r1} des Lichts reflektiert. Im Glas wird I_a absorbiert. An der zweiten Grenzfläche (Glas-Luft) wird ein Teil I_{r2} reflektiert. Das austretende Licht ist I_t . (Übrigens handelt es sich hier nicht um das reintransmittierte Licht, was aber für die folgenden Betrachtungen keine Rolle spielt.) Der Anteil des reflektierten Lichts läßt sich berechnen. Fällt ein Lichtstrahl aus einem Medium mit der Brechzahl n_1 senkrecht auf die Grenzfläche eines Mediums mit der Brechzahl n_2 , so ist der Reflexionsgrad ρ definiert als

$$\text{Formel (5)} \quad \rho(\lambda) = \frac{(n_2 - n_1)^2}{(n_2 + n_1)^2}$$

Der reflektierte Anteil des Lichts I_{r1} berechnet sich dann zu $I_{r1} = \rho \cdot I_0$. Ist das Medium 1 Luft ($n_1 = 1,000$), ergibt sich also ein Reflexionsgrad von

$$\rho = \left(\frac{1,523 - 1,000}{1,523 + 1,000} \right)^2 = 0,043 = 4,3\%$$

d.h. es werden ca. 4% des einfallenden Lichts an der ersten Grenzfläche reflektiert; ca. 96% dringen also in das Medium ein. Beim Austreten des Lichts aus dem Medium 2 wieder in das Medium 1 hinein, wird ebenfalls gemäß Formel (5) das Licht reflektiert, d.h. von dem auf diese Grenzfläche auftreffenden Licht werden im Falle eines Glases in Luft ebenfalls 4% reflektiert. Unter Vernachlässigung von Absorption im Glas sowie Mehrfachreflexion treten durch ein Glas nur ca. 92% der auftreffenden Lichtintensität durch.

Bei hochwertigen optischen Geräten mit vielen reflektierenden Grenzflächen (Kameraobjektive usw.) und auch bei Brillengläsern stören die Reflexionen teilweise erheblich.

Man kann den Anteil des reflektierten Lichts vermindern, indem man die Optik vergütet. Dabei wird eine oder mehrere dünne Schichten einer Substanz mit einer zwischen den Brechzahlen beider Medien liegenden Brechzahl auf die Grenzflächen gebracht. Dadurch werden Reflexe z.T. stark vermindert, aber nicht völlig beseitigt.

1.3 Absorption und Schichtdicke

Im folgenden wird der Begriff Transmission bzw. Absorption in der Bedeutung von Reintransmission bzw. Reinabsorption verwendet.

Gleich dicke Schichten einer Substanz absorbieren bei konstanten Meßbedingungen gleich viel. Wieviel wird bei Verdoppelung der Schichtdicke absorbiert?

Nehmen wir als Beispiel ein gefärbtes Glas der Schichtdicke d , in dem 30% absorbiert werden, d.h. $T = 70\%$ ($\tau = 0,7$). Bei Verdoppelung der Schichtdicke (das ist nicht dasselbe, als wenn man zwei gleich dicke Gläser hintereinander stellt!) wird durch die erste Hälfte der Schicht 70% durchgelassen, durch die zweite Hälfte der Schicht von diesen 70% wieder 70% durchgelassen, d.h. insgesamt $0,7 \cdot 0,7 \cdot 100\% = 49\%$ durchgelassen. Ver-n-facht ($n =$ natürliche Zahl) man die Schichtdicke werden noch $0,7^n \cdot 100\%$ durchgelassen bzw. allgemein $\tau^n \cdot 100\%$.

Bezeichne I_e das in das Glas eingetretene Licht und I_a das aus dem Glas austretende Licht, so kann man schreiben

Formel (6) $I_a = I_e \cdot \tau^n$

Setzt man $K = -\ln \tau$ bzw. $\tau = e^{-K}$ und macht außerdem einen Übergang von ganzzahligen n zu kontinuierlichen Schichtdicken x , läßt sich die Gleichung (6) umschreiben in

Formel (7) $I_a = I_e \cdot e^{-K \cdot x}$

Diese Gleichung heißt das Bouguer-Lambertsche Gesetz (manchmal auch nur Lambert-sches Gesetz). Es lautet in Worten allgemein formuliert:

In einem homogenem Medium wird das eingetretene Licht I_e längs des Weges x exponentiell geschwächt.

Die Schichtdicke x ist nun als eine kontinuierliche Variable angenommen. In Gleichung (6) war sie zunächst diskret; der Übergang diskret-kontinuierlich ist hier unproblematisch.

Die Konstante K (der Schwächungskoeffizient) wird allgemein als Extinktionskonstante bezeichnet und hat die Dimension Länge⁻¹ (Einheit m⁻¹ oder cm⁻¹), da das Argument der Exponentialfunktion dimensionslos sein muß. K ist von den Eigenschaften des absorbierenden Stoffes und von der Wellenlänge des verwendeten Lichts abhängig.

Der Kehrwert von K - $a = 1/K$ - wird als mittlere Eindringtiefe (Reichweite) bezeichnet. Sie entspricht der Strecke, nach der die einfallende Strahlung auf den 1/e-ten Wert ($1/e=1/2,7=0,37=37\%$) abgesunken ist.

Das exponentielle Schwächungsgesetz gilt sinngemäß für viele Absorptionsvorgänge (Absorption von Radiowellen, Röntgenstrahlen, Schallwellen usw.).

1.4 Absorption und Konzentration

Eine Substanz kann in verschiedener Konzentration in einer Lösung oder in einem anderen Festkörper vorliegen.

Transmission bzw. Absorption und damit auch die Extinktionskonstante von Lösungen hängen von der Konzentration c des gelösten Stoffes ab. Näherungsweise gilt für stark verdünnte Lösungen das Beersche Gesetz:

Formel (8) $K = k \cdot c$ $k =$ Proportionalitätskonstante

In Worten formuliert: Die Extinktionskonstante K ist bei vielen Lösungen und bei kleinen Konzentrationen ($c < 10^{-2}$ mol/l) der Konzentration des gelösten Stoffes proportional.

Damit wird Gleichung (7) zu:

Formel (9) $I_a = I_e \cdot e^{-k \cdot c \cdot x}$

SPE

Als nützliche Vereinfachung dieser Gleichung führt man den Begriff der Extinktion E ein. Man definiert:

$$\text{Formel (10)} \quad E = -\log(I_a/I_e)$$

Setzt man Gleichung (9) in Gleichung (10) ein, so ergibt sich durch mathematische Umformung:

$$\text{Formel (11)} \quad E = -\log e^{-k \cdot c \cdot x} = k \cdot c \cdot x \cdot \log e = \epsilon \cdot c \cdot x$$

wobei $k \cdot \log e = \epsilon$ gesetzt wurde. Damit lautet das Bouguer-Lambert-Beersche Gesetz (manchmal auch nur Lambert-Beersche-Gesetz genannt):

$$\text{Formel (11)} \quad E = \epsilon \cdot c \cdot x$$

In Worten formuliert: Die Extinktion E einer monochromatischen Strahlung ist (in Grenzen) dem Produkt aus der Konzentration c und der Schichtdicke x einer Lösung proportional.

Die Konstante ϵ heißt Extinktionskoeffizient (oder auch molare Extinktion) und ist eine für jede Stoffart spezifische Größe: sie ist wellenlängenabhängig (d.h. $\epsilon = \epsilon(\lambda)$).

Einheiten:	Extinktion E	Einheit 1 (eins)
	Extinktionskoeffizient ϵ	m ² /mol (üblicher ist cm ² /μmol)
	Konzentration c	mol/l (mol/liter)
	Schichtdicke x	m oder cm

Hinweis: Auf Photometern mit Analoganzeige sind häufig Skalen für die Extinktion E und für die Transmission T (in Prozent) vorhanden. Der Zusammenhang ist gemäß Gleichung (2), (3) und (10) logarithmisch:

$$\text{Formel (12)} \quad E = -\log(I_a/I_e) = -\log \tau = 2 - \log T$$

<u>Zahlenbeispiele:</u>	$\tau = 1$	d.h. T = 100%	folgt	E = 0
	$\tau = 0,5$	T = 50%		E = 0,301
	$\tau = 0,1$	T = 10%		E = 1
	$\tau = 0,01$	T = 1%		E = 2

Ablesungen der Extinktion auf einer analogen Skala sind nur bis ca. 1,2 hinreichend genau.

2 Beschreibung des Spektralphotometers

Die physikalischen Grundlagen, die in der folgenden Beschreibung vorkommen (geometrische Optik, Beugung, Gitter, Photodiode) können im Rahmen dieser Unterlagen nicht erklärt werden. Bitte orientieren Sie sich in einem Lehrbuch.

Der Glühfaden einer Wolfram-Fadenlampe (16; vgl. Abb. 3a und b) erzeugt ein weißes (polychromatisches) Lichtbündel, das durch eine Rechteckblende (17) fällt. Das divergierende Strahlenbündel wird von der Kollimatorlinse (10) parallel ausgerichtet, geht durch das zu messende Filter oder Küvette (8) und wird am Gitter (5) gebeugt. Die anschließende Kollektorlinse (4) fokussiert das Strahlenbündel auf den Austrittsspalt (27). Das Licht tritt anschließend durch einen weiteren Schlitz (29; dient zur Streu- bzw. Falschlichtreduktion) und fällt endlich auf eine Photodiode (30). Diese setzt die eintreffende Lichtintensität in elektrischen Strom um, der auf dem digitalen Meßinstrument (15) abgelesen werden kann.

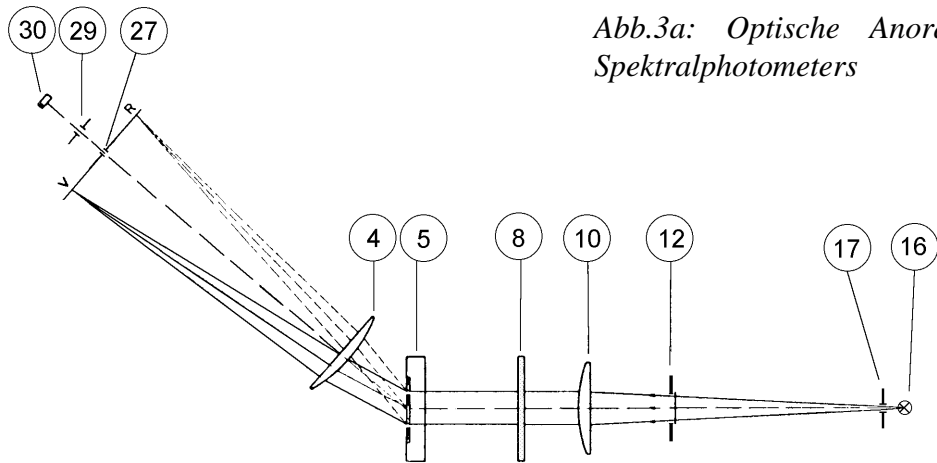
Die Linsen (10) und (4) bilden den Glühfaden (16) auf dem Austrittsspalt (27) ab. Das Gitter (5) zerlegt das parallele weiße Lichtbündel in seine spektralen Anteile. Je nach Wellenlänge wird das Licht verschieden stark gebeugt und trifft auf den weißen Schirm des Empfängergehäuses (20) unter verschiedenen Winkeln auf. Es entsteht ein Farbband mit den Spektralfarben. Der Strahlengang des roten (R) und des violetten (V) Lichtanteils ist in Abb. 4a eingezeichnet.

Nach Betätigung des Feststellhebels (21; falls vorhanden) kann mit dem Wellenlängenkopf (9) das Empfängergehäuse (20) auf einem Kreis um das Gitter (5) geschwenkt werden, sodaß je nach Stellung von (9) nur das Licht einer bestimmten Wellenlänge durch den Austrittsspalt (27) treten kann. Mit der Verschlussblende (12) kann der Strahlengang unterbrochen und mit dem Nullpunktregler (13) der Nullpunkt ($T=0\%$) eingestellt werden.

Das bei diesem Versuch benutzte Spektralphotometer wird in dieser Weise praktisch in keinem Labor mehr benutzt. Es ist dafür im Aufbau klar und übersichtlich. Man kann erkennen, wo man gegebenenfalls Fehler macht. Die Fehler können auch bei Laborgeräten auftreten; ihre Kenntnis kann vor übertriebener Interpretation von Messungen schützen.

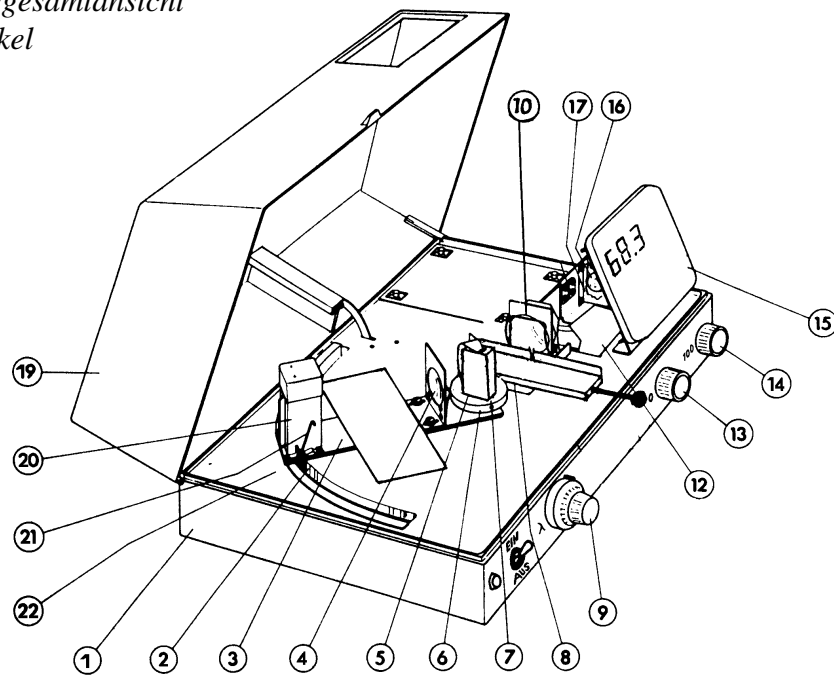
Es gibt heute aufwendige, teilweise auch computerisierte Geräte, mit denen man meist mehr und genauer messen kann. Diese sind unübersichtlich im Aufbau (Black Box) und darüberhinaus ziemlich teuer.

Abb.3a: Optische Anordnung des Spektralphotometers



- | | | | |
|----|-----------------------------------------------------------|----|-------------------------------------|
| 1 | Grundplatte | 12 | Verschlußblende |
| 2 | Kreissektorschlitz | 13 | Nullpunktregler (T=0%) |
| 3 | Schwenkarm | 14 | 100%-Einstellung |
| 4 | Kollektorlinse | 15 | digitales Anzeigeelement |
| 5 | Gitter | 16 | Wolfram-Fadenlampe |
| 6 | Drehtisch | 17 | Rechteckblende |
| 7 | Fixierschraube | 19 | Deckel |
| 8 | Küvetten und Filter auf verschiebbarer Halterung | 20 | Empfängergehäuse mit Austrittsspalt |
| 9 | Wellenlängeneinstellknopf (in Skalenteilen; nicht in nm!) | 21 | Feststellhebel (nur bei Gerät 1) |
| 10 | Kollimatorlinse | 27 | Austrittsspalt |
| | | 29 | Falschlichtblende |
| | | 30 | Fotodiode |

Abb.3b: Gerätegesamtansicht bei offenem Deckel



3 Durchführung und Auswertung der Versuche

Bevor Sie mit der Versuchsdurchführung beginnen, sollten die folgenden Hinweise lesen und beachten; sie können Ihnen Zeit, Fehler und Ärger ersparen.

- a) Schließen Sie vor dem Ablesen der Transmissionswerte immer die Abdeckhaube des Photometers, da sonst Falschlicht Ihre Messungen beeinträchtigen kann. Falls die Sonne auf das Gerät scheint, können sogar bei geschlossenem Deckel Fehler auftreten.
- b) Halten Sie die Optik des Photometers und vor allem die Filter und Küvetten sauber. Letztere müssen beim Messen frei von Verunreinigungen und Feuchtigkeit sein. Wischen Sie sie sorgfältig sauber (Kleenex fusselfrei benutzen); vermeiden Sie Fingerabdrücke.
- c) Beim Einstellen eines bestimmten Skalenwertes am Wellenlängenknopf (9) und am 100%-Einstellknopf (14) sollten Sie sich immer mit der gleichen Drehrichtung (Uhrzeigersinn) dem gewünschten Wert annähern. Sie vermeiden dadurch das mechanische Spiel der Apparatur.
- d) Zum Notieren der Meßwerte und zum Auftragen der Spektren gibt es Spezialvordrucke.
- e) Es sei nochmals darauf hingewiesen, daß die Übersichtlichkeit und Sauberkeit der Versuchsdurchführung in die Gesamtbewertung des Versuchs einfließen.

3.1 Wellenlängeneichung

Notieren Sie die Gerätenummer!

Bevor mit dem Gerät Transmissionsmessungen durchgeführt werden können, muß im Prinzip eine Wellenlängenzuordnung gemacht werden, d.h. jedem Skalenteil auf dem Wellenlängenknopf (9) wird die entsprechende Wellenlänge zugeordnet. Diese Eichung ist hier schon gemacht worden. Zur Vereinfachung wird bei diesem Versuchsteil eine Tabelle mit entsprechenden Messungen vorgegeben (Sie erhalten einen entsprechenden Vordruck).

Achtung: Bei Gerät Nr. 1 den Feststellhebel auf keinen Fall lösen, da sonst alle Messungen wiederholt werden müssen!!

SPE

Führen Sie die Messungen bei den weiteren Experimenten dann bei den Skalenteilen durch, die glatten Wellenlängen entsprechen (400 nm, 410 nm usw.). Sie ersparen sich später viel Zeit beim Auftragen Ihrer Meßwerte.

3.2 Spektrale Transmission von Filtern

Von Ihrem Betreuer erhalten Sie Filter, deren Reintransmission in Abhängigkeit von der Wellenlänge Sie bestimmen sollen. Dazu setzen Sie ein Filter (Nummer notieren) und ein transparentes Diaglas (beide vorsichtig mit nichtfusselndem Kleenex geputzt) auf die verschiebbare Halterung (8) und befestigen Sie sie mit Magneten so, daß Sie leicht das Filter bzw. das Diaglas in das parallele Lichtbündel schieben können (auch bei geschlossenem Gerätedeckel).

Der Ablauf der Transmissionsmessung bei einer bestimmten Wellenlänge geht nun so vor sich:

- a) Nullpunkt überprüfen und gegebenenfalls nachjustieren.
- b) Schieben Sie das Diaglas in den Strahlengang und stellen mit dem 100%-Einstellknopf (14) die Transmission auf 100%.
- c) Schieben Sie das Filter in den Strahlengang und lesen den Transmissionswert ab.

Auf diese Weise haben Sie die Reintransmission des Filters bei der betreffenden Wellenlänge bestimmt.

An sich läßt auch das Diaglas aufgrund der Reflexionsverluste nicht alles Licht hindurch. Stellt man bei Diaglas die Transmission auf 100% und nimmt an, daß Filterglas und Diaglas aus einer Substanz mit der gleichen Brechzahl bestehen, werden bei der Messung mit dem Filter die Reflexionsverluste automatisch eliminiert; man erhält die Reintransmission.

Die Transmission im umgangssprachlichen Sinn würde man erhalten, wenn man das Filter gegen Luft (statt gegen das Diaglas) mißt.

Achtung!

Bei der nächsten Messung (andere Wellenlänge) müssen Sie in der gleichen Reihenfolge vorgehen, d.h. die 100% wieder einstellen.

Die Meßabstände der Wellenlängen (bzw. der Skalenteile) sollen so gewählt werden, daß die Darstellung der Transmissionskurve klar und eindeutig möglich ist. Das bedeutet z.B. bei steilen Flanken bzw. bei einem Absorptionsmaximum oder -minimum im Transmissionspektrum geringe Wellenlängenabstände.

Zusatz: Wenn Sie später die Transmission Ihrer Sonnen-, der Laserschutzbrille o.ä. messen wollen, empfiehlt es sich, die zu jeder Wellenlänge gehörigen Skalenteile am 100%-Einstellknopf nach Einstellung auf 100% mit dem Diaglas zu notieren.

Auswertung 3.2

Stellen Sie die Reintransmission der Filter in einem Transmissionsspektrum dar (auf dem Spezialpapier).

3.3 Einfluß von Verschmutzung

Messen Sie bei einigen ausgewählten Wellenlängen ein mit möglichst vielen sichtbaren Fingerabdrücken versehenes Diaglas gegen ein sehr gut geputztes Diaglas.

Auswertung 3.3

Wie stark absorbieren Fingerabdrücke?

Ist eine Wellenlängenabhängigkeit zu erkennen?

Um welchen Betrag ändert sich die Extinktion?

Bitte nicht auf das Spezialpapier auftragen

3.4 Spektrale Transmission einer Farbstofflösung

Messen Sie die Reintransmission der Farbstofflösung Kristallviolett (eventuell auch einer anderen Lösung nach Rücksprache mit dem Betreuer) im verfügbaren Spektralbereich. Zu diesem Zweck füllen Sie aus der Flasche mit unbekannter Farbstoffkonzentration eine saubere Meßküvette (Schichtdicke innen 20 mm) etwa 3/4 voll, mindestens aber so voll, daß der ganze Meßparallellichtstrahl durch die Flüssigkeit hindurchtritt.

Nummer der Flasche mit der unbekanntem Konzentration **notieren!**

Vorsicht beim Umgang mit Kristallviolett. Es macht unangenehme Flecken, die nur mit Aceton oder ähnlichen Lösungen wieder zu entfernen sind. Ansonsten ist es harmlos; man kann es in den Ausguß kippen (nicht aber Aceton!).

Als Referenzküvette füllen Sie eine zweite Küvette (gleiche Schichtdicke) mit deionisiertem Wasser.

Wiederholen Sie obige Messung mit der gleichen Lösung mit Küvetten der Schichtdicke 10 mm.

Achtung: Während der Messungen die Küvetten auf Luftbläschen kontrollieren. Eventuell mit dem Finger wegstreichen.

Auswertung 3.4

Zeichnen Sie das Transmissionsspektrum von Kristallviolett für die Schichtdicken von 20 mm und 10 mm (auf das Spezialpapier).

Ermitteln Sie die Wellenlänge, bei der die Farbstofflösung maximal absorbiert.

Berechnen Sie aus dem Transmissionsspektrum für die 20 mm-Küvette das Spektrum für eine 10 mm-Küvette und vergleichen Sie die berechneten Werte mit den gemessenen Werten. Tragen Sie die berechneten Werte ebenfalls in dasselbe Spezialpapier ein.

3.5 Spektrale Transmission von Blut (freiwillig)

Füllen Sie eine 10 mm-Meßküvette ca. halb mit destilliertem Wasser.

Auf eigene Verantwortung: Reinigen Sie eine Ihrer Fingerkuppen mit Alkohol und stechen Sie mit einer sterilisierten Hämostilette hinein. Lassen Sie ca. 4-6 Tropfen Blut in die Küvette fallen, rühren um und füllen die Küvette 3/4 voll.

Messen Sie das Transmissionsspektrum Ihres (hämolysierten) Blutes (O_2 -Hämoglobin). Als Referenz nehmen Sie eine Küvette mit destilliertem Wasser.

Setzen Sie nun zum Blut etwas (eine Spatelspitze) Dithionit zu, das den Sauerstoff reduziert und dadurch das Oxyhämoglobin in Hämoglobin verwandelt und messen wieder das Transmissionsspektrum.

Auswertung 3.5

Zeichnen Sie die Transmissions- und Extinktionsspektren des Blutes.

Vergleichen Sie Ihr Transmissionsspektrum mit dem Spektrum aus der Literatur (am Ende dieser Anleitung).

3.6 Spektrale Transmission einer Sonnenbrille (freiwillig)

Legen und befestigen Sie Ihre Sonnenbrille (oder was Sie messen möchten) mit Magneten so auf der zwischen Kollektorlinse (4) und Empfängergehäuse befindlichen flachen Halterung, daß das zu messende Glas möglichst dicht vor dem Empfängerschlitze (27) sitzt. Damit kann eine im Glas eventuell vorhandene optische Wirkung vermindert bzw. ausgeschaltet werden.

Nun drehen Sie den Wellenlängenkopf (9) zum extrem roten und am 100%-Einstellknopf auf den Skalenteil, den Sie bei der 100%-Einstellung des Diaglasses notiert hatten. Jetzt können Sie die (Rein)transmission Ihres Sonnenbrillenglases ablesen.

Messen Sie auf diese Weise die spektrale (Rein)transmission Ihres Sonnenbrillenglases. Als Referenzglas ist das Diaglas genommen.

Überprüfen Sie bei eingelegter Sonnenbrille in nicht veränderter Position mit den Interferenzfiltern, ob die Wellenlängeneichung noch stimmt.

Auswertung 3.6

Zeichnen Sie das (Rein)-transmissionsspektrum Ihrer Sonnenbrille.

Wie wird das Transmissionsspektrum im umgangssprachlichen Sinn aussehen?

Wie könnte man das messen?

Wieviel Prozent absorbiert Ihre Brille im Mittel im sichtbaren Bereich?

Hinweis: Gute Sonnenbrillen müssen UV- und IR-Strahlung gut absorbieren (Warum?). Manche (meist billigen) Kunststoffgläser tun dies nicht. Solche Sonnenbrillen sind gefährlich!

3.7 Extinktion einer Farbstofflösung als Funktion der Konzentration

Eine gekennzeichnete Flasche enthält eine Kristallviolettlösung in genau abgemessener Konzentration. Dabei bezieht sich der angegebene Wert ($2 \cdot 10^{-3}$ molar) auf die Definition der Volumenkonzentration: 1 molar = 1 mol/l. Kristallviolett hat eine Molmasse von 408g; es wurden also 816 mg pro Liter Lösung eingewogen.

Verdünnen Sie mit Hilfe der vorliegenden Gefäße und Pipetten die vorhandene $2 \cdot 10^{-3}$ molare Lösung auf $2 \cdot 10^{-5}$ molar und messen Sie die Reintransmission beim Absorptionsmaximum in der 10 mm und 20 mm-Küvette.

Machen Sie mit der so verdünnten Lösung weitere Verdünnungsschritte (jeweils Faktor 2; nicht Potenz!) und messen Sie jeweils die Reintransmission. Um später sinnvoll auswerten zu können, müssen Sie Transmissionswerte für mindestens 6 verschiedene Konzentrationen gemessen haben. Tip: Achten Sie besonders auf Sauberkeit und Trockenheit der Meßküvetten vor dem Einfüllen der Lösung und wischen Sie vor dem Messen sorgfältig ab. Füllen Sie die Küvetten immer nur ca. 3/4 voll. Das genügt für die Messung im Spektralphotometer und Sie vermeiden ein Überlaufen der Küvetten beim Hin- und Herschieben mit dem Schlitten.

Zur Kontrolle messen Sie am Ende deionisiertes Wasser gegen deionisiertes Wasser (Ergebnis notieren).

Auswertung 3.7 (sofort durchführen)

Berechnen Sie aus den Reintransmissionswerten die Extinktion und tragen Sie diese als Funktion der Konzentration in ein doppeltlogarithmisches Papier ein (wird vom Betreuer zur Verfügung gestellt).

Zeichnen Sie die Ausgleichs- und die Fehlergeraden ein.

Wie groß ist die Konzentration der (unbekannten) Farbstofflösung aus dem Experiment 3.4? Hierzu gehört eine Fehlerbetrachtung!

Wie groß ist der Extinktionskoeffizient ϵ des Kristallvioletts im Extinktionsmaximum? (Wert mit Hilfe der Ausgleichsgeraden ermitteln!)

Wie groß ist der Extinktionskoeffizient bei den Wellenlängen $\lambda = 650$ nm (rot) und $\lambda = 480$ nm (blau)?

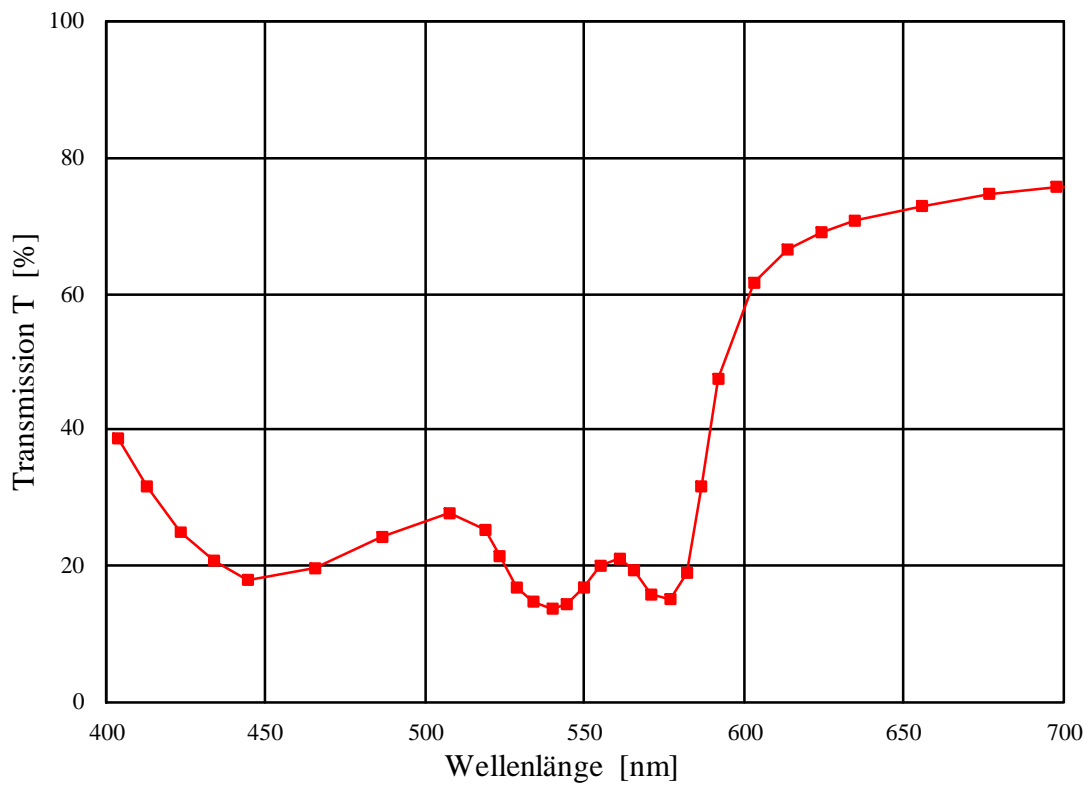
Nach Beendigung der Experimente:

Sämtliche benutzten Küvetten, Pipetten und sonstigen Geräte gründlichst mit Wasser gegebenenfalls mit einem anderen Lösungsmittel (Aceton) ausspülen und mit deionisiertem Wasser nachspülen.

Arbeitsplatz aufräumen.

Zum Versuchsteil 3.5 Transmission von Blut:

Die folgende Transmissionskurve von Blut (4 Tropfen in 10mm-Küvette mit deionisiertem H₂O) wurde mit dem Spektralphotometer Nr. 1 aus dem Praktikum aufgenommen:



Die folgende Abbildung ist entnommen aus:

R.F. SCHMIDT, G. THEWS; Physiologie des Menschen, Berlin 1993, Seite 613.

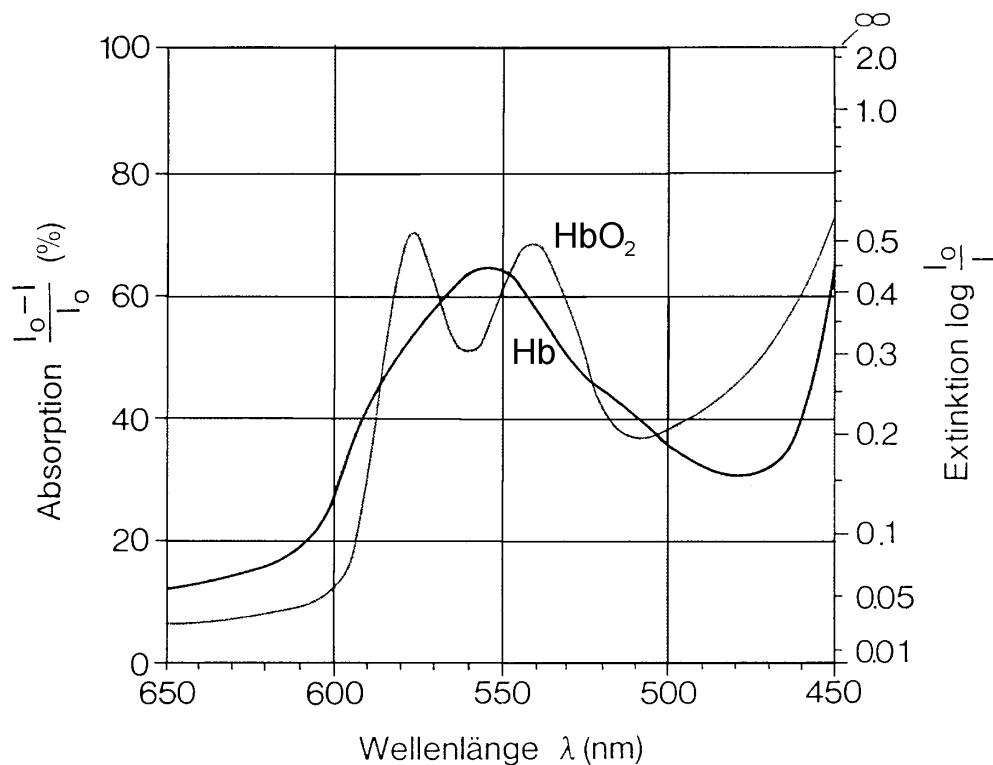


Abb. 22-4. Absorptionsspektren des Oxyhämoglobins (HbO_2) und des desoxygenierten Hämoglobins (Hb). *Linke* Ordinate: Absorption; *rechte* Ordinate: Extinktion

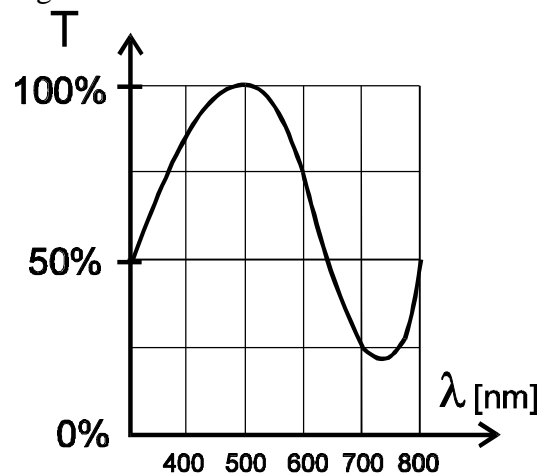
Das arterielle Blut ist mit Sauerstoff gesättigt (HbO_2) und hat eine hellrote Farbe. Venöses Blut (Hb) wird mit zunehmender Desoxygenisierung dunkler und bläulicher. Dies läßt sich aus den Absorptions- bzw. Transmissionskurven direkt ersehen. Die Absorption der HbO_2 -Kurve ist im roten Wellenlängenbereich relativ gering, d.h. es wird viel rot durchgelassen, im blauen Bereich erheblich stärker; das arterielle Blut erscheint rötlich. Bei der Hb-Kurve ist das zwar auch noch so, aber im blauen Bereich wird weniger absorbiert als bei der HbO_2 -Kurve, im roten Bereich mehr, d.h. insgesamt erscheint das desoxygenisierte Blut bläulicher-rot.

Die beiden charakteristischen Sattel (Absorptionsbanden) bei der HbO_2 -Kurve liegen bei $\lambda = 541\text{nm}$ und 577nm .

Es ist übrigens ganz normal, daß verschiedene Autoren verschiedene Auftragungsarten verwenden. Üblich ist allerdings bei der Abszisse eine Auftragung der Meßwerte von kleinen Werten zu großen Werten hin; hier ist das gerade umgedreht. Ob auf der Ordinate die Absorption oder die Transmission aufgetragen wird, ist Geschmackssache.

Aufgaben

- 1) Kann eine Verdoppelung der Schichtdicke einer Küvette zu einer 10-fachen Intensitätsabnahme der transmittierenden Strahlung führen?
- 2) Wie hängen mittlere Eindringtiefe a , Extinktionskonstante K , Konzentration c und Extinktionskoeffizient ϵ zusammen?
- 3) Läßt sich folgende Aufgabe lösen:
Eine $2 \cdot 10^{-3}$ molare Lösung eines Farbstoffes absorbiert in einer Schichtdicke von 10mm 30% des Lichts.
Wieviel absorbiert eine 10^{-5} molare Lösung des Stoffes in der gleichen Schichtdicke?
- 4) Wie muß die Transmissionskurve eines Spiegels aussehen, der IR-Strahlen durchläßt und sichtbares Licht reflektiert (sog. Kaltlichtspiegel, wie er in Projektionslampen verwendet wird)?
- 5) Ein normales Mikroskopdeckgläschen läßt 92% des Lichts durch.
Wieviel Licht kommt durch 50 übereinanderliegende Deckgläschen durch?
- 6) Die Reintransmission grünen Lichts in Meerwasser betrage 99% auf 1 m Schichtdicke.
Wieviel Prozent des auf die Meeresoberfläche auffallenden Lichts kommen in 100 m Tiefe an (Brechzahl des Meerwassers $n = 1,34$)?
- 7) Wieviel Prozent des auffallenden Lichts läßt eine mit destilliertem Wasser gefüllte Küvette, wieviel eine mit Luft gefüllte Küvette durch?
- 8) Das Reintransmissionsspektrum einer Lösung mit einer bestimmten Konzentration sehe so aus:



Wie sieht das Spektrum qualitativ aus, wenn die Konzentration verdoppelt wird? (Zeichnung)