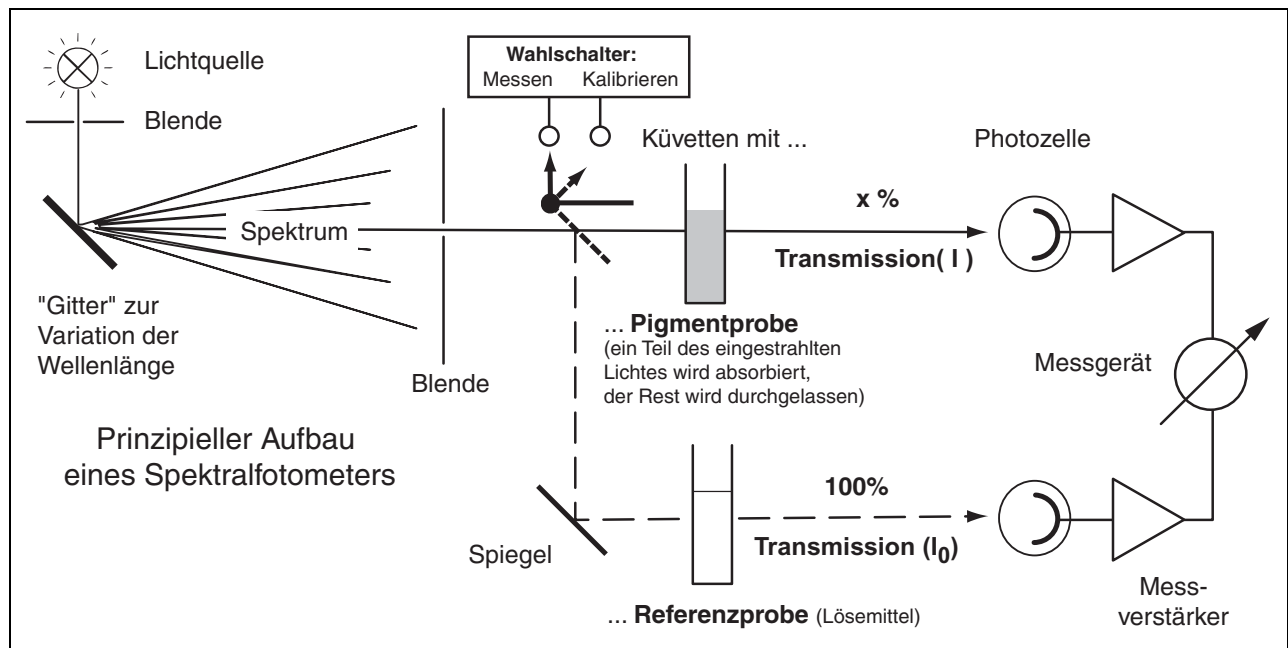


## 1. Fachliche Voraussetzung für den Versuch:

### 1.1 Das Spektralfotometer



Eine Lichtquelle emittiert **weißes Licht**, das von einem **Prisma** oder **Gittermonochromator** in die einzelnen **Spektralfarben** aufgespalten wird. Durch einen Spalt wird aus dem gesamten Spektrum nur ein relativ schmales Band von **einfarbigem** (monochromatischem) **Licht ( $I_0$ )** ausgeblendet und auf die Probe gerichtet (Messstrahl). Das von der Probe **nicht absorbierte Licht ( $I$ )** wird von einer Photozelle in **elektrischen Strom umgewandelt**, der verstärkt und **angezeigt** wird. Da der Gittermonochromator verschiebbar ist, kann jede gewünschte Wellenlänge ausgewählt werden.

Spektralfotometer erlauben durch fortlaufende Veränderung der eingestellten Wellenlänge die Aufnahme von Absorptionsspektren. Bei **Einstrahlphotometern** erfolgt die Wellenlängeneinstellung **manuell** und in **kleinen Intervallen** (in der Praxis z. B. 3 oder 10 nm). Aus den so erhaltenen **Punktmessungen** kann dann eine **Absorptionskurve** zusammengesetzt werden.

Für Messungen der Absorptionsspektren der fotosynthetischen Pigmente und für quantitative Bestimmungen (Farbreaktionen) sind Spektralfotometer mit einem Wellenlängenbereich zwischen 400 nm und 700 nm ausreichend.

#### 1.1.1 Das Messprinzip

Bei einer fotometrischen Messung wird die **Schwächung eines monochromatischen Lichtstrahls ( $I_0$ ) durch die zu messende Probe** bestimmt.

Das Ergebnis der Messung wird als **Transmission T** (Durchlässigkeit) ausgedrückt, d.h. als Verhältnis des durchgelassenen zum eingestrahlenen Licht. Bei vollständiger Lichtdurchlässigkeit einer Probe erhält man 100% Transmission, bei Undurchlässigkeit 0 %.

$$\text{Transmission } T [\%] = (I / I_0) \cdot 100$$

Für photometrische Messungen in der Biologie und Chemie wird auch eine andere Einheit benutzt, die **Extinktion** (auch Absorption oder optische Dichte). Im Gegensatz zur Transmission ist diese Einheit **der Konzentration der lichtabsorbierenden Substanz in der Küvette direkt proportional**. Die Extinktion (E) ist der Logarithmus des Verhältnisses von einfallendem ( $I_0$ ) zu durchgelassenem Licht (I).

$$\text{Extinktion } E = \log ( I / I_0 )$$

Die Transmissionsskala reicht von 100% bis 0 % , die Extinktionsskala von 0 bis unendlich.

## 1.2 Absorptionsspektren von Blattpigmenten

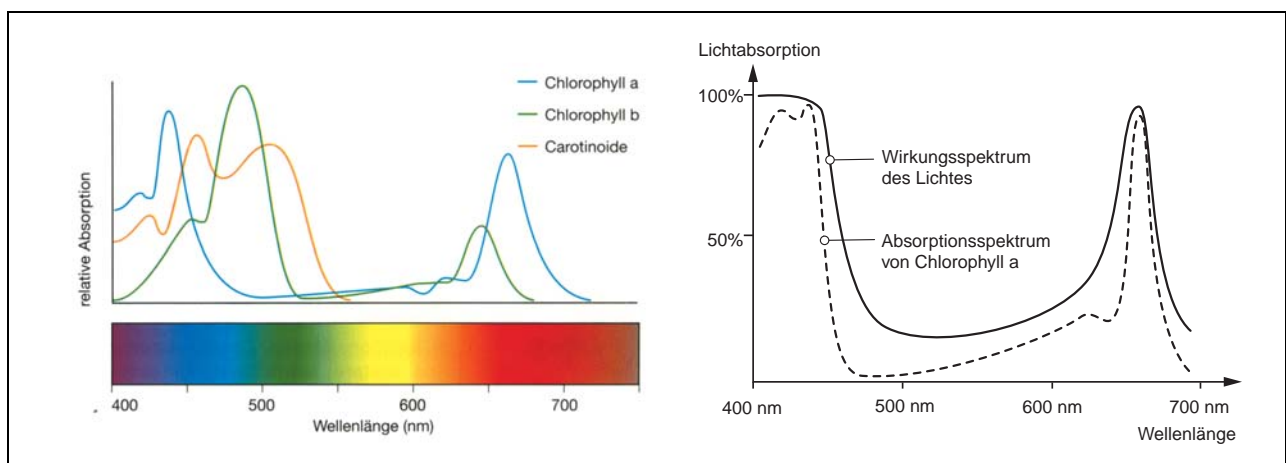
In der Regel wird von einer Pigmentprobe die, seiner Farbe entsprechende Komplementärfarbe absorbiert. So haben z.B. die **gelben** Carotinoide ihre Hauptabsorptionsbanden im **blauen** Bereich. Viele Stoffe haben jedoch zwei oder mehr Absorptionsbanden, so z.B. die **Chlorophylle, deren Hauptabsorptionsbanden im roten und blauen Spektralbereich** liegen.

Grünes und gelbes Licht wird nur in geringem Maße absorbiert und bestimmt damit die grüne Farbe der Chlorophylle. Die **Absorptionsmaxima für Chlorophyll a und b** im blauen und roten Bereich liegen an **verschiedenen Stellen**. So absorbiert **Chlorophyll a mehr im kurzwelligem Blau** und lässt längerwelliges Blau zum Teil noch durch. **Chlorophyll a ist daher blaugrün** gefärbt. **Chlorophyll b** hingegen, das im ganzen Blaubereich absorbiert, **ist gelbgrün**.

**Chlorophyll b** ist ein sogenanntes **Zusatzpigment** (akzessorisches Pigment) der Photosynthese. Seine **Hauptabsorptionsbanden** liegen in Bereichen, in denen **Chlorophyll a nur wenig Licht absorbiert**.

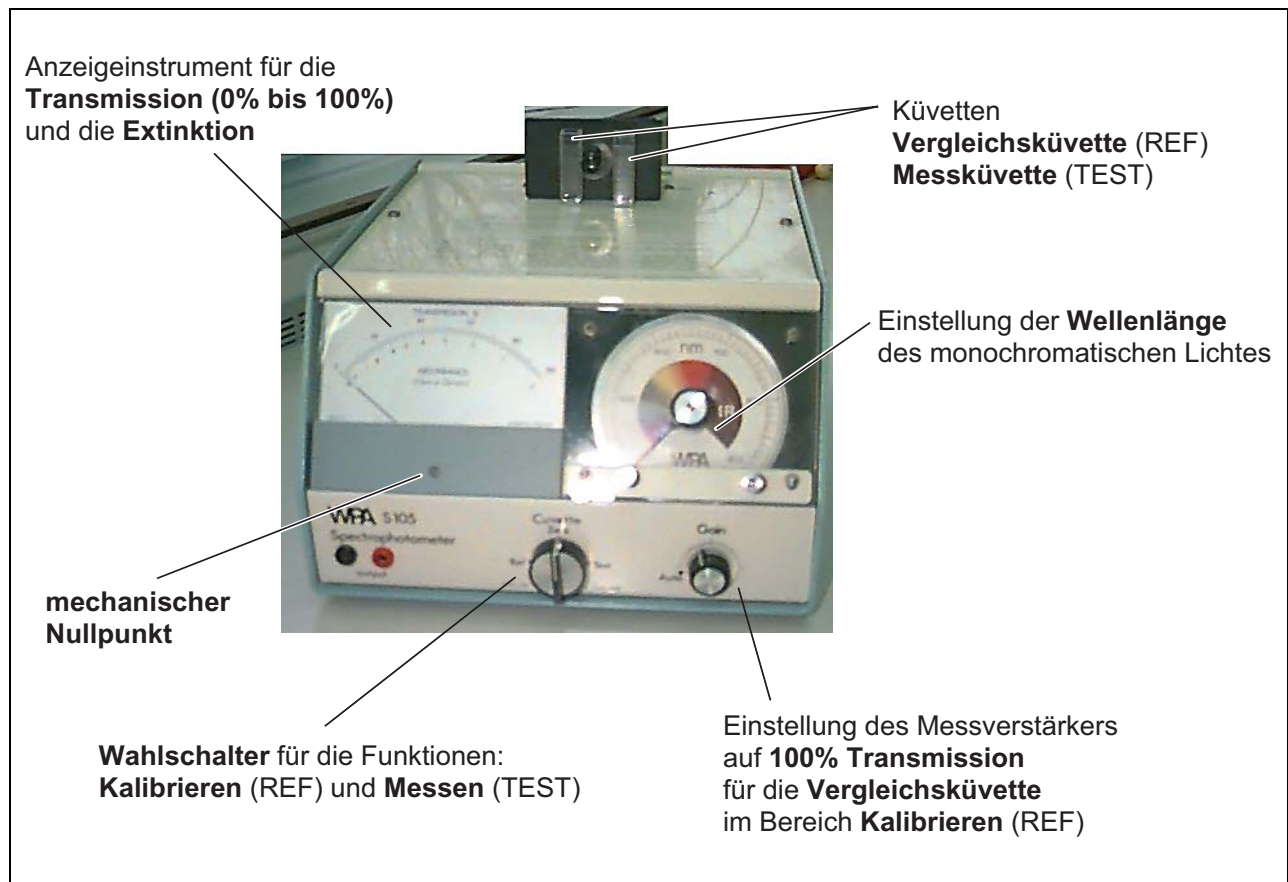
Dies ist für die Photosynthese von wesentlicher Bedeutung, da Chlorophyll b die Energie des angeregten Zustandes auf Chlorophyll a übertragen kann. Damit kann auch **Licht, das von Chlorophyll a nicht absorbiert wird, für die Photosynthese genutzt** werden.

Das **Spektrum des Gesamtblattextraktes** setzt sich im wesentlichen **aus den Teilspektren der beiden Chlorophylle zusammen**. Im blauen Bereich kommt noch die Absorption, der im Blattextrakt enthaltenen Carotinoide hinzu.



## 2. Durchführungsanleitung für die Versuche:

### 2.1 Aufnahme eines Absorptionsspektrums mit dem Spektralfotometer



#### 1. Vorbereitende Maßnahmen:

5 Minuten warmlaufen des Gerätes (Stecker in Steckdose stecken),

Vorbereitung der **Vergleichsküvette** (Füllen mit dem Lösungsmittel Ethanol)

**Die durchsichtigen Flächen der Küvetten nicht berühren!**

**Küvetten nur an den matten Stellen anfassen!**

**Flüssigkeit vorsichtig mit einem Papiertuch entfernen!**

#### 2. Nullpunkteinstellung:

Der mechanische Nullpunkt des Gerätes ist bereits eingestellt und sollte nicht mehr verstellt werden. Dieser entspricht 0 % Transmission oder maximale Extinktion.

#### 3. Vergleichsküvette einsetzen

4. Für die erste Messung **Wellenlänge 400 nm am Drehknopf einstellen**

5. Wahlschalter auf „REF“ stellen und das Gerät auf **100 % Transmission bzw. 0 Extinktion einstellen**. Jetzt ist das Photometer für die eingestellte Wellenlänge geeicht.

6. **Einsetzen der Messküvette** mit dem Blattextrakt
7. Wahlschalter auf „**Test**“ stellen und den **Transmissionswert** sowie den **Extinktionswerte** ablesen und in das Arbeitsblatt eintragen.
8. Wellenlänge um 10nm erhöhen (bis 700 nm)
9. Wahlschalter auf „**REF**“ stellen und das Gerät auf **100 % Transmission bzw. 0 Extinktion einstellen**. Jetzt ist das Photometer für die neue Wellenlänge geeicht.
10. Zur Erneuerung der Eichung bei den folgenden Wellenlänge wird Schritt 7 bis 9 wiederholt.

## 2.2 Fehlermöglichkeiten bei der Messung

- a) Die Probe ist nicht klar, sondern **trüb**. Es ergibt sich eine **sehr hohe Extinktion**.
  - **Abhilfe**: filtrieren oder zentrifugieren.
- b) Falls die Extinktion der Probe **sehr hoch ist (größer als 1.5)**, ergeben sich Fehler, da die Messgenauigkeit des Gerätes stark abnimmt. Auch liegen bei vielen einfachen Fotometern die Skalenteile der Extinktion in diesem Bereich sehr nahe beieinander, so dass der genaue Messwert schlecht ablesbar ist.
  - **Abhilfe**: Probe verdünnen.

**Wertetabelle  
zur Aufnahme eines Absorptionsspektrums von Blattfarbstoffen**

Wellenlänge des Lichtes	Messung 1		Messung 2	
	Transmission (in %)	Extinktion	Transmission (in %)	Extinktion
400 nm				
410 nm				
420 nm				
430 nm				
440 nm				
450 nm				
460 nm				
470 nm				
480 nm				
490 nm				
500 nm				
510 nm				
520 nm				
530 nm				
540 nm				
550 nm				
560 nm				
570 nm				
580 nm				
590 nm				
600 nm				
610 nm				
620 nm				
630 nm				
640 nm				
650 nm				
660 nm				
670 nm				
680 nm				
690 nm				
700 nm				
710 nm				
720 nm				
730 nm				
740 nm				
750 nm				

## Minilabor-Chemikaliensatz

### Ethanol

Alkohol unvergällt ca. 37%, (Wodka)

CAS-Nr.: 64-17-5  
EG-Nr.: 200-578-6

**Gefahrenmerkmale:** H225

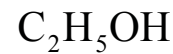
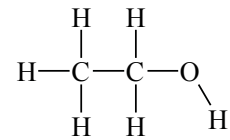
Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.

**Sicherheitshinweise:** P210

Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten.  
Nicht rauchen.

**Besondere gesundheitliche Risiken:\***

**Hinweise zur Risikominimierung:\***



Molare Masse:	46,07	g/mol
Festpunkt:	-114,5	°C
Siedepunkt:	75 - 78	°C
BrennFlüss:	F	WGK: 1
Grenzwert:	960	mg/m <sup>3</sup>
	500	ml/m <sup>3</sup>

**GEFAHR**



**Tätigkeitsbeschränkung:\***

**S1**

Tätigkeitsbeschränkung für Schülerinnen und Schüler bis Jahrgangsstufe 4



Persönliche Schutzausrüstung benutzen

**Aufbewahrung:**

**Minilabor Chemikaliensatz:**  
In bruchfesten Borosilikatglasgefäßen 24ml mit PTFE-Dichtung, Schraubkappe und Aufklebern mit Sicherheits- und Warnhinweisen.

**Erste Hilfe**



**Hautkontakt:**

Betroffene Hautstelle gründlich - mehrere Minuten - mit Wasser und Seife waschen.  
Bei Verbrennungen mit kaltem Wasser kühlen.  
Für sofortige Hilfe sorgen. (ggf. Schocklagerung vornehmen)

**Verschlucken:**

Sofort und wiederholt reichlich Wasser trinken (lassen), falls möglich mit Aktivkohlezusatz.  
Erbrechen möglichst verhindern, ggf. in eine stabile Seitenlage bringen und Atemwege freihalten.

**NOTRUF 112**



**Augenkontakt:**

Unter fließendem Wasser bei gut geöffnetem Lidspalt mehrere Minuten spülen und möglichst umgehend den Augenarzt aufsuchen.

**Einatmen:**

Für Frischluft sorgen und Arzt aufsuchen.

Auch bei geringfügigem Kontakt mit dem Gefahrstoff einen Arzt aufsuchen.

**Sachgerechte Entsorgung:**

Gefäß 1: Flüssige organische Abfälle - halogenfrei

\*) Die Einstufung erfolgt nach GefStoffV / Stoffrichtlinie

Herkunft der Daten: GISS-Datensatz