

# Anleitung zum Kursteil 6 „Spektrometrie“

## 1. Bestimmung der Konzentration von Parietin in einem Flechtenthallus

Photometrische Methoden werden häufig eingesetzt, um die Konzentration eines Farbstoffes zu bestimmen. Im heutigen Versuch sollen Sie den Gehalt des orange gefärbten sekundären Flechtenstoffes Parietin in einem Flechtenthallus bestimmen.

Jede Gruppe bekommt ein Stück Thallus zugeteilt, dessen trockengewichtsbezogener Gehalt bestimmt werden soll. Eine größere Menge Thalli wurde von stark besonnten oder schattigen Standorten gesammelt. Im Experiment soll der Parietiningehalt und seine Streuung in den unterschiedlich exponierten Flechten bestimmt werden. Es gibt eine Hypothese, wonach Parietin ein Lichtschutzpigment ist, das die Photobionten der Flechte vor zu starkem Sonnenlicht schützt. Entsprechend sollte man erwarten, dass der Parietiningehalt mit dem Lichtgenuss ansteigt. Jede Gruppe trägt ihr Ergebnis in eine große gemeinsame Tabelle ein.

### Extraktion des Flechtenthallus

Da das Parietin im Thallus extrazellulär vorliegt, lässt es sich zum größten Teil leicht durch Aceton extrahieren, ohne dass der Thallus zerkleinert werden muss. 5 bis 10% des Parietins sind im Thallus fester gebunden. Diese sollen aber im heutigen Versuch aus Praktikabilitätsgründen unberücksichtigt bleiben.

Das Thallusstück wird gewogen und anschließend in 2 bis 5 ml 100%igem Aceton unter dem Abzug 3 Minuten geschüttelt. Nach Dekantieren des Extrakts wird dies ein zweites Mal wiederholt. Der Extrakt wird in einem Messreagenzglas gesammelt und das Volumen abgelesen. Da Aceton leicht flüchtig ist, sollte der Extrakt auf Eis aufbewahrt werden und das Glas mit Parafilm verschlossen werden.

### Messung eines Absorptionsspektrums der Eichlösung

Eine Lösung von Parietin in Aceton mit bekanntem Gehalt wird Ihnen zur Verfügung gestellt. Gehalte misst man bei der Wellenlänge, bei der die Absorption am höchsten ist, da hier die größte Empfindlichkeit gegeben ist. Registrieren Sie ein Absorptionsspektrum eines Aliquots der Lösung und bestimmen Sie die Wellenlänge des Absorptionsmaximums.

### Bestimmung des Extinktionskoeffizienten

Der Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) im Lambert-Beerschen Gesetz beschreibt den quantitativen Zusammenhang zwischen Absorption ( $A$ ) und Konzentration ( $c$ ) der untersuchten Lösung.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Die Schichtdicke ( $d$ ) wird in praktischen Messungen durch die Verwendung entsprechender Küvetten immer auf 1 cm eingestellt.

Bestimmen Sie  $\epsilon$ , indem Sie aus der vorgegeben Eichlösung drei verschiedene Verdünnungen herstellen und deren Absorption messen.  $\epsilon$  ist die Steigung der Regressionsgeraden, wenn Sie  $A$  gegen  $c$  auftragen. Alternativ können Sie die Lambert-Beersche Gleichung nach  $\epsilon$  auflösen und  $\epsilon$  für jeden Ansatz berechnen. Bilden Sie anschließend den Mittelwert der drei Ergebnisse.

### Bestimmung des Gehalts im Extrakt

Bestimmen Sie die Absorption des Extrakts Ihres Flechtenstücks. Nutzen Sie den eben bestimmten Extinktionskoeffizienten, um die Konzentration im Extrakt zu berechnen. Welche Einheiten hat das Ergebnis? Berechnen Sie nun die Gesamtmenge Parietin im Flechtenstück

und anschließend den Gehalt pro Trockengewicht. Tragen Sie Ihr Ergebnis in die große gemeinsame Graphik ein.

## **2. Bestimmung der Emissionsmaxima verschiedener Lampen mit dem Handspektrometer**

Ihnen wird ein einfaches Handspektrometer zur Verfügung gestellt, mit dessen Hilfe das Emissionsspektrum einer Lichtquelle auf eine Wellenlängenskala abgebildet werden kann.

### **1. Aufgabe:**

*Machen Sie sich den Strahlengang im Spektrometer klar.*

Wodurch wird der einfallende Lichtstrahl spektral zerlegt? Eine Folie mit einem optischen Gitter wird Ihnen zur Verfügung gestellt.

### **2. Aufgabe:**

Betrachten Sie folgende Lichtquellen:

Eine Fluoreszenzröhre

Eine Energiesparlampe

Sonnenlicht. Schauen dabei nicht direkt in die Sonne! Zielen Sie auf eine Wolke oder ein helles Stück Himmel!

Eine Glühlampe

Eine Halogenlampe

*Bei welchen Wellenlängen sehen Sie Maxima in der Intensität?*

*Wie beeinflusst die spektrale Empfindlichkeit Ihres „Detektors“, des Auges, das Ergebnis?*

### **3. Aufgabe:**

Richten Sie das Spektrometer auf eine Halogenlampe, und führen Sie Lösungen von Chlorophyll oder Parietin in den Strahlengang.

*Bei welchen Wellenlängen tritt eine Abschwächung der Lichtintensität ein?*

*Wiederholen Sie den Versuch mit farbigen Folien!*

## **3. Beobachtung von Chlorophyll-Fluoreszenz**

Die Absorption von Licht versetzt Chlorophyll-Moleküle in einen angeregten Zustand. Dieser Zustand ist sehr kurzlebig und das Molekül kehrt rasch (innerhalb von 1-2 Nanosekunden) in seinen Grundzustand zurück. Die absorbierte Lichtenergie wird zu einem großen Teil in Wärme umgewandelt, zu einem kleinen Teil aber auch als Licht wieder emittiert. Dieses Licht bezeichnet man als Fluoreszenz. Normalerweise können Menschen die von einem grünen Blatt emittierte Fluoreszenz nicht erkennen, da das reflektierte grüne Licht deutlich stärker ist und unsere Augen im Spektralbereich der Chlorophyllfluoreszenz (680 - 730 nm) sehr unempfindlich sind. Auch in Fluoreszenzmessgeräten müssen die Detektoren gegen reflektiertes Anregungslicht geschützt werden. Dabei wird das Prinzip der sogenannten „optischen Schere“ genutzt.

Regen Sie den Chlorophyllextrakt mit kurzwelligem Licht an, und „detektieren“ Sie die Fluoreszenz mit Ihren Augen durch den langwelligen Filter!

Machen Sie sich die Eigenschaften der beiden benutzten Filter durch Beobachten klar (schauen Sie zum Beispiel durch die Filter in verschiedenen Lichtquellen)! Kombinieren Sie beide Filter! Vergleichen Sie Ihre Beobachtungen mit den ausgeteilten Transmissionsspektren der Filter!

Funktioniert der Versuch auch, wenn Sie zur Anregung einen roten Laserpointer benutzen?

#### **4. Demonstration eines Spektralphotometers**

Ein nicht mehr gebrauchtes Spektralphotometer, dessen Deckel entfernt wurde, wird Ihnen zur Verfügung gestellt.

Verfolgen Sie den Strahlengang zunächst im ausgeschalteten Zustand von der Lichtquelle bis zum Detektor!

Wie wird der Lichtstrahl geteilt, um sowohl durch die Messküvette als auch durch die Referenzküvette zu fallen?

Schalten Sie das Gerät ein und machen Sie sich klar, auf welche Weise die Wellenlänge des Messstrahls geändert werden kann?

Verfolgen Sie den Lichtstrahl, indem Sie ein Stück (Transparent-) Papier in den Strahl halten!

Was würde mit dem Lichtstrahl passieren, wenn sich in der Küvette ein streuendes Medium befände?