

FACHARBEIT

Fach : ..Biologie mit verpflichtendem chem. Praktikum

Thema : ..Konstruktion eines Photometers und An-
..wendung der Photometrie auf die Konzen-
..trationsbestimmung von Proteinen nach
..der Biuretmethode.

Nachname : ..WOLKERSDORFER

Vorname : ..CHRISTIAN

Jahrgang : ..1981/84

Abgegeben am ..07.02.1984.....
.....
(Unterschrift d. Kollegiaten)

Abgeholt am
.....
(Unterschrift d. Kollegiaten)

Note: = Punkte:
.....
(Unterschrift d. Kursleiters)

K O N S T R U K T I O N
E I N E S P H O T O M E T E R S
U N D A N W E N D U N G D E R P H O T O M E T R I E
A U F D I E
K O N Z E N T R A T I O N S B E S T I M M U N G V O N
P R O T E I N E N N A C H D E R
B I U R E T M E T H O D E

Wolkersdorfer
Christian
1984

Facharbeit in Biologie mit verpflichtendem chemischen
Praktikum am Gymnasium Roth.

Thema:

Konstruktion eines Photometers und Anwendung
der Photometrie auf die Konzentrationsbestimmung
von Proteinen nach der Biuretmethode.

Gliederung:

Vorwort	3
1.1 Prinzip der Photometrie	4
1.1. Geschichtliches	4
1.2. Theoretische Grundlagen	5
2. Konstruktion des Photometers	9
2.1. Beschreibung des Arbeitsprinzips	9
2.2. Die Gerätetypen	10
2.3. Wahl des Photometers	13
2.4. Der Bau des Photometers	14
2.5. Eichung des Geräts	17
3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	18
3.1. Erläuterung der Methode und des Arbeitsvorgangs	18
3.2. Arbeitsdurchführung	20
4. Schlußbetrachtungen	24
5. Anhang	25
6. Literaturhinweise	27

Vorwort

Ziel dieser Facharbeit sollte nicht sein, ein absolut exakt arbeitendes Photometer herzustellen, wie es im Handel zu erhalten ist. Vielmehr sollte durch diese Facharbeit ein Einblick in die Arbeitsweise sowie in die theoretischen Grundlagen eines solchen Gerätes gewonnen werden. Deshalb darf auf keinen Fall eine zu hohe Erwartung an das Gerät gestellt werden.

Die von mir durchgeführten Versuche zeigen jedoch, daß das Gerät für seine Einfachheit ganz ordentliche Werte liefert, soweit man die weiter unten beschriebenen Punkte beachtet.

1. Prinzip der Photometrie

1.1. Geschichtliches

Bereits seit PLINIUS, der Eisen durch Galläpfelextrakte nachwies, sind die Grundlagen der Bestimmung von Elementen und Molekülgruppen durch Färbungen bekannt. Man denke nur an die vielen Farbreaktionen, mit deren Hilfe heutzutage verschiedenste Elemente und Verbindungen nachgewiesen werden. So zum Beispiel der Nachweis von Kobalt mit Rhodanit, der erstmals 1838 von LAMPADIUS angewandt wurde, oder der ebenfalls mit Rhodanit durchgeführte Fe^{+++} - Nachweis, erstmals 1837 von OSSIAN beobachtet. Doch all diese Nachweise beruhten weniger auf einer quantitativen Analyse, als auf einer qualitativen, wennauch gewisse visuelle Aussagen über die Konzentrationen möglich waren.

Beobachtungen anderer Natur wurden im Jahre 1760 von LAMBERT angestellt, der erkannte, daß der dekadische Logarithmus des Quotienten Anfangsintensität zu Endintensität des durch einen Stoff gesandten Lichts proportional zu dessen Schichtdicke ist. BEER schließlich erkannte, daß der dekadische Logarithmus dieses Quotienten außerdem proportional zur Konzentration einer Lösung ist. BUNSEN letztlich benannte diesen dekadischen Logarithmus als Extinktion E (lat. "extingere": auslöschen).

Somit hatte man eine Möglichkeit gegeben, die Konzentrationen von Lösungen anhand einfacher Farbreaktionen festzustellen, indem man durch die Lösung Licht sandte und dessen Intensität vor und nach dem Durchgang durch die Lösung bestimmte.

Geräte zur quantitativen Analyse wurden in den Jahren 1894-1951 von KÖNIG, MARTENS, PULFRICH, KORTÜM, LEHRE und BECKMANN entwickelt, die gleichzeitig eine Mehrkomponentenanalyse (VIERODT, 1870) sowie eine sehr hohe Präzision (KORTÜM, 1934) ermöglichten.

Die heute auf dem Markt befindlichen Geräte erlauben es, schnell und einfach die Konzentration einer Lösung festzustellen, wobei die Genauigkeit der Titration oder Maßanalyse sogar fast übertroffen wird.

1.2. Theoretische Grundlagen

Im Jahre 1760 beobachtete LAMBERT, daß die Abnahme der Intensität eines durch eine lichtdurchlässige Substanz geschickten Lichtstrahls proportional zu deren Schichtdicke ist.

Diese Entdeckung beschränkt sich jedoch nicht nur auf sichtbares Licht, sondern gilt gleichermaßen im UV und UR Bereich. Zur Veranschaulichung soll ein Beispiel mit sichtbarem Licht angeführt werden.

Ein Lichtstrahl der Anfangsintensität $I_0 = 1$ soll ein gefärbtes Glas der Schichtdicke l durchstrahlen. Dabei wird die Intensität um die Hälfte abgeschwächt, sie wird zur Intensität $I = 0.5$. Den Quotienten I/I_0 bezeichnet man als Durchlässigkeit T (engl.: "transmission"), die Differenz $1 - T$ als Absorption A .

Schaltet man nach Abb. 1/1 (1 mehrere gleichartige, farbige Gläser hintereinander, so wird der Lichtstrahl bei jedem Durchgang um die Hälfte abgeschwächt.

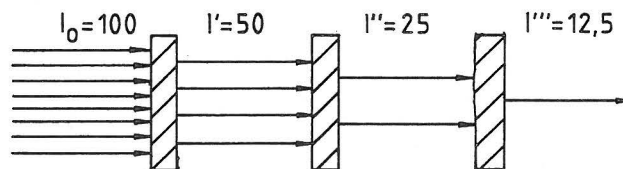


Abb. 1/1

Schwächung eines monochromatischen Lichtstrahls der Anfangsintensität $I_0 = 100$ beim Durchgang durch mehrere gleichartige, hintereinander aufgestellte Schichten.

Die Graphiken der Abb. 1/2 zeigen die Abhängigkeit der Schichtdicke von der Durchlässigkeit T und der Absorption A . Man erkennt, daß die Durchlässigkeit nie den Wert Null annimmt, geht man nicht von einer lichtundurchlässigen Schicht aus.

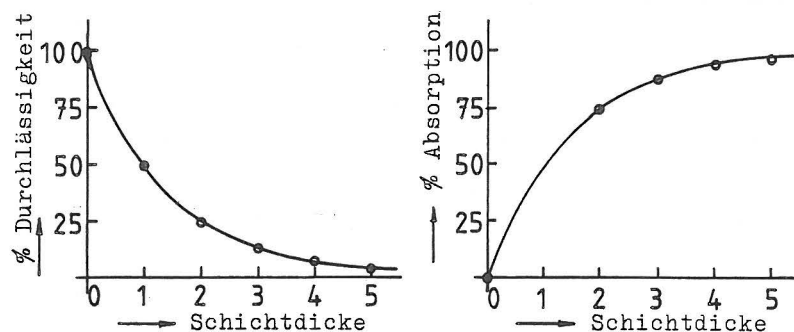


Abb. 1/2

Abhängigkeit der prozentualen Durchlässigkeit und der prozentualen Absorption von der Schichtdicke (s. Abb. 1/1).

An diesen Graphiken läßt sich ablesen, daß die Abnahme der Intensität $-dI$ proportional zur Intensität I vor der Schicht und in jeder dieser Schichten der Dicke dl wiederum konstant ist. Somit ergibt sich folgende Gleichung:

$$(1.1) \quad \frac{-dI}{dl} = k \cdot I \quad \text{bzw.} \quad \frac{dI}{I} = -k \cdot dl;$$

Nun integriert man die Gleichung und ersetzt gleichzeitig $\int \frac{dI}{I}$ durch $\ln I$:

$$(1.2) \quad \int \frac{dI}{I} = -k \cdot dl \quad \text{bzw.} \quad \ln I = -k \cdot l + C;$$

Zur Bestimmung der Integrationskonstante C überlegt man, daß bei einer Schichtdicke von $l=0$ die Anfangsintensität $I=I_0$ herrscht:

$$(1.3) \quad \ln I_0 = 0 + C \quad \text{bzw.} \quad C = \ln I_0;$$

Durch Einsetzen in (1.2) erhält man:

$$(1.4) \quad \ln I = -k \cdot l + \ln I_0;$$

$$(1.5) \quad \ln I - \ln I_0 = \ln \frac{I}{I_0} = -k \cdot l;$$

$$(1.6) \quad I = I_0 \cdot e^{-k \cdot l};$$

$$(1.7) \quad \ln \frac{I_0}{I} = k \cdot l;$$

$$(1.8) \quad \log \frac{I_0}{I} = \frac{k}{\ln 10} \cdot l = \frac{k}{2.3} \cdot l = k' \cdot l;$$

$$(1.9) \quad \log \frac{I_0}{I} = k'' \cdot l; \quad \text{(Vereinfachte Wieder-
gabe der Gleichungen
nach (1).)}$$

Somit ist der natürliche Logarithmus durch den dekadischen ersetzt und gleichzeitig das negative Vorzeichen beseitigt worden.

Die Gleichung (1.9) wird das BOUGUER-LAMBERTsche Gesetz genannt und wurde bereits 1760 von LAMBERT angegeben, nachdem schon 1729 ähnliche, allerdings qualitative Angaben von

BOUGUER gemacht wurden.

Zur quantitativen Analyse fehlen allerdings in der Gleichung (1.9) noch Angaben zur Konzentration. Diese Grundlagen wurden von BEER geschaffen. Er erkannte, daß die Erhöhung der Konzentration dc mit der Abnahme der Lichtintensität $-dI$ proportional zur Intensität I ist:

$$(1.10) \quad - \frac{dI}{dc} = k'' \cdot I;$$

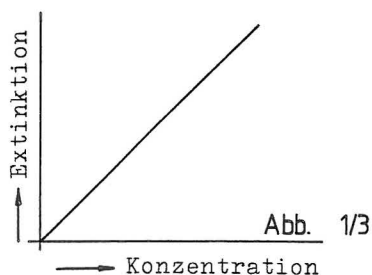
Führt man jetzt die Rechnung wie oben durch, so erhält man folgende Gleichung, die BEERsches Gesetz genannt wird:

$$(1.11) \quad \log \frac{I_0}{I} = k''' \cdot c;$$

Das BEERsches Gesetz gilt im allgemeinen nur im Bereich kleiner Konzentrationen bis etwa 0.01 Mol/l , da bei größeren Konzentrationen gegenseitige Beeinflussungen der Moleküle (absorbierende Teilchen) stattfinden. Das LAMBERTsches Gesetz hingegen gilt für alle Schichtdicken, ist also im Gegensatz zum BEERschen Gesetz nicht begrenzt. Dennoch faßt man beide Gesetze zusammen und erhält somit das BOUGUER-LAMBERT-BEERsches Gesetz, üblicherweise als LAMBERT-BEERsches Gesetz bezeichnet. Die Konstante wird mit e'' ⁽²⁾ bezeichnet:

$$(1.12) \quad \log \frac{I_0}{I} = E = e'' \cdot c \cdot l;$$

e'' ist eine für jede Substanz charakteristische Größe und wird als "molarer dekadischer Extinktionskoeffizient" (1) bezeichnet, seine Benennung in $\frac{1}{\text{Mol} \cdot \text{cm}}$ angegeben. Die von BUNSEN definierte Extinktion (s. 1.1.) ist, sofern das BEERsches Gesetz von Gültigkeit ist, direkt proportional zur Konzentration c , wobei die Schichtdicke l konstant gehalten werden muß (s. Abb. 1/3).



Abhängigkeit der Extinktion E von der Konzentration c bei Gültigkeit des BEERschen Gesetzes.

Zur Konzentrationsbestimmung von Lösungen muß man die Gleichung (1.12) nach c auflösen und erhält folgende Gleichung:

$$(1.13) \quad c = \frac{\log \frac{I_0}{I}}{e'' \cdot l} \quad \text{bzw.} \quad c = \frac{E}{e'' \cdot l}$$

Mit dem LAMBERT-BEERSchen Gesetz hat man also eine Möglichkeit, mit relativ einfachen Mitteln sowie schnell und ohne großen Zeitaufwand, Konzentrationsbestimmungen durchzuführen, die eine beachtenswerte Genauigkeit erlangen.

Anmerkungen:

- (1) Alle Abbildungen sind verändert nach BOCK, 1980 wiedergegeben.
- (2) Da der Satz der Schreibmaschine des Verfassers kein ϵ enthält, wird der Buchstabe mit e'' ausgedrückt.

2. Konstruktion des Photometers

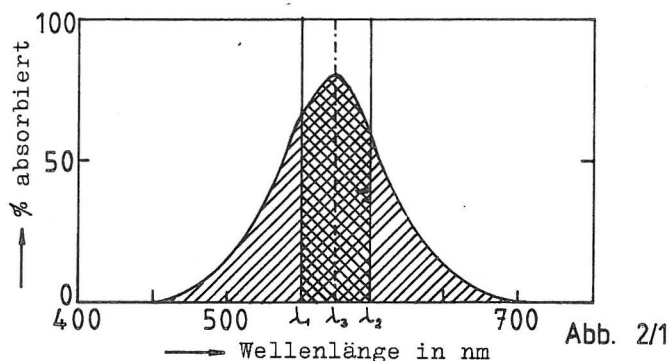
2.1. Beschreibung des Arbeitsprinzips

Der Aufbau eines Photometers besteht aus einer Lichtquelle, einem Gefäß zur Aufnahme der zu analysierenden Substanz, einem Detektor (Photozelle) mit Verstärker sowie einem Anzeigeelement.

Die Genauigkeit der Messung hängt im wesentlichen von der Empfindlichkeit des Detektors und dessen Linearität in Bezug auf die Lichtstärke ab. Die Empfindlichkeit kann dabei entweder durch Filter oder Monochromatoren erhöht werden.

Man unterscheidet deshalb zwei Gerätetypen: Filter- und Spektralphotometer.

Bei Betrachtung der Abb. 2/1 ⁽³⁾ erkennt man den Vorteil eines Spektralgerätes, das nur eine bestimmte Wellenlänge λ_3 zu ca. 80%, ein Filtergerät hingegen den Bereich zwischen λ_1 und λ_2 zu etwa 70% durchläßt.



Absorption von weißem, gefiltertem und von monochromatischem Licht durch eine Absorptionsbande.

Dennoch haben Filtergeräte gegenüber Spektralgeräten eine größere Genauigkeit. Dies erklärt sich aus der stärkeren Lichtintensität der Filtergeräte, was eine geringere Anforderung an die Empfindlichkeit des Detektors sowie an die Verstärkung nach sich zieht. Diese Faktoren wirken sich positiv auf die Meßgenauigkeit aus. Absorptionskurven sowie Mehrkomponentenanalysen können hingegen nur mit den empfindlicheren Spektralgeräten aufgenommen werden.

Als Lampen verwendet man im allgemeinen Wolframfadenlampen, die ein kontinuierliches Spektrum liefern. Mit Filtern oder Monochromatoren werden die für die Analyse notwendigen

Wellenlängenbereiche herausgetrennt. Eine andere Möglichkeit besteht in der Verwendung von Spektrallampen. Der Nachteil besteht jedoch darin, daß man für jedes Gerät mehrere solcher Lampen benötigt.

Als Empfänger verwendet man je nach Gerätetyp Photoelemente oder Photozellen. Weniger geeignet sind nach BOCK (1980) Photowiderstände, obwohl sie sich bei dieser Facharbeit als geeigneter erwiesen, da die Verstärkung wegfällt.

Die Gefäße zur Aufnahme der Lösungen bezeichnet man als Küvetten. Am gebräuchlichsten sind Küvetten mit quadratischem Querschnitt. Die Seitenlänge beträgt meist 1cm. Für verschiedenste andere Zwecke hat man Küvetten anderer Art entwickelt. Für Gase beträgt die Länge zum Beispiel 5 - 50cm, während man sich für die Analyse geringster Stoffmengen Mikroküvetten (1 - 5mm) bedient.

2.2. Die Gerätetypen

Bei der Beschreibung der Gerätetypen sollen nur die wichtigsten Arten genannt werden. Auf dem Markt erhältlich sind heute auch Photometer, die mehrere Kennzeichen in sich vereinen. Sie sollen jedoch außerhalb der Betrachtung stehen.

Die einfachste Art eines Photometers stellt das Einstrahlphotometer dar (Abb. 2/2). Der Lichtstrahl wird durch einen Filter "monochromatisch" gemacht und fällt durch eine Küvette mit Analysenlösung. Über ein Meßinstrument kann die Lichtintensität bestimmt werden. Dabei ist es wie bei allen Modellen nicht von Belang, ob man die Stromstärke, die Lei-

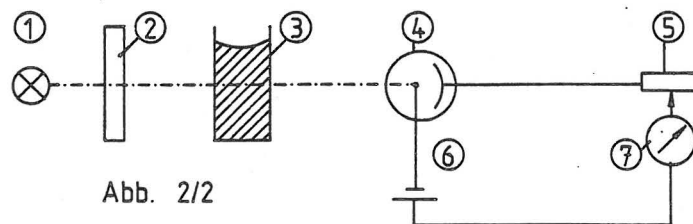


Abb. 2/2

Einstrahlphotometer mit Direktablesung. 1) Lichtquelle; 2) Filter;
3) Küvette mit Analysenlösung; 4) Photozelle; 5) Potentiometer;
6) Spannungsquelle; 7) Meßgerät.

stung, den Widerstand oder die Spannung mißt, da das LAMBERT-BEERSche Gesetz nur die Verhältnisse der Intensitäten berücksichtigt, nicht aber die Meßmethode.

Bei der Meßung geht man wie folgt vor. Man bringt zuerst eine Blindküvette, die reines Lösungsmittel enthält, in den Strahlengang. Dann stellt man die Durchlässigkeit auf 100% (bzw. die Absorption auf 0%) und bringt die Analysenlösung in den Strahlengang. Nun liest man den Wert am Meßinstrument ab und kann die Extinktion E bestimmen.

Dieses Verfahren zeichnet sich durch seine einfache Handhabung aus, was die Geräte billig und deshalb leicht erschwinglich macht. Nachteile dieser Geräteart liegen in der relativen Unempfindlichkeit sowie der Anfälligkeit gegenüber Spannungsschwankungen der Lichtquelle und Photozelle.

Dieser Nachteil wird umgangen, wenn man sich einer Brückenschaltung im Empfangskreis bedient (Abb. 2/3). Die Genauigkeit hängt dann lediglich von der des zur Justierung verwendeten Widerstands oder Schleifdrahts ab. Nichtlinearitäten

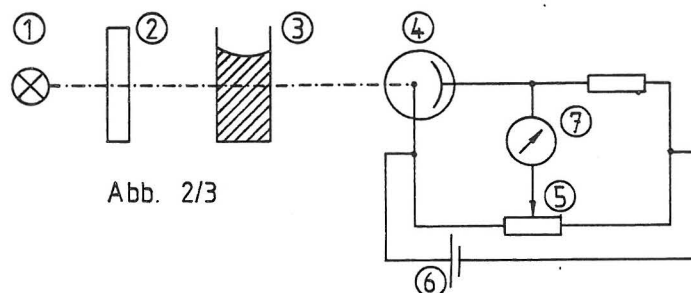


Abb. 2/3

Einstrahlphotometer mit Brückenschaltung. 1) Lichtquelle; 2) Filter; 3) Meßküvette; 4) Photozelle; 5) Potentiometer; 6) Spannungsquelle; 7) Meßgerät.

des Meßinstruments oder des Detektors hingegen können vernachlässigt werden. Lichtschwankungen oder Ermüdungen des Detektors wirken sich allerdings noch immer auf die Meßung aus.

Verwendet man ein Zweistrahlgerät (Abb. 2/4 und 2/5), kann dieser Nachteil umgangen werden. Der Aufbau wird dann jedoch schon kompliziert. Durch Spiegel oder Sektorblenden (Abb. 2/6) wird der Lichtweg geteilt und einem oder zwei Detektoren zugeführt. Der Vorteil der Apparatur mit einem Detektor liegt darin, daß keine ungleichmäßige Alterung auftritt, was

sich bei zwei Detektoren nie ausschließen läßt.

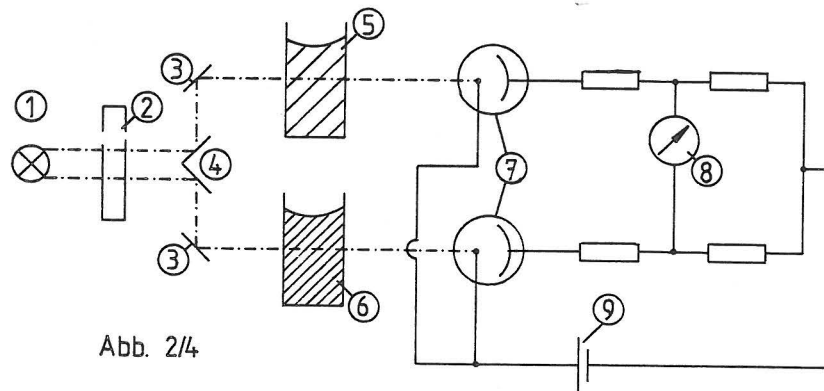


Abb. 2/4

Zweistrahlfotometer mit direkter Verhältnisbildung bei feststehender Strahlungsteilung und zwei Detektoren. 1) Lichtquelle; 2) Filter; 3) Umlenkspiegel; 4) Strahlungsteilung durch Spiegel; 5) Blindküvette; 6) Meßküvette; 7) Photozelle; 8) Meßgerät; 9) Spannungsquelle.

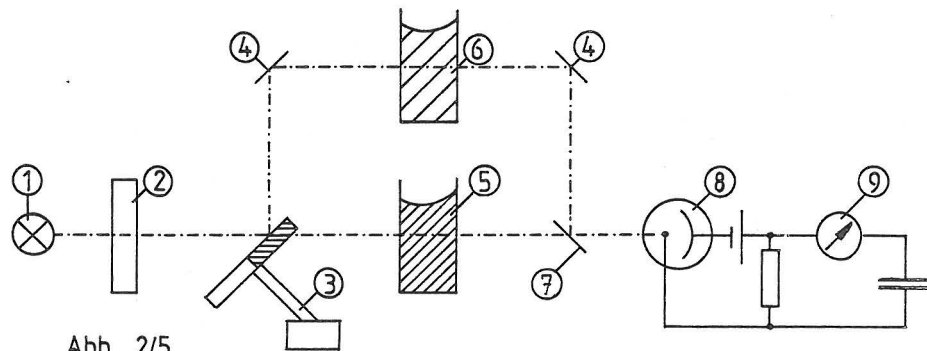


Abb. 2/5

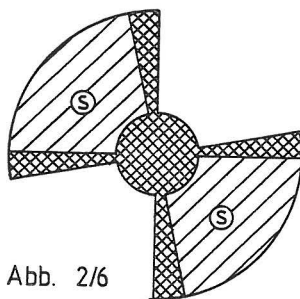


Abb. 2/6

Rotierende Sektorblende (Schemazeichnung); s) Spiegelflächen.

Die Vorteile gegenüber den Einstrahlgeräten liegen auf der Hand. Man kann die Intensitätsschwankungen der Lichtquelle übergehen, da das Meßgerät automatisch das Verhältnis von der Anfangs- zur Endintensität bildet. Bei dem Gerät der Abb. 2/5 wird ein modulierter Gleichstrom hergestellt, den man leicht verstärken kann. Die Amplitude dieses Wechselstroms ist umso größer, je größer der Intensitätsunterschied der beiden Lichtquellen ist.

Die beste Genauigkeit bieten jedoch Zweistrahlgeräte mit automatischem Nullabgleich durch Kammbliquen (Abb. 2/8). Den Apparaturaufbau gibt Abb. 2/7 wieder.

Sind die Intensitäten der beiden Strahlen ungleich, wird dies von einem Schaltkreis erkannt. Dieser regelt einen Servomotor, der die Kammbende soweit in den Strahlengang schiebt, bis beide Intensitäten gleich sind. Die Stellung der Kammbende gibt Aufschluß über die Konzentration der Lösung.

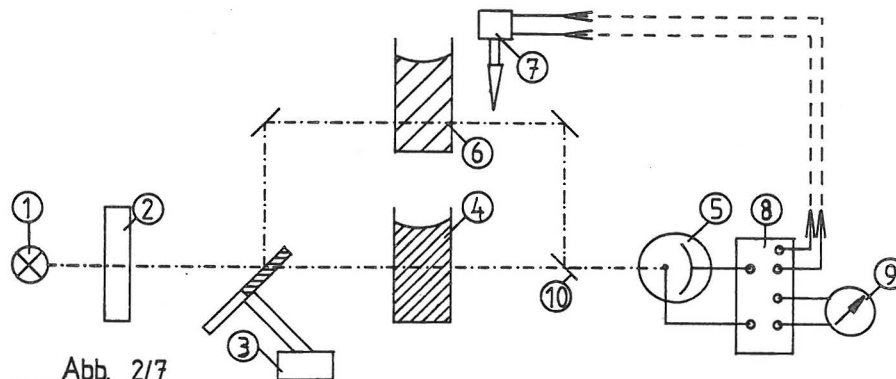


Abb. 2/7
Zweistrahphotometer mit Nullabgleich bei Strahlungsteilung durch eine rotierende Sektorblende und einem Detektor. 1) Lichtquelle; 2) Filter; 3) rotierende Sektorblende; 4) Meßküvette; 5) Photozelle; 6) Blindküvette; 7) Kammbende mit Motor; 8) Nullabgleichsteuergerät; 9) Meßgerät; 10) halbdurchlässiger Spiegel.

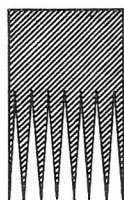


Abb. 2/8

Kammbende

Schließt man die Kammbende an den y-Eingang eines Plotters, die Einstellung der Wellenlänge des Spektralgeräts an den x-Eingang, so erhält man eine Absorptionskurve der Analysesubstanz.

Die wichtigste Verbesserung zur Analyse schuf SKEGGS im Jahre 1957, als er den vollautomatisch arbeitenden "Autoanalyser" (3) einführte, mit dem es über eine Durchflußküvette möglich wurde, mehrere Substanzen in selbständig, hintereinander ablaufenden Analysen qualitativ und quantitativ zu bestimmen.

2.3. Wahl des Photometertyps

Bei der Wahl eines zum Selbstbau geeigneten Photometers mußte darauf geachtet werden, daß es zum einen einfach zu konstruieren sein, zum anderen aber eine gute Genauigkeit besitzen sollte.

Große Genauigkeit hätte man mit einem Zweistrahlgerät erreichen können. Der Materialaufwand hätte seines Umfangs wegen den Sinn einer Facharbeit jedoch bei weitem überschrit-

ten. Somit fiel die Wahl auf eines der beiden Einstrahlgeräte. Ein Photometer mit Direktablesung hätte der Forderung nach Einfachheit genüge geleistet, wäre jedoch zu ungenau gewesen. Daher entschied ich mich zum Bau eines Photometers mit Brückenschaltung. Dieses Gerät vereint alle Forderungen in sich. Es hat durch die Brückenschaltung eine gute Stabilität des Detektors und des Stroms im Empfangskreis, ist also relativ genau. Der Forderung nach unkomplizierter Bauart wird dieses Gerät dank der übersichtlichen Anordnung der Bauelemente ebenso gerecht, was man in Abb. 2/3 und 2/9 gut erkennen kann.

2.4. Der Bau des Photometers.

Zuerst mußte ein für meinen Zweck geeignetes Gehäuse gefunden werden. Im Handel erhältliche Gehäuse erschienen mir zu leicht gebaut. Deshalb verwendete ich einen ausgeschlachten Schaltkasten aus Metall, an dem gut die Lampe montiert werden konnte, um für genügende Kühlung zu sorgen. Das Gehäuse enthielt ausreichend Platz für die Lampe, den Küvettenhalter, den Detektor, sowie die Platine mit den Bauelementen. Weiterhin war es robust, was für den Schulgebrauch durchaus nötig ist.

Anhand des Schaltplanes wurden die Bauteile auf die Platine gelötet, wobei ich darauf achtete, noch Platz für spätere Veränderungen zu lassen, was sich beim ersten Versuch als entscheidend herausstellte.

Weiterhin wurden in das Gehäuse die Löcher für Schalter und Regler sowie Meßinstrument gebohrt. Als diese Arbeiten ausgeführt waren, begann ich mit dem ersten Test des Gerätes, der sich jedoch nicht bewährte.

Es zeigten sich folgende Probleme: zu starke Erwärmung des Trafos, starke Schwankungen und Abfall des Meßgerätes, Blinken der Lampe, als auch leichter Qualm aus dem Gehäuse. Der rechtzeitige Griff zum Stecker verhinderte, daß größerer Schaden entstand.

Die Erwärmung des Trafos konnte auf die Wolframfadenlampe zurückgeführt werden, die bei 24V eine Stromaufnahme von 3 A hatte.

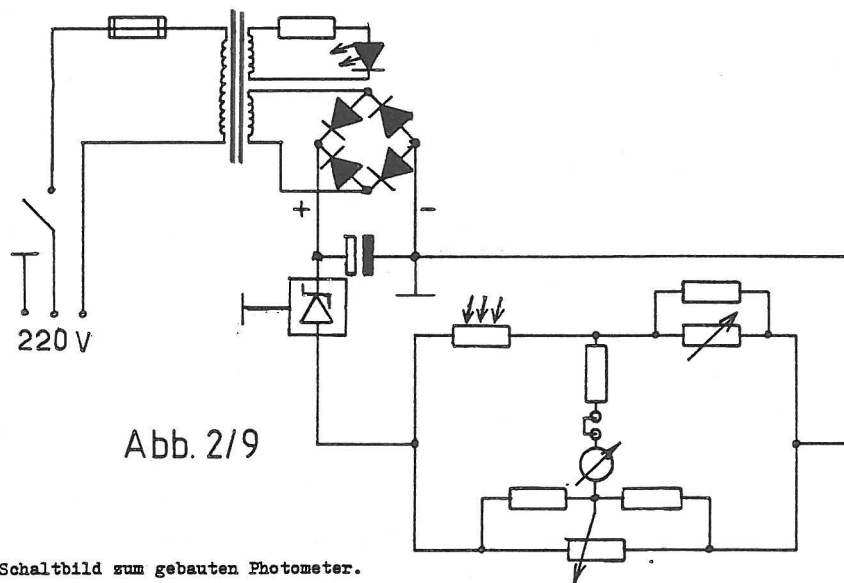
Die Schwankungen des Meßgeräts hatten zwei Ursachen. Zum ersten die Erwärmung des Trafos, der auch den Strom für den Meßkreis lieferte, sowie die Erwärmung der Bauteile aufgrund der starken, von der Lampe abgesonderten Hitze.

Der eigentliche Grund für das Blinken der Lampe konnte nicht eindeutig geklärt werden. Versuche zeigten, daß ein Kondensator diesem Problem ein Ende bereitete. Zur Spannungstabilisierung erwies es sich jedoch als günstiger, eine externe Speisung der Lampe vorzunehmen.

Ebenso leicht konnte die Ursache des Rauches behoben werden. Ein Widerstand war versehentlich falsch eingelötet und deshalb verbrannt worden.

Mit dem Lösen dieser ersten Fehler war die letztliche Schaltung des Photometers festgelegt. Zur genaueren Ablesung des Meßwertes nahm ich noch eine Auftrennung der Brückenleitung in Reihe zum Meßinstrument vor, was den Anschluß eines externen Strommeßgerätes erlaubte und sich als sehr nützlich erwies.

Wie bereits in Punkt 2.3. erwähnt, handelt es sich bei dem von mir gebauten Photometer um ein Einstrahlgerät mit Brückenschaltung. Dies ist aus Abb. 2/9 ersichtlich.

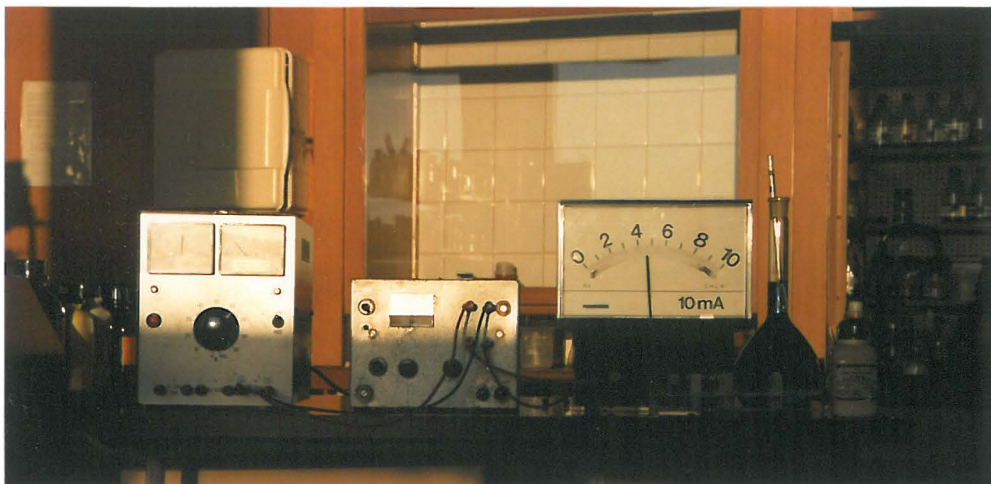


Die Zener-Diode soll für die Konstanthaltung des Stroms im Brückenkreis sorgen. Leider kann sie den Spannungsabfall im

Kreis nach etwa fünf bis sechs Stunden Betriebsdauer nicht aufhalten, was dazu führt, daß mit Fortgang der Messung auch der Strom durch das Meßgerät abnimmt. Dies wiederum hat zur Folge, daß der Strom I_0 während des Versuchs immer wieder neu bestimmt werden muß. Die größte Konstanz hat das Gerät zwischen einer halben und zwei Stunden Betriebsdauer.

Das Problem der Spannungsstabilisierung hätte aufgrund des gestellten Themas den Rahmen der Arbeit bei weitem überschritten, da der Schwerpunkt nicht im technischen, sondern vielmehr im physikalisch-chemischen Bereich liegen sollte. Um jedoch der Erwärmung des Trafos durch die Wolframfadenlampe aus dem Wege zu gehen, erwies sich eine externe Spannungsquelle (max. 15V) für die Lampe als sehr nützlich. Auf der Platine ist die Schaltung für die Lampe (Kondensator, Widerstand, Diode) noch aufgelötet, um die Möglichkeit offen zu lassen, bei geeigneten Bauteilen wieder eine interne Speisung der Lampe vorzunehmen. Im Schaltplan ist sie nicht wiedergegeben, um Verwirrung zu ersparen.

Eine Leuchtdiode im Inneren sowie außerhalb des Gehäuses zeigen die Betriebsbereitschaft des Gerätes an. Eine Sicherung sorgt bei Überlastung zur Abschaltung der Apparatur. Weiterhin wurde das Gehäuse gegen Masse geerdet.



Versuchsaufbau. Links: Netzgerät zur externen Speisung der Lichtquelle; Mitte: Photometer; Rechts: Meßgerät zur Intensitätsmessung.

2.5. Eichung des Gerätes

Aufgrund der Schwankungen von Spannung und Stromstärke, ist es vor jeder Messung notwendig, das Gerät zu eichen. Dies sollte man auch bei im Handel erhältlichen Geräten machen, obwohl zu bemerken ist, daß die Stabilität neuerer Geräte kaum zu übertreffen ist.

Zuerst stellt man eine Blindlösung her, die lediglich aus dem Lösungsmittel besteht. Nun bringt man den später für die Analyse notwendigen Filter ⁽⁴⁾ und die Küvette mit der Blindlösung in den Strahlengang und stellt das Meßgerät auf einen bestimmten Strom ein, der etwas kleiner als der maximal mögliche Ausschlag sein sollte (Spannungsabfall!). Bei anderen Geräten muß das Gerät auf $T = 100\%$ oder $A = 0\%$ eingestellt werden. Zweck dieser Eichung ist es, Spiegelungen der Küvettenwände als auch Intensitätsverluste durch das Lösungsmittel auszugleichen. Führt man jetzt die Messung durch, so sind Fehler, die man aufgrund von Absorptionen des Lösungsmittels sowie der Küvettenwände erhält, völlig ausgeschaltet. Nach der Eichung kann mit der Feststellung des Extinktionskoeffizienten e'' begonnen werden.

Man sollte allerdings, besonders bei Einstrahlgeräten, darauf achten, die Eichung nach jeder Messung zu wiederholen, um die Fehlergrenzen so weit wie möglich einzuschränken.

Anmerkungen:

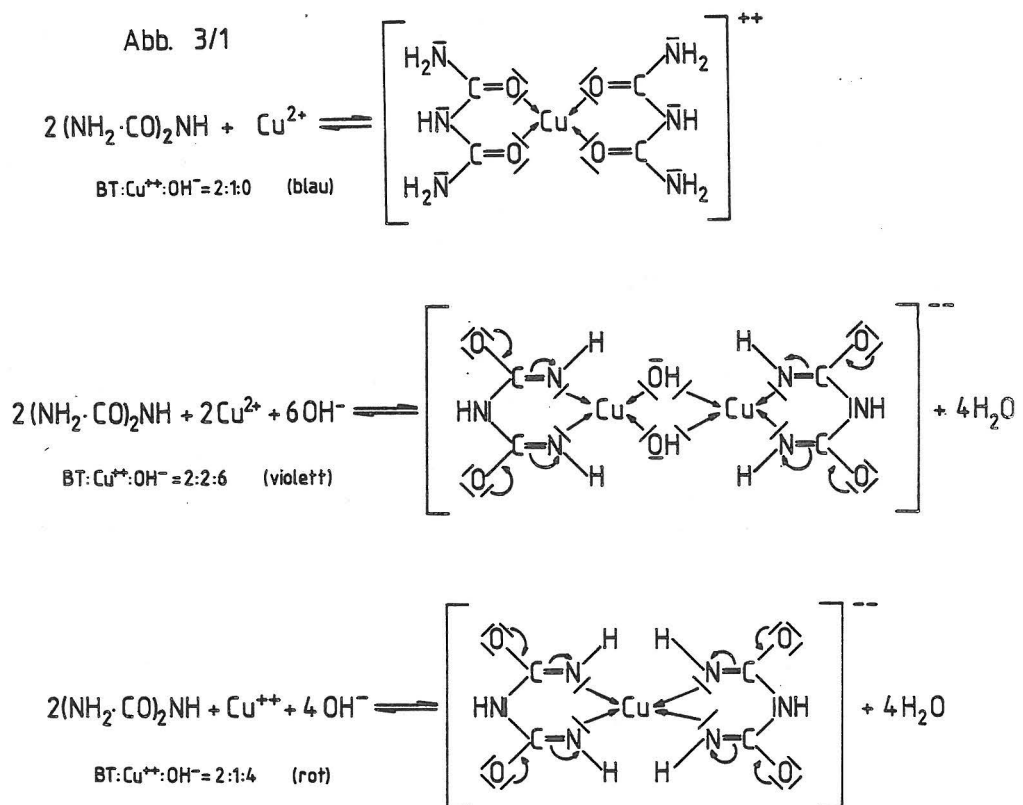
(3 Wiedergabe der Schaltzeichnungen nach BOCK, 1980 (1);
ausgenommen Abb. 2/9

(4 Angaben zur Verwendung der richtigen Filter geben
KADÁČ/VEJDELEK; Handbuch der photometrischen Analyse
organischer Verbindungen; Verlag Chemie und andere einschlägige Werke.

3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

3.1. Erläuterung der Methode und des Arbeitsvorgangs

Bei der Konzentrationsbestimmung von Eiweißen bedient man sich der Fähigkeit von Proteinen, mit bestimmten Substanzen Komplexe eingehen zu können. In unserem Fall verwenden wir ein Kupfer (II) - Salz, das zusammen mit dem Protein einen farbigen Komplex bildet, den man Biuret (BT) nennt. Wichtig dabei ist, daß das Protein mindestens zwei CO-NH-Gruppen besitzt, wie sie bei Biuret ($(\text{NH}_2\text{CO})_2\text{NH}$) vorliegen. Je nach Konzentrationsverhältnis Protein (PT): Cu^{++} : OH^- bilden sich verschiedenfarbige Komplexe, deren Absorptionsmaxima in verschiedenen Bereichen liegen (Abb. 3/1).



Die Hydroxidionen kommen aus der Base, die notwendig ist, um das Protein zu dehydrieren.

BOCK (1980) gibt noch andere Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration an. Eine davon sei der Vollständigkeit halber erwähnt. Sie beruht auf der Möglichkeit, mit organischen Farbstoffen ebenfalls farbige Komplexe zu bilden, die mit Hilfe der Photometrie untersuchbar sind.

Am gebräuchlichsten jedoch ist die Biuretmethode, die sich

durch ihre hohe Spezifität ausgezeichnet.

Bei der Durchführung der Analyse ist zuerst eine Blindlösung anzufertigen, die sämtliche zur Bestimmung nötigen Stoffe, mit Ausnahme des Proteins, enthält. Diese bringt man in den Strahlengang des Photometers und geht wie unter 2.5. beschrieben vor. Die Blindlösung besteht aus einem Cu^{++} - Salz, das in Natronlauge gelöst ist.

Nach vorgenommener Eichung stellt man eine Probelösung her, um den Extinktionskoeffizienten e'' festzustellen. Bei dem von mir gebauten Photometer sollte zur Sicherheit eine zweite Probelösung anderer Konzentration zur Koeffizientenbestimmung bereit gehalten werden. In jedem Fall ist von Anfang an darauf zu achten, daß man ein Filter im Bereich 535nm (grün) verwendet.

Sobald man das Gerät geeicht, sowie den Extinktionskoeffizienten bestimmt hat, gibt man das zu bestimmende Eiweiß in die Cu^{++} -NaOH-Lösung, die in der gleichen Konzentration vorzuliegen hat, wie die der Blind und Probelösung.

Diese Küvette bringt man in den Strahlengang und bestimmt die Extinktion E , welche man in die Gleichung (1.13) einsetzt. Man erhält dann die Konzentration c des zu untersuchenden Proteins.

$$(1.13) \quad c = \frac{\log \frac{I_0}{I}}{e'' \cdot l} \quad \text{bzw.} \quad c = \frac{E}{e'' \cdot l}$$

Störend bei dieser Methode sind außer reduzierenden Verbindungen höhere Fettsäuren, Salzsäure, Saccharose, Lactose, Phenole, Triethanolamin, Mannit, Triglyzeride sowie EDTA.

Ohne irgendeinen Einfluß sind nach (1) hingegen Nucleinsäuren, Phosphate, Chloride, Flouride, etliche Metallionen und Eisen - Salze.

Bei vorliegender Facharbeit wurde neben der Feststellung des Koeffizienten e'' eine Eichkurve des Proteins angefertigt.

3.2. Arbeitsdurchführung

Die einzelnen Mengen und Konzentrationen der Stoffe wurden anhand von Versuchen auf den Zweck der Facharbeit zugeschnitten.

a) Benötigte Reagenzien

Kupfersulfat (Substanz 1)

Ka-Na-Tartrat (Substanz 2)

Natriumhydroxyd (Substanz 3)

dest. Wasser

Eiweiß (Bei dieser Arbeit wurde Albumin aus Eiern trocken von MERCK verwendet)

b) Arbeitsdurchführung

3g der Substanz 1 und 6g der Substanz 2 werden abgewogen und in 200ml aqua dest. gelöst (Lösung A). Von Substanz 3 werden 300ml 2.5Molare Lösung hergestellt und zusammen mit Lösung A auf 1000ml aufgefüllt. Die sich einstellende tiefblaue Farbe wird durch den Komplex der Cu^{++} -Ionen mit dem Tartrat hervorgerufen, den man Biuret nennt.

Dann werden 2g des Eiweißes unter längerem Rühren in 200ml Wasser gelöst. Nach vollständigem Lösen filtriert man, um eine klare, zur photometrischen Bestimmung geeignete Flüssigkeit zu bekommen. Nun stellt man eine Verdünnungsreihe des Eiweißes nach Tabelle 1 her, wobei in jedes Reagenzglas je 10ml Biuret gegeben werden.

Nach der Eichung (siehe 2.5.) bringt man die mit der jeweiligen Konzentration an Eiweiß gefüllten Küvetten in den Strahlengang des Photometers und liest die Intensität I ab. Dabei ist auf mehrmalige Kontrolle der Intensität I_0 zu achten.

Das externe Strommeßgerät soll eine Meßskala bis 10mA besitzen und wird am Eingang 'ext. Meßgerät' angeschlossen. Günstig ist ein digitales Amperemeter. Am Eingang 'Lampenspannung' muß eine Spannung von max. 15V liegen. Der von mir verwendete Filter stammte aus der Physiksammlung des Gymnasiums Roth.

c) Ergebnisse

Die Intensitäten des Stromes meiner Meßreihe sind aus

Tabelle 1

Angesetzte Verd. (g/l) ≙ PT (ml)	H ₂ O(ml)	I(mA)	E(10 ⁻²)	T(%)	a(%)
0.0	10.0	3.00	0.00	100	0.0
0.5	9.5	2.80	3.00	93	17.7
1.0	9.0	2.70	4.58	90	10.2
1.5	8.5	2.45	8.80	82	15.0
2.0	8.0	2.40	9.69	80	5.0
2.5	7.5	2.25	12.5	75	2.0
3.0	7.0	2.15	14.5	72	5.2
3.5	6.5	2.00	17.6	67	1.4
4.0	6.0	1.94	18.9	65	7.4
4.5	5.5	1.90	19.8	63	13.7
5.0	5.0	1.84	21.2	61	16.9
5.5	4.5	1.75	23.4	58	16.6
6.0	4.0	1.70	24.7	57	19.3
6.5	3.5	1.65	26.0	55	21.6
7.0	3.0	1.60	27.3	53	23.5
7.5	2.5	1.60	27.3	53	28.6
8.0	2.0	1.55	28.7	52	29.7
8.5	1.5	1.55	28.7	52	33.8
9.0	1.0	1.55	28.7	52	37.5
9.5	0.5	1.50	30.1	50	37.9
10.0	0.0	1.50	30.1	50	41.0

a gibt die errechnete Abweichung zur hergestellten Konzentration in Prozent an. Weitere Erläuterungen im Text. Zusätzlich sind jeweils 10ml Biuret hinzuzugeben.

Tabelle 1, Spalte 3 ersichtlich. Mit Gleichung (1.12) bestimmte ich die Extinktion E. Gleichzeitig trug ich in die Tabelle die Durchlässigkeit T ein (siehe 1.2.), wobei deutlich die Nichtlinearität bei Nichtgültigkeit des LAMBERT-BEERSchen Gesetzes erkennbar ist.

Dann wurden die Werte in das Koordinatensystem (siehe Abb. 3/2) übertragen. Dabei wurde ersichtlich, daß die Gültigkeit des LAMBERT-BEERSchen Gesetzes ab einer Konzentration von etwa 4g/l Albumin nicht mehr gegeben ist. Deshalb berechnete ich aus den Werten bis 4g/l den Extinktionskoeffizienten nach

folgender Gleichung:

$$(3.1) \quad e'' = \frac{\sum_{c=0.5}^4 \frac{E(c)}{c}}{8} \quad c \in \{0.5, 1, 1.5, \dots, 4\}$$

Somit ergab sich für e'' ein Wert von $0.051^{\text{l}}/\text{cm}\cdot\text{g}$. Mithilfe Gleichung (1.13) rechnete ich auf die Konzentrationen zurück, um die Abweichungen a zur Ausgangskonzentration herauszufinden:

$$(3.2) \quad a = \left| 100\% - \frac{E(c) \cdot 100\%}{e'' \cdot c \cdot 1\text{cm}} \right|$$

Hier bestätigte sich eine Meßreihe mit anorganischer Substanz, die im Bereich geringer Konzentrationen ebenfalls größere Abweichungen erkennen ließ, was jedoch auf Ableseungenauigkeiten bei kleinen Stromänderungen hinweisen kann. Die Verschiedenheiten bis zu 41% ab Konzentrationen von 4.5g/l sind bereits oben erklärt.

Durch diese Meßreihe wurde zum einen ersichtlich, daß das von mir gebaute Photometer zur Konzentrationsbestimmung in einem bestimmten Rahmen geeignet ist. Voraussetzung dafür ist allerdings, daß die Absorption zwischen 80 und 60% liegen muß. Bei Stoffen geringeren Molekulargewichts (anorganische Substanzen) können die Grenzen weiter auseinander sein (ca. 80 - 30%). Zum anderen wurde das LAMBERT-BEERSche Gesetz als völlig zutreffend erkannt. Deutlich festzustellen sind die Abweichungen bei großen Konzentrationen, sowie die Linearität bei geringen Konzentrationen.

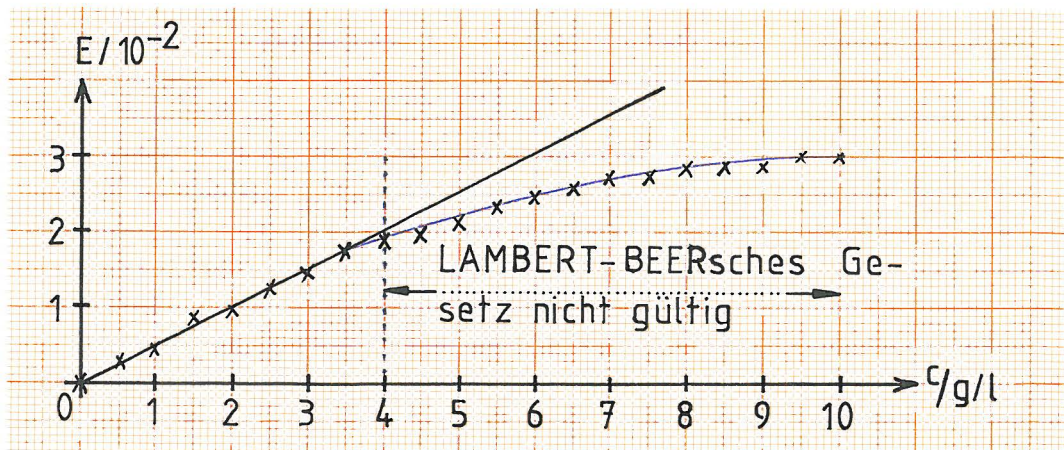


Abb. 3/2

Der durchschnittliche Fehler von 8% ($c=0.5 - c=4\text{g/l}$) liegt im Rahmen der Schulchemie bzw. -physik.

Das Ziel dieser Facharbeit, die Konstruktion eines Photometers, sowie die Konzentrationsbestimmung eines Proteins nach der Biuretmethode, wurde somit erreicht.

4. Schlußbetrachtungen.

Die anfänglichen Probleme, die sich bei dem Bau des Geräts ergaben, sowie die Bedenken, ob ein einfacher Photowiderstand den Anforderungen genüge, konnten durch die Meßreihe voll ausgeräumt werden. Ebenso wurden durch die Versuche die theoretischen Grundlagen von LAMBERT, BEER und BOUGUER in ihrem Umfang als gültig erkannt. Gleichzeitig wurde mir klar, daß die Photometrie tatsächlich eine relativ einfache Methode ist, um Konzentrationen festzustellen. Ob man einen Fehler von durchschnittlich 8% allerdings in Kauf nehmen will, ist von Fall zu Fall zu entscheiden. Die Analyse organischer Substanzen, dies zeigten die Versuche, ist vor allem zu Demonstrationszwecken gut geeignet. Will man jedoch exakte Daten, so ist eine Maßanalyse einer Bestimmung mit dem von mir gebauten Photometer vorzuziehen. (Das Verhalten bei mehreren organischen Substanzen konnte nicht überprüft werden.) Die Abweichungen in Tabelle eins ergeben sich nicht nur aus Ungenauigkeiten des Geräts, sondern sind gleichfalls durch Differenzen beim Herstellen der Verdünnungsreihe festgelegt. Um die absolute Genauigkeit des Gerätes zu erkennen, wäre es sicherlich wünschenswert, mehrere Meßreihen herzustellen, die genau gleiche Substanzen in gleichen Konzentrationen enthalten und im Gerät analysiert werden.

Dies könnte durchaus das Ziel einer weiteren Arbeit sein, die als Thema 'die Genauigkeit des Photometers bei der Analyse organischer und anorganischer Substanzen' ins Auge faßt.

5. Anhang

Anfang Februar konnte ich Dank der Bereitstellung des Photometers eines Rother Arztes meine Ergebnisse der Facharbeit überprüfen. Dabei verwendete ich die Eiweißansätze meiner Arbeit, die ich aufbewahrt hatte. In wenigen Minuten waren die Daten aufgenommen (siehe Tabelle 2, Spalte 2) und konnten zum Vergleich mit den Daten aus Tabelle 1 verwendet werden.

Zu erwähnen ist, daß ich einen Filter für Quecksilberdampflampen (564nm) gebrauchte, der 60 nm über dem meines für Tabelle 1 benutzten lag.

Angesetzte Verd. (g/l) ≙ PT (ml)	E ₂	E ₂ '	E ₁	a ₂	a ₁ (%)
0.0	.000	.000	.000	0.0	0.0
0.5	.042	.020	.030	16.5	17.7
1.0	.102	.048	.046	0.2	10.2
1.5	.156	.074	.088	3.0	15.0
2.0	.211	.100	.097	4.4	5.0
2.5	.260	.123	.125	2.7	2.0
3.0	.309	.146	.145	1.6	5.2
3.5	.378	.179	.176	6.8	1.4
4.0	.399	.189	.189	1.4	7.4
4.5	.448	.212	.198	1.6	13.7

E₂' = E₂/f; e''₁ = 0.0511/cm·g; e''₂' = 0.0481/cm·g; Fehler: 5.9%

Aus Tabelle 2, Spalte 2 und 3, ist ersichtlich, daß die Extinktionswerte von denen der Tabelle 1 deutlich abweichen. Mit folgender Formel konnte ich eine Linearität bezüglich dieser Abweichung feststellen:

$$(5.1) \quad f = \frac{\sum_{c'=1}^9 \frac{E_1(c'/2)}{E_2(c'/2)}}{9} = 2.11$$

E₁ = Werte Tab. 1
E₂ = Werte Tab. 2

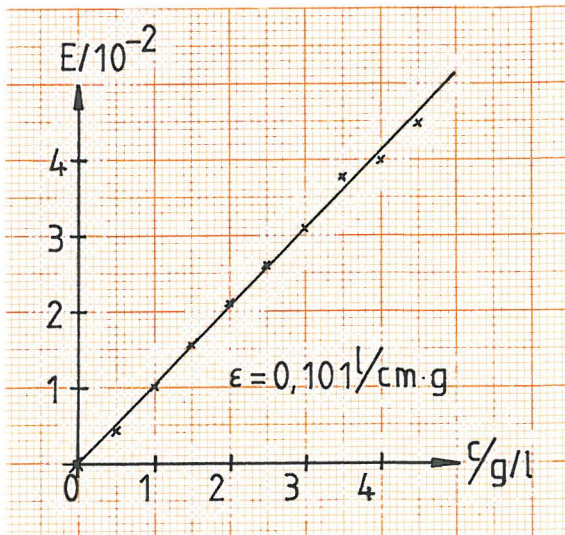


Abb.5/1

Dadurch wurde es möglich, von den zweiten Werten auf die ersten zurückzuschließen. Ich berechnete ein weiteres Mal den Extinktionskoeffizienten, ähnlich Formel (3.1) nur einschließlich des Werts $c=4.5\text{g/l}$, der sich zu $0.048\text{l/cm}\cdot\text{g}$ ergab.

Leider lassen sich aus Tabelle 2 nicht alle gestellten Fragen klären. Dies wäre nur anhand eines zweiten Ansatz-

es möglich gewesen (siehe 4.). Dennoch erkennt man folgendes:

Der Wert 0.5g/l hat eine ähnlich starke Abweichung a wie in Tabelle 1. Daraus folgt, daß die Konzentration falsch eingestellt wurde und kein Ablesefehler vorliegt.

Bei allen anderen Konzentrationen liegen bezüglich Tabelle 1 deutliche Ablesefehler vor, also keine durch falsche Herstellung des Ansatzes oder des Gerätes, was von mir vermutet wurde.

Schließlich kann man noch zwei Dinge feststellen. Zum einen steigt die Abweichung a_2 ab dem Wert 4g/l an, was auch bei a_1 zu erkennen ist und zum anderen läßt sich sagen, daß die Abweichung von 5.9% bezüglich e''_1 und e''_2 wieder im Rahmen der Schulphysik bzw. Chemie liegt und als durchaus zufriedenstellend angesehen werden kann, setzt man voraus, daß der Wert e''_2 richtig ist. Die Erkenntnisse am Ende von Kapitel 3.2. können somit durch die Vergleichsmessung als bestätigt angesehen werden.

Am Ende möchte ich noch festhalten, daß die Ableseungenauigkeiten, die zu den Abweichungen in Tabelle 1 führten, nur durch die Verwendung eines digitalen Amperemeters zusammen mit meinem Photometer so gering wie möglich gemacht werden können.

6. Literaturhinweise

- (1) R.Bock; Methoden der analytischen Chemie; Band 2, Teil 1; Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beech/Florida, Basel; 1980; s.114-119 u. s. 140-165
- (2) B.Kadáč/Z.J.Vejdělík; Handbuch der photometrischen Analyse organischer Verbindungen; 1. Ergänzungsband; Verlag Chemie, Weinheim, New York; 1977; s.376ff
- (3) B.T.Skeggs; American Journal for Clinical Pathy 28; 1957; s.311ff

Ich erkläre, daß ich die Facharbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und nur die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen und Hilfsmittel benützt habe.

Wendelstein, den 05. Februar 1984


(Ch. Wolkersdorfer)