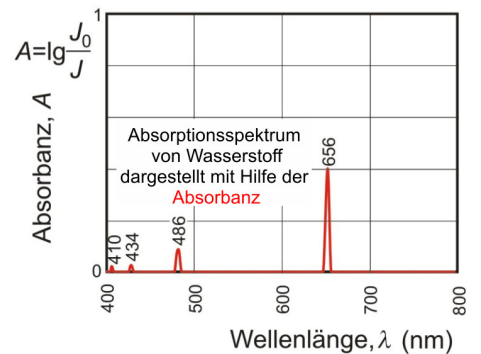
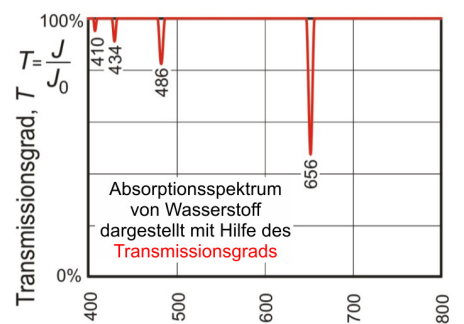
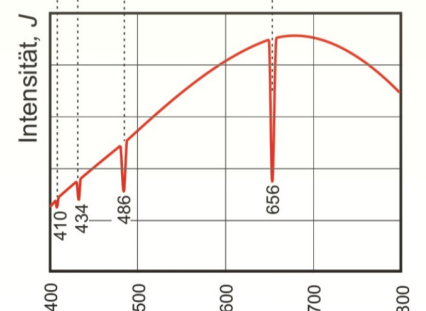
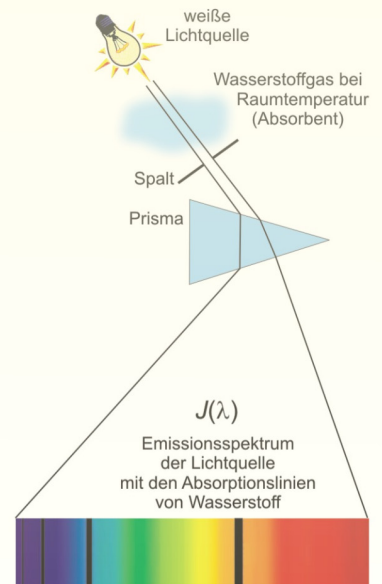
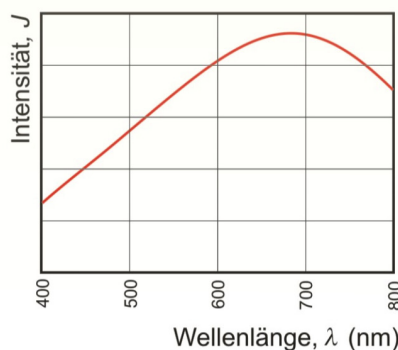
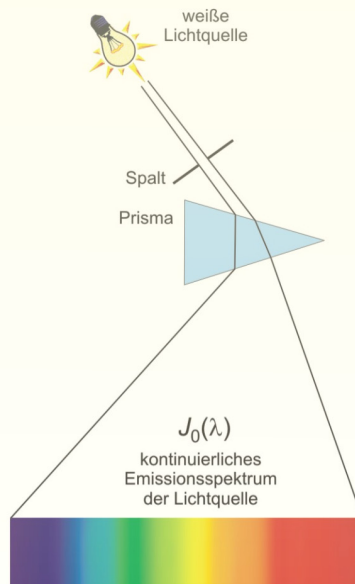
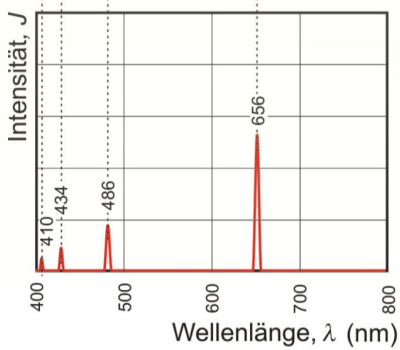
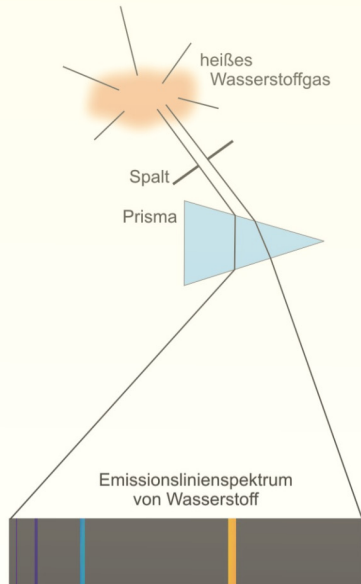
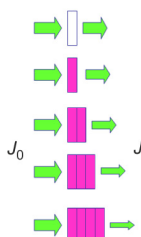
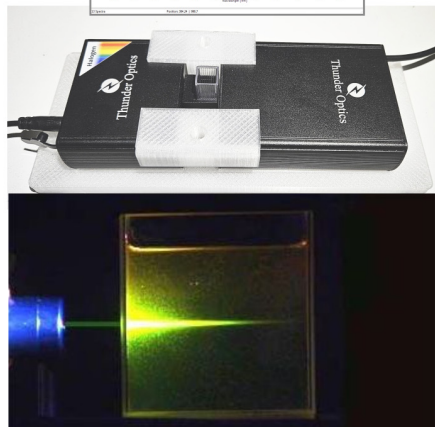
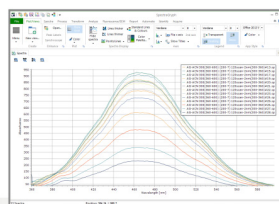


LICHTABSORPTION

PHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN DER SPEKTROPHOTOMETRIE



Pulsmesser nach dem Absorptionsverfahren



GRUNDBEGRIFFE:

LICHTABSORPTION: Das Aufnehmen von Lichtteilchen (Photonen) in Materie. Auf atomarem Niveau regt die Energie der absorbierten Photonen die äußeren Elektronen an.

EXTINKTION (E), OPTISCHE DICHT (OD): Dekadischer Logarithmus des Quotienten ($\lg(J_0/J)$) aus der Intensität des senkrecht einfallenden (J_0) und des senkrecht ausfallenden Lichtes (J).

ABSORBANZ (A): Dekadischer Logarithmus des Quotienten ($\lg(J_0/J)$) aus der Intensität des senkrecht einfallenden (J_0) und des senkrecht ausfallenden Lichtes (J) wenn die durch Lichtstreuung verursachte Intensitätsabnahme vernachlässigbar ist und es lediglich eine Lichtabsorption auftritt.

MOLARER EXTINKTIONSKOEFFIZIENT ($\epsilon(\lambda)$): Eine für das Absorptionsvermögen charakteristische stoffspezifische Größe, die von der Wellenlänge des Lichtes und von den materiellen Eigenschaften des Stoffes abhängt. Er gibt die **optische Dichte** einer Lösung mit Einheitskonzentration und Einheitsschichtdicke an. (Er ist unabhängig von der Konzentration und Schichtdicke des Stoffes.)

LAMBERT-BEER-GESETZ: Eine für dünne Lösungen gültige Beziehung, nach der die **Absorbanz** der Lösung proportional zur Konzentration (c) und Schichtdicke des Materials (x) ist: $\lg(J_0/J) = \epsilon(\lambda) \cdot c \cdot x$, wobei der Proportionalitätsfaktor der **molare Extinktionskoeffizient** ($\epsilon(\lambda)$) ist.

KOMPLEMENTÄRFARBEN: Zwei Farben, deren additive Farbmischung Weiß ergibt. Solche Farbpaare sind z.B. Gelb-Blau, Grün-Rot usw. Absorbiert ein Material eine gewisse Farbe, so wird die von diesem Material reflektierte oder die austretende Farbe bei durchgehendem Licht die Komplementärfarbe der absorbierten Farbe sein.

Im Praktikum wollen wir die Grundprinzipien der Absorptionsspektroskopie kennen lernen und mit spektrophotometrischen Methoden die Konzentration verschiedener Lösungen bestimmen.

Beim **Studium von biologischen Strukturen** ist die Untersuchung der Wechselwirkung von Licht und Materie von großer Bedeutung. Infolge der Wechselwirkungen erhält man aus den Intensitätsänderungen des auf die Probe fallenden Lichtes nützliche Informationen über die Elektronen- bzw. Raumstruktur der in Wechselwirkung stehenden Moleküle, sowie Informationen bezüglich der Konzentrationsverhältnisse. Mit spektrophotometrischen Untersuchungen wird die Abhängigkeit der Lichtabsorption von der Wellenlänge untersucht und es kann die Konzentration dünner Lösungen bestimmt werden. Beides zusammen garantiert breite Anwendungsmöglichkeiten in der Biologie und der medizinischen Praxis.

Eines der wichtigsten Anwendungsgebiete ist die **Labordiagnostik**. Die Konzentration verschiedener Stoffe (z.B. Glukose, Cholesterin usw.) in Blut, Urin und anderen Körperflüssigkeiten wird mit Absorptionsmessungen bestimmt.

THEORETISCHE ZUSAMMENFASSUNG

Die Intensität eines Lichtstrahls wird beim Durchdringen von Materie durch Absorption bzw. Streuung schwächer. Bei den in der Praxis untersuchten dünnen Lösungen ist die Streuung minimal, deshalb ist die Schwächung eindeutig Folge der Absorption (s. Abb. 1). Das Maß der Absorption wird am häufigsten mit der **Absorbanz (A)** gekennzeichnet:

$$A = \lg \frac{J_0}{J}, \quad (1)$$

wo J_0 die Intensität des senkrecht einfallenden und J die Intensität des senkrecht austretenden Lichtes sind. Wenn die Lichtstreuung in der untersuchten Lösung vernachlässigbar ist, entspricht der Absorptionswert der **Extinktion (E)** oder der **optischen Dichte (OD)**.

Alternativ zum Absorptionsvermögen kann man einen Stoff auch mit seiner Durchlässigkeit charakterisieren. Unter Durchlässigkeit oder **Transmissionsgrad (T)** versteht man den Quotienten

$$T = \frac{J}{J_0} (\cdot 100 \%), \quad (2)$$

der meist in Prozent angegeben wird. Die Tabelle illustriert die Zusammenhänge zwischen den beschriebenen Größen.

Absorption:	J_0 (rel. Einheit)	J (rel. Einheit)	J_0/J	$A = \lg(J_0/J)$	$T = J/J_0$ (%)
keine	100	100	1	0	100%
gering	100	50	2	0,301	50%
mittlere	100	10	10	1	10%
hoch	100	1	100	2	1%
unendlich	100	0	∞	∞	0%

Das Maß der Absorption kann bei den verschiedenen Wellenlängen unterschiedlich sein, das zeigt das **Absorptionsspektrum**, bei dem die Absorbanz als Funktion der Wellenlänge dargestellt wird.

Das Absorptionsspektrum der Atome und Moleküle hängt von ihrer Elektronenstruktur ab. Die gebundenen Elektronen befinden sich in verschiedenen, gut bestimmten (gequantelten) Energiezuständen. Dementsprechend erwarten wir, dass ein Elektron aus dem Grundzustand in den Anregungszustand übergeht, wenn es genau die Energie erhält, die der Energiedifferenz zwischen einem höheren Energiezustand (E_2) und dem gegebenen Grundzustand (E_1) entspricht. Beleuchtet man also solche Atome mit Licht, dessen Energie (Frequenz, Wellenlänge, Farbe) dieser Energiedifferenz ($E_2 - E_1$) entspricht, dann wird das System einen Teil der Photonen absorbieren:

$$E_2 - E_1 = \varepsilon = h \cdot f = h \frac{c}{\lambda}, \quad (3)$$

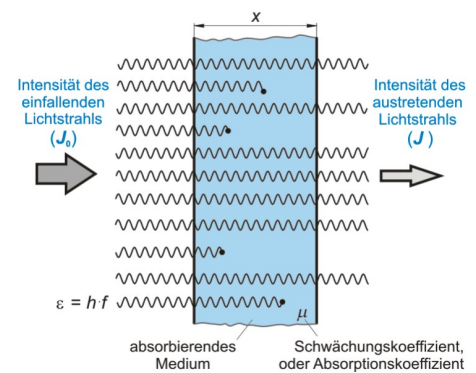
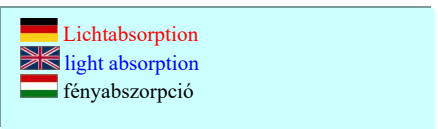
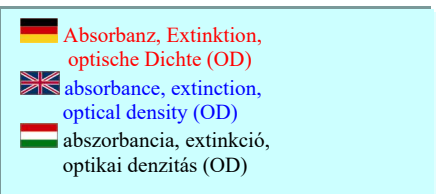


Abb. 1. Lichtabsorption in einem Medium.



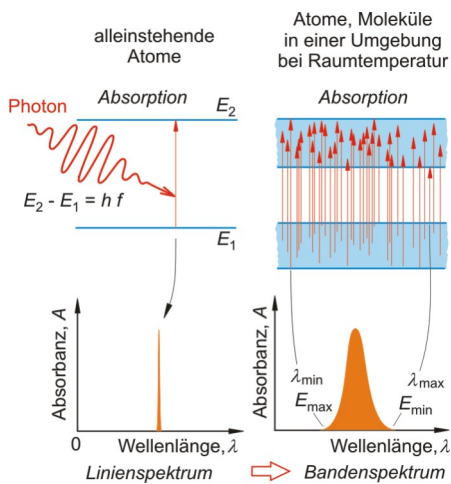


Abb. 2. Der Absorptionsprozess auf Atomniveau bzw. die Verbreiterung des Linienpektrums zum Bandenspektrum

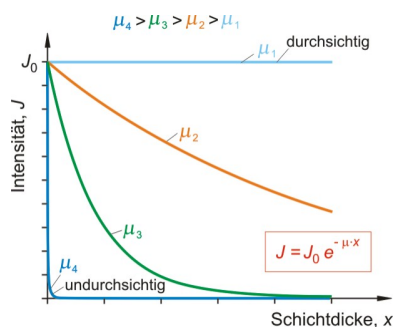


Abb. 3. Die Abhängigkeit der Intensität des durchfallenden Lichtes von der Schichtdicke bei verschiedenen Schwächungskoeffizienten

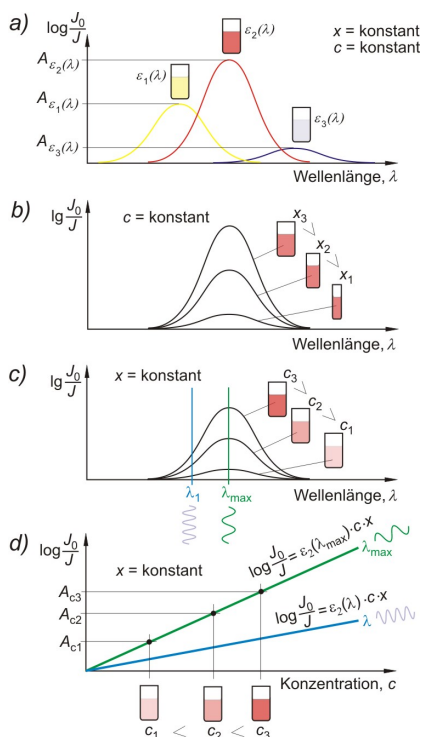


Abb. 4. Die Abhängigkeit des Absorptionsspektrums

- von dem Material,
- von der Schichtdicke,
- von der Konzentration.
- Absorbanz als Funktion der Konzentration (bei λ_1 und λ_{max}).

wobei $(E_2 - E_1)$ die zur Anregung erforderliche Energiedifferenz, ε die Energie des Photons, h das plancksche Wirkungsquantum, f die Lichtfrequenz, λ die Wellenlänge und c die Lichtgeschwindigkeit sind.

Nach der Anregung ist das System bestrebt, in den Grundzustand zurückzukehren, indem es den erhaltenen Energieüberschuss abgibt. Dieser Prozess erfolgt in den meisten Fällen in kleinen Schritten durch Abgabe von Wärme an die Umgebung (Relaxation).

Dieser einfache Gedankengang gibt aber keine Antwort auf die Frage, warum die Absorptionsspektren der Lösungen gleichartiger Moleküle nicht aus der Theorie entsprechenden scharfen Maxima (Linien) bei den diskreten Photonenenergien (Wellenlängen) bestehen, sondern aus deutlich verbreiterten Banden. Diese Tatsache erhält auch dadurch keine ausreichende Erklärung, dass bei Molekülen der Energiezustand der Elektronen durch ihren Schwingungs- und Rotationszustand gering verändert ist.

Die Verbreiterung ist auf zwei Faktoren zurückzuführen. Einerseits befinden sich die Moleküle in gelöstem Zustand in einem Lösungsmittel (d.h. in einer Umgebung von anderen Molekülen). Andererseits erfolgen die Messungen in der Regel bei Zimmertemperatur, in einer Umgebung von 290-300 K. Die Umgebung, d.h. die Anwesenheit der Moleküle des Lösungsmittels, sowie ihre starke Wärmebewegung führen schon allein zur Verbreiterung. Dazu kommt aber noch, dass die Wechselwirkungen mit der Umgebung (dem Lösungsmittel) die Zustände der Moleküle des gelösten Stoffes gering verändern, die vielen Moleküle also nicht mit der gleichen, sondern mit etwas abweichenden Energien angeregt werden (Abb. 2).

Das Maß der Absorption erhalten wir wegen der erwähnten Vernachlässigung der Streuung aus dem allgemeinen Schwächungsgesetz:

$$J = J_0 e^{-\mu \cdot x}, \quad (4)$$

wobei J_0 die in das Medium senkrecht eintretende, J die aus dem Medium senkrecht austretende Lichtintensität, μ der für das Medium bzw. die Wellenlänge des Lichtes charakteristische **Schwächungskoeffizient** und x die Dicke der absorbierenden Schicht sind (Abb. 3).

Aus Gl. (4) kann die schon eingeführte Absorbanz folgendermaßen ausgedrückt werden:

$$A = \lg \frac{J_0}{J} = \lg e \cdot \mu \cdot x. \quad (5)$$

Im Falle von **dünnen Lösungen**, in denen das Lösungsmittel in dem gegebenen Wellenlängenbereich nicht absorbiert (durchsichtig ist, wie z.B. im sichtbaren Bereich Wasser oder Alkohol), ist der Absorptionskoeffizient μ proportional der Konzentration der Lösung (c), und die rechte Seite von Gl. (5) lässt sich folgendermaßen trennen:

$$\lg e \cdot \mu \cdot x = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot x, \quad (6)$$

wobei $\varepsilon(\lambda)$ der sog. **molare Extinktionskoeffizient** (kurz Extinktionskoeffizient) ist, dessen Wert charakteristisch für das Medium von der Wellenlänge abhängt. Er gibt die optische Dichte einer Lösung von Einheitskonzentration und Einheitsschichtdicke an. Die Bezeichnung molar weist darauf hin, dass die Konzentration c in M, d.h. in mol/l gemessen wird. Für dünne Lösungen gilt also das **Lambert-Beer-Gesetz**:

$$\lg \frac{J_0}{J} = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot x. \quad (7)$$

Als **Absorptionsspektrum** wird meistens die Verteilung nach der Wellenlänge der Absorbanz ($\lg(J_0/J)$) angegeben (Abb. 4a, für drei chemisch unterschiedliche Lösungen). Nach Gl. (7) ist also die Absorbanz der Lösung bei allen Wellenlängen des Absorptionsspektrums proportional zur Schichtdicke (Abb. 4b) und zur Konzentration der Lösung (Abb. 4c). Misst man die Absorbanz einer Lösung bei einer bestimmten Wellenlänge λ , dann kann man bei bekanntem $\varepsilon(\lambda)$ und x die Konzentration bestimmen. Dies wird in der medizinischen Labordiagnostik eingesetzt. In Abb. 4d zeigen die unterschiedlichen Steigungen der Geraden, dass $\varepsilon(\lambda)$ bei jeder Wellenlänge unterschiedlich ist. Am genauesten kann die Konzentration bei der Wellenlänge des Maximums des Absorptionsspektrums (Abb. 4, λ_{max}) bestimmt werden, bei der die Gerade in Abb. 4d die größte Steigung hat. Diese Gerade ist die sog. **Kalibrationskurve**.

EIGENSCHAFTEN UND MESSUNG DES ABSORPTIONSSPEKTRUMS

In Abb. 5 sind die Absorptionsspektren von drei verschiedenen Lösungen mit gleicher Konzentration und Schichtdicke dargestellt (Kurve L, K und M). Man sieht, dass die verschiedenen Stoffe bei unterschiedlichen Wellenlängen absorbieren und dass sich die Extinktionskoeffizienten ($\epsilon(\lambda)$) ihrer Absorptionsbereiche deutlich voneinander unterscheiden (die Kurven haben unterschiedliche Maximalwerte).

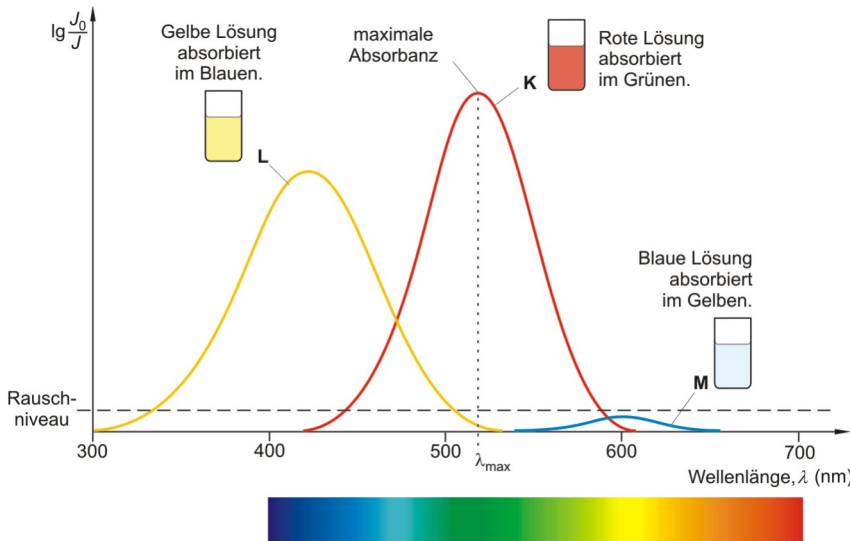


Abb. 5. Absorptionsspektrum von drei verschiedenen Lösungen gleicher Konzentration und Schichtdicke. Die Lösung M ist so farblos, dass sie wegen des Rauschniveaus des Spektrophotometers nicht mehr messbar ist.

Die **Maxima der Absorptionsspektren** (eine Lösung kann mehrere Maxima haben!) können — unter Berücksichtigung von Gl. (3) — mit den für die **Molekülstruktur charakteristischen Anregungsenergien der Elektronen** in Beziehung gebracht werden.

Untersucht man aber unterschiedliche Konzentrationen (c) derselben Lösung, dann ändern sich die Werte der Maxima — bei gleicher Schichtdicke — direkt proportional zur Konzentration (s. Gl. (7) und Abb. 4b). Diese Proportionalität kann zur **Bestimmung der Konzentration** genutzt werden.

Farbige, durchsichtige Lösungen absorbieren im sichtbaren Bereich nur bei bestimmten Wellenlängen. Unser Auge nimmt das durchgelassene Licht, die **Komplementärfarbe** des absorbierten Lichtes wahr (z.B. sehen wir eine im Grünen absorbierende Lösung als rot, eine im Blauen absorbierende als gelb und umgekehrt). Farblose Medien (z.B. Wasser, Alkohol) lassen das Licht im vollen sichtbaren Spektrum durch. Chlorophyll absorbiert im Roten und im Blauen, so sehen wir es insgesamt als grüne Farbe (Abb. 6).

Abb. 6. Das Absorptionsspektrum von Chlorophyll. Das Chlorophyll der Blätter absorbiert im Roten und im Blauen, deshalb erscheint es grün.

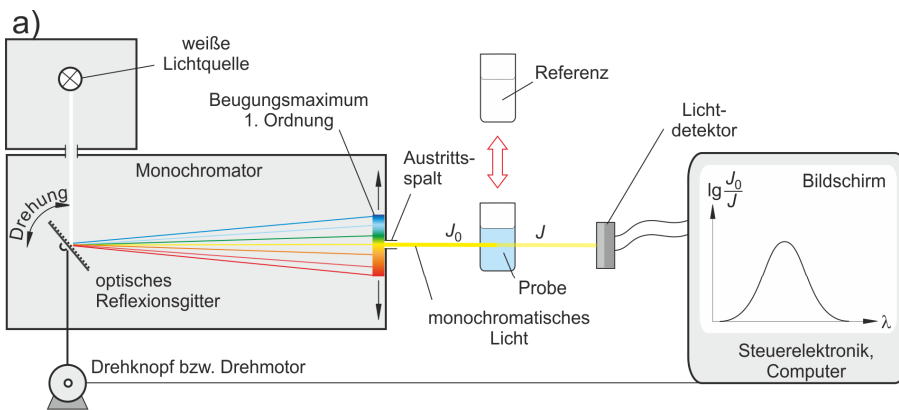


Abb. 7. Aufbau eines klassischen (a) und eines modernen (b) Absorptionsspektrophotometers.

Die Absorptionsspektren werden mit einem **Absorptionsspektrometer** (Spektrophotometer) gemessen (Abb. 7). Mit einem einfacheren Spektrometertyp wird die von der Wellenlänge abhängende Absorbanz der **Probe** und der **Referenzlösung** (Lösungsmittel) bei jeder Wellenlänge separat gemessen. Modernere Geräte arbeiten in einem breiten Wellenlängenbereich (z. B. 190-900 nm), und können automatisch im voreingestellten Bereich scannen. Die sog. Zweistrahlenspektrometer detektieren gleichzeitig die Probe und die Referenzlösung und zeigen mittels des eingebauten Computers sofort die Absorbanz als Wellenlängenfunktion an.

Das Messen der Referenzlösung ist erforderlich, um die von der Wellenlänge abhängige Empfindlichkeit des Detektors bzw. eventuelle Farbe des Lösungsmittels (die von der Wellenlänge abhängige Absorbanz) zu berücksichtigen.

Die spektrophotometrischen Methoden eignen sich auch zur Untersuchung von Komplexverbindungen. (Komplexe sind Verbindungen, bei denen auch die d Elektronenbahnen des Metallions an der chemischen Bindung teilnehmen.) Eine Gruppe der biologisch wichtigen Eiweiße, mehrere der prothetischen Gruppen (Coenzyme) der Chromoproteide (z. B. Häm, Zytochrome) sind Komplexverbindungen aus organischen Verbindungen (Liganden) und Metallionen. Die Metallionen verändern die Elektronenstruktur der organischen Verbindung, wodurch es zu einer Änderung der Absorption (Farbe) und biologischen Funktion der Verbindungen kommt. Es kann gleichermaßen wichtig sein, die Menge dieser Komplexe (Konzentration), ihre Stabilität und die Rate Metall/Ligand zu bestimmen. Auch auf diese Fragen können wir mit spektrophotometrischen Messungen eine Antwort erhalten.

Im Praktikum demonstrieren wir das Miniphotometer Ames MiniLab PC, mit dem sich die Konzentration von Hämoglobin im Vollblut und die Konzentration von Harnstoff, Glukose, Bilirubin (beim Erwachsenen und Neugeborenen), Cholesterin, HDL-Cholesterin und Triglycerid im Serum und Plasma messen lassen. In jedem Fall erfolgt die Bestimmung der Konzentration nach der Reaktion mit einem geeigneten Reagenz und es wird die Absorbanz bei 546 nm gemessen.

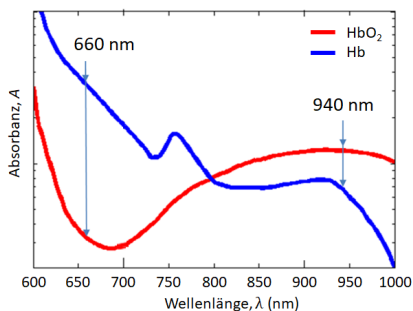


Abb. 8. Absorptionsspektren von Hämoglobin und Oxyhämoglobin.

Die Absorption des Hämoglobins spielt auch bei der sich rapide entwickelnden optischen Tomographie eine wichtige Rolle. Hierbei wird das Bild aus den Intensitätsänderungen von Infrarotlicht durch die Streuung in den durchdrungenen Geweben erstellt. Weil die Absorption des Hämoglobins im Infrarotbereich bedeutend stärker ist als die der Gewebezellen im Allgemeinen, wird die Intensität des Streulichtes abnehmen, wenn das Licht durch blutreiche Gewebe fällt. Darauf basiert z.B. die Untersuchung der Sauerstoffversorgung des Gehirns oder die Bestimmung von Ausdehnung und Lokalisation eines Schädelhämatoms.

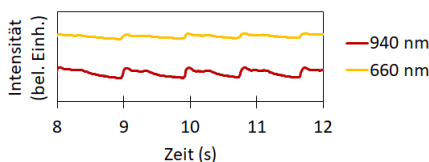


Abb. 9. Typisches Signal gemessen mit einem Pulsoxymeter.

Die Konzentration dünner farbiger Lösungen kann also durch Messen der Absorbanz im sichtbaren Bereich ausgeführt werden, was messtechnisch relativ einfach ist und sich auch leicht automatisieren lässt. Deshalb ist man in medizinischen Laboratorien in letzter Zeit bestrebt, Lösungen unbekannter Konzentration mit sehr geringem Extinktionskoeffizienten (die praktisch farblos sind) mittels geeigneter Reagenzien in farbige Lösungen mit hohem Extinktionskoeffizienten umzuwandeln. Bei ausreichendem Überschuss der Reagenzien stimmt die Konzentration des Komplexes mit der Konzentration der ursprünglich zu bestimmenden Konzentration überein. So kann mit Hilfe einer zuvor aufgenommenen Kalibrationskurve von Konzentration-Absorbanz des Komplexes die unbekannte Konzentration spektrophotometrisch mit Messung der Absorbanz sogar bei nur einer Wellenlänge bestimmt werden.

ABLAUF DER MESSUNGEN

1. DEMONSTRATION - PULSOXYMETRIE

Die pulsoximetrische Untersuchung des Hämoglobinmoleküls, das für die Aufnahme und den Transport des Sauerstoffs verantwortlich ist, basiert auf der Tatsache, dass die optischen Spektren von Hämoglobinmolekülen in verschiedenen Zuständen unterschiedlich sind (Abb. 8). Die Absorbanz von Oxyhämoglobin (HbO_2) ist bei 650–700 nm niedrig, während sie oberhalb von 900 nm, im Infrarotbereich, typischerweise höher ist. Das Spektrum von Deoxyhämoglobin (Hb) verläuft umgekehrt. Während der Pulsoximetrie wird ein relativ dünner Körperteil (z. B. eine Fingerspitze oder ein Ohrläppchen) mit Licht einer bestimmten Wellenlänge beleuchtet und die Intensität des austretenden Lichts gemessen. In diesem dünnen Gewebe wird die Lichtabsorption anderer Gewebe als des arteriellen Blutes als konstant angesehen, sodass die Änderung der Intensität des austretenden Lichts von der Änderung der Menge des arteriellen Blutes abhängt. Da die Menge des arteriellen Blutes entsprechend der Herzfrequenz (Puls) pulsiert, wird sich diese Pulsation auch im Messsignal widerspiegeln (Abb. 9). Daher kommt auch der Name des Verfahrens („Pulsoximetrie“). (Manche Geräte arbeiten mit einem schräg einfallenden, dann teilweise absorbierten und teilweise gestreuten Lichtstrahl, wobei eine vollständige Durchleuchtung des jeweiligen Körperteils nicht erforderlich ist.) Die gemessene Absorbanz hängt gemäß dem Lambert-Beer Gesetz auch von der Schichtdicke des untersuchten Gewebes ab, ist aber nicht genau bekannt und variiert von Patient zu Patient. Um die Konzentration des Oxyhämoglobins zu bestimmen, verwenden wir zwei Lichtstrahlen unterschiedlicher Wellenlänge (z. B. Rot mit einer Wellenlänge von 660 nm und Infrarot mit einer Wellenlänge von 940 nm). Aus dem Verhältnis der bei den beiden Wellenlängen gemessenen Absorbanzen lässt sich mit einer empirischen Formel die Sauerstoffsättigung berechnen.

Der Grad der Sauerstoffaufnahme hängt aber nicht nur von der Hämoglobinkonzentration ab. Die effektive Sauerstoffbindung der Hämoglobinmoleküle hängt auch stark von der Oxydationsstufe der Eisenionen in der Hämgruppe des Hämoglobins ab. Die Fe^{3+} -Ionen des Methämoglobins eignen sich z. B. nicht zur Bindung von Sauerstoff und so auch nicht zur Versorgung der physiologischen Funktion. Auch die Fe^{2+} -Ionen der Hämoglobinmoleküle binden nur dann Sauerstoff, wenn die entsprechenden Bindungsstellen der Eisenionen frei sind (Deoxyhämoglobin) oder nur locker gebundene Liganden enthalten (CO_2). Liganden mit starker kovalenter Bindung, wie z. B. CO-Moleküle oder CN^- -Ionen, lähmen die normale Hämoglobinfunktion. Da die Oxydationsstufe der Eisenionen und das chemische Milieu die Wechselwirkung der Hämoglobinmoleküle mit Licht und damit auch das Absorptionsspektrum modifizieren, kann man anhand des Spektrums auch auf den Hämoglobintyp und eventuelle pathologische Veränderungen schließen.

2. BESTIMMUNG DER KONZENTRATION VON METHYLENBLAU

Als Modellsubstanz verwenden wir eine wässrige Methylenblaulösung. Die Methylenblaulösung (Abb. 10) besitzt eine blaue Farbe (absorbiert gelb) und hat einen sehr hohen Extinktionskoeffizienten. Daher untersuchen wir die Substanz in der Praxis in hoher Verdünnung.

Um die Wellenlänge (λ_{\max}) des Absorptionsmaximums der Methylenblaulösung zu bestimmen, werden die Absorptionsspektren der unterschiedlichen Lösungen einzeln mit dem Thunder Optics-Spektrophotometer gemessen. (Abb. 11).

AUFGABEN

1. Messung der Absorptionsspektren von Methylenblaulösungen bekannter Konzentration.
2. Ablesung der Absorptionswerte im Spektrum der Lösung mit der höchsten Konzentration bei den Wellenlängen von $\lambda = 400, 450, 500, 550, 600, 620, 640, 660, 680, 700, 750$ und 800 nm. Darstellung des typischen Absorptionsspektrums von Methylenblau anhand der abgelesenen Daten.
3. Aus den erhaltenen Absorptionsspektren ermitteln wir die Wellenlänge, die der maximalen Absorbanz entspricht (λ_{\max}). Diese Wellenlänge ist für alle Lösungen gleich. Basierend auf Gleichung (3) mit Hilfe von λ_{\max} berechnen wir die durchschnittliche Energie, die für den Elektronenübergang benötigt wird.
4. Eine Kalibrationskurve wird erstellt, indem die bei λ_{\max} von Lösungen mit bekannter Konzentration gemessenen Absorbanzwerte als Funktion der Konzentration aufgetragen werden.
5. Messung des Absorptionsspektrums der Lösung unbekannter Konzentration und anschließende Ablesung ihrer Absorbanz bei λ_{\max} . Mithilfe der Kalibrationskurve wird die unbekannte Konzentration bestimmt.

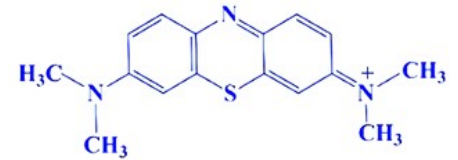


Abb. 10. Die Struktur des Methylenblau-Moleküls.

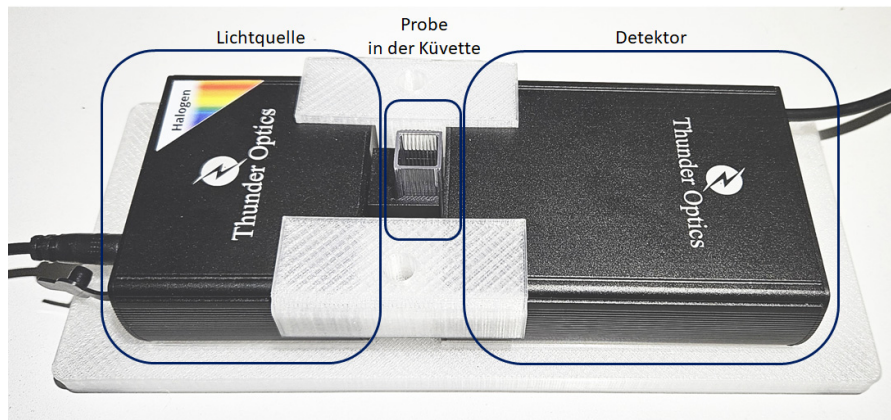


Abb. 11. Teile des Thunder Optics-Spektrophotometers.