

## Versuchsprotokoll

### Einleitung

In vergangenen Versuchen wurde das Photometer von uns zur qualitativen Analyse (z.B. von Blattfarbstoffen), d.h. zur Identifizierung und Überprüfung der Reinheit einer Probe genutzt. Mit dem Absorptionsspektrum eines Stoffes lassen sich aber auch quantitative Analysen (z.B. zur Konzentrationsbestimmung) durchführen.

Die mathematische Grundlage hierfür lieferten die beiden Wissenschaftler Johann Heinrich Lambert (1728-1777) und August Beer (1825-1863), welche das Lambert-Beer'sche Gesetz formulierten.

Erst dieses liefert den Zusammenhang zwischen der Extinktion ( $E$ ), der durchquerten Schichtdicke ( $d$  in cm) und der Konzentration des absorbierenden Stoffes ( $c$  in mol/l). Die Extinktion wurde eingeführt, um die Zusammenhänge von Absorption und Transmission zu linearisieren:

$$E_{\lambda} = \varepsilon * \chi * \delta$$

Die durch die Gleichung definierte physikalische Größe  $\varepsilon$  wird molarer Extinktionskoeffizient der absorbierenden Substanz bei der Wellenlänge  $\lambda$  genannt und in der Einheit [ $\text{l} * \text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ ] angegeben. Im Idealfall ist  $\varepsilon$  eine unter definierten Messbedingungen (Temperatur, Lösungsmittel, pH usw.) nur von der absorbierenden Substanz und der Wellenlänge  $\lambda$  der monochromatischen Strahlung, nicht aber von  $c$  und  $d$  abhängige Konstante. Es besteht daher ausschließlich ein linearer Zusammenhang zwischen  $E$  und  $c$ , d.h. wenn sich die Konzentration eines Stoffes erhöht, ändert sich das Absorptionsspektrum nicht, wohl aber nimmt die Extinktion zu ( $E \sim c$ ).

### Prinzip

Zur Überprüfung des Lambert-Beer'schen Gesetzes und zur Bestimmung der Bedingungen, welche für dieses bestehen müssen, ermitteln wir empirisch den molekularen Extinktionskoeffizienten von Methylblau. Hierzu wird zunächst das Absorptionsmaximum von Methylblau bestimmt, um dann bei verschiedensten Verdünnungen der Lösung die entsprechenden Extinktionen zu ermitteln und in einem Graphen in Abhängigkeit von der Stoffmengenkonzentration aufzutragen.

Aus dem linearen Bereich des Graphen soll dann der Extinktionskoeffizient nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz errechnet und mit dem Literaturwert verglichen werden.

### Versuchsdurchführung

1. ca. 20mg Methylblau (genaue Menge siehe Ergebnis) analytisch in einen 100ml Messkolben einwiegen, mit destilliertem Wasser auffüllen und durch Schütteln homogenisieren
2. mit einer 10ml Vollpipette 10ml dieser Lösung abnehmen und in einen zweiten 100ml Messkolben überführen. Diesen dann ebenfalls mit destilliertem Wasser auffüllen (= 1:10 verdünnt). Diese Lösung entspricht der Stammlösung  $V_0$

3. mit dieser Stammlösung wird nun eine Kunststoffküvette (nach Augenmaß) zu ca.  $\frac{3}{4}$  gefüllt, ebenso wird eine zweite Küvette zu  $\frac{3}{4}$  mit destilliertem Wasser (=Referenzprobe) gefüllt
4. die Referenzprobe wird in die erste Kammer des kalibrierten Photometers gegeben, die Küvette mit der Stammlösung in die zweite Kammer
5. der Wellenlängenbereich wird auf 300-800nm eingestellt und danach wird ein Absorptions-spektrum erstellt
6. mit Hilfe des Programmes wird das Absorptionsmaximum ermittelt und notiert (siehe Ergebnis)
7. von der Stammlösung wird nun eine Verdünnungsreihe erstellt; hierzu werden zunächst 10 Küvetten im Küvettenrack und die Mikropipetten mit den Spitzen vorbereitet
8. in zwei Bechergläser kommen (nach Augenmaß) etwas mehr als 10ml der Stammlösung in das eine und 10ml destiliertes Wasser in das andere Glas
9. mit Hilfe der Mikropipetten werden dann bestimmte Mengen der Stammlösung und dH<sub>2</sub>O in die Küvetten pipettiert (genaue Mengen siehe Ergebnis) und gleichzeitig in diesen durch Ansaugen und Ablassen der Flüssigkeit mit der Pipette homogenisiert
10. am Photometer bleibt die Referenzprobe in der ersten Kammer, in die folgenden Kammern werden die 10 Küvetten mit den Verdünnungen nacheinander eingesetzt
11. im Menü des Programmes wird die Wellenlänge eingegeben, bei welcher die Extinktionen gemessen werden soll. Diese entspricht dem zuvor bestimmten Absorptionsmaximum (siehe Ergebnis)
12. nullabgleich mit der Referenzprobe durchführen
13. mit dem Programm wird durch Drehen der Kammern nun die entsprechende Extinktion jeder Lösung zur eingestellten Wellenlänge ermittelt und notiert

## Ergebnis

### Rohmessdaten

### Absorptionsmaximum

Das ermittelte Absorptionsspektrum von Metylenblau folgt unten. Das vom Programm bestimmte Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 663.1nm (Absorption = 2,872) was der Spektralfarbe rot entspricht.

Verdünnungsreihe der Stammlösung und Stoffmengenkonzentrationen von Metylenblau

Proben Nr.	Volumen V <sub>0</sub>	Volumen dH <sub>2</sub> O	Massenkonz. von Metylenblau in mg/ml (ß)	Stoffmengenkonz. von Metylenblau in mmol/l (c)
1	1000µl	-	0,0206	0,0644
2	900µl	100µl	0,01854	0,0580
3	800µl	200µl	0,01648	0,0515
4	700µl	300µl	0,01442	0,0451
5	600µl	400µl	0,01236	0,0386
6	500µl	500µl	0,0103	0,0322

7	400µl	600µl	0,00824	0,0258
8	300µl	700µl	0,00618	0,0193
9	200µl	800µl	0,00412	0,0129
10	100µl	900µl	0,00206	0,00644

### Rechnungen

Die Massenkonzentration ( $\beta$ ) von Methylenblau in der Stammlösung entspricht der, in der ersten Probe:

- Einwaage: 20,6 mg  $\Rightarrow V_0=0,206\text{mg/ml} \Rightarrow 1:10$  verdünnt  $\Rightarrow \beta_1 = 0,0206$
- die restlichen Massenkonzentrationen werden berechnet mit:  $\beta_1 * V_0$  der Probe x

Die entsprechende Stoffmengenkonzentration (c) wird ausgehend von 1ml (=0,0206mg) wie folgt berechnet:

- $c = \beta / M * 1\text{ml} \Rightarrow \text{Bsp.: } c = 0,0206\text{mg} / 319,86\text{mg/mmol} * 1\text{ml} = 0,0644 \text{ mmol/l}$  (=0,0644mM)

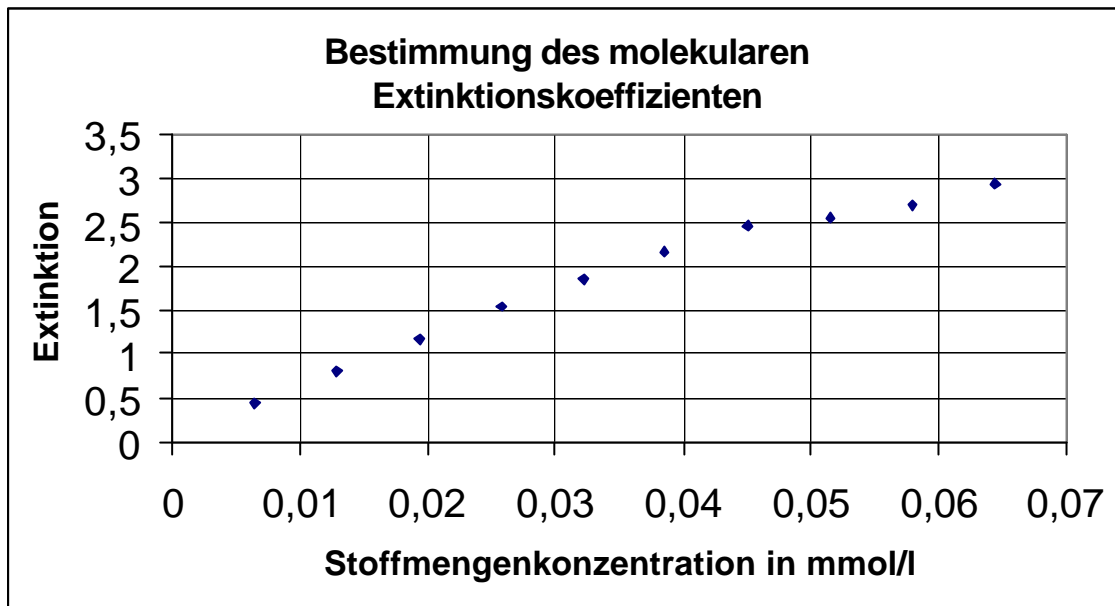
Bestimmung der Extinktion aller Proben beim Absorptionsmaximum ( $\lambda = 663\text{nm}$ ):

Probe	Extinktion
1	2,932
2	2,699
3	2,550
4	2,450
5	2,160
6	1,848
7	1,539
8	1,166
9	0,804
10	0,443

Erstellung eines Graphen aus Extinktion und Stoffmengenkonzentration:

Stoffmengenkonzentration in mmol/l	Extinktion
0,0644	2,932
0,0580	2,699
0,0515	2,550
0,0451	2,450
0,0386	2,160
0,0322	1,848
0,0258	1,539
0,0193	1,166
0,0129	0,804
0,00644	0,443

## Auswertung



### Graph

Der Graph verläuft, bis auf 2-3 Ausreißer am Schluss, annähernd linear durch den Nullpunkt. Die Auswahl des linearen Bereiches fiel bei mir auf die Wertepaare der Proben 4-10 (siehe eingezeichnete Regressionsgerade). Anhand dieser Wertepaare möchte ich nun im Weiteren den molekularen Extinktionskoeffizienten von Methylblau bestimmen.

### Überprüfung des Lambert-Beer'schen Gesetzes

➤ Berechnung von  $\epsilon$

ausgewählte Wertepaare:

Stoffmengenkonzentration in mmol/l	Extinktion	$\epsilon$ (Epsilon) in l/mmol * cm
0,0451	2,450	54,32
0,0386	2,160	55,96
0,0322	1,848	57,39
0,0258	1,539	59,65
0,0193	1,166	60,41
0,0129	0,804	62,33
0,00644	0,443	68,79

Epsilon wurde wie folgt berechnet:

$$E_1 = \epsilon \cdot c \cdot d$$

$$\Rightarrow E_{663} = \epsilon \cdot c \cdot 1\text{cm}$$

$$E_{663} / c \cdot 1\text{cm} = \epsilon?$$

$$\text{Bsp.: } 2,450 / 0,0451\text{mmol/l} \cdot \text{cm} = 54,32 \text{ l / mmol} \cdot \text{cm}$$

Zur Ermittlung eines Mittelwertes benutzte ich alle Werte von epsilon bis auf den Letzten (68,79), da dieser in der Tendenz zu hoch von den anderen abweicht:

$$\text{Mittelwert} = \epsilon_1 + \epsilon_2 \dots + \epsilon_7 / 7 = 58,34$$

### Diskussion

#### *Wann gilt das Lambert-Beer'sche Gesetz?*

- nur für monochromatische Strahlung, d.h. die zur Messung der Lichtabsorption in der Probe verwendete elektromagnetische Strahlung darf nur eine Wellenlänge haben.
  
- nur für verdünnte Lösungen. Bei höheren Konzentrationen des absorbierenden Stoffes treten auf Grund der teilweise abgelenkten monochromatischen Strahlung an Molekülen in der Lösung bei allen Stoffen Abweichungen vom linearen Zusammenhang zwischen E und c auf; diese Kurven sind gekrümmt, d.h. E ist dann auch von c abhängig.

Dies könnte auch erklären, warum der Graph bei den letzten Wertepaaren (höchste Stoffmengenkonzentration) von seiner Linearität abweicht.

#### *Vergleich unseres Ergebnisses mit dem Literaturwert*

In der Literatur finden wir den molekularen Extinktionskoeffizienten von Methylenblau von 28,00 ( $\lambda \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), erstellt bei einem Absorptionsmaximum von 668nm.

Da der Wert des Absorptionsmaximums kaum von dem uns ermittelten (~663nm) abweicht, muss es andere Gründe dafür geben, dass unser epsilon um einen Wert von ~30 ( $\lambda \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) vom Literaturwert abweicht:

### Fehlerquellen

- Fehler bei der Einwaage des Methylenblau
- Rechenfehler im Versuchsdurchlauf
- Unsterile Glasgeräte
- Fehler bei der Verdünnungsreihe mit Methylenblau (Pipettierung mit der Mikropipette)