

4 Fotometrie

4.1 Prinzip der Fotometrie und Geräte

Worum es geht

Die Lichtabsorption geht mit der Anregung von Molekülen einher. Chromophore aus konjugierten Doppelbindungen absorbieren im ultravioletten bzw. sichtbaren Bereich des Spektrums. Die Fotometrie nutzt diese Eigenschaft vieler Substanzen und den quantitativen Zusammenhang zwischen Lichtabsorption und Substanzkonzentration. Wir beschäftigen uns hier

- mit den physikalischen Grundlagen der Lichtabsorption,
- mit dem Lambert-Beer-Gesetz, welches das Absorptionssignal mit der Konzentration verknüpft, und schließlich
- mit der fotometrischen Messtechnik.

Die **Farbe** einer Substanz (► Tab. 4.1) kommt dadurch zustande, dass sie Licht bestimmter Wellenlängen absorbiert. Roter Wein z. B. absorbiert alle blauen und gelben Spektralanteile des weißen Lichtes.

Definition

Unter **monochromatischem Licht** versteht man einfarbiges Licht von einer exakt definierten Wellenlänge.

4.1.1 Physikalische Grundlagen

Die spezifische Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge kommt dadurch zustande, dass die Anregung von Elektro-

Tab. 4.1 Farbe und Lichtabsorption.

Farbe	Wellenlänge (nm)	Energie
(ultraviolett)	< 400	
violett	400–450	
blau	450–500	
grün	500–570	
gelb	570–590	
orange	590–620	
rot	620–760	
(infrarot)	> 760	

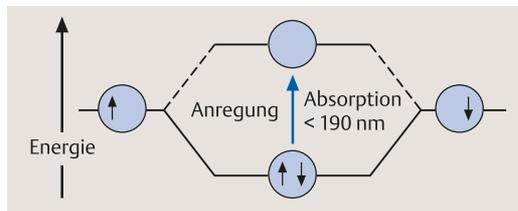


Abb. 4.1 **Anregung von Elektronen.** Bei der Anregung wechseln die Bindungselektronen aus dem bindenden Orbital (unten) in ein antibindendes Orbital (oben).

nen immer von Übergängen zwischen ganz bestimmten (diskreten) Energiezuständen (**Orbitalen**) begleitet ist. Dabei gelangen die Elektronen (gewöhnlich aus einem bindenden Orbital) vorübergehend in ein energiereicheres nichtbindendes oder antibindendes Orbital (► Abb. 4.1).

Definition

Meistens ist nur ein ganz bestimmter Teil des absorbierenden Moleküls für die Absorption verantwortlich. Dieses Molekülteil wird als **Chromophor** bezeichnet.

Eine **isolierte Doppelbindung** oder ein **einsames Elektronenpaar**, wie sie nahezu in jeder organischen Verbindung vorkommen, absorbieren bei **ca. 190 nm**.

Merke

Der Wellenlängenbereich unterhalb 200 nm ist **nicht charakteristisch** für bestimmte Chromophore und für fotometrische Messungen daher **ungeeignet**.

Im Gegensatz dazu sind Chromophore, in denen eine **Konjugation** vorliegt, von großer Bedeutung für die Fotometrie. Ein solches konjugiertes System besteht aus abwechselnd aufeinanderfolgenden Einfach- und Doppelbindungen, wobei zwei Doppelbindungen nur durch eine Einfachbindung voneinander getrennt sind. Konjugierte Systeme erleichtern im Vergleich zu einer einzelnen Doppelbindung die Lichtabsorption, da sie energetisch begünstigt sind (► Abb. 4.2).

Ein System aus zwei solchen **konjugierten Doppelbindungen** absorbiert **oberhalb 200 nm**. Wenn sich die Orbitale von mehr als zwei Doppelbindungen überlappen, reduziert sich der Abstand der Energieniveaus noch weiter und die Absorption erfolgt bei längerer Wellenlänge. β -Carotin z. B. verfügt über einen besonders langen konjugierten Chromophor (► Abb. 4.3) und absorbiert – wie schon an seiner Farbe erkennbar – im sichtbaren Bereich.

Der angeregte Zustand ist gewöhnlich nur sehr kurzlebig, wenn man von den selteneren Erscheinungen der Fluoreszenz (S.97) und der Phosphoreszenz absieht. Unter Wärmeabgabe kehren die angeregten Moleküle daher im Allgemeinen innerhalb von Sekundenbruchteilen in ihren Grundzustand zurück.

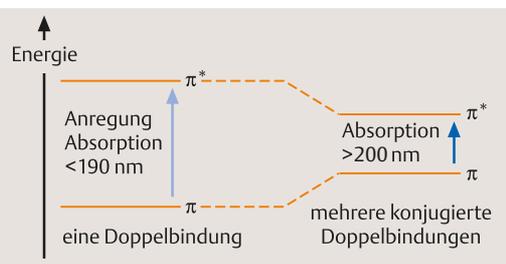
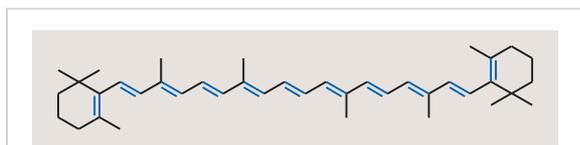


Abb. 4.2 **Anregung von konjugierten Systemen.**

Abb. 4.3 Strukturformel des β -Carotins.

4.1.2 Lambert-Beer-Gesetz

In vielen praktischen Beispielen kann man beobachten, dass die Absorption umso stärker ist, je höher die Konzentration der untersuchten Probenlösung in der Fotometerküvette ist. Zur Bestimmung der Konzentration misst man die Lichtschwächung, die durch die Substanz verursacht wird (► Abb. 4.4).

Bei verdünnten Lösungen und monochromatischer Messstrahlung (Licht einer definierten Wellenlänge oder eines sehr engen Wellenlängenbereiches) besteht eine lineare, von der Strahlungsintensität unabhängige Beziehung zwischen Absorption und Konzentration. Diese wird durch das Lambert-Beer-Gesetz beschrieben.

► **Herleitung des Lambert-Beer-Gesetzes.** Die grundlegenden Versuche zum Lambert-Beer-Gesetz führte Pierre Bouguer zu Beginn des 18. Jahrhunderts durch. Er stellte eine Reihe gleicher, mit einer absorbierenden Flüssigkeit gefüllte Glasgefäße hintereinander auf und bestimmte das Licht, das auf jedes Glas auftraf, und den Teil des Lichtes, der durch es hindurchging. Der auf das erste Glas auffallende Strahlung gab er den Wert 1,0. 50% des auffallenden Lichtes wurden zufällig von der Substanz absorbiert. Der Wert des einfallenden Lichtes bei Glas 2 ist damit 0,5. Werden im nächsten Gefäß wieder 50% absorbiert, so treten nur mehr 25% der ursprünglichen Lichtintensität durch.

Johann Heinrich Lambert führte daraufhin den Begriff der **Transmission T** als Quotient der Intensitäten des durchtretenden (I) und des einfallenden Lichtstrahles (I_0) ein:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Die Transmission kann maximal den Wert 1,0 haben bzw. 100% betragen.

Lambert erkannte dann, dass die Transmission von der **Schichtdicke** (d = Lichtweg) abhängig ist und formulierte unter Verwendung der **Konstante a'** (bei konstanter Konzentration):

$$T = e^{-a' \times d}$$

August Beer stellte zusätzlich die Abhängigkeit von der **Konzentration (c)** fest (c war vorher in der Konstante a' enthalten):

$$T = e^{-a_c \times c \times d}$$

$$T = 10^{-a_c \times c \times d}$$

$$\log T = -a_c \times c \times d$$

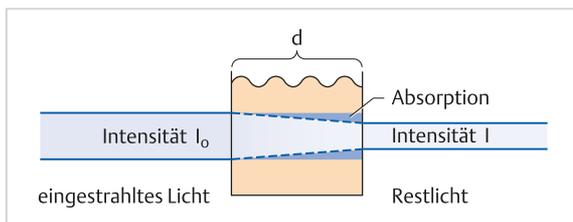
$$-\log T = a_c \times c \times d$$

$$\frac{\log 1}{T} = a_c \times c \times d$$

Daraus ergibt sich das **Lambert-Beer-Gesetz**:

$$A = a_c \times c \times d$$

- Die Absorption A (internationale Bezeichnung) ist dabei eine dimensionslose Größe.

Abb. 4.4 Prinzip der Absorptionsspektrometrie. I_0 = Intensität des eingestrahlen Lichts. d = Schichtdicke der Küvette. I = Intensität des Lichts nach Durchtritt durch die Küvette.

- Der Proportionalitätsfaktor a_c ist eine substanzspezifische Konstante mit der Dimension cm^2/mol .
- c ist die Konzentration in mol/cm^3 .
- d ist die Schichtdicke in cm.



Merke

Die im deutschen Sprachraum verbreiteten Begriffe Extinktion (E) und Extinktionskoeffizient (ϵ) sollen schon lange **nicht mehr** verwendet werden.

► **Proportionalitätsfaktor a_c näher betrachtet.** Der Proportionalitätsfaktor a_c gibt die **theoretische Absorption** für ein Mol Substanz pro Milliliter Lösung bei einer definierten Wellenlänge und definierter Temperatur, z. B. 25 °C, an. Diese Faktoren (früher Extinktionskoeffizienten) für viele fotometrisch messbare Substanzen können in Tabellenwerken nachgeschlagen werden.

4.1.3 Anwendung der Fotometrie

Zwei wesentliche Anwendungen der Fotometrie werden uns im Folgenden intensiver beschäftigen:

► **Absorptionsfotometrie.** Die Absorptionsfotometrie misst, **wie viel Licht** von einer gelösten Substanz **absorbiert** wird. Es wird Licht jener Wellenlängenbereiche genutzt, die besonders stark und möglichst spezifisch von der zu bestimmenden Substanz absorbiert werden. Häufig besteht bei der Absorptionsfotometrie ein linearer Zusammenhang zwischen dem Messsignal und der Konzentration der Substanz, der sich aus dem Lambert-Beer-Gesetz herleitet. Vereinfacht gilt:

$$A = \text{Faktor} \times c$$



Merke

Zur fotometrischen Bestimmung wird Licht jener Wellenlängenbereiche benutzt, die besonders stark und möglichst spezifisch absorbiert werden.

► **Absorptionsspektroskopie.** Absorptionsspektren können zur **Identifizierung von Substanzen** herangezogen werden, indem man die Intensität der Absorption in Abhängigkeit von der Wellenlänge registriert. Die Absorption von Strahlung durch eine zu untersuchende Substanz hängt von deren Struktur (Gehalt an Chromophoren) ab, sodass Stoffe häufig anhand ihrer Absorptionsspektren identifiziert werden können (S. 76). Hierzu wird die

Intensität der Absorption in Abhängigkeit von der Wellenlänge registriert (► Abb. 4.5).

Definition

In der **Absorptionsspektroskopie** wird die Absorption kontinuierlich oder bei zahlreichen nebeneinanderliegenden Wellenlängen gemessen.



4.1.4 Messtechnik der Fotometrie

Die Absorption messen wir durch **Vergleich der Intensitäten** des einfallenden und des durchgelassenen (nicht absorbierten) Restlichtes (► Abb. 4.4) mithilfe von Fotometern, die grundsätzlich aus folgenden Bauteilen aufgebaut sind:

- Lichtquelle
- Kollektor
- Filter oder Monochromator
- Blende
- Küvette mit Analysenlösung
- Strahlungsempfänger (Fotodiode, Fotomultiplier)
- Elektronik und Messanzeige

► **Einstrahlfotometer.** ► Abb. 4.6 zeigt den Strahlengang eines Einstrahlfotometers mit Prisma als Monochromator. Als Lichtquelle sind eine **Wolframlampe** (vis-Bereich) und eine **Deuteriumlampe** (UV-Bereich) eingebaut. Die Verspiegelung einer Prismenfläche bewirkt, dass die Strahlung das Prisma zweimal durchläuft. Die Veränderung der Wellenlänge der Messstrahlung wird durch Drehen des Prismas um eine zur Strahlung senkrechte Achse erreicht. Störungen z.B. durch Nebenlicht werden nach Zerhackung des Messstrahls durch eine gleichmäßig rotierende Blende (Chopper) elektronisch entfernt.

Manuell oder mithilfe eines Probenwechslers wird das Messlicht nacheinander durch die Vergleichsküvette (Leerwertansatz) und die Messküvette (Probenansatz) geleitet. Die Vergleichsküvette dient zum Abgleich (Nullpunkt), wobei als Vergleichslösung z. B. destilliertes Wasser verwendet wird.

► **Doppel- oder Zweistrahlfotometer.** Beim Doppel- oder Zweistrahlfotometer (► Abb. 4.7) wird durch zwei synchron rotierende Sektorspiegel der Messstrahl nicht nur gleichmäßig unterbrochen, sondern abwechselnd durch die Probenlösung und eine Vergleichslösung geleitet. Solche Fotometer erlauben also die **gleichzeitige Messung von Proben- und Vergleichslösung**. Zweistrahlfotometer sind technisch in der Regel wesentlich höherwertiger als die einfacheren Einstrahlgeräte.

Spektrallinienfotometer

Spektrallinienfotometer besitzen als Lichtquelle **Metalldampflampen** (z. B. Quecksilberdampfampe), deren Licht im Gegensatz zur üblichen Glühlampe nicht aus allen möglichen Wellenlängen zusammengesetzt ist, sondern diskontinuierlich ist. Mit einfachen lichtabsorbierenden Filtern kann man aus dem Licht der Metalldampflampen Strahlung von hoher spektraler Reinheit (diskrete Spektrallinien) und oft hoher Intensität isolieren (► Abb. 4.8). Spektrallinienfotometer arbeiten daher mit **echt monochromatischem Licht**.

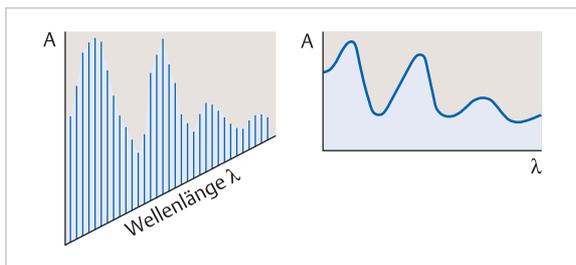


Abb. 4.5 Wellenlängenabhängigkeit der Lichtschwächung durch Absorption.

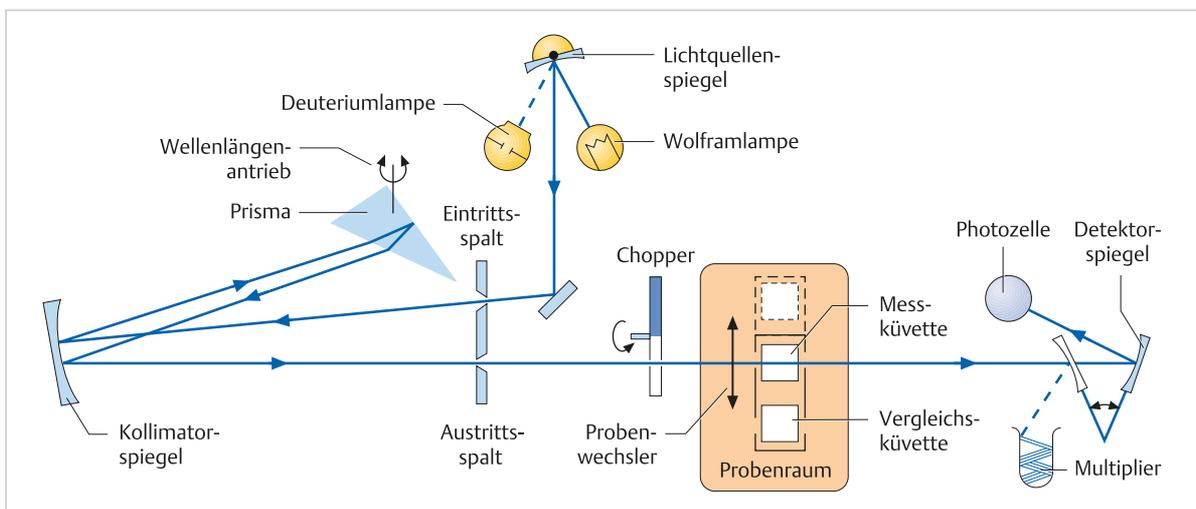


Abb. 4.6 Strahlengang eines Einstrahlfotometers. Mit einem Prisma wird das Messlicht spektral zerlegt und der Messstrahl durch die Mess- bzw. Vergleichsküvette geleitet. Das durchtretende Restlicht wird mit einer Fotodiode oder einem Fotomultiplier gemessen.

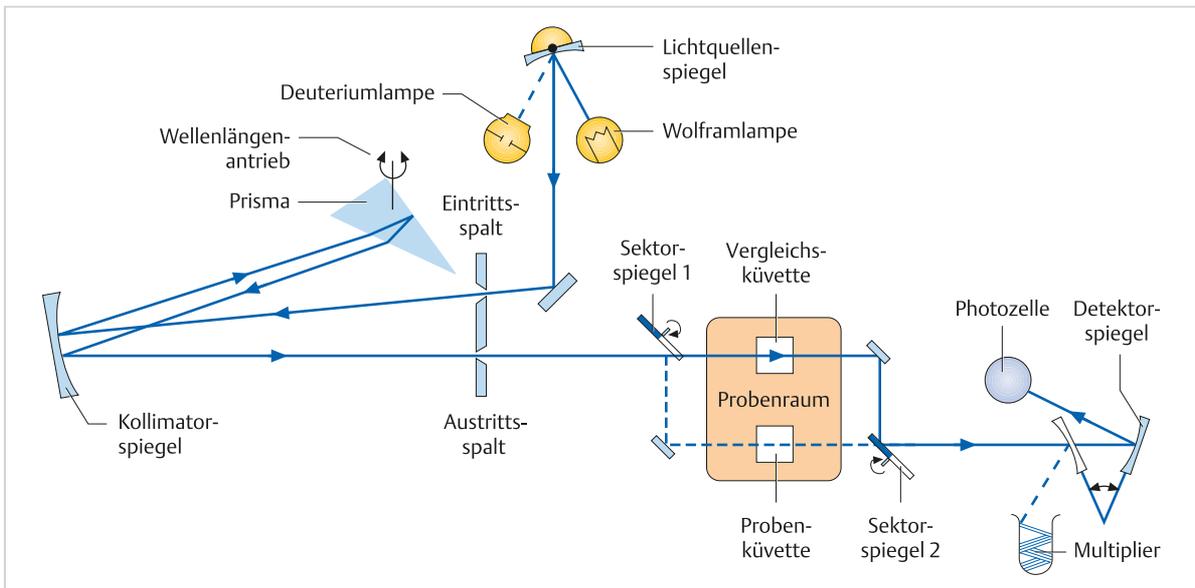


Abb. 4.7 Strahlengang eines Zweistrahlphotometers. Im Unterschied zum Einstrahlphotometer wird der Messstrahl geteilt und geht gleichzeitig durch die Proben- und Vergleichsküvette.

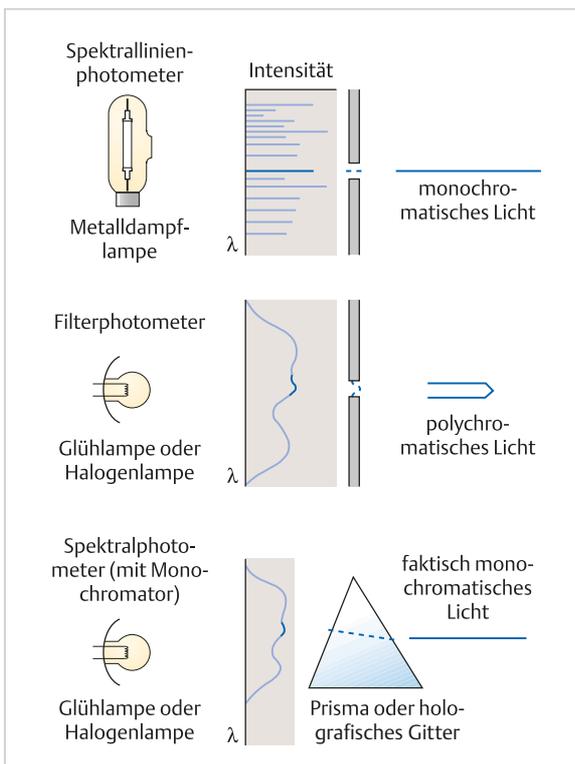


Abb. 4.8 Strahlungsarten bei verschiedenen Fotometertypen.

Filterfotometer

Auch aus dem weißen Licht einer Glühlampe oder Halogenlampe kann man Licht bestimmter Wellenlängen ausfiltern (einfaches Filterfotometer), dieses Licht ist aber **polychromatisch** (► Abb. 4.8). Gerade heute besitzen **Analysenautomaten** oft nur einfache Filterfotometer als Messplätze. Mithilfe der bichromatischen Messtechnik (S. 75) lässt sich die mangelnde optische Qualität von Filterfotometern „elektronisch“ verbessern. Unter anderem aus diesem Grund wird in Analysenautomaten häufig die bichromatische Messtechnik eingesetzt.

Spektralfotometer

Wird das weiße Licht mittels eines Prismas oder eines optischen Gitters in seine spektralen Bestandteile zerlegt, so erhält man nahezu monochromatisches Licht von geringer Bandbreite (► Abb. 4.8). Solche Fotometer mit **Monochromator**, d. h. mit Gitter oder Prisma, werden für die Messung von **Absorptionsspektren** verwendet (► Abb. 4.5).

In kurzer Zeit wird die Wellenlänge der Messstrahlung kontinuierlich verändert, z. B. durch Drehung des Prismas, und die Intensität der austretenden Strahlung registriert. Dieses Verfahren kann zur **Substanzcharakterisierung und -identifizierung** (S. 77) benutzt werden.

Die meisten Spektralfotometer enthalten **2 Lichtquellen**, eine für UV-Licht und eine zweite für sichtbares Licht. Je geringer die Wellenlängen-Bandbreite des Fotometers ist (z. B. 0,5 nm), umso höher ist die spektrale Auflösung (► Abb. 4.9) und damit die Auflösung der Feinstruktur der Absorptionsspektren. Zusätzlich sind für die Beurteilung der Leistungsfähigkeit eines Spektralfotometers von Bedeutung:

- die fotometrische Genauigkeit (z. B. 0,0005 Absorptionseinheiten),
- der Scanbereich (Wellenlängenbereich),
- die Scangeschwindigkeit (Aufzeichnungsgeschwindigkeit der Spektren) und
- der Messbereich (z. B. 0–1 oder 0–3 Absorptionseinheiten).

Heute werden fast ausnahmslos **Diodenarraydetektoren** (DAD) für die Spektrenaufzeichnung eingesetzt (► Abb. 4.10). Bei diesen modernen Spektralfotometern gibt es keine beweglichen Teile mehr und der Lichtstrahl geht zuerst durch die Küvette und fällt erst dann auf ein holografisches Konkavgitter. Das hierbei spektral zerlegte Licht fällt dann auf eine Fotodiodenzeile. Bis zu über 1 000 Fotodioden – jede für eine bestimmte Wellenlänge – erfassen den gesamten Informationsgehalt eines Spektrums simultan. Ein Vorteil des Diodenarrays ist daher, dass die Spektren **unmittelbar** aufgenommen werden, während der Aufzeichnung also keine Zeit vergeht. Dies ist günstig, wenn **reaktionskinetische Abläufe** verfolgt werden oder wenn **veränderliche Substanzzusammensetzungen** z.B. in einem chromatografischen Trennverfahren gemessen werden. Ein weiterer wesentlicher Vorteil von Diodendetektoren ist ihre messtechnische **Präzision**.

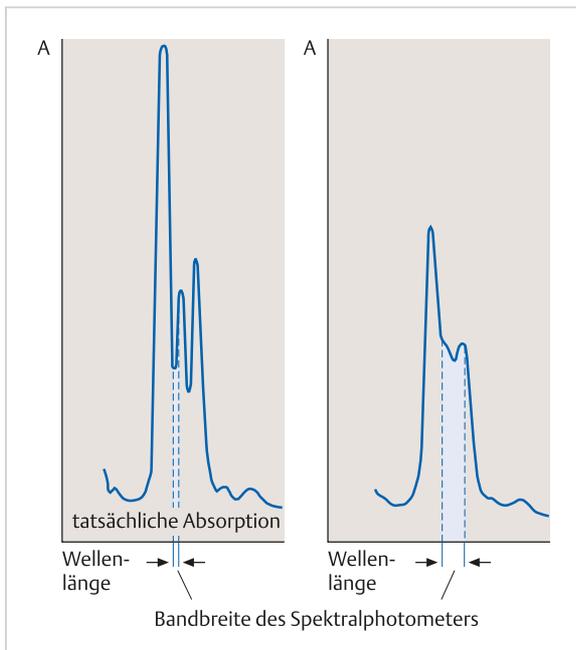


Abb. 4.9 Wellenlängen-Bandbreite und spektrale Auflösung. Je geringer die optische Bandbreite des Fotometers ist, umso höher ist die spektrale Auflösung.

4.1.5 Fehlervermeidung

Vor der Messung wird das Fotometer bei unterbrochenem Lichtweg auf 0 % Transmission abgeglichen. Anschließend wird die Absorption mit einer mit Wasser gefüllten Küvette im Strahlengang auf Null abgeglichen (100 % Transmission).

Der beliebten Messung gegen einen Leerwert, d. h. Fotometerabgleich mit dem Reagenzien- oder Probenleerwert, ist die Messung auch von Proben- und Leerwertansätzen gegen **Wasser** vorzuziehen. Auf diese Weise können Hinweise z. B. auf Trübungen leichter erkannt werden: Ergibt sich ein hohes Leerwertsignal, dann muss vom Fotometer sehr viel Untergrundsignal kompensiert werden, und die eigentlichen Messungen erfolgen nicht mehr im optimalen fotometrischen Messbereich.



Merke

In der Regel weist die fotometrische Messung im Bereich von **0,1 bis 1 Absorptionseinheit** die höchste Präzision auf.

Bei den Fehlermöglichkeiten unterscheidet man zwischen Gerätefehlern und Küvettenfehlern.

► **Gerätefehler.** Im Zusammenhang mit dem verwendeten Gerät sind besonders von Bedeutung:

- eine richtige und exakte Wellenlängeneinstellung,
- die Verwendung von sauberen und homogenen Filtern,
- die Vermeidung von Falschlicht (lichtdichter Küvettenraum) und
- Intensitätsverlust der Fotometerlampe.

Besonders anfällig sind die **Fotometerlampen**. In vielen Laboratorien werden täglich die Untersuchungsmethoden an den Analysenautomaten neu kalibriert und danach vorschriftsmäßig Kontrollproben gemessen. Nun stellen wir plötzlich eines Tages fest, dass sich die Präzision der Messungen erheblich verschlechtert hat, wobei die Ergebnisse der Kontrollprobenmessungen noch im zulässigen Bereich liegen können. Wir suchen den Fehler und finden ihn bei der Geräteprüfung: Die Fotometerlampe zeigt eine **stark verminderte Lampenenergie**, was aufgrund der täglichen Kalibrierung bisher nicht aufgefallen ist. Wie hätten wir die Leistungseinbuße der Fotometerlampe früher erkennen können? Genau durch **Verzicht auf die tägliche Kalibrierung** hätten wir wahrscheinlich viel rascher an der Tendenz der Kontrollwerte die Lampendrift erkannt. Von ganz besonderer Bedeutung sind Lampenfehler bei **gepulsten Lampen**, die nur kurze Lichtblitze für die fotometrischen Messungen aussenden. Hier können mit dem Altern der Lampe Ausreißer bei der Messung auftreten.

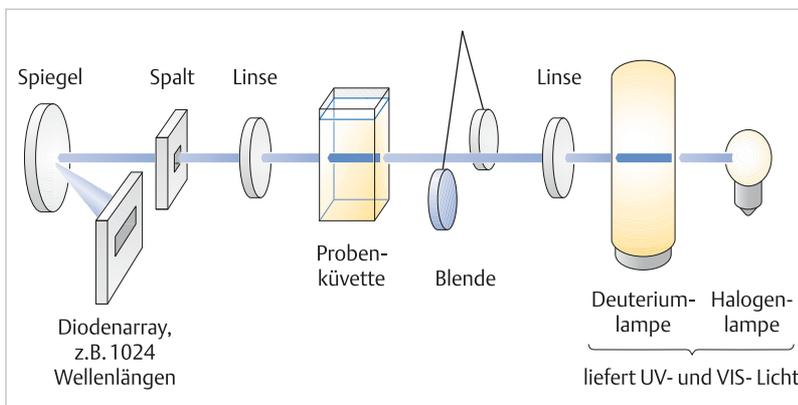


Abb. 4.10 Strahlengang DAD-Fotometer. Erläuterung s. Text.

► **Häufige Küvettenfehler.** Hierzu zählen Verschmutzungen (Schlieren), flottierendes (aufschwimmendes) Material in der Küvette, ungenügende Küvettenfüllung und falsche Temperierung. Gerade bei der Überprüfung der Temperierung ist es wichtig, dass nicht nur der Thermostat überprüft wird, sondern die Temperatur tatsächlich in der Küvette nachgemessen wird.



Achtung

Ganz wichtig ist es, daran zu denken, dass die meisten Analysenautomaten, die wir heute für die Messungen in der Klinischen Chemie einsetzen, auf fotometrischen Messverfahren beruhen, sodass auch hier an die oben angesprochenen Fehlermöglichkeiten gedacht werden muss.

Dies bedeutet, dass wir auch beim Einsatz von Analysenautomaten den Messküvetten, der Temperierung usw. große Aufmerksamkeit widmen müssen.

4.1.6 Problemfälle bei der Fotometrie

Bisher haben wir erfahren, dass es für die Reproduzierbarkeit und Richtigkeit fotometrischer Bestimmungen von besonderer Wichtigkeit ist, dass:

- monochromatisches Licht verwendet wird,
- die Messwellenlänge exakt stimmt und
- nur die nachzuweisende Substanz erfasst wird.

Zu ungenauen Ergebnissen kommt es bei der Fotometrie demnach, wenn nicht mit monochromatischem Licht gearbeitet wird und/oder die eingestellte Wellenlänge nicht exakt ist. Dies ist z. B. der Fall bei der Verwendung einfacher Filterfotometer. Weitere Probleme treten auf, wenn:

- die Proben trüb sind oder Verfärbungen aufweisen,
- Trübungen bei der Messung entstehen oder
- bei der Messreaktion andere Stoffe als der zu untersuchende Analyt mitreagieren.

Eine teilweise Problemlösung besteht in der **Probenleerwertmessung**. Diese führt nur im Fall von leichten Proben-trübungen oder -verfärbungen zu richtigen Ergebnissen. Hierbei wird ein Leerwertreagenz eingesetzt, das es erlaubt, die Eigenabsorption der Störung zu messen, ohne dass der eigentliche Analyt umgesetzt wird. Dieses Verfahren macht für jede Probe einen zusätzlichen Messansatz mit dem Leerwertreagenz erforderlich. Dieser Probenleerwert wird jeweils vom ursprünglichen Messwert abgezogen. Die elegantere Lösung ist allerdings die bichromatische Messtechnik.

4.2 Fotometrische Quantifizierung von Substanzen (Absorptionsfotometrie)



Worum es geht

Mithilfe des Lambert-Beer-Gesetzes können wir zahlreiche Substanzen quantitativ durch direkte oder indirekte Fotometrie bestimmen. Im 1. Fall absorbiert der Analyt selbst (z. B. Harnsäure), im 2. Fall wird er durch eine chemische, oft enzymkatalysierte Reaktion in eine absorbierende Substanz umgewandelt (z. B. Glukose).

Im Folgenden werden wir verschiedene Beispiele solcher Bestimmungsverfahren näher betrachten.

4.2.1 Direkte Absorptionsfotometrie

Substanzen, die selbst entweder farbig sind oder im UV-Bereich eine deutliche Absorption zeigen, können durch **direkte Fotometrie** bestimmt werden. Beispiele für farbige Substanzen, die im sichtbaren Bereich absorbieren, sind das Bilirubin oder Cytochrom c, Harnsäure oder Barbiturate absorbieren im UV-Bereich.

Die Berechnung kann mithilfe eines Dreisatzes erfolgen:

$$c_{\text{Probe}} = \frac{A_{\text{Probe}}}{A_{\text{Standard}}} \times c_{\text{Standard}}$$

Beispiele für die Anwendung der direkten Absorptionsfotometrie sind die Bestimmung von Harnsäure und des Barbiturats Thiopental.



Beispiel aus dem Labor

Konzentrationsbestimmung von Harnsäure

Harnsäure zeigt eine starke Absorption im UV-Bereich mit einem Maximum bei 293 nm. Da Serum- oder Plasmaproben hierbei jedoch eine hohe Hintergrundabsorption zeigen, wird die Harnsäure bei der praktischen Anwendung dieses Verfahrens mit Uricase vollständig zu Allantoin, CO₂ und H₂O₂ umgesetzt:



Gemessen wird die **Absorptionsabnahme ΔA** bei 293 nm; sie ist der ursprünglich vorhandenen Harnsäuremenge proportional. Da diese Absorptionsabnahme allerdings gegen eine hohe Hintergrundabsorption gemessen werden muss, werden für die Harnsäure (S. 235) andere Bestimmungsverfahren bevorzugt.



Merke

Über den molaren Absorptionskoeffizienten kann nur ausgewertet werden, wenn die Messstrahlung zumindest annähernd monochromatisch ist und in ihrer Wellenlänge mit derjenigen übereinstimmt, bei der das a_ϵ ermittelt wurde.



Beispiel aus dem Labor

Fotometrische Bestimmung von Thiopental

Thiopental, das als Narkotikum und Therapeutikum bei erhöhtem Hirndruck in der Intensivmedizin angewendet wird, absorbiert bei 270 nm. Allerdings gibt es bei dieser Wellenlänge eine Hintergrundabsorption, sodass zuerst eine Probenextraktion erfolgen muss. Dazu schütteln wir die Proben mit Diethylether aus und messen das Thiopental in der organischen Phase.

Wir wollen ein Rechenbeispiel betrachten:

Sei die Absorption der Probe 0,355, die Absorption des Standards 0,74, die Standardkonzentration 50 mg/l, dann gilt:

$$c_{\text{Thiopental}} = \frac{A_{\text{Probe}}}{A_{\text{Standard}}} \times c_{\text{Standard}} = \frac{0,355}{0,74} \times 50 = 24 \text{ mg/l}$$

Exaktere Ergebnisse werden erhalten, wenn wir anhand einer Standardkurve auswerten. Die Spezifität des Verfahrens wird erhöht, wenn man vor der eigentlichen fotometrischen Konzentrationsbestimmung das Thiopental durch ein hochdruckflüssigkeitschromatografisches Verfahren isoliert.

Durch **Extraktion des Analyten** können wir Störungen durch andere Bestandteile aus der Probe größtenteils vermeiden. Die genannten Störungen schränken im Allgemeinen die Anwendungsmöglichkeiten für die direkte fotometrische Bestimmung aus Körperflüssigkeiten ein. Häufig kann hier die bichromatische Messtechnik (S.75) weiterhelfen.

4.2.2 Indirekte Absorptionsfotometrie

Eine höhere Spezifität der Fotometrie lässt sich erzielen, indem man den Analyten zuerst in einer Messreaktion zu einem fotometrisch messbaren Produkt **umwandelt** und dann aufgrund der bekannten Stöchiometrie dieser Reaktion die Analytkonzentration **indirekt** bestimmt.

Zahlreiche Substanzen (z. B. Glukose, Pyruvat, Laktat, Ethanol) können nicht direkt fotometrisch bestimmt werden. Diese Substanzen lassen sich allerdings mit den Coenzymen (besser Cosubstraten) **NAD(H)** bzw. **NADP(H)** enzymatisch umsetzen. Bei diesen von Otto Warburg eingeführten optischen Testverfahren wird eine dem zu bestimmenden Stoff (Substrat) stöchiometrisch äquivalente Menge reduziert Coenzym (NADH oder NADPH) verbraucht oder gebildet. Die Konzentration des reduzierten Coenzym wird bei **340 nm** vor und nach der enzymatischen Umsetzung gemessen. Aus dem ermittelten ΔA berechnet man Coenzym- und Substratumsatz, ohne dass man einen Standard braucht:

$$c = \frac{\Delta A}{a_c \times d} \text{ [mol/ml]}$$

Was uns als Ergebnis interessiert, ist jedoch nicht die Konzentration der Substanz in der Messküvette, sondern die **ursprünglich in der Patientenprobe (Serum oder Plasma)** vorliegende Konzentration. Da in die Messküvette nicht nur die Probe, sondern auch die Reagenzien gegeben werden, erfolgt vor der Messung eine Verdünnung. Erst durch Berücksichtigung der **Probenverdünnung** als Quotient aus dem Testvolumen (Summe aller Volumenzugaben in die Messküvette) und dem Probenvolumen erhalten wir die gesuchte Konzentration in der Probe selbst:

$$c = \frac{\Delta A \times \text{Testvolumen}}{a_c \times d \times \text{Probenvolumen}} \text{ [mol/ml]}$$

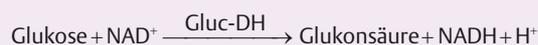
Wie bei der direkten Fotometrie ist die Konzentrationsbestimmung in der Probe auch mithilfe einer parallel gemessenen **Standardprobe** möglich. Es gilt die Gleichung, die wir bereits bei der direkten Fotometrie kennengelernt haben:

$$c_{\text{Probe}} = \frac{A_{\text{Probe}}}{A_{\text{Standard}}} \times c_{\text{Standard}}$$

Beispiel aus dem Labor

Messung der Glukosekonzentration

Bei der Gluc-DH-Methode wird die Glukose zu Glukonsäure oxidiert, während NAD^+ zu NADH reduziert wird. Diese Reaktion katalysiert die Glukosedehydrogenase (Gluc-DH):



Je Molekül Glukose entsteht ein Molekül NADH, die gemessene NADH-Menge entspricht der ursprünglich vorhandenen Glukosemenge.

$$a_c(\text{NADH}) = 6,2 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$$

- $d = 1 \text{ cm}$
- Probenvolumen $20 \mu\text{l}$
- Reagenzvolumen $980 \mu\text{l}$

Nach vollständigem Umsatz wird die Absorption gemessen: $A = 1,2$.

$$\begin{aligned} c_{\text{Glukose im Plasma}} &= \frac{\Delta A \times \text{Testvolumen}}{a_c \times d \times \text{Probenvolumen}} \\ &= \frac{1,2 \times 1000}{6,2 \times 10^6 \text{ [cm}^2/\text{mol}] \times 1 \text{ [cm]} \times 20} \\ &= 0,0097 \text{ [mol/cm}^3\text{]} \times 10^{-3} \\ &= 0,0097 \text{ mol/l} = 9,7 \text{ mmol/l} \end{aligned}$$

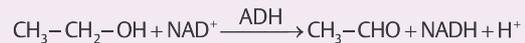
Um die Glukosekonzentration in der konventionellen Einheit (mg/dl) zu erhalten, müssen wir die molare Konzentration mit dem Molekülmasse der Glukose (180) multiplizieren und das Ergebnis durch 10 teilen (Umrechnung von Litern auf dl):

$$c_{\text{Glukose im Plasma}} = \frac{9,7 \times 180}{10} \text{ [mg/dl]} = 175 \text{ mg/dl}$$

Beispiel aus dem Labor

Ethanolbestimmung

Das Enzym Alkoholdehydrogenase (ADH) katalysiert die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd, während NAD^+ zu NADH reduziert wird:



Wir betrachten folgendes Beispiel: An einem Analysenautomaten wird in einer Endpunktbestimmung eine Absorption von 1,4 gegen einen Leerwert gemessen. Es gilt:

$$a_c(\text{NADH}) = 6,2 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$$

- Probenvolumen: $2 \mu\text{l}$
- Reagenzvolumen: $398 \mu\text{l}$ (Testvolumen: $400 \mu\text{l}$)
- Schichtdicke: $0,7 \text{ cm}$

$$\begin{aligned} c(\text{NADH}) &= \frac{(\Delta A \times \text{Testvolumen})}{(a_c \times d \times \text{Probenvolumen})} \\ c(\text{NADH}) &= \frac{(1,4 \times 400 \mu\text{l})}{(6,2 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol} \times 0,7 \text{ cm} \times 2 \mu\text{l})} \\ &= \frac{(1,4 \times 400 \times 10^{-6})}{(6,2 \times 0,7 \times 2)} \text{ [mol/cm}^3\text{]} \\ &= \frac{(1,4 \times 4 \times 10^{-4})}{(6,2 \times 1,4)} \text{ [mol/ml]} \\ &= 6,5 \times 10^{-5} \text{ [mol/ml]} \\ &= 6,5 \times 10^{-2} \text{ [mol/l]} \end{aligned}$$

Nach Reaktionsgleichung gilt:

$$c_{\text{NADH}} = c_{\text{Ethanol}}$$

Umrechnung in g/l:

$$\begin{aligned} c_{\text{Ethanol}} &= 6,5 \times 10^{-2} \times \text{Molekülmasse} = 6,5 \times 10^{-2} \times 46 \text{ [g/l]} \\ &= 2,99 \text{ [g/l]} \end{aligned}$$

Übrigens: Um die bekannten Promille Blutalkohol zu erhalten, muss man die oben gefundene Serumkonzentration durch 1,2 dividieren.