

Photometermessung Phosphat ($\text{PO}_4\text{-P}$)

1. Methodenbeschreibung:

Die Bestimmung des gelösten reaktiven Phosphats (SRP oder $\text{PO}_4\text{-P}$) erfolgt über eine photometrische Messung bei 880nm. Dabei reagiert die gefilterte Wasserprobe mit einem zusammengesetzten Reagenz aus Molybdat, Ascorbinsäure und Antimon. Die gebildeten Molybdänsäuren werden anschließend durch Reduktionsmittel zu einem blau-gefärbten Komplex umgewandelt.

In einem Photometer wird ein Lichtstrahl durch die Probe geschickt. Je dunkler die Färbung ist, desto stärker wird der Lichtstrahl abgeschwächt. Das Photometer misst diese Extinktion. Um nun die Konzentration des Phosphats zu berechnen, brauchst du eine Standardreihe. Das ist eine Reihe von Lösungen mit ansteigenden Phosphatkonzentrationen. Diese Standardreihe wird wie die Proben mit Reagenzien versetzt und im Photometer vermessen. Da du bei der Standardreihe die Konzentrationen kennst, kannst du aus der Beziehung zwischen Konzentration und Extinktion deiner Standardreihe auch die Konzentration deiner Proben berechnen.

2. Probennahme:

- Spüle dein Probengefäß 3mal mit dem Bachwasser.
- Fülle es dann an und schließe es sorgfältig. Du musst dabei immer bachabwärts vom Entnahmeort stehen.
- Bewahre die Probe stets gekühlt und im Dunkeln auf (am besten im Kühlschrank)
- Filtriere die Probe so bald wie möglich mit einem $0.45\ \mu\text{m}$ Glasfaserfilter.

3. Materialien für Analysen (pro Gruppe):

- 1 Spritze plus Filteraufsatz, Filter, Spritzflasche und Pinzette zum Filtrieren
- 1 Rack sowie je 1 Tube pro Probe und 5 Tubes für die Standardreihe
- 1-5 mL Kolbenhubpipette plus Spitzen zum Pipettieren der Proben
- 0,1-1 mL Kolbenhubpipette plus Spitzen
- 5 Messkolben für die Standardreihe
- 40 oder 50 ml Vollpipette plus Peleusball für Mischreagenz, Bechergläser

4. Chemikalien:

- a) **Ascorbinsäurelösung:** 2g Ascorbinsäure in 10mL Milli-Q Wasser und 10mL $4,5\text{mol H}_2\text{SO}_4$ lösen (schwer löslich, anwärmen; immer frisch zubereiten)

- b) 4,5mol H₂SO₄: 122,4ml 98% H₂SO₄ auf 500ml mit Milli-Q auffüllen (lange haltbar)
- c) Molybdän-Lösung: 6,25g Ammoniumheptamolybdat-tetrahydrat in 62,5 mL Milli-Q Wasser lösen
- d) Tartrat-Lösung: 0,25g Kaliumantimontartrat in 10mL Milli-Q Wasser lösen
- e) **Misch-Reagenz**: Die Molybdän-Lösung in 175ml der 4,5mol H₂SO₄ überführen und anschließend die Tartratlösung zugeben.
- f) Phosphatstammlösung 1 (100 mg/l P-PO₄): Löse 0.43935 g KH₂PO₄ in 1000 ml Milli-Q Wasser
- g) Phosphat-Stammlösung 2 (5mg/L P-PO₄): Pipettiere 5ml der Stammlösung 1 in einen 100mL Messkolben und fülle auf 100ml mit Milli-Q Wasser auf
- h) **Standardreihe** aus Stammlösung 2:

Konzentration	Stammlösung	
400µg PO ₄ /l	8 ml	Mit Milli-Q Wasser auf 100mL auffüllen
200µg PO ₄ /l	4 ml	Mit Milli-Q Wasser auf 100mL auffüllen
100µg PO ₄ /l	2 ml	Mit Milli-Q Wasser auf 100mL auffüllen
50µg PO ₄ /l	1 ml	Mit Milli-Q Wasser auf 100mL auffüllen
10µg Po ₄ /l	0,2 ml	Mit Milli-Q Wasser auf 100mL auffüllen

5. Durchführung:

- Proben: Beschrifte Probenröhrchen mit deinen Probenamen. Fülle 25 mL deiner Proben mit einer Kolbenhubpipette jeweils in die jeweiligen Probenröhrchen. Wechsle die Pipettierspitze zwischen jeder Probe.
- Standardreihe: Beschrifte Probenröhrchen mit den Konzentrationen der Standardreihe. Vergiss nicht, dass du auch ein Röhrchen für Milli-Q Wasser brauchst. Fülle 25 mL der Konzentrationen deiner Standardreihe mit einer Kolbenhubpipette in die jeweiligen Probenröhrchen. Wechsle die Pipettierspitze zwischen jeder Konzentration.
- Füge 0,4ml Mischlösung mit einer Kolbenhubpipette zu den Proben und zu den Konzentrationen deiner Standardreihe. Du kannst dieselbe Spitze verwenden, aber tauche sie nicht in die Proben oder die Standardreihe ein.
- Füge danach 0,4ml Ascorbinsäure-Lösung mit einer Kolbenhubpipette zu jedem Röhrchen und mische es. Vorsicht: Verwechsle nicht die Kappen der Röhrchen, wenn du sich nach dem Öffnen wieder verschließt.
- Warte zumindest 30 min.

6. Messung am Photometer:

- Messe die Extinktion mit einer 5 cm Küvette bei 880nm Wellenlänge.
- Fülle zunächst Milli-Q Wasser in die Küvette und führe den Nullabgleich durch.

- Fülle nun das Milli-Q Wasser mit den Reagenzien in die Küvette und messe die Extinktion.
- Spüle die Küvette mit Milli-Q Wasser aus.
- Fülle die niedrigste Konzentration deiner Standardreihe in die Küvette, messe die Extinktion und spüle die Küvette. Nimm dann die nächsthöhere Konzentration deiner Standardreihe und wiederhole den Vorgang.
- Nach der Standardreihe misst du deine Proben.

7. Berechnung der Konzentrationen:

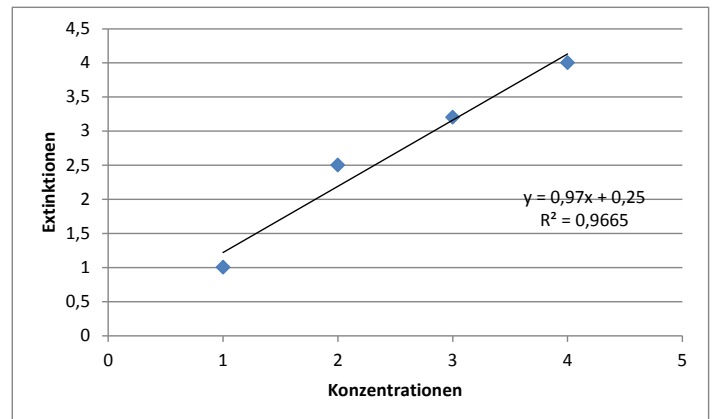
Die Standardreihe ist eine Reihe von ansteigenden Konzentrationen deiner Substanz (z.B. Phosphat). Sie stellt eine Verbindung zwischen der Konzentration und der Extinktion her. So wird es gemacht:

Trage in einem Punktdiagramm die Konzentrationen deiner Standardreihe gegen die gemessenen Extinktionen auf.

Berechne die Regressionsgerade: Markiere die Punkte, drücke die rechte Maustaste;

klicke auf „Trendlinie hinzufügen“ und markiere „linear“, „Formel anzeigen“ und „Bestimmtheitsmaß darstellen“.

Aus der Formel kannst du dir nun die Konzentrationen deiner Proben ausrechnen. Du setzt die gemessene Extinktion für x ein und berechnest y (=Konzentration).



8. Literatur:

Wetzel & Likens, Limnological Analyses, 3rd edition