# **Colorimetrie** (meten met kleur)

# **De blauwe kleurstof op een M&M**

Volgens de verpakking bevatten M&M’s de kleurstof E133. Dit is een blauwe kleurstof.

  

We gaan de hoeveelheid van deze blauwe kleurstof op een blauwe M&M onderzoeken.

Eerst lossen we de kleurstof van de M&M op in water. Daarna vergelijken we de kleur van de oplossing met oplossingen van E133 met bekende concentraties. Meten is vergelijken.

**Onderzoeksvraag**

Hoeveel mg E133 zit er op een M&M?

**Werkwijze**

* Pipetteer precies 50,0 mL demiwater in een bekerglas van 250 mL.
* Doe er een blauwe M&M bij en roer tot alle blauwe kleurstof in het water is opgelost.
* Verwijder de (wit/bruine) M&M met een pincet.
* Centrifugeer de suspensie in twee epjes om het witte pigment (E171) te verwijderen.
* Maak een standaard kleurstofoplossing van 10,0 mg E133 per liter demiwater.
* Pipetteer in een aantal genummerde reageerbuizen de hoeveelheden standaardoplossing, gecentrifugeerde M&M oplossing en water volgens de tabel.
* Homogeniseer de inhoud van de buizen.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Buis nr. | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Standaard E133 (mL) | 0,0 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 5,0 | 0,0 |
| M&M oplossing (mL) | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,0 |
| Demiwater (mL) | 5,0 | 4,0 | 3,0 | 2,0 | 1,0 | 0,0 | 3,0 |
| Bereken [E133] (mg/L) | 0 |  |  |  |  |  | ? |
| Meet extinctie ***E*** @590nm  | 0,000 |  |  |  |  |  |  |

**Visuele colorimetrie**

* Vergelijk buis 6 met de ijkreeks (buizen 1 t/m 5).
* Schat de concentratie [E133] in buis 6.

Het menselijk oog is niet zo goed in het waarnemen van kleurintensiteitsverschillen. Daarom gebruiken we een colorimeter.

**Instrumentele colorimetrie**

Een colorimeter is een instrument waarmee we nauwkeurig kunnen meten hoeveel licht er door een oplossing gaat.

Zet de colorimeter aan zodat deze kan opwarmen.

De colorimeter bestaat uit een lichtbron, een lichtsensor en een display om de meter af te lezen.

De gekleurde oplossing wordt tussen de lichtbron en de lichtsensor geplaatst.

**De lichtintensiteit**

Een lichtbundel met een intensiteit **I0** valt op de oplossing. Omdat de oplossing licht absorbeert is de intensiteit **I** na het passeren van de oplossing afgenomen.

De transmissie **T** is de relatieve hoeveelheid licht die door de oplossing gaat:

  **T = ( I / I0 )** x **100** **%**

Als de buis geen kleurstof bevat (buis 0) dan zal de oplossing geen licht absorberen.

Al het licht gaat door de oplossing en dus is lichtintensiteit **I** gelijk aan **I0** en **T** = 100%.

Als we een grafiek maken van de transmissie **T** tegen de concentratie kleurstof dan ontstaat een kromme lijn (een exponentieel verband). Daarom meten we niet de transmissie maar de extinctie. De extinctie ***E*** is een logaritmische waarde. Met een logaritme kunnen we van een exponentieel verband een lineair verband maken:

***E* = 2- log%T**

Een grafiek van de extinctie ***E*** tegen de concentratie kleurstof geeft wél een rechte lijn. We noemen dit de ijklijn. Op het display van de colorimeter kunnen we zowel **T** als ***E*** aflezen. We gebruiken altijd ***E*** want een rechte ijklijn werkt veel makkelijker en nauwkeuriger*.*

**De golflengte**

De colorimeter kan bij 8 verschillende golflengten (kleuren van de regenboog) meten. Welke golflengte is het meest geschikt?

Een oplossing van de kleurstof E133 is blauw omdat het blauwe licht er doorheen gaat. Het wordt niet of nauwelijks geabsorbeerd. Het meten van blauw licht heeft dus niet zo veel zin want **T** is dan altijd in de buurt van 100%. De andere golflengten worden door de kleurstof geabsorbeerd. We kiezen 590 nm want dit is de golflengte die het meest wordt geabsorbeerd (kleinste **T**, grootste ***E***) en dit geeft de meest gevoelige en nauwkeurige meting.

**Meten met de colorimeter**

* Doe van elk van de oplossingen minimaal 2 mL in een cuvet (halfvol).
* Plaats cuvet 0 (de blanco oplossing) in de colorimeter.
* Druk op de BLANCO-toets. De colorimeter geeft nu aan: **T**=100% ***E*** = 0,000.
* Plaats cuvet 5 in de colorimeter en houd de GOLFLENGTE-toets ca. 2 seconden ingedrukt tot de melding HAMDMATIG GOLFLENGTE op het display verschijnt.
* Druk nu net zo vaak kort op de golflengtetoets tot de golflengte op 590 nm staat.
* Noteer de extinctie ***E*** van cuvet 5 in de tabel.
* Plaats de overige cuvetten om de beurt in de colorimeter en meet de extinctie ***E***.
* Noteer de extincties in de tabel.

**Uitwerking**

* Maak een diagram van ***E*** (y-as) tegen de concentratie [E133] in de buizen 1 t/m 5 (x-as).
* Trek een gemiddelde rechte lijn (ijklijn) door de punten.
* Zoek de concentratie [E133] in buis 6 op met behulp van de ijklijn.
* Bereken de hoeveelheid E133 kleurstof op de M&M.

**Docentenhandleiding bij colorimetrie proef M&M blauw**

**Inleidende demo-proef**

Deze demo-proef is bedoeld als een eerste kennismaking met colorimetrie. Leerlingen krijgen het voorschrift en kunnen tijdens de demo meelezen, de afgelezen extincties invullen, een ijklijn maken en de hoeveelheid E133 berekenen.

Tijdens de demo kan de theorie van de colorimetrie en de werking van de colorimeter worden uitgelegd (zie verderop). Bovendien kan de instructie voor het pipetteren, het hanteren van cuvetten en alle andere praktische handelingen aan de hand van de proef worden gegeven.

De titaandioxide (E171) ‘grondverf’ die onder de blauwe kleurstof zit zorgt voor een heel fijne suspensie tijdens de extractie van de kleurstof. Te fijn om te filtreren of te laten bezinken. De oplossing wordt helder na ongeveer een half uur centrifugeren bij 7000 RPM Eventueel kan een reageerbuisje met heldere oplossing van te voren worden bereid. Tijdens de demo leg je uit dat het centrifugeren te lang duurt en dat je daarom eerder al een oplossing hebt gecentrifugeerd en je pakt het buisje er bij.

Ook de E133 standaardoplossing van 10,0 mg/L is van te voren bereid.

**De werking van de BLANCO-toets**

Om de transmissie te kunnen berekenen moet de colorimeter de intensiteit van de invallende lichtstraal **I0** én van de uittredende lichtstraal **I** weten. De sensor van de colorimeter kan alléén de uittredende lichtbundel **I** meten want alleen dáár zit de sensor. Hoe doet hij dat dan?

Als je op de BLANCO-toets van de colorimeter drukt zeg je eigenlijk tegen de colorimeter:

**I0**= de intensiteit **I** die de sensor nu meet . De colorimeter onthoud deze waarde voor **I0** en berekent hiermee de transmissie **T**.

Stel dat de sensor een waarde van **I** = 13842 meet bij de blanco-oplossing. Als je op dat moment op de BLANCO-toets drukt wordt **I0** 13842. Het cuvet zit op dat moment in de colorimeter, dus **I** is ook nog steeds 13842.

(13842/13842)x100% = 100%. Vandaar dat de colorimeter aangeeft **T**=100,0% als je op de BLANCO-toets hebt gedrukt.

**Waarom geeft de transmissie T een kromme ijklijn?**

Om dit uit te leggen bespreek ik (en teken op het bord) de volgende situatie:

Stel, je hebt een kleurstofoplossing van 1 mmol/L waarbij de transmissie **T**=50%.

Wat is dan de transmissie van een oplossing van 2 mmol/L?..........0% ?

Nee, dan zou de oplossing pikzwart zijn!

Bij 2 mmol/L komt de lichtstraal 2x zoveel kleurstofmoleculen tegen. Dat is hetzelfde als twee cuvetten met elk 1 mmol/L achter elkaar. Probeer maar! Je ziet dat één cuvet met 2 mmol/L precies even donker gekleurd is als twee cuvetten met elk 1 mmol/L achter elkaar.

Met ‘cell culture flasks’ (platte flessen) kan je dit goed aan de klas laten zien.

Het tweede cuvet absorbeert opnieuw 50% van de 50% die er in valt dus komt er nog maar 25% uit. Bij 3 mmol/L wordt de transmissie 12,5%, bij 4 mmol/L 6,25% enz.

Dit is een exponentieel verband met (in dit geval) een halfwaardeconcentratie van 1 mmol/L.

 

**Wiskunde**

Met een logaritme kan van een exponentieel verband een lineair verband worden gemaakt. Een logaritme is een wiskundige bewerking, een knopje op je rekenmachine.

In de colorimeter is een rekenmachine ingebouwd die de logaritme uitrekent.

Neem je de logaritme van **T**, dan krijg je een rechte lijn. In principe zou je dit al als ijklijn kunnen gebruiken, maar de lijn daalt (negatieve richtingscoëfficient) en snijdt de Y-as bij 2.

We willen liever een verband dat evenredig is met de concentratie (positieve richtingscoëfficient en een snijpunt Y=0).

De positieve richtingscoëfficient krijg je door de negatieve logaritme te nemen (-log%**T**) en het snijpunt komt op 0 door er twee bij op te tellen. De formule wordt dan: 2-log%**T**.

Dit noemen we de extinctie ***E***.

De extinctie kan op verschillende manieren worden berekend want:

***E* = 2**-**log%T = -log(%T/100) = log(100/%T) = log(I0/I) =** -**log(I/I0)**

De rekenmachine in de WESP colorimeter gebruikt de formule 2-log%**T** maar zou net zo goed één van de 4 andere formules kunnen gebruiken.

Regels 391 en 392 uit het firmware-programma van de WESP:



**De golflengte**

Door het cuvet gaat wit licht (alle golflengten van zichtbaar licht).

De sensor van de WESP bestaat eigenlijk uit 8 sensoren die elk bij een andere golflengte meten. De blanco levert dan ook voor elke golflengte een waarde voor **I0**. De colorimeter berekent voor elke golflengte **T** en ***E***. Op het display zie je alléén de waarden voor de gekozen golflengte.

Automatische golflengtekeuze kiest bij lage concentraties van deze kleurstof vaak 630 nm. Deze golflengte geeft echter zeer kromme ijklijnen. Beter is om de golflengte in te stellen op 590 nm.

**Uitwerking**

Als alle extincties tijdens de demo gemeten zijn deel ik mm-papiertjes uit en moeten de leerlingen de resultaten zelf uitwerken.

Opvallend is dat de leerlingen vaak denken dat ze klaar zijn als ze de concentratie van de M&M oplossing uit de ijklijn hebben afgelezen. Goed lezen! Wat is de onderzoeksvraag?

Eventueel kan worden besproken waarom deze meting niet zo zinvol is:

Als je serieus wilt meten hoeveel E133 M&M’s bevatten moet je de kleurstoffen van meerdere M&M’s (bijvoorbeeld 100g) van alle kleuren (de groene en bruine bevatten ook E133) extraheren en dan meten hoeveel E133 daarin zit. Dan pas zou je kunnen zeggen hoeveel mg E133 er per 100g in zit.

Een volgend practicum kunnen leerlingen zelf een colorimetrie-proef doen. Het koperammoniakcomplex (proef: Cu in 10 eurocent) geeft altijd een zeer strakke super rechte ijklijn. Hierdoor is goed te beoordelen of de leerlingen netjes hebben gepipetteerd.

Het blijkt in de praktijk niet overbodig om tijdens de eerste vijf minuten van dit practicum de instructie van het pipetteren nog even kort te herhalen.

Het blijkt in de praktijk niet overbodig om tijdens de eerste vijf minuten van dit practicum de instructie van het pipetteren nog even kort te herhalen.

Succes!

Frans Killian