

Gewöhnliche Spektrofotometer besitzen in der Regel folgende Anordnung an Bauteilen

Strahlenquelle → Monochromator → Küvette → Detektor → Signalverarbeitungseinheit

Weitere Bauteile sind diverse Linsen- und Spiegelsysteme und verschiedene Blenden.

Als einfache Monochromatoren dienten früher optische Filter, die nur Licht einer bestimmten Wellenlänge durchließen (vgl. Abb. 1.1a). Später erhielten Spektrofotometer Glasprismen als Monochromatoren (vgl. Abb. 1.1b). Sie nutzen die Tatsache aus, dass der Brechungswinkel

von EM-Strahlung an einem Glasprisma von der Wellenlänge abhängt (vgl. Abb. 1.1b). Das Prisma konnte durch das Gerät so gedreht werden, dass die passende Wellenlänge in die Küvette gelang. Seit mehreren Jahrzehnten haben sich in Spektrofotometern **optisches Gitter** als Monochromatoren durchgesetzt (vgl. Abb. 1.1c). Das Phänomen, dass feine Gitter und Rillen auch hier das Licht je nach Wellenlänge mit unterschiedlichem Winkel brechen, kennen Sie von CDs und DVDs. Wenn „weißes“ Licht auf der Scheibe reflektiert wird, sehen Sie die Regenbogenfarben, d.h. je nach Farbe wird das Licht mit unterschiedlichem Winkel gebrochen.

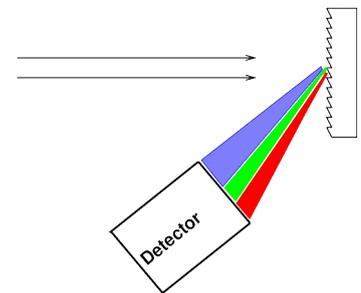
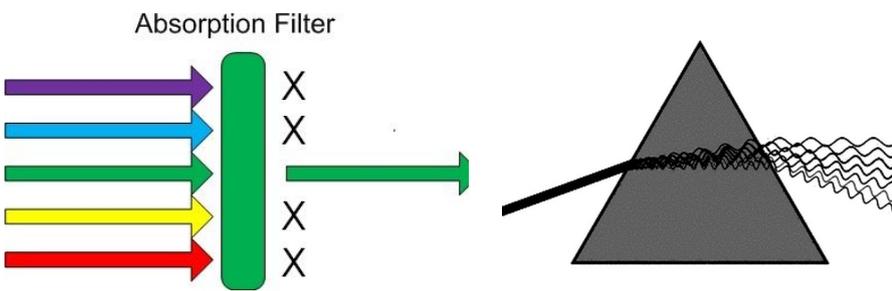


Abb. 1.1.a) Ein optischer Filter lässt nur bestimmte Wellenlängen passieren. Quelle: CC; chem.libretexts.org

Abb. 1.1b) Lichtbrechung an einem Glasprisma. Je nach Wellenlänge, unterscheidet sich der Brechungswinkel. Quelle: wikipedia.org.

Abb. 1.1c) optisches Gitter. Quelle: CC; spiff.rit.edu (Michael Richmond)

1. Einstrahlfotometer

Einstrahlfotometer haben eine einzige Messposition für Küvetten. Sie können jedoch mit einem Schlittensystem, Karussell o.ä. ausgestattet sein, in dem gleich mehrere Küvetten Platz finden. Das Einstrahlfotometer bewegt dann die gewünschte Küvette selbständig in die Messposition.

liefert, als bei der ersten Messung. Um solche Effekte auf die Messgenauigkeit zu minimieren, muss die Messung von Referenzlösung und Probelösung in kurzem zeitlichen Abstand erfolgen.

Die meisten modernen Einstrahlfotometer können das ganze Spektrum automatisch aufnehmen, so dass man nur noch die Startwellenlänge und die Endwellenlänge festlegen muss. Häufig ist hierfür jedoch der Anschluss eines Computers mit der entsprechenden Steuerungssoftware nötig. Im Rahmen eines so genannten **Basislinienlauf (baseline run)** werden für jede Wellenlänge im Messbereich zuerst die Absorbanzen der Referenzlösung gemessen und gespeichert. Anschließend wird die Probe durchgemessen und für jede Wellenlänge automatisch die Differenzen $A_{\text{Probe}} - A_{\text{Referenz}}$ gebildet.

Ein Vorteil des Einstrahlfotometers ist der kleine und einfache apparative Aufbau, so dass es auch häufig für Geländeuntersuchungen im Außenbereich eingesetzt werden kann.

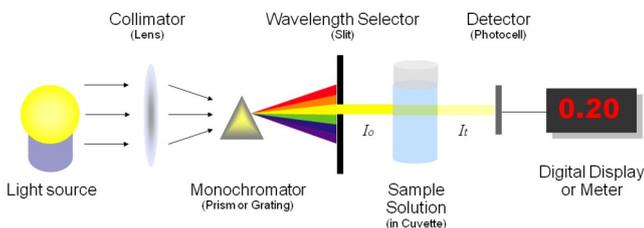


Abb. 1.2: Strahlengang eines Einstrahlfotometers Quelle: chem.libretext.org; Heesung Shim

Der größte Nachteil des Einstrahlfotometers sind leichte zeitliche Schwankungen der Strahlungsintensität der Lichtquelle. Dies kann dazu führen, dass die erneute Messung einer Probe nach einer bestimmten Zeit einen geringfügig anderen Wert für die Absorbanz (Extinktion)

2. Zweistrahlphotometer (Doppelstrahlphotometer)

Beim Zweistrahlgerät werden Probe und Vergleichslösung gleichzeitig bestimmt. Der Lichtstrahl wird durch ein Spiegelsystem geteilt, und dadurch beiden Küvetten (Probe und Referenz) quasi gleichzeitig durchstrahlt.

Dieses Verfahren ist gerätetechnisch wesentlich aufwendiger als das Einstrahlgerät, hat aber den Vorteil, dass Schwankungen der Strahlungsquelle ausgeglichen werden, weil sie sowohl die Referenz als auch die Probe in gleichem Ausmaß betreffen. Vor allem in der Vergangenheit, war dieser Fotometertyp deshalb etwas genauer. Bei modernen Einstrahlphotometern spielt der Vorteil bei den meisten Anwendungen keine Rolle mehr. Bei Sonderaufgaben, beispielsweise der Verfolgung der Absorptionsänderung über die Zeit gegenüber einer

jeweils zeitgleich gemessenen Referenz, ist dieser Fotometertyp natürlich weiterhin sehr wichtig. Der häufigste Typ unter den **Zweistrahlfotometer** besitzen nur einen Detektor. Durch einen rotierenden Spiegel (**Sektorspiegel, chopper**), der in einem Sektor durchlässig ist und im anderen Sektor spiegelt, ist es möglich, abwechslungsweise einen der beiden Lichtstrahlen zu messen.

Nicht alle Geräte mit mehreren Küvettenhäuschen sind Zweistrahlphotometer! Meistens handelt es sich auch hier um Einstrahlphotometer, die die gewünschte Küvette automatisch in den Lichtstrahl platzieren.

2.1 Vervollständigen Sie in Abb. 2.1 den Strahlengang, wenn der Lichtstrahl durch die Messlösung fällt.

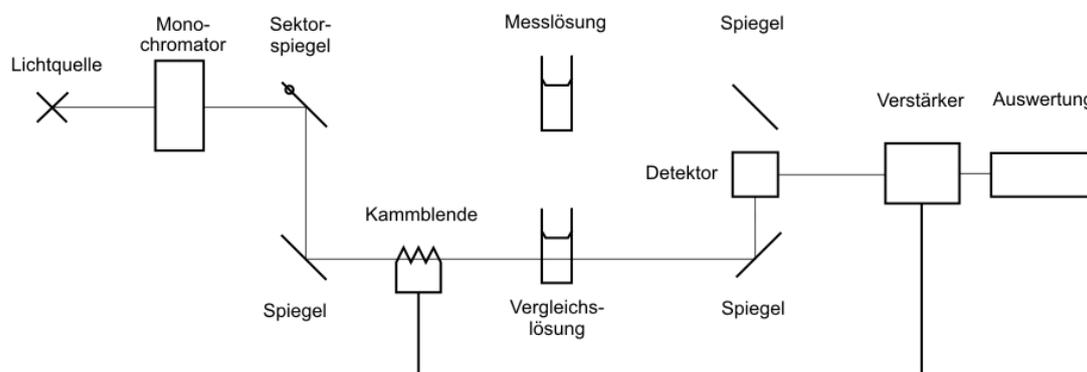


Abb. 2.1: Strahlengang eines Zweistrahlphotometers. Es gibt auch Bautypen mit 2 Detektoren. Quelle: wikipedia.org (verändert)

3. Mikroliter-Fotometer

Was tun, wenn man von einer Probe die Absorbanz messen muss, aber nur wenige Tropfen der Lösung zur Verfügung stehen? Hier helfen Mikroliter-Spektralfotometer. Einigen von diesen Geräten reichen nur 0,5 µL (!) Lösung, um eine Messung durchführen zu können. Die Lösung wird mit einer Mikropipette (Kolbenhubpipette)

auf die Querschnittsfläche eines Lichtfaserkabels pipettiert. Anschließend wird ein Deckel geschlossen, wodurch das andere Lichtfaserkabelende von der anderen Seite in die Lösung taucht. Insgesamt liegt also die Probelösung Tropfenform im Lichtweg durch die Lichtfaserkabel (vgl. Abb. 3.1 - 3.3).



Abb. 3.1: Spektralfotometer mit geöffnetem Deckel



Abb. 3.2: Spektralfotometer mit geschlossenem Deckel

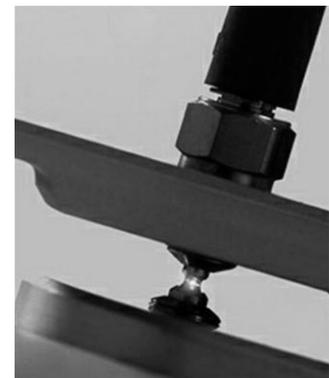


Abb. 3.3: Probelösung zwischen beiden Lichtfaserkabeln

Die effektive Schichtdicke liegt im Bereich von wenigen Zehnteln Millimetern (z.B. 0,2 mm). Insgesamt ist sie allerdings nicht so konstant und muss durch Kalibrier-messungen in regelmäßigen Abständen neu bestimmt werden. Durch diese Einschränkung sind solche Mikroliter-Spektrofotometer etwas ungenauer als herkömmliche Fotometer. Sie finden besonders in der biochemi-

schen Analytik (Proteinmessung, DNA-Messungen) Verwendung. Auch können sie zum Teil ganze Spektren aufnehmen. Ein Vorteil ist, dass auf Küvetten verzichtet werden kann. Nach der Messung wird der Probetropfen mit einem Lappen einfach weg gewischt und evtl. mit reinem Lösungsmittel nach gewischt.

4. Diodenarray-Spektrometer

Beim Diodenarray-Detektor (DAD, vgl. Abb. 4.1) fällt das polychromatische (!) Licht der Lichtquelle auf die Probe. Nach Passieren von Linsensystemen, Blenden etc. fällt es auf ein festes optisches Gitter. Dieses übernimmt die Funktion der spektralen Aufspaltung des Lichts. Die Spektralbestandteile gelangen auf einen Photodiodenarray, einem flächigen Bauelement aus vielen Photodioden, die die einzelnen spektralen Bestandteile gleichzeitig erfassen. Anders als bei einem Mono-chromator wird also durch das optische Gitter nicht eine Wellenlänge ausgewählt. Das Licht wird in alle vorhandenen Wellenlängen zerlegt, die dann separat voneinander bestimmt werden. Deshalb spricht man hier auch von einem Polychromator. Es wird also die

Absorption bei allen Wellenlängen gleich zeitig in Sekundenbruchteilen gemessen, ein langwieriges Durchscannen mit verschiedenen Wellenlängen entfällt. Die Verarbeitung der Signale erfolgt hier in jedem Fall durch einen Computer/Mikroprozessor. Die schnelle Aufnahme eines gesamten Spektrums erlaubt das Verfolgen des zeitlichen Verlaufs von chemischen Reaktionen, die in der Küvette ablaufen. Dafür werden in sehr kurzen Zeitabständen viele Spektren der Probe aufgenommen. Da es keine beweglichen Teile gibt, die sich abnutzen, werden Wellenlängenfehler reduziert und der Detektor ist wartungsfreundlicher als konventionelle Spektrofotometer.

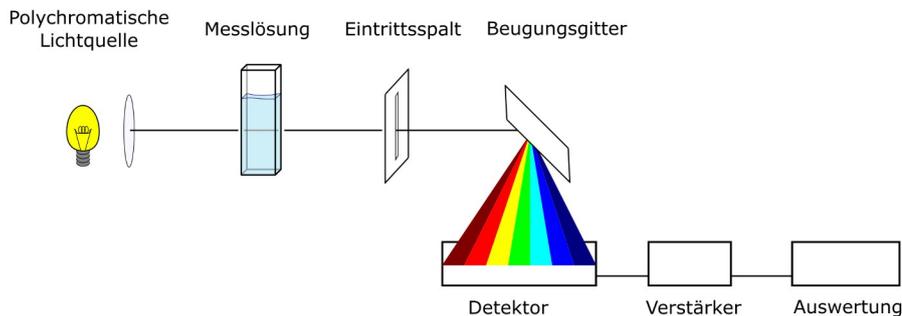


Abb. 4.1: Schematischer Aufbau eines Diodenarray-Fotometers
. Quelle: wikipedia.de



Abb. 4.2: Abbildung eines Diodenarray-Fotometers. Quelle: wikipedia.de