

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.

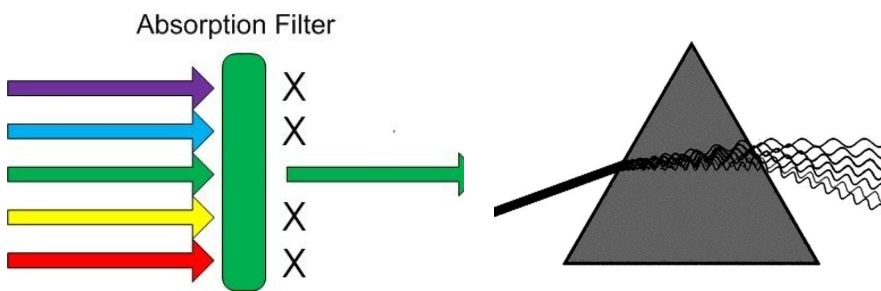


Abb. 1.1.a) Ein optischer Filter lässt nur bestimmte Wellenlängen passieren. Quelle: CC; chem.libretexts.org

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

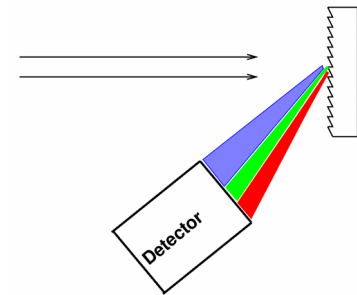


Abb. 1.1c) optisches Gitter. Quelle: CC; spiff.rit.edu (Michael Richmond)

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.

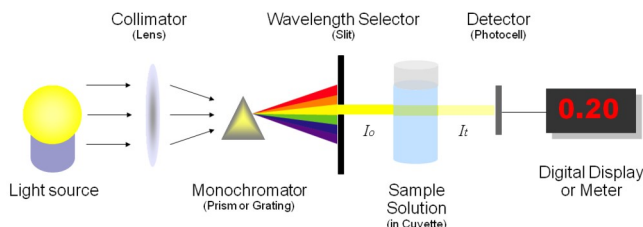


Abb. 1.2: Strahlengang eines Einstrahlfotometers Quelle: chem.libretext.org; Heesung Shim

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) 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.

2. Zweistrahlphotometer (Doppelstrahlphotometer)

Bei allen Zweistrahlphotometern werden die Absorbanzen von der Probe und einer Vergleichslösung, beispielsweise dem Reagenzienleerwert („blank“) gleichzeitig oder quasi-zeitgleich gemessen. Die Küvette der Probe und der Vergleichslösung werden hierfür zeitgleich oder nahezu zeitgleich durchstrahlt.

Zweistrahlphotometer sind wesentlich komplexer gebaut als Einstrahlphotometer. Sie haben den Vorteil, dass zeitliche Schwankungen der Intensität der Strahlungsquelle ausgeglichen werden, weil sie sowohl die Referenz als auch die Probe in gleichem Ausmaß betreffen. Modernen Einstrahlphotometer sind mittlerweile so präzise geworden, dass dieser Vorteil keine große Rolle mehr spielt. Bei Sonderaufgaben, beispielsweise der Verfolgung der Absorptionsänderung über die Zeit gegenüber, jeweils zeitgleich zu

einer gemessenen Referenz, ist dieser Fotometertyp trotzdem weiterhin wichtig.

Bei Zweistrahlphotometer gibt es verschiedene Bauprinzipien, die sich jeweils deutlich unterscheiden. Ein häufiger Typ unter den **Zweistrahlphotometer** besitzt nur einen Detektor: Durch einen rotierenden Spiegel (**Sektorspiegel, chopper**), bei dem einige Sektoren durchlässig und die anderen Sektoren die Strahlung spiegeln, ist es möglich, abwechselungsweise einen der beiden Lichtstrahlen zu messen (vgl. Abb. 2.1). Es gibt allerdings auch Zweistrahlphotometer mit zwei getrennten Detektoren für Referenz und Probe.

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

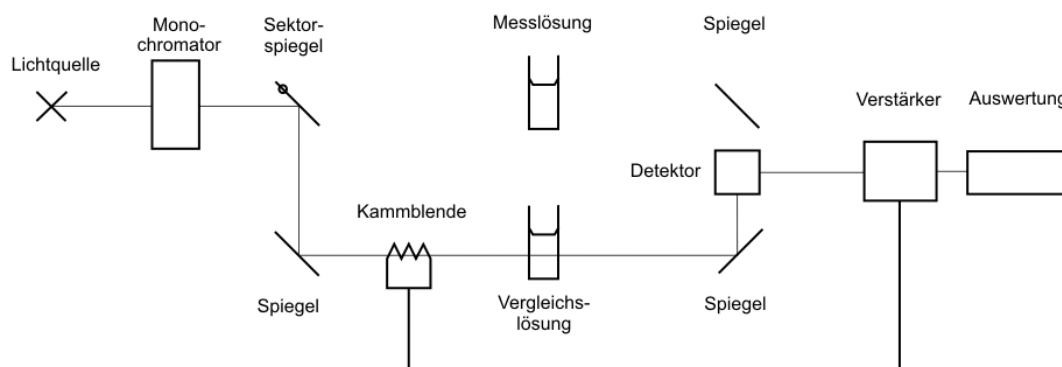


Abb. 2.1: Strahlengang eines Zweistrahlphotometers. Es gibt auch Bautypen mit 2 Detektoren. Quelle: wikipedia.org (verändert)

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

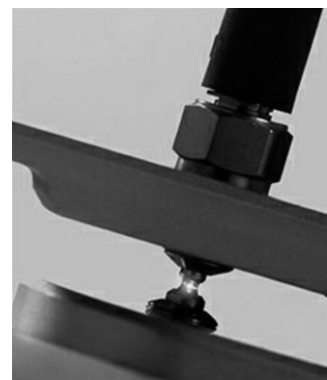


Abb. 3.3: Probelösung zwischen beiden Lichtfaserkabeln

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 Kalibrierungen in regelmäßigen Abständen neu bestimmt werden. Durch diese Einschränkung sind solche Mikroliter-Spektrofotometer etwas ungenauer als herkömmliche Fotometer. Sie finden besonders in der biochemischen

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 weggewischt 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 Monochromator 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.

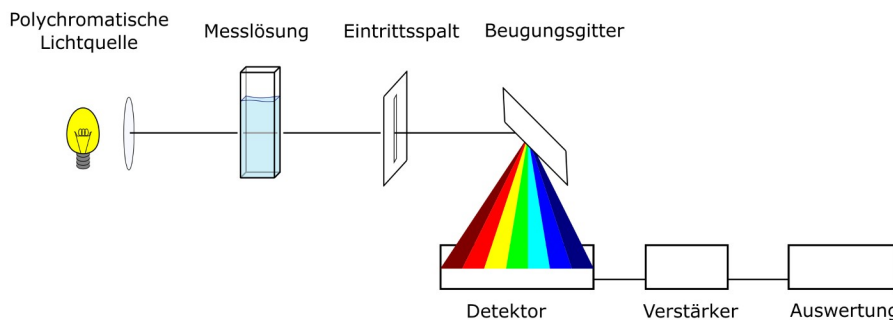


Abb. 4.1: Schematischer Aufbau eines Diodenarray-Fotometers

. Quelle: wikipedia.de



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