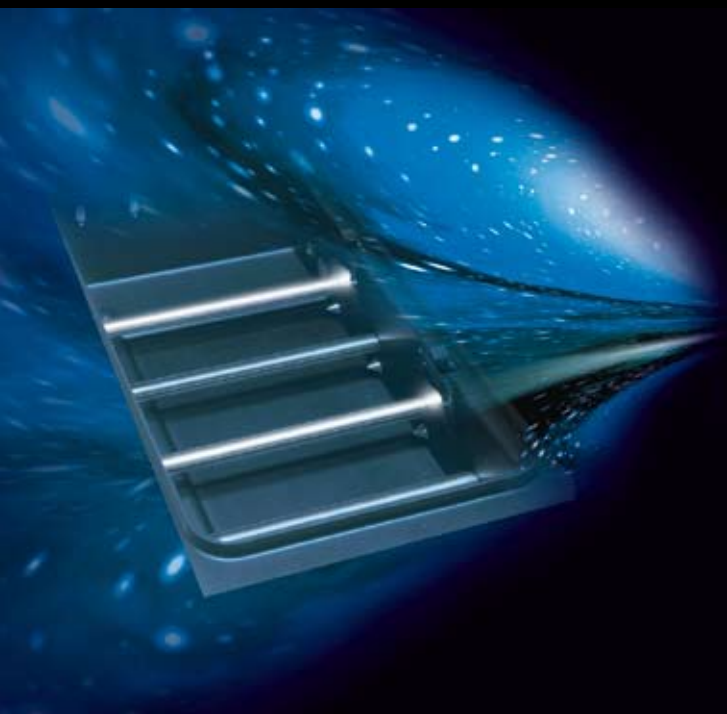


Grundlagen

Instrumentation und Techniken der
UV VIS Spektroskopie



Inhalt

1	Definitionen und Grundlagen.....	5
1.1	Lichtabsorption und Spektrum.....	5
1.2	Transmission und Absorption.....	6
1.3	Qualitative Analyse.....	6
1.3.1	Spektren und Strukturen	6
1.3.2	Beeinflussung des Spektrums.....	8
1.3.3	Qualitative Informationen	8
1.4	Quantitative Analyse	9
1.4.1	Lambert – Beer´sches Gesetz.....	9
1.4.2	Der Kalibrationsprozess	9
1.4.3	Probenpräparation für photometrische Messungen	10
1.5	Kinetik	11
1.6	Weitere Anwendungen der UV VIS Spektroskopie.....	12
1.6.1	Protein - und DNA - Analyse	12
1.6.2	DNA-Schmelzpunktbestimmung	14
1.7	Derivativspektroskopie	15
1.7.1	Farbanalyse	17
1.7.2	Schichtdickenbestimmung	18
2	Aufbau eines UV VIS Spektralphotometers.....	20
2.1	Komponenten des UV VIS Spektralphotometers	20
2.2	Strahlungsquellen.....	20
2.3	Einheit zur spektralen Lichtzerlegung.....	20
2.3.1	Monochromatorsystem.....	21
2.3.2	Polychromatorsystem.....	22
2.4	Einfluss des Austrittsspalt auf die spektrale Auflösung.....	23
2.5	Probeneinheit	24
2.6	Detektor.....	24
2.7	Ein- und Zweistrahlssysteme	25
3	Küvetten für die Spektralphotometrie	26
4	Zubehör in der UV VIS Spektroskopie.....	30
4.1	Überblick Einfach-Küvettenhalter	30

4.1.1	Applikation: Bestimmung von Calcium in Milch mittels Schnelltestküvetten.	31
4.1.2	Applikation: DNA-Analyse in Mikrokleinküvetten und justierbarem Küvettenhalter	32
4.2	Messen im Durchfluss	33
4.2.1	Applikation: Quantitative Phosphatbestimmung mit Durchflusssküvette	33
4.3	Küvettenwechsler	35
4.3.1	Applikation: Enzymkinetik mit Küvettenwechsler.....	36
4.4	Zubehör für das Messen von festen Proben	38
4.4.1	Halter für feste Proben und Reflexionsmesseinsätze.....	38
4.4.2	Applikation: Schichtdickenbestimmung durch Transmissionsmessung mit dem SPECORD®	39
4.4.3	Applikation: Bestimmung des Weißgrades von Zahnoberflächen mit der Ulbrichtkugel.....	41
4.4.4	Applikation: Charakterisierung von Sonnencreme	43
4.5	Messsonden	45
4.5.1	Applikation: Farbstoffmessung mit der ATR-Sonde	46

1 Definitionen und Grundlagen

1.1 Lichtabsorption und Spektrum

Bei Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Festkörpern, Flüssigkeiten oder Gasen treten verschiedene Effekte wie Absorption, Reflexion oder Streuung auf. In der UV VIS Spektroskopie wird ausschließlich die Wechselwirkung von Strahlung im ultravioletten und sichtbaren Bereich mit Materie untersucht.

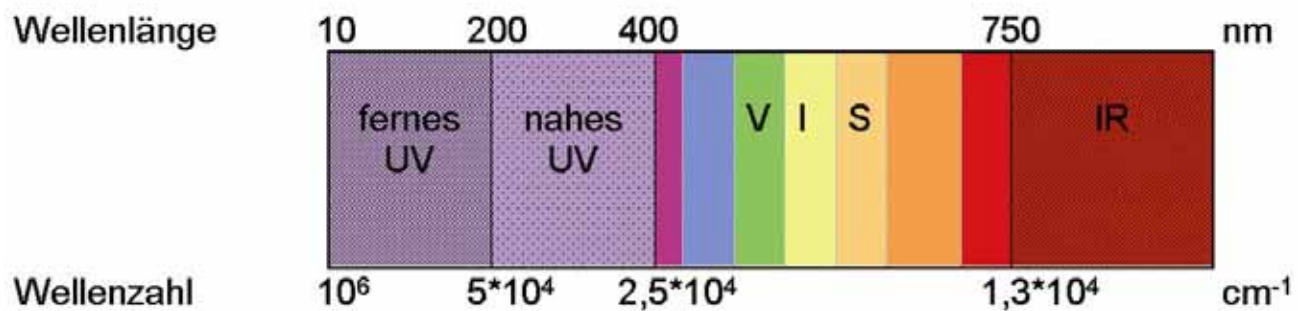


Abbildung 1: elektromagnetische Strahlung

Bei der Absorption von elektromagnetischer Strahlung durch Atome oder Moleküle werden diese von einem Grundzustand in einen energetisch angeregten Zustand versetzt. Dabei wird Energie einer bestimmten Frequenz aufgenommen (absorbiert). Die verschiedenen Molekülzustände haben im Gegensatz zu Atomen relativ breite Energiebereiche. Im Bereich des infraroten Lichtes können Rotation und Schwingung eines Moleküls angeregt werden. Im Bereich des sichtbaren und ultravioletten Lichtes wird durch die Aufnahme definierter Energiepakete (Quanten) die Anregung der Valenzelektronen beobachtet.

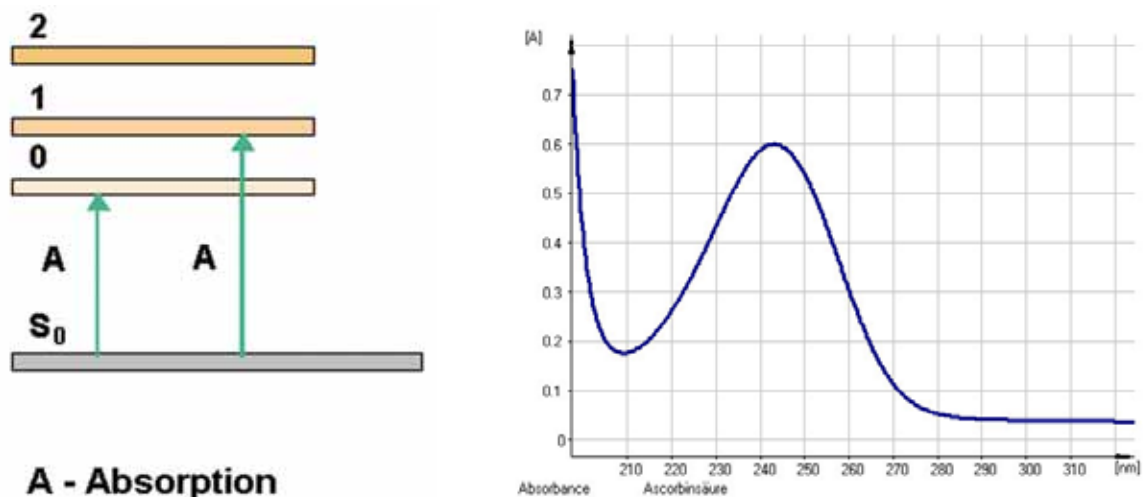


Abbildung 2: Absorption und Absorptionsspektrum (Ascorbinsäure)

Die Energie dieser Quanten kann als Wellenlänge der Strahlung angegeben werden. Je kürzer die Wellenlänge, umso größer ist die Energie der Quanten. Mit UV VIS Spektralphotometern kann die Lage der Absorptionsstellen und die relative Absorptionsgröße bestimmt werden.

1.2 Transmission und Absorption

Durchdringt ein Lichtstrahl mit der Intensität I_0 ein Medium mit der Schichtdicke d , wird der Lichtstrahl, abgesehen von Reflexions- und Streuverlusten, durch die Absorptionseigenschaften der Probe geschwächt. Der austretende Lichtstrahl (Transmission) hat nun die Intensität I .

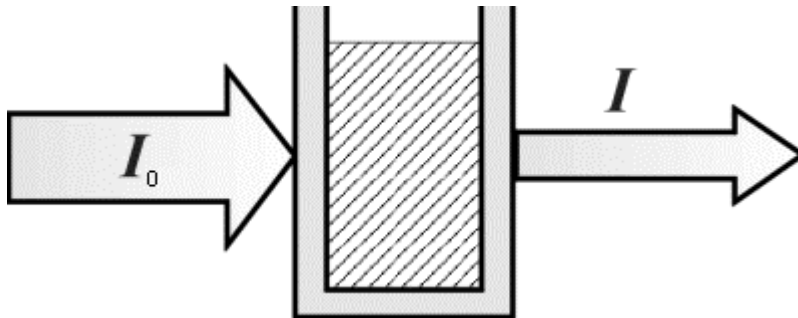


Abbildung 3: Transmission

Die Transmission T ist durch folgende Gleichung definiert:

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

oder

$$\%T = \frac{I}{I_0} \cdot 100\%$$

(Gleichung 1)

Für die Absorption A einer Probe gilt folgende Gleichung:

$$A = -\log_{10} T = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

(Gleichung 2)

Die Absorption einer Lösung nimmt somit im Gegensatz zur Transmission mit wachsender Abschwächung des Lichtstrahles zu.

1.3 Qualitative Analyse

1.3.1 Spektren und Strukturen

UV VIS Spektren zeigen generell relativ breite Absorptionsbanden von Molekülen. Verglichen mit der IR Spektroskopie, welche viele schmale Banden produziert, ist die Ausbeute an qualitativen Informationen vergleichsweise gering. Häufig wird die Absorption im UV VIS Bereich von organischen Molekülen mit chromophoren Gruppen (Farbträger)

hervorgerufen. Die folgende Tabelle 1 zeigt eine Übersicht chromophorer Gruppen mit entsprechenden Absorptionsmaxima.

Tabelle 1

Chromophor	Formel	Beispiel	Absorptionsmaximum
Carbonyl- (Ketone)	$RR'C=O$	Acetone	271 nm
Carbonyl- (Aldehyd)	$RHC=O$	Acetaldehyd	293 nm
Carboxyl-	$RCOOH$	Essigsäure	204 nm
Amido-	$RCONH_2$	Acetamid	208 nm
Azo-	$-N=N-$	Diazomethan	339 nm
Nitro-	$-NO_2$	Nitromethan	280 nm

Eine Verschiebung der Absorptionsbande in den langwelligen Bereich tritt vor allem dann auf, wenn Chromophore zueinander konjugiert angeordnet sind.

 1,5-Hexadien	 1,3,5-Hexatrien
(Nicht konjugiert) Absorptionsmaximum 185 nm	(konjugiert) Absorptionsmaximum 250 nm

Besonders zyklische ungesättigte Kohlenwasserstoffe weisen sehr charakteristische Absorptionsbanden im UV VIS Bereich auf.

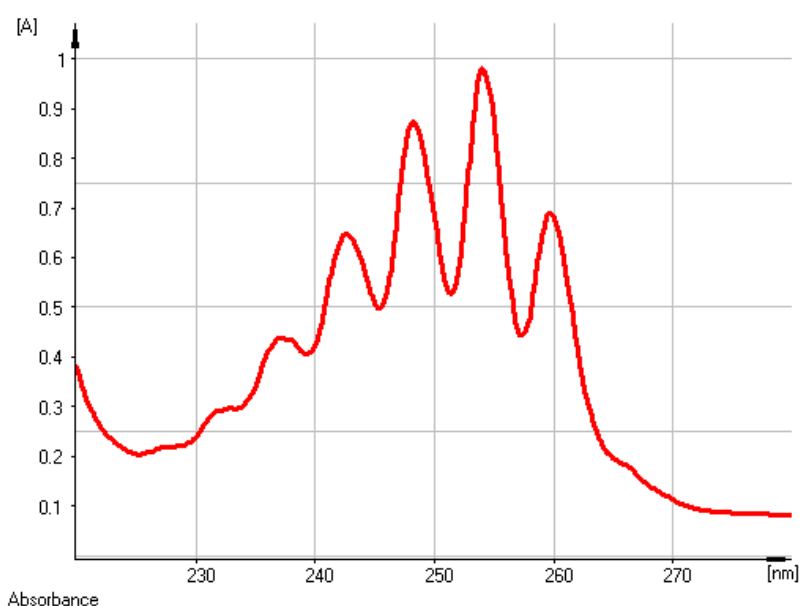


Abbildung 4: UV VIS Spektrum von Benzoldampf

1.3.2 Beeinflussung des Spektrums

Die exakten Werte für die Wellenlängen hängen sowohl von den konkreten Substituenten als auch vom Lösungsmittel ab. Generell beobachtet man bei steigender Lösungsmittelpolarität eine hypsochrome (kurzwellige) Verschiebung und bei sinkender Polarität des Lösungsmittels eine bathochrome (langwellige) Verschiebung des Absorptionsspektrums.

Tabelle 2

Lösungsmittel (nach steigender Polarität)	Durchlässigkeitsgrenze in nm
n - Hexan	195
Chloroform	240
Diethylether	200
Ethanol	200
Wasser	185

Andere Parameter wie pH-Wert und Temperaturen beeinflussen ebenfalls die Lage und Intensität des Absorptionsmaximums.

1.3.3 Qualitative Informationen

Die UV VIS-Spektralphotometrie kann folgende qualitative Informationen liefern:

- Identifizierung von reinen Substanzen
- Identifizierung von Substanzen nach HPLC-Trennung (bevorzugt mit Diodenarray-Systemen)
- Reinheitsprüfung (zum Beispiel von Proteinen oder DNA/RNA)
- Schmelzpunktkurven von Proteinen und Nukleinsäuren
- Unterscheidung von gesättigten und ungesättigten Verbindungen
- Unterscheidung von Keto- und Enolform
- Identifizierung von Carbonylbanden
- Aufklärung von Bindungsverhältnissen und Substituenteneinflüssen
- Enzymaktivitäten

1.4 Quantitative Analyse

1.4.1 Lambert – Beer'sches Gesetz

Den Zusammenhang zwischen Absorption und Konzentration beschreibt das Bouguer-Lambert-Beer'sche Gesetz.

Bouguer (1696 – 1758) Absorption ist proportional der Schichtdicke

Lambert (1728 – 1777)

Beer (1825 – 1863) Absorption ist proportional der molaren Konzentration

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d$$

(Gleichung 3)

- $A(\lambda)$ - Absorption bei Wellenlänge λ
- $\varepsilon(\lambda)$ - molarer Absorptionskoeffizient bei der Wellenlänge λ ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
- c - Konzentration (mol L^{-1})
- d - Schichtdicke der Küvette in cm

Das Lambert-Beer'sche Gesetz ist ein Grenzesetz und gilt nicht in folgenden Fällen:

- Die Konzentration der zu messenden Substanz ist zu hoch ($> 0.01 \text{ M/L}$).
- Es gibt Seitenreaktionen zwischen der zu messenden Substanz und dem Lösungsmittel.
- Die verwendete Strahlung ist nicht streng monochromatisch.
- Streulicht (diffuses Licht, das z. B. durch Reflexionen an Objekten entsteht).

Das bedeutet, die Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes muss überprüft werden.

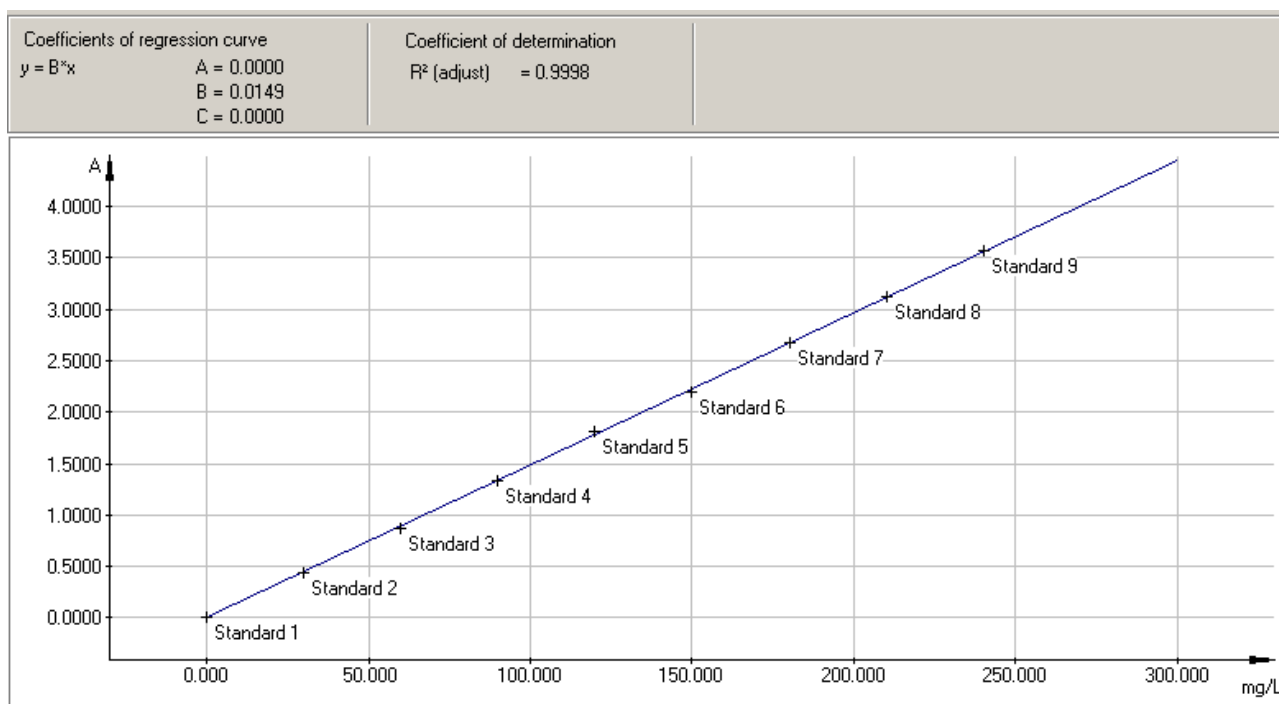
Diese Überprüfung ist der Kalibrationsprozess.

1.4.2 Der Kalibrationsprozess

Kalibration heißt, Proben mit bekannter Konzentration (Standards) werden vermessen und die gemessenen Absorptionswerte werden gegen die zugehörigen Konzentrationen aufgetragen.

Das Lambert-Beer'sche Gesetz ist im linearen Bereich der Kalibrationskurve gültig.

Durch den Einsatz erweiterter Rechenmodelle lassen sich bis zu einem gewissen Grad auch nichtlineare Kalibrationskurven verwenden.



Standard	Konz.	Quelle	1. Reihe	2. Reihe	3. Reihe	Mittelw.	SD	RSD
Standard 1	0.000	Messen: Linearität.par	-0.0001	-0.0001	0.0000	-0.0001	0.0000	-32.5359
Standard 2	30.000	Messen: Linearität.par	0.4340	0.4339	0.4339	0.4339	0.0000	0.0111
Standard 3	60.000	Messen: Linearität.par	0.8718	0.8719	0.8719	0.8719	0.0000	0.0025
Standard 4	90.000	Messen: Linearität.par	1.3333	1.3336	1.3337	1.3335	0.0002	0.0140
Standard 5	120.000	Messen: Linearität.par	1.8053	1.8063	1.8060	1.8059	0.0005	0.0266
Standard 6	150.000	Messen: Linearität.par	2.2028	2.2044	2.2046	2.2039	0.0010	0.0444
Standard 7	180.000	Messen: Linearität.par	2.6791	2.6835	2.6876	2.6834	0.0043	0.1598
Standard 8	210.000	Messen: Linearität.par	3.1069	3.1235	3.1302	3.1202	0.0120	0.3842
Standard 9	240.000	Messen: Linearität.par	3.5414	3.5702	3.6009	3.5709	0.0297	0.8330

Abbildung 5: Kalibration

1.4.3 Probenpräparation für photometrische Messungen

In den meisten Fällen müssen die zu untersuchenden Spezies in gefärbte Verbindungen überführt werden. Die Reagenzien für diesen Farbbildungsprozess können sein:

- Anorganischer Natur. Diese Reagenzien sind aber nicht sehr weit verbreitet.
- Organischer Natur. Mehr als 7500 solcher organischer Reagenzien sind bekannt. Die zu beobachtenden Farben resultieren aus Interligandenbanden und Charge-Transfer-Komplexen.

In der folgenden Tabelle 3 ist eine Auswahl von Parametern, die mittels UV VIS bestimmt werden können, dargestellt.

Tabelle 3

Aluminium	Brom	Chlorid	Fluorid	Mangan	Nitrit	Sauerstoff	Sulfit
Ammoniak	BSB	Chromat	Gold	Molybdän	Ozon	Silber	Tenside (anion.)
Ammonium	Cadmium	CSB	Iod	Natrium	Phenol	Stickstoff (ges.)	TOC
Blei	Chlor	Cyanid	Kalium	Nickel	Phosphat	Sulfat	Wasserstoffperoxid
Bor	Chlordioxid	Eisen	Kupfer	Nitrat	Resthärte	Sulfid	Zink

1.5 Kinetik

Mit Kinetikstudien können Änderungen der Absorption in Abhängigkeit von der Zeit, und somit die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion verfolgt werden.

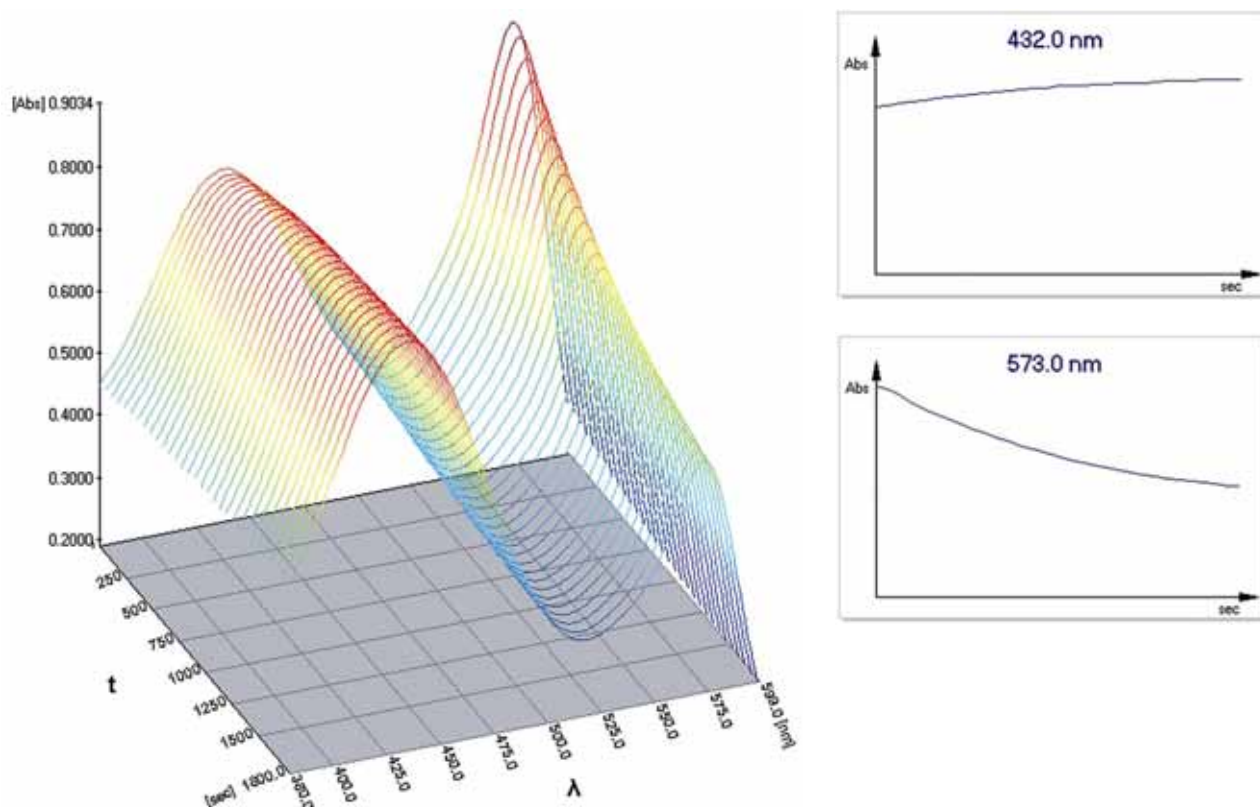


Abbildung 6: Dreidimensionale Ergebnisdarstellung einer kinetischen Messung mit Zeitschnitt bei den jeweiligen Absorptionsmaxima

Diese Zeitschnitte können zur Ermittlung von Reaktionsgeschwindigkeiten ausgewertet werden (z. B. Ermittlung des Anstiegs durch lineare Regression).

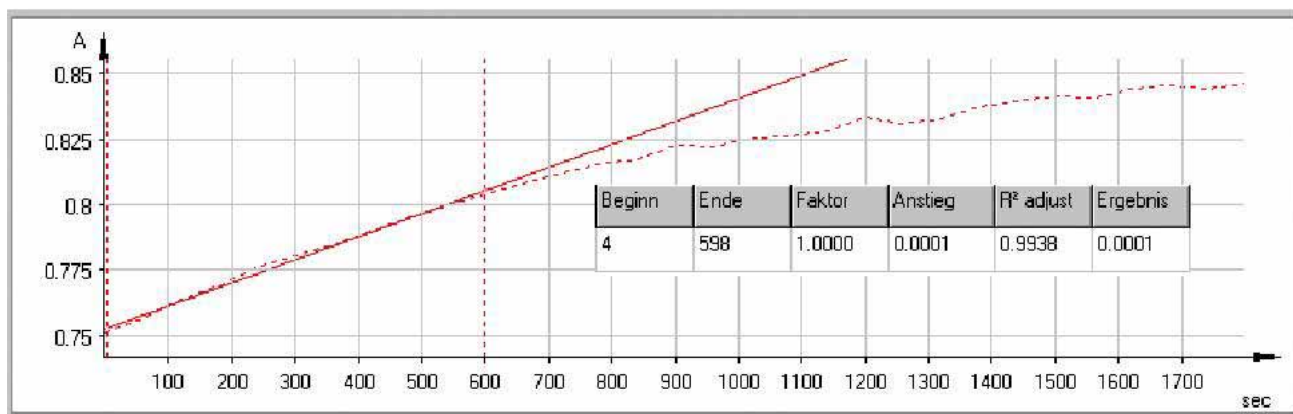


Abbildung 7: Auswertungsmöglichkeit einer kinetischen Messung

Die Konzentration von Enzymen wird ebenfalls zeitaufgelöst (Kinetik) bestimmt. Das bedeutet, die Konzentration eines Enzymsubstrates ändert sich mit der Zeit. Der gemessene Anstieg der Zeitkurve ist proportional zur Enzymkonzentration.

In der Lebensmittelchemie werden zum Beispiel enzymatische Reaktionen zur Bestimmung einiger wichtiger Parameter (siehe Tabelle 4) durchgeführt.

Tabelle 4

Acetat	Cholesterin	Glucose	Hydroxybuttersäure	Oxalsäure
Alkohol	Citrat	Glutamin	Isocitronensäure	Saccharose
Ameisensäure	Formaldehyd	Glycerin	Lactat	Sorbit
Ascorbinsäure	Fructose	Harnstoff	Lactose	Stärke
Bernsteinsäure	Galactose	Hydrazin	Maltose	Xylit

1.6 Weitere Anwendungen der UV VIS Spektroskopie

1.6.1 Protein - und DNA - Analyse

DNA besteht in ihrem Grundzustand aus zwei Desoxyribose-Strängen, die sich helikal um eine Achse winden. Die Stränge sind durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen Purin und Pyrimidin (P-P), Adenin und Thymin (A-T) bzw. Guanin und Cytosin (G-C) miteinander verbunden. Diese Basen bilden die UV-Absorptionseigenschaft von DNA mit einem Peakmaximum bei 260 nm. Für die Gehaltsbestimmung wird die Absorption bei 260 nm gemessen und über das Lambert-Beer'sche Gesetz die Konzentration berechnet.

In DNA-Lösungen stellen Proteine eine häufige Verunreinigung dar. Durch die Bestimmung des Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm wird die Reinheit der Nucleinsäuren abgeschätzt. Liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2 beträgt die Reinheit 70 - 95 %.

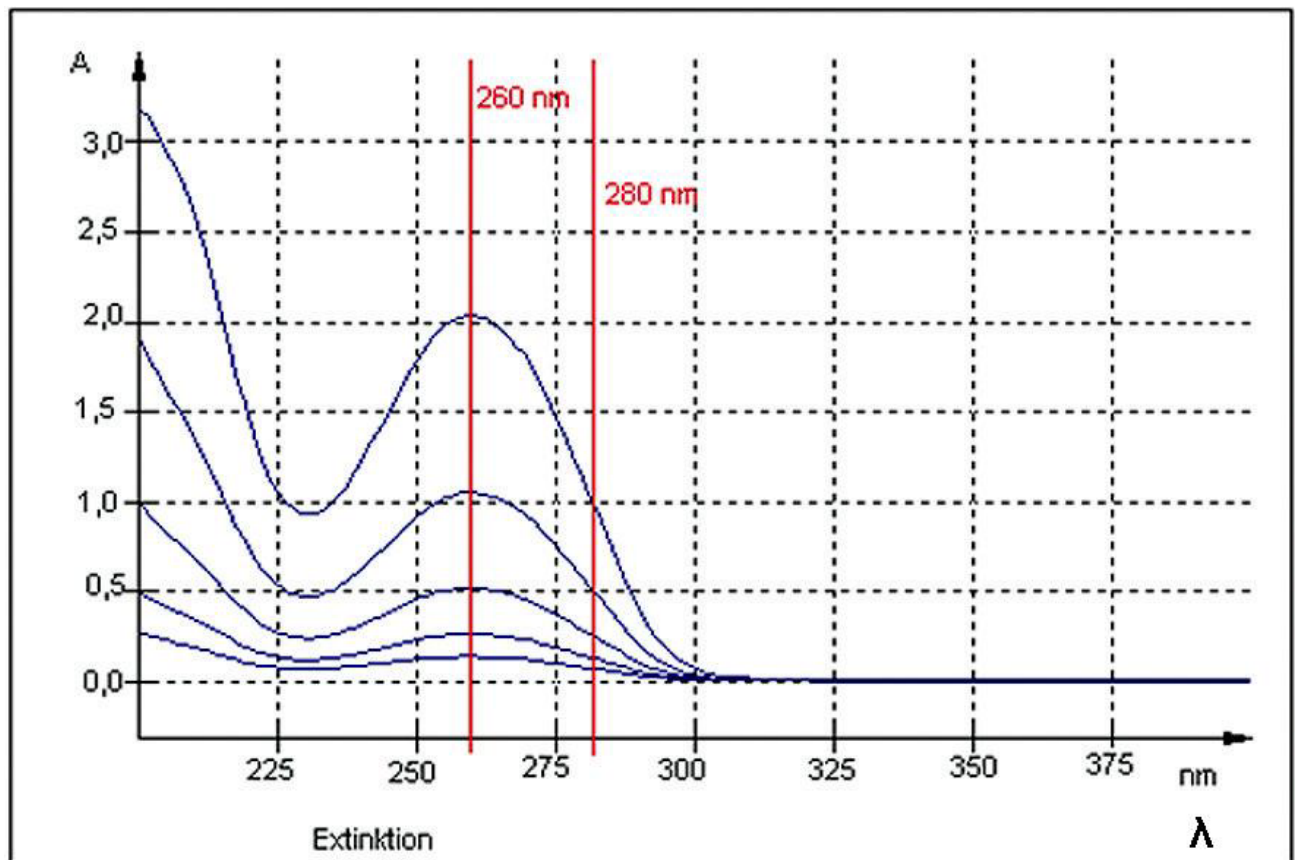


Abbildung 8: Darstellung des Absorptionsverhaltens von DNA-Standardlösungen bei 260 und 280 nm

Proteine besitzen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, welches vor allem auf die aromatischen Ringsysteme der Aminosäuren (besonders Tryptophan und Tyrosin) zurückzuführen ist. Die Proteinkonzentration wird daher direkt über die Absorption bei 280 nm über das Lambert-Beer'sche Gesetz ermittelt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration ist außerdem durch die Verwendung von Farbreagenzien wie dem Bradford Reagenz (mit Coomassie-Brillant-Blau G-250, Absorptionsmaximum bei 595 nm), dem Biuret Reagenz (violetter Farbkomplex zwischen dem Cu^{2+} des Biuret-Reagenzes und den an der Peptidbindung beteiligten Stickstoffatomen, Absorptionsmaximum bei 546 nm) und dem Lowry Reagenz (Kopplung von Biuret-, Folin- und Molybdänblau-Reaktion, Absorptionsmaximum bei 540-750 nm) möglich.

1.6.2 DNA-Schmelzpunktbestimmung

Das Aufwinden der DNA - Doppelhelix wird als Schmelzen bezeichnet, da dieser Vorgang bei einer höheren Temperatur erfolgt. Die Schmelztemperatur T_m ist dabei die Temperatur, bei der die Hälfte der Helixstruktur verlorengegangen ist. Infolge des Zusammenbruchs der Basenpaare (Hyperchromie) nimmt die Absorption bei 260 nm mit steigender Temperatur zu. Um diese Absorptionsänderung in Abhängigkeit der Temperatur so genau wie möglich bestimmen zu können, ist es notwendig, die Temperierung mit einer sehr hohen Temperaturgenauigkeit vorzunehmen. Hierfür sind Peltiertemperierungen mit einer Genauigkeit von bis zu $0,1^\circ\text{C}$ der klassischen Wasserbadtemperierung vorzuziehen. Die Auswertung einer Schmelzpunktkurve kann an jeder im Spektrum zur Verfügung stehenden Wellenlänge erfolgen.

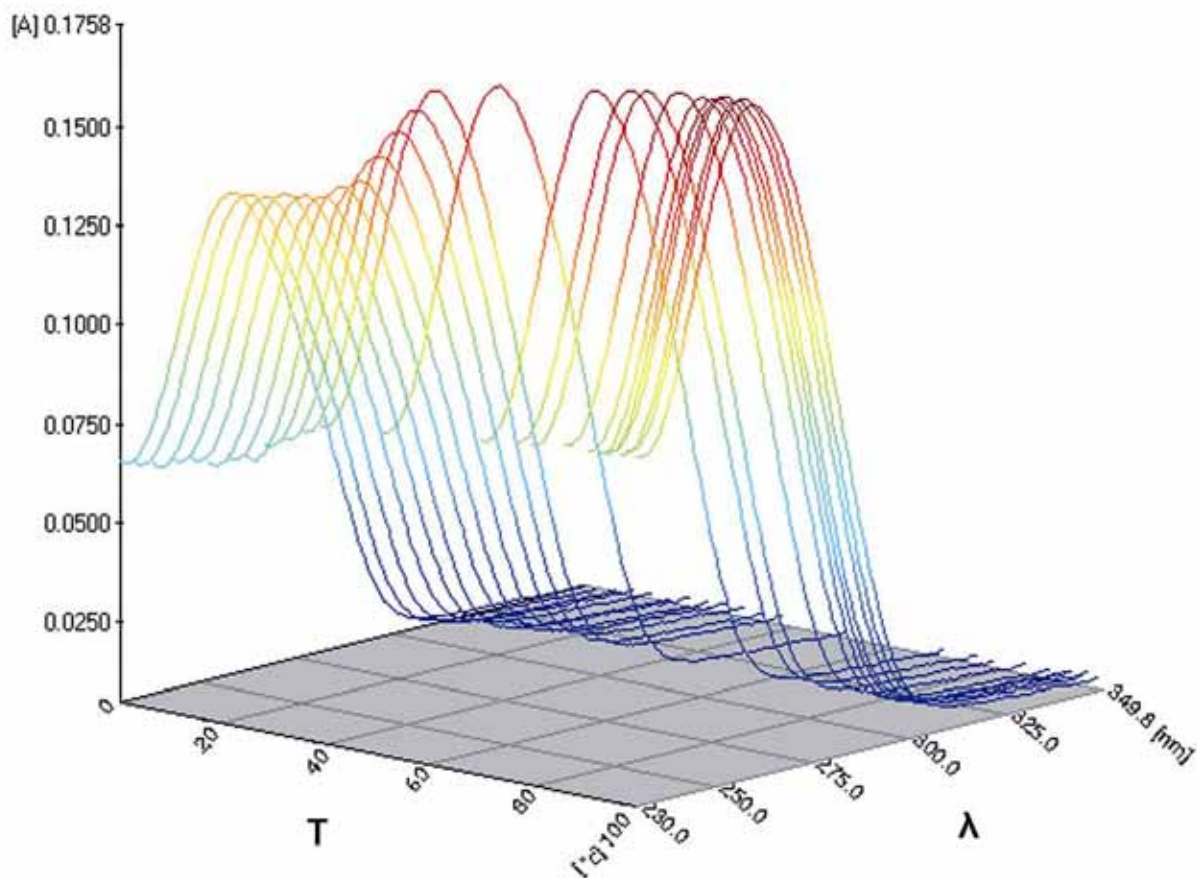


Abbildung 9: DNA-Spektren bei verschiedenen Temperaturen

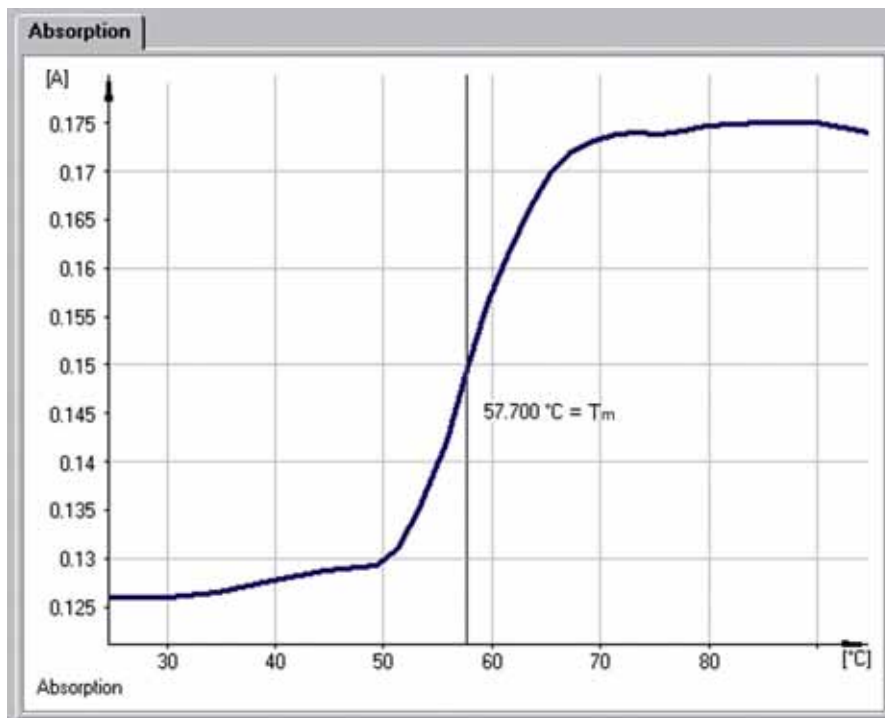


Abbildung 10: DNA-Schmelzpunktkurve bei 260 nm

Aus der Schmelzpunktkurve kann zum Beispiel durch die Bestimmung des Wendepunktes der T_m – Wert ermittelt werden. Die Schmelztemperatur ist von den vorhandenen Basenpaaren abhängig. DNA mit einem hohen Anteil an GC-Basenpaaren zeigt einen höheren T_m – Wert als DNA mit überwiegend AT-Basenpaaren. Für die im Beispiel verwendete Kalbsthyphus - DNA wurde ein T_m Wert von 57,7 °C ermittelt.

1.6.3 Derivativspektroskopie

In der Derivativspektroskopie wird die Ableitung eines Spektrums sowohl zur qualitativen als auch zur quantitativen Auswertung herangezogen. Viele der wichtigen Anwendungen der Derivativspektroskopie im ultravioletten und sichtbaren Bereich dienen der qualitativen Identifizierung und Analyse von Proben. Dabei ermöglichen genaue Details in den Feinstrukturen der Ableitungsspektren eine Unterscheidung von Verbindungen mit sich überlappenden Spektren.

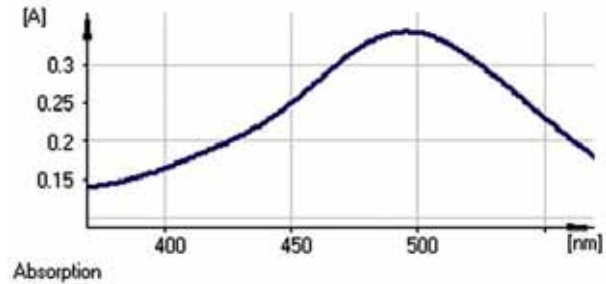
Die Derivativspektroskopie hat sich auch zur Untersuchung des Analyten bei spektralen Störungen bewährt. Durch die Ableitung eines Spektrums kann der einem Messspektrum überlagerte Untergrund unterdrückt und die spezifische Absorption deutlicher hervorgehoben werden.

Im Fall der UV VIS Spektroskopie ergeben sich die für das Lambert-Beer'sche Gesetz entsprechenden Ableitungen:

Ausgangsspektrum

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d$$

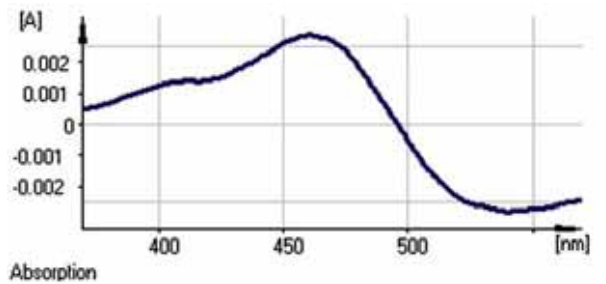
(Gleichung 3)



1. Ableitung

$$\frac{dA}{d\lambda} = c \times d \frac{d\varepsilon}{d\lambda}$$

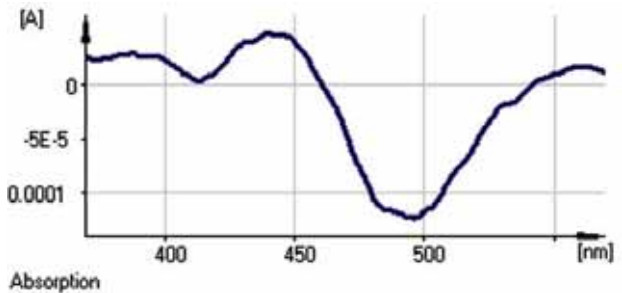
(Gleichung 4)



2. Ableitung

$$\frac{d^2 A}{d\lambda^2} = c \times d \frac{d^2 \varepsilon}{d\lambda^2}$$

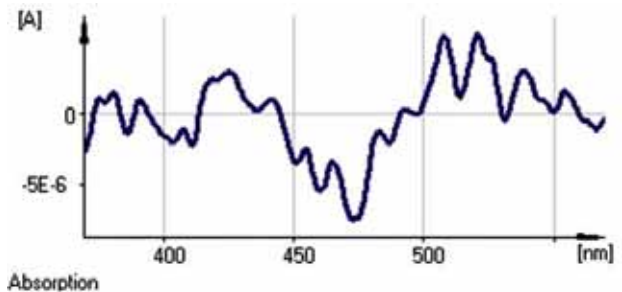
(Gleichung 5)



3. Ableitung

$$\frac{d^3 A}{d\lambda^3} = c \times d \frac{d^3 \varepsilon}{d\lambda^3}$$

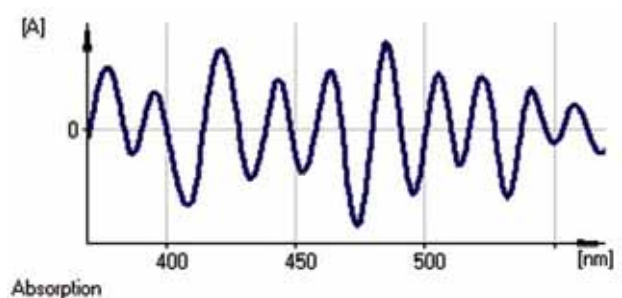
(Gleichung 6)



4. Ableitung

$$\frac{d^4 A}{d\lambda^4} = c \times d \frac{d^4 \varepsilon}{d\lambda^4}$$

(Gleichung 7)



Die Ableitungen nehmen sowohl positive als auch negative Werte an. Da die erste und zweite Ableitung außerordentlich empfindlich auf jede Änderung der Steigung im Absorptionsspektrum reagieren, ist die Methode der Derivativspektroskopie sehr gut geeignet, Schultern bzw. sich überlappende Absorptionsbanden zu analysieren. Deshalb

wird die Derivativspektroskopie in der Analytik oft sowohl zum Spurennachweis als auch zur quantitativen Bestimmung verwendet. Zur Auswertung bedient man sich der Tangentenmethode, der Peak-Peak-Methode und der Peak-Null-Methode.

1.6.4 Farbanalyse

Die Farbe ist eine wichtige Eigenschaft von Substanzen. Sie kann durch Auswertung des Reflexionsspektrums von festen oder undurchlässigen Proben (a) oder durch Transmissionsmessung von lichtdurchlässigen Proben wie Harze, Öle oder Detergentien (b) bestimmt werden.

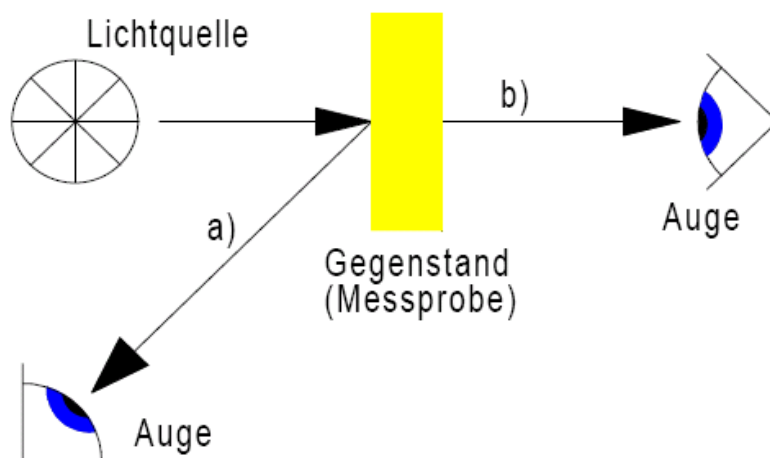


Abbildung 11: Wahrnehmung von Farbe mit dem menschlichen Auge

Das menschliche Auge sieht jeweils die Komplementärfarbe zur absorbierten Farbe. Zum Beispiel absorbiert eine gelbe Lösung Licht im blauen Bereich, wie die folgende Übersicht zeigt.

Absorbierte Farbe	Absorbierte Wellenlänge [nm]	Komplementärfarbe
 Violett	380 – 435	 Gelb-grün
 Blau	435 – 480	 Gelb
 Grünblau	480 – 490	 Orange
 Grün	490 – 560	 Rot
 Gelb-grün	560 – 595	 Purpur
 Orange	595 – 650	 Grün-blau
 Rot	650 – 780	 Blau-grün

Der Sehvorgang im menschlichen Auge wird mit genormten Datensätzen rechnerisch nachgeahmt. Ergebnis ist ein Satz von Farbwerten, welche die Farbe einer Probe objektiv und eindeutig beschreiben.

Die Auswertung berücksichtigt Festlegungen des CIE-Normvalenzsystems* in nationalen und internationalen Normen wie z.B. DIN 5033 oder ASTM E-308.

* CIE-Normvalenzsystem ist der Versuch der Commission internationale de l'éclairage, Farben beruhend auf dem menschlichen Farbwahrnehmungsapparat darzustellen.

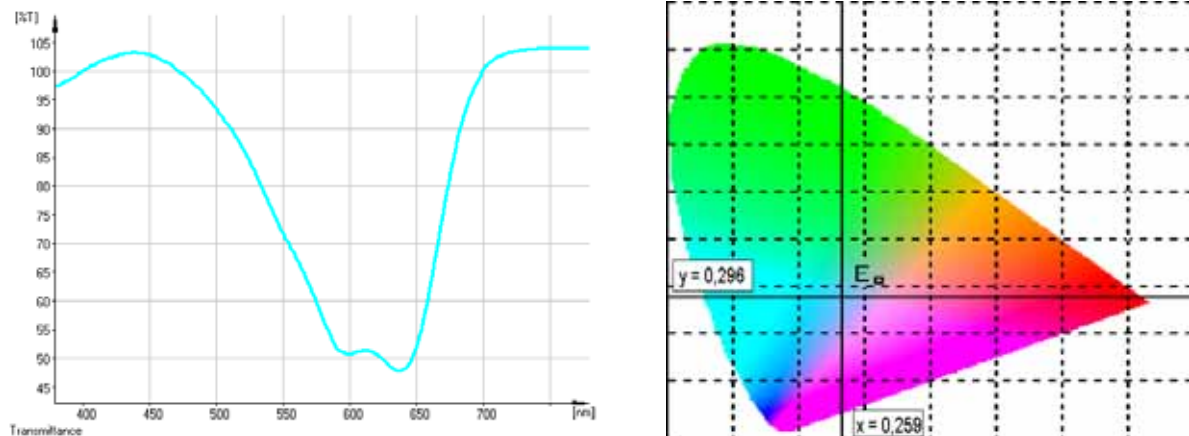


Abbildung 12: Farbbestimmung einer blauen Lösung (links Transmissionsspektrum, rechts Darstellung in der Farbtafel)

1.6.5 Schichtdickenbestimmung

Durch Reflexion von Licht an Schichten entstehen Interferenzspektren, aus denen die Dicke der Schicht berechnet werden kann. Zur Bestimmung der Schichtdicke wird ein Reflexionseinsatz mit variablem Winkel verwendet und ein Reflexionsspektrum in einem definierten Winkel aufgenommen.

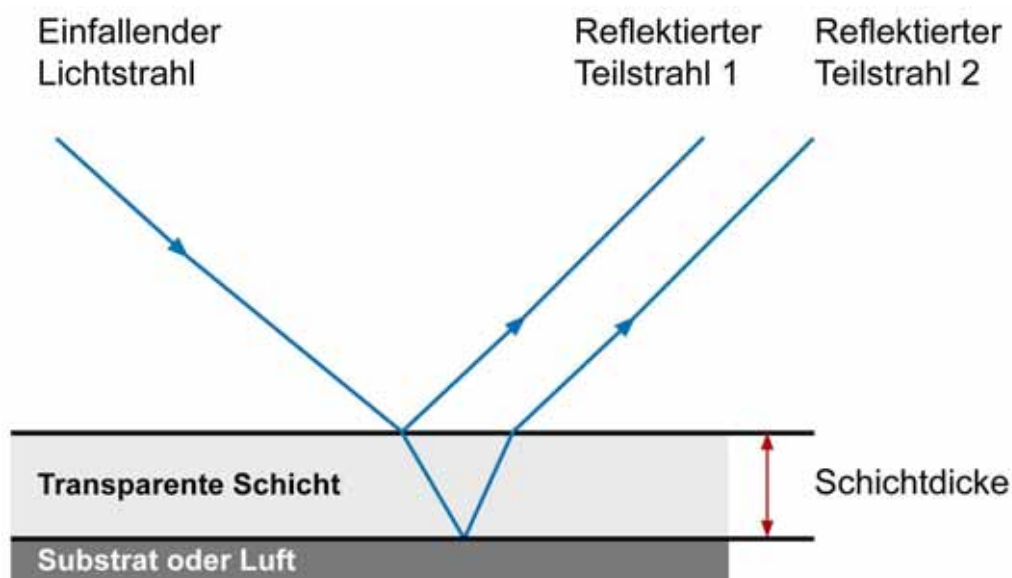


Abbildung 13: Interferenzmodell zur Schichtdickenbestimmung

Das entstehende Interferenzspektrum ist abhängig von der geometrischen Schichtdicke und dem Brechungsindex. Berechnet wird die optische Schichtdicke, das Produkt aus geometrischer Schichtdicke und Brechungsindex.

$$d = \frac{m \cdot \frac{\lambda_2 \cdot \lambda_1}{2(\lambda_2 - \lambda_1)}}{\sqrt{n^2 - \sin^2 \Theta}}$$

(Gleichung 8)

Dabei ist d die Dicke der Probe, m die Anzahl der Interferenzmaxima nach nulltem Maximum, n die Brechzahl der Probe, Θ der eingestellte Reflexionswinkel, λ_1 die Wellenlänge des nullten Interferenzmaximums und λ_2 die Wellenlänge des 2. Interferenzmaximum ($\lambda_2 > \lambda_1$).

Die folgende Abbildung zeigt ein Reflexionsspektrum eines Polyesters. Die auftretenden Interferenzen sind an diesem Beispiel deutlich zu erkennen.

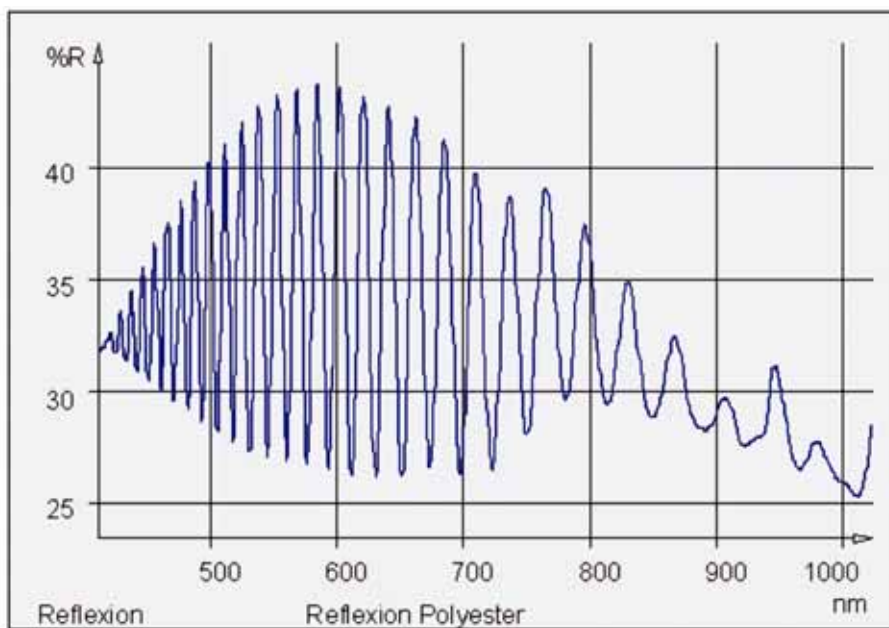


Abbildung 14: Beispiel eines Reflexionsspektrums zur Schichtdickenbestimmung (Für einen Einfallswinkel von 45° wurde ein Absorptionsmaximum von 6,45 µm bestimmt.)

2 Aufbau eines UV VIS Spektralphotometers

2.1 Komponenten des UV VIS Spektralphotometers

Ein modernes UV VIS Spektralphotometer besteht prinzipiell aus den folgenden Komponenten:

- Strahlungsquelle
- Einheit zur spektralen Lichtzerlegung
- Probenraum
- Detektor
- Analog-Digital-(AD)-Wandler
- Computer mit Anzeige und anderen Peripheriegeräten

2.2 Strahlungsquellen

In UV VIS Spektralphotometern kommen hauptsächlich Kontinuumstrahler wie zum Beispiel eine Kombination aus Deuteriumlampe (UV-Bereich) und Halogenlampe (VIS-Bereich) zum Einsatz.

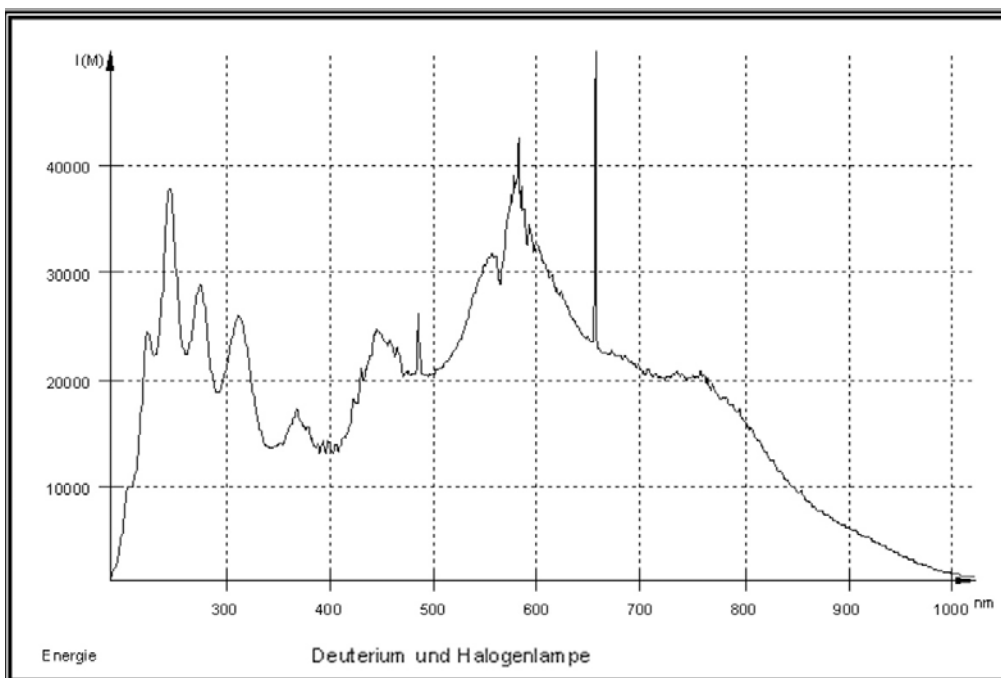


Abbildung 15: Energieverteilung Kombination Deuterium- und Halogenlampe

2.3 Einheit zur spektralen Lichtzerlegung

Lichtzerlegende Einheiten in Photometern können Interferenzfilter, Prismen oder holographische Gitter sein. Man unterscheidet außerdem zwischen Monochromator und Polychromator:

2.3.1 Monochromatorsystem

Es gibt prinzipiell zwei Arten von Photometern, Monochromator- und Polychromatorsysteme. Bei Monochromatorsystemen wird das Licht vor der Probe zerlegt. Die Probe wird somit mit monochromatischem Licht durchleuchtet. Messungen sind daher auch bei niedrigen Absorptionen sehr präzise.

Optischer Aufbau

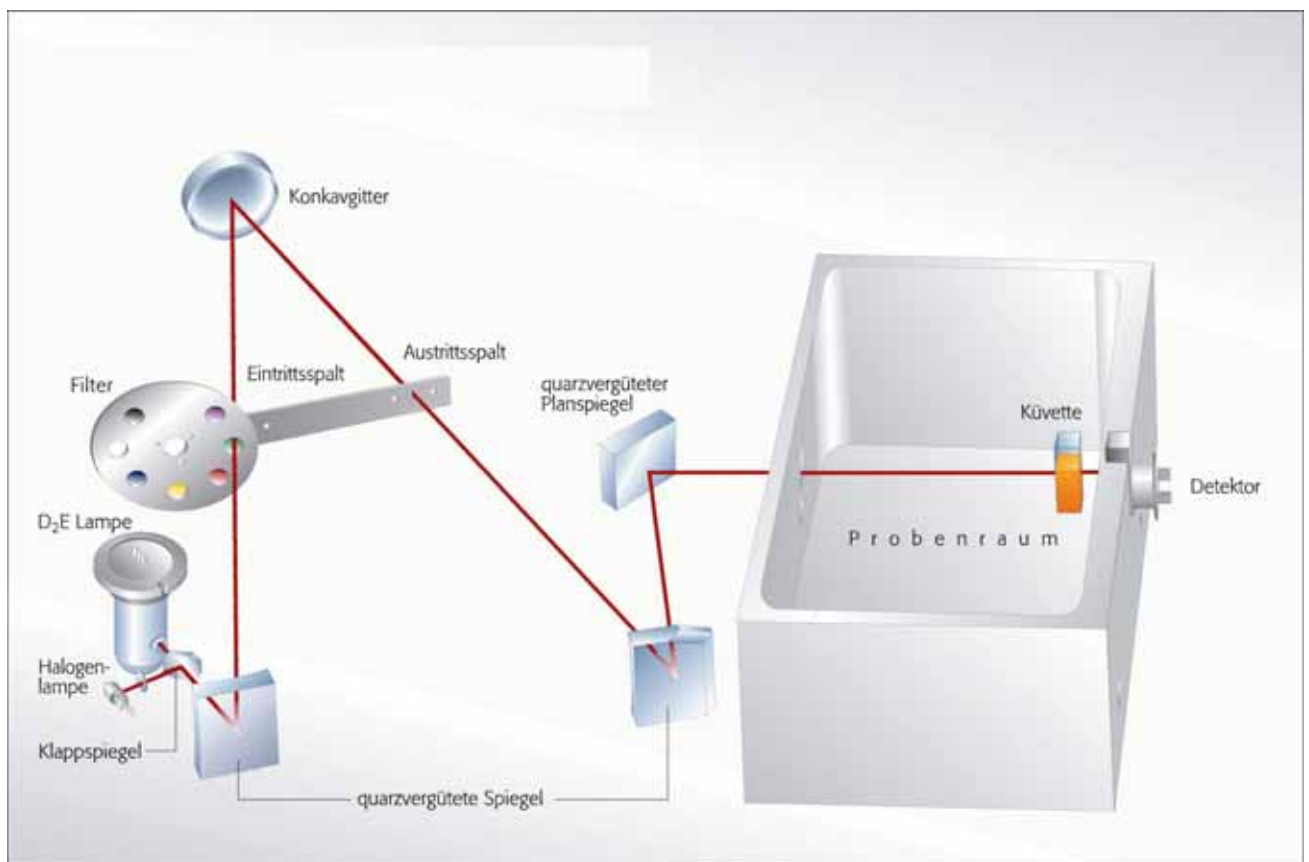
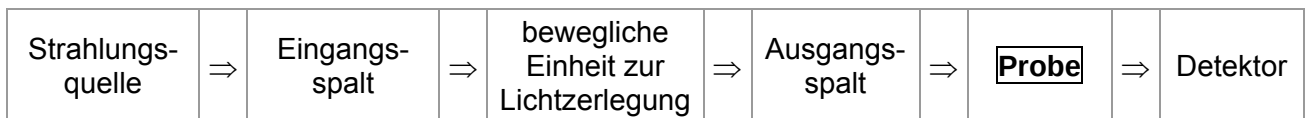


Abbildung 16: Optischer Aufbau eines Monochromatorsystems (z. B. SPECORD® 40)

Eigenschaften

- Austrittsspalt variabel
- Sehr gute Linearität
- Sehr gutes S/N-Verhältnis
- Scannen von Spektren

2.3.2 Polychromatorsystem

Bei Polychromatorsystemen wird die Probe mit dem kompletten Lichtspektrum durchleuchtet. Die Zerlegung des Lichts erfolgt erst danach. Dadurch sind besonders schnelle Spektrenmessungen möglich.

Optischer Aufbau

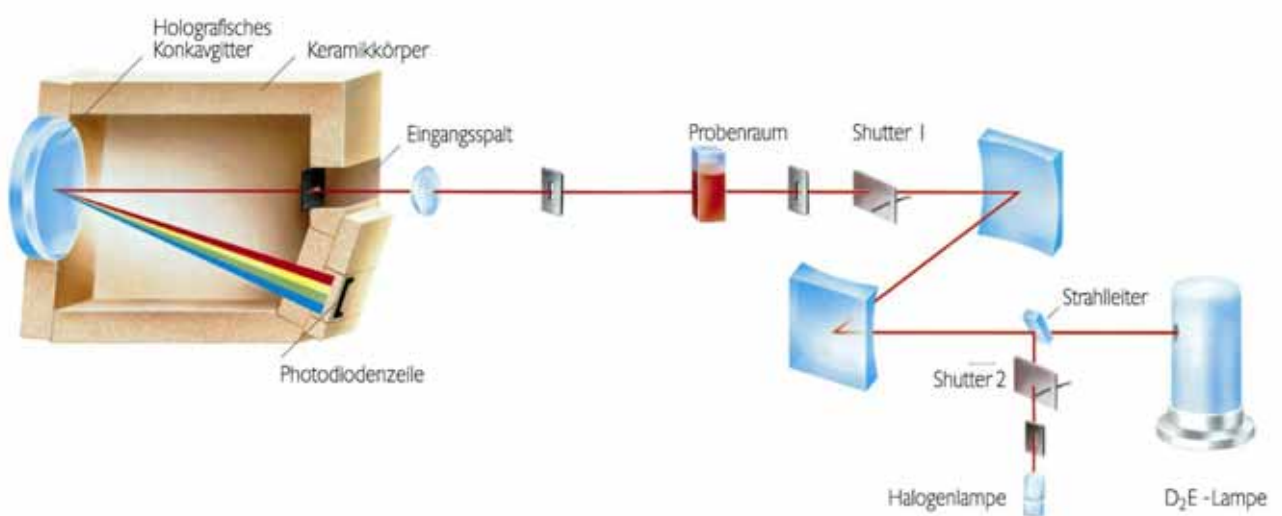
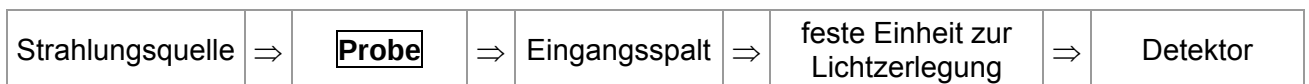


Abbildung 17: Optischer Aufbau eines Polychromatorsystems (z. B. SPECORD® S 600)

Eigenschaften

- Eingangsspalt fest
- Schnelle und simultane Aufnahme von Spektren
- Offener Probenraum
- Sehr gute Wellenlängenreproduzierbarkeit

2.4 Einfluss des Austrittsspalt auf die spektrale Auflösung

Ein bekanntes Beispiel zur Verdeutlichung des Einflusses der Spaltbreite auf die Auflösung ist Toluol, welches im UV-Bereich durch ein feinstrukturiertes Spektrum gekennzeichnet ist. Zur Auswertung wird das Verhältnis zwischen Minima und Maxima bei 266/ 269 nm berechnet. Je größer das Verhältnis ist, um so besser ist die Auflösung und um so kleiner ist der Spalt.

Im Folgenden sind die Spektren eines Toluolstandards in Hexan, aufgenommen mit verschiedenen Spaltbreiten, dargestellt.

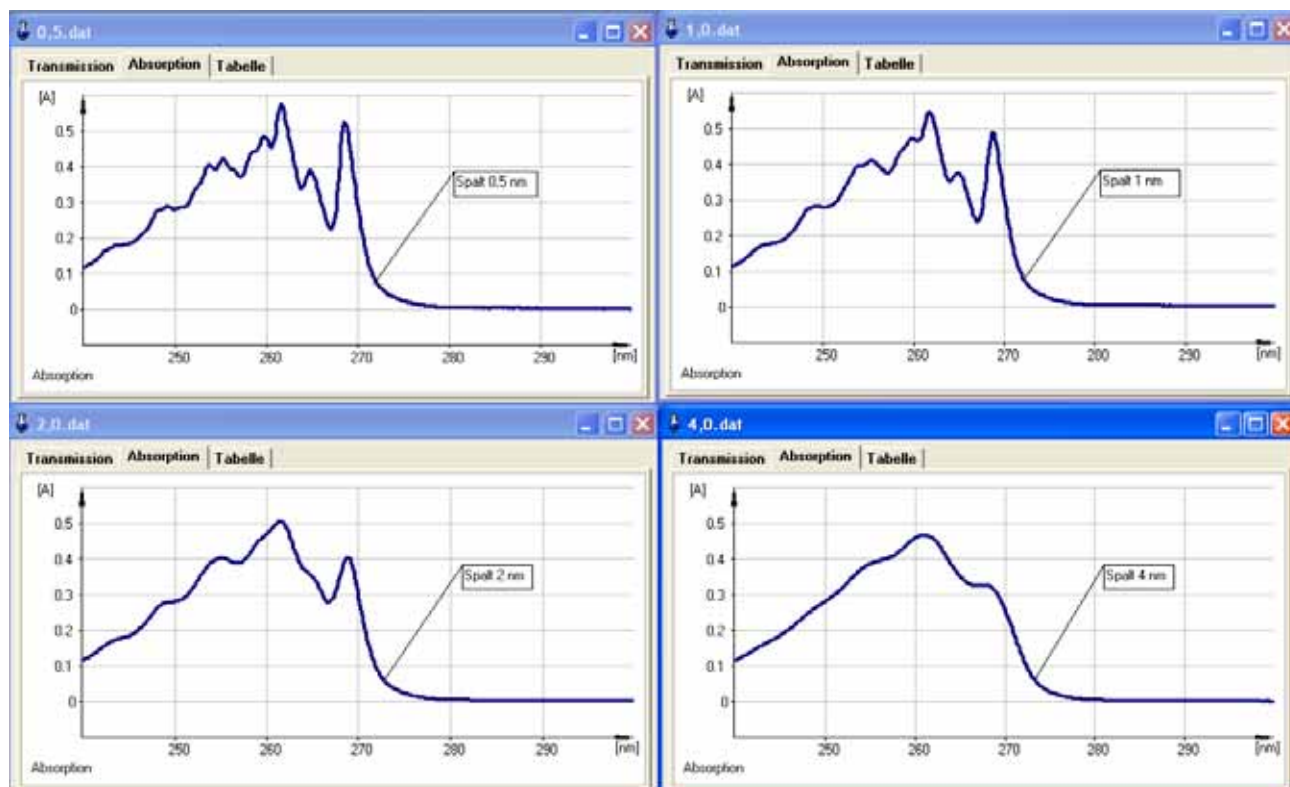


Abbildung 18: Einfluss der Spaltbreite auf die optische Auflösung

Tabelle 5

Spalt	$A_{\text{Minimum}}_{266 \text{ nm}}$	$A_{\text{Maximum}}_{269 \text{ nm}}$	Verhältnis $A_{\text{Maximum}}/A_{\text{Minimum}}$
4 nm	0,3252	0,3265	1,0
2 nm	0,2784	0,4026	1,4
1 nm	0,2384	0,4823	2,0
0,5 nm	0,2244	0,5229	2,3

Mit der Spaltbreite von 0,5 nm kann die Feinstruktur des Toluol-Spektrum deutlich aufgelöst werden. Dies zeigt auch der große Wert für das Verhältnis $A_{\text{Maximum}}/A_{\text{Minimum}}$. Messungen mit einem kleinen Spalt zeigen jedoch auf Grund der niedrigeren Energie, die

auf den Detektor trifft, ein höheres Signal zu Rausch Verhältnis als Messungen mit größerem Spalt. Für Messungen nahe der Nachweisgrenze ist deshalb ein größerer Spalt (z.B. 4 nm) empfehlenswerter. Ist der Austrittspalt größer, trifft mehr Energie auf den Detektor. Das Signal zu Rausch Verhältnis wird somit geringer und Messungen von gering absorbierenden Proben können zuverlässiger durchgeführt werden.

2.5 Probeneinheit

Als Proben kommen hauptsächlich Flüssigkeiten und Lösungen zum Einsatz. Diese werden in Küvetten in den Probenraum des Photometers eingesetzt.

Doch auch Gase und Feststoffe können unter Verwendung von speziellem Zubehör photometrisch vermessen werden.

2.6 Detektor

In UV VIS Spektralphotometern kommen als Detektoren hauptsächlich Photodioden oder Photomultiplier (PMT) zum Einsatz.

	Photodioden	PMT
Vorteile	▪ Großer spektraler Empfindlichkeitsbereich (190 - 1100 nm) ▪ Geringe Anfälligkeit gegen: - Überbelichtung - Äußere mechanische Störungen - Äußere magnet. Störungen ▪ Arbeit im Niederspannungsbereich ▪ Keine zusätzliche Spannungs- oder Stromversorgung	▪ Hohe Empfindlichkeit bis 10^6 A/W ▪ Geringes Rauschen ▪ Großer Dynamikbereich ▪ Große Empfängerfläche bis 50 mm
Nachteile	▪ Empfindlichkeit ca. 0,5 A/W erfordert Nachfolgeverstärkung ▪ Dynamikbereich bei 10^4 - 10^5 ▪ i.a. beschränkte Empfängerfläche (ca. $10 \times 10 \text{ mm}^2$)	▪ Benötigt Spannung bis 1200 V mit Spannungsteiler ▪ Empfindlich gegen Überbelichtung (Zerstörungsgefahr) ▪ Empfindlich gegenüber äußeren mechanischen oder magnetischen Störungen ▪ Eingeschränkter spektraler Empfindlichkeitsbereich (180 - 650 nm, 180 - 900 nm) ▪ relativ teuer (100 → 1000 €) zzgl. Spannungsversorgung (ca. 200 €)

2.7 Ein- und Zweistrahlssysteme

Einstrahl

Einstrahl-Photometer haben ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis, da die Energie nicht in zwei Teilstrahlen aufgespaltet wird.

Split-Beam-Technologie (SBT)

Spektralphotometer mit Referenzstrahltechnologie (Split-Beam-Technologie) kombinieren den hohen Energiedurchsatz eines Einstrahlphotometers mit der Stabilität eines Zweistrahlsystems.

Zweistrahl

Zweistrahl-Photometer zeigen eine bessere Langzeitstabilität, da das Messergebnis immer den aktuellen Vergleich der Energie der beiden Teilstrahlen darstellt und so Drifterscheinungen weitgehend kompensiert werden können.

Außerdem erlauben sie direkt die Kompensation von Veränderungen in der Referenzprobe.

3 Küvetten für die Spektralphotometrie

Die günstigsten Materialien, aus denen Küvetten gefertigt werden, sind Polymer Materialien, meistens Acryl. Die Verwendung dieser Küvetten ist nur oberhalb von 300 nm möglich, da der Kunststoff unterhalb eine starke Eigenabsorption besitzt.

Glasküvetten sind etwas teurer als die Plastikküvetten, besitzen aber eine höhere Lebensdauer und können über mehrere Jahre verwendet werden. Glasküvetten können nicht für Messungen unterhalb von 320 nm verwendet werden.

Quarzküvetten werden aus hochreinem synthetischen Siliziumoxid hergestellt. Sie besitzen die gleiche Lebensdauer wie Glasküvetten, haben aber den Vorteil, dass sie auch im UV Bereich verwendbar sind.

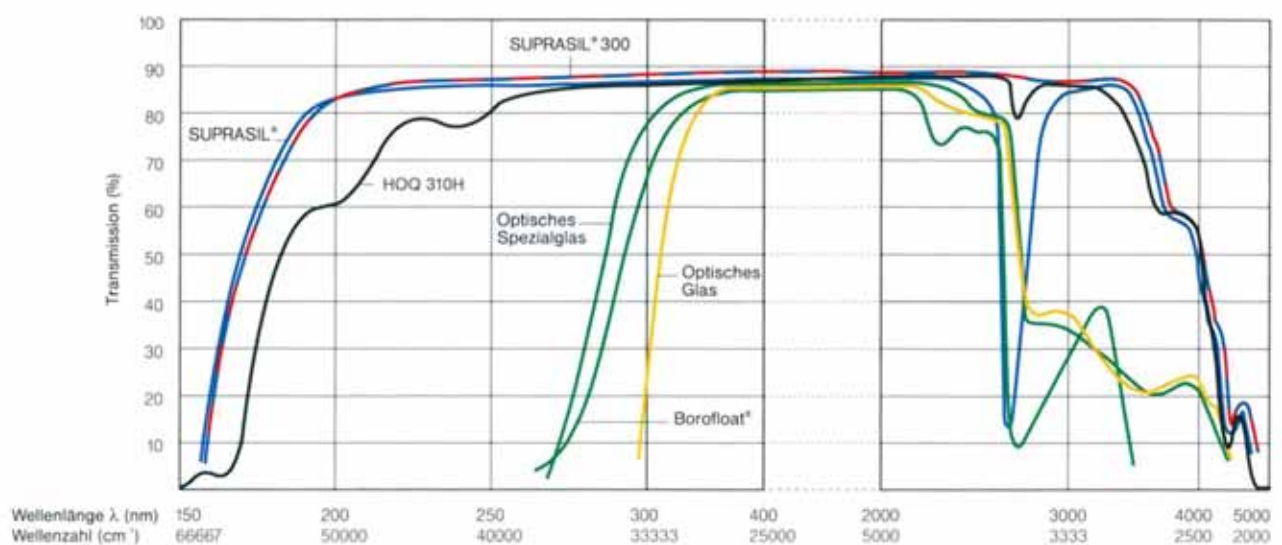


Abbildung 19: Optische Eigenschaften verschiedener Glasmaterialien

Abhängig vom speziellen Verwendungszweck werden verschiedene Arten von Küvetten eingesetzt.

Standardküvetten

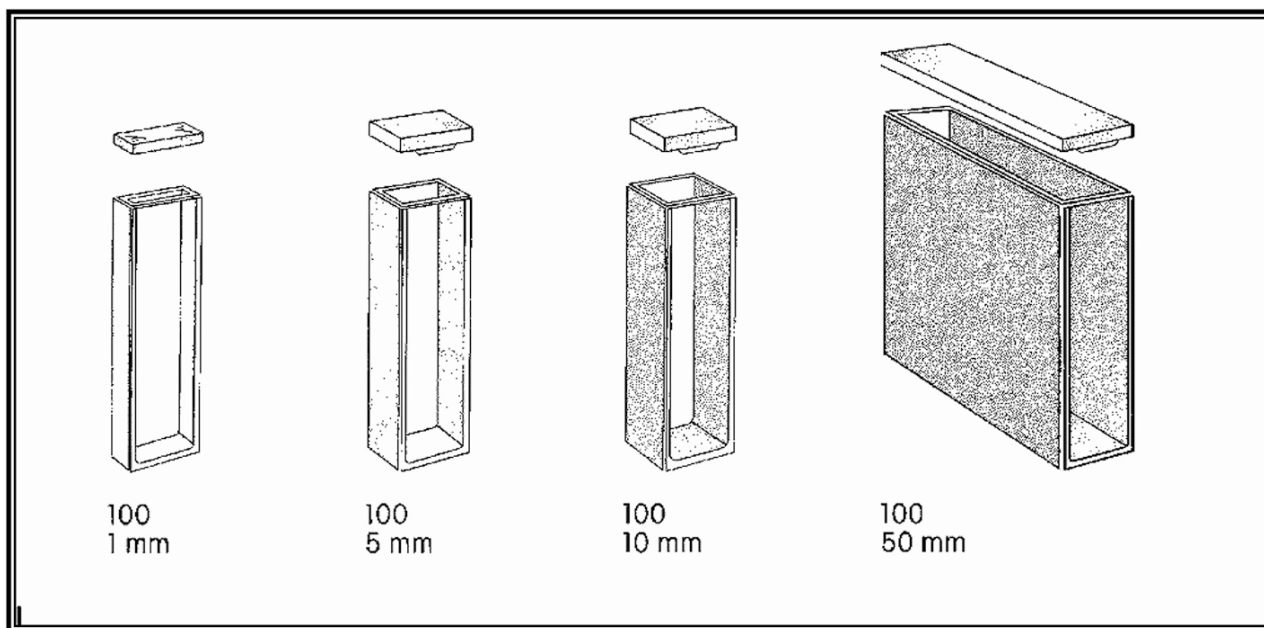


Abbildung 20: Makroküvetten mit unterschiedlichen Schichtdicken

Küvetten für kleine Probevolumina



Halbmikroküvetten

Mikroküvetten

Ultramikroküvetten

Ultramikroküvetten

(10 mm, 1400 µl)

(10 mm, 400 µl)

(ab 180 µl...)

(...bis minimal 5 µl)

Abbildung 21: Halbmikro-, Mikro- und Ultramikroküvetten der Firma Hellma



Traycell

Faseroptische Ultramikromesszelle für Probenvolumen von 0,7 – 5 µl (0,2 oder 1 mm Schichtdicke)

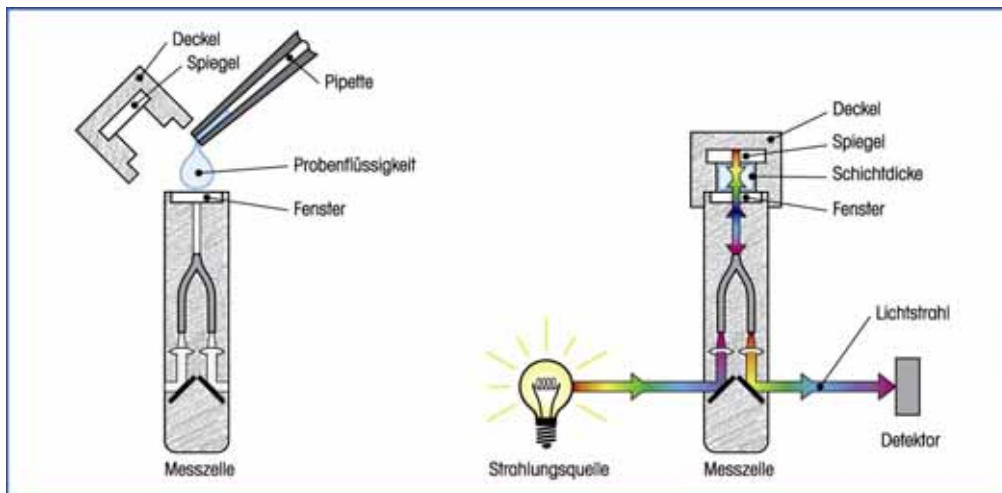


Abbildung 22: Funktionsprinzip der faseroptischen Ultramesszelle Traycell

Durchflussküvetten



Durchfluss-makroküvette

SD 10 mm, 750 µl
SD 50 mm, 3750 µl



Durchfluss-mikroküvette

SD 10 mm, 450 µl
SD 50 mm, 2250 µl



Durchfluss-ultramikroküvette

SD 10 mm, 80 µl
SD 50 mm, 370 µl

Abbildung 23: Verschiedene Durchflussküvetten der Firma Hellma

Absaugküvette



Absaugküvette mit Kunststofftrichter

Küvetten mit losen Fenstern für kleine Schichtdicken



Fensterplatten mit verschiedenen Schichtdicken
(0,01 – 0,5 mm)



Halter für Küvetten mit losen Fenstern

4 Zubehör in der UV VIS Spektroskopie

Für verschiedene Anwendungen können in Spektralphotometern spezielle Zubehöre eingesetzt werden. Ob einfache Halter für feste Proben, verschiedene Küvetten mit Temperierung, Justierung oder Automatisierungseinrichtungen bei hohem Probendurchsatz, für fast jede Applikation steht das passende Zubehör zur Verfügung. Im folgenden werden verschiedene Zubehöre mit Anwendungsbeispielen vorgestellt.

4.1 Überblick Einfach-Küvettenhalter

Halter für Küvetten bis 100 mm	Eine höhere Schichtdicke erhöht die Empfindlichkeit der Messung.	
Schnelltest-Küvettenhalter	Für einfache und schnelle quantitative Analysen geeignet. Die Chemikalien sind in den Rundküvetten vorgelegt bzw. zugabefertig. Nach der Reaktion kann die Rundküvette direkt im Photometer gemessen werden.	
Halter für Absorptionsrohre	Für gasförmige Proben geeignet.	
Temperierbare Küvettenhalter mit und ohne Rührer	Für Enzymkinetiken z. B. bei 37 °C geeignet. Die Temperierung erfolgt mittels externem Wasserbad.	
Justierbare Küvettenhalter für Mikroküvetten	Für kleine Probenvolumina bei Verwendung von Mikro- und Ultra-Mikroküvetten geeignet.	

Peltiertemperierbarer Küvettenhalter mit Kontrolleinheit PTC 100	Für sehr genaue Temperierungen bei Enzymkinetiken oder DNA – Schmelzpunktbestimmungen geeignet.	
--	---	---

4.1.1 Applikation: Bestimmung von Calcium in Milch mittels Schnelltestküvetten

Methode

Photometrische Bestimmung mit Glyoxal-bis(2-hydroxyanil) nach Carrez-Klärung und Aufschluss

Reagenzien

Spectroquant® Calcium-Test, Fa. Merck, Art. 1.14815.0001

Bioquant® Carrez, Fa. Merck, Art. 1.10537.0001

Natronlauge 1 mol/l, Fa. Merck, Art. 1.09137.0001

Neutralit®-Indikatorstäbchen pH 5-10, Fa. Merck, Art. 1.09533.0001

Oxisolv® Aufschlussreagenz, Fa. Merck, Art. 1.12936.0030

Aufschluss-Basisset, Fa. Merck, Art. 1.14613.0001

Mikrowellen-Aufschlussgerät MW 500, Fa. Merck, Art. 1.14672.0001

Wasser z.A., Fa. Merck, Art. 1.16754.9010

Probenvorbereitung

5 ml Milch werden unter Rühren mit je 5 ml Carrez-1- und -2-Lösung versetzt. Der entstehende dicke Brei wird mit etwas Wasser zur Analyse verdünnt und anschließend mit Natronlauge 1 mol/l auf einen pH-Wert von 7,5 - 8,0 gebracht (Prüfung mit Neutralit®-Indikatorstäbchen pH 5-10). Anschließend wird die Mischung mit Wasser zur Analyse in einen 250 ml-Messkolben überführt und bis zur Marke aufgefüllt. Nach guter Durchmischung werden die ungelösten Anteile durch ein Faltenfilter abfiltriert und 10 ml des Filtrates mit 500 mg (= 5 Dosierlöffel) Oxisolv® im Aufschlussgefäß vermischt. Das verschlossene Gefäß wird 65 s mit 500 Watt Mikrowellenleistung erhitzt. Nach 5 min Abkühlzeit wird das Aufschlussgefäß gut umgeschüttelt und geöffnet. Die Lösung kann zur Bestimmung von Calcium eingesetzt werden.

Analyse

Die Bestimmung erfolgt mittels des oben genannten Testsatzes bei 550 nm.

Berechnung

Calcium-Gehalt in mg/l = Analysenwert in mg/l x 50

4.1.2 Applikation: DNA-Analyse in Mikrokleinküvetten und justierbarem Küvettenhalter

Besonders bei biologischen Proben ist es oft der Fall, dass nur ein kleines Probenvolumen von lediglich ein paar Mikrolitern zur Verfügung steht, da Probenmaterial oft sehr teuer ist. Aus diesem Grund werden Semimikro- oder Mikroküvetten zur Durchführung von photometrischen Analysen eingesetzt. Im Photometer wird dafür ein justierbarer Küvettenhalter verwendet, um zuverlässige Messungen durchzuführen. Er sorgt dafür, dass der Messstrahl auf dem optimalen Weg durch die Probenküvette geführt wird.

Zur Bestimmung der DNA Konzentration wurde die Absorption bei 260 nm gegen extrem reines Wasser als Referenz gemessen. Zur Berechnung der Konzentration für die Messung in einer Küvette mit einem Lichtweg von 1 cm wird der Faktor 50 für die Doppelstrang-DNA (ds [double-stranded] DNA), ein Faktor von 33 für die Einzelstrang-DNA (ss [single-stranded] DNA) und ein Faktor von 40 für die RNA in die folgende Gleichung eingesetzt:

$$\text{Konzentration [ng/}\mu\text{l]} = A(260) * \text{Faktor}$$

Im folgenden Beispiel wurde DANN bei einer Schichtdicke von 0,1 cm (Faktor = 500) vermessen. Die Konzentration der ds-DNA wurde anhand der obigen Gleichung bestimmt und ist in der folgenden Tabelle 6 aufgelistet:

Tabelle 6

Absorption	Konzentration [ng/μL]	Standardabweichung [ng/μL]
0,007	3,50	0,50
0,017	8,50	1,00
0,033	16,67	0,29
0,074	37,17	2,02
0,150	75,17	1,76
0,290	145,17	2,36
0,601	300,33	7,18
1,161	580,50	9,64
2,154	1076,83	13,29

4.2 Messen im Durchfluss

Sippersystem	Für den Einsatz von Durchflussküvetten geeignet.	
APG	Automatischer Probengeber in Kombination mit dem Sippersystem	

4.2.1 Applikation: Quantitative Phosphatbestimmung mit Durchflussküvette

Einleitung

Die Phosphatbestimmung ist eine häufig angewendete Methode in der Wasser- und Abwasseranalytik. Hervorgerufen durch die Einleitung von Abwässern und Einwaschung von Düngemittelrückständen der Landwirtschaft können besonders Oberflächengewässer einen relativ hohen Phosphatgehalt aufweisen.

Zur quantitativen Bestimmung von Phosphat wird ein Reaktionsgemisch aus Ammoniummolybdat, Kaliumantimon(III)-oxidentartrat und Ascorbinsäure zur Probe gegeben. Als Standardlösung wird Kaliumhydrogenphosphat verwendet.

Zur Durchführung einer quantitativen Analyse gehört die Kalibration mit Standardlösungen und die anschließende Konzentrationsmessung der Proben. In der Routine werden für diese Bestimmungen oft Durchflussküvetten verwendet, um den Aufwand so gering wie möglich zu halten. Um mit diesen Küvetten arbeiten zu können ist ein spezielles Zubehör, das Sippersystem, notwendig. Dieses System beinhaltet eine justierbare Halterung für 1, 2 oder 5 cm Durchflussküvetten sowie eine Pumpeinheit, die den Durchfluss ermöglicht. Die folgende Abbildung zeigt schematisch die Funktionsweise des Sippersystems.

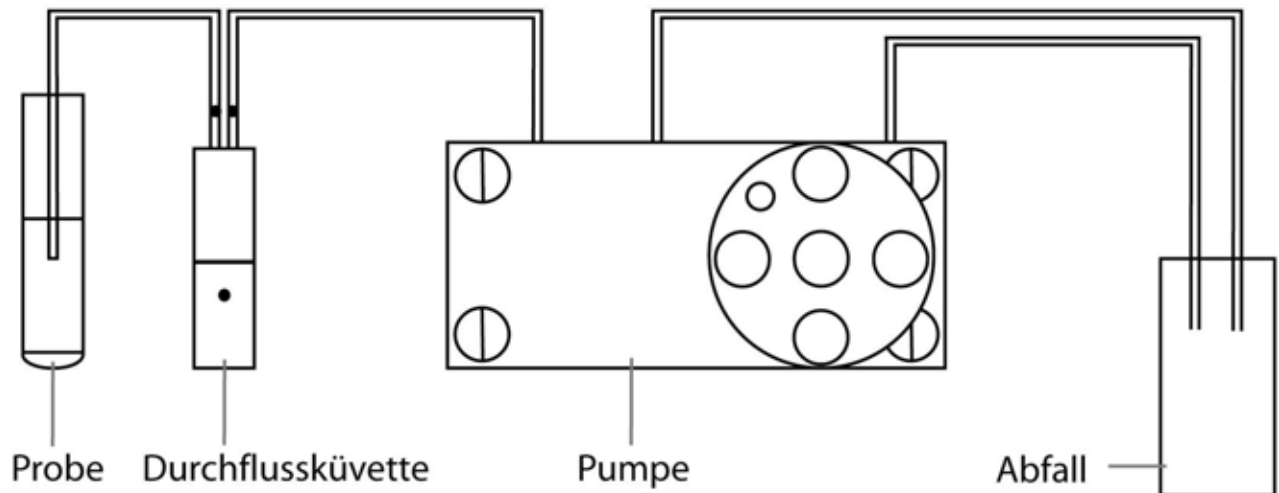


Abbildung 24: Funktionsprinzip des Sippersystems

Probenvorbereitung

Zur Herstellung des Reaktionsgemisches sind folgende Lösungen herzustellen:

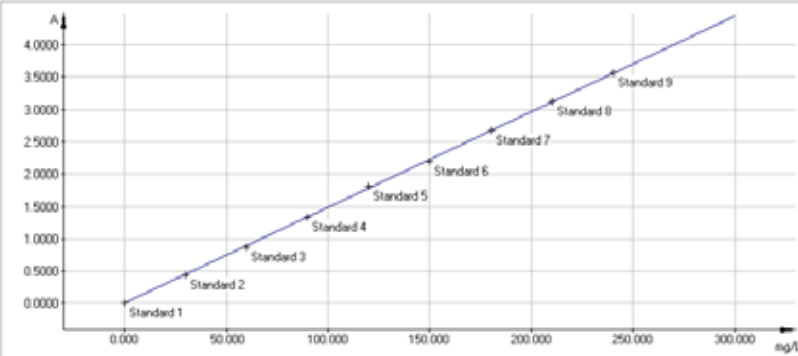
- Lösung 1: 40 g Ammoniummolybdat in 1 l Wasser (dest. aqua) lösen
- Lösung 2: 2,6 g L(+)-Ascorbinsäure in 150 ml Wasser (dest. aqua) lösen
- Lösung 3: 2,7 g Kaliumantimon (III)-oxidtartrat in 1 l Wasser (dest. aqua) lösen
- Lösung 4: 25%ige H_2SO_4

Für die Reaktionslösung werden 250 ml Lösung 4, 75 ml Lösung 1, 150 ml Lösung 2 und 25 ml Lösung 3 miteinander gemischt. Die Reaktionslösung sowie die Lösung 2 sollten täglich frisch angesetzt werden.

40 μl der Probe bzw. Standards werden in einen 50 ml Kolben gegeben, mit 8 ml des Reaktionsgemisches versetzt und auf 50 ml aufgefüllt. Nach 10 Minuten wird die Absorption bei 700 nm gemessen.

Parametereinstellungen

Kalibration

Bezeichnung	Phosphat	Coefficients of regression curve $y = B \cdot x$ A = 0.0000 B = 0.0149 C = 0.0000 Coefficient of determination R² (adjust) = 0.9998 
Zyklus	Kein	
Anzeige	Absorption	
Korrektur	Referenz	
Lampenwechsel	320 nm	
Messmodus	Wellenlängen	
Wellenlängen	700 nm	
Integrationszeit [s]	0.2	
Zubehör	Sipper	
Pumpzeit [s]	30	

4.3 Küvettenwechsler

6 fach Küvettenwechsler	Für 1, 2 oder 5 cm Küvetten, mit Wasser-, Peltier oder ohne Temperierung, mit und ohne Rührer	
Küvettenkarussell	Mit 15 Positionen für 1 cm Küvetten	
8 fach Küvettenwechsler	Mit Wasser-, Peltier- oder ohne Temperierung wahlweise mit und ohne Rührer kann in Zweistrahlphotome- tern als 2 x 8 fach Kombina- tion eingesetzt werden	
Küvettenkette	Für sehr hohen Probendurchsatz mit 50 Positionen für 1 cm Küvetten	

4.3.1 Applikation: Enzymkinetik mit Küvettenwechsler

Einleitung

Bei Kinetikmessungen wird die zeitliche Änderung der Konzentration eines Reaktionspartners mit photometrischen Eigenschaften durch Messung an einer Wellenlänge in kurzen Zeitabständen über eine längere Zeit bestimmt. Die Änderung der Absorption in einer bestimmten Zeitspanne entspricht der Geschwindigkeit der Reaktion. Durch Einsatz eines Küvettenwechslers können mehrere Kinetikmessungen gleichzeitig durchgeführt werden.

Betriebsarten der Küvettenwechsler

Für den Betrieb des Probenwechslers gibt es neben dem normalen Betrieb auch noch die Betriebsart *langsamer Zeitzyklus*.

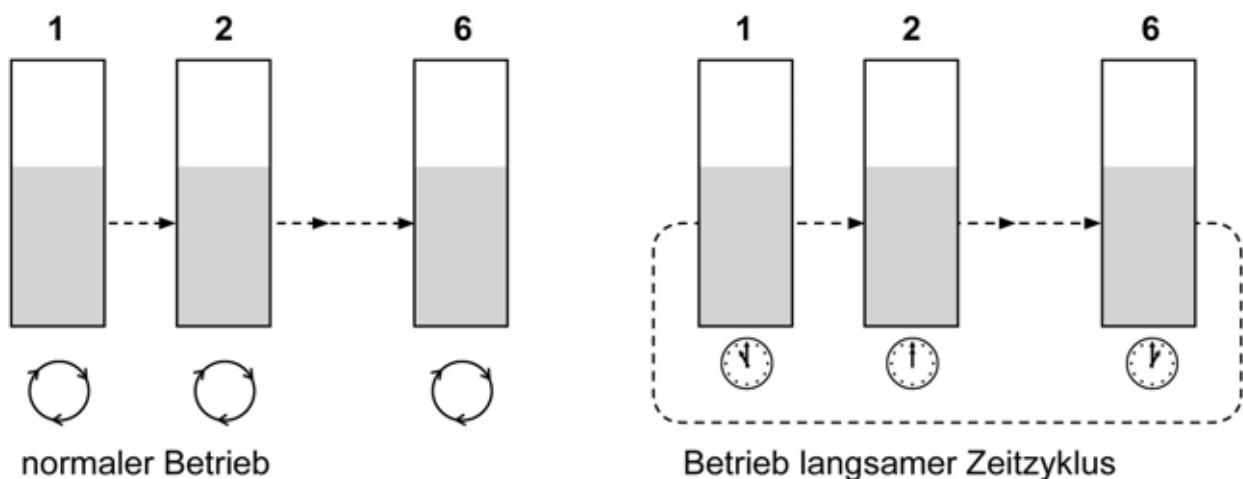


Abbildung 25: Betriebsmöglichkeiten der Küvettenwechsler

Im normalen Betrieb wird die gesamte Messung der Probe einer Position ausgeführt, bevor die Messung in der nächsten Probe beginnt. Für eine Kinetikmessung bedeutet das, dass die gesamte reaktionskinetische Messung in einer Probe ausgeführt wird, bevor die nächste Reaktionskinetik startet.

Bei langen Kinetikmessungen kann man hingegen die Messung optimieren und die Messung der Proben zeitgestaffelt zyklisch ausführen. Bei der Betriebsart langsame Kinetik werden die Proben, beginnend mit der Position der ersten Probe, in jedem Zyklus nacheinander gemessen, bevor der nächste Zyklus beginnt.

Anwendungsbeispiel

Im folgenden Beispiel ist die kinetische Reaktion von Laktat mit Laktatdehydrogenase und NAD in Glyzinpuffer dargestellt. Dabei wurden ein Blindwert und drei verschiedene Konzentrationen Laktat gemessen. Die Messung erfolgte bei 340 nm. Bei einer Gesamtmesszeit von 10 Minuten wurde alle 30 Sekunden ein Messpunkt aufgenommen. Die Referenzmessung wurde in der ersten Position des Küvettenwechslers gegen eine leere Küvette durchgeführt. Nach dem Ende der Messung erscheint im Fenster automatisch die Probestabelle sowie die überlagerten Kinetikkurven im Diagrammformat.

Probe	Beginn	Ende	Faktor	Anstieg	R ² adjust	Ergebnis
Blindprobe	5	30	1	0,0001	0,9994	0,0001
Konz 1	5	30	1	0,0003	0,9994	0,0003
Konz 2	5	30	1	0,0015	0,9988	0,0015
Konz 3	5	30	1	0,0026	0,9984	0,0026

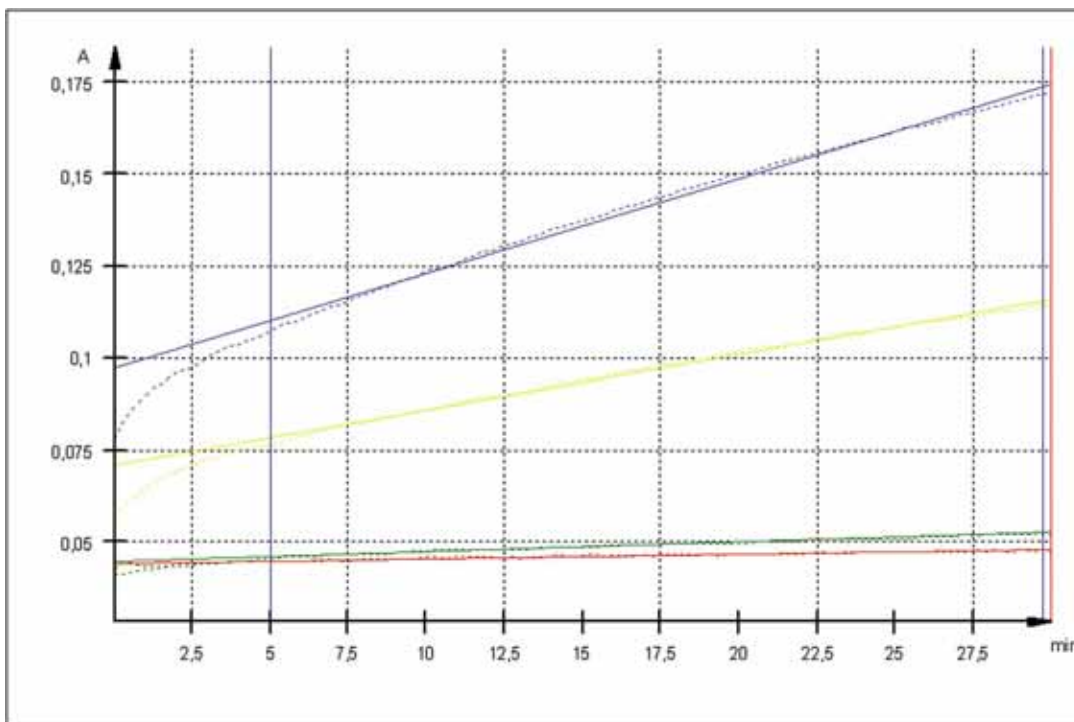
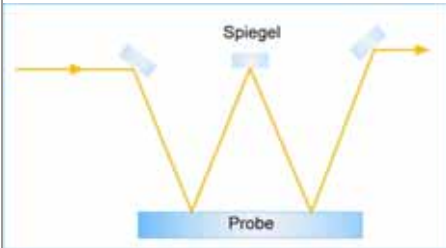
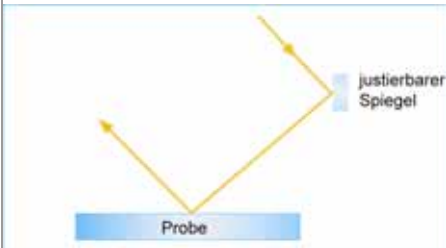
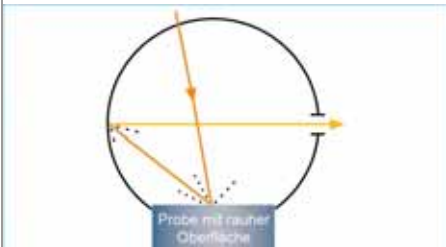


Abbildung 26: Ergebnisdarstellung einer Kinetischen Messung mit Küvettenwechsler

Zur Berechnung des Anstieges kann ein frei wählbarer Bereich ausgewählt werden. Der Anstieg kann zusätzlich mit einem Faktor multipliziert werden. R² adjust gibt das Bestimmtheitsmaß der angelegten Geraden und somit die Genauigkeit an.

4.4 Zubehör für das Messen von festen Proben

4.4.1 Halter für feste Proben und Reflexionsmesseinsätze

Feststoffhalter	Für Transmissionsmessung von festen Proben (z.B. Gläsern)		
Absoluter Reflexionsgrad		Bestimmung des Reflexionsgrades an glatten Oberflächen	
Reflexionsmeseinsatz mit variablem Winkel		Reflexionsmessung an glatten Oberflächen, Schichtdickenmessung	
Remissionsmessungen mit der Photometerkugel		Diffuse Reflexion von Pulvern oder Feststoffen mit rauher Oberfläche, diffuse Transmissionsmessung	

4.4.2 Applikation: Schichtdickenbestimmung durch Transmissionsmessung mit dem SPECORD®

Für die Transmissionsmessung eines beschichteten Objektträgers wurden folgende Parametereinstellungen vorgenommen:

Zyklus:	Kein	Messmodus:	Schrittbetrieb
Korrektur:	Referenz	Bereich [nm]:	350 - 700
Anzeige:	Transmission	Schrittweite [nm]:	0,2
Lampenwechsel:	320 nm	Integrationszeit [s]:	0,2
Spalt:	0,5 nm	Zubehör	Kein

Die Referenzmessung wurde gegen Luft beziehungsweise gegen einen unbeschichteten Objektträger durchgeführt.

In beiden Fällen zeigen die Transmissionsspektren ein Interferenzmuster ab ca. 535 nm. Im folgenden sind die beiden Spektren in dem relevanten Bereich zwischen 530 und 700 nm dargestellt.

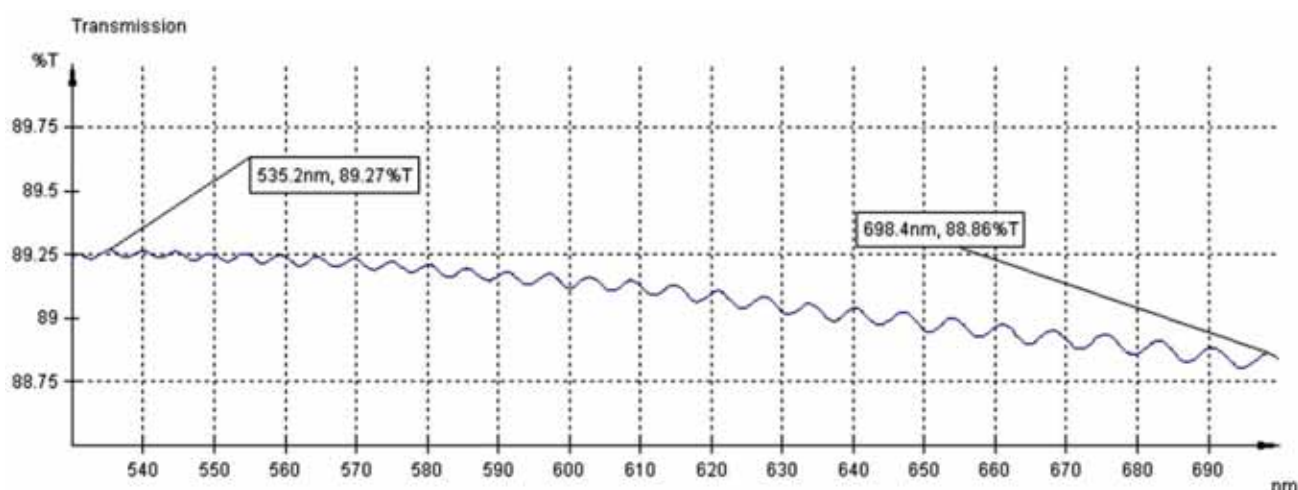


Abbildung 27: Transmissionsspektrum einer beschichteten Probe gegen Luft (geglättet mit 25 Stützstellen)

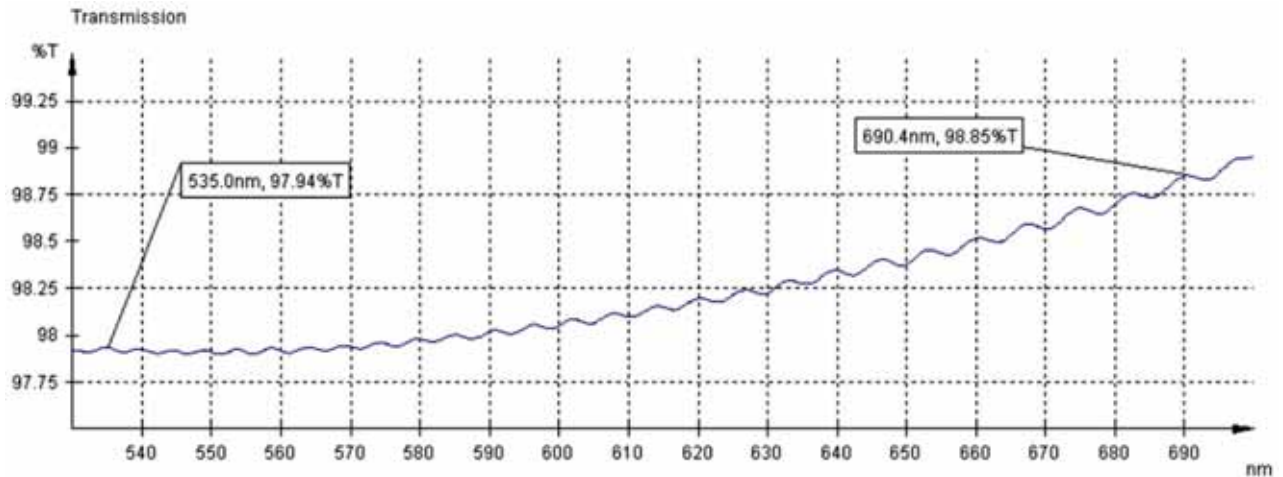


Abbildung 28: Transmissionsspektrum einer beschichteten Probe gegen einen unbeschichteten Objektträger (geglättet mit 25 Stützstellen)

Auf Grund von Transmissionsverlusten des unbeschichteten Objektträgers, werden mit einer Referenzmessung gegen Luft andere Transmissionswerte ermittelt als bei einer Referenzmessung gegen den unbeschichteten Objektträger. Das interessante Interferenzspektrum bleibt jedoch erhalten und ist ausschließlich in dem Probenspektrum zu verzeichnen.

Nach Gleichung 8 kann mit einer speziellen Software aus den gemessenen Spektren die Schichtdicke ermittelt werden.

	Probe gegen Luft	Probe gegen Referenzobjektträger
m	27	26
λ_1 [nm]	535,0	698,4
λ_2 [nm]	535,2	690,4
n	1,5	1,5
Θ	0	0
d [μm]	20,6	20,6

4.4.3 Applikation: Bestimmung des Weißgrades von Zahnoberflächen mit der Ulbrichtkugel

Einleitung

Die Ulbrichtkugel (Integrationskugel) eignet sich hervorragend für Transmissions- und Remissionsmessungen von festen und flüssigen Proben sowie von Pulverproben. In der folgenden Applikation wird eine Methode zur Analyse von Zahnoberflächen sowie deren Auswertung beschrieben. Als Ergebnis erhält man das jeweilige Reflexionsspektrum, aus dem der Weiß- und Gelbindex berechnet werden kann. Der Weiß-Index (Weißgrad) soll den Grad der Ähnlichkeit der Farbe zum idealen Weiß, der Gelbindex die Abwesenheit eines Bunt- oder Grautones einer Farbe (DIN 6167) beschreiben.

Durchführung

Die Ulbrichtkugel kann zusammen mit dem SPECORD® eingesetzt werden. Die folgenden Parameter sind für die Bestimmung verschiedener Zahnproben verwendet worden:

Spektrum	380 – 780 nm
Modus	Registrieren
Anzeige	Reflexion
Integrationszeit	0.10 s
Schrittweite	1 nm
Geschwindigkeit	10 nm/s
Zubehör	Integrationskugel
Zyklus	Kein
Spaltbreite	4 nm

Ergebnisse

Für die Zahnproben A, B und C wurden folgende Spektren aufgenommen:

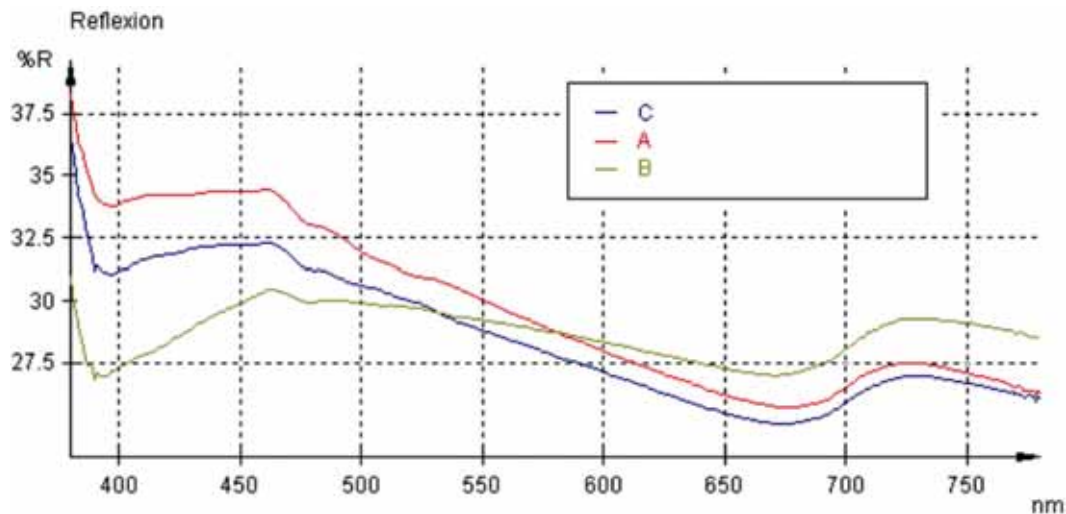


Abbildung 29: Reflexionsspektren der Zahnproben gemessen mit der Photometerkugel

Auswertung

Die Auswertung wurde mit Hilfe der Farbsoftware der Analytik Jena AG durchgeführt. Diese Software bietet die Möglichkeit den Weiß/Gelb-Index zu berechnen. Zur Charakterisierung der Zahnproben wurde folgende Berechnungsformel mit einem Beobachtungswinkel von 10° und dem Lichtmodell D65 (dem natürlichen Licht entsprechend) verwendet.

Weiß/Gelb-Index (ASTM-Berechnung: E 313-67):

$\text{Weiß} = 4 \cdot B - 3 \cdot Y$, $\text{Gelb} = 100 \cdot (1 - B/Y)$ mit $B = 0.8475 \cdot Z$

Y und Z sind jeweils die CIE-Normfarbwertanteile in den Farbsystemen.

Tabelle 7

Probe	Weißgrad	Gelbindex
A	46.53	-14.13
B	31.66	-2.25
C	41.62	-11.36

Aus den erfassten Weiß- und Gelbindices in der Tabelle 7 und aus den o.g. Spektren können die verschiedenen polierten Zahnproben eindeutig unterschieden werden. Die Methode kann sehr gut zur Bestimmung der Zahnoberflächen angewendet werden.

Ähnliche Anwendungen sind Bestimmungen des Weißgrades von Textilien, Papier oder anderen Materialien.

4.4.4 Applikation: Charakterisierung von Sonnencreme

Charakterisierung der UVA-Schutzwirkung

Bis vor kurzem gab es in Europa keine anerkannte Methode für die Bestimmung der UVA-Strahlung. Deswegen haben viele Hersteller von Sonnenschutzmitteln den Australischen Standard 2604:98 verwendet. Die Australische Norm gilt als erfüllt, wenn die Transmission der UVA-Strahlung im Bereich von 320 bis 360 nm durch die Sonnenschutzmittel mindestens um 90% reduziert wird. Wenn die Transmission in diesem Bereich in irgend einem Punkt darüber liegt, wird die Norm nicht erfüllt. Seit 2004 gibt es jedoch die DIN-Norm 67502 für die Charakterisierung der UVA-Schutzwirkung. UVA-Schutz wird hier als UVA-Bilanz berechnet, und gibt daher eine bessere Differenzierung der UVA-Schutzleistung.

Geräte und Materialien

Es wurden 6 unterschiedliche Sonnenschutzmittel, die auf dem europäischen Markt erhältlich sind, untersucht. Die vom Hersteller angegebenen Lichtschutzfaktor (LSF) und die UV-Filtersysteme, die in den Schutzmitteln verwendet worden sind, werden in der folgenden Tabelle 8 dargestellt. Dabei handelt es sich ausschließlich um Öl-in-Wasser-Emulsionen.

Tabelle 8

Probennummer	Typ	angegebener LSF	UV-Filtersystem
1	Sonnenmilch	6	Octyl Methoxycinnamate Phenylbenzimidazole Sulphonic Acid
2	Sonnenmilch	12	Ethylhexyl Methoxycinnamate Octocrylene Buthyl Methoxydibenzoylmethane
3	Sonnenmilch	15	Ethylhexyl Methoxycinnamate Octocrylene Buthyl Methoxydibenzoylmethane
4	Sonnenspray	15	Ethylhexyl Methoxycinnamate Octocrylene Buthyl Methoxydibenzoylmethane
5	Sonnencreme	20	Ethylhexyl Methoxycinnamate Octocrylene Buthyl Methoxydibenzoylmethane
6	Sonnencreme	30	Octocrylene Zinc oxide Ethylhexyl Methoxycinnamate Phenylbenzimidazole Sulphonic Acid

Fast alle untersuchten Sonnenschutzmittel haben mindestens ein UVB- und ein UVA-Filtersystem. Probe 1 dagegen enthält nur UVB Filter und ist daher keine repräsentative Probe des europäischen Marktes.

Für die Untersuchungen der Sonnenschutzmittel wurde das SPECORD[®] und als Zubehör eine Integrationskugel (Ulbrichtkugel) eingesetzt. Die Kugel mit einem Kugeldurchmesser von 75 mm besteht aus zwei Spektral[®] – Halbkugeln mit Öffnungen zum Strahlungsein- und -austritt, einer Strahlumlenkoptik und Halterungen für Proben und Küvetten für Transmissions- und Remissionsmessungen. Spektral[®] ist ein teflonartiger Kunststoff mit sehr hohem Reflexionsvermögen über einen weiten Spektralbereich. Die Integrationskugel bewirkt eine gleichmäßige Ausleuchtung der Empfängerfläche im Spektrometer, unabhängig von einer Beeinflussung (Streuung, Ablenkung) des Strahls durch die Probe. Dadurch wird die Richtigkeit der Messergebnisse verbessert. Für feste transparente Proben großer Schichtdicke ist die Messung mit Integrationskugel die einzige Möglichkeit, den sonst durch die Strahlbeeinflussung verursachten systematischen Messfehler zu vermeiden.

Durchführung

Als Probenträger wurde eine Platte aus Quarz ausgewählt. Der unbeschichtete Probenträger wurde zuerst gewogen. Die Produkte wurden dann über die Quarzplatte gleichmäßig in mehreren Punkten in einer Menge von $0,75 \text{ mg/cm}^2$ aufgetragen. Die Proben wurden anschließend mit einem puderfreien Latexlaborhandschuh, der vorher mit der Probe ca. 1 min lang gesättigt worden ist, gleichmäßig auf der Quarzplatte verteilt. Die Platte wurde nochmals zur Kontrolle ausgewogen. Die Proben wurden erst nach einer Equilibrierzeit von 15 min gemessen. Dieser Prozess wurde für jede Probe zweimal durchgeführt und die Einzelmessungen wurde zweimal in unterschiedlichen Positionen wiederholt. Die Transmissionsmessung wurde im SPECORD[®] im Bereich von 290 bis 400 nm durchgeführt. Als Referenzmessung wurde eine leere Quarzplatte verwendet. Man kann als Referenz auch Glycerin auf die Platte verteilen und so Referenzmessungen durchführen.

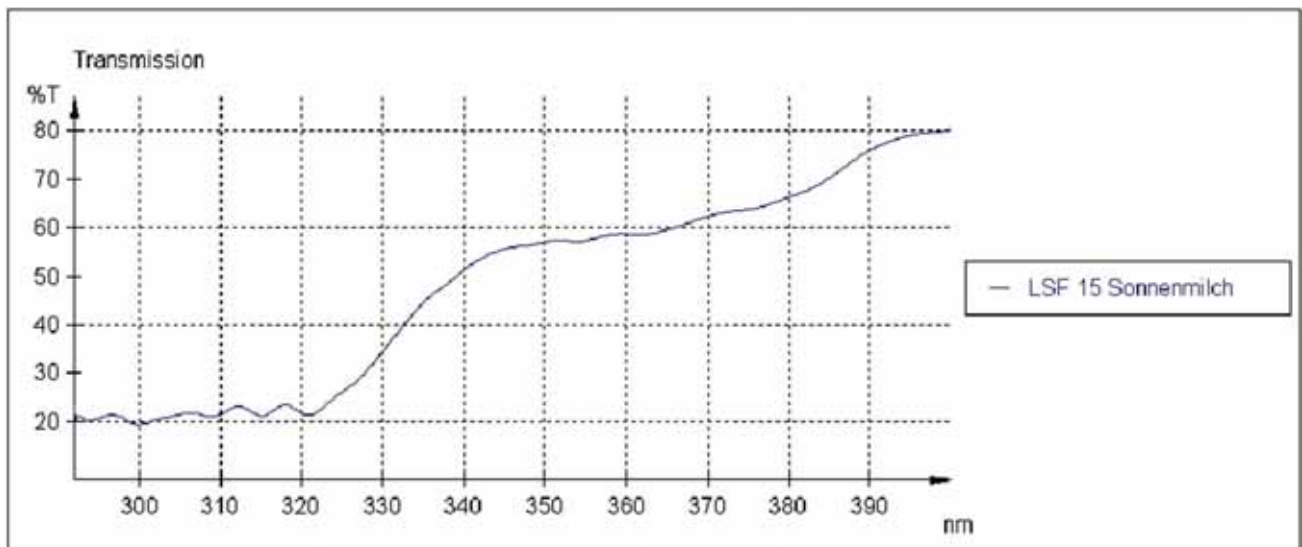


Abbildung 30: Transmissionsspektrum der Sonnenmilch 3 mit LSF 15

Ergebnis und Diskussion

Die Messmethode ließ sich auf alle Produkte problemlos anwenden. Als ein Beispiel wurde das Transmissionsspektrum der Probe 3 dargestellt. Es wurde festgestellt, dass alle Proben die Strahlung im Transmissionsspektrum zwischen 320 und 360 nm um 60% reduzierten. Lediglich bei Probe 1 war mit LSF 6 die Transmission stärker. Auf der Packung der Probe 1 stand jedoch keine Angabe, dass bei diesem Mittel die UVA-Strahlung nach international anerkanntem Australischen Standard 2604 geprüft wurde. Nach Auswertung der Spektren ist nicht auszuschließen, dass höhere Schutzfaktoren auch höheren UVA-Schutz haben. Es gibt keine Korrelation von UVA-Schutz und LSF. Mit steigendem LSF ist bei manchen Proben der UVA-Schutz gleich geblieben ohne die Norm zu verletzen. Außerdem wurde beobachtet, dass die Sonnenschutzmittel mit dem selben LSF 15 (Probe 3 und Probe 4) unterschiedlichen UVA-Schutz aufweisen. Eine bessere Differenzierung zwischen den Sonnenschutzmitteln könnte durch Anwendung der DIN 67502 möglich sein.

4.5 Messsonden

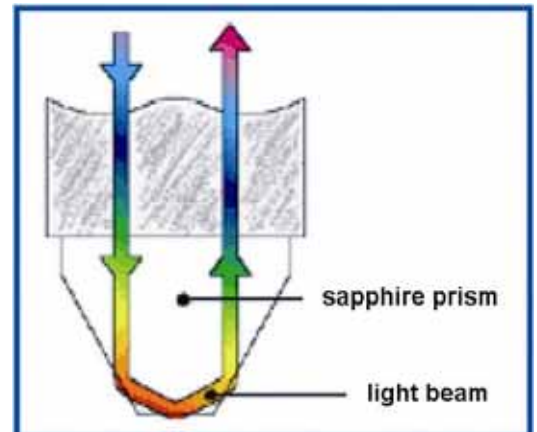
- Lichtleiter mit optionaler Messsonde
- für Onlinemessungen außerhalb des Photometers



4.5.1 Applikation: Farbstoffmessung mit der ATR-Sonde

Einleitung

Mit ATR-Sonden können die Absorptionseigenschaften optisch dichter Medien analysiert werden. Das Prinzip der ATR-Sonden (Abgeschwächte Total Reflexion) beruht auf unterschiedlichen Brechzahlen des ATR-Kristalls (große Brechzahl) und der Probe (kleine Brechzahl). Der Lichtstrahl wird auf der Grenzfläche zwischen ATR-Kristall und Probe total reflektiert. Ein Teil des Lichtstrahls dringt in geringer Tiefe in die Probe ein und kann absorbiert werden. Das total reflektierte Licht wird dadurch geschwächt. Als Ergebnis erhält man das Absorptions- oder Transmissionsspektrum der Probe.



Durchführung

Die ATR-Sonde kann zusammen mit dem SPECORD® eingesetzt werden. Das Licht wird dabei über einen Lichtleiteradapter in die Lichtleiter eingekoppelt und gelangt zur Sonde. Das geschwächte Licht gelangt über einen zweiten Lichtleiter wieder zum Photometer und wird detektiert.

Für die Bestimmung verschiedener Farbstoffe wurden mit dem SPECORD® Absorptionsspektren zwischen 370 und 800 nm aufgenommen.



Ergebnisse

Folgende Spektren wurden aufgenommen:

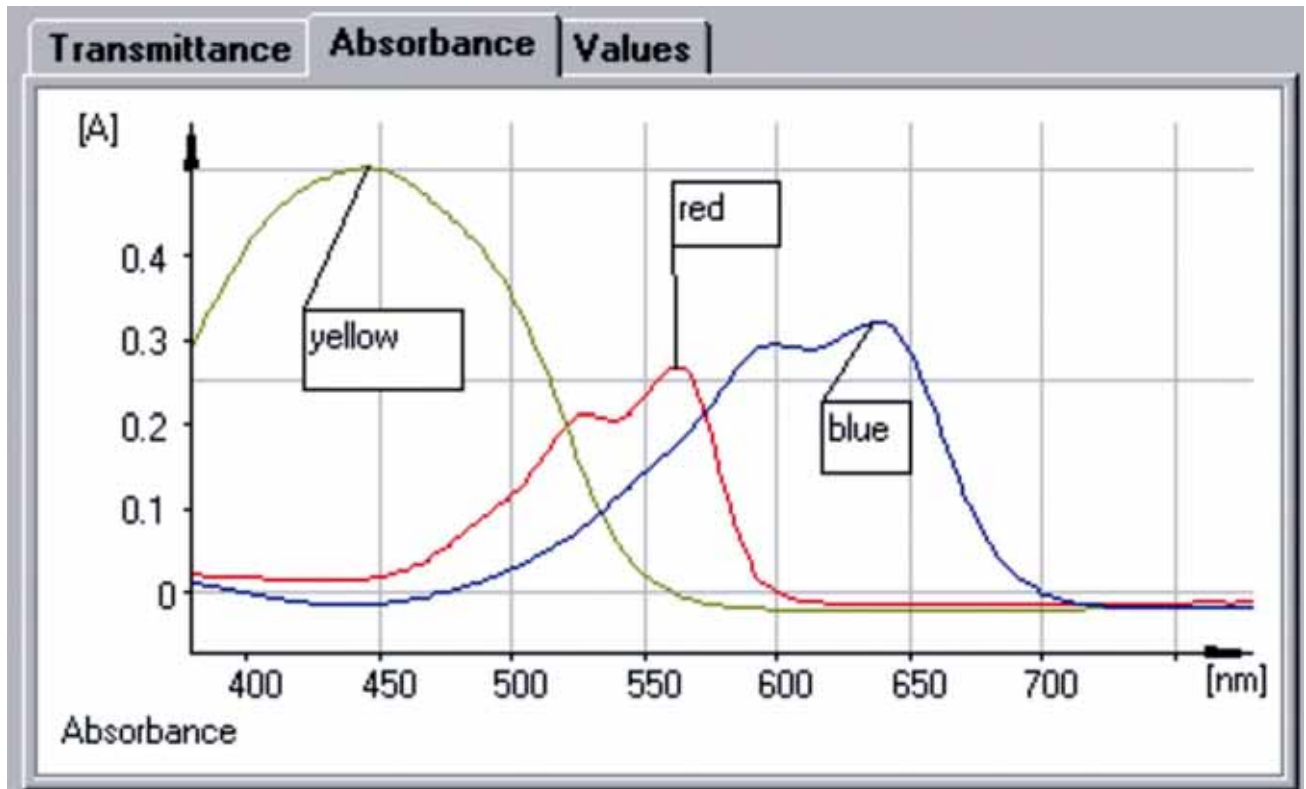


Abbildung 31: Absorptionsspektrum von verschiedenen Druckerfarben

Für den roten Farbstoff wurden die Absorptionsmaxima bei 528 nm und 562 nm, für den gelben Farbstoff bei 446 nm und für den blauen Farbstoff bei 600 nm und 638 nm gefunden.

Auswertung

Die Auswertung wurden mit Hilfe der Farbsoftware der Analytik Jena AG durchgeführt. Diese Software bietet die Möglichkeit verschiedene Farbzahlen unter Berücksichtigung verschiedener Einfallswinkel und Lichtmodelle zu berechnen.

Als Farbsysteme wurden die Normfarbwerte sowie das CIE-Lab-System verwendet. Dabei wurde ein Beobachtungswinkel von 10° und das Lichtmodell D65 (dem natürlichen Licht entsprechend) ausgewählt.

Die Normfarbwerte x , y und z charakterisieren die Farbe in einem dreidimensionalen kartesischen Raum. Im CIE-Lab-System wird die Helligkeit des Farbtons durch den Wert L charakterisiert. Der a -Wert steht hier für den Rot-Grün-Anteil und der b -Wert für den Gelb-Blau-Anteil.

	Normfarbwerte			CIE-Lab		
Farbe	X	Y	Z	L	a	b
Rot	81,36	74,23	99,59	89,03	22,42	-13,98
Gelb	83,35	83,35	36,36	93,17	8,44	48,80
Blau	63,32	72,27	108,81	88,10	-11,65	-21,43