



**Wissen kompakt:  
Spektralphotometrie**

**Flexibel. Verlässlich. Persönlich.**

Zur Untersuchung von molekularen Eigenschaften ist die Wechselwirkung von Licht mit Molekülen eine grundlegende und sehr gut untersuchte Methode. Mit der Methode, die als Spektralphotometrie bezeichnet wird, können verschiedene Moleküle sowohl identifiziert als auch quantifiziert werden. Bei der photometrischen Messung wird die Menge der sichtbaren (VIS) und ultravioletten (UV) elektromagnetischen Strahlung (Licht) gemessen, die von den Molekülen reflektiert oder absorbiert bzw. durch die Moleküle hindurch gelassen wird.

Es stellt sich die Frage, was genau gemessen werden kann bzw. was Licht absorbiert. Die Antwort ist: Alles.

## Messprinzip

Die chemische Struktur von Molekülen führt dazu, dass elektromagnetische Strahlung spezifisch in Abhängigkeit davon absorbiert wird. Spektralphotometer werden in vielen Laboren zur Probenbeschreibung und Bestimmung unterschiedlichster Faktoren eingesetzt:

- Qualität von Lebensmitteln.
- Konzentration von DNA.
- Verunreinigung von Wasserproben.
- UV-Durchlässigkeit von Kleidung und Sonnenbrillen.

UV / VIS Spektralphotometer sind so aufgebaut, dass die notwendige Lichtenergie im benötigten Spektrum im sichtbaren oder ultravioletten Bereich (~ 200 bis 1.000 nm) erzeugt wird. Sichtbares Licht ist im Bereich von 400 bis 750 nm (blau bis rot) und beschreibt in der Tat den Teil des Spektrums, den ein Mensch sehen kann. Daher haben Substanzen, die in diesem Bereich absorbieren eine charakteristische Farbe, die als Komplementärfarbe bezeichnet wird.

Es gibt sehr unterschiedliche Wege, auf denen Licht mit Proben wechselwirken kann. Der bekannteste ist die Absorption. Licht kann die Probe aber auch durchdringen (Transmission) oder durch die Probe gebrochen werden. Ebenso kann Licht an der Oberfläche reflektiert oder gestreut werden.

Die Lichtabsorption einer Probe ist die Folge der spezifischen Elektronenkonfiguration des Moleküls. Licht einer bestimmten Wellenlänge hat genau die Energie, die gebraucht wird, um Elektronen innerhalb des Moleküls von ihrem Grundniveau auf ein angeregtes Niveau anzuheben. Viele Moleküle haben Energiezwischenstufen, die dazu führen, dass nicht nur exakt eine Wellenlänge absorbiert wird, sondern benachbarte Wellenlängen gleich mit. Das führt zu den charakteristischen runden Peaks in einem UV / VIS-Spektrum (Abb. 1). Der größte Teil der Absorptionsspektrometrie basiert auf elektronischen Übergängen innerhalb einer verbundenen Gruppe von Atomen. Zum Beispiel hat die -OH-Gruppe des Ethanol ein Absorptionsmaximum bei 210 nm. Die funktionelle Gruppe, die die Absorption verursacht, wird als Chromophor bezeichnet. Ein Großteil aller Moleküle hat mehr als einen Chromophor, welches zu komplexen Spektren führen kann. Diese Spektren sind charakteristisch für dieses spezifische Molekül und können zur Identifizierung genutzt werden.

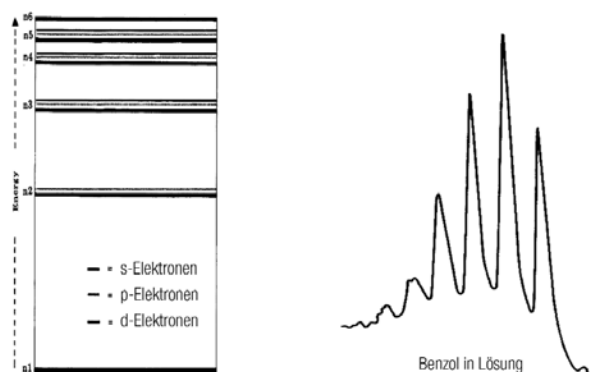


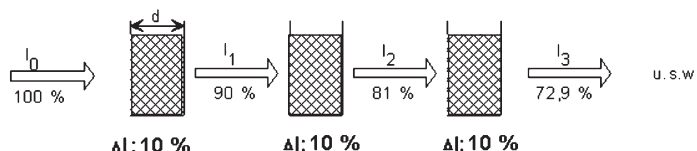
Abb. 1: Elektronenniveau und UV-Spektrum

Viele organische Verbindungen mit einfachen Doppelbindungen zwischen Nichtmetallatomen wie Kohlenstoff, Sauerstoff oder Stickstoff sowie kleine konjugierte Ringstrukturen wie Proteine und Nucleinsäuren absorbieren Licht im UV-Bereich. Größere aromatische Strukturen verschieben das Absorptionsmaximum in Richtung des sichtbaren Lichts. Ein Beispiel ist TMB, welches oft als Substrat in ELISA-Assays genutzt wird, um Antigene nachzuweisen.

## Gesetz von Lambert-Beer

Wie wird nun die Absorption von Licht in einer Probe genau gemessen? Um das zu verstehen, schauen wir uns die von Lambert und Beer aufgestellten Gesetzmäßigkeiten zur Lichtabsorption an.

Das Lambertsche Gesetz



Das Beersche Gesetz

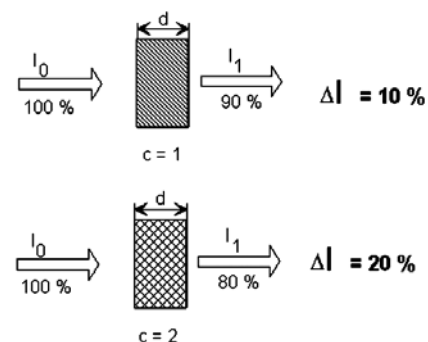


Abb. 2

Das Lambertsche Gesetz besagt, dass die von einem transparenten Medium absorbierte Lichtmenge nicht von der Intensität des einfallenden Lichts beeinflusst wird. Die Anzahl der Schichten ist für die Absorption unerheblich, solange die Gesamtdicke gleich bleibt. Die von einer Probe absorbierte Menge an Licht wird sowohl als Transmission wie auch als Extinktion angegeben. Transmission (T) beschreibt das Verhältnis der Menge an Licht (I) in %, das die Probe komplett durchdringt zur ursprünglich eingestrahlenen Menge an Licht (I<sub>0</sub>) von

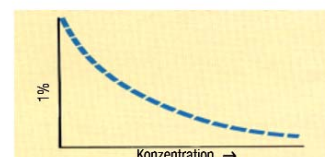
$$T = \frac{I}{I_0} * 100\%$$

Wenn die Konzentration des gesuchten Moleküls in der Probenlösung ansteigt, fällt als Folge dessen der Transmissionswert exponentiell ab.

Für eine etwas einfachere Betrachtung beschreibt das Beersche Gesetz die Absorption des Lichtes in der Probe: Es besagt, dass der dekadische Logarithmus der Transmission proportional der Absorption (A) ist, da das Verhältnis von Absorption zu Konzentration des absorbierenden Moleküls

$\epsilon$  = Funktion der Wellenlänge  
Charakteristische Konstante jedes Stoffes bei bestimmtem pH und bestimmter Wellenlänge.

Transmission gegen Konzentration ergibt exponentielle Kurve.



Absorption gegen Konzentration ergibt lineare Kurve mit Gradienten =  $\epsilon \cdot l$  (= Lichtstärke).

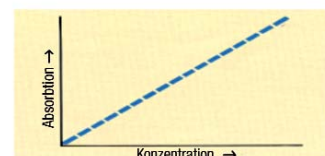


Abb. 3: Der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$



linear verläuft. Absorption entspricht dabei der Konzentration, multipliziert mit der Wellenlänge des Lichts, multipliziert mit dem molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ).

Der molare Extinktionskoeffizient eines Moleküls ist dabei abhängig vom pH-Wert und der Wellenlänge. Der Auftragung von Absorption ( $A$ ) gegen Konzentration ( $c$ ) ergibt eine Gerade mit der Steigung ( $\epsilon$ ), welches die lineare Beziehung zwischen Lichttransmission und Probenkonzentration des Beerschen Gesetzes beschreibt.

Als Resultat ergibt sich das Lambert-Beersche Gesetz:

$$\lg \frac{I_0}{I} = \epsilon cd$$

Schickt man Licht durch ein absorbierendes Medium, so nimmt seine Intensität dabei exponentiell ab.

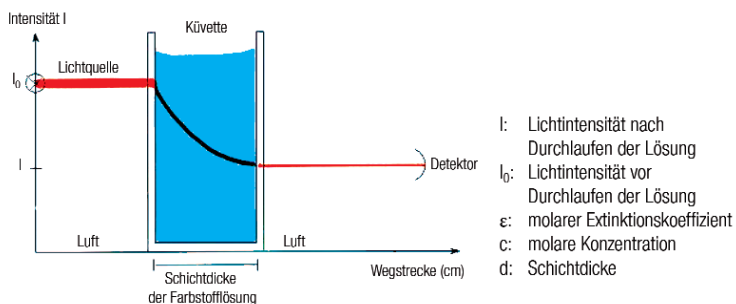


Abb.4: Lambert-Beersches Gesetz

In welchem Verhältnis stehen nun Absorption und Transmission:

- 1A Absorption entspricht 10 % transmittiertem Licht
- 2A Absorption entspricht 1 % transmittiertem Licht
- 3A Absorption entspricht 0,1 % transmittiertem Licht
- 4A Absorption entspricht 0,01 % transmittiertem Licht

Deutlich wird, dass mit steigender Absorption die Menge des transmittierten Lichtes extrem abfällt. Das führt dazu, dass Messungen bei hoher Absorption oft außerhalb des linearen Messbereichs der Geräte durchgeführt werden. Diese Messungen sind kein verlässlicher Indikator für die Konzentration der absorbierenden Moleküle und weichen damit vom Beer-

schen Gesetz ab. Ein weiterer Faktor, der eine korrekte Messung beeinträchtigen kann, ist Streulicht. Als Streulicht bezeichnet man Strahlung, die außerhalb der für die Messung ausgewählten bzw. gewünschten Wellenlängen auf die Probe trifft. Eine potentielle Fehlerquelle ist auch die Probe, in der verschiedene Effekte wie Polymerisation oder Ionisation auftreten können. All die genannten Faktoren können der Grund für ein ungenaues Messergebnis sein.

### Optischer Aufbau

Zunächst muss ein Photometer folgende Ausstattung besitzen:

- Lichtquelle
- Möglichkeit Wellenlängen auszuwählen bzw. zu filtern
- Probenhalter
- Detektor
- Auswertungsmöglichkeit

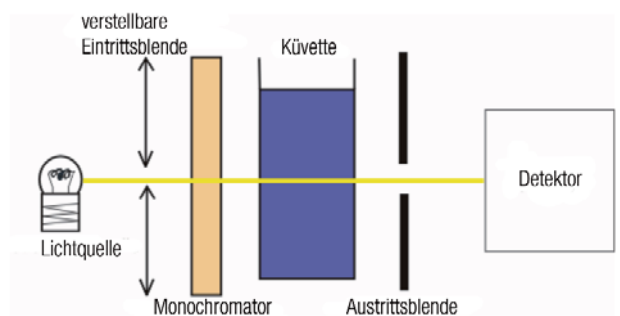


Abb. 5: Aufbau eines Photometers

Die mit Abstand am häufigsten verwendeten Lichtquellen sind die Wolfram-Halogenlampe für den sichtbaren Bereich (VIS-Bereich), die Deuteriumlampe für den ultravioletten Bereich (UV-Bereich) sowie die Xenon-Blitzlampe (UV / VIS-Bereich). Für die Arbeit im VIS-Bereich bzw. für reine VIS-Photometer genügt eine Halogenlampe, da das abgestrahlte Licht im Bereich von 400 - 800 nm liegt und somit den gesamten sichtbaren Bereich abdeckt. Photometer, die auch im UV-Bereich messen, nutzen entweder Deuteriumlampen, um Licht im Bereich von 190 - 400 nm zu er-

halten oder Xenon-Blitzlampen, welche das Spektrum von 200 - 1100 nm abdecken können. Eine Deuteriumlampe emittiert nach Einschalten des Photometers UV-Licht mit sehr konstanter Stärke, während die Xenon-Blitzlampe nur während der Messung per Gasentladung Licht erzeugt. Aufgrund des konstanten Lichtstroms gilt die Deuteriumlampe als präziser. Sie muss jedoch in regelmäßigen Abständen ausgewechselt werden. Die Xenon-Blitzlampe hingegen zeichnet sich durch eine extrem lange Lebensdauer aus, hat jedoch durch die notwendige Integration über die Zeit aufgrund der vielen einzelnen Lichtblitze eine etwas niedrigere Reproduzierbarkeit.

Das von der Lichtquelle erzeugte Licht muss nun gefiltert oder speziell ausgewählt werden, damit nur die gewünschten Wellenlängen auf die Probe treffen. Eine einfache Methode der Filterung ist die Nutzung eines Absorptionsfilters aus gefärbtem Glas, der nur für bestimmte Wellenlängen durchlässig ist und alle anderen Wellenlängen absorbiert. Photometer mit Absorptionsfiltern werden auch Kolorimeter genannt. Anspruchsvoller und leistungsfähiger ist bereits der Interferenzfilter, der den Effekt der Interferenz nutzt, um Licht bestimmter Wellenlängen zu brechen und schmale Bandbreiten auszustrahlen.

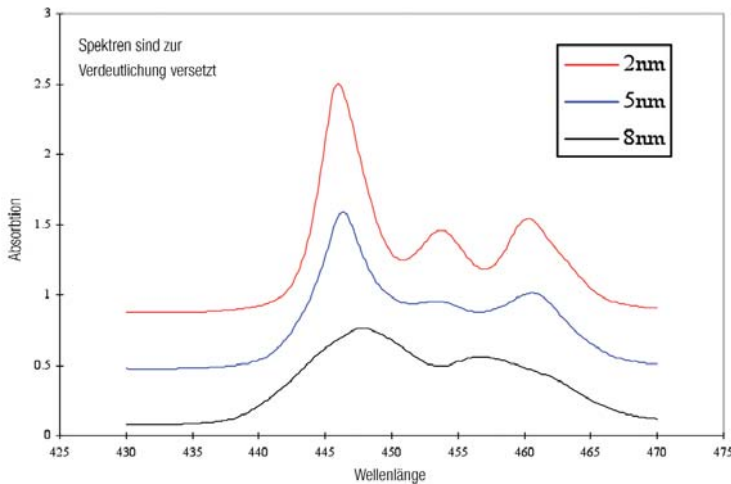


Abb. 6: Auflösung und Abhängigkeit der optischen Bandbreite

Moderne Laborphotometer nutzen hingegen einen Monochromator, der über ein Prisma bzw. ein optisches Gitter bestimmte Wellenlängen sehr effizient emittiert. Ein Monochromator liefert Licht mit einer deutlich höheren aufgelösten, schmalen Bandbreite als ein konventioneller Absorptionsfilter. Da beliebige Wellenlängen ausgewählt werden können, erlaubt er auch die Messung eines Spektrums, d.h. das Absorptionsverhalten einer Probe über alle Wellenlängen im Messbereich. Die Analyse von Spektren ergibt viele Informationen über die vermessenen Proben. Während einer Konzentrationsbestimmung von DNA wird beispielsweise die Probe im Bereich von 230 - 320 nm gemessen. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei 260 nm. Der ausgegebene Wert dient als Grundlage für die Bestimmung der Konzentration. Absorption bei Werten über oder unter 260 nm gibt dem Anwender darüber hinaus Aufschluss über die Reinheit der DNA. Absorption bei Werten unterhalb von 260 nm weist auf Reste von Substanzen wie Phenol oder Guanidin HCl hin, die während der Probenvorbereitung genutzt wurden. Absorption bei Werten über 260 nm ist ein Indiz für die Kontamination der DNA mit Proteinen. Unabhängig von der Art die gewünschte Wellenlänge auszuwählen ist es wichtig, die Funktion der spektralen Bandbreite zu verstehen. Je nach Anwendung kann eine kleinere Bandbreite nötig sein, um schmale Peaks in einer Probe zu finden (Abb. 6).

## Küvetten

Der „klassische“ Probenhalter in einem Photometer ist für eine 10 mm Küvette, in der Regel aus Quarzglas, ausgelegt. Die besondere Eigenschaft von Quarzglas, weder im VIS noch im UV-Bereich, Licht zu absorbieren, kommt hier zum Tragen. Die meisten Arten von Plastikkuvetten absorbieren Licht im UV-Bereich und sind daher nicht universell geeignet (Ausnahme z. B. BRAND UV-Küvette ab 220 nm einsetzbar).

Neben den weit verbreiteten 10 mm Küvetten gibt es auch andere Modelle, wie die 40 mm Küvette, für stark verdünnte Proben wie Gewässerproben oder die Mikrovolumen-Küvetten für DNA Messungen (z.B. Hellma TrayCell). Ebenso existiert mittlerweile eine Vielzahl verschiedener Küvetten- und Probenhalter für besondere Anforderungen.

Bei der Durchflussmessung etwa wird mittels einer Pumpe, ein sogenannter Sipper, ein kontinuierlicher Probenstrom durch die Küvette gepumpt, um einen repräsentativen Durchschnittswert oder auch Kinetiken, also Veränderungen über die Zeit, zu erhalten.

Folienhalter erlauben die Messung größerer lichtdurchlässiger Objekte, wie u. a. Sonnenbrillengläser auf deren UVA / UVB Durchlässigkeit. Temperierbare Küvettenhalter sind ebenso erhältlich wie Küvettenwechsler mit z. B. 8 Plätzen. Der Küvettenwechsler erlaubt die schnelle Messung einer größeren Anzahl Proben.



Abb. 7: Küvettenwechsler

## Detektor

Sobald das Licht die Probe durchdrungen hat, muss es reproduzierbar gemessen werden. Hierzu gibt es viele verschiedene Methoden. Bei der Detektion mittels Photodiode wird das auf das aktive Zentrum der Elektrode fallende Licht in einen kleinen Elektronenfluss umgewandelt, der als elektrischer Strom gemessen werden kann. Ebenfalls eine gängige Methode ist die Messung per Diodenarray oder CCD Sensor. In einem Diodenarray sind viele optisch aktive Elemente linear oder in eine Matrix angebracht. So kann das gesamte optische Spektrum gleichzeitig gemessen werden. Eine Siliziumphotodiode ist empfindlicher für kleine Lichtmengen, ein Diodenarray ist wesentlich robuster, da keine beweglichen Teile verbaut werden. Zudem dauert eine Messung nur wenige Sekunden.

Wie kommen nun all diese Elemente in einem Kolorimeter oder UV / VIS Spektrophotometer zusammen?

Ein einfaches Photometer verfügt über eine Halogenlampe als Lichtquelle, einen Absorptionsfilter und einen 10 mm Küvettenhalter. Mit dieser Ausstattung können Routinemessungen im VIS Bereich durchgeführt werden.

**Libra S12**



Ein komplexerer Aufbau wird dagegen im Einstrahlphotometer realisiert (Abb. 8). Als Lichtquelle kommt hier neben der Halogenlampe auch eine Deuteriumlampe zum Einsatz, um im UV-Bereich messen zu können. Die Wellenlängenauswahl erfolgt über einen Monochromator während ein Photodioden-Detektor das aufgefangene Licht misst. Als Probenhalter stehen hier neben dem 10 mm Küvettenhalter auch beheizbare Probenhalter sowie ein Rundküvettenhalter für Reagenzgläser zur Auswahl.

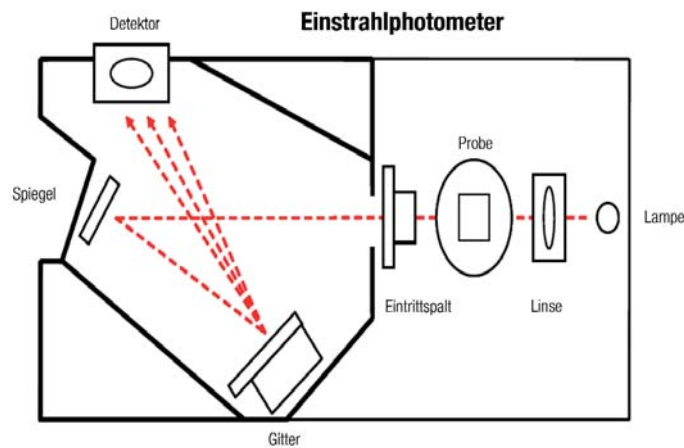


Abb. 8: Aufbau eines Einstrahlphotometers

Noch eine Stufe höher stehen die Einstrahlphotometer mit Referenzstrahl (eng: Split Beam). In diesem Fall ist eine Xenon-Blitzlampe verbaut, um sowohl Licht im UV als auch im VIS Bereich zu erzeugen. Ein Monochromator regelt die Wellenlängenauswahl. Das Licht der Lampe wird hier vor Auftreffen auf die Probe geteilt (gesplittet). Der so abgesplattene Teil des Lichts, der nicht auf die Probe trifft, wird mit einem separaten Detektor gemessen und dient zur Korrektur des Messergebnisses (Abb. 9).

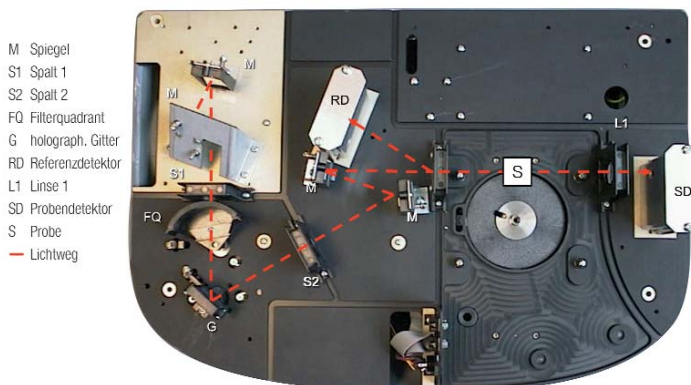


Abb. 9: Biochrom Photometer mit Referenzstrahl

Die Lichtleitung kann auch über Glasfaser erfolgen.

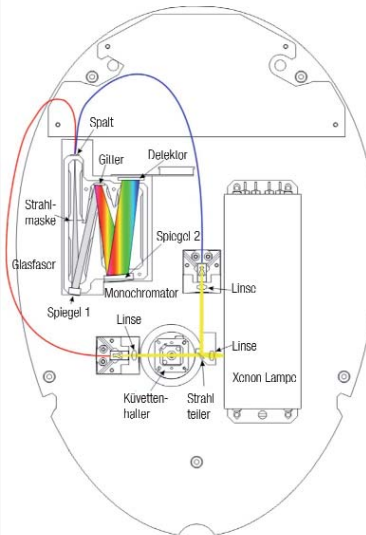


Abb. 10: Einstrahlphotometer mit Glasfaser und Referenzstrahl

**FoodALYT Photometer**



Für höchste Ansprüche, wie z. B. in der Pharmaindustrie, werden Zweistrahlphotometer (eng. Double Beam) verwendet (Abb. 11). Als Lichtquelle ist hier wieder eine Halogenlampe für den VIS- und eine Deuteriumlampe für den UV-Bereich verbaut. Der hochpräzise Monochromator erlaubt es, die Bandbreite zwischen 0,5 und 4 mm zu variieren. Besonders schmale Bandbreiten wie 0,5 mm werden bei komplexen Proben mit sehr steilen und schmalen Absorptionsmaxima genutzt, um diese sauber zu trennen. Da eine Halbierung der Bandbreite immer auch eine Viertelung der Lichtenergie bedeutet, ist es oft sinnvoll, nicht mit der kleinsten technisch möglichen Bandbreite zu messen, um ein besseres, rauschärmeres Spektrum zu bekommen. Größere Bandbreiten verbessern das Signal- / Rauschverhältnis.

Doppelstrahlphotometer messen gleichzeitig die tatsächliche Probe und eine Referenzprobe. Sie eignen sich dadurch insbesondere für komplexe Messungen bei denen sehr präzise gemessen werden muss oder solche mit ständig wechselnder Referenzprobe.

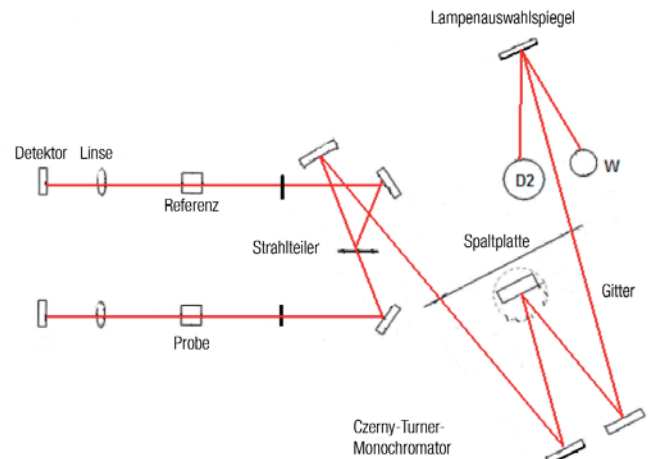


Abb. 11: Zweistrahlphotometer

Moderne Geräte werden zunehmend auch mit einer leistungsfähigen internen Software ausgestattet, die oft mit Touchscreens direkt am Gerät bedient werden kann. Daneben gibt es leistungsfähige Software für die Steuerung und Datenaufnahme, die auf einem separaten PC installiert ist und verschiedene Anforderungen erfüllt (z. B. 21 CFR Part 11).

Die Auswahl des richtigen Gerätes, ob Kolorimeter oder UV/VIS Spektralphotometer, erfordert ein gutes Verständnis für die Anwendung und die technischen Eigenschaften des Gerätes.

### Zusammenfassung

Wenn die Ansprüche an die Messung relativ gering sind, wie etwa bei der Messung von farbigen Lösungen, ist ein einfaches Einstrahlphotometer oder Kolorimeter ausrei-

chend. Ein höherwertiges Gerät würde ebenfalls präzise Ergebnisse liefern, die eigentlichen Anforderungen der Anwendung aber bei weitem übersteigen. Dieses führt zu unnötig höheren Anschaffungs- und Unterhaltskosten. Einfache Geräte eignen sich gut für die Demonstration chemischer und physikalischer Grundprinzipien, z. B. in Schullaboren.

Komplexere Messungen, wie etwa Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA, erfordern leistungsfähigere Geräte, die auch im UV-Bereich messen und Spektren aufnehmen können. Die Transmission von Strahlung durch Sonnenbrillengläser benötigt zudem den nötigen Platz im Probenraum. Pharmazeutische und andere spezielle Anwendungen sind dann die Domäne der High-End Zweistrahlphotometer mit variabler Bandbreite, die höchsten Ansprüchen gerecht werden.

**Libra S80**



Gerne stehen wir Ihnen auch persönlich für eine Beratung zur Verfügung.



Robert-Hooke-Straße 8 · 28359 Bremen · Telefon 0421 / 1 75 99-0

[www.omnilab.de](http://www.omnilab.de) · [info@omnilab.de](mailto:info@omnilab.de)

**Flexibel. Verlässlich. Persönlich.**



**30989 Gehrden / Hannover**  
Elbingeröder Straße 1  
Telefon 05108 / 91 67-0

**22143 Hamburg**  
Neuer Höltigbaum 30  
Telefon 040 / 65 90 95-0

**04416 Markkleeberg**  
Hauptstraße 130  
Telefon 034299 / 7 56 91

### VERTRIEBSBÜROS

**Berlin**  
Telefon 03322 / 20 24 69

**Braunschweig**  
Telefon 05308 / 69 38 64

**Essen**  
Telefon 0201 / 1 05 46 34

**Frankfurt**  
Telefon 0160 / 90 89 82 56

**Göttingen**  
Telefon 0551 / 6 94 02-16

**Heidelberg**  
Telefon 0151 / 18 00 02 90

**Kiel**  
Telefon 040 / 65 90 95 40

**Magdeburg**  
Telefon 039292 / 6 56 51

**Münster**  
Telefon 0421 / 17 59 93 24

**Nürnberg**  
Telefon 089 / 6 92 57 18

**Osnabrück**  
Telefon 0421 / 17 59 93 21

**Rostock**  
Telefon 038455 / 2 23 29

**Ruhrgebiet**  
Telefon 01520 / 1 66 98 00

**Ulm**  
Telefon 089 / 6 92 57 18

**Schubert & Weiss OMNILAB**  
**81547 München**  
Fromundstraße 34  
Telefon 089 / 6 92 57 18

**OMNILAB baltic**  
**1002, Riga / Lettland**  
Maza Nometnu iela 45A  
Telefon +371 67 67 05 10

**OMNILAB Laboratuvar**  
**Malzemeleri San. ve Tic. Ltd. Sti.**  
**35170 Mersinli / Izmir / Türkei**  
1201 / 1 Sk. No:2 Su Plaza  
K:5 / 502  
Telefon +90 232 4 69 42 44