

Die Grundlagen der Spektrophotometrie im UV-/Vis-Bereich

Eine Einführung





Inhalt

1	Grundlegende Prinzipien von Messungen im UV- und Vis-Bereich	3
1.1	Das elektromagnetische Spektrum	3
1.2	Wellenlänge und Frequenz	3
1.3	UV-/Vis-Spektren	3
1.4	Transmission und Extinktion	4
1.5	Zusammenfassung	4
2	Wie funktioniert ein modernes UV-Vis-Spektralphotometer?	5
2.1	Geräteaufbau	7
3	Auswahl der optimalen Parameter für UV-Vis-Messungen	13
3.1	Auswahl der Küvetten	13
3.2	Probentemperierung	16
3.3	Rühren der Probe	16
3.4	Messungen bei niedrigen Temperaturen	16
3.5	Transparenz von Lösemitteln	17
3.6	Optimale spektrale Bandbreite	18
3.7	Streulicht	19
3.8	Der lineare Bereich eines UV-Vis-Geräts	19
3.9	Weitere nützliche Informationen	20
3.10	Wellenlänge oder Wellenzahl	20
4	Überblick über gängige UV-Vis-Applikationen.	21
4.1	Identifizierung – Spektren und Struktur	21
4.2	Bestätigung der Identität	22
4.3	Quantifizierung von Molekülen	22
4.4	Kinetische Messungen	24
4.5	Farbmessungen	26
4.6	Strukturänderungen von Verbindungen	28
4.7	Schmelztemperatur von Proteinen und Nukleinsäuren	28
4.8	Mehrkomponentenanalyse	30
4.9	Software-Anforderungen	32
5	Glossar	34

1. Grundlegende Prinzipien von Messungen im UV- und Vis-Bereich

1.1 Das elektromagnetische Spektrum

Die ultraviolette (UV) und die sichtbare Strahlung gehören zum elektromagnetischen Spektrum. Dieses umfasst weitere Strahlungsformen wie Radio-, Infrarot(IR)-, kosmische und Röntgenstrahlung.

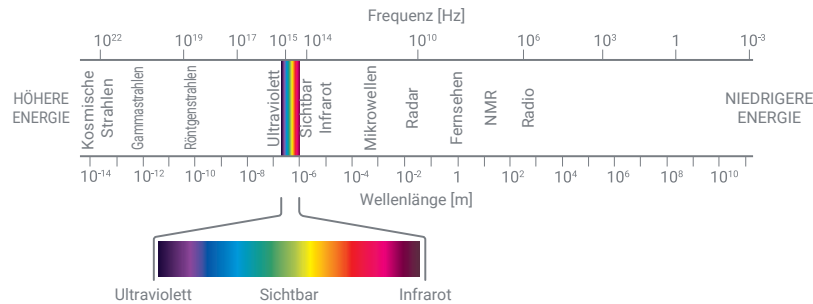


Abb. 1: Das elektromagnetische Spektrum mit vergrößerter Darstellung des Bereichs des sichtbaren Lichts.

Die Energie der elektromagnetischen Strahlung ist folgendermaßen definiert:

$$E = h\nu$$

wobei **E** für Energie (in Joules), **h** für das Plancksche Wirkungsquantum ($6,62 \times 10^{-34}$ Js) und **ν** für die Frequenz (pro Sekunde) steht.

Mit Spektroskopie kann untersucht werden, wie Materie mit elektromagnetischer Strahlung interagiert bzw. elektromagnetische Strahlung abgibt. Je nach gemessenem Wellenlängenbereich gibt es verschiedene spektroskopische Methoden. UV-Vis-Spektroskopie nutzt den ultravioletten und sichtbaren Strahlungsbereich des elektromagnetischen Spektrums. Bei Infrarotspektroskopie wird der energieärmere Infrarotanteil des Spektrums verwendet.

1.2 Wellenlänge und Frequenz

Elektromagnetische Strahlung kann als Kombination gekoppelter elektrischer und magnetischer Wechselfelder beschrieben werden, die sich wellenförmig im Raum ausbreiten. Da sich die Strahlung wie eine Welle verhält, kann sie mit den Parametern Wellenlänge bzw. Frequenz beschrieben werden. Diese hängen laut folgender Gleichung zusammen:

$$\nu = c/\lambda$$

wobei **ν** für Frequenz (pro 1/Sekunde), **c** für die Lichtgeschwindigkeit (3×10^8 ms⁻¹) und **λ** für die Wellenlänge (in m) steht.

Die Wellenlängen für die UV-Vis-Spektroskopie werden gewöhnlich in Nanometern angegeben (1 nm = 10^{-9} m). Aus den Gleichungen ergibt sich, dass Strahlung mit kleineren Wellenlängen energiereicher ist. In der UV-Vis-Spektroskopie besitzt das kurzwellige UV-Licht die höchste Energie. Manchmal

ist diese Energie groß genug, um bei der Messung lichtempfindlicher Proben unerwünschte photochemische Reaktionen zu erzeugen.

1.3 UV-/Vis-Spektren

Bei der Wechselwirkung von Strahlung mit Materie werden verschiedene Prozesse beobachtet. Dazu gehören Reflexion, Dispersion, Absorption, Fluoreszenz/Phosphoreszenz (Absorption und erneute Emission) und photochemische Reaktionen (Absorption und Spaltung von chemischen Bindungen). Bei der Ermittlung des UV-Vis-Spektrums von Proben wird die Extinktion gemessen. Im Folgenden wird angenommen, dass die Extinktion der Absorbanz entspricht, d. h. dass die Extinktion absorptionsbedingt ist.

Materie absorbiert Licht, und da Licht eine Energieform ist, steigt der Energiegehalt der Moleküle (oder Atome) dieser Materie. Die gesamte potenzielle Energie eines Moleküls ist die Summe aller elektronischen Übergangs-, Schwingungs- und Rotationsenergien:

$$E_{\text{gesamt}} = E_{\text{elektronisch}} + E_{\text{Schwingung}} + E_{\text{Rotation}}$$

Dabei sind die Energieformen, die ein Molekül besitzt, nicht kontinuierlich, sondern besitzen diskrete Energieniveaus bzw. -zustände. Die Energieunterschiede der verschiedenen Energieformen haben unterschiedliche Größenordnungen:

$$E_{\text{elektronisch}} > E_{\text{Schwingung}} > E_{\text{Rotation}}$$

In einigen Molekülen und Atomen besitzen die Photonen des einfallenden UV- und sichtbaren Lichts genug Energie, um einen Übergang von einem elektronischen Energieniveau zu einem anderen zu bewirken. Die Wellenlänge des absorbierten Lichts entspricht dabei der Energie, die für den Übergang eines Elektrons von einem niedrigeren Energieniveau zu einem höheren Energieniveau notwendig ist. In Abbildung 2 sind als Beispiel die elektronischen Übergänge von Formaldehyd dargestellt. Die Wellenlängen des Lichts, das die Übergänge verursacht, sind angegeben.

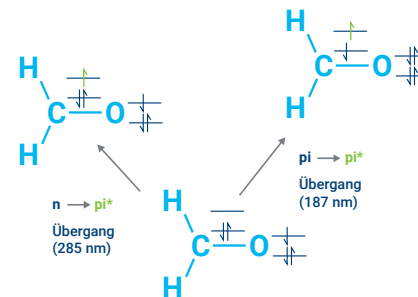


Abb. 2: Elektronische Übergänge in Formaldehyd. UV-Licht bei 187 nm führt zur Anregung eines Elektrons in der C-O-Bindung und Licht bei 285 nm führt zur Anregung und zum Transfer eines Elektrons vom Sauerstoffatom zur C-O-Bindung.

Diese Übergänge resultieren in sehr schmalen Absorptionsbanden bei Wellenlängen, die äußerst charakteristisch für die Differenz der Energieniveaus der absorbierenden Spezies sind. Dies gilt auch für Atome (siehe Abbildung 3).

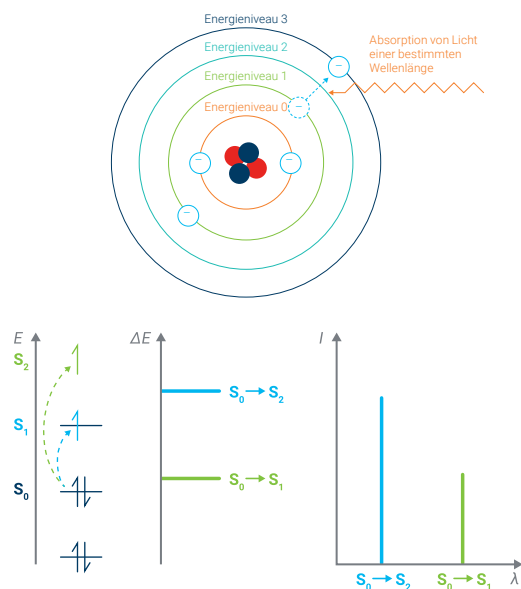


Abb. 3: Einfallendes Licht einer bestimmten Wellenlänge bewirkt eine Anregung von Elektronen in einem Atom. Die Art des Atoms bzw. des Ions (d. h. um welches Element es sich handelt) und die Energieniveaus, zwischen denen sich ein Elektron bewegt, bestimmen die Wellenlänge des Lichts, das absorbiert wird. Elektronen können um mehr als ein Energieniveau angeregt werden. Je weiter ein Elektron sich vom Kern entfernt, desto mehr Energie wird benötigt, d. h. desto kürzer ist die entsprechende Wellenlänge.

In Molekülen überlagern sich die Schwingungs- und Rotationsenergieniveaus und die elektronischen Energieniveaus. Da viele Übergänge mit verschiedenen Energien auftreten können, sind die Banden verbreitert (siehe Abbildung 4). Die Verbreiterung wird in Lösungen noch stärker, da außerdem Wechselwirkungen zwischen Lösemittel und gelöstem Stoff auftreten.

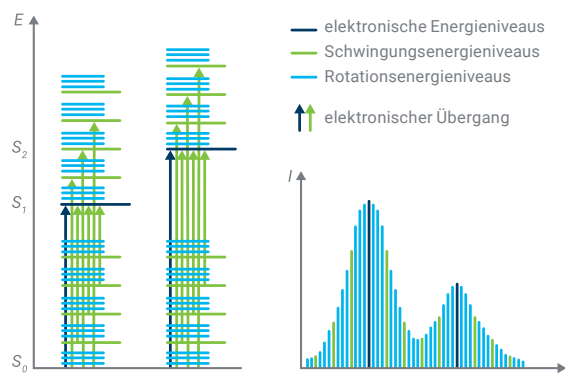


Abb. 4: Elektronische Übergänge und UV-Vis-Spektren von Molekülen (I steht für Intensität und λ für Wellenlänge).

1.4 Transmission und Extinktion

Wenn Licht eine Probe passiert (oder im Falle von Feststoffproben von einer Probe reflektiert wird), ist die Menge des absorbierten Lichts der Unterschied zwischen der einfallenden Strahlung (I_0) und der ausgesandten Strahlung (I). Die Menge des absorbierten Lichts wird als Extinktion (bzw. Absorbanz) ausgedrückt. Transmission, d. h. das von der Probe durchgelassene Licht, wird gewöhnlich als Bruchteil von 1 bzw. in Prozent angegeben. Transmission ist wie folgt definiert:

$$T = I / I_0 \text{ oder } \%T = I / I_0 \times 100$$

Extinktion (bzw. Absorbanz) ist wie folgt definiert:

$$A = -\log T$$

Bei den meisten Applikationen werden die Extinktionswerte verwendet, da das Verhältnis von Extinktion und Konzentration bzw. Schichtdicke normalerweise linear ist (siehe das Lambert-Beersche Gesetz in Abschnitt 1.9).

1.5 Zusammenfassung

- UV und sichtbares Licht gehören zum elektromagnetischen Spektrum.
- Die Wellenlängen für die UV-Vis-Spektroskopie werden in Nanometern angegeben (nm).
- Materie kann Licht reflektieren, streuen, durchlassen oder absorbieren. Licht kann photochemische Reaktionen verursachen.
- Die Energie des einfallenden Lichts bewirkt, dass Elektronen auf andere Energieniveaus gehoben werden. Es können auch elektronische Übergänge zwischen Schwingungs- und Rotationsenergieniveaus von Molekülen vorkommen.
- Bei den meisten Applikationen der UV-Vis-Spektroskopie wird die Extinktion (Absorbanz) von Licht gemessen. Extinktion ist definiert als $A = -\log T$, wobei T für Transmission steht.

2. Wie funktioniert ein modernes UV-Vis-Spektralphotometer?

In einem UV-Vis-Spektralphotometer beleuchtet eine Lichtquelle eine Probe mit Licht im UV- bis sichtbaren Wellenlängenbereich (gewöhnlich 190 bis 900 nm). Das Gerät misst dann das von der Probe absorbierte, durchgelassene bzw. reflektierte Licht bei jeder Wellenlänge. Einige Spektralphotometer bieten einen in den Nah-Infrarot-Bereich (NIR, 800 bis 3200 nm) erweiterten Wellenlängenbereich.

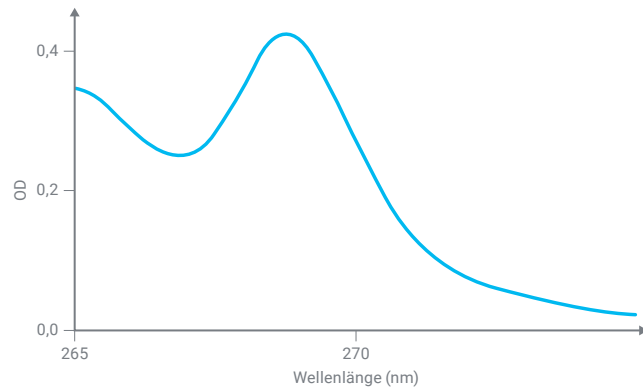


Abb. 5: UV-Absorptionsspektrum, mit einem Absorptions-Peak bei ungefähr 269 nm.

Anhand des erhaltenen Spektrums (z. B. Abbildung 5) können die chemischen bzw. physikalischen Eigenschaften der Probe ermittelt werden. Im Allgemeinen ist Folgendes möglich:

- Identifizierung von Molekülen in einer Feststoff- oder Flüssigprobe.
- Ermittlung der Konzentration von bestimmten Molekülen in einer Lösung.
- Charakterisierung der Extinktion bzw. der Transmission durch eine Flüssigkeit oder einen Feststoff über einen Wellenlängenbereich.
- Charakterisierung der Reflexionseigenschaften einer Oberfläche oder Messung der Materialfarbe.
- Untersuchung chemischer Reaktionen und biologischer Prozesse.

Durch Kombination von unterschiedlichen Zubehörteilen und Probenhalterungen können in UV-Vis-Spektralphotometern verschiedenartige Messungen durchgeführt werden. Es gibt verschiedene Zubehörteile für unterschiedliche Messarten und Probentypen, z. B. Feststoffproben gegenüber Flüssigproben, und für unterschiedliche Messbedingungen (Abb. 6 und 7).



Abb. 6: Ein UV-Vis-Spektralphotometer kann mit einer Faseroptik-Sonde ausgestattet werden, um Flüssigproben in verschiedenen Behältern zu messen.

UV-Vis-Spektrophotometrie ist eine vielseitige Methode und wird seit fast einhundert Jahren in vielen Bereichen verwendet. UV-Vis-Spektralphotometer werden in Labors in der Materialprüfung/Forschung, Chemie/Petrochemie und Biotechnologie/Pharmazeutik oft eingesetzt.

Abb. 7: Feststoffproben, wie diese polykristalline photovoltaische Solarzelle, können in einem UV-Vis-Spektralphotometer gemessen werden.



2.1 Geräteaufbau

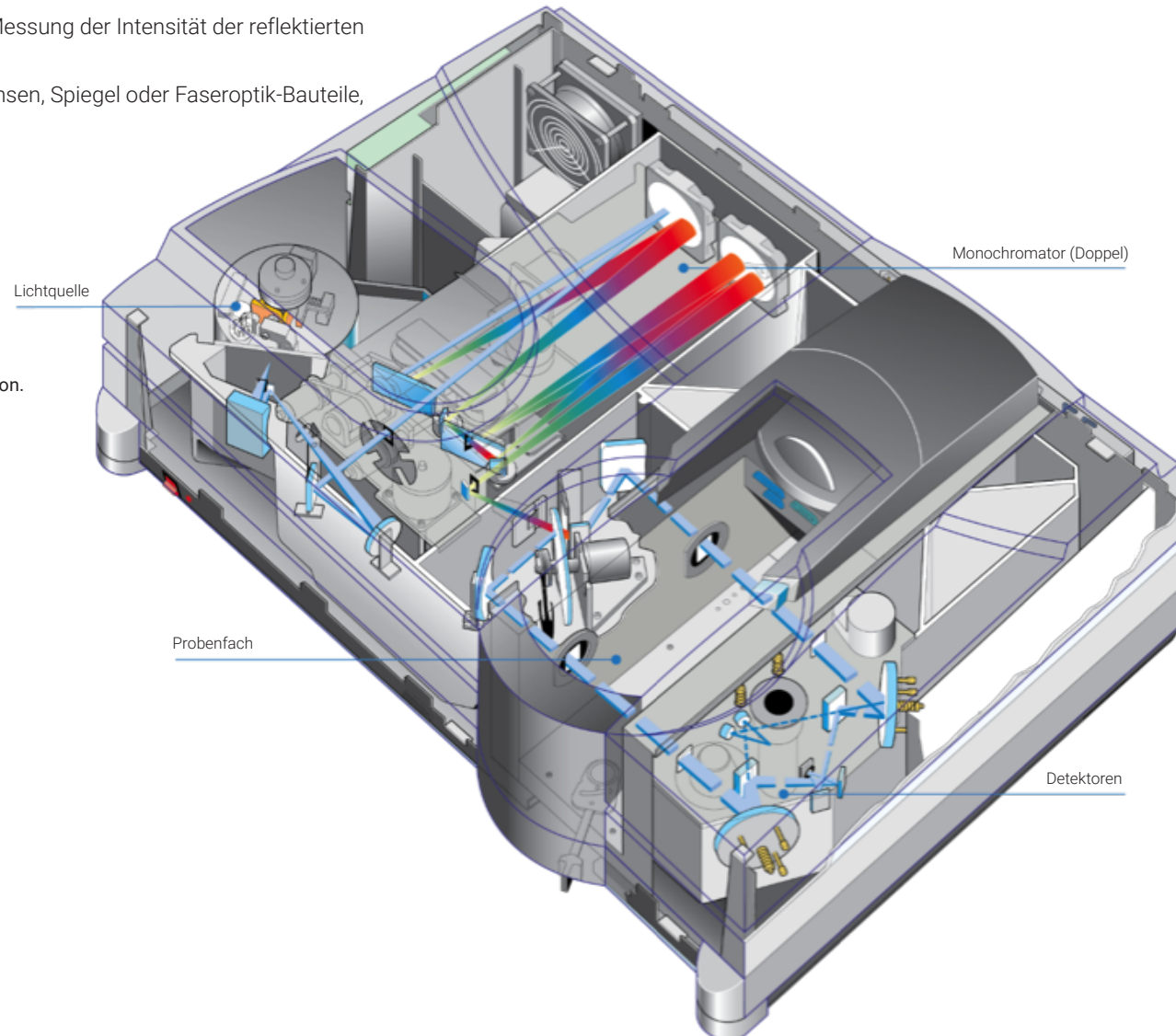
Komponenten

Die wichtigsten Komponenten eines Spektralphotometers sind:

- eine Lichtquelle, die elektromagnetische Breitbandstrahlung im UV-Vis-Bereich abgibt;
- eine Dispersionsvorrichtung, die die Breitbandstrahlung in ihre Wellenlängen zerlegt;
- ein Probenbereich, in dem Licht die Probe passiert oder von der Probe reflektiert wird;
- ein oder mehrere Detektoren zur Messung der Intensität der reflektierten bzw. durchgelassenen Strahlung;

andere optische Komponenten wie Linsen, Spiegel oder Faseroptik-Bauteile, die Licht durch das Gerät leiten.

Abb. 8: Schematische Darstellung des Inneren eines Agilent Cary 5000 UV-Vis-NIR Spektralphotometers mit den wichtigsten Komponenten. Hinweis: Dies ist ein Hochleistungsgerät. UV-Vis-Spektralphotometer für Routinemessungen besitzen eine einfachere optische Konstruktion.



Lichtquellen

Die ideale Lichtquelle liefert bei allen Wellenlängen eine konstante Intensität mit geringem Rauschen und ist langfristig stabil. Leider gibt es keine ideale Lichtquelle. In UV-Vis-Spektralphotometern wurden in der Vergangenheit zwei verschiedene Lichtquellen verwendet:

- Deuterium-Bogenlampen liefern eine gute, kontinuierliche Intensität im UV-Bereich und nützliche Intensitäten im Vis-Bereich.
- Wolframhalogenlampen liefern eine gute Intensität über den gesamten sichtbaren Bereich und Teile des UV-Bereichs.

Heutzutage werden häufiger Xenon-Blitzlampen als einzige Lichtquelle eingesetzt. Xenon-Blitzlampen als einzige Lichtquelle bieten erhebliche Vorteile gegenüber der Verwendung der beiden herkömmlichen Lampen.

Deuterium(D_2)-Bogenlampen

Bei Deuterium-Bogenlampen wird Deuterium zum Leuchten angeregt. Das Ergebnis ist ein gutes, kontinuierliches Lichtspektrum im UV-Bereich und nützliche Intensitäten im sichtbaren Bereich (185 nm bis 400 nm, siehe Abb. 9). Obwohl moderne Deuterium-Bogenlampen oft ein niedriges Signalrauschen erzeugen, ist das Rauschen der Lichtquelle meist der begrenzende Faktor der Leistung des gesamten Geräts hinsichtlich Rauschen. Im Laufe der Zeit nimmt die Lichtintensität einer Deuterium-Bogenlampe stetig ab. Die Halbwertszeit einer solchen Lampe (Zeit bis zur Abnahme der Lichtintensität auf die Hälfte des Ausgangswerts) liegt bei ungefähr 1000 Stunden. Wegen dieser niedrigen Halbwertszeit müssen D_2 -Lampen relativ häufig ausgewechselt werden.

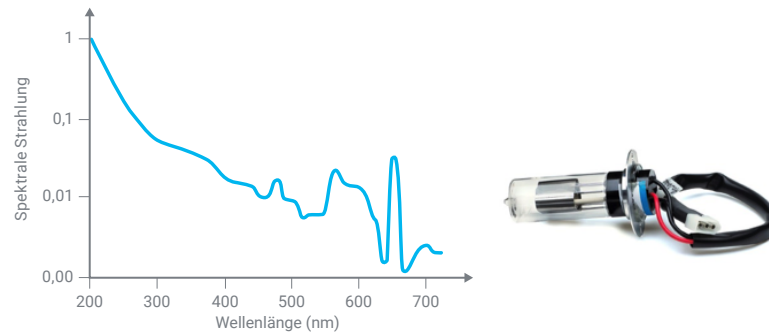


Abb. 9: Intensitätsspektrum einer Deuterium-Bogenlampe.

Wolframhalogenlampe

Wolframhalogenlampen nutzen einen Glühfaden. Wenn Strom durch den Glühfaden fließt, heizt sich der Glühfaden auf und gibt Licht ab (siehe Abb. 10). Die Lampe liefert eine gute Intensität in Teilen des UV-Spektrums und im gesamten sichtbaren und NIR-Bereich (350 nm bis 3000 nm). Dieser Lampentyp ist mit einem sehr niedrigen Rauschen und niedriger Drift verbunden und besitzt eine funktionelle Lebensdauer von 10.000 Stunden.

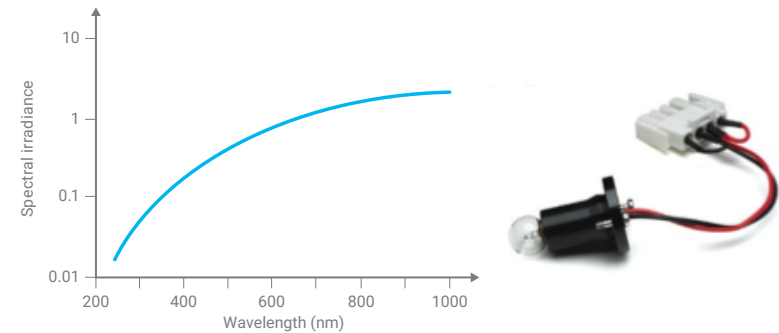


Abb. 10: Intensitätsspektrum einer Wolframhalogenlampe.

In UV-Vis-Spektralphotometern, die sowohl mit einer D_2 - als auch einer Wolframhalogenlampe ausgestattet sind, dient ein Lichtquellenselektor zum Umschalten von einer Lichtquelle zur anderen. Oder aber das Licht beider Lichtquellen wird gemischt, um eine Breitband-Einzellichtquelle zu simulieren.

Xenon-Blitzlampe

Anders als D_2 - oder Wolframhalogenlampe, die durchgängig leuchten, gibt eine Xenon-Blitzlampe Licht in extrem kurzen Blitzen ab. Da auf diese Weise das Licht nur für eine kurze Zeit und nur während der Probenmessung abgegeben wird, hat die Lampe eine lange Lebensdauer. Die Probe wird nur zum Zeitpunkt der Messung mit Licht bestrahlt. Wegen dieser kurzen Beleuchtungsdauer eignen sich Xenon-Blitzlampen eventuell für die Messung von Proben, die empfindlich in Bezug auf Photobleaching sind. Photobleaching wird beobachtet, wenn empfindliche Proben von einer kontinuierlichen Lichtquelle lang konstant beleuchtet werden. Eine Xenon-Blitzlampe gibt sehr intensives Licht im Wellenlängenbereich von 185 nm bis 2500 nm ab. Daher wird keine sekundäre Lichtquelle benötigt (Abb. 11). Eine Xenon-Blitzlampe kann viele Jahre lang verwendet werden, bevor sie ausgewechselt werden muss. Das macht sie im Vergleich zu Systemen mit D_2 - oder Wolframhalogenlampe zur bevorzugten Wahl. Dazu kommt, dass diese Lampe anders als D_2 - oder Wolframhalogenlampen keine Aufwärmzeit benötigt.

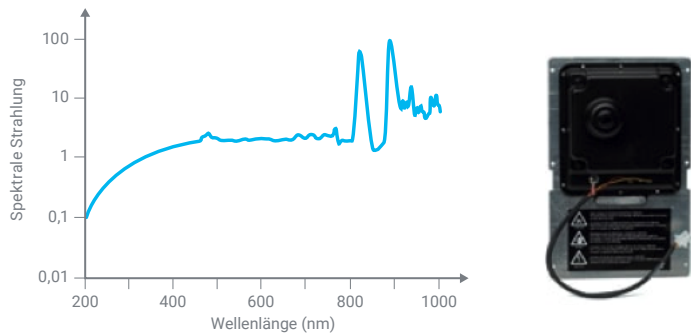


Abb. 11: Intensitätsspektrum einer Xenonlampe.

Der Monochromator

Alle Lichtquellen erzeugen ein breitbandiges, weißes Licht. Um das Licht auf eine bestimmte Wellenlänge zu begrenzen, passiert es einen Monochromator. Ein Monochromator besitzt:

- einen Eintrittsspalt;
- eine Dispersionsvorrichtung, um Licht in die unterschiedlichen Wellenlängen zu trennen (wie ein Regenbogen) und eine Auswahl einer Wellenlängenbande zu ermöglichen und
- einen Austrittsspalt, durch den das Licht der ausgewählten Wellenlängen den Monochromator verlässt und zur Probe gelangt.

Man kann sich einen Monochromator einfach wie einen Raum mit Fenster vorstellen, durch das die Sonne scheint. Das Sonnenlicht fällt auf ein Prisma, welches das weiße Licht in die Farben des Regenbogens auffächert. Das Regenbogenlicht fällt auf ein Fenster auf der gegenüberliegenden Seite des Raums. Beim Drehen des Prismas fallen unterschiedliche Farben, d. h. Licht unterschiedlicher Wellenlängen, auf das gegenüberliegende Fenster.

Am besten wäre es, wenn ein Monochromator nur Licht einer einzigen Wellenlänge ausgäbe. In der Praxis gibt ein Monochromator jedoch immer ein Wellenlängenband aus.

Bei den meisten heutzutage verkauften Spektralphotometern dienen holographische Beugungsgitter als Dispersionsvorrichtung. Diese optischen Komponenten werden aus Glas hergestellt. Dazu werden extrem feine Furchen präzise auf die Glasoberfläche geätzt. Die Abmessungen dieser Furchen haben die gleiche Größenordnung wie die Wellenlänge des Lichts, das dispersiert werden soll. Die abschließende Beschichtung mit Aluminium macht die Oberfläche reflexiv.

Das Licht, das auf das Gitter fällt, interferiert, wird gebeugt und abhängig von der Wellenlänge in verschiedenen Winkeln reflektiert. Holographische Gitter erzeugen eine wellenlängenabhängige lineare Winkeldispersion und sind temperaturunempfindlich. Das Licht wird jedoch in mehreren Ordnungen reflektiert, die sich überlappen (siehe Abb. 12). Daher müssen Filter verwendet werden, damit nur das Licht der gewünschten Reflexionsordnung den Detektor erreicht. Ein konkaves Gitter dispersiert und fokussiert das Licht gleichzeitig.

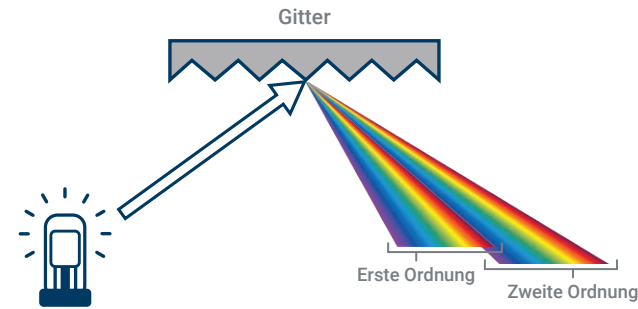


Abb. 12: Auffächerung von weißem Licht an einem holographischen Gitter in Licht unterschiedlicher Wellenlängen.

Spektralphotometer mit Einzelmonochromator

Spektralphotometer mit Einzelmonochromator werden in der allgemeinen Spektroskopie eingesetzt und können in ein kompaktes optisches System integriert werden. In Abbildung 13 ist ein optisches System mit Einzelmonochromator schematisch dargestellt. Ein Einzelmonochromator kann die Wellenlängen des Lichts nicht so eng auswählen wie ein Doppelmonochromatorsystem. Für viele Applikationen ist dies jedoch auch nicht erforderlich, z. B. bei der Messung von Proben mit breiten Absorptionspeaks.

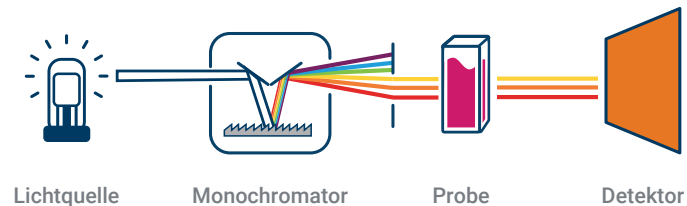


Abb. 13: Spektralphotometer mit Einzelmonochromator.



Spektralphotometer mit Doppelmonochromator

Hochleistungsgeräte sind in der Regel mit Doppelmonochromator ausgestattet. Zwei Monochromatoren werden in Serie hintereinander angeordnet. Das Licht der Quelle wird vom ersten Monochromator geteilt, und das geteilte Licht vom zweiten Monochromator weiter geteilt. Weniger Streulicht gelangt in das System und die spektrale Genauigkeit (d. h. die Fähigkeit, eine bestimmte Wellenlänge auszuwählen) ist erhöht. In Abbildung 14 ist ein optisches System mit Doppelmonochromator schematisch dargestellt.

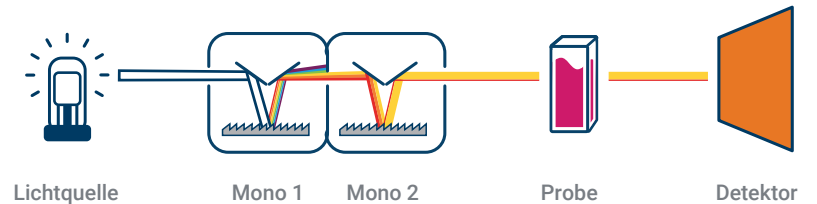


Abb. 14: Schematische Darstellung eines Spektralphotometers mit Doppelmonochromator.

Probenfach

Die Probe wird so in das Probenfach gesetzt, dass der Strahl vom Monochromator die Probe passiert. Im Rahmen von Absorptionsmessungen werden flüssige Proben gewöhnlich in einer Küvette mit einer bekannten Schichtdicke gehalten. Bei einer Küvette handelt es sich um ein rechteckiges Gefäß für Flüssigkeiten (siehe Abb. 15). Küvetten werden aus Glas, Quarzglas, Kunststoff oder anderen Materialien hergestellt, die für UV- bzw. sichtbares Licht durchlässig sind. Standardküvetten haben eine Schichtdicke von 10 mm und werden aus Quarzglas hergestellt, damit die Transmission für Wellenlängen im UV-Bereich gut ist. Es können auch preisgünstigere Kunststoffküvetten verwendet werden. Diese sind jedoch im Allgemeinen nicht für UV-Licht durchlässig und eignen sich daher nur für Messungen im sichtbaren Wellenlängenbereich. Es sind zahlreiche Küvetten für spezielle Applikationen erhältlich – von Küvetten für winzige Flüssigkeitsvolumen bis zu Küvetten mit sehr viel längeren Schichtdicken für sehr verdünnte Proben.



Abb. 15: Küvetten für die Messung von flüssigen Proben. Von links nach rechts: Standard-Küvette mit einer Schichtdicke von 10 mm und einem Volumen von 3 ml, Ultramikroküvette für sehr niedrige Volumen und eine Küvette mit sehr großer Schichtdicke für verdünnte Lösungen.

Feststoffproben können in Position gehalten und einfache Transmissionsmessungen durchgeführt werden. Es sind auch Messungen bei verschiedenen Einfallswinkeln möglich. Zur Durchführungen von komplexeren Messungen wie diffuse Reflexions- bzw. Transmissionsmessungen, können weitere Zubehörteile im Probenfach installiert werden.

Einstrahl-Spektralphotometer

Die einfachsten UV-Vis-Spektralphotometer besitzen ein optisches System mit einem Strahlengang. In einem solchen optischen System wird das Licht vom Monochromator durch die Probe und dann zum Detektor geleitet. Dieses einfache Design ist mit weniger optischen Komponenten verbunden. Daher können die Größe des Geräts und damit die Kosten reduziert werden.

Allerdings muss vor der Messung einer Probe die Basislinie bzw. der Blindwert anhand einer Blindprobe gemessen werden. Im Falle von Flüssigkeiten soll durch Messung der Blindprobe die Absorption von Küvette und verwendetem Lösemittel ermittelt werden. In einem Einstrahlssystem muss die Basislinie von der Probe getrennt gemessen werden. Und da es sich um separate Messungen handelt, können Schwankungen der Lichtintensität oder der optischen Leistungen des Systems zwischen der Leerwert- und der Probenmessung die Genauigkeit der Messung beeinträchtigen. Solche Ungenauigkeiten sind besonders dann von Bedeutung, wenn Probenmessungen lange dauern oder sich die Blindprobe im Zeitverlauf ändert. In der Praxis müssen bei Messungen mit einem Einstrahlssystem Basislinien bzw. Blindproben oft und regelmäßig gemessen werden.

Zweistrahl-Spektralphotometer

Viele UV-Vis-Systeme sind optische Systeme mit zwei Strahlengängen. Beim Zweistrahltyp wird Licht vom Monochromator in zwei Strahlen aufgeteilt, den Referenzstrahl und einen Probenstrahl. Das Licht wird mithilfe eines optischen Bauelements geteilt. Dazu dient ein sich drehender Sektorspiegel oder ein Strahlteiler mit teilreflexiver Beschichtung. Die Strahlen gelangen über separate optische Pfade zum Probenfach. Da also zwei Strahlen der gleichen Wellenlänge zur Verfügung stehen, können die Referenz- bzw. Blindprobe und die Messprobe gleichzeitig gemessen werden. Damit kann der Messwert der Probe hinsichtlich Geräteschwankungen in Echtzeit korrigiert werden. Diese Echtzeitkorrektur sorgt für sehr genaue Messungen.

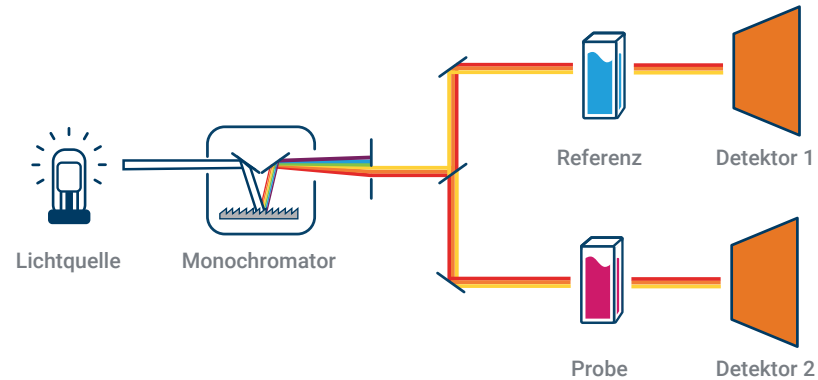


Abb. 16: Schematische Darstellung eines optischen Systems mit zwei Strahlengängen und zwei Detektoren.

Referenzstrahl-Spektralphotometer

Bei einem weiteren, noch moderneren Spektralphotometerdesign kommt ein optisches Zweistrahl-Layout mit einem Proben- und Referenzdetektor zum Einsatz. Der Referenzdetektor dient zur Korrektur der Schwankungen der Lampenintensität bei jeder Messung. Gleichzeitig wird das Lösemittel oder die Blindprobe (im Fall einer Feststoffprobe) in der Probenposition gemessen und anschließend – nach der Messung der Probe – vom Probenspektrum abgezogen. Bei diesem Design werden eine verbesserte Elektronik und Software für einen einfacheren Messprozess genutzt, mit welchem Anwenderfehler (ungleiche Küvetten oder falsche Probenpositionierung) vermieden werden können. Referenzstrahlphotometer haben die gleiche Leistungsfähigkeit wie Standard-Zweistrahlphotometer, die heutzutage oft nur noch bei Geräten für die Forschung zum Einsatz kommen.

Probenfach

Das Probenfach eines UV-Vis-Spektralphotometers ist gewöhnlich ein schwarzer Kasten mit Deckel. Die mattschwarze Farbe im Kammerinneren hilft, in die Kammer gelangtes Streulicht zu absorbieren.

Die Probe wird so in das Probenfach gesetzt, dass der Strahl vom Monochromator die Probe passiert. Wie oben erwähnt, werden für flüssige Proben Glas, Kunststoff- oder Quarzglasküvetten (Abb. 15) verwendet. Feststoffproben werden von einem Halter, der am Boden des Probenfachs befestigt ist, in Position gehalten. Das Licht kann auch mit Faseroptiken aus dem Probenfach geleitet werden. Faseroptiken sind insbesondere bei der Messung von sehr großen, heißen, kalten, radioaktiven oder anderen gefährlichen Proben nützlich. In Abbildung 6 ist dargestellt, wie Licht aus dem Spektralphotometer durch eine Faseroptik-Sonde zur Probe geleitet werden kann, um Lösungen außerhalb des Probenfachs zu messen. Es kann auch eine Faseroptik verwendet werden, die die Messung von Reflexion, Fluoreszenz oder Transmission einer Feststoffprobe erlaubt.

Der Detektor

Ein Detektor wandelt Licht von der Probe in ein elektrisches Signal um. Im Idealfall sollte ein Detektor (genau wie eine Lichtquelle) über einen großen Wellenlängenbereich hinweg ein lineares Ansprechen (Response) mit geringem Rauschen und hoher Empfindlichkeit liefern. Spektralphotometer sind gewöhnlich mit einem Photomultiplier- oder einem Photodioden-Detektor ausgestattet. Hochleistungssysteme sind unter Umständen mit anderen spezialisierten Detektoren ausgestattet, die die Wellenlängenabdeckung oder -empfindlichkeit verbessern.

Jeder Detektor besitzt unterschiedliche Empfindlichkeiten und Wellenlängenbereiche. Sind mehrere Detektoren vorhanden, schaltet das System während der Messung zum passenden Detektor des erforderlichen Wellenlängenbereichs um.

Photomultiplier-Röhre (PMT)

Eine Photomultiplier-Röhre (Abb. 17) wandelt das Lichtsignal in ein elektrisches Signal um und verstärkt dieses mehrfach im Inneren der Röhre. Die Eigenschaften des Kathodenmaterials bestimmen die spektrale Empfindlichkeit. Eine einzige PMT liefert eine gute Empfindlichkeit über den gesamten UV-Vis-Bereich von 200 nm bis 900 nm. Ein PMT-Detektor besitzt eine hohe Empfindlichkeit bei niedrigen Lichtintensitäten. Bei verdünnten Proben passiert das meiste auf die Probe fallende Licht die Probe und kommt beim Detektor an. Die Unterschiede zwischen Blindprobe und Messprobe sind daher gering, und der Detektor muss bei diesen Hochintensitätsbedingungen ein niedriges Signalrauschen besitzen.

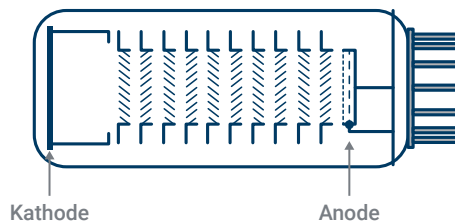
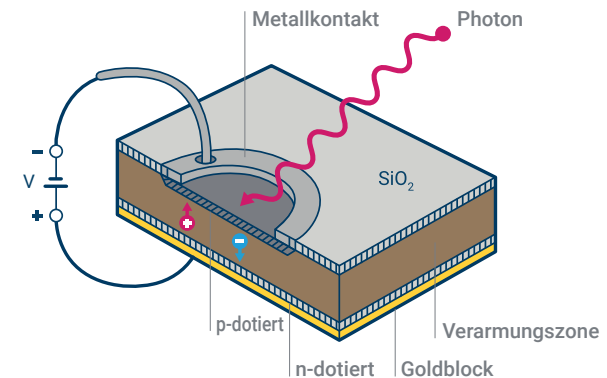


Abb. 17: Detektor mit Photomultiplier-Röhre.

Siliziumdioden (Si)

In modernen Spektralphotometern werden oft Detektoren mit Siliziumphotodioden (Abb. 18) verwendet. Photodioden-Detektoren besitzen einen größeren dynamischen Bereich und sind robuster als PMT-Detektoren. In einer Photodiode fällt Licht auf das Halbleitermaterial und verursacht einen elektrischen Strom. Dadurch wird die Ladung im am Material angeschlossenen Kondensator verringert. Die Ladungsmenge, die nötig ist, den Kondensator in regelmäßigen Abständen wieder aufzuladen, ist proportional zur Lichtintensität. Die Detektionsgrenzen für Detektoren auf Siliziumbasis liegen bei ungefähr 170 nm bis 1100 nm.

Abb. 18: Siliziumphotodioden-Detektor.



Indiumgalliumarsenid(InGaAs)-Photodiode

InGaAs-Detektoren sind spezialisierte Detektoren mit hervorragenden Leistungen im sichtbaren und NIR-Wellenlängenbereich. InGaAs-Detektoren sind als Schmalband- (800 nm bis 1700 nm) und Breitband-Option (800 nm bis 2500 nm) erhältlich. Diese Detektoren zeichnen sich durch eine lineare Response und Empfindlichkeit im Nahinfrarotbereich aus.

Bleisulfid(PbS)-Detektor

Der in NIR-Spektralphotometern am häufigsten verwendete Detektor ist der PbS-Detektor. Dieser Detektor ist zwischen 1000 nm und 3500 nm empfindlich. Bei Hochleistungsspektrophotometern mit breitem Wellenlängenbereich wird ein PbS-Detektor oft mit einem PMT-Detektor kombiniert, um den gesamten UV-Vis-Bereich abzudecken. Ist eine hohe Empfindlichkeit bei niedrigen NIR-Frequenzen erforderlich, kann ein PbS-Detektor mit einem Schmalband-InGaAs-Detektor kombiniert werden.

3. Auswahl der optimalen Parameter für UV-Vis-Messungen

Die Auswahl der am besten geeigneten Probenhalterungen, Lösemittel und Geräteparameter sind für den Messerfolg entscheidend wichtig.

3.1 Auswahl der Küvetten

Flüssige Proben werden gewöhnlich in einer Küvette (eine andere Bezeichnung ist „optische Zelle“ oder nur „Zelle“) gemessen. Küvetten werden in den verschiedensten Formen für unterschiedliche Applikationen angeboten. Dazu gehören:

- Eine optische Standardküvette mit einer Schichtdicke von 10 mm (siehe Abb. 15). Die Küvette nimmt ein Volumen von ca. 3,5 ml auf und besitzt zwei optische Fenster, die parallel zueinander stehen. In der Regel sind die anderen beiden Seiten matt oder gerillt, was darauf hinweist, dass diese Seiten für die Handhabung der Küvette vorgesehen sind. Die optischen Fenster müssen so sauber wie möglich sein und dürfen nie berührt werden. Kratzer auf den optischen Oberflächen müssen vermieden werden, auch bei der Reinigung und sonstigen Handhabung. Es stehen auch Einwegküvetten zur Verfügung, die begrenzt einsetzbar sind. Einwegküvetten werden aus Polystyrol oder Polymethylmethacrylat (PMMA) hergestellt und eignen sich nicht für erhöhte Temperaturen. Polystyrol lässt kein UV-Licht durch. Daher können nur Messungen zwischen 340 nm und 800 nm durchgeführt werden. PMMA-Küvetten eignen sich bis 300 nm.
- Für kleine Volumen (ca. 0,5 ml) stehen Semimikroküvetten zur Verfügung. Die Außenabmessungen entsprechen ungefähr denen einer Standardküvette, es befindet sich jedoch nur ein enger Kanal im Inneren, damit weniger Probe erforderlich ist. Außerdem sind Ultramikroküvetten erhältlich, die u. U. mit nur 0,5 µl Probenvolumen auskommen. Durch Schwärzung der Seiten des optischen Fensters (siehe Abb. 19 und Abb. 20) werden interne Reflexionen im Innern der Küvette verhindert. Es muss sorgfältig darauf geachtet werden, dass die Küvette auf der richtigen optischen Höhe im Strahlengang des UV-Vis-Geräts sitzt. Diese Höhe wird auch als z-Höhe bezeichnet. Die z-Höhe ist der Abstand vom Boden der Küvette bis zum Mittelpunkt des Querschnitts des optischen Wegs.

Semi- bzw. Ultramikroküvetten sind nützlich, wenn die Probenvolumen begrenzt sind.

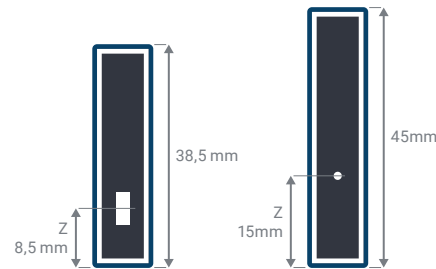


Abb. 19: Durch „Maskierung“ der Küvetten wird sichergestellt, dass die Strahlen durch die Probe fallen. Es ist sehr wichtig sicherzustellen, dass die z-Höhe der Küvette mit dem verwendeten UV-Vis-Spektralphotometer kompatibel ist.



Abb. 20: Semimikroküvette, Schichtdicke 10 mm, Volumen 1,4 ml.

Bei Messung von mehreren Flüssigproben kann eine Durchflussküvette verwendet werden. Auch Durchflussküvetten sind mit verschiedenen internen Küvettenvolumen und Schichtdicken erhältlich. Die Durchflussküvetten werden in der Regel an eine peristaltische Pumpe angeschlossen. Auch ein Anschluss an einen automatischen Probengeber ist möglich. Die Pumpe befördert die Probe durch die Schläuche in die Küvette, die sich auffüllt und dann gemessen werden kann. Anschließend wird eine Spüllösung durch die Küvette befördert, um die Küvette zu reinigen. Dann kann die nächste Proben in die Zelle gepumpt werden.



Abb. 21: Durchflusszelle, mit rechteckiger Apertur 4 x 11 mm, Schichtdicke 10 mm. Dargestellt mit Anschlüssen und Schläuchen.

Die meisten optischen Zellen werden mit einer Kappe oder einem Deckel geliefert. Eine Kappe soll ein versehentliches Verschütten bzw. die Verdampfung der Probe verhindern. Insbesondere für die Messung flüchtiger oder gefährlicher Proben wird eine Kappe ausdrücklich empfohlen.

Küvetten-schichtdicke

Die Schichtdicke bezieht sich auf den Weg, den das einfallende Licht durch eine Probe zurücklegt. Küvetten sind mit unterschiedlichen Schichtdicken erhältlich. Die Schichtdicke muss abhängig von der Absorption der Probe gewählt werden:

- Für konzentrierte Proben mit hoher Absorption (>3 OD) werden Küvetten mit niedrigen Schichtdicken (ca. 5 mm oder weniger) benötigt. Oder aber die Proben müssen verdünnt werden. Küvetten mit niedrigen Schichtdicken eignen sich auch bei Lösemitteln mit hoher Extinktion.
- Für verdünnte Proben mit niedriger Absorption ($<0,2$ OD) werden hohe Schichtdicken (bis zu 100 mm) benötigt, was die Absorptionsmesswerte erhöht. Auf diese Weise kann auch die Fehleranfälligkeit gesenkt werden.

Die meisten UV-Vis-Spektralphotometersysteme werden mit einem Küvettenhalter für eine Standardküvette (Schichtdicke 10 mm) geliefert. Für Küvetten mit höheren Schichtdicken ist ein Küvettenhalter von entsprechender Länge erforderlich.

Küvetten mit niedrigen Schichtdicken sind mit den Abmessungen einer Standardküvette (Schichtdicke 10 mm) erhältlich. Diese Küvetten passen in den standardmäßigen Küvettenhalter, der im Lieferumfang des Geräts enthalten ist. Es sind außerdem Abstandhalter erhältlich, mit der kleinere Küvetten mit niedrigerer Schichtdicke sicher im Küvettenhalter positioniert werden können.

Material

Die optischen Eigenschaften des Materials der Küvettenfenster sind wichtig. Quarzglas ist die erste Wahl, wenn ein großer Wellenlängenbereich erforderlich ist. Quarzglas ist teurer als optisches Glas bzw. Kunststoff, die in Frage kommen, wenn keine Messungen unter 340 nm (Polystyrol) bzw. unter 350 nm (optisches Glas) durchgeführt werden sollen. Polystyrolküvetten eignen sich nicht zur Verwendung bei erhöhten Temperaturen. Es muss außerdem darauf geachtet werden, dass die Proben/Lösemittel die Polystyrolküvetten nicht beschädigen. Polystyrolküvetten werden oft als Einweg- oder Kunststoffküvetten bezeichnet. Sie zerkratzen leicht und sind für den einmaligen Gebrauch vorgesehen. In Tabelle 1 wird die Transmission von häufig verwendeten Materialien im UV- bzw. Nah-Infrarot-Wellenlängenbereich dargestellt.

Tabelle 1: Transparenzfenster üblicher Küvettenmaterialien

Material	Geeignete Wellenlänge (nm)
Quarz	170-2700
Infrasil-Quarz (NIR)	220-3800
Optisches Glas	334-2500
Polystyrol (Einweg)	340-800

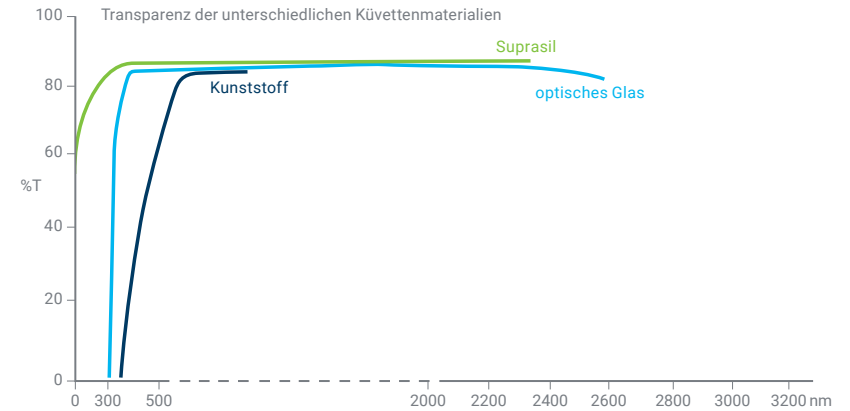


Abb. 22: Transparenz der gängigsten optischen Küvettenmaterialien.

Küvettenpaare

Einige Küvetten sind als aufeinander abgestimmte Küvettenpaare erhältlich und werden in UV-Vis- und UV-Vis-NIR-Routineanalysen verwendet. Die Extinktions- bzw. Transmissionswerte dieser leeren oder mit Wasser gefüllten Paare sind sehr ähnlich. Der Paarcode ist wie eine Chargennummer. Er bezieht sich auf die Transmissionseigenschaften der (geschmolzenen) Rohmaterialcharge, aus der die Küvetten hergestellt werden.

Bei einem Küvettenpaar muss die Transmissionstoleranz bei einer bestimmten Wellenlänge innerhalb des zulässigen Bereichs liegen. Beispielsweise sollten die Transmissionswerte eines Paares bei 200 nm nicht mehr als 1,5 % voneinander abweichen. Die Küvettenhersteller geben die Transmissionstoleranzen der verwendeten Materialien bei den gemessenen Wellenlängen an.

Die Paarcodes sind nur beim Vergleich neuer Küvetten wirklich nützlich. Die Transmissionseigenschaften ändern sich im Laufe der Zeit, weil die Oberfläche verschmutzt wird oder sich beim Reinigen oder bei einer fehlerhaften Verwendung abnutzt. Daher stimmen brandneue Küvetten nicht unbedingt mit gebrauchten älteren Zellen mit dem gleichen Paarcode überein.

Dank moderner Herstellungs- und Fügetechniken konnten die Flachheit, die Parallelität und die Konstruktionstoleranzen verbessert werden. Gleichzeitig wird die Qualität der Rohmaterialien besser überwacht. Daher besteht heutzutage praktisch kein Bedarf mehr nach Paarung von hochwertigen Standardküvetten aus Quarzglas.

Sauberkeit

Die Fette in Fingerabdrücken absorbieren erheblich im UV-Bereich. Fingerabdrücke auf optischen Oberflächen können zu Messfehlern führen. Vor der Verwendung sollten daher alle Fingerabdrücke und Kontaminationen mit einem sauberen, weichen Tuch abgewischt werden. Achten Sie darauf, dass sich auf dem Tuch keine Reinigungs- oder Schmiermittel befinden. Brillenputztücher oder Reinigungstücher für andere Anwendungen enthalten oft Reinigungs- oder Schmiermittel, die Ihre Messungen beeinträchtigen können.

Reinigen Sie Glas- oder Quarzglasküvetten nicht in einem Ultraschallbad. Ultraschallbäder erzeugen Ultraschallwellen mit unterschiedlichen Frequenzen. Wenn Ihr Ultraschallbad Frequenzen erzeugt, die mit der Küvette resonant sind, dann bricht die Küvette.

Fluorhaltige Säuren wie Flusssäure (HF) müssen in allen Konzentrationen vermieden werden, da sie Quarzglas und Glas angreifen. Auch stark alkalische Lösungen (pH 9,0 und darüber) greifen die Fensteroberfläche an und verkürzen die Lebensdauer der Küvette.

Nach der Messung des Blindwerts sollte das optische Fenster der Küvette nicht mehr gereinigt werden. Kann eine Reinigung nicht vermieden werden, muss ein neuer Blindwert gemessen werden. Erst dann können Sie mit den Probenmessungen fortfahren.

Weitere Hinweise zum Umgang mit Küvetten

Damit die Küvetten eine möglichst lange Lebensdauer haben, sollten Sie einige einfache Maßnahmen beachten.

- Entfernen Sie die Proben sofort nach der Messung aus den Küvetten. Auf diese Weise vermeiden Sie ein Antrocknen der Probe in der Küvette und damit klebrige Ablagerungen. Dies gilt ganz besonders im Fall von Proteinen und intensiven Farbstoffen, die bekanntermaßen an den Innenflächen der Küvette haften. Entfernen Sie diese Proben sofort nach der Messung aus der Küvette und spülen Sie die Küvette zwischen Proben gründlich mit Ihrem Lösemittel.
- Wird eine Probe über eine lange Zeit gemessen, sollte die Küvette mit einer Kappe verschlossen und bei einer geeigneten Temperatur gehalten werden, um Verdunstung auf ein Minimum zu begrenzen. Einige Proben müssen ständig gerührt werden.
- Am Ende des Tages reinigen Sie alle Küvetten und:
 - bewahren Sie sie nach dem Trocknen in einem geeigneten Behälter auf oder
 - bewahren Sie sie nass in einer leicht sauren Lösung (1 % Salpeter- oder Salzsäure) in einem säureresistenten Becherglas auf. Bewahren Sie nur je eine Küvette in einem Becherglas auf, damit Sie die Küvettenränder nicht anschlagen. Unmittelbar vor der nächsten Verwendung spülen Sie die Küvette mit reichlich Wasser.



Messung der Displays von Mobiltelefonen

Die Entwickler von Bildschirmen für Mobiltelefone, Tablet- und Laptop-Computer und Fernseher streben nach möglichst dünnen Konstruktionen. Schon eine Reduktion der Dicke um wenige Dutzend Mikrometer hat eine signifikante Auswirkung auf die Gesamtgröße eines Geräts. Bei diesen Bildschirmen dienen lichtemittierende Dioden (LED) als Lichtquelle und Flüssigkristalldisplays (LCD) der Farbgebung, während Hintergrundlichtreflektoren für die gleichmäßige Beleuchtung sorgen. Hintergrund-Reflektoren werden gewöhnlich aus einem transparenten Polymermaterial hergestellt. Eine Seite wird mit einer Reflektorfolie beschichtet. Die Reflektoren sehen aus wie verspiegelte Kunststofffolie. Die Messung der Reflexion und Transmission der Hintergrundlicht-Reflektoren ist ein entscheidender Schritt bei der Entwicklung eines neuen Designs. Diese Messung ist außerdem eine wichtige Qualitätskontrolle während der Fertigung. Die Reflexion und Transmission eines Hintergrundlicht-Reflektors wird mit einem UV-Vis-Spektralphotometer gemessen. Der Hintergrundlicht-Reflektor wird vertikal im Probenfach befestigt und um seine zentrale Drehachse gedreht, damit die Reflexion und Transmission bei unterschiedlichen Einfallswinkeln gemessen werden können.

[Hier finden Sie die Details der Messungen](#)

3.2 Probentemperierung

Viele Proben können bei Raumtemperatur gemessen werden. In einigen Situationen müssen Proben jedoch erwärmt oder gekühlt werden. Dazu gehören:

- Kühlung von flüchtigen Proben, um ein Verdunsten zu verhindern;
- Erwärmen von viskosen Proben, um die Handhabung der Probe zu erleichtern oder die Homogenität zu verbessern;
- Proben, die sich beim Erwärmen chemisch ändern;
- Beobachtung von Änderungen beim Erwärmen oder Abkühlen von Proben.

Zur Temperaturkontrolle von Proben kann Zubehör in UV-Vis-Spektralphotometern installiert werden. Einfachste Temperaturregelsysteme eignen sich für Messungen bei einer bestimmten Temperatur. Dazu pumpt eine Umwälzpumpe temperiertes Wasser durch einen Küvettenwechsler, in dem sich die Probenküvette befindet. Eine präzisere Temperaturregelung kann durch ein Peltier-Element erzielt werden, das im Küvettenwechsler eingebettet ist. Peltier-Elemente erlauben eine bessere Temperaturregelung, z. B. Messungen bei steigenden/fallenden Temperaturen. Luftgekühlte Peltier-Systeme benötigen weniger Wartung als wassergekühlte Peltier-Systeme oder Wassenumwälzsysteme. Wassenumwälzsysteme müssen regelmäßig gewartet, die Wasserschläuche auf Undichtigkeit geprüft und das Kühlmittel aufgefüllt werden. Ein weiterer Vorteil von Peltier-Systemen ist der leise Betrieb, da keine Kühlmittellösung gepumpt werden muss.

Unabhängig von der Wahl der Temperaturregelmethode muss das System die Temperaturüberwachung erlauben. Dazu muss das System mindestens die Temperatur der Probenhalterung melden. Dies ist insbesondere bei externen, auf Wasser basierenden Heizsystemen wichtig. Zwischen dem Wasserbad, das auf eine bestimmte Temperatur eingestellt ist, und der Umwälzpumpe bzw. dem Küvettenwechsler kann Wärme verloren gehen. Bei durch Peltier-Element gesteuerten Systemen wird die Temperatur in der Probenhalterung mit Feedback-Funktion überwacht, um die Temperatur stabil zu halten.

Wenn die Temperaturen besonders wichtig sind, liefern Temperaturmessungen unmittelbar in der Probe ein genaueres Ergebnis. Kleine Temperatursonden werden in die Probe im Inneren der Küvette eingeführt. Die Sonden werden sorgfältig so positioniert, dass sie den Lichtweg nicht behindern. Wird die Probentemperatur auf diese Weise überwacht, sollte die Steuerungssoftware des UV-Vis-Systems die Aufzeichnung der Temperatur jeder Küvette bei jeder Messung erlauben.

3.3 Rühren der Probe

Es ist wichtig, eine thermostatisierte Probe zu rühren, denn so wird sichergestellt, dass die Lösung und die Temperatur immer homogen sind. Rühren ist besonders wichtig bei viskosen Proben oder bei der Untersuchung von chemischen Reaktionen in der Küvette, um sicherzustellen, dass sich die Lösungen gut vermischen.

Ob durch Rühren eine Temperatur- und chemische Homogenität effektiv erreicht werden kann, hängt stark von der Probe, dem Lösemittel und der Viskosität der Lösung ab. Es ist wichtig, bei Temperaturrampen über eine längere Zeit darauf zu achten, dass sich die Viskosität temperaturabhängig ändern kann, was wiederum die Rühreffizienz und Messungen beeinflussen könnte.

Zum Rühren von Lösungen wird eine Magnetrührperle oder ein Magnetrührstern unten in die Probenküvette gesetzt. Es sind besondere Küvetten mit einem Boden mit Vertiefung erhältlich. In dieser runden Vertiefung befindet sich die Rührperle, die Rühreffizienz ist erhöht.

Bei der Entwicklung der analytischen Methode muss sorgfältig darauf geachtet werden, dass sich die Rührgeschwindigkeit für die Lösungen eignet. Ist die Rührgeschwindigkeit zu niedrig, wird die Probe unter Umständen nicht ausreichend gemischt. Ist die Rührgeschwindigkeit zu hoch, können Luftblasen in der Probe entstehen, die zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

Es wird empfohlen, Testversuche mit allen Proben durchzuführen, um die optimale Rührgeschwindigkeit zu ermitteln. Bei Messung von Flüssigkeiten mit einer ähnlichen Viskosität wie Wasser erzielen Rührgeschwindigkeiten von 800 bis 900 U/min gewöhnlich die einheitlichsten Temperaturen in Standardküvetten. Senken Sie die Rührgeschwindigkeit für Proben mit höherer Viskosität und erhöhen Sie die Geschwindigkeit für Proben mit niedriger Viskosität.

3.4 Messungen bei niedrigen Temperaturen

Wenn Proben bei Temperaturen unter Umgebungstemperatur gemessen werden, können die Küvetten außen beschlagen. Dies kann die Messung stören. Ein Beschlagen kann verhindert werden, wenn das Probenfach des UV-Vis-Spektralphotometers mit einem sauberen, trockenen Gas gespült wird. Einige Systeme haben spezielle Spülanschlüsse, damit Gas in das Probenfach geleitet werden kann, ohne dass Licht eindringt. Alternativ können gekühlte Proben mit einer Faseroptik-Tauchsonde gemessen werden. Dazu wird ein Lichtleiterkoppler in das Probenfach eingesetzt, der das einfallende Licht des Systems durch ein Faseroptikkabel zur Tauchsonde leitet, die in die Probe eingetaucht wird (siehe Abb. 6). Das ausgegebene Licht wird durch ein weiteres Faseroptikkabel zurück zum Detektor geleitet. Diese Methode kann dann besonders nützlich sein, wenn Messungen bei vielen Proben und einer festen Temperatur durchgeführt werden sollen.

3.5 Transparenz von Lösemitteln

Bei der UV-Analyse von Flüssigproben oder gelösten Feststoffproben muss die Transparenz der Lösemittel beachtet werden. Lösemittel werden aufgrund der Löslichkeit, der Stabilität, der pH-Anforderungen der Probe und der Cut-off-Wellenlänge im UV-/Vis-Bereich ausgewählt. Ein gutes Lösemittel für in Wasser lösliche Verbindungen ist Wasser, da eine Messung des gesamten UV-Wellenlängenbereichs möglich ist. Bei Verwendung von organischen Lösemitteln ist der effektiv nutzbare UV-Wellenlängenbereich eingeschränkt. Bei Wahl eines Lösemittels müssen Sie sowohl die Löslichkeit der Probe im Lösemittel als auch die Transparenz des Lösemittels im gewünschten UV-Wellenlängenbereich berücksichtigen (siehe Abb. 23).

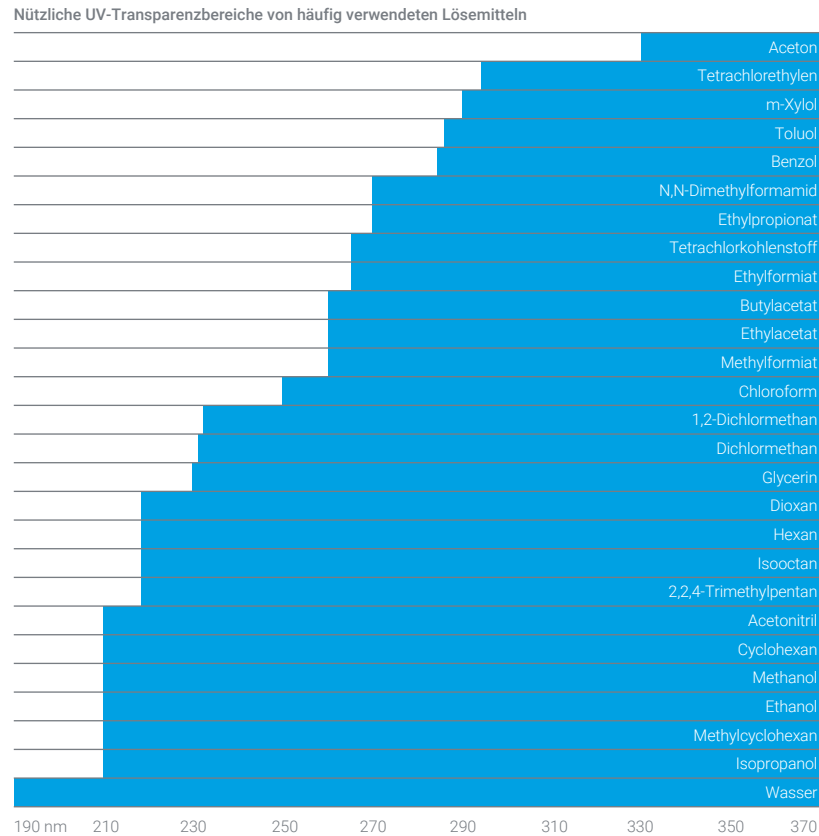


Abb. 23: UV-Transparenzbereiche von häufig verwendeten Lösemitteln. Für UV-Analysen ist Wasser das bevorzugte Lösemittel. Wenn die Probe jedoch nicht wasserlöslich ist, kann ein anderes Lösemittel erforderlich sein.



Ein Molekül, das eine sehr wichtige Rolle spielt

Protoporphyrinmoleküle sind die Lebensgrundlage vieler Pflanzen und Tiere. Im Körper werden in unreifen Blutzellen (Retikulozyten) Zinkatome zur Stabilisierung in die Protoporphyrin-Ringstruktur eingesetzt. Während der Reifung der Retikulozyten wird das Zinkatom durch Eisen ersetzt und bildet so Häm. In den reifen Erythrozyten wird Häm an Globin-Ketten gebunden und Hämoglobin entsteht, das sauerstofftransportierende Molekül in vielen Tieren und im Menschen.

Pflanzen stabilisieren den Protoporphyrin-Ring mit Magnesium und bilden Chlorophyll, die wichtigste Verbindung für die Photosynthese.

Protoporphyrin absorbiert Licht, was nicht überrascht, wenn man an die Bedeutung von Chlorophyll für die Photosynthese denkt. Das Molekül fluoresziert auch. Diese Eigenschaften machen Protoporphyrin zu einem idealen Analyten für die Spektroskopie. Es ist z. B. die Grundlage für den primären Screening-Test auf Bleivergiftung in der Kindheit (1).

1. Clinical and Laboratory Standards Institute, Erythrocyte Protoporphyrin Testing; Approved Guideline, Volume 16, No. 8, 1996

3.6 Optimale spektrale Bandbreite

Bei Messung einer Probe sollte die erforderliche Messauflösung erwogen werden. Die meisten Feststoff- oder Flüssigproben, die im UV-Vis-Bereich spektroskopisch analysiert werden, besitzen natürlich breite Peaks in der Größenordnung von 20 nm von einer Seite zur anderen. Es ist gute Praxis, ein Gerät zu verwenden, dessen spektrale Bandbreite (SBW) auf ein Zehntel der natürlichen Bandbreite des Analyten eingestellt ist. Die SBW eines Geräts ist definiert als Breite der Lichtbande auf halber Höhe des Peakmaximums (siehe Abb. 24). SBW wird manchmal als Halbwertsbreite (FWHM, Full Width at Half Maximum) bezeichnet. Die SBW eines UV-Vis-Spektralphotometers hängt mit dem optischen Spalt des Monochromators zusammen.

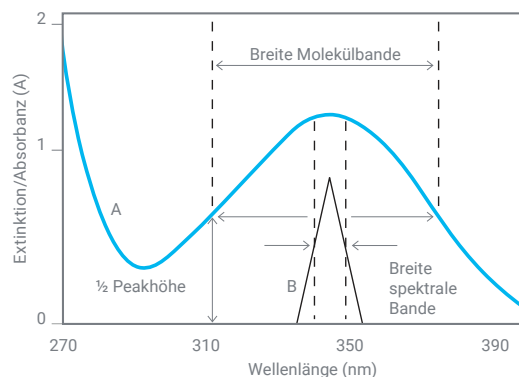


Abb. 24: Spektrum A besitzt ein Peakmaximum in der Nähe von 345 nm. Die spektrale Bandbreite ist dargestellt. Die spektrale Spaltbreite des UV-Vis-Spektralphotometers ist immer kleiner als die erforderliche spektrale Bandbreite.

Je nach Spektralphotometerdesign besitzt der optische Spalt entweder eine feststehende oder eine variable Breite. Die meisten UV-Vis-Spektralphotometer der mittleren Preisklasse besitzen eine feststehende spektrale Bandbreite von 1,5 nm. Diese reicht für die Peakauflösung der meisten Flüssig- und Feststoffproben. Eine größere SBW lässt mehr Licht durch die Probe und kann mit einer besseren Datenqualität und weniger Rauschen verbunden sein. Scharfe bzw. eng beieinanderliegende Probenpeaks können jedoch nicht aufgelöst werden. Mit einer kleineren SBW kann die Auflösung verbessert werden, die für die Datenerfassung benötigte Zeit bei gleicher Datenqualität kann sich jedoch verlängern, da weniger Licht in die Probe gelangt.

Hochleistungsgeräte bzw. Spektralphotometer für die Forschung sind dagegen oft so konstruiert, dass Anwender die Spaltbreite einstellen und damit die Auflösung des Systems anpassen können. Dies ist bei anspruchsvolleren Proben hilfreich. Die Spaltbreite kann maximiert werden, um bei Proben mit hoher Absorption, bei denen keine hohe Peakauflösung erforderlich ist, mehr Licht durchzulassen. Je mehr Licht im Detektor ankommt, desto besser sind die Methodenreproduzierbarkeit, Genauigkeit und Präzision der Ergebnisse. Ist eine hohe Auflösung erforderlich, kann die Spaltbreite verringert werden (siehe Abb. 25 und 26).

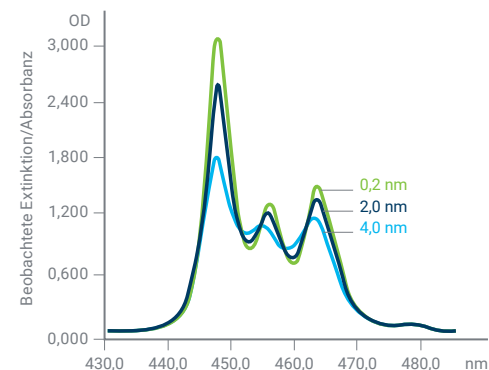


Abb. 25: Überlagerung von Scans, die bei unterschiedlicher Spaltbreite gemessen wurden. Mit steigender Spaltgröße steigt das Signal/Rausch-Verhältnis, aber die Auflösung nimmt ab.

Als Faustregel gilt, dass die Spaltbreite ein Zehntel der Molekülbandenbreite der Proben betragen sollte (siehe Beispiele in Tabelle 2).

Tabelle 2: Empfohlene Einstellungen der spektralen Bandbreite bei gängigen UV-Vis-Messungen

Repräsentative Verbindung	Peak, nm	Bandbreite, nm	Optimum (SBW) nm
Aminosäuren			
Tryptophan	279	45	4,5
Tyrosin	275, 195	40, 10	4,0, 1,0
Phenylalanin	258	2,2	0,2
Nukleotide			
Adenosin	260	28	2,8
Thymin	265	30	3
Proteine			
Cytochrom c, oxidiert	410	25	2,5
Rhodopsin	500, 278	~90, 25	9, 2,5
Ribonuklease	278	20	2
Pigmente und Farbstoffe			
β-Carotin	480	35	3,5
Chlorophyll a	660	20	2
Coenzyme			
Nikotinamidadenindinukleotid	260	35	3,5
NADH	340, 260	50, 25	5, 2,5
Einfache organische Moleküle			
Benzol, Dampf	253	<< 0,1	<< 0,01
Benzol, Lösung	253	2	0,2
Anthracen	375	3	0,3

Bei der Optimierung der spektralen Auflösung sollte außerdem das Datenintervall der Erfassung berücksichtigt werden. Es müssen mindestens drei Datenpunkte eines Peaks erfasst werden. Kürzere Datenintervalle sind zwar mit einer besseren Auflösung verbunden, das Datenintervall und die Dauer der Datenerfassung müssen jedoch gegeneinander abgewogen werden.

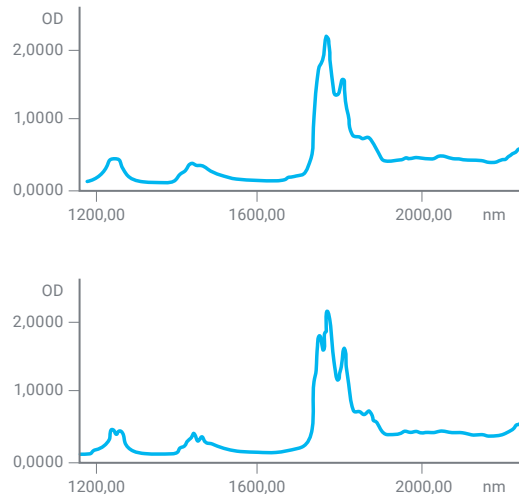


Abb. 26: Diese beiden Spektren belegen die Wirkung von zwei unterschiedlichen SBW auf die Auflösung. Bei einer SBW von 15 nm (oben) sind im Spektrum wenige strukturelle Details erkennbar. Bei einer SBW von 3 nm (unten) sind die Peaks sehr viel mehr definiert.

3.7 Streulicht

Streulicht bzw. Streustrahlungsenergie (SRE, Stray Radiant Energy) ist definiert als prozentualer Anteil der Strahlung, die im Detektor ankommt, aber nicht im ausgewählten spektralen Band liegt. Diese Strahlung entsteht durch Mängel des Gerätedesigns (Licht der Lampen im Labor oder Tageslicht von Fenstern gelangt in das Gerät oder der Monochromator kann das einfallende Licht nicht gut trennen) oder durch Geräteschäden. Die meisten Systeme sehen Prüfungen der Geräteleistungen vor, mit denen Streulichtprobleme erkannt werden können. Diesem Zweck dient eine Testlösung. Testlösungen für Streulichtprüfungen lassen bei den angegebenen Wellenlängen kein Licht durch (jedoch bei anderen Wellenlängen). Wird also Transmission bei den angegebenen Wellenlängen beobachtet, ist diese auf Streulicht zurückzuführen.

Streulicht senkt die Absorptionsmesswerte und ändert die beobachtete Peakform (siehe Abb. 27). Streulicht erzeugt so Abweichungen vom Lambert-Beerschen Gesetz (siehe Abb. 28) und macht Konzentrationsmessungen unzuverlässig. Die Leistungen eines UV-Vis-Geräts im Hinblick auf Streulicht bestimmen außerdem den maximalen Extinktionswert, den ein Gerät messen kann.

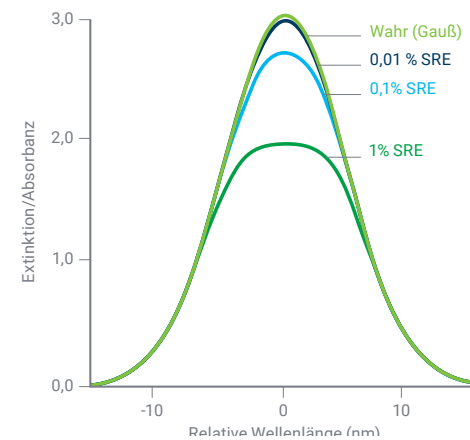


Abb. 27: Mit steigendem Streulicht im Gerät sinkt der maximale Extinktionswert der Peaks und die Kurven werden flacher.

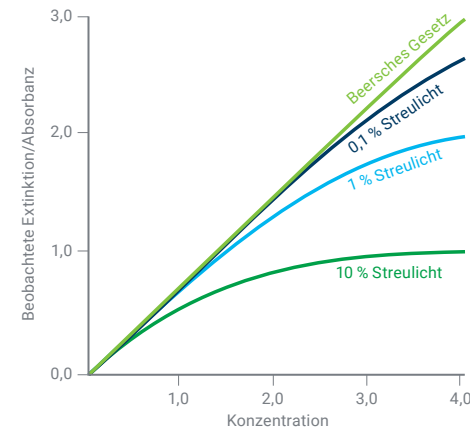


Abb. 28: Bei Streulicht in einem UV-Vis-System gilt das Lambert-Beersche Gesetz nicht mehr. Berechnungen der Konzentration werden so unzuverlässig.

3.8 Der lineare Bereich eines UV-Vis-Geräts

Das Gerätedesign und die Messparameter bestimmen die maximale Extinktion, die ein Gerät bei einer bestimmten Wellenlänge messen kann. Ist die Extinktion hoch, kommt nur sehr wenig Licht am Detektor an. Dies senkt das Signal/Rausch-Verhältnis (siehe die charakteristischen „Fransen“ in den Spektren in Abb. 29). Wenn Sie die Grenzen Ihres Systems verstehen, können Sie Probenmessungen und Kalibrierungen vermeiden, die die Leistungsfähigkeit des Geräts übersteigen. Flüssige Proben können zum Beispiel verdünnt werden, damit die Messung im linearen Bereich des Geräts erfolgen kann. Oder aber Sie verwenden eine Küvette mit kleiner Schichtdicke.

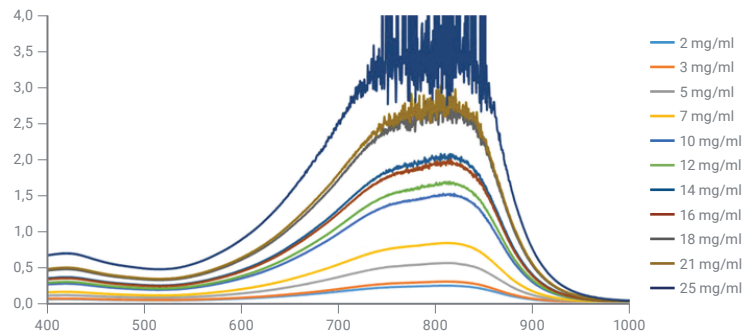


Abb. 29: Mit steigender Absorption der Probe kommt immer weniger Licht im Detektor an. Dies erhöht das Rauschen der Ergebnisse und im Scanmodus werden offensichtlich verrauschte Signale beobachtet.

3.9 Weitere nützliche Informationen

In der UV-Vis-Spektroskopie wird oft die Extinktion (E, auch A für Absorbanz und OD für optische Dichte, wenn Schichtdicke = 10 mm) gemessen, da die Konzentration und die Extinktion gemäß Lambert-Beerschen Gesetz eine lineare Beziehung zueinander haben. Bei anderen Applikationen kann es bedeutsamer sein, das durchgelassene bzw. absorbierte Licht als prozentualen Anteil anzugeben. Beim Vergleich der optischen Eigenschaften eines Materials kann es nützlich sein, die prozentualen Transmissions- oder Extinktionsunterschiede zu vergleichen.

Die meisten UV-Vis-Spektralphotometersysteme erlauben eine Umwandlung der erfassten Daten je nach gewünschtem Parameter. Die Beziehung zwischen diesen Parametern ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Die Beziehung zwischen prozentualer Transmission und Extinktion ist schwer zu visualisieren. In der Tabelle wird ersichtlich, dass eine Probe mit 7 OD nur 0,00001 % des Lichts durchlässt.

%T	T	OD	%A	LogA
100	10	0	0	–
50	0,5	0,3	50	-0,52
10	0,1	1	90	0
1	0,01	2	99	0,3
0,1	0,001	3	99,9	0,48
0,01	0,0001	4	99,99	0,60
0,001	0,00001	5	99,999	0,70
0,0001	0,000001	6	99,9999	0,78
0,00001	0,0000001	7	99,99999	0,85

3.10 Wellenlänge oder Wellenzahl

Die meisten UV-Vis-Messungen werden in Abhängigkeit von der Wellenlänge in nm (1×10^{-9} m) angegeben. In einigen älteren Arbeiten wird der Kehrwert der Wellenlänge, d. h. die Wellenzahl (cm^{-1}), verwendet. In der Infrarot(IR)-Spektroskopie wird gewöhnlich die Wellenzahl angegeben. Die Angabe in Wellenzahlen ist nützlich, da sie die Änderung der Energieniveaus der einfallenden Strahlung repräsentieren. Eine kürzere Wellenlänge ist mit einer höheren Wellenzahl und einer höheren Energie verbunden (siehe Tabelle 4).

In der Infrarotspektroskopie können die spektralen Unterschiede bei allmählich kürzeren Wellenlängen mithilfe der Wellenzahlen besser visualisiert werden.

In der UV-Vis-Spektroskopie gilt die Wellenlänge allgemein als praktische Größe bei der Visualisierung der angezeigten Spektren über einen Spektralbereich.

Die meisten UV-Vis-Spektralphotometer ermöglichen die Erfassung eines Spektrums in Abhängigkeit zur Wellenlänge oder Wellenzahl.

Tabelle 4: Umwandlung von Wellenlänge (nm) in Wellenzahl (cm^{-1}).

λ nm	cm^{-1}
3300	3030
3000	3300
2500	4000
2000	5000
1500	6666
1000	10 000
800	12 500
600	16 667
400	25 000
200	50 000
175	57 143

4. Überblick über gängige UV-Vis-Applikationen

4.1 Identifizierung – Spektren und Struktur

UV-Vis-Spektren zeigen im Allgemeinen nur wenige breite Absorptions-Peaks. Im Vergleich zu anderen Methoden wie z. B. der Infrarotspektroskopie, die viele enge Peaks liefern, vermitteln UV-Vis-Spektren nur wenige qualitative Informationen. Es ist schwierig, eine Verbindung anhand eines charakteristischen Spektrums zu identifizieren, wenn nur einige wenige breite Peaks vorhanden sind.

Absorption organischer Substanzen beruht hauptsächlich auf der Anwesenheit von π -Bindungen (d. h. konjugierter Elektronen). Ein Chromophor ist eine funktionelle Gruppe eines Moleküls, die üblicherweise eine π -Bindung enthält. Wird ein Chromophor an einen gesättigten Kohlenwasserstoff (welcher im UV-Vis-Bereich nicht absorbiert) gebunden, entsteht eine Verbindung mit einer Absorption zwischen 185 und 1000 nm. In Tabelle 5 sind einige Chromophore und die Wellenlängen ihrer Absorptionsmaxima aufgeführt.

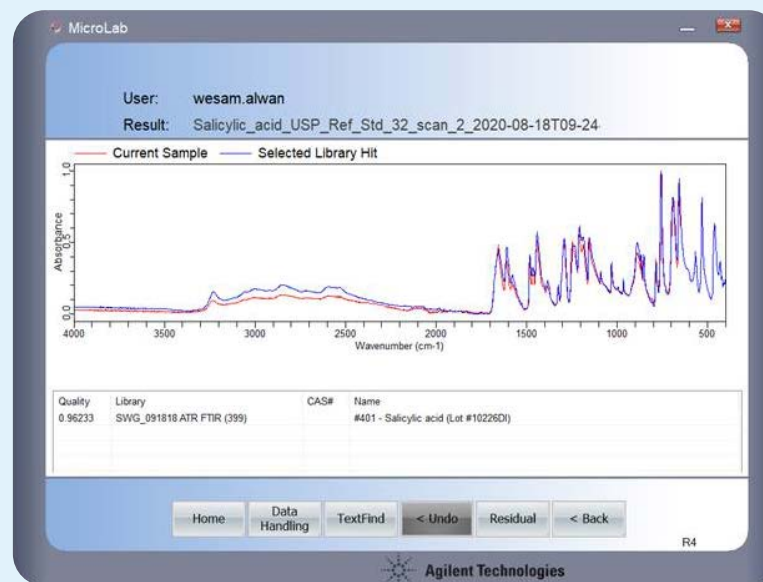
Tabelle 5: Ausgewählte Chromophore und die Wellenlänge ihrer Absorptionsmaxima

Chromophor	Formel	Beispiel	λ_{max} (nm)
Carbonyl (Keton)	$\text{RR}'\text{C}=\text{O}$	Aceton	271
Carbonyl (Aldehyd)	$\text{RHC}=\text{O}$	Acetaldehyd	293
Carboxyl	RCOOH	Essigsäure	204
Amid	RCONH_2	Acetamid	208
Ethylen	$\text{RCH}=\text{CHR}$	Ethylen	193
Acetylen	$\text{RC}=\text{CR}$	Acetylen	173
Nitril	$\text{RC}=\text{N}$	Acetonitril	< 160
Nitro	RNO_2	Nitromethan	271

Eine Absorptionsbande bei einer bestimmten Wellenlänge ist ein guter Hinweis auf die Gegenwart eines Chromophors. Die Wellenlängenposition des Absorptionsmaximums ist jedoch nicht konstant und hängt teilweise von der molekularen Umgebung des Chromophors und vom Lösemittel ab, in dem die Probe gelöst ist. Auch Parameter wie pH-Wert und Temperatur können die Intensität und die Wellenlängenposition des Absorptionsmaximums beeinflussen.

Verbindungen können anhand von FTIR-Spektren identifiziert werden

Fourier-Transform-Infrared-(FTIR)-Spektren enthalten sehr viel mehr Informationen als UV-Vis-Spektren. Ein gemessenes Spektrum (rot) kann mit FTIR-Bibliotheksspektren verglichen werden, um die Verbindung zu identifizieren. In diesem Fall handelt es sich um Salicylsäure (Bibliotheksspektrum von Salicylsäure ist blau dargestellt).



Die Vergrößerung des konjugierten Systems durch weitere Doppelbindungen erhöht die Intensität und die Wellenlänge der Absorptionsbande. Bei einigen molekularen Systemen, wie konjugierten Kohlenwasserstoffen oder Carotinoiden, ist das Verhältnis zwischen Intensität und Wellenlänge systematisch untersucht worden. Auch die Übergangsmetalle haben elektronische Energieniveaus, die eine Absorption im sichtbaren Bereich zwischen 400 nm und 700 nm ermöglichen.

4.2 Bestätigung der Identität

Eine unbekannte Substanz kann mithilfe von UV-Vis-Spektren zwar nicht eindeutig identifiziert werden, durch Vergleich eines gemessenen Spektrums mit einem Referenzspektrum kann die Identität jedoch bestätigt werden. Bei sehr ähnlichen Spektren können Ableitungsspektren verwendet werden. Je höher die Ordnung der Ableitung, desto größer die Anzahl der Banden (siehe Abb. 30). Diese komplexen Ableitungsspektren können insbesondere bei qualitativen Analysen nützlich sein, entweder zur Charakterisierung von Materialien oder zur Identifizierung. Das Steroid Testosteron besitzt z. B. ein einziges, sehr breites Absorptionsspektrum bei 330 nm ohne besondere Merkmale. Die zweite Ableitung besitzt jedoch sechs unterschiedliche Peaks. Auch bei der Identifizierung einer unbekannten Substanz kann diese höhere Auflösung nützlich sein. In Abbildung 30 ist ein computersimuliertes Spektrum dargestellt. Werden zwei Gaußsche Banden mit einer natürlichen spektralen Bandbreite (NBW) von 40 nm im Abstand von 30 nm simuliert, ergibt sich eine einzige Bande im Absorptionsspektrum, wobei der Spitzenwert in der Mitte zwischen den beiden ursprünglichen Banden liegt. Die beiden Komponenten werden nicht aufgelöst. In der vierten Ableitung des Spektrums sind diese beiden Banden deutlich sichtbar, und die Maximalwerte befinden sich in der Nähe von $\lambda_{\max}$ der Komponentenbanden.

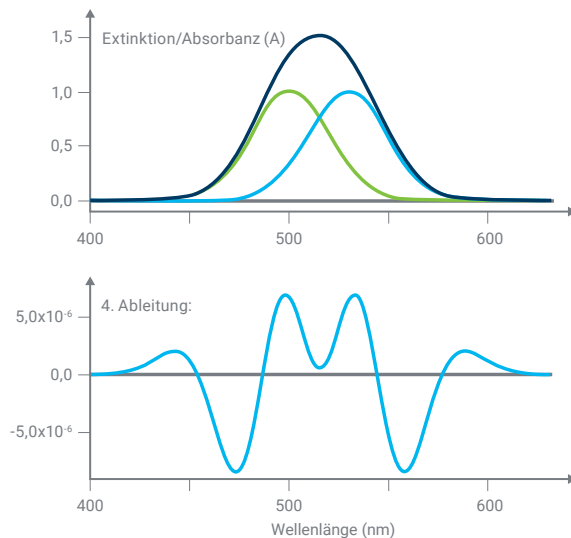


Abb. 30: Verbesserung der Auflösung durch Analyse der Ableitungen. Die ursprünglichen, überlappenden Peaks ergeben einen einzigen, breiten Peak. Durch Verwendung der 4. Ableitung des Spektrums kann die Auflösung der Peakergebnisse deutlich verbessert werden.

4.3 Quantifizierung von Molekülen

Beersches Gesetz

Wenn 100 Photonen (Lichtteilchen) in eine Küvette eintreten und nur 50 Photonen auf der anderen Seite wieder herauskommen, dann ist die Transmission 0,5 bzw. 50 %. Wenn diese 50 Photonen auf eine weitere, identische Küvette einfallen, passieren nur 25 Photonen usw. In Abbildung 31 ist die Transmission gegen die Schichtdicke der Küvette aufgetragen.

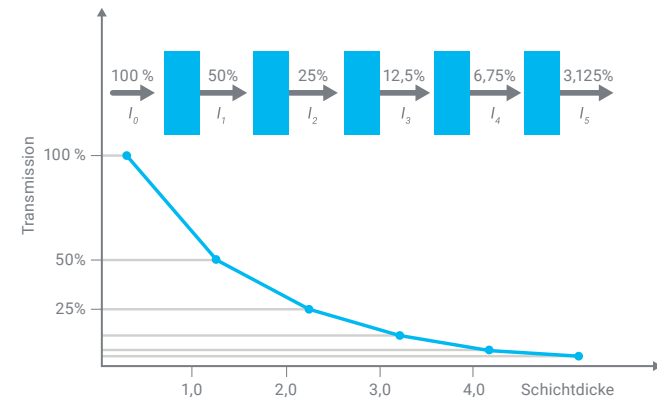


Abb. 31: Transmission und Schichtdicke – das Bouguer-Lambertsche Gesetz.

Dieser erste mathematische Ausdruck dieses Effekts wird allgemein Lambert (1760) zugeschrieben, obwohl es sich mittlerweile herausgestellt hat, dass Bouguer ihn bereits 1729 beschrieben hat. Die Gleichung ist:

$$T = I/I_0 = e^{-kb}$$

Wobei gilt:

- I_0 ist die Intensität des einfallenden Lichts;
- I ist die Intensität des durchgelassenen Lichts;
- e ist die Basis des natürlichen Logarithmus;
- k ist eine Konstante;
- b ist die Schichtdicke (gewöhnlich in cm).

Das Beersche Gesetz entspricht dem Bouguer-Gesetz, es ist allerdings in Konzentrationen ausgedrückt. Die absorbierte Lichtmenge ist proportional zur Anzahl der absorbierenden Moleküle im Strahlengang. In Abbildung 32 ist die Transmission gegen die Konzentration aufgetragen.

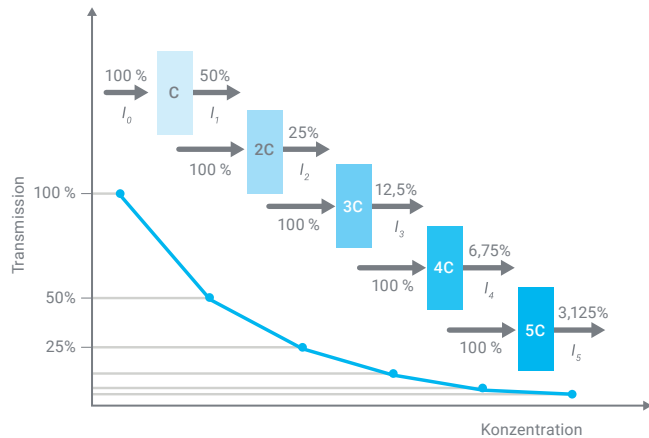


Abb. 32: Transmission und Konzentration – Beersches Gesetz

Durch Kombination dieser beiden Gesetze ergibt sich das Beer-Bouguer-Lambertsche Gesetz:

$$T = I/I_0 = e^{-kbc}$$

wobei **c** die Konzentration der absorbierenden Spezies ist (gewöhnlich in g/l oder mg/l). Diese Gleichung kann logarithmiert und so in einen linearen, normalerweise dekadischen Ausdruck umgewandelt werden:

$$A = -\log T = -\log(I/I_0) = \log(I_0/I) = \epsilon bc$$

wobei **A** für Extinktion (Absorbanz) und **ε** für den molaren Extinktionskoeffizienten (andere Bezeichnung: Absorptionskoeffizient) steht. Dieser Ausdruck ist allgemein als Beersches Gesetz bekannt. In Abbildung 33 ist die Extinktion gegen die Konzentration aufgetragen.

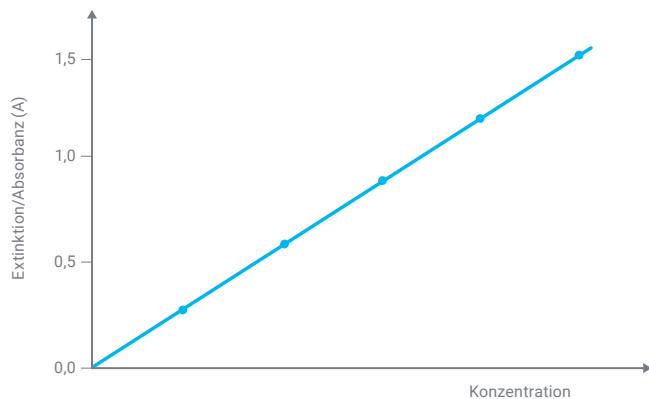


Abb. 33: Das Beer-Bouguer-Lambertsche Gesetz beschreibt eine lineare Beziehung zwischen der Extinktion (Absorbanz) des einfallenden Lichts und der Konzentration des Moleküls.

Der Extinktionskoeffizient (**ε**) ist für eine gegebene Substanz bei präzise definierten Bedingungen (Wellenlänge, Lösemittel und Temperatur) charakteristisch. In der Praxis hängt der gemessene Extinktionskoeffizient auch teilweise von den Eigenschaften des verwendeten Messgeräts ab. Aus diesen Gründen werden in quantitativen Analysen keine vorbestimmten Werte für den Extinktionskoeffizienten verwendet. Stattdessen wird eine Kalibrier- bzw. Arbeitskurve der zu analysierenden Substanz erstellt. Dazu dienen eine oder mehrere Standardlösungen mit bekannten Analytkonzentrationen.

Bei elektronischen Übergängen sind die energetischen Unterschiede zwischen den Grund- und den angeregten Zuständen relativ groß. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass sich alle Moleküle bei Raumtemperatur im elektronischen Grundzustand befinden. Absorption und die Rückkehr zum Grundzustand sind schnelle Prozesse, und das Gleichgewicht wird sehr schnell erreicht. Daher ist die Absorption von UV-/sichtbarem Licht quantitativ sehr präzise. Die einfache lineare Beziehung zwischen Absorption und Konzentration sowie die relativ problemlose Messung des UV-Vis-Lichts haben die UV-Vis-Spektroskopie zur Grundlage Tausender quantitativer analytischer Methoden gemacht. Wenn das Beersche Gesetz für ein Spektrum der 0. Ordnung gilt, gibt es auch bei den abgeleiteten Spektren eine ähnliche lineare Beziehung zwischen Konzentration und Amplitude:

0. Ordnung: $A = \epsilon bc$

1. Ableitung: $dA/d\lambda = (d\epsilon/d\lambda)bc$

n. Ableitung: $d^n A/d\lambda^n = (d^n \epsilon/d\lambda^n)bc$

bei **λ**, wobei **A** für Extinktion (Absorbanz), **ε** für den Extinktionskoeffizienten, **b** für die Schichtdicke und **c** für die Probenkonzentration steht.

Im Rahmen der Quantifizierung einer Einzelkomponente ist die Auswahl der Wellenlängen bei abgeleiteten Spektren schwieriger als im Absorptionsspektrum, da sowohl positive als auch negative Peaks auftreten. Die Ableitungen gerader Ordnungen haben ein Peakmaximum bzw. -minimum bei λ_{max} wie das Absorptionsspektrum. Ableitungen ungerader Ordnungen ergeben bei dieser Wellenlänge einen Schnittpunkt mit der x-Achse. Die Differenz zwischen dem höchsten Maximum und tiefsten Minimum gibt das beste Signal/Rausch-Verhältnis, kann aber auch empfindlicher gegenüber Interferenzen durch andere Komponenten sein.

Das Ergebnis ist nur dann genau, wenn die zu analysierende Probe nur die absorbierende Komponente enthält, für die die Kalibrierung durchgeführt wurde. Handelt es sich bei der Probe um eine Lösung, sollte das reine Lösemittel ohne Analyt als Blindwert verwendet werden. Anhand einer anderen Wellenlänge kann möglicherweise eine Korrektur der Interferenz durch eine störende Komponente erfolgen.

Konzentrationsmessungen

UV-Vis-Spektralphotometer werden sehr häufig zur einfachen quantitativen Konzentrationsermittlung eingesetzt. In Kombination mit einer Faseroptik-Tauchsonde kann ein UV-Vis-Spektralphotometer zur Messung direkt im Probenbehälter verwendet werden: Das Umfüllen in eine Küvette entfällt.

[Mehr Infos.](#)



4.4 Kinetische Messungen

Die kinetische Analyse von Reaktionen ist für das Verständnis von chemischen und biochemischen Reaktionen sehr wichtig. UV-Vis-Spektrophotometrie eignet sich ideal für diese Applikation, da die Probe nicht zerstört wird. Eine Änderung der Reaktanten bzw. Produkte kann dann gemessen werden, wenn sich die Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge im Zeitverlauf ändert. Mit schnell scannenden UV-Vis-Systemen können während der Reaktion mehrere Scans durchgeführt werden. So können die Reaktion visualisiert und die Wahl der Wellenlängen für die Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit unterstützt werden.

Einzelpunktkinetik

Die einfachste Methode zur Ermittlung einer Reaktionsgeschwindigkeit ist die Einzelpunktkinetik. Es wird eine einzige Wellenlänge ausgewählt, oft die Wellenlänge, bei der der Zielanalyt maximal absorbiert. Nach Start der Reaktion wird die Absorption bei dieser Wellenlänge kontinuierlich überwacht. Dies ergibt einen Graphen, in dem Absorption gegen Zeit aufgetragen wird (siehe vier Beispiele in Abb. 34). Durch Überwachung der Absorptionsänderung im Zeitverlauf kann die Reaktion untersucht werden. Eine Absorption, die sich nicht mehr ändert, verweist in der Regel auf eine abgeschlossene Reaktion. In Abb. 34 sind vier unterschiedliche Beispiele über 30 Minuten dargestellt.

Einzelpunktmessungen haben den Vorteil, dass schnelle Reaktionen nahezu kontinuierlich erfasst werden können, da das System während der Messung sich nicht auf eine andere Wellenlänge umstellen muss. Die Geschwindigkeit der Datenerfassung des Geräts und die Zeit für die Signal-Mittelwertbildung begrenzen die Datenmenge, die gesammelt werden kann.

Bei kinetischen Messungen können auch mehrere Wellenlängen überwacht werden. Diese lassen u. U. Rückschlüsse auf die Erzeugung eines Reaktionsprodukts bei einer Wellenlänge und den Verbrauch eines anderen bei einer anderen Wellenlänge zu.

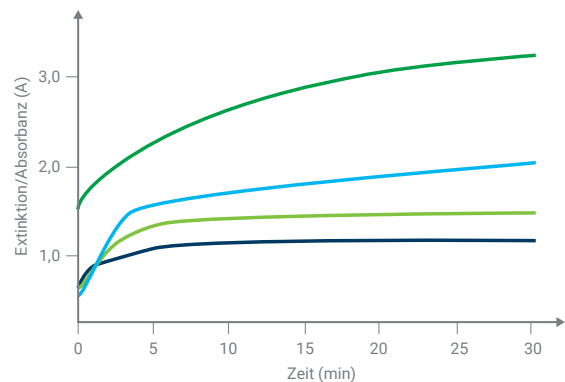


Abb. 34: Durch Überwachung der Absorptionsänderung im Zeitverlauf kann die Reaktion untersucht werden. Eine Absorption, die sich nicht mehr ändert, verweist in der Regel auf eine abgeschlossene Reaktion. In dieser Grafik sind vier unterschiedliche Beispiele über 30 Minuten dargestellt.

Kinetische Scans

Bei der Durchführung von kinetischen Messungen können durch wiederholtes Scannen eines Wellenlängenbereichs zusätzliche Informationen gewonnen werden. Dies ist nicht nur eine visuelle Darstellung der laufenden Reaktion (siehe Abb. 34). Diese Messung erlaubt auch die Flexibilität, eine beliebige Anzahl von Wellenlängen im Wellenlängenbereich des Scans auszuwählen, um die Reaktionsgeschwindigkeit zu berechnen. Dazu gehört die Analyse des Verbrauchs von Reaktanten und der Entstehung von Reaktionsprodukten mit fortschreitender Reaktion. Bei kinetischen Scans ist es wichtig, sicherzustellen, dass das UV-Vis-System den ausgewählten Wellenlängenbereich schnell scannen kann. Langsames Scannen begrenzt die Datenmenge, die bei einer Wellenlänge während der Reaktion erfasst werden kann.

Schnellmisch-Kinetik

Zur Überwachung der Reaktionsgeschwindigkeit oder von zwei schnell reagierenden Lösungen kann ein spezielles Schnellmisch- oder Stopped-Flow-Zubehör erforderlich sein. Solches Zubehör wird im UV-Vis-Spektrophotometer installiert und erlaubt die genaue Abgabe von zwei oder mehr Lösungen in eine Durchflussszelle im Inneren des UV-Vis-Systems, wo die Lösungen gemischt werden. Das Stopped-Flow-Zubehör löst die Analyse durch das UV-Vis-System aus, sobald die Lösungen in der Durchflussszelle vermischt sind. Optional können das Mischverhältnis der Lösungen geändert und die Temperatur der Durchflussszelle und Reaktanten geregelt werden. Da die Erfassungsgeschwindigkeit sehr wichtig ist, muss ein UV-Vis-System mit einer Datenerfassungsrate gewählt werden, mit welcher eine Reihe von Datenpunkten im jeweiligen Zeitfenster der Reaktion erfasst werden können. In Abb. 36 ist eine Reaktion dargestellt, die über drei Sekunden überwacht wird.

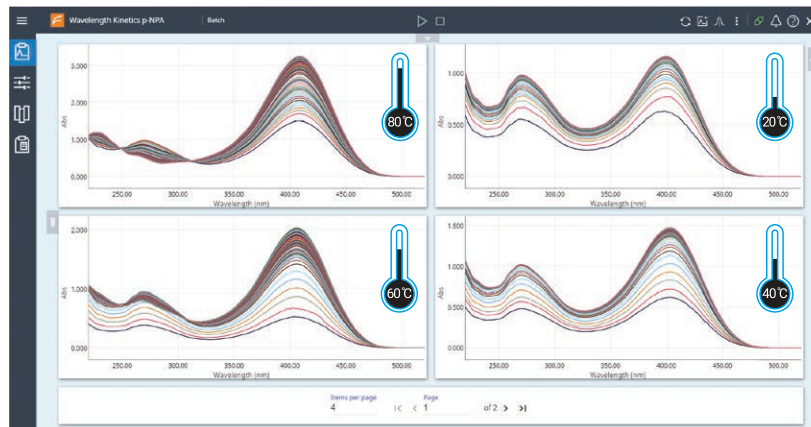


Abb. 35: Kinetische Scans: UV-Vis-Spektrophotometer liefern wertvolle Erkenntnisse für die Reaktionschemie. Die Auswirkung der Temperatur auf chemische Reaktionen kann durch schnelles Scannen bei mehreren Temperaturen zügig und einfach beobachtet werden.

[Hier wird ein kinetisches Scan-Experiment vorgestellt.](#)

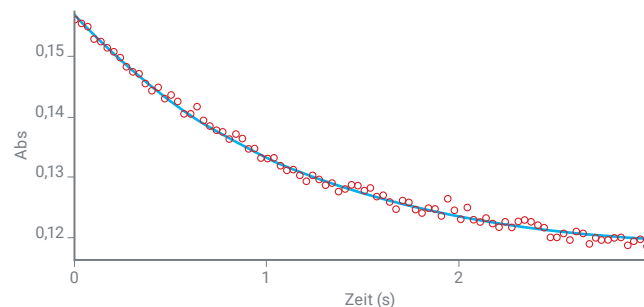


Abb. 36: Die Kombination eines modernen UV-Vis-Spektrophotometers und eines Schnellmischzubehörs erlaubt die Messung von Reaktionen im Zeitverlauf von nur wenigen Sekunden. [Hier ist ein Beispielerperiment.](#)

Zu beachtende Faktoren bei kinetischen Messungen

Die Reaktionsgeschwindigkeit kann temperaturabhängig sein. Aus diesem Grund kann es wichtig sein, die Temperatur einer Probe konstant zu halten, z. B. Körpertemperatur (37 Grad) für biologische Reaktionen. Zu diesem Zweck werden oft Peltier-gekühlte/beheizte Küvetten oder wassertempertierte Küvettenhalter in einem UV-Vis-System verwendet. Mit solchem Zubehör können Proben bei einer bestimmten Temperatur gehalten oder die Temperatur im Zeitverlauf geändert werden (Temperaturrampe).

Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Temperatur müssen sorgfältig abgewogen werden, da auch kleine Änderungen der Temperatur bzw. der Temperaturrampe die Ergebnisse erheblich beeinflussen können. Einige Systeme bieten die Möglichkeit, die Probentemperatur unmittelbar in der Küvette (statt die Temperatur des Küvettenhalters) zu messen. Durch Kombination mit einer Feedback-Schleife kann die Temperaturregelung der Probe typischerweise verbessert werden. Temperatursonden in der Probe können auch zur Aufzeichnung der Probentemperatur zeitgleich zur Aufnahme der Absorptionsdaten verwendet werden.

Außerdem ist das gleichmäßige und reproduzierbare Rühren von Proben wichtig. Bei Messung von Reaktionen bei Raumtemperatur sorgt Rühren für eine einheitliche Vermischung der Reaktanten während der Reaktion. Bei temperierten Proben werden durch Rühren Temperaturgradienten in der Probe vermieden.

Zur Messung von komplexen Systemen eignet sich unter Umständen eine Faseroptik-Sonde am besten. Das Licht vom Spektralphotometer wird im Faseroptik-Kabel zur Probe außerhalb des UV-Vis-Spektralphotometers geleitet. Dies ist bei Messungen von kontinuierlichen Herstellungsprozessen nützlich, wenn die Probe extremen Temperaturen oder Drücken ausgesetzt ist oder einfach nicht räumlich in das Probenfach des Spektralphotometers passt.

Auf Agilent.com werden kinetische Experimente in einem [Video](#) vorgestellt.

4.5 Farbmessungen

Die Farbe ist eine wichtige Materialeigenschaft. Die Farbe von Materie hängt von der wellenlängenabhängigen Absorption bzw. Reflexion ab. Das menschliche Auge sieht die Komplementärfarbe der absorbierten Farbe (siehe Abb. 37 und Abb. 38).

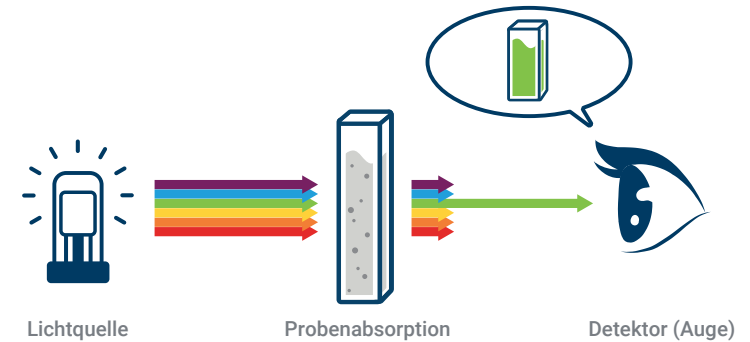


Abb. 37: Transmission und Farbe Das menschliche Auge sieht genau wie der Detektor eines Spektralphotometers Licht, das durchgelassen oder von einer Oberfläche umgelenkt wurde. Wir nehmen dieses Licht als Farbe des Objekts wahr.

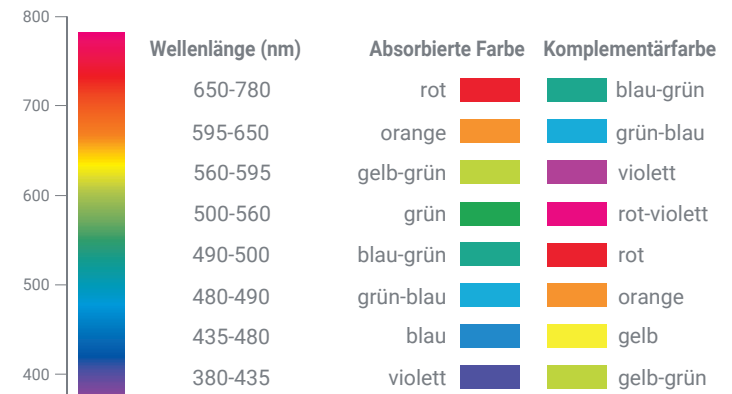


Abb. 38: Die Wellenlängen des Lichts verschiedener Farben (links), die Farbe des absorbierten Lichts (Mitte) und die dazugehörigen Komplementärfarben, die das menschliche Auge wahrnimmt (rechts).

In der Praxis sind die Erzeugung und Wahrnehmung von Farbe sehr komplex und hängen von vielen Faktoren ab, z. B.:

- dem Spektrum des Lichts, das auf ein Objekt fällt (denken Sie an die unterschiedlichen Farben beim Sonnenuntergang im Vergleich zur Mittagszeit.);
- der Oberflächenbeschaffenheit von Feststoffen (Fischschuppen und Vogelfedern sind zwei Beispiele für physikalische Strukturen auf der Oberfläche, die die wahrgenommene Farbe beeinflussen.);
- dem Sichtwinkel (bei einigen Oberflächen, z. B. Perleffektlacken, ändert sich die wahrgenommene Farbe mit dem Sichtwinkel.).

Es sind spezialisierte Farbmesssysteme (z. B. CIELAB-Farbraum) und Geräte entwickelt worden. Die meisten Spektralphotometer können zur Farbmessung verwendet werden, solange eine entsprechende Software vorhanden ist. Die Farbwahrnehmung wird auch von der Oberfläche und ihrer gerichteten („gespiegelten“) und diffusen Reflexion (Dispersion) beeinflusst. Aufgrund dieser Faktoren kann besonderes Zubehör zur Farbmessung notwendig sein, damit die gerichtete und diffuse Reflexion erfasst und bei unterschiedlichen Sichtwinkeln beobachtet werden kann.

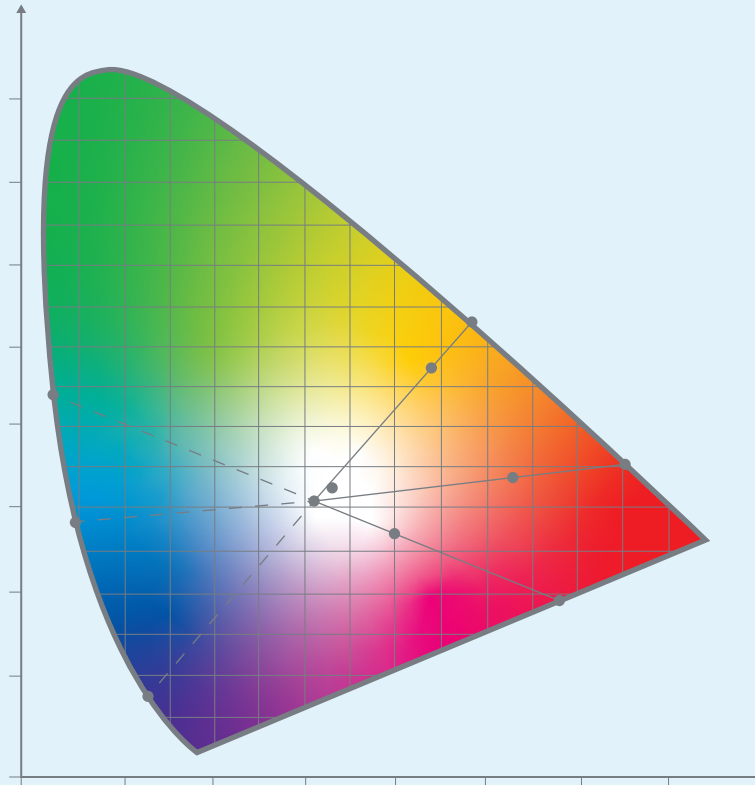
Ein Farbmessgerät nimmt das UV-Vis-Spektrum einer Probe und wandelt es in drei Farbkoordinaten um. Diese beschreiben die Farbe in einem dreidimensionalen Farbraum (siehe Bild im seitlichen Kasten). Die drei Koordinaten definieren die Helligkeit, Sättigung und den Farbton. Die Helligkeit gibt an, wie hell oder dunkel eine Farbe ist. Die Sättigung bezieht sich auf die „Farbreinheit“ und der Farbton ist die dominante spektrale Farbe, ähnlich wie bei den Farben im Regenbogen.

Ein UV-Vis-Spektralphotometer kann zur Farbabstimmung, z. B. bei der Messung von Malerlack-Produkten, und zur Messung einer Farbänderung einer Lösung verwendet werden. Mit UV-Vis-Messungen wird oft geprüft, ob eine Reaktion stattgefunden hat bzw. aktuell stattfindet, ohne die Proben visuell prüfen zu müssen. Farbbasierte Analysen gehören zu den gängigsten Applikationen in der UV-Vis-Spektrophotometrie.

Farbmessung

UV-Vis-Spektralphotometer dienen zur Messung der Farbe von Flüssigkeiten und Feststoffen. Durch Messung des sichtbaren Lichts, das eine Lösung oder ein Material durchdringt oder das von einer Oberfläche reflektiert wird, kann die Farbe der Flüssigkeit bzw. des Materials berechnet werden. Die gemessene Farbe wird mithilfe von drei Koordinaten im Farbraum definiert.

[Mehr Infos.](#)





Wie schwarz ist Schwarz? Was Tiefseefische dazu sagen

Forscher haben viele Tiefseefische entdeckt, die eine ultraschwarze Haut besitzen. Diese reflektiert weniger als 0,5 % des einfallenden Lichts. Die ultraschwarze Haut sorgt dafür, dass diese Fische bei der Jagd nicht entdeckt werden. In der Tiefsee verwenden Lebewesen oft den Schein von Biolumineszenz, um Beute oder Jäger zu sehen. Ultraschwarze Haut absorbiert das Biolumineszenzlicht und der Fisch bleibt unsichtbar.

Forscher vom Smithsonian National Museum of Natural History und von der Duke University haben die Reflexion von Fischhaut gemessen, die 99,5 % des Lichts absorbiert. Dagegen absorbieren schwarze Paradiesvogelfedern 99,95 % und Vanta-Schwarz, das schwärzeste, jemals künstlich hergestellte Material, 99,96 % des Lichts.

Die von den Fischen genutzten Mechanismen für die Lichtabsorption könnten sich für Anwendungen in Solaranlagen, Teleskopen, Kameras und Camouflage-Systemen eignen.

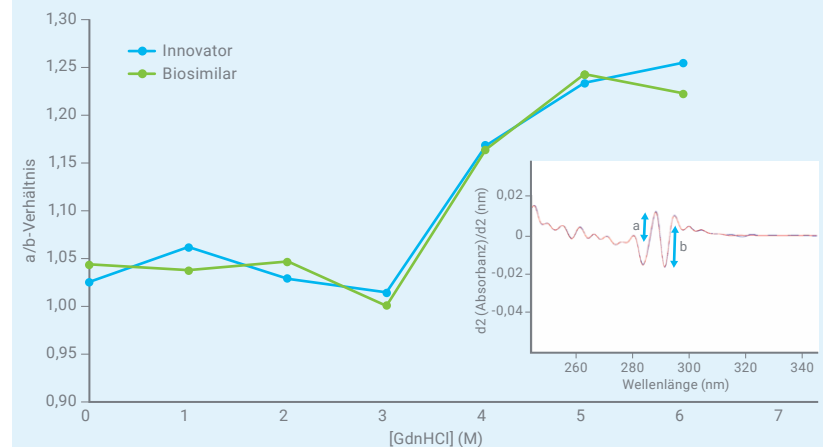
[Erfahren Sie mehr über die Forschungsergebnisse.](#)

4.6 Strukturänderungen von Verbindungen

UV-Vis-Spektroskopie eignet sich zur Ermittlung vieler physikalisch-chemischer Eigenschaften von Verbindungen. Mit diesen Messungen können Verbindungen identifiziert oder bestimmte Eigenschaften ermittelt werden.

Konformationsstudien

UV-Vis-Spektroskopie liefert Hinweise auf die Proteinstruktur. UV-Vis-Spektroskopie ist zudem eine zerstörungsfreie Messmethode und es müssen keine wertvollen Proben geopfert werden. Daher eignet sich UV-Vis-Spektroskopie insbesondere zur Voranalyse vor LC oder Massenspektroskopie. Dies wird anhand des Vergleichs eines Innovator- und Biosimilar-mAB-Paars demonstriert. [Mehr Infos.](#)



4.7 Schmelztemperaturen von Proteinen und Nukleinsäuren

UV-Vis-Spektroskopie dient in den Biowissenschaften oft zur Analyse von Biomolekülen wie Proteinen und Nukleinsäuren. Das Absorptionsspektrum von Proteinen wird von der Absorption der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin dominiert. Durch die Mehrkomponentenanalyse kann ermittelt werden, wie viele der jeweiligen aromatischen Aminosäuren in einem intakten Protein vorhanden sind.

Ein Protein bei Raumtemperatur besitzt eine bestimmte tertiäre Struktur bzw. Konformation. Diese wiederum erzeugt ein bestimmtes elektronisches Umfeld für die aromatischen Aminosäuren. In einer anderen UV-Vis-Spektroskopie-Applikation werden Proteine thermisch oder chemisch denaturiert. Dies führt – bei einer bestimmten Temperatur bzw. Konzentration – zum Entfalten des Proteins, d. h. das Protein verliert seine Struktur (es „schmilzt“).

Dadurch ändert sich das elektronische Umfeld der aromatischen Aminosäuren, was mit spektralen Änderungen bzw. Verschiebungen verbunden ist.

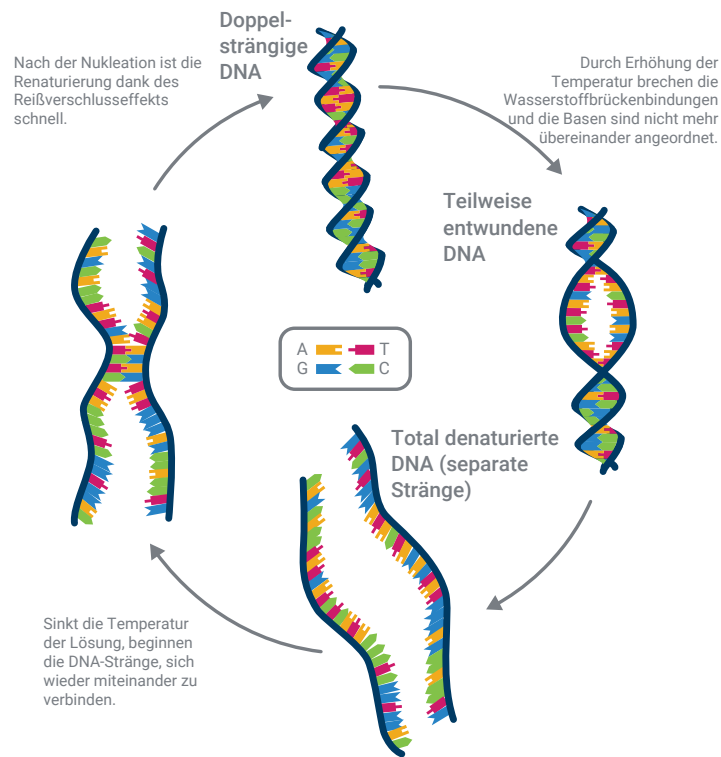


Abb. 39: Beim Erwärmen von DNA entwenden sich die Stränge der DNA-Doppelhelix. Dabei erhöht sich die Absorption von UV-Licht bei 260 nm. Beim Abkühlen der DNA vereinigen sich die Stränge wieder.

Desoxyribonukleinsäure (DNA) besteht im nativen Zustand aus zwei Desoxyribosenukleotid-Strängen, die in Form einer Doppelhelix um eine Achse gewunden sind. Die Stränge sind durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Purin- und Pyrimidinbasen miteinander verbunden, Adenin mit Thymin (A-T) und Guanin mit Cytosin (G-C). Diese Basen sind hauptsächlich für die UV-Absorption von DNA und anderen Nukleinsäuren verantwortlich. Das Peakmaximum liegt bei 260 nm. Wie bei allen Mehrkomponentensystemen sollte die für Nukleinsäuremoleküle beobachtete Absorption der Summe aller einzelnen Absorptionen entsprechen:

$$A_{DNA} = A_{Adenin} + A_{Guanin} + A_{Cytosin} + A_{Thymin}$$

Die beobachtete Absorption ist jedoch immer signifikant niedriger als erwartet. Dies liegt an den Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen, die das elektronische Umfeld modifizieren. Bei Erwärmung dieser Moleküle brechen die Wasserstoffbrückenbindungen. Die Doppelhelix dissoziiert sich und die Absorption erhöht sich, bis sie ungefähr der Summe aller Basen entspricht (siehe Abb. 39). Dieser Denaturierungsvorgang wird auch als Schmelzen bzw. thermisches Schmelzen bezeichnet. Im Rahmen eines Schmelzexperiments wird die Temperatur einer Lösung doppelsträngiger Nukleinsäure schrittweise erhöht, bei jeder Temperatur die Absorption bei 260 nm gemessen und als Schmelzkurve aufgetragen (siehe Abb. 40). Der Mittelpunkt des Temperaturbereichs, in dem Schmelzen beobachtet wird, ist die Schmelztemperatur T_m . Der T_m -Wert einer bestimmten Nukleinsäure hängt hauptsächlich vom prozentualen Anteil der G-C-Paare in der Probe ab. G-C-Paare sind durch drei Wasserstoffbrückenbindungen verbunden (dagegen enthalten A-T-Paare nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen). Je höher der prozentuale Anteil von G-C-Paaren in der Probe, desto höher ist die beobachtete Schmelztemperatur T_m .

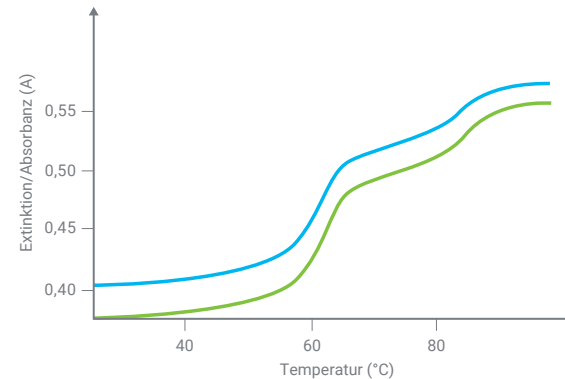


Abb. 40: Absorptionsmessungen bei 260 nm bei steigender Temperatur ergibt diese charakteristische Schmelzkurve von DNA. Die Absorptionsänderungen verweisen auf mehrere Übergänge beim Entwinden der DNA-Doppelhelix.

Zur Durchführung von Schmelzanalysen bei Proteinen und DNA müssen UV-Vis-Spektrophotometer entsprechend ausgestattet sein, um die Proben temperatur genau und reproduzierbar ändern zu können. Modernste spektrophotometrische Geräte bieten eine erhebliche Zeitersparnis für thermische Schmelzmessungen sowie eine höhere Temperaturpräzision, als dies zuvor möglich war. UV-Vis-Systeme für thermische Schmelzanalysen sind mit integrierten Temperatursonden in den Küvetten erhältlich. Mit diesen kann die Temperatur der Lösungen während des Experiments genau gesteuert werden. Außerdem werden Küvetten-Rührvorrichtungen angeboten, um die homogene Erwärmung der Proben sicherzustellen. Zur Analyse von hohen Probenzahlen werden Multiküvettenhalter als integrierte

Funktion oder optionales Zubehör angeboten. Für das meiste auf Peltier-Elementen basierende Temperaturzubehör wird ein Umlaufwasserbad zur Kühlung der Peltier-Elemente benötigt. Aktuelle Innovationen ermöglichen die Verwendung von luftgekühlten Peltier-Elementen im Küvettenblock. Es werden gewöhnlich Temperaturen zwischen 0 und 110 °C benötigt. Die integrierte Temperaturüberwachung und die Küvetten-Rührvorrichtung erlauben möglichst schnelle Temperaturänderungen der Probe während der Analyse.

Thermische Schmelzanalyse von Nukleinsäuren

Die Temperaturregelung der Probe ist eine wichtige Anforderung an UV-Vis-Systeme für die thermische Schmelzanalyse. Die schnelle und reproduzierbare Erwärmung kann durch eine Temperatursonde in der Küvette unterstützt werden.

[Mehr Infos.](#)



4.8 Mehrkomponentenanalyse

Fast von Anfang an wurden neben Einkomponenten- auch Mehrkomponentenanalysen mithilfe von UV-Vis-Spektren durchgeführt. Da Mehrkomponentenanalysen aufgrund der verwendeten Methoden oft falsche Ergebnisse lieferten, waren sie nicht sehr weit verbreitet. Ein gut konstruiertes, modernes UV-Vis-Spektralphotometer liefert jedoch präzisere Daten. Moderne Kurvenanpassungen sorgen außerdem für genauere Ergebnisse und – was vielleicht noch wichtiger ist – liefern Hinweise auf falsche Ergebnisse.

Additivitätsprinzip

Gemäß dem Beerschen Gesetz ist die Extinktion (Absorbanz) proportional zur Anzahl der Moleküle, die Strahlung einer bestimmten Wellenlänge absorbieren. Dieses Prinzip gilt auch dann, wenn mehrere absorbierende Spezies vorhanden sind. Quantitative Mehrkomponentenanalysen beruhen auf dem Prinzip, dass die Absorption bei einer Wellenlänge der Summe der Absorptionen aller Komponenten der Mischung bei dieser Wellenlänge entspricht.

Der einfache Ansatz der Mehrkomponentenanalyse beruht auf Absorptionsmessungen bei verschiedenen Wellenlängen, wobei die Zahl der gemessenen Wellenlängen der Anzahl der Komponenten in der Mischung entspricht. Dazu werden Wellenlängen gewählt, die in der Nähe der Absorptionsmaxima der jeweiligen Komponente liegen. Zur Kalibrierung wird die Absorption von Standards gemessen. Standards enthalten bekannte Mengen der reinen Komponenten und dienen zur Ermittlung

der Extinktionskoeffizienten jeder Komponente bei jeder ausgewählten Wellenlänge. Die Absorption der Mischung bei jeder Wellenlänge ist die Summe aller Absorptionen aller Komponenten bei dieser Wellenlänge. Diese hängen wiederum vom Extinktionskoeffizienten und von der Konzentration der Komponenten ab. Für zwei Komponenten, x und y, kann so die folgende Gleichung aufgestellt werden:

$$A'_{(x+y)} = A'_x + A'_y = \epsilon'_x b c_x + \epsilon'_y b c_y$$

und

$$A''_{(x+y)} = A''_x + A''_y = \epsilon''_x b c_x + \epsilon''_y b c_y$$

Wobei gilt:

- A' ist die Extinktion bei Wellenlänge '
- A'' ist die Extinktion bei Wellenlänge ''
- ϵ' ist der Extinktionskoeffizient bei Wellenlänge '
- ϵ'' ist der Extinktionskoeffizient bei Wellenlänge ''
- c ist die Konzentration
- b ist die Schichtdicke

Diese Gleichungen sind leicht lösbar und die Konzentration jeder Komponente kann ermittelt werden. Wenn Messungen immer perfekt wären, könnte man auch bei komplexen Mischungen von Komponenten mit ähnlichen Spektren genaue Ergebnisse erhalten. In der Praxis gibt es jedoch immer einen Messfehler. Solche Fehler können die Genauigkeit der Ergebnisse erheblich beeinträchtigen, wenn die Spektren stark überlappen. In Abb. 41 ist eine simulierte Zwei-Komponenten-Mischung dargestellt, deren Spektren sich bei den Absorptionsmaxima nicht überlappen.

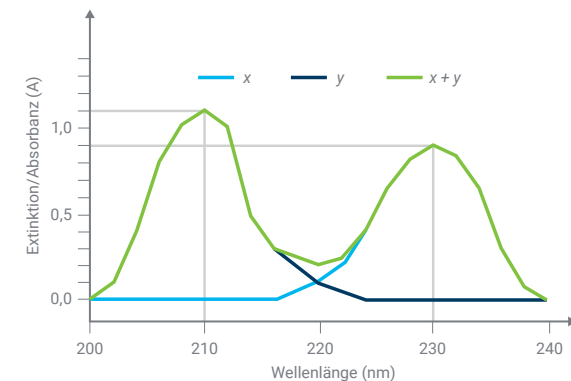


Abb. 41: Eine Mischung von zwei Komponenten mit wenig spektraler Überlappung.

Abb. 42 zeigt dagegen eine simulierte Zwei-Komponenten-Mischung mit erheblicher Überlappung der Spektren im Bereich der Absorptionsmaxima.

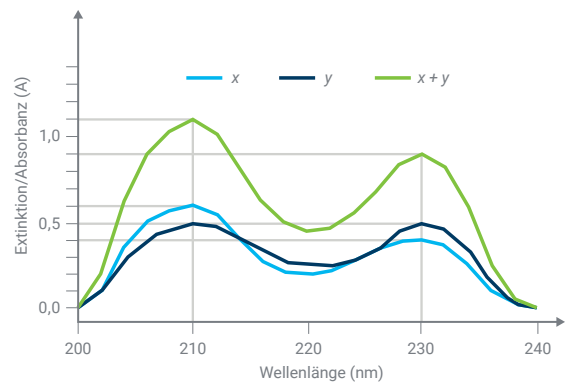


Abb. 42: Eine Mischung von zwei Komponenten mit erheblicher spektraler Überlappung.

Mit wenig spektraler Überlappung	Mit erheblicher spektraler Überlappung
$A'(x+y) = 1,1 + 0,0 = 1,1$	$A'(x+y) = 0,6 + 0,5 = 1,1$
$A''(x+y) = 0,0 + 0,9 = 0,9$	$A''(x+y) = 0,4 + 0,5 = 0,9$

Bei einer Mischung aus x und y mit $c_x = c_y = 1$ sollten folgende Absorptionen gemessen werden:

Tritt bei Messung von $A'_{(x+y)}$ und $A''_{(x+y)}$ ein Fehler von 10 % auf, z. B. $A'_{(x+y)} = 0,99$ (-10 %) und $A''_{(x+y)} = 0,99$ (+10%), dann kommen die folgenden quantitative Berechnungen zu den Ergebnissen in Tabelle 6:

Tabelle 6: Ergebnisvergleich nach Mehrkomponentenanalysen von Beispielen mit wenig bzw. mit erheblicher spektraler Überlappung.

Komponente	Nenn-konzentration	Berechnete Konzentration	Wenig spektrale Überlappung		Erhebliche spektrale Überlappung	
			%-Fehler		Berechnete Konzentration	%-Fehler
x	1	0,9	-10%		0,0	-100 %
y	1	1,1	+10%		1,98	+98%

Methode der kleinsten Quadrate

Um die Auswirkungen von zufälligem Rauschen zu senken, können zusätzliche spektrale Informationen genutzt werden. Dazu dient statt zwei Datenpunkten eine ganze Serie von Datenpunkten. In einem solchen sogenannten überbestimmten System liefert eine Kleinste-Quadrate-Approximation der Standardspektren zu den Probenmesswerten quantitative Werte (1,2). In Abb. 43 ist das gleiche Spektrum einer Zwei-Komponenten-Mischung dargestellt wie in Abb. 42. Jeder Messwert hat nun jedoch einen Zufallsfehler von 10 %.

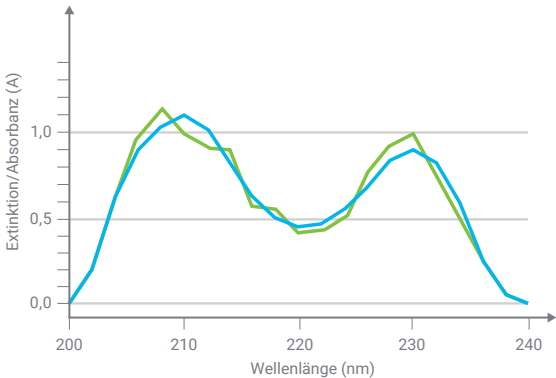


Abb. 43: Spektrum einer Mischung mit 10%igem Zufallsfehler bei jeder Wellenlänge.

Auf der Grundlage von 21 Datenpunkten (2-nm-Intervalle zwischen 200 und 240 nm) liefert die Methode der kleinsten Quadrate quantitative Ergebnisse mit einem Fehler von < 1 %. Dagegen liegt der Messfehler von Messungen bei nur zwei Wellenlängen bei ungefähr 100 % (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Ergebnisvergleich nach Mehrkomponentenanalyse mit einem einfachen Gleichungssystem und mit der Methode der kleinsten Quadrate.

Komponente	Nenn-konzentration	Berechnete Konzentration	Nur 210 nm und 230 nm	Bereich 200 nm bis 240 nm	
			%-Fehler	Berechnete Konzentration	%-Fehler
x	1	0,0	-100 %	1,003	+0,3%
y	1	1,98	+98%	0,995	-0,5%

Auf diese Weise erlaubt diese Methode die Analyse von komplexeren Mischungen bzw. die Analyse von einfachen Mischungen von Komponenten mit ähnlichen Spektren. Die Residuen aus der Berechnung der kleinsten Quadrate sind ein guter Hinweis darauf, wie gut das Probenspektrum zu Standardspektrum passt. Daher lassen die Residuen Rückschlüsse auf die wahrscheinliche Genauigkeit der Ergebnisse zu.

Ein Beispiel ist die Mehrkomponentenanalyse zur Quantifizierung von fünf Hämoglobinvarianten im Blut bei minimaler Probenvorbereitung (3). In Abbildung 44 sind die Absorptionsspektren der Hämoglobinvarianten dargestellt. Diese Analyse wurde in der Vergangenheit mit mehreren analytischen Techniken, darunter Spektroskopie und Titrations, durchgeführt.

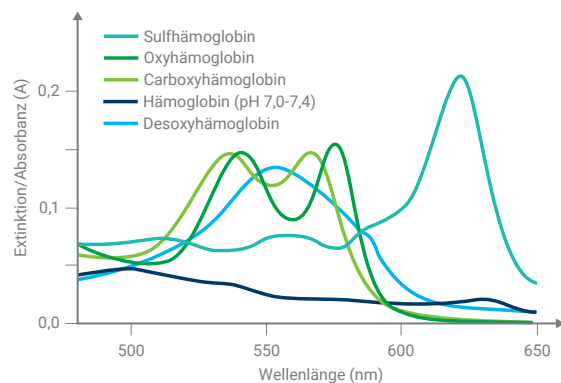


Abb. 44: Absorptionsspektren von Hämoglobinvarianten.

Andere Methoden

Zu weiteren statistischen Ansätzen für die Mehrkomponentenanalyse gehören die Methoden der partiellen kleinsten Quadrate (PLS), Hauptkomponentenregression (PCR) und multiplen kleinsten Quadrate (MLS). Diese Methoden bieten theoretisch einige Vorteile gegenüber der oben genannten Methode. Das Kalibrierverfahren ist jedoch sehr viel komplexer.

Anforderungen an die Proben

Ein einfaches Gleichungssystem und die Methode der kleinsten Quadrate liefern nur dann genaue Ergebnisse, wenn eine Kalibrierung mit reinen Standards oder einer Mischung reiner Standards durchgeführt wird. Die Standards müssen alle Komponenten enthalten, die in der Probe vorhanden sind und zum UV-Vis-Spektrum beitragen. Die unbekannte Probe darf keine zusätzliche absorbierende Spezies besitzen.

Geräteanforderungen

Zur Quantifizierung einer Einzelkomponente wird ein Standard bzw. eine Serie von Standards und dann die unbekannte Probe mit dem gleichen Gerät gemessen. Das Kalibrierverfahren sollte jegliche gerätebedingte systematische Fehler beseitigen. Daher sind die absolute Wellenlängengenauigkeit und die absolute photometrische Genauigkeit relativ unwichtig. Auf der anderen Seite ist die photometrische Reproduzierbarkeit wichtig für die Ergebnisgenauigkeit. Wenn nur Messungen im Absorptionsmaximum durchgeführt werden, ist auch die Wellenlängenreproduzierbarkeit relativ unwichtig, da die Absorption in diesem Bereich gleichmäßig hoch ist. Wird jedoch eine Wellenlänge in der Flanke einer Bande verwendet, wo die Absorption steil ansteigt bzw. abfällt, hat die Wellenlängenreproduzierbarkeit eine besonders wichtige Bedeutung. Letztendlich ist auch der lineare Bereich des Geräts wichtig, da die Kalibrierung eine lineare Beziehung zwischen Messwerten und Konzentration voraussetzt. Eine genaue Mehrkomponentenanalyse erfordert ein hervorragendes Signal/Rausch-Verhältnis, insbesondere dann, wenn eine Methode mit einfachem Gleichungssystem verwendet wird. In die Methode der kleinsten Quadrate fließen auch Daten von den Flanken der Absorptionsbanden in die Berechnungen ein. Daher ist auch in diesem Fall eine hervorragende Wellenlängenreproduzierbarkeit sehr wichtig. Und da mehr Daten erfasst werden müssen, werden Schnellscan-Funktionen benötigt, um eine angemessene Produktivität zu erzielen.

4.9 Software-Anforderungen

Für die Analyse der erfassten Daten ist spezielle Mehrkomponenten-Software erhältlich, die die Erstellung von Datenmodellen unterstützt. Solche Softwarepakete sind entweder ein integraler Bestandteil der Geräte- oder Berichtsoftware oder sind als separate Software erhältlich. Die meisten UV-Vis-Systeme erlauben den Export der Daten in einem Standardformat, das in ein Mehrkomponenten-Softwarepaket geladen und dort bearbeitet werden kann.

Literatur:

1. Kisner, H.; Brown, W.; Kavarnos, G. Multiple analytical frequencies and standards for the least-squares analysis of serum lipids. **Anal. Chem.** **1983**, *55*, 1703.
2. Maris M.; Brown, C.; Lavery, D. Nonlinear multicomponent analysis by infrared spectrophotometry. **Anal. Chem.** **1983**, *55*, 1694.
3. Zwart, A.; van Kampen, E.; Zijlstra, W. Multicomponent analysis of hemoglobin derivatives with a reversed-optics instrument. **Clin. Chem.**, **1984**, *30*, 373.



5. Glossar

Absorption: 1. Lichtabsorbierende Eigenschaft einer Substanz, 2. wird als Extinktion bzw. Absorbanz gemessen und mit E bzw. A oder Abs gekennzeichnet.

Arzneibuch/Pharmakopöe: Amtliches Dokument, in dem die Arzneimittel detailliert beschrieben werden und die erforderlichen bzw. empfohlenen Testverfahren für die pharmazeutische Industrie angegeben sind.

Auf Null setzen: Entspricht der Tara-Funktion einer Waage, setzt das Gerät auf den Messwert 0 Abs zurück.

Basislinie: Messung, die bei den gleichen Parametern erfolgt wie die Probenmessung, wobei aber keine Probe vorhanden ist. Gewöhnlich wird ein Blindwert zur Messung der Basislinie verwendet, um die Beteiligungen des Geräts, des Lösemittels, der Küvette usw. von der Probenmessung subtrahieren zu können.

Blindwert: Das Lösemittel (Substrat) der Probe ohne die absorbierende Spezies. Im Fall von Flüssigproben handelt es sich dabei um das Lösemittel (oft Wasser) in einer Küvette. Die Absorption des Blindwerts kann dann von der Absorption der Probe subtrahiert werden, um die Absorption zu ermitteln, die allein von der Probe stammt.

Carotinoide: Chromophore, die in einigen Pflanzen, Algen und Bakterien mit der Photosynthese verbunden sind.

Chromophor: Teil eines Moleküls, der Licht absorbiert.

CRM: Abkürzung. Zertifiziertes Referenzmaterial. Dabei handelt es sich um Standards, die mit Bezug auf einen primären Standard zertifiziert worden sind.

Dispersion: Bezieht sich auf die Fähigkeit von optischen Elementen, die Wellenlängen des Lichts aufzutrennen. Beispiel: Weißes Licht, das auf ein Prisma fällt, fächert sich aufgrund von Dispersion in die Farben des Regenbogens auf.

Dispersion: Licht, das in zufälligen Winkeln von der Oberfläche zurückgeworfen wird.

Fluoreszenz: Eine Art von Lumineszenz und charakteristische Eigenschaft von einigen Molekülen, Licht bei einer Frequenz zu absorbieren und als (kurzlebiges) Licht einer anderen Wellenlänge wieder abzugeben.

GMP: Abkürzung. Gute Herstellungspraxis. Dies ist ein gängiger Begriff in der pharmazeutischen Industrie und anderen regulierten Fertigungsbereichen.

Holographisch-optische Bauelemente: Holographisch-optische Bauelemente werden hergestellt, indem Interferenzmuster auf eine optische Oberfläche geätzt werden. Sie können Linsen, Spiegel und andere optische Elemente ersetzen. Dank ihrer Bauweise ermöglichen sie genaue Replikate und sie sind klein und leicht.

Küvette: Wird auch als Zelle bezeichnet. Die Küvette nimmt Flüssigproben auf, die gemessen werden sollen. Küvetten sind in verschiedenen Volumen und Schichtdicken erhältlich. Das Material der Küvette hat einen Einfluss auf die optische Transparenz.

Lichtbogen (Lampe): Entsteht durch elektrische Entladung bei hohen Spannungen durch ein inertes Gas.

Lichtempfindlichkeit: Eigenschaft einer Substanz, die bei Exposition gegenüber Licht reagiert.

Metalle der Seltenen Erden: Holmium-, Didym- und Samariumoxide sind von Normenorganisationen und in Arzneibüchern zur Validierung von Wellenlängenmessungen vorgesehen.

Peltier: Ein Peltier-Element ist eine Heiz- bzw. Kühlvorrichtung, die von einem Thermoelement gesteuert wird. Das Peltier-Element überträgt Wärme von einer Seite zu anderen. Es kann die Temperatur einer Probe genau regeln.

Phosphoreszenz: Eine Art von Lumineszenz ähnlich wie Fluoreszenz. Phosphoreszenz ist eine charakteristische Eigenschaft von einigen Molekülen, Licht bei einer Frequenz zu absorbieren und als verzögertes Licht einer anderen Wellenlänge wieder abzugeben.

Photochemische Reaktion: Chemische Reaktion, die durch die Absorption von Licht verursacht wird.

QA/QK: Abkürzung. Qualitätskontrolle bzw. Qualitätssicherung

Qualitativ Messung: Messung, die nicht numerische Informationen über die Probe liefert, z. B. Identifizierung eines Moleküls in einer Lösung

Quantitative Messung: Messung, die zu einem Zahlenwert führt. Beispiel: Konzentration.

Rauschen: Im Zusammenhang mit Spektralphotometern bezieht sich der Begriff Rauschen auf das elektrische Hintergrundsignal, das vom Gerät selbst stammt. Ist das Rauschen zu hoch, kann es das Messsignal überdecken. In diesem Fall können die beiden Signale nicht gut voneinander unterschieden werden. Stellen Sie sich dazu einfach den Unterschied vor, wenn Sie in einer Stadt oder an einem Ort ohne Lichtverschmutzung die Sterne betrachten. Das Hintergrundlicht der hell erleuchteten Stadt (das Rauschen) erschwert die Sicht auf die Sterne. An einem Ort ohne Lichtverschmutzung gibt es sehr wenig Hintergrundlicht, daher sind die Sterne sehr viel besser zu sehen.

Reflexion: Das auf eine Probe einfallende Licht wird im Einfallswinkel zurückgeworfen.

SOP: Abkürzung. Standardarbeitsanweisung. Dokument, das sichere und reproduzierbare Messungen sicherstellen soll.

Spektrum: Plural, Spektren. Wellenlängenbereich. Das elektromagnetische Spektrum. Bezieht sich auch auf die graphische Darstellung der Intensität (bzw. Extinktion/Absorbanz, die von einem Spektralphotometer gemessen wird) gegen die Wellenlänge.

SST: Abkürzung. Systemeignungstests. Prüfung, die die Eignung des Systems belegen soll.

Transmission: Prozentualer Anteil des einfallenden Lichts, der eine Probe passiert.

Weitere Informationen:

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

Online-Store:

www.agilent.com/chem/store

Antworten auf technische Fragen und Zugriff auf
Ressourcen finden Sie in der Agilent Community:

community.agilent.com

Deutschland

0800-603 1000

CustomerCare_Germany@agilent.com

Europa

info_agilent@agilent.com

Asien und Pazifik

inquiry_lsca@agilent.com

DE-008895

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2025
Veröffentlicht in den USA, 19. August 2025
5980-1397DEE