

Mikrospektralfotometrie

Inhalt

1. Einführung	1
2. Wie es angefangen hat.....	1
3. Grundlagen: Simultan- und scannende Spektrometer.....	2
4. Das Multichannel-Spektrometer (MCS)	3
4.1. Multichannel-Modul.....	3
4.2. Software.....	4
4.3. Kalibrierung.....	5
4.4. Optische und mechanische Ankopplung an das Mikroskop	9
5. Praktische Anwendungen.....	11
5.1. Spektrale Eigenschaften von Lichtquellen – Durchlässigkeit von Objektiven.....	11
5.2. Messung der Emission von LEDs und Blitzlampen	13
5.3. Messung von Filtercharakteristiken	14
5.4. Absorptionsmessungen an mikroskopischen Objekten	15
5.5. Schichtdickenmessung.....	19
6. Bewertung und Ausblick.....	20

1. Einführung

Im folgenden Beitrag wird ein Spektrometer beschrieben, das an das Mikroskop optisch angekoppelt ist und einfache spektroskopische Messungen im UV/VIS-Bereich an mikroskopischen Objekten und an Filtern und Lichtquellen ermöglicht. Anhand einiger Beispiele mit Spektren und Fotos werden Möglichkeiten und Grenzen dieses recht wenig verbreiteten Meßverfahrens aufgezeigt sowie einige Hinweise zum Selbstbau gegeben.

2. Wie es angefangen hat

Vor einiger Zeit fand ich im Internet ein Angebot über ein „Carl Zeiss-Spektrometermodul MCS“, mit dem offensichtlich keiner etwas anzufangen wußte und das deshalb für wenig Geld zu mir kam. Laut Abbildung war ein Vorverstärker-Modul vorhanden, so daß sich nach meiner Erwartung mit etwas Elektronik ein komplettes Spektrometer daraus basteln ließe. Was ich nicht wußte: dieses Modul wurde laut Prüfprotokoll schon 2001 produziert und stammte von einer Firma, die schon seit Jahren keine Spektrometer mehr baute – Unterlagen wie Schaltpläne und Anschlußbelegungen nicht mehr vorhanden, der Konstrukteur in Rente. Von Zeiss waren aber noch alle Kalibrierdaten für den Spektrometerblock zu erhalten, außerdem fand sich die Firma tec5 AG, Oberursel, als

Hersteller von Elektronikkomponenten für die Zeiss-Spektrometer, so daß mit etwas Zukauf die Anlage in Betrieb genommen werden konnte.

3. Grundlagen: Simultan- und scannende Spektrometer

Im optischen Wellenlängenbereich vom UV bis ins IR werden heute hauptsächlich Gitter zur Erzeugung eines Spektrums verwendet. Eine dafür weit verbreitete Anordnung ist die nach Czerny-Turner (Abb. 1). Das zu analysierende Licht fällt auf den Eintrittspalt (B), der durch zwei Parabolspiegel (C, E) auf den Austrittspalt (F) abgebildet wird. Im parallelen Strahlengang dazwischen befindet sich das ebene Streugitter D. Bei Einstrahlung von weißem Licht erhält man in der Ebene des Austrittspalts ein Spektrum, aus dem ein durch die Spaltbreite definierter Ausschnitt ausgewählt und hinter dem Spalt über einen Detektor G - Photovervielfacher oder Halbleitersensoren - quantifiziert wird. Der Vorteil dieser Anordnung liegt im einfachen Aufbau und in der Kompensation von Komafehlern beider Spiegel. Zur Messung eines Spektrums wird das Gitter gedreht, so daß zeitlich nacheinander ein durch die Spaltbreite einstellbarer, sehr kleiner Teil des Spektrums auf den Detektor fällt: „scannendes Spektrometer“. Die Gitterdrehung ist mit großer Präzision durchzuführen, um eine ausreichende spektrale Reproduzierbarkeit der Wellenlänge zu erreichen, und damit zeitaufwendig.

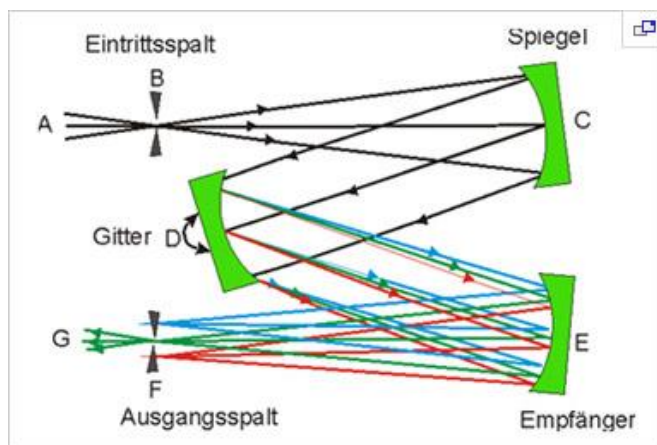


Abbildung 1: Monochromator in Czerny-Turner-Anordnung (Quelle: Zeiss-Homepage, www.smt.zeiss.com)

Das „Simultanspektrometer“ dagegen besitzt keinen Austrittspalt; das dispergierte Spektrum fällt auf eine Diodenzeile und wird damit simultan detektiert. Ein solches Simultan- oder Multichannel-Spektrometer hat keine bewegten Teile, ist als stabiler, kompakter Block aufzubauen und kann ein komplettes Spektrum in kürzester Zeit aufnehmen. Das hier beschriebene Gerät ist so schnell, daß es einen Fotoblitzen vermessen kann (Beispiel siehe Abschnitt 5.2, Abb. 14).

Nachteilig ist die geringe Auflösung, bedingt durch die Anzahl der Dioden, und die geringere Empfindlichkeit, im Vergleich zum konventionellen Spektrometer mit Photovervielfacher oder Halbleiterdetektor.

4. Das Multichannel-Spektrometer (MCS)

4.1. Multichannel-Modul

Das Spektrometer-Modul besteht aus einem Keramikkörper mit einem abbildenden, aberrations-korrigiertem Gitter mit 248 l/mm. Alle Bauteile sind fest miteinander verfügt; es ist deshalb leider nicht möglich, Diodenarray oder Gitter auszutauschen. Andererseits ist dadurch eine hohe thermische und mechanische Stabilität gewährleistet (Abb. 2, 3, 4).

Durch Gitter und Diodenarray wird ein Wellenlängenbereich von 190 bis 1024 nm überstrichen, also vom fernen UV bis zum nahen IR. Der UV-Bereich bis etwa 360 nm ist leider nicht nutzbar, im Gegensatz zum Nah-IR bis 1024 nm; schließlich verwenden wir in der Mikroskopie nur das nahe UV bei 365 nm. Der optische Eingang ist ein Lichtleiter mit 1,0 mm Durchmesser, angekoppelt über handelsübliche SMA-Kupplung für Lichtleiter. Der kreisförmige Austritt wird über einen



Abbildung 2: Zeiss Multichannel-Spektrometerblock (Quelle: Zeiss-Homepage, www.meditec.zeiss.de). Links unten der Platz für das Diodenarray; der zylindrische Ansatz ist der SMA-Anschluß des Lichtleiters. Abmessungen 140 x 105 x 75 mm³

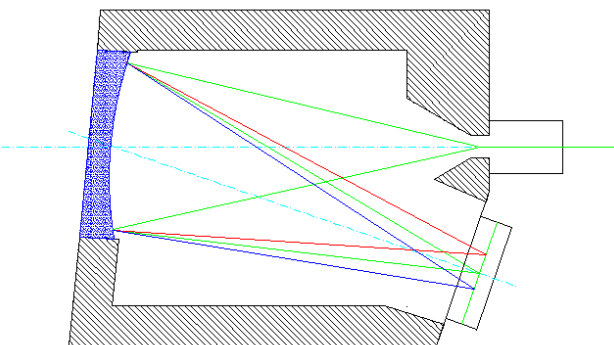


Abbildung 3: Querschnitt durch den MCS-Block

Glasfaser-Querschnittswandler in einen linearen „Austrittsspalt“ mit den Abmessungen 50 µm x 2 mm umgewandelt; dazu werden die im Eintritt rund gebündelten Fasern in eine lineare Anordnung aufgefächert.



Der Detektor besteht aus eine Hamamatsu-Diodenarray mit 1024 Dioden. Daraus ergibt sich – zusammen mit den Gitter-Daten – eine Auflösung von ca. 3 nm (Rayleigh-Kriterium).

Abbildung 4: MCS-Block (braun), vorn Lichtleitereingang, darunter Abschirmblech für das Detektorarray. In der rechten Teilfrontplatte SMA-Anschlußplatte mit rückseitiger LED-Beleuchtung für die Meßfleck-Einspiegelung

Unmittelbar hinter dem Diodenarray-IC ist die Treiber/Vorverstärker-Platine fest mit dem Gehäuse verschraubt. Sie liefert die Ansteuersignale an den IC und übergibt ein verstärktes, analoges Videosignal an die folgende „Front-End“-Platine, die es aufbereitet und mit einer Auflösung von 15 bit digitalisiert. Außerdem werden die Ansteuersignale für den Array generiert. Die digitalisierten Daten werden an eine dritte Platine übergeben, die „USB-Interface-Elektronik“. Sie speichert die Daten PC-lesbar zwischen und ermöglicht über den USB-Anschluß die Steuerung des gesamten Systems über den Rechner. Außerdem lassen sich z.B. externe Lichtquellen oder Shutter ansteuern, Funktionen, die aber derzeit nicht genutzt werden.

Die Empfindlichkeit des Spektrometers wird über die Diodenintegrationszeit eingestellt (von 30 ms bis 65 s).

Die gesamte Elektronik ist derart kompliziert, daß mir ein Selbstbau für den durchschnittlichen Elektronikbastler unmöglich erscheint. Jedoch enthält jede Digitalkamera einen ähnlichen Detektor mit nachfolgender Signalverarbeitung, mit dem einzigen Unterschied, daß der Sensor bei der Digitalkamera zweidimensional ist. Auf die Verwendung einer Kamera als Spektrometer-Detektor wird noch im letzten Abschnitt kurz eingegangen.

4.2. Software

Zu den Platinen wird ein Softwarepaket „Admin Tool“ geliefert, mit dem man die wichtigsten Parameter einstellen, insbesondere auch die Kalibrierdaten des MCS hinterlegen kann. Zur praktischen Messung ist das Programm ungeeignet. Aber mit einem von tec5 erhältlichen Software Development Kit mit DLL-Datei ist die Eigenentwicklung eines Auswertungs-Programms möglich. Das dazu eingesetzte Microsoft Visual Basic 2010 Express ist antiquiert,

aber kostenlos; damit ließ sich sogar eine sehr brauchbare grafische Spektrendarstellung programmieren.

Die verfügbaren Funktionen (siehe Abb. 4, Screenshot):

- Übertragung der Kalibrierdaten des MCS.
- Aufnahme von Referenzspektren und des Dunkelstroms.
- Aufnahme von Emissionsspektren in einstellbaren Wellenlängenbereichen und Integrationszeiten.
- Darstellung der Spektren mit Zoom-Funktion, Überlagerung mehrerer Spektren, Messung von Wellenlängen und Intensitäten über Cursor, Druckfunktion.
- Abspeicherung der Spektren als pdf-Grafik, als Binär-, Excel- oder csv-Datei.
- Aufnahme von Absorptionsspektren und Berechnung als Transmission oder Extinktionsspektren.

Möglich, aber noch nicht programmiert ist die Aufnahme von Zeitreihen.

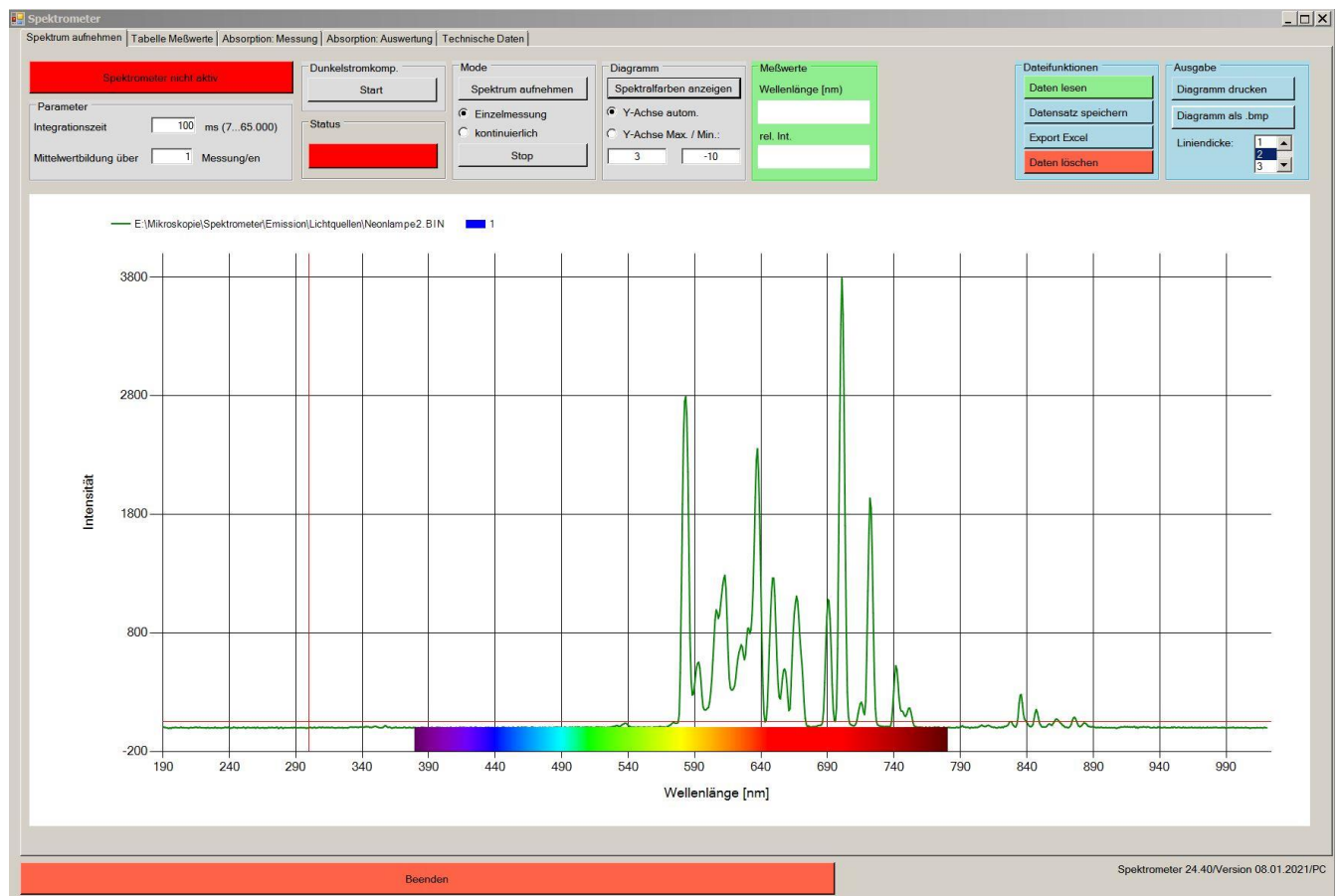


Abbildung 4: Screenshot des Spektrometer-Programms (mit Neon-Spektrum).

4.3. Kalibrierung

An Spektrometern werden mehrere Arten von Kalibrierungen und Überprüfungen vorgenommen:

- **Wellenlängenrichtigkeit und –präzision.** Damit wird die korrekte Wellenlängen-Kalibrierung geprüft sowie die Reproduzierbarkeit. Dazu ist ein Referenzstandard mit schmalen, wohldefinierten Peaks über den gesamten Wellenlängenbereich erforderlich.
- **Photometrische Richtigkeit und –präzision.** Auch hierzu ist ein Referenzstandard erforderlich, beispielsweise ein Satz Neutralglasfilter oder Kaliumdichromatlösung für den UV-Bereich von 325 bis 350 nm.
- **Korrektur der spektralen Strahlungsempfindlichkeit des Detektors.**

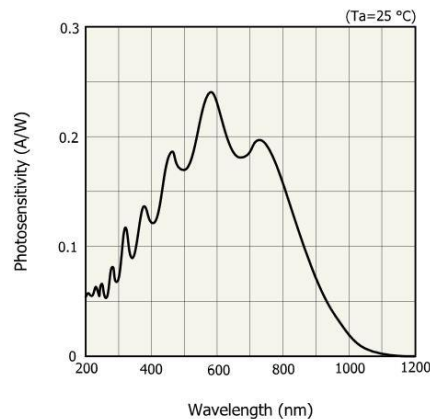


Abbildung 5: Spectral response des Detektors Hamamatsu S3904-1024Q

Abb. 5 zeigt, daß die Empfindlichkeit des Detektors stark von der Wellenlänge abhängt, mit einem starken Abfall gegen das nahe IR. Für exakte Messungen muß dies berücksichtigt werden. Normalerweise sind alle Spektrometer nur auf die Wellenlänge kalibriert. Eine Kalibration auf absolute Bestrahlungsstärken ist dagegen recht selten und kostet in der Regel einen deutlichen Aufpreis. Außerdem geht in die Kalibration noch die Absorption vorgeschalteter Einheiten wie Lichtleiter etc. ein.

Für viele wissenschaftliche Anwendungen ist eine Kalibration auf absolute Bestrahlungsstärken nicht notwendig, weil nur in einem sehr engen Spektralbereich gearbeitet wird oder weil nur Transmission und Reflektivität gemessen wird, bei deren Berechnung die absolute Intensität sowieso nicht eingeht. Wenn das Spektrometer an der y-Achse „counts“ anzeigt, handelt es sich in der Regel um ein nicht-kalibriertes Spektrometer.

Die Kalibrierung erfordert eine Referenzlampe mit bekanntem Verlauf der Emission, ein Bauteil mit hohem Preis und niedriger Lebensdauer.

- **Streulicht** ist definiert als das detektierte Licht einer beliebigen Wellenlänge außerhalb der Bandbreite der detektierten Wellenlänge. Es ist beim MCS herstellerseits bei 240 und 340 nm ermittelt worden, bedingt durch den festen Aufbau nicht zu beeinflussen.
- **Auflösung.** Ergibt sich beim MCS aus den Gitterdaten, der Geometrie des Blockes und aus Diodenzahl und –abstand. Herstellerseits spezifiziert mit 3 nm.
- **Rauschen**
- **Stabilität, Drift**

Für den beabsichtigten Einsatz am Mikroskop sind nur die beiden ersten Prüfungen von Interesse; auf die übrigen Parameter hat man keinen Einfluß, oder sie sind bauartbedingt zu vernachlässigen. Im akkreditierten Prüflabor dagegen wären alle Tests nachzuweisen und zu dokumentieren.

4.3.1. Wellenlängenrichtigkeit

Ein einfacher Test besteht in der Aufnahme eines Leuchtstofflampenspektrums. Die Quecksilberlinie bei 365,48 nm ist schwach, aber immer vorhanden. Die übrigen Linien sind je nach Lampenausführung unterschiedlich ausgeprägt (Abb. 6).

Linien im gesamten Wellenlängenbereich liefern kleine, edelgasgefüllte Glimmlampen. Vorgehensweise und Linientabellen findet man bei unseren Kollegen von der Astronomie-Zunft, die empfindliche, besonders hochauflösende Spektrometer betreiben. Wir Mikroskopiker haben es mit physikalisch bedingt breiten Banden zu tun, so daß die Auflösung kein wesentliches Kriterium ist. Ich habe also die Wellenlängenskala mit einer Lösung von Holmiumperchlorat in Perchlorsäure verifiziert, eine Vorgehensweise, die in DIN- und ASTM-Normen festgelegt ist (z.B. *ASTM E-275: Standard Practice for Describing and Measuring Performance of Ultraviolet, Visible, and Near-Infrared Spectrophotometers*). In den Normen sind auch die Wellenlängen der Absorptionsbanden angegeben. Das Transmissionspektrum zeigt Abb. 7.

Eine verschließbare 1-cm-Küvette wird mit der Lösung gefüllt und auf einen Objektträger gelegt; als Referenz dient dieselbe Küvette gefüllt mit dest. Wasser.

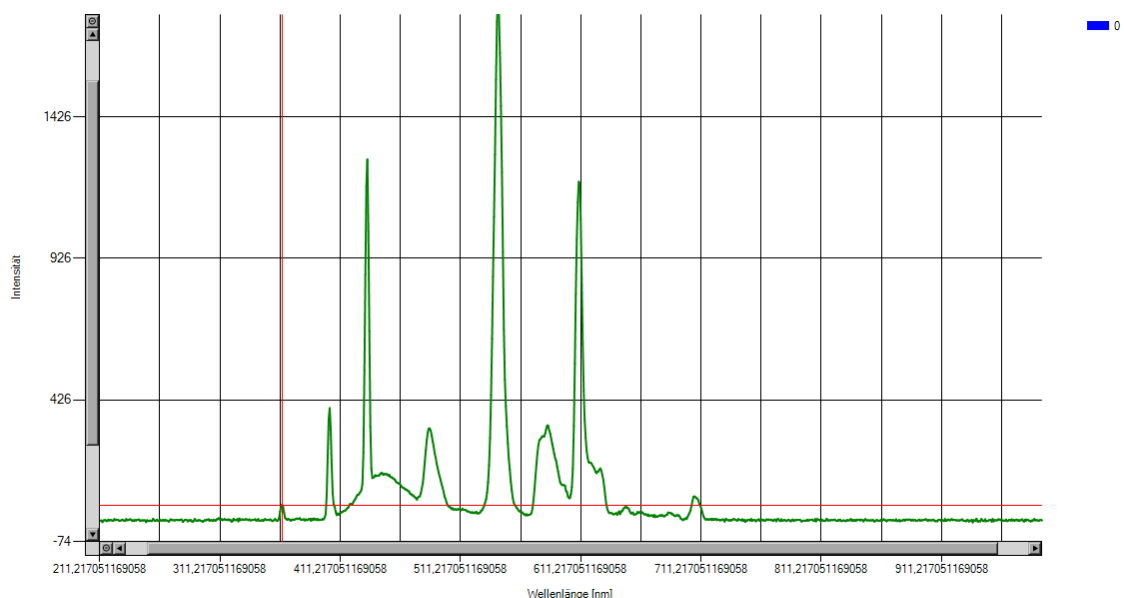


Abbildung 6: Spektrum einer Leuchtstofflampe. Die senkrechte rote Linie markiert die Hg-Linie bei 365 nm. Weitere Hg-Linien 402 nm und 435 nm. Terbium 487 und 542 nm (stärkste Linie). Europium 611 nm (alle aus dem Leuchtstoff).

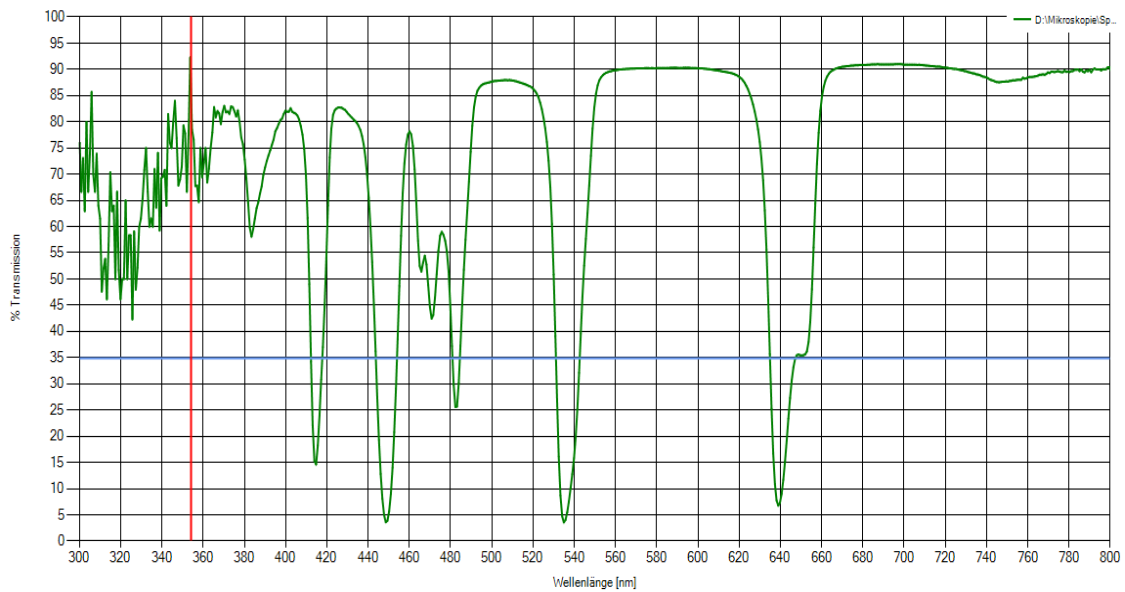
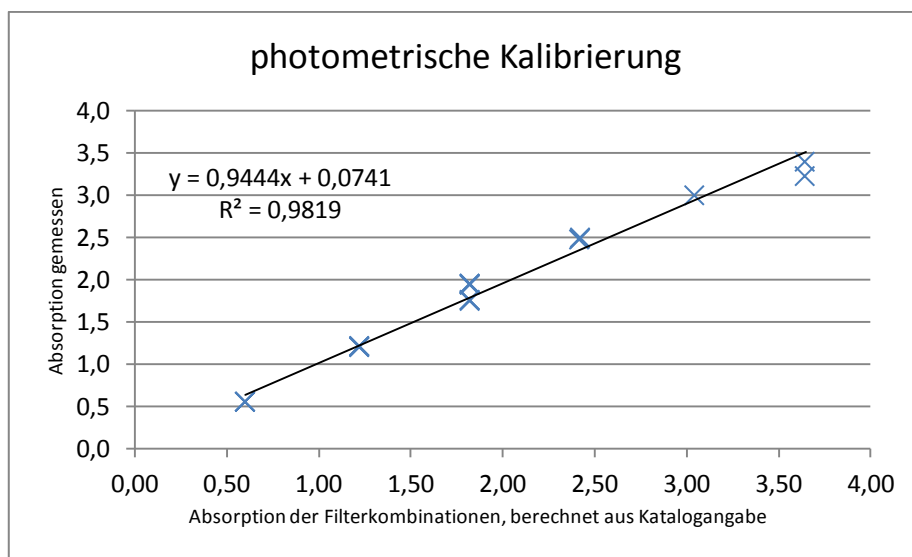


Abbildung 7: Transmissionsspektrum einer Holmiumperchlorat-Lösung in Perchlorsäure, 1-cm-Küvette

Am besten sind Kalibriersätze mit Glasfiltern, wie sie von Geräteherstellern angeboten werden; nachteilig ist der Preis in der Gegend von 800 Euro.

4.3.2. Photometrische Richtigkeit

Zur Prüfung braucht man einen Satz von Neutral- bzw. Graufiltern, wie sie der Mikroskopiker zur Lichtdämpfung verwendet; bei der Zeiss-Axio-Serie oft im Fuß als Filtermagazin vorhanden, mit den Durchlässigkeiten 1,5%/6,0%/25%. Zur überschlägigen Kontrolle des Systems ist das ausreichend; quantitative Konzentrationsmessungen sind schließlich nicht beabsichtigt. An den genannten Filtern wurden die Durchlässigkeiten 1,55/6,24/28 % gemessen. Die entsprechende Kalibrierkurve (Absorption!) zeigt folgende Grafik:



4.4. Optische und mechanische Ankopplung an das Mikroskop

Das Prinzip ist die Abbildung des zu messenden Objektdetails auf die Eintrittsfläche des Lichtleiters; dieser wird also exakt in die Ebene des reellen Zwischenbildes positioniert.

Der Lichtleiter wurde von Thorlabs bezogen (1000 μm Faserdurchmesser, nA 0,39, beidseits SMA-Anschlüsse, 1m, #M35L01). Für die mikroskopseitige Montage können Adapter von Thorlabs (z.B. C-Mount threaded Fiber Adapter CMTSMA -wie in Abb. 4 rechts - oder Bulkhead Adapter HASMA) bezogen werden, oder man bohrt eine SMA-Buchse aus dem Elektronik-Handel auf.

Die Ankopplung erfolgt über den Fototubus: auf einen leeren Okularstutzen ist ein Aluminiumdrehteil aufgeklemt, das an seinem oberen Ende eine Befestigung für den Lichtleiter trägt. Die Eintrittsfläche des Lichtleiters wird genau in der Ebene des reellen Zwischenbildes positioniert (Abb. 8). Damit wird exakt der Teil des Präparates analysiert, der auf kreisförmigen Eintrittsfläche des Lichtleiters abgebildet wird. Die Positionierung läßt sich folgendermaßen einstellen: man nutzt dazu die Eigenschaft abbildender Systeme, unabhängig von der Lichtrichtung zu sein. Mit einer roten Leuchtdiode wird das spektrometerseitige Ende des Lichtleiters beleuchtet; der am mikroskopseitigen Ende entstehende Leuchtfleck wird gewissermaßen rückwärts im Präparat abgebildet und ist als rote, eng begrenzte Markierung sowohl makroskopisch auf dem Präparat als auch im mikroskopischen Bild sichtbar. Voraussetzung ist natürlich ein Fototubus mit 50/50 Strahlenteilung.

Die Größe der „Meßblende“ ist abhängig von der Vergrößerung (Tab. 1). Beim Objektiv 100x ist es also möglich, z.B. die Fluoreszenz-Emission eines einzelnen Chloroplasten zu messen (siehe Abschnitt 4.4).

Objektiv	Meßblende μm
10x	100
20x	50
40x	25
63x	16
100x	10

Tabelle 1: Größe der Meßblende im Objekt bei verschiedenen Objektiven

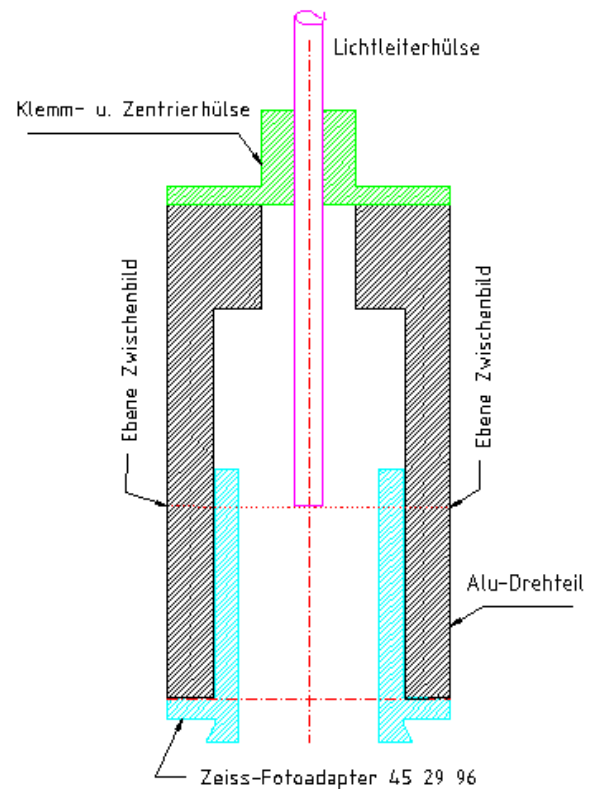
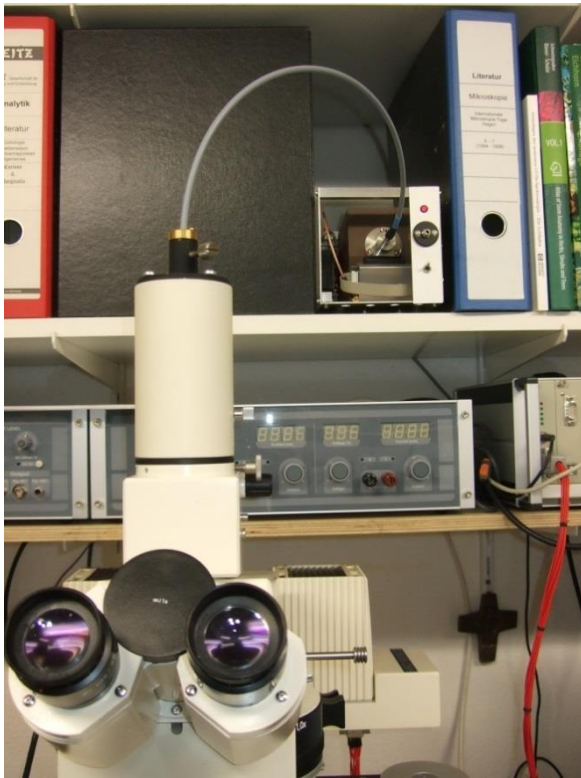


Abbildung 8: Positionierung des Lichtleiters auf dem Fototubus mit der Ringschwalbe des Fotoadapters. Klemmhülse hier Eigenbau, Empfehlung: SMA-Adapter CMTSMA.

Wenn man einen Axiophot-Aufsatz opfern will: man baut die Teile für die nicht mehr zeitgemäßen Analogfotografie aus; dann kann der Lichtleiter mit einer y,x-Verschiebeeinheit zentrier- und fokussierbar im reellen Zwischenbild montiert werden. Vorteil ist die komfortable Umschaltmöglichkeit zwischen Kamera, Okular und Spektrometer, Nachteil ein nicht unbeträchtlicher Empfindlichkeitsverlust von ca. 20% durch die zusätzlichen Glaskörper.

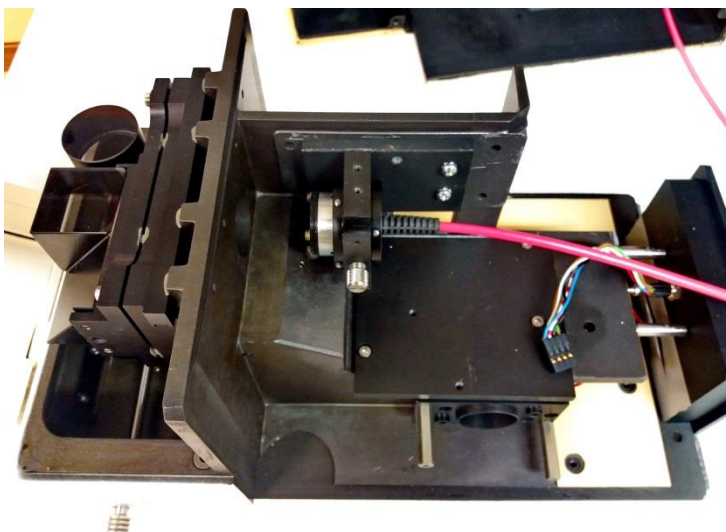


Abbildung 9: Axiophot-Oberteil mit Lichtleiter-Anschluß

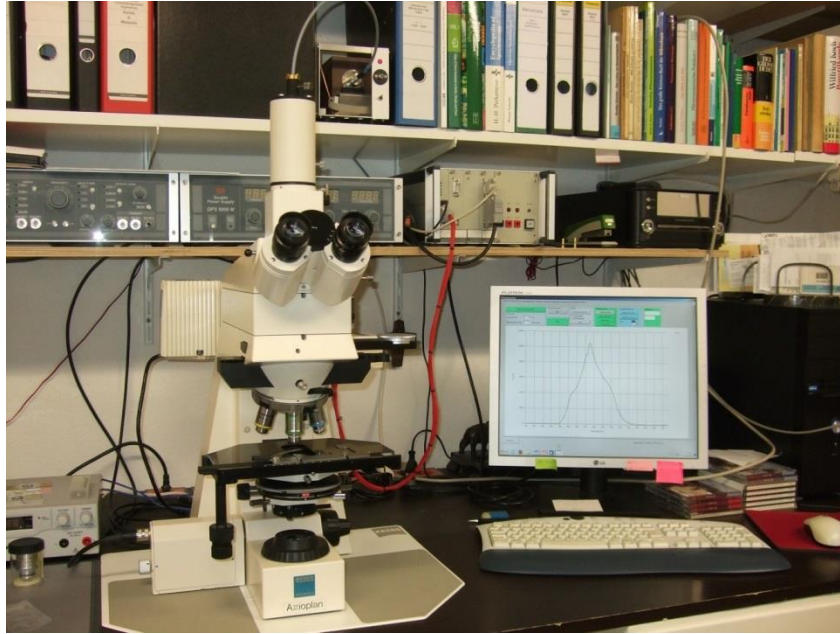


Abbildung 10: Aufbau mit Lichtleiter-Ankopplung und Spektrometer

5. Praktische Anwendungen

5.1. Spektrale Eigenschaften von Lichtquellen – Durchlässigkeit von Objektiven

Die nachfolgenden Emissionsspektren sind alle unkorrigiert, d.h. die spektrale Empfindlichkeit des Detektors ist nicht berücksichtigt, weil eine Kalibrierlampe bisher nicht zur Verfügung stand. Für orientierende Messungen ist das aber ausreichend. Die Halogenlampenspektren haben deshalb nicht die erwartete Planck-Form!

Die eingebaute Halogenlampe hat bei Maximalspannung das in Abb. 11 gezeigte Spektrum, gemessen am Kollektor-Ausgang ohne Wärmeschutzfilter. Nach Durchgang durch die Mikroskopoptik ergibt sich Spektrum Abb. 12. Im langwelligen Bereich ist die Intensität durch das Wärmeschutzfilter erniedrigt. Im Kurzwelligen erkennt man, daß bei etwa 470 nm noch Intensität vorhanden ist, ausreichend z.B. für Blaulicht-Fluoreszenzanregung im Durchlicht. Nach Ausbau des Wärmeschutzfilters ist die Optik durchaus für Aufnahmen im nahen Infrarot noch geeignet, IR-empfindliche Kamera vorausgesetzt. Das sichtbare Licht wird dazu mit IR-Langpaßfiltern abgesperrt, wie in Bild 11 gezeigt.

Zumindest orientierende Messungen sind auch an Objektiven möglich. Abb. 13 zeigt den Vergleich eines 63x1,25 Plan-Neofluars mit einem 63x/1,40 Plan-Apochromaten von Zeiss; erkennbar ist die geringere UV-Durchlässigkeit des Planapos; die zur Fluoreszenz-Anregung übliche UV-Wellenlänge 365 nm wird nicht mehr durchgelassen, das Objektiv ist dafür ungeeignet.

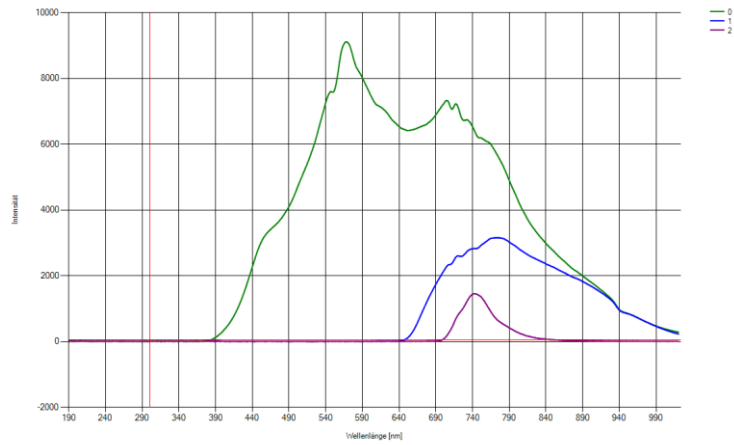


Abbildung 11: Halogenlampe ohne Wärmeschutzfilter. Grüne Kurve: Lampe ohne Filter, blaue und rote Kurve: von zwei verschiedenen IR-Filtern durchgelassenes Licht (Langpaßfilter!). Unkorrigiert (siehe Abschnitt 4.3)

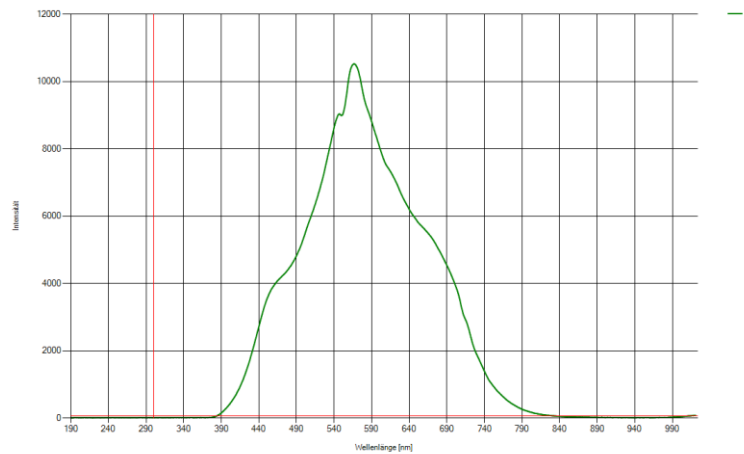


Abbildung 12: Halogenlampe mit Wärmeschutzfilter: Infrarotbereich ausgefiltert. Unkorrigiert (siehe Abschnitt 4.3).

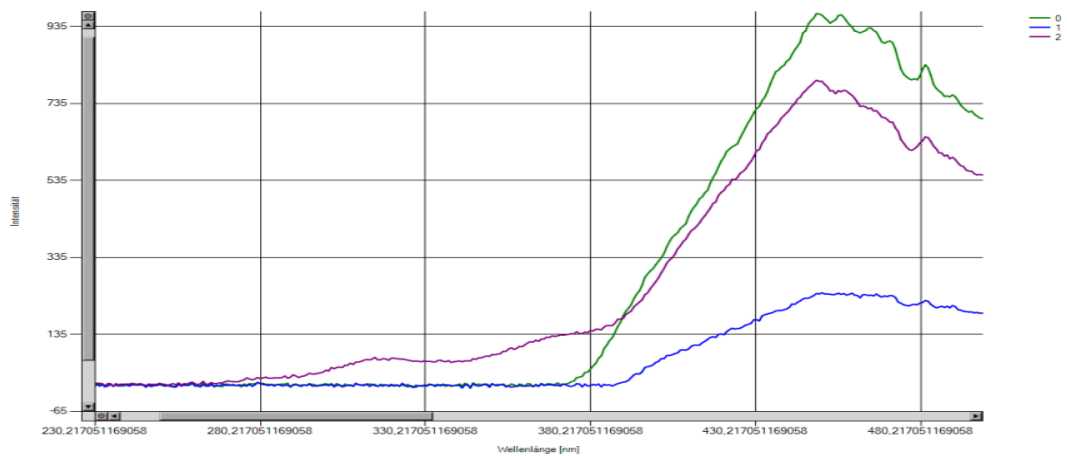


Abbildung 13: Vergleich 63x Plan-Neofluar (grün) mit 63x Planapo (blau). Rot: Blitzlampenspektrum. Intensitätsverhältnisse nur grob qualitativ. Die Beleuchtung mit Blitzlampe sorgte für ausreichende Lichtenergie im UV. Unkorrigiert (siehe Abschnitt 4.3).

5.2. Messung der Emission von LEDs und Blitzlampen

LEDs lassen sich sehr einfach durch Positionierung des Lichtleiters vor der LED messen, feste Montage und Dunkelheit im Raum vorausgesetzt, Beispiele in Abb. 14. Die Intensitäten sind natürlich nicht vergleichbar, weil abhängig von Positionierung des Lichtleiters, der Integrationszeit und der LED-Leistung. Auffällig ist die doch recht breitbandige Abstrahlung der blauen LED. Damit ist klar, daß das Anregungsfilter nicht weggelassen werden darf, andernfalls man einen deutlichen Untergrund erhält. Als Beispiel für eine schmalbandige Abstrahlung ist das Spektrum einer roten Laserdiode überlagert.

Ebenso wird die Emission einer Blitzlampe gemessen, wobei nach dem Entfernen der Streuscheibe eine erheblich erhöhte Intensität im UV beobachtet wird; die Blitzlampe kann also auch als Lichtquelle für den nahen UV-Bereich bis etwa 300 nm genutzt werden (Abb. 15).

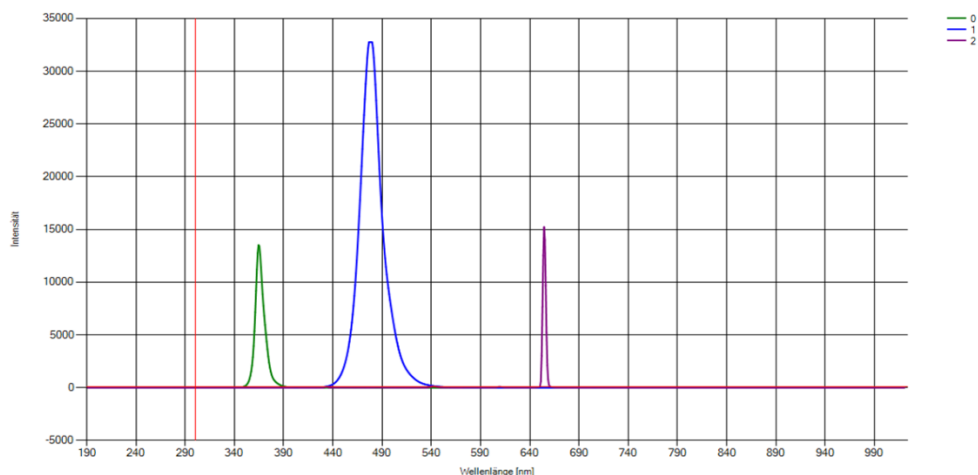


Abbildung 14: LED-Emissionen. Grün: 365-nm-LED von Nichia, blau: 470-nm-LED, violett: rote Laserdiode

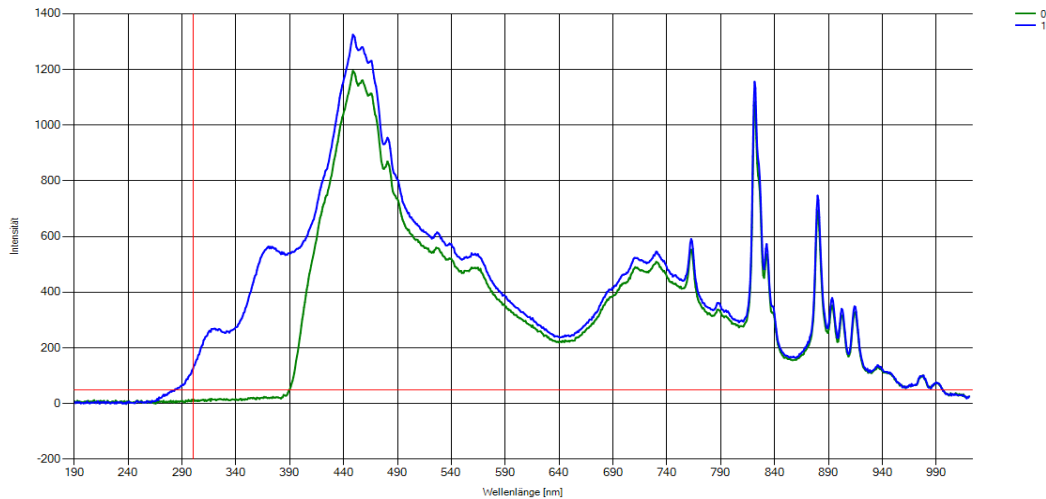


Abbildung 15: Fotoblitz Agfamatic mit UV-absorbierender Streuscheibe (grün) und ohne Streuscheibe (blau). Unkorrigiert (siehe Abschnitt 4.3).

5.3. Messung von Filtercharakteristiken

Hierzu wird das Mikroskop selbst genutzt: das zu messende Filter wird in den einschwenkbaren Filterhalter unter dem Kondensator eingelegt. Zuerst wird ein Referenzspektrum ohne Filter aufgenommen, danach das Meßspektrum. Die „Menge“ des absorbierten Lichts ist die Differenz zwischen der ursprünglichen Lichtintensität I_0 und der Intensität I nach Wechselwirkung mit dem Filter. Die Menge des absorbierten Lichts kann als Transmission und als Absorption ausgedrückt werden. Die Transmission T wird als Bruchteil von 1 ausgedrückt oder in Prozent:

$$T = I / I_0 \quad \text{oder} \quad \%T = (I / I_0) * 100$$

Die Absorption A ist folgendermaßen definiert:

$$A = - \log T$$

Die unterschiedliche Darstellung ist in den Spektren zu beachten!

Auf diese Weise wurden die nachfolgenden Absorptionskurven gewonnen. In gleicher Art kann jedes Filter vermessen werden. Es mag verwundern, daß die Emissionskurve der Lichtquelle wie in Abb. 11/12 keinen Einfluß hat; es wird aber der *Quotient* aus den Intensitäten mit und ohne Filter gebildet. Die spektrale Empfindlichkeit des Detektors wirkt sich deshalb nicht aus.

Kleinere Filter lassen sich auf einen Objektträger messen: einmal ohne, einmal mit aufgelegtem Filter, nicht ganz korrekt, aber man erhält brauchbare Spektren. Als Beispiel sei ein Transmissionspektrum eines Interferenzfilters mit unbekanntem Daten gezeigt (Abb. 16).

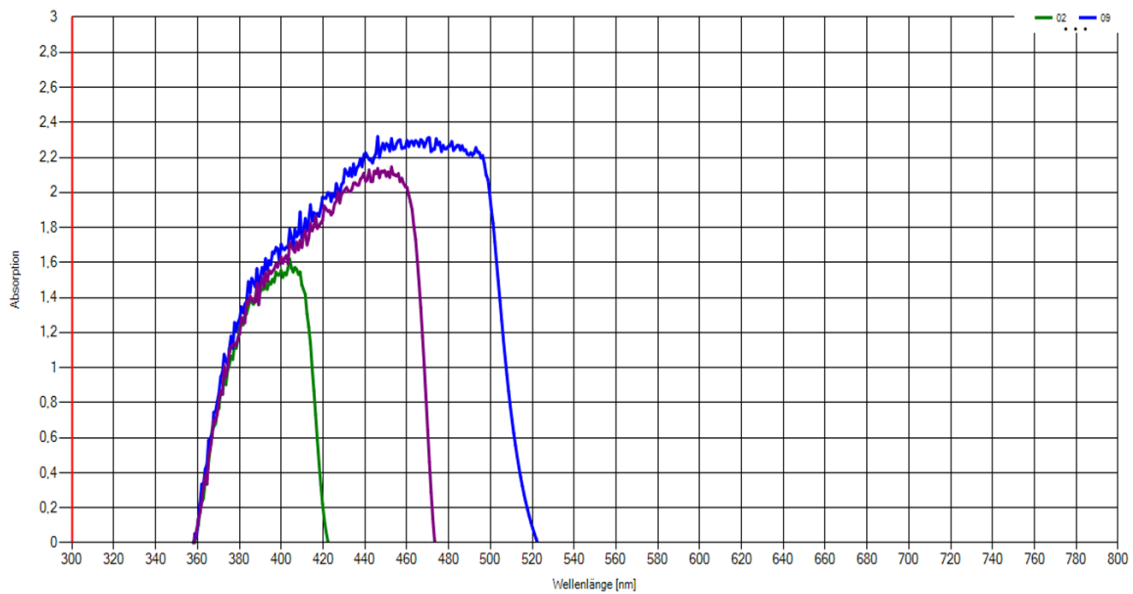


Abbildung 16: Absorptionskurven von Fluoreszenz-Sperrfiltern. Grün: Filtersatz 02 (LP420), violett Filtersatz 05 (LP470), blau Filtersatz 09 (LP515).

Am lang- und am kurzwelligen Ende des Spektrums ist das Rauschen sehr stark, weil hier die Lichtquelle praktisch keine Emission hat. Sinnvollerweise wird das Spektrum nur im nutzbaren Bereich von 380 nm bis 800 nm aufgenommen.

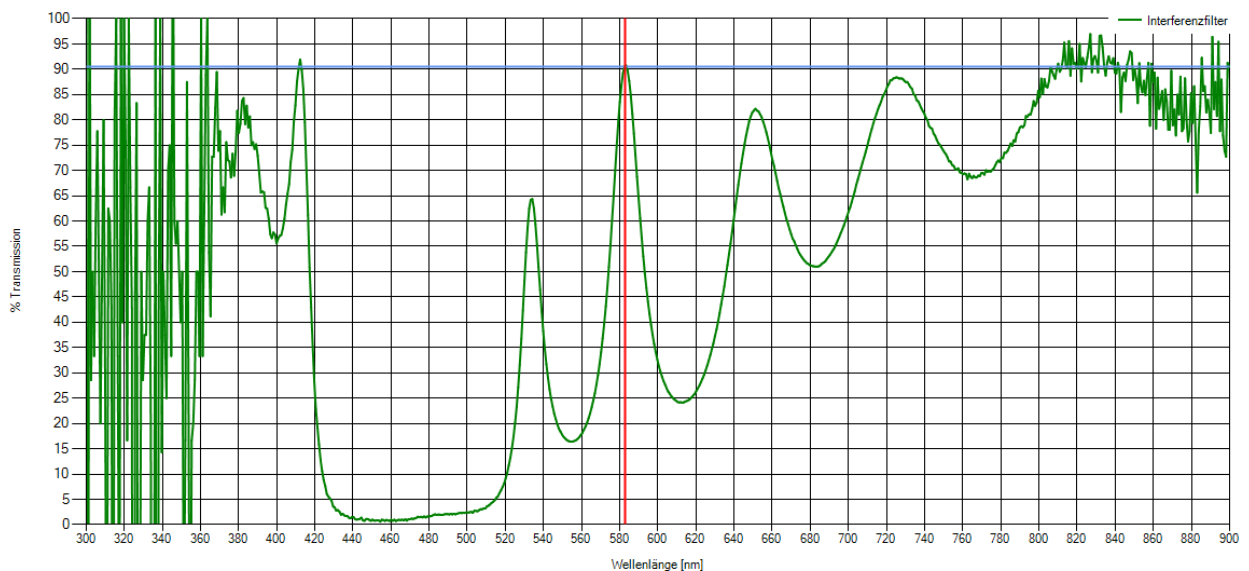


Abbildung 17: Transmissionsspektrum eines unbekanntes Interferenzfilters.

5.4. Absorptionsmessungen an mikroskopischen Objekten

Als erstes Beispiel sei hier der Pleochroismus an Hornblendekristallen gezeigt. Im mikroskopischen Bild ist bei Drehung des Kristalls eine Farbänderung von gelbgrün nach blaugrün erkennbar (Abb. 18); dies ist natürlich auch spektrometrisch meßbar (Abb. 19):

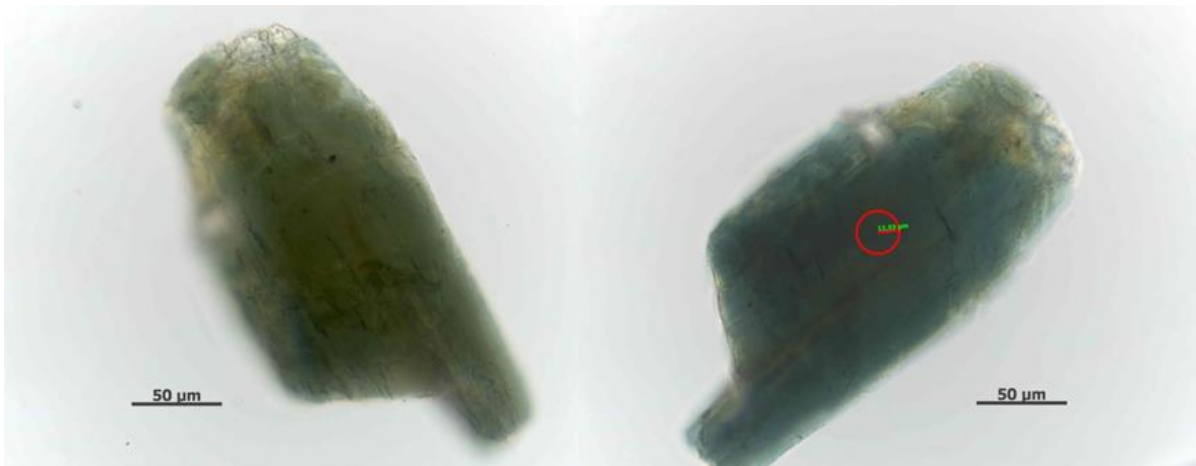


Abbildung 18: Hornblendekristalle - Pleochroismus. Der rote Kreis im rechten Bild zeigt die Position der Meßblende.

Man erkennt im Spektrum deutlich die Verschiebung der Maxima: die grüne Kurve des rechts abgebildeten Kristalls mit einem hohen Blauanteil, die blaue des linken Kristalls mit einem Maximum im Grünen bei etwa 540 nm.

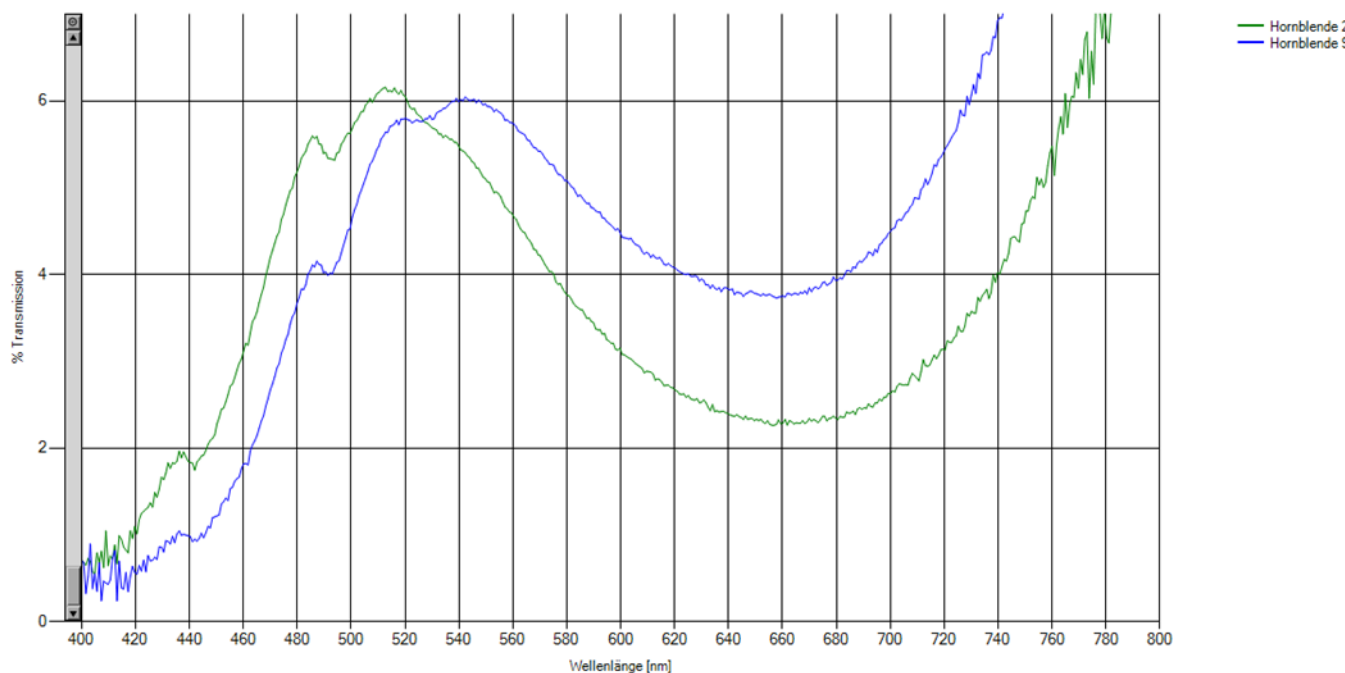


Abbildung 19: Transmissionsspektren zu Abb. 18 a/b

Sehr schön lassen sich auch Fluoreszenzspektren messen – hier als erstes Beispiel die Fluoreszenz des Chlorophylls. Abb. 20 zeigt eine Durchlichtaufnahme eines Moosblättchens mit den Chloroplasten, Abb. 21 das Fluoreszenzbild dazu bei 470 nm Anregung.

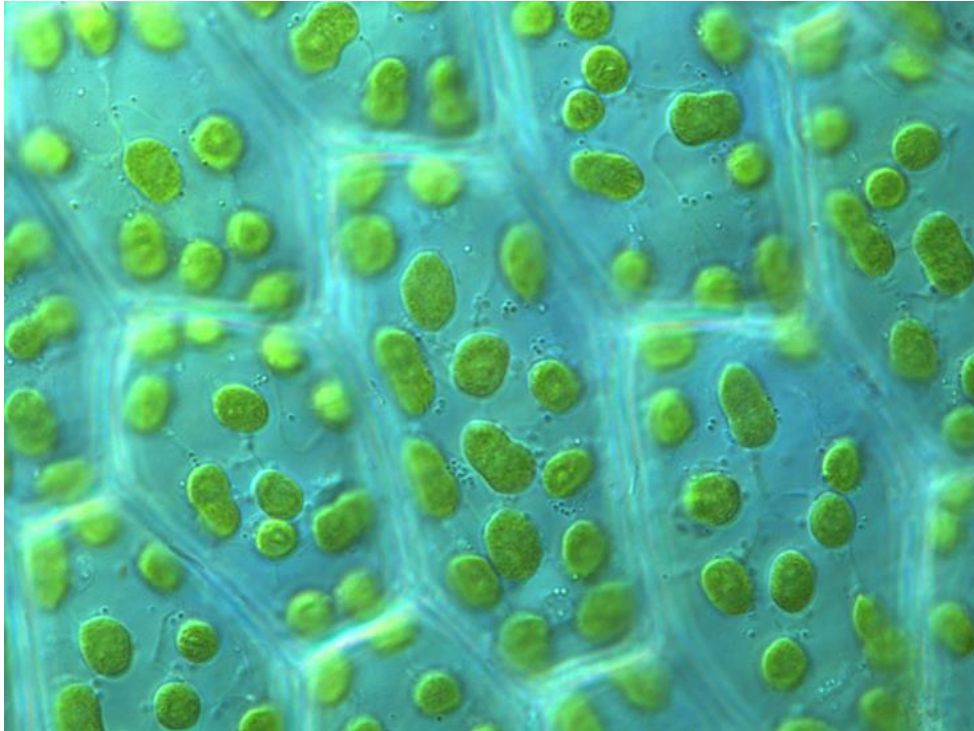


Abbildung 20: Chloroplasten eines Moosblättchens, Hellfeld DIK

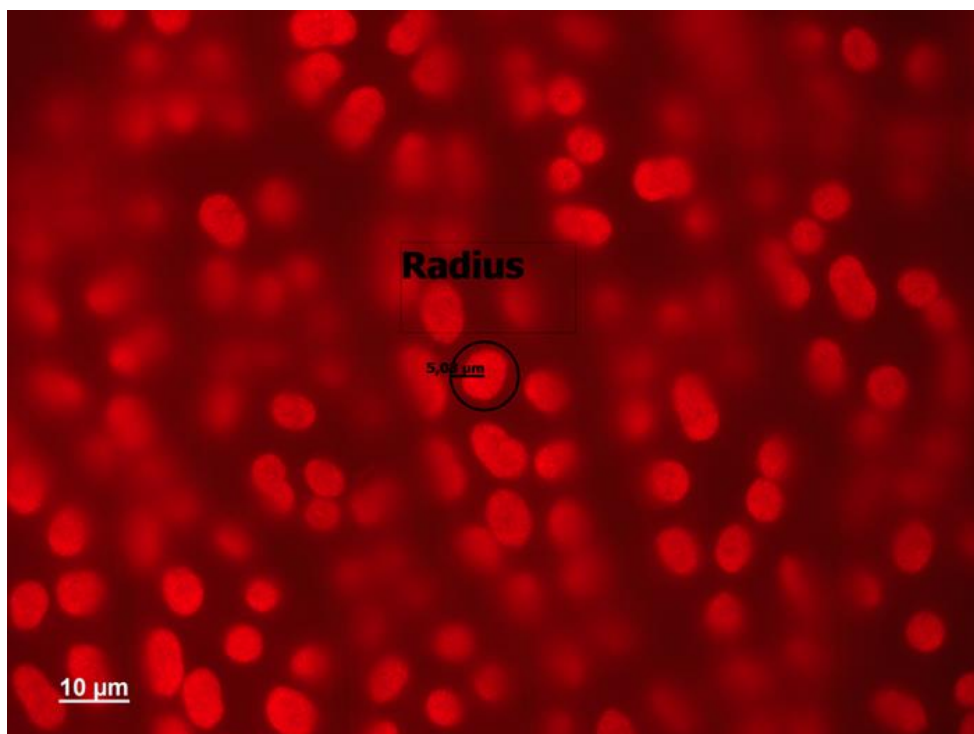


Abbildung 21: Chlorophyll-Fluoreszenz bei 470 nm Anregung. Der Kreis zeigt die Position der Meßblende, Durchmesser 10 μm.

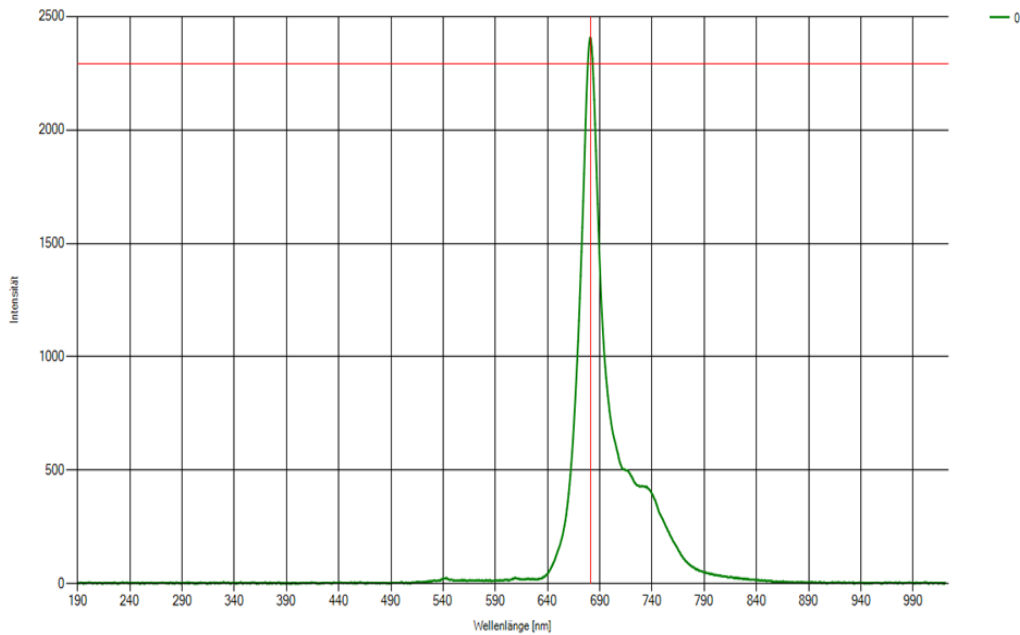


Abbildung 22: Spektrum zu Abb. 16, Emissionssignal mit Maximum bei 481 nm.

Anorganische Pigmente

Auf der alten 5-Euro-Banknote sind bei genauem Hinsehen schwach gelbe kleine Kreise zu erkennen (Abb. 23 links). Mikroskopische Untersuchung bei höherer Vergrößerung beweist, daß die Druckfarbe aus anorganischen Pigmenten besteht. Interessanterweise fluoreszieren diese kleinen Kreise bei Anregung im UV (365 nm) sehr stark im Roten (Abb. 23 rechts). Das Spektrum zeigt überraschenderweise eine sehr schmale Bande bei 611 nm; dies beweist eine Europium-Dotierung des Pigments (Abb. 24).

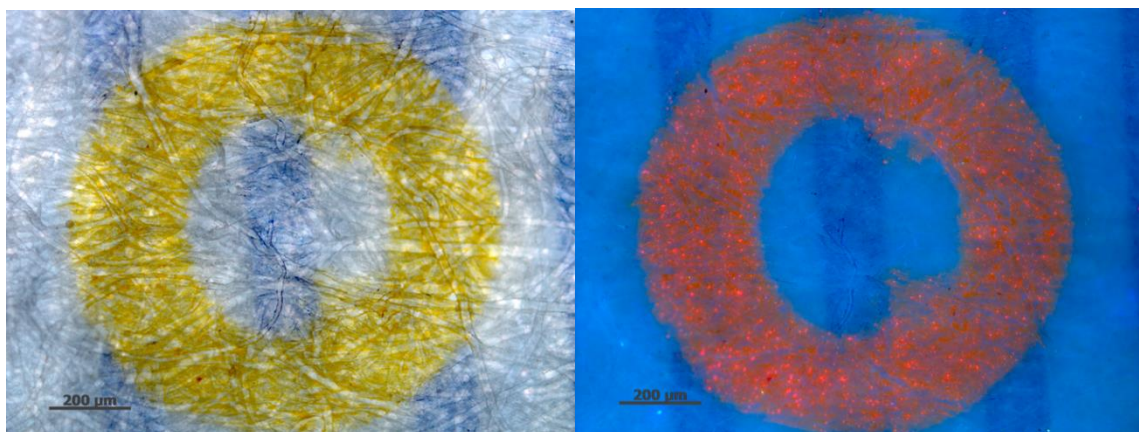


Abbildung 23: links: gelbe Markierung auf 5-Euro-Banknote im Auflicht; rechts: gleiches Objekt bei UV-Anregung.

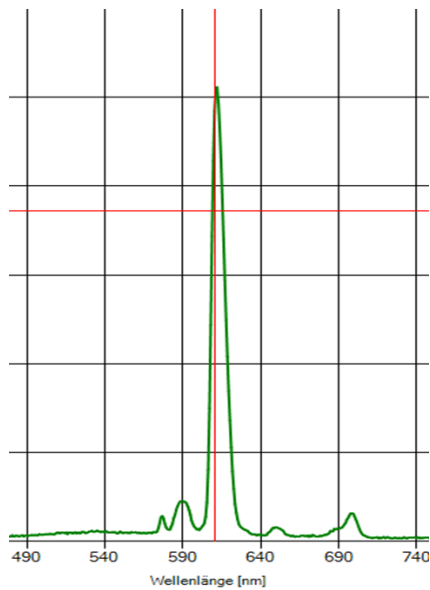


Abbildung 24: Fluoreszenzspektrum zu Bild 21 rechts; Anregung 365 nm, Emissionsmaximum bei 611 nm.

5.5. Schichtdickenmessung

Eine dünne Haushaltsfolie erscheint im unpolarisierten Durchlicht völlig klar und ungefärbt. Das Transmissionsspektrum zeigt aber deutliche Interferenzerscheinungen:

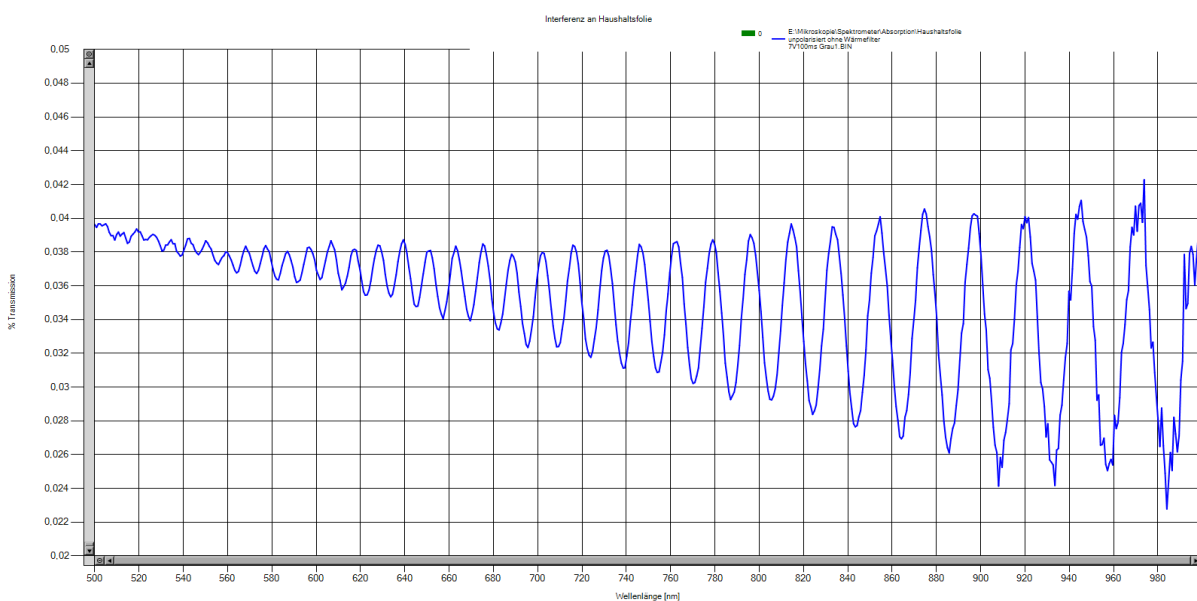


Abb. 24: Interferenz an dünner Haushaltsfolie. Wärmeschutzfilter der Lampe ausgebaut, um bis ins Nah-IR messen zu können, Meßbereich dadurch bis 1020 nm.

Durch Einstrahlung von Weißlicht entstehen an optisch transparenten Schichten Interferenzen durch Reflexion an Ober- und Unterseite der Schicht. Bei bestimmten Wellenlängen tritt konstruktive, bei anderen destruktive Interferenz auf. Wird die Intensität dieses Interferenzsignales über der Wellenlänge aufgetragen, zeigen sich abwechselnd Minima und Maxima, wie in Abb. 23 dargestellt. Das sieht einer Sinus-Kurve ähnlich, ist aber keine! Aus dem Kurvenverlauf lassen sich Schichtdicke oder Brechungsindex berechnen. Die

Rechenverfahren sind sehr komplex, die Beschreibung würde den Rahmen dieses Berichts bei weitem sprengen und sei einem weiteren MKB-Artikel vorbehalten.

6. Bewertung und Ausblick

Mit diesen Beispielen sollte nur eine kleine Auswahl von interessanten Anwendungen der Mikrospektrofotometrie gezeigt werden. Besonders wertvoll ist die Einrichtung für die Vermessung unbekannter Filter; es gibt aber oft auch überraschende und unerwartete Ergebnisse, die sich auf anderem Wege nicht erzielen lassen, wie die Pigmentanalyse der Eurobanknote, oder die Schichtdickenmessung durch Interferometrie.

Aber auf die Frage, ob man so ein Gerät wirklich braucht, kann ich nur ehrlich antworten: nein – macht aber mächtig Spaß.

Die Einrichtung ist auch nicht ganz billig. Der Preis eines neuen Spektrometerblocks entspricht dem eines kompletten Mikroskops. Der Eigenbau eines Spektrometers aus Gebrauchtteilen setzt Menge Optik-, Elektronik- und Programmierkenntnisse voraus. Für Einfachst-Geräte gibt es im Internet zahlreiche Bauanleitungen, z.B. unter Verwendung einer CD als Gitter.

Einen einfachen, äußerst kostengünstigen Weg hat Johannes Kropiunik gewiesen, der ein brauchbares Spektrometer aus einem Gitter, zwei Rasierklingen für den Eintrittsspalt und ein wenig Sperrholz gebaut hat (Beitrag in Mikro-Forum.de vom 29. Oktober 2013). Anders als oben beschriebenen Apparatur ist der Meßfleck nicht kreisförmig, sondern ein Spalt. Als Detektor wurde eine normale Digitalkamera eingesetzt, die Auswertesoftware ist im Internet zugänglich und produziert brauchbare Spektren. Die Auflösung ist wesentlich höher als für die Mikroskopie erforderlich, allerdings ist die Einrichtung auf den Wellenlängenbereich 400 bis 650 nm beschränkt, also nicht für UV/NIR geeignet. J. Kropiunik hat auch herausgefunden, daß mit seinem Gerät durch Verschieben des Präparates unter dem Eintrittsspalt *Multispektralfotos* machbar sind, bei denen jedem Bildpixel also ein komplettes Spektrum hinterlegt ist. Durch Software-Filterung ließen sich so Fotos von einzelnen selektierten Wellenlängenbereichen extrahieren. Die Methode ist nicht so neu wie das Forum seinerzeit geglaubt hat; das ist das „push-broom-Verfahren“, Geräte werden von Firmen wie CytoViva und Pariss seit langem vertrieben. Die laterale Auflösung in x-Richtung ist immer durch die Schrittweite des Motortisches begrenzt.

Beide Einrichtungen sind auch nicht für die Raman-Spektroskopie geeignet; sie haben beide eine zu geringe Auflösung und Empfindlichkeit. Aber selbst der Eigenbau eines brauchbaren Raman-Spektrometers ist machbar, wie Stefan Örtel (www.uranglasuren.com) und J. M. Derochette (www.jm-derochette.be) gezeigt haben.

Thilo Bauer sei herzlich für seine konstruktive Kritik und das Korrekturlesen gedankt!

Stand Januar 2021