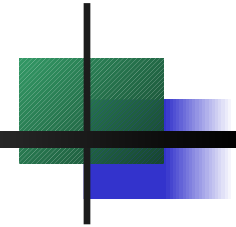


# Spektroskopie/Spektrometrie im ultravioletten bzw. sichtbaren (UV/Vis)

Instrumentelle Bioanalytik, Biotechnologie (B.Sc.), 6. Sem. (HSWT)

Prof. Dr. Michael Schrader



## Lernziele/ -fragen

- Physikalisches Grundprinzip?
- Zuordnung aller spektroskopischen Methoden auf Skalen Wellenlänge, Frequenz, Energie
- Bezug von Molekülstrukturen, über quantenmechanischer Beschreibung von Bindungen, zu Wechselwirkungen mit Strahlung herstellen und berechnen können
- Quantifizierung theoretisch beschreiben und Größen berechnen
- Kenntnis zum Aufbau der Geräte und Nutzung der Methoden

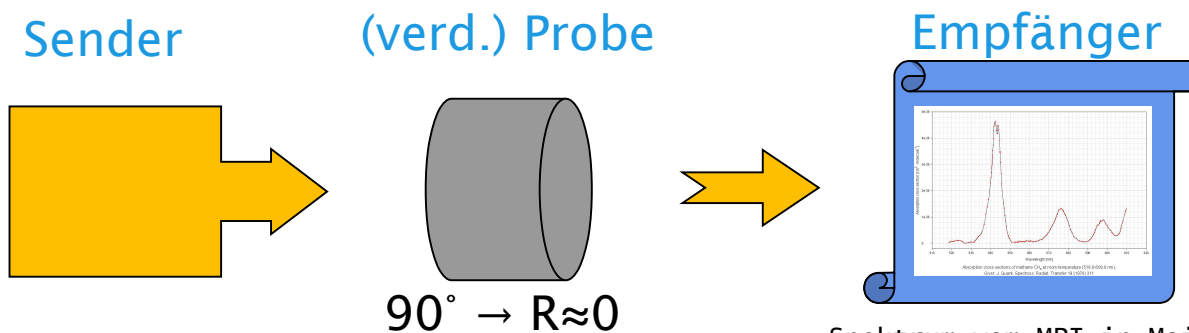
## Inhalte

- Elektromagnetische Wellen und
- Elektromagnetisches Spektrum
- Quantenmechanische Grundlage
- Farben, Sehen und Messen
- Gesetz von Lambert und Beer
- Chromophore
- Spektrometeraufbau
- Praktische Aspekte

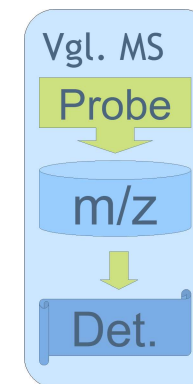
# Spektroskopische sowie Optik-Grundlagen

- Spektroskopie:  
Messung der Wechselwirkung von **elektromagnetischer** Strahlung mit Materie/Molekülen/Atomen
- Beschreibung von **Wellen**, Welle/Teilchen-Dualismus
- Energiezustände sind diskret (**Quantentheorie**)
- Energieaufnahme/**Absorption** bzw. -abgabe/**Emission**
- Intensitätsänderung der Strahlung erlaubt Rückschlüsse auf die untersuchte Materie:  
 $R+T+A = 100\%$   
(Reflektions-/Absorptions-/Transmissionsf.)

Der Unterschied zwischen Aufnahme an einer Oberfläche (d) oder im Volumen (b)  
Quelle: <http://www.eric.n1/Chemviron/P%20adsorption.htm>



Spektrum vom MPI in Mainz  
<http://satellite.mpic.de/>



Prof. M. Schrader  
HS Weihenstephan-Tr.

# Einschub: Grundlegende Phänomene und zugehörige Bauteile der Optik (neu in 2025)

- Licht und benachbarte Strahlungsarten
- Welle-Teilchen-Dualismus, elektromagnetische Wellen
- Brechung, Reflexion, Totalreflexion
- Streuung, Interferenz und Beugung (sowie Polarisation)
  
- Weiterführende Literatur  
Lehrbücher der Physik, z.B.
  - Gerthsen Physik, Springer
  
  - Bergmann/Schaefer, Lehrbuch der Experimentalphysik, deGruyter, 10. Aufl. 2004

Erinnerungen aus der Physik?

# Licht und andere Strahlungsarten (Entwurf)

- ◆ **Licht**

  - **Definition:** (Nur!) Die Strahlungsart, die mit menschlichem Auge zu sehen ist.
  - **Farben:** Teilebereiche von Licht (je nach Wellenlänge)
  
- ◆ **UV**

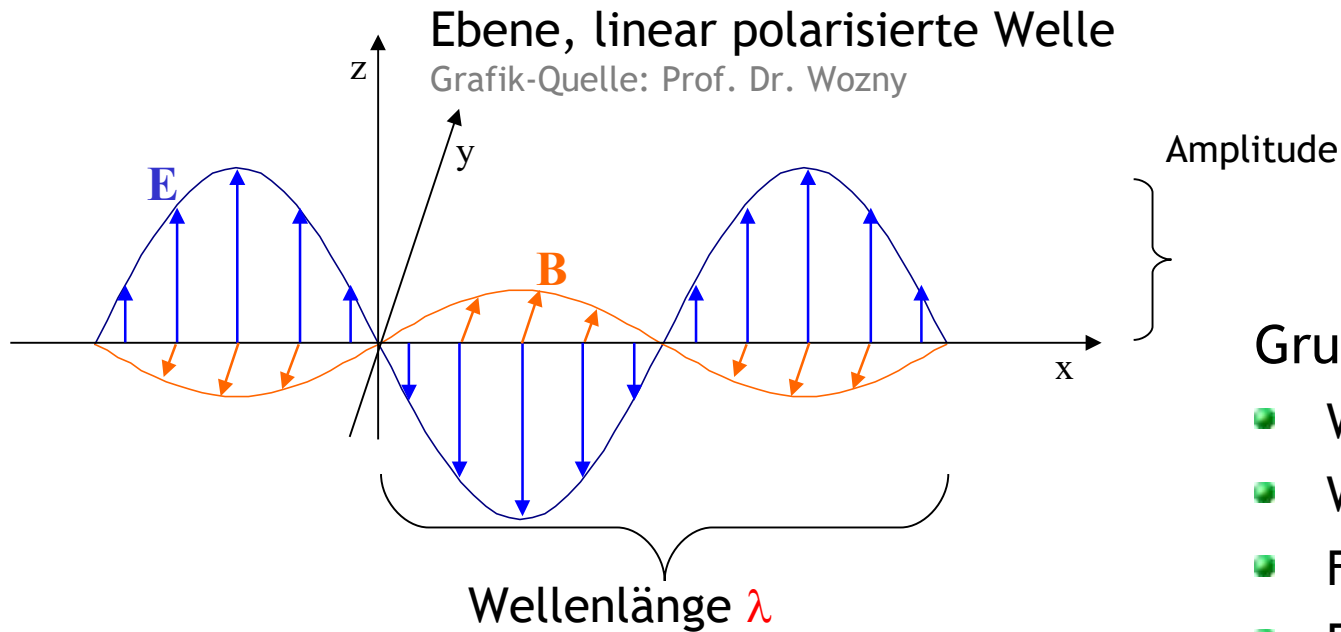
  - **Phänomen:** unsichtbar und energiereicher
  - **nnn:** fff = ttt
  
- ◆ **Infrarot**

Strahlungsart	untere Grenze (nm)	obere Grenze (nm)
Vakuum-UV	100	200
fernes UV-C	200	280
mittl. UV-B	280	315
Nahes UV-A	315	380
Licht (Vis)	380	780
Nah-Infrarot	780	1400
mittl. IR	1400	3000
fernes IR	3000	10 <sup>6</sup>
Mikrowellen		

Quelle: Bergmann/Schaefer, deGruyter 2004

# Strahlung = elektromagnetische Wellen

## Physikalische Beschreibung



Diese Wellen breiten sich (im Vakuum) mit immer derselben **Lichtgeschwindigkeit  $c$**  aus.

$$c = 299\,792\,458 \text{ m/s} \approx 3 \cdot 10^8 \text{ m/s}$$

*Alles in der Welt geht in der Wellenlinie.*

*Jede Landstraße und so weiter...*

*Wehe dem, der überall ein Lineal anlegt!*

*Wilhelm Raabe (1831 - 1910), Weserbergland*

### Grundbegriffe

- Welle
- Wellenlänge
- Frequenz
- Energie
- Amplitude
- Geschwindigkeit
- Dosis
- Interferenz
- ...

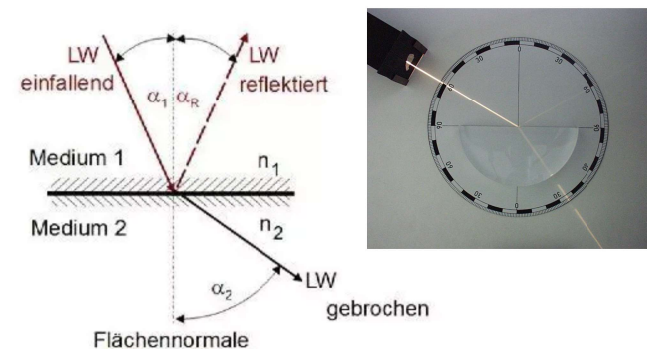
# Brechung, Reflexion, Transmission

- Brechung**
  - **Basis:** Die Lichtgeschwindigkeit ist für Vakuum definiert und ändert sich in optisch dichteren Medien.
  - **Maßzahl:** Brechzahl oder Brechungsindex  $n = c/v$ , diese ist abhängig von Wellenlänge (bei Flüssigkeiten auch deutlich T-abhängig)
  - **Phänomen:** Bei Auftreffen auf ein optisch dichteres Medium ändert sich der Durchtrittswinkel zum Einfallswinkel (s. Abb.; falls nicht  $90^\circ$ )

- Reflexion**
  - **Phänomen:** Einfallswinkel = Ausfallswinkel
  - **Maßzahl:** Reflexionsgrad = reflektierte Lichtintensität/ einfallende Lichtintensität
  - für **senkrechten Lichteinfall** ist der Reflexionsgrad  $= [(n-1)/(n+1)]^2$ ; also 4 % bei  $n=1,5$
  - der Unterschied steigt mit Abweichung von  $90^\circ$
  - ab einem Grenzwinkel tritt **Totalreflexion** ein, also keine Brechung mehr; dieser Winkel ist umso kleiner je größer die Brechzahl (daher glitzern z.B. Diamanten)

Stoff	$n_e, 20^\circ \text{ C}$ 546 nm	nD 589 nm
Luft	1,0003	
Wasser	1,3446	1,3330
Ethanol	1,3635	
CaF <sub>2</sub>	1,4350	1,4338
Quarz	1,4601	
Benzen	1,5045	1,5013
NaCl	1,5474	
Diamant	2,4235	

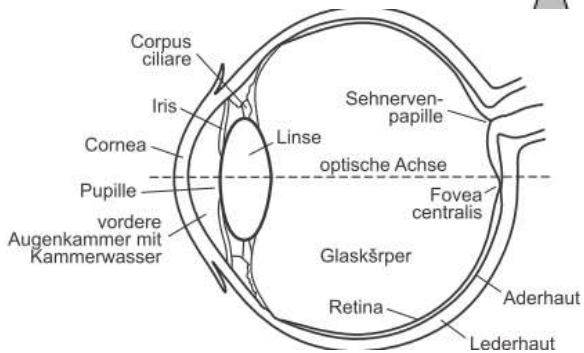
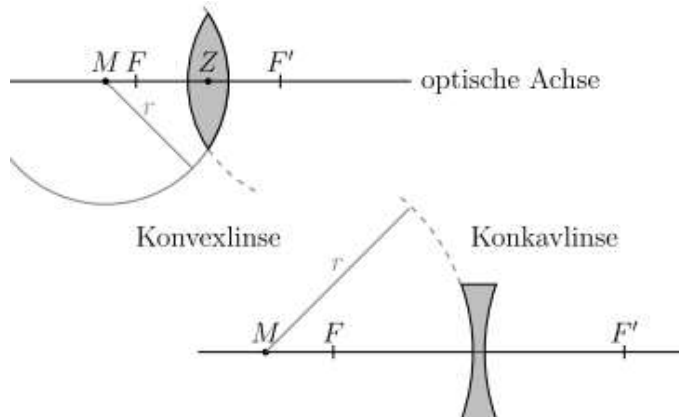
Quelle: Bergmann/Schaefer, deGruyter 2004



Quellen:  
- [polymerservice-merseburg.de/.../Brechzahl](http://polymerservice-merseburg.de/.../Brechzahl)  
- [de.wikipedia.org](http://de.wikipedia.org)

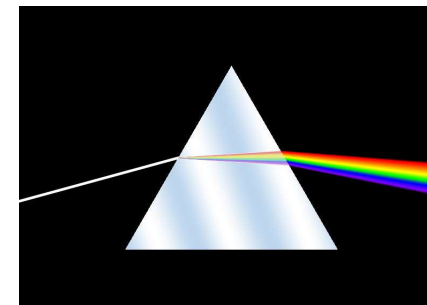
Prof. M. Schrader  
HS Weihenstephan-Tr.

# Grundlegende Bauteile zu Brechung



Quelle: FU Berlin, Physikal. Praktikum  
„Optische Komponenten“

- Linsen
  - konvex (Sammellinse, fokussierend)
  - konkav (Streulinse)
- Auge ist Konvexlinse
- Kombination von Linsen führt zu
  - Fernrohr
  - Foto-Objektiven
  - Mikroskopen
- **Prisma** (Prinzip Brechung)
  - je nach Ausfallswinkel treten unterschiedliche Wellenlängen aus

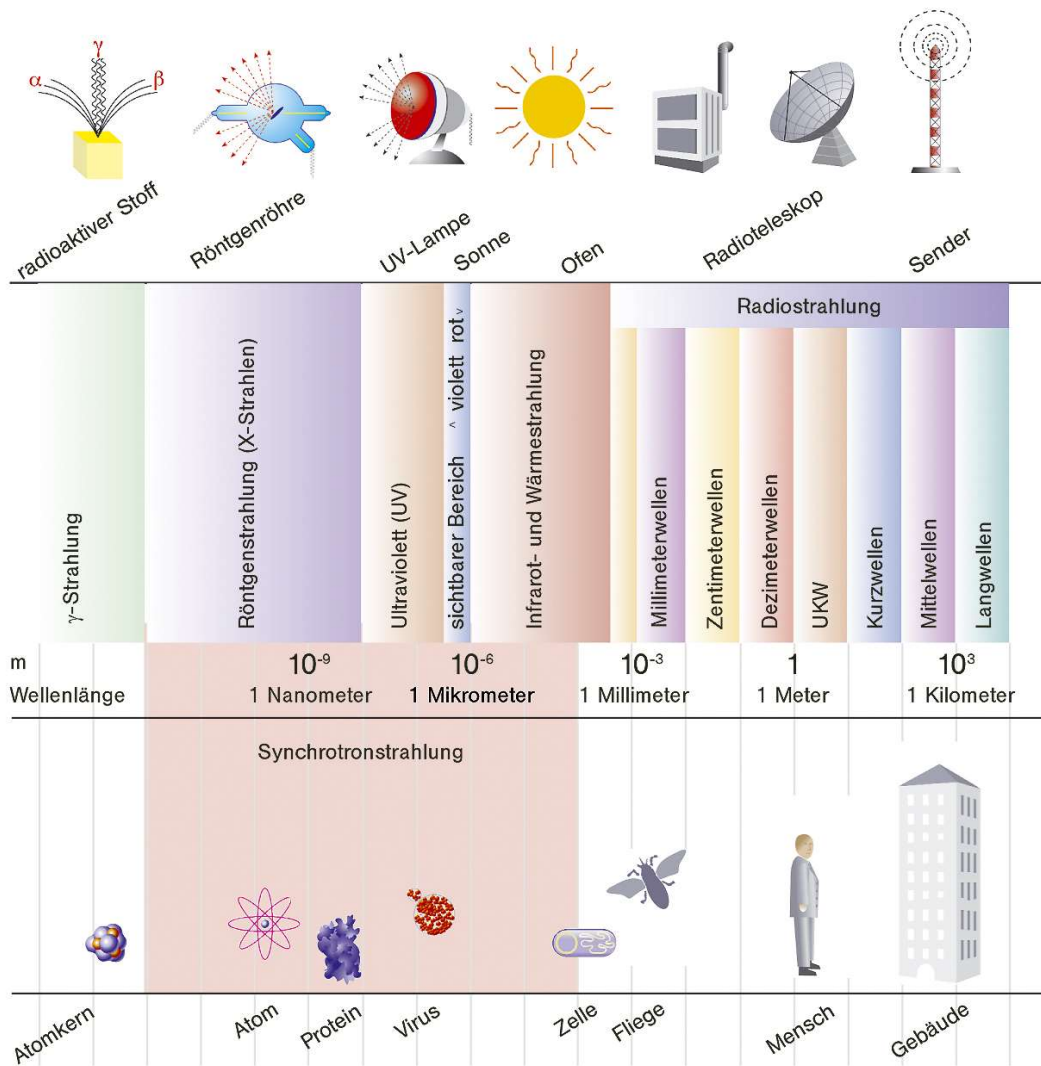


Quelle: <https://commons.wikimedia.org>



# Wellenlängen im elektromagnetischen Spektrum

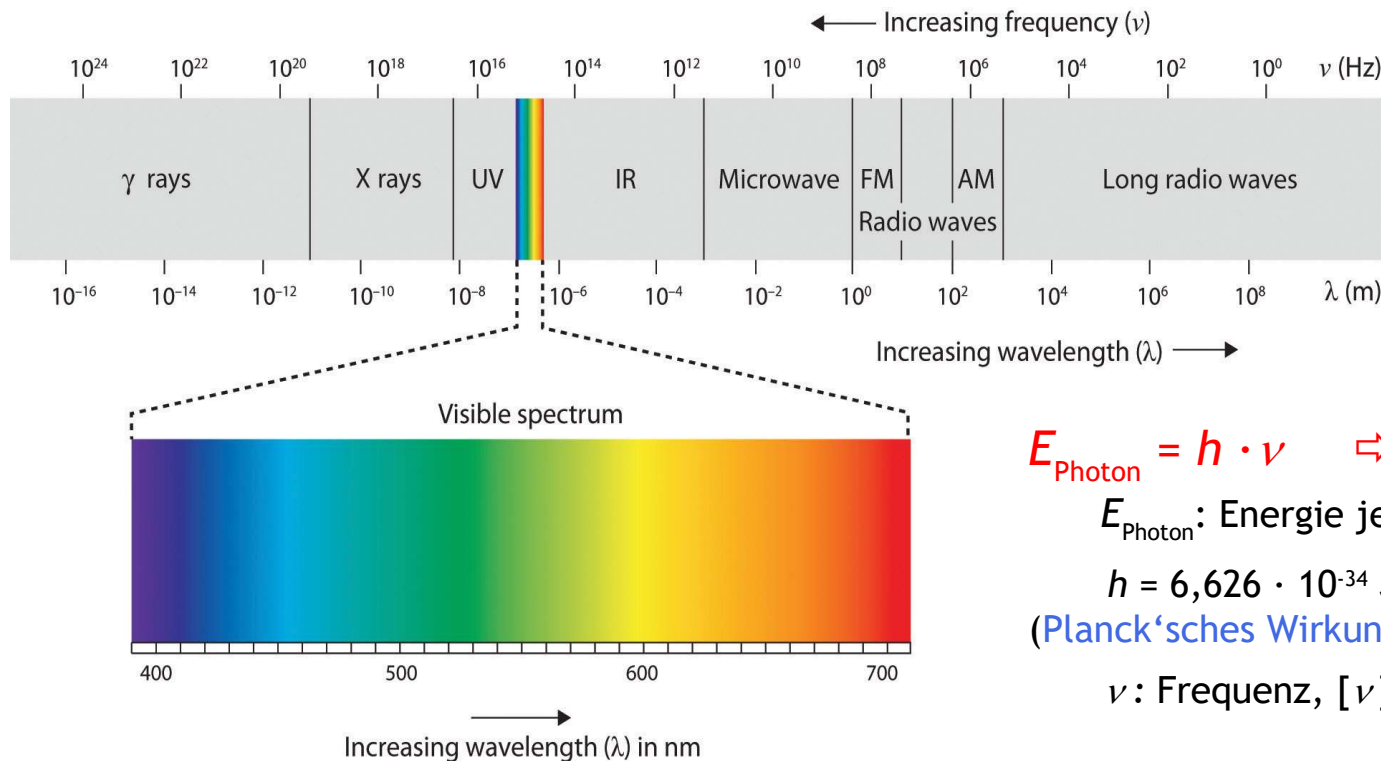
(vgl. Cammann, S. 4-3)



- Beispiel für Strahlungsquelle
- Art der Strahlung (viele Strahlungsarten, alle mehr oder weniger intensiv spektroskopisch genutzt)
- Wellenlänge
- Vergleichsobjekte zur Wellenausdehnung

Quelle: <http://www.desy.de/pr-info/desyhome/html/presse/fotos/hasylab/>

# (Sichtbares) Licht und Kenngrößenberechnung im Spektrum der elektromagnetischen Strahlung



$$E_{\text{Photon}} = h \cdot \nu \quad \Leftrightarrow \quad E_{\text{Photon}} = h \cdot c / \lambda$$

$E_{\text{Photon}}$ : Energie je Photon

$$h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$$

(Planck'sches Wirkungsquantum)

$\nu$ : Frequenz, [ $\nu$ ] = 1/s

Üblicher in [ $E_{\text{mol}}$ ] = kJ/mol:

$$E_{\text{mol}} = N_A \cdot h \cdot \nu$$

(oder 1 eV entspr. 96,5 kJ/mol)

Quantenmechanische Randbedingung:  
Energieübergang in der Probe  
entspricht Strahlungsenergie

Quelle: <http://2012books.lardbucket.org/books/beginning-psychology/s08-02-seeing.html>

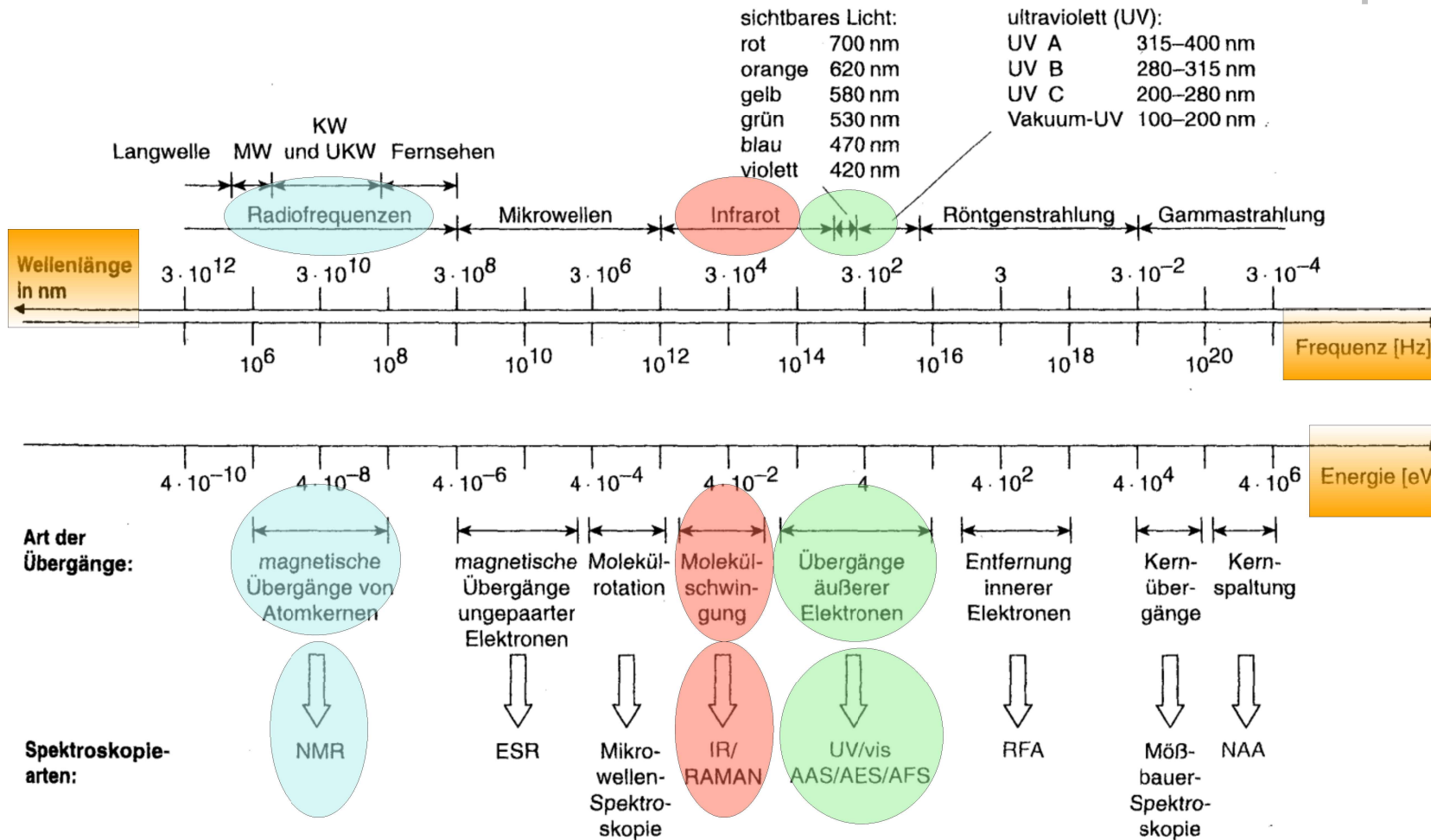
Zusammenhang Wellenlänge  $\lambda$  und Frequenz  $\nu$   
über Lichtgeschwindigkeit  $c$

$$c = \lambda \cdot \nu \quad \Leftrightarrow \quad \nu = c / \lambda$$

Historisch auch üblich,

Wellenzahl:  $\bar{\nu} = 1/\lambda$  (in  $\text{cm}^{-1}$ )

# Informationsreichste Übersicht zum Spektrum der elektromagnetischen Strahlung



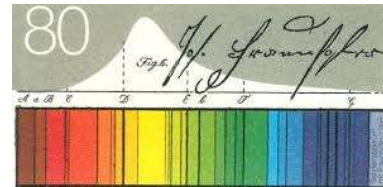
## 4.2 Spektrum der elektromagnetischen Strahlung mit Zuordnung der verschiedenen Spektroskopiearten. Cammann 2001

Quelle: Cammann, Instrumentelle Analytische Chemie, Spektrum, Heidelberg 2001, S. 4-3

# Historie und Literatur zu UV-Vis

## Historie

- Analytik über Farbvergleiche
- Sonnen- und Atomspektroskopie als Ausgangspunkte (Fraunhofer sowie Bunsen/Kirchh., vgl. Abb.)
- Vis-Spektroskopie zu Anfang 20. Jh., UV ab etwa 1940
- In Chemie-, Bio- und LM-Technologie extrem verbreitetes Standard-Verfahren



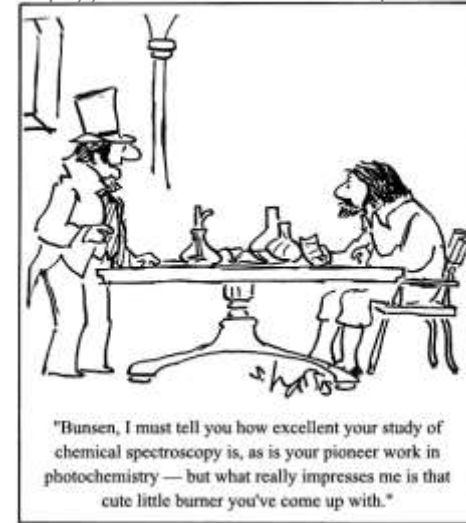
Joseph von Fraunhofer *Optik und Physik* 1827-1828 Deutsche Bundespost 1987

Quelle:  
<http://www.fraunhofer.de>




Quelle und Ausflugstipp:  
<https://www.benediktbeuern.de>

<http://www.sciencecartoonsplus.com>



"Bunsen, I must tell you how excellent your study of chemical spectroscopy is, as is your pioneer work in photochemistry — but what really impresses me is that cute little burner you've come up with."

## Literatur

- UV-Vis als oft genutzte Methode in nahezu allen gängigen Analytik- und Spektroskopiebüchern
- In Moodle: „Grundlagen, Instrumentation und Techniken der UV VIS Spektroskopie“
- Fundamentals of UV-visible spectroscopy, Tony Owen, in HSWT-Bibliothek und PC-Praktikum oder als pdf für registrierte Nutzer  [www.chem.agilent.com/scripts/cag\\_registerNew.asp](http://www.chem.agilent.com/scripts/cag_registerNew.asp)
- Im WWW: [http://www.chemgapedia.de/vsengine/topics/de/Chemie/Physikalische\\_00032Chemie/Spektroskopie/index.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/topics/de/Chemie/Physikalische_00032Chemie/Spektroskopie/index.html)
- Perkampus „UV-Vis-Spektr. und ihre Anw.“, Springer 1986/92

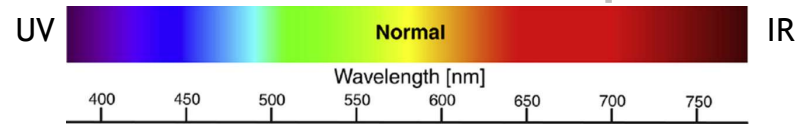


Gebäudeschild  
in Heidelberg

Prof. M. Schrader  
HS Weihenstephan-Tr.

# Grundlagen der UV-Vis-Spektroskopie

- Sichtbares Licht: etwa 390 - 750 nm  
UV:  $\lambda < 400$  nm, typisch 190-400 nm
- Die Einstrahlung von UV bzw. sichtbarem Licht führt zur Anregung von äußeren (Bindungs-) Elektronen von Molekülen.
- Bei Raumtemperatur sind Moleküle im Grundzustand. Absorption von Licht bildet angeregte Moleküle  
 $M + h \cdot \nu \rightarrow M^*$
- Im UV-Vis-Bereich vorhandene „Energieportionen“ entsprechen elektronischen Übergängen (HOMO  $\rightarrow$  LUMO)
- Im UV-Bereich geht es über zu Bindungsbrüchen  
(prüfe:  $E_{\text{mol}}(555\text{nm}) = 217$  kJ/mol;  
 $E_{\text{mol}}(254\text{nm}) = ?$   
und vgl. mit typischen Bindungsenergien)



Farbspektrum für normale Menschen;  
Quelle: Hofmann und Palczewski (2015):  
doi:10.1016/j.preteyeres.2015.07.004



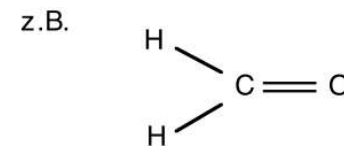
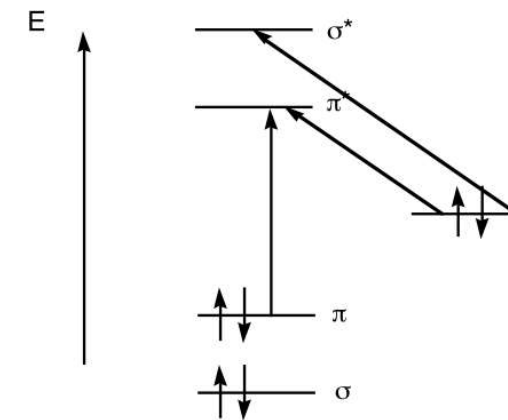
Brechungsspektrum eines Prismas (2020):  
<https://www.itp.uni-hannover.de>

## Fragestellungen zur optischen Spektroskopie (UV-Vis)

- Welche Moleküle absorbieren und bleiben intakt?
- Wie kann die Wechselwirkung quantitativ beschrieben werden (Lambert-Beer)?
- Wie ist ein Spektrometer aufgebaut?
- Wie sehen Messergebnisse aus?
- Wofür wird die Methode genutzt?

# Forts. Grundlagen der UV-Vis-Spektroskopie

- Messbar sind vor allem Übergänge, an denen  $\pi$ -Elektronen beteiligt sind. ( $\pi \rightarrow \pi^*$  und  $n \rightarrow \pi^*$ ). Übergänge von  $\sigma$ -Bindungen sind energiereicher (absorbieren bei  $< 190$  nm)  
(vgl. Abb. in Lottspeich + Cammann)
- Im Vis-Bereich dominieren Übergänge unter Beteiligung von konjugierten  $\pi$ -Elektronensystemen oder d-Orbitalen (Nebengruppenelemente)
- Die zugeführte Energie wird überwiegend als Wärme wieder abgegeben (nicht als Licht; Ausnahme sind polierte Metalloberflächen)
- Beispiele aus der Biotechnologie
- Typisch ist Absorption in breitem  $\lambda$ -Bereich, sogenannte „Bandenspektren“, (Erklärung folgt im Kapitel Fluoreszenz)

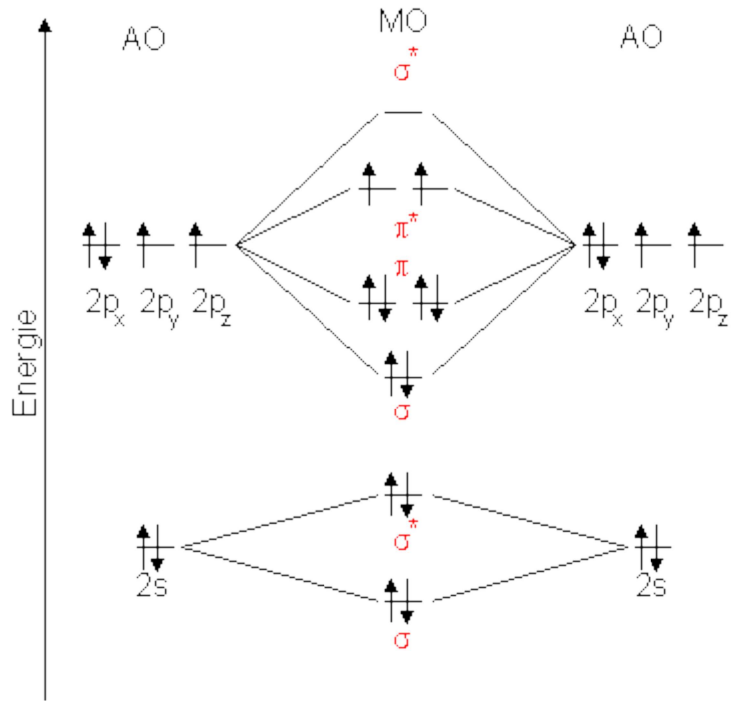


$n \rightarrow \pi^*$ -Übergang:	304 nm ( $\epsilon = 18$ )
$\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang:	208 nm
$n \rightarrow \sigma^*$ -Übergang:	vermutlich um 180 nm

Quelle:ETH-Zürich  
<https://www.analytik.ethz.ch/vorlesungen/biopharm/Spektroskopie/UV.pdf>

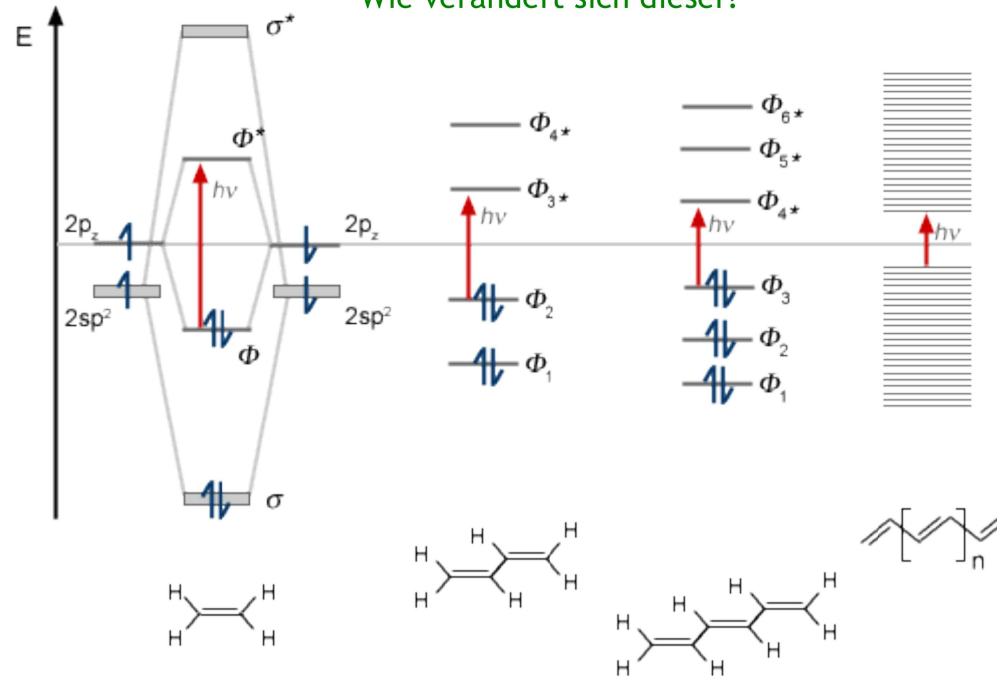
# Orbital-Termschemata

## Erinnerung + Fortführung



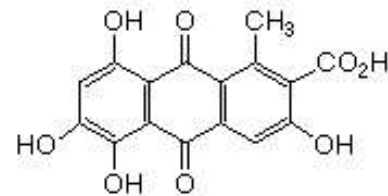
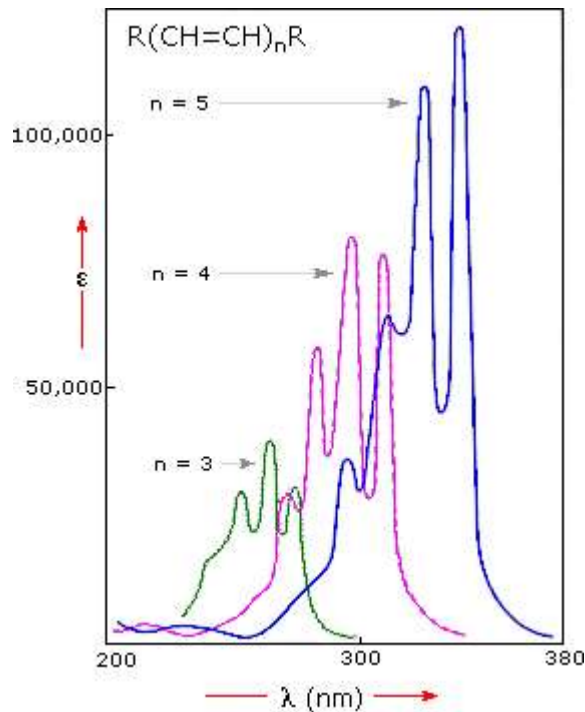
MO-Schema von Polyenen,  
bei der der HOMO-LUMO-Abstand variiert  
(Grenzzustand ist 1D-quasi-metallisch)  
Quelle: <http://www.chemgapedia.de/>

Wo findet sich der HOMO-LUMO-Abstand?  
Wie verändert sich dieser?

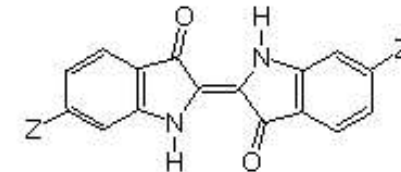


# Einfluss der Konjugation und natürliche Farbstoffe (je mehr Doppelbindungen, desto eher im Vis)

## Some Natural Organic Pigments



**Kermesic Acid  
(Carminic Acid)**  
from the insect *Coccus cacti*

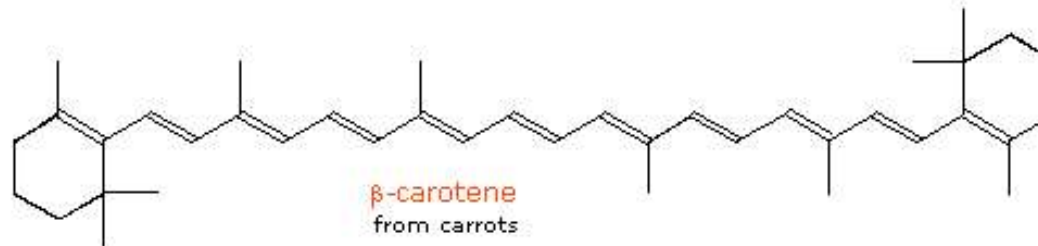


$Z=H$   
**Indigo**  
from *Isatis tinctoria* (woad)

$Z=Br$   
**Punicin or Tyrian Purple**  
from mollusks of the genus *Murex*



**Crocetin**  
from saffron



**$\beta$ -carotene**  
from carrots

Quelle: <http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/UV-Vis/spectrum.htm>

- Welche typischen Bausteine machen Moleküle zu Farbstoffen?
- Welche sind chemisch eher stabil

# Durchbruch in der Farbstoffsynthese

## Mauveinsynthese durch Perkin (per Zufall)

**Experiment: Preparation of Mauvein**

The reaction scheme shows the synthesis of Mauvein from aniline, p-toluidine, and o-toluidine using  $K_2Cr_2O_7$  and  $H_2SO_4$ . The product is Mauvein, a triphenylmethane dye, and  $HSO_4^-$ .

*T. Massmann*

TU DELFT

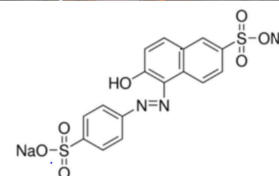
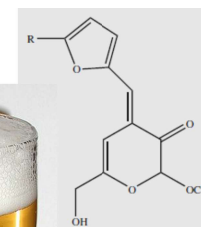
Quelle: [http://www.morechemistry.com/publ/colours\\_dyes/slide114.html](http://www.morechemistry.com/publ/colours_dyes/slide114.html)

- Kennen Sie den Begriff „Teerfarben“? Recherchieren Sie im Zweifel.
- Kennen Sie den Namen „IG Farben“? Recherchieren Sie im Zweifel.
- Wie wurde noch etwa bis zum 2. Weltkrieg gefärbt?
- Was bedeutet die Abkürzung BASF und was hat das mit diesem Thema zu tun?

# Farbempfinden des menschlichen Auges

Bei etwa welchen Wellenlängen absorbieren diese Getränke?

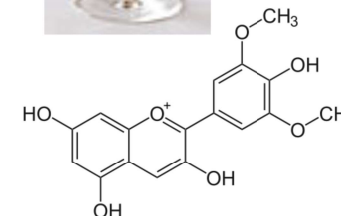
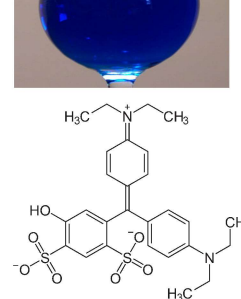
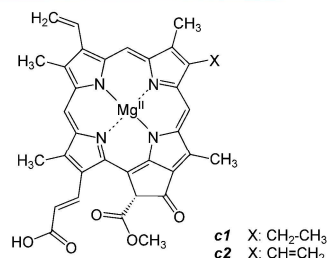
- Orangenlimo
- Bier
- Kaffee
- Rotwein
- Grüntee
- Blue Curacao
- Aperol
- Campari
- Cognac



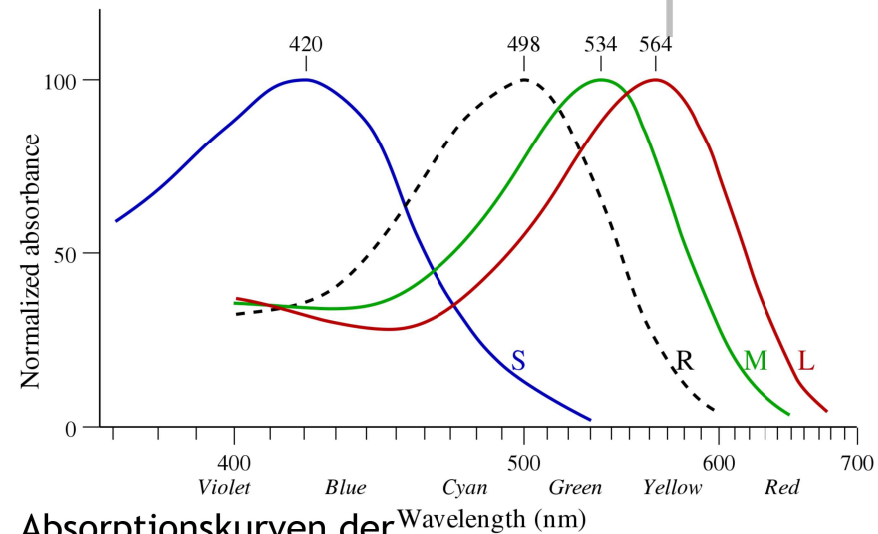
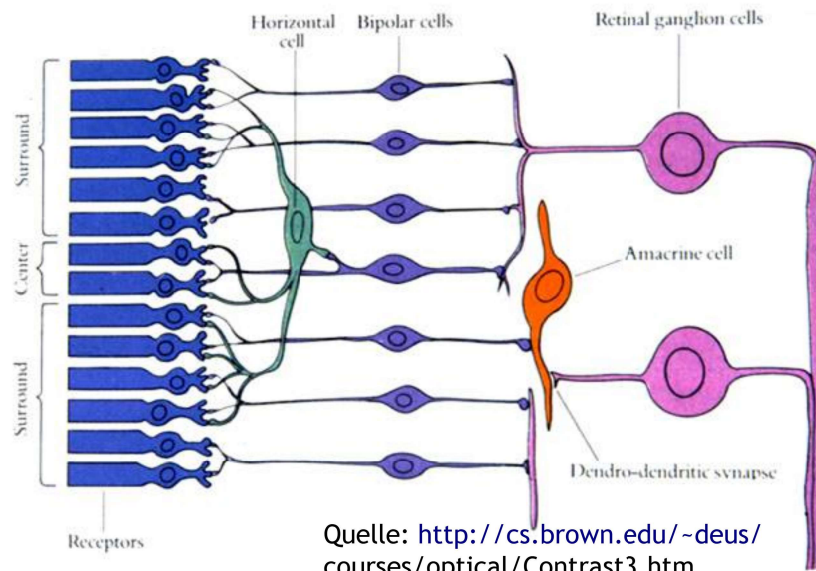
Datenquellen: wikimedia commons sowie Matissek Lebensmittelchemie, Springer



Bei welchen Wellenlängen absorbieren diese Getränke?



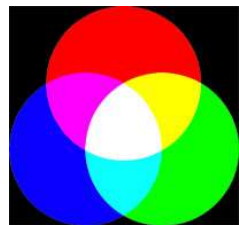
# Lichtdetektion und -prozessierung vom menschlichen Auge



Absorptionskurven der Zapfen (S, M, L) und der Stäbchen (R).

Quelle: de.wikipedia.org; user Maxim Razin based on work by w>User:DrBob and w>User:Zeimusu. - After Bowmaker J.K. ; and Dartnall H.J.A., "Visual pigments of rods and cones in a human retina." J. ; Physiol. 298: pp501-511 (1980).

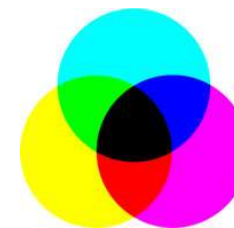
- Jede bipolare Zelle ist mit mehrere Photorezeptoren verbunden.
- Etwa 125 Mio. Rezeptoren, bei 1 Mio. Ganglien-Zellen
- Lit.-Tipp: <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2013.08.009>



**Emission**  
RGB  
ergibt  
weiß

additiv	subtraktiv
Red	cyan
Green	magenta
Blue	Yellow

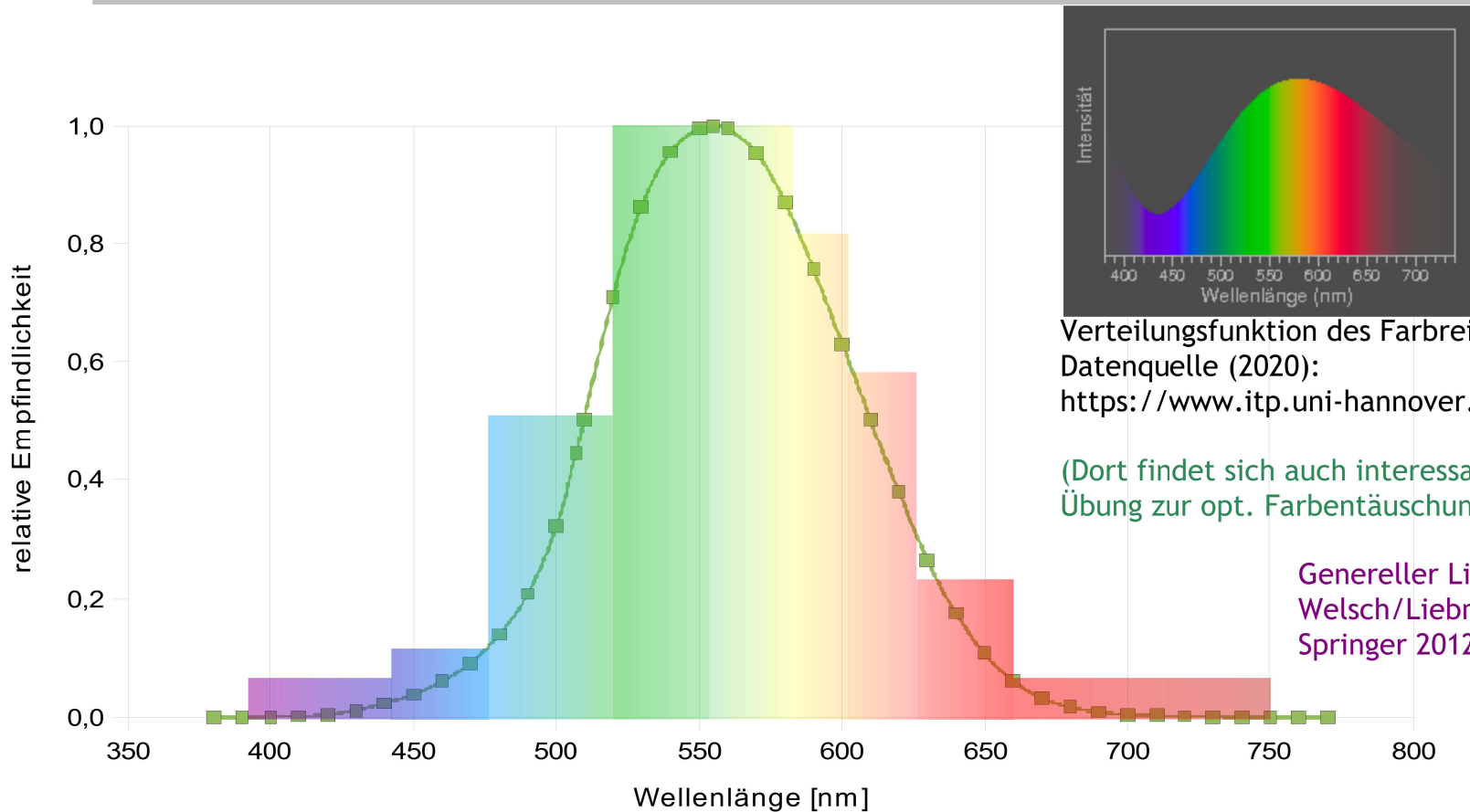
**Absorption**  
CMY +key  
ergibt  
schwarz  
(alternativ:  
Pantone)



Quelle: <https://www.math.hu-berlin.de/~filler/3D/farben.html>

Quelle: <https://www.math.hu-berlin.de/~filler/3D/farben.html>

# Hellempfindlichkeit des menschlichen Auges in Abhängigkeit von der Wellenlänge (Farbe)



Verteilungsfunktion des Farbreizes  
Datenquelle (2020):  
<https://www.itp.uni-hannover.de>

(Dort findet sich auch interessante  
Übung zur opt. Farbentäuschung)

Genereller Lit.-Tipp:  
Welsch/Liebmann „Farben“  
Springer 2012 (sehr umfassend)

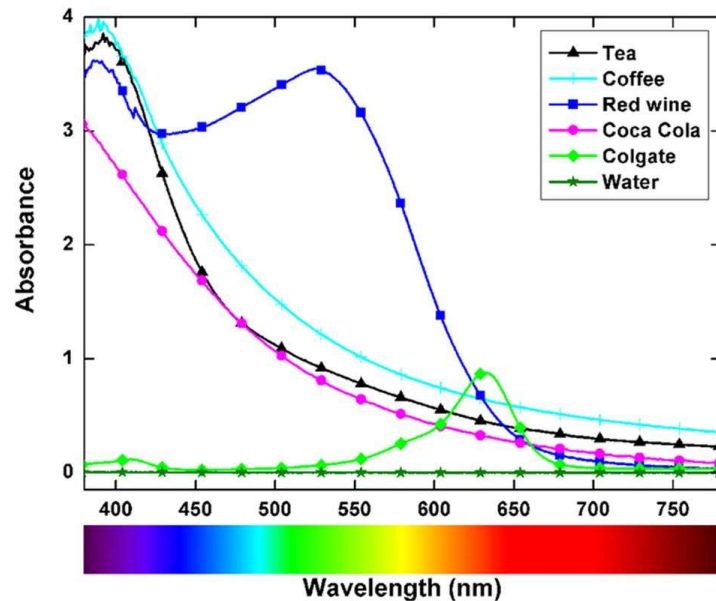
minimale relative Empfindlichkeit > 0,01 % für 390 bis 750 nm

Datenquelle: [www.intl-lighttech.com](http://www.intl-lighttech.com); OSA Handbook of Optics Vol. III 1999

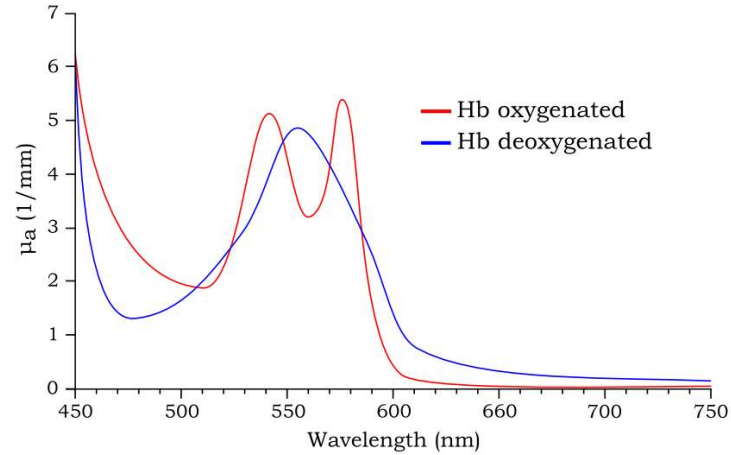
Weiterführender Lit.-Tipp zu Farbenblindheit  
Es gibt verschieden Typen. Die lichtsensitiven Einheiten sind dann genetisch defekt.  
Wer tiefer einsteigen möchte, folgende beiden Reviews sind frei zugänglich:  
<https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2013.08.009>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4651776/>

# Was haben Rotwein und Blut gemeinsam?

## Spektrale Information, Farbkreise, Komplementärfarben

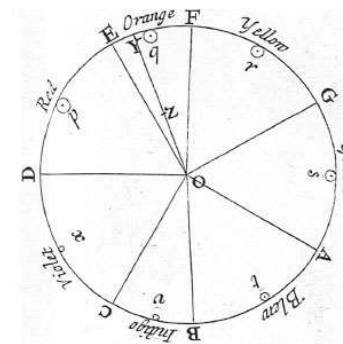


Quelle: Scientific Reports Vol. 5, Art. No.: 14638 (2015)  
<https://doi.org/10.1038/srep14638>



Quelle: <https://www.edaphic.com.au>

Farbkreise, nach Goethe, verfeinerte Weiterentwicklung und nach Newton



Newton hatte ein Notensystem (Oktave) vermutet.  
Quelle: <https://www.the-scientist.com/foundations/newtons-color-theory-ca-1665-31931>

Quelle: [www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch](http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch)

Quelle: <https://www.xposeprint.de>

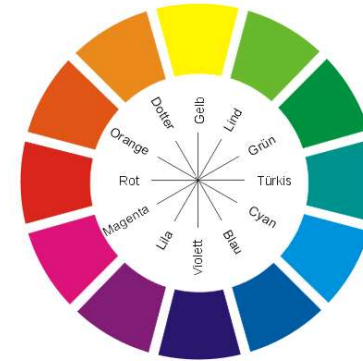
# Komplementärfarben in der Kunst



Münter,  
Quelle:<https://www.pinterest.de/pin/21040323239560841/>



Warhol, Quelle:<https://guyhepner.com/>



Ergänzter Farbkreis (mit Cyan und Magenta)  
Quelle:<https://http://www.metacolor.de>



van Gogh  
Quelle:<http://www.v3wall.com/de>

Wo finden sich komplementäre Paare?

# Zwischenzusammenfassung, Teil I

## (selbst beantworten)

### Lernziele/ -fragen und Themen

- Elektromagnetische Wellen und deren Eigenschaften?
- Zuordnung von spektroskopischen Methoden auf den Skalen Wellenlänge, Frequenz, Energie?
- Physikalisches Grundprinzip der UV-Vis-Spektroskopie, inkl. quantenmechanische Grundlage?
- Molekulare Grundbausteine für Farbigkeit oder UV-Absorption?
- Quantenmechanische Beschreibung von Bindungen erzeugt wie Wechselwirkungen mit Strahlung?
- Wie entstehen Farben, Farbsehen? Was bedeuten Komplementärfarben, additive, subtraktive Farberzeugung?

### Weitere Inhalte, Teil II

- Gesetz von Lambert und Beer
- Chromophore und Eigenschaften
- Spektrometeraufbau
- Grundlagen aus der Optik
- Praktische Aspekte

- Die Absorption von Licht durch die Probe (Aufnahme von Photonen) führt zur Abschwächung des eingestrahnten Lichtes ( $I_0$ )
- Transmissionsfaktor  $T = I(\text{Lösung})/I(\text{Lösungsmittel})$   
der  $T = I/I_0$
- Lambert-Beersches Gesetz  
 $I = I_0 \cdot \exp(-\alpha(\lambda) \cdot d \cdot c)$   
Intensität nimmt exponentiell mit Schichtdicke  $d$  und Konzentration  $c$  ab,  $\alpha(\lambda)$  : wellenlängenabhängiger Absorptionskoeffizient
- Logarithmieren, dekadisch  
 $\lg I_0/I = \alpha(\lambda) \cdot d \cdot c \cdot \lg e = 0,4343 \alpha(\lambda) \cdot d \cdot c$   
oder  $\lg I_0/I = A = -\lg T = \varepsilon(\lambda) \cdot d \cdot c$   
A: englisch: Absorbance (früher/dt.: „E“, Extinktion)  
 $\varepsilon(\lambda)$  : Absorptions-/Extinktionskoeffizient (abh. von  $\lambda$ )

Größen werden so auch in allen anderen klassischen Spektrometriearten verwandt, z.B. IR

# Chromophore in der Chemie

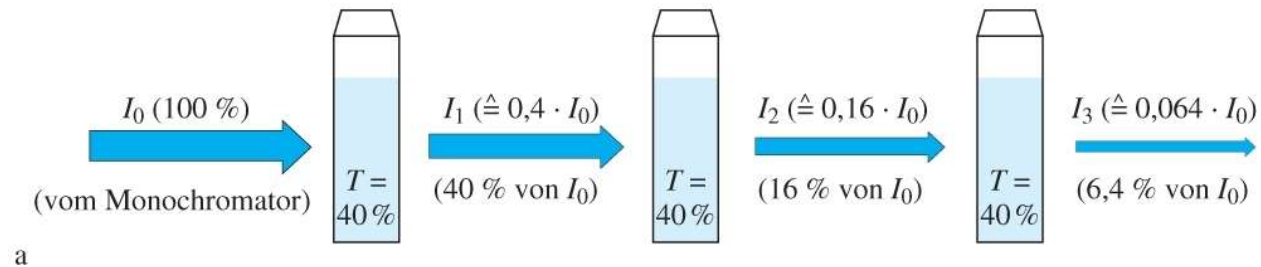
(Folie noch in Bearbeitung)

- Überwiegende Gruppen
  - d-Gruppen Elemente (z.B.  $\text{Cu}^{2+}$ )
  - aromatische Chromophore
  - Doppelbindungen
- UV-aktiv sind vor allem Übergänge mit  $d \rightarrow d^*$ ;  $n \rightarrow d^*$ ;  $\pi \rightarrow \pi^*$ ;  $n \rightarrow \pi^*$  und  $n \rightarrow \sigma^*$ , (meist zu energiereich:  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ; absorb. bei  $< 190 \text{ nm}$ )
- Im Vis-Bereich konjugierte  $\pi$ -Systeme oder d-Orbitale
- Typisch ist Absorption in breitem  $\lambda$ -Bereich, „Bandenspektren“, (Erklärung folgt bei Fluoreszenz)
- Entscheidend ist eigentlich Dipolübergangsmoment mit Wahrscheinlichkeit  $P$ , also Orbitalorientierung zur Strahlung (mit  $\epsilon = 8,7 \cdot 10^{19} P \cdot A$ , Quelle: Skoog/Leary, A: Wechselwirkungsquerschnitt)

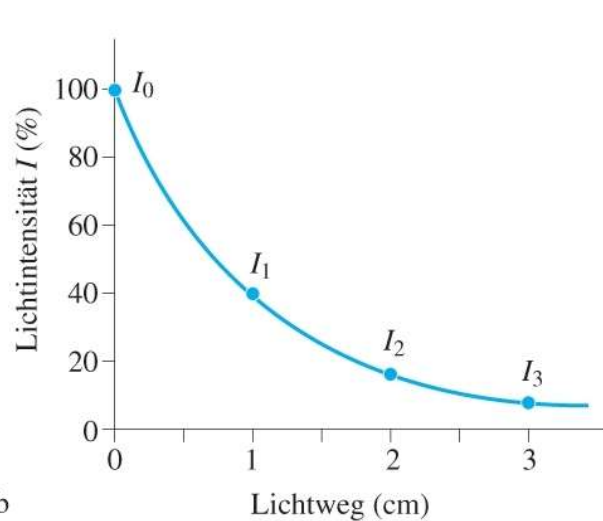
Stoff	Chromophor	$\lambda_{\text{max}}$ in nm	$\epsilon$ in $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Wasser (g)	$n \rightarrow \sigma^*$	167	7,0/ 1,5 (?)
häufig z.B. Alkene Benzen	$\pi \rightarrow \pi^*$ $\pi \rightarrow \pi^*$	177 204	$> 1$ 10 7,9
seltener, z.B.			$> 100$
wenige			bis 1000
weitere Bsp.			
8-Hydroxy- chinolin, pH 6,8		240 305	33 2,5
Cu (II) (aq)	$d \rightarrow d$	794	0,01

Quellen: Perkampus „UV-Vis-Spektr. und ihre Anw.“, Springer 1986/92  
Skoog/Leary, „Instr. Analytik“ Springer 1996  
+ diverse

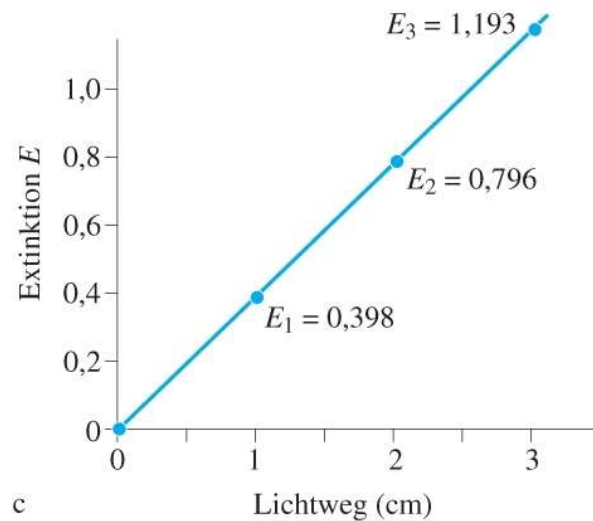
# Grafische Beschreibung der Absorption (hier noch in alter dt. Schreibweise als Extinktion E)



a



b



c

- Lichtweg kann gedanklich in mehrere Teilstücke zerlegt werden
- Intensität ist abklingende e-Funktion (wie Kinetik 1. Ordnung)
- Gesamt-Absorption ist Summe der „Teilküvetten“
- c max. 0,01 mol/L, sonst nichtlinear

Aus "Allgemeine und Anorganische Chemie" (Binnewies, Jäckel, Willner, Rayner-Canham), erschienen bei Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; © 2004 Elsevier GmbH München. Abbildung12-12.jpg

# Begriffsvielfalt bei der Absorption

**aktuell** (siehe z.B. Schwedt et al., „Analytische Chemie“, Wiley)

- Engl. **Absorbance (A)**, nach IUPAC  
Dt.: Absorbanz, spektrales Absorptionsmaß nach DIN,  
Maß der Abschwächung einer Strahlung durch Absorption
- Engl. Absorption coefficient /  
Dt. Absorptionskoeffizient (molar, dekadisch, auf cm bezogen)
- **Absorbance unit (AU)**; einheitenlos; nicht a.u.: arbitrary unit),  
Absorbance für eine fiktive Messzelle von 1 cm Weglänge (z.B.  
Faktor 10, wenn mit 1 mm gemessen)
- Engl. Attenuance  
Dt. Extinktion  
als Maß für die Summe aller optischen Effekte einer Probe,  
inklusive Lumineszenz und Streuung (seltener)

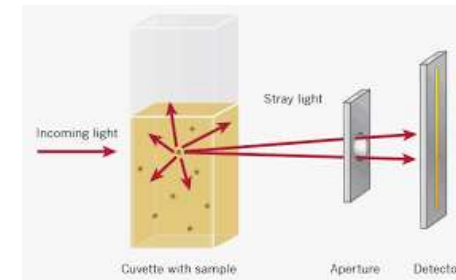
**Historisch, aber immer noch im Gebrauch**

- Extinktion (E): frühere deutsche Bezeichnung für Absorption
- Absorptionskoeffizient, Extinktionskoeffizient entsprechend
- Optische Dichte (OD), statt absorbance unit (s. oben bzw. nä. S.)
- außerdem im Englischen früher auch extinction statt attenuance

# Optische Dichte (OD)

## In der Biotechnologie üblich

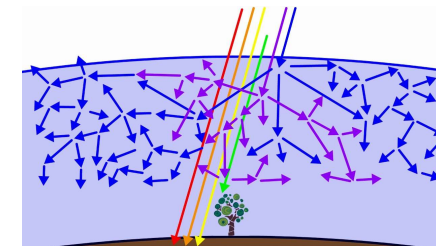
- Zelldichten werden typischerweise über eine „OD600“ bestimmt, also eine Extinktion bei 600 nm Wellenlänge und 1cm Küvette (wobei Streuung überwiegt). Dieser Begriff wird auch im Englischen verwendet.
- Dt. Extinktion als Maß für die Summe aller optischen Effekte einer Probe, inklusive Streuung und weiterer opt. Effekte



Die OD600 (bei 600 nm) wird genutzt, um Zelldichten zu bestimmen  
Quelle: [www.implen.de/od600-diluphotometer/od600/](http://www.implen.de/od600-diluphotometer/od600/)

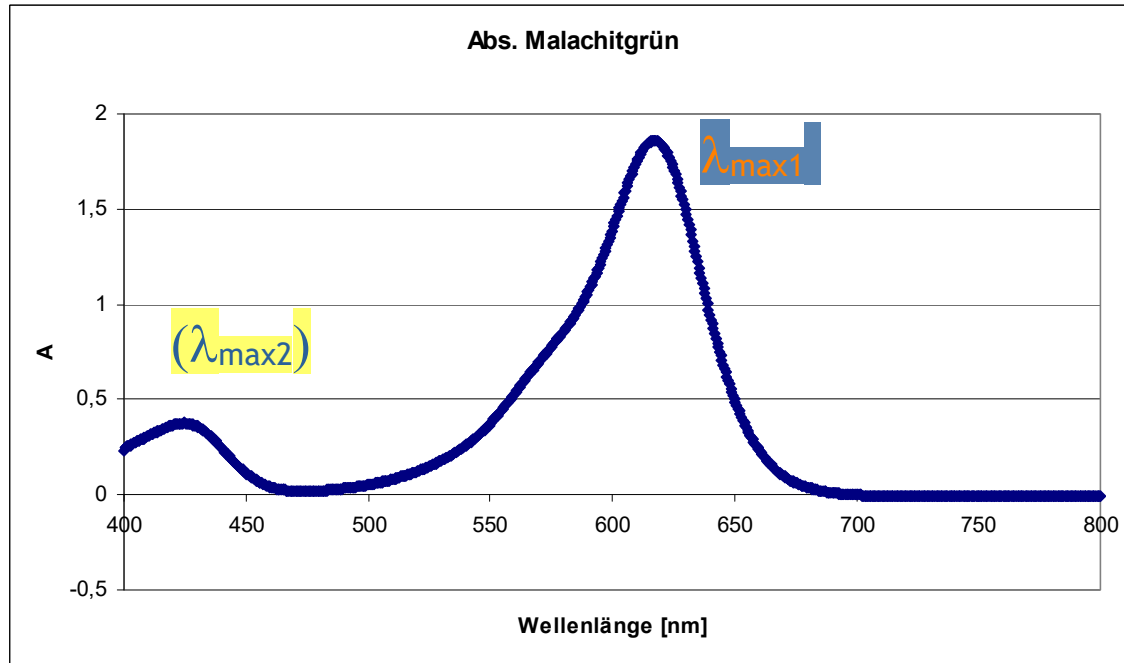
## Weitere optische Effekte

- Streuung: Lichtwellen streuen an kleinen Partikeln, die in der Größenordnung der Wellenlänge liegen
- Reflektion an Oberflächen (bei Auftreffen  $\neq 90^\circ$ )
- Fluoreszenz, Phosphoreszenz (Nachleuchten, siehe eigenes Kap. Fluoreszenz)
- Luminiszenz (Eigenleuchten, siehe Fluoreszenz)



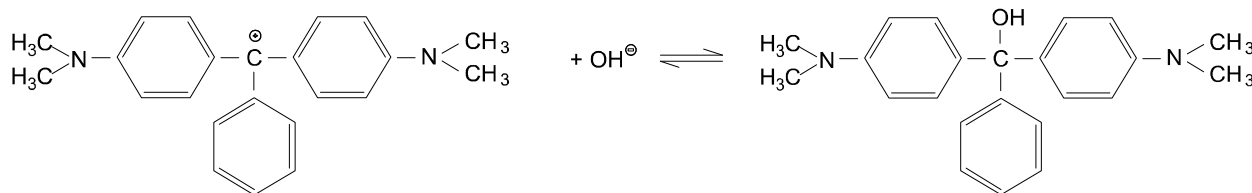
Der Himmel ist (tagsüber) blau, weil diese Strahlung stärker streut.  
Quelle: [www.youtube.com/watch?v=vNYef57huDE](https://www.youtube.com/watch?v=vNYef57huDE)

# Beispielspektrum eines Farbstoffes (aus PC-II-Praktikum)

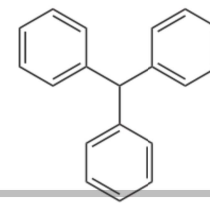


## Beobachtungen, Fragen

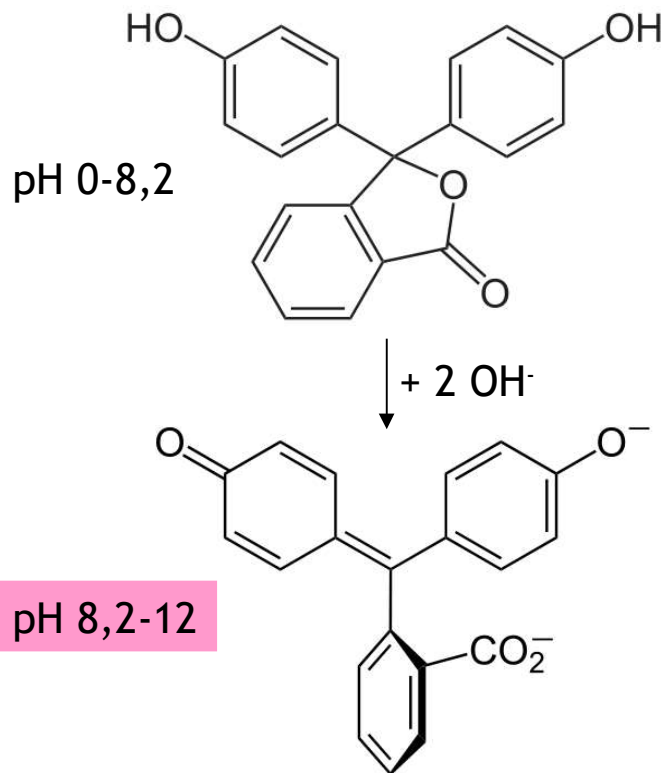
- breite, wenig strukturierte Signale
- 2 bzw. 3 Komponenten erkennbar
- flache Maxima (sicher einstellbar)
- A proportional zu c (Lambert und Beer)
- Chromophor 1 wird durch Addition ausgeschaltet“
- Chromophor 2 verschiebt sich
- Warum sind Peaks so breit, obwohl quantenmechanisch diskret definiert (später)



# Weitere Triphenylmethanfarbstoffe



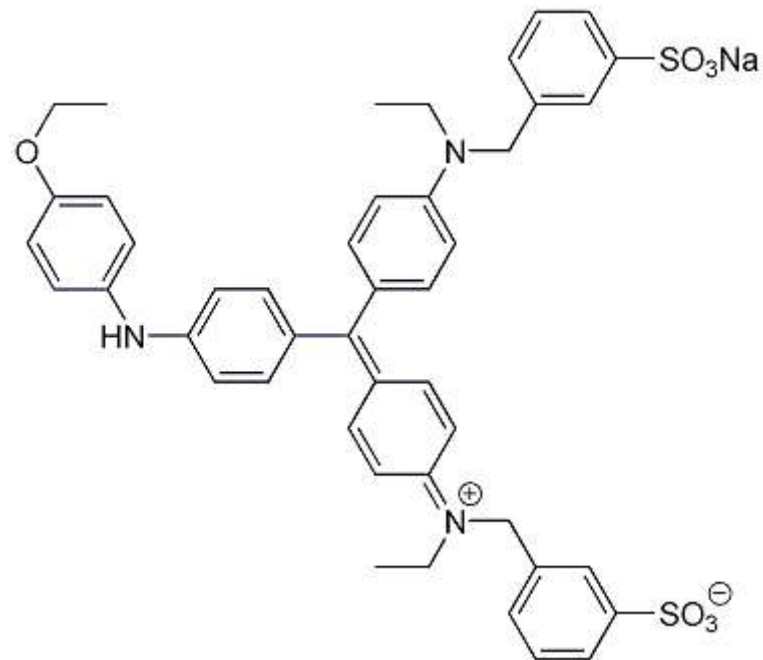
## Phenolphthalein



## Farbstoff für Proteine: Coomassie

(Bradford, Gelfärbung)

bindet unspezifisch an kationische Gruppen,  
vorzugsweise Arginin-Seitengruppen



Quelle: Wikimedia Commons

Weitere Beispiele (mit vielen pH-Indikatoren):

<https://de.wikipedia.org/wiki/Triphenylmethanfarbstoffe>

# Natürliche Chromophore in der Biotechnologie

- Kaum farbige, überwiegend aromatische Chromophore
- UV-aktiv sind vor allem Übergänge mit  $\pi \rightarrow \pi^*$  und  $n \rightarrow \pi^*$ , energiereicher bei Beteiligung von  $\sigma$ -Bindungen (absorb. bei  $< 190$  nm) vgl. Lottspeich et al. Bioanalytik/cs
- Im Vis-Bereich  $\pi$ -Elektronensysteme oder d-Orbitale
- Typisch ist Absorption in breitem  $\lambda$ -Bereich, „Bandenspektren“, (Erklärung folgt bei Fluoreszenz)

Stoff	Chromophor	$\lambda_{\max}$ in nm	$\epsilon$ in $10^3$ $M^{-1} cm^{-1}$
Wasser	$n \rightarrow \sigma^*$	167	7,0
Tryptophan	Aromat	280 219	5,6 47
Peptid, Protein	Pept.-B. Aromaten	190 280	7 0,1
DNA	Aromaten	258	6,6
RNA	Aromaten	258	7,4
Chlorophyll a	Porph.	780 362	85 60
Carotin	Multi-en	450	120

Quelle:  
Winter et al. Methoden der Biophys. Chemie Vieweg 2. Aufl. 2011

# Große Moleküle (Bsp. Proteine) oder Mischungen: Absorptionskoeffizienten addieren sich

- Teil-Absorptionskoeffizienten ergeben in Summe jenen der Probe
- Proteine (205 nm), ins. Peptid-Bindung
- Proteine (280 nm), inbes. Aromaten
- Beispiele
  - h-Insulin
  - bov-Albumin
  - (mAb)

any protein the extinction coefficient at 280 nm, may be calculated [8]:

$\epsilon_{\text{pro280}} = (n_W 5500) + (n_Y 1490) + (n_{S-S} 125)$  where  $n$  is the number of each group per protein molecule, and the subscripts W, Y and S-S denote tryptophan, tyrosine and cystine, respectively.

$$\epsilon_{\text{pro280}} = (n_W 5500) + (n_Y 1490) + (n_{S-S} 125)$$

results. The basis for the method is that, for virtually all proteins, absorbance at 214 nm is dominated by the summed contributions from the peptide groups. More accurate estimates can be made when the amino acid composition of the eluting protein is known, since this permits a correction to be made for contributions of amino acid side chains to absorbance at 214 nm. Comparison of

$$\epsilon_{\text{pro214}} = (n_{AA} - 1 + n_N + n_Q) 2846 + n_F 7200 + n_H 6309 + n_W 22\,735 + n_Y 5755$$

Quelle sowie weitere Lit.:



Journal of Chromatography A  
Volume 891, Issue 2, 8 September 2000, Pages 235-242



Approaches towards the quantitative analysis of peptides and proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography in the absence of a pure reference sample

Frank Moffatt , Paul Senkans, Dean Ricketts <sup>1</sup> 

Show more 

+ Add to Mendeley  Share  Cite

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00620-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00620-8)

[Get rights and content](#)



Analytical Biochemistry  
Volume 182, Issue 2, 1 November 1989, Pages 295-299



Protein estimation by the product of integrated peak area and flow rate

Melissa A. Buck <sup>1</sup>, Timothy A. Olah, Carl J. Weitzmann <sup>2</sup>, Barry S. Cooperman 

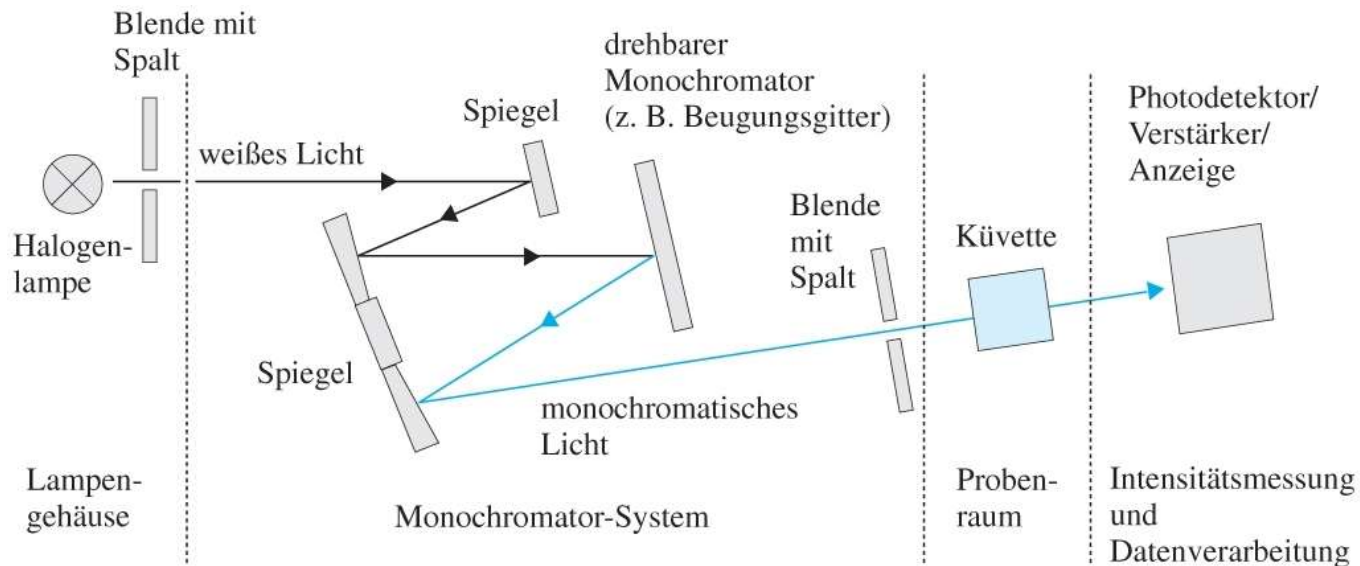
Show more 

+ Add to Mendeley  Share  Cite

[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90597-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90597-6)

[Get rights and content](#)

# Bauteile und Aufbau eines Spektralphotometers



Aus "Allgemeine und Anorganische Chemie" (Binnewies, Jäckel, Willner, Rayner-Canham), erschienen bei Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; © 2004 Elsevier GmbH München. Abbildung12-11.jpg

## Notwendige Elemente

- Lichtquelle/Lampe
- Monochromator (Prisma oder Beugungsgitter)
- Probengefäß/Küvette (durchlässig für UV-Vis)
- Detektor (Photomultiplier oder Photodiode)

## Zusätzliche Elemente

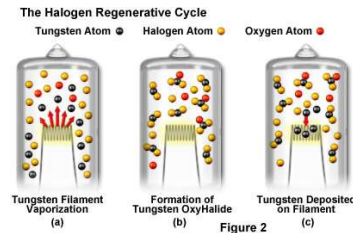
- Spiegel
- Linsen
- Blenden/Spalte
- Weitere Bauteile

# Lichtquellen

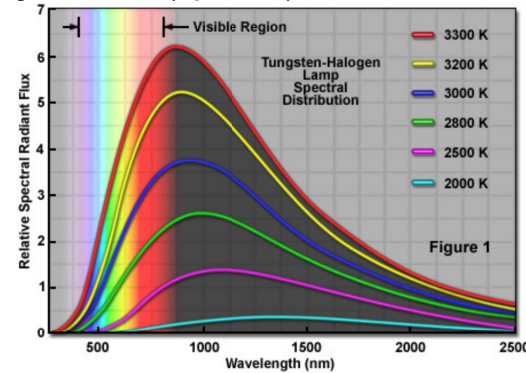
## Im sichtbaren Bereich: Wolframlampen

- Arbeitstemperatur 2870 K, hoher NIR-Anteil
- Arbeitsbereich 350 - 2500 nm
- In der Praxis mit Halogenzusatz (Lebensdauer)

Detektor-W-Lampe, Quelle:  
www.agilent.com (2020)

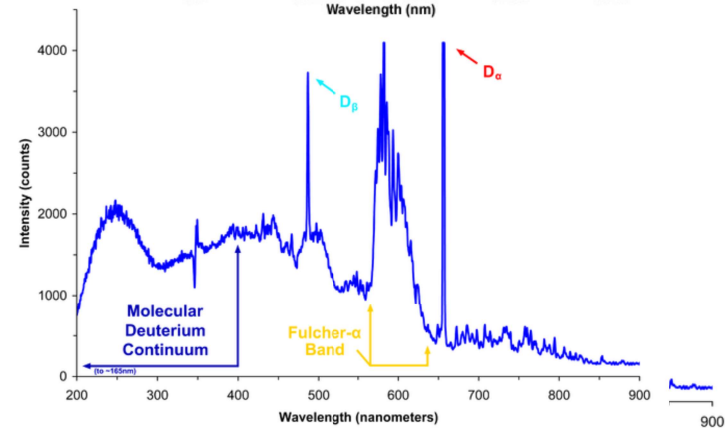


Spektrum einer W-Lampe, Quelle: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu> (Apr-2021)



## Im UV-Bereich: Deuteriumlampen

- $D_2 + E_{\text{elektr}} \rightarrow D_2^* \rightarrow D' + D'' + h\nu$
- $E_{\text{elektr}} = E(D_2^*) = E(D') + E(D'') + h\nu$   
 $E(D')$ ;  $E(D'')$ : kinet. Energien der Atome
- Durch unterschiedliche kinetische Energien ergibt sich Emissionsspektrum von 160-400 nm mit  $E_{\text{max}}$  bei etwa 220-250 nm; über 400 nm störende Emissionslinien von  $D_2$



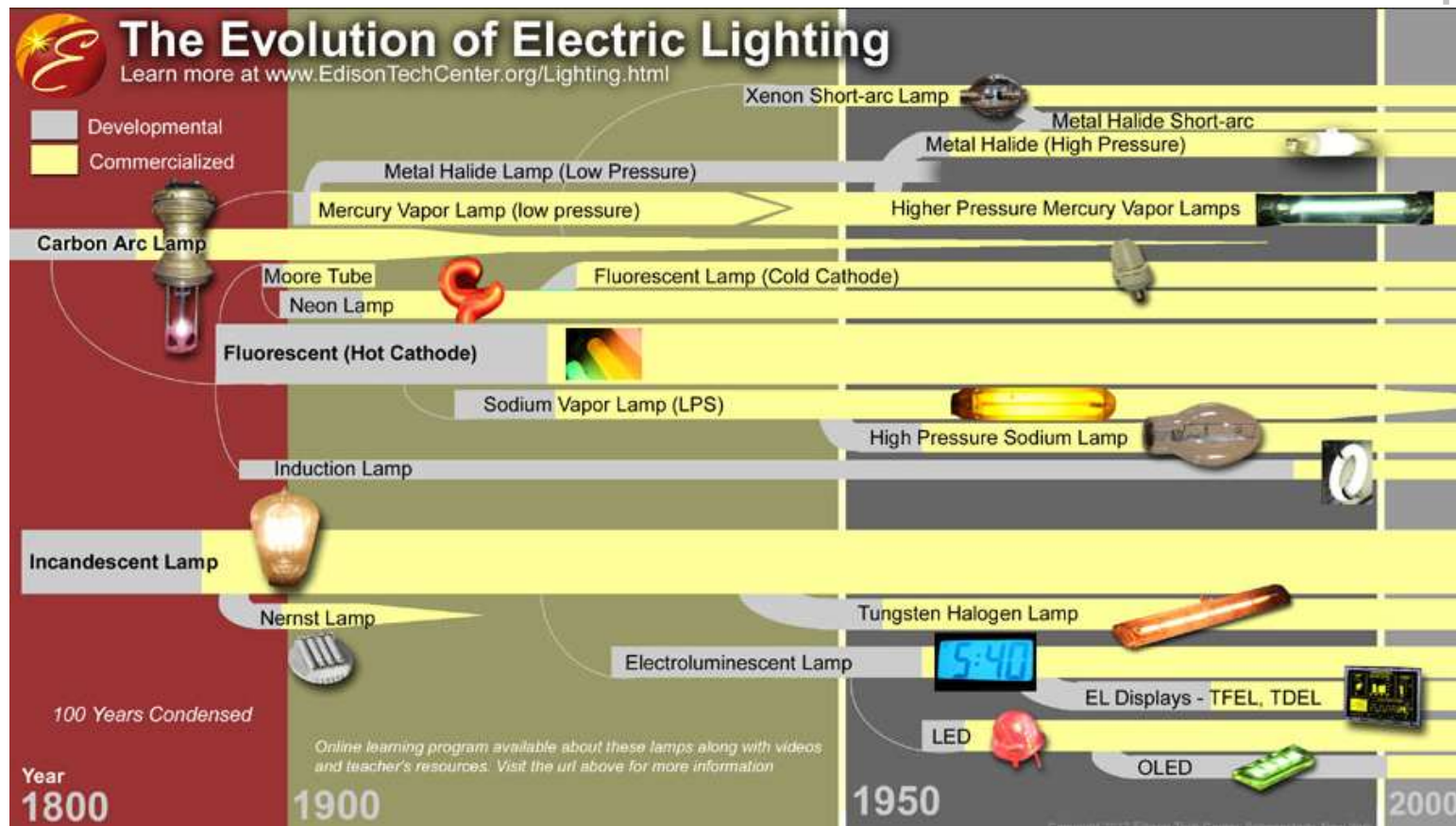
Quelle: Wikipedia.org\_Falcorian  
Quelle: Wikipedia.org\_Falcorian

Quelle: Wikipedia.org /  
Flickr\_Latente

Weiterf. Literatur:

M. Born, T. Jüstel, Elektrische Lichtquellen, Chemie in unserer Zeit 40 (2006) 294

# Entwicklung von Lichtquellen



Historische Abfolge dominierender Lampentypen,  
(Laser sind hier nicht eingebunden)  
Quelle: <http://edisontechcenter.org/Lighting.html> (Jan-2023)

Weiterf. Literatur: Elektrische Lichtquellen: Chemie in Lampen“ Born und Jüstel  
Chemie in unserer Zeit 2006 und 2021,  
<https://doi.org/10.1002/ciuz.200600377> und <https://doi.org/10.1002/ciuz.202000055>

Thema: UV-Vis-Spektroskopie

# Zukünftige Lichtquellen: LED

## Aus Halbleitertechnologie: LED-Lichtquellen

- Emissionswellenlängen konfigurierbar durch Doping der Halbleiter (s. Abb,)
- durch Überlagerung zu Kontinuum oder Durchschalten mehrerer Lampen

Lebensdauer verschiedener Lampentypen,  
Quelle: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu> (Apr-2021)

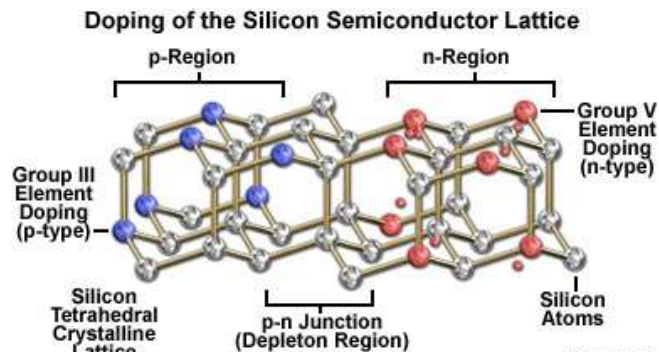
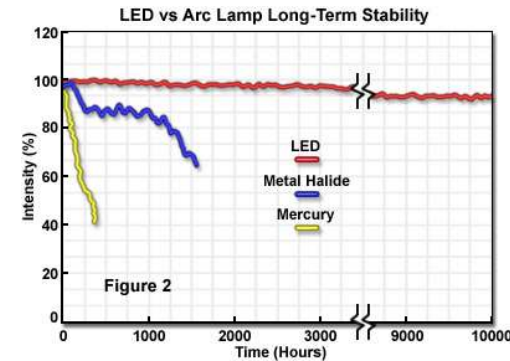
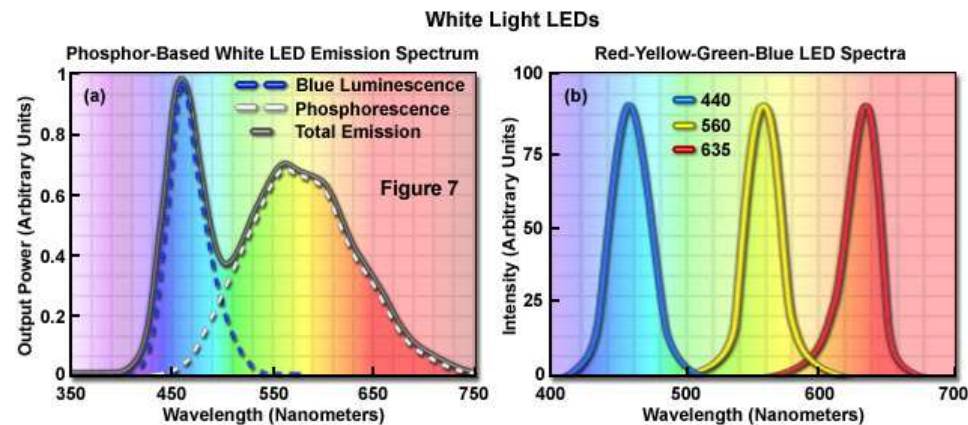


Figure 3

Unterschiedliches Doping/Interkalation in Silizium oder andere Halbleitermaterialien (wie GaN), um p-n-Sperrschicht aufzubauen (oben)

So sind spezifische Farben oder auch Überlagerungen erzeugbar (rechts)

Quelle: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu> (Apr-2021)



White Light LEDs

Weiterf. Literatur:

Davidson und Zeiss: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/print/lightsources/leds-print.html>



# Aufbau des Spektralphotometers im Praktikum



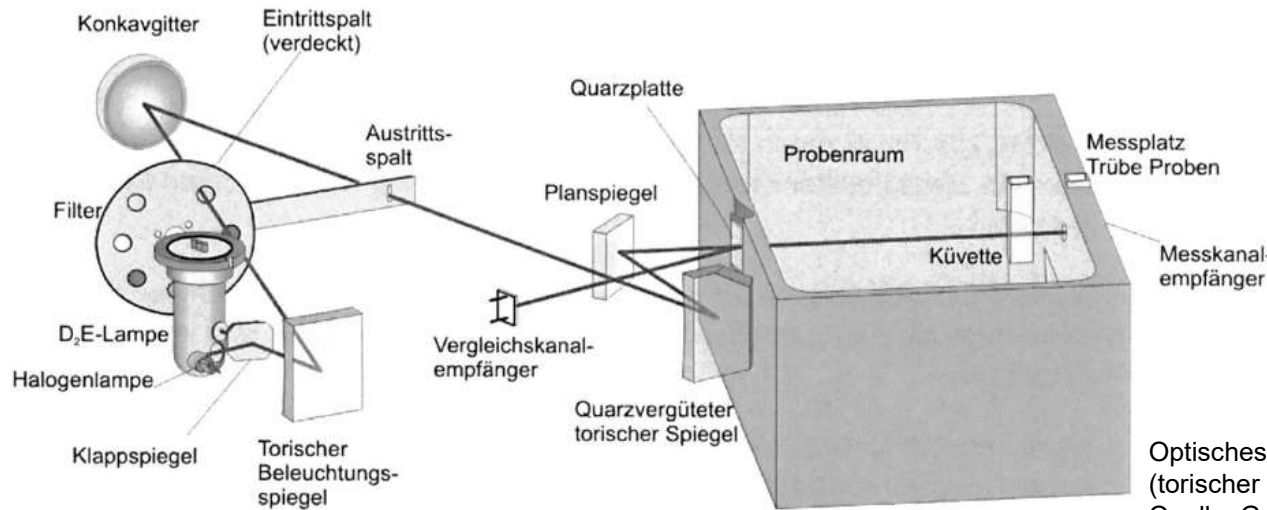
UV/Vis-Gerät im Praktikum

## Verbaute Elemente (s. unten)

- Halogen- und D<sub>2</sub>-Lampe
- Monochromator-Beugungsgitter
  - (großer) Probenraum
    - Küvettenhalter
- Empfänger (Detektion)

## Zusätzliche Elemente

- diverse Spiegel
  - Filterrad
  - Spalte



Optisches Schema des SPECORD 50 PLUS (torischer Spiegel, Abschnitt eines Ringes)  
Quelle: Geräteanleitung, Analytik Jena, 2013

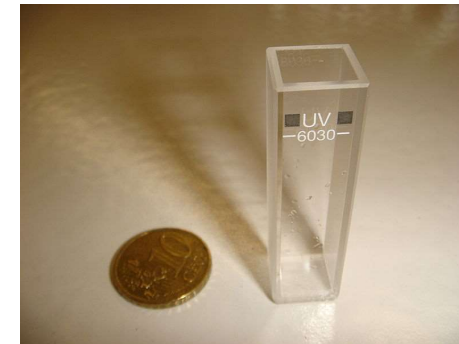
# Probengefäße/ Küvetten

## Kriterien

- UV-vis-Durchlässigkeit (Glas, Plexiglas; Quarzglas oder kristallin für UV < 350 nm)
- Geringe optische Eigenschaften (z.B. planar)
- Hohe Präzision ( $\pm 0,01$  mm für d)
- offen oder geschlossen

## Typen

- Standardküvette aus einem Material (d=1 cm)
- Küvette mit Apertur (nur ein Teil durchlässig)
- Mikroküvette (bis hinunter zu 5  $\mu$ L)
- Langküvetten für hohe Empfindlichkeit
- Durchflussküvette (z. B. für Reaktionen und LC bzw. CE)

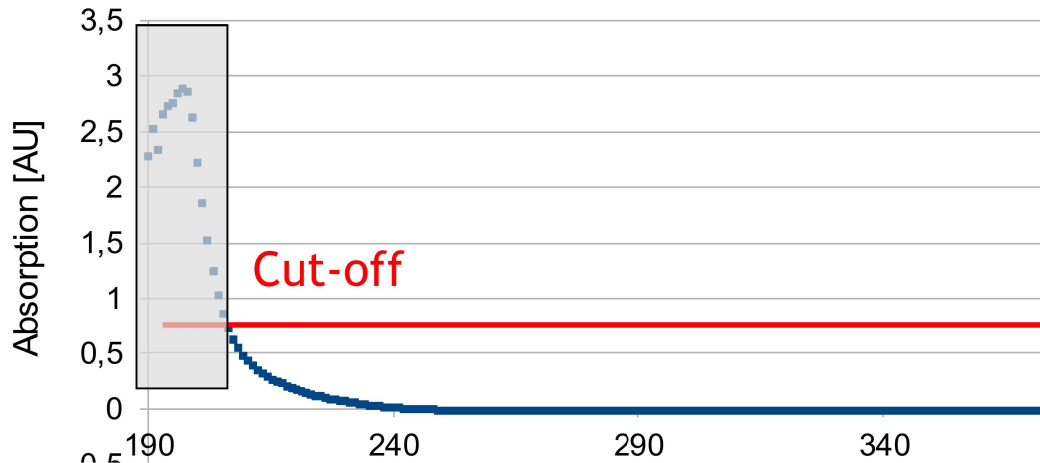


Quelle: wikimedia.de; „Semfmaster“

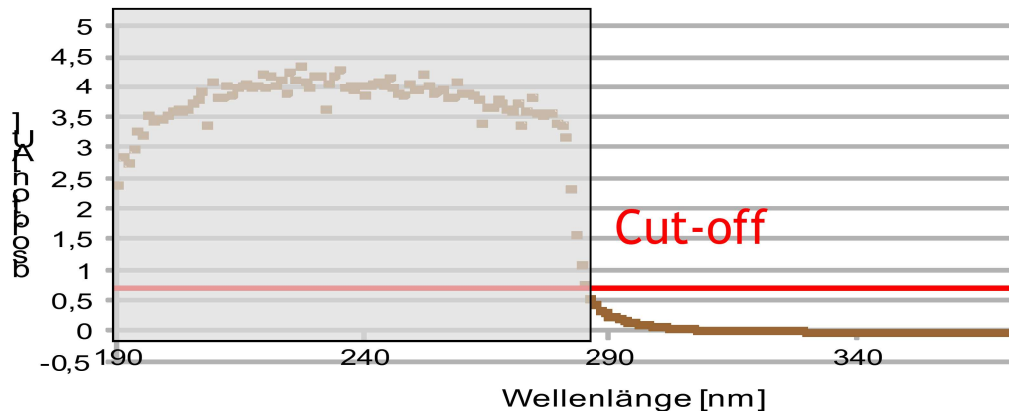
Obacht: genau senkrecht zum Lichtstrahl;  
keine Verschmutzungen, Fingerabdrücke, Kratzer, Blasen,  
Suspensionen oder Partikel

# Unterschiedliche Nutzbereiche von Lösungsmitteln

## Reines Methanol



## Reines Toluen

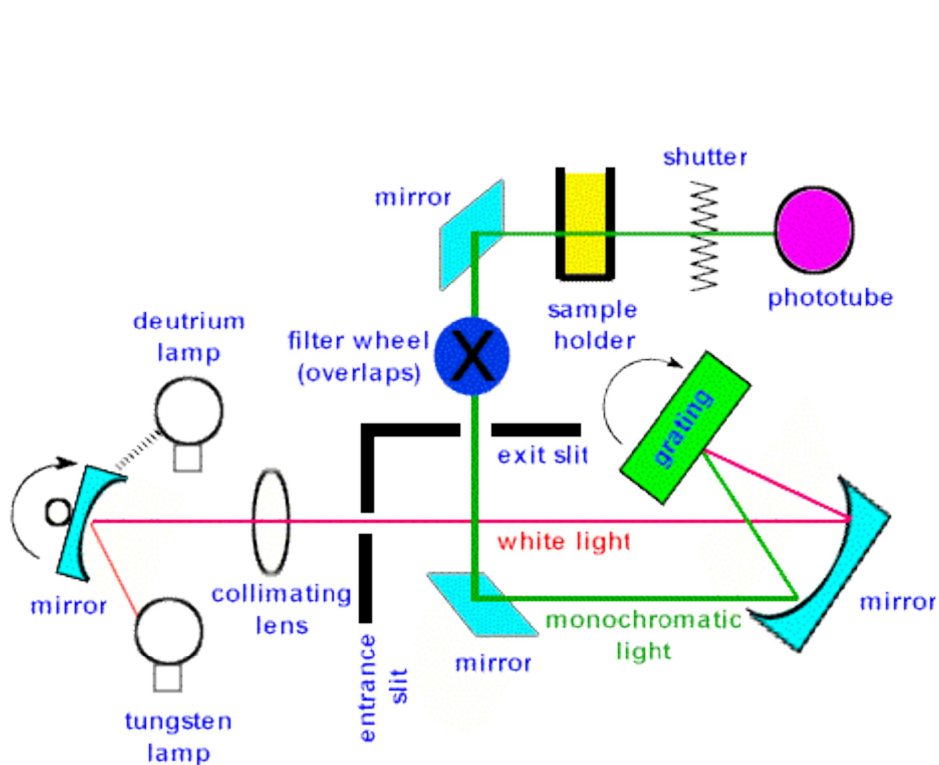


## Kriterien

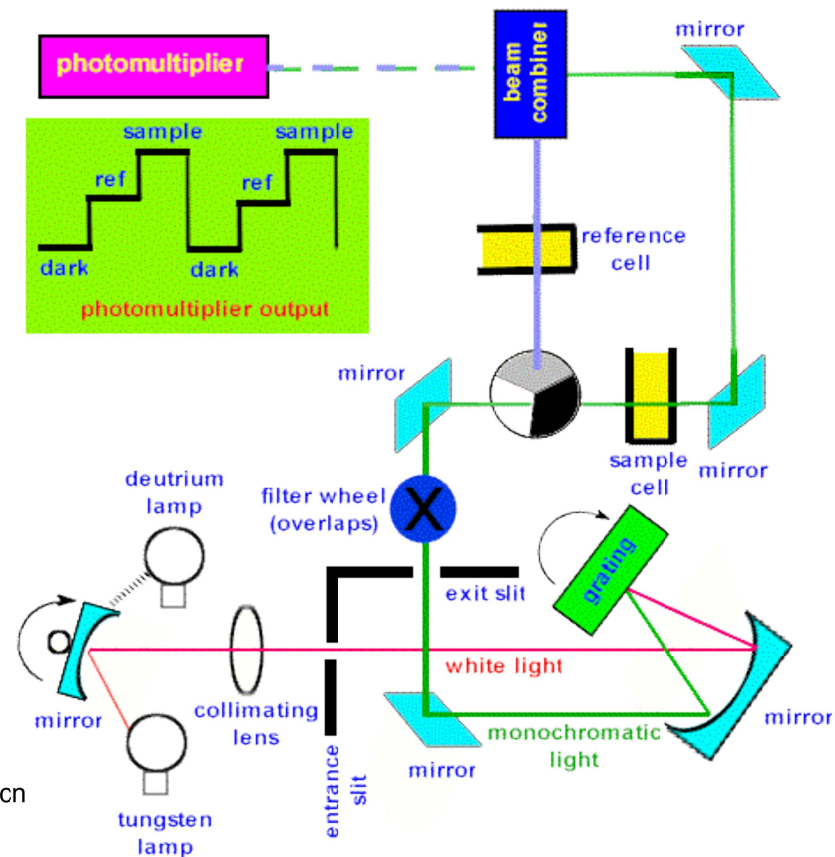
- Gute Lösungseigenschaften
- nicht zu hoher Dampfdruck
- nicht entflammbar/giftig
- UV-Vis-Durchlässigkeit
- Niedrige Cut-off-Wellenlänge (bei d=10 mm: T < 25 % o. A > 0,6)
- Achtung auch bei Puffern wie HPO<sub>4</sub><sup>-</sup>

Lösungsmittel	Formel	$\lambda$ cut-off (nm)
Wasser	H <sub>2</sub> O	195
Hexan	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	199
Methanol	CH <sub>3</sub> OH	210
Cyclohexan	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	211
Chloroform	CHCl <sub>3</sub>	246
Dimethylsulfoxid	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO	270
Aceton	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	330

# Prinzipieller Aufbau Ein- oder Zweistrahlphotometer



Quelle: www.chemtech.org/cn



s. auch Spektrometertypen (Lottspeich)  
Zweistrahprinzip (Cammann bzw. Owen)

Vertiefung: [www.youtube.com/watch?v=O39avevqndU&feature=related](http://www.youtube.com/watch?v=O39avevqndU&feature=related) (RSC)

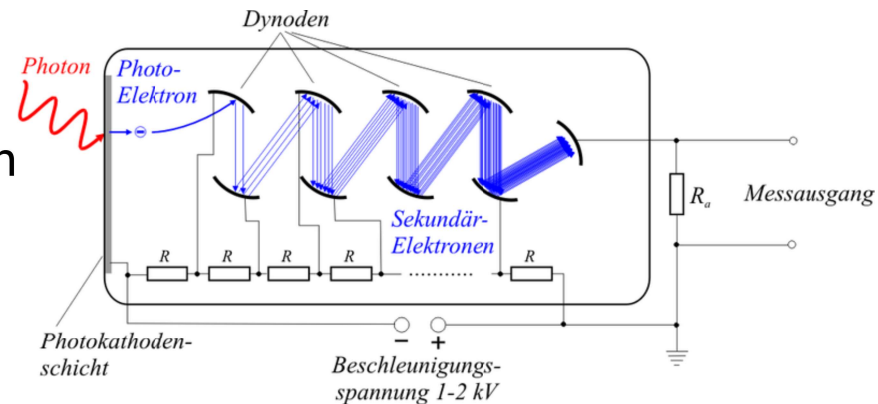
# Detektoren

## Fotozelle

- Bestrahlung einer lichtelektrischen Schicht durch einfallende Photonen führt zur Freisetzung von Elektronen.

## Fotomultiplier (-Folie)

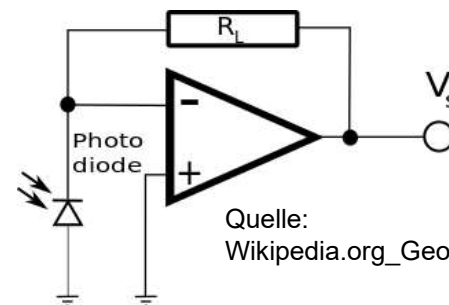
- Photozelle, deren Primärelektronen in Elektronenkaskaden verstärkt werden  
(vgl. MS-Detektoren)



Quelle: Wikipedia.org\_Jkrieger

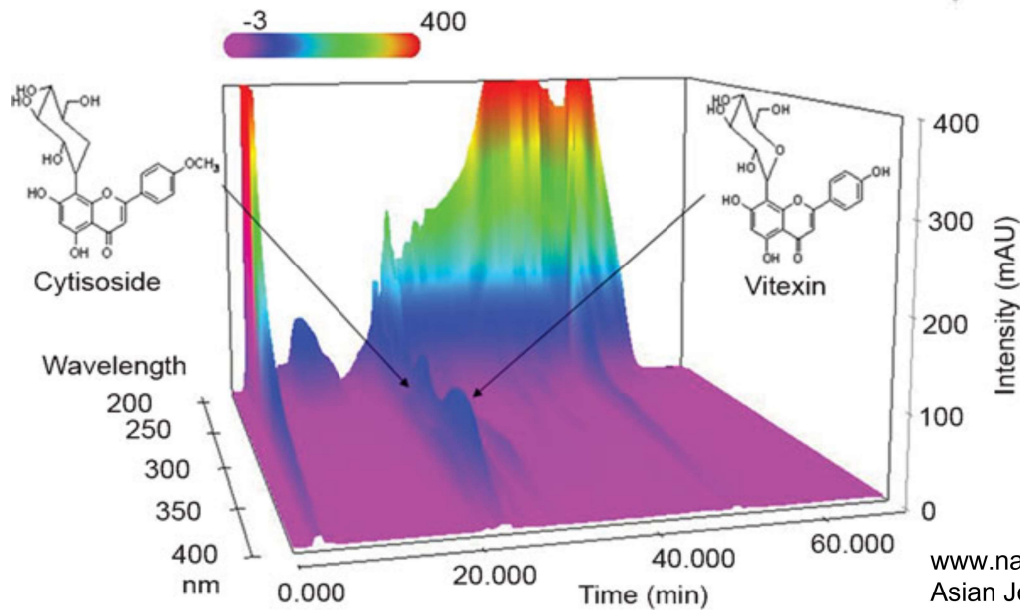
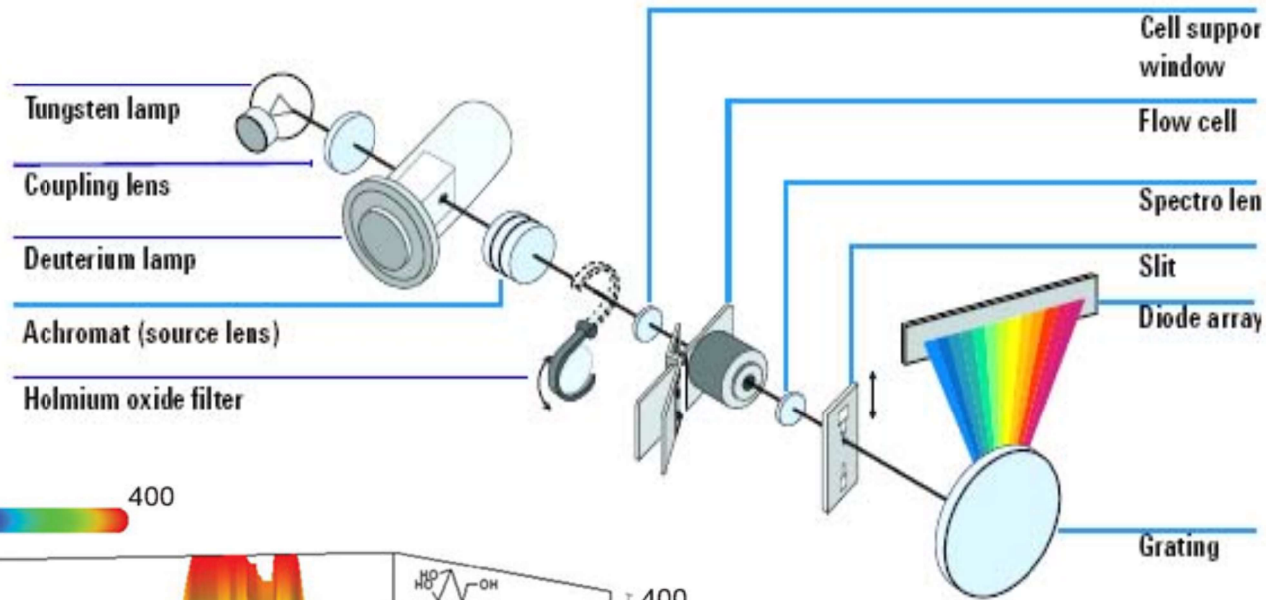
## Fotodiode

- Kurzschlussstroms in der Sperrschicht eines Halbleiters durch Bildung von freien Elektronen und positiv geladenen Löchern



Quelle:  
Wikipedia.org\_Georges.khaznadar

# DAD-Detektor (für die HPLC)



[www.chemistry.nmsu.edu/Instrumentation/HPLC1200DiodeArraySketch.jpg](http://www.chemistry.nmsu.edu/Instrumentation/HPLC1200DiodeArraySketch.jpg)

- ♦ üblich: eine oder zwei  $\lambda$
- ♦ hier: polychrom
- ♦ 2D-Information: t und  $\lambda$
- ♦ erhöhte Gerätekosten

[www.nature.com/aja](http://www.nature.com/aja)  
Asian Journal of Andrology (2012) 14, 320–324;  
doi:10.1038/aja.2011.166

# Vor- und Nachteile von UV-Vis

## Nachteile

- breite Signale, unspezifische Informationen
- Mischungen kaum auflösbar
- mäßiger dyn. Bereich (etwa 3 Größenordnungen)

## Vorteile

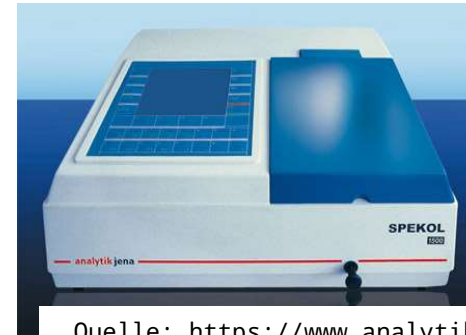
- einfach (bekannte Optik) und empfindlich, schnell
- quantitatives Signal, reproduzierbar und robust

## Geräte

- Kosten ab etwa 2000 bis 15000 €
- Hersteller: u.a. Analytik Jena, Perkin-Elmer, Hitachi

## Störungsmöglichkeiten

- Dispersion, Streuung, Reflektion an Grenzflächen
- Fluoreszenz, Phosphoreszenz
- Überlagerungen bei Mischungen



Quelle: <https://www.analytik-jena.de/>



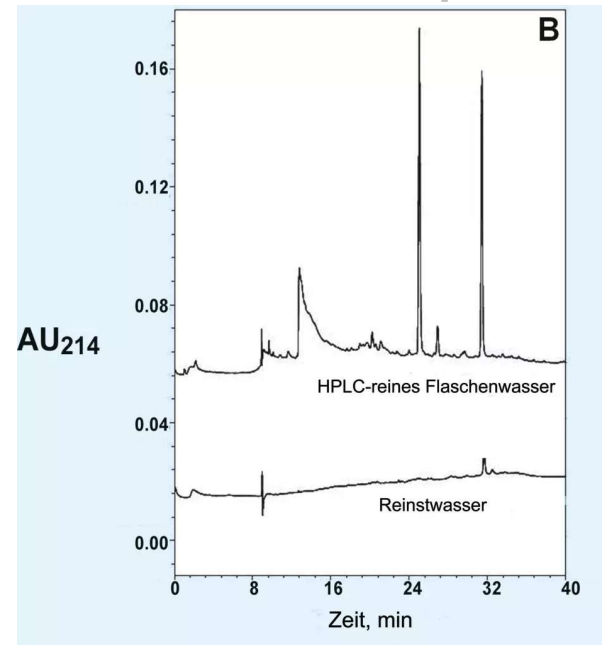
Quelle: [www.perkinelmer.com](http://www.perkinelmer.com)



Quelle: <http://chinahao.com/>

## UV-Vis-Detektoren (in LC oder CE)

- Routineeinsatz für Trennverfahren wie Flüssigchromatographie (LC) oder Kapillarelektrophorese (CE)
- empfindliches, lineares Signal (Lambert-Beer)
- verschiedene Signale addieren sich  
 $A(\lambda) = \sum \varepsilon_i(\lambda) \cdot c_i \cdot d$
- Einheiten  
„optische Dichte/optical density“ (OD) oder „absorbance unit“ (AU), oft mit Wellenlängenangabe
- dynamischer Bereich etwa  $0 < A < 1,5$ ; Sättigung möglich (geknappte Peaks)
- hohe Qualität (durch Robustheit), z.B. für Anwendungen in Pharma, Lebensm., Umwelt



Reinstwasser im UV (typische Wellenlänge für Proteine)  
Quelle:  
<https://www.laborpraxis.vogel.de>



DAD-detektor, Quelle:  
<https://www.agilent.com>



DAD-Detektor, Quelle:  
<https://www.knauer.net>



Zweiwellenlängendet., Quelle:  
<https://www.thermofisher.com>

# Anwendungen von UV-Vis-Spektrometrie

- Universelle Detektoren für viele Trennverfahren wie HPLC und CE; Alternative: einfache LC- und CE-MS
- Quantitative Messung von Spurenstoffen
- Farbstoffe (auch durch Zusätze erreichbar)
- Protein- und DNA-Analytik
- Metallkomplexe (z.B. Hämoglobin)
- Klassifizierung von Stoffgruppen
- auch kompakte, mobile Geräte (s. Abb.)
- auch Kleinstvolumina messbar (s. Abb.)
- Kaum Strukturuntersuchungen; (besser mit NMR, MS und IR)

## Ergänzungen (selbständig)



Mobiles UV/Vis-Spektrometer für Lebensmittel, Quelle: <https://www.directindustry.de>



Mikrovolumen-UV/Vis-Spektralphotometer  
Quellen

- l.: <https://de.vwr.com/store/>
- r.: <https://www.implen.de/>



# Zwischenzusammenfassung, Teil II

## (selbst beantworten)

### Fragen zu Lernzielen und -themen

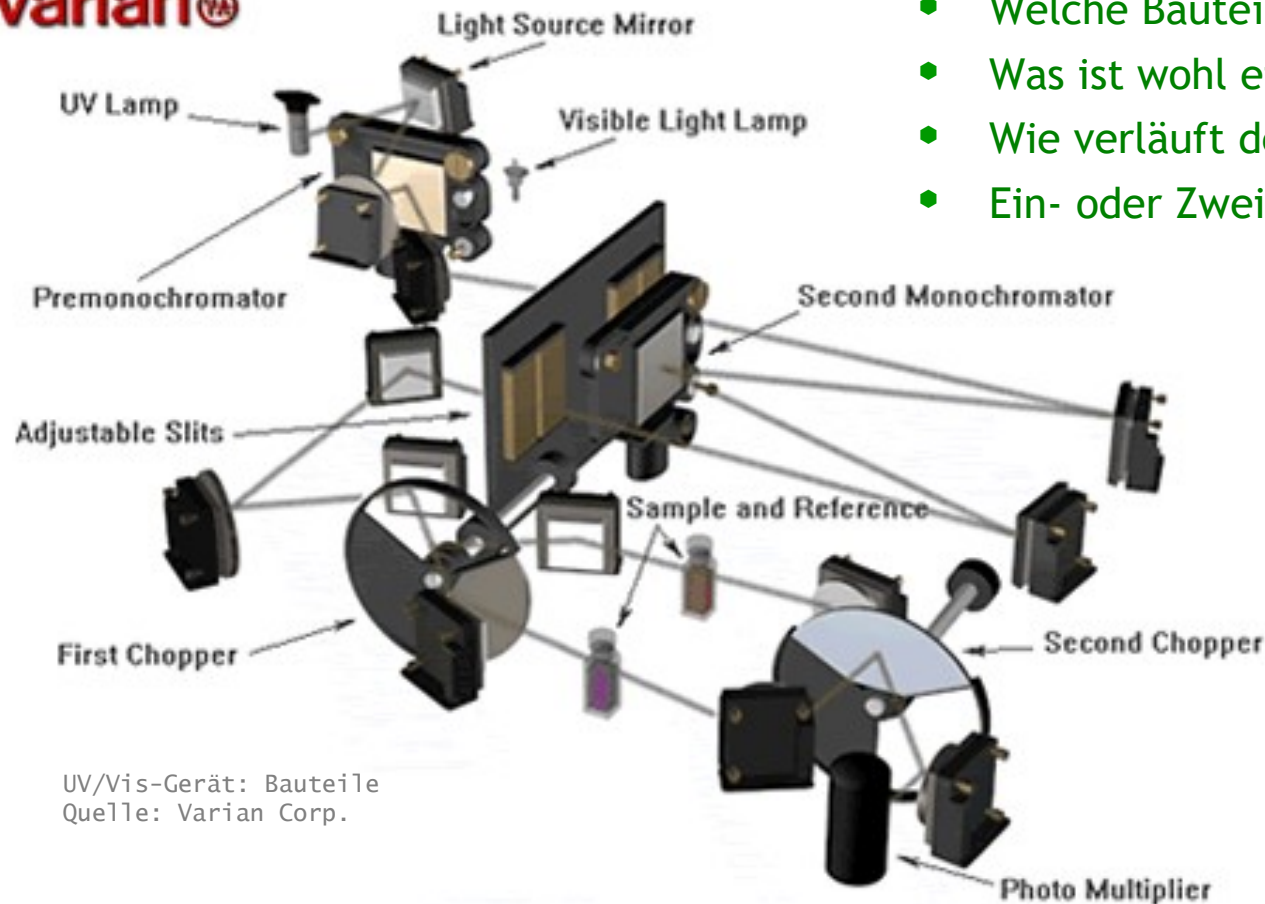
- Was bedeutet eine Absorbanz von 2 und warum sind einfache Detektoren hier oft schon an ihrer Grenze, Spektrometer aber erst bei  $A \approx 3$ ?
- Warum sind die meisten Stoffe in der Biochemie farblos?
- Welche Gruppen machen Farbe?
  - in Naturstoffen
  - synth. Farbstoffen
  - Farbigen Stoffen im Labor
- Beschreiben Sie vier wesentliche Komponenten eines UV-/Vis-Spektrometers, ihre Funktion sowie ihr Zusammenwirken
- Wie wird UV-Detektion in der HPLC eingesetzt, welche Bauteile sind besonders? Was ist ein DAD-Detektor?
- Nennen Sie besondere Vor- und Nachteile von UV/Vis

### Zusatzfragen

- Was ist bei einem Gerät mit Zweistrahlprinzip anders? (in Pharmacopoe meist gefordert)
- Einmal-Kunststoffküvetten sind wofür gut geeignet? Welche Alternativen gibt es?
- Wieso ist die Wahl des Lösungsmittels für UV-Spektren relevant?
- Warum auch die Wahl von Puffern in HPLC-Läufen?

# Bauteile und Aufbau eines Spektralphotometers

**varian** 



UV/Vis-Gerät: Bauteile  
Quelle: Varian Corp.

## Übung

- Welche Bauteile sind wo vorhanden?
- Was ist wohl ein Chopper?
- Wie verläuft der Lichtweg?
- Ein- oder Zweistrahlgerät?