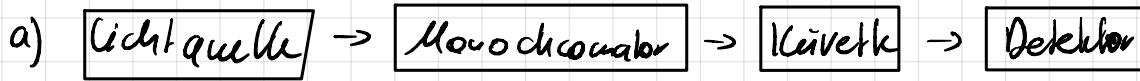


### 3. Optische Spektrometrie:

- Beschreiben Sie den Aufbau eines UV-Detektors (zu einer HPLC) anhand einer Skizze. Benennen Sie drei wesentliche Bauteile und deren Funktion/Eigenschaften.
- Erläutern Sie zwei wesentliche Unterschiede zum apparativen Messprinzip eines Fluoreszenz-Detektors. Warum ist dessen Empfindlichkeit/Selektivität so anders?
- Geben Sie zwei Maßnahmen aus der Qualitätssicherung an, die vor quantitativen Messungen mit einem UV-Detektor erfolgen müssen.
- Wie kann eine Probe auch dann im UV-Detektor quantifiziert werden, wenn Sie in einem Puffer gelöst ist, der selbst bei der Messwellenlänge absorbiert?

(etwa 16 min)



Lichtquelle: Sorgt für Emission von Wellenlänge, die die Probe ausregt  
abh. ob im UV oder VIS-Bereich gemessen wird gibt es andere Lampe

Monochromator: Spaltet das Licht und sorgt damit dafür, dass nur bestimmte Wellenlänge auf Probe trifft

Detektor: Detektiert Licht, das nicht von Probe absorbiert wurde und wandelt die Lichtintensität in ein el. Signal um

- b) Bei Fluoreszenz werden die emittierten Wellenlängen detektiert, im Gegensatz zu allen nicht absorbierten bei UV/VIS.

Außerdem ist die Messanordnung verschieden.

Bei UV/VIS sind Lichtquelle, Monochromator und Detektor hintereinander angeordnet. Bei Fluoreszenz steht der Detektor in 90° Winkel zur Lichtquelle.

- c) - SOP zur Handhabung erstellen  
- Gerät qualifizieren

- d) Stoff kann neben höherem Abs. hat noch ein zweites Maximum (geringer) haben. Das könnte ggf. genutzt werden. Sollte es nicht möglich sein, besteht auch die Möglichkeit eine Baseline Subtraktion. Dafür wird die Baseline des Puffers ohne Probe gemessen. Diese Baseline wird dann bei den eigentlichen Messungen mit Probe abgezogen. Dadurch wird der Eigenwert der Probe isoliert

+ pot. Acridinderivaten?

22. Sie messen die Absorption einer Proteinlösung bekannter Konzentration bei 200 nm, 280 nm und 500 nm.

Welche Schlüsse können Sie aus dem Ergebnis der Messung bezüglich der Struktur des Proteins ziehen?

200 nm: alle Peptide (Peptiden)  
→ sensitiv für Peptidbindung

280 nm: → aromatische Aminosäuren  
wie Tryptophan, Tyrosin

500 nm: → sichtbares Licht  
→ Vorhandensein von Farbstoffen oder prosthetischen Gruppen im Protein  
z.B. Häm-Gruppe oder Chromophore

20. Warum messen UV-Spektrometer üblicherweise nur bis zu einer Wellenlänge von nicht kleiner als 190 nm?

Wegen dieser Wellenlänge können auch bindende  $\sigma$ -Orbitale zu antibindenden  $\sigma^*$ -Orbitalen angehoben werden

also  $\sigma \rightarrow \sigma^*$

wele Moleküle haben diese  $\sigma$ -Orbitale

→ Ergebnis unspezifisch

18. Sie messen das Absorptionsspektrum einer Substanz und beobachten die langwelligste Bande bei 400 nm.

Welchen Schluss können Sie aus dieser Beobachtung hinsichtlich der Struktur des Moleküls ziehen?

Worum kann es sich bei dem Molekül auf keinen Fall handeln?

→ 400 nm → sichtbares Licht

→ 400 nm → Molekül ist System konjugierter Doppelbindungen

→ Diese senken die Energie der el. Übergänge

→ Absorption fällt in den sichtbaren Bereich

3. Begründen Sie, warum das UV-Vis-Spektrum von Molekülen in der Regel aus breiten Absorptionsbanden besteht.

- elektronische Übergänge  $\rightarrow$  Änderungen in den Schwingungszuständen
- Mol. absorbiert Licht  $\rightarrow$  ein Schwingungszustand kann zu einem anderen Schwingungszustand im angeregten Zustand übergehen
  - $\Rightarrow$  Serie von Übergängen, liegen nahe beieinander und so breite Absorptionsbanden bilden
- zusätzlich gibt es Rotationsstufen
  - $\rightarrow$  feinere, aufgespaltene Energiezustände
  - $\Rightarrow$  viele mögl. Übergänge zw. versch. Schwingungs- und Rotationszuständen
    - $\rightarrow$  Verbreiterung der Absorptionsbande
- ( $\rightarrow$  zum Teil noch darüber obere El. Flüssig., die die Energieniveaus verändern können)

17. Welche Substanzgruppen sind farbig? Was ist der molekulare Grund? Nennen Sie jeweils ein Beispiel. Bei welcher Farbe und welcher Wellenlänge etwa absorbiert eine blaue Lösung

Substanzgr. die el. mag. Strahlung der sichtbaren Bereichs absorbieren sind farbig.

→ vor allem Mol. mit konjugierten DB (und arom. Systemen)

(konj. DB: abwechselnd Doppel- und Einfachbindung)

→ Delokalisierung von  $\pi$ -Elektronen über gesamt. Mol.)

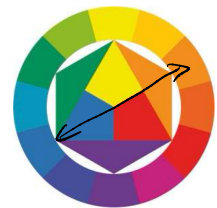
Beispiel: Blauer Farbstoff: Methylengelb

→ hat umfangreiches  $\pi$ -Elektronensystem in seiner aromatischen Struktur, das sichtbares Licht absorbiert und dabei dunkel. blaue Farbe aufweist

→ Lösung ist blau, da Licht im orangen bis roten Bereich der sichtbaren Bereichs 590 nm bis 610 nm absorbiert wird

→ blaues Licht (komplementär) wird reflektiert oder durchgelassen

→ Wahrnehmung blauer Licht



14. Sie verwenden ein Spektralphotometer und erhalten mit derselben Küvette für unterschiedliche Verdünnungen einer Probe bei 550 nm folgende Extinktionswerte:

unverdünnt:

$$E_{550 \text{ nm}} = 2,3992$$

Verdünnung 1:2:

Verdünnung 1:10:

Wie groß sind die Extinktionen für die verdünnten Lösungen und wie ist das Verhältnis der Lichtintensitäten, die durch die Probenküvette gelangen, zueinander

$$A = \epsilon \cdot d \cdot c \quad \Rightarrow \quad A_{550 \text{ nm}} = c \cdot d \cdot \epsilon \quad \Rightarrow \quad E \sim c$$

$$A_{1:2} = A_1 \cdot \frac{1}{2} = 2,3992 \cdot \frac{1}{2} = 1,1996$$

$$A_{1:10} = A_1 \cdot \frac{1}{10} = 2,3992 \cdot \frac{1}{10} = 0,23992$$

$$A = \lg \frac{I_0}{I} \quad \frac{I_0}{I} = 10^A$$

$$\frac{I_1}{I_2} = 10^{A_2 - A_1} = 10^{1,1996 - 0,23992} = 9,11$$

→ 9 mal mehr Licht absorbiert

3. Welche grundlegenden Unterschiede weisen Atome und Moleküle im Hinblick auf Methoden der UV-Vis-Spektroskopie auf?

Atome: Absorptionsbanden durch elektr. Übergänge  
zw. diskreten Energieniveaus des  $e^-$  in den Atomorbitalen  
→ scharfe, diskrete Linien

da Energieniveaus quantisiert und eng definiert sind  
→ spez. Wellenlängen (bei denen Licht absorbiert wird)

Moleküle:

Absorptionsbanden umfassen neben elektr. Übergängen auch  
Schwingungs- und Rotationsübergänge

→ Vielzahl von Energiezuständen

→ Absorptionsspektren bestehen aus breiten Banden  
(Überlagerung vieler enger Linien  
durch Kombination von elektr., schwingenden und  
rotierenden Übergängen entstehen)

15. Wozu benötigt man bei einer spektralphotometrischen Messung eine Referenzküvette?

liefert die Intensität  $I_0$

→ reines Lösungsmittel ohne Probe

→ dann in Verhältnis zu Intensität der Probenlösung

→ Ermittlung von Einfluss von Lösungsmittel und Küvette selbst auf Messergebnis

Das Protein Myoglobin (Molmasse etwa 18.000 u) hat eine gut detektierbare Absorption im Bereich des grünen Lichtes aufgrund einer Häm-Fe-Gruppe. Der Extinktionskoeffizient bei 580 nm beträgt  $15.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . (Extinktion:  $E = \log [I_0/I]$ ; Transmission:  $T = I/I_0$ ).

a) Wie groß ist die Extinktion einer Lösung von 0,5 mg/mL Myoglobin, die mit einem Detektor bei 580 nm mit einer Durchflusszelle von 1 mm Durchmesser während einer chromatographischen Trennung gemessen wird?

$$M = \frac{m}{g}$$

b) Bei der Chromatographie wurde noch ein zweites Signal bei 280 nm aufgenommen. Nach einer Faustregel hat eine Proteinlösung dabei eine Extinktion von etwa 1 bei einer Konzentration von 1 g/L und einer Schichtdicke von 1 cm (1 AU). Um welchen Faktor unterscheidet sich die Transmission bei dieser Wellenlänge verglichen zu a) (größer oder kleiner)? Welche Messung ist damit empfindlicher?

$$\Rightarrow c_m = \dots$$

(12 Punkte)

a)  $c = 0,5 \text{ mg/ml}$  in  $\text{mol/L}$  umrechnen

$$c = \frac{0,5 \text{ mg/ml}}{18000 \text{ g/mol}} = \frac{0,5 \cdot 10^{-3} \text{ g/ml}}{18000 \text{ g/mol}} = \frac{0,5}{18000 \cdot 10^3} \frac{\text{mol}}{\text{ml}}$$

$$= 2,78 \cdot 10^{-8} \frac{\text{mol}}{\text{ml}} = 2,78 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d$$

$$= 15000 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \cdot 2,78 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 0,1 \text{ cm}$$

$$= 0,0417$$

b)  $A=1$  ;  $d=1 \text{ cm}$  ;  $c=1 \text{ g/L}$

$$\Leftarrow E = -\lg(T)$$

$$c = 1 \frac{\text{g}}{\text{L}} \rightarrow c_m = 5,56 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d \Rightarrow \epsilon = \frac{A}{c \cdot d} = \frac{1}{5,56 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 1 \text{ cm}} = 17985,16 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$$

$$\approx 18000 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$$

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d = 18000 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \cdot 2,78 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 0,1 \text{ cm} = 0,05$$

$$A(580\text{nm}) = 0,0417$$

$$A(280\text{nm}) = 0,05$$

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \log\left(\frac{1}{T}\right) = -\log T$$

$$\Rightarrow T = 10^{-A}$$

$$\Rightarrow T(580\text{nm}) = 0,908$$

$$T(280\text{nm}) = 0,891$$

Bei 280 nm absorbiert die gleiche Probe mehr Licht, was aus folgt, dass die Messung bei dieser Wellenlänge empfindlicher ist.

UV-Detektor einer HPLC-Anlage mit einfacher Einwellenlängenmessung:

a) Aus welchen Bauteilen ist er prinzipiell aufgebaut? Wie funktioniert die Konzentrationsbestimmung? Was verteuert den Aufbau beim DAD-Detektor und was rechtfertigt diesen Preis?

b) Sie wollen DNA-Konzentrationen am Absorptionsmaximum von etwa 260 nm quantitativ messen. Welche Lösungsbestandteile könnten Ihnen Probleme bereiten: Wasser, Phenol ( $C_6H_5OH$ ), Ethanol ( $C_2H_5OH$ )? Wenn ja, warum gibt es damit Probleme?

c) Durch zu starken Druckabfall nach der Säule bzw. vor dem Detektor, kann die Löslichkeit von Gasen sehr stark abfallen. Die Bildung von Gasblasen äußert sich in deutlichen Intensitätsschwankungen bei der Detektion mit einer Wellenlänge. Solche Störungen sind sehr ungünstig, wenn quantitative Analysen unter GLP-Bedingungen erstellt werden. Wie wirken sich diese auf Präzision, Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Nachweisgrenze aus?

**(14 Punkte)**

08 - SS

→ keine Lsg

→ check GPT

Ein in Wasser gelöster Kupfer-Glycin-Komplex  $[\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{N})]$  absorbiert Licht, mit einem Maximum bei 629 nm. Die Absorption (früher: Extinktion) einer Lösung mit einer Konzentration von 0,024 mol/l in einer Standardküvette (1 cm) beträgt 1 an diesem Maximum.

- Berechnen Sie den Absorptionskoeffizienten der Substanz für diese Lösung.
- Geben Sie außerdem die Absorption und Transmission bei einer Verdünnung von 1 : 2 bzw. 1 : 5 dieser Lösung an.
- Wie viel unterscheiden sich die Lichtintensitäten hinter der Küvette im Fall b) gegenüber a)?

**(8 Punkte)**

08 - SS BI

→ keine Lsg

→ kein GPT

Das Protein Myoglobin (ungefähre Molekülmasse 18.000 Da) färbt Lösungen aufgrund einer komplexierten Häm-Gruppe schwach rötlich ein und besitzt damit eine gut detektierbare Absorption im sichtbaren Bereich. Der Extinktionskoeffizient bei 580 nm beträgt  $15.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . (Extinktion:  $E = \log I_0/I = \epsilon \cdot c \cdot d$ ; Transmission =  $I/I_0$ ).

a) Wie groß ist die Extinktion und die Transmission einer wässrigen Lösung von 0,5 mg/mL Myoglobin, die mit einem Detektor bei 580 nm mit einer Durchflusszelle von 1 mm Durchmesser während einer Chromatographie gemessen wird? Welcher Farbe entspricht das absorbierte Licht?

b) Bei der Chromatographie wurde noch ein zweites Signal bei 280 nm aufgenommen. Warum absorbieren Proteine an dieser Wellenlänge im mittleren UV-Bereich? Nach einer Faustregel hat eine Lösung dann eine Extinktion von 1 bei einer Konzentration von etwa 1 g/L (bei  $d = 1 \text{ cm}$ ). Um welchen Faktor unterscheidet sich die Transmission des jeweiligen Lichtes in obiger Durchflusszelle verglichen zu a) (größer oder kleiner)? Welche Messung ist damit empfindlicher?

c) Um etwa welchen Faktor unterscheidet sich die Energie der unter b) benutzten Strahlungsart zu a) (je Photon/ Lichtteilchen)?

(12 Punkte)

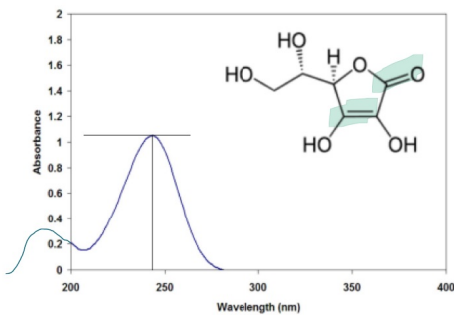
ECana

β-Carotin ist ein wichtiger natürlicher Farbstoff, der unter anderem Bestandteil vieler Lebensmittel ist.

a) Die Substanz kann zum Beispiel aus Algenkulturen aufgereinigt werden. Die Konzentration eines Extraktes in Hexan soll anhand seiner Lichtabsorption im Extinktionsmaximum bestimmt werden. Der Extinktionskoeffizient für eine Lösung in Hexan beträgt  $139.500 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Wie groß ist die Menge an β-Carotin in 500 Liter Extrakt, bei einer Extinktion von 0,67 für eine 1:200 verdünnte Probe des Extraktes (Küvette von 10 mm Durchmesser)?

b) Bei der unter a) vorgenommenen Bestimmung wurde nicht berücksichtigt, dass im Extrakt noch andere Farbstoffe vorhanden sind, die ebenfalls an der genannten Stelle absorbieren. Wie groß ist der bei a) gemachte systematische Fehler, wenn 6 % der Ausgangsintensität auf diesem Wege in der Probe von anderen Substanzen absorbiert wurden, welche nicht in der Standardlösung waren?

Elena



UV-Spektrometrie:

- Beschreiben Sie den Aufbau eines UV-Spektrometers. Benennen Sie vier wesentliche Bauteile und deren Funktion/Eigenschaften.
- Erläutern Sie das apparative Messprinzip, die eigentliche Messgröße und die üblicherweise angegebene Größe (spektrales Absorptionsmaß). Erläutern Sie damit, warum eine Erhöhung der Absorption von 2 auf 3 für viele Spektrometer zu nichtlinearen Effekten bei Konzentrationsbestimmungen führt.
- Oben ist ein UV-Spektrum von Vitamin C angegeben. Erläutern Sie es kurz. Welche Wellenlänge würden Sie demnach für eine HPLC-Trennung für dieses Molekül wählen, wenn die erwartete Konzentration sehr niedrig bzw. relativ hoch ist?
- Wovon werden bei diesem Molekül im obigen Messbereich Signale erhalten? Warum ist deren Peakbreite so hoch?

(14 Punkte)

a) Der grundlegende Aufbau besteht aus einer Lichtquelle, einem Monochromator, einer UV-Durchlässigen Küvette in der sich die Probe befindet und einem Detektor. Die Lichtquelle produziert die UV-Strahlung, durch den Monochromator gelangt nur eine bestimmte Wellenlänge auf die Probe. Die Küvette sorgt dafür, dass die durchstrahlte Schichtdicke konstant und reproduzierbar ist. Der Detektor detektiert die Strahlung die nicht von der Probe absorbiert wurde und wandelt das optische Signal in ein el. um.

b) Eine Strahlung der Intensität  $I_0$  dringt in die Probe ein und eine reduzierte Strahlung der Intensität  $I$  verlässt die Küvette und wird vom Detektor registriert. Das Verhältnis  $\frac{I}{I_0}$  ist die Transmission. Üblicherweise wird aller dings die Absorption angegeben  $A = -\log(T) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$

$$A = 2 \rightarrow T = 10^{-A} = 10^{-2} = \frac{1}{100}$$

$$A = 3 \rightarrow T = 10^{-3} = \frac{1}{1000}$$

nur noch  $\frac{1}{1000}$  der Strahlung dringt durch die Probe. Das kann bei vielen Detektoren unterhalb des CoA's liegen  
↳ Limit of Quantification

c) Vitamin C besitzt ein Abs maximum bei ca. 240nm, das abgeschwächte Spektrum scheint unter 200nm noch ein weiteres Maximum zu besitzen. Die Höhe des 2. Max ist nicht abschätzbar. Bei kleinen Konzentrationen ist die Wellenlänge des höchsten Maximums zu wählen. Bei großen Konzentrationen ist die Wellenlänge unter dem Maximum zu wählen, aber allerdings noch unter 200nm, dort absorbiert Vitamin C gar nicht mehr.

d) Signale von den  $\pi$ -Elektronen der Doppelbindungen. Der Peak ist breit, da sich die elektrischen Übergänge durch Schwingungs-/Rotationsübergänge überlagern.

Wi SE 2005 / 5f

a) gelber Farbstoff  
orange

↳ Die komplementäre Farbe wird absorbiert  
blau hat höhere Wellenlänge  
 $\lambda_{\text{abs}} \sim 480 \text{ nm}$

b) 
$$E = \epsilon_1 c_1 d = \epsilon_2 c_2 d = \frac{E}{\epsilon_1 c_1} = \frac{1,34}{135500 \frac{\text{mol}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \cdot 1 \text{ cm}} = 9,6 \cdot 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$

$V_2 = 200 \cdot V_1$   
 $\rightarrow c_1 = \frac{c_2 \cdot 100 \cdot V_1}{V_1} = c_2 \cdot 100 = 9,6 \cdot 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 100 = 9,6 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{L}} = 0,96 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$

$n = c \cdot V = 0,96 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 200 \text{ L} = 1,92 \cdot 10^{-2} \text{ mmol}$



$T = \frac{1}{10} =$

$E = A = -\log T = -\log \frac{1}{10} = -\log \frac{0,94}{1}$

$n = \frac{E}{\epsilon_1 \cdot d} = \frac{-\log \left( \frac{0,94}{1} \right)}{135500 \frac{\text{mol}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \cdot 1 \text{ cm}} \cdot 100 \cdot 200 \text{ L} \approx 3,19 \text{ mmol}$