

1800:
Entdeckung der IR-Strahlung
durch Astronom Herschel bei
der Zerlegung von Sonnenlicht

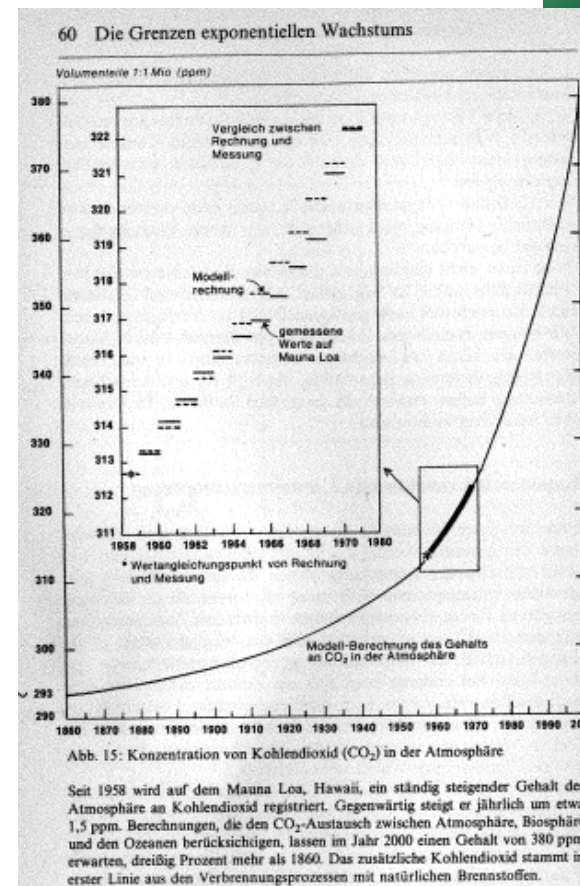
Bildquelle: www.weltderphysik.de

Infrarotspektroskopie (sowie Raman)

Wärme (be)schwingt!

Lernziele

- Physikalische Grundlagen
 - Was verbindet Klimawandel und IR-Spektroskopie?
 - Molekülschwingungen
 - (Quanten-)mechanische Grundlagen
- Spektrometernaufbau und Messgrößen
- Beispielspektren und Interpretation
- Einsatzgebiete
- Spezielle Methoden
 - Nahinfrarot (NIR)
 - Raman-(Laser-)Spektroskopie

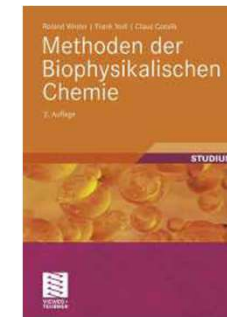


1972:
Vorhersage
Klimawandel

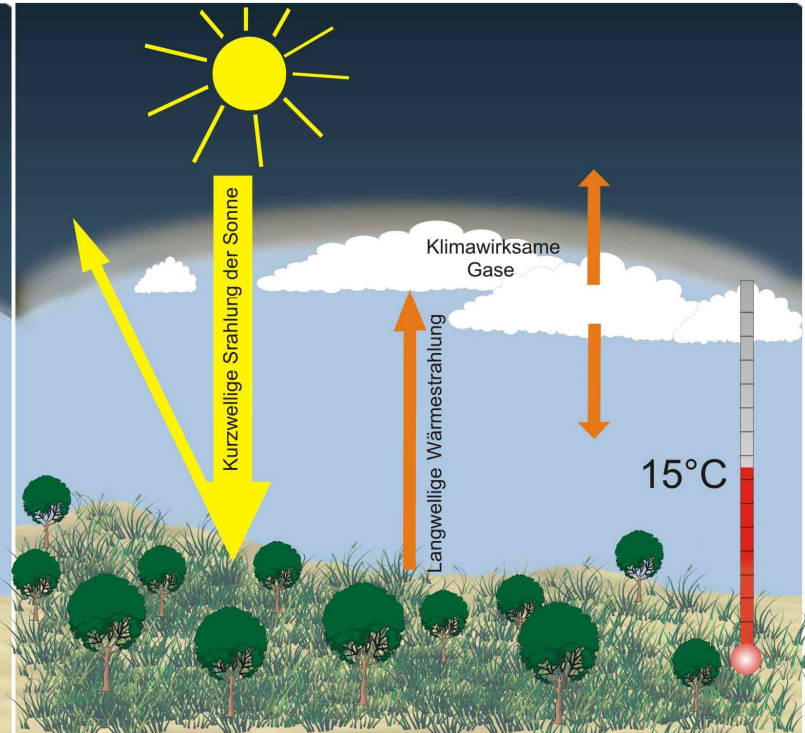
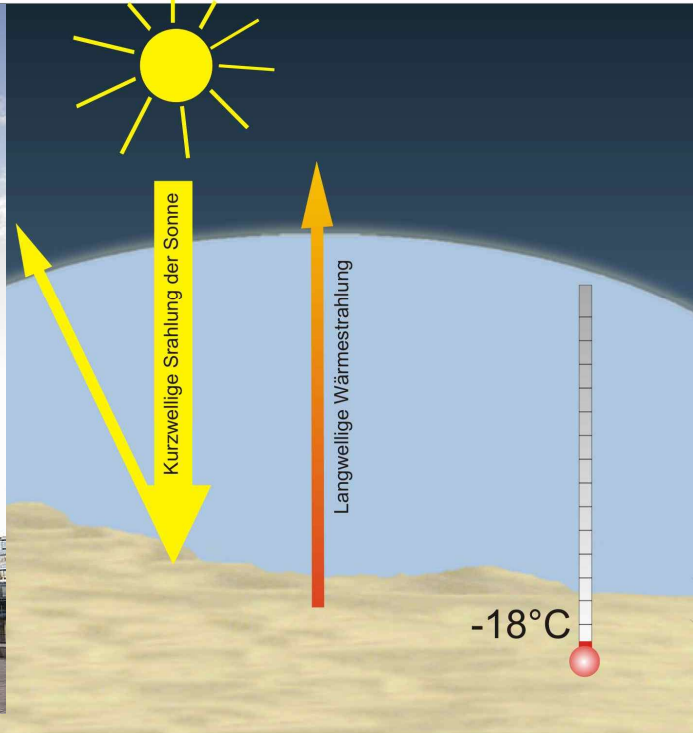
Quelle: Meadows et al. „Grenzen des Wachstums“, rororo 1989

Literatur zur IR-Spektroskopie

- Grundlagen:
Lehrbücher der Phys. Chemie (Wedler, Atkins)
- Instrumentelle Analytik
 - Cammann
 - Skoog/Leary
- Firmenschriften von Bruker (Moodle)
 - Gremlich „IR Spektren verstehen“ 2002
 - Guide for Infrared Spectroscopy 2014 (Tabellen)
- Anwendung in der Bioanalytik:
Winter/Noll, „Methoden der biophysikal. Chemie“
Teubner 2011 (oder 1998)
- Internet:
 - www.ir-spektroskopie.de (gute Einführung)
 - www.chemlin.de/chemie/ir_spektroskopie.htm (Links)
 - <http://orgchem.colorado.edu/hndbksupport/irtutor/tutorial.html>
- Interaktives Tutorial zu FT-IR:
 - Fa. Bruker Optics (nur in Moodle)
- Monografien zur Vertiefung
 - Schrader „Infrared and Raman Spectroscopy: Methods and Applications“ Wiley-VCH 1995 (Tipp MA-Studentin in 2022)
 - Larkin „Infrared and Raman Spectroscopy“ Elsevier 2nd ed. 2018 (ein Ex. TU-Bibliothek)



„Glashauseffekt“ (nicht Treibhaus-...) (Strahlungserwärmung)

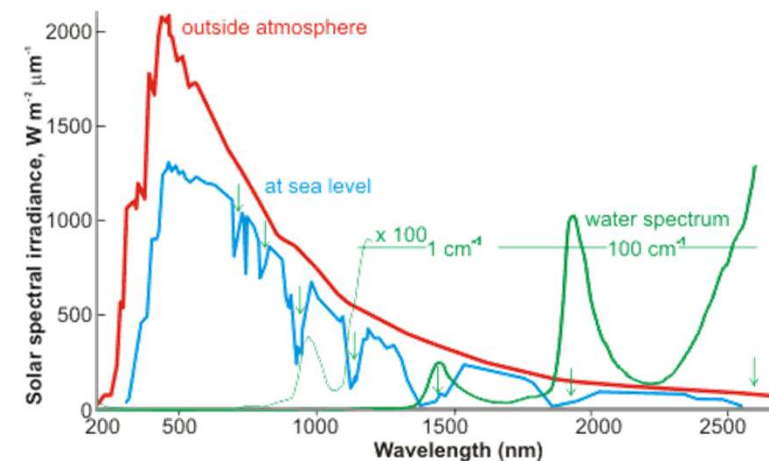


Nord/LB in
Hannover

Quelle:
ChristianSchd
<https://de.wikipedia.org/>

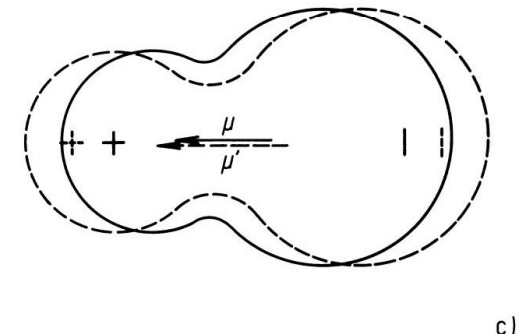
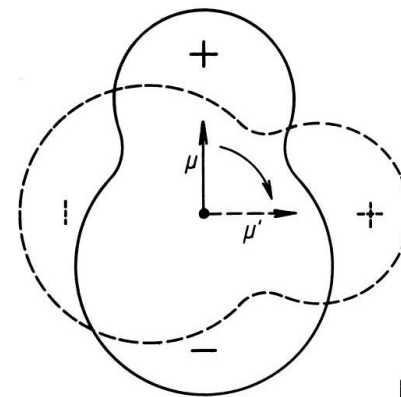
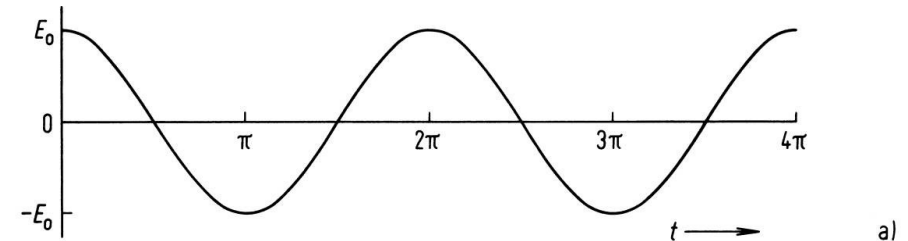
<http://www.deutsches-klima-konsortium.de>

- Was macht den Haupt-Klimaeffekt?
- Warum macht gerade auch CO₂ einen Klimaeffekt?
- Was bewirken andere Bestandteile der Atmosphäre?



Grundlagen der IR-Spektroskopie

- Schwingende oder rotierende **Dipole** erzeugen fluktuierende elektrische Felder
- Moleküle mit Dipolmomenten können daher emittieren als auch absorbieren.
- Dazu **muss** eine Änderung des elektrischen Dipolmomentes auftreten
- Moleküle (Atome) ohne zeitlich veränderliches Dipolmoment sind IR-inaktiv
- IR-inaktiv sind auch feld-symmetrische Schwingungen/Rotationen



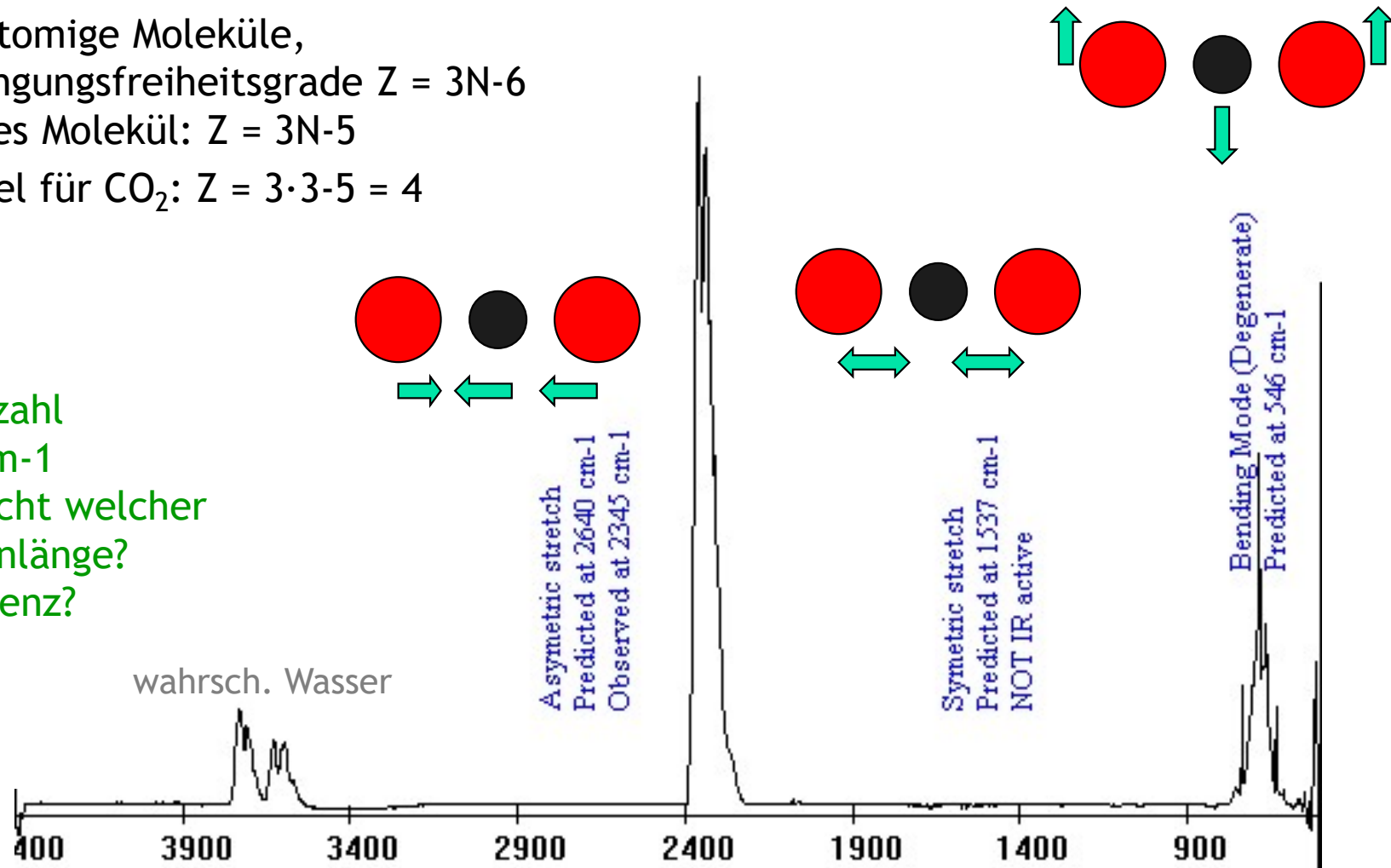
© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Wedler / Lehrbuch der Physikalischen Chemie
ISBN: 3-527-31066-5 Abb-03-04-02

IR-Spektrum von CO₂ (bei 4 kPa)

- Eine Normalschwingung (Freiheitsgrad) für zweiatomige Moleküle
- Mehratomige Moleküle, Schwingungsfreiheitsgrade $Z = 3N - 6$
lineares Molekül: $Z = 3N - 5$
- Beispiel für CO₂: $Z = 3 \cdot 3 - 5 = 4$

Wellenzahl
2400 cm⁻¹
entspricht welcher

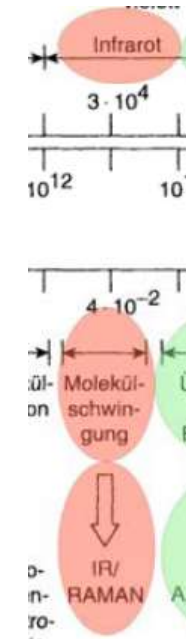
- Wellenlänge?
- Frequenz?
- Emol?



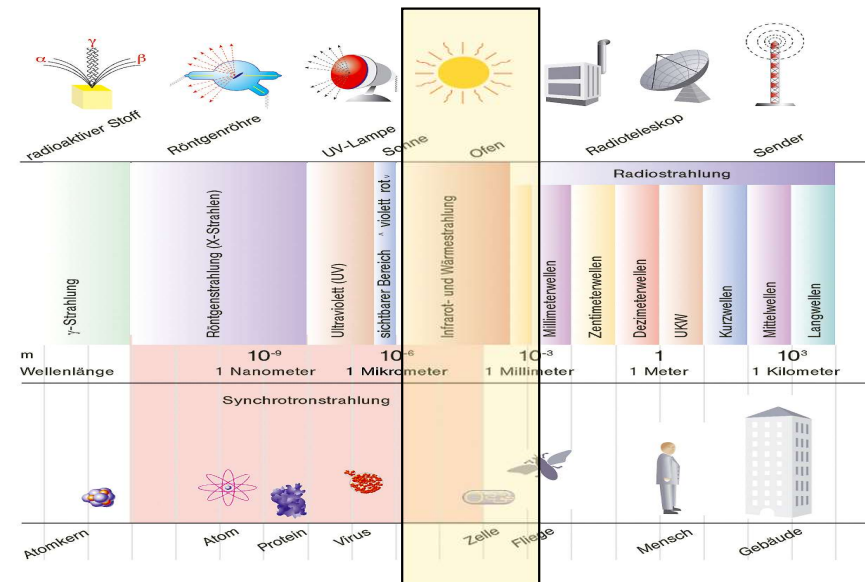
http://science.widener.edu/svb/ftir/ir_co2.html

Bereiche der Infrarot-Spektroskopie

- Energiedifferenzen für etwa 700 bis 10^6 nm entsprechen Molekülschwingungen und -rotationen. (vgl. UV-Vis-Spektroskopie)
- Drei Bereiche mit unterschiedlicher Anregungen
 - NIR (0,7-2,5 μm): Ober- und Kombinationsschwingungen
 - MIR (2,5 bis 50 μm): Grundschwingungen
 - FIR (50-1000 μm): Rotationsübergänge

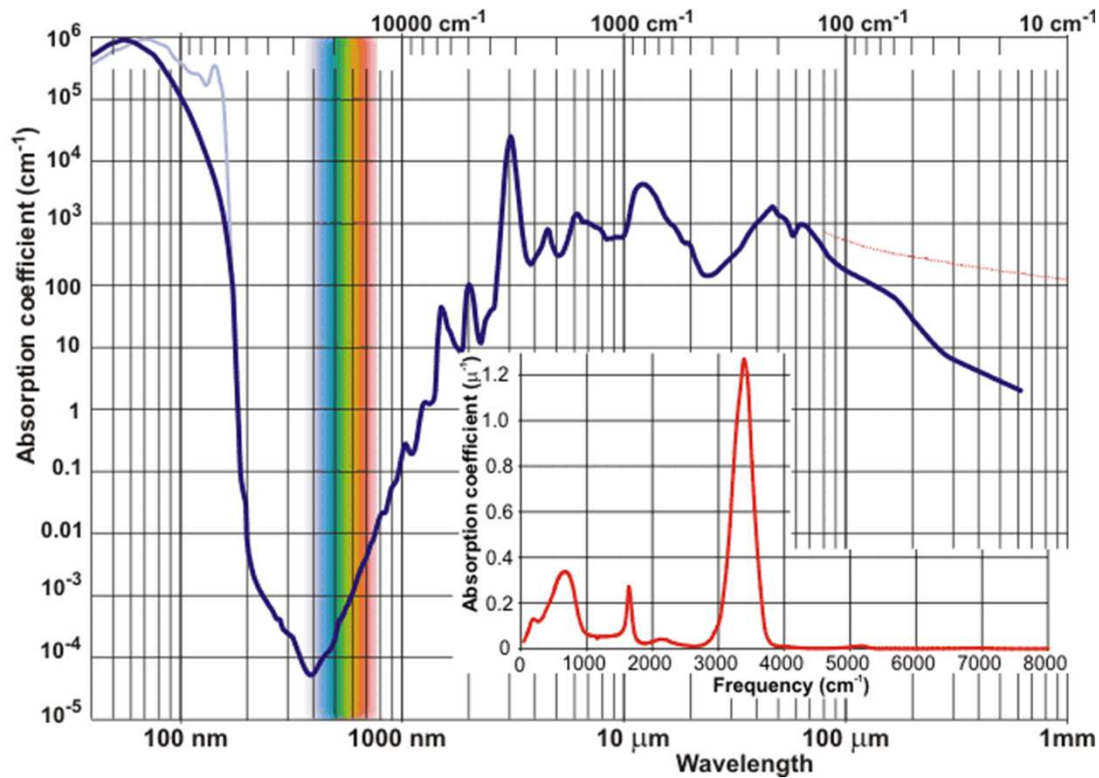


Vergleiche allg. Spektroskopie in Kapitel UV/Vis



Wasser-Spektrum

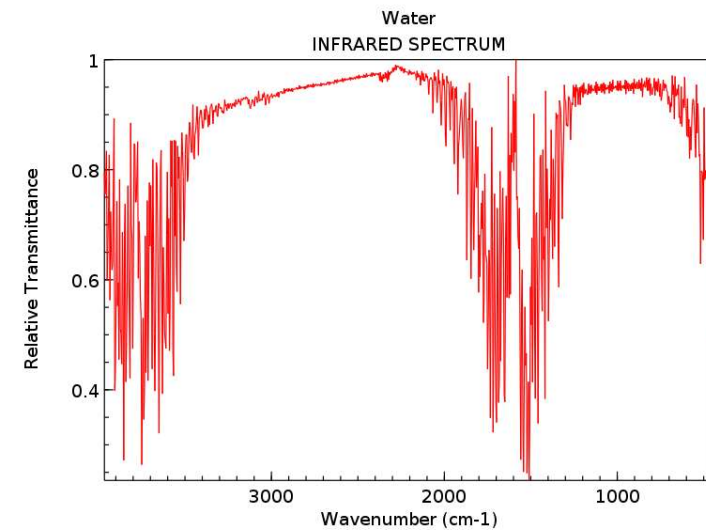
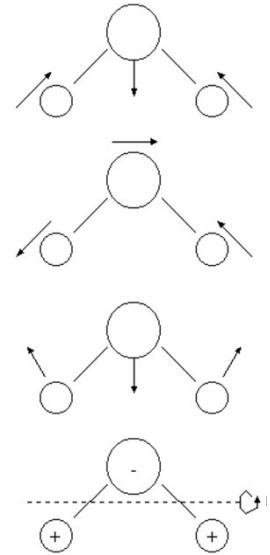
UV bis FIR



<http://www1.lsbu.ac.uk/water/vibrat.html>

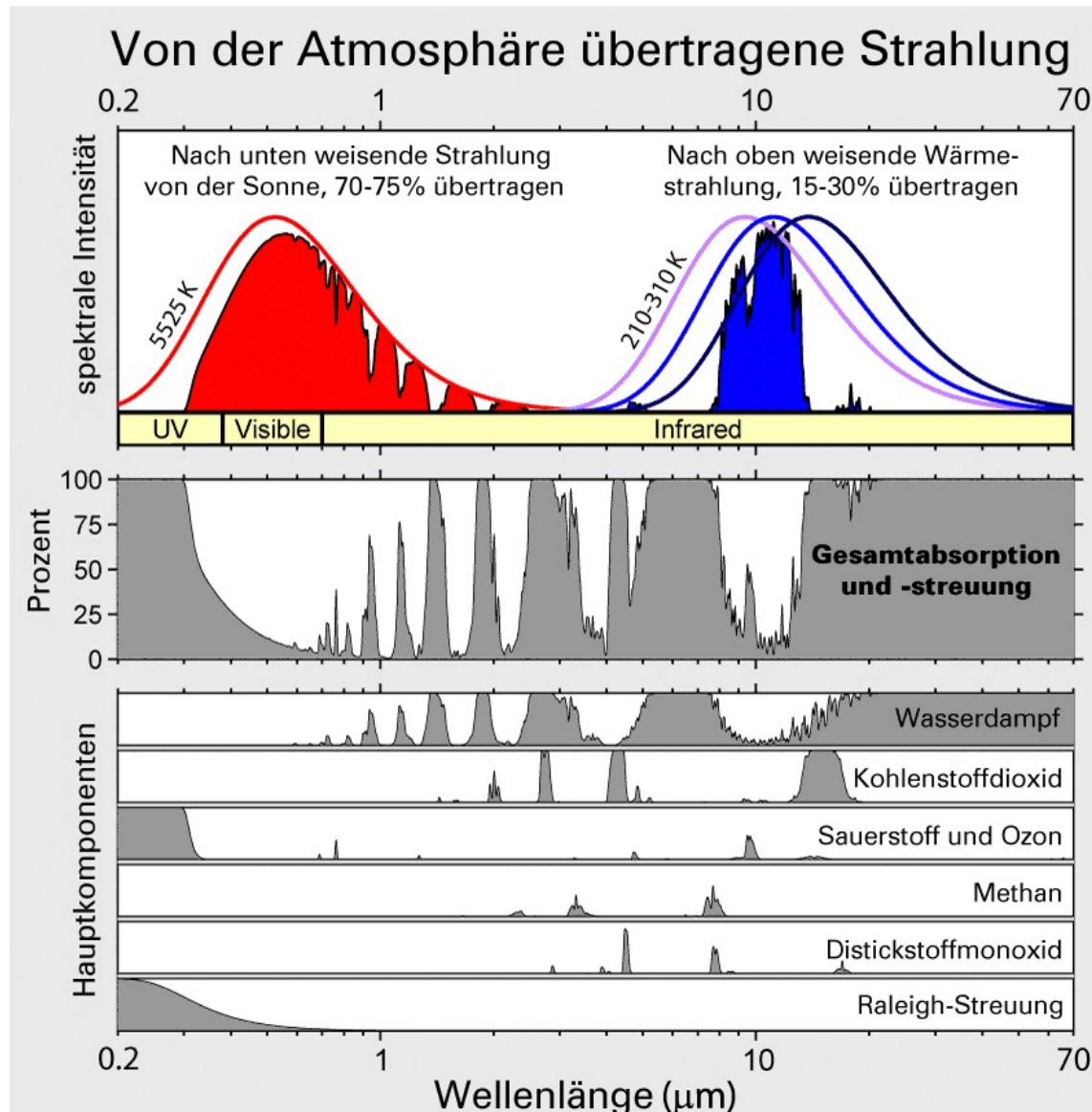
MIR

3.657 cm ⁻¹	sym. Valenz- schwingung	IR- aktiv
3.756 cm ⁻¹	asym. Valenz- schwingung	IR- aktiv
1.595 cm ⁻¹	Deformations- schwingung	IR- aktiv



NIST Chemistry WebBook (<https://webbook.nist.gov/chemistry>)

Klimagase reduzieren Abstrahlung (im IR-Bereich)



- ◆ CO₂ reduziert abgestrahlte IR-Strahlung, also Wärme.

⇒ Damit steigt Wärmemenge in Atmosphäre

⇒ Damit steigt globale mittlere Temperatur
- ◆ Temperaturänderungen sind unterschiedlich verteilt

⇒ Energie wird in Wasserverdampfung oder Winden merklich

⇒ Mögliche Wetterextreme

Quelle:CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=49295181>

Physikalische Beschreibung von Schwingungen

Annäherung aus der klassischen Mechanik (Oszillator):

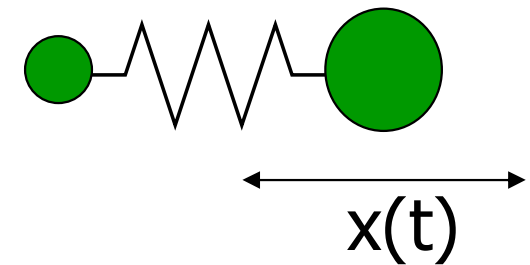
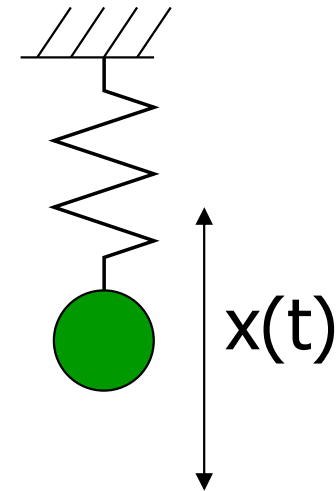
- Hookesches Gesetz: $F = -D \cdot x$; D : Federkonstante, x : Auslenkung
- $F = -d(E_{\text{pot}})/dx$; $E_{\text{pot}} = \frac{1}{2} D \cdot x^2$
- Schwingungsfrequenz $\nu_0 = 1/2\pi \cdot (D/m)^{1/2}$

Übergang zu vereinfachten Molekülmodell

- zwei Massen durch Bindung (Feder) verbunden
- Ersatz der Masse durch reduzierte Masse μ
 $\nu_0 = 1/2\pi \cdot (D/\mu)^{1/2}$; $\mu = m_1 \cdot m_2 / (m_1 + m_2)$

Quantenmechanische Beschreibung

- Einsetzen in Schrödinger-Gleichung
 $d^2\psi/dx^2 + 8\pi^2 \mu/h^2 \cdot (E - \frac{1}{2} D \cdot x^2) \cdot \psi = 0$
- Eigenwerte der Energieniveaus ableiten.
- Erlaubte Energieniveaus: $E_v = h \cdot \nu_0 (v + \frac{1}{2})$; $v: 0, 1, 2, \dots$
- Auch im Zustand $v=0$ findet schon Schwingung statt!
- Energieniveaus und -abstände für harmonischen und anharm. Osz.
- ψ^2 ergibt Wahrscheinlichkeitsdichten (Abb. Wedler)

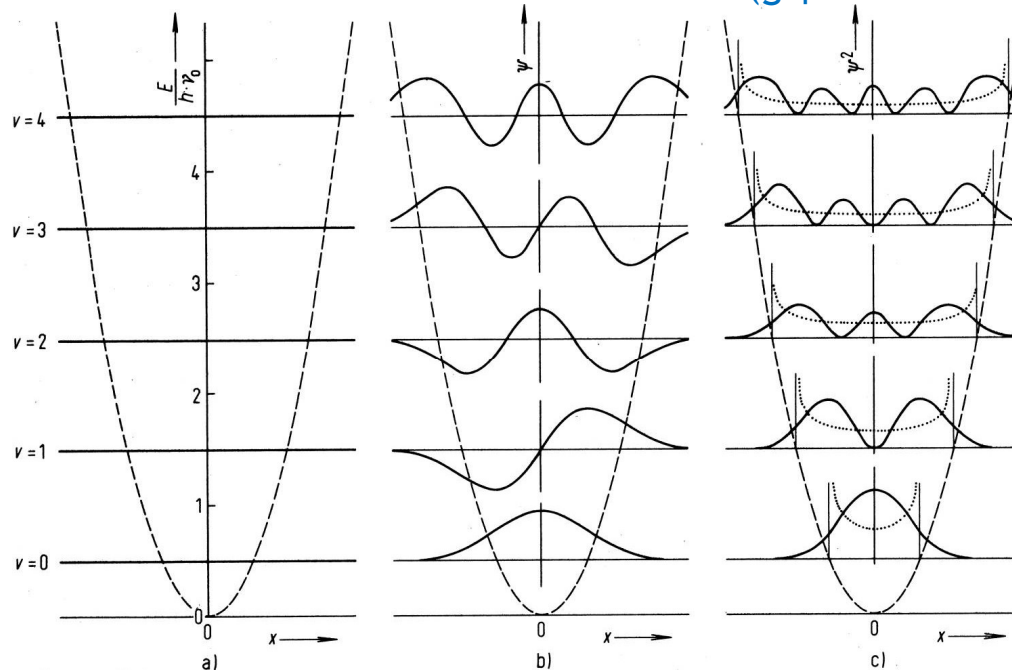


Lösungen für harmon./anharm. Oszillator

Energieniveaus

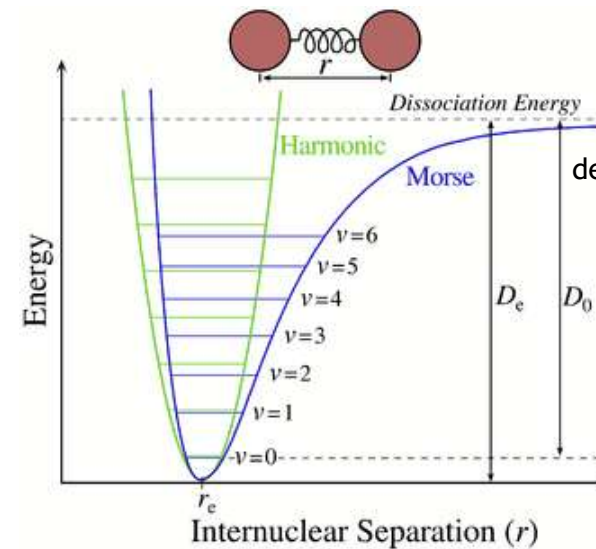
Wellenfunktionen

Wahrscheinlichkeitsdichten
(gepunktet: klass. mechanisch)



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Wedler / Lehrbuch der Physikalischen Chemie
ISBN: 3-527-31066-5 Abb-03-01-06

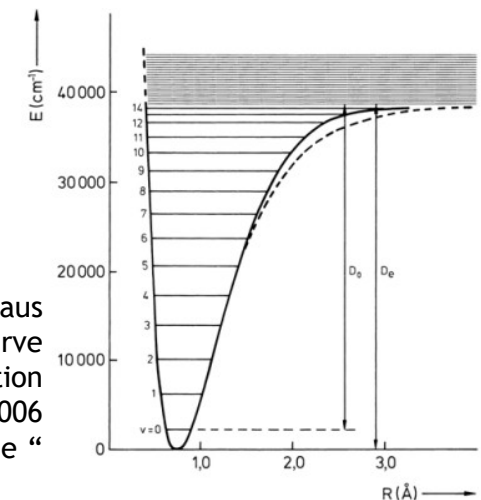
Energieniveaus beim
anharm. Oszillator,
mit Dissoziation



Quelle:
de.wikipedia.org
(Apr-2021)
Autor: Somoza

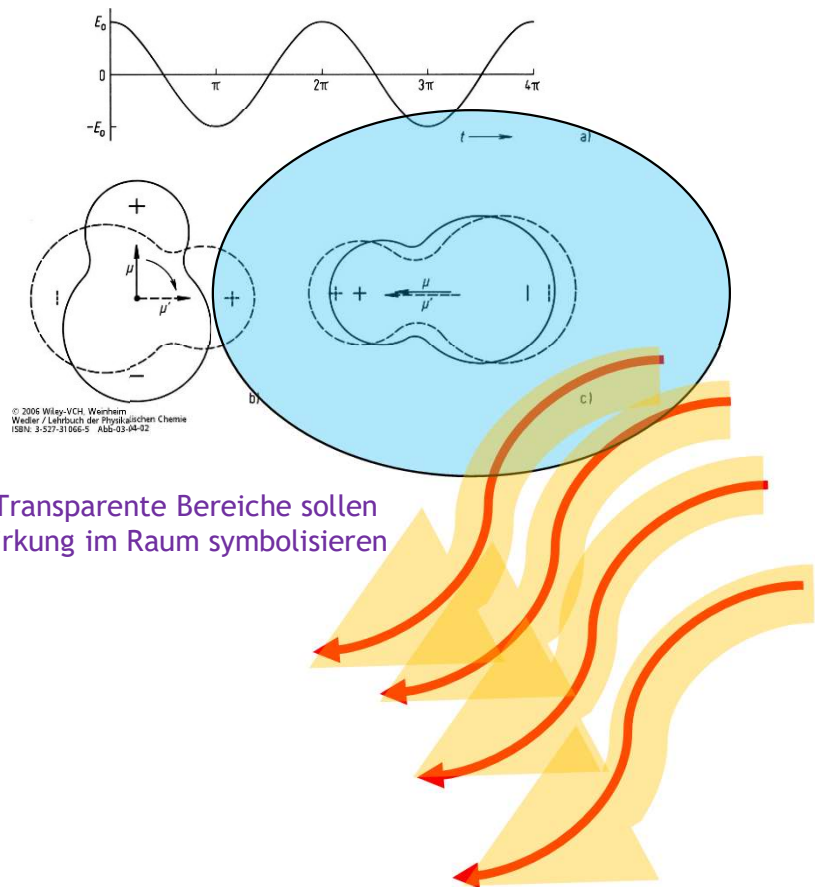
Molekül	Wellenzahl	Diss.-Energie D_0
H ₂	4159 cm ⁻¹	435 kJ/mol
O ₂	1556 cm ⁻¹	497 kJ/mol
CO	2143 cm ⁻¹	1074 kJ/mol

Potentialkurve und Schwingungsniveaus
für das H₂-Molekül. Die gestrichelte Kurve
ist die Annäherung durch eine Morse-Funktion
Quelle: Haken/Wolf, Springer 2006
„Molekülphysik und Quantenchemie“

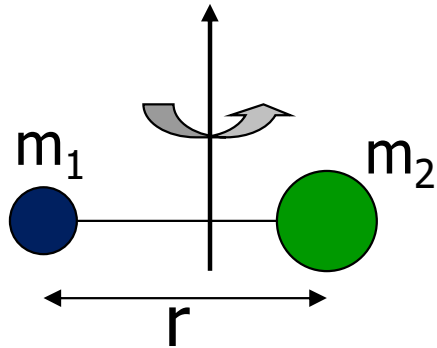


Grundlage von Absorption elektromagn. Strahlung durch veränderliche Dipolmomente in Molekülen

- Schwingende oder rotierende **Dipolmomente** erzeugen fluktuierende elektrische Felder, die für el.magn. Wellen „sichtbar“ sind (gleiche phys. Qualität)
- Molekül und Welle müssen sich gar nicht direkt treffen, sondern „bemerken“ sich beim Vorbeiziehen, mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit
- Je größer die Dipolmomente, desto höher die Wahrscheinlichkeit zu „überlappen“ und somit zu absorbieren.
- Daher ist Absorptionsspektroskopie (UV/VIS/IR) sehr empfindlich, die Probe muss stets verdünnt werden.
- (Alternative Methode, mit Aufeinandertreffen Photon + Molekül: Raman-Spektroskopie)



Schwingung und Rotation sind überlagert



Kurzer Blick auf Theorie
und Quantenmechanik

Energieniveaus

$$E = h/(8\pi^2 I) \cdot J(J+1)$$

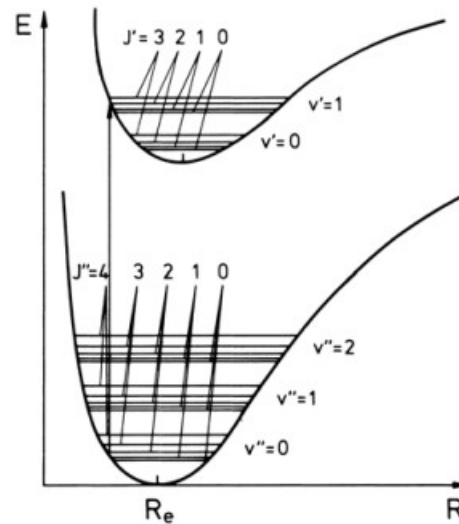
J: Rotationsquantenzahl

I: Trägheitsmoment, $I = \mu \cdot r^2$

$$J = 0, 1, 2, 3, 4$$

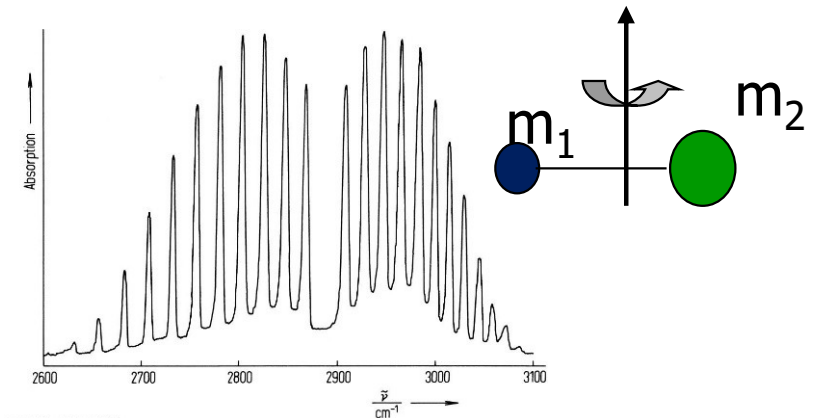
$$E/hcB = 0, 2, 6, 12, 20$$

mit $B = h/(8\pi^2 \cdot c \cdot I)$
Rotationskonstante



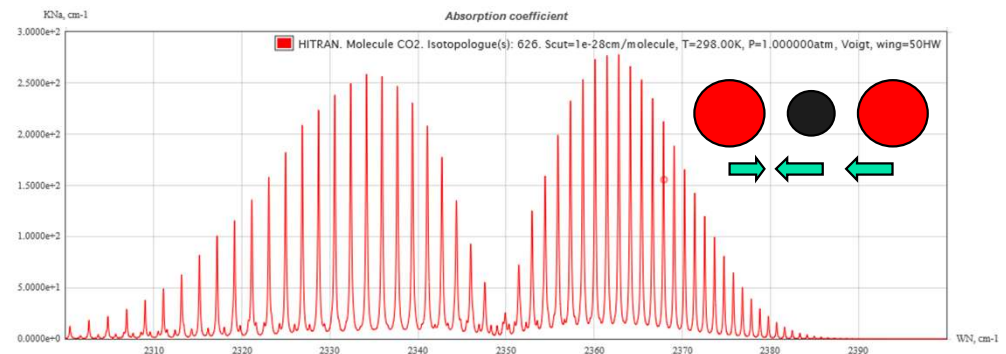
Zwei Schwingungszustände,
von Rotation feinaufgespalten
Quelle: Haken/Wolf, Springer 2006
„Molekülphysik und Quantenchemie“

Absorptionsspektrum von HCl



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Wiedler / Lehrbuch der Physikalischen Chemie
ISBN: 3-527-31066-5 Abb-03-04-07

Absorptionsspektrum von CO₂



Quelle: <https://hitran.iao.ru/>
Molekülsimulationen können
dort selbst erstellt werden

Spektrometeraufbau

- **Strahlungsquellen:**
 - erhitzter Festkörper bei 1200 bis 2200 K (nahezu schwarzer Strahler)
 - z.B. SiC-Globar oder Nernst-Stift aus ZrO_2
 - NIR: Quarz-Halogen mit niedriger Glühtemperatur
- **Wellenzahlselektion**
 - Monochromator (NIR-Absorptionsspektren), ähnlich wie bei UV-Vis
 - Michelson-Interferometer (MIR), mit Laser und FT-IR (folgt)
- **Detektoren:**
Halbleiter-Photozellen, Diodenarray, pyroelektrische Detektoren (Umwandlung von Ferroelektrika), thermische Detektoren
- **Messgrößen**
 - Transmissionsfaktor (T oder T%) für qual. Spektren
 - Absorbance (A), vorwiegend für Quantifizierung (vgl. UV-Vis)

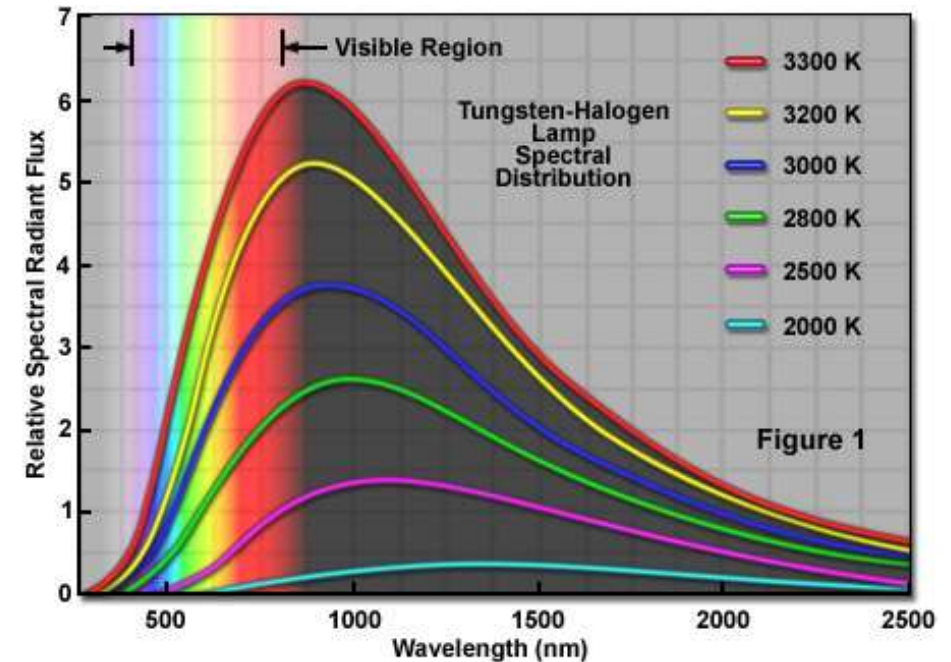
Tab: IR-Aktivität unterschiedlicher Stoffe und Materialien

IR-Aktiv	IR-inaktiv
H ₂ O	O=O
Graphit	Diamant
Metall	Hochreines Si
	ZnSe (weitg.)
PE, PP, PTFE	
Glas (MIR)	Glas (NIR)

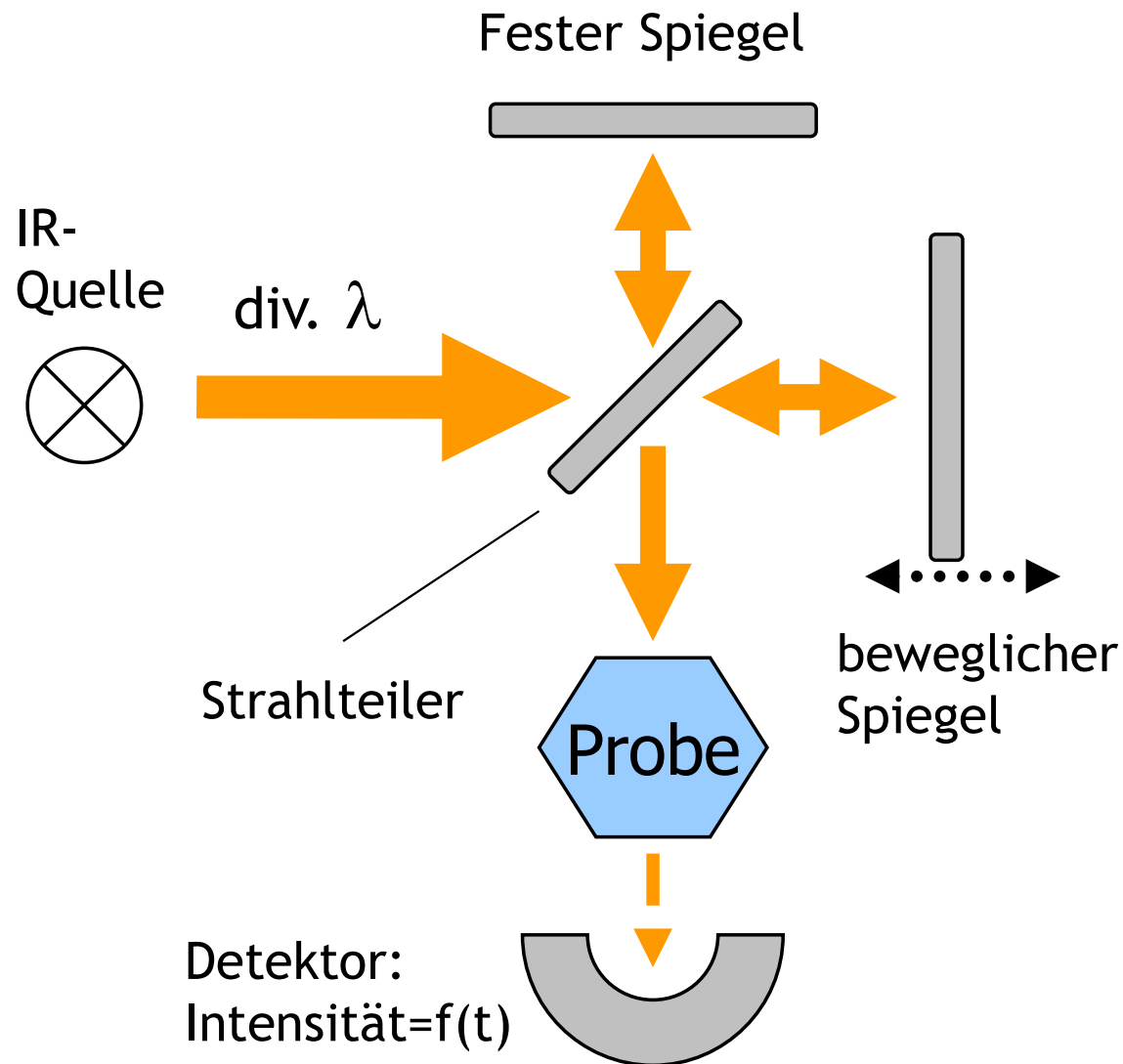
„Farbtemperatur“, Schwarzer Körper (Planck 1920er)

Abstrahlung näherungsweise nur von T abhängig

- Körper gleicher Temperatur leuchten ähnlich (zB glühende Kohle mit Metallstab)
- Maximum wird immer hochenergetischer → Arbeitstemperatur > 3500 K war wünschenswert für UV-Vis; hier reichen etwa 1500-2500 K
- ...



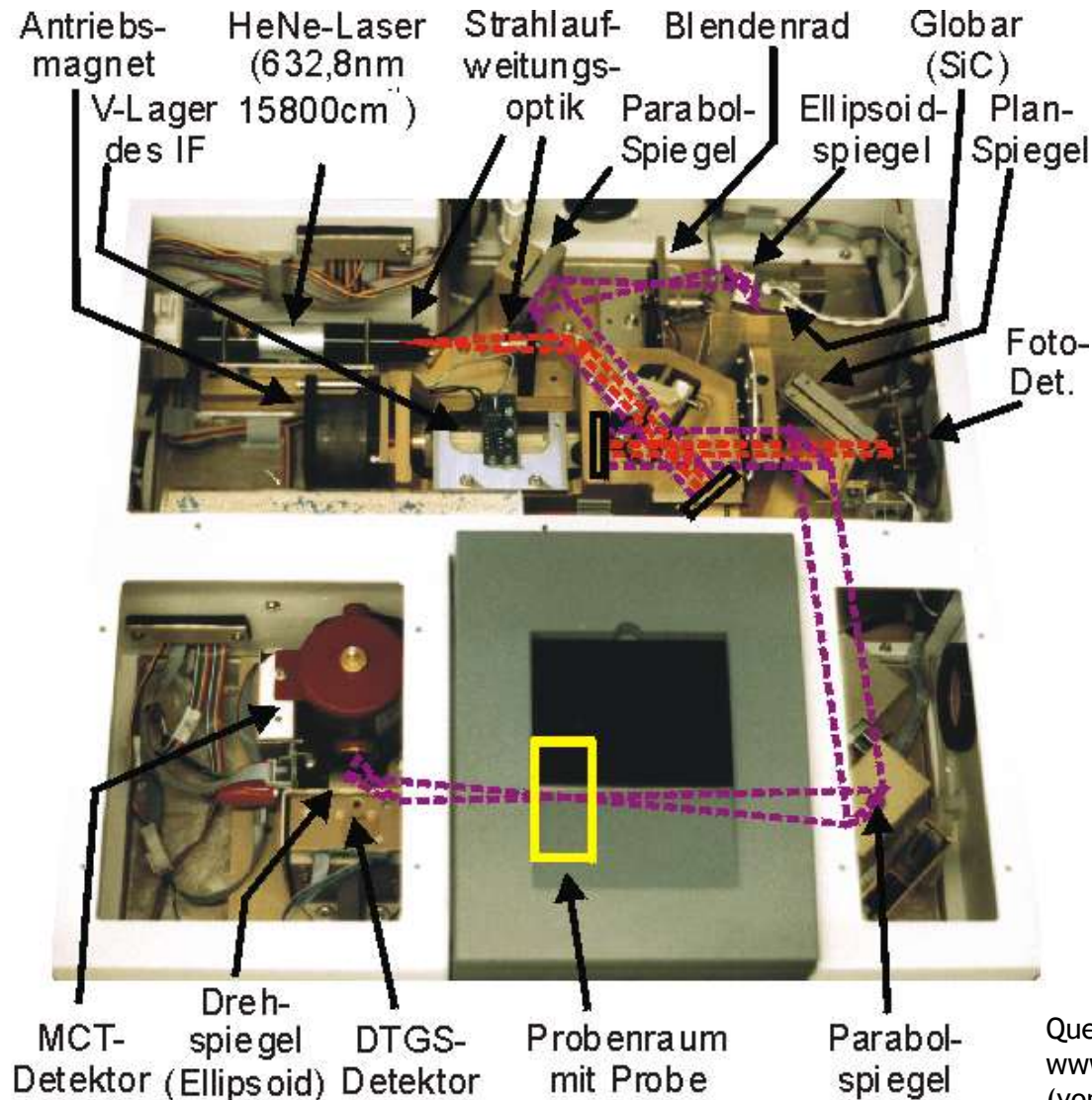
Messaufbau bei der FT-IR (Michelson-Interferometer, ca. 1970) „Inverser Oligo-Chromator“



Vorteile

- geringerer Zeitbedarf (Faktor etwa 15)
- kostengünstigerer Betrieb), Multiplex-Technik, d.h. mehrere Wellenlängen gleichzeitig
- höhere Strahlungsintensitäten, keine Spalte notwendig, sondern runde Blenden \Rightarrow höheres Signal-zu-Rausch-Verhältnis
- Wellenlängenrichtigkeit, parallele Kalibrierung mit HeNe-Laser
- Nur etwas höhere Anschaffungskosten

Beispiel eines FT-IR-Spektrometers



More information:
<https://www.youtube.com/watch?v=DDTIJgIh86E>

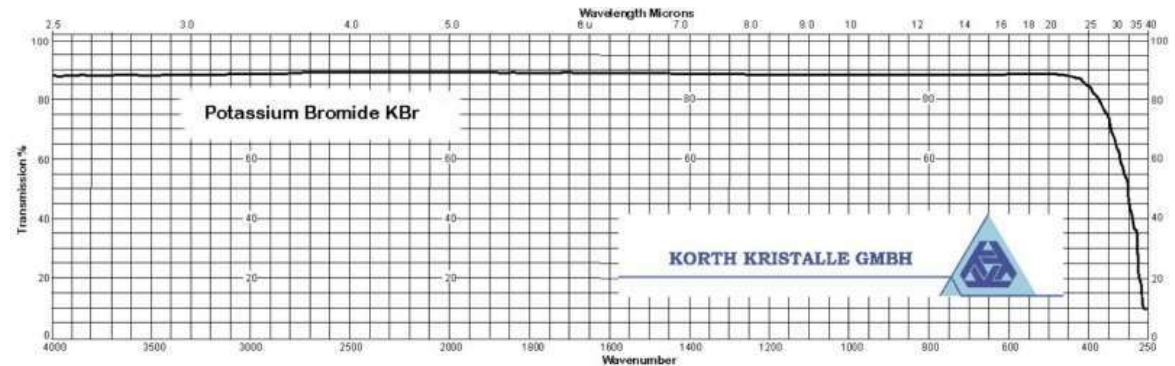
Erläuterungen (weitere s. Quelle)

- IF: Interferometer
- HeNe: Helium/Neon
- SiC: Siliciumcarbid
- DTGS-Detektor: pyroelektrischer Detektor mit deuteriertem Triglycinsulfat (DTGS)
- MCT: Halbleiter-Verbindung aus Quecksilber (Mercury), Cadmium und Tellur

Quelle:
www.ir-spektroskopie.de
 (von Hersteller: BioRad)

IR-Durchlässigkeit

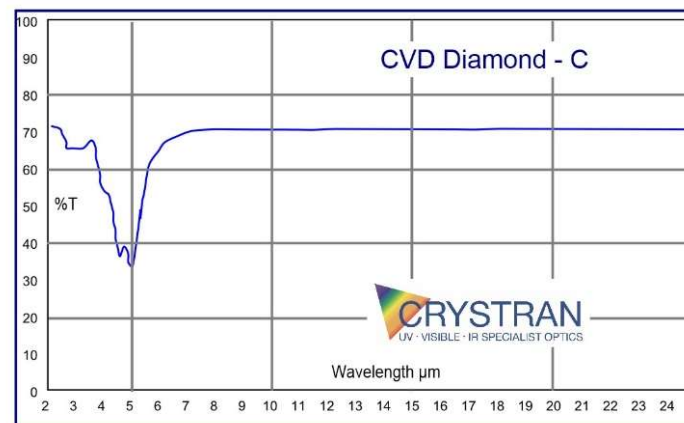
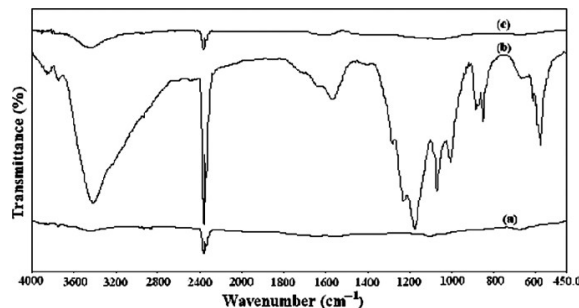
- Strahlengang muss IR-durchlässig sein, d.h.
 - kein Glas
 - Optiken aus Salzen, insb. KBr (ohne Feuchtigkeit)
- Probenraum
 - Einbettung in KBr-Presslinge
 - Küvetten/Träger aus CaF_2 , NaCl oder ZnSe, auch Diamant
 - Si-Wafer als moderne Träger
- Moderner: „Attenuated total reflexion“ (ATR)
 abgeschwächte Totalreflexion
 Probe wird auf geschliffenes, hochbrechendes optisches Fenster (z.B. aus Diamant) aufgesetzt/gedrückt, wobei reflektierte IR-Strahlung teilweise in Probe eindringt
 ⇒ sehr einfache Probenvorbereitung



www.crystran.co.uk



www.azom.com



Diamantspektrum, Quelle: www.crystran.co.uk

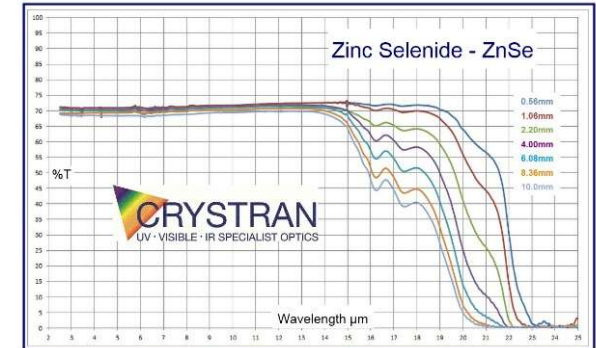
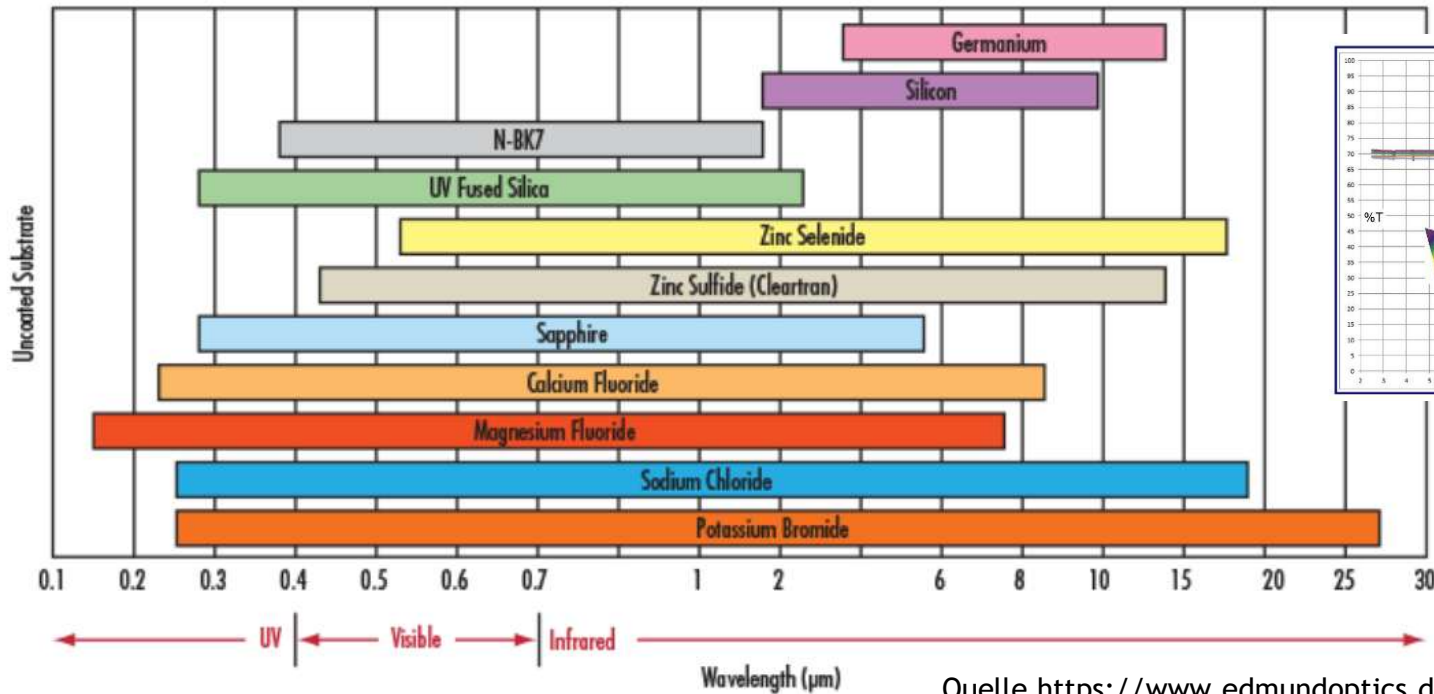
Vergleich zu Diamant: a) Graphit; b) Graphitoxid; c) Graphen

Quelle: Bindumadhavan et al. DOI: [10.1166/jnn.2013.7461](https://doi.org/10.1166/jnn.2013.7461)

via https://www.researchgate.net/figure/FTIR-spectra-of-a-graphite-b-graphite-oxide-and-c-graphene_fig1_249996062

Thema: Infrarot-Spektroskopie

Durchlässigkeit von Optiken



Quelle: www.crystran.co.uk

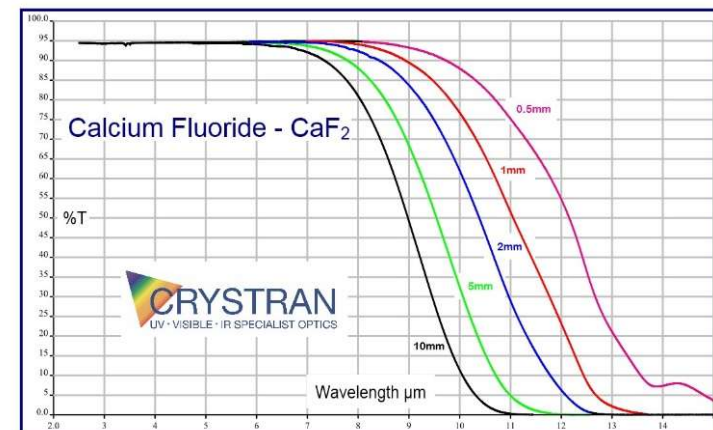
Quelle <https://www.edmundoptics.de/knowledge-center/application-notes/optics/the-correct-material-for-infrared-applications>

● Übliche Materialien

- Ge und Si (Halbmetalle)
- ZnSe, ZnS (halbleitende Salze)
- CaF_2 , CaF_2 , NaCl, KBr (Salze)
- kein Wasser im Spektrometer

● Kriterien

- Durchlässigkeit (Abs.-Koeff.), Brechungsindex
- Härte, chem. Stabilität, Sprödigkeit



Quelle: www.crystran.co.uk

Patentiertes Interferometer (Praktikums-Gerät von Bruker Optik)



(10) DE 10 2011 086 226 B3 2013.01.17

Quelle:
<https://worldwide.espacenet.com>

(12) Patentschrift

(21) Aktenzeichen: 10 2011 086 226.9
(22) Anmeldetag: 11.11.2011
(43) Offenlegungstag: –
(45) Veröffentlichungstag der Patenterteilung: 17.01.2013

(51) Int. Cl.: **G01J 3/45** (2011.01)
G01B 11/24 (2011.01)
G01B 9/02 (2011.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
Bruker Optik GmbH, 76275, Ettlingen, DE

(72) Erfinder:
Harig, Roland, 76337, Waldbronn, DE; Gerhard, Jörn-Hinrich, 76337, Waldbronn, DE

(74) Vertreter:
Kohler Schmid Möbus Patentanwälte, 70565, Stuttgart, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
DE 101 44 214 C1

(54) Bezeichnung: **Aufnahme eines spektral aufgelösten Bildes durch Auslesen von verschiedenen Teil-Arrays in mehreren Interferometer-Durchläufen**

Erläuterungen (weitere s. Quelle)

- Neu: zweidimensionaler Detektorarray (ähnlich Katzenauge)
- Mehrere Durchläufe mit unterschiedlichen optischen Gangunterschieden werden aufgenommen und fouriertransformiert
- Soll noch stabiler sein
 - weniger Einfluss von Vibrationen
 - weniger Einfluss von Probenbewegung
- Sehr kompakte Bauweise im Bruker alpha

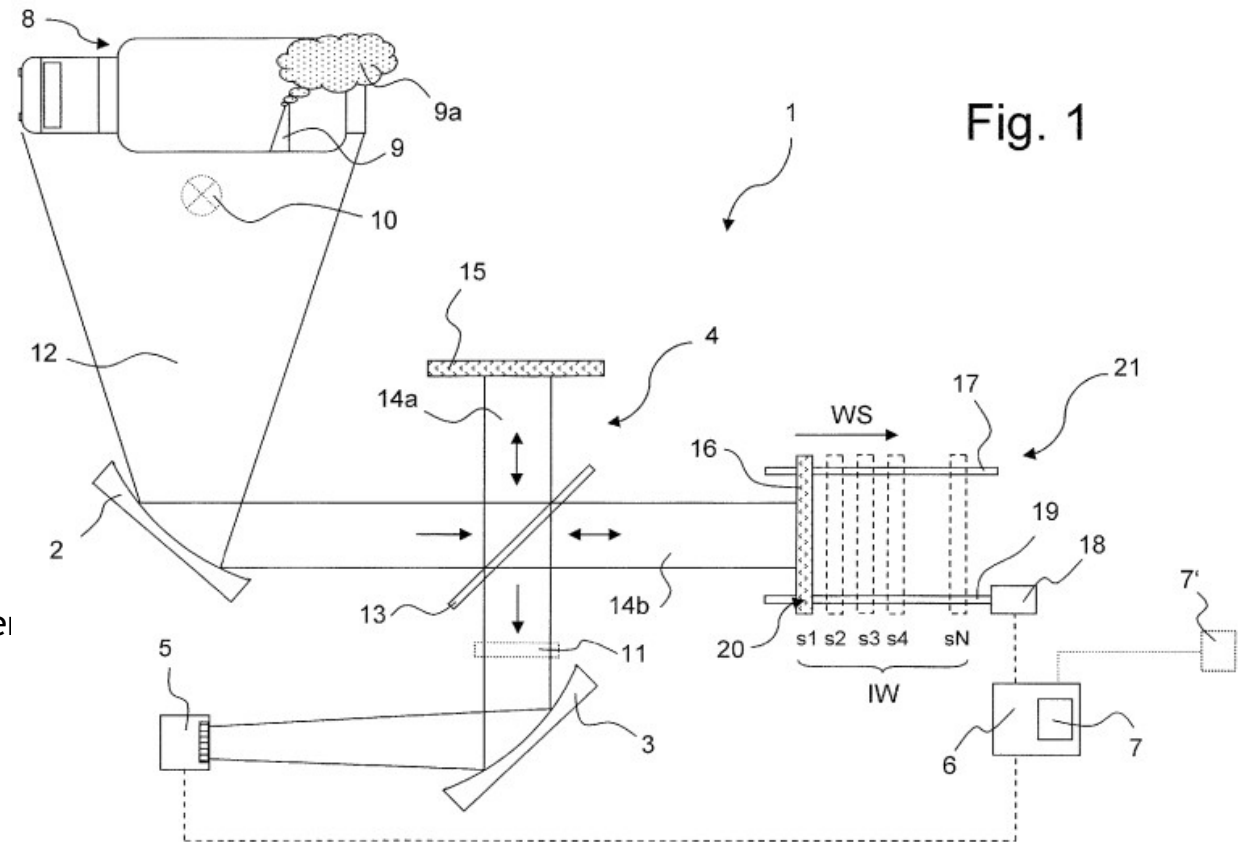
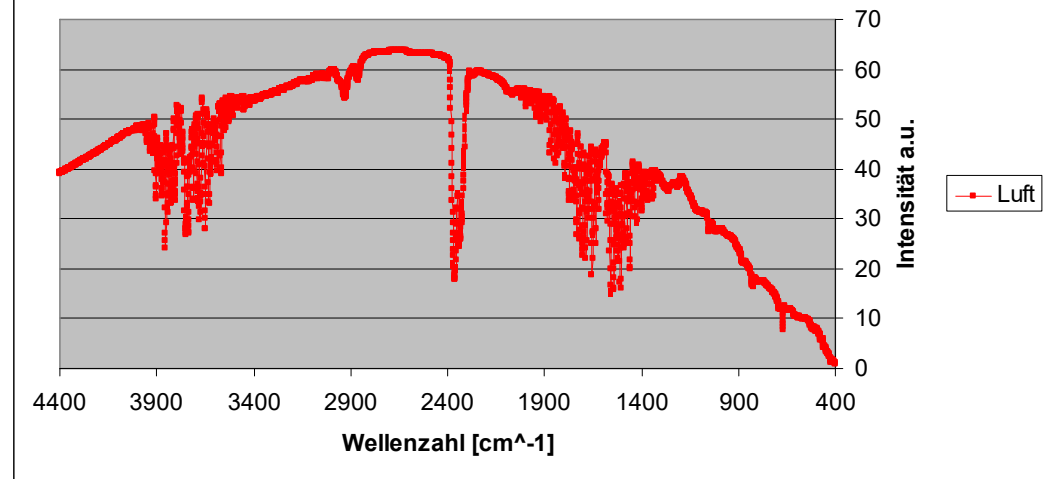


Fig. 1

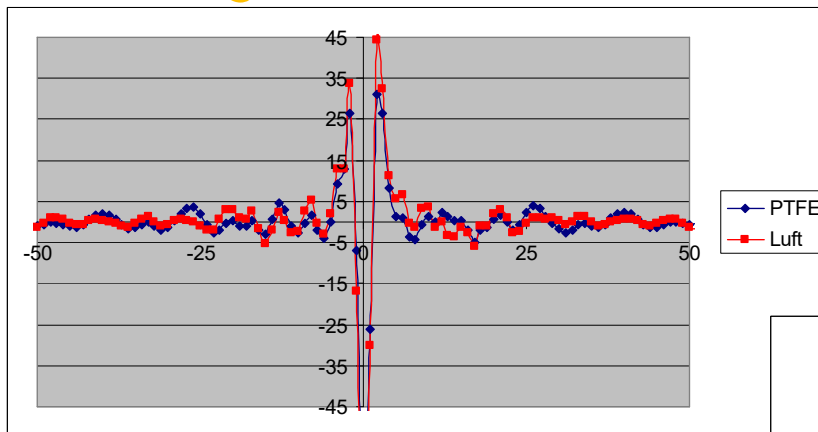
Interferogramme und zugehörige Spektren nach FT (Älteres Praktikumsgerät, Perkin-Elmer)

Hintergrund-Spektrum

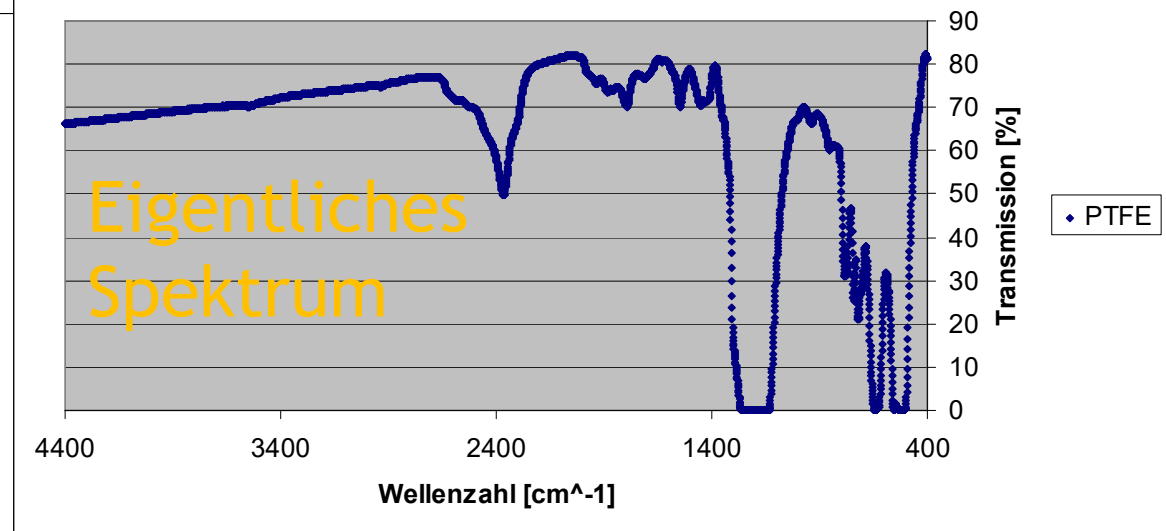
Spektrum von Luft



Interferogramme



Spektrum PTFE "Teflon"



Spektreninformation

- NIR-Spektren sind günstiger, haben weniger und schwächere Absorptionen, die zudem stark überlappen.
- Im MIR-Bereich mehr Informationen zu Molekülen
- Spektrensammlungen sind separiert in NIR oder MIR

MIR-Bereiche

NIR
nur Ober-
schwingungen
($\Delta v > 1$)

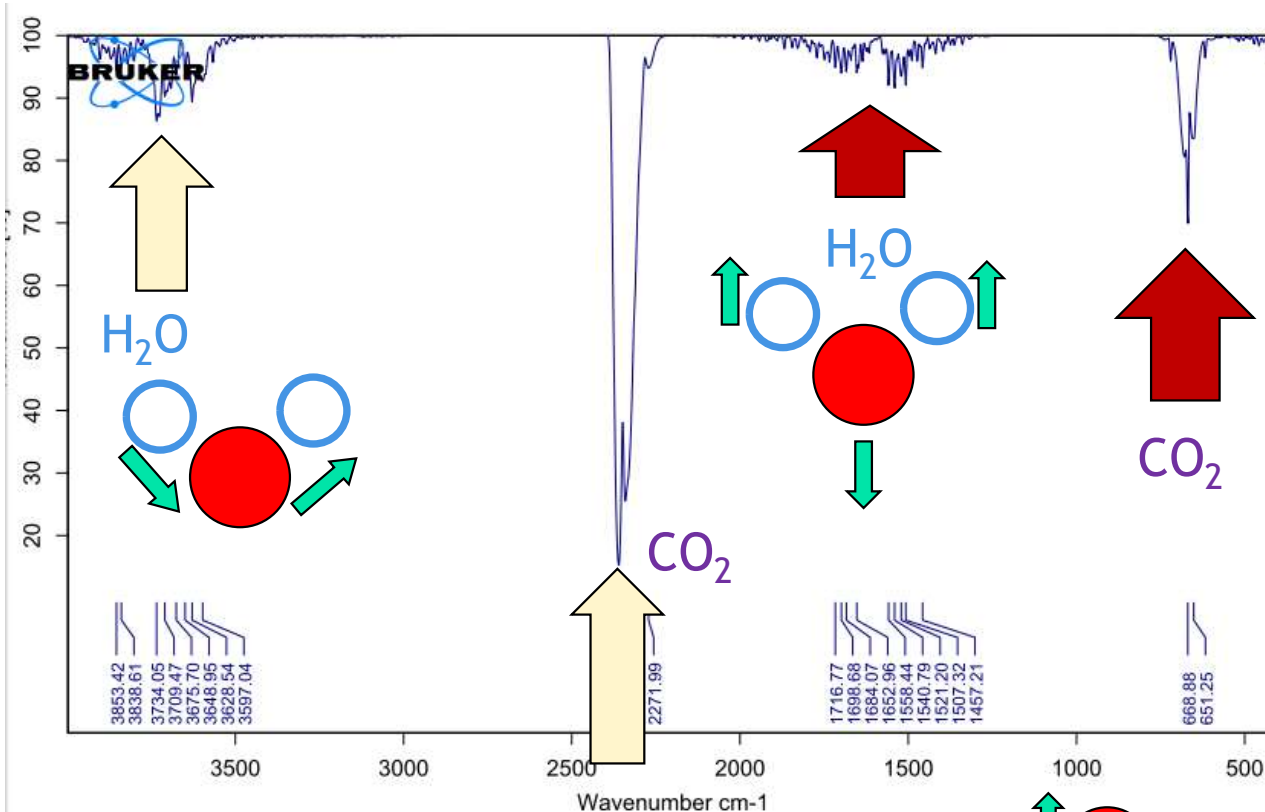
4000 cm^{-1}	2500 cm^{-1}	2000 cm^{-1}	1500 cm^{-1} 400 cm^{-1}
Y-H Streckschwingungen	Streckschwingungen von Dreifachbindungen und kumulierten Doppelbindungen	Streckschwingungen von Doppelbindungen	'Fingerprint'
O-H N-H C-H =C-H ≡C-H	C≡C C=N N=C=O	C=O C=N C=C	ganz ähnliche Moleküle geben unterschiedliche Absorptionsmuster in diesem Bereich, da kleine sterische und elektronische Änderungen die Beuge- und Gerüstschwingungen stark beeinflussen

FIR
Kombinations-
schwingungen
und
Rotationen

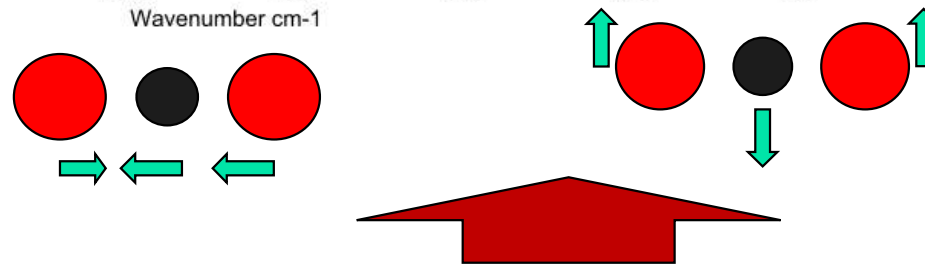
Aus Bruker: Gremlich 2002

MIR-Absorptionsbeispiele im Bruker-Tutorial

IR-Spektrum von Atemluft (eigene Messung, Sauerstoff und Stickstoff: IR-inaktiv)

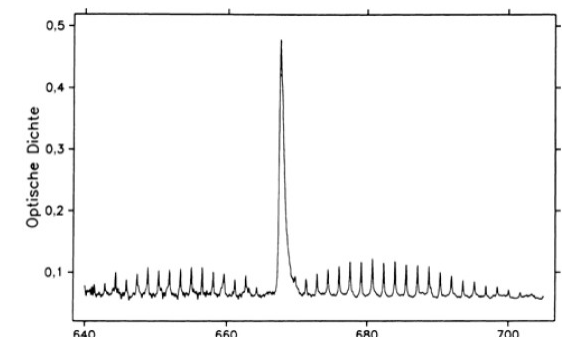


- Moleküle nehmen IR-Strahlung auf, unter Schwingungen mit Änderung Dipolmoment
- O₂ und N₂ sind mittels IR-Spektrometrie nicht messbar (nicht IR-aktiv)
- Wasser und meiste andere Moleküle sind IR-aktiv.
- CO₂ ist mittels IR-Spektrometrie messbar.

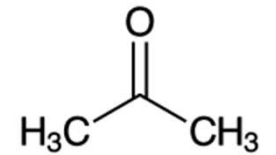
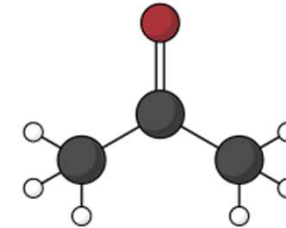
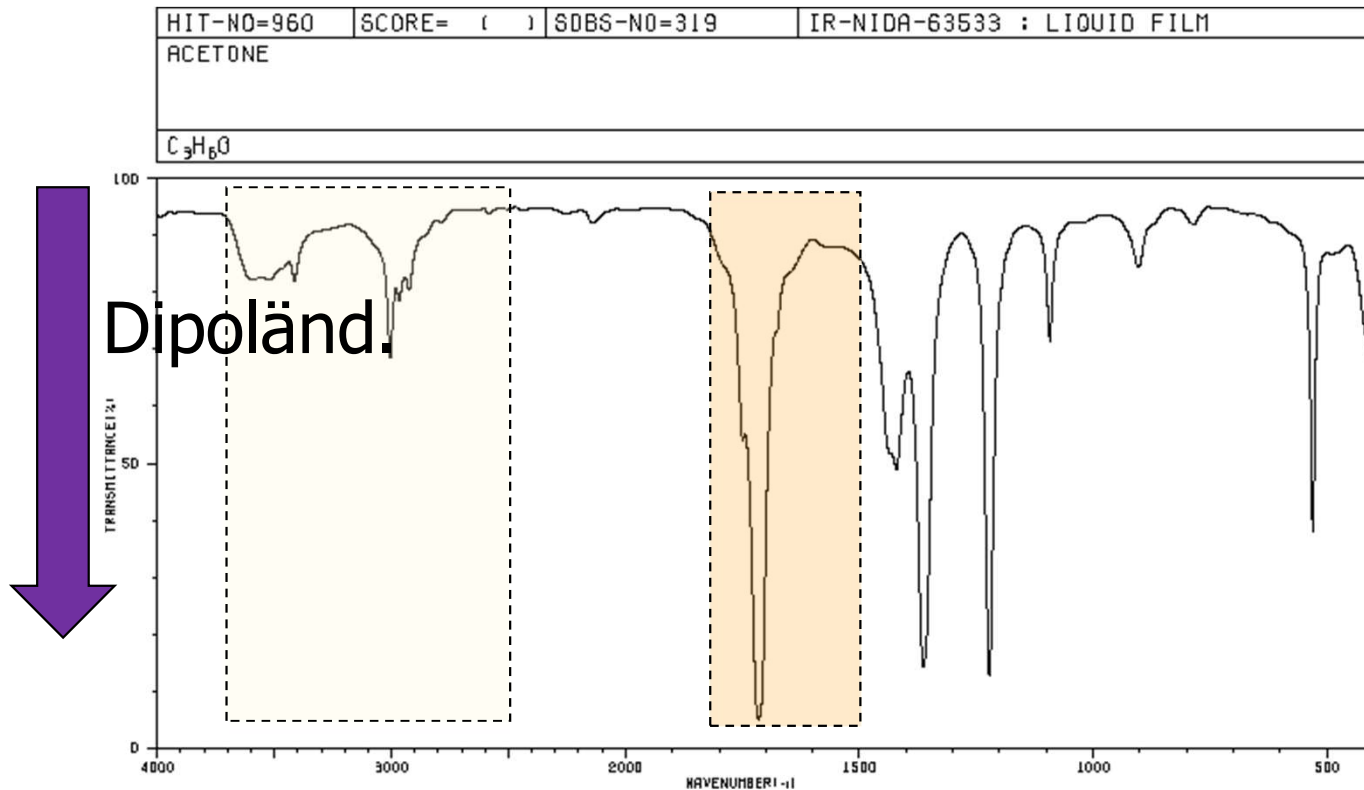


6 bis 7 μm (H₂O) bzw. 15 μm (CO₂),
nahe Erdmaximum (10 μm)
⇒ Absorption

Rotations-/Schwingungsüberlagerung
zur Deformationsschwingung von CO₂
Quelle: Haken/Wolf, Springer 2006
„Molekülphysik u. Quantenchemie“



Typische Absorptionsbereiche im MIR am Beispiel von Aceton (überarb. 2023)



Aceton

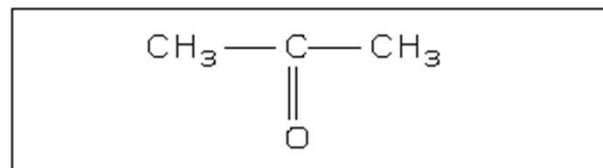
© www.pharmawiki.ch

Keton mit zwei Methylgruppen.

Beispiel für einige typische Schwingungssignale.
 Noch relativ einfach, weil symmetrisches Molekül.

Wie sind die physikalischen Hintergrundinformationen der beiden Achsen (Transmission bzw. Wellenzahl) mit den Verhältnissen im Molekül in Einklang zu bringen?

3414	79	1421	47
3005	66	1363	13
2966	74	1223	12
2926	77	1093	68
1749	52	903	81
1715	4	531	36
1434	49		



Quelle: SDBS-Datenbank (AIST)
<https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/>



Absorptionsbanden im MIR

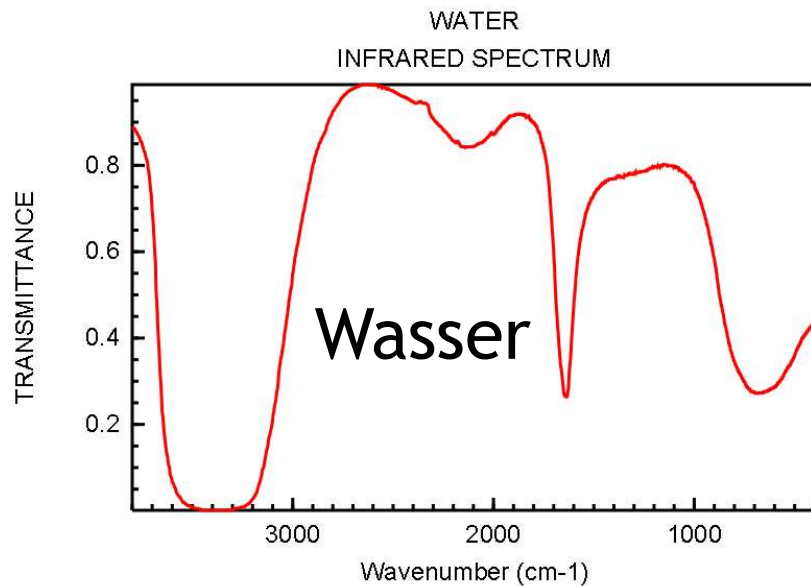
Funktionelle Gruppe	Wellenzahl cm^{-1}	Intensität	Valenz
Alkane, Alkylgruppen	2850-2960	stark	} C-H
Alkene	3020-3100	mittel	
	1650-1670	mittel	C=C
Alkine	3300	stark	$\text{C}\equiv\text{C}$
	2100-2260	mittel	$\equiv\text{C}-\text{H}$
Alkylhalogene	600-800	stark	C-Cl
	500	stark	C-I
Alkohole	3200-3600	stark, breit	O-H
	1050-1150	stark	C-O
Aromaten	3030	mittel	C-H
	1600,1500	stark	$\text{C}=\text{C}$
	680 - 850	stark	Nachbar-H
Amine	3310-3500	mittel	N-H
	1030,1230	mittel	C-N
Carbonyl-Verbindungen	1670-1800	stark	C=O
Carbonsäuren	2500-3100	stark, sehr breit	O-H
Nitril	2210-2260	mittel	$\text{C}\equiv\text{N}$
Nitrogruppen	1560,1350	stark	$-\text{NO}_2$

Tabelle 10.3. Wellenzahlen einiger typischer Gruppen-Schwingungen

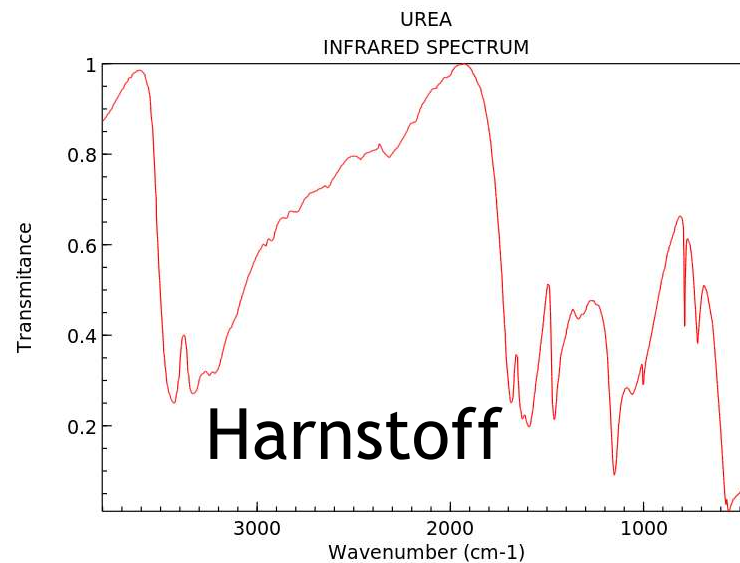
C-H Valenz	2850–3000 cm^{-1}
C-H Deformation	1350–1460 cm^{-1}
C-C Valenz	700–1250 cm^{-1}
C=C Valenz	1600–1700 cm^{-1}

In Biochemie fast immer auftretende Signale
Quelle: Haken/Wolf, Springer 2006
„Molekülphysik u. Quantenchemie“

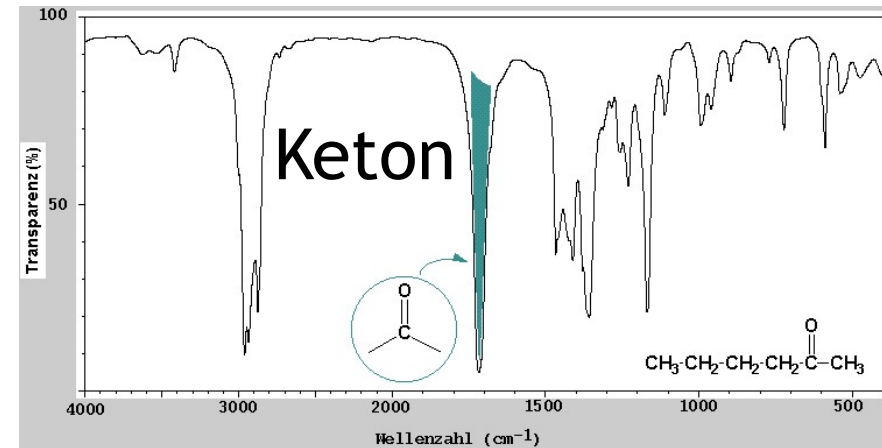
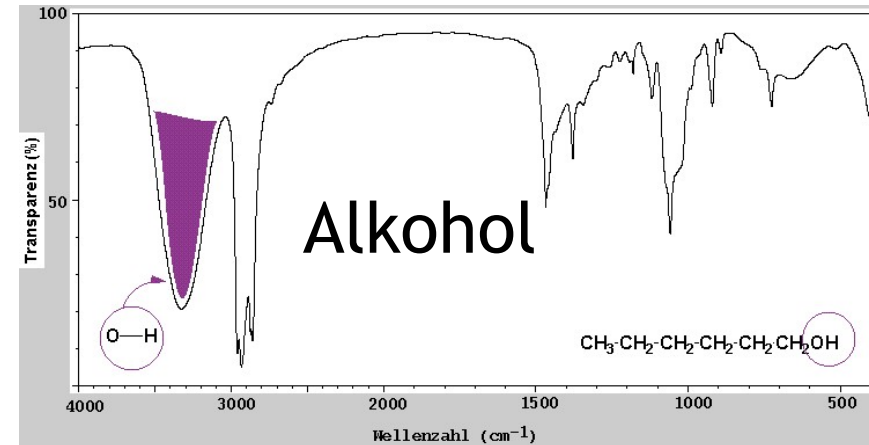
Weitere einfache Beispiel-Spektren



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

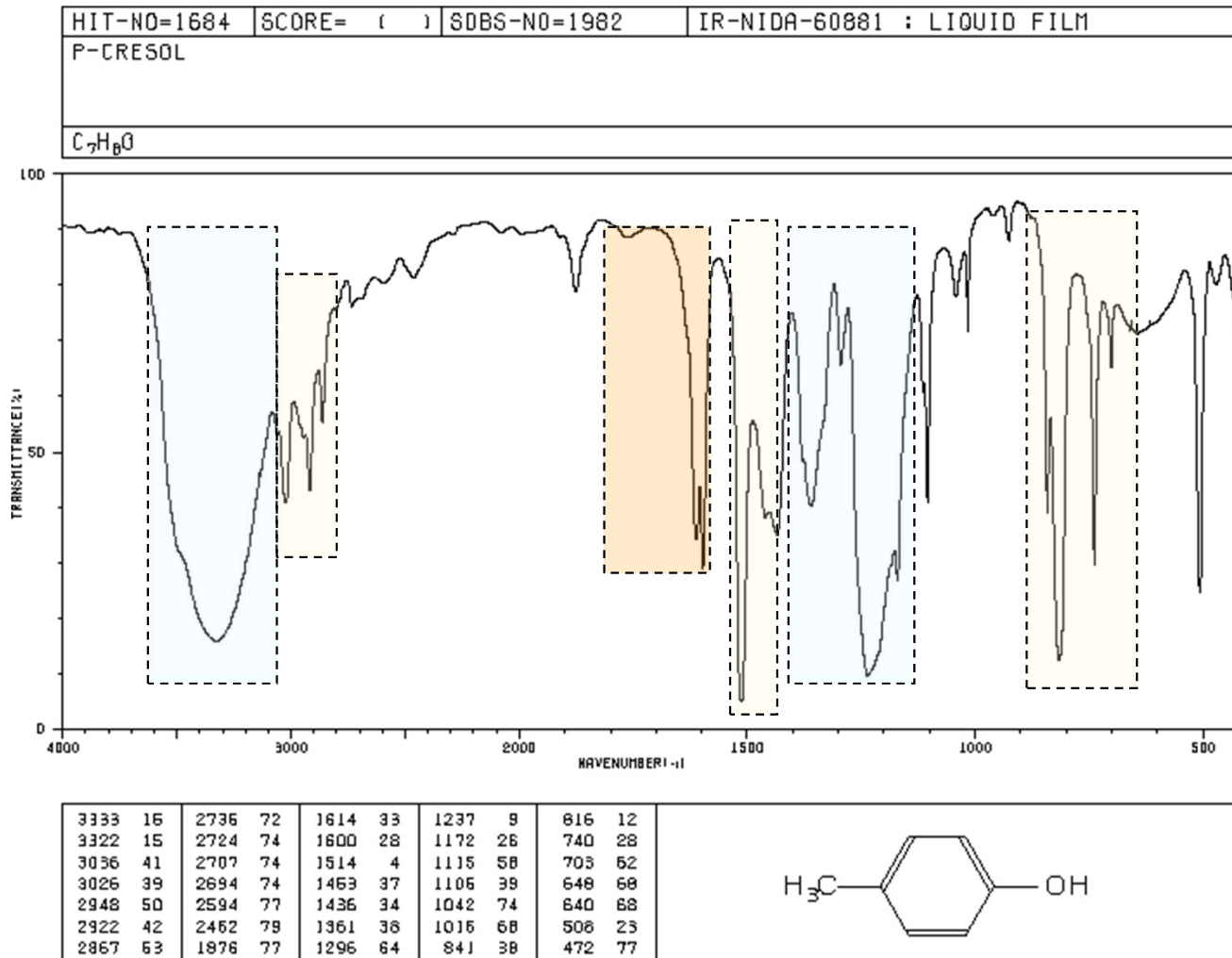


NIST Chemistry WebBook (<https://webbook.nist.gov/chemistry>)



Beispielspektren für C-H-O-Verbindungen
Quelle: www.chem.uzh.ch/robinson/lectures (Mai 2021),
dort interaktiv animiert

Typische Absorptionsbereiche im MIR am Beispiel von p-Cresol (neu 2023)



Aromat mit Hydroxy- und Methylgruppe.

Ordnen Sie die Signalbereiche zu.

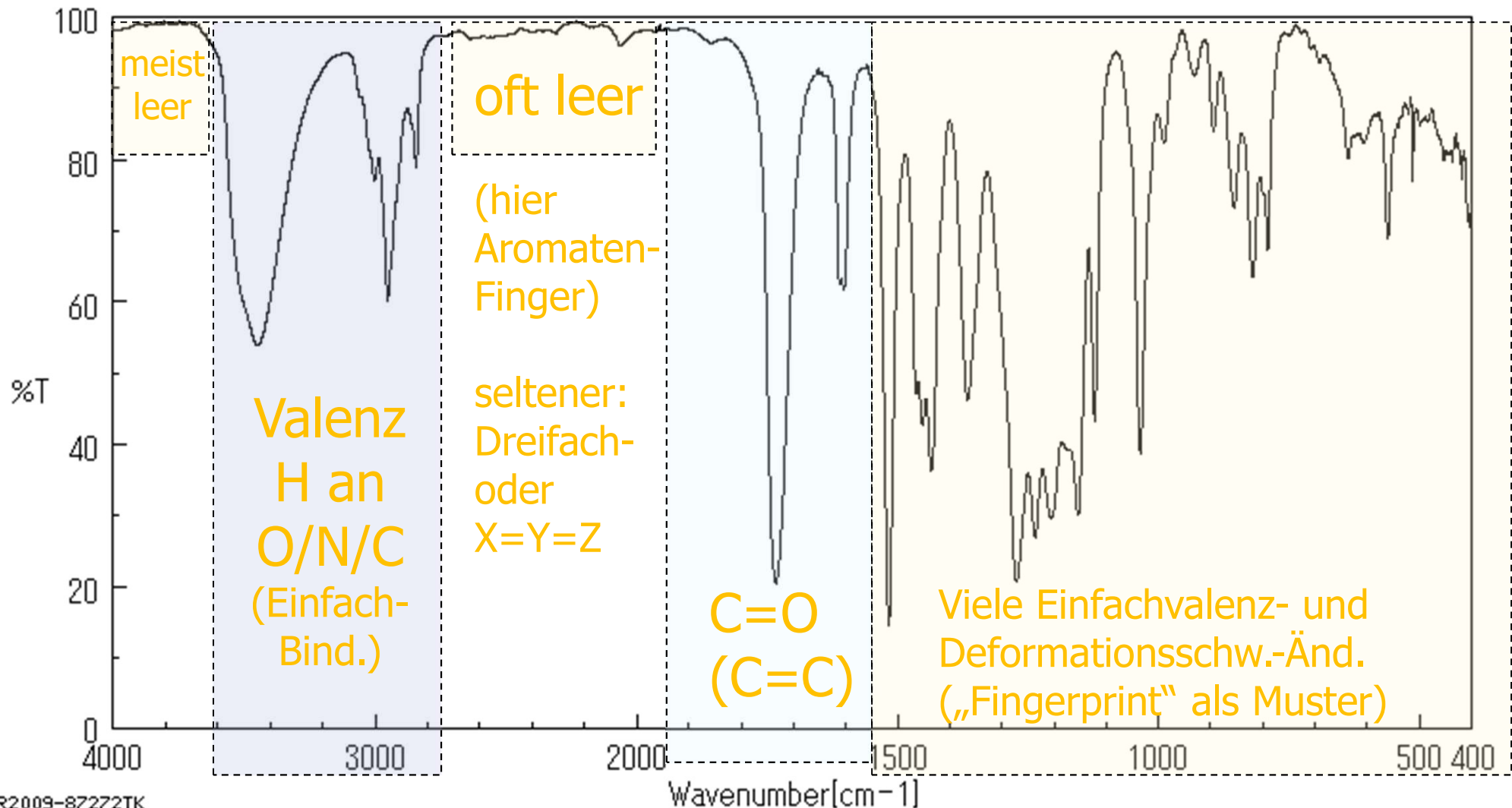
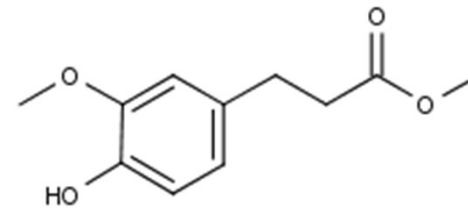
Welche Signale haben intensive oder weniger intensive Transmission (und warum)

Welche Signale brauchen eher mehr oder weniger Energie zur Anregung (und warum)?

Quelle: SDBS-Datenbank (AIST)
<https://sdb.db.aist.go.jp/sdb/>

Charakteristische Absorptionsbereiche im MIR (neu 2023)

Quelle: SDBS-Datenbank (AIST)
<https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/>



IR2009-87272TK

Vergleich zweier Alkohole

Lebensmittelbestandteil oder Gift?

Ethanol

Ethanal

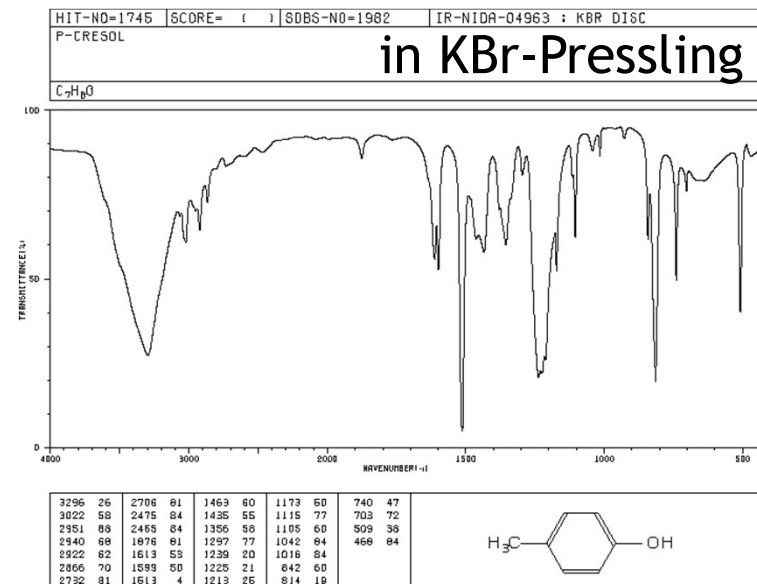
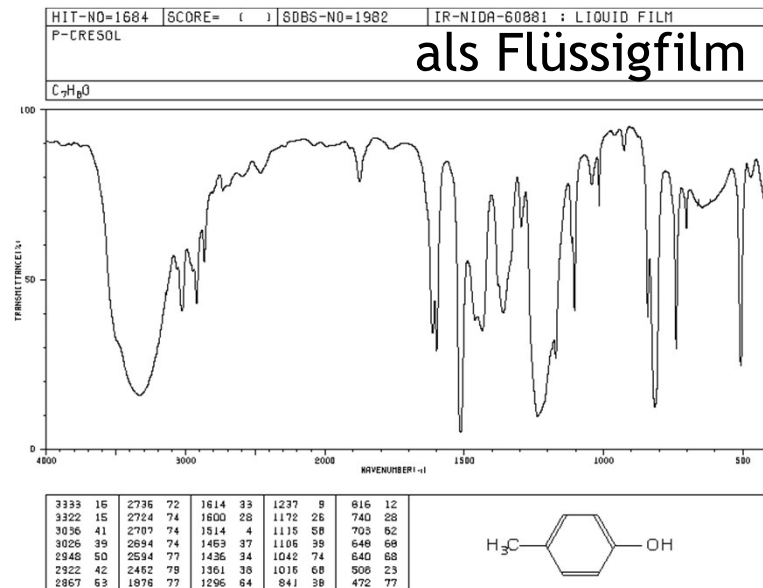
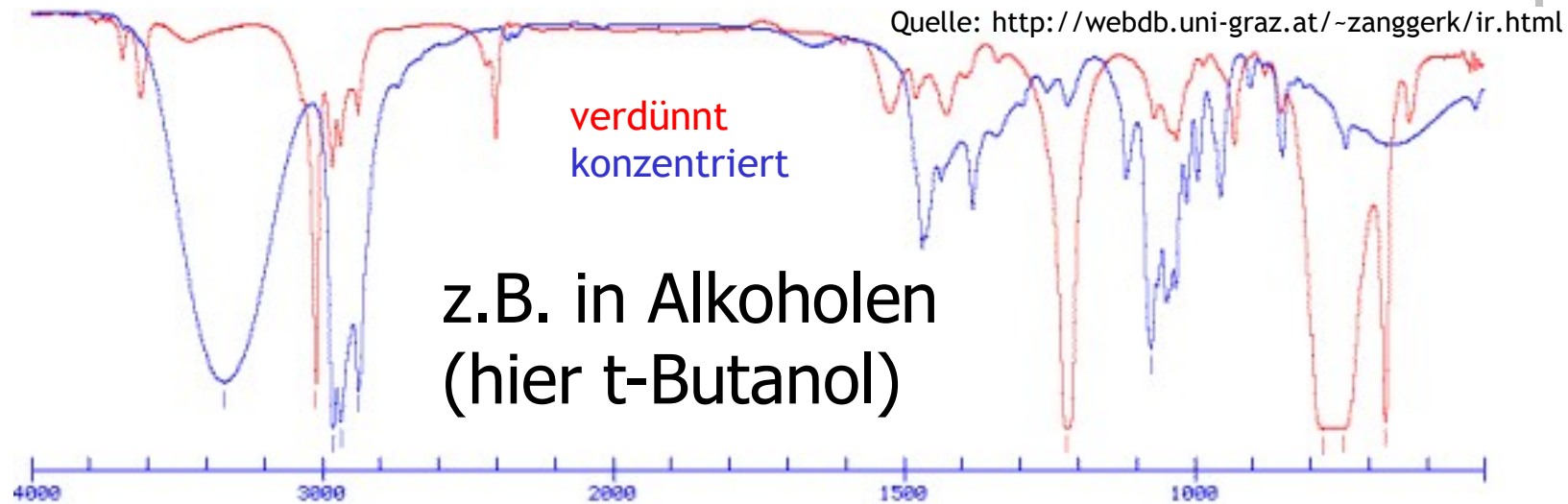
Spektren aus Datenbank selbst ergänzen und vergleichen

Quelle: SDBS-Datenbank (AIST), <https://sdb.db.aist.go.jp/sdb/>

Methanol

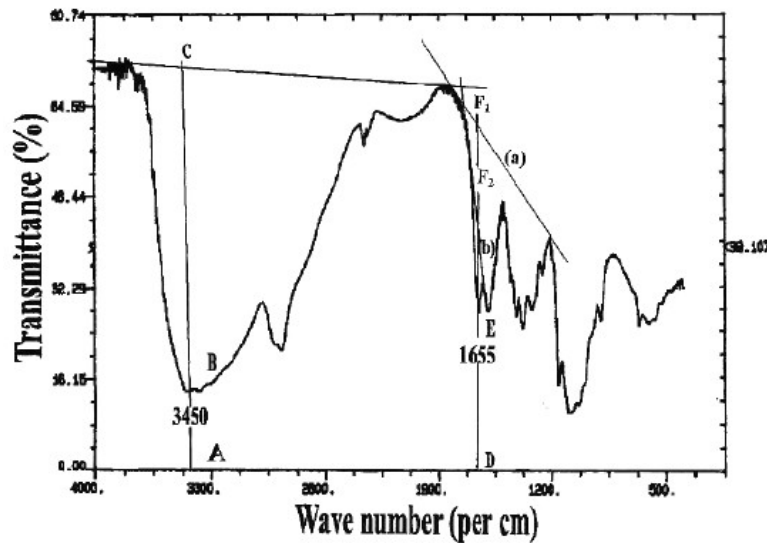
Methanal

Einfluss von H-Brückenbildung ist konzentrations- und matrixabhängig

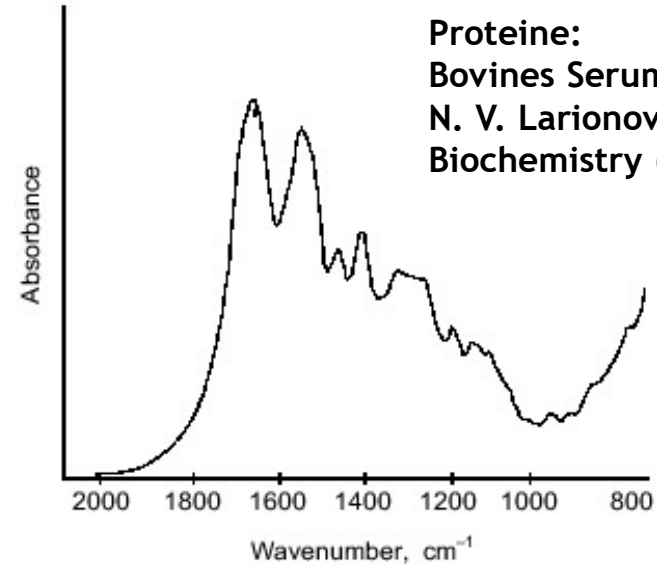


Quelle: SDBS-Datenbank (AIST), <https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/>

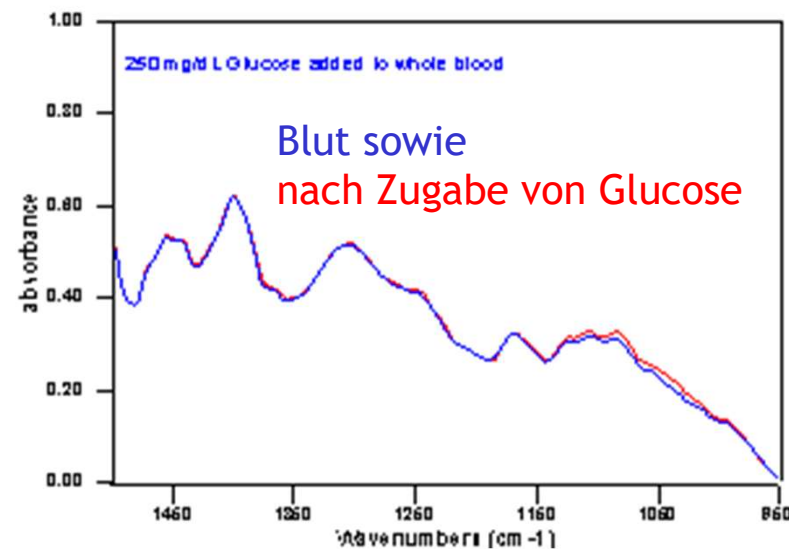
IR-Spektren von biologischen Proben (Beispiele)



Polysaccharide:
Chitosan (natural comprising copolymers
of glucosamine and N-acetylglucosamine)
T.A. Khan,
J Pharm Pharmaceut Sci 5 (2002) 205-212



Proteine:
Bovines Serum-Albumin (BSA)
N. V. Larionova et al.,
Biochemistry (Moscow) 64(1999)1022



Selbst in komplexen
Matrices sind
Änderungen messbar

Source
<http://www.risoe.dk/ofd/competence/FTIR.htm>

IR-Spektren von Biopharmazeutischen Wirkstoffen (inkl. Ableitungen)

Instrumentelle Bioanalytik (Spek.)

Biotechnologie 6. Sem.



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/saa



Review Article

ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals

Hannah Tiernan^{a,b}, Bernadette Byrne^b, Sergei G. Kazarian^{a,*}

^a Department of Chemical Engineering, Imperial College London, UK

^b Department of Life Sciences, Imperial College London, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 May 2020

Received in revised form 15 June 2020

Accepted 19 June 2020

Available online 22 June 2020

Keywords:

FTIR spectroscopy

ATR

Proteins

Biopharmaceuticals

Bioprocessing

Aggregation

ABSTRACT

Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) spectroscopy is a label-free, non-destructive technique that can be applied to a vast range of biological applications, from imaging cancer tissues and live cells, to determining protein content and protein secondary structure composition. This review summarises the recent advances in applications of ATR-FTIR spectroscopy to biopharmaceuticals, the application of this technique to biosimilars, and the current uses of FTIR spectroscopy in biopharmaceutical production. We discuss the use of ATR-FTIR spectroscopic imaging to investigate biopharmaceuticals, and finally, give an outlook on the possible future developments and applications of ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging to this field. Throughout the review comparisons will be made between FTIR spectroscopy and alternative analytical techniques, and areas will be identified where FTIR spectroscopy could perhaps offer a better alternative in future studies. This review focuses on the most recent advances in the field of using ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging to characterise and evaluate biopharmaceuticals, both in industrial and academic research based environments.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Amid-Banden in Proteinen sind Indikatoren für Stress.

Direkter Vergleich oder nach Bildung der Ableitung.

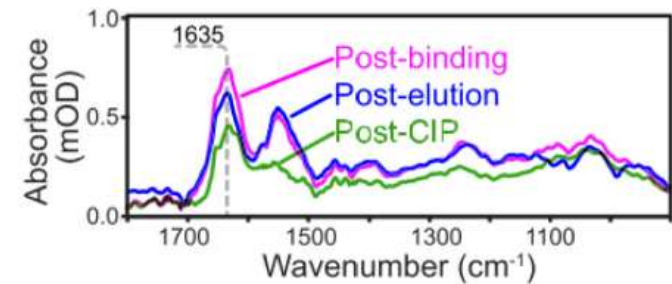


Fig. 6. Extract of a figure demonstrating the changes in Amide bands at various stages of the cleaning in place (CIP) cycle. This spectrum demonstrates the Amide I ($1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$), Amide II $1510\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$ and Amide III ($1300\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$) bands, commonly used to monitor protein structure and PTMs [3].

(Reprinted with permission from Boulet-Audet, M.; Kazarian, S. G.; Byrne, B., In-column ATR-FTIR spectroscopy to monitor affinity chromatography purification of monoclonal antibodies. *Sci Rep* 2016, 6, 30526).

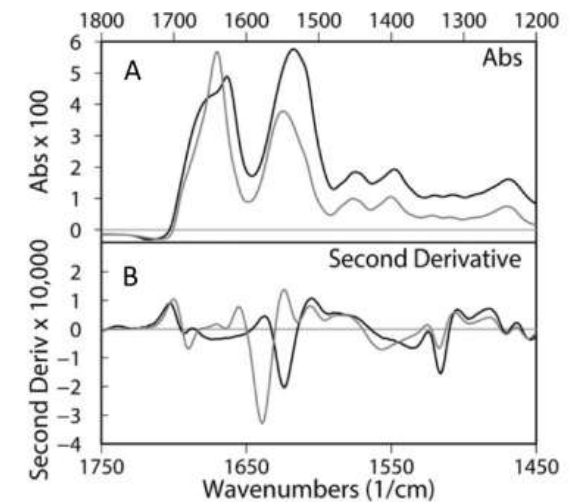
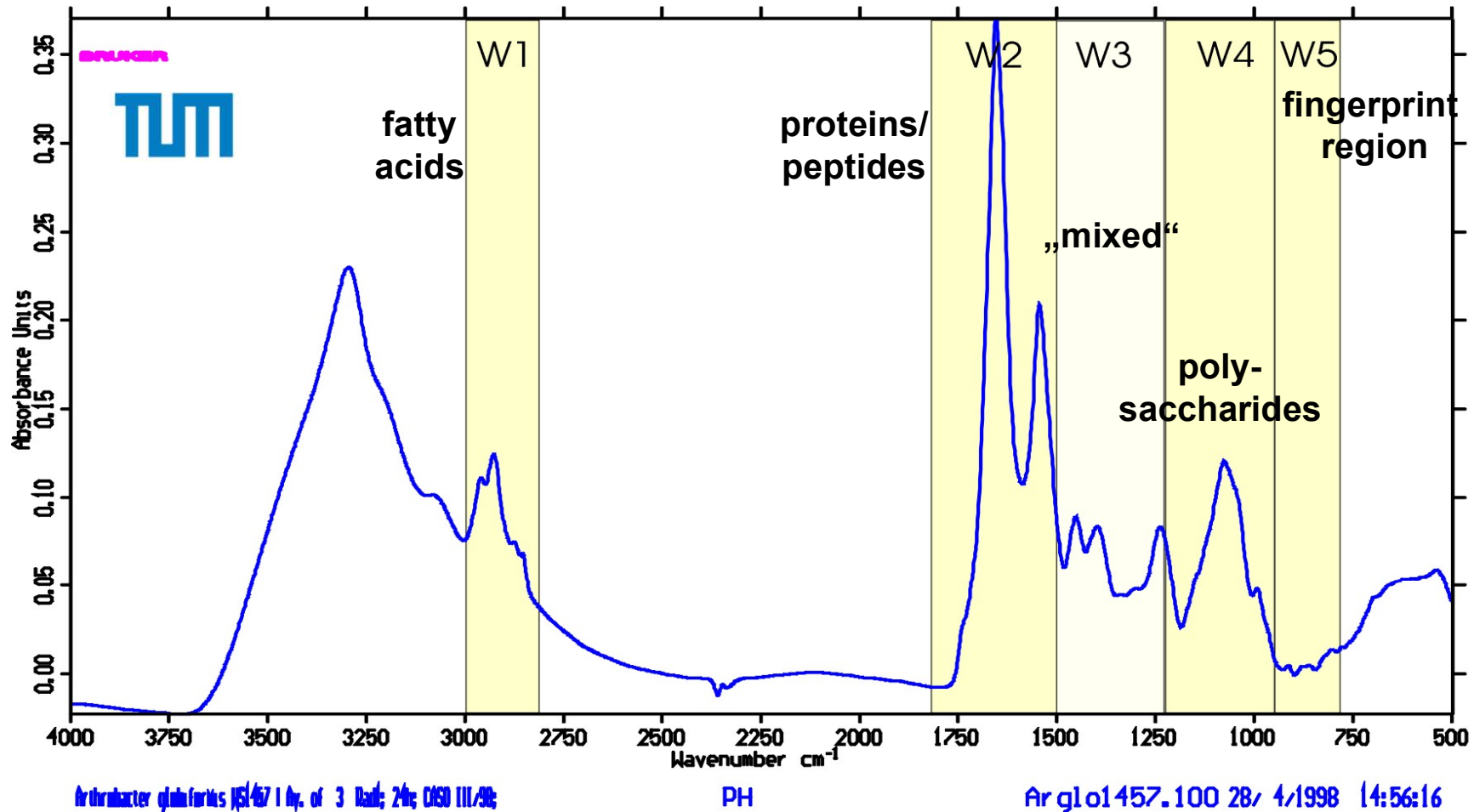


Fig. 8. (A) Absorbance of Amide I and II band of stressed mAb after heating to 90 degrees compared with an unheated control at room temperature (B) Respective second derivative spectra for each spectrum [1].

(Reprinted with permission from Lin, J. C.; Glover, Z. K.; Sreedhara, A., Assessing the Utility of Circular Dichroism and FTIR Spectroscopy in Monoclonal-Antibody Comparability Studies. *J Pharm Sci* 2015, 104 (12), 4459–4466).

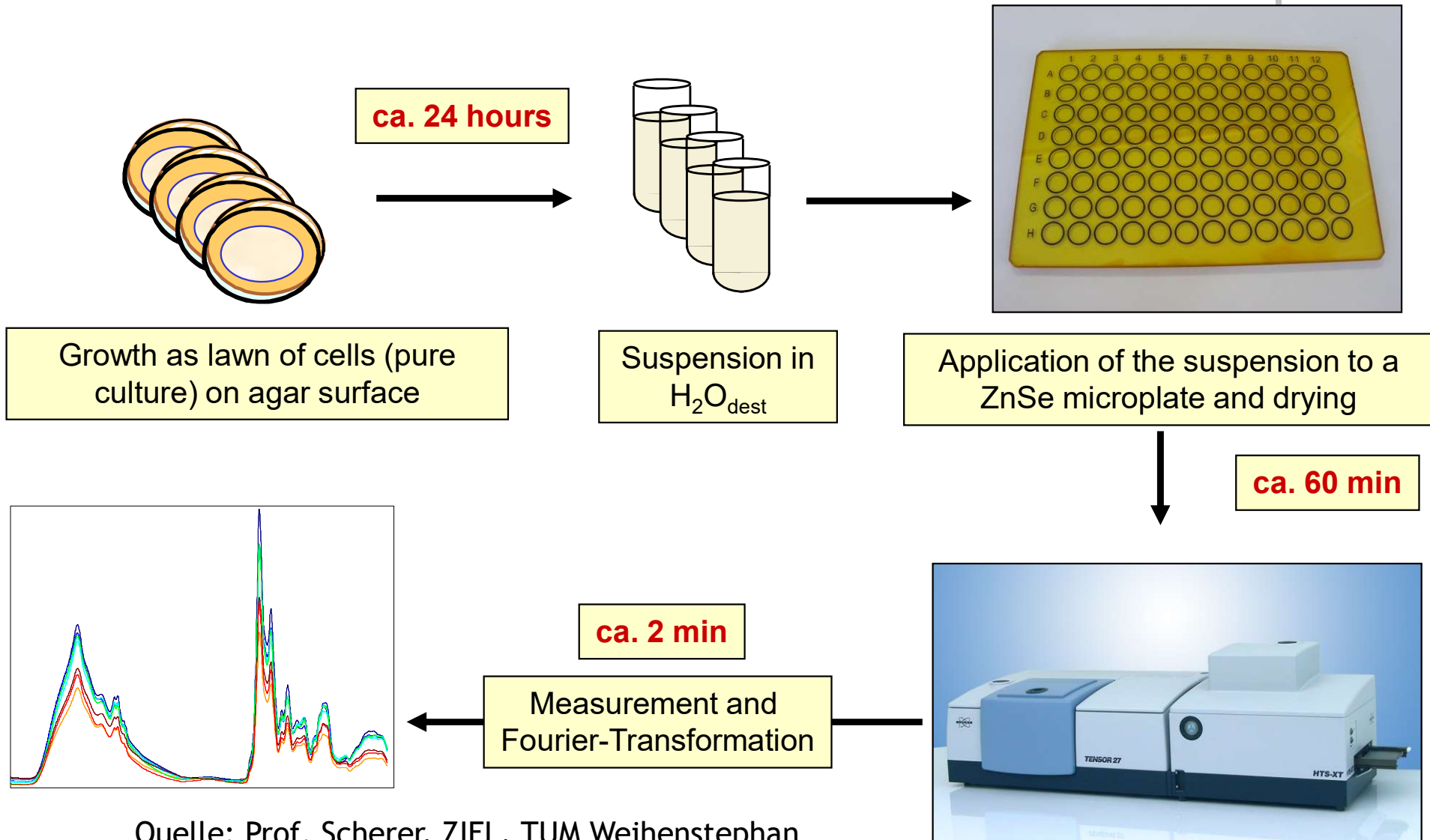
Identifikation von Mikroorganismen / Stämmen

FT-IR-Spektrum von Hefe



Quelle: Prof. Scherer, ZIEL, TUM Weihenstephan

Prinzip der Speziesidentifikation mittels FT-IR (durch Datenbankabgleich)



Quelle: Prof. Scherer, ZIEL, TUM Weihenstephan

Wichtig: vergleichbare Wachstumsmedien, Alternative: MALDI-MS, „Biotyper“

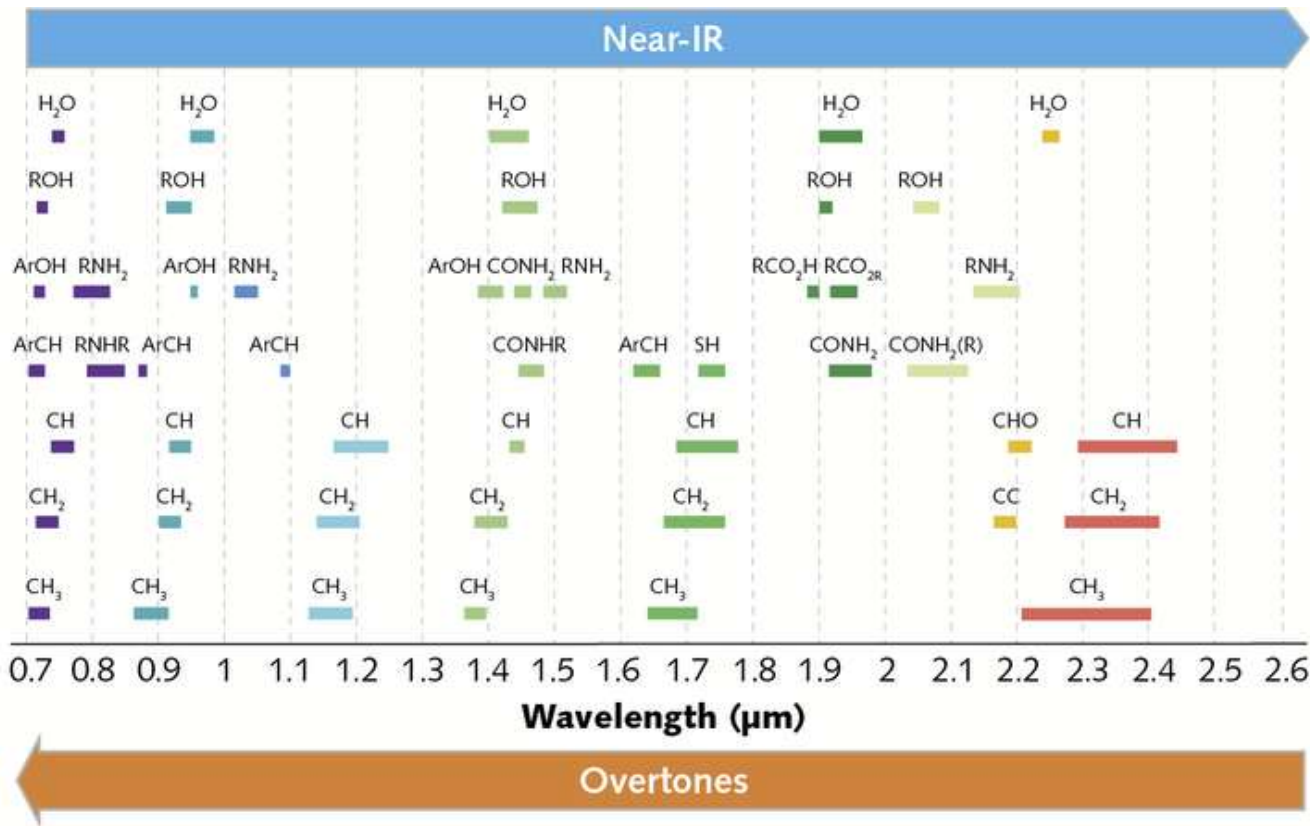
NIR-Spektren (Obertöne)

Bei höheren Konzentrationen können Mehrfachanregungen von Schwingungen gemessen werden.

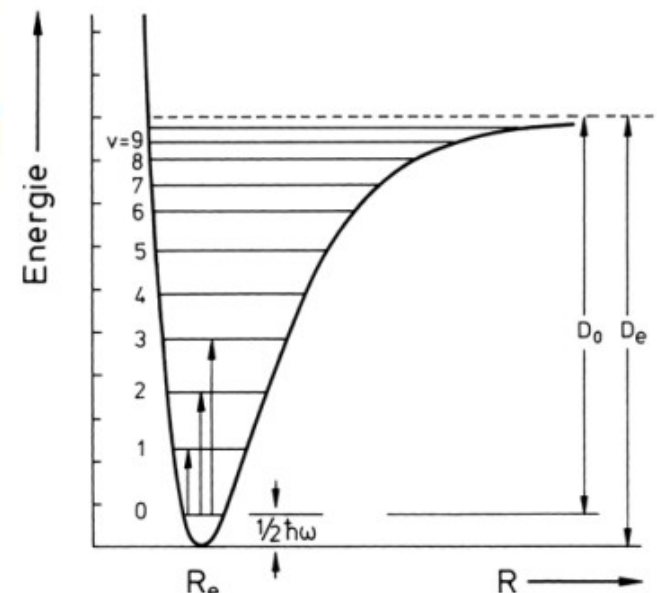
Source

Goeltner, Osram Opto Semiconductors, Regensburg
www.laserfocusworld.com
(Apr-2021)

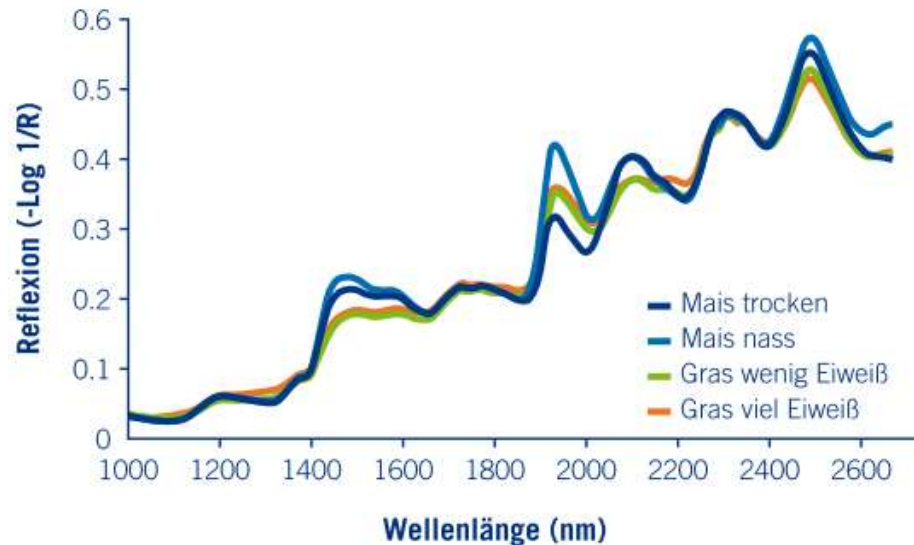
Welche Signale sind besonders interessant für Anwendungen?



Grundanregung und erste beide Obertöne eines anharmonischen Oszillators (Pfeile). Anregungsenergien nehmen etwa mit dem Faktor v zu.
Quelle: Haken/Wolf, Springer 2006 „Molekülphysik und Quantenchemie“



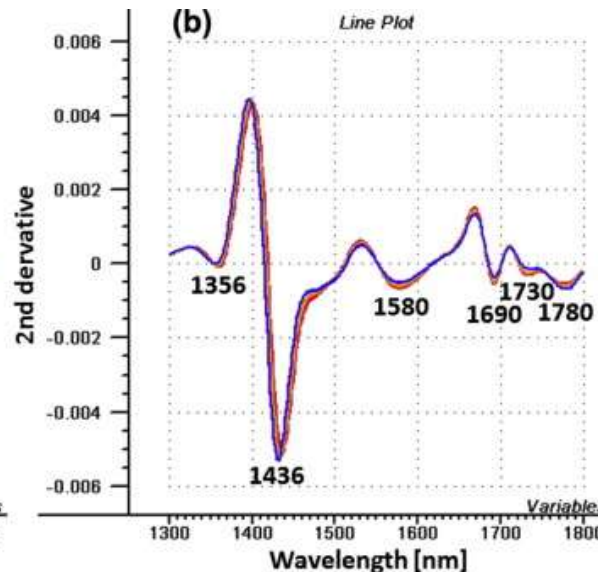
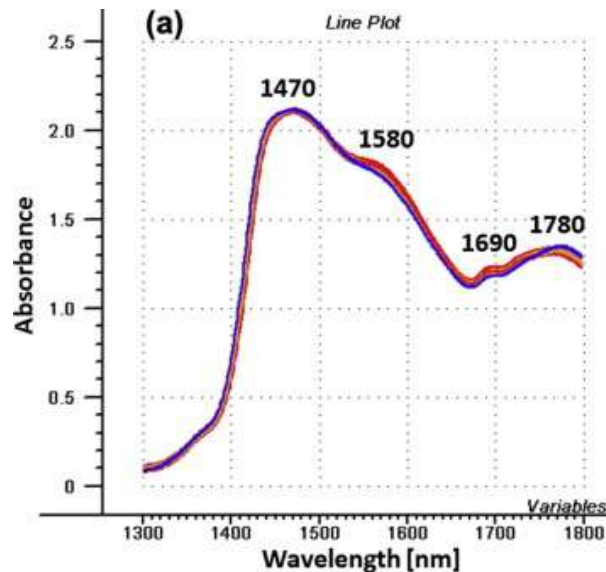
NIR-Spektren (Obertöne)



Von komplexen Mischungen werden Gesamtmuster gemessen, hier als Reflektionsspektren (nur grobe Zuordnungen zu Stoffklassen möglich)

Quelle
<https://www.eurofins.de/agro/analysen/boden/nirs-bodenanalytik/>

Welcher Wellenzahl und molarer Energie (in kJ/mol) entsprechen 1000 und 2500 nm?



Die Alterung von Honig wurde hier vermessen. Als zusätzliche Abb. wird die Ableitung dargestellt (ein häufiges Verfahren, auch mit höheren Abl.)

Source
Food Chemistry 194 (2016) 873-880
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.092>

Erklären Sie den Übergang von a) zu b) an Beispielstellen im Spektrum. Was sind die Vorteile von Ableitungsspektren?

NIR-Analyse von Lebensmitteln

Schnell, einfach, kostengünstig, zerstörungsfrei



Getreidemehlanalytik
in der Rosenmühle
(Landshut)
Messgenauigkeit bei
Proteingehalt etwa
(13,5 +/- 0,3) %

Foto: M. Schrader

Projekt zwischen HSWT und Fraunhofer IOSB
„Zerstörungsfreie Messmethode zur schnellen
Qualitätsbewertung und Haltbarkeitsabschätzung
von Lebensmitteln mithilfe von Food-Scannern“



Quelle und weitere Infos:

https://forschung.hswt.de/forschungsprojekt/1076-food-scanner?person_id=51

bzw.

Goisser, S.; Mempel, H.; Bitsch, V. (2020): Food-Scanners as a Radical Innovation in German Fresh Produce Supply Chains. International Journal on Food System Dynamics 11 (2), S. 101-116.

[DOI: 10.18461/ijfsd.v11i2.43](https://doi.org/10.18461/ijfsd.v11i2.43)

NIR-Gerät, Quelle:
www.medicalexpo.com/prod/hitachi



Vielfältige Anwendungen von (N/FT-)IR

- Abgleich der Identität
- Molekülstrukturbestimmung
- Änderung von Strukturen (Bindung von Cofaktoren o.ä.)
- Einfache Gasanalytik über IR-Sensoren (z.B. CO₂)
- Qualitätskontrolle von Tabletten
- Wasser-, Fett- und Proteingehalt in Lebensmitteln
- Quantifizierung von Pharmaproteinen
- Polymeranalytik
- Online-Analytik in der Prozesskontrolle
- Isotopeneffekte
- Außerdem: IR-Mikroskope
- Typ. Geräte-Bauweise
 - meist Desktop
 - etwa 1 x 0,6 x 0,3 m für FT/IR
 - etwa 0,5 x 0,5 x 0,3 m für NIR
- viele Hersteller, z.B.
 - D: Bruker Optics
 - USA: Perkin-Elmer, Beckmann
 - Asien: Shimadzu
 - Lebensmittel: Foss, Perten
- Preis: etwa 10 - 50 T€

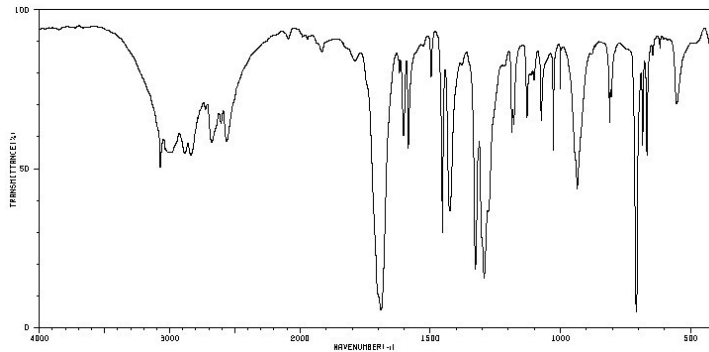
Einfache Routineanalytik: NIR

Aufwändigere Strukturinformation: MIR

Lit-Tipp:

Bec et al. Near-Infrared Spectroscopy in Bio-Applications,
Molecules 2020, 25, 2948; doi:10.3390/molecules25122948

Mögliche Prüfungsfragen zu IR (unvollständig)



Quelle:
sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/

Aus Lernzielen

- ◆ Was sind die Grundlagen der IR-Spektroskopie?
 - Was ist IR-aktiv, was nicht?
 - Wie hängen Molekülschwingungen und IR-Absorption zusammen?
 - Wieso unterscheiden sich Moleküle / Feststoffe untereinander
- ◆ Wie ist ein Spektrometer aufgebaut und wie misst es was?
- ◆ Welche Materialien sind IR-aktiv bzw. (teilweise) inaktiv?
- ◆ Erläuterung von Beispielspektren und Spektrenbestandteilen
- ◆ Wofür wird IR genutzt, mit welchen Besonderheiten, Stärken und Schwächen?
- ◆ Wann kommt NIR zum Einsatz, was ist Unterschied zu MIR?

Raman-Spektroskopie



Chandrasekhara Venkata **Raman**
Nobelpreisträger 1930 in Physik

"for his work on the scattering of light and for the discovery of the effect named after him."

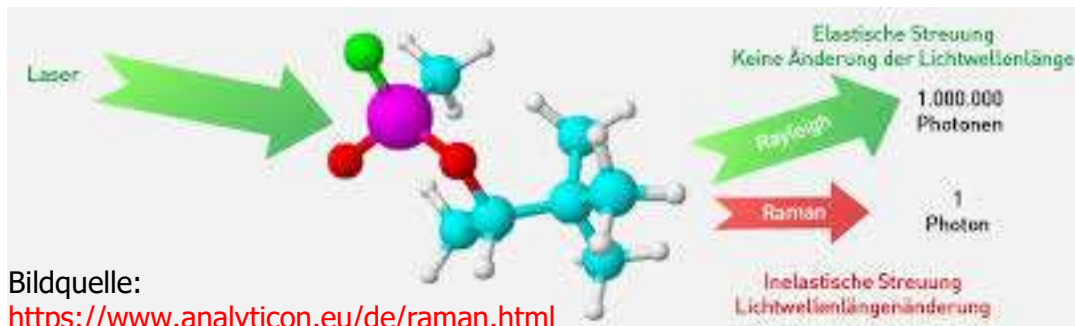
Bildquelle und weitere Infos:

<https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1930/raman/biographical/>

- ◆ Alternative Mustererkennung bzw. Quantifizierung
 - Komplettes physikalisches Messprinzip
 - instrumentell ist Laser notwendig sowie sehr empfindliche Detektion
 - Signallagen und Datenauswertung ähnlich wie (M)IR
- ◆ Literatur:
 - Lehrbücher der Phys. Chemie (Wedler, Atkins)
 - Spezial-Monographien, z.B. Schrader, Larkin, sowie Smith/Dent „Modern Raman Spectr.“, Wiley 2005
 - Videos
 - <https://www.bruker.com/de/products-and-solutions/infrared-and-raman/raman-spectrometers/what-is-raman-spectroscopy.html>
- ◆ Anwendungen

Grundlagen der Raman-Spektroskopie

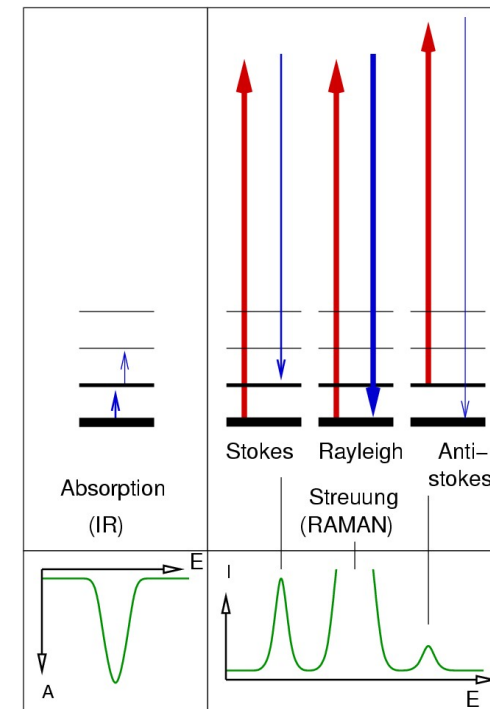
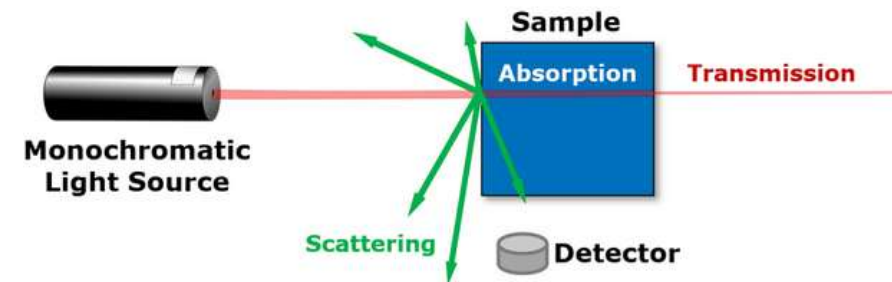
- Laserstrahlung trifft direkt auf Molekül, Energieübertrag, wenn sich Polarisierbarkeit ändert
- Drei Optionen
 - Licht wird gestreut (nach Rayleigh)
 - Energieaufnahme bei Kontakt (Stokes)
 - Energieabgabe bei Kontakt (anti-Stokes)
- Moleküle mit veränderlicher Größe können daher absorbieren, was komplementär zu IR ist.
- Molekülschwingungen (Atome) ohne zeitlich veränderliches Polarisierbarkeit sind Raman-inaktiv



Bildquelle:

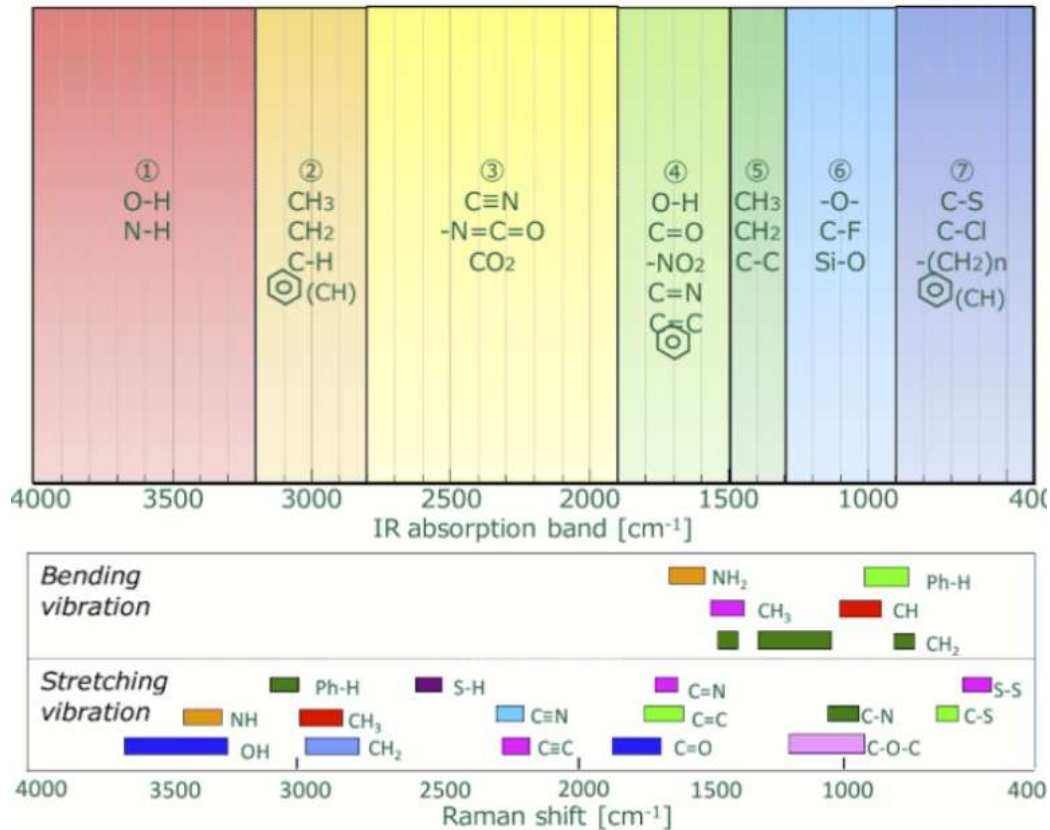
<https://www.analyticon.eu/de/raman.html>

Bildquelle: https://www.bruker.com/de/products-and-solutions/infrared-and-raman/raman-spectrometers/what-is-raman-spectroscopy.html_ramana.png



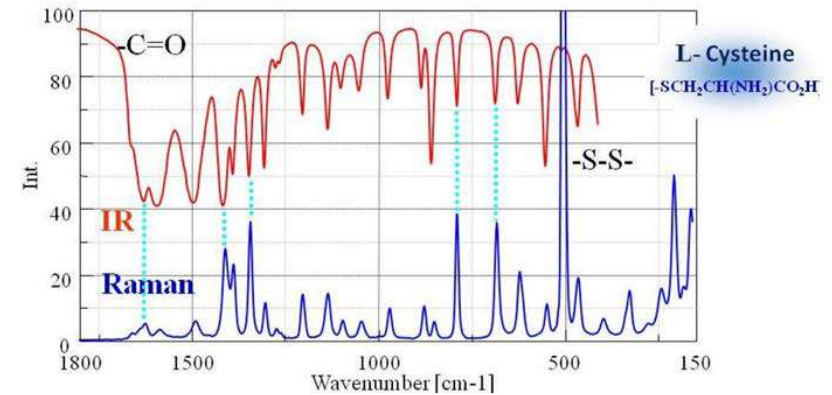
Bildquelle: http://ruby.chemie.uni-freiburg.de/Vorlesung/Gif_bilder/Methoden_ac/ir_raman.png

Vergleich Raman- mit MIR-Spektroskopie



Oben sind IR-Absorptionsbereiche, unten Raman-Shifts für typische funktionelle Gruppen angegeben.

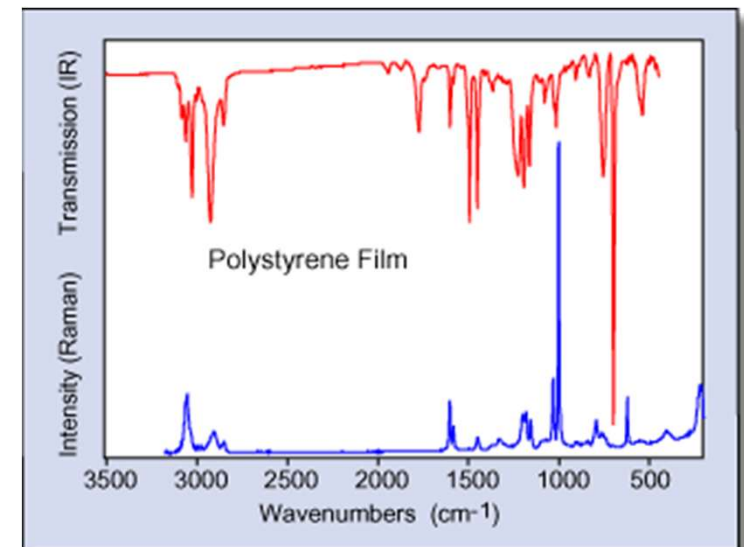
Bildquelle: <https://jascoinc.com/products/spectroscopy/raman-imaging-microscope/what-is-raman-spectroscopy/>



Oben ist das IR-Spektrum von L-Cystein in Transmission angegeben unten das Raman-Spektrum mit gleicher Wellenzahl-Achse (aber Intensitäten)

Bildquelle:

<https://jascoinc.com/products/spectroscopy/raman-imaging-microscope/what-is-raman-spectroscopy/>



Oben ist das IR-Spektrum von Polystyren in Transmission angegeben unten das Raman-Spektrum mit gleicher Wellenzahl-Achse (aber Intensitäten)

Bildquelle: <https://www.inphotonics.com/raman.htm>

Anwendungen von Raman-Spektroskopie

- **Musterkontrolle mit Handheld instruments**
 - Materialcharakterisierung im allgemeinen
 - Kontrollanalytik im Wareneingang im Pharma-Bereich (in Behältnissen möglich!)
 - viele andere Branchen möglich
- **Raman-Mikroskopie**
(mit Auflösungen bis hinab zu 20 nm)
- **Ausgewählte Lit.-Tipps**
 - **Bioprozesse: Graf et. al. (Rentschler),**
https://www.rentschler-biopharma.com/fileadmin/user_upload/News/Downloads/PI8311_2499_Graf_et_al._11_21_30Nov21.pdf
 - **Pharma: Buckley & Ryder Applications of Raman Spectroscopy in Biopharmaceutical Manufacturing, Applied Spectroscopy 2017, DOI: 10.1177/0003702817703270**
- **Einfache Routineanalytik: Handheld**
- **Aufwändigere Strukturinformation: Labor-Spektrometer**
- **Hersteller ähnlich wie IR, z.B. Bruker Optics, Agilent, Perkin-Elmer, Thermo, Jasco, Horiba**



Handheld Spektrometer; Bildquelle:

<https://www.analyticon.eu/en/raman-spectrometer.html>



Raman-Mikroskop; Bildquelle:

<https://www.horiba.com/deu/semiconductor/products/detail/action/show/Product/raman-spectrometer-modular-systems-1694/>

Vergleich (M)IR, NIR und Raman-Spektroskopie

Kriterium	(M)IR	Raman	NIR
Probenvorbereitung	unterschiedlich	sehr einfach	einfach
Aufwand Gerätetechnik	moderat	hoch	gering
Beste Schwingungen	asymmetrisch	symmetrisch	Obertöne
Quantifizierung	gut	gut	exzellent
Fingerprints	exzellent	exzellent	gut
Vergleichsdaten(banken)	reichlich	noch gering	moderat
Wässrige Lösungen	schwierig	einfach	kaum
Mobiler Einsatz	möglich	üblich	üblich

Tabelle entwickelt und erweitert, auf Basis Table 1.1 aus:
Larkin „Infrared and Raman Spectroscopy“ Elsevier 2nd ed. 2018

Methoden sind weitgehend komplementär,
je nach Anwendungsfall überwiegen unterschiedliche Vor- und Nachteile

Lit-Tipps

- Bioprozesse mit Raman oder MIR: Graf et. al. (Rentschler, 2021), s. oben
- Pharma mit portablen NIR oder Raman: Deidda et al. (2019), <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.035>
- <https://www.horiba.com/int/scientific/technologies/raman-imaging-and-spectroscopy/raman...>