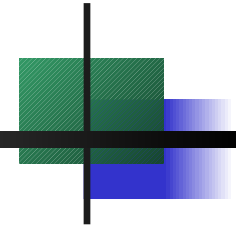


Spektroskopie/Spektrometrie im ultravioletten bzw. sichtbaren (UV/Vis)

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

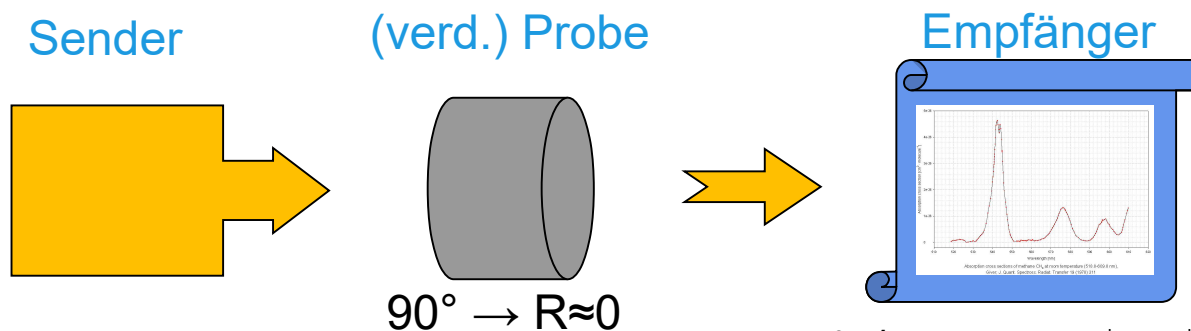
Inhalte

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

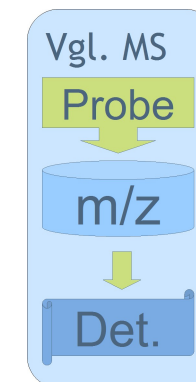
Spektroskopische sowie Optik-Grundlagen

- 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:
 $R + \text{Abs} + T = 100\%$
(Reflektions-/Absorptions-/Transmissionsf.)

Der Unterschied zwischen Aufnahme an einer Oberfläche (d) oder im Volumen (b)
Quelle: <http://www.ericca.nl/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, seit 1980er

 - Bergmann/Schaefer, „Lehrbuch der Experimentalphysik“, deGruyter, 10. Aufl. 2004

Erinnerungen aus der Physik?

Licht und andere Strahlungsarten (Teilentwurf)

- **Licht**

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

- **UV**

 - **Phänomen:** unsichtbar und energiereicher
 - **Gefährdung:** genetische Schäden bei UV-C möglich, vgl. Absorptionsmax. Von DNA

- **Infrarot**

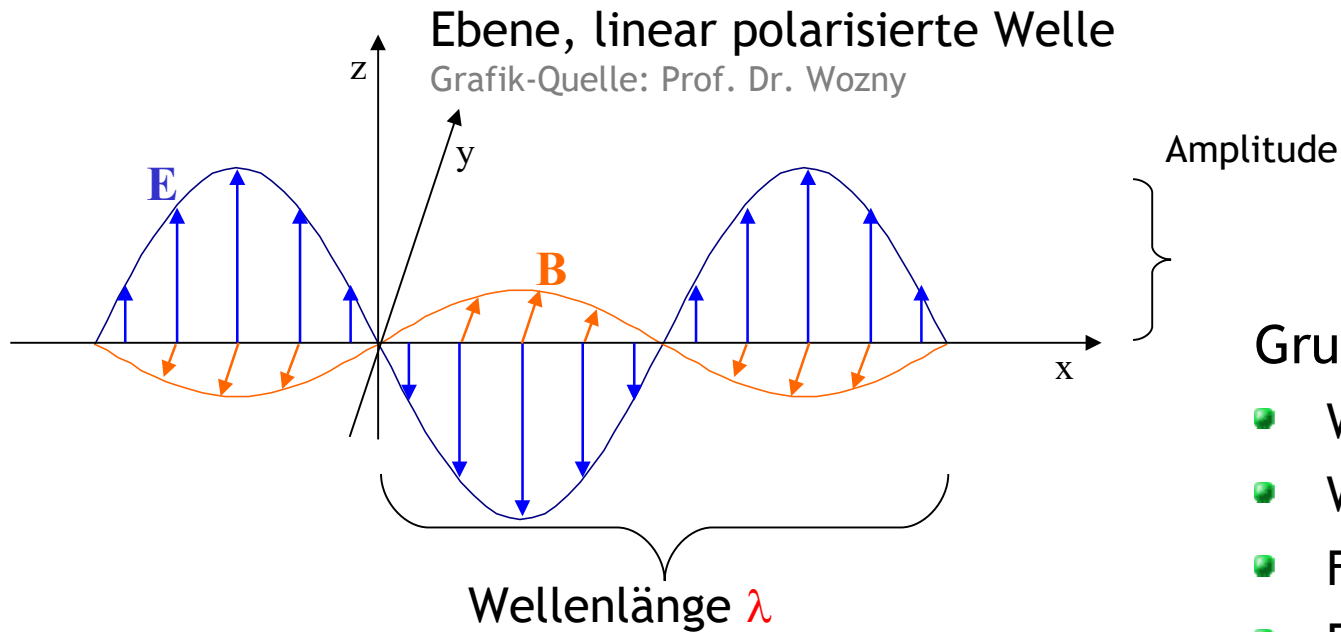
 - auch Wärmestrahlung

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 ⁶
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

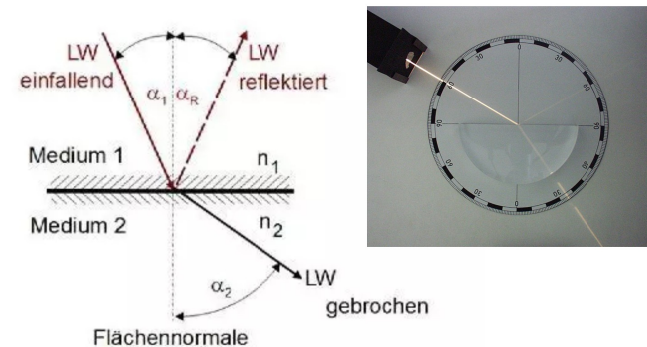
- Welle
- Wellenlänge
- Frequenz
- Energie
- Amplitude
- Geschwindigkeit
- Dosis
- Interferenz
- ...

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°)
- 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°
 - ab Grenzwinkel nur Totalreflexion, 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 ₂	1,4350	1,4338
Quarz	1,4601	
Benzen	1,5045	1,5013
NaCl	1,5474	
Diamant	2,4235	

Quelle: Bergmann/Schaefer, deGruyter 2004

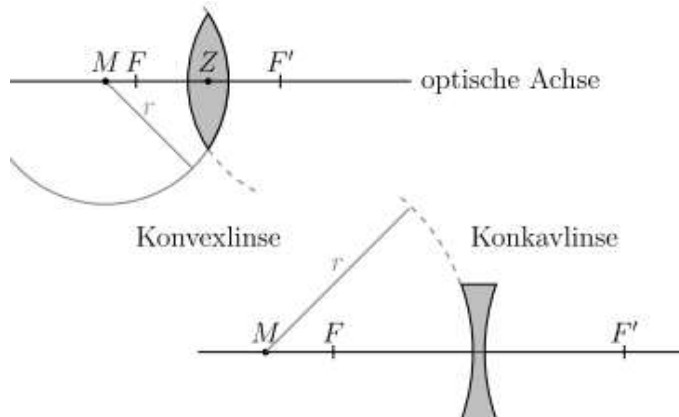


Quellen:

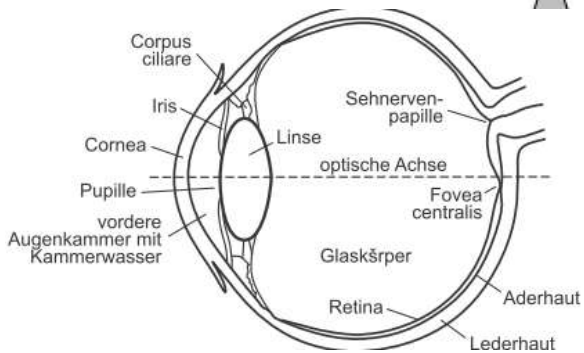
- polymerservice-merseburg.de/.../Brechzahl
- de.wikipedia.org

Prof. M. Schrader
HS Weihenstephan-Tr.

Grundlegende Bauteile zu Brechung

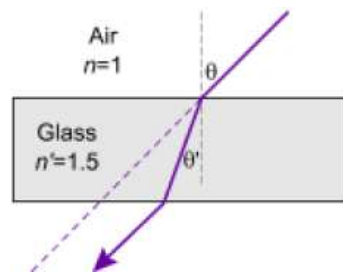


- Linsen
 - konvex (Sammellinse, fokussierend)
 - konkav (Streulinse)
- Auge ist Konvexlinse
- Kombination von Linsen führt zu
 - Fernrohr
 - Foto-Objektiven
 - Mikroskopen

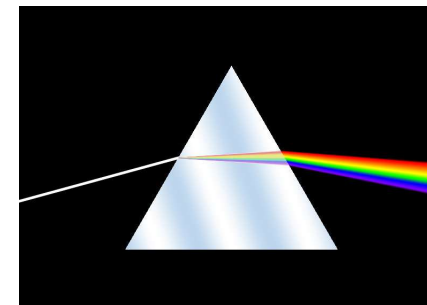


Quelle: FU Berlin, Physikal. Praktikum
„Optische Komponenten“

- Prisma (Prinzip Brechung)
 - je nach Ausfallswinkel treten unterschiedliche Wellenlängen aus



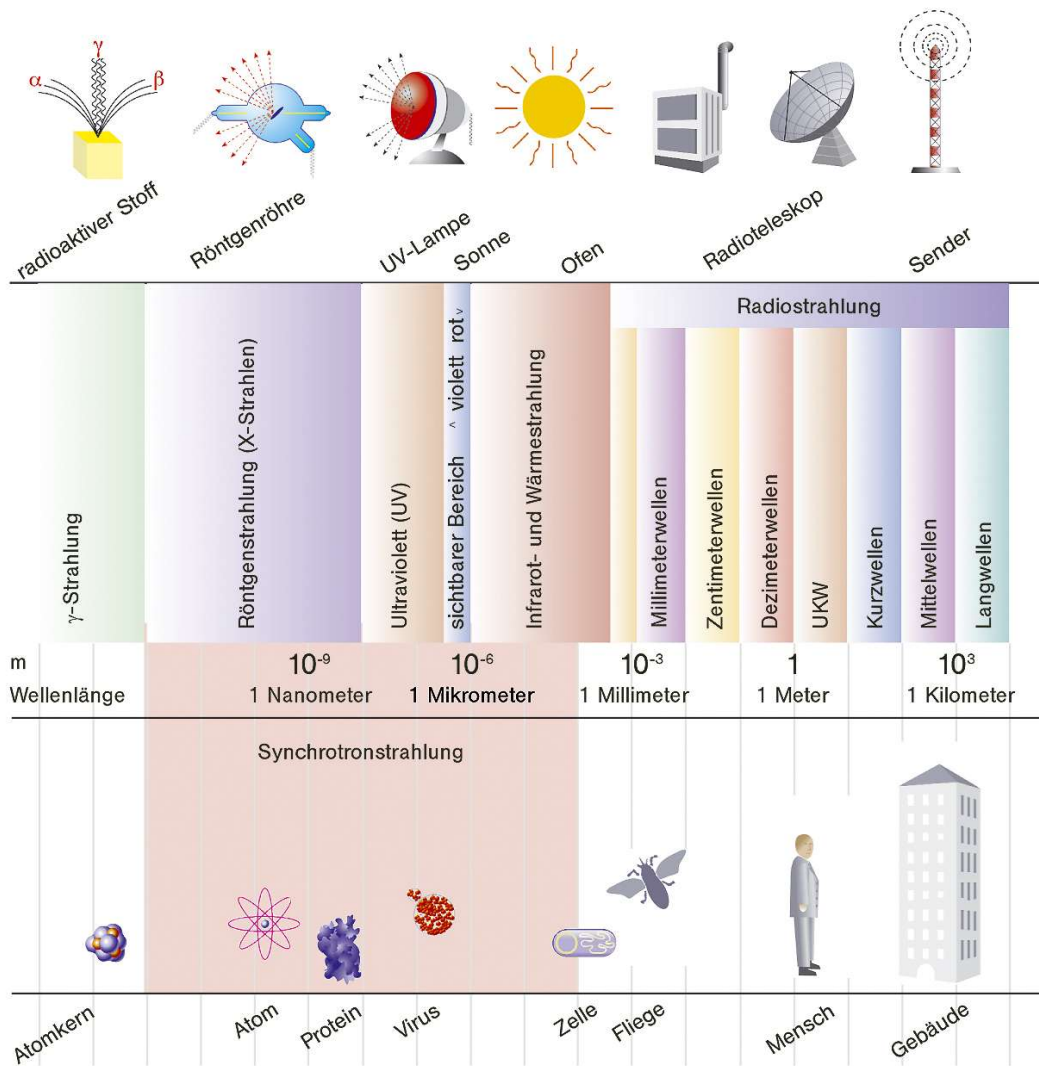
Quelle: Ryer (1997)
“Light measurement handbook“



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/>

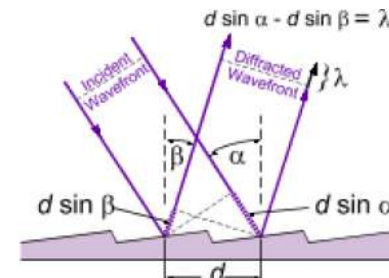
Streuung, Beugung, Polarisation

Physikalische Prinzipien

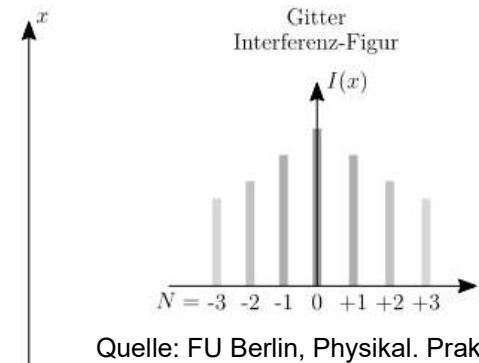
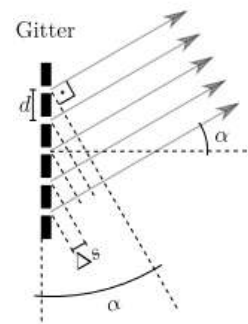
- Bei Streuung wird unterschieden in
 - **nicht kohärente Streuung**: Wellen werden in ihrer Phasenbeziehung verändert, das Ergebnis ist ein diffuses Streubild - ohne Form
 - **kohärente Streuung**: Die Phasenbeziehung bleibt erhalten, somit entstehen Interferenz- oder Beugungsmuster.
- **Interferenz**: Wechselwirkungen bei Phasenverschiebung und identischer Wellenlänge
- **Beugung**: Musterentwicklung, aufgrund von Interferenz an definierten Oberflächenstrukturen, z.B. Beugungsgitter (s. rechts)
- (Polarisation: Schwingungsebene im Raum wird definiert bzw. analysiert)

Bauteile

- Spalt- und Lochblende
- Beugungsgitter
- (Polarisationsfilter)

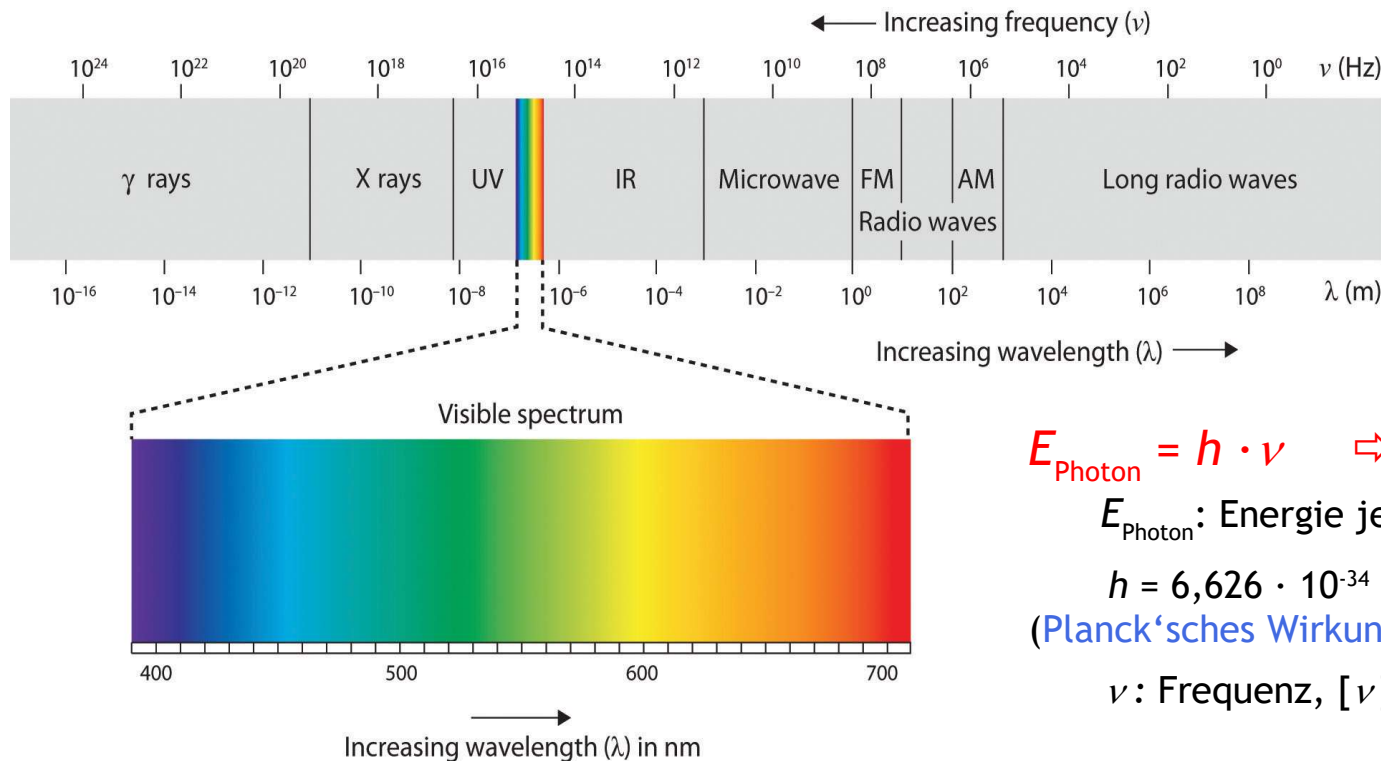


Grating Equation: $m\lambda = d (\sin \alpha \pm \sin \beta)$ Quelle: Ryer (1997) "Light measurement handbook"



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

(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_{Photon} : Energie je Photon

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

(Planck'sches Wirkungsquantum)

ν : Frequenz, [ν]= 1/s

Üblicher in [E_{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>

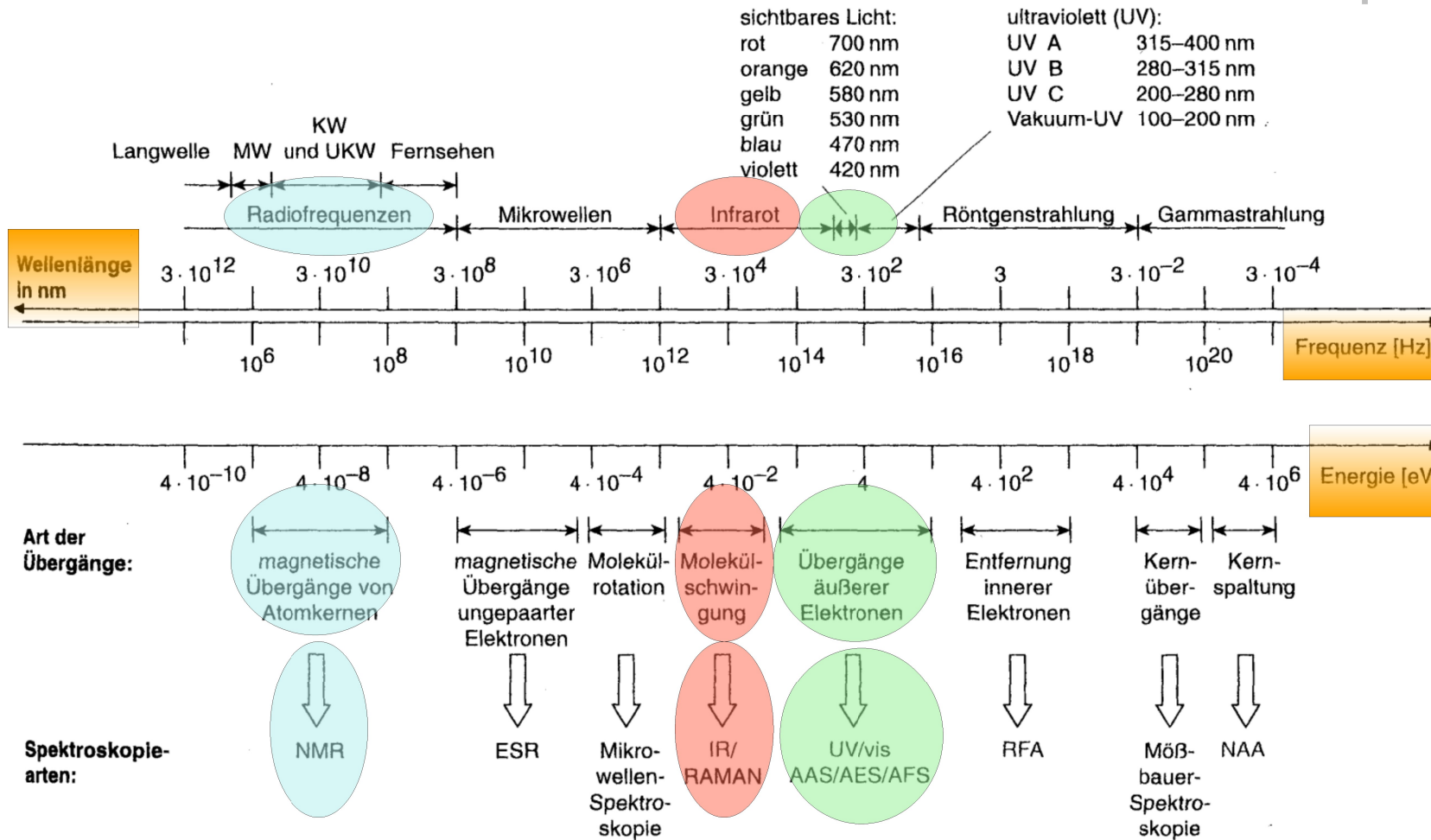
Zusammenhang Wellenlänge λ und Frequenz ν
über Lichtgeschwindigkeit c

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

Historisch auch üblich,

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

Informationsreichste Übersicht zum Spektrum der elektromagnetischen Strahlung



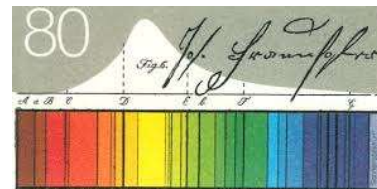
4.2 Spektrum der elektromagnetischen Strahlung mit Zuordnung der verschiedenen Spektroskopiearten. Cammann 2001

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



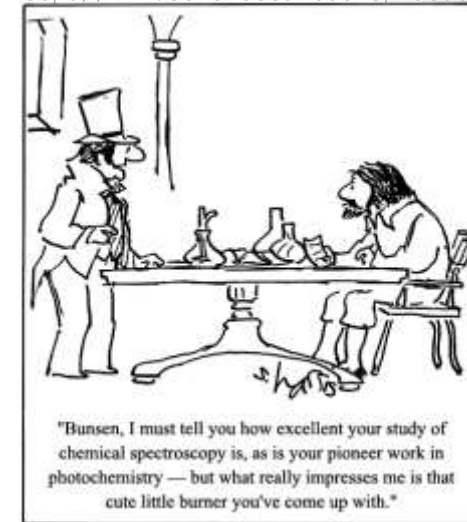
Joseph von Fraunhofer *Optik und Physik 1827-1828* Deutsche Bundespost 1987

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
- Im WWW: http://www.chemgapedia.de/vsengine/topics/de/Chemie/Physikalische_00032Chemie/Spektroskopie/index.html
- Perkampus „UV-Vis-Spektr. und ihre Anw.“, Springer 1986/92

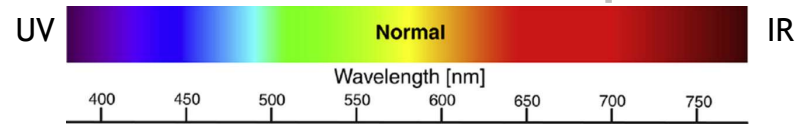


Gebäudeschild
in Heidelberg

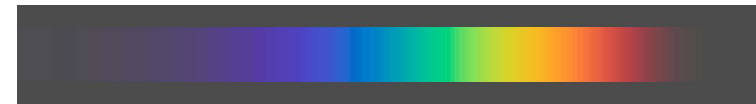
Prof. M. Schrader
HS Weihenstephan-Tr.

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: $E_{\text{mol}}(555\text{nm}) = 217 \text{ kJ/mol}$;
 $E_{\text{mol}}(254\text{nm}) = ?$
und vgl. mit typischen Bindungsenergien)



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



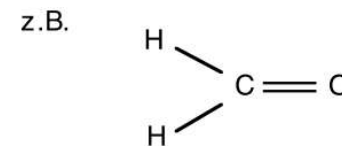
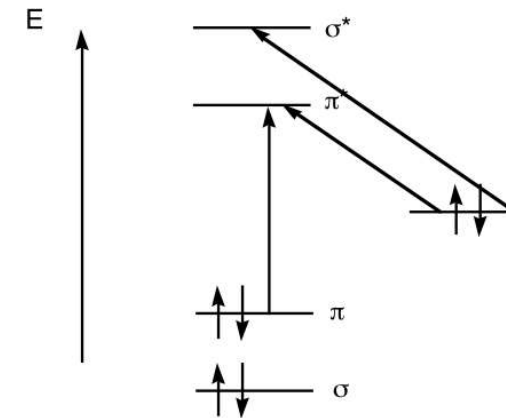
Brechungsspektrum eines Prismas (2020):
<https://www.itp.uni-hannover.de>

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 π -Elektronen beteiligt sind. ($\pi \rightarrow \pi^*$ und $n \rightarrow \pi^*$). Übergänge von σ -Bindungen sind energiereicher (absorbieren bei < 190 nm)
(vgl. Abb. in Lottspeich + Cammann)
- Im Vis-Bereich dominieren Übergänge unter Beteiligung von **konjugierten π -Elektronensystemen oder d-Orbitalen** (Nebengruppenelemente)
- Die zugeführte Energie wird überwiegend **als Wärme** wieder abgegeben: **Relaxation** (nicht als Licht; Ausnahme sind polierte Metalloberflächen)
- Typisch ist Absorption in breitem λ -Bereich, so genannte „**Bandenspektren**“
(Erklärung folgt im Kapitel Fluoreszenz)

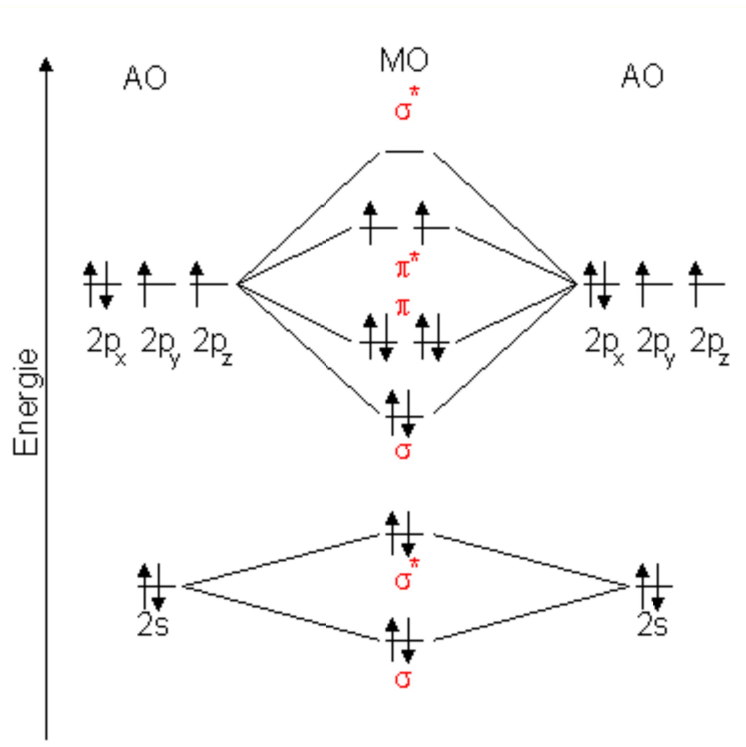


$n \rightarrow \pi^*$ -Übergang:	304 nm ($\epsilon = 18$)
$\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang:	208 nm
$n \rightarrow \sigma^*$ -Übergang:	vermutlich um 180 nm

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

Orbital-Termschemata

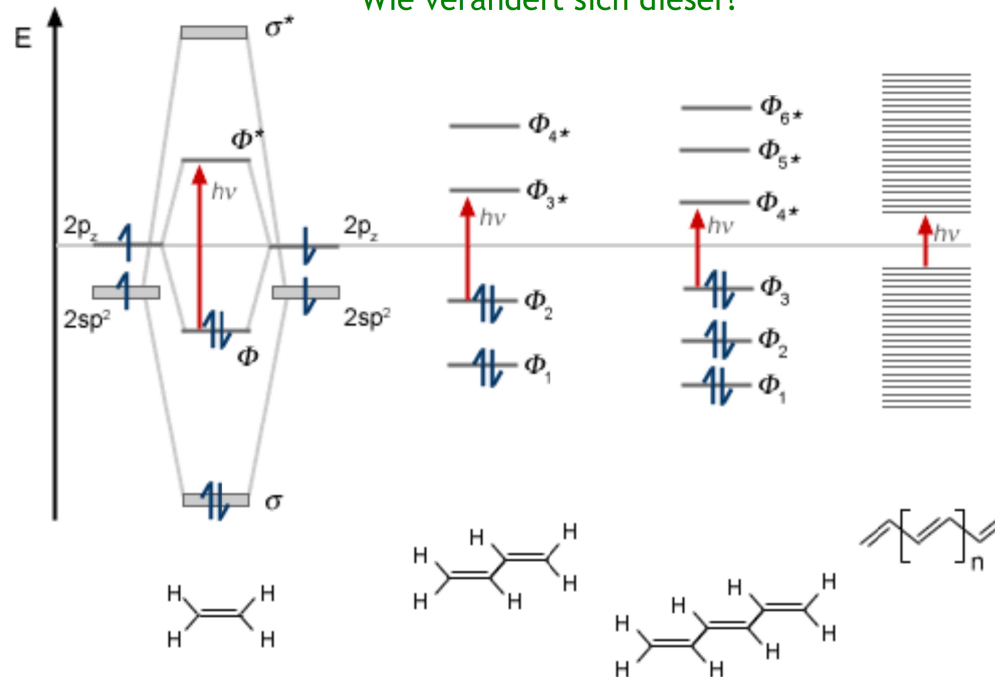
Erinnerung + Fortführung



MO-Schema von Sauerstoff (LUMO = HOMO)
Quelle: <http://www.chemgapedia.de/>

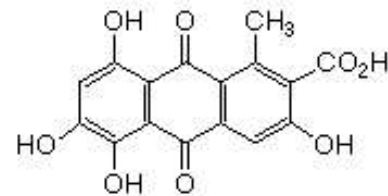
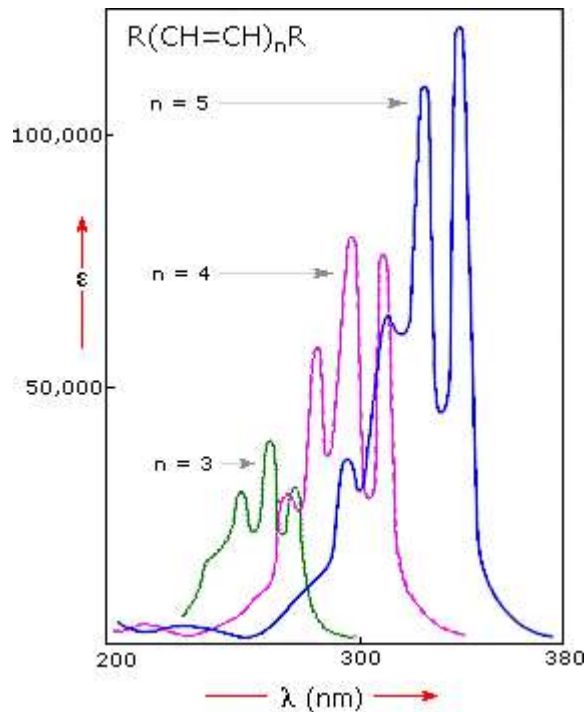
MO-Schema von Polyenen,
bei der der HOMO-LUMO-Abstand variiert
(Grenzzustand ist 1D-quasi-metallisch)
Quelle: <http://www.chemgapedia.de/>

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

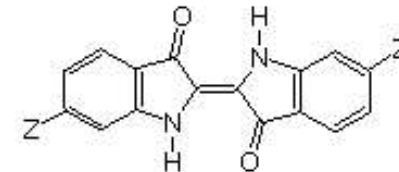


Einfluss der Konjugation und natürliche Farbstoffe (je mehr Doppelbindungen, desto eher im Vis)

Some Natural Organic Pigments



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

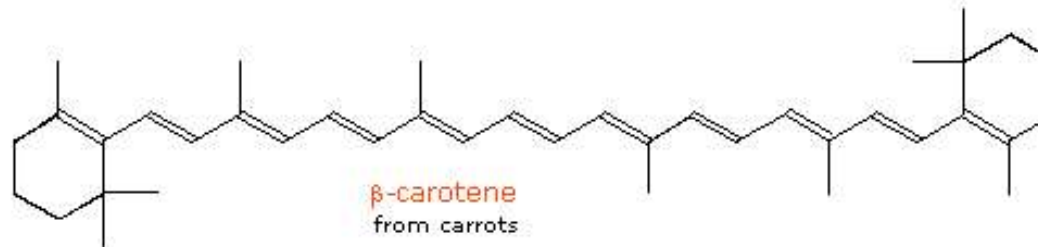


$Z=H$
Indigo
from *Isatis tinctoria* (woad)

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



Crocetin
from saffron



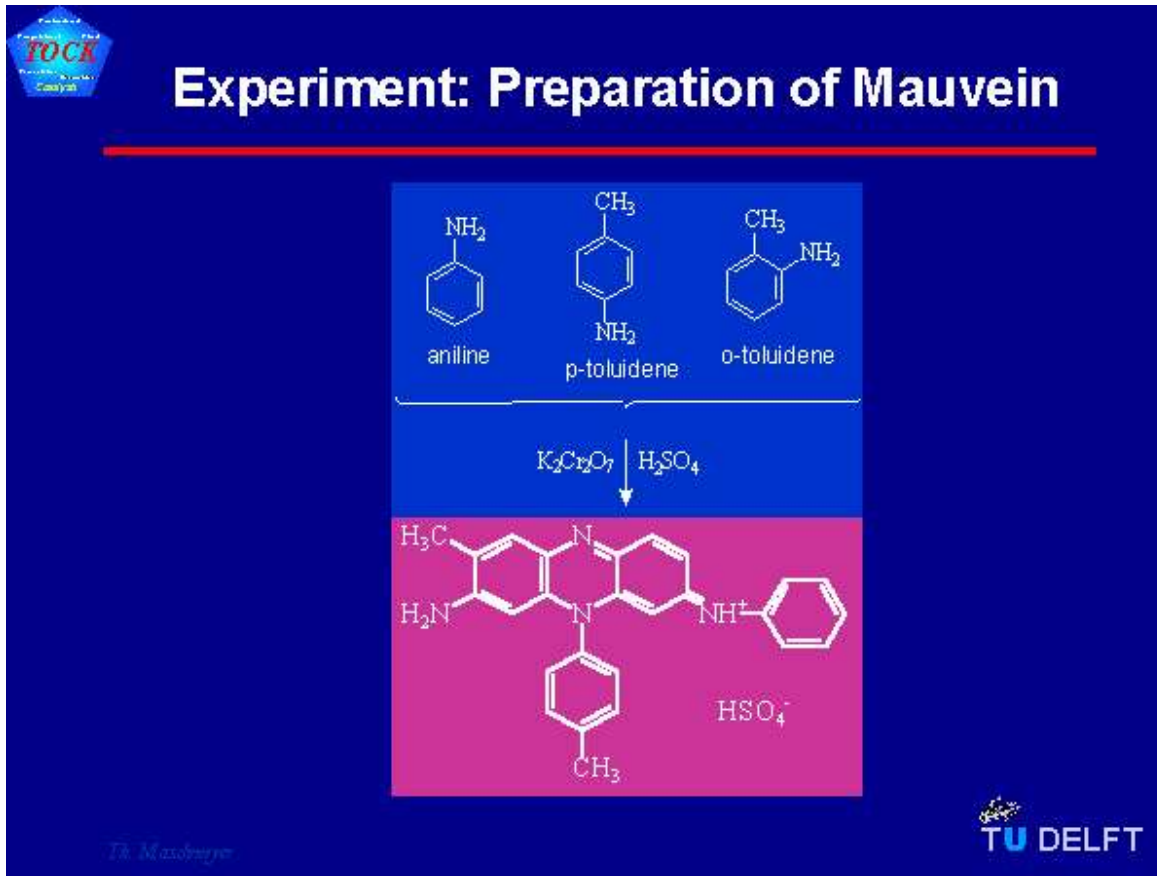
β -carotene
from carrots

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)



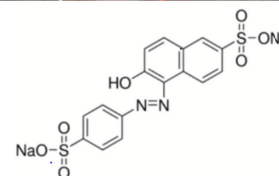
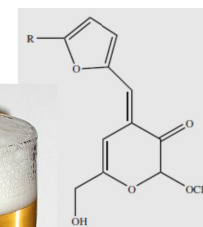
Quelle: http://www.morechemistry.com/publ/colours_dyes/slide114.html

- 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?

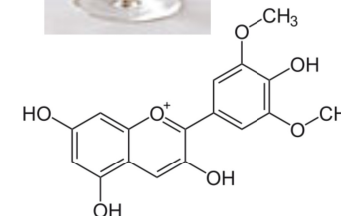
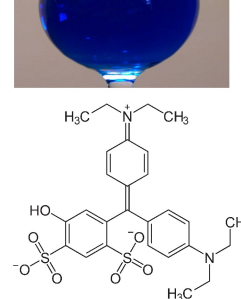
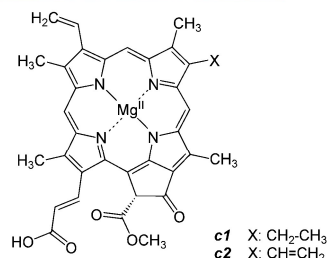
- Orangenlimo
- Bier
- Kaffee
- Rotwein
- Grüntee
- Blue Curacao
- Aperol
- Campari
- Cognac



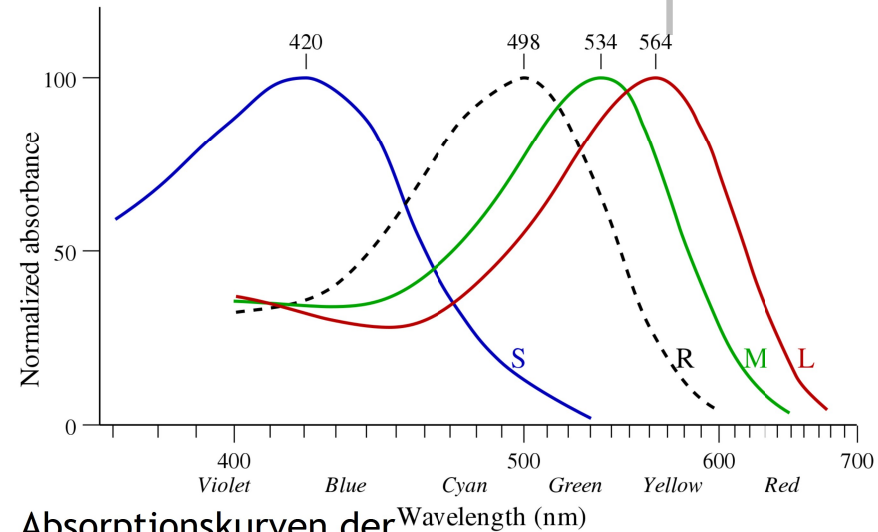
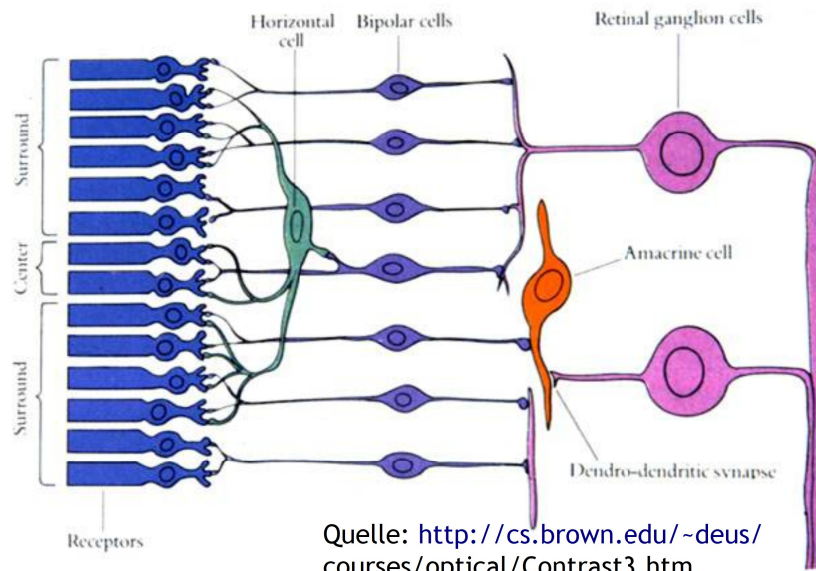
Datenquellen: wikimedia commons sowie Matissek Lebensmittelchemie, Springer



Bei welchen Wellenlängen absorbieren diese Getränke?



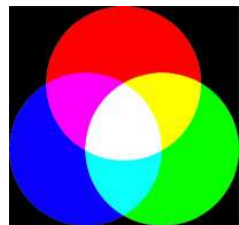
Lichtdetektion und -prozessierung vom menschlichen Auge



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).

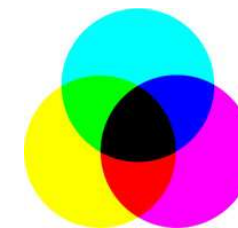
- Jede bipolare Zelle ist mit mehreren Photorezeptoren verbunden.
- Etwa 125 Mio. Rezeptoren, bei 1 Mio. Ganglien-Zellen
- Lit.-Tipp: <https://doi.org/10.1016/j.bbabc.2013.08.009>



Emission
RGB ergibt weiß

additiv	subtraktiv
Red	cyan
Green	magenta
Blue	Yellow

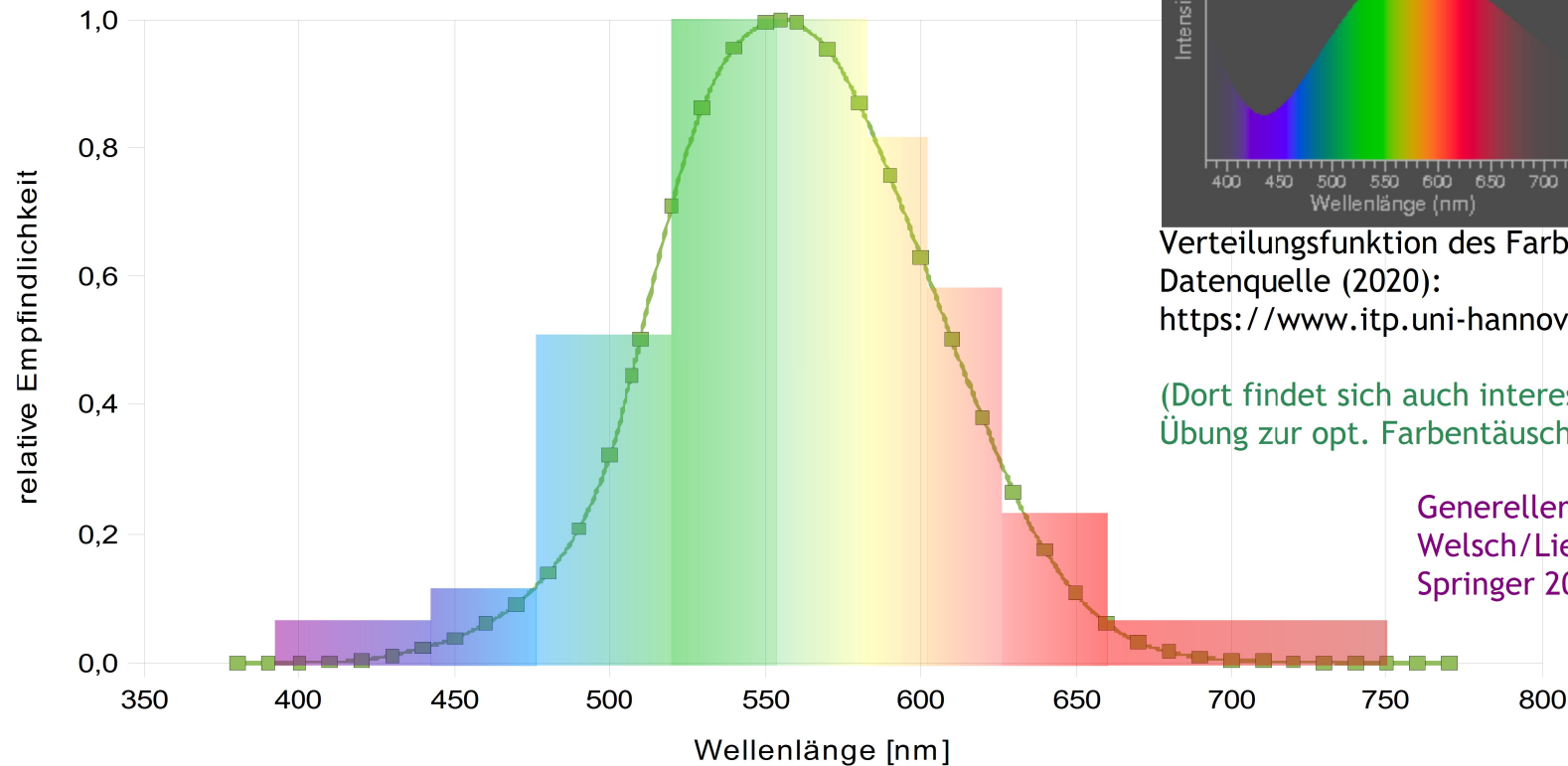
Absorption
CMY +key ergibt schwarz (alternativ: Pantone)



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
(sehr großer dynamischer Bereich)

Datenquelle: 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.

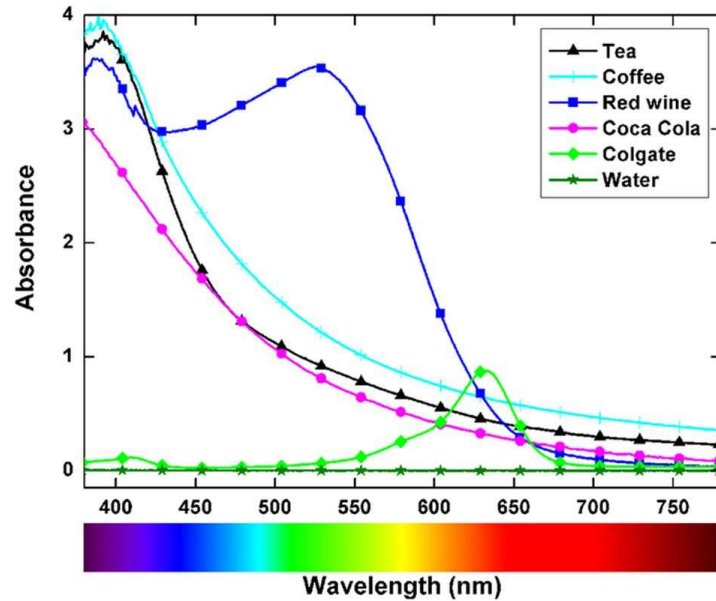
Wer tiefer einsteigen möchte, folgende beiden Reviews sind frei zugänglich:

<https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2013.08.009>

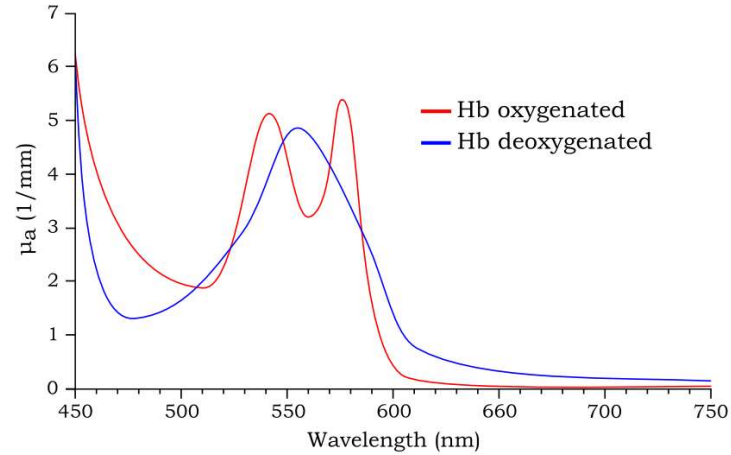
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4651776/>

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>

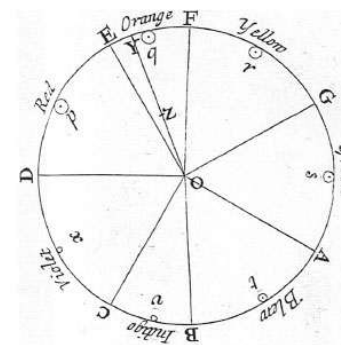
Farbkreise, nach Goethe, verfeinerte Weiterentwicklung und nach Newton



Quelle: www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch



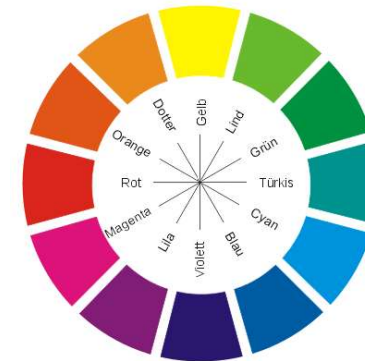
Quelle: <https://www.xposeprint.de>



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

Komplementärfarben in der Kunst

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



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



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

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 bzw. el.magn. Strahlung durch die Probe (Aufnahme von Photonen) führt zur Abschwächung des eingestrahnten Lichtes (I_0)
- Transmissionsfaktor $T = I(\text{Lösung})/I(\text{Lösungsmittel})$
oder $T = I/I_0$
- Lambert-Beersches Gesetz
 $I = I_0 \cdot \exp(-\alpha(\lambda) \cdot d \cdot c)$
Intensität nimmt exponentiell ab,
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 λ)

T in %	A
100	0
32	0,5
10	1
1	2
0,1	3

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

Mögliche Chromophore in der Chemie

- Überwiegende Gruppen
 - **d-Gruppen** Elemente (z.B. 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 π -Systeme oder d-Orbitale
- Typisch ist Absorption in breitem λ -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)

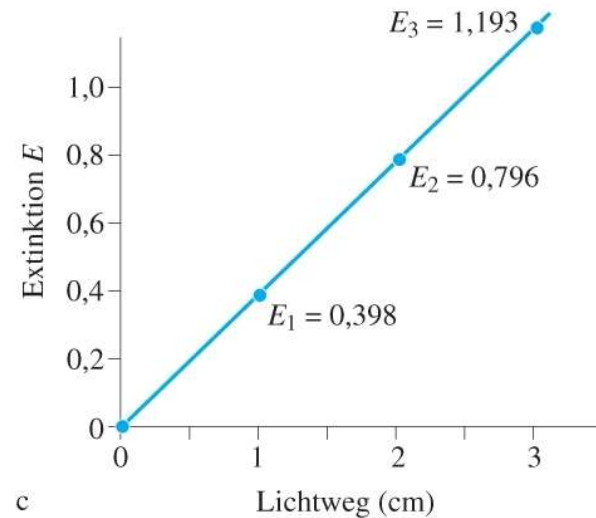
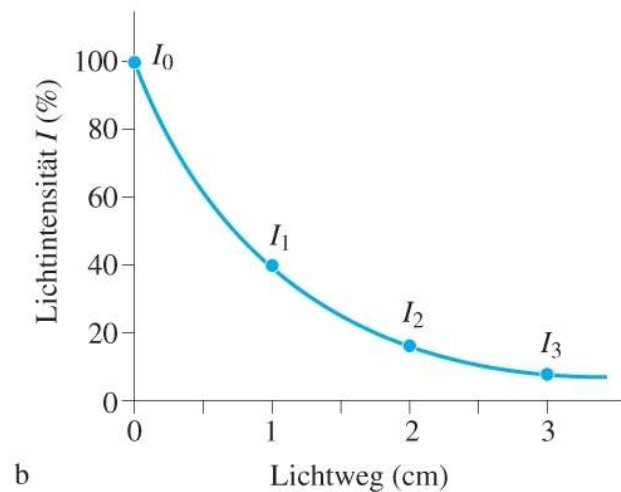
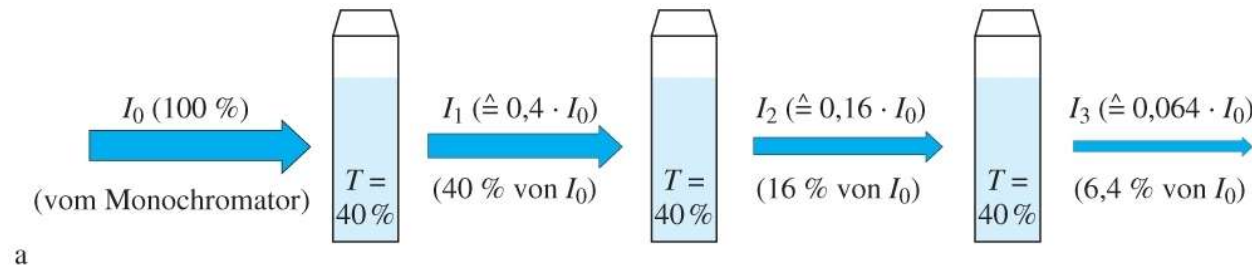
ϵ in $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Auftreten
> 1	häufig
> 100	seltener
bis 1000	wenige

Beispiel-Stoffe	Chromophor	λ_{max} in nm	ϵ in $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Wasser (g)	$n \rightarrow \sigma^*$	167	7,0/ 1,5 (?)
C=C-Bindungen			
- Alkene	$\pi \rightarrow \pi^*$	177	10
- Benzen	$\pi \rightarrow \pi^*$	204	7,9
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

Prof. M. Schrader
HS Weihenstephan-Tr.

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



- 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 Luminiszenz und Streuung (seltener)

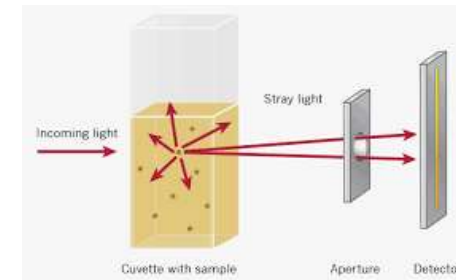
Historisch, aber immer noch im Gebrauch

- ◆ 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

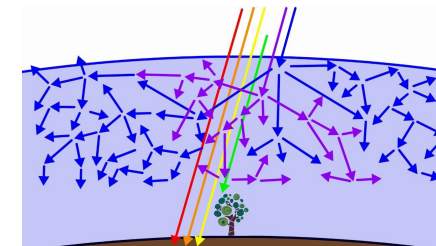
- Zelldichten werden typischerweise über eine „OD600“ bestimmt, also eine Extinktion bei 600 nm Wellenlänge und 1cm Küvette (wobei Streuung überwiegt). Dieser Begriff wird auch im Englischen verwendet.
- Dt. Extinktion als Maß für die Summe aller optischen Effekte einer Probe, inklusive Streuung und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



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

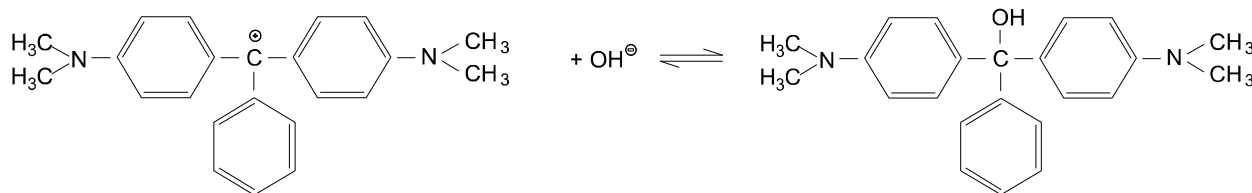
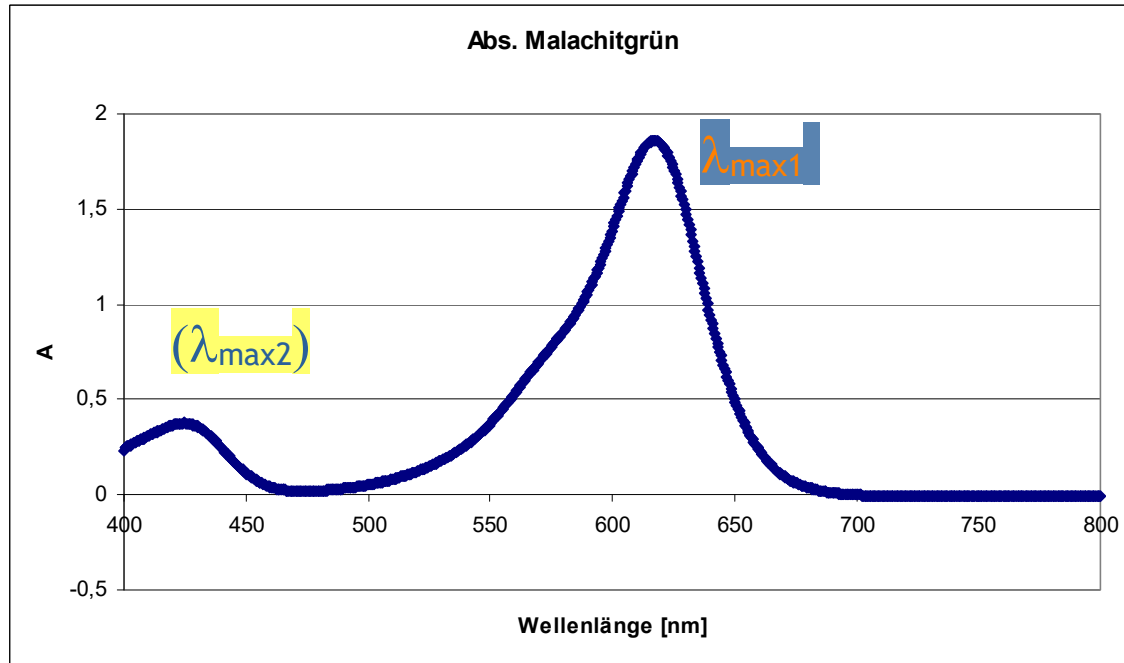
Weitere optische Effekte

- 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

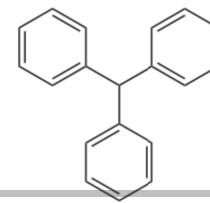
Beispielspektrum eines Farbstoffes (aus PC-II-Praktikum)



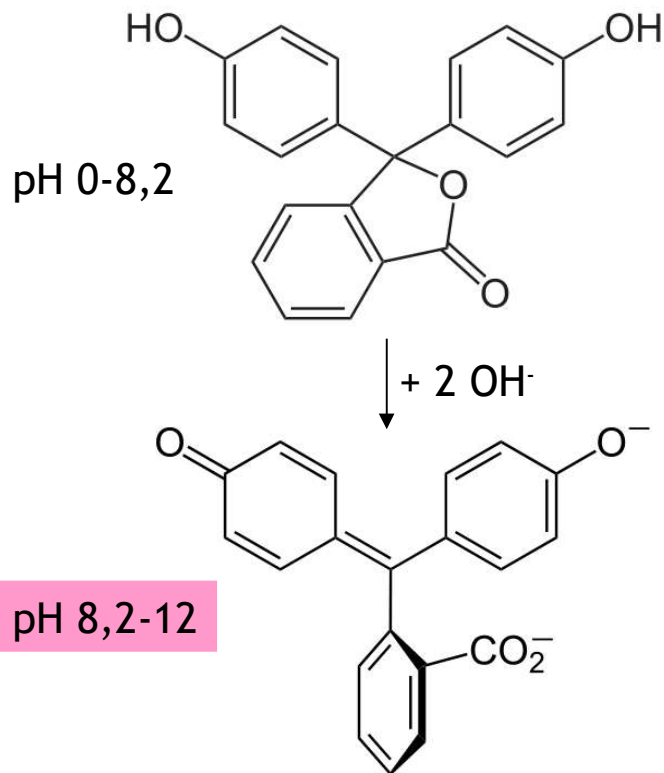
Beobachtungen, Fragen

- 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



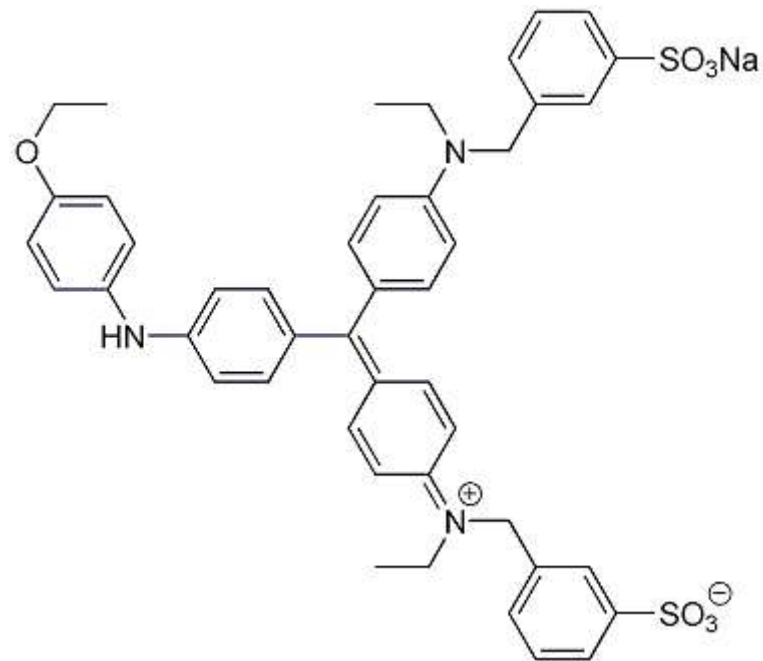
Phenolphthalein



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**
- Einiges UV-aktiv, vor allem Übergänge mit $\pi \rightarrow \pi^*$ und $n \rightarrow \pi^*$, energiereicher bei Beteiligung von σ -Bindungen (absorb. bei < 190 nm) vgl. Lottspeich et al. Bioanalytik/cs
- **Vis-Bereich** selten
 - große π -Elektronensysteme (aromatisch oder linear)
 - oder d-Orbitale
- Auch hier Absorption in breitem λ -Bereich, „**Bandenspektren**“, (Erklärung folgt bei Fluoreszenz)

Stoff	Chromophor	λ_{\max} in nm	ϵ 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 ¹ 

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 ¹, Timothy A. Olah, Carl J. Weitzmann ², Barry S. Cooperman 

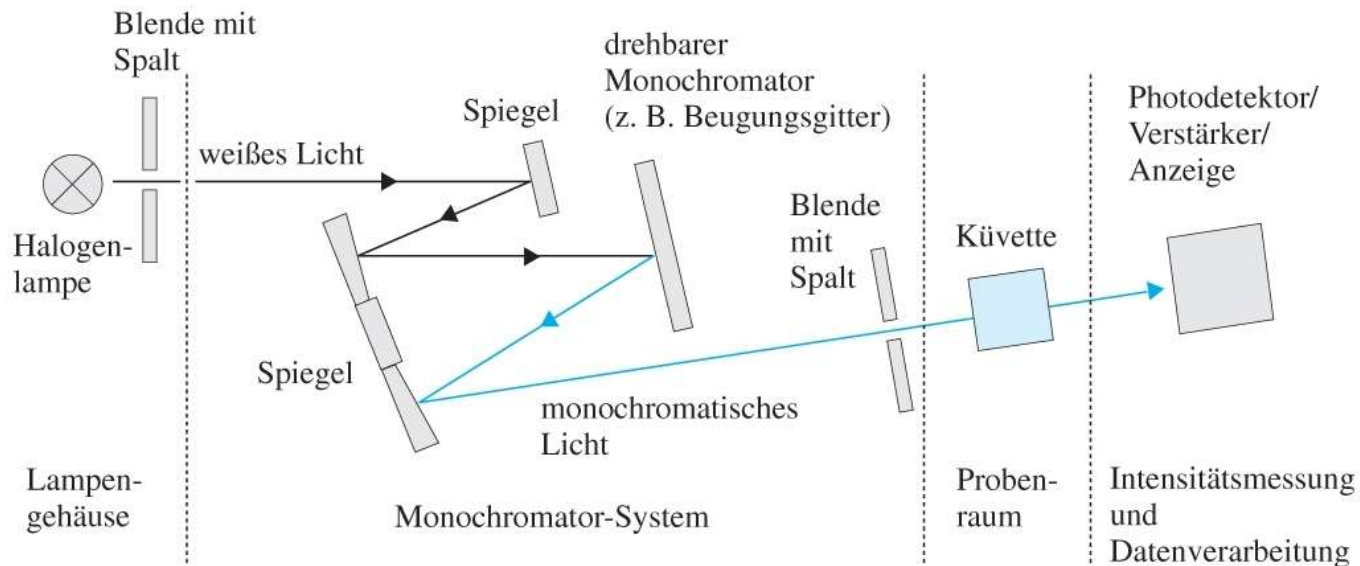
Show more 

+ 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

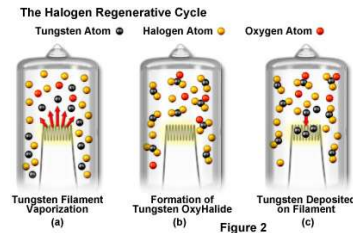
- Spiegel
- Linsen
- Blenden/Spalte
- Weitere Bauteile

Strahlungs-/Lichtquellen

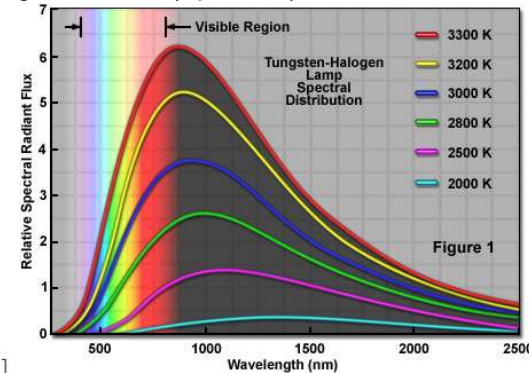
Im sichtbaren Bereich: Wolframlampen

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

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



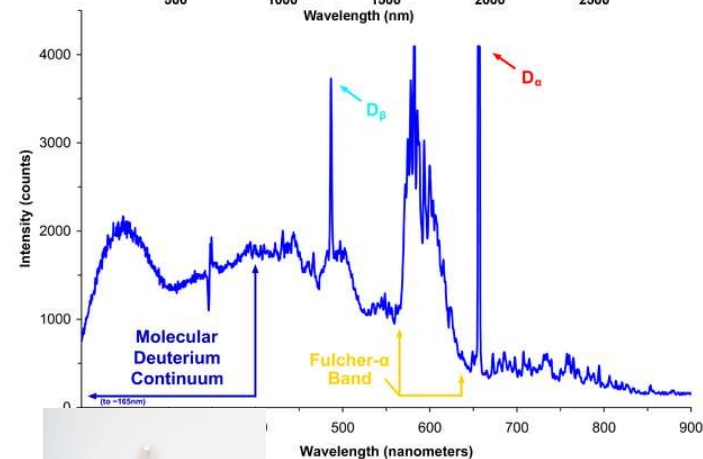
Spektrum einer W-Lampe, Quelle: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu> (Apr-2021)



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
- Emissionsspektrum von 160-400 nm durch unterschiedliche kinetische Energien, mit E_{max} bei etwa 220-250 nm; über 400 nm störende Emissionslinien von D_2

Lampen sind regelmäßig zu ersetzen
(mehrere hundert Betriebsstunden)



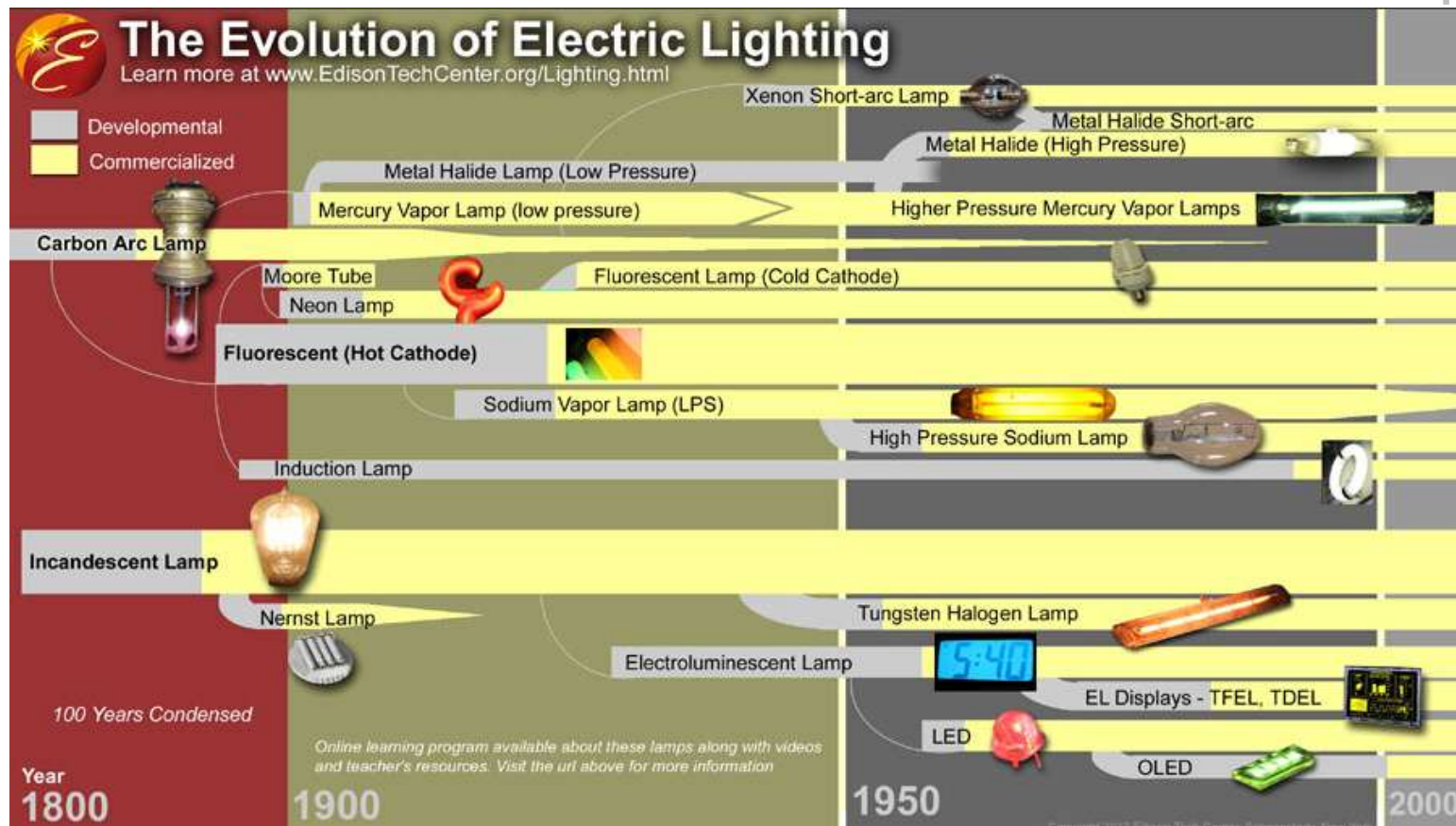
Quelle: Wikipedia.org_Falcorian

Quelle: Wikipedia.org /
Flickr_Latente

Weiterf. Literatur:
Born, Jüstel, Elektrische Lichtquellen,
Chemie in unserer Zeit 40 (2006) 294

Prof. M. Schrader
HS Weihenstephan-Tr.

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)

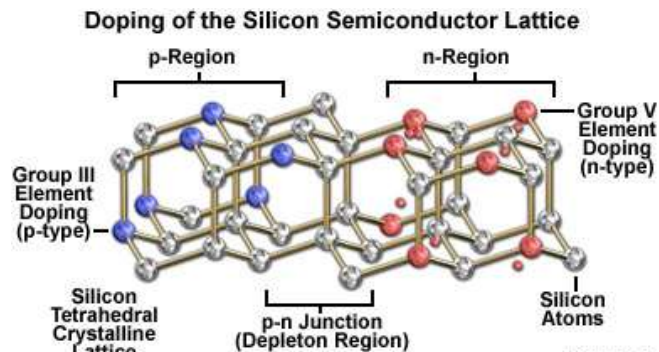
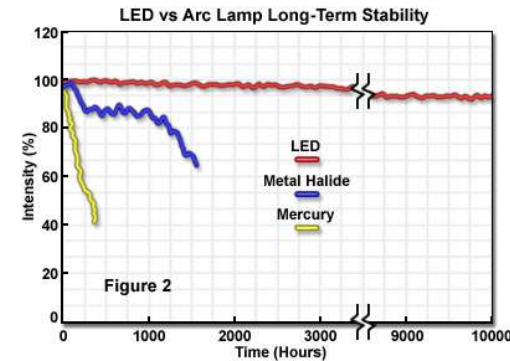
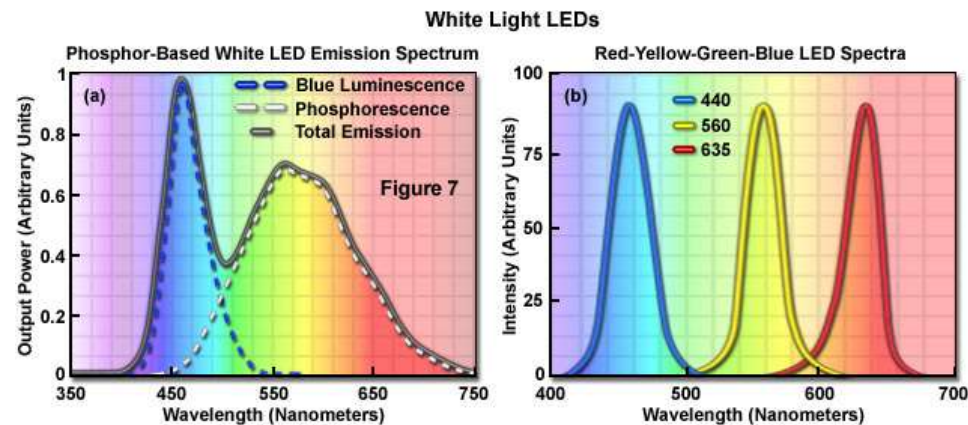


Figure 3

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>

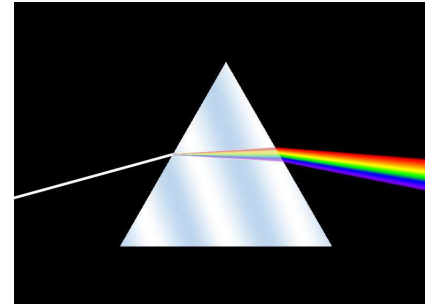
Monochromatoren

(weil ε wellenlängenabhängig ist)

Optisches Bauteil mit einem Kernstück, das den Lichtweg wellenlängenabhängig beeinflusst (Dispersion):

Prisma (klassisch)

- Aufspaltung des Lichtes durch Brechung (Winkel nicht linear von λ abhängig)

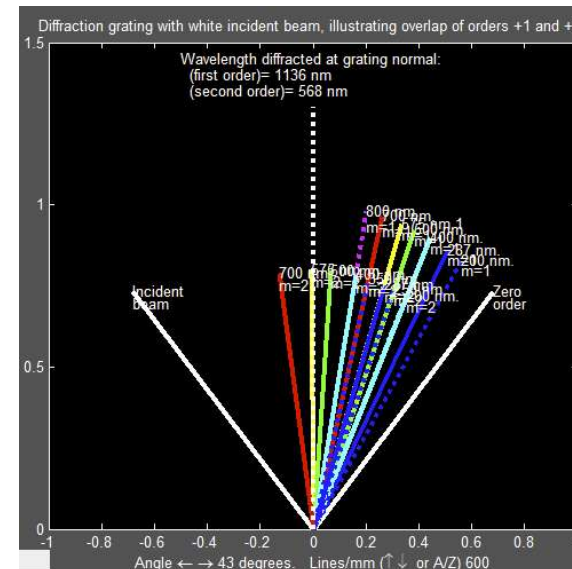


Quelle: <https://commons.wikimedia.org>

Gitter (moderner)

- Aufspaltung des Lichtes durch Beugung an einer reflektierenden Oberfläche (Winkel linear von λ abhängig, lineare Dispersion)

Beispielrechnung für Gitterbeugung: s. Skoog/Leary oder Skoog/Holler/Crouch, Abschnitt 7.3.2



Quelle: <https://terpconnect.umd.edu/~toh>

Aufbau des Spektralphotometers im Praktikum



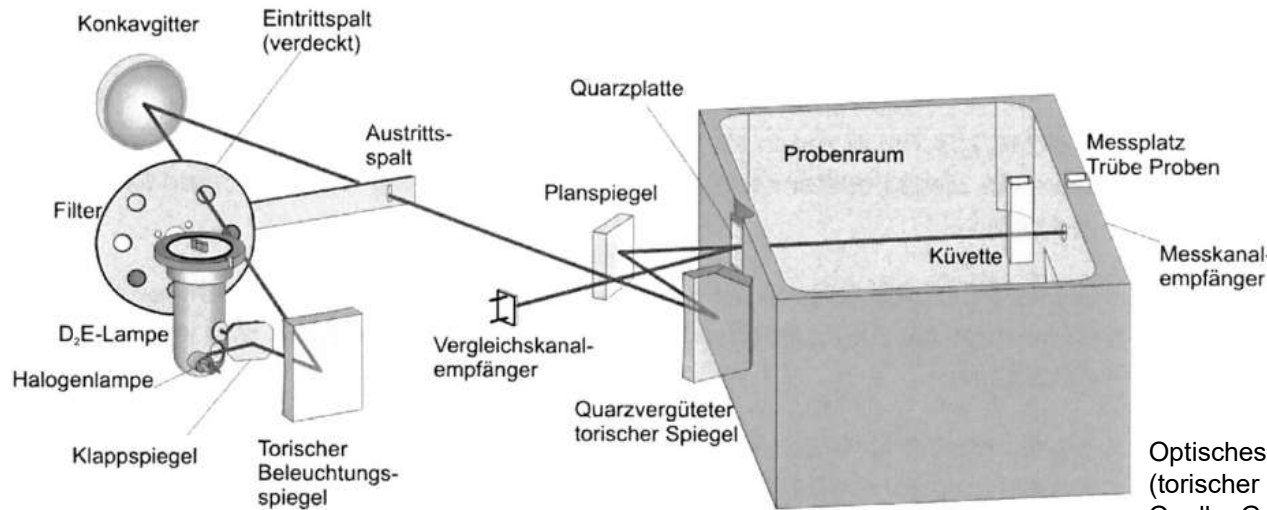
UV/Vis-Gerät im Praktikum

Verbaute Elemente (s. unten)

- Halogen- und D₂-Lampe
- Monochromator-Beugungsgitter
 - (großer) Probenraum
 - Küvettenhalter
- Empfänger (Detektion)

Zusätzliche Elemente

- diverse Spiegel
 - Filterrad
 - Spalte

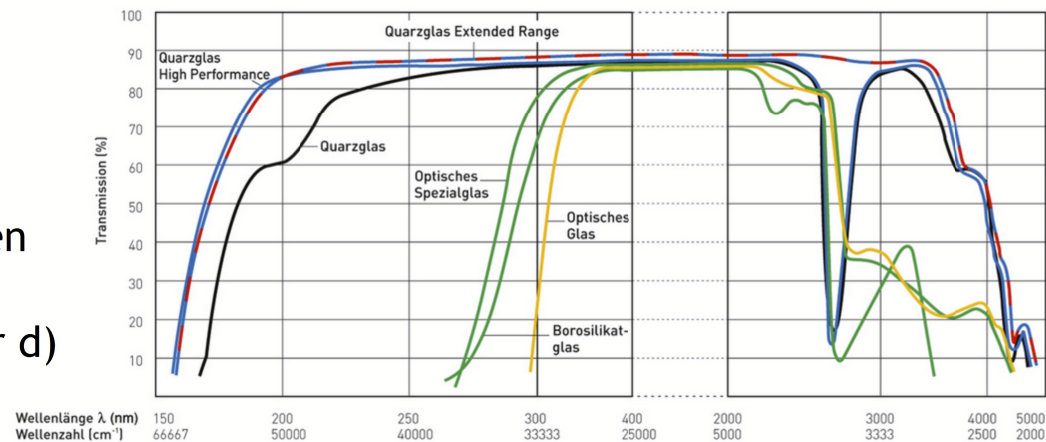


Optisches Schema des SPECORD 50 PLUS
(torischer Spiegel, Abschnitt eines Ringes)
Quelle: Geräteanleitung, Analytik Jena, 2013

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



Durchlässigkeit von Gläsern, Quelle: Hellma GmbH & Co. KG
<https://www.hellma.com/de/kuetten-laborprodukte/>

Typen

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

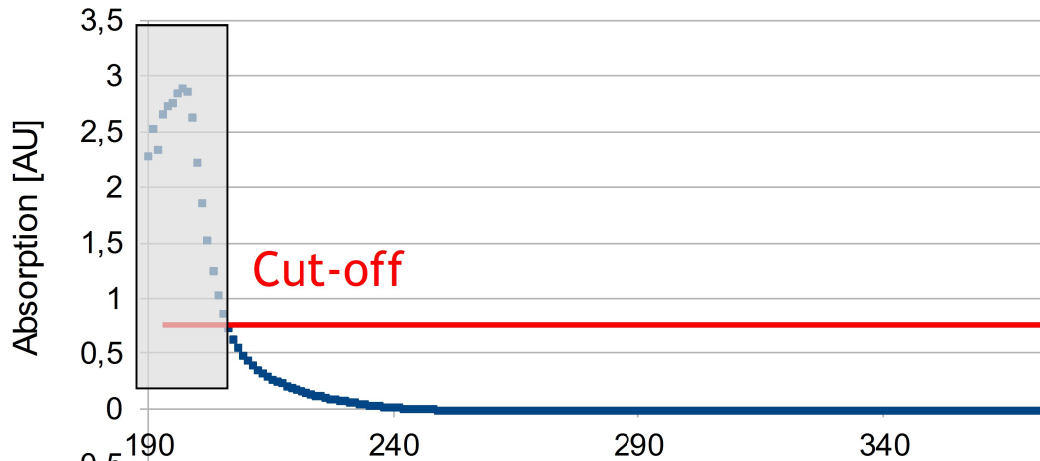
Obacht: genau senkrecht zum Lichtstrahl;
keine Verschmutzungen, Fingerabdrücke,
Kratzer, Blasen, Suspensionen oder Partikel



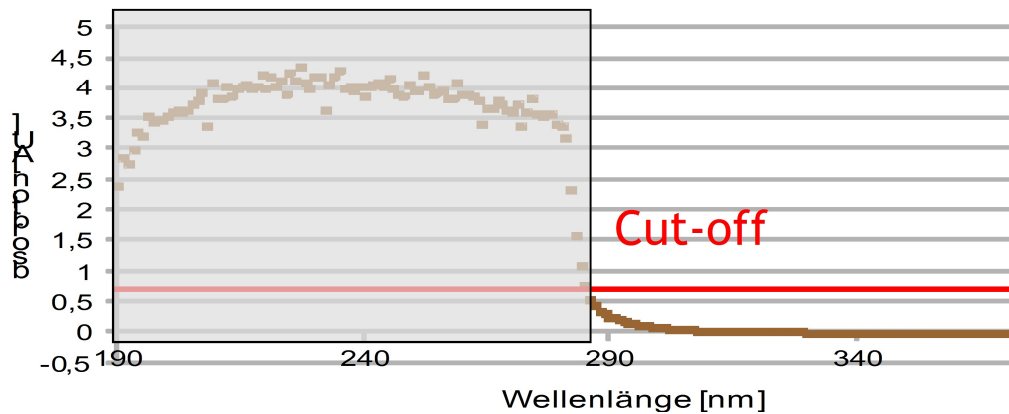
Quelle: eigenes Foto

Unterschiedliche Nutzbereiche von Lösungsmitteln

Reines Methanol



Reines Toluol

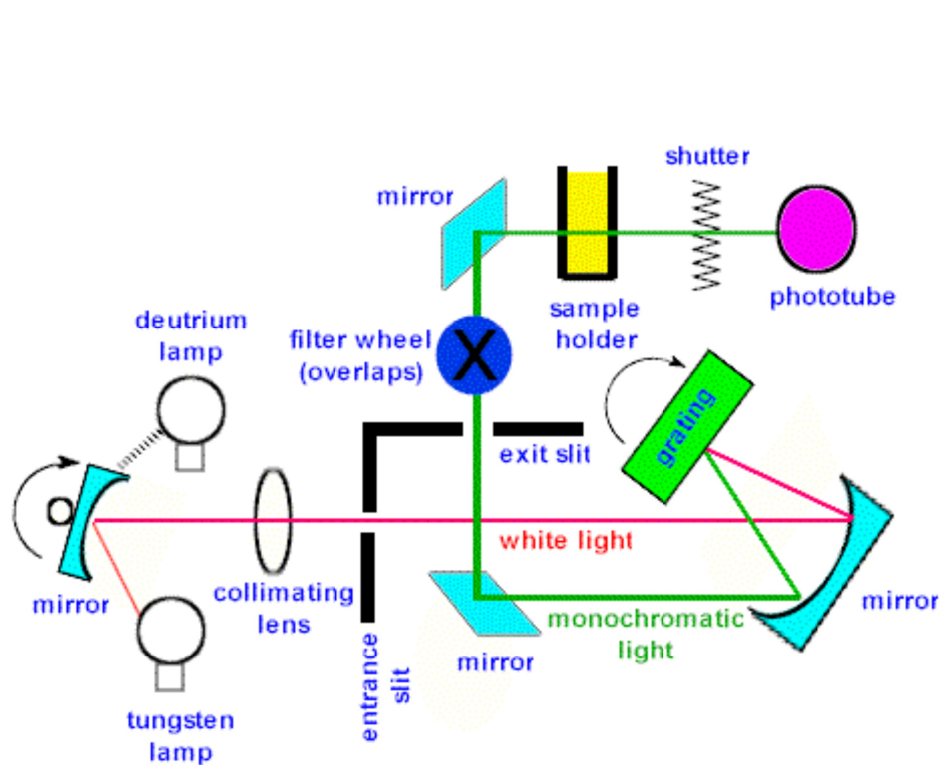


Kriterien

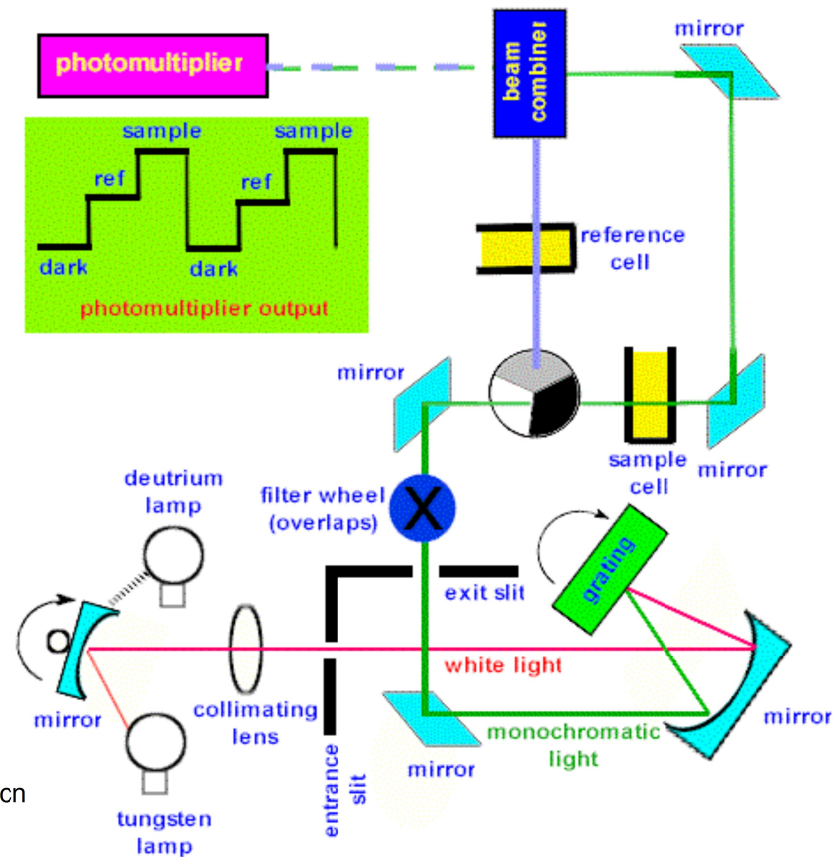
- Gute Lösungseigenschaften
- nicht zu hoher Dampfdruck
- nicht entflammbar/giftig
- UV-Vis-Durchlässigkeit
- Niedrige Cut-off-Wellenlänge (bei d=10 mm: T < 25 % o. A > 0,6)
- Achtung auch bei Puffern wie HPO₄⁻

Lösungsmittel	Formel	λ cut-off (nm)
Wasser	H ₂ O	195
Hexan	C ₆ H ₁₄	199
Methanol	CH ₃ OH	210
Cyclohexan	C ₆ H ₁₂	211
Chloroform	CHCl ₃	246
Dimethylsulfoxid	(CH ₃) ₂ SO	270
Aceton	(CH ₃) ₂ 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 (RSC)

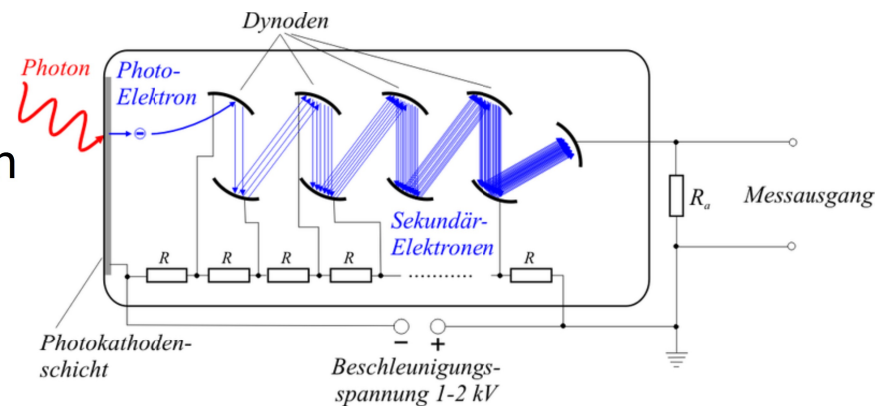
Detektoren

Fotozelle

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

Fotomultiplier (-Folie)

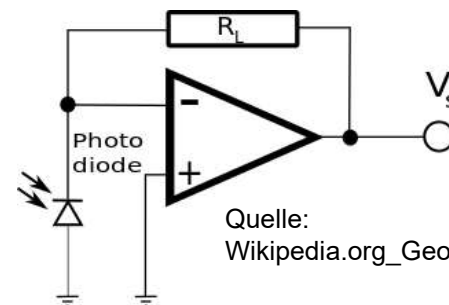
- Photozelle, deren Primärelektronen in Elektronenkaskaden verstärkt werden
(vgl. MS-Detektoren)



Quelle: Wikipedia.org_Jkrieger

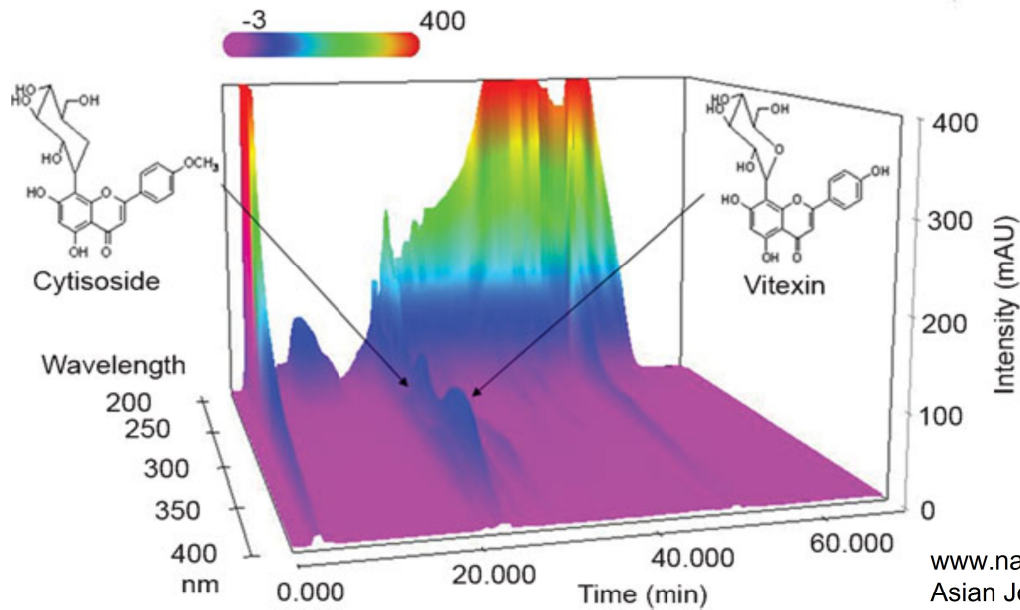
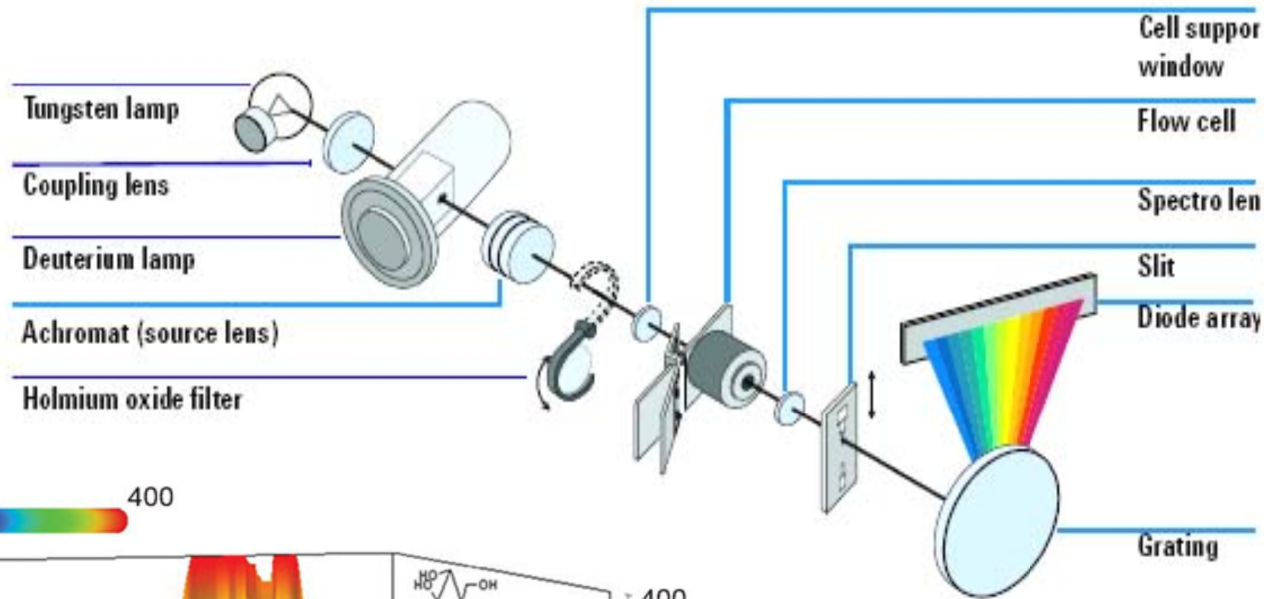
Fotodiode

- 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

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

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

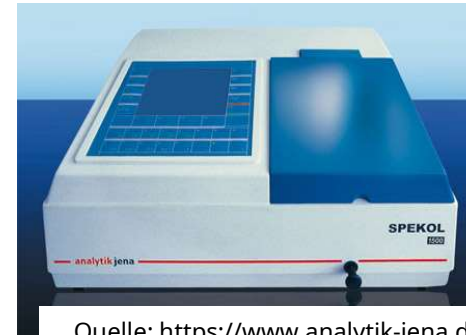
- einfach (bekannte Optik) und empfindlich, schnell
- quantitatives Signal, reproduzierbar und robust

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/>



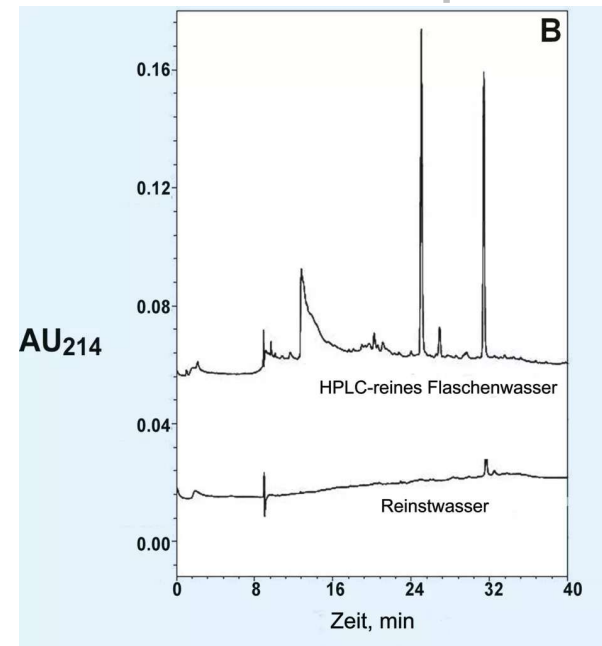
Quelle: www.perkinelmer.com



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

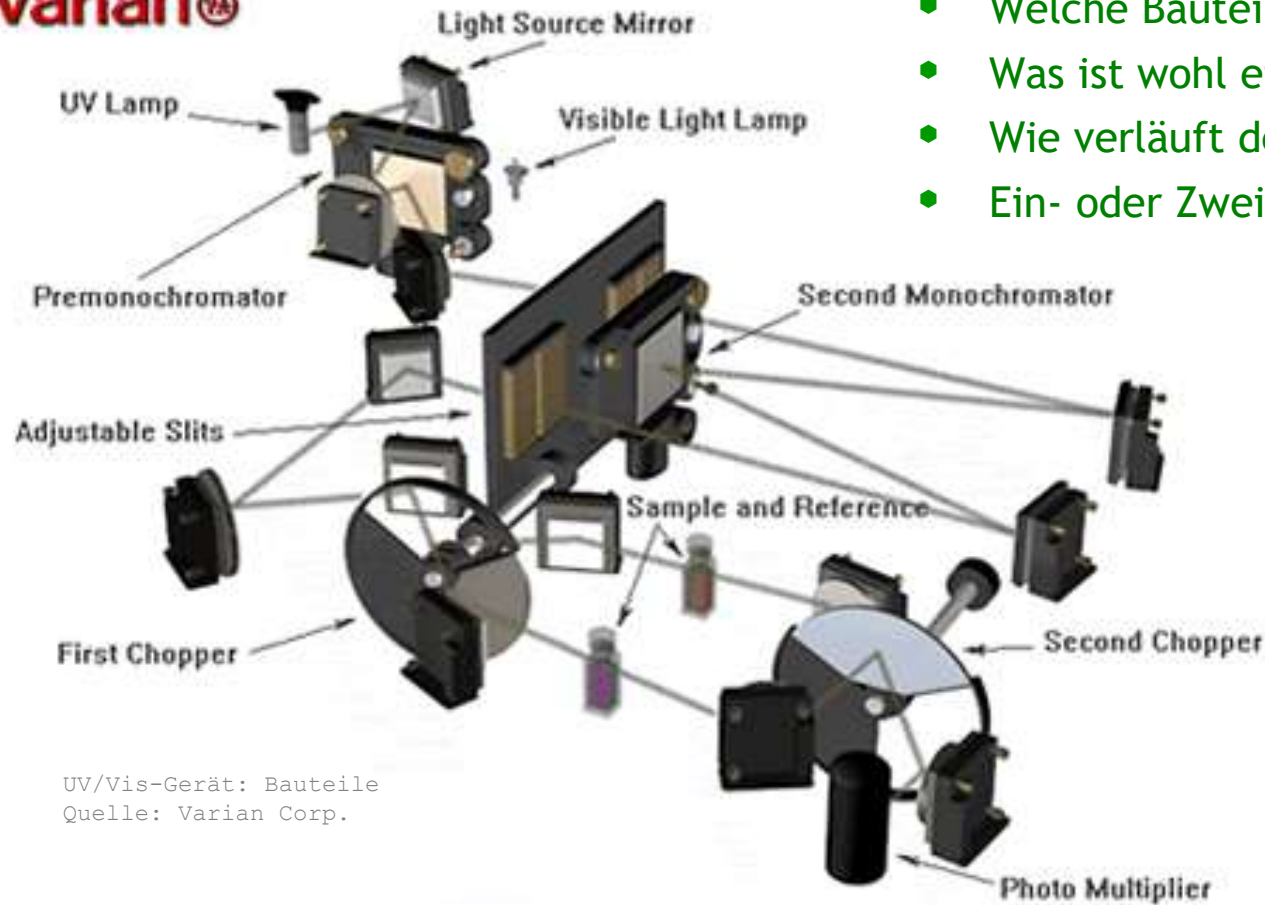
- Was bedeutet eine Absorbanz von 2 und warum sind einfache Detektoren hier oft schon an ihrer Grenze, Spektrometer aber erst bei $A \approx 3$?
- Warum sind die meisten Stoffe in der Biochemie farblos?
- Welche Gruppen machen Farbe?
 - in Naturstoffen
 - synth. Farbstoffen
 - Farbigen Stoffen im Labor
- 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?