



# Infrarotspektroskopie

## Quantitative und Qualitative Bestimmung von Citronensäure und Sekundärstrukturanalyse von Polylysin

### Versuchsdurchführende

Tom Oberländer (633676)  
Huyen Anh Nguyen (572309)

### Versuchsort

Invalidenstraße 42, Erdgeschoss rechts  
Institut für Biophysik

### Versuchsbetreuer

Prof. Dr. Franz Bartl

5. Juli 2024

# Contents

<b>1 Einführung</b>	<b>1</b>
<b>2 Material und Methode</b>	<b>2</b>
2.1 Citronensäure-Messungen . . . . .	2
2.2 Polylysin . . . . .	2
<b>3 Ergebnis</b>	<b>2</b>
3.1 Qualitative und Quantitative Bestimmung von Citronensäure . . . . .	3
3.1.1 Konzentrationsbestimmung von Citronensäure . . . . .	7
3.2 Sekundärstrukturaufklärung von Polylysin . . . . .	7
<b>4 Error estimation</b>	<b>7</b>
<b>5 Diskussion</b>	<b>7</b>
5.1 Citronensäure . . . . .	7
5.2 Polylysin . . . . .	7
<b>6 Anhang</b>	<b>7</b>
6.1 Rohdaten . . . . .	7
6.1.1 Standardreihe Citronensäure . . . . .	8
<b>References</b>	<b>8</b>

## 1 Einführung

Anders als in der klassischen Spektroskopie wird in der Infrarot (abgekürzt:IR) - Spektroskopie nicht die Änderung der Energiezustandes der Elektronen in der äußersten Schalen der zu untersuchende Substanz untersucht, sondern die Änderung der Schwingungszustandes des Moleküles. Die Energie, die ein Molekül bzw Atom von den IR-Strahlungen absorbiert, ist ausreichend um die Rotationszustandes eines Moleküls und die Schwingungszustandes einer Bindung charakteristisch zu verändern. Dadurch ist es möglich die Struktur eines Moleküles zu untersuchen.

In der Infrarotspektroskopie gibt es unterschiedliche Methoden, wie die Infrarotwellen genutzt werden kann um die Proben zu untersuchen.

Der Klassiker in der Spektroskopie ist die Transmissionsspektroskopie. Dort wird die Probe mit Infrarotstrahlung bestrahlt und die durchgegangene Strahlung am Detektor gemessen. Je nach dem wie IR-aktiv ein Stoff ist, wird mehr oder weniger absorbiert, wodurch dann ein bestimmtes Bandenmuster gemessen werden kann. Bei den Proteinen gibt es neun verschiedene IR-aktive Schwingungen, die in bestimmten Wellenzahlintervallen (Absorptionsbanden) liegen. Die Banden werden als Amid A,B, I bis VII - Bande bezeichnet.

Für die Sekundärstrukturaufklärung in Proteinen ist die Amid I Bande am wichtigsten, da diese zum größtenteils durch die C=O Streckschwingung der Peptidbindung verursacht wird. Die Amid I Bande ist eine Kombination aus C=O - Valenzschwingungen, C-N-Streckschwingungen und N-H-Deformationsschwingungen, die in den Bereich  $1600-1700\text{ cm}^{-1}$  liegen. Aufgrund dieser IR-Aktivität der Peptidbindung, kann die Sekundärstruktur von Polylysin bei den Bedingungen :

- neutralen pH und auf Eis
- basischen pH und auf Eis
- basischen pH und auf  $50^{\circ}\text{C}$  erhitzt

untersucht werden.

Eine andere Messmethode in der Infrarotspektroskopie ist die attenuated total Reflexion (abgekürzt:

ATR) - Spektroskopie. Hier wird die Probe auf ein Kristall (Zinksilicium) aufgetragen und die Infrarotstrahlungen so auf das Kristall bestrahlt, so dass eine Totalreflexion im Kristall entsteht. Dabei bildet sich an der Grenzfläche eine evaneszente Welle, die mit der Probe interagieren kann. Durch die Interaktion wird die Intensität der reflektierte IR-Strahlung abgeschwächt.<sup>1</sup> Die Intensität der reflektierten IR-Strahlung ist ebenfalls von der Probe abhängig, wodurch dieses Messprinzip verwendet werden kann, um feste aber auch flüssige Proben, wie die Citronensäure, zu charakterisieren. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die Messung unabhängig von der Probenmenge<sup>5</sup> ist.

Für diesen Versuch werden die beiden Messmethoden verwendet um die Sekundärstruktur von Polylysin bei neutralen, basischen pH-Wert und bei 50°C zu untersuchen.

## 2 Material und Methode

Alle Messungen wurden am IFS 66v/S Spektrometer (Bruker, Berlin - Humboldt Universität zu Berlin am Biophysik Institut) durchgeführt.

Für die Maximabestimmung wurden mit der Gaussfunktion die Peaks in den ausgewählten Wellenzahlbereich in Python (scipy, curve\_fit) gefittet.

### 2.1 Citronensäure-Messungen

Die Citronensäureproben wurden in Wasser gelöst und bei Normaldruck und 20 Grad Celsius auf die ATR-Zelle (Zink-Siliciumkristall) aufgetragen und das ART-Spektrum gemessen.

Gegen die Standardkurve, welches nach Table 5 hergestellt wurde, wurde die Konzentration der zwei unbekannten Citronensäureproben bestimmt.

Als Blanklösung wurde entionisiertes Wasser verwendet.

### 2.2 Polylysin

Polylysin wurde in Deuteriumoxid gelöst und das Transmissionsspektrum im Vakuum gemessen.

Die Proben wurden vor der Messung vorher in drei unterschiedlichen Bedingungen vorbehandelt:

- bei neutralen pH-Wert auf Eis
- bei pH = 11.62 (pH-Einstellung mit Natronlauge)
- 3 Minuten mit einer Heißluftpistole aufheizen

Als Blanklösung wurde Deuteriumoxid verwendet.

## 3 Ergebnis

Die Kurven wurden am Hochpunkt mit der Gaussfunktion (Gl 1) gefittet und so die Maximawerte bestimmt.

$$f(x) = a \cdot e^{-\frac{(x-x_0)^2}{2 \cdot \sigma^2}} \quad (1)$$

### 3.1 Qualitative und Quantitative Bestimmung von Citronensäure

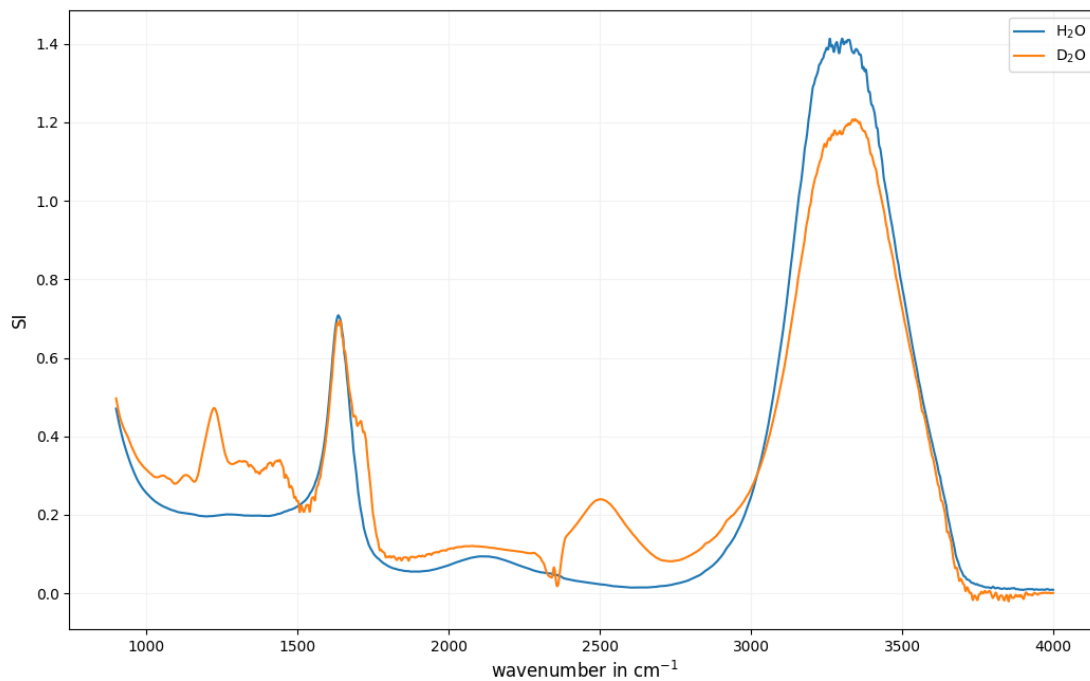


Figure 1: Infrarotspektrum von Wasser und Deuteriumoxid.

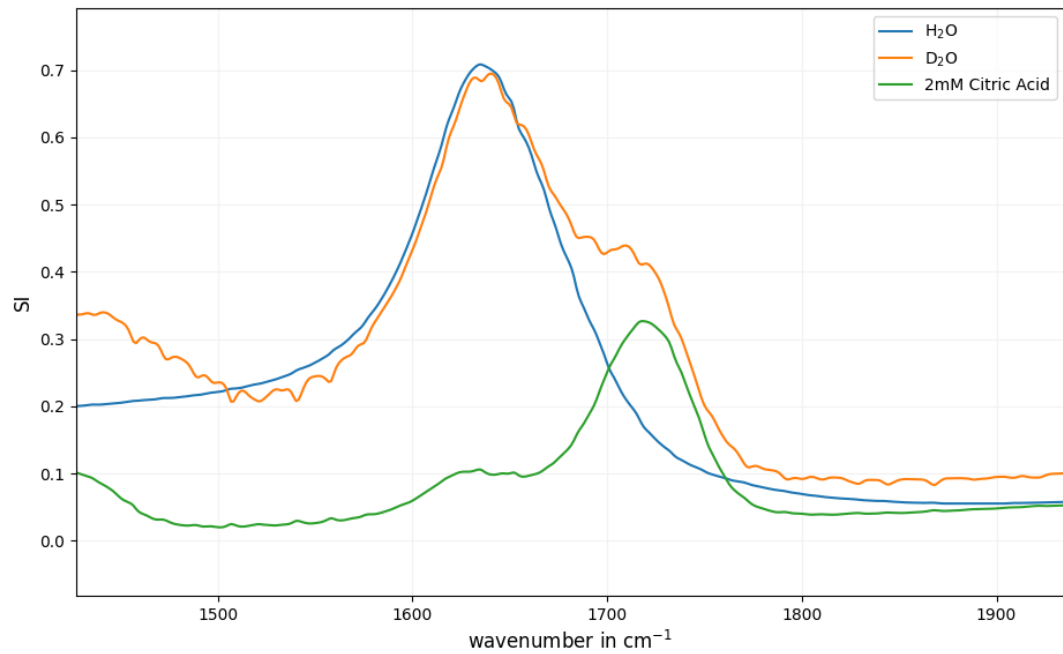


Figure 2: Infrarotspektrum von Wasser, Deuteriumoxid und Citronensäure in Wasser im Wellenzahlbereich von 1450- 1930 cm<sup>-1</sup>.

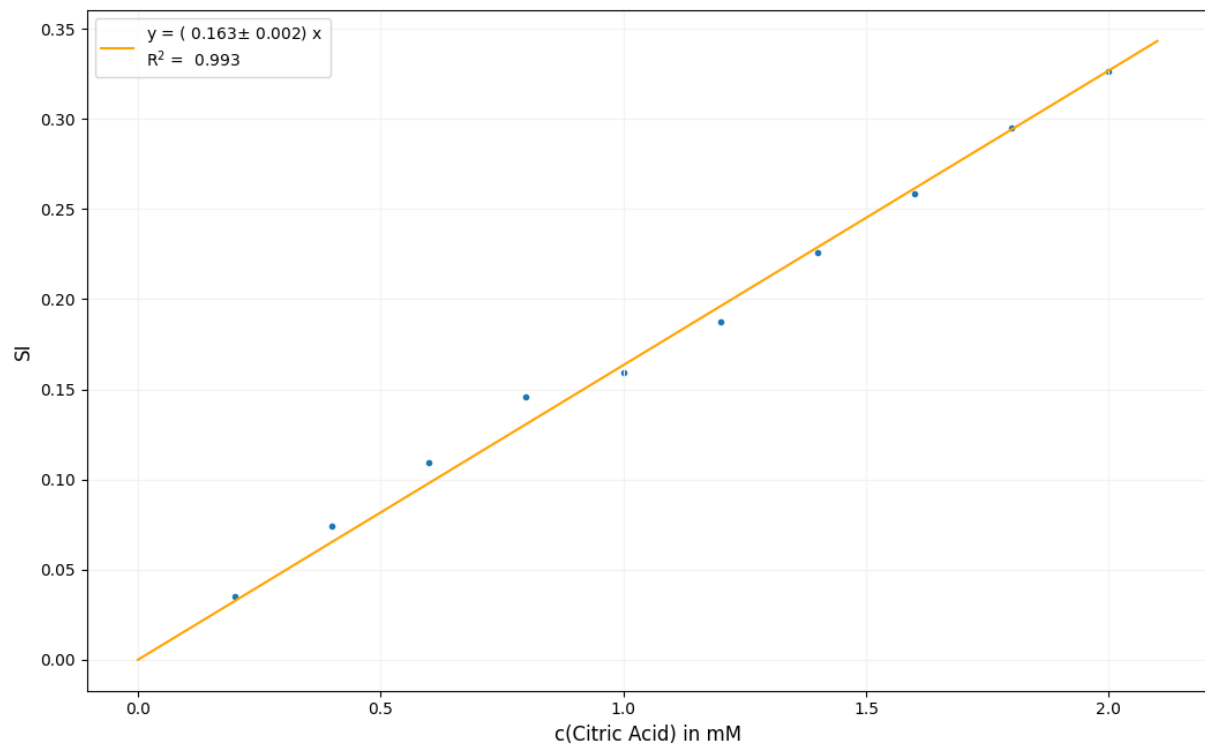


Figure 3: Infrarotspektrum von der Standardreihe von Citronensäure in Wasser von 0.2 bis 2 mM.

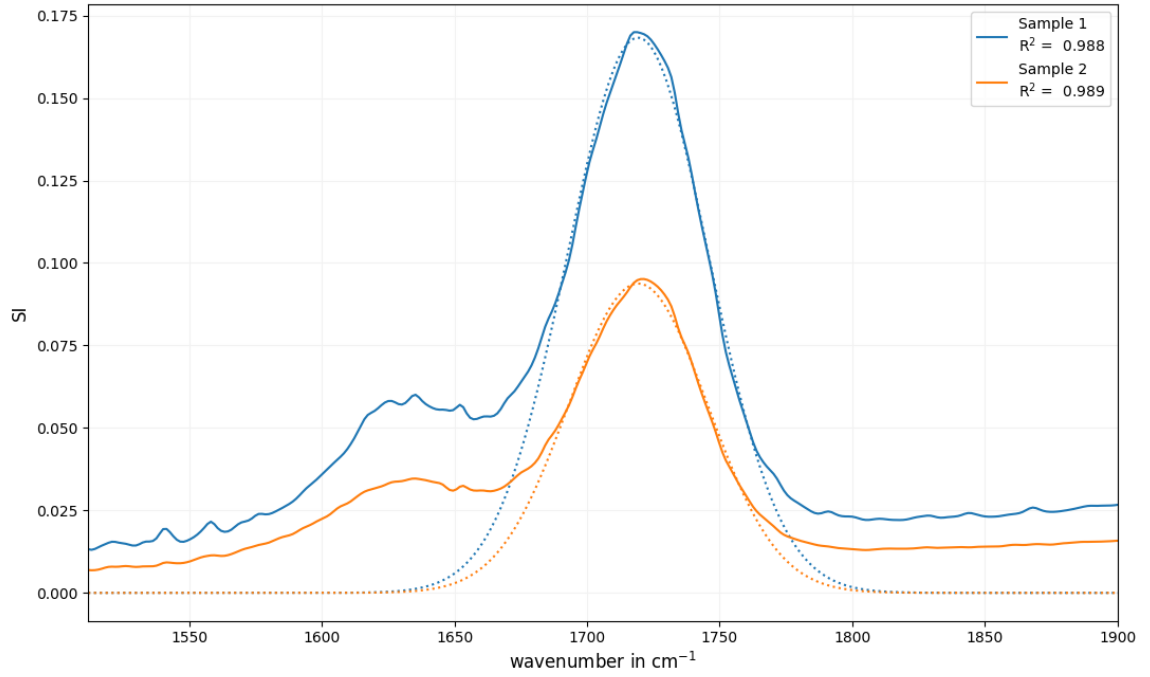


Figure 4: Infrarotspektrum der unbekannten Citronensäuren Proben.

Table 1:  $R^2$ -Werte des Gauss-Fitmodells für die Citronensäure-Standardreihe.

c(Citronensäure) in mM	Maxima SI	$R^2$ -Werte
0.2	0.033	0.982
0.4	0.073	0.990
0.6	0.108	0.989
0.8	0.144	0.990
1.0	0.158	0.990
1.2	0.186	0.991
1.4	0.223	0.990
1.6	0.256	0.990
1.8	0.292	0.989
2.0	0.323	0.990

Table 2: Molare Konzentration der Unbekannten Citronensäureproben berechnet aus der Standardkurve in Figure 3.

Samplename	c(Sample) in mM
Sample 1	$1.04 \pm 0.012$
Sample 2	$0.58 \pm 0.007$

### 3.1.1 Konzentrationsbestimmung von Citronensäure

### 3.2 Sekundärstrukturaufklärung von Polylysin

## 4 Error estimation

## 5 Diskussion

### 5.1 Citronensäure

### 5.2 Polylysin

## 6 Anhang

### 6.1 Rohdaten

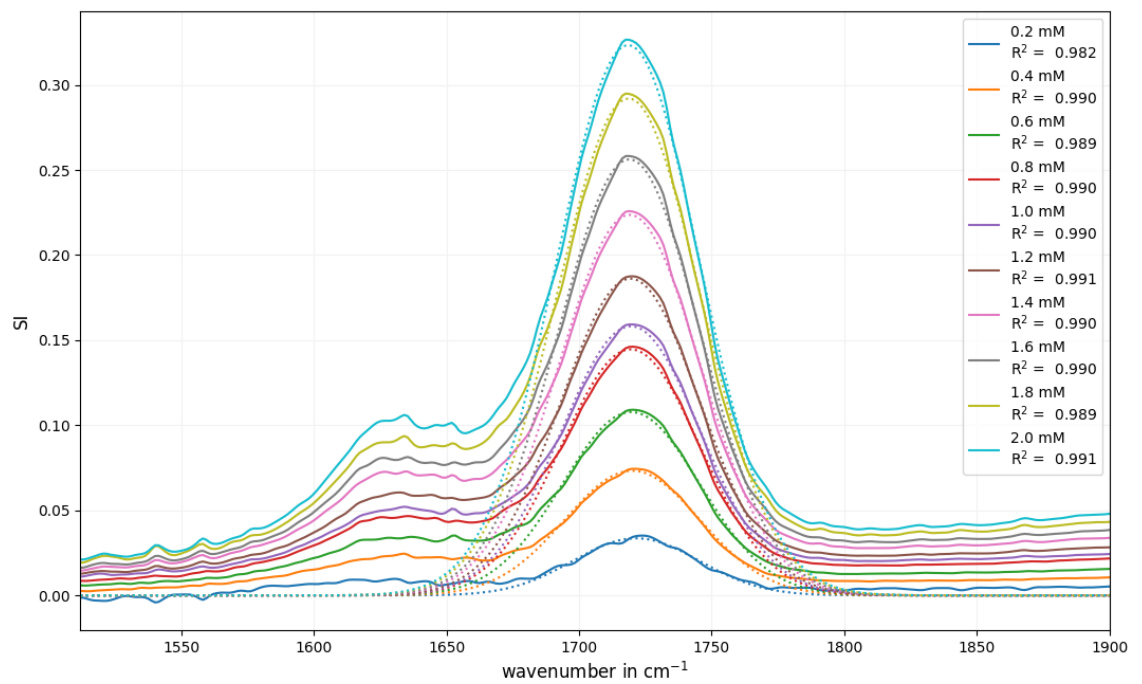


Figure 5: Infrarotspektrum der Verdünnungsreihe von Citronensäure in Wasser und der gaussche Fit des Maxima.



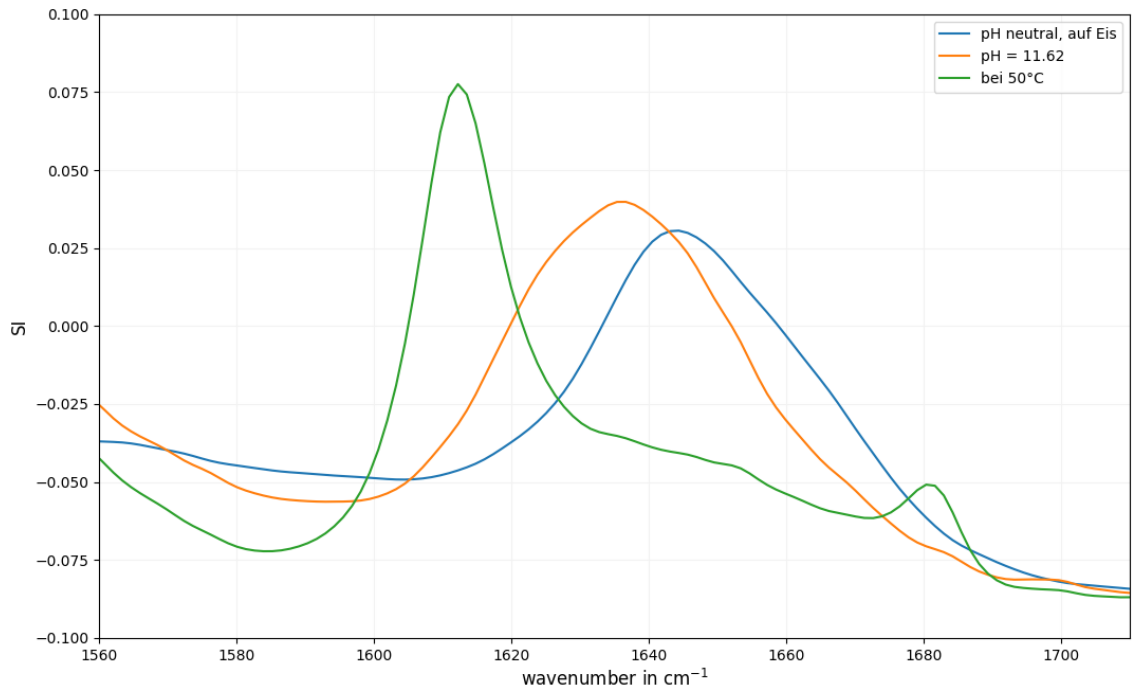


Figure 6: Infrarot-Transmissionsspektrum von Polylysine ( $\beta \approx 10 \text{ mg/mL}$  in  $\text{D}_2\text{O}$ ) bei unterschiedlichen Bedingungen.

### 6.1.1 Standardreihe Citronensäure

Table 3: Pipettierschema der Standardreihe von Citronensäure in  $\text{H}_2\text{O}$ . Die molare Konzentration der Stammlösung beträgt 2mM in Wasser.

c(Citronensäure) in mM	V(2mM Citronensäure) in mL	V( $\text{H}_2\text{O}$ in mL)
2.0	2.0	0.0
1.8	1.8	0.2
1.6	1.6	0.4
1.4	1.4	0.6
1.2	1.2	0.8
1.0	1.0	1.0
0.8	0.8	1.2
0.6	0.6	1.4
0.4	0.4	1.6
0.2	0.2	1.8
0.0	0.0	2.0

## References

<sup>1</sup> Atr-infrarotspektroskopie. gelesen: 17. Juli 2024, 19:48 Uhr. URL: <https://de.wikipedia.org/wiki/ATR-Infrarotspektroskopie>.

<sup>2</sup> Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung IAP. Spektrometrie. gelesen: 13. Juli 2024, 08:48 Uhr. URL: <https://www.iap.fraunhofer.de/de/Analytik/spektrometrie.html>.

- <sup>3</sup> 3 Sergei Yu. Venyaminov<sup>2</sup> and Franklyn G. Prendergast. Water (h<sub>2</sub>O and d<sub>2</sub>O) molar absorptivity in the 1000–4000 cm<sup>−1</sup> range and quantitative infrared spectroscopy of aqueous solutions. 1997. doi:10.1006/abio.1997.2136.
- <sup>4</sup> Waclaw Kolodziejski Sylwester Krukowski, Mateusz Karasiewicz. Convenient uv-spectrophotometric determination of citrates in aqueous solutions with applications in the pharmaceutical analysis of oral electrolyte formulations. 2016. doi:10.1016/j.jfda.2017.01.009.
- <sup>5</sup> Mettler Toledo. Abgeschwächte totalreflexion atr. gelesen: 17. Juli 2024, 19:48 Uhr. URL: [https://www.mt.com/de/de/home/applications/L1\\_AutoChem\\_Applications/ftir-spectroscopy/attenuated-total-reflectance-atr.html](https://www.mt.com/de/de/home/applications/L1_AutoChem_Applications/ftir-spectroscopy/attenuated-total-reflectance-atr.html).