



# Infrarotspektroskopie

## ATR und Transmissionsspektroskopie

### **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 Wasser und Deuteriumoxid Infrarotspektrum . . . . .	2
3.2 Charakterisierung von Citronensäure . . . . .	3
3.3 Sekundärstrukturanalyse von Polylysin . . . . .	5
<b>4 Diskussion</b>	<b>6</b>
4.1 Wasser und Deuteriumoxid . . . . .	6
4.2 Polylysin . . . . .	9
<b>5 Anhang</b>	<b>9</b>
5.1 Rohdaten . . . . .	9
<b>References</b>	<b>11</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 ein Komposition 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 Bedingung :

- 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 IR-Spektroskopie ist die attenuated total Reflexion (abgekürzt: ATR) - Spektroskopie. Hier wird die Probe auf ein Kristall (Zinksilicium-Kristallzelle) aufgetragen und die IR-Strahlungen 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.

Auf der ATR-Zelle (Zinksilicium-Kristall) wurde so viel Wasser und Deuteriumoxid raufpipettiert, bis dieser vollständig bedeckt war und davon ein Infrarotspektrum jeweils aufgenommen.

Für die Konzentrationsbestimmung der Proben wurde ein linearen Fit mit der Funktion `curve_fit` (scipy, Python) durchgeführt.

### 2.1 Citronensäure-Messungen

Die Citronensäureproben wurden in Wasser gelöst und bei Normaldruck und 20 Grad Celsius auf die ATR-Zelle aufgetragen und das IR-Spektrum gemessen.

Das Gleiche wurde für die Verdünnungsreihe (Pipettierschema siehe Table: 7) durchgeführt.

Als Blanklösung wurde entionisiertes Wasser verwendet.

### 2.2 Polylysin

Polylysin (grob 10 mg/mL) 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

### 3.1 Wasser und Deuteriumoxid Infrarotspektrum

Beide besitzen ähnliche IR-Banden im Bereich von  $1500 - 1900\text{cm}^{-1}$  und  $3000 - 4000\text{cm}^{-1}$  auf. Deuteriumoxid besitzt noch zwei weitere Banden bei  $100 - 1500\text{cm}^{-1}$  und  $2400 - 2800\text{cm}^{-1}$  (siehe Figure 1) .

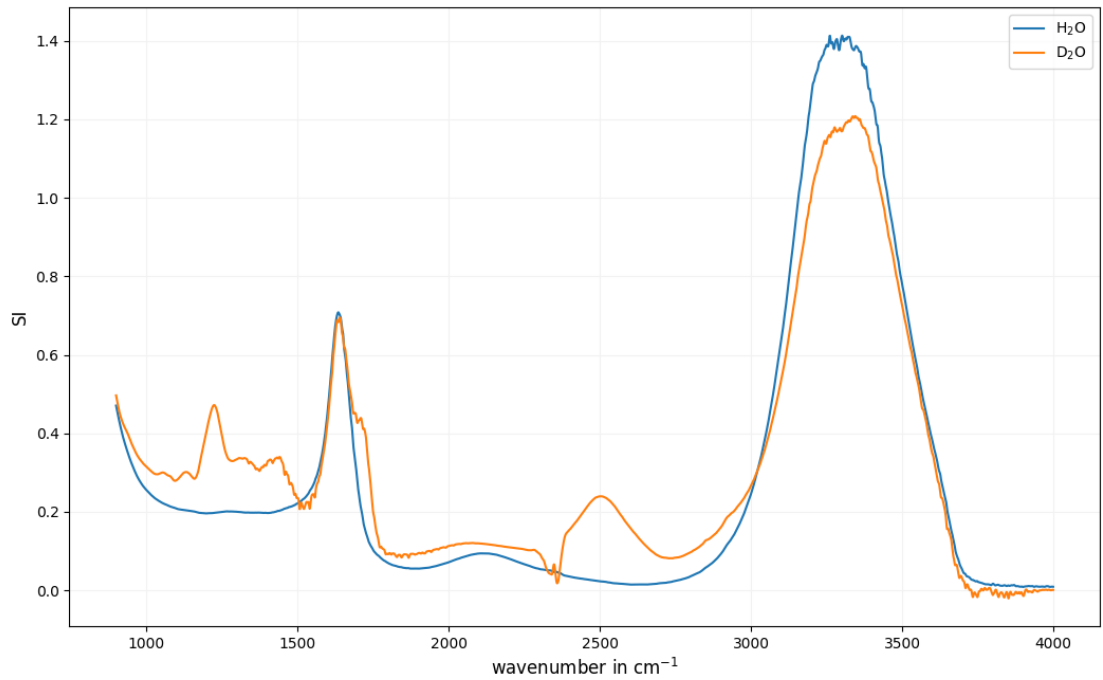


Figure 1: Infrarotspektrum von Wasser und Deuteriumoxid.

### 3.2 Charakterisierung von Citronensäure

In Figure 2 wurde verglichen, ob Wasser oder Deuteriumoxid die Messung von Citronensäure behindern.

Die  $SI_{max}$  von Citronensäure liegt ungefähr im Bereich von  $1718\text{ cm}^{-1}$  und überlappt mit Wasser und Deuteriumoxid.

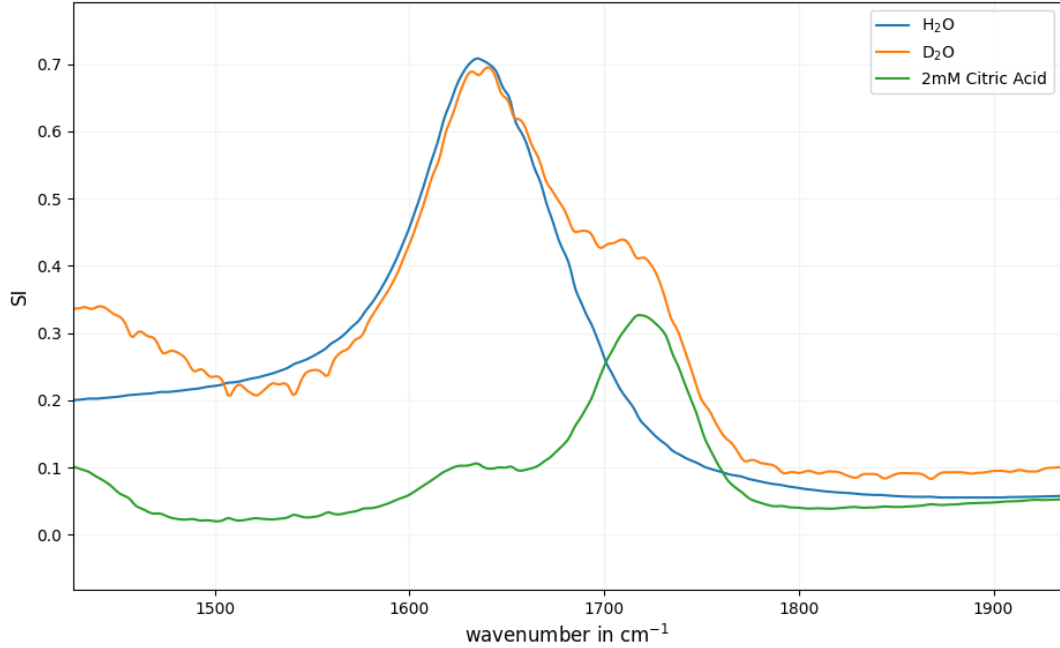


Figure 2: Vergleich der Bande von Wasser, Deuteriumoxid und Citronensäure in Wasser im Wellenzahlbereich von 1450- 1930  $\text{cm}^{-1}$ .

Für die Konzentrationsbestimmung der unbekannten Proben, wurde eine Standardsreihe (oder auch Verdünnungsreihe genannt) hergestellt und gemessen.

Die  $SI_{max}$  der einzelnen Standardkonzentrationen wurden in Abhängigkeit der Citronenkonzentration aufgetragen (siehe Figure 3).  $a$  ist die Steigung der gefittete Gerade. Die Datenpunkte wurden nach der Gleichung (1) gefittet und die Konzentration der Proben (in Table 1) wurden nach Gleichung (2) ermittelt.

$$SI_{max}(c) = a \cdot c \quad (1)$$

$$c = \frac{SI_{max}}{a} \quad (2)$$

Table 1: 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	$0.58 \pm 0.007$

Eine unvollständige Gauss'sche Fehlerfortpflanzung (siehe in Gleichung (3)) wurde hier für die Unbekannten durchgeführt, da nicht die Messungenauigkeit des IFS 66v/S Spektrometer notiert wurde. Zudem werden auch die Fehler der Pipette vernachlässigt.

$$\Delta c = \sqrt{\left(\frac{SI_{max}}{a^2}\right)^2 \cdot \Delta a} \quad (3)$$

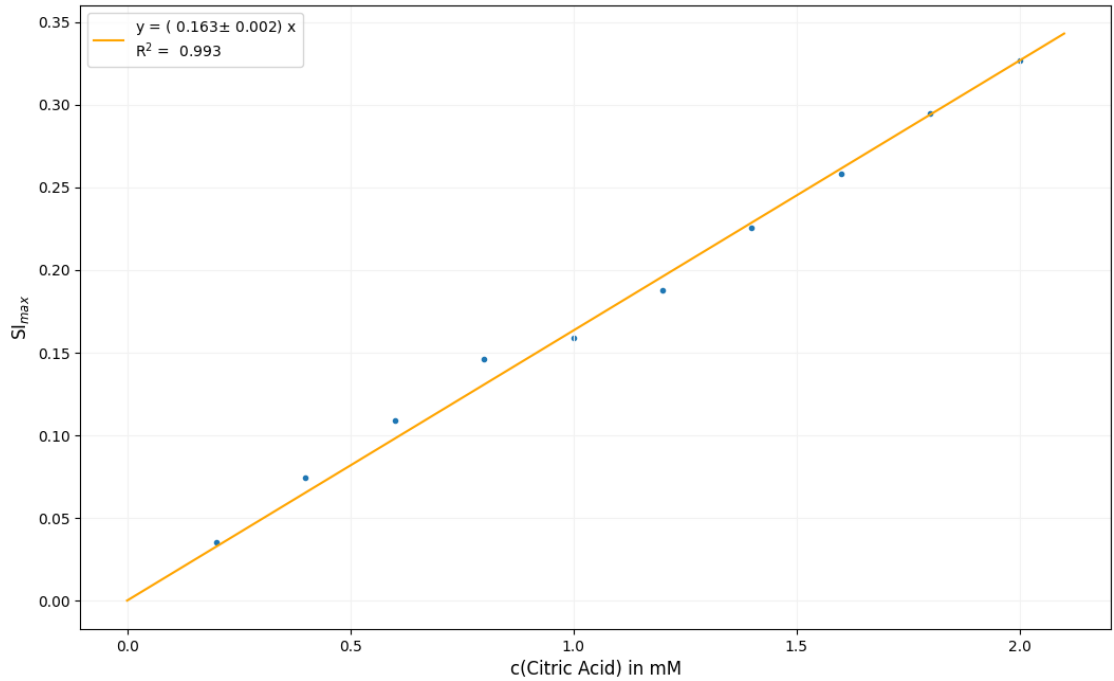


Figure 3: Die Abhängigkeit der maximale Signalintensität von Citronensäure in Wasser von der molaren Konzentration.

### 3.3 Sekundärstrukturanalyse von Polylysine

In Figure 4 wurden die drei IR-Spektrum im Wellenzahlbereich von  $1560 - 1750 \text{ cm}^{-1}$  dargestellt. Polylysine zeigt bei neutralem und basischen Bedingung jeweils ein  $SI_{max}$  im Bereich von circa  $1640 \text{ cm}^{-1}$ . Wird Polylysine auf  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$  aufgeheizt, sind zwei  $SI_{max}$  bei  $1612$  und  $1680 \text{ cm}^{-1}$  sichtbar (siehe Table 2).

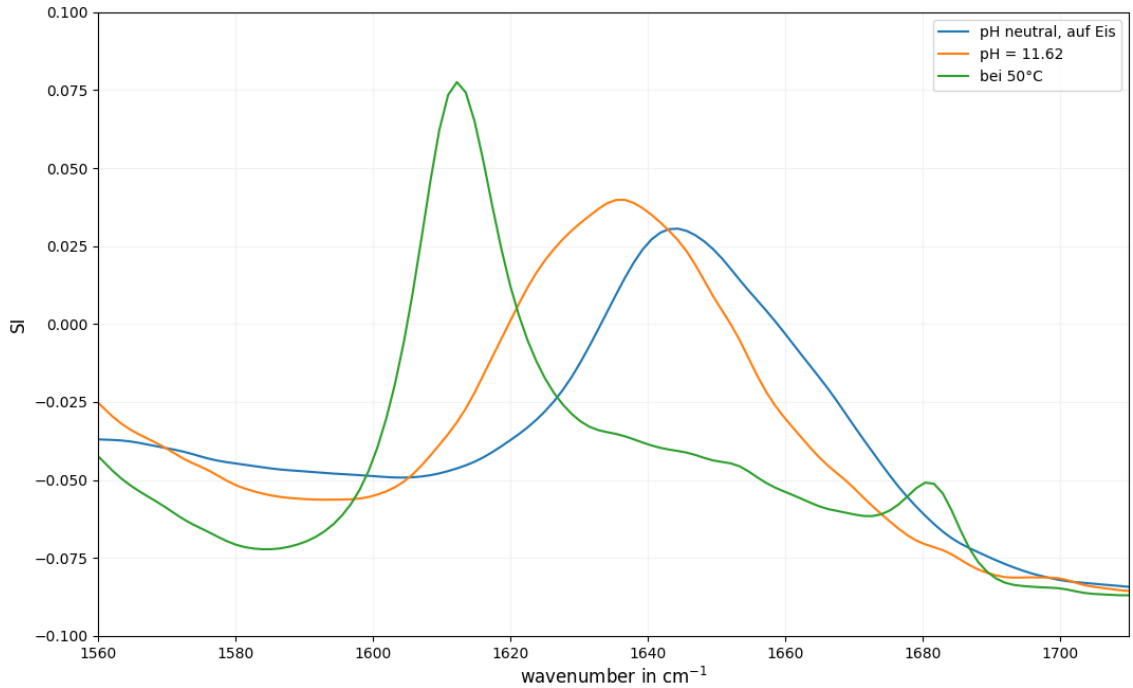


Figure 4: IR-Transmissionsspektrum von Polylysin ( $\beta \approx 10$  mg/mL in  $D_2O$ ) bei unterschiedlichen Bedingungen im Wellenzahlbereich von  $1560 - 1750 \text{ cm}^{-1}$ .

Table 2: Wellenzahl von Polylysin bei unterschiedlichen Bedingungen, wo im Bereich von  $1560 - 1750 \text{ cm}^{-1}$  eine maximale Signalintensität zu sehen ist.

Bedingung	wavenumber <sub>max</sub> in $\text{cm}^{-1}$
pH neutral	1644
pH = 11.62	1636
50°C	1612
	1680

## 4 Diskussion

### 4.1 Wasser und Deuteriumoxid

In Figure 1 wurde das IR-Spektrum von Wasser und Deuteriumoxid dargestellt. Den Kurvenverlauf der beiden ähneln sich sehr. Bei der Datensicherung könnte eventuell ein Fehler unterlaufen sein, da Deuteriumoxid in dem Bandenbereich von Amid I der Proteine eine schwache  $SI_{max}$  bei  $1555 \text{ cm}^{-1}$ <sup>3</sup> zeigt und eine mittelstarke  $SI_{max}$  bei  $1209 \text{ cm}^{-1}$ <sup>3</sup>. In diesen Fall ist die  $SI_{max}$  bei beiden Banden relativ gleich stark und hoch.

Vermutet wird, dass die in Figure 1 dargestellte Deuteriumoxid IR-Spektrum sich eventuell von einem Citronensäure in Deuteriumoxid gelöst handelt.

Wird das komplette IR-Spektrum der Proben dargestellt, wie in Figure 5, dann sind viele Peaks der Citronensäure ähnlich wie von der Deuteriumoxid oder um etwas anderes, nur nicht reinem

Deuteriumoxid.

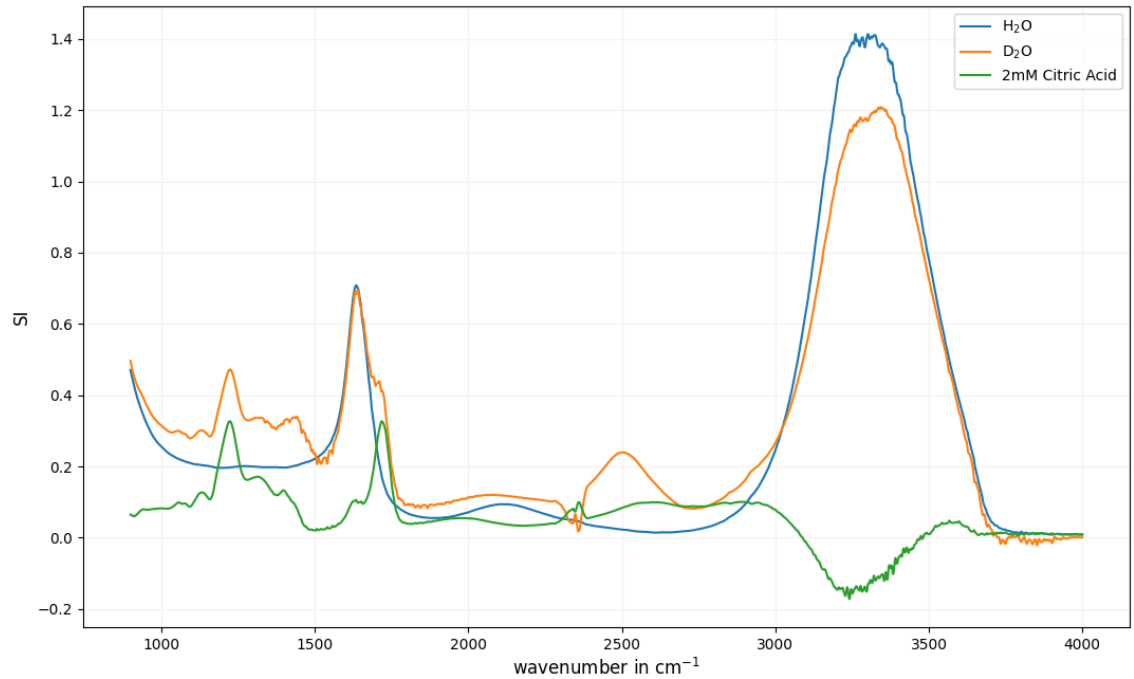


Figure 5: Infrarotspektrum von Wasser, Deuteriumoxid und 2 mM Citronensäure

Für die Amid I Bande bei der Proteinstrukturanalyse wird gerne Deuteriumoxid verwendet, da dort die Absorption nicht so intensiv ist wie bei Wasser und deswegen bei der Messung nicht stört. Wie aber in Figure 6 zu sehen ist, sind die Peaks von Wasser und Deuteriumoxid gleich hoch und überlappen sehr die Peaks des Peptids.



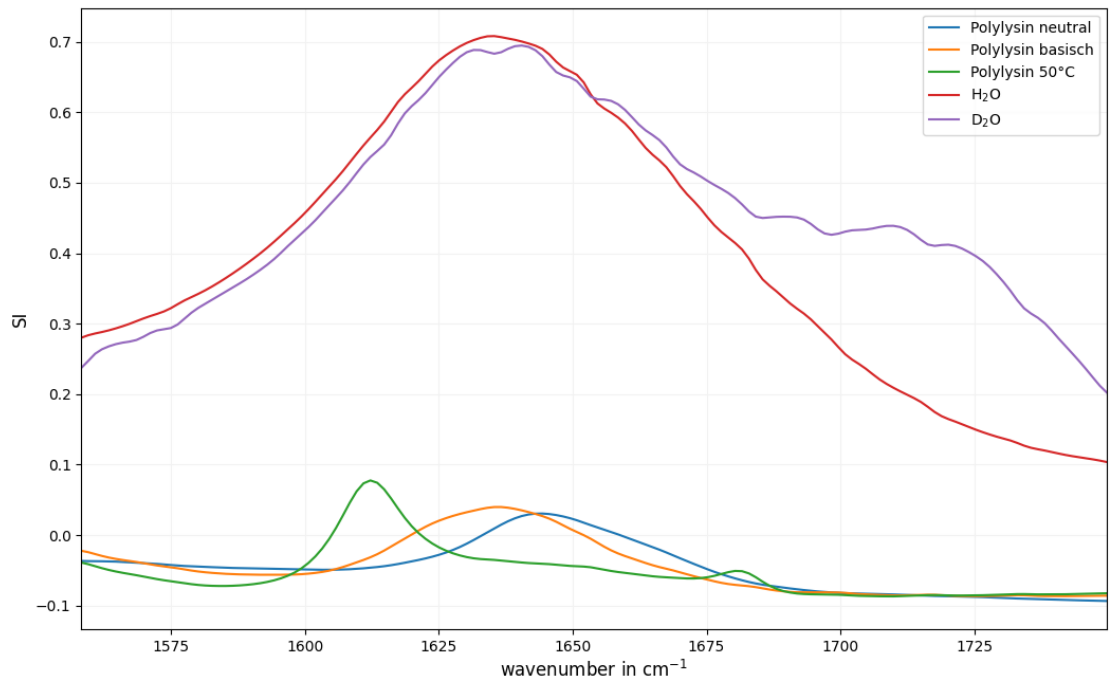


Figure 6: Signalintensität von Wasser, Deuteriumoxid und Polylysine in Abhängigkeit von der Wellenzahl im Bereich von 1550-1750  $\text{cm}^{-1}$

Für den Vergleich Wasser und Deuteriumoxid und warum welches geeigneter für eine Messung wäre, müsste die Messung wiederholt werden, da nicht nachvollzogen werden kann, welche Probe das "Deuteriumoxid"-Spektrum ist.

## 4.2 Citronensäure

Citronensäure ist ein Molekül, das bei ultraviolettem Licht ein breites Absorptionsbande im Bereich von  $\lambda = 200 \text{ nm}$  bildet.<sup>4</sup> Das ist für die heutigen Photometer kaum messbar, weswegen die IR-Spektroskopie eine gute Messmethode darstellt.

Citronensäure zeigt eine intensive  $SI_{max}$  im Bandenbereich von 1500 - 1800  $\text{cm}^{-1}$ , welches geeignet ist für die quantitative Analyse von Citronensäure.

Da sowohl Deuteriumoxid und Wasser in der Absorption diese Bande bei Citronensäure etwas überlappen, macht es keinen Unterschied, ob Citronensäure in Wasser oder in Deuteriumoxid gemessen wird. Da Deuterium preislicher ist als Wasser und auch mengenmäßig mit Wasser gleicht, ist es sinnvoller Citronensäure in Wasser zu messen.

Die beiden unbekannten Proben 1 und 2 haben bei dieser Messung eine Konzentration von  $1.04 \pm 0.012 \text{ mM}$  und  $0.58 \pm 0.007$ . Da jeweils bei der Standardreihe und bei der Probe nur eine Einzelmessung durchgeführt wurde, weichen die Werte sehr von dem realen Wert ab.

Für eine bessere quantitative Aussage sollen mehr Mehrfachwerte der einzelnen Proben durchgeführt werden.

### 4.3 Polylysin

## 5 Anhang

### 5.1 Rohdaten

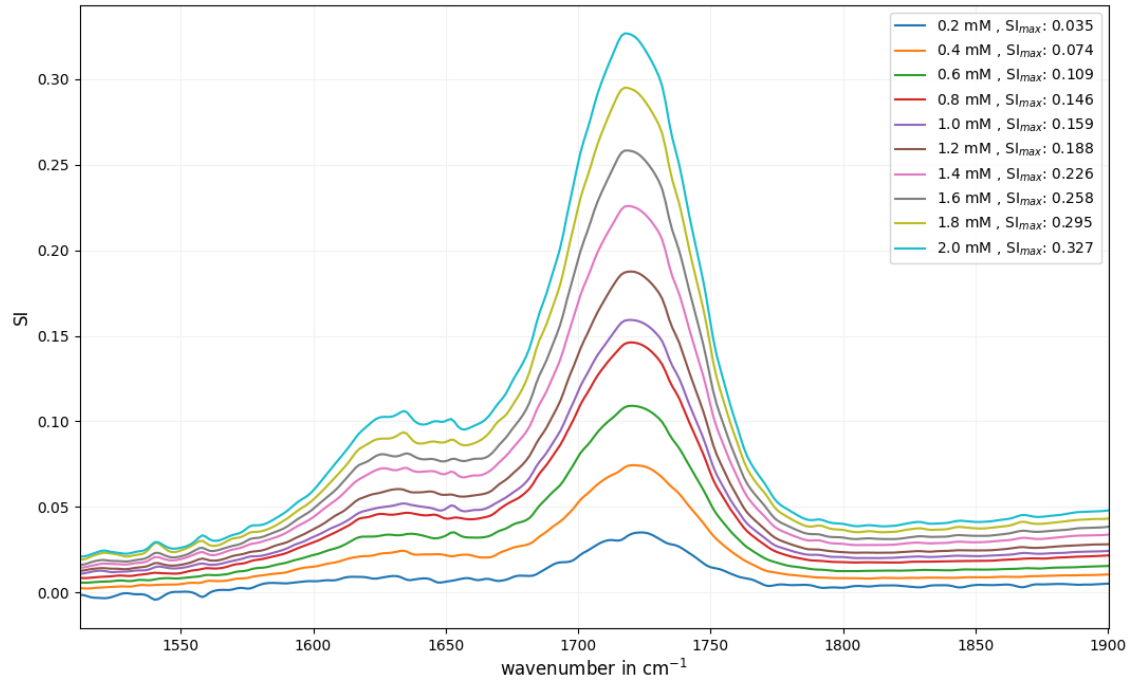


Figure 7: Infrarotspektrum der Verdünnungsreihe von Citronensäure in Wasser und der gaussche Fit des Maxima.

Table 3: Signalintensitäts-Werte der Standardreihe.

c(Citronensäure) in mM	$SI_{max}$
0.2	0.035
0.4	0.074
0.6	0.109
0.8	0.146
1.0	0.159
1.2	0.188
1.4	0.226
1.6	0.258
1.8	0.295
2.0	0.327

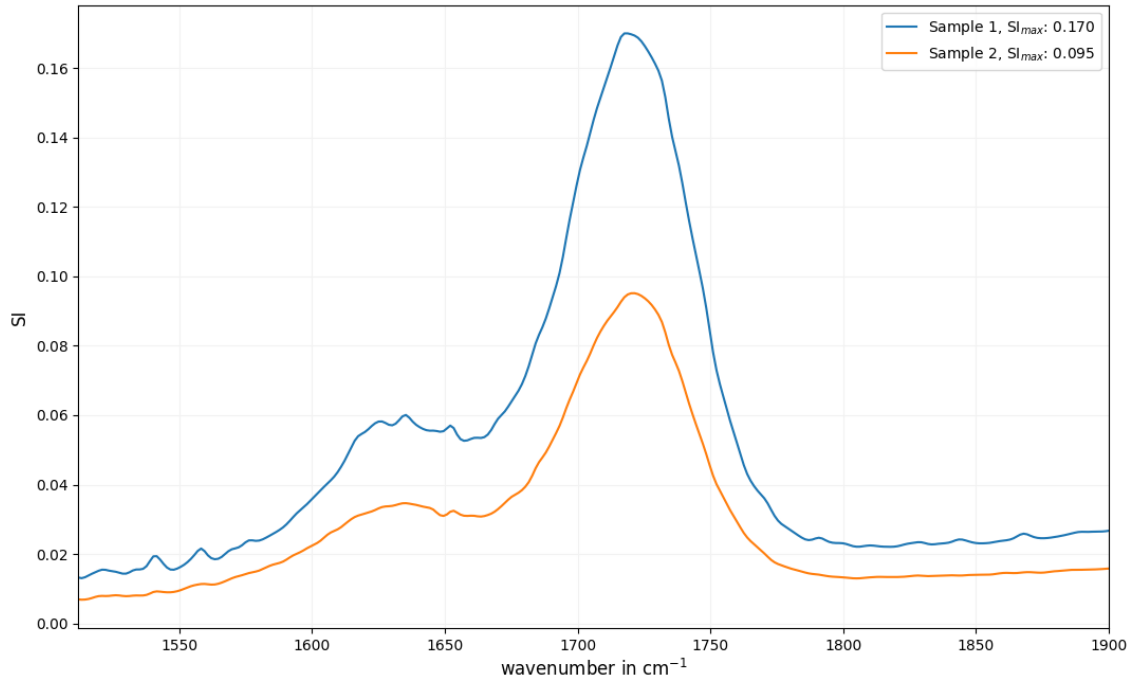


Figure 8: Infrarotspektrum der unbekannten Citronensäuren Proben.

Table 4: Signalintensitäts-Werte der unbekannten Citronensäure.

Probe	$SI_{max}$
Sample 1	0.170
Sample 2	0.095

Table 5: Pipettierschema der Standardreihe von Citronensäure in  $H_2O$ . Die molare Konzentration der Stammlösung beträgt 2mM in Wasser.

$c(\text{Citronensäure})$ in mM	$V(2\text{mM Citronensäure})$ in mL	$V(H_2O)$ 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> Wacław 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).