



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

1 Einführung	1
2 Material und Methode	2
2.1 Citronensäure-Messungen	2
2.2 Polylysin	2
3 Ergebnis	2
3.1 Wasser und Deuteriumoxid Infrarotspektrum	2
3.2 Charakterisierung von Citronensäure	3
3.3 Sekundärstrukturanalyse von Polylysin	5
4 Diskussion	5
4.1 Wasser und Deuteriumoxid	5
4.2 Citronensäure	7
4.3 Polylysin	7
5 Anhang	8
5.1 Rohdaten	8
References	9

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 Probe untersucht, sondern die Änderung der Schwingungszustandes des Moleküles.

Die Energie, die ein Molekül bzw Atom von den IR-Strahlungen absorbiert, reicht aus um die Rotationszustandes eines Moleküls und der Schwingungszustandes einer Bindung charakteristisch zu verändern. Dadurch ist es möglich die Struktur eines Moleküles zu untersuchen.

In der IR-Spektroskopie gibt es unterschiedliche Methoden, wie die IR-Wellen genutzt werden kann um die Proben zu untersuchen.

Der Klassiker in der Spektroskopie ist die Transmissionsspektroskopie.

Dort wird die Probe mit IR-Strahlung 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 IR-Absorptionsspektrum gemessen werden kann. Bei den Proteinen gibt es neun verschiedene IR-aktive Schwingungen, die in bestimmten Wellenzahlintervallen (Absortionsbanden) 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°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.¹ 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 Probenmenge⁷ ist.

2 Material und Methode

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

Auf die ATR-Zelle (Zinksilicium-Kristall) wurde so viel Wasser und Deuteriumoxid raupipettiert, 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: 2) durchgeführt.

Um Hintergrundrauschen zu minimieren, wurde die Luft im Messgerät geblankt.

2.2 Polylysin

Polylysin (grob 10 mg/mL) wurde in Deuteriumoxid gelöst und das Transmissionsspektrum im Vakuum bei 20 Grad Celcius 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) .

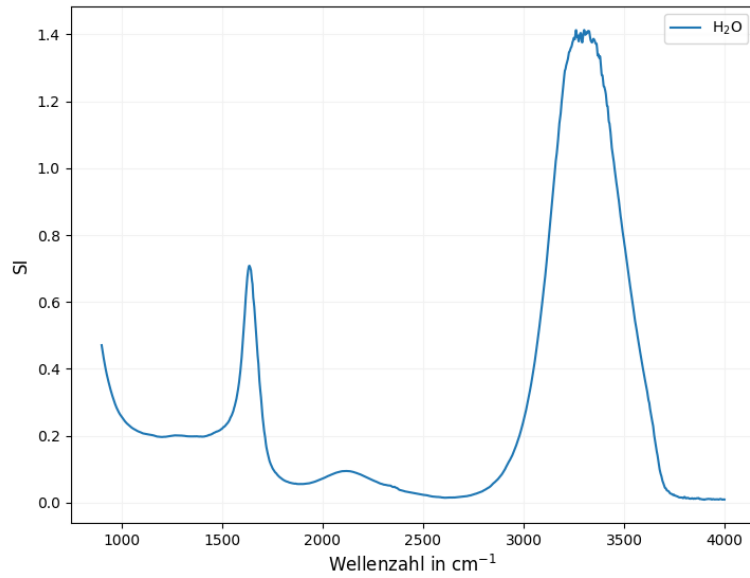


Figure 1: Infrarotspektrum von Wasser.

3.2 Charakterisierung von Citronensäure

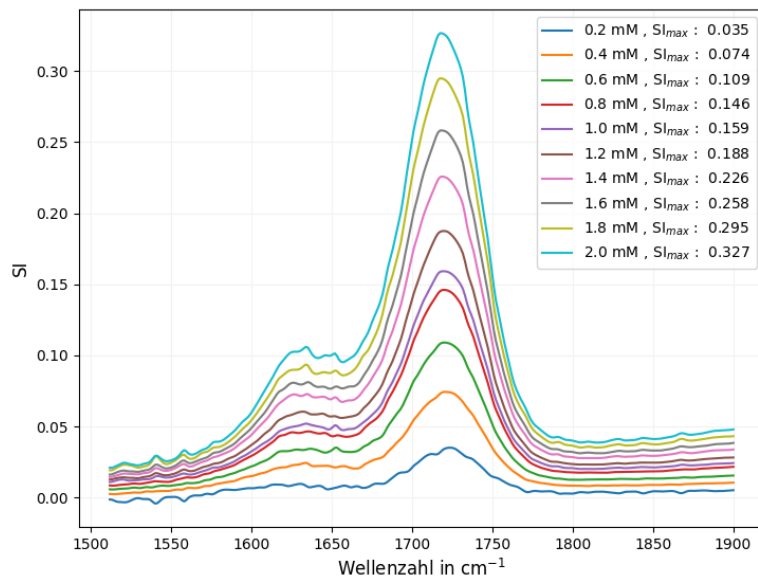


Figure 2: Infrarotspektrum der Verdünnungsreihe von Citronensäure in Wasser. Abgebildet ist die maximale Signalintensität (SI_{max}) zwischen $1520 - 1900 \text{ cm}^{-1}$

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

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 Citronensäurekonzentration 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 ± 0.012
Sample 2	0.58 ± 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. Der Term für die Abweichung von SI (ΔSI_{max}) in der Gleichung wurde auf 0 gesetzt.

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

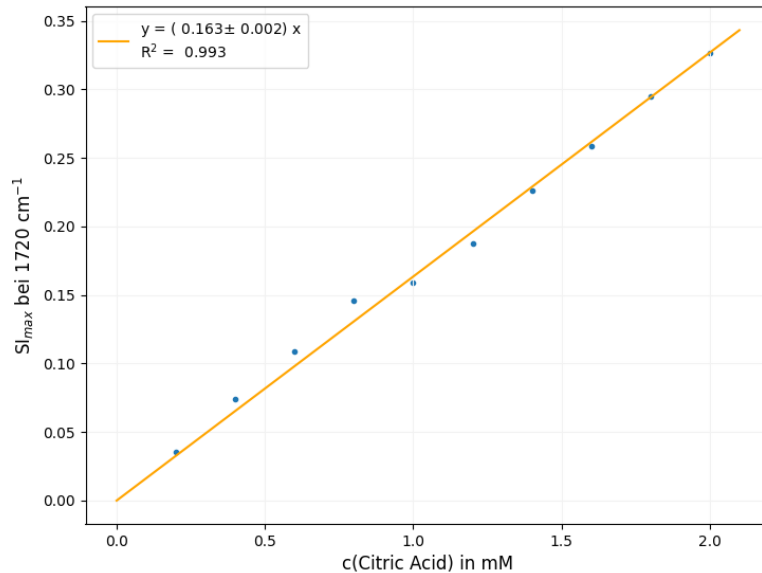


Figure 3: Standardkurve von der Citronensäure in der Abhängigkeit der maximale Signalintensität (abgekürzt: SI_{max}) bei $\tilde{\nu} = 1720 \text{ cm}^{-1}$ von Citronensäure in Wasser von der molaren Konzentration.

3.3 Sekundärstrukturanalyse von Polylysin

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

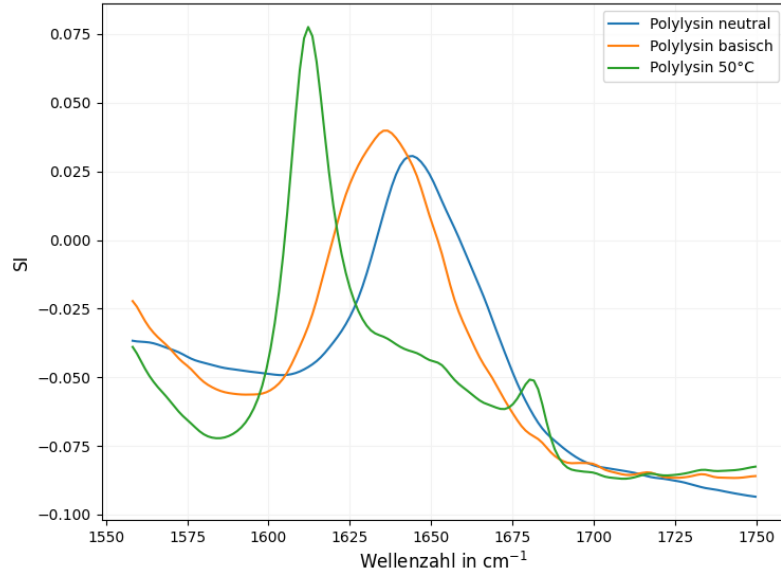


Figure 4: IR-Transmissionsspektrum von Polylysin ($\beta \approx 10 \text{ mg/mL}$ in D_2O) bei unterschiedlichen Bedingungen im Wellenzahlbereich von $1560 - 1750 \text{ cm}^{-1}$.

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

Bedingung	$\tilde{\nu}_{max}$ in 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 cm^{-1} zeigt und eine mittelstarke SI_{max} bei 1209 cm^{-1} .⁵ 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 Wasser gelöste Probe handelt.

Wird das komplette IR-Spektrum der drei Proben dargestellt, wie in Figure 5, dann sind viele Peaks ähnlich von der orangene Kurve und grüne Kurve.

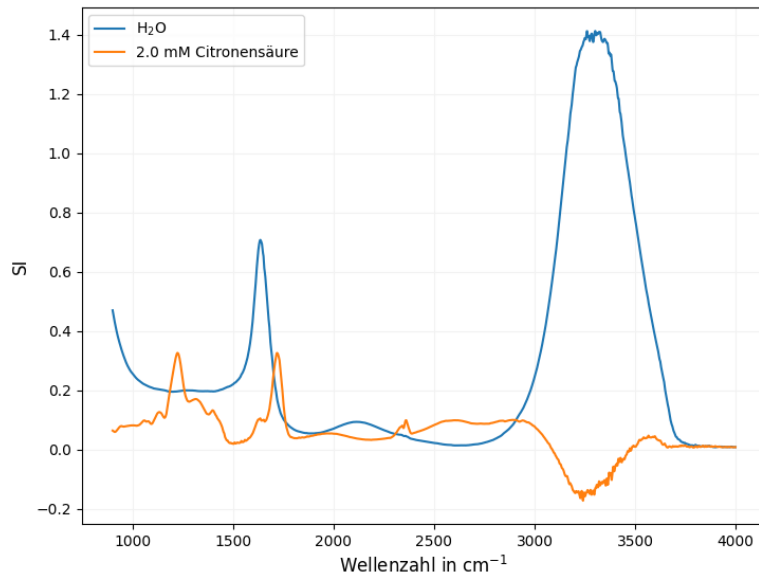


Figure 5: Infrarotspektrum von Wasser, Deuteriumoxid und 2 mM Citronensäure

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.

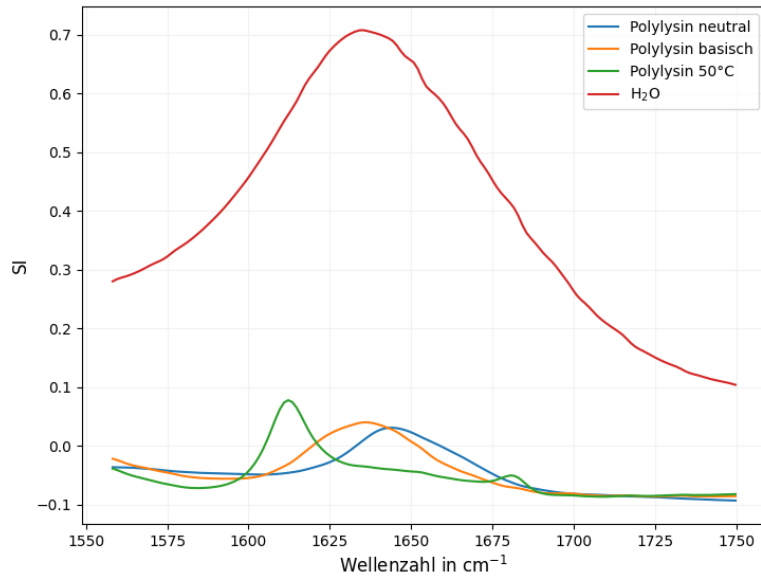


Figure 6: Infrarotspektrum von Wasser und Polylysin im Bereich von $\tilde{\nu} = 1550\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$

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 Ultra Violettes Licht ein breites Absorptionsbande im Bereich von $\lambda = 200\text{ nm}$ bildet.⁶ 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 $1500\text{ - }1800\text{ cm}^{-1}$, 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 kein Unterschied ob Citronensäure in Wasser oder in Deuteriumoxid gemessen wird. Da Deuterium teurer ist als Wasser und auch nicht zugänglicher ist, ist es wirtschaftlich sinnvoll Citronensäure in Wasser zu messen.

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

Für eine bessere quantitative Aussage sollen mehr Mehrfachwerte der einzelnen Proben durchgeführt werden. Außerdem soll auch die Messfehlern von den Geräten mitnotiert werden, für eine vollständige Fehleranalyse.

Trotzdem konnte gezeigt werden, dass mit IR-Spektroskopie auch eine quantitative und qualitative Untersuchung einer Probe möglich ist.

4.3 Polylysin

Die Amid I Bande, welches für die Sekundärstrukturauflärung die meiste Bedeutung hat, hat ihre Absorptionsbande im Bereich $1600\text{ - }1700\text{ cm}^{-1}$. Die für diesen Versuch verwendete Referenzwerten wurde in Table 3 dargestellt.

Table 3: Bandenposition von Peptiden in Wasser der Amid I Bande.²

Sekundärstruktur	Average in cm^{-1}	Extrema in cm^{-1}
α -Helix	1652	1642 - 1660
β -Faltblatt	1630	1615 - 1638
	1679	1672 - 1694
Turns	1671	1653 - 1692
Disordered	1645	1639 - 1654

Polylysin in Deuteriumoxid bei neutralen pH hat ein Absorptionsmaxima in der Amid I Bande bei 1644 cm^{-1} was nach der Table 3 die α -Helix Struktur ihren SI_{max} zeigt.

Polylysin im basischen Bereich hat ihren SI_{max} bei 1636 cm^{-1} , dass nahelegt, dass es eine disordered Struktur zeigt.

Beim Aufwärmen des Peptids auf 50°C bilden sich zwei SI_{max} bei 1612 und 1680 cm^{-1} , welches im Bereich des β -Faltblatt liegt.

Es ist schwierig die disordered und α -Helix Struktur auseinander zu halten, da die Bandenposition der beiden überlappen und die Peaks sehr nahe liegen. Zusätzlich sind die Referenzwerte in Table 3 Messwerte von Peptiden in Wasser und nicht in Deuteriumoxid.

Nach Zhang et al⁴ zeigt Polylysin bei nicht basischen Bedingung eine disordered Konformation auf und bei basischen eine α -Helix-Konformation.

Um dieses bestätigen zu können, muss der Versuch nochmal wiederholt werden und die Proben auch in Wasser zu messen, um diese mit der Referenzwerten besser vergleichen zu können. Trotzall-dem konnte gezeigt werden, dass die Sekundärstruktur ihre charakteristischen Absorptionsmaxima in der Amid I Bande besitzen und Polylysin gut geeignet ist, diese zu untersuchen. Die Konformationsänderung der Probe bei Bedingungsänderung konnte hier gut nachverfolgt werden.

5 Anhang

5.1 Rohdaten

Table 4: 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

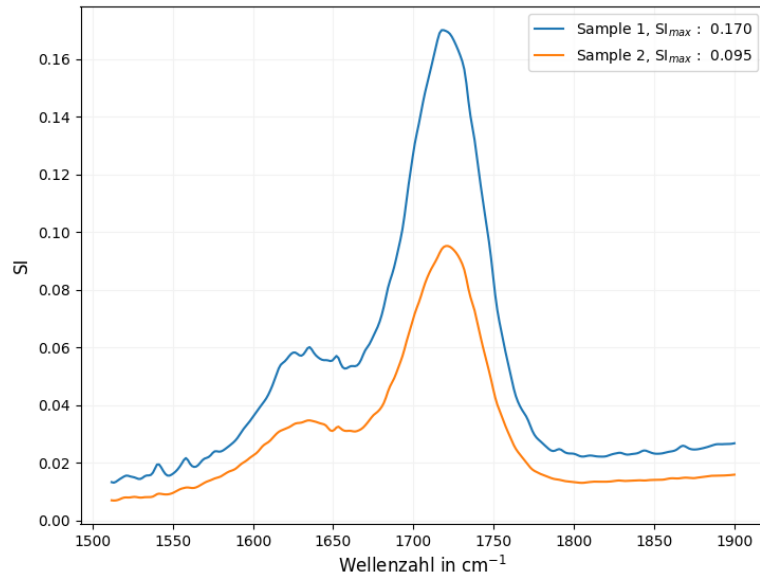


Figure 7: Infrarotspektrum der unbekannten Citronensäuren Proben.

Table 5: Signalintensitäts-Werte der unbekannten Citronensäure.

Probe	SI _{max}
Sample 1	0.170
Sample 2	0.095

Table 6: Pipettierschema der Standardreihe von Citronensäure in H₂O. Die molare Konzentration der Stammlösung beträgt 2mM in Wasser.

c(Citronensäure) in mM	V(2mM Citronensäure) in mL	V(H ₂ 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

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

- ² Prof. Dr. Franz Bartl. Bestimmung der sekundärstruktur von polylysin und ausgewählter proteine durch analyse der amid i bande. Praktikumsskript 2024. URL: https://moodle.hu-berlin.de/pluginfile.php/5950403/mod_resource/content/2/FTIR.doc.pdf.
- ³ Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung IAP. Spektrometrie. gelesen: 13. Juli 2024, 08:48 Uhr. URL: <https://www.iap.fraunhofer.de/de/Analytik/spektrometrie.html>.
- ⁴ Yuqing Wu Min Zhang, Liping Zhang. The pressure tolerance of different poly-l-lysine conformers in aqueous solution: Infrared spectroscopy and two-dimensional correlation analysis. 2011. doi: 10.1016/j.vibspec.2011.09.007.
- ⁵ 3 Sergei Yu. Venyaminov2 and Franklyn G. Prendergast. Water (h₂O and d₂O) molar absorptivity in the 1000–4000 cm⁻¹ range and quantitative infrared spectroscopy of aqueous solutions. 1997. doi:10.1006/abio.1997.2136.
- ⁶ Wacław Kolodziejcki 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.
- ⁷ 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.