

Prüfverfahren:

Organisch qualitative Elementaranalyse

erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 05.08.03

Seite 1 von 8

Abl.: UE1_Organisch qualitative Elementaranalyse

1. Allgemeines

Die Analyse von organischen Verbindungen beginnt in der Regel mit der Isolierung von Reinsubstanzen aus einem Substanzgemisch. Hierzu stehen die klassischen physikalischen Methoden zur Verfügung (Destillation, Kristallisation, Sublimation, Extraktion).

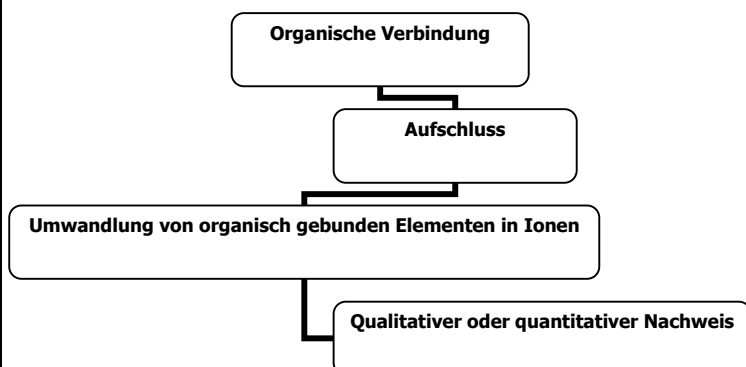
Um einzelne Elemente einer organischen Verbindung qualitativ oder quantitativ zu bestimmen, muss diese meist "aufgeschlossen" (=Überführung in eine bestimmbare, zumeist anorganische Form) werden.

Die nachzuweisenden Elemente

Kohlenstoff	C	Schwefel	S
Wasserstoff	H	Chlor	Cl
Stickstoff	N	Brom	Br
Phosphor	P	Iod	I

werden dabei in eine geeignete anorganische Verbindung überführt und z.B. mittels Ionennachweis oder Titration bestimmt.

Schema des Nachweises:



Die organisch qualitative Elementaranalyse ist eine Methode zum raschen Nachweis von organisch gebundenem C, H, N, (P), S und den Halogenen (mit Ausnahme von F).

Prüfverfahren:

Organisch qualitative Elementaranalyse

erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 05.08.03

Seite 2 von 8

Abl.: UE1_Organisch qualitative Elementaranalyse

2. Aufgabenstellung

2.1 Nachweis von Organischen Verbindungen (Verkohlungsprobe)

Eine kleine Menge der Substanz wird auf einem Magnesiastäbchen oder einem Platindraht in der nicht-rußenden Flamme eines Gasbrenners erhitzt.

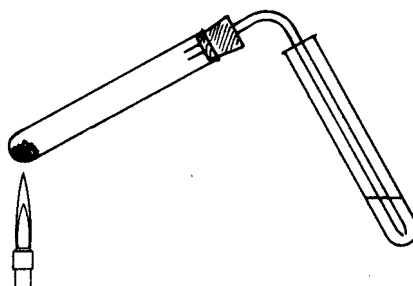
➤ *Bewertung der Verkohlungsprobe:*

Aromatische Kohlenwasserstoffe verbrennen mit schwach leuchtender Flamme unter Rußabscheidung in großen Flocken; Aliphatische Kohlenwasserstoffe mit hell leuchtender Flamme unter mäßiger Rußabscheidung. Bei sauerstoffhaltigen Verbindungen nimmt die Leuchterscheinung mit zunehmendem Sauerstoffgehalt ab.

Anorganische Substanzen, die meist einen hohen Schmelzpunkt aufweisen, verbrennen nicht. Eventuell kann ein Aufglühen der Substanz beobachtet werden.

2.2 Nachweis von Kohlenstoff und Wasserstoff (Kupferoxidprobe)

Ca. 0.1 g trockene Substanz mit ca. 1 g Kupferoxid ($\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$) mischen und in einem trockenen Reagenzglas in der Gasflamme erhitzen. Die entstehenden Gase werden in eine klare, gesättigte Bariumhydroxidlösung eingeleitet:

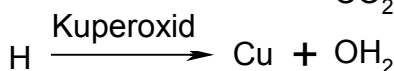
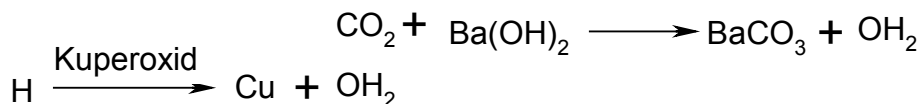
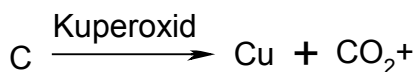


➤ *Bewertung der Kupferoxidprobe:*

Kondenswasser im oberen Teil des Reagenzglas weist auf Wasserstoff hin; eine Trübung der Bariumhydroxidlösung lässt auf Kohlenstoff schließen.

erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 05.08.03

Reaktionsschema:



2.3 Beilsteinprobe: Nachweis von Halogenen

Man befeuchtet einen ausgeglühten Kupferdraht mit der Substanz bzw. gibt einige Kristalle darauf und hält den Draht in den Saum der nicht leuchtenden Gasflamme. Die bei der Verbrennung entstehenden leichtflüchtigen Kupferhalogenide färben den Flammensaum grün bis grünblau.

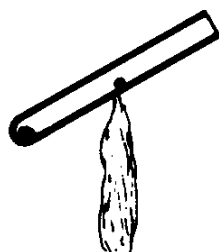
➤ *Bewertung der Beilsteinprobe*

Sehr empfindliche Probe!

Eindeutig kann nur die Abwesenheit von Halogenen bewiesen werden, wenn kein grüner Flammensaum entsteht. Organische Stickstoffverbindungen zeigen oft auch eine positive Reaktion.

2.4 Lassaigne-Aufschluss

Einige Milligramm der Substanz (oder 1 Tropfen) werden in einem Glühröhrchen vorgelegt. Dazu gibt man ein Stück blankes Natrium (Streichholzkopf-Größe). Das Röhrchen wird von oben her vorsichtig mit der Gasflamme erwärmt und das Natrium geschmolzen. Nach erfolgtem Aufschluss (Funkenbildung) wird bis zur Rotglut erhitzt und ca. 1 Minute geglüht.



		Prüfverfahren: <u>Organisch qualitative Elementaranalyse</u>	
erstellt / geändert:	Datum: 05.08.03	von:	Unterschrift:

Seite 4 von 8

Abl.: UE1_Organisch qualitative Elementaranalyse

Das noch heiße Röhrchen (nicht mehr rotglühend) wird in ein Reagenzglas, das ca. 5 ml Wasser enthält und zur Sicherheit in einem Erlenmeyerkolben steht, fallen gelassen. Das heiße Glühröhrchen zerspringt und die Reaktionsprodukte gehen unter heftiger Reaktion des Natriumoxids und des evtl. noch vorhandenen Natriums zum Teil in Lösung. Das deutlich alkalische Aufschlussgemisch wird kurz aufgekocht und durch Filtration von Glasscherben und kohligen Überresten befreit.

Sicherheitshinweis: korrektes Arbeiten mit Natrium beachten und in der Kapelle arbeiten.

➤ *Bewertung des Lassaigne-Aufschlusses*

Bei nicht eindeutigen oder negativen Ergebnissen der folgenden Nachweisreaktionen wird der Aufschluss mit einer größeren Substanzmenge wiederholt.

Reaktionsschema

org. gebundener N geht über in CN^-

org. gebundener S geht über in S^{2-}

org. gebundene Hal geht über in Hal^-

2.5 Nachweis von Stickstoff (Stickprobe)

Ein Teil der Aufschlusslösung wird mit ca. 0.5 ml Eisen-II-sulfatlösung (1 % in Wasser, frisch hergestellt) versetzt. Das Gemisch wird aufgekocht und nach dem Abkühlen mit einigen Tropfen verdünnte Salzsäure (chem. rein 1+1) angesäuert.

➤ *Bewertung der Stickstoffprobe*

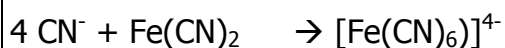
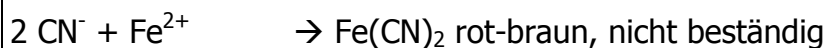
Bildet sich ein blau-schwarzer Niederschlag oder tritt eine grüne Färbung auf, enthält die untersuchte Substanz organisch gebundenen Stickstoff (Berlinerblau-Reaktion).

erstellt / geändert:	Datum: 05.08.03	von:	Unterschrift:
-------------------------	--------------------	------	---------------

Hinweis:

Liegt das Berlinerblau in schlecht erkennbaren Mengen vor, wird filtriert oder man bringt einige Tropfen der Lösung auf ein Filterpapier (Tüpfelprobe).

Nach dem Ab- resp. Auslaufen der Flüssigkeit kontrolliert man das Filter auf Anwesenheit von blau-schwarzen Kristallen.

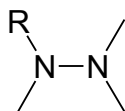
Reaktionsschema:

Durch Aufkochen der Aufschlusslösung werden die überschüssigen Eisen-II-ionen mit Luftsauerstoff zu Eisen-III-ionen oxidiert. Diese reagieren in salzsaurer Lösung zum Berlinerblau:



Bleibt die Lösung gelb, konnte kein Stickstoff nachgewiesen werden. Dafür können folgende Gründe vorliegen:

- die Substanz enthält keinen organisch gebundenen Stickstoff
- die Substanz spaltet den Stickstoff elementar ab, bevor es zur Cyanidbildung kommt



Beispiele: Hydrazinderivate :

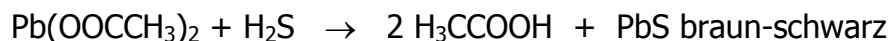
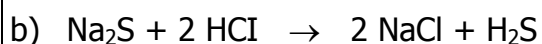
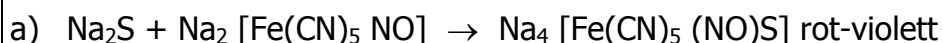
- Azo- und Diazoverbindungen (Farbstoffe) $\text{R}-\text{N}=\text{N}-\text{R}$
- in schwefelreichen Verbindungen bildet sich vorwiegend Eisensulfid;
in diesem Fall wird der Aufschluss mit der doppelten Menge Natrium wiederholt

2.6 Nachweis von Schwefel

- Ein Teil der alkalischen Aufschlusslösung wird mit ca. 0.5 ml einer frisch hergestellten Natriumnitroprussiatlösung (1 % in Wasser) versetzt.
- Ein Teil der alkalischen Aufschlusslösung wird mit verdünnter Salzsäure (chem. rein 1+1) angesäuert. In die Gasphase hält man ein mit Wasser angefeuchtetes Bleiacetapapier. Die Empfindlichkeit dieser Methode ist nicht so groß wie beim Nachweis mit Natriumnitroprussiat.

➤ *Bewertung der Schwefelprobe*

- Entsteht eine rot-violette Färbung, enthält die untersuchte Substanz organisch gebundenen Schwefel.
- Entsteht eine braun-schwarze Färbung, enthält die untersuchte Substanz organisch gebundenen Schwefel.

Reaktionsschema:2.7 Nachweis von Halogenen

Ein Teil der Aufschlusslösung wird mit einigen Tropfen verdünnter Salpetersäure (chem. rein 1+1) angesäuert. Diese Lösung wird, um eventuell vorhandenes S^{2-} als H_2S oder CN^- als HCN auszutreiben, auf das halbe Volumen eingedampft. Nach dem Abkühlen gibt man 0.5 ml Silbernitratlösung 0.1 N zu.

➤ *Bewertung der Halogenprobe*

Entsteht ein Niederschlag (weiß bis gelb), enthält die untersuchte Substanz Halogene.

Prüfverfahren:

Organisch qualitative Elementaranalyse

erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 05.08.03

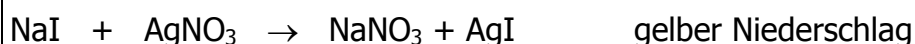
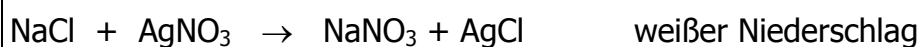
Seite 7 von 8

Abl.: UE1_Organisch qualitative Elementaranalyse

Hinweis:

Enthält die Lösung bei der Zugabe von Silbernitrat noch Sulfid- oder Cyanidionen (ungenügend ausgekocht), tritt auf jeden Fall ein Niederschlag auf.

Reaktionsschema:



Störung durch Sulfid- oder Cyanidionen:



2.8 Nachweis von Phosphor

Einige Milligramm der Substanz (oder 1 Tropfen) werden in einem Glühröhrchen mit Natrium aufgeschlossen (Lassaigne). Nach erfolgtem Aufschluss wird das Röhrchen zur Rotglut erhitzt und eine Minute geglüht. Nach dem Abkühlen gibt man zum kalten Glührückstand eine Spatelspitze Natriumnitrat und glüht nochmals eine Minute. Das noch heiße Glühröhrchen (nicht mehr rotglühend) wird in ein Reagenzglas, das ca. 5 ml Wasser enthält und zur Sicherheit in einem Erlenmeyerkolben steht, fallen gelassen. Das heiße Röhrchen zerspringt und die Reaktionsprodukte gehen in Lösung. Die Aufschlusslösung wird mit verdünnter Salpetersäure (1+1) angesäuert und filtriert. 1 ml des klaren Filtrats versetzt man mit 1 ml Ammoniummolybdat/Weinsäure (18 g Ammoniummolybdat + 20 g Ammoniumnitrat + 20 g Weinsäure einzeln in 100 ml Wasser lösen; diese Lösung zu 35 ml verdünnter Salpetersäure (1+1) gießen) und erwärmt.

➤ *Bewertung der Phosphorprobe*

Das Auftreten einer gelben Fällung zeigt die Anwesenheit von Phosphor an.

Prüfverfahren:

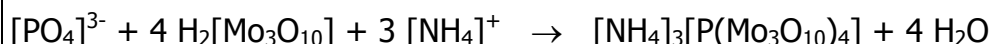
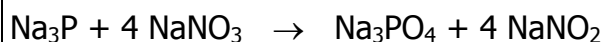
Organisch qualitative Elementaranalyse

erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 05.08.03

Seite 8 von 8

Abl.: UE1_Organisch qualitative Elementaranalyse

Reaktionsschema:



3. Geräte

Reagenzgläser, Reagenzglashalter, Glühröhrchen, Bunsenbrenner, Bechergläser, Trichter, Filter, Erlenmeyerkolben, Magnesiastäbchen, Kupferdraht etc.

4. Reagenzien

Kupferoxid $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$; Natrium; Eisen-II-sulfatlösung, 1% in Wasser, frisch hergestellt; Salzsäure, chemisch rein; Natriumnitroprussiatlösung (Natriumpentacyanonitrosylferrat(II) – Lsg.) 1% in Wasser, frisch hergestellt; Bleiazetatpapier; Salpetersäure, chem. Rein; Silbernitratlösung 0,1 N; Natriumnitrat; Ammoniummolybdat; Ammoniumnitrat; Weinsäure; Proben: Organische Reinsubstanzen nach Belieben

5. Protokoll

Protokollnummer, Datum, Titel, Kurzfassung mit Durchführung und Beobachtungen

6. Literatur

Autorenkollektiv, Organikum, 20.Auflage, Johann Ambrosius Barth, Heidelberg 1996

A.I.Vogel, Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, 5th ed., Longman Scientific & Technical, Essex, 1989

R.L.Shriner, R.C.Fuson, D.Y.Curtin, T.C.Morrill, The Systematic Identification of Organic Compounds, 6th ed., John Wiley & Sons, Chichester 1980

Prüfverfahren:

Bestimmung des Proteingehaltes

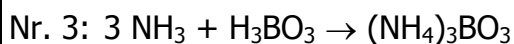
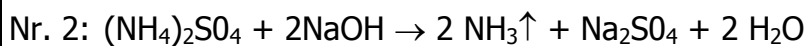
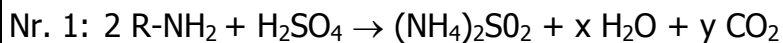
erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 16.02.03

Seite 1 von 5

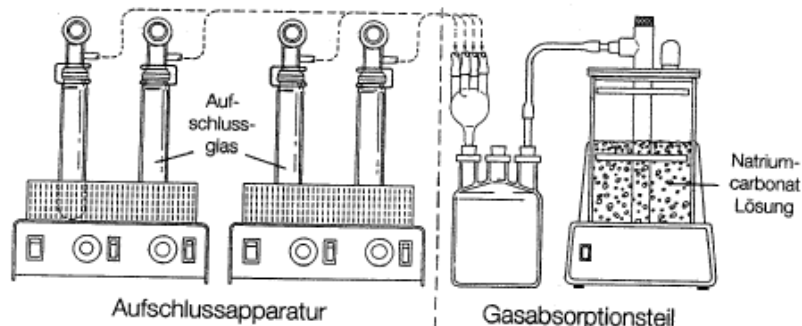
Ab: UE_2.2_Proteingehalt

1. Allgemeines

Die Probe wird mit konzentrierter Schwefelsäure in Anwesenheit eines Katalysators (Gleichung Nr.1) oxidativ aufgeschlossen. Aus dem gebildeten Ammoniumsulfat ((NH₄)₂SO₄) wird Ammoniak (NH₃) mittels Natronlauge (NaOH) freigesetzt (Gleichung Nr.2) und durch Wasserdampfdestillation in eine borsäurehaltige (H₃BO₃) Vorlage übergetrieben wobei Ammoniumborat ((NH₄)₃BO₃) entsteht (Gleichung Nr.3). Das entstandene Salz wird mit einer Salzsäure-Masslösung (HCl) titriert (Gleichung Nr.4).



1.2 Apparatur für Aufschluss nach Kjeldhal:



Achtung: Schutzbrillenpflicht beim gesamten Arbeitsvorgang! Elektrische Leitungen und Schläuche von den Wärmequellen verhalten!

2. Durchführung

2.1 Oxidativer Aufschluß mit Büchi 430 -Digester

1-2 g der genau eingewogene Probe (Analysenwaage) werden mit 3 g Selenreaktionsgemisch (genaue Menge und Verwendung in das Giftbuch eintragen!) und mit 25 ml konz. Schwefelsäure im Büchi-Aufschlusskolben vorsichtig versetzt.

Prüfverfahren:

Bestimmung des Proteingehaltes

erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 16.02.03

Seite 2 von 5

Ab: UE_2.2_Proteingehalt

Um Siedeverzüge zu vermeiden, werden ein paar Glasperlen zugegeben. Um ein Schäumen während des Aufschlusses zu verhindern, eine Spatelspitze Stearinsäure zusetzen.

Die Aufschlussapparatur ca. 7 min. auf Stufe 10 vorheizen (falls nur 4 Aufschlüsse benötigt werden, darauf achten, dass die zweite Hälfte der Aufschlussapparatur abgeschaltet und der freiliegende Absaugschlauch mit einem Stopfen verschlossen ist).

Aufschlussgläser mit den dafür vorgesehenen Sicherungsklammern am Verbindungsglas befestigen.

Garnitur aufsetzen und den Schlauch für die Absaugung (= Büchi 412 -Scrubber) am Verbindungsglas anschrauben und das gegenüberliegende Ende (Lufteintrittsöffnung) mit Glaswolle locker verstopfen (damit keine heißen Schwefelsäuredämpfe austreten können!). Probe solange auf Stufe 10 erhitzen, bis die Kondensationslinie das obere Drittel des Büchi-Aufschlusskolbens erreicht hat.

Danach die Heizleistung so reduzieren, dass die Probe immer siedet. Nach dem Klarwerden der Aufschlusslösung noch 15 Minuten weitersieden lassen. Aufschlussgläser in den Halter für die Aufschlussgefäße geben und abkühlen lassen (niemals die heißen Gläser mit kaltem Wasser kühlen!)

Niemals das Verbindungsglas nach dem Abnehmen der Aufschlusskolben an der Aufhängevorrichtung des Aufschlussgerätes hängen lassen, da sonst die kondensierte Schwefelsäure auf das Aufschlussgerät (Heizkalotten) tropft und dieses zerstört wird! Das Verbindungsglas gut und sichtbar mit Leitungswasser reinigen und trocknen. Verfestigt sich die Probe oder wird die aufgeschlossene Proben beim Abkühlen zähflüssig, muss diese vorsichtig mit entionisiertem Wasser verflüssigt werden (Achtung im Gerät befindet sich konz. H₂SO₄!).

		Prüfverfahren:	
		<u>Bestimmung des Proteingehaltes</u>	
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von:	Unterschrift:
			Seite 3 von 5

Ab: UE_2.2_Proteingehalt

2.2 Destillation mit Büchi 324 - Destillator:

2.2.1 Vorbereitungen:

Das Destillationsgerät an der rechten oberen Hinterseite einschalten, Kühlung aufdrehen (Wasserhahn beim Waschbecken). Kontrolle der benötigten Lösungen in den Vorratsbehältern (3%ige Borsäurelösung, 30%ige Natronlauge destilliertes Wasser). Es müssen alle Lösungen bzw. das dest. Wasser mindestens bis zur Markierung vorhanden sein! Einen leeren Büchi-Aufschlusskolben in die vorgesehene Halterung einspannen sowie einen 500 ml-Erlenmeyerkolben für die Vorlage an seinem vorgesehen Platz stellen. Die Funktion "Preheating" durchführen.

2.2.2 Durchführung:

Die erkaltete aufgeschlossene Probelösung (sie darf nicht fest sein!) in die Halterung einspannen. In einen 500 ml-Erlenmeyerkolben ca. 100 ml dest. Wasser mit einigen Tropfen Mischindikator 5 geben und unter das Destillat-Auslaufrohr stellen. Nun wird die Destillation gestartet. Dies geschieht durch Drücken der Pfeiltasten nach oben oder unten bis man sich im Destillationsmodus befindet. Danach drückt man die Taste ENTER, um ins Destillationsmenü zu gelangen. Im Destillationsmenü startet man die Destillation mit START. Die Destillation erfolgt automatisch. Man muss nur darauf achten, dass die Schutztüre immer geschlossen ist, da das Gerät das Starten der Destillation bei offener Tür verhindert.

2.2.3. Destillationsmodus -Einstellungen:

H ₂ O: 55 ml	NaOH (30%ig!): 110 ml	H ₃ BO ₃ (3%ig!): 100 ml	Delay: 0'05"
Dest: 6'00"	Dampf: 50%	Aspir: OFF	

Darauf achten, dass die automatische Absaugung der Probe im Destillationsmenü nicht eingeschaltet ist. Am Ende jeden Labortages bzw. einer Bestimmungsreihe auf die Taste ESC drücken und die Funktion REINIGUNG (Einstellung mit den Pfeiltasten) starten.

Prüfverfahren:

Bestimmung des Proteingehaltes

erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 16.02.03

Seite 4 von 5

Ab: UE_2.2_Proteingehalt

Dabei muss stets ein leerer Aufschlusskolben und ein leerer Erlenmeyerkolben angeschlossen sein. Danach das Gerät und das Kühlwasser abdrehen.

Das Aufschlussgerät und das Destilliergerät immer sauber halten!

2.3 Titration der Vorlage:

Das borsäure- und ammoniakhaltige Wasserdampfdestillat wird mit einer 0.1 molaren Salzsäuremasslösung bis zum Farbumschlag nach Rot titriert. Neben einer Doppelbestimmung wird auch ein Blindversuch mit den verwendeten Chemikalien durchgeführt.

2.4. Auswertung:

$$P(\%) = (a - b) \cdot 1,4008 \cdot F / E \cdot 10$$

P(%) = Proteingehalt in %

a = Verbrauch an 0.1 molarer Salzsäurelösung im Hauptversuch in ml

b = Verbrauch an 0.1 molarer Salzsäurelösung im Blindversuch in ml

F = Umrechnungsfaktor zur Errechnung des Proteingehaltes

E = Probeneinwaage in g

1 ml 0.1 molare Salzsäuremasslösung = 1,4008 mg N

Umrechnungsfaktoren F:

Gelantine 5.55	Milch, Milchprodukte 6.38
Fleisch, Ei, Fisch 6.25	Nüsse und Ölsaaten 5.40
Gemüse, Obst und Getriedeprodukte 6.25	Roggen, Hafer, Gerste 6.25
Weizen 5.70	Leguminosen 6.25

		Prüfverfahren: <u>Bestimmung des Proteingehaltes</u>	
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von:	Unterschrift:

Seite 5 von 5

Ab: UE_2.2_Proteingehalt

3. Geräte:

Analysenwaage, Büchi-Aufschlußgefäße, Glasperlen bzw. Raschigringe, Büchi 430 Digestor, Büchi 412 Scrubber, 25 ml Vollpipette bzw. 30 ml Dispenser, Büchi 324 – Destillator, Erlenmeyerkolben 500 ml

4. Reagenzien:

Se-Reaktionsgemisch, Schwefelsäure konz. Stearinsäure

Herstellung der Waschlsg. für Scrubber Büchi 412: 600 g Na₂CO₃ wasserfrei in 2,8 Liter dest. Wasser (oder 1,62 kg Na₂CO₃·10H₂O in 1,8 Liter) lösen u. mit 100 mg Bromthymolblau versetzen.

Natronlauge 30%ig, Borsäure 3%ig, Mischindikator 5, Salzsäuremasslösung 0,1 mol/l

5. Protokoll

Protokollnummer, Datum, Titel, Kurzfassung mit Durchführung, Ergebnissen und Beobachtungen

6. Literatur

Eigenerstellung

Prüfverfahren:

Dünnschichtchromatographische Trennung

von Aminosäuren:

erstellt /

Datum:

von:

Unterschrift:

geändert:

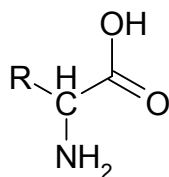
16.02.03

Seite 1 von 5

Abl.: UE_3.3_DC_Aminosäuren

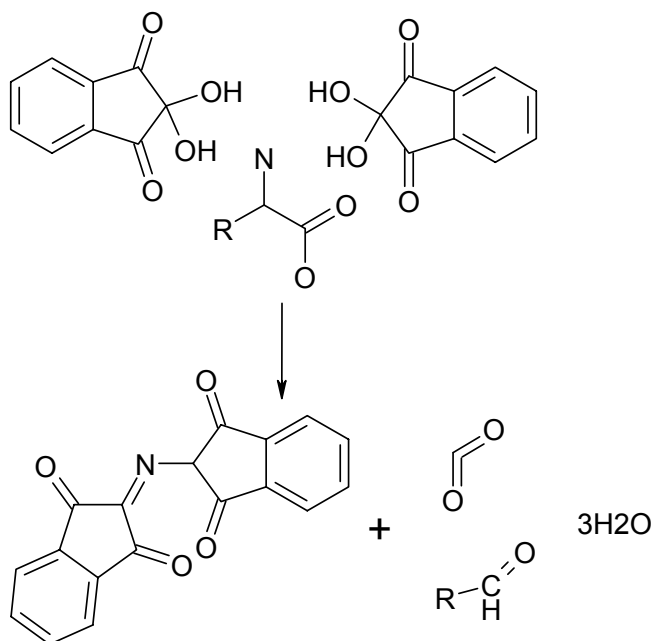
1. Allgemeines

Aminosäuren sind die kleinsten Bausteine der Proteine (Eiweiße). Es sind 20 verschiedene Aminosäuren bekannt, die alle 2 charakteristische Gruppen (-COOH; -NH₂) in (annähernd) gleicher Anordnung aufweisen:



Grundstruktur aller Aminosäuren (R = individueller Rest)

Die verschiedenen Aminosäuren können dünn-schichtchromatographisch getrennt werden. Da die Aminosäuren im Regelfall farblos erscheinen, müssen diese nach der chromatographischen Trennung durch Anfärbung sichtbar gemacht werden. Ein weit verbreitete Färbetechnik ist das Besprühen der Dünnschichtplatten (nachdem diese getrocknet wurden) mit Ninhydrin-Reagenz. Dadurch werden die Aminosäuren zu färbigen Verbindungen umgesetzt.



Schema der Ninhydrin-Reaktion

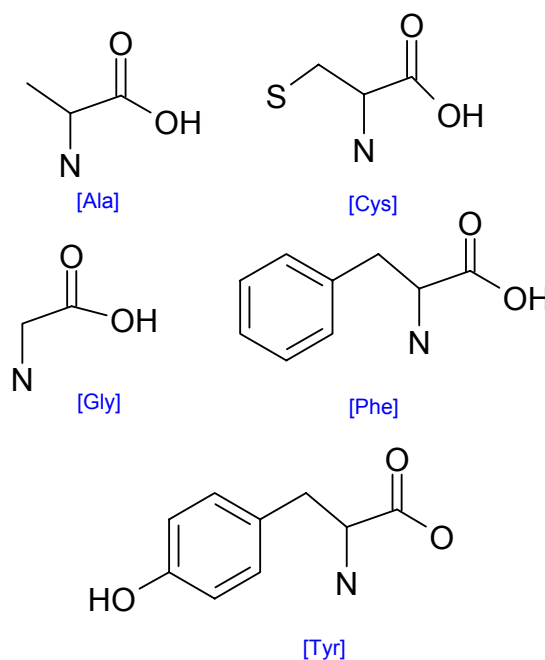
		Prüfverfahren: <u>Dünnschichtchromatographische Trennung</u> <u>von Aminosäuren:</u>	
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von:	Unterschrift:
			Seite 2 von 5

Abl.: UE_3.3_DC_Aminosäuren

2. Aufgabenstellung

Die dünnschichtchromatographische Trennung und qualitative Bestimmung folgender Aminosäuren aus Referenz- und Testlösungen:

Alanin (Ala), Cystein (Cys), Glycin (Gly), Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr)



Struktur der zu trennenden Aminosäuren

2.1 Herstellung der Referenzlösungen

Die Referenzsubstanzen Alanin, Cystein, Glycin und Phenylalanin werden in getrennten Meßkolben als 0.1 % (m/v) (entsprechend 0.1 g/100 ml) Lösungen in destilliertem Wasser hergestellt.

Die Referenzsubstanz Tyrosin wird ebenfalls als 0.1 % Lösung hergestellt. Allerdings muß Tyrosin vor dem Auffüllen mit einigen Tropfen ca. 1 N NaOH gelöst werden.

Von Ihrem Übungsleiter erhalten Sie die Testlösung mit unbekannter Zusammensetzung.

➤ *Protokollieren Sie die Einwaage und Herstellung der Referenzlösungen*

		Prüfverfahren: <u>Dünnschichtchromatographische Trennung</u> <u>von Aminosäuren:</u>	
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von:	Unterschrift:
			Seite 4 von 5

Abl.: UE_3.3_DC_Aminosäuren

2.3 Herstellen der mobilen Phase

Als mobile Phase (=Laufmittel) zur Chromatographie wird Butanol mit Eisessig (konzentrierte Essigsäure) und Wasser im Verhältnis 3:1:1 (v/v/v) gemischt (z.B. 30 ml Butanol mit je 10 ml Wasser und Eisessig). Dabei ist zu beachten, daß die Komponenten einzeln abgemessen werden müssen, da durch das Mischen eine Volumskontraktion auftritt. Dadurch würde sich das beschriebene Verhältnis falsch einstellen.

Die mobile Phase wird, nach sorgfältigem Mischen, in die Chromatographiekammer überführt. Dabei ist zu beachten, daß der Flüssigkeitsstand nicht höher als 0.5 cm ist, da andernfalls die frisch aufgetragenen Referenzlösungen direkt in die mobile Phase eintauchen würden.

Die Kammer wird verschlossen und für etwa 15 Minuten mit dem Laufmittel (-dampfdruck) gesättigt.

2.4 Chromatographie der vorbereiteten Platten

Die vorbereitete Platte vorsichtig in den Tank überführt und "entwickelt".

Die Platte wird so lange entwickelt, bis die Laufmittelfront zumindest 2 Drittel, besser 3 Viertel der gesamten Plattenhöhe erreicht hat (Dauer ca. 2 Stunden). Die entwickelte Platte wird aus dem Tank genommen, die Lösungsmittelfront wird mit einem Bleistift markiert, kurz an der Luft abgetrocknet und dann im Trockenschrank (allenfalls unter einem Fön) bei maximal 50 °C lösungsmittelfrei getrocknet. Das Abdampfen der Lösungsmittel wird durch den Geruch der Platten erkannt.

➤ *Protokollieren Sie die Dauer der Plattenentwicklung und die gesamte Laufstrecke (Lösungsmittelfront – Startlinie).*

2.5 Anfärben der aufgetrennten Aminosäuren

Die getrockneten Platten werden mit Ninhydrinreagens (0.2 % Lösung von Ninhydrin in Aceton mit einigen Tropfen Essigsäure) auf der gesamten Lauffläche besprüht und für etwa 15 Minuten in den Trockenschrank gelegt. Die so behandelte Platte sollte die aufgetragenen Aminosäuren als färbige Flecken (Banden) erscheinen lassen.

		Prüfverfahren: <u>Dünnschichtchromatographische Trennung von Aminosäuren:</u>
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von: Unterschrift:
		Seite 5 von 5

Abl.: UE_3.3_DC_Aminosäuren

2.6 Auswertung

Nun können die R_f -Werte der einzelnen Aminosäuren auf den beiden verschiedenen Platten ermittelt werden. Diese können nun mit den Werten, die für die unbekannte Probe ermittelt wurden, verglichen werden. Daraus kann auf die An-/Abwesenheit der Aminosäuren in der Probe mit unbekannter Zusammensetzung geschlossen werden. Im Zweifelsfall (z.B. bei undeutlicher Trennung) wird die Farbe der einzelnen Banden berücksichtigt.

3. Geräte

Kieselgelplatten auf Folie 10 x 10 cm, Aluminiumoxidplatten auf Folie 10 x 10 cm
Chromatographiekammer von entsprechender Größe, Glaskapillaren 0.1 ml, Sprühflaschen aus Glas, Fön, 5 Meßkolben á 100 ml, Laborwaage

4. Reagenzien

Alanin, Cystein, Glycin, Phenylalanin, Tyrosin in 0.1 % Lösungen, NaOH 1 Mol/Liter
Butanol p.a., Eisessig p.a., Ninhydrin p.a., Aceton p.a.

5. Protokoll

Protokollnummer, Datum, Titel, Kurzfassung mit Durchführung, Ergebnissen und Beobachtungen

6. Literatur

Bhushan R., Amino Acids and their Derivatives in Handbook of Thin-Layer
Chromatography, CSS, Vol. 55, Part II/14: 353-389; 1999

		Prüfverfahren: <u>Trennung von Sorbin-, Benzoessäure und der</u> <u>p-Hydroxybenzoessäureester (PHB-Ester)</u>	
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von:	Unterschrift:

Seite 1 von 3

Abl.: UE_4.1_DC_Optimierung

1. Allgemeines

Gängige Konservierungsmittel sollen mittels Dünnschichtchromatographie getrennt und durch Fluoreszenzlöschung unter UV-Licht detektiert werden. Nach Optimierung der Trennung werden Lebensmittelproben in Wasser gelöst/suspendiert und nachfolgend die Konservierungsmittel mit Ether extrahiert. In diesem Extrakt sollen allfällig vorhandene Konservierungsmittel qualitativ nachgewiesen werden.

2. Aufgabenstellung

2.1. Optimierung der DC-Trennung:

2.1.1. Herstellung der Standardlösungen:

0.5 g Benzoessäure sowie je 50 mg Sorbinsäure und PHB-Ester in 100 ml Messkolben einwiegen und in Ethanol lösen und mit Ethanol auffüllen.

2.1.2. Herstellung der Laufmittel:

Petroleumbenzin/Tetrachlormethan/Chloroform/konz. Ameisensäure/konz. Essigsäure in verschiedenen Anteilen in einem Scheidetrichter mischen. Nach dem Absitzen wird die frisch zubereitete obere Phase zur Chromatographie verwendet.

Als Ausgangspunkt dient eine Zusammensetzung im Verhältnis 30/30/30/5/5.

2.1.3. Dünnschichtchromatographie:

Sättigung der Atmosphäre im Chromatographietank mit dem Laufmittel.

Auftrag der Proben auf die Platten (2-5 µl der Standardlösungen). Platten in den Tank stellen, verschließen und die Platten für 30 Minuten entwickeln (Steighöhe 14 cm). Danach für ca. 10 min. bei Warmluft (Haarfön) trocknen und die Substanzflecken im UV bei 254 nm detektieren. Die Laufmittelzusammensetzung wird auf Basis der Ergebnisse geändert und die Chromatographie wird erneut durchgeführt. Sind all Standardsubstanzen getrennt kann die Probenuntersuchung gemäß 2.2 unter diesen Bedingungen durchgeführt werden.

		Prüfverfahren: <u>Trennung von Sorbin-, Benzoesäure und der</u> <u>p-Hydroxybenzoesäureester (PHB-Ester)</u>	
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von:	Unterschrift:

Die Konservierungsmittel zeichnen sich unter optimalen Bedingungen nach steigenden R_f -Werten in nachstehender Reihenfolge ab:

	$R_f \cdot 100$ (Richtwerte)	Nachweisgrenze in μg
PHB-Methylester	13	0.2
PHB-Ethylester	18	0.2
PHB-Propylester	22	0.2
Benzoesäure	70	5.0
Sorbinsäure	62	0.5

- *Protokollieren Sie die Ergebnisse der Laufmittelloptimierung und begründen Sie die durchgeführten Veränderungen.*

2.2. Qualitative Untersuchung von Konservierungsmitteln

10 g Probenmaterial (max. 10 % Fettgehalt) mit wenig Wasser in einem Becherglas lösen, suspendieren (nötigenfalls verreiben, um homogenes Probenmaterial zu erhalten). 1 ml Schwefelsäure 2,5 mol/l zufügen und mit 200 ml Wasser in einen 500 ml- Scheidetrichter überführen. Mit 100 ml Ether während 5 Minuten sorgfältig schütteln, absetzen lassen und die organische Phase sammeln. 25 ml der organischen Phase am Rotavapor zur Trockene eindampfen. Den Rückstand mit 5 ml ca. 50 °C warmem Methanol aufnehmen und auf Zimmertemperatur abkühlen lassen. Die methanolische Lösung direkt auf die Dünnschichtplatte auftragen. Als Vergleichslösungen werden die Standardlösungen (siehe 2.1.1.) verwendet. Die Anwesenheit von Konservierungsmittel wird über den Vergleich der R_f -Werte Standards/Probe geprüft.

- *Protokollieren Sie die Ergebnisse der Untersuchung.*

3. Geräte

DC-Fertigplatten: Silcel-Mix-25-UV 25413, 10 X 20 cm; Schichtdicke 0.25 mm, Haarfön, Rotationsverdampfer, UV-Lampe (254 nm), Chromatographietank, Glaskapillare (2-5 μl)

		Prüfverfahren: <u>Trennung von Sorbin-, Benzoessäure und der</u> <u>p-Hydroxybenzoessäureester (PHB-Ester)</u>	
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von:	Unterschrift:

Seite 3 von 3

Abl.: UE_4.1_DC_Optimierung

4. Reagenzien

Diethylether (rein), Petroleumbenzin, Siedebereich 40 - 60 °C, Methanol, Tetrachlormethan, Chloroform, Ethanol, konz. Ameisensäure, konz. Essigsäure, Schwefelsäure, 2.5 mol/l: 140 ml konz. Säure mit Wasser zu 1 l verdünnen.

5. Protokoll

Protokollnummer, Datum, Titel, Kurzfassung mit Durchführung und Beobachtungen

6. Literatur

Gosselé J. A. W.: Modified Thin-Layer Chromatographic Separation of Preservatives. J. Chromatogr. 63, 433 (1971).

Woidich H., Gnauer H. und Galinovsky E.: Z. Lebensm.-Unters.Forsch. 133, 317 - 322 (1967).

Amtliche Methodensammlung des schweizerischen Lebensmittelbuch, Stand Januar 2001

Prüfverfahren:

Photometrische Eisenbestimmung

erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 16.02.03

Seite 1 von 5

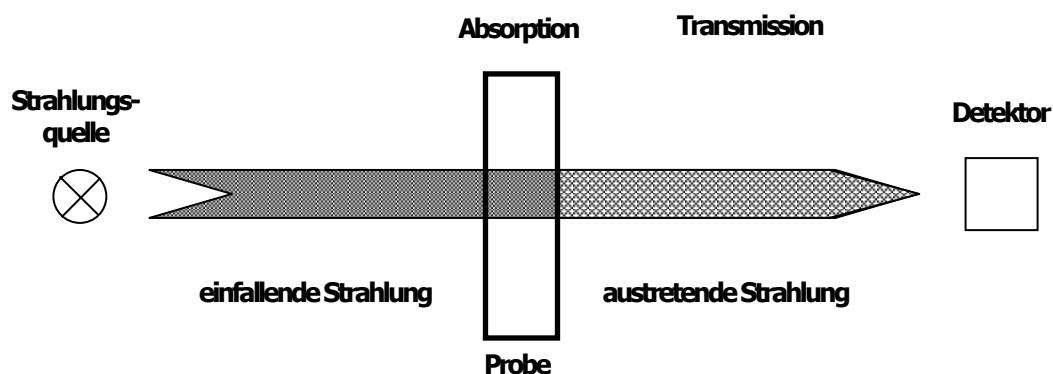
Abl.: UE_5.2_Photom

1. Allgemeines

Die **Spektroskopie** dient u.a. zur Strukturaufklärung von Stoffen. Materie wird elektromagnetischer Strahlung ausgesetzt; aufgrund von Wechselwirkungen (Resonanz) zw. Strahlung und Materie können **Spektren** aufgenommen werden. Man unterscheidet zwischen Absorptionsspektren (z.B. bei der Ultraviolett/Visible-Spektroskopie) und Emissionsspektren (z.B. beim Flammen-Photometer). Mit einem Photometer arbeitet man im UV/VIS – Bereich (ca. 1 – 400nm bzw. 400 – 750nm).

Messprinzip des Photometers:

In Abhängigkeit der Wellenlänge kommt es zu einer Absorption der einfallenden Strahlung. Die Intensitätsänderung zwischen ein- und ausfallender Strahlung, bei einer bestimmten Wellenlänge, ermöglicht eine quantitative Aussage über die Anzahl der absorbierenden Moleküle im Strahlengang der Küvette (physikalische Grundlage: Lambert-Beer' Gesetz).



Prüfverfahren:

Photometrische Eisenbestimmung

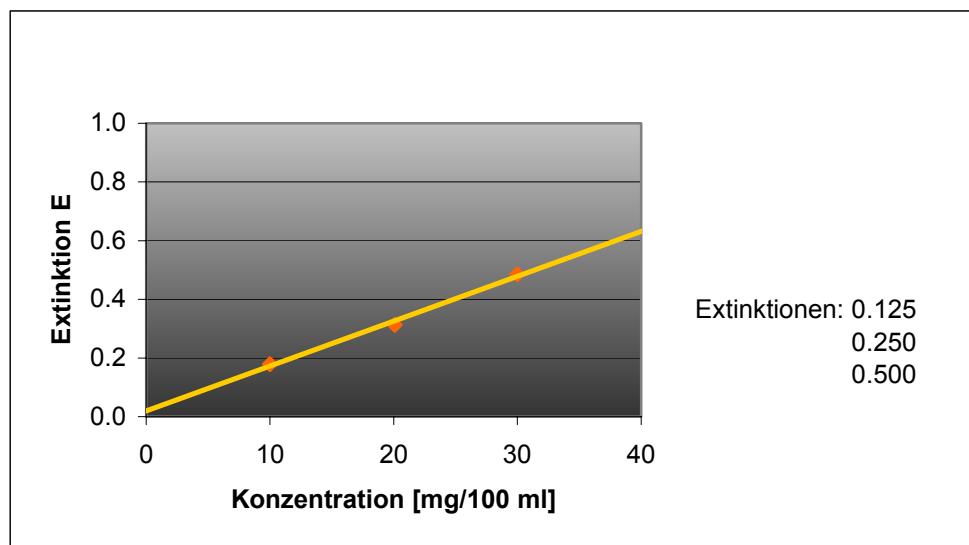
erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 16.02.03

Seite 2 von 5

Abl.: UE_5.2_Photom

Auswertung:

Aus der gemessenen Transmission T (Durchlässigkeit) wird die Extinktion E nach $E = -\log T$ berechnet. Eine unbekannte Konzentration läßt sich über eine Kalibriergerade mit 2 – 3 Meßpunkten durch Auftragen der Extinktion gegen die Konzentration ermitteln.



2. Aufgabenstellung

Eisenbestimmung in Wasser mit dem Photometer

Eisen(II)-Ionen bilden mit 1,10-Phenanthrolin einen orangeroten Komplex, der im pH-Bereich von 2.5 bis 9.0 stabil ist. Nicht in Form von Eisen(II)-Ionen vorliegendes Eisen wird gegebenenfalls nach dem Lösen - durch Reduktion mittels Hydroxylammoniumchlorid in Eisen(II)-Ionen übergeführt.

2.1. Herstellung der Lösungen:

Ammoniumacetat-Eisessig-Lösung:

100 g Ammoniumacetat und 125 ml Essigsäure (Eisessig) werden in entionisiertem Wasser gelöst und auf 250 ml aufgefüllt.

		Prüfverfahren:	
		<u>Photometrische Eisenbestimmung</u>	
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von:	Unterschrift:

Hydroxylammoniumchlorid-Lösung:

50 g Hydroxylammoniumchlorid in entionisiertem Wasser lösen und auf 250 ml auffüllen.

Phenanthrolin-Lösung:

1,25 g 1, 10 Phenanthroliniumchlorid in entionisiertem Wasser lösen und auf 250 ml auffüllen.

Eisen-Stammlösung:

4,9781 g Eisensulfat $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ werden in entionisiertem Wasser gelöst. Nach Zugabe von 5 ml HCl konz. wird die Lösung auf 1000 ml aufgefüllt.

1 ml enthält 1 mg Eisen bzw. 1000 mg Fe / l

Eisen-Standardlösung:

10 ml Eisen-Stammlösung werden in einen 1000 ml Meßkolben pipettiert und bis zur Marke mit entionisiertem Wasser aufgefüllt. 1 ml entspricht 0,01 mg Eisen.

➤ *Protokollieren Sie die Einwaage und Herstellung der Lösungen*

2.2. Durchführung der Bestimmung:

Zur Erfassung des ungelösten Eisengehaltes werden 100 ml Probe mit 2 ml konz. HCl 10 min. unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen werden davon 20 ml in einen 25 ml Schüttelzylinder pipetiert.

Zugabe von: **2 ml Ammoniumacetat-Eisessig-Lösung**
 1 ml Hydroxylammoniumchlorid-Lösung
 2 ml Phenanthrolin-Lösung

Bei der Zugabe der einzelnen Reagenzien muß die Lösung gut geschüttelt werden.

Soll nur Fe(II) ermittelt werden, so wird statt der Hydroxylammoniumchlorid-Lösung 1 ml entionisiertem Wasser zugegeben.

		Prüfverfahren: <u>Photometrische Eisenbestimmung</u>
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von: Unterschrift:

Reaktionszeit: 15 Minuten

Blindwert: entionisiertes Wasser + Reagenzien

Schichtdicke: 5 cm

Wellenlänge: 510 nm

2.3. Erstellung der Eichkurve:

Von der Standardlösung (10 mg Fe / l) wird folgende Verdünnungsreihe erstellt.

3 ml / 100 ml	entspricht 0,3 mg Fe / 1000 ml
7 ml / 100 ml	entspricht 0,7 mg Fe / 1000 ml
10 ml / 100 ml	entspricht 1,0 mg Fe / 1000 ml
20 ml / 100 ml	entspricht 2,0 mg Fe / 1000 ml
30 ml / 100 ml	entspricht 3,0 mg Fe / 1000 ml

Von den einzelnen Standards je 20 ml in einen 25 ml Schüttelzylinder pipettieren.

Reagenzienzugabe wie oben.

2.4. Berechnung des Ergebnisses:

Ablesung der Eisenkonzentration aus der Eichkurve in mg Fe / l

Gegebenenfalls Umrechnung auf FeSO₄:

f Fe ---> FeSO₄ · 7 H₂O = 4,9781

f FeSO₄ · 7 H₂O ---> Fe = 0,2009

3. Geräte

250 ml und 1000 ml Meßkolben, 25 ml Schüttelzylinder, Photometer

4. Reagenzien

Ammoniumacetat, Essigsäure (Eisessig), Hydroxylammoniumchlorid,
Phenanthroliniumchlorid, Eisensulfat, HCl konz.

		Prüfverfahren: <u>Photometrische Eisenbestimmung</u>
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von: Unterschrift:
		Seite 5 von 5 Abl.: UE_5.2_Photom

5. Protokoll

Protokollnummer, Datum, Titel, Kurzfassung mit Durchführung und Beobachtungen

6. Literatur

analog DEV E 1 - Abweichung: HCl-Aufschluß an Stelle H_2SO_4/S_2O_8

Photometrische Metall- und Wasseranalysen (Zimmermann Methode B-b6/2)

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Essen 1967

		Prüfverfahren: <u>Quantitative Bestimmung von Koffein und typischen Verunreinigungen</u>
erstellt / geändert:	Datum: 23.02.03	von: Unterschrift:

1. Allgemeines

Die quantitative Gehaltsbestimmung und die Anwesenheit (Menge) von Verunreinigungen ist ein wesentlicher Qualitätsparameter für Rohstoffe, die in Arznei- und Lebensmitteln eingesetzt werden. Ziel dieser Übung(en) ist es, Proben des Rohstoffes Koffein auf deren Gehalt an Koffein und auf die Anwesenheit von Verunreinigungen zu untersuchen. Dabei wird einerseits eine chromatographische HPLC-Methode zur simultanen Bestimmung des Gehaltes und der Verunreinigungen verwendet und andererseits eine Titrationsmethode zur Bestimmung des Gehaltes alleine.

2. Aufgabenstellung

2.1 Bestimmung von Koffein und Verunreinigungen mit HPLC

2.1.1 Laufmittel

1.64 g Natriumazetat wasserfrei genau in einen 2000 ml Messkolben einwiegen, in Wasser lösen und bis zur Marke auffüllen, mischen. 1910 ml dieser Lösung in einen anderen 2000 ml Messkolben überführen und mit 50 ml Acetonitril und 40 ml Tetrahydrofuran mischen, mit Eisessig pH=4.5 einstellen, filtrieren und entgasen.

2.1.2 Chromatographisches System

Die HPLC-Stahlsäule (C18, 3-5 μm mit 4.6 x 150 mm) wird mit einer isokratischen Pumpe, dem Probeaufgabesystem und einem UV-Detektor (275 nm) verbunden. Die Säule, die nicht temperiert werden muss, wird zuerst mit Wasser gespült. Danach wird die Säule bei einer Flussrate von 1 ml/min mit dem Laufmittel äquilibriert. Nach ca. 1 Stunde können die Standard- und Probelösungen in das System injiziert werden.

Das Injektionsvolumen beträgt in Abhängigkeit von der Empfindlichkeit des Detektors 10-30 μl .

2.1.3 Charakteristische Kenngrößen des Systems

Beträgt die relative Retentionszeit für Koffein 1.00, sollte die relative Retentionszeit für Isokoffein, Theobromin, Paraxanthin, Theophyllin ca. 0.39,0.43, 0.61,0.69.

Prüfverfahren:
**Quantitative Bestimmung von Koffein und
typischen Verunreinigungen**

erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 23.02.03

Seite 2 von 4

Abl.: UE_67_34_HPLC_Potentiometrie

Tailing Faktor für jeden Peak ist nicht mehr als 2.0

Auflösung (R) zwischen den identifizierten Peaks ist nicht weniger als 1.5.

2.1.4 Herstellung der Standard- und Probelösungen

Lösung (1): 2 mg von Isokoffein, Theobromin, Paraxanthin und Theophyllin

(synthesebedingte Verunreinigungen in Koffein) in 200 ml Messkolben einwiegen, mit 50 ml Wasser mit Ultraschall lösen, schütteln und auffüllen.

Lösung (2): 5 mg Koffein-Standard in 25 ml Messkolben mit 5 ml Lösung (1) mischen. 10 ml Wasser zugeben, mit Ultraschall lösen, schütteln und auf 25 ml mit Wasser auffüllen.

Diese Lösung enthält je 0.1 % der genannten Verunreinigungen (2 µg/10 ml) bezogen auf Koffein (2 mg/10 ml).

Lösung (3): 10 mg Substanz genau in 50 ml Messkolben einwiegen. 10 ml Wasser zugeben, schütteln, mit Ultraschall lösen, schütteln und auf 50 ml mit Wasser auffüllen.

Hintereinander werden die Standardlösung (2) und die Probelösung (3) chromatographiert. Aus den Chromatogrammen wird der Gehalt an Koffein und der Anteil synthesebedingter Verunreinigungen bestimmt.

2.1.5 Auswertung

Die Peakflächen von Koffein (und den Nebenprodukten) in den Chromatogrammen aus Probelösung (3) und Standardlösung (2) vergleichen und Gehalt (%) daraus errechnen:

$$\% \text{-Gehalt Koffein} = 50 \times c \times (r_u / r_s)$$

c... Konzentration Koffein-Standard in mg/10 ml

r_u... Fläche Koffein von Lösung (3) (Probe)

r_s... Fläche Koffein von Lösung (2) (Standard)

➤ *Der Gehalt an Koffein muss zwischen 98.5-101 % liegen, um für pharmazeutische Zwecke verwendbar zu sein.*

Prüfverfahren:
**Quantitative Bestimmung von Koffein und
typischen Verunreinigungen**

erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 23.02.03

Seite 3 von 4

Abl.: UE_67_34_HPLC_Potentiometrie

%-Gehalt Verunreinigung = $50 \times c \times (r_u/r_s)$

c... Konzentration Verunreinigung in $\mu\text{g}/10 \text{ ml}$

r_u ... Fläche Verunreinigung von Lösung (3) (Probe)

r_s ... Fläche Verunreinigung von Lösung (2) (Standard)

- *Der Gehalt an individuellen Verunreinigungen darf 100 % in keinem Fall überschreiten. Zusätzlich darf der Anteil an Verunreinigungen insgesamt 0.2 % bezogen auf den Koffeingehalt nicht überschreiten.*

2.2 Bestimmung von Koffein mit Titration

2.2.1 Standardtitration

Ca. 0.170 g Koffein Standard werden genau eingewogen und unter Erhitzen in 5 ml wasserfreier Essigsäure gelöst. Erkalten lassen mit 10 ml Acetanhydrid und 20 ml Toluol versetzen. Mit 0.1 mol/l Perchlorsäure bis zum Äquivalenzpunkt titrieren. (Endpunktserkennung potentiometrisch, Doppelbestimmung durchführen).

2.2.2 Probetitration

Ca. 0.170 g Koffein Probe werden genau eingewogen und unter Erhitzen in 5 ml wasserfreier Essigsäure gelöst. Erkalten lassen mit 10 ml Acetanhydrid und 20 ml Toluol versetzen. Mit 0.1 mol/l Perchlorsäure bis zum Äquivalenzpunkt titrieren. (Endpunktserkennung potentiometrisch, Doppelbestimmung durchführen).

Der Gehalt an Koffein in der Probe wird nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{- Gehalt} = \frac{EW_{\text{Probe}}}{EW_{\text{Standard}}} * \frac{\text{Verbrauch}_{\text{Standard}}}{\text{Verbrauch}_{\text{Probe}}} * 100$$

		Prüfverfahren: <u>Quantitative Bestimmung von Koffein und typischen Verunreinigungen</u>
erstellt / geändert:	Datum: 23.02.03	von: Unterschrift:

3. Geräte

HPLC-System (isokratische Pumpe, Probenaufgabesystem, UV-Detektor, Datenauswertesystem), Titrationseinheit mit potentiometrischer Endpunktserkennung, Ultraschallbad, Messkolben, Titrationskolben

4. Reagenzien

Natriumazetat (p.a.), Acetonitril (HPLC-grade), Tetrahydrofuran (HPLC-grade), Eisessig (p.a.), Eisessig (wasserfrei), Acetanhydrid (wasserfrei), Toluol (wasserfrei), Perchlorsäure (p.a.)

Standardsubstanzen Koffein, Isokoffein, Theobromin, Paraxanthin, Theophyllin

5. Protokoll

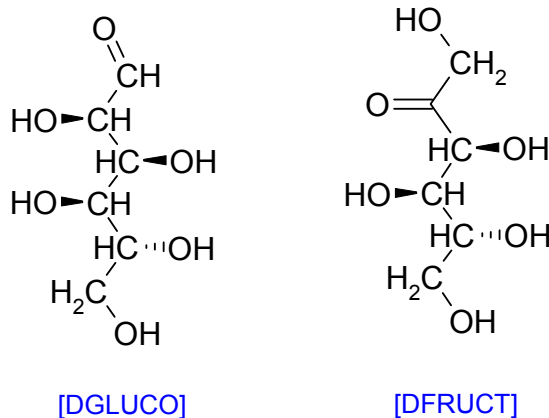
Protokollnummer, Datum, Titel, Kurzfassung mit Durchführung und Beobachtungen

6. Literatur

Amerikanisches Arzneimittelbuch (USP XXIV, 2002)

1. Allgemeines**1.1 Prinzip**

Der Gehalt an D-Glucose kann vor und nach enzymatischer Hydrolyse des Disaccharids Saccharose (Speisenzucker, bestehend aus 1 Molekül Glucose verbunden mit 1 Molekül Fructose) bestimmt werden.



Durch die Bestimmung der D-Glucose vor der enzymatischen Hydrolyse wird der Anteil an freier D-Glucose im Speisenzucker bestimmt. Nach der enzymatischen Hydrolyse wird die aus der Saccharose freigesetzte Glucose bestimmt.

Der erste Teil ist daher eine Reinheitsprüfung, der zweite Teil dient der Gehaltsbestimmung von Saccharose in der Probe.

1.2 D-Glucosebestimmung vor der enzymatischen Hydrolyse (Inversion)

Das Enzym Hexokinase (HK) katalysiert bei pH 7.6 die Phosphorylierung von D-Glucose mit Adenosin-5'-triphosphat (ATP) zu Glucose-6-Phosphat unter gleichzeitiger Bildung von Adenosin-5'-diphosphat (ADP).



Das entstehende D-Glucose-6-phosphat (G-6-P) wird von Nicotinamidadenin-dinucleotid-phosphat (NADP) in Gegenwart von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) spezifisch zu D-Gluconat-6-phosphat oxidiert, wobei reduziertes Nicotinamidadenin-dinucleotid-phosphat (NADPH) entsteht.



		Prüfverfahren: <u>Enzymatische Zuckerbestimmung</u>		
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von:	Unterschrift:	Seite 3 von 5

Abl.: UE_8.4_Enzym_Zucker

2.2 Testbedingungen:

Spektralphotometer, Wellenlänge: 365 nm
 Glas- oder Kunststoffküvette: 1.00 cm Schichtdicke
 Temperatur: 20-25°C
 Testvolumen: 3.020 ml
 Messung gegen Luft (im Strahlengang keine Küvette)
 Probelösung: 4-150 µg Saccharose/D-Glucose/pro Testansatz (in 0.10-2.00 ml Volumen)

2.3 Probenvorbereitung

Etwa 10-20 ml Bier in einem Becherglas zirka 30 sec. mit einem Glasstab zur Entfernung der Kohlensäure rühren oder kurz im Ultraschallbad entgasen. Die weitgehend CO₂-freie Probe wird unverdünnt zum Test eingesetzt.

2.4 Testdurchführung

In Küvetten pipettieren	Leerwert Saccharose-Probe	Saccharose-Probe	Leerwert D-Glucose-Probe	D-Glucose-Probe
Lösung 3	0.200 ml	0.200 ml	-	-
Probelösung	-	0.100 ml		0.100 ml
mischen, 15-20 min. bei Raumtemperatur (20-25 °C) stehen lassen, Zugabe von				
Lösung 1	1.000 ml	1.000 ml	1.000 ml	1.000 ml
Wasser	1.800 ml	1.700 ml	2.000 ml	1.900 ml
mischen, nach ca. 3-5 min. Extinktion der Lösungen bei 365 nm gegen Luft messen und für jede Lösung dokumentieren (E1). Die Reaktion wird gestartet durch Zugabe von				
Suspension 2	0.020 ml	0.020 ml	0.020 ml	0.020 ml
mischen, nach 15-20 min. Extinktion der Lösungen bei 365 nm gegen Luft messen und für jede Lösung dokumentieren (E2).				

2.5 Auswertung, Rechenhinweise

Für den Leerwert der Saccharose-Probe die Differenz $E_2 - E_1 = \delta_{LW-Sacch}$ berechnen. In gleicher Weise Differenzen $\delta_{Probe-Sacch}$, $\delta_{LW-GLuc}$, $\delta_{Probe-GLuc}$, δ_{Std-S} und δ_{Std-G} errechnen.

Im nächsten Schritt werden von den entsprechenden Probendifferenzen die Leerwertdifferenzen abgezogen (z.B. $\Delta_{Saccharoseprobe} = \delta_{Probe-Sacch} - \delta_{LW-Sacch}$)

		Prüfverfahren: <u>Enzymatische Zuckerbestimmung</u>	
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von: Unterschrift:	Seite 5 von 5

Abl.: UE_8.4_Enzym_Zucker

4. Reagenzien

Destilliertes Wasser, hochrein

5. Protokoll

Protokollnummer, Datum, Titel, Kurzfassung mit Durchführung, Ergebnissen und Beobachtungen

6. Literatur

Boehringer Mannheim Biochemica, Methoden der enzymatischen Bioanalytik und Lebensmittelanalytik, 1997

		Prüfverfahren: Gaschromatographie
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von: Unterschrift:

1. Allgemeines

Der Unterschied zwischen Gaschromatographie und anderen chromatographischen Verfahren besteht in der Verwendung von Gasen als mobile Phase.

Als stationäre Phase dienen Adsorptionsmaterialien (Gas - Adsorptionschromatographie, GSC) oder Flüssigkeiten, welche auf Trägermaterialien aufgezogen sind (Gasverteilungschromatographie, GLC).

Da die GSC eher von geringerer Bedeutung ist, wird nachfolgend nur die GLC besprochen. Der Vorteil gegenüber anderen Trennverfahren besteht darin, dass kleine Mengen eines Substanzgemisches im gleichen Arbeitsgang aufgetrennt und quantitativ bestimmt werden können. Grundsätzlich soll die zu untersuchende Substanz unterhalb von 400 °C verdampfbar sein. Bei schwerflüchtigen Substanzen (z.B. Makromoleküle) untersucht man die Pyrolyseprodukte. Eine weitere Möglichkeit bietet die Reaktionschromatographie, bei der auf einer Vorsäule die Substanz durch chemische Reaktion in eine flüchtige Verbindung umgesetzt wird.

1.1 Einsatzbereiche der GC

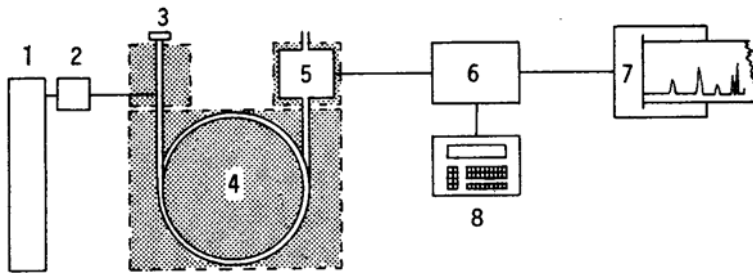
- Quantitative Bestimmung einzelner Komponenten eines Gemisches
- Qualitative Bestimmung einzelner Komponenten eines Gemisches mit Hilfe von Vergleichssubstanzen, spezifischen Detektoren oder in Kombination mit anderen Nachweismethoden
- Kombination GC - Spektroskopie, indem die aufgetrennten und quantitativ bestimmten Komponenten des Gemisches isoliert und spektroskopisch (z.B. IR, MS, NMR) untersucht werden
- Spurenanalyse (Nachweisgrenze etwa 1 ppb)
- Untersuchung von Reaktionsabläufen durch Konzentrationsbestimmung von Reaktions-komponenten in Abhängigkeit der Zeit
- Betriebs- und Prozesskontrollen (z.B. mit automatischer On-Line Einspritzvorrichtung)

		Prüfverfahren: Gaschromatographie	
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von:	Unterschrift:

1.2. Aufbau und Funktion eines Gaschromatographen

1.2.1. Aufbau eines GC

Ein Gaschromatograph besteht im Wesentlichen aus folgenden Bauteilen:



Thermostatisierte Teile des Gaschromatographen mit verstellbarer Temperatur sind grau unterlegt.

1 Trärgasquelle: meistens Helium

2 Trärgasregelung: Feineinstellung des Arbeitsdruckes und der Gasmenge/Zeit

3 Injektor: heizbar, zum verdampfen der eingespritzten Probe

4 Trennsäule: gefüllt mit Adsorptionsmittel oder mit Trägermaterial, auf dem die flüssige stationäre Phase aufgezo-gen ist

5 Detektor: erzeugt elektrische Signale beim Passieren von Substanzen

6 Elektronischer Verstärker: für die Signale des Detektors

7 Schreiber

8 Integrator oder Computer

1.2.2. Funktion eines GC

- Das als mobile Phase dienende Trärgas strömt mit einer bestimmten Fließgeschwindigkeit durch eine beheizte Trennsäule
- Das zu trennende Probengemisch wird meistens mit einer Injektions-spritze durch die Gummimembrane (Septum) des Injektors an den Anfang der Säule gebracht. Der Injektor wird so beheizt, dass die Substanzprobe sofort verdampft.
- Diese Dämpfe werden vom Trärgas durch die Trennsäule transportiert, wobei sich die Komponenten infolge der Verteilungs- bzw. Adsorptionsvorgänge trennen.

		Prüfverfahren: Gaschromatographie
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von: Unterschrift:

- Am Ende der Trennsäule misst ein Detektor die Menge der vorbeiströmenden, einzelnen Komponenten. Das dabei entstehende elektrische Signal ist proportional zur jeweiligen Substanzmenge.
- Diese Signale werden verstärkt, mit einem Schreiber aufgezeichnet und je nach Anlage manuell, mit Integratoren oder Computern ausgewertet.

1.3. Trennsäulen

Je nach Verwendungszweck sind Trennsäulen in den verschiedensten Dimensionen und Ausführungen (präparative Säulen, analytische Säulen, Kapillarsäulen) meist fertig gefüllt erhältlich.

Länge: von ca. 50 cm bis einige Meter (Nomlänge Analytik 2 m)

Durchmesser: 0.2 - 50 mm

Material: Glas, Stahl

Füllung: Flüssige stationäre Phase als dünner Film auf ein inertes Trägermaterial (Korngröße 0,1-0,8 mm) aufgetragen.

Belegung: Üblich sind 3 - 10% stationäre Phase bezogen auf das Trägermaterial. Das Trägermaterial darf keine Adsorptionswirkung durch den Flüssigkeitsfilm hindurch haben. Bei Kapillarsäulen dient die Säulenwand als Träger für die stationäre Phase.

1.3.1. Wahl der Säule:

Die Wahl der stationären Phase ist von entscheidender Bedeutung.

Polare Gemische lassen sich auf einer mit polarer stationärer Phase gefüllten Säule auftrennen. Unpolare Gemische trennt man auf einer unpolaren stationären Phase.

Polare stationäre Phasen bestehen typischerweise aus Polyethylenglykolen (Carbowaxe).

Unpolare stationäre Phasen bestehen typischerweise aus Siliconölen.

Siehe folgende Tabelle:

		Prüfverfahren: Gaschromatographie	
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von:	Unterschrift:

Seite 4 von 16

Abl.: UE_9.5_Gaschromatographie

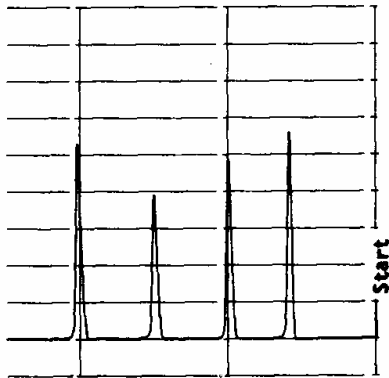
Stationäre Phase	Belegung in %G	Trägermaterial	Temperaturbereich °C	Anwendung
Reoplex 400	3%	Gaschrom Q	bis 200	Stärker polare Substanzen als für Carbowax 20 M
Polyester	10%	80-100 mesh		
Carbowax 1540	3%		bis 170	Niedersiedende polare Substanzen z.B. Amine
Polyaethylenglykol mit MG - 15000	10%			
Carbowax 20 M	3%	Gaschrom Q	bis 230	Höhersiedende polare Substanzen
Polyaethylenglykol mit MG - 20000	10%	80-100 mesh		
Silikonoel OV 225	3%	Gaschrom Q	bis 250	Mittelpolare Substanzen
Cyano-methyl- propyl-silikon	10%	80-100 mesh		
Silikonoel OV 17	3%	Gaschrom Q	bis 320	Mittelpolare Substanzen, Aromaten
Methylsilikon/Phen ylsilikon	10%	80-100 mesh		
Silikonoel OV 101	3%	Gaschrom Q	bis 350	Unpolare Substanzen, Aliphaten
Methylsilikon	10%	80-100 mesh		

Mit diesen Säulentypen ihnen lassen sich etwa 80% aller gaschromatographischen Probleme lösen.

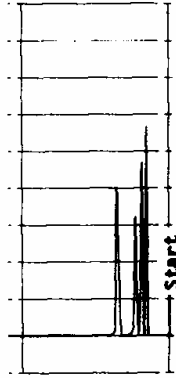
1.3.2 Beeinflussung der Trennwirkung

Die Trennwirkung wird beeinflusst durch die Beschaffenheit der Säule, die Temperatur der Säule und die Trägergasgeschwindigkeit (siehe folgende Abbildung).

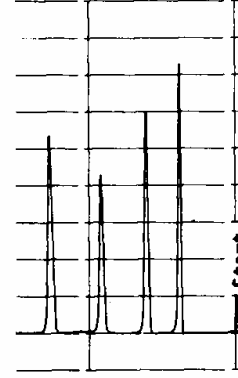
		Prüfverfahren: Gaschromatographie	
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von:	Unterschrift:



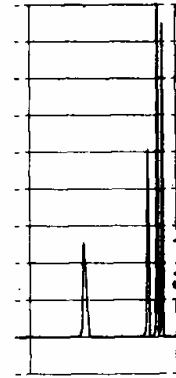
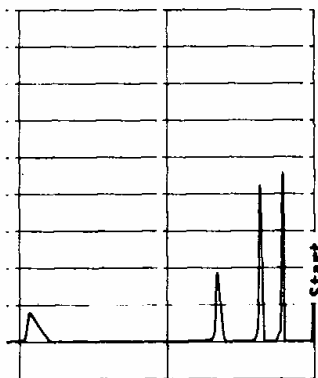
Temperatur zu tief
Chromatogramm dauert zu
lange



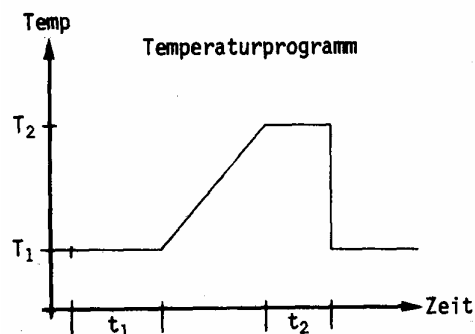
Temperatur zu hoch
schlechte Auftrennung



Temperatur richtig
Trennung optimal

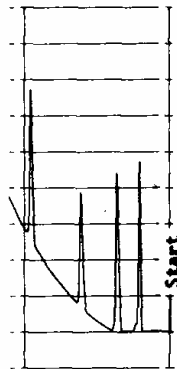


Die Auftrennung dieser vier Komponenten gelingt mit einem sog. Temperaturprogramm (siehe folgende Abbildung). Man arbeitet zunächst mit der konstanten Temperatur T_1 . Nach Ablauf dieser isothermen Vorperiode beginnt ein linearer Temperaturanstieg bis zum Erreichen der Temperatur T_2 . Diese wird konstant gehalten, bis das Chromatogramm beendet ist.



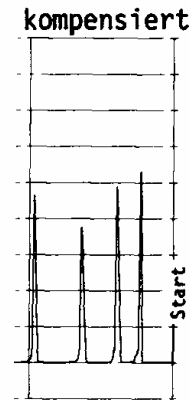
		Prüfverfahren: Gaschromatographie	
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von:	Unterschrift:

Trennung mit Temperaturprogramm



Vorteil : alle Komponenten aufgetrennt
Nachteil: mit zunehmender Temperatur verdampft mehr stationäre Phase (Säulenbluten) und die Nulllinie driftet

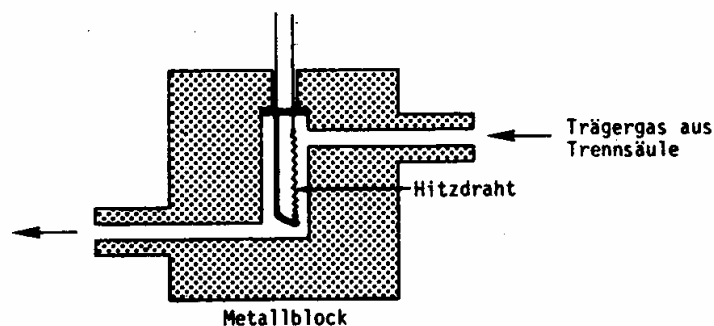
Trennung mit Temperaturprogramm kompensiert



Durch Gegeneinander-schalten mit einer gleichartigen zweiten Säule kompensieren sich die Driftsignale aus. Zu diesem Zweck verwendet man Zwei-säulengeräte.

1.4. Detektoren

1.4.1. Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD)



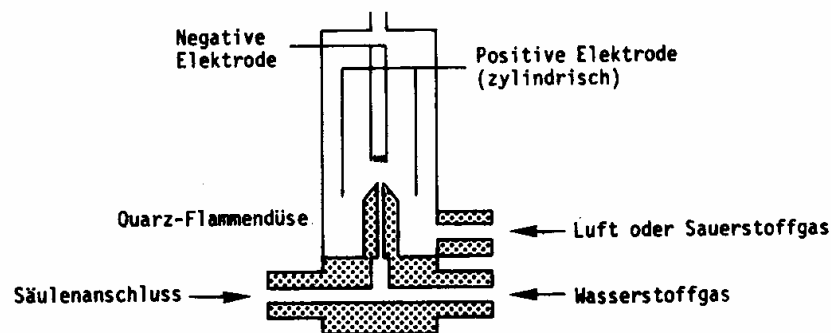
Helium (Trärgas) als kleines Gasmolekül besitzt eine gute Wärmeleitfähigkeit (Null-Wert). Substanzen mit höherem Molekulargewicht weisen eine kleinere Leitfähigkeit auf, der Hitzdraht wird heißer, was durch einen größeren Widerstand einen kleineren Stromfluss bewirkt (-+Schreiber).

		Prüfverfahren: Gaschromatographie
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von: Unterschrift:

Anwendung: Für sämtliche Substanzen, mit Ausnahme des Trägergases.

Hinweise: Der Hitzdrahtstrom (Current) darf nur eingeschaltet werden, wenn Trägergas durch den Detektor strömt; der Hitzdraht würde sonst durch Überhitzung verbrennen. Alkylhalogenide, HCl und andere aggressive Substanzen können den Hitzdraht zerstören.

1.4.2. Flammenionisationsdetektor (FID):



Das aus der Säule austretende Gasmisch (Substanz plus Trägergas) wird zusammen mit Wasserstoff verbrannt. Die durch die Verbrennung erzeugten Ionen und freien Elektronen werden von den Elektroden angezogen und verringern dadurch die Spannung zwischen den Elektroden proportional zur Menge. Der Spannungsabfall wird elektronisch verstärkt und das Signal dem Schreiber zugeleitet.

Anwendung: Für die meisten organischen Substanzen, wo eine große Ansprechempfindlichkeit verlangt ist (der FID ist etwa 1000mal empfindlicher als der WLD, Empfindlichkeit ca. $1-10 \cdot 10^{-12}$ g/sek). Wasserdampf und Luft werden nicht angezeigt.

Hinweise: Für genaue quantitative Analysen ist für jede Substanz ein Eich- oder Korrekturfaktor zu bestimmen (-Auswertung quantitativ). Wegen der hohen Empfindlichkeit des FID ist extrem sauber zu arbeiten. Das Verhältnis Trägergas, Brennergas und Luft muss genau aufeinander abgestimmt sein (meist 1+1+10).

		Prüfverfahren: Gaschromatographie
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von: Unterschrift:

1.5. Arbeitstechnik

Für die Bedienung der verschiedenen Gerätetypen siehe jeweilige Gerätecheckliste.

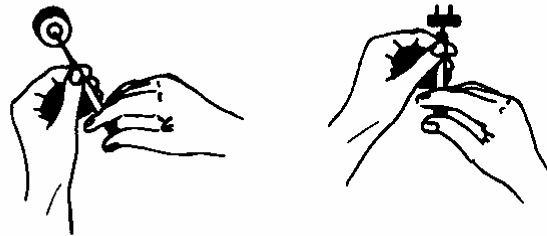
1.5.1 Allgemeiner Arbeitsablauf

- Gerät und Detektor wählen und entsprechende Trennsäule einbauen.
- Trägergasstrom einstellen und System auf Dichtigkeit prüfen.
- Temperaturen für die verschiedenen Heizblöcke wählen (Injektor, Interface und WLD ca. 50°C heisser als Trennsäule) und Gerät nach Checkliste einschalten.
- Beim FID Gasgemisch entzünden.
- Schreiber vorbereiten (Null-Linie auf 10% stellen).
- Abschwächung des Detektorsignals (Attenuation) so wählen, dass möglichst große Peaks aufgezeichnet werden (evtl. für jeden Peak gemäß Vorversuch ändern).
- Probe vorbereiten.
- Probe einspritzen und Start auf Schreiber markieren.
- Bei Verwendung eines Integrators dient der Schreiber nur zu Kontrollzwecken.
- Das Markieren des Starts geschieht durch betätigen der Runtaste.

1.5.2 Handhabung der Injektionsspritze:

- Spritze auf Sauberkeit kontrollieren.
- Probe aufziehen, Luftblasen durch mehrmaliges Ausstoßen und Aufziehen entfernen.
- Spritze senkrecht nach oben halten, Kanüle durch ein Papierfilter stoßen und gewünschte Menge einstellen.
- Durch Abziehen des Filterpapiers Kanüle abwischen
- Etwas Luft einziehen.
- Spritze mit beiden Händen zum Septum (Einspritzgummimembran) führen
- Kanüle möglichst weit einstecken (Stempel festhalten)
- Rasch ausstoßen
- Nach 1-2 Sekunden Kanüle herausziehen (Stempel durchgedrückt)
- Spritze reinigen (Lösungsmittel durchsaugen und mit Luft trocknen)

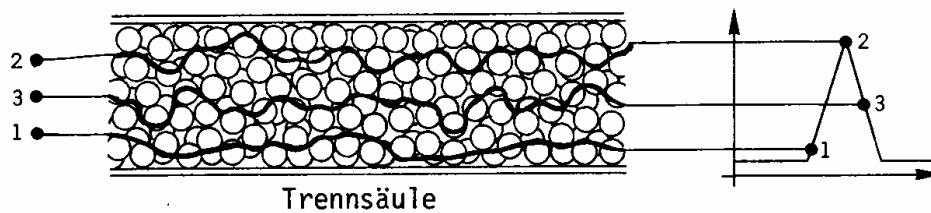
		Prüfverfahren: Gaschromatographie	
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von:	Unterschrift:



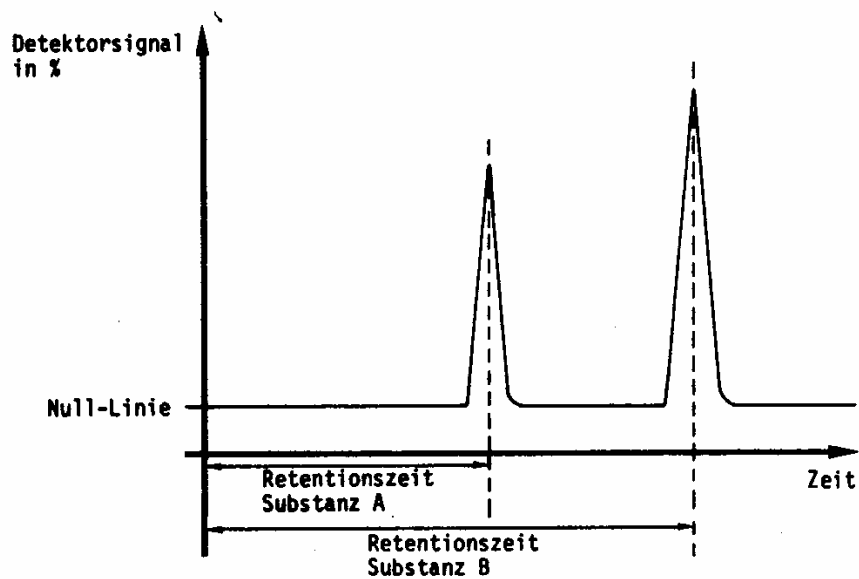
Handhabung der Injektionsspritze

1.6. Auswertung

1.6.1 Entstehung eines Peaks



1.6.2 Aufzeichnung/Darstellung der Peaks



		Prüfverfahren: Gaschromatographie	
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von:	Unterschrift:

1.6.3. Auswertung qualitativ:

Direkter Vergleich:

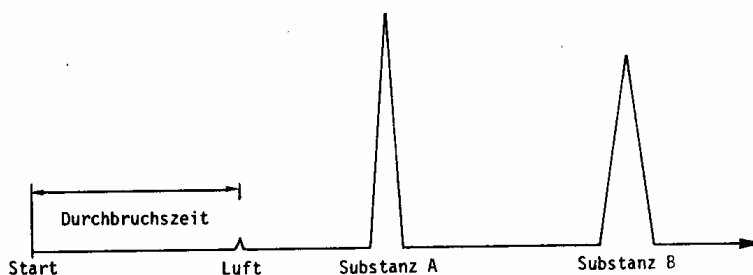
Auswertung aufgrund der Retentionszeiten anhand von Literaturwerten, Vergleichssubstanzen und Vergleichschromatogrammen.

Zumischmethode:

Durch Zumischen der vermuteten Substanz zur Probe kann beobachtet werden, ob sich die Peakhöhe verändert oder ein neuer Peak entsteht. Auf diese Weise wird eine Substanz eindeutig identifiziert.

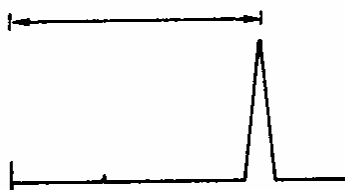
1.6.4. Retentionszeitbestimmung:

Die Durchbruchzeit ist die Zeit zwischen Injektion und dem Auftreten des Luftpeaks.



Die unkorrigierte Retentionszeit (Brutto-Retentionszeit t) wird vom Zeitpunkt der Injektion bis zum Auftreten des Peakmaximums ermittelt.

Start → Peakmaximum



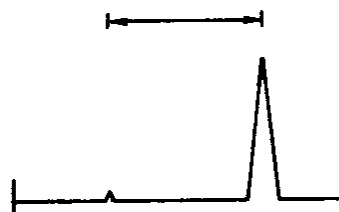
		Prüfverfahren: Gaschromatographie	
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von:	Unterschrift:

Diese ist abhängig von:

- der Länge und dem Durchmesser der Säule (Säulenvolumen)
- der Art der stationären Phase
- der Temperatur der Säule
- der Art und Strömungsgeschwindigkeit des Trägergases
- dem Druckabfall der Säule
- dem Totvolumen der Anlage

Die korrigierte Retentionszeit (Netto-Retentionszeit) wird vom Auftreten des Luftpeaks bis zum Auftreten des Peakmaximums ermittelt.

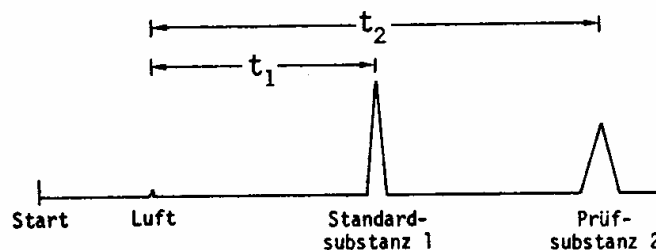
Luftpeak → Peakmaximum



Gleiche Abhängigkeiten wie oben, mit Ausnahme des Totvolumens.

Die relative Retentionszeit (r) wird aus dem Verhältnis der Netto-Retentionszeiten der Prüfsubstanz zu einer bekannten Standardsubstanz ermittelt.

$$r = \frac{t_2}{t_1}$$



		Prüfverfahren: Gaschromatographie
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von: Unterschrift:

1.6.5. Auswertung quantitativ:

Ermittlung der Peakflächen:

Wägemethode (historisch): Ausschneiden der Peaks und Wägen der ausgeschnittenen Peaks auf einer Waage (Gewicht proportional zur Größe).

Dreiecksmethode: Bei symmetrischen Peaks kann die Fläche mit folgender Formel näherungsweise berechnet werden:

$$A_{peak} = \frac{Peakbreite - Peakhöhe}{2}$$

Halbwertsbreite: Ebenfalls bei symmetrischen Peaks kann die Fläche mit folgender Formel näherungsweise berechnet werden:

$$A_{peak} = Peakbreite \text{ in halber Höhe} \cdot Höhe$$

Flächenberechnung: Bei asymmetrischen Peaks kann die Fläche mit folgender Formel näherungsweise berechnet werden

$$A_{peak} = \frac{Breite_{15\%Höhe} + Breite_{85\%Höhe}}{2} \cdot Höhe$$

Planimetrieren: Ausmessen der Flächen mit einem Planimeter.

Integrieren (übliche Methode): Ermitteln des Flächeninhalts auf elektronischem Weg mit einem Integrator oder Computer.

Auswertung nach der 100%-Methode:

Auswertung über die Peakflächen (Flächenprozent).

Dabei wird die Gesamtfläche aller Peaks gleich 100% gesetzt, die Flächen aller Komponenten sind dann entsprechend der Peakfläche ein prozentueller Anteil davon.

Voraussetzung dafür ist, dass alle Komponenten die Säule vollständig verlassen und vom Detektor erfasst werden.

$$\text{Gehalt Komponente A (Flächen - \%)} = (100 - BB) \frac{FA}{SF}$$

FA = Fläche der Komponente A; SF = Summe aller Flächen im Chromatogramm

BB = "Bereits Bestimmtes" (Gehalt in % an Komponenten, die bereits mit einer anderen Methode bestimmt und durch das Gaschromatogramm nicht erfasst) oder ausgewertet wurden.

		Prüfverfahren: Gaschromatographie	
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von:	Unterschrift:

Auswertung mit Korrekturfaktoren:

Da Detektoren nicht für alle Substanzen die gleiche Empfindlichkeit aufweisen, sind oftmals mit einem Gemisch von Eichsubstanzen Korrekturfaktoren zu bestimmen und diese in der Berechnung zu berücksichtigen.

$$\text{Gehalt Komponente A (Massen - Anteile)} = (100 - BB) \frac{FA * KA}{SKF}$$

FA = Fläche der Komponente A; KA = Flächen-Korrekturfaktor der Komponente A

SKF = Summe der korrigierten Flächen im Chromatogramm; BB = "Bereits Bestimmtes"

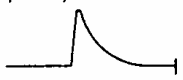
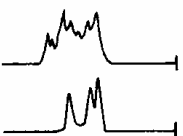
(Gehalt in % an Komponenten, die bereits mit einer anderen Methode bestimmt und durch das Gaschromatogramm nicht erfasst oder ausgewertet wurden)

Berechnung von Flächenkorrekturfaktoren unter Verwendung einer Vergleichslösung:

$$KA = \frac{FX * \%A}{\%X * FA}$$

KA = Flächen-Korrekturfaktor der Komponente A; FA = Fläche der Komponente A; FX = Fläche der Komponente X für welche der Flächenkorrekturfaktor = 1 gesetzt wird (KX = 1); U = Gehalt in Massen-% an Komponente A im Vergleichsgemisch; %X = Gehalt an Massen-% an Komponente X im Vergleichsgemisch.

1.6.6. Fehlerhafte Chromatogramme und deren mögliche Ursachen:






Erscheinung	Mögliche Ursachen	Prüfungen und/oder Abhilfen
"Peaks" mit flachem Anstieg (heading peaks) 	a) Säule überladen; zu grosse Probenmenge für Säulenabmessungen b) Kondensation der Probe im System c) Schlechte Einspritztechnik	a) Kleinere Probenmenge verwenden b) Sicherstellen, dass Verdampfer- und Detektortemperatur richtig eingestellt sind c) Einspritztechnik überprüfen
Unaufgelöste "Peaks" 	a) Zu hohe Säulentemperatur b) Zu kurze Säule c) Stationäre Phase zwischen dem Trägermaterial "zusammenbacken" d) Falsche Säule Falsche stationäre Phase und/oder falsches Trägermaterial e) Trägergasströmung zu hoch f) Schlechte Einspritztechnik	a) Säulentemperatur verringern b) Längere Säule verwenden c) Neue Säule verwenden d) Andere Säule versuchen e) Trägergasstrom reduzieren f) Einspritztechnik überprüfen

Prüfverfahren:
Gaschromatographie

erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 16.02.03

Seite 14 von 16

Abl.: UE_9.5_Gaschromatographie

Erscheinung	Mögliche Ursachen	Prüfungen und/oder Abhilfen
<p>Schlechte Empfindlichkeit bei normalen Retentionszeiten</p> 	<p>a) Falsche Attenuation b) Ungenügende Probenmenge c) Schlechte Einspritztechnik d) Undichtigkeit der Spritze oder am Septum e) Undichtigkeit im Trägergassystem f) Zu geringe Detektorempfindlichkeit</p>	<p>a) Attenuation verringern b) Probenmenge vergrössern c) Einspritztechnik überprüfen d) Entsprechendes Teil ersetzen e) Undichtigkeit suchen und beheben f) WLD: Hitzdrántstrom erhöhen, Detektortemperatur erhöhen; anderes Trägergas verwenden; Hitzdráhte mit höherem Widerstand verwenden FID: Grössere Wasserstoff-, Luft- oder Trägergasströmung versuchen; Auffangelektrode näher an die Flamme bringen Detektor reinigen</p>
<p>Zu hohe Empfindlichkeit bei normalen Retentionszeiten</p> 	<p>a) Falsche Attenuation b) zu grosse Probenmenge</p>	<p>a) Attenuation erhöhen b) Probenmenge verkleinern</p>
<p>Schlechte Empfindlichkeit bei erhöhter Retentionszeit</p> 	<p>a) Zu geringe Trägergasströmung b) Undichtigkeit nach dem Verdampfer c) Dauernde Undichtigkeit des Septums</p>	<p>a) Trägergasströmung erhöhen Eventuelle Verstopfungen im Trägergassystem beheben b) Undichtigkeit suchen und beheben c) Septum auswechseln</p>
<p>Unregelmässige Null-Linienabweichung (Driften)</p> 	<p>a) Gerät nicht richtig geerdet b) "Säulenbluten" c) Undichtigkeit im Trägergassystem (evtl. undichtes Septum) d) Schlechte Trägergasregelung</p>	<p>a) Sicherstellen, dass Gaschromatograph und Schreiber gut geerdet sind b) Säule gemäss Angaben in der Gebrauchsanweisung konditionieren Gewisse stationäre Phasen werden bei hohen Empfindlichkeiten immer ein gewisses "Säulenbluten" aufweisen c) Undichtigkeit suchen und beheben d) Reduzierventil und Strömungsregler auf richtige Funktion überprüfen; Sicherstellen, dass genügend Gas (und Druck) vorhanden ist</p>
<p>"Peaks" mit Schwanzbildung (tailing peaks)</p> 	<p>a) Verdampfer Temperatur zu tief oder zu hoch b) Verschmutztes Verdampferrohr c) Säulenofentemperatur zu tief d) Schlechte Einspritztechnik e) Falsche Säule; Reaktion zwischen Probe und Trägermaterial und/oder stationärer Phase f) Trägergasströmung zu tief</p>	<p>a) Richtige Verdampfer Temperatur einstellen b) Verdampferrohr mit Lösungsmittel und Bürste reinigen Bei Bedarf komplettes Einlasssystem ersetzen c) Temperatur erhöhen, Maximaltemperatur der Säule jedoch nicht überschreiten d) Einspritztechnik überprüfen e) Andere Säule verwenden Höhere Belegung der Säule, polarere stationäre Phase oder inerteeres Trägermaterial versuchen f) Trägergasströmung erhöhen</p>

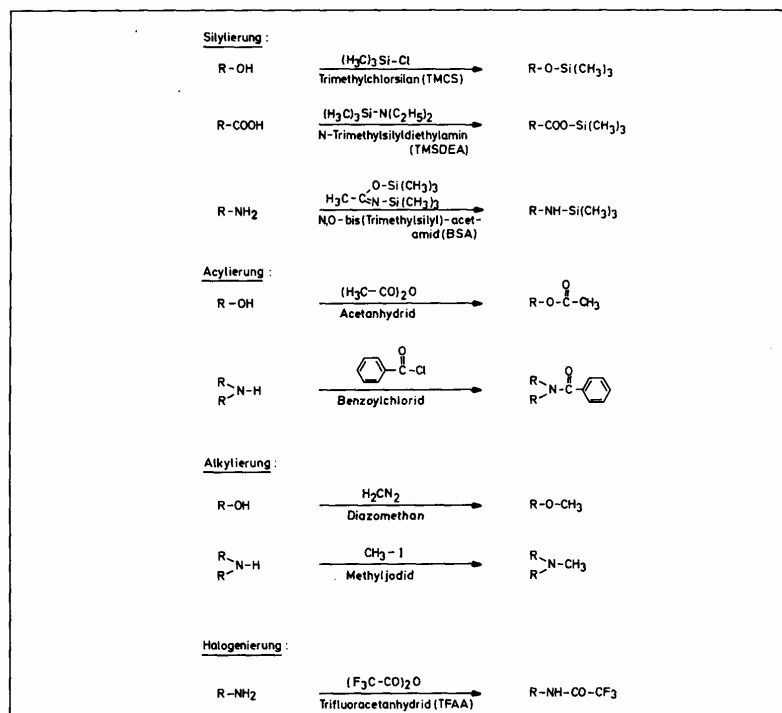
1.7 Derivatisierungen

In manchen Fällen ist es notwendig, die zu untersuchenden Substanzen vor der eigentlichen GC-Analyse chemisch umzusetzen (Derivatisierung).

Gründe dafür sind:

- Untersuchungssubstanz ist zu wenig flüchtig
- Untersuchungssubstanz zersetzt sich beim Verdampfen
- Untersuchungssubstanz weist zu hohe Polarität auf
- Untersuchungssubstanz verfügt über keine selektiven Heteroatome, die von elementspezifischen Detektoren empfindlich angezeigt werden.

Um die Verdampfbarkeit von Substanzen zu verbessern, werden polare funktionelle Gruppen (z. B. $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$) in weniger polare Gruppen umgewandelt. Um die hohe elementspezifische Empfindlichkeit des ECD zu nutzen, können Halogenatome in die Untersuchungssubstanzen eingeführt werden. Für viele Stoffgruppen werden industriell vorbereitete Derivatisierungsreagenzien (siehe Abbildung) angeboten, in denen die Probe nur gelöst bzw. kurz erwärmt werden muss. Wichtig ist bei den meisten Derivatisierungen der Ausschluss von Feuchtigkeit.



		Prüfverfahren: Gaschromatographie
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von: Unterschrift:

Seite 16 von 16

Abl.: UE_9.5_Gaschromatographie

2. Experimentelle Durchführung

Die Probe wird entsprechend der Vorschrift Anhang I umgeestert. Das Fettsäuremethylestergemisch wird gaschromatographisch getrennt.

Die Peaks werden mit Hilfe der Standardlösungen zugeordnet und die Zusammensetzung der Probe ermittelt.

3. Protokoll

Protokollnummer, Datum, Titel, Kurzfassung mit Durchführung und Beobachtungen

4. Literatur

[1] P.Wörfel, M.Bitzer, U.Claus, H.Felder, M.Hübel, B.Vollenweider, Laborpraxis Band 4, Analytische Methoden, 5.Aufl.,Birkhäuser, Basel (1996)

[2] G. Rücker, M. Neugebauer, G., G. Willems, Instrumentelle pharmazeutische Analytik, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart (1988)

[3] W. Heindl, Aufgabensammlung für das Organisch technologische Praktikum an der HTBLA Wels.

[4] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren des Schweizer Lebensmittelbuches, Ausgabe Juli 1994

Es folgt Anhang I (9 Seiten)

3.6 Bestimmung des Fettgehalts und der Fettsäurezusammensetzung mittels direkter Umesterung im Lebensmittel

ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH

Methode zur Bestimmung des Fettgehaltes und der Fettsäurezusammensetzung direkt in Lebensmitteln. Sie hat folgende Vorteile:

- die Fettextraktion entfällt,
- die Umesterung ist schnell (1 min),
- der Gesamtfettgehalt und die Fettsäurezusammensetzung ergeben sich aus dem gleichen Chromatogramm.

PRINZIP

Bildung der Fettsäuremethylester (FAME) durch alkalische Transmethylierung der Fettsäureester im Lebensmittel. Im Lebensmittel leicht zugängliches Fett wird direkt umgeestert. Schwerer erreichbares Fett muss vor der Umesterung durch eine Aufschlammung in Wasser oder Rückflusskochen in DMF zugänglich gemacht werden. Die Methylester werden mittels Kapillar-GC quantitativ bestimmt. Berechnung des Fettgehaltes aus der Summe der gefundenen FAME, dem internen Standard und einem globalen Responsefaktor, sowie der Zusammensetzung durch Normalisierung (100 % Methode). Kontrolle der Umesterung über interne Standards.

Freie Fettsäuren werden durch die Umesterung nicht erfasst. Sie können von Bedeutung sein für lange gelagerte Käse (Parmiggiano) oder Fleischwaren (Salami).

DEFINITION

Der Fettgehalt eines Lebensmittels wird aus der Summe der gefundenen Fettsäuren als Triglyceride in g/100 g Lebensmittel berechnet.

GERÄTE UND MATERIAL

- Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor (FID). Vorzugsweise on-column Injektor
- GC-Kapillarsäule prinzipiell je nach der erforderlichen Auftrennung frei wählbar, z.B. 15-25 m x 0.25 mm ID, Carbowax, z.B. von BGB Analytik, Anwil
- unbelegte, desaktivierte Vorsäule: Für on-column Autosampler: ca. 50 cm x 0.53 mm ID; für manuelle Einspritzung: ca. 1 m x 0.32 mm ID (z.B. BGB Analytik AG, Anwil)
- Präzisionswaage mit 0.1 mg Wägegenauigkeit

- Heizbares Magnetrührwerk
- Vortexmixer
- Rückflusskühler mit Schliff
- 50 ml Erlenmeyer mit Schliffstopfen
- Pipette, z.B. Eppendorf 100-1000 µl oder Handstep Dispensor
- Mittel zur Dosierung von 5-25 ml Flüssigkeit (z.B. Messzylinder, Dosimat)
- Labormixer (z.B. Büchi-B400)
- Magnetrührstäbchen

REAGENZIEN UND LÖSUNGEN

Standards

- Triundecanin (Tri-11) z.B. Fluka 93495
- 1-Tetradecen (C14en) z.B. Fluka 87189
- Pelargonsäuremethylester (E9) z.B. Fluka 76370
- Referenzproben zur Ermittlung der globalen Responsefaktoren: wasserfreies Milchfett (Bratbutter), pflanzliches Öl oder Fett (ein Speiseöl), tierisches Fett, Kokosfett, Fischöl.

Reagenzien

- Natriummethylatlösung 30% in Methanol z.B. Merck 818194
- Heptan purum z.B. Fluka 51750
- Dimethylformamid (DMF) puriss z.B. Fluka 40250
- Methanol z.A. z.B. Merck 6009
- 1,4-Dioxan z.B. Merck 9671
- Dinatriumhydrogencitrat purum z.B. Fluka 71635

Lösungen

- Dinatriumhydrogencitratlösung 15g/100g in ention. Wasser
- Natriummethylatlösung 5g/100 ml Methanol: 1 Teil Natriummethylat 30 % und 5 Teile Methanol
- Lösung der internen Standards (IST-Lösung): Tri-11, C14en und E9, je 0.5g/100ml Dioxan
- Testlösung für Blanks:
2.5 ml DMF in einen 50 ml Erlenmeyer:
umestern wie unten beschrieben (4.5 ml Dioxan und 500 µl IST-Lösung zugeben...)
Wenn nie DMF-Vorbehandlungen durchgeführt werden, die IST-Lösung direkt den 4.5 ml Dioxan zufügen.

Lagerung und Haltbarkeiten

- IST-Lösung: im Kühlschrank lagern; mehrere Monate haltbar (eine Aufkonzentrierung ist unkritisch, solange die Kalibrierlösung die gleiche IST-Lösung enthält)
- Dinatriumhydrogencitratlösung: ungekühlt, 1 Monat
- Natriummethylatlösung: ungekühlt, bis stark getrübt (Natriumcarbonat aus CO₂ der Luft)
- Kalibrierlösungen für die globalen Responsefaktoren: eine Woche
- Testlösung für Blanks: Erneuern, wenn neues Lösungsmittel oder neue Reagenzien verwendet werden.

AUSFÜHRUNG

Homogenisierung, Einwaage

Manche Lebensmittel müssen zuerst zu einem feinen Brei/Pulver homogenisiert werden. Das kann mit einem Labormixer oder einer Mühle geschehen. Dabei darf kein Fett abgetrennt (ausgeschleudert) werden (Vorsicht vor Erwärmung z.B. bei Gebäck).

Die obere Grenze der Einwaage ist einerseits durch den Wassergehalt gegeben: Die Umesterungskinetik vermeidet namhafte Verseifung bis zu 500 mg Wasser. Wenn die Probe wenig Wasser enthält, darf sie im Prinzip 500 mg überschreiten (z.B. für nicht genügend homogene Proben), doch kann dann die Dispergierung knapp und die GC-Trennsäule überladen werden. Damit in der GC ohne individuelle Anpassung der Verdünnung ähnliche Peakgrößen erhalten werden, sollte die Einwaage ≤ 50 mg Fett enthalten.

Fettgehalt der Probe	Einwaage
70 - 100 %	50 mg
20 - 70 %	150 mg
> 20 %	500 mg

Einwaage der Probe auf 0.1 mg genau in einen 50 ml Erlenmeyerkolben.

Probenvorbereitung

a) für Proben mit leicht zugänglichem Fett

Milch, Schokolade (ohne Nüsse), Joghurt, Quark, Rahm, Mayonnaise

- in 4.5 ml Dioxan aufschlämmen
- umestern wie unten beschrieben (IST-Lösung zugeben...)

b) Aufschlammung mit Wasser

Milchpulver, adaptierte Babynahrung, Kondensmilch

- mit 0.5 ml entionisiertem Wasser aufschlänmen
- ca. 5 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- 4.5 ml Dioxan zufügen und mischen
- umestern wie unten beschrieben (IST-Lösung zugeben...)

c) für Proben mit eingeschlossenem Fett

Fleisch, Fleischprodukte, Fertigmehnes, Trockensuppen, Käse, Getreideprodukte, Müesli, Nüsse

- der eingewogenen Probe 2.5 ml DMF zusetzen
- sofort anschliessend 5-15 min auf dem Magnetrührwerk unter Rühren rückflusskochen
- Ausnahmen: Salami, Trockenfleisch, Müesli: 60 min rückflusskochen
- noch im warmen Zustand 4.5 ml Dioxan zufügen und mischen (verhindert Fettausfällung)
- im Wasserbad auf Raumtemperatur abkühlen
- umestern wie unten beschrieben (IST-Lösung zugeben...)

Umesterung

- zur ev. vorbehandelten Probe 500 µl IST-Lösung zupipettieren (2.5 mg)
- sicher stellen, dass die Probe fein dispergiert ist
- 5 ml Na-Methylatlösung zupipettieren (Lösung bei RT)
- kurz aber intensiv auf dem Vortex mischen
- Umesterung: ca. 1 min warten (akzeptabler Bereich: 50-120 s)
- 15 ml Heptan zudosieren und kurz mischen
- 10 ml Dinatriumhydrogencitratlösung zugeben (stoppt die Reaktion)
- intensiv mischen
- bis zur Phasentrennung stehen lassen
- überstehende Heptanphase ca. 1 + 4 mit Heptan verdünnen
- in die GC einspritzen.

Gaschromatographie

Die Trennsäule nach Analysenziel wählen.

Die Einspritzung ist oft die wichtigste Fehlerquelle. Die Standardabweichung für die wiederholte Einspritzung der gleichen Lösung darf 2 % nicht überschreiten (Verhältnis E11/Summe FAME).

GC Bedingungen für on-column Einspritzung und eine 25 m x 0.25 mm I.D. Carbowax-Säule:

- Eingangsdruck: 80 kPa für H₂, 140 kPa für He
- Einspritzung: on-column Autosampler mit 5 µl Spritze: 0.6 µl; Spritzenadel im Säuleneingang 10 s vor bis 10 s nach Injektion halten
- Temp. Programm: Einspritzung bei 80 °C, dann mit 25 °C/min bis 180°C, 15 °/min bis 250 °C, isotherm für 3 min
- Detektorbasis: 240 °C

Blank

Die Reinheit der eingesetzten Reagenzien und des GC-Systems wird durch einen Blindlauf überprüft. Zu diesem Zweck werden alle Analysenschritte durchgeführt, jedoch ohne Einwaage eines Referenzöls oder Proben. Das erhaltene Chromatogramm sollte keine störenden Signale von Verunreinigungen aufweisen.

KALIBRIERUNG

Für die rechnerische Auswertung der Resultate ist die Verwendung einer Excel-Datei empfehlenswert. Rohdaten werden eingetragen oder vom Integrationssystem übernommen. Daraus lassen sich nicht nur die E4- und Gesamtfettgehalte berechnen, sondern auch die Flächenverhältnisse der internen Standards, die zur Kontrolle der Umesterung und der GC-Analyse dienen.

Die Auswertung kann über absolute Flächen oder Flächenprozentage erfolgen. Flächenprozentage ergeben oft übersichtlichere Zahlen.

Globale Responsefaktoren

Aus der nachfolgenden Liste wird ein Referenzöl oder -fett gewählt, das der Fettphase im Lebensmittel am nächsten kommt.

- pflanzliche Öle/Fette vor allem aus C16/C18 Fettsäuren (z.B. Sonnenblumenöl)
- tierische Fette
- Milchfett (z.B. Bratbutter)
- Kokosfett
- Fischöl

Für dieses Referenzöl oder -fett wird der globale Response- und Korrekturfaktor (Rf) bestimmt: Summe aller Peakflächen dieses Öls oder Fetts bezogen auf den internen Standard FAME-11 (E11), der aus Tri-11 stammt.

Der Rf wird nach folgender Formel berechnet:

$$RF = \frac{\text{Peakfläche E11}}{(\sum \text{ allerPeakflächen} - E11 - C14 - E9)} * \frac{\text{mg Einwaage}}{\text{mg E11}}$$

Milch- und Kokosfett können mit oder ohne FAME-4 und FAME-6 analysiert werden (beim angegebenen Temperaturprogramm sind sie vom Lösungsmittelpeak nicht genügend abgetrennt). Die Kalibrierung muss jedoch auf die gleiche Art ausgeführt werden.

Bei der Auswertung muss darauf geachtet werden, dass kleine Peaks genügend erfasst werden: Wenn mehrere Nebenkompenten im Konzentrationsbereich von 0.5-1 % im einen Fall erfasst, im anderen aber vernachlässigt werden, entsteht ein Fehler von bis zu mehreren Prozenten. Da die Intensität der Chromatogramme variiert, sollten alle Peaks mit einer Fläche von ≥ 0.2 % des Totals einbezogen werden.

Richtwerte sind:

C16/C18 Fette/Oele:	Rf = 0.94 - 0.97
Milchfett:	Rf = 1.02 - 1.06
Kokosfett:	Rf = 1.00

Die Rfs hängen etwas vom Zustand der Vor- und Trennsäule ab und müssen deswegen für jede Analysenserie neu bestimmt werden.

Misch-Responsefaktoren (RfMix)

Falls das Fett aus einer Mischung besteht (z.B. Milchfett und Kakaobutter in Schokolade), wird der Rf-Wert entsprechend der ungefähren Zusammensetzung der Fettphase aus den Teil-Rfs berechnet (Rfmix). Das Mischungsverhältnis wird der Deklaration entnommen oder aus dem E4-Gehalt abgeschätzt. Unsicherheiten in der Fettzusammensetzung von 10 % bewirken einen Fehler im Gesamtfettgehalt von höchstens 1 %.

Für das Beispiel Milkschokolade mit Rf Milchfett (RfM) und Rf Pflanzenfett (RfPfla):

$$Rfmix = (\% \text{ Milchfett} \times RfM + \% \text{ C18-Fett} \times RfPfla) / 100$$

BERECHNUNG UND ANGABE DER RESULTATE

Auswertung nach Fettgehalt

Sämtliche Peakflächen oder Flächenprozentage der zwischen dem Lösungsmittelpeak und dem Programmende eluierten Komponenten werden erfasst. Jene der internen Standards (E11/C14en/E9) sowie allfälliger Fremdkomponenten (z.B. DMF) werden subtrahiert.

Der Fettgehalt wird folgendermassen berechnet.

$$\text{Fett (\%)} = 100 * R_f * \frac{(\sum \text{ aller Peakflächen} - E11 - C14 : 1 - E9)}{\text{Peakfläche E11}} * \frac{\text{mg E11}}{\text{mg Einwaage}}$$

Angabe des Fettgehaltes mit einer Nachkommastelle.

Auswertung nach Fettzusammensetzung

Für Fette und Öle ausschliesslich mit Fettsäuren mit mindestens 10 Kohlenstoffatomen wird die Zusammensetzung durch Normalisierung (100 % Methode) ohne Responsefaktoren berechnet.

VERIFIZIERUNG DER RESULTATE

Zur Kontrolle der Umesterung wird die Fläche des E11-Standards durch jene des C14en-Standards dividiert. Dieses Verhältnis sollte bei vollständiger Umesterung bei ca. 0.75 liegen. Tiefere Werte weisen auf eine unvollständige Umesterung oder einsetzende Verseifung hin.

Zur Ermittlung einer Verseifung wird die Fläche des E9-Standards durch jene des C14en-Standards dividiert. Dieser Wert liegt ohne Verseifung bei ca. 0.72.

E11/C14en < 0.75 und E9/C14en ~ 0.72 => Umesterung nicht vollständig

E11/C14en < 0.75 und E9/C14en < 0.72 => Verseifung hat eingesetzt

Die Resultate sind akzeptabel, wenn das Verhältnis E11/C14en mindestens 0.70 und E9/C14en mindestens 0.68 erreicht. Bei grösseren Abweichungen muss die Aufarbeitung überprüft oder wiederholt werden.

Wenn mit Splitinjektion gearbeitet wird, kann ein weiterer interner Alkanstandard eingesetzt werden, der im Bereich der FAME-22 eluiert wird. Das Verhältnis zum C14en zeigt Diskriminierung der höher siedenden Komponenten an. Diese ist oft unvermeidbar und kann toleriert werden, solange sie für die Kalibrierung des Rf und die Probe gleich ist.

ANGABEN ZUR GENAUIGKEIT DER METHODE

Im Frühjahr 1997 wurde ein Ringversuch mit 10 Laboratorien durchgeführt.

Folgende Proben waren zu analysieren:

- 1 Sonnenblumenöl (Referenzöl)
- 2 Bratbutter (Referenzfett)
- 3 Kaffeerahm (deklariertes Fettgehalt: 15 %)

- 4 schwarze, milchfreie Schokolade mit 30 % Fett
- 5 Ovomaltine (deklarerter Fettgehalt: 3.3 %)
- 6 Fleischkäse (deklarerter Fettgehalt: 28 %)

Fettgehalte

Der Ringversuch ergab für Fettgehalte folgende Ergebnisse

	Kaffeerahm	Schokolade	Ovomaltine	Mayonnaise	Fleischkäse
Anzahl Resultate	18	20	16	18	18
Anzahl Ausreisser			4	2	2
Mittelwert (g Fett/100 g)	15.27	30.45	2.72	83.35	26.84
Erwartungswert	15.01	30.04	3.3	82.7	28
Wiederholbarkeit: CV_R (%)	0.4	1.0	2.5	1.2	2.2
Vergleichbarkeit: CV_R (%)	3.4	2.0	6.3	2.4	5.6

Bei der Diskussion dieser Resultate wurden zwei Probleme offenkundig:

- Ovomaltine ist kein genügend homogenes Produkt
- Der Fleischkäse wurde nicht genügend homogenisiert. Bei der Behandlung mit DMF müssen Produkte wie Fleischkäse schnell dispergiert werden, da andernfalls der Wasserentzug zu harten Klumpen führt.

Fettsäurezusammensetzung

Bezüglich Vergleichbarkeit der Fettsäurezusammensetzung wurden folgende Resultate erhalten (Mittelwerte, Standardabweichung [SD], relative Standardabweichung, CV_R [%]):

Probe berücksichtigte Labors	Sonnenblumenöl 9			Schokolade 10			Mayonnaise 10		
	Mittel	SD	CV_R (%)	Mittel	SD	CV_R (%)	Mittel	SD	CV_R (%)
FAME 16:0	6.30	0.14	2.2	25.35	0.43	1.7	6.43	0.13	2.0
FAME 18:0	3.81	0.10	2.6	35.68	0.43	1.2	4.32	0.12	2.8
FAME 18:1	25.74	0.46	1.8	33.45	0.43	1.3	22.01	0.25	1.1
FAME 18:2	63.07	0.53	0.84	3.48	0.12	3.4	65.90	0.73	1.1

Dabei ist zu bemerken, dass die Erfassung kleiner Komponenten nicht einheitlich war: Für die einen Labors erreichte die Summe der oben angegebenen Hauptsäuren 100 %, für andere nur 97 %.

LITERATUR

- 1 *Determination of fat content and fatty acid composition through 1 min transesterification in the food sample*; principals. B. Suter, K. Grob, and B. Pacciarelli, Z. Lebensm. Unters. Forsch. 204 (1997) 252-258.
- 2 *Determination of fat content and fatty acid composition through 1 min transesterification in the food sample*; II. Solubilization of the fat. B. Suter, K. Grob, B. Pacciarelli, and A. Novoselac, Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 88 (1997) 259-276.

Prüfverfahren:

Infrarotspektroskopie

erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 16.02.03

Seite 1 von 28

Abl.: UE_10.5_Infrarotspektroskopie

1. Allgemeines

Die Infrarotspektroskopie befasst sich mit der Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung der Wellenlängen 0.7 bis 100 μm und Molekülschwingungen, d. h. Schwingungen von Atomen in Molekülen oder Kristallgittern.

1.2 Historische Entwicklung

1946: Erster serienmäßiger Bau von IR-Spektrographen, ermöglicht durch die Entwicklung der Elektronik. Der Monochromator besteht aus einem Natriumchlorid-Prisma.

1960: Der feuchtigkeitsempfindliche Monochromator wird ersetzt durch ein Strichgitter auf Aluminiumoberfläche.

1970: Bau von Fourier-Transform-IR-Geräten, ermöglicht durch den Stand der Computertechnik. Der Monochromator wird durch ein Interferometer ersetzt.

2. Physikalische Grundlagen

Die Wellenzahl berechnet sich: $\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda}$ oder $\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c}$ $c = 3 \times 10^{10} \text{ cm/s}$, $\nu = \text{Frequenz in Hz}$

$\lambda = \text{Wellenlänge in cm}$

Zur Charakterisierung einer Schwingung verwendet man in der Praxis meistens den Begriff Wellenzahl $\tilde{\nu}$ (Anzahl Wellen/cm) mit der Einheit $1/\text{cm} = \text{cm}^{-1}$.

Moleküle, die infrarotes Licht absorbieren, enthalten polarisierte Bindungen.

Die IR-Spektroskopie wird vorwiegend zur qualitativen Analyse von organischen Substanzen angewendet:

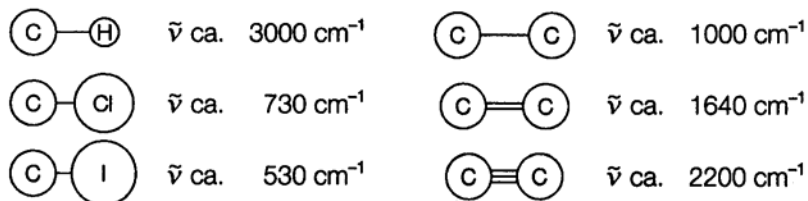
- Identifikation von funktionellen Gruppen
- Identitätsprüfung
- Reaktionskontrolle bei Synthesen
- Strukturaufklärung (nur in Kombination mit anderen spektroskopischen Methoden)

Es sind auch Untersuchungen von anorganischen Substanzen und quantitative Bestimmungen möglich wie z. B.: Messen der Schichtdicken von Filmen.

erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 16.02.03

2.1. Prinzip der Absorption

In einem Molekül befinden sich die einzelnen Atome bzw. Atomgruppen in bestimmten Schwingungszuständen. Da die Elektronenverteilung in einem Molekül durch die unterschiedliche Elektronegativität der Elemente meist asymmetrisch ist, treten in den einzelnen Strukturelementen des Moleküls wechselnde Dipolmomente (elektromagnetische Wechselfelder) von bestimmten Frequenzen auf. Die Frequenz einer solchen Grundschiwingung ist im wesentlichen abhängig von der Bindungsstärke und der Masse der schwingenden Atome oder Atomgruppen.



Beispiele:

Besitzt die einfallende IR-Strahlung die gleiche Frequenz wie das elektromagnetische Wechselfeld eines dieser Strukturelemente, erfolgt Resonanz und somit Absorption der IR-Strahlung. Die Schwingungsenergie (Amplitude) des betreffenden Teilchens vergrößert sich; es geht in einen angeregten Zustand über. Die Intensität der Absorption wird vom Dipolmoment der betreffenden Bindung beeinflusst:

Nur wenn sich mit der Schwingung das Dipolmoment ändert, kann IR-Strahlung absorbiert werden! Da Moleküle meist mehrere Strukturelemente enthalten, und jedes verschiedene Schwingungen ausführen kann, besitzen IR-Spektren in der Regel mehrere Absorptionsbanden.

2.2. Schwingungsarten

Ein komplexes Molekül besitzt viele Schwingungsmöglichkeiten, deren Anzahl sich theoretisch auch berechnen lässt.

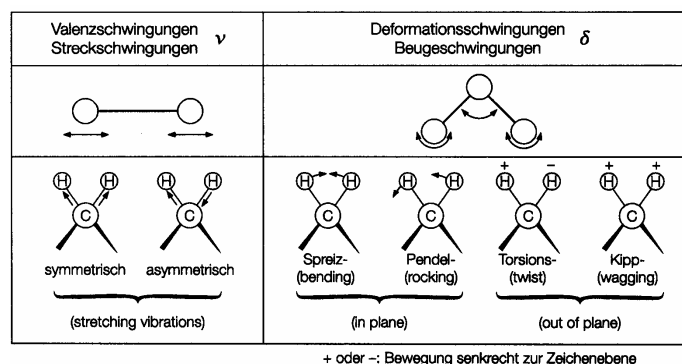
erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 16.02.03

Die Grundschnwingungen werden unterteilt in:

- Lokalisierte Schwingungen
- Gerüst- oder Fundamentalschwingungen

2.2.1 Lokalisierte Schwingungen

Lokalisierte Schwingungen sind Schwingungen einzelner Atome oder funktioneller Gruppen (im Spektrum → Gruppenfrequenzbereich von 4000 cm^{-1} bis 1500 cm^{-1}). Lokalisierte Schwingungen erfolgen entweder in Richtung der Bindung, oder sie deformieren den Bindungswinkel.



2.2.2 Gerüst- oder Fundamentalschwingungen

Gerüst- oder Fundamentalschwingungen sind Schwingungen mit relativ tiefer Frequenz, an denen das ganze Molekül teilnimmt (im Spektrum → Fingerprintgebiet unterhalb von 1500 cm^{-1}). Alle diese Banden sind charakteristisch für das betreffende Molekül.

2.2.3 Weitere Schwingungsarten

Neben den aufgeführten Grundschnwingungen sind noch weitere Schwingungsarten möglich, die sich jedoch meist nicht eindeutig identifizieren lassen.

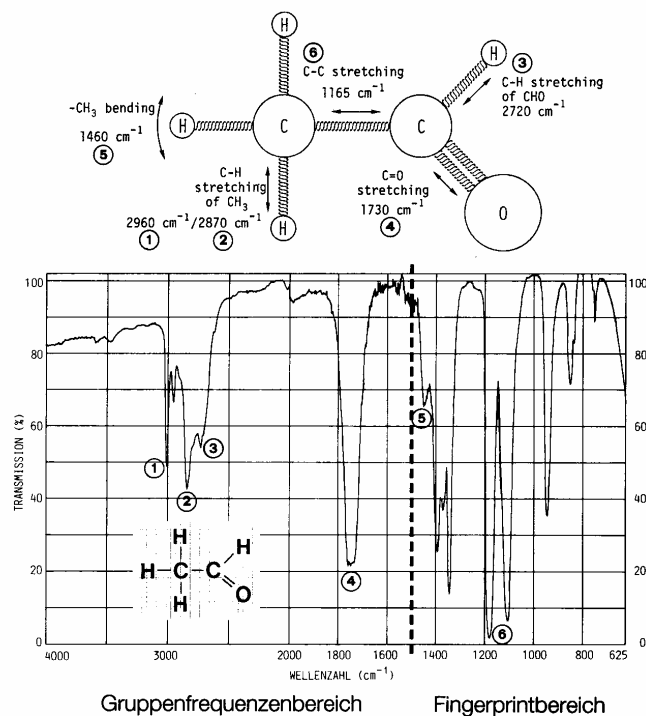
- Oberschwingungen sind ein Vielfaches einer Grundschnwingung. Die Intensität der Oberschwingung ist kleiner als die der Grundschnwingung.

- Kombinationsschwingungen Kombinationsschwingungen entstehen durch Überlagerung mehrerer Schwingungen.
- Entartete Schwingung Eine entartete Schwingung entsteht durch verschiedene Schwingungen gleicher Frequenz (nur eine Absorptionsbande).

2.3. Schwingungen und ihre Frequenzen im Spektrum

Bestimmte Atomgruppen wie z. B. Methyl (-CH₃), Hydroxyl (-OH), Carbonyl (>C=O) erzeugen ganz charakteristische Absorptionsbanden. Im Spektrum werden diese als Gruppenfrequenzen bezeichnet. Andere Atomgruppen, deren Atome sehr ähnliche Schwingungsfrequenzen haben wie z. B. C-C Ketten erzeugen ganze Bandensysteme. Im Spektrum werden diese als "Fingerprint"-Banden bezeichnet, weil sie - ähnlich einem Fingerabdruck einen Stoff in unverwechselbarer Weise charakterisieren.

Die Aufzeichnung des Spektrums erfolgt meistens in Transmission gegen Wellenzahl. Das folgende Beispiel zeigt die Schwingungen und charakteristischen Frequenzen von Acetaldehyd:



		Prüfverfahren: <u>Infrarotspektroskopie</u>
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von: Unterschrift:

Die Lage der Absorptionsbanden liefert Informationen über die Art der Substanz (qualitative Aussage). Die Tiefe einer Absorptionsbande ist abhängig von der Substanzmenge. Der Vergleich Bandentiefe - Substanzkonzentration ermöglicht quantitative Aussagen.

2.4. IR-Frequenzbereiche

Der IR-Bereich wird unterteilt in:

Nahes IR NIR

Mittleres IR MID-IR

Fernes IR FAR-IR

2.4.1 Nahes IR

Bereich: 12500-4000 cm^{-1} Im Nahen Infrarot werden nur Ober- und Kombinations-schwingungen der im mittleren IR-Bereich beobachteten Grundschiwingungen registriert. Dieser Bereich gewinnt in der Analytik zunehmend an Bedeutung.

2.5.2 Mittleres IR

Bereich: 4000-400 cm^{-1} Das Mittlere Infrarot hat in der IR-Spektroskopie die grösste Bedeutung. Es umfasst die Wechselwirkungen der Valenz-, Deformations- und Gerüstschwingungen; damit liefert es die Informationen über funktionelle Gruppen, Teilstrukturen und Isomere eines Moleküls.

2.5.3 Fernes IR

Bereich: 400-40 cm^{-1} Im Fernen Infrarot werden hauptsächlich Torsions- und Gerüstschwingungen registriert. Das Messen in diesem Bereich ist instrumentell schwierig und wird deshalb nur in speziellen Fällen angewendet.

Prüfverfahren:

Infrarotspektroskopie

erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 16.02.03

Seite 6 von 28

Abl.: UE_10.5_Infrarotspektroskopie

3. IR – Spektrometer

IR-Spektrometer werden nach ihrem Funktionsprinzip unterschieden. Früher wurden hauptsächlich dispersive Geräte verwendet. Diese werden heute jedoch zunehmend durch FT-IR Spektrometer ersetzt, da diese eindeutige Vorteile bieten.

3.1. Dispersive IR-Spektrometer

Dispersive IR-Spektrometer arbeiten nach dem folgenden Prinzip: Die Probe wird mit IR-Strahlung der Wellenzahlen 4000 cm^{-1} bis 400 cm^{-1} bestrahlt, wobei Strahlen bestimmter Wellenzahlen absorbiert werden. Die nicht absorbierte Strahlung gelangt in einen Monochromator (Prisma oder Gitter), der sie in die einzelnen Wellenlängen aufteilt (dispergiert). Dieses Spektrum wird nun von 4000 cm^{-1} bis 400 cm^{-1} Wellenzahl für Wellenzahl vom Detektor gemessen und registriert, wobei die durch die Probe absorbierte Strahlung im Spektrum bei der betreffenden Wellenzahl als Absorptionsbande erscheint. Dispersive IR-Spektrometer sind nach heutigem Stand der Technik veraltet.

3.2. Fourier-Transform-IR-Spektrometer

FT-IR-Spektrometer arbeiten nach folgendem Prinzip: Die Probe wird mit IR-Strahlung der Wellenzahlen 4000 cm^{-1} bis 400 cm^{-1} bestrahlt, wobei Strahlung bestimmter Wellenzahlen absorbiert wird. Die nicht absorbierte Strahlung gelangt in ein Interferometer, in dem durch Interferenzen alle noch in der Strahlung vorkommenden Wellenlängen überlagert und vom Detektor augenblicklich registriert werden. Dabei entsteht ein charakteristisches Bild, das als Interferogramm bezeichnet (siehe Bild) wird und sämtliche spektralen Informationen enthält.

Prüfverfahren:

Infrarotspektroskopie

erstellt /
geändert:

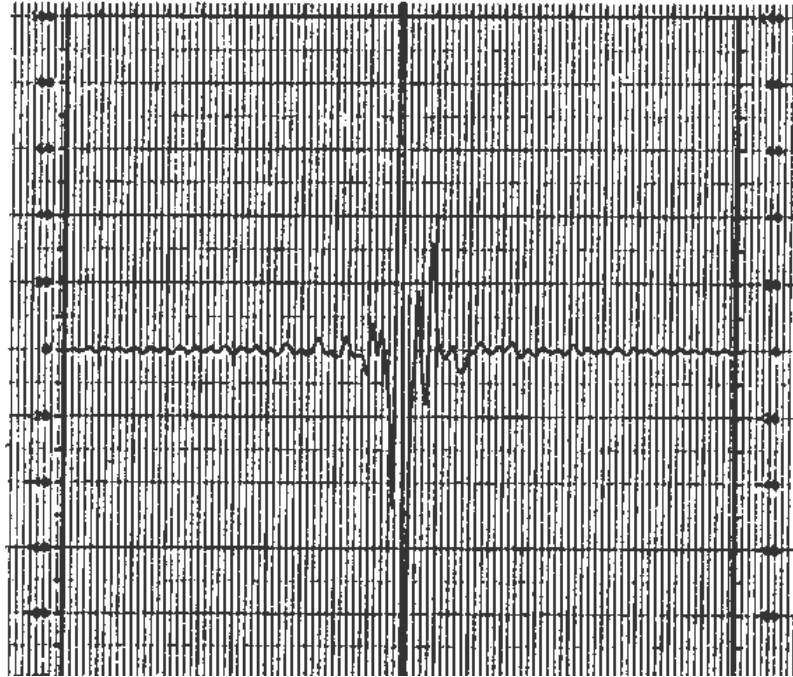
Datum:
16.02.03

von:

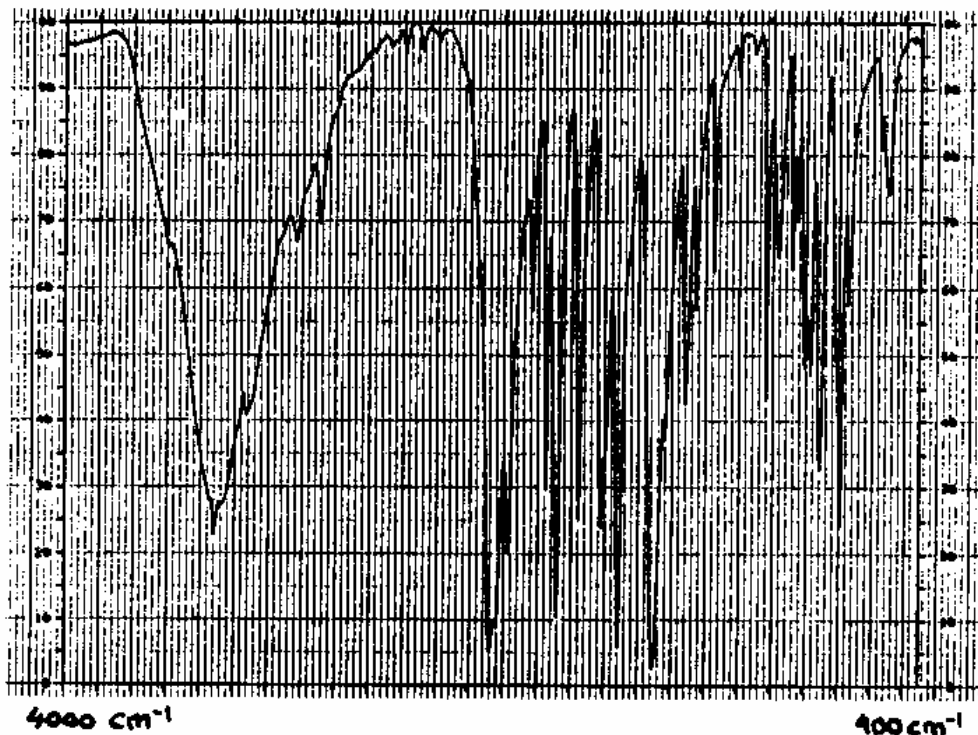
Unterschrift:

Seite 7 von 28

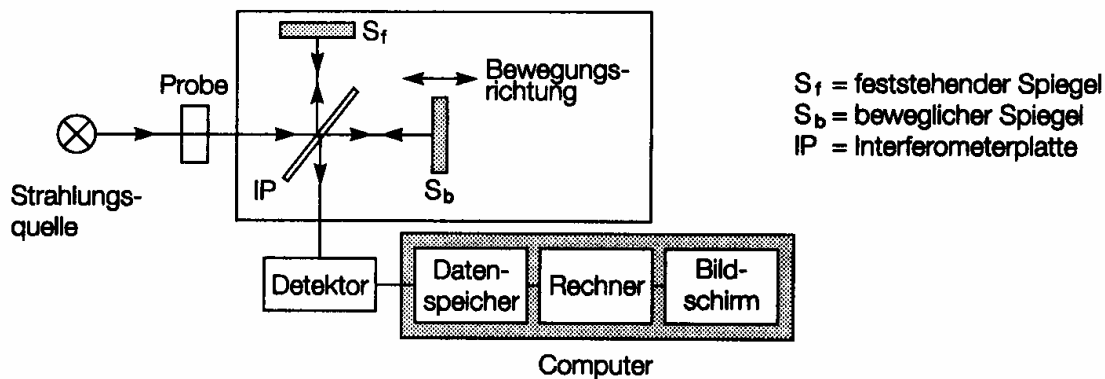
Abl.: UE_10.5_Infrarotspektroskopie



Mit Hilfe eines Computers, der unter anderem die mathematische Operation der Fourier-Transformation ausführt, wird das Interferogramm in die einzelnen Schwingungen zerlegt. Als Schlussergebnis liegt ein konventionelles Spektrum vor (siehe folgende Darstellung).



3.3. Aufbau eines FT-IR-Spektrometers



FT-IR-Spektrometer sind Einstrahl-Geräte. Dies bedingt, dass vor der Messung der Probe ein Spektrum der Luft und gegebenenfalls eines verwendeten Lösemittels aufzunehmen ist und vom Computer gespeichert wird. Nach dem Registrieren der Probe als Interferogramm und der anschließenden Fourier-Transformation bildet der Rechner aus den beiden Einstrahlspektren den Quotienten: Intensität mit Probe und Intensität ohne Probe. Das Ergebnis stellt dann das Spektrum der Probe dar. Durch diesen Vorgang wurden störende Absorptionsbanden (CO_2 und Wasserdampf aus der Luft, Lösemittel) eliminiert.

Das hohe Nachweisvermögen der FT-IR-Spektroskopie ermöglicht die Messung extrem kleiner Probenmengen (Mikrotechnik, bis zu $10 \mu\text{g}$) die Messung von Oberflächen durch Reflexion (ATR-Technik)

Die hohe Registriergeschwindigkeit ermöglicht

- Aufaddieren von Spektren: Die Registrierung eines Interferogrammes benötigt höchstens einige Sekunden. In der Praxis werden deshalb in kurzer Zeit eine große Anzahl Interferogramme hintereinander registriert und aufaddiert, was das Nachweisvermögen wesentlich erhöht.
- Kopplung mit Trennmethoden wie GC - IR (Ergänzung zu GC - MS)
- Kinetische Untersuchung rasch ablaufender Reaktionen

ON LINE - Datenverarbeitung durch Anschluss an ein geräteexternes Computersystem ermöglicht:

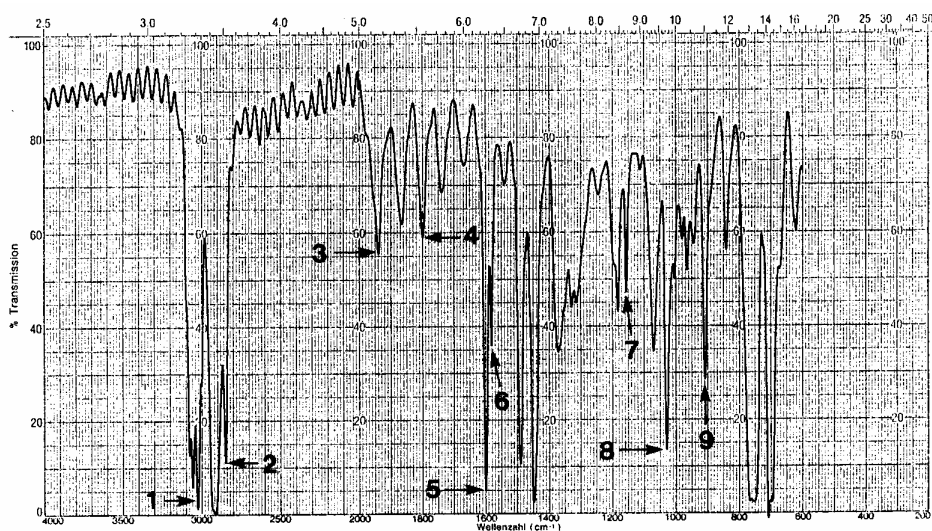
- Mathematische Nachbehandlung von Spektren wie Umrechnen Transmission in Extinktion; Bilden von Summen und Differenzen von Spektren usw.
- Speichern und Suchen von Spektren in Dateien und Bibliotheken

3.4 Gerätetests

Um einwandfreie Messergebnisse zu gewährleisten, müssen periodisch Gerätetests durchgeführt werden, die im entsprechenden Gerätehandbuch aufgeführt sind.

Viele Testinformationen liefert ein Polystyrolstandard-Spektrum, welches für dispersive und für FT-IR Geräte geeignet ist.

Mit dem Polystyrolfilm wird die richtige Lage der Banden überprüft. Die Wellenzahlen dürfen höchstens $\pm 5 \text{ cm}^{-1}$ abweichen. Gleichzeitig kann aufgrund der Bandenaufspaltung das Auflösungsvermögen des Geräts und evtl. einfallendes Falschlicht festgestellt werden (siehe folgende Darstellung).



Prüfverfahren:

Infrarotspektroskopie

erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 16.02.03

Kalibrierbande	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Wellenzahl in cm^{-1} (Vakuum)	3027.1	2850.7	1944.0	1801.6	1601.4	1583.1	1154.3	1028.0	906.7

Einfallendes Falschlicht ist zu vermuten, wenn Banden oberhalb von 0 % T keine Spitze, sondern eine mehr oder weniger ausgeprägte waagrechte Linie haben.

4. Bestimmung mit IR - Spektrometern

4.1. Übersicht: Verschiedene Aufnahmetechniken

Die folgenden Ausführungen beziehen sich - mit Ausnahme der ATR-Technik - auf das Arbeiten mit Makroproben. Bei der Wahl der Aufnahmetechnik ist der Aggregatzustand beziehungsweise die Löslichkeit der Substanz und die Eignung des entsprechenden Lösemittels zu beachten.

Aufnahmetechnik	Probe	Bemerkungen
Feststoffe Suspensionstechnik Presslinge	ca. 10 mg ca. 1 mg	Diese Aufnahmetechniken werden hauptsächlich dann angewendet, wenn kein geeignetes Lösemittel zur Verfügung steht. Bei empfindlichen Substanzen können bei der Press-Technik infolge des hohen Pressdruckes Kristallumwandlungen und andere Reaktionen erfolgen, die das Spektrum wesentlich beeinflussen.
transparenter Film Lösung in Küvetten	5-10 % Lösung	zur Untersuchung von Polymeren Lösungsspektren sind anderen Methoden vorzuziehen, da sie eindeutiger zu interpretieren sind.
Flüssigkeiten Flüssigkeitsfilm (Sandwich) Lösung in Küvetten	einige Tropfen 5-10 % Lösung	Für leichtflüchtige Stoffe ungeeignet.
Gase (Dämpfe) in Gasküvetten	Menge je nach Substanz und Druck unterschiedlich	
Oberflächen ATR-Technik	ca. 1 cm^2	Untersuchung stark absorbierender Stoffe wie Kunststoff-, Lack- und Metalloberflächen; Papier- und Textilbeschichtungen.

Prüfverfahren:

Infrarotspektroskopie

erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 16.02.03

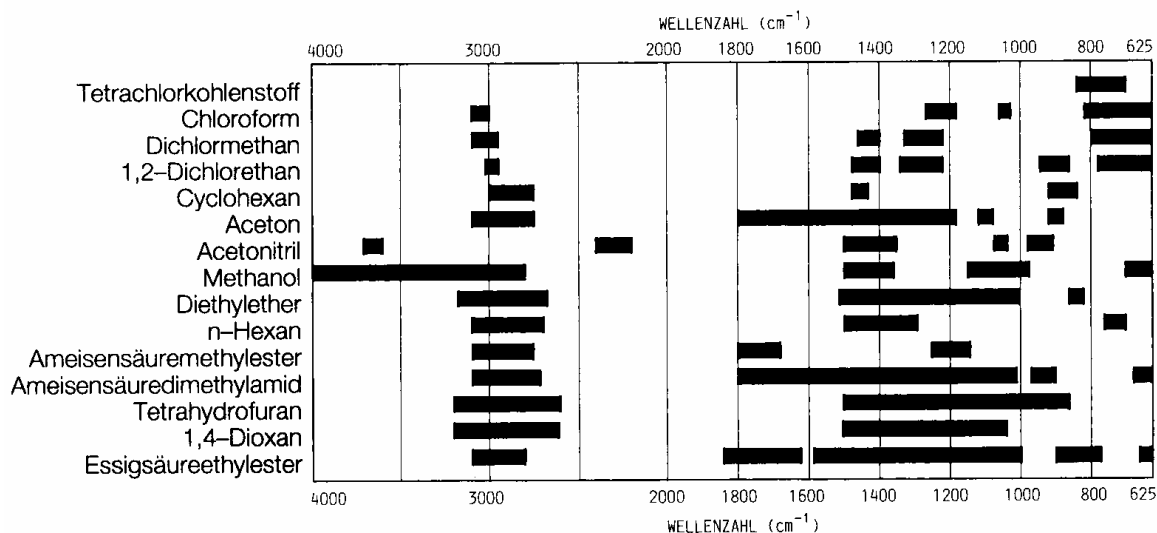
Seite 11 von 28

Abl.: UE_10.5_Infrarotspektroskopie

4.2. Lösungsmittel/Suspensionsmittel

Um die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen Substanz und Löse- bzw. Suspensionsmittel möglichst gering zu halten, werden im Allgemeinen ziemlich unpolare Lösemittel verwendet. Die vom Lösemittel verursachten Absorptionsbanden lassen sich in Zweistrahlgeräten mit einer Referenzküvette gleicher Schichtdicke, die nur reines Lösemittel enthält, kompensieren. Bei FT-IR Geräten erfolgt die Kompensation durch Spektren-Subtraktion. Beträgt die Eigenabsorption jedoch mehr als 40 % (60 % Transmission), genügt die Messgenauigkeit nicht mehr für die exakte Aufzeichnung der Probenabsorption. Diese Zonen im Spektrum werden als Sperrgebiete oder "energietote" Zonen bezeichnet; die Breite dieser Zonen vergrößert sich mit zunehmender Schichtdicke.

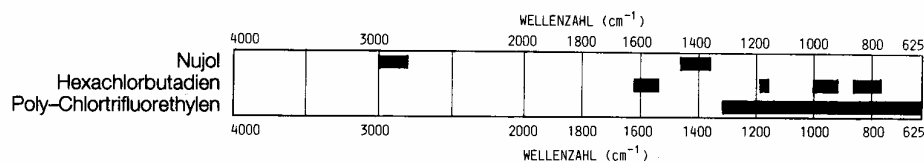
4.2.1 Sperrgebiete verschiedener Lösemittel bei 0.1 mm Schichtdicke



Bei der Lösemittelwahl sind bestimmte Anforderungen zu beachten:

- hohe Reinheit, z. B. "UVASOL" (Merck), "zur Spektroskopie" (Fluka)
- inertes Verhalten gegenüber Substanz und Küvettenfenster
- keine Beeinflussung des Spektrums der gelösten Substanz
- möglichst geringe Eigenabsorption
- geeigneter Anwendungsbereich in Bezug auf Sperrgebiete

4.2.2 Sperrgebiete verschiedener Suspensionsmittel



Das Suspensionsmittel soll die Reflexionen an den Kristalloberflächen vermindern und muss daher möglichst den gleichen Brechungsindex wie die Proben haben. Bei der Wahl der Suspensionsmittel sind die zuvor genannten Kriterien zu berücksichtigen.

Als Einbettungssubstanz für Presslinge werden Kaliumbromid, Kaliumiodid oder Kaliumchlorid ("UVASOL", Merck) verwendet; sie haben keine Sperrgebiete.

4.3. Fenster und Presslinge

Lösungen von Feststoffen oder Flüssigkeiten, Suspensionen von Feststoffen sowie Flüssigkeitsfilme werden zwischen zwei IR-durchlässigen, plan geschliffenen Platten (Fenster) gemessen. Die Wahl des Fenstermaterials richtet sich hauptsächlich nach der Art der zu bestimmenden Substanz und dem zu verwendenden Lösemittel.

Für Flüssigkeitsküvetten wird als Fenstermaterial am häufigsten Natriumchlorid verwendet (für polare Lösemittel nicht geeignet!):

- Durchlässigkeitsbereich = 40000 cm^{-1} bis 625 cm^{-1}
- ziemlich robust, leicht schleif- und polierbar

Kaliumbromid als Fenstermaterial (für polare Lösemittel nicht geeignet!):

- Durchlässigkeitsbereich = 40000 cm^{-1} bis 400 cm^{-1}
- mechanisch wenig stabil

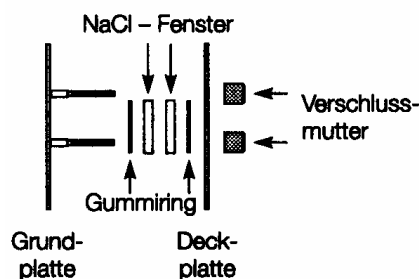
Natriumchlorid und Kaliumbromid sind in der benötigten Reinheit hygroskopisch. Küvetten bzw. Fenstermaterialien werden daher unter Feuchtigkeitsausschluss aufbewahrt. Fenster und Presslinge dürfen nur an den Kanten berührt werden.

		Prüfverfahren: <u>Infrarotspektroskopie</u>	
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von:	Unterschrift:

4.4. Aufnahmetechniken für Feststoffe

4.4.1 Suspensionen

In der englischen Literatur werden Suspensions-Spektren als "mull" bezeichnet. Auf einer plan geschliffenen Glasplatte ca. 10 mg Substanz mit 2-5 Tropfen Suspensionsmittel (bzw. 1 Teil Substanz und 2 Teile Suspensionsmittel) versetzen und mit einem plan geschliffenen Glasstempel kreisförmig zu einer Suspension verreiben. Die Teilchen müssen kleiner sein als die kleinste Wellenlänge der einfallenden Strahlung. Größere Kristalle erzeugen durch Streuung der Strahlen hohe Absorptionen (Christiansen-Effekt), was ein Herabsetzen der Null-Linie im Spektrum und Bandenverzerrungen zur Folge hat. Ein Teil der Suspension wird mit Hilfe eines Spatels so zwischen zwei Fenster (z. B. Natriumchlorid-Platten von je 5 mm Dicke) gebracht, dass keine Luft eingeschlossen wird. Die beiden Fenster werden in den entsprechenden Halter eingespannt (siehe Abbildung). Die Schichtdicke der Suspension zwischen den beiden Fensterplatten ist kleiner als 0.1 mm. Für größere Schichtdicken werden 0.1 mm dicke Abstandsfolien (sog. Spacer) verwendet. Ein Referenzstrahlabgleich erfolgt bei dispersiven Geräten gegen ein gleiches, leeres Fenster. Glasstempel dürfen nicht trocken auf der Glasplatte gerieben werden, da abgeschliffenes Glas Absorptionsbanden erzeugt. Die Küvette wird nach Gebrauch zerlegt und mit Methylenchlorid oder einem ähnlichen, trockenen Lösemittel gereinigt. Stark trübe oder zerkratzte Fenster müssen nachpoliert werden.

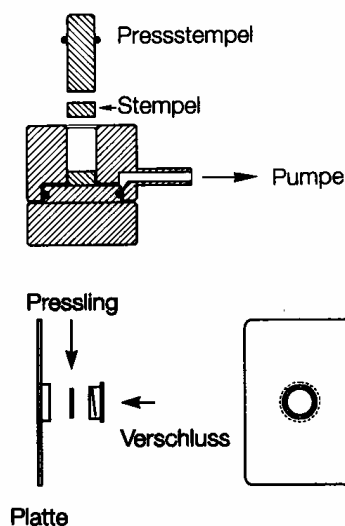


		Prüfverfahren: <u>Infrarotspektroskopie</u>	
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von:	Unterschrift:

4.4.2 Presslinge

300 mg Kaliumbromid "UVASOL" (oder eine andere geeignete Einbettungssubstanz) abwägen.

1-3 mg Substanz mit ca. 30 mg Kaliumbromid in einer Achatreibschale pulverisieren. Das Pulver mit ca. 3 Tropfen geeignetem Suspensiermittel verreiben bis es wieder trocken ist. Anschließend restliches Kaliumbromid zugeben, gut mischen und solange verreiben, bis die Mischung mehlig Konsistenz hat. Die Teilchen müssen kleiner sein als die kleinste Wellenlänge der einfallenden Strahlung. Größere Kristalle erzeugen durch Streuung der Strahlen hohe Absorptionen (Christiansen-Effekt), was ein Herabsetzen der Null-Linie im Spektrum und Bandenverzerrungen zur Folge hat. Nach dem Einfüllen in die Pressform den Stempel einsetzen und einige Male hin und her drehen, damit die Probe verteilt wird. Pressform vor dem Pressen 1 Minute auf ca. 1 mbar evakuieren (verhindert Luft einschüsse), dann im evakuierten Zustand mit einem Druck von ca. 250 bar pressen. Dabei wird die Einbettungssubstanz zähflüssig und umschließt die Substanzteilchen (siehe Abbildung). Vakuumpumpe abstellen, Pressform belüften, Druckpresse entlasten und Pressling mit Hilfe des Stempels vorsichtig aus der Pressform drücken. Der Pressling hat in der Regel einen Durchmesser von 13 mm und eine Dicke von ca. 2 mm.



		Prüfverfahren: <u>Infrarotspektroskopie</u>
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von: Unterschrift:

Zur Messung Pressling in den Halter einspannen, und diesen in den Probenstrahl bringen. Der Referenzstrahlabgleich erfolgt bei dispersiven Geräten gegen Kaliumbromid, selten gegen Luft (Kompensation der durch Luftfeuchtigkeit entstehenden Banden). Bei FT-IR Geräten wird meist darauf verzichtet.

Ein Pressling soll relativ durchsichtig sein; trübe Presslinge sind zu zerbrechen, nochmals zu verreiben und anschließend neu zu pressen. Dadurch werden die Probenpartikel noch kleiner.

An Stelle einer Achatreibschale kann auch eine Schwingmühle verwendet werden. Blankpolierte Stempelseiten dürfen nicht zerkratzt werden.

Eine schwache Absorptionsbande bei 3500 cm^{-1} ist auf aufgenommene Feuchtigkeit zurückzuführen; zur Bestimmung von Hydroxylgruppen (-OH) ist deshalb diese Aufnahmetechnik weniger geeignet.

4.4.3 Filme, Folien

Die zu untersuchenden Filme gewinnt man meistens durch Eintrocknen einer Lösung auf einer geeigneten Unterlage; bei thermoplastischem Material durch Pressen zwischen zwei geheizten Stahlplatten. Zum Messen wird der Film in einen Magnethalter eingespannt. Der Abgleich erfolgt gegen Luft. Sehr dünne Filme werden auf eine IR-durchlässige Unterlage gelegt oder direkt auf ihr hergestellt (z. B. Kaliumbromid-Pressling).

4.4.4 Lösungen

Eine 5 % - 10 % Lösung der Substanz wird mit Hilfe einer Pasteurpipette in den unteren Füllkonus der etwas schräg gehaltenen Küvette so eingefüllt, dass keine Luft eingeschlossen wird. Anschließend wird zuerst der untere und dann der obere Konus verschlossen.

Es werden meist Küvetten mit Natriumchlorid-Fenster und einer Schichtdicke von 0.1 bzw. 0.2 mm verwendet (siehe Abbildung).

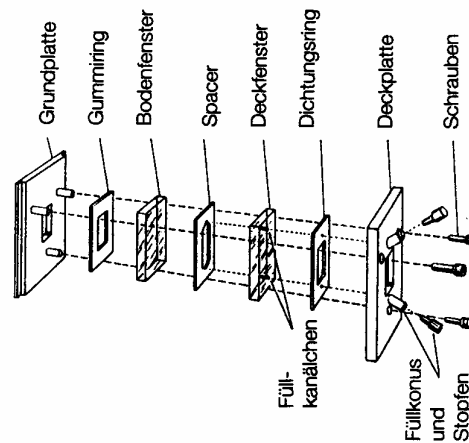
Prüfverfahren:

Infrarotspektroskopie

erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 16.02.03

Seite 16 von 28

Abl.: UE_10.5_Infrarotspektroskopie



Durch Einsetzen eines entsprechenden Spacers sind jedoch auch andere Schichtdicken möglich (z. B. 0.05 mm, 1.00 mm). Die genaue Schichtdicke lässt sich nach der Interferenzmethode bestimmen. Der Referenzstrahlabgleich erfolgt bei dispersiven Geräten gegen eine Küvette gleicher Schichtdicke, die jedoch nur Lösungsmittel enthält (eine leichte Überkompensation, "negative Banden", ist möglich, da die Probenküvette etwas weniger Lösungsmittel enthält). Lösungsmittel und Substanz dürfen das Küvettenfenster nicht zerstören. Küvetten nach Gebrauch mit Methylenchlorid oder einem ähnlichen, trockenen Lösungsmittel spülen (Injektionsspritze verwenden), anschließend mit trockener, sauberer Luft oder Stickstoff ausblasen. Bei FT-IR Geräten sind von der Luft sowie vom Lösungsmittel Spektren aufzunehmen und zu speichern, welche anschließend vom Probenspektrum subtrahiert werden.

4.5 Aufnahmetechniken für Flüssigkeiten

4.5.1 Flüssigkeitsfilme (Sandwich)

In der englischen Literatur werden Spektren von Flüssigkeitsfilmen mit "neat" bezeichnet. Einige Tropfen Substanz werden so zwischen zwei Fenster (z. B. Natriumchloridplatten von je 5 mm Dicke) gebracht, dass keine Luft eingeschlossen wird. Die beiden Fenster werden in den entsprechenden Halter eingespannt. Die Dicke des Flüssigkeitsfilms beträgt ca. 0.01 mm. Durch Einsetzen eines Spacers aus Teflon oder Aluminium können größere Schichtdicken erreicht werden.

		Prüfverfahren: <u>Infrarotspektroskopie</u>	
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von: Unterschrift:	Seite 17 von 28

Abl.: UE_10.5_Infrarotspektroskopie

Prüfverfahren:

Infrarotspektroskopie

erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 16.02.03

Seite 18 von 28

Abl.: UE_10.5_Infrarotspektroskopie

Der Referenzstrahlabgleich erfolgt bei dispersiven Geräten gegen ein gleiches Fenster. Bei FT-IR Geräten ist nur ein Luftabgleich nötig. Fenster nach Gebrauch mit Methylenchlorid oder einem ähnlichen, trockenen Lösungsmittel reinigen.

Diese Aufnahmetechnik eignet sich nur für viskose Flüssigkeiten oder solche mit tiefem Dampfdruck, da die Fenster nicht abgedichtet sind; leichtflüchtige Substanzen misst man in abgedichteten Küvetten von 0.01-0.05 mm Schichtdicke.

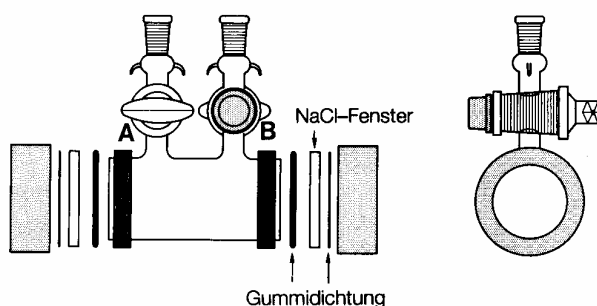
4.5.2 Lösungen

Eine 5 % - 10 % Lösung der Substanz wird mit Hilfe einer Pasteurpipette in den unteren Füllkonus der etwas schräg gehaltenen Küvette so eingefüllt, dass keine Luft eingeschlossen wird. Anschließend wird zuerst der untere und dann der obere Konus verschlossen.

4.6 Aufnahmetechnik für Gase

Gase erfordern infolge ihrer geringen Dichte große Schichtdicken und eine spezielle Einfülltechnik (siehe folgende Abbildung). Geringste Spuren von Feuchtigkeit verursachen bei hygroskopischen Gasen beträchtliche Störungen.

Meist werden Gasküvetten von 5-10 cm Länge benützt. Für Spurenuntersuchungen stehen Küvetten mit Umlenkspiegeln zur Verfügung; in diesen Küvetten kann der Strahl eine Weglänge bis zu 40 m zurücklegen.



		Prüfverfahren: <u>Infrarotspektroskopie</u>
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von: Unterschrift:

Küvetten von 10 cm Länge haben ein Volumen von etwa 150 mL. Sie werden ungefähr zu einem Fünftel mit dem zu untersuchenden Gas gefüllt; der Rest ist Luft bzw. Inertgas.

Zur Ermittlung des exakten Küvettenvolumens wird der Hohlraum der tarierten Küvette mit einer geeigneten Flüssigkeit (z. B. Cyclohexan) luftblasenfrei bis zu den Hahnen gefüllt und die Küvette ausgewogen. Das Volumen der Küvette wird mit Hilfe der Dichte der Flüssigkeit berechnet.

Vor dem Füllen der Gasküvette soll zur Kontrolle der Basislinie ein Leerspektrum aufgenommen werden. Anschließend wird diese Küvette z. B. auf folgende Art gefüllt: Der Küvettenstutzen A wird mit einem Einspritzgummi (Septum) oder einem Gummi-Pipettenhut verschlossen. Bei geöffnetem Hahn A und B wird über den Küvettenstutzen B evakuiert. Nach dem Evakuieren Hahn B schließen.

Mit einer gasdichten Injektionsspritze wird dem Vorratsgefäß ("Gasmaus" mit Septum oder Druckgasflasche mit Entnahmevorrichtung) die gewünschte Gasmenge entnommen und durch das Septum bzw. den Pipettenhut in die noch evakuierte Küvette injiziert.

Durch den gleichen Küvettenstutzen wird Luft (oder ein inertes Gas) in die Küvette eingesogen, bis der Druckausgleich erfolgt ist (Durchmischung!). Nach dem Schließen der Hähne A und B wird das Spektrum registriert.

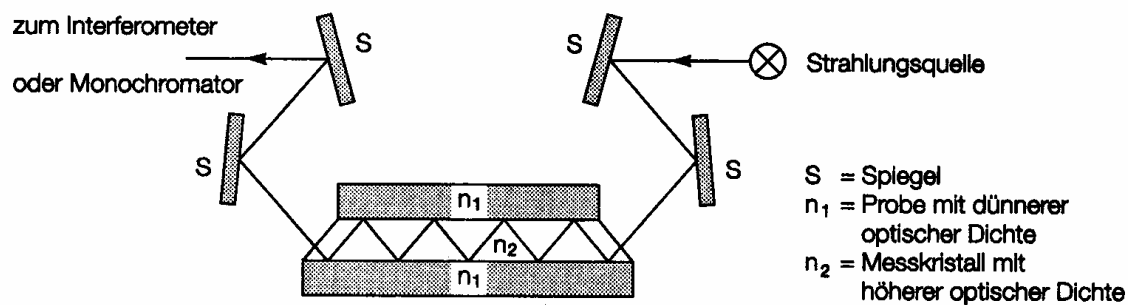
4.7 Spezielle Methoden

4.7.1 ATR – Technik für Oberflächenmessungen

Die ATR-Technik (Attenuated Total Reflectance) ermöglicht die Aufnahme von IR-Spektren von Metall-, Lack- und Kunststoffoberflächen.

Die ATR-Einrichtung, bestehend aus einem Spiegelsystem und einem Messkristall mit hohem Brechungsindex, wird in den Probenraum des Spektrometers eingebaut. Die Probe wird auf beiden Seiten des Messkristalls fest angepresst, damit zwischen den Grenzflächen ein guter Kontakt gewährleistet ist.

Strahlengang bei einem ATR-Zusatzgerät



Als Messkristalle eignen sich Germanium ($n = 4,0$) oder KRS-5 ($n = 2,37$). KRS-5 ist ein Mischkristall aus dem stark giftigen Thalliumbromid und Thalliumiodid.

Die Oberfläche des Proben-Mediums mit der optisch dünneren Dichte absorbiert von der schräg einfallenden Infrarotstrahlung Strahlen einzelner Wellenzahlen. Die nicht absorbierte Strahlung wird unter einem bestimmten Winkel in den Kristall zurückreflektiert, um an die gegenüberliegende Grenzfläche zu gelangen. So wird der Strahl ca. 25mal hin und her reflektiert, wobei jeweils ein Kontakt mit der Probenoberfläche stattfindet. Da die von der Probenoberfläche absorbierte Energie sehr gering ist, muss mit großer Messempfindlichkeit gearbeitet werden. Für ATR-Messungen werden daher mit Vorteil FT-IR-Spektrographen eingesetzt.

ATR-Spektren sind mit normalen Absorptionsspektren nicht ohne weiteres vergleichbar, weil das Spektrum durch den Einfallswinkel der IR-Strahlung auf den Messkristall beeinflusst wird.

5. Auswerten eines Spektrums

Eine wertvolle Hilfe zur qualitativen Auswertung von Spektren bieten die Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen.

		Prüfverfahren: <u>Infrarotspektroskopie</u>
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von: Unterschrift:

5.1. Kriterien zur Auswertung

Bei der qualitativen Interpretation eines IR-Spektrums sind folgende Kriterien zu berücksichtigen:

- Soll die Identität einer Substanz durch direkten Vergleich ihres Spektrums mit einem Vergleichsspektrum festgestellt werden?
- Sollen funktionelle Gruppen identifiziert und ihr Vorhandensein oder ihre Abwesenheit nachgewiesen werden?
- Soll die Struktur einer unbekannt Substanz bestimmt werden?

5.1.1 Identitätsprüfung

Zur Identitätsprüfung muss das gemessene Spektrum eines Musters bei gleichen Aufnahmebedingungen im Gruppenfrequenzen- und im Fingerprintbereich bezüglich der Lage der Absorptionsbanden mit dem Vergleichsspektrum übereinstimmen.

5.1.2 Identifikation von funktionellen Gruppen

Funktionelle Gruppen werden aufgrund der Lage ihrer Absorptionsbanden mit Hilfe von Zuordnungstabellen identifiziert. Bei der Überwachung einer chemischen Reaktion werden mehrere Spektren aufgenommen und miteinander verglichen, wobei speziell das Auftreten bzw. Verschwinden der in Frage kommenden funktionellen Gruppen beobachtet wird.

5.1.3 Strukturaufklärung

Soll die Struktur einer unbekannt Substanz bestimmt werden, wird das Spektrum mit Hilfe von Zuordnungstabellen auf mögliche oder nicht mögliche Strukturelemente geprüft. Zusätzlich zu diesen Informationen sind noch weitere Angaben erforderlich, z. B. Summenformel, NMR-, MS-, UV-Spektrum.

Prüfverfahren:

Infrarotspektroskopie

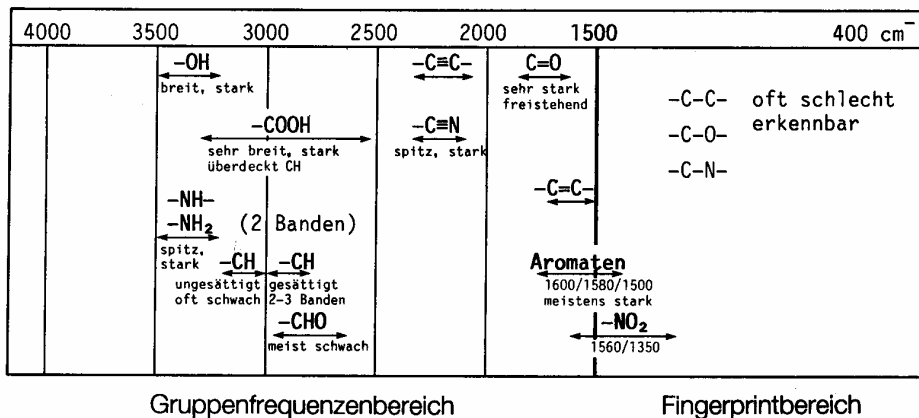
erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 16.02.03

Seite 22 von 28

Abl.: UE_10.5_Infrarotspektroskopie

5.2 Typische Strukturelemente

Die folgenden Strukturelemente lassen sich im Spektrum aufgrund ihrer Valenzschwingung leicht erkennen.



Wasserstoffbrücken können eine Verbreiterung der Absorptionsbande und eine Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen bewirken.

Bei der Interpretation der Absorptionsbanden ist auch die Intensität der Bande zu berücksichtigen.

Je polarer eine Bindung ist, desto intensiver die Absorption bei gleicher Schichtdicke und bei gleicher Stoffmengenkonzentration.

Beispiel: C-C schwache Bande C=O starke Bande

Transmission	100%	keine Absorption	
	ca. 80 %	schwache Absorption	Bezeichnung: schw./w
	ca. 50 %	mittelstarke Absorption	Bezeichnung: m/m
	ca. 20 %	starke Absorption	Bezeichnung: st./s

5.3 Typische Frequenzbereiche

Ein IR-Spektrum kann grob in zwei folgende Bereiche unterteilt werden:

Prüfverfahren:

Infrarotspektroskopie

erstellt /
geändert:

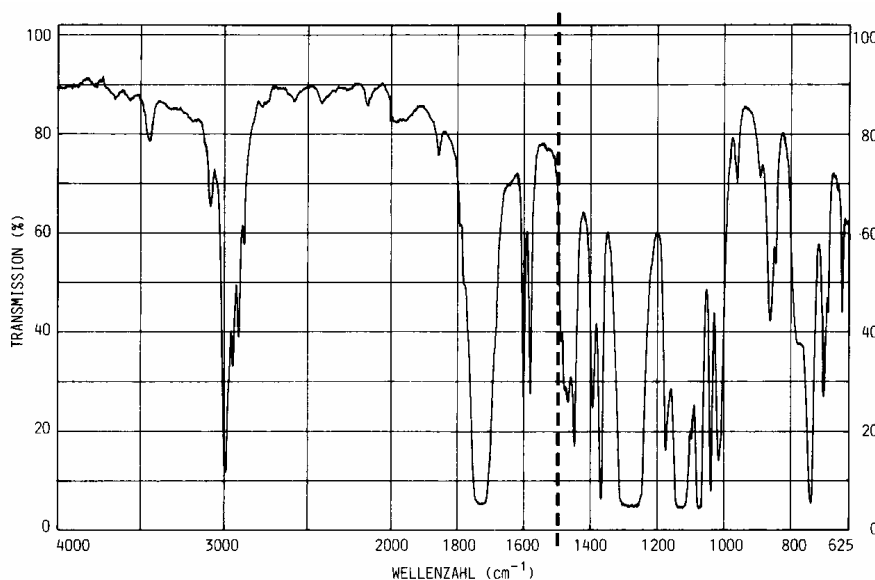
Datum:
16.02.03

von:

Unterschrift:

Seite 23 von 28

Abl.: UE_10.5_Infrarotspektroskopie



5.3.1 Gruppenfrequenzbereich (linker Teil)

4000-1500 cm^{-1} (2.5-6.5 μm)

Dieser Bereich informiert über die Bindungsarten (→ funktionelle Gruppen), die im betreffenden Molekül vorhanden sind.

Die Absorptionsbanden werden hauptsächlich durch Valenz- bzw. Streckschwingungen erzeugt.

5.3.2 Fingerprintbereich (rechter Teil)

1500-625 cm^{-1} (6.5-16 μm)

Dieser Bereich charakterisiert das einzelne Molekül (→ Identitätsnachweis).

Die Banden entstehen teilweise durch Deformationsschwingungen. Diese haben etwa die halbe Frequenz wie die entsprechende Streckschwingung. Die meisten Banden entstehen jedoch durch komplexe Molekülschwingungen, die als Ganzes sehr charakteristisch, im einzelnen aber nicht interpretierbar sind (→ Fingerabdruck).

		Prüfverfahren: <u>Infrarotspektroskopie</u>
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von: Unterschrift:

6. Interpretation eines Spektrums

Sind funktionelle Gruppen festzustellen, oder ist eine Strukturaufklärung durchzuführen, so sind folgende Überlegungen nützlich:

- 1) Sperrgebiete von Löse- bzw. Suspensionsmitteln müssen im Spektrum eingezeichnet werden. Es werden nur diejenigen Banden interpretiert, die sich eindeutig zuordnen lassen; die Lage der Bande ist oft mehrdeutig!
- 2) Banden interpretieren (Zuordnungstabellen beziehen); beim Zuordnen einer funktionellen Gruppe muss der ganze Frequenzbereich beachtet werden. Wird zum Vergleichen eine Spektrensammlung verwendet, ist zu beachten, daß Prismengeräte linear in Wellenlängen und Gittergeräte linear in Wellenzahlen registrieren.
- 3) Bindungsart bzw. zu erwartende funktionelle Gruppen abklären. Aufgrund des Molekülbaus (Bindungsart und Masse) abschätzen, wo die betreffende Absorption zu erwarten ist.
- 4) Die aus dem Spektrum interpretierten funktionellen Gruppen bzw. Strukturelemente werden aufgelistet.
- 5) Aufgrund der gefundenen Strukturelemente und der Summenformel werden unter Berücksichtigung der Ring-Regel mögliche Strukturen aufgestellt (Isomere berücksichtigen).
- 6) Nicht mögliche Strukturen sind mit Hilfe von anderen Spektren (IR-Vergleichsspektren, NMR, MS) und einem Vergleich der physikalischen Konstanten eindeutig auszuschließen.
- 7) Die gefundene Struktur muss bestätigt werden durch ein Vergleichsspektrum und die physikalischen Konstanten.

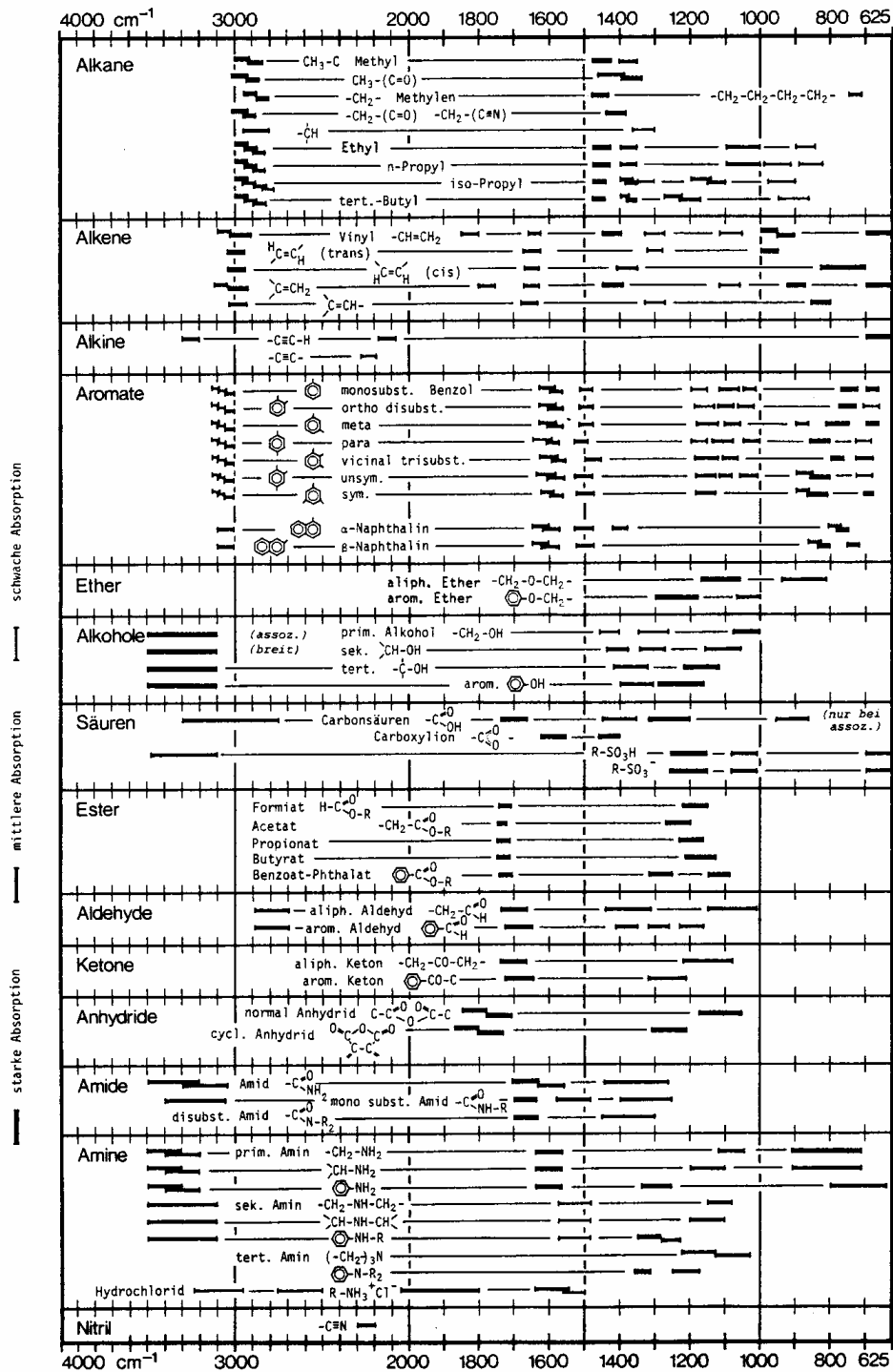
In der folgenden Graphik ist die Zuordnungstabelle nach Colthub dargestellt.

erstellt /
geändert:

Datum:
16.02.03

von:

Unterschrift:



Prüfverfahren:

Infrarotspektroskopie

erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 16.02.03

Seite 26 von 28

Abl.: UE_10.5_Infrarotspektroskopie

Die folgende Tabelle zeigt charakteristische Gruppen- und Gerüstfrequenzen

Wellenzahl (1cm ⁻¹)	Schwingungstyp	Verbindungen
3700–3600 (scharfe Bande)	–O–H Valenz. (unassoziiert)	Alkohole, Phenole, Säuren
3500–3300 (breite Bande)	–O–H Valenz. (assoziiert)	
3550–3350	–N–H Valenz. (unassoziiert)	Primäre (2 Banden) und sekundäre Amine und Amide
3500–3100	–N–H Valenz. (assoziiert)	
3300–3270	≡C–H Valenz.	Monosubstituierte Alkine
3350–3150 (breite Bande)	–NH ³⁺ Valenz.	Aminhydrochloride
3300–2500 (sehr breite Bande)	–O–H Valenz. (assoziiert)	Carbonsäuren
3100–3000	=C–H Valenz.	Aromaten, Alkene
3000–2800	–C–H Valenz.	Alkane, Cycloalkane
2962, 2872	–CH ₃ Valenz.	Alkane
2926, 2853	–CH ₂ Valenz.	Alkane
2820	–CH ₃ Valenz.	Methylether
2300–2100	–C≡X Valenz.	Alkine, Nitrile (X = C, N, O)
2260–2190	–C≡C Valenz.	1,2-Disubstituierte Alkine
2245–2220	–C≡N Valenz.	Nitrile
2140–2100	–C≡C Valenz.	Monosubstituierte Alkine
1900–1600	–C=O Valenz.	Carbonylverbindungen
1850–1740	–C=O Valenz.	Carbonsäurehalogenide
1840–1780 1780–1720	–C=O Valenz.	Carbonsäureanhydride (2 Banden)
1760–1700	–C=O Valenz.	Gesättigte Carbonsäuren
1750–1730	–C=O Valenz.	Gesättigte Carbonsäurealkylester
1730–1710	–C=O Valenz.	Ges. Aldehyde und Ketone, α, β-ungesättigte und aromatische Carbonsäureester
1745	–C=O Valenz.	Cyclopentanon
1715	–C=O Valenz.	Cyclohexanon
1715–1680	–C=O Valenz.	α, β-ungesättigte und aromatische Aldehyde
1690–1660	–C=O Valenz.	α, β-ungesättigte und aromatische Ketone
1680–1630	–C=O Valenz.	Primäre Carbonsäureamide (Amidbande I)
1660–1600	–C=O Valenz.	Aromaten, Alkene
1650–1620	–NH ₂ Deform.	Primäre Säureamide (Amidbande II)

Prüfverfahren:

Infrarotspektroskopie

erstellt / Datum: von: Unterschrift:
geändert: 16.02.03

Seite 27 von 28

Abl.: UE_10.5_Infrarotspektroskopie

1650–1580	–N–H Deform.	Primäre und Sekundäre Amine
1630–1615	H–O–H Deform.	Kristallwasser
1610–1590	Ringschwingung	Aromaten
1560	–NO ₂ Valenz.	Nitroalkane
1518	–NO ₂ Valenz.	Aromatische Nitroverbindungen
1500–1480	Ringschwingung	Aromaten
1480–1430	–CH ₃ und –CH ₂ Deform.	Kohlenwasserstoffe, Ester
1420–1340	–OH Deform.	Alkohole, Phenole, Carbonsäuren
1390–1370	–CH ₃ Deform.	Kohlenwasserstoffe
1360–1030	–C–N Valenz.	Amide, Amine
1350–1240	–NO ₂ Valenz.	Aliphatische und aromatische Nitroverbindungen
1290–1050	–C–O Valenz.	Ether, Alkohole
1250–1180	–C–O Valenz.	Gesättigte Carbonsäureester
1200–600	–C–C Valenz. Gerüstschiwingung	Alkane, Cycloalkane, Alkene, Aromaten mit Seitenketten
970–960	=C–H Deform.	1,2–Disubstituierte Alkene (<i>trans</i>)
995–985 915–905	=C–H Deform.	Monosubstituierte Alkene
900–860 810–750 725–680	=C–H Deform.	1,3–Disubstituierte Benzole
885–855	=C–H Deform.	1,1–Disubstituierte Alkene
860–800	=C–H Deform.	1,4–Disubstituierte Benzole
770–735	=C–H Deform.	1,2–Disubstituierte Benzole
770–730 710–690	=C–H Deform.	Monosubstituierte Benzole
720	=C–H Deform.	Alkane mit mehr als 4 CH ₂ –Gruppen
690	=C–H Deform.	1,2–Disubstituierte Alkene (<i>cis</i>)
670	=C–H Deform.	Benzol
800–650	C–Cl Valenz.	Aliphaten, 1100–1050 Aromaten ?
700–500	C–Br Valenz.	Aliphaten
620–490	C–I Valenz.	Aliphaten

		Prüfverfahren: <u>Infrarotspektroskopie</u>
erstellt / geändert:	Datum: 16.02.03	von: Unterschrift:

Seite 28 von 28

Abl.: UE_10.5_Infrarotspektroskopie

2. Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Übung werden mit Unterstützung des Übungsleiters verschiedene Substanzproben zur Messung vorbereitet und gemessen. Die erhaltenen Spektren werden unter Zuhilfenahme der beschriebenen Methoden beziehungsweise mithilfe von Spektrenbibliotheken interpretiert.

➤ *Protokollieren Sie die Probenherstellung, -messung und die Interpretation der Spektren*

3. Geräte

IR-Spektrometer und Zubehör zur Probenherstellung

4. Reagenzien

-

5. Protokoll

Protokollnummer, Datum, Titel, Kurzfassung mit Durchführung und Beobachtungen

6. Literatur

[1] Autorenkollektiv, Organikum, 20.Auflage, Johann Ambrosius Barth, Heidelberg 1996

[2] A.I.Vogel, Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, 5th ed., Longman Scientific & Technical, Essex 1989

[3] R.L.Shriner, R.C.Fuson, D.Y.Curtin, T.C.Morrill, The Systematic Identification of Organic Compounds, 6th ed., John Wiley & Sons, Chichester 1980

[4] W.Gottwald, G.Wachter, IR-Spektroskopie für Anwender, Wiley-VCH 1997

[5] M.Hesse, H.Meier, B.Zeeh, Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Thieme Verlag Stuttgart 1979

[6] R.M.Silverstein, G.C.Bassler, T.C.Morrill, Spectrometric Identification of Organic Compounds, John Wiley & Sons, New York 1981

[7] G.Sokrates, Infrared Characteristic Group Frequencies Tables and Charts, 2nd ed., John Wiley & Sons, Chichester 1994