
3 Ausführung der Messung

3.1 Methoden und Messaufbauten

3.1.1 Fourier-Transformation-Infrarot-Spektroskopie

Die Infrarot-Spektroskopie nutzt die Eigenschaft von Materie, Licht im infraroten Wellenlängenbereich (ab 700 nm) zu absorbieren. Die Absorption von Licht dieser Wellenlängen geschieht über Änderungen der Schwingungs- und Rotationseigenschaften von Molekülen, weswegen die Infrarot-Spektroskopie schon lange Zeit als spezifische, sensitive und einfache Analytik-Methode eingesetzt wird.

Die absorbierte Menge des Lichtes hängt von der durchstrahlten Stoffmenge sowie der spezifischen Wechselwirkung zwischen Licht und Stoff ab. Die Anzahl der absorbierenden Moleküle ist proportional zum durchstrahlten Volumen und zur Konzentration c der untersuchten Verbindung. Die Wechselwirkung, die zur Absorption der Lichtenergie führt, bedingt immer eine Zustandsänderung des Dipolmoments der absorbierenden Moleküle bzw. Molekülgruppen und ist ein stoffabhängiger Prozess. Diese Gegebenheiten werden durch das Lambert-Beer'schen Gesetz für die Absorption wiedergegeben:

$$(3.1) \quad \text{Absorption} = \epsilon c d$$

Dabei bezeichnet d die Weglänge in der Probe und der Extinktionskoeffizient ϵ eine wellenlängenabhängige Stoffkonstante. Die Absorption geschieht additiv, d. h. bei mehreren Banden für die selbe Wellenlänge addieren sich ihre Einzelabsorptionen (Colthup *et al.* 1990).

Die Messung eines Spektrums bei der klassischen dispersiven Infrarot-Spektroskopie geschieht, indem das eingestrahlte Licht eines gleichmäßigen Schwarzen Strahlers und das aus der Probe austretende Licht je nach Auflösung für jeden Wellenlängenabschnitt verglichen werden. Bei der Fourier-Transformation-Infrarot-Spektroskopie (FTIR-Spektroskopie) wird das Licht der Strahlenquelle in einem Interferometer mit verstellbaren Spiegel zerlegt und dann wellenlängenabhängig zur Interferenz gebracht, bevor es die Probe passiert. Über die Verschiebung des Spiegels erhält das resultierende Interferogramm eine Phaseninformation, mathematisch die Fourier-Transformation, des Spektrums über die Wellenlänge. Das FTIR-Spektrum, das die Absorption für jeden Wellenlängenabschnitt wiedergibt, lässt sich über entsprechende Algorithmen aus der Information über die Spiegelbewegung errechnen. Jedes einzelne Interferogramm beinhaltet schon Informationen über die Absorption des gesamten gemessenen Wellenlängenbereichs, dadurch ergibt sich für die FTIR-Spektroskopie bei

PC-Unterstützung ein wesentlicher Vorteil in Aufnahmegeschwindigkeit, Auflösung und vor allem beim Signal-Rausch-Verhältnis.

Eine wichtige Möglichkeit der FTIR-Spektroskopie ist dank der großen Aufnahmegeschwindigkeit die zeitnahe Messung bei gezielten Änderungen von Probenparametern wie Wärme, Druck, Laser-Induktion oder Einfluss einer chemische Reaktion. Solch ein resultierendes Differenzspektrum erlaubt eine sensitive Bestimmung von spektralen Änderungen, deren gemessene Signalhöhe mehrere Größenordnungen kleiner als die Signale der sogenannten Einzelspektren sein kann.

Weitere Entwicklungen der Infrarot-Spektroskopie umfassen Untersuchungen dünner Schichten mittels der Absorption des infraroten Lichtes, das bei Totalreflexion an der Probenoberfläche wechselwirkt („Attenuated Total Reflection“, ATR-Methoden), sowie polarisationsabhängige Messungen, Mikroskop-Techniken, zeit- und orts aufgelöstes Messen und die Kombination mit anderen Methoden (Raman-Spektroskopie) (Atkins 1990; Colthup *et al.* 1990; George und McIntyre 1987; Schrader 1995; Welfle 1996).

3.1.2 Apparatur

3.1.2.1 Das Spektrometer

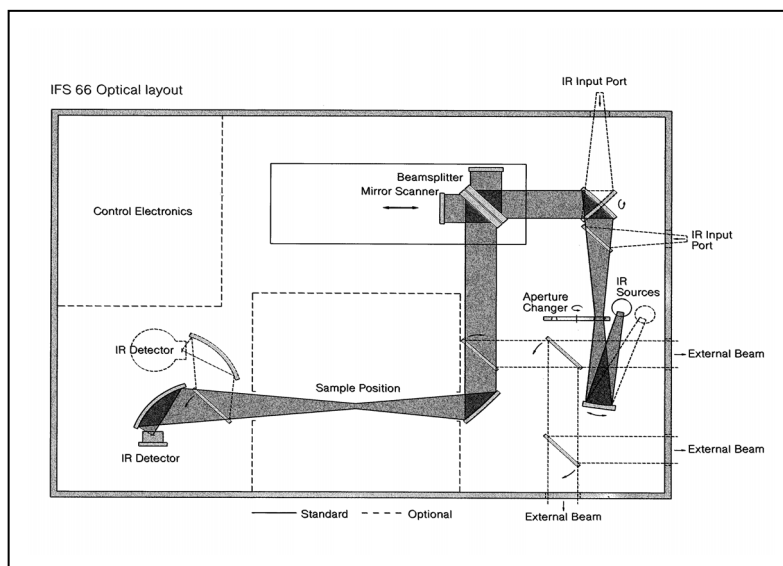


Abbildung 3-1 : Opto-mechanischer Aufbau im Spektrometer IFS 66 (Bruker Saxonia Analytik)

Die FTIR-Messungen wurden durchgeführt an einem Spektrometer der Firma Bruker Saxonia Analytik GmbH, Modell IFS 66. Das Gerät wurde ergänzt mit einem beweglichen, temperierbaren Probenhalter für zwei Zellen, der im Detail in Abschnitt 3.1.2.2 vorgestellt wird. Der opto-mechanische Aufbau des Geräts wird in Abbildung 3-1 wiedergegeben.

Die Infrarotlichtquelle war ein Siliziumkarbid-Globar mit Wasserkühlung („SiC-Glow Bar“, hergestellt aus einer Silizium-Kohlenstoff-Verbindung), der zu 75 % der Schwarzkörperstrahlung bei 1400 K entspricht (Brügel 1995). Die Apertur des Infrarotlichtes wurde mittels eines PC-gesteuerten Lochblendenrads eingestellt. Nach Passage des Michelson-Interferometers wurde das Licht weiter über Spiegel in der Mitte der Probenkammer fokussiert. Dort befand sich ein motorisierter Schlitten, der einen Probenhalter aufnehmen konnte und es erlaubte, zwei Küvetten sukzessive in den fokussierten Lichtstrahl zu bewegen. Als Detektor für das transmittierte Licht standen ein thermischer DTGS- („deuterated-triglycine sulphate“) und ein empfindlicherer, mit flüssigen Stickstoff zu kühlender MCT- („mercury-cadmium-telluride“, HgCdTe) Detektor zur Wahl. Der für die Fourier-Transformation notwendige Wellenlängenstandard stammte von der sichtbaren roten Linie bei 632.8 nm eines eingebauten He-Ne-Lasers. Der Laserstrahl verlief für die Justage leicht versetzt zum IR-Strahlengang durch die Probe.

Die gesamte Datenaufnahme, -verarbeitung und -speicherung geschah über eine Verstärker- und Steuerungselektronik (16bit, 200 kHz A/D-Wandler und Akquisitionsprozessor) und ein angeschlossenes PC-System (486DX33 mit OS/2) mit der mitgelieferten Software (OPUSv3.0, Bruker Saxonia Analytik). Die Probenkammer wurde mit getrockneter Luft im Überdruck gespült (System von Zander Aufbereitungstechnik GmbH), und das gesamte Spektrometer war schwebend gelagert (schwingungsisolierter Tisch von Microplan).

3.1.2.2 Probenhalter

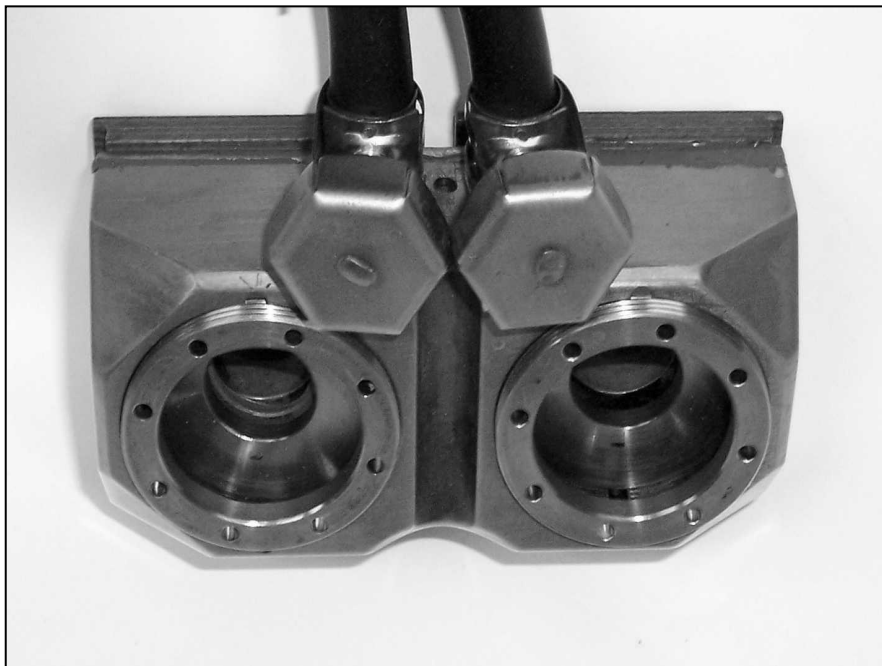


Abbildung 3-2 : Photo des Probenhalters für das Spektrometer

Der Probenhalter wurde in der MDC-Werkstatt passend für den Schlitten gebaut (Abbildung 3-2). Er bestand aus einem hohlen Messingkörper mit zwei Kammern für die Aufnahme der CaF_2 -Sandwichzellen mit einem Durchmesser von 40 mm. Die Zellen wurden mit zwei Bleischeiben (für den Druckausgleich) und einem Distanzstück mittels eines Drehmomentschlüssels fest angeschraubt. Der Messingkörper besaß zwei Anschlussstutzen für die Durchspülung mit temperierten Wasser sowie eine Bohrung zur Aufnahme eines Temperaturfühlers (Platin Messwiderstand P 100/0815, hartglasüberzogen, Firma Merz Messführlertechnik GmbH). Der maximale Durchmesser der Öffnung für den infraroten Lichtstrahl betrug ungefähr 27 mm.

Der Probenhalter war an ein Wasserbad angeschlossen (Haake F8-C25), das über eine RS232C-Schnittstelle vom Messcomputer gesteuert wurde. Die Messung der Temperatur erfolgte über den angeschlossenen Messfühler im Probenhalter und die Temperaturregelung im Wasserbad. Theoretisch war ein Temperaturbereich von -28 °C bis 150 °C möglich, je nach Art der Zumischung von Frostschutzmittel bzw. Ölen zum Wasser des Bades.

3.1.2.3 Probenzellen

Bei der Entscheidung für eine Probenzelle mussten die Absorptionseigenschaften des Küvettenmaterials berücksichtigt werden. Da Glas- und Quarzmaterialien unterhalb 2500 cm^{-1} absorbieren, konnten Verbindungen wie z. B. CaF_2 , BaF_2 , KBr , ZnS und NaCl verwendet werden, die für Licht im infraroten Wellenlängenbereich relativ durchsichtig sind (Colthup *et al.* 1990).

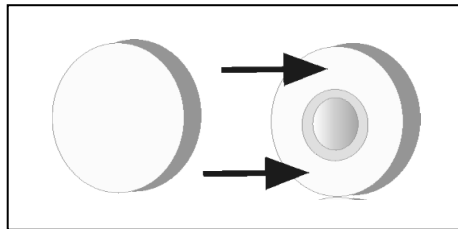
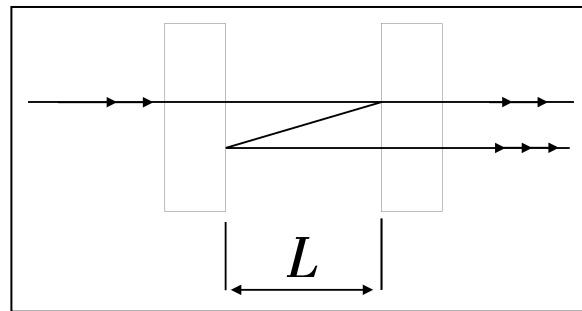


Abbildung 3-3 : Aufbau der Scheibenzellen aus CaF_2

Die verwendeten Zellen bestanden aus zwei kreisrunden, planen Platten aus CaF_2 mit einer jeweiligen Dicke von 3 mm und einem Durchmesser von 40 mm (Körth Kristalle GmbH). Eine der beiden Scheiben war jeweils mit einer Vertiefung versehen (Abbildung 3-3), die mittig aus der Scheibe herauspoliert worden war (Feinoptische Werkstatt W. Krawiec). Beim Übereinanderlegen der Platten entstand ein Hohlraum mit einem Durchmesser von 10 mm bzw. 16 mm sowie einer Tiefe von einigen Mikrometern, die die Weglänge des Infrarotstrahls durch die Probe definierte. Am Rand des Hohlraums befand sich ein Graben, der überschüssiges Probenmaterial aufnehmen konnte. Insgesamt konnten so maximal 10 bis $20\text{ }\mu\text{L}$ Probenmaterial in eine Zelle gegeben werden, wovon sich circa $0.3\text{ }\mu\text{L}$ im eigentlichen Messbereich befanden. Für den infraroten Lichtstrahl stand nicht der maximale Durchmesser der Vertiefung zur Verfügung, da der Strahl nicht bei beiden Probenzellen im Schlitten gleich exakt auf den Mittelpunkt des Messbereichs eingestellt werden konnte. Der Durchgang des infraroten Lichts durch die Zellenmessbereiche wurde mit einem lichtempfindlichen Fluorophor auf einem Stäbchen justiert und überprüft.

Die Schichtdicke der Zellen verblieb extrem abhängig von Auswahl und Zusammenbau der Küvetten, da die Oberflächen der CaF_2 -Scheiben nicht auf den Submikrometerbereich genau planparallel sein konnten. Daher waren vorhergehende Bestimmungen der Schichtdicken und Markierungen der Einzelplatten für definierte Verhältnisse wichtig. Der Einbau der Zellen in den Probenhalter mit definiertem Andruck durch einen Drehmomentschlüssel diente ebenfalls der Reproduzierbarkeit der Schichtdicke.



**Abbildung 3-4 : Interferenz in der mit Luft gefüllten Zelle
(George und McIntyre 1987)**

Die genaue Bestimmung der Schichtdicken im Mikrometerbereich war nicht einfach. Eine „klassische Methode“ beruhte auf der Beobachtung von Interferenzen, die in der leeren bzw. mit Luft gefüllten Zelle entstehen. Durch die Reflexion des infraroten Strahls an den Grenzschichten zwischen CaF_2 und Luft geht ein Teil des Strahles den Weg mehrmals durch die leere Küvette, so dass sich mittels konstruktiver Interferenz dem Spektrum eine stehende Welle in Funktion zur Probenschichtdicke überlagert (Abbildung 3-4). Nur die Teilstrahlen, die ein Vielfaches der Schichtdicke zurück gelegt haben, sind in der richtigen Phase 2π und verstärken sich zu Maxima im erhaltenen Spektrum. Daher ließ sich aus der Distanz $\Delta\nu$ (in Wellenzahlen) zwischen dem ersten und n-ten Wellenberg die Schichtdicke d ableiten nach:

$$(3.2) \quad d = n / (2 \Delta\nu)$$

Bei Schichtdicken kleiner als $5 \mu\text{m}$ lagen zwischen zwei Maxima mindestens 1000 cm^{-1} und somit bei einem Messbereich von 1200 bis 4500 cm^{-1} gerade einmal drei Wellenberge.

Eine zweite Methode war besser geeignet für die Ermittlung kleiner Probenschichtdicken. Venyaminov *et al.* (Venyaminov und Prendergast 1997), benutzten CaF_2 -Zellen mit Probenschichtdicken von $1.2 \mu\text{m}$ bis $120.5 \mu\text{m}$, um die molaren Absorptionskoeffizienten von Wasserschwingungsbanden sowie optimale Schichtdicken für Messungen in diesem Zusammenhang zu bestimmen

(Abbildung 2-14). Ausgehend von diesen Daten (Tabelle 3-1) war es möglich, anhand reiner Wasserspektren die gegebenen Schichtdicken über die Absorptionskoeffizienten zu ermitteln.

Bei der Bestimmung der Schichtdicken mittels der Wasserabsorption musste eine sorgfältige Basislinienkorrektur beachtet werden, damit keine Absorption durch CaF_2 in die Auswertung einfluss. Für mindestens drei Messungen wurden die Absorptionswerte bei den vier in Tabelle 3-1 aufgeführten Wellenzahlen bestimmt und mit dem Literaturwert für $10 \mu\text{m}$ -Schichten verglichen. Der Mittelwert dieser vier Ergebnisse ergab die relevante Probenschichtdicke.

Zugeordnete Schwingung	Wellenzahl	Molarer Absorptionskoeffizient (mit Fehler)	Wasserabsorption für $10 \mu\text{m}$ Weglänge	Optimale Weglänge
	ν_0 (cm^{-1})	E_0 ($\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	$A_{10\mu\text{m}}$ (a.u.)	l_{opt} (μm)
Streckschwingung & Oberton der Biegeschwingung von H_2O	3404,0	$99,9 \pm 0,8$	5,53	0,8
Kombinierte Biege und Wag-Schwingung	2127,5	$3,50 \pm 0,10$	0,194	22,4
Biegeschwingung von OH	1643,5	$21,8 \pm 0,3$	1,206	3,6
Position der Amid II-Bande von Proteinen, die in entsprechenden Studien wichtig ist	1550	$6,55 \pm 0,13$	0,362	12,0

Tabelle 3-1 : Molare Absorptionskoeffizienten für Wasser (Venjaminov und Prendergast 1997)

Die optimale Schichtdicke für die Absorptionen um 3400 cm^{-1} lag nach Tabelle 3-1 bei $0.8\text{ }\mu\text{m}$, so dass die benutzten Zellen in dieser Größenordnung gewählt wurden. Bei der Auswahl der Zellen sollte die Probenzelle mit der Cyclodextrin-Lösung eine etwa $1\text{ }\mu\text{m}$ größere Schichtdicke aufweisen als die Referenzzelle mit Wasser.

Für diese Studie wurden Messungen mit zwei Küvettenpaaren in die Auswertung aufgenommen, die jeweils ein bestimmtes, reproduziertes Verhältnis der Proben- und Referenzschichtdicke besaßen. In Tabelle 3-2 sind diese Werte aus den Messungen mit Wasser wiedergegeben.

	Probenzelle		Referenzzelle		Schichtdicken- differenz
	Schicht- dicke	Max. Durch- messer	Schicht- dicke	Max. Durch- messer	
Satz 1	$3.0\text{ }\mu\text{m}$	10 mm	$1.7\text{ }\mu\text{m}$	16 mm	$1.3\text{ }\mu\text{m}$
Satz 2	$2.5\text{ }\mu\text{m}$	14 mm	$1.7\text{ }\mu\text{m}$	14 mm	$0.8\text{ }\mu\text{m}$

Tabelle 3-2 : Liste der verwendeten Küvettenpaare, Schichtdicken aus den Wasserabsorptionskoeffizienten nach Venyaminov et al. bestimmt (Venyaminov und Prendergast 1997)

3.2 Zur Durchführung der Messung

3.2.1 Experimenteller Ablauf

3.2.1.1 Zusammenbau der Zellen

Vor jeder Messreihe wurde am Spektrometer mit Hilfe des Wellenlängenstandards des eingebauten HeNe-Lasers und der Software-Routine „auto-align“ die Startposition des Schrittmotors des Interferometerspiegels justiert. Der Probenhalter auf dem motorisierten Schlitten konnte mit einer Schraube an einer festen Position arretiert werden, so dass der stets gleiche IR-Strahlengang durch Probenhalter und Zellenmitte gewährleistet war. Der verwendete DTGS-Detektor bedurfte keiner Kühlung. Da die Öffnung des Probenraums es mit sich brachte, dass Wasserdampfbanden in den Spektren erscheinen, war nach Schließen des Raumes eine Spülung mit trockener Luft notwendig. In der Regel reichten dafür 30 Minuten.

Eine bestmögliche Staubfreiheit der Zellscheiben war Pflicht, da ein hoher mechanischer Druck auf die Platten wirkte und Verunreinigungen zum Bruch führen konnten. Der erste Schritt war daher die Reinigung der einzelnen Zellplatten mit Druckluft aus der Hausversorgung (gefiltert mit Fritte).

Für einen dichten Verschluss der Sandwichzellen wurde im Randbereich der Zellscheiben eine Lösung aus Öl und Chloroform (1:1) aufgetragen. Anschließend wurden circa fünf Minuten zum Verflüchtigen des Lösungsmittels abgewartet und dann die Probe in die Zellenvertiefung aufgetragen. Bei einem Probenraumdurchmesser von 10 mm wurde ein Lösungsvolumen von 2 μL bzw. bei 14 mm von etwa 4 μL verwendet. Beim Aufsetzen der Deckplatte gewährleisteten Markierungen an den Seitenrändern die Orientierung der Scheiben und die Reproduzierbarkeit der Schichtdicken. Die zusammengesetzte Zelle wurde in eine definierte Position zwischen zwei Lochscheiben aus Blei zum Druckausgleich in den Probenhalter gesetzt. Es folgte das Zusammenschrauben mittels eines fest eingestellten Drehmomentschlüssels (Venyaminov und Prendergast 1997), wodurch sich die Öldichtung der Zellen besser zwischen den Platten verteilte.

Nach den Messungen wurden die Zellen vorsichtig getrennt und gereinigt. Von allen notwendigen Schritten führte die starke Adhäsion der CaF_2 -Platten zur stärksten Abnutzung der Zellen. Die Reinigung der Zellscheiben geschah mit 5% Decon und CCl_4 (üblicherweise zweimal 400 μL pro Seite); zum Spülen wurde erst Millipore-Wasser, dann Alkohol verwendet und zur Trocknung Druckluft.

3.2.1.2 Makro gesteuerter Ablauf der Messung

Jede Absorptionsmessung braucht zum Vergleich die Aufnahme von zwei Einzelspektren. Im verwendeten Ein-Strahl-Gerät war dies möglich durch einen Probenschlitten, der vom Computer gesteuert die beiden Zellen sukzessive in den Strahlengang fuhr. Der Vorteil war eine zeitnahe Messung der beiden Spektren ohne kurzzeitige Änderungen.

Der mehrfache Wechsel von Proben- und Referenzmessung wurde mit einer temperaturgesteuerten Serien-Messroutine der Software neu kombiniert. Dazu wurde eine Makrosteuerung des Messablaufes für den folgenden Ablauf einer automatisierten Messreihe ergänzt:

1. vor Start des Makros wurden in einer Maske Probandaten, Start-, Ziel- und Schritttemperatur eingegeben sowie eine gespeicherte Messroutine mit weiteren Messparametern wie Apertur- und Detektorwahl ausgewählt;
2. bei Erreichen der ersten Temperatur der Messreihe im Rahmen der einstellbaren Marge (üblich ± 0.1 °C) startete das Makro eine Warteschleife von 3 min bis zur Stabilisierung der Temperatur;
3. danach startete das Makro die eigentliche Messung, die aus acht zeitnahen Einzelmessungen der Referenz- und der Probenzelle mit jeweils acht Durchgängen bestand. Die Spektren der acht (Doppel-)Messungen wurden mittels Aufrufs eines OPUS-Makros („average spectra“) zu einem Gesamtspektrum gemittelt.
4. die Temperaturmessreihe wird mit sämtlichen relevanten Daten bei jedem Temperaturschritt in zwei Textdateien automatisch protokolliert;

3.2.1.3 Einstellungsparameter

Verschiedene Messparameter wurden im Anfangsstadium dieser Arbeit optimiert und in der Folge beibehalten. Dazu zählte die Auswahl eines festen Zellenpaares und des DTGS-Detektors.

Für die Apertur wurden 4 mm gewählt, da größere Werte zu Übersättigung des Wasserbandensignals bei 3400 cm^{-1} führten bzw. der IR-Strahl zum Teil nicht mehr den Messbereich der Zellen traf. Kleinere Aperturwerte führten dagegen zu Interferenzerscheinungen in den Spektren, was auf die Schichtdicken im Mikrometerbereich zurückzuführen war. Das Spektrometer IFS 66 erlaubte eine spektrale Auflösung bis zu 0.25 cm^{-1} , alle Spektren der Messungen in Lösung wurden aber mit einer Schrittweite von 0.96 cm^{-1} abgespeichert.

Weitere nie variierte Parameter z. B. für den gewählten Algorithmus der Fourier-Transformation sind für alle Messungen über eine Parameter-Datei („weldtgs.xmp“) festgehalten worden.

3.2.1.4 Auswertung

Mehrere Programme wurden zur Auswertung der Daten benutzt. Der OS/2-PC am Spektrometer war mit dem Programm OPUS v3.0 (Bruker Saxonia Analytik) ausgestattet, das die Steuerung des Gerätes, die Datenaufnahme und -speicherung sowie die grundlegende Bearbeitung (Fourier-Transformation) übernahm. Außerdem konnten mit OPUS mittels eingebauter Routinen Auswertungen wie die Korrektur über Basislinien, die Differentialbildung oder eine Spektrensubtraktion ausgeführt werden.

Die hauptsächliche Auswertung und graphische Darstellung der Resultate geschah mit einem Windows-PC. Dafür wurden die Messdaten von OPUS in einem ASCII-Format abgespeichert und transferiert. Genutzt wurden für die Auswertung und Darstellung ORIGIN v5.0 und v6.1 (Microcal) sowie GRAMS/Ai v7.00 (Thermo Galactic), für die Zerlegung der Banden in Einzelkomponenten MSGAUSS v17.04.2000 (Dr. Otto Ristau) und für die Dateibehandlung eigene Programme in TURBO-PASCAL v6.0 (Borland). Verschiedene Makros, Subroutinen und Vorlagen mussten bei diesen Programmen ergänzt werden.

Für die Bestimmung der für Lösungsmittelmoleküle zugänglichen Kontaktfläche (Lee und Richards 1971) von TRIMEG wurden publizierte Kristallstruktur-Koordinaten in Form von pdb-Dateien (Format der ‚Protein Data Bank‘, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB)) für TRIMEG·2H₂O (Steiner und Saenger 1998a) und (4TRIMEG)·19.3H₂O (Aree *et al.* 1999c) benutzt. Bei der Berechnung wurde das Programm CCP4 v6.0.0 (Collaborative Computational Project 1994) mit seiner implementierten Routine „areaimol“ verwendet. Bei „areaimol“ ergibt sich die zugängliche Oberfläche aus der Schnittmenge der Oberflächensphären aller Einzelatome, die als idealisierte Kugeln mit dem van-der-Waals-Radius der Atome plus dem van-der-Waals-Radius des Lösungsmittelmoleküls (Wasser 1.4 Å) gerechnet werden, wobei die Anteile innerhalb benachbarter Kugeloberflächen eliminiert werden.

3.2.2 Bestimmung der Probenkonzentration

Die für die Messungen verwendeten wässrigen Lösungen wurden aus eingewogenen Proben und definierten Wasservolumina hergestellt. Die Konzentration der Lösung während des Experiments war unsicher, da sie u. a. durch teilweise Verdunstung des maximal vier Mikroliter großen Tropfens der Probenlösung während des Zusammenbaus der raumwarmen Zelle variierte.

Die Konzentration wurde daher spektroskopisch in der Zelle kontrolliert bzw. kalibriert. Eine Kontrolle war die Reproduktion der Messung bei Raumtemperatur bzw. 30 °C jeweils am Ende der Messreihe von 5 °C bis 50 °C. Die absolute Konzentration in der Zelle war wegen den unbekanntem Absorptionskonstanten der (methylierten) Cyclodextrine nicht zugänglich. Auf der anderen Seite war eine Kalibrierung der Konzentrationsbestimmung möglich.

3.2.2.1 Rechengrößen für die Konzentrationsbestimmung

Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Absorption direkt proportional zu den Werten Extinktionskoeffizient ϵ , Konzentration c und Schichtdicke bzw. Weglänge der IR-Strahls d . Die Kenntnis zweier Werte ergibt den dritten. Der Extinktionskoeffizient ist eine Stoffkonstante, deren Einheit sich nach der Konzentration (g/L bzw. Mol/L) und der Weglänge (meist cm) richtet und von Parametern wie Temperatur und Konzentrationsbereich abhängen kann. Mit den Voraussetzungen eines konstanten Extinktionskoeffizienten und von stets reproduzierten Schichtdicken durch experimentelle Vorkehrungen konnte eine Kalibrierkurve für die Probenkonzentration erstellt werden.

Die Messungen in Kompensationsanordnung waren nicht geeignet für eine Kalibrierung, da die Absorption in zwei Zellen mit zwei schwer zu bestimmenden Schichtdicken (im Mikrometerbereich mit einem relativen Fehler von rund 5 %) gemessen wurden. Diese Schwierigkeit konnte mit Messungen ohne Referenzzelle, bei denen die Abhängigkeit von den Schichtdicken entfällt, umgangen werden.

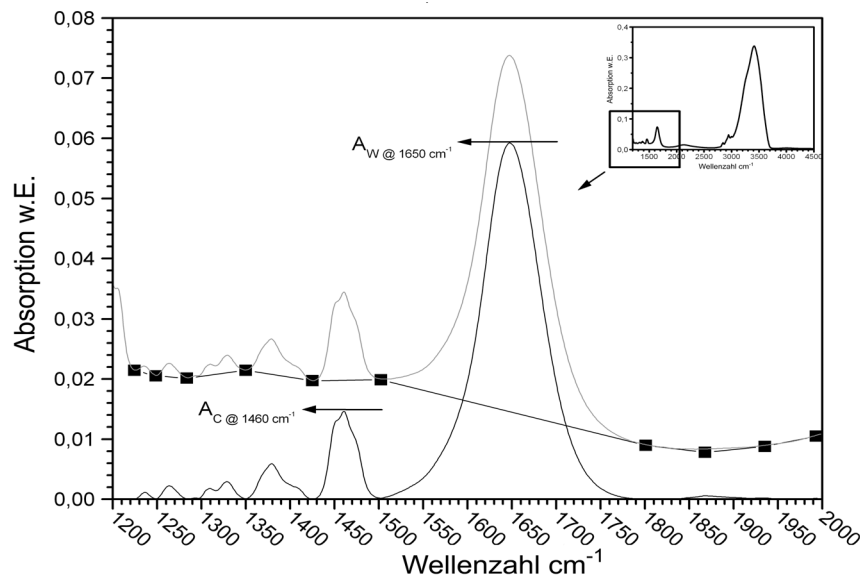


Abbildung 3-5 : FTIR-Spektrum von TRIMEG in wässriger Lösung, gemessen ohne Referenzzelle (helle Kurve) mit Basislinie (Punktlinie) und nach Abzug der Basislinie (dunkle Kurve)

Das FTIR-Spektrum der Cyclodextrin-Lösung beinhaltete klar getrennte spektrale Signale von zwei verschiedenen Komponenten (Abbildung 3-5). Es waren dies (nach Abzug der Basislinie) die Absorption A_C des Cyclodextrins bei 1460 cm^{-1} (3.3) und die Absorption A_H des Wassers bei 1640 cm^{-1} (3.4). ϵ_C bzw. ϵ_H sind die entsprechenden Extinktionskoeffizienten, c die Konzentration des Cyclodextrins und c_H die (effektive) Wasserkonzentration. Sei \mathcal{A} das Verhältnis dieser beiden Absorptionen, dann galt nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz :

$$(3.3) \quad A_C = \epsilon_C c d_1$$

$$(3.4) \quad A_H = \epsilon_H c_H d_2$$

$$\rightarrow (3.5) \quad \mathcal{A} = A_C / A_H = [\epsilon_C c / \epsilon_H c_H] d_1 / d_2$$

Die Extinktionskoeffizienten ϵ_H und ϵ_C galten als unabhängig von der Temperatur und der Probenkonzentration sowie in jedem Fall unabhängig von den Weglängen.

Dieses Verhältnis \mathcal{A} konnte bei unserer Messanordnung jeweils für die zwei Zellen ausgedrückt werden. Zunächst gab es für die nur mit Wasser gefüllte Referenzzelle (Index ^R) keinen Absorptionsbeitrag vom Cyclodextrin, also galt für die Absorptionen A_C^R und A_H^R in dieser Zelle bei einer Weglänge d_R :

$$(3.6a) \quad A_C^R = 0 \quad \text{da kein Cyclodextrin vorhanden}$$

$$(3.6b) \quad A_H^R = \epsilon_H c_H^R d_R \quad \text{für das Wasser}$$

c_H^R war hier die Konzentration des Wassers von 55.5 mol/L.

In der Probenzelle (Index P) wurde dagegen gleichzeitig die Absorption von zwei Stoffen gemessen. Für beiden erwähnten unabhängigen Banden galt die gleiche Weglänge in der Probenzelle d_P . Die Cyclodextrin-Moleküle waren in einer Konzentration von c ($=c^P$) und das Wasser von c_H^P vorhanden. Die gegebene Wasserkonzentration in der Probenzelle war durch die Gegenwart der Cyclodextrin-Moleküle geringer als der Wert von 55.5 mol/L, also war c_H^P kleiner als c_H^R . Daraus folgte für die Probenzelle :

$$(3.7a) \quad A_C^P = \epsilon_C c d_P \quad \text{für Cyclodextrin}$$

$$(3.7b) \quad A_H^P = \epsilon_H c_H^P d_P \quad \text{für Wasser}$$

In unserem Experiment wurde das resultierende Spektrum aus der Differenz der beiden Absorptionen A_C und A_H behandelt, also :

$$(3.8a) \quad A_C = A_C^P - 0 \quad \text{für Cyclodextrin}$$

$$= \epsilon_C c d_P$$

$$(3.8b) \quad A_H = A_H^P - A_H^R \quad \text{für Wasser}$$

$$= \epsilon_H c_H^P d_P - \epsilon_H c_H^R d_R$$

Das in (3.5) eingeführte Verhältnis \mathcal{A} änderte sich somit bei der Kompen-sationsanordnung mit verschiedenen gefüllten Zellen zu:

$$(3.9) \quad \mathcal{A} = (\epsilon_C c d_P) / (\epsilon_H c_H^P d_P - \epsilon_H c_H^R d_R)$$

$$= (\epsilon_C c) / [\epsilon_H c_H^P - \epsilon_H c_H^R (d_R / d_P)]$$

$$(3.9a) \quad = (\epsilon_C c / \epsilon_H c_H^P) / [1 - (c_H^R / c_H^P) (d_R / d_P)]$$

Es ist zu sehen, dass die einzelnen Bandenabsorptionen (3.8a) und (3.8b) und das Verhältnis in (3.9a) von den Schichtdicken d_R und d_P abhängig waren.

Bei Messungen ohne Referenzzelle galt $d_R = 0$, d. h. das entsprechende Verhältnis \mathcal{A}^{Luft} vereinfachte sich zu (vergleiche (3.5)):

$(3.10) \quad \mathcal{A}^{Luft} = \epsilon_C c / \epsilon_H c_H^P$

Nur Gleichung (3.10) stellt eine Möglichkeit dar, eine Konzentrationskurve zur Kalibrierung unabhängig von den Schichtdicken zu erstellen.

Anzumerken ist: (3.9a) kann ausgedrückt werden als

$$(3.11) \quad \mathcal{A} = \mathcal{A}^{\text{Luft}} / [1 - (c_{\text{H}}^{\text{R}} / c_{\text{H}}^{\text{P}}) (d_{\text{R}} / d_{\text{P}})]$$

Bei entsprechend niedrigeren Mischungsverhältnissen bzw. bei einer Extrapolation auf eine Cyclodextrin-Konzentration gleich null war die Konzentration des Wassers in beiden Zellen gleich (also $c_{\text{H}}^{\text{P}} = c_{\text{H}}^{\text{R}} = 55,5 \text{ mol/L}$) und es folgt aus (3.11):

$$(3.11a) \quad \lim_{c \rightarrow 0} (\mathcal{A}^{\text{Luft}} / \mathcal{A}) = 1 - (d_{\text{R}} / d_{\text{P}})$$

Somit stand eine weitere experimentelle Größe für die Bestimmung der Weglängen zur Verfügung. Die Auswertung hierzu wird in Kapitel 4 folgen.

3.3 Messvorhaben

3.3.1 Probenauswahl und -vorbereitung

Die Proben der methylierten Cyclodextrine TRIMEG, TRIMEB und DIMEB (Tabelle 3-3) wurden ohne weitere Behandlung als wässrige Lösungen angesetzt, indem zu einer eingewogenen Menge des Zuckers einige Mikroliter Millipore-Wasser zugefügt wurden. Für Zwecke der Kalibrierung wurden Eichkolben (1 mL) benutzt. Durch Verdünnung ergaben sich Lösungen von 250 mg/mL bis 50 mg/mL. Alle Lösungen wurden versiegelt bei Kühlschranktemperatur verwahrt.

Die Lösungen mit γ - und β -Cyclodextrin wurden in der selben Weise angesetzt. Allerdings war für β -Cyclodextrin wegen der geringen Sättigungskonzentration von 18.5 mg/mL kein vergleichbarer Konzentrationsbereich für die gewählte Zellenkombination möglich.

D-Glukose und das vierfach methylierte Derivat Tetramethylglukose waren jeweils gut wasserlöslich. Von Glukose wurde eine gesättigte Lösung hergestellt, die zentrifugiert wurde und deren gefilterter (0.1 μ m Poren) Überstand für die Messung verwendbar war. Die wässrigen Lösungen von Tetramethylglukose wurden wie für Cyclodextrin angesetzt.

Auch $MgCl_2$ wurde als gesättigte Lösung (4.5 mol/L) und in Verdünnung (1 mol/L) gemessen. Dimethylsulfoxid konnte sowohl unverdünnt, also wasserfrei, als auch als 50 % (v/v) und 25 % (v/v) wässrige Lösung untersucht werden.

Methyl-, Dimethyl- und Trimethylamin waren als stark basische Wasserlösungen (pH 12, 40 % Gewichtsanteil) geliefert worden, die sich nicht ohne Luftblasen in die Zellen füllen ließen. Alle Aminlösungen wurden daher mit HCl auf pH 8 bis pH 8.5 titriert. Zusätzlich wurden noch Ammoniumchlorid-Lösungen aus NH_4Cl -Salz hergestellt und auf pH 4 bzw. pH 8.5 titriert.

Für die KBr-Messungen wurden die Substanzen (rund 1 mg Probe) ohne weitere Behandlung mit 250 mg KBr zu einem Pellet gepresst (Pressdruck 100 kN). Hierfür wurde die möglichst trockene Probe zuerst zusammen mit KBr in einem Mörser verrieben und anschließend in einer hydraulischen Presse zu einem klaren Pellet (\varnothing ca. 10 mm) gepresst. Die Messungen erfolgten mit einem Nicolet Spektrometer Modell 55XC in Transmission bei Raumtemperatur (Dr. Wolf-Dietrich Hunnius, FU Berlin).

3.3.2 Übersicht der untersuchten Verbindungen

Probe (Nomenklatur)	Formel	Molekül- masse in g M _R	Löslichkeit in g/100 mL H ₂ O ³⁾	Liefe- rant ⁴⁾	Bem.
TRIMEG (Octakis (2,3,6-tri-O- methyl)- γ -Cyclodextrin)	C ₇₂ H ₁₂₈ O ₄₀	1634	48 (RT) ¹⁾	Cyclolab ⁱ⁾	
γ -Cyclodextrin	C ₄₈ H ₈₀ O ₄₀		23.2 ²⁾	Fluka ⁱⁱ⁾	CA 8
TRIMEB (Heptakis (2,3,6-tri-O- methyl)- β -Cyclodextrin)	C ₆₃ H ₁₁₂ O ₃₅	1430	31 (RT) ¹⁾	Cyclolab	
DIMEB (Heptakis (2,6-di-O- methyl)- β -Cyclodextrin)	C ₅₆ H ₉₈ O ₃₅	1331	57 (RT) ¹⁾	Cyclolab	
β -Cyclodextrin	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅	1135	1.85 (RT) ²⁾	Fluka	CA 7
D-(+)-Glukose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.2	120 (30 °C) ³⁾	Sigma- Aldrich ⁱⁱⁱ⁾	Dextrose
Tetramethylglukose (2,3,4,6-Tetra-O-Methyl-D- Glucose)	C ₁₀ H ₂₀ O ₆	236.3	?	ICN ^{iv)}	
MgCl ₂	MgCl ₂	203.3		Merck ^{v)}	
DMSO (Dimethylsulfoxid)	C ₂ H ₆ SO	78.14 (anhydr.)		Sigma- Aldrich	Schmelzpunkt 18.55 °C ⁴⁾
Amine:					Alle Amine :
Trimethylamin	(CH ₃) ₃ N	59.11		Sigma- Aldrich	Gasförmig
Dimethylamin	(CH ₃) ₂ NH	45.09			> 4 °C ⁵⁾
Methylamin	CH ₃ NH ₂	31.06			(geliefert als 40% wässrige Lösung)
Ammoniumchlorid	NH ₄ Cl	53.49	37.2(20 °C) ⁶⁾		Salmiak

Tabelle 3-3 : Liste der untersuchten Verbindungen

³⁾ Löslichkeiten und Daten : 1) (Uekama und Irie 1987), 2) (Saenger *et al.* 1998), 3) (Kaltofen 1982), 4) Merck Index (12), No. 3308 (1999), 5) Merck Index (12), No. 9841 (1999), 6) (Römpp 1997);

⁴⁾ Lieferanten: i) Cyclolab R&D Lab. Ltd. H-1525 Budapest, ii) Fluka Chemie GmbH, iii) Sigma-Aldrich Chemie GmbH D-Steinheim, iv) ICN Biomedicals Inc. USA-Aurora, Ohio, v) Merck KGaA D-Darmstadt

