



---

***VERSUCH:  
UV/VIS-SPEKTROMETRIE  
MULTIKOMPONENTENANALYSE***



---

# 1 Versuch UV/VIS-Spektrometrie

## 1.1 Theoretische Grundlagen

Die UV/VIS-Spektrometrie ist eine optische Spektrometrie, bei der Elektronen von Atomen oder Molekülen durch elektromagnetische Strahlung angeregt werden. Die elektromagnetische Strahlung, die zur Anregung führt, läßt sich in zwei Wellenlängenbereiche trennen,

- den UV-Bereich von 200 - 380 nm Wellenlänge (Ultraviolett),
- den sichtbaren Bereich von 380 - 780 nm Wellenlänge (Visible).

Die zur Anregung der Elektronen notwendige Energie liegt im Bereich von wenigen eV. Diese Energie wird der einfallenden Strahlung entnommen, die dadurch geschwächt wird. Die UV/VIS-Spektrometrie ist daher Absorptionsspektrometrie.

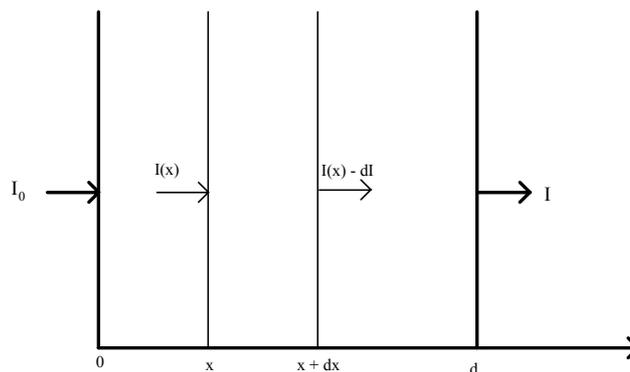
### 1.1.1 Lambert-Beersches Gesetz

Läßt man monochromatisches Licht auf ein homogenes isotropes Medium der Schichtdicke  $d$  fallen, so wird ein Bruchteil der Strahlung reflektiert, während der Rest - hier mit der Intensität  $I_0$  bezeichnet - in das Medium eindringt. Bleibt die Strahlungsintensität  $I_0$  beim Durchgang unverändert, so spricht man von einem "durchlässigen Medium". Wird die Strahlungsintensität geringer, so sind zwei Ursachen möglich:

- Das Licht wird teilweise absorbiert. Dabei wird es von der Materie in eine andere Energieformen umgewandelt (z.B. in längerwelliges Licht oder Wärme).
- Das Licht wird teilweise gestreut (z.B. an Schwebstoffen in der Lösung oder Staubteilchen in der Luft).

Absorption und Streuung werden zusammen als Extinktion (= Auslöschung) bezeichnet.

In den folgenden Betrachtungen geht man davon aus, daß die Streuung vernachlässigbar klein ist und Reflexionsverluste apparativ korrigiert werden. In diesem Fall kann die Extinktion gleich der Absorption durch das interessierende Medium gesetzt werden.



$I_0$  = eintretende Intensität bei der Schichtdicke  $x = 0$

$I$  = austretende Intensität bei der Schichtdicke  $x = d$

$d$  = Schichtdicke des Mediums



Wenn die eintretende Strahlung  $I_0$  sich in Richtung  $x$  ausbreitet, so kommt es mit zunehmender Weglänge durch das Medium zu einer Intensitätsabnahme. Um die verbleibende Intensität  $I$  an der Stelle  $d$  zu bestimmen, wobei  $d$  z.B. die Dicke einer Küvette ist, wird die Intensitätsänderung in einem infinitesimal kleinen Längenelement  $dx$  betrachtet. Die Abnahme der Intensität pro Längeneinheit  $\frac{dI}{dx}$  ist proportional zum vorhandenen Wert der Intensität  $I(x)$  an der Stelle  $x$ . Die Proportionalitätskonstante  $k$  wird als Absorptionskoeffizient bezeichnet.

$$- \frac{dI}{dx} = k I(x).$$

Diese homogene lineare Differenzialgleichung 1. Ordnung läßt sich durch Trennung der Variablen lösen

$$- \int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = \int_0^d k dx$$

Die Integration zwischen  $I_0$  und  $I$  bzw. zwischen 0 und  $d$  liefert

$$\ln \frac{I_0}{I} = k d.$$

Meist schreibt man die Gleichung in dekadische Logarithmen um und erhält so das Bouger-Lambertsche Gesetz

$$\log_{10} \frac{I_0}{I} = \alpha d.$$

$T = I/I_0 =$  Transmissionsvermögen

$\log_{10}(1/T) =$  (dekadisches) Absorptionsvermögen oder Extinktion

$\alpha =$  linearer dekadischer Absorptionskoeffizient

Der lineare dekadische Absorptionskoeffizient  $\alpha$  ist eine stoff- und wellenlängenabhängige Größe.

A. Beer erkannte 1852, daß die Absorption längst des Weges  $x$  nur von der Gesamtzahl der im Strahlengang befindlichen absorbierenden Teilchen abhängt. Für eine Lösung, deren Lösungsmittel völlig durchlässig ist und in der ausschließlich ein Stoff der Konzentration  $c$  absorbiert, ersetzt man  $\alpha$  durch  $\epsilon * c$  und erhält das Lambert-Beersche Gesetz

$$\log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon c d$$

oder

$$A = E = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon c d.$$



---

Der Ausdruck  $\log_{10} \frac{I_0}{I}$  wird als Extinktion E oder Absorption A bezeichnet. In älterer Literatur wird auch der Begriff optische Dichte OD verwendet. Der molare dekadische Absorptionskoeffizient  $\varepsilon$  ist eine stoff- und wellenlängenabhängige Größe.

Die Extinktion ist, von Ausnahmen abgesehen, eine additive Eigenschaft. Für n absorbierende Spezies gilt demgemäß:

$$E_{ges.} = \log_{10} \frac{I_0}{I} = d \sum_{i=1}^n \varepsilon_i c_i.$$

Das Lambert-Beersche Gesetz gilt strenggenommen nur, wenn:

- die absorbierenden Stoffe keine Wechselwirkung aufeinander ausüben, d.h. die Lösung hinreichend verdünnt ist,
- es beim Lösungsvorgang zu keiner chemischen Veränderung und damit zu keiner Konzentrationsänderung der absorbierenden Stoffe kommt,
- die absorbierenden Stoffe statistisch gleichmäßig verteilt sind.

### **1.1.2 Multikomponentenanalyse**

Liegt ein Substanzgemisch in einer Lösung vor, so lassen sich durch Messung bei einer Wellenlänge  $\lambda$  die Konzentrationen  $c_i$  der einzelnen Substanzen i nicht bestimmen. Deshalb wird bei dem hier verwendeten Spektrometer die Spektralinformation des gesamten UV/VIS-Spektrums zur Konzentrationsbestimmung benutzt. Dazu ändert man die Wellenlänge  $\lambda$  der einfallenden UV/VIS-Strahlung kontinuierlich, d.h. man "scannt" den gesamten UV/VIS-Spektralbereich durch, und mißt die Extinktion. Das Lambert-Beersche Gesetz gilt dann für jede Wellenlänge  $\lambda_j$ . Man erhält so folgendes lineares Gleichungssystem:

$$E_{ges}(\lambda_1)/d = c_1 \cdot \varepsilon_1(\lambda_1) + c_2 \cdot \varepsilon_2(\lambda_1) + \dots$$

$$E_{ges}(\lambda_2)/d = c_1 \cdot \varepsilon_1(\lambda_2) + c_2 \cdot \varepsilon_2(\lambda_2) + \dots$$

.....

Mit der UV/VIS-Spektrometrie können bei bekannten  $\varepsilon_i(\lambda)$  die Konzentrationen  $c_i$  in einer Meßlösung durch Lösung des linearen Gleichungssystems ermittelt werden. Weil hier sehr viele Wellenlängen benutzt werden, sind auf jeden Fall ausreichend linear unabhängige Gleichungen vorhanden, die man für die Bestimmung der unbekannt Konzentrationen  $c_i$  einiger weniger Substanzen (z.B. vier, siehe Versuchsdurchführung) benötigt. Das Auswertprogramm findet durch numerische Variation der Konzentrationen  $c_i$  diejenigen Werte der Konzentrationen  $c_i$ , bei denen das gemessene Spektrum am besten mit dem nach obigem Gleichungssystem berechneten Spektrum übereinstimmt.

Für die Bestimmung der  $\varepsilon_i(\lambda)$  werden Referenzmessungen mit Lösungen unterschiedlicher Zusammensetzung durchgeführt. Diese Referenzlösungen müssen alle Substanzen enthalten, die auch in der Meßlösung vorhanden sind. Dabei müssen die gewählten Konzentrationsbereiche die Konzentration der Meßlösung überdecken. Da bei den Referenzlösungen die Konzentrationen  $c_i$  bekannt sind, können nach obigem Gleichungssystem die  $\varepsilon_i(\lambda)$  berechnet werden. Je mehr Referenzmessungen durchgeführt werden, desto genauer wird die Bestimmung der  $\varepsilon_i(\lambda)$ . Für den hier durchzuführenden Versuch sind die Referenzmessungen bereits durchgeführt worden; die Ergebnisse sind gespeichert und stehen im Computer zur Verfügung.

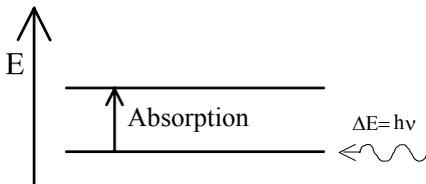


Eine Multikomponentenanalyse kann nur erfolgreich durchgeführt werden, wenn die Methode folgende Voraussetzungen erfüllt:

1. Jede Einzelverbindung muß für jede gemessene Wellenlänge das Lambert-Beersche Gesetz erfüllen. Der Zusammenhang zwischen Konzentration und Extinktion muß streng linear sein.
2. Die „Einzelextinktionen“ aller Komponenten müssen sich in der Mischung addieren. Die Extinktion der Mischungen darf den linearen Bereich nicht übersteigen. Es darf nicht zu molekularen Wechselwirkungen kommen die sich auf die Extinktion der Einzelkomponenten auswirken.
3. In der Mischung müssen alle Komponenten bekannt sein. Es dürfen in der Mischung keine unbekanntes Verunreinigungen oder Reaktionsprodukte enthalten sein.
4. Die Zahl der gemessenen Wellenlängen muß mindestens so groß sein wie die Zahl der enthaltenen Komponenten. (Zur Fehlerkompensation sollten jedoch mehr Wellenlängen verwendet werden.)
5. Es müssen mindestens so viele Standardmischungen verwendet werden, wie Komponenten im Gemisch vorhanden sind. (Um statistische Fehler zu kompensieren sollten jedoch mehr Standardmischungen verwendet werden).

### 1.1.3 Das UV/VIS-Spektrum

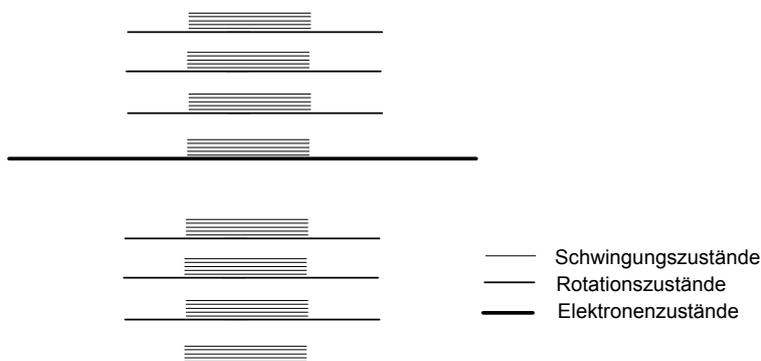
Wie aus der Quantenmechanik bekannt ist, können die Elektronen in Atomen oder Molekülen nur diskrete Energiewerte annehmen; d.h. die Energieeigenwerte sind gequantelt. Trifft Licht mit geeigneter Frequenz  $\nu$  auf ein Atom oder Molekül, dann kann es absorbiert werden und das Molekül in einen energetisch höheren Zustand versetzen. Die eingestrahlte Energie  $h\nu$  muß dabei genau dem energetischen Abstand der beiden beteiligten Niveaus entsprechen.



Bei freien Atomen ist die exakte Lage der Energieniveaus von der Kernladungszahl und der Anzahl der an das Atom gebundenen Elektronen abhängig. Die Übergänge zwischen einzelnen Niveaus können spektroskopisch als einzelne, diskrete Linien aufgelöst werden.

Bei Molekülen können die beteiligten Atome ihren gegenseitigen Abstand ändern, d.h. schwingen, und das ganze Molekül kann sich drehen. Dies führt zu zusätzlichen Energiezuständen. Die charakteristischen Energien für die Elektronen-, Schwingungs- und Rotationsanregung verhalten sich in etwa wie 10.000 : 100 : 1. Wird also von einem Molekül Licht absorbiert, dessen Energie für eine elektronische Anregung ausreicht, so erwartet man, daß gleichzeitig Schwingungen und Rotationen angeregt werden. Da zu jedem elektronischen Zustand ca. 30 - 50 Schwingungszustände gehören, von denen jeder eine große Anzahl von Rotationszuständen aufweist, ist eine Vielzahl von Übergängen möglich, die zu komplizierten Spektren führen.

Prinzipiskizze:





---

In kondensierter Phase bestehen aufgrund des geringen Abstandes zusätzlich Wechselwirkungen zwischen den Teilchen. Dies führt zu einer zusätzlichen, nicht mehr auflösbaren "Verbreiterung" der Linien im Spektrum. Im Absorptionsspektrum ist deshalb nur noch die nichtaufgelöste Umhüllende der Linien als breitbandiges Signal sichtbar.

Aus den in den meisten Fällen wenig charakteristischen UV/VIS-Spektren kann man kaum Information über die Identität der untersuchten Substanzen, ihre Struktur bzw. Bindungen im Molekül erhalten. Die UV/VIS-Spektrometrie bietet jedoch wie kaum eine andere Spektrometrieart die Möglichkeit, Substanzmengen quantitativ zu bestimmen, weil das Lambert-Beersche Gesetz im Normalfall gültig ist.

## **1.2 Aufbau und Handhabung des Spektrometers Lambda 12**

### **1.2.1 Der Aufbau des Spektrometers Lambda 12**

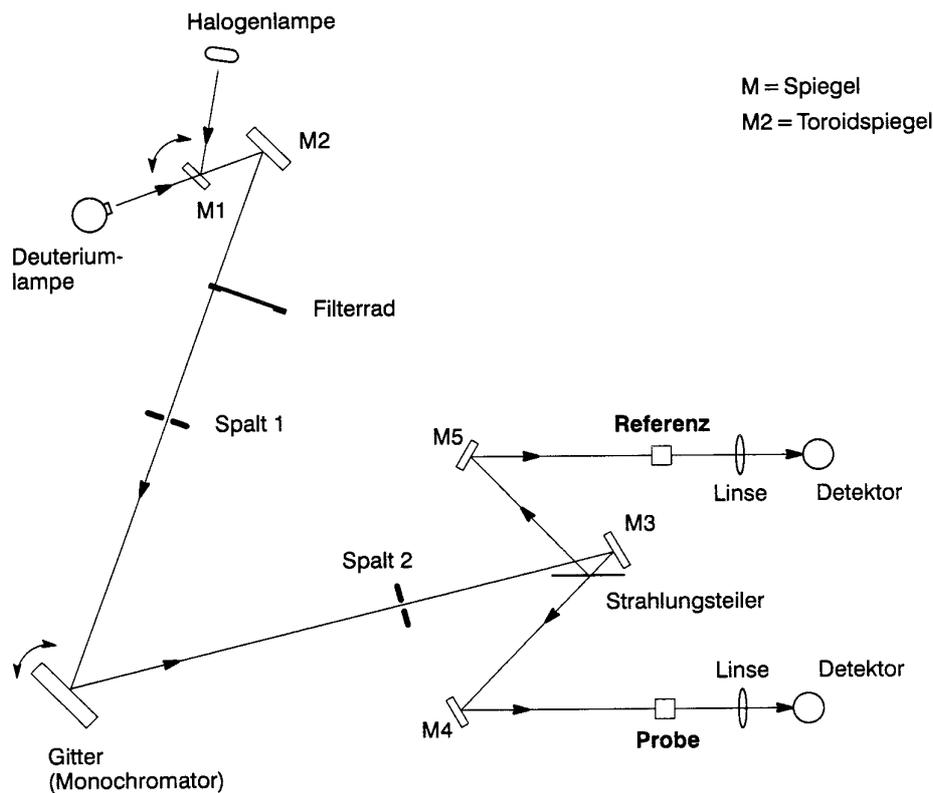
Das UV/VIS-Spektrometer Lambda 12 arbeitet mit einem reflektierenden optischen System. Die optischen Komponenten sind zur besseren Haltbarkeit mit Quarz beschichtet. Das nächste Bild zeigt eine schematische Darstellung des optischen Systems und des Strahlengangs.

Zwei Strahlungsquellen decken den Arbeitsbereich des Spektrometers ab: eine Deuteriumlampe und eine Halogenlampe. Bei Arbeiten im sichtbaren Bereich (VIS) reflektiert Spiegel M1 das Licht der Halogenlampe auf Spiegel M2. Gleichzeitig unterbricht M1 den Strahlengang der Deuteriumlampe. Bei Arbeiten im ultravioletten Bereich (UV) wird Spiegel M1 angehoben, so daß die Strahlung der Deuteriumlampe auf Spiegel M2 treffen kann. Das Umschalten zwischen den Strahlungsquellen erfolgt automatisch und synchron mit der Monochromatordrehung.

Spiegel M2 reflektiert die Strahlung auf das Filtrerrad. Ein Schrittmotor dreht das Filtrerrad synchron zum Monochromator. Damit wird die Strahlung abhängig von der Wellenlänge vorgefiltert. Das Umschalten auf einen anderen Filter erfolgt automatisch.

Nach dem Filter trifft die Strahlung auf den Eintrittsspalt (Spalt 1) und von dort auf das Gitter im Monochromator. Dieses ist ein holographisches Gitter mit 1053 Linien/mm im Zentrum. Die Strahlung wird am Gitter gebeugt und in ein Spektrum zerlegt. Die gewünschte Wellenlänge wird durch Drehen des Gitters auf den Austrittsspalt (Spalt 2) projiziert und trifft danach auf den Spiegel M3. Der Austrittsspalt liefert eine nahezu monochromatische Strahlung. Die Spalte erzeugen eine spektrale Bandbreite von 1 nm.

Spiegel M3 reflektiert die Strahlung auf den Strahlungsteiler. Der Strahlungsteiler läßt 50% der Strahlungsenergie auf Spiegel M4 passieren. Die anderen 50% werden auf Spiegel M5 reflektiert. Spiegel M4 bildet den Probenstrahl. Von dort wird die Strahlung in die Probenküvette fokussiert und fällt dann schließlich auf eine Linse und von dort auf den Photodioden-Detektor. Spiegel M5 bildet den Referenzstrahl. Von dort wird die Strahlung in die Referenzküvette fokussiert und fällt dann schließlich auf eine Linse und von dort auf den Photodioden-Detektor.



### **1.2.2 Technische Daten des Spektrometers Lambda 12**

Typ: registrierendes Zweistrahlenspektrometer für den UV/VIS-Bereich mit Mikroprozessor und Tastatur.

Netzanschluß: 100 bis 240 V AC, 50/60 Hz, 300 VA

Umgebungstemperatur: 15 °C bis 35 °C

Luftfeuchtigkeit: 20 % bis 80 % relative Feuchte ohne Kondensation

#### **Optik**

Strahlquerschnitt: 1 nm Spalt: ca. 0,6 mm x 9 mm (Breite x Höhe) Zentrumshöhe: 15 mm über dem Boden des Küvettenschachtes

Gitter: Holographisches Gitter mit 1053 Linien/mm im Zentrum

Strahlungsquellen vorjustierte Deuterium - und Halogenlampe

#### **Abszisse**

Wellenlängenbereich: 190 nm bis 1100 nm

Richtigkeit: +/-0,3 nm

Reproduzierbarkeit: +/-0,1 nm

Spektrale Bandbreite: 1 nm (Festspalt)

Lampenumschaltzeitpunkt: automatisch bei 326 nm

Registriereschwindigkeit: 7,5, 15, 30, 60, 120, 240, 480, 960, 1920 und 2880 nm/min

#### **Ordinate**

##### **Photometrische Daten:**

Bereich:

Transmission: 0% bis 100%

Extinktion: -6,000 bis +6,000 (Anzeigenbereich)

Konzentrationseinheiten: 1 bis 9999

Genauigkeit: Extinktion +/-0,003 (bei Absorbance = 1 und 440nm, 546,1nm und 635nm gemessen mit NIST-930-Filtern)

Streulicht: Transmission: < 0,02% (bei 220nm, 340nm und 370nm)



---

**Basislinie**

Linearität: (1 nm Spalt) Extinktion:  $\pm 0,001$  (korrigiert, 200nm-1100nm, Registriergeschwindigkeit 240 nm/min, Glättung 2)

Rauschen: (1 nm Spalt) Extinktion  $< 0,00008$  RMS Extinktion  $< 0,0003$  Peak-Peak (3 min bei  $A=0$  und 500 nm; RMS = quadratischer Mittelwert)

Stabilität (Drift): Extinktion  $< 0,0003/h$  (gemessen bei 500 nm, nach Vorwärmzeit)

**Methoden**

Typen: zeitabhängige Messung, Spektrenaufnahme, Wellenlängenprogramm, Konzentrationsbestimmung mit Faktor oder Kalibrierkurve

Anwendungen: vorprogrammierte Methoden für biochemische Analysen

**Datenausgabe****Schnittstellen:**

eine serielle RS-232-Schnittstelle zum Anschluß eines Druckers oder PC

**Anzeige:**

40stellige, alphanumerische Vakuumfluoreszenzanzeige für Parameter, Ergebnisse und Benutzerinformationen



---

---

### **1.2.3 Über den Umgang mit Küvetten**

#### **1.2.3.1 Allgemeines**

Eine gute Küvette ist ein optisches Element und Teil des optischen Systems des benutzten Spektrometers. Eine Küvette muß daher mit derselben Sorgfalt wie jedes andere optische Bauteil behandelt werden. Schon geringe optische Defekte und Störungen wie Kratzer, Fingerabdrücke, Fussel usw. können leicht analytische Fehlmessungen verursachen.

Daher sind folgende Punkte zu beachten, um systematische Fehler zu vermeiden:

1. Küvetten immer nur an den matten, d. h. nicht optisch aktiven Flächen anfassen.
2. Kratzer auf den Küvetten vermeiden; niemals Küvetten aneinander oder an harten Oberflächen reiben lassen.
3. Schmirgelnde, korrosive oder fleckenverursachende Reinigungsmittel vermeiden. Die durchstrahlten Flächen optisch sauber halten
4. Die optischen Flächen mit einem weichen Tuch oder Papiertuch trockenwischen und Fingerabdrücke beseitigen, bevor die Küvette in den Halter gesetzt wird.
5. Bei Messungen kalter Lösungen ( $\ll$  Raumtemperatur) kann sich Kondenswasser auf den optischen Flächen der Küvette niederschlagen.
6. Sicherstellen, daß keine Gasblasen in der Küvette vorhanden sind, insbesondere bei kalten Lösungen.
7. Um maximale Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Analyse zu erreichen, für Blindwert, Bezugslösung und Messung immer dieselbe Küvette benutzen.
8. Die Küvetten immer in derselben Ausrichtung in Bezug auf die Strahlungsquelle in den Halter einsetzen (z.B. die Küvettenbeschriftung immer in Richtung Strahlungsquelle).

#### **1.2.3.2 Das Füllen der Küvetten mit Lösungen**

1. Um eine Verschleppung zu vermeiden ist die Küvette vor dem Füllen mindestens 4x mit der zu untersuchenden Lösung vorzuspülen. Beim Wechsel der Lösungen ist ein Zwischenspülen mit destilliertem Wasser meist nicht erforderlich.
2. Die Küvetten bis etwa 0,5 cm unter den Rand füllen.
3. Küvette auf außen anhaftende Flüssigkeit und Fussel kontrollieren und - falls nötig - mit einem weichen Papiertuch abwischen.

#### **1.2.3.3 Weitere Fehlerquellen bei photometrischen Messungen**

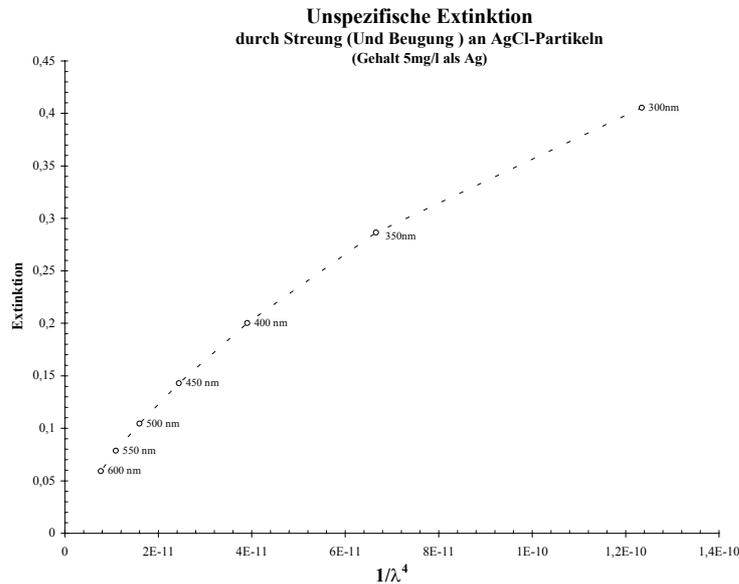
Trübungen (verursacht durch Feststoffsuspensionen oder Emulsionen) der zu vermessenden Lösungen verursachen durch Streuung und Beugung eine unspezifische Extinktion. Die unspezifische Extinktion durch Streuung ist näherungsweise

proportional zu  $\frac{1}{\lambda^4}$ . Daher ist vor allem bei kürzeren Wellenlängen auf Trübungsfreiheit der Lösungen zu achten. In einigen

Sonderfällen können Trübungen jedoch analytisch verwendet werden, wenn andere absorbierende Substanzen ausgeschlossen werden können oder deren Gehalt bekannt ist. Zum Beispiel kann der Zellgehalt von Zellsuspensionen durch Trübungsmessung bestimmt werden.



Das Diagramm zeigt, daß schon bei geringsten Partikelmengen von wenigen mg/l (In Abhängigkeit von Wellenlänge und Partikelgröße) beträchtliche unspezifische Extinktionswerte auftreten können.



## 1.2.4 Ein und Ausschalten des Systems

### 1.2.4.1 Einschalten des Systems

1) Wichtig: Vor dem Einschalten des Systems am Spektrometer prüfen:

Proben und Referenzpositionen im Probenraum müssen frei sein. Probenzubehöre (Küvettenwechsler etc.) müssen korrekt installiert sein und dürfen die Strahlengänge nicht blockieren.

Sind Küvetten im Probenraum eingesetzt, dürfen sie keine absorbierenden Proben enthalten (absorbierende Proben können die automatische Wellenlängenkalibrierung stören).

2) Spektrometer einschalten.

3) Drucker und sonstige Peripheriegeräte einschalten, außer PC.

4) PC einschalten. PECSS-Programm wird automatisch gestartet

5) Meldung **Ready for next command** abwarten. Sobald diese Meldung erscheint, ist das System betriebsbereit.

Wichtig: Werden hohe Anforderungen an die Richtigkeit der Ergebnisse gestellt, ca. 30 Minuten warten, bis das Spektrometer Betriebstemperatur erreicht hat.

### 1.2.4.2 Ausschalten des Systems

Bei Arbeitsende das System ausschalten wie folgt:

1) Wichtige Meßdaten und Methoden speichern.

2) Alle Proben- und Referenzmaterialien aus dem Probenraum entfernen.

Wichtig: Wird ein Probenzubehör benutzt und bleiben Teile davon im Probenraum (Durchflußküvetten o.ä.), das Zubehör bei Arbeitsende reinigen. Generell sollten solche Zubehöre mit entionisiertem Wasser gefüllt werden, bevor sie ausgeschaltet werden.

3) PECSS verlassen mit dem Kommando **Stop**

4) Disketten aus den Laufwerken herausnehmen, in die Schutzhülle stecken und sicher aufbewahren.

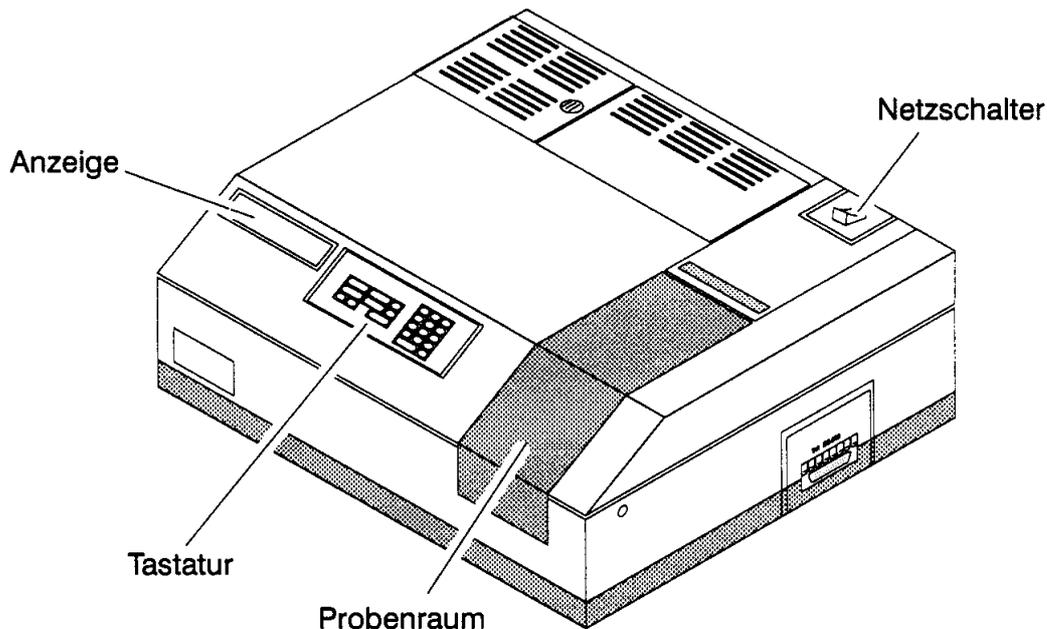
5) Spektrometer ausschalten.

6) PC ausschalten laut Betriebsanleitung.



Wichtig: PC niemals ausschalten, solange das PECSS-Programm läuft. Vor dem Ausschalten des PC zuerst das PECSS-Programm mit **Stop** beenden.

Bedienungselemente des  
Spektralphotometers Lambda 12



### **1.3 Durchführung des Versuchs:**

#### **Schmerzmittelanalyse mittels UV/VIS-Spektrometrie**

##### **1.3.1 Einschalten des Systems**

- Wie oben Beschrieben

##### **1.3.2 Herstellung der Lösungen**

Vor Beginn der Messungen müssen 2 Stammlösungen, 4 Einzelstandardlösungen, 2 Mischstandardlösungen und eine Thomapyrin-Schmerztablettenlösung angesetzt werden. **Als Lösungsmittel für alle Verdünnungen wird destilliertes Wasser benutzt.**

###### **1.3.2.1 Herstellung der Stammlösungen:**

**Acetylsalicylsäure-Stammlösung:**



---

100 mg Acetylsalicylsäure werden abgewogen und in ca. 20 ml destilliertem Wasser in einem Becherglas erwärmt bis sie sich gelöst haben. Anschließend läßt man die Lösung abkühlen, überführt sie in einen 100 ml Meßkolben, spült das Becherglas 4x mit wenig Wasser nach und füllt den Kolben bis zur Marke auf.



---

### **Paracetamol-Stammlösung:**

Herstellung wie die Acetylsalicylsäure-Stammlösung.

Die so hergestellten Stammlösungen haben eine Konzentration von 1 g/l. Die Stammlösungen von Coffein und Salicylsäure stehen aus und brauchen nicht neu angesetzt werden.

#### ***1.3.2.2 Herstellung der Standardlösungen:***

Von den Standardlösungen werden jeweils 100 ml benötigt. Dazu verdünnt man die Stammlösungen von Acetylsalicylsäure, Paracetamol, Coffein und Salicylsäure auf die folgenden Konzentrationen.

##### **Einzelstandard 1**

enthält: 10mg/l Acetylsalicylsäure

##### **Einzelstandard 2**

enthält: 10mg/l Paracetamol

##### **Einzelstandard 3**

enthält: 2mg/l Coffein

##### **Einzelstandard 4**

enthält: 1 mg/l Salicylsäure

##### **Mischstandard I**

Dieser Mischstandard entspricht dem Verhältnis der Schmerzmittelkomponenten in der Thomapyrintablette (gemäß Herstellerangaben):

12,5 mg/l Acetylsalicylsäure

10 mg/l Paracetamol

2,5 mg/l Coffein

1 mg/l Salicylsäure

- **Mischstandard II:** Die Zusammensetzung des Mischstandards II ist in den folgenden Grenzen frei wählbar. Sie sollte sich jedoch deutlich von der Zusammensetzung des Mischstandards I unterscheiden.

Grenzen:

12,5 ± 6 mg/l Acetylsalicylsäure

10 ± 5 mg/l Paracetamol

2,5 ± 1,25 mg/l Coffein

1 ± 1 mg/l Salicylsäure

#### ***1.3.2.3 Herstellung der Tablettenlösung:***

1. Eine Thomapyrin-Tablette wird in ein Becherglas eingewogen und mit ca. 20 ml destilliertem Wasser unter Rühren aufgekocht. Die Lösung wird mindestens 5 Minuten warm gehalten und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Man überführt sie komplett in einen 100 ml Meßkolben und wäscht das Becherglas 4x mit wenig Wasser nach. Der Meßkolben wird bis zur Marke aufgefüllt.
2. Von der erhaltenen Lösung werden einige ml entnommen und zum Abtrennen der Bindemittelteilchen zentrifugiert (5min bei 4000 min<sup>-1</sup>) (**gefüllte Zentrifugengläser nur zu 2/3 füllen und vorher zur Vermeidung von Unwuchten auf gleiches Gewicht bringen!**).



3. Der **klare** Überstand wird für die weitere Verdünnung auf die Arbeitskonzentration von 25 mg/l Gesamtwirkstoff ( $c_{\text{Acetylsalicylsäure}} + c_{\text{Paracetamol}} + c_{\text{Coffein}} = 25 \text{ mg/l}$ ) verwendet.

### 1.3.3 Aufnahme der Absorptionsspektren der hergestellten Lösungen

#### 1.3.3.1 Vorbereiten des Spektrometers

Am Rechner **Scan** ↵ eingeben. Danach erscheint folgender Bildschirm. Sollten die Aufnahmeparameter verstellt worden sein, so sind sie wie im unteren Bild einzustellen. Nach Korrektur der Scan-Parameter mit ↵ bestätigen.

```
SCAN
reg start 375.0 end 200.0 int 1.0 nycl 1
----- Instrument parameters -----
ord speed 60.0 smooth 0.00 lamps 1 rec 1
----- Accessory -----
----- Output -----
sample id probe1 ymin 0.100 ymax 2.000 asave 1 aprint 1
info
Information text
```

#### 1. Nullabgleich

Beide Küvetten wie oben beschrieben mit reinem Lösungsmittel befüllen und in die Küvettenhalterungen im Probenraum stellen. Am Rechner mit **A (Für (A)utozero/Backgroundcorrection)** die Messung auslösen. Warten bis die Messung beendet wurde (Erkennbar am Signalton des Geräts).

#### 2. Aufnahme der Spektren

Die (vordere) Probenküvette entnehmen und mit Probe bzw. Standardlösung befüllen (4-maliges Vorspülen der Küvette mit der betreffenden Lösung nicht vergessen!). Küvette wieder in die Halterung einsetzen. Nach eventueller Korrektur des Probenamens Messung durch drücken der **Y-Taste ((Y)es)** starten. (Es empfiehlt sich an den Namen eine Zahl anzuhängen (z.B. Probe ...), da das Programm dann automatisch hochzählt (Probe1, Probe2, ...), so daß ein versehentliches Überschreiben früherer Messungen unwahrscheinlich wird.)

Der Bildschirminhalt d.h. die Spektren können mit der Taste „**Druck**“ ausgedruckt werden

#### 1.3.3.2 Multikomponentenanalyse

Wurden die Spektren aller Lösungen aufgenommen und gespeichert, führt man die Multikomponentenanalyse wie folgt durch:

1. Mit der Taste „**Esc**“ das Scanprogramm verlassen bis im unteren Bildschirmbereich die Meldung „**Ready for next command**“ erscheint.
2. Software zur Multikomponentenanalyse mit Eingabe von „**Mult** ↵“ aufrufen. Es erscheint im unteren Bildschirmbereich folgendes Eingabefeld

**Mult spectrum**  **factor** 1.0000 **method**

3. Im Feld **Spectrum** den Namen des zu analysierenden Spektrums eingeben und im Feld **Method** „FHM1“ eingeben.
4. Ergebnisse durch Taste „**Druck**“ ausdrucken.
5. Den Vorgang mit den anderen Spektren wiederholen.



---

### 1.3.3.3 Kalibrationsdatensatz der Methode FHM1

Als Kalibrationsdatensatz (zur Erstellung des linearen Gleichungssystems) wurden die Absorptionsspektren folgenden Standardgemische aufgenommen. Der Hydrolysegrad der Acetylsalicylsäure wurde mittels HPLC gesondert bestimmt und bei den Acetylsalicylsäure- und Salicylsäuregehalten berücksichtigt.

|            | Acetylsalicylsäure | Paracetamol | Coffein   | Salicylsäure |
|------------|--------------------|-------------|-----------|--------------|
| Standard1  | 11,91 mg/l         | 10,00 mg/l  | 2,50 mg/l | 0,83 mg/l    |
| Standard2  | 16,68 mg/l         | 15,00 mg/l  | 3,75 mg/l | 1,20 mg/l    |
| Standard3  | 6,20 mg/l          | 5,00 mg/l   | 1,25 mg/l | 0,23 mg/l    |
| Standard4  | 6,67 mg/l          | 14,00 mg/l  | 2,00 mg/l | 0,85 mg/l    |
| Standard5  | 10,48 mg/l         | 13,00 mg/l  | 1,30 mg/l | 0,89 mg/l    |
| Standard6  | 15,25 mg/l         | 6,00 mg/l   | 4,00 mg/l | 0,775 mg/l   |
| Standard7  | 7,63 mg/l          | 9,00 mg/l   | 1,00 mg/l | 0,69 mg/l    |
| Standard8  | 12,39 mg/l         | 7,00 mg/l   | 3,00 mg/l | 0,57 mg/l    |
| Standard9  | 16,20 mg/l         | 8,00 mg/l   | 3,50 mg/l | 1,01 mg/l    |
| Standard10 | 11,44 mg/l         | 11,00 mg/l  | 1,50 mg/l | 0,43 mg/l    |
| Standard11 | 8,58 mg/l          | 12,00 mg/l  | 1,40 mg/l | 0,62 mg/l    |
| Standard12 | 13,34 mg/l         | 5,50 mg/l   | 3,80 mg/l | 0,057 mg/l   |
| Standard13 | 7,15 mg/l          | 14,50 mg/l  | 0,50 mg/l | 0,82 mg/l    |
| Standard14 | 15,73 mg/l         | 6,50 mg/l   | 3,30 mg/l | 0,71 mg/l    |
| Standard15 | 8,10 mg/l          | 13,50 mg/l  | 1,35 mg/l | 0,77 mg/l    |

### 1.3.4 Ausschalten des Geräts

Gerät ausschalten wie oben beschrieben



---

## **1.4 Hinweise zur Auswertung**

### **Folgende Aufgaben sind zu bearbeiten:**

- a) Beschreiben Sie mit eigenen Worten das von ihnen hier angewendete Verfahren.
- b) Dokumentieren Sie die verwendete Probenvorbereitung
- c) Berechnen Sie die Menge jeder Komponente in Ihrer Schmerztablette. Korrigieren Sie den ASS-Gehalt mit Hilfe des Salicylsäuregehaltes.
- d) Wie die folgenden Diagramme zeigen, findet man mit der Methode FHM1 bei Salicylsäure Coffein und Paracetamol zuwenig, während man bei der Bestimmung der ASS einen etwas höheren Gehalt findet. Der Fehler wirkt sich bei geringen Konzentrationen mehr aus als bei höheren Konzentration. Korrigieren Sie die Ergebnisse von Teil a) mit Hilfe der folgenden Diagramme.
- e) Berechnen Sie den prozentualen Anteil der Bindemittel in der Schmerztablette.
- f) Berechnen Sie für die Standardlösungen die Abweichungen der gemessenen/berechneten Konzentrationen der Schmerzmittelkomponenten von den eingewogenen Konzentrationen. Vergleichen Sie die Ergebnisse der Einzelstandardlösungen mit den Ergebnissen der Mischstandardlösungen.  
Berücksichtigen Sie bei den Berechnungen, daß Acetylsalicylsäure in Wasser hydrolysiert und dabei Salicylsäure bildet (siehe Versuchsanleitung HPLC).
- g) Vergleichen Sie die Substanzgehalte Ihrer Tablette (aus c) bzw. d)) mit den Angaben des Herstellers.
- h) Vergleichen Sie die Ergebnisse der beiden angewendeten Verfahren HPLC und UV/VIS-Spektrometrie.
- i) Arbeiten Sie die Vor- und Nachteile der beiden Methoden heraus.
- j) Unter welchen Voraussetzungen dürfen in der Analytik Korrekturfaktoren verwendet werden?

### Literatur:

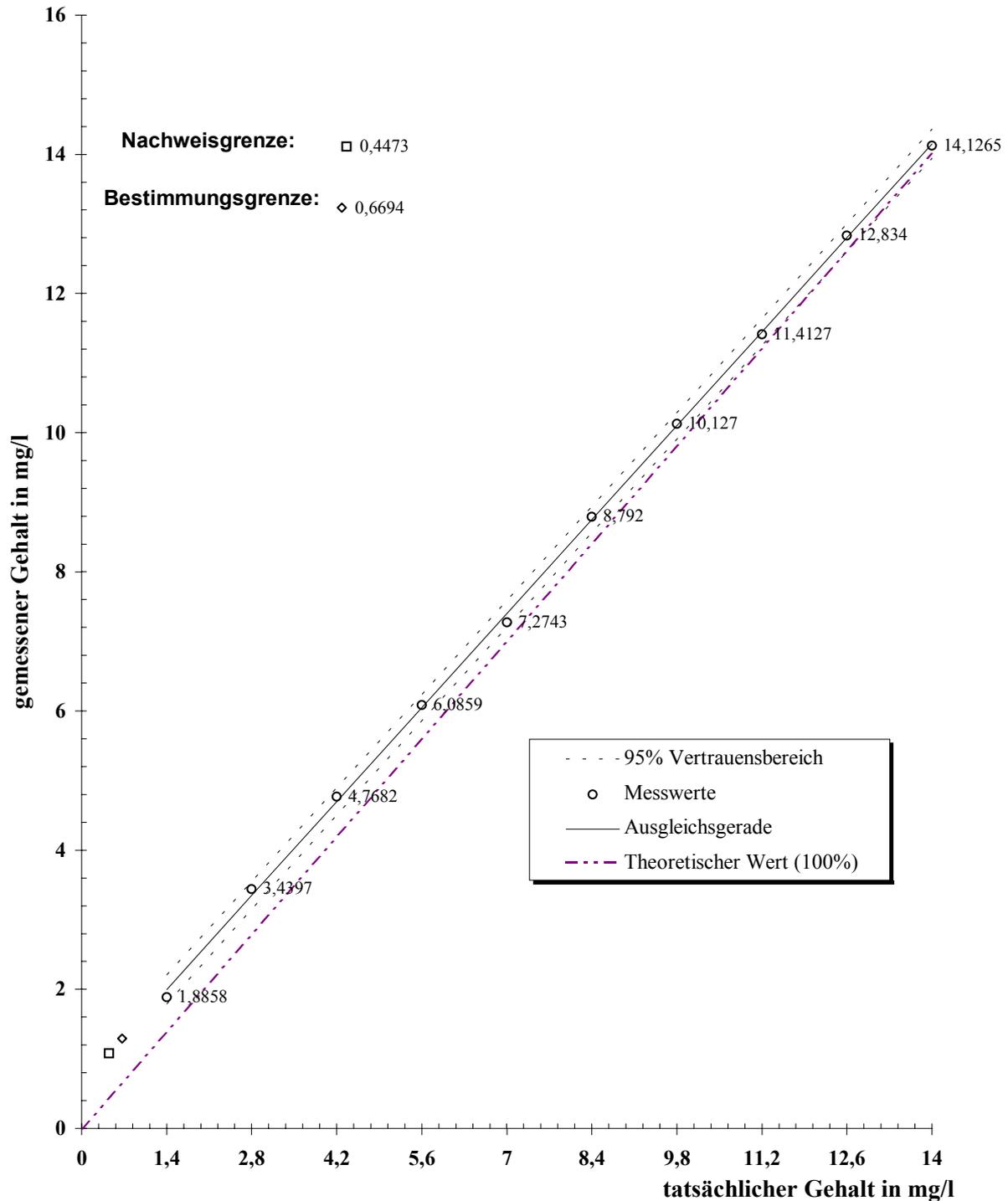
- 1.) H. Naumer, W. Heller: Untersuchungsmethoden in der Chemie. Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York 1986.
- 2.) Perkin Elmer - Gerätebeschreibung für das Spektralphotometer Lambda-12

© Scheithauer / Düttmann 1996



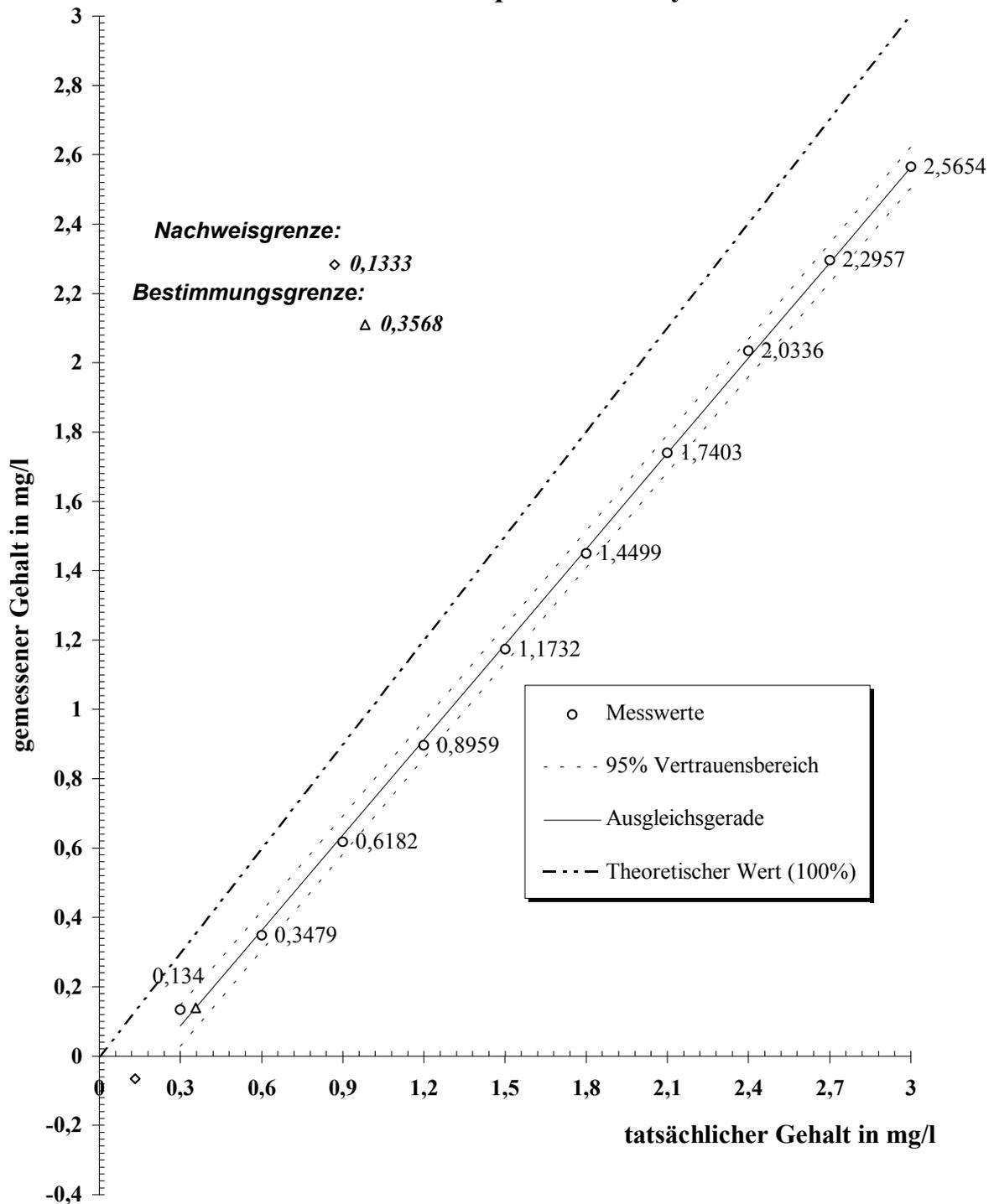
## Anhang 1

### Bestimmung von Acetylsalicylsäure im Gemisch mit Paracetamol (1,1-11mg/l), Coffein (0,3-3mg/l), Salicylsäure (0,2-2mg/l) mittels Multikomponentenanalyse



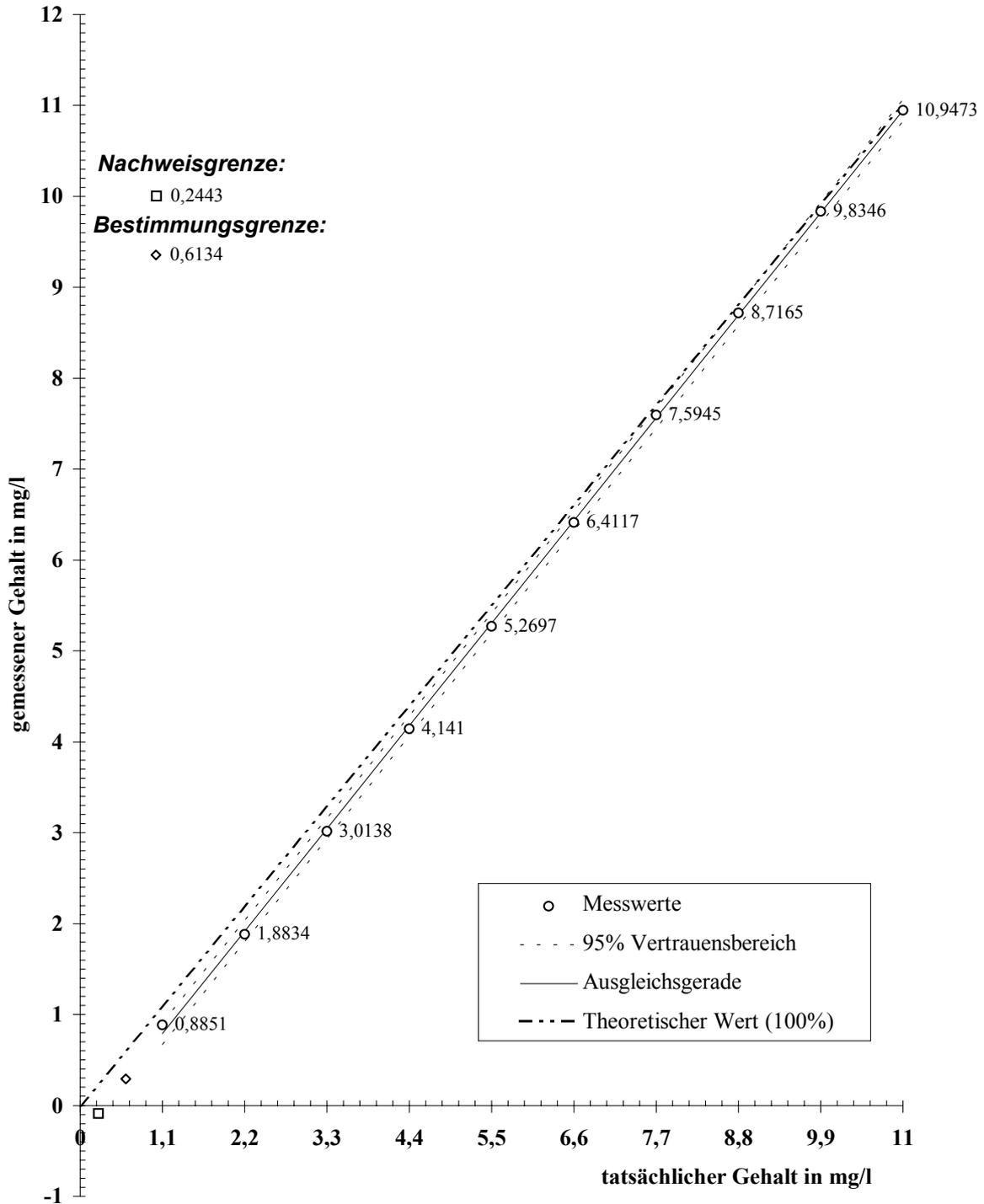


**Bestimmung von Coffein**  
**im Gemisch mit Paracetamol (1,1-11mg/l),**  
**Acetylsalicylsäure(1,4-14mg/l), Salicylsäure (0,2-2mg/l)**  
**mittels Multikomponentenanalyse**





**Bestimmung von Paracetamol**  
**im Gemisch mit Acetylsalicylsäure (1,4-14mg/l), Coffein (0,3-3mg/l), Salicylsäure (0,2-2mg/l) mittels**  
**Multikomponentenanalyse**





**Bestimmung von Salicylsäure**  
**im Gemisch mit Paracetamol (1,1-11mg/l), Coffein (0,3-3mg/l), Acetylsalicylsäure (1,4-14mg/l) mittels**  
**Multikomponentenanalyse**

