

Von Gerhard Talsky, Lothar Mayring und Hans Kreuzer^[*]

Professor E. O. Fischer zum 60. Geburtstag gewidmet

In den vergangenen zwei Jahren hat die Derivativspektrophotometrie zunehmend an Bedeutung gewonnen und erlebt gegenwärtig einen stürmischen Aufschwung. Dieser Aufsatz bringt nach einer Einführung eine Übersicht über die äußerst leistungsfähige Methode. An praktischen Beispielen aus den verschiedensten Gebieten der Analytik wird vor allem auf die Vorteile der Derivativspektrophotometrie *höherer* Ordnung (DSHO-Methode; $n > 2$) eingegangen. Die Ergebnisse wurden mit einer neu entwickelten Analogrecheneinheit erzielt, mit der man erstmalig gut reproduzierbare rauscharme Spektren on-line bis zur 7. Ordnung, in günstigen Fällen sogar bis zur 9. Ordnung verwirklichen kann. In der Praxis hat sich das Arbeiten mit Spektren der 3. bis 5. Ordnung bewährt; noch höhere Ableitungen können bei der Trennung stark überlagerter Signale oder bei „Fingerprints“ vorteilhaft sein.

1. Einleitung

Seit der Einführung der Derivativspektrophotometrie durch Hammond und Price^[1], Tannenbauer et al.^[2], Morrison^[3] sowie Giese und French^[4] in den frühen fünfziger Jahren wurde die Ableitung von Meßkurven auf zahlreiche analytische Verfahren angewendet. Aus der Vielzahl der Methoden und Arbeiten sei hier eine repräsentative Auswahl getroffen:

UV/VIS-Absorptionsspektrophotometrie^[2, 5-11]
 IR- und Raman-Spektrometrie^[12-16]
 NMR-Spektrometrie^[17-19]
 ESR-Spektrometrie^[18-20]
 Flammenemissions- und Absorptionsspektrometrie^[21-25]
 Lumineszenzspektrometrie^[26]
 Atom- und Molekülfluoreszenzspektroskopie^[27]
 Gaschromatographie^[28, 29]
 Polarographie^[30]
 Potentiometrische Titration und andere elektroanalytische Verfahren^[31-36]
 Reaktionskinetische Untersuchungen^[5, 37-42]

In den vergangenen zwei Jahren hat die Derivativspektrophotometrie besonders auf dem Gebiet der Spurenanalyse zunehmende Bedeutung erlangt^[11, 15, 43-45]. Auch in der UV/VIS-Spektrophotometrie begann sie sich allmählich durchzusetzen und erlebt derzeit eine stürmische Entwicklung.

Im Gegensatz zu Gasen und Dämpfen, die vielfach im UV- und im sichtbaren Spektralbereich zahlreiche scharfe Linien zeigen, geben gelöste Substanzen oder Flüssigkeiten meist nur wenig charakteristische Spektren mit mehr oder weniger gut ausgeprägten Maxima und Schultern. Diese sind auf Überlagerung zahlreicher Terme von Elektronenübergängen wie $n \rightarrow \pi^*$, $\sigma \rightarrow \sigma^*$ und $\pi \rightarrow \pi^*$, der Rotation und Translation zurückzuführen.

Ableitungsspektren (Derivativspektren) ermöglichen eine bessere Bestimmung flacher Maxima, aber auch das Herausheben von Schultern und schwachen Signalen aus einem unerwünschten Untergrund.

Die gegenwärtige rasche Entwicklung der Derivativspektrophotometrie ist nicht zuletzt auf die Fortschritte moderner Elektronik zurückzuführen, die auf verhältnismäßig einfache Weise im on-line-Betrieb eine Analogdifferenzierung der Signale ermöglicht. Bisher wurde allerdings auf diese Weise unseres Wissens nur die erste oder zweite Ableitung der Grundspektren geschrieben.

Die aufwendigere digitale Differenzierung verwendet in off-line-Anordnung in zunehmendem Maße Halbleiterspeicher und Mikrocomputer.

Wir haben mit einem von uns neu entwickelten, sehr variationsfähigen elektronischen Analogdifferenzierer^[46-48] systematisch untersucht, ob und in welchem Maße besonders *höhere* Ableitungen die Aussagekraft von UV/VIS-Spektren verbessern.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Erläuterungen zum Begriff „Ableitung“

Die Ableitung einer Kurve oder deren Funktion bedeutet, mathematisch ausgedrückt, die Ermittlung der Steigung der Kurve über den gesamten Bereich.

In der Spektralphotometrie wird das Verhältnis des Lichtstromes I_0 vor der Probe zum Lichtstrom I hinter der Probe gemessen. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-cd\epsilon} \quad (1)$$

(c Konzentration der Probe [mol/l], d Schichtdicke [cm], ϵ molarer Extinktionskoeffizient)

Unter der Voraussetzung eines konstanten Lichtstromes I_0 über den gesamten Wellenlängenbereich, der technisch z. B. durch eine Spaltautomatik oder automatische elektronische Verstärkungsregelung erreicht wird, ergibt die erste Ableitung von Gl. (1):

$$\frac{dI}{d\lambda} = -cd \frac{d\epsilon}{d\lambda} \quad (2)$$

[*] Univ.-Doz. Dr. G. Talsky, Dipl.-Chem. L. Mayring, H. Kreuzer
 Lehrstuhl I für Technische Chemie der Technischen Universität München
 Lichtenbergstraße 4, D-8046 Garching

Die erste Ableitung ist bei jeder Wellenlänge λ der Konzentration direkt proportional. Eine besonders hohe Meßempfindlichkeit besteht in der Nähe von Wendepunkten, da hier Extremwerte von $d\varepsilon/d\lambda$ vorliegen.

Für die 2. Ableitung ergibt sich:

$$\frac{d^2 I}{d\lambda^2} = c^2 d^2 \left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda} \right)^2 - c d \frac{d^2 \varepsilon}{d\lambda^2} \quad (3)$$

Direkte lineare Proportionalität zur Konzentration liegt nur dann vor, wenn die 1. Ableitung von ε (also $d\varepsilon/d\lambda$) gleich Null wird. Nimmt $d^2\varepsilon/d\lambda^2$ (= 2. Ableitung von ε) zusätzlich einen Extremwert ein, so besteht besonders hohe Empfindlichkeit.

Auch bei der 3. Ableitung

$$\frac{d^3 I}{d\lambda^3} = -c d \frac{d^3 \varepsilon}{d\lambda^3} + 3 c^2 d^2 \frac{d\varepsilon}{d\lambda} \frac{d^2 \varepsilon}{d\lambda^2} + c^3 d^3 \left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda} \right)^3 \quad (4)$$

muß $d\varepsilon/d\lambda$ Null werden, wenn sie linear proportional zur Konzentration sein soll. Besonders hohe Meßempfindlichkeit ergibt sich bei Schultern mit horizontaler Wendetangente und kleinem Krümmungsradius.

Ist dagegen die 1. Ableitung nicht Null, d.h. handelt es sich um Punkte ohne horizontale Tangente, so muß man für quantitative Messungen spezielle, nichtlineare Eichkurven anfertigen.

Analog lassen sich Gleichungen für noch höhere Ableitungen aufstellen. Für die 4. Ableitung sei vermerkt, daß lineare Proportionalität nur dann auftritt, wenn sowohl $d\varepsilon/d\lambda$ als auch $d^2\varepsilon/d\lambda^2$ den Wert Null annehmen.

$$\frac{d^4 I}{d\lambda^4} = -c d \frac{d^4 \varepsilon}{d\lambda^4} + 4 c^2 d^2 \frac{d\varepsilon}{d\lambda} \frac{d^3 \varepsilon}{d\lambda^3} + 3 c^2 d^2 \left(\frac{d^2 \varepsilon}{d\lambda^2} \right)^2 - c^4 d^4 \left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda} \right)^4 \quad (5)$$

2.2. Ableitungen analytischer Banden

Eine Absorptionsbande, auch analytische Bande genannt, läßt sich mit Näherungsformeln wie der Gauß- und Lorentz-Funktion sowie der Cauchy-Verteilung beschreiben. Nach Gauß ergibt sich für die Extinktion E der Bande bei der Wellenlänge λ

$$E_\lambda = E_{\max} e^{-C\lambda^2} \quad (6)$$

(E_{\max} Extinktion des Absorptionsmaximum, C Konstante)

und für die Halbwertsbreite s , unter der man den Abstand der Wendepunkte der Kurve parallel zur Abszisse versteht,

$$s = \sqrt{\frac{2}{C}} \quad (7)$$

In Abbildung 1a ist die Differenzierung einer einfachen analytischen Bande graphisch dargestellt. Das Maximum der Grundkurve entspricht in den Ableitungen ungerader Ordnung einem Nulldurchgang, in den Ableitungen gerader Ordnung einem Extremwert (abwechselnd Minimum und Maxi-

mum). Mit steigender Ableitungsordnung nimmt die Schärfe der Bande zu, die Bandbreite dagegen ab. Wendepunkte der Grundkurve führen in den Ableitungen ungerader Ordnung zu Extrema, in den Ableitungen gerader Ordnung dagegen zu Nulldurchgängen. Daraus erklärt sich die Zunahme der Anzahl der Extrema gegenüber der Grundkurve. Man spricht hier von „virtuellen Extrema“, da sie in der Grundkurve nicht vorkommen und beim Differenzieren aus den Wendepunkten entstehen. Dies hat zur Folge, daß einerseits die Wendepunkte besser bestimmbar und das Spektrum dadurch besser auflösbar wird, andererseits durch die Zunahme der Extrema -1 Maximum ergibt in der n -ten Ableitung $n+1$ Extrema – mit steigender Ordnung an Übersichtlichkeit verliert.

Der Vorteil der Derivativspektrophotometrie wird dann besonders deutlich, wenn man Kurvenzüge untersucht, die durch Überlagerung zweier oder mehrerer analytischer Banden (Gauß-Kurven) entstehen:

$$E(\lambda) = E_{1(\lambda_0)} + E_{2(\lambda_0 - \Delta\lambda)} \quad (8)$$

($E(\lambda)$ Superposition, $E_{1(\lambda_0)}$ Absorptionsbande mit Maximum bei λ_0 , $E_{2(\lambda_0 - \Delta\lambda)}$ Absorptionsbande, deren Maximum gegenüber dem von $E_{1(\lambda_0)}$ um $\Delta\lambda$ verschoben ist)

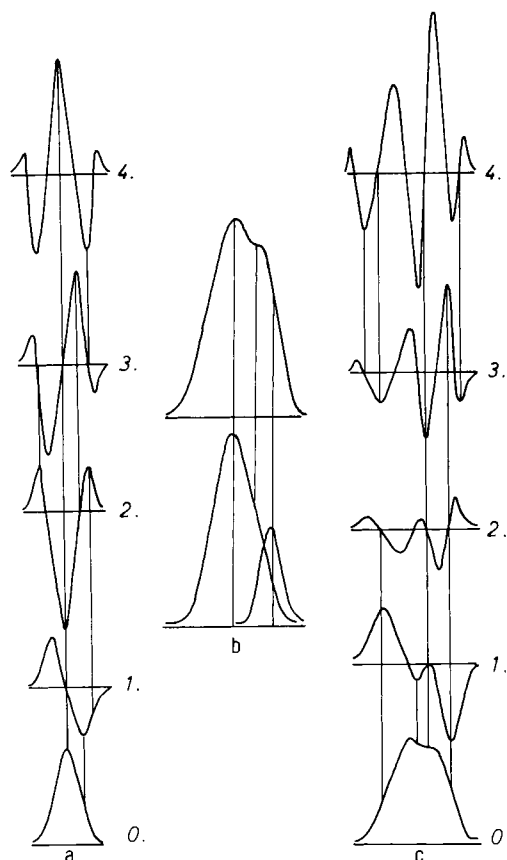


Abb. 1. a) Differentiation einer Gauß-Kurve (analytische Bande); Grundkurve und 1. bis 4. Ableitung [$E_\lambda = E_0 \exp(-C\lambda^2)$]; b) Überlagerung zweier ungleicher Gauß-Kurven [$E_\lambda = E_{1(\lambda_0)} + E_{2(\lambda_0 - \Delta\lambda)}$]; c) Differentiation zweier überlagerter ungleicher Gauß-Kurven; Grundkurve und 1. bis 4. Ableitung.

Handelt es sich um die Superposition zweier gleicher Gauß-Kurven, so tritt erst dann ein dritter oder vierter Wendepunkt auf, wenn $\Delta\lambda$ mindestens der Halbwertsbreite s entspricht.

Überlagern sich dagegen Banden mit *unterschiedlichen* Maximum-Ordinaten, so entstehen Schultern bereits dann, wenn der Abstand der Maxima kleiner als die größte Halbwertsbreite ist; bei weiterem Auseinanderrücken der Banden gehen die

Schultern in Terrassenpunkte über, was mit dem Auftreten eines 4. Wendepunktes in der Superposition verbunden ist (Abb. 1 b).

Differenziert man nun diese Grundkurve, so wird in den ungeraden Ableitungen der Terrassenpunkt zu einem Extremwert (z. B. in der 3. Ableitung das intensivste Minimum), wodurch eine bessere Auflösung des Spektrums und auch eine quantitative Erfassung beider Komponenten möglich wird (Abb. 1 c).

2.3. Informationsverluste durch Differentiation – Steigerung der Auflösung

Jede Funktion läßt sich näherungsweise durch eine Potenzreihe wiedergeben, z. B.:

$$E_{\lambda} = c_0 + c_1 \lambda + c_2 \lambda^2 + c_3 \lambda^3 + U_{\lambda} \quad (9)$$

Differenziert man diese Gleichung, so fällt dabei die Konstante c_0 weg, der lineare Term $c_1 \lambda$ geht in eine Konstante über:

$$E'_{\lambda} = c_1 + 2c_2 \lambda + 3c_3 \lambda^2 + U'_{\lambda} \quad (10)$$

Praktisch bedeutet dies, daß man damit einen linearen Untergrund eliminieren kann (Abb. 2).

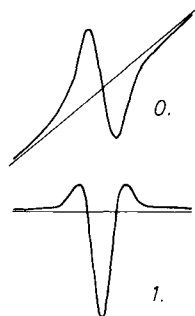


Abb. 2. Eliminierung einer linearen Untergrundfunktion ($y = ax$) durch Differenzierung (1. Ableitung, $dE/d\lambda$).

Durch die 2. Ableitung der Grundfunktion (9)

$$E''_{\lambda} = 2c_2 + 6c_3 \lambda + U''_{\lambda} \quad (11)$$

fallen die Terme $c_0 + c_1 \lambda$ heraus, da sie zu Konstanten werden, und $c_2 \lambda^2$ (z. B. eine parabelförmige Untergrundfunktion) geht in eine lineare Funktion über.

Ableitungen höherer Ordnung eliminieren auch Untergrundfunktionen höherer Ordnung und komplizierteren Verlaufes:

$$E'''_{\lambda} = 6c_3 + U'''_{\lambda} \quad (12)$$

$$E''''_{\lambda} = U''''_{\lambda} \quad (13)$$

Die Auflösung wird auch durch Signalschärfung verbessert, die man durch die Derivativspektrophotometrie erzielt. Bei Lorentz- oder Gauß-Funktionen verhalten sich nämlich die Halbwertsbreiten der Grundfunktion zu den Halbwertsbreiten ihrer 2. Ableitung wie 1:0.33, d. h. sie nehmen auf ein Drittel ab. Das Rauschen steigt dabei allerdings – wenn man nicht besondere Maßnahmen trifft – um den Faktor $0.33^2/1$

an, wird also etwa 10mal stärker^[49]. Man verwendet meistens eine um $2n$ ($n = 1, 2, \dots$) höhere Ableitungsordnung, da in diesem Falle die Extremwerte einander entsprechen^[50] (Abb. 3 a und 3 b).

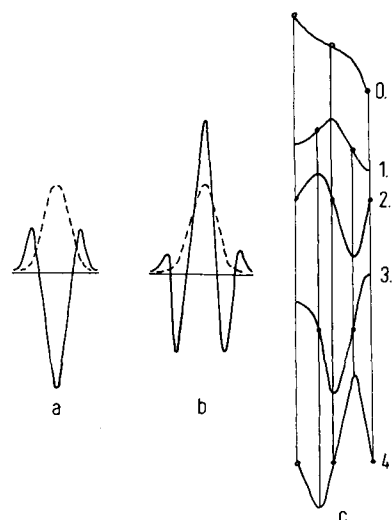


Abb. 3. Signalschärfung durch Differentiation von Maxima. a) Grundfunktion (---) und 2. Ableitung $d^2E/d\lambda^2$ (—); b) Grundfunktion (---) und 4. Ableitung $d^4E/d\lambda^4$ (—); c) Signalschärfung durch Differentiation von Schultern; Grundkurve und 1. bis 4. Ableitung.

Eine extreme Signalschärfung ist auch bei der Auflösung von Schultern zu beobachten. Dabei treten zwei Effekte auf (Abb. 3 c):

- Die Umwandlung einer Schulter in den Ableitungen ungeradzahlgiger Ordnung in einen Extremwert,
- die in den Abbildungen 3 a und 3 b gezeigte Signalschärfung.

Durch a) können Bandenüberlappungen aufgelöst werden, durch b) wird die Feinstruktur der Spektren hervorgehoben, was für Identitäts- und Reinheitsprüfungen (Fingerprint-Spektren, siehe z. B. Abb. 18) von Bedeutung ist. Dieses Verfahren ist der in der Analytik, besonders in der biochemischen Analytik, üblichen Bildung des Quotienten der Absorption bei zwei Wellenlängen als Reinheitskriterium in vielen Fällen überlegen (z. B. ^[11]). Die Spektren werden in den höheren Ableitungen allerdings zunehmend komplexer, was ihre Auswertung erschweren kann.

Die Derivativspektrophotometrie kann zwar die Information in den Spektren nicht vermehren – diese ist ja durch die Güte des Spektralphotometers vorgegeben – sie kann jedoch die Auflösung auf Kosten des Verlustes der Untergrundsignale erhöhen und damit die Nachweisempfindlichkeit überlagerter schwacher Banden beträchtlich steigern oder sogar die qualitative oder quantitative Erfassung dieser Banden erst ermöglichen.

Weitere Arbeiten über die Theorie der Derivativspektrophotometrie findet man bei ^[51–60].

2.4. Auswertung von Derivativspektren für quantitative Messungen

Wie in Abschnitt 2.1 ausgeführt, sind die Ableitungen von I/I_0 unter manchen Bedingungen der Konzentration linear proportional und müssen nicht erst durch Logarithmierung in Extinktionen übergeführt werden.

Bei der *Tangenten-Methode* legt man an zwei benachbarte Maxima oder Minima eine gemeinsame Tangente und mißt parallel zur Ordinate den Abstand t bis zum dazwischenliegenden Extremwert (Abb. 4). Die Methode ist bei linearem Untergrund gut anwendbar.

Der Abstand p zweier Extremwerte ist proportional der Differenz der Wendetangentensteigungen in der Grundkurve. Diese Auswertungsart wird *Peak-Peak-Methode* genannt und meist bei quantitativen Mehrkomponentenanalysen angewendet. In Abbildung 4 sind zwei Beispiele – p_1 und p_2 – eingezeichnet.

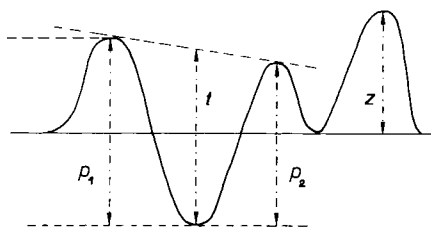


Abb. 4. Auswertung von Derivativspektren. Tangentenmethode (t), Peak-Peak-Methode (p) und Peak-Zero-Methode (z) (siehe Text).

Nur in Spezialfällen verwendet man die *Zero-Crossing-Methode* (*Peak-Zero-Methode*). Man ermittelt dabei den senkrechten Abstand z zur Null-Linie (Abb. 4). Diese Methode eignet sich für die Auswertung höherer Ableitungen mit zur Abszisse symmetrischen Signalen sowie bei ungestörter Überlagerung der Einzelkurven (wenn eine der Kurven an dieser Stelle einen Nulldurchgang aufweist).

Schließlich kann man auch das Verhältnis jeweils zweier benachbarter Peaks ($p_1 : p_2$) bilden; ändert sich dieses, so zeigt es eine Störung durch einen Untergrund und damit abweichende Qualität der Probe an (*Peak-Peak-Verhältnis-Methode*) (Abb. 4).

3. Apparative Verifizierung von Derivativspektren

3.1. Elektromechanische Tachometer

Olson und Alway^[61] haben eine Methode zur Aufzeichnung der ersten Ableitung beschrieben. Sie verwendeten einen Schreiber mit Tachometergenerator und einen Lock-in-Verstärker mit nachgeschaltetem Filter. Bei Wellenlängenvorschub ist die Geschwindigkeit des Schreiberstiftes in Ordinateurichtung proportional zur 1. Ableitung.

Klein und Dratz^[62] sowie Cook^[63] erzeugten mit einem Tachometergenerator ein 60 Hz-Signal, dessen Amplitude proportional zur Ordinatenkomponente ist; nach Verstärkung wird mit einem Lock-in-Verstärker gleichgerichtet und nach Glättung gefiltert.

3.2. Modulationsverfahren

Bei der sinusidalen Wellenlängenmodulation wird die Hauptwellenlänge λ_0 sinusförmig moduliert:

$$\lambda - \lambda_0 = d \cdot \sin \omega t \quad (14)$$

(λ Nebenwellenlänge, d Schwingungsweite, ω Winkelgeschwindigkeit, t Zeit)

Dies erreicht man z. B. durch schwingende Gitter, Quarzplättchen, Spiegel, vibrierende Austrittsspalte oder optische Wobbler^[52,55,64–68]. Die Modulation der Wellenlänge induziert eine synchrone Modulation der Amplitude. Entwickelt man diese Intensitäten in eine Taylor-Reihe um λ_0 und drückt man die Potenzen der Sinusfunktionen in den Sinus- und Cosinusfunktionen der entsprechenden multiplen Winkel aus, so ergeben sich die Ableitungen aus den Fourier-Koeffizienten dieser Reihe. Die 2. Ableitung erhält man aus der zweiten Harmonischen der induzierten Intensität. Hager und Anderson^[55] geben eine vollständige theoretische Beschreibung der sinusoidal modulierten Derivativspektrometer an.

Die andere Möglichkeit – nämlich die Amplitude direkt zu modulieren –, wird nur selten realisiert.

3.3. Zweiwellenlängen-Spektrophotometrie

Diese ebenfalls optische Differenziermethode, die auf Arbeiten von French^[69] zurückgeht, wurde von Saide^[70] und besonders Shibata^[7,71] weiter ausgebaut und angewendet.

Bei dieser Methode wird das Licht auf zwei Monochromatoren verteilt und die Lichtintensität durch zwei gleiche Photomultiplier gemessen. Die erhaltenen Signale werden nun nach Verstärkung einem Subtraktionsglied zugeführt, dessen Ausgang mit dem Y-Eingang eines Schreibers verbunden ist; die X-Achse des Schreibers wird synchron mit dem Wellenlängenvorschub angetrieben. Wenn die Differenz der Wellenlängenvorschübe genügend klein ist (meist 1–2 nm), erhält man die 1. Ableitung bezüglich der Wellenlänge. Die Zeitkonstante kann durch Veränderung der Wellenlängendifferenz (zeitlicher Abstand des Scan) der Monochromatoren eingestellt werden. Höhere Ableitungen kann man mit dieser Methode nicht direkt erhalten.

3.4. Derivativspektrophotometrie durch Subtraktion zeitlich oder räumlich verzögerter Spektren

Über einen anderen instrumentellen Ansatz zur Verwirklichung der 1. Ableitung berichten Grum et al.^[72]. Der Ausgang des Photomultipliers wird in zwei gleiche Teile geteilt. Ein Signal geht direkt zum Subtraktionsglied. Das andere Signal wird vorher durch eine elektronische oder optoelektronische Schaltung zeitlich oder räumlich verzögert.

Das Ausgangssignal des Subtraktionsgliedes wird dem Schreiber zugeführt und ist direkt proportional zur 1. Ableitung des Spektrums.

Inoue et al.^[73] entwickelten eine Technik, bei der die Verzögerung der Signale durch Tonbandaufnahme mit zwei hintereinander angeordneten Tonköpfen erzeugt wird. Die Zeitkonstante ist durch den Abstand der Tonköpfe gegeben und regelbar.

Die hier beschriebene zeitliche oder räumliche Verzögerung der Spektren ist apparativ für die 1. Ableitung relativ leicht zu verwirklichen und liefert eine Differentiation bezüglich der Zeit. Höhere Ableitungen wurden auf diese Art bisher nicht erzeugt; der Aufwand wäre verhältnismäßig hoch.

3.5. Digitale Differentiation

Eine Methode, die mit hohem apparativem Aufwand verbunden ist, bedient sich der numerischen Berechnung von

Ableitungen durch Digitalrechner^[74, 75]. Die Berechnung kann on-line oder off-line durchgeführt werden^[72].

Das Ausgangssignal des Spektrophotometers muß zunächst einem Analog-Digital-Wandler zugeführt werden. Um die Reproduzierbarkeit zu erhöhen, werden die Signale bei einer bestimmten Wellenlänge jeweils gesammelt und geglättet; so dann wird der Mittelwert berechnet (off-line). Bei anderen Methoden wird eine Kurvenglättung mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate durchgeführt. Auch die Differentiation kann punktweise oder durch Verwendung der Lagrange-schen Differentiationspolynome programmiert werden. Der Wellenlängenabstand bei den Messungen beträgt im allgemeinen 0.1–1.0 nm. Das Spektrum und seine Ableitungen können durch lineare Regression interpoliert werden.

Morrey^[76] verwendete für die Analyse digitalisierter Spektren einen großen Computer. Um die Positionen der Absorptionsbanden zu bestimmen, wurde die 2., 3. und 4. Ableitung berechnet, aus denen die Signalbreite und die relative Menge der Komponenten erhalten werden konnte.

Butler und Hopkins^[77–79] untersuchten Pigmente in Suspensionen von Mitochondrien, Chloroplasten und Hefezellen. Die durch das Streulicht und andere Komponenten bedingte Untergrundfunktion wurde durch elektronische Funktionssimulation oder off-line nach Digitalisierung und Speicherung durch punktweise digitale Differenzierung eliminiert. Diese Autoren führten auch empirische Computeranalysen der Spektren durch und geben Beispiele von Derivativspektren der 2. und 4. Ordnung an.

In den vergangenen Monaten kamen auch preiswertere, weniger aufwendige digitale Differenzierer auf den Markt, die in der Regel auf Mikrocomputerbasis aufgebaut sind. Sie waren bisher meist nur für die 1. und 2. Ableitung ausgelegt und kaum variabel. Seit kurzem werden auch MC-Differenzierer für Ableitungen bis zur 4. Ordnung angeboten; über Erfahrungen mit diesen Modulen findet man außer werksinternen Angaben in der Literatur noch keine Hinweise. Sofern der Mikrocomputer genügend Speicherkapazität besitzt, kann man nämlich Differenzierungen beliebiger Ordnung durchführen, indem man die Grundkurve dem Speicher entnimmt, sie differenziert, das Ergebnis speichert, es seinerseits differenziert und diesen Vorgang n-mal wiederholt. Allerdings machen sich mit steigender Ordnung die Fehler bei den Näherungslösungen zunehmend bemerkbar, was sich in leicht gezackten Kurven und höherem Rauschpegel äußert.

3.6. Elektronische Analogdifferentiation

Die Analogdifferentiation mit elektronischen Differenzierschaltungen bietet gegenüber den in den Abschnitten 3.1 bis 3.5 beschriebenen Methoden eine Reihe von Vorteilen:

- Ein Eingriff in das optische System unterbleibt.
- Die Verwendung von Lock-in-Verstärkern entfällt.
- Rückwirkungen auf den Meßvorgang sind leicht vermeidbar.
- Alle Vorteile analoger Datenverarbeitung (z. B. Filterung, Glättung) bleiben gewahrt.
- Zeitkonstante, Filter, Dämpfung u.ä. können leicht optimiert werden.
- Auch höhere Ableitungen lassen sich relativ einfach realisieren.
- Die Störanfälligkeit ist gering.

- Die Kosten sind verhältnismäßig niedrig; das Preis/Leistungs-Verhältnis ist gut.

Diesen Vorteilen stehen einige Nachteile gegenüber:

- Die Differentiation wird nicht direkt in bezug auf die Wellenlänge, sondern in bezug auf die Zeit durchgeführt. Dies stört jedoch nicht, wenn der Wellenlängenvorschub (Scan) mit konstanter Geschwindigkeit erfolgt.
- Die Ableitungsspektren sind gegenüber dem Grundspektrum etwas verzögert, bedingt durch die RC-Glieder. Diese Phasenverschiebung ist abhängig von der Differentiationszeitkonstante sowie der Geschwindigkeit des Wellenlängenvorschubs. Die Verschiebung der Signale kann durch Eichung oder rechnerisch^[80] berücksichtigt werden (systematischer Fehler). Eine weitere Möglichkeit bildet der Vergleich der Ableitungsspektren bei hin- und rückläufigem Durchfahren des Grundspektrums und Mittelwertbildung.
- Reproduzierbarer und zeitlich konstanter Wellenlängenvorschub ist unbedingt erforderlich (z. B. synchroner Antrieb von Wellenlängen- und Schreibervorschub durch Schrittmotoren oder andere Vorrichtungen). Dies kann man leicht bei Gitterchromatoren erreichen, bei Prismengeräten, deren Wellenlängenskala logarithmisch verläuft, dagegen nur sehr schwer.
- Die Bandbreite des Lichtes muß unabhängig von λ sein; die Methode eignet sich also nicht für Spektrophotometer mit Spaltautomatik.

Green und O'Haver^[26] konnten bei der Derivativ-Lumineszenzspektrometrie zeigen, daß die Wellenlängenmodulationstechnik und die elektronische Analogdifferentiation das gleiche Signal/Rausch-Verhältnis ergeben und auch bei den anderen Spektrparametern kein Unterschied besteht^[81–83].

4. Elektronische on-line-Analogdifferentiation höherer Ordnung

Eine elektronische Analogdifferentiation gelingt im einfachsten Fall durch das Zusammenwirken eines Kondensators C_s mit einem Widerstand R_r . Zweckmäßigerweise verbindet man diese passiven Bauelemente mit einem Operationsverstärker OP (Abb. 5). Der Operationsverstärker soll hier als „black

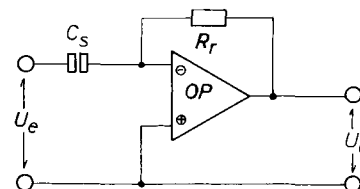


Abb. 5. Prinzipschaltung eines invertierenden Differenzierers (U_e Eingangsspannung, U_a Ausgangsspannung, C_s Kondensator, R_r Rückkopplungswiderstand, OP Operationsverstärker).

box“ betrachtet werden. Dieses moderne integrierte aktive Bauelement übernimmt auf einer Fläche von etwa 1–2 mm² die Funktionen von acht bis zehn Transistoren sowie einigen Widerständen und Kondensatoren und verstärkt das Signal je nach Eingang gleichpolig (\oplus), also mit gleichem Vorzeichen, oder invertiert (\ominus) (Leerlaufverstärkung 1000–100 000!). Die Differentiationszeitkonstante τ ergibt sich aus

$$\tau = C_s \cdot R_r \quad (15)$$

und kann somit durch Variation der kapazitiven und/oder ohmschen Komponente eingestellt werden.

Die Auflösung des Derivativspektrums hängt außer von der Spaltbreite in hohem Maße von der Geschwindigkeit des Wellenlängenvorschubes S (Scan) sowie von τ ab. Die beste Auflösung erhält man danach bei geringer Spaltbreite, langsamem Scan und kleinem τ . In der Praxis muß man einen Mittelweg einschlagen, denn bei zu geringer Spaltbreite steigt das Rauschen durch die hohe Verstärkung stark an und gibt eine schlechte Null-Linienkonstanz, die sich nachteilig auf die Reproduzierbarkeit der Ableitungsspektren auswirkt. Ist S und auch τ gering, so erhält man auch nur geringe Spannungsdifferenzen, denn es gilt

$$\frac{dE}{d\lambda} \sim \frac{dE}{dt} \sim \frac{dU}{dt} \quad (16)$$

Bei der Optimierung des Differentiators muß man darauf achten, daß die Auflösung A_D des Differentiators höchstens gleich der spektralen Bandbreite, besser jedoch kleiner als diese ist, da sonst wertvolle Information verloren geht und die Auflösung der Spektren schlechter wird. Andererseits kann man sich in speziellen Fällen gerade diesen Effekt zunutze machen, um störende Signale des Spektrums zu dämpfen oder zu unterdrücken. Die Zeitauflösung T einer analytischen Bande beträgt für die 1. Ableitung

$$T_1 \sim 4\tau_1 = 4RC \text{ [s]} \quad (17)$$

und für die 2. Ableitung

$$T_2 \sim 8\tau_2 = 8RC \text{ [s]} \quad (18)$$

Daraus ergibt sich die Auflösung des Differenzierers

$$A_D = T \cdot S \text{ [nm]} \quad (19)$$

($S = \text{Scan [nm/s]}$)

Bei eingestellter spektraler Bandbreite B des Gerätes soll dann

$$A_D \leq B \quad (20)$$

sein und

$$T < \frac{B}{S} \quad (21)$$

Wenn es sich nicht um extrem schwierige Aufgaben handelt, wählt man im allgemeinen spektrale Bandbreiten von 0.5–2 nm, einen Wellenlängenvorschub S von 1–5 nm/s und Differentiationszeitkonstanten τ zwischen 0.1 und 1 s.

Während man mit der Grundschaltung noch die 1., im günstigsten Fall die 2. Ableitung erhält, steigt bei höheren Ableitungen das Rauschen so stark an, daß die Reproduzierbarkeit – die Voraussetzung für die quantitative Auswertung – sehr unbefriedigend wird.

Unter „Rauschen“ versteht man das meist höherfrequente Schwanken der Signalspannung um einen Mittelwert. Es wird vor allem von folgenden Faktoren bestimmt:

- a) Rauschen der Probe, z. B. durch Temperaturgradienten, Inhomogenitäten, Streuung

- b) Rauschen der Optik durch Fluktuation der Lichtquelle
- c) Rauschen der Elektronik des Spektralphotometers, vor allem des Multipliers und der Verstärker
- d) Rauschen des Differenzierteiles, vor allem Rauschverstärkung durch Differentiation

Da die Ausgangsspannung eines Differentiators direkt proportional zur zeitlichen Änderung der Eingangsspannung ist, wird das (höherfrequente) Rauschen gegenüber der (niederfrequenten) Signalspannung bevorzugt verstärkt. Der Rauschpegel nimmt dabei exponentiell mit der Ordnung der Ableitung zu. Spektrale Auflösung und Rauschdämpfung sind in der Derivativspektrophotometrie deshalb zwei gegenläufige Effekte, die von Fall zu Fall optimiert werden müssen.

Bisher konnte mit Analogdifferenzierern on-line nur die 1. und 2. Ableitung erhalten werden. Wir haben ein Gerät zur Erzeugung von Derivativspektren höherer Ordnung entwickelt, um zu prüfen, wie weit die Auflösung von Meßsignalen durch die höheren Ableitungen verbessert wird und bis zu welcher Ordnung eine Differentiation noch sinnvoll ist.

Das Gerät besteht aus neun Differenziermodulen (invertierend und nichtinvertierend; Tandemdifferenzierer); dazu kommen Operationsverstärker, Impedanzwandler, Dämpfungsglieder, aktive und passive Filter, Meßgeräte und Spannungsteiler zur Anpassung der Ein- und Ausgänge (vgl. auch Abb. 7).

Durch die breite Variationsmöglichkeit des Eingangsquellenwiderstandes, des Eingangszeitgliedes, der Verstärker, der ohmschen und kapazitiven Glieder der Differenzierer und Filter sowie der Dämpfungsglieder konnte das Gerät der jeweiligen Aufgabe optimal angepaßt werden. Aus den gewonnenen Erfahrungen ließen sich wesentliche Prinzipien solcher elektronischen Schaltungen ableiten; außerdem konnte für den praktischen Gebrauch ein günstiges Verhältnis zwischen Leistungsfähigkeit bei der Auflösung der Signale und dem dazu erforderlichen Aufwand erreicht werden.

Welche Grundforderungen muß ein Analogdifferenzierer erfüllen, damit er sich besonders für die Verifizierung höherer Ableitungen eignet?

Als erstes muß dafür gesorgt werden, daß weder das Eingangssignal durch die Differenziereinheiten beeinflusst wird noch diese Einheiten einander beeinflussen. Dies erreicht man durch Vor- oder Dazwischenschalten von Impedanzwandlern mit hohem Eingangs- und niedrigem Ausgangswiderstand (galvanische Trennung). Das Signal wird hierauf mit einem linearen Operationsverstärker von meist 10 mV bis 1 V Spitzenspannung auf 5–10 V angehoben, was sich auf die Qualität der anschließenden Differenzierung (geringe Totzeiten) positiv auswirkt. Als Differenzierer eignen sich sowohl invertierende als auch nichtinvertierende Module, deren Zeitkonstante getrennt variabel sein sollte. Das Rauschen, das ausschlaggebend für die Güte von Ableitungen besonders höherer Ordnung ist, kann man durch mehrere Maßnahmen eliminieren:

- a) Dämpfung des Differentiators. Dies kann z. B. durch Vorschalten eines ohmschen Widerstandes vor den Differentiationskondensator oder durch schaltbare Kondensatoren in der Rückführung (Kapazitive Gegenkopplung) geschehen.

- b) Mehrmalige Differentiation mit hoher Zeitkonstante τ . Verwendet man bei der Differentiation große Zeitkonstanten, so werden Signale mit kleiner Amplitude und Frequenz in der 1. Ableitung zwar nur schlecht in Form einer kleinen Schulter aufgelöst, gehen jedoch bei weiterer, eventuell mehrfacher Differentiation in relative Extrema über. Man erhält schließlich ein Spektrum, das keine Schultern mehr aufweist

und rauscharm ist. Ein Nachteil kann die der Größe der τ -Werte proportionale Phasenverschiebung und die Zunahme „virtueller“ Derivatiband durch die höhere Differentiationsordnung sein.

c) Verwendung elektronischer Filter. Das Rauschen kann auch durch das Vor- oder Nachschalten passiver oder aktiver (mit Verstärkung) selektiver elektronischer Filter eliminiert werden. Ein „Tiefpaß“ läßt alle Signale bis zu einer einstellbaren Grenzfrequenz praktisch ungehindert durch, während die unerwünschten höher- und hochfrequenten Signale abgeleitet werden. – Eine weitere Möglichkeit besteht in der Integrierung des Frequenzfilters in die Rückkopplung des Differenziergliedes selbst, wodurch z. B. die interessierenden niederfrequenten Signale bevorzugt differenziert werden. – Die selektive Frequenzfilterung ist somit eine wirkungsvolle Methode der Rauschunterdrückung, besonders dann, wenn sich die Grenzfrequenz und die Güte des Filters getrennt variieren lassen.

d) Eliminierung des Rauschens durch Statistik. Dieses Verfahren wird vor allem dann angewendet, wenn nur geringe Probemengen zur Verfügung stehen, wenn die Substanzen niedrige Extinktionskoeffizienten besitzen und/oder wenn durch die hohe Verstärkung trotz aller oben geschilderter Maßnahmen ein schlechtes Signal/Rausch-Verhältnis resultieren sollte. – Das Spektrum wird mindestens zehnmal mit dem Schreiber mit mittlerer Farbtiefe genau übereinander aufgezeichnet. Die Bereiche hoher Liniendichte erscheinen intensiver und können nun entweder manuell abgepaust oder mit unzureichender Belichtungszeit auf Filmmaterial mit steilem γ -Wert photographiert werden. Nach Umkopieren auf hartem Papier treten Stellen hoher Liniendichte zuerst hervor. – Natürlich ist auch eine Aufbereitung der überlagerten Kurven nach Digitalisierung mit rechnerisch-statistischen Methoden möglich, doch wäre dies weitaus aufwendiger.

Wie sich die individuelle Anpassung der Differenzierglieder an das jeweilige Problem bereits bei der 2. Ableitung auswirkt,

zeigt Abbildung 6. Im Trypsin-Spektrum z. B. werden besonders die schwachen Schultern bei 245 und 275 nm stärker aufgelöst.

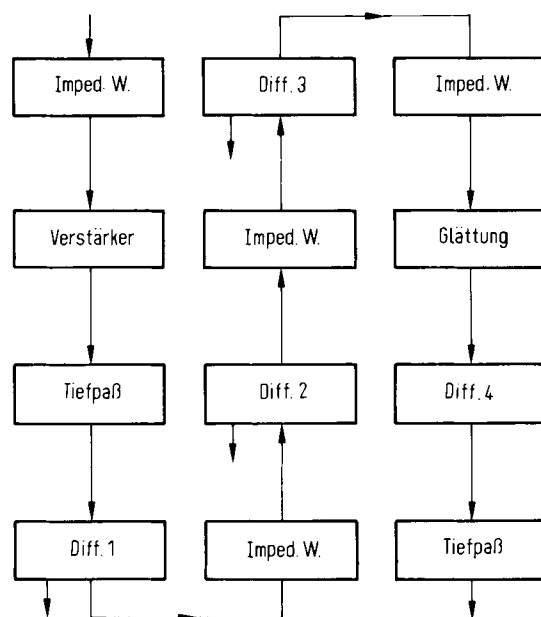


Abb. 7. Blockschaltbild eines Differentiators für Ableitungen bis zur 4. Ordnung.

Zuletzt sei noch anhand eines Blockschaltbildes gezeigt, wie eine Schaltung für einen Differentiator – in diesem Fall für die Verwirklichung von Ableitungen bis zur 4. Ordnung – bevorzugt aufgebaut ist (Abb. 7).

5. Anwendungen der UV/VIS-Derivativspektrophotometrie

Die nachstehenden praktischen Beispiele aus den verschiedensten Gebieten der Analytik sollen den breiten Anwendungsbereich der Derivativspektrophotometrie aufzeigen und besonders die Leistungsfähigkeit und die Vorteile der Derivativspektrophotometrie *höherer* Ordnung darlegen (DSHO-Methode; $n > 2$).

Zunächst einige allgemeine Hinweise zur Analogdifferentiation! In Abbildung 8a ist ein Original-Spektrum 4. Ordnung des Azofarbstoffs Kongorot wiedergegeben. Zehnmaliges Über-einanderschreiben der 4. Ableitung demonstriert die vorzügliche Reproduzierbarkeit und Rauscharmut. Sie wird durch schrittweise spezielle Anpassung der Apparatur an das jeweilige Problem erreicht. Die Ableitungen von Spektren mit breiten Maxima und flachen Flanken können relativ schnell erzeugt werden (Scan S etwa 5 nm/s). Bei steilen und schmälere Maxima würde dies zu verringerter Auflösung führen, besonders dann, wenn die Zeitkonstante groß gewählt wird ($\tau \geq 1$ s). Dies geht aus Abbildung 8b und 8c hervor. Bei Abbildung 8b wurde ein Scan von 2 nm/s gewählt. Die Feinstruktur der 4. Ableitung (Trypsin, sechsmal übereinandergeschrieben) läßt sich gut reproduzieren. Dagegen ist in Abbildung 8c von der Feinstruktur nur noch wenig zu sehen; bei einem Scan von 5 nm/s werden die charakteristischen Banden zwischen 250 und 280 nm unterdrückt. Man könnte natürlich auch die Zeitkonstante geringer wählen, was jedoch nur beschränkt möglich

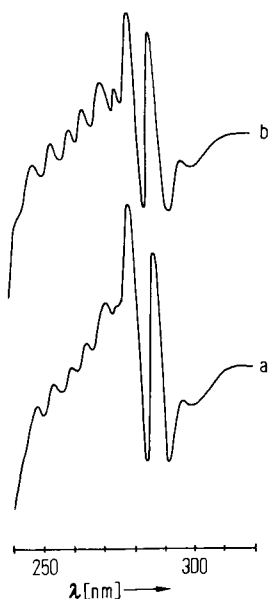


Abb. 6. Vergleich der Spektrenauflösung (Rindertrypsin): a) 2. Ableitung, aufgenommen unter Verwendung eines kommerziellen Analogdifferentiators; Konz. 1 g/l, SD (Schichtdicke) 1 cm, Spalt 1 nm, Scan 1 nm/s, Mode 6; b) 2. Ableitung, aufgenommen unter Verwendung des von uns entwickelten Analogdifferentierers; Konz. 1 g/l, SD 1 cm, Spalt 1 nm, Scan 1 nm/s.

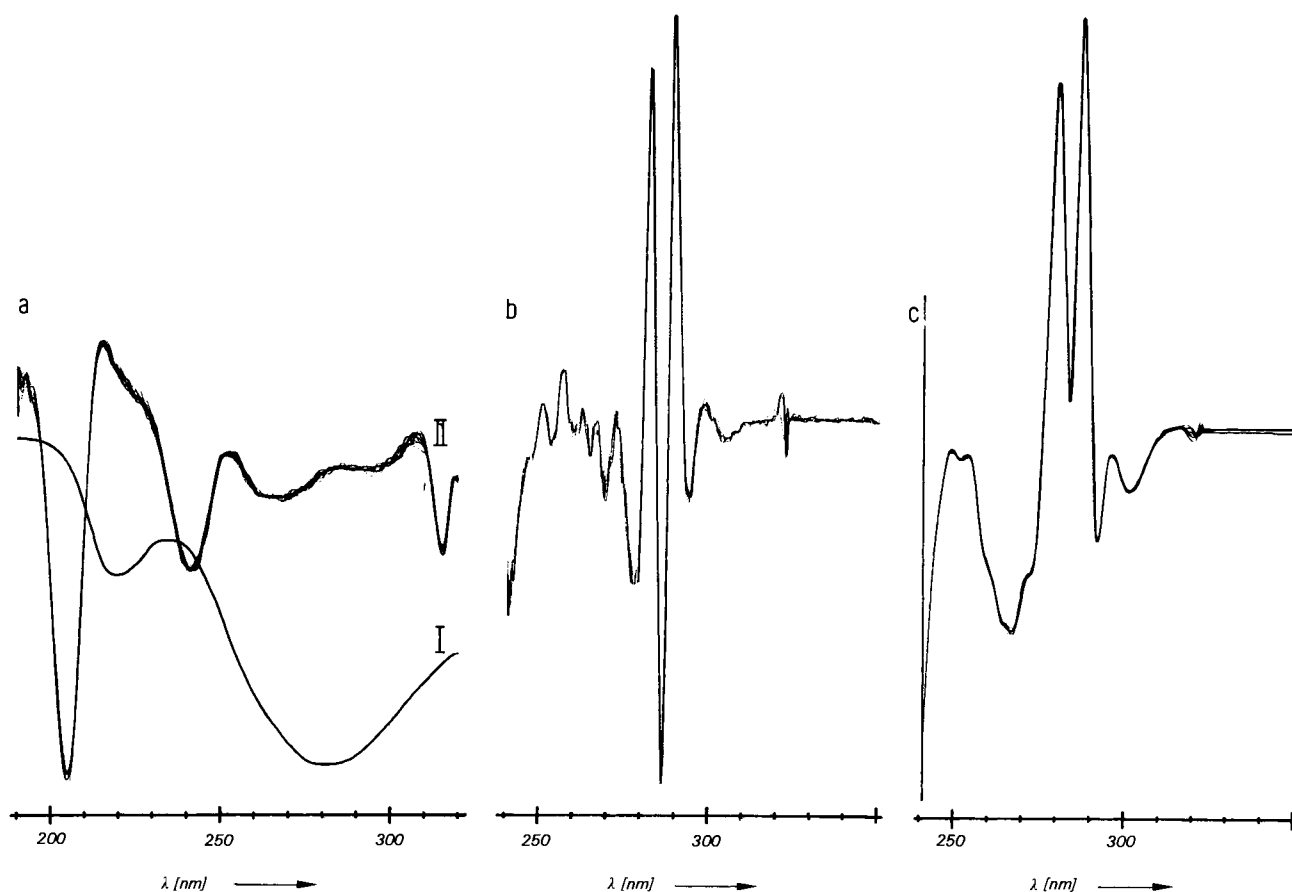


Abb. 8. a) Kongorot, Konz. 20 mg/l, SD 1 cm, Spalt 1 nm, Scan 5 nm/s. I: Grundspektrum; Bereich 2E; II: 4. Ableitung, zehnmal übereinandergeschrieben; b) Rindertrypsin, Konz. 0.5 g/l, SD 1 cm, Spalt 1 nm; 4. Ableitung, sechsmal übereinandergeschrieben, Scan 2 nm/s; c) wie b), Scan 5 nm/s.

ist, da dadurch besonders bei flachem Anstieg $dE/d\lambda$ klein wird und durch die dann erforderliche hohe Verstärkung auch das Rauschen zunimmt.

Bis zu welcher Ordnung ist es sinnvoll, das Grundspektrum abzuleiten? Diese Frage ist nicht exakt zu beantworten, denn die günstigste Ordnung ist von Probe zu Probe verschieden. Man sollte aber zumindest die Ordnung wählen, bei der sämtliche Schultern und Terrassen in bipolare Signale übergeführt sind. Dies ist in der Regel mit der 4. oder 5. Ableitung erreichbar. Noch höhere Ableitungen können vor allem als „Fingerprints“ Vorteile bringen. Abbildung 9 macht dies am Grundspektrum sowie an den Derivativspektren 1. bis 7. Ordnung des Enzyms Ribonuclease A deutlich. Das Grundspektrum weist das für Proteine typische Maximum bei ca. 280 nm und ein Minimum bei ca. 250 nm auf; an den Flanken sind nur andeutungsweise Schultern erkennbar. In der 2. und 3. Ableitung tritt die Feinstruktur schon deutlich hervor und ist in der 4. Ableitung größtenteils in bipolare Signale übergeführt. Die 5. bis 7. Ableitung schärfen die kleinen Maxima in zunehmendem Maße. Noch auffällender erkennt man die Vorteile der Differentiation höherer Ordnung, wenn man jeweils die geraden und ungeraden Ordnungen untereinander vergleicht. Die 7. Ableitung wurde zehnmal übereinandergeschrieben, um die selbst bei so hoher Ordnung noch vorzügliche Reproduzierbarkeit zu demonstrieren.

Während Extrema der Grundkurve am besten in geradzahligten Ableitungen erkennbar werden (siehe Abschnitt 2.2), lassen sich Wendepunkte am vorteilhaftesten in ungeradzahligten Ableitungen auflösen. Deshalb ist es zweckmäßig, Spektren der

Ordnung $2n+1$ und der Ordnung $2n$ ($n=0, 1, 2, \dots$) zu erstellen.

Bei der Optimierung der Einzelschritte ist darauf zu achten, daß die maximal zulässige Arbeitsspannung der verwendeten IC nicht überschritten wird, da sonst Verzerrungen der Spektren und Schwingen der Schaltkreise auftreten können, was schlechte Reproduzierbarkeit und stärkere Abweichung von der Linearität bedingt. Weisen die Spektren flache Maxima und schlecht ausgeprägte Schultern auf, hat es sich als günstig erwiesen, die Signalspannung vor dem Differenzieren auf ca. 5–8 V anzuheben. Der Ausgang der 1. Stufe, der in diesem Fall eine Spannung von 10–12 V aufweist, wird dann wieder nach Filterung auf 5–8 V gedämpft und der 2. Stufe zugeführt (Differenzierung bei gleichem Spannungspegel). Besitzen dagegen die Extrema steilere Flanken, so ist es besser, das Eingangssignal vor dem Differenzieren nur auf etwa 2 V anzuheben. Der Eingang der 2., 3., 4. und höheren Stufe wird in diesem Fall auf 4, 6, 8 V und höher angehoben (Differenzierung bei ansteigendem Spannungspegel).

5.1. Spurenanalyse

Reinheitsprüfungen von Roh-, Zwischen- und Endprodukten, Nachweis geringer Mengen von Verunreinigungen in Lebensmitteln, in Pharmaka, im Abwasser u. a. nehmen einen großen Raum in der angewandten Analytik ein. Hierzu einige Beispiele:

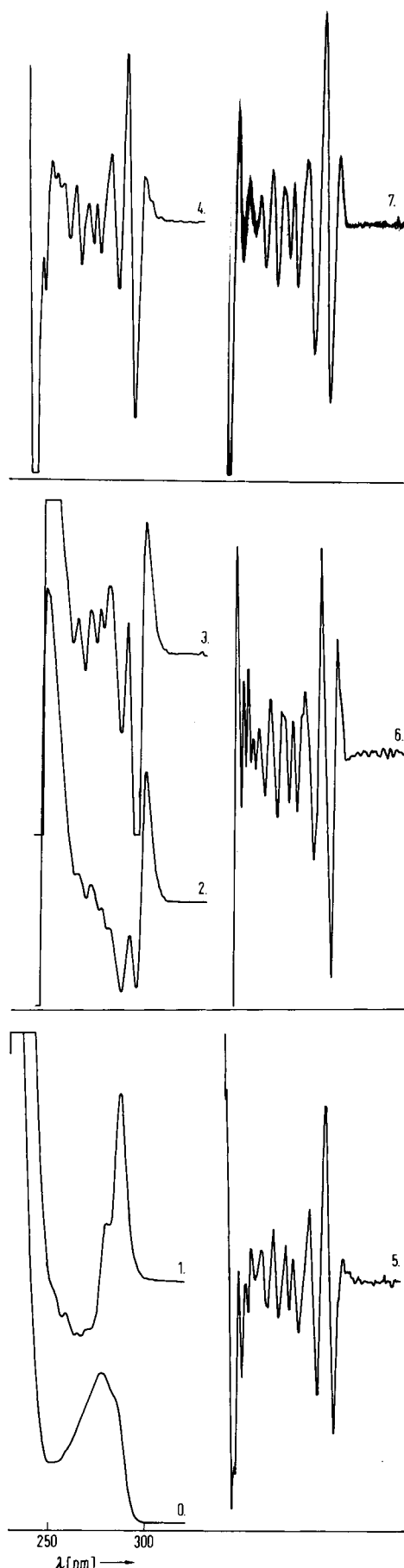


Abb. 9. Ribonuclease A (Rind), Konz. 1 g/l, SD 1 cm, Spalt 1 nm, Scan 2 nm/s, Bereich 2 E; Grundspektrum und 1. bis 7. Ableitung. Die 7. Ableitung wurde zehnmal übereinandergeschrieben.

Ethanol wird meistens durch ternäre Rektifikation mit Benzol, Toluol oder Xylol als Schlepper absolutiert. Bei Verwendung als Rohstoff zur Herstellung alkoholischer Getränke, pharmazeutischer Zubereitungen, für Extrakte u.ä. dürfen jedoch höchstens Spuren eines solchen toxisch wirkenden Arens im Ethanol enthalten sein. Im Grundspektrum lassen sich bei 1 cm Schichtdicke 50 ppm Benzol in Ethanol gerade noch quantitativ erfassen ($\pm 10\%$); 10 ppm geben nur noch leichte Wellen (Abb. 10, Kurve III), und 1 ppm erkennt man überhaupt nicht mehr (Abb. 10, Kurve II). Differenziert man jedoch das Spektrum mehrfach, so sinkt die Grenze: Für die 2. Ableitung liegt sie bei 5 ppm, mit der 4. Ableitung kommt man sogar gut bis auf 1 ppm herunter (Abb. 10, Kurve V; mittlerer Fehler des Mittelwertes $\pm 5\%$), und der halbquantitative Nachweis gelingt sogar noch mit 100 ppb!

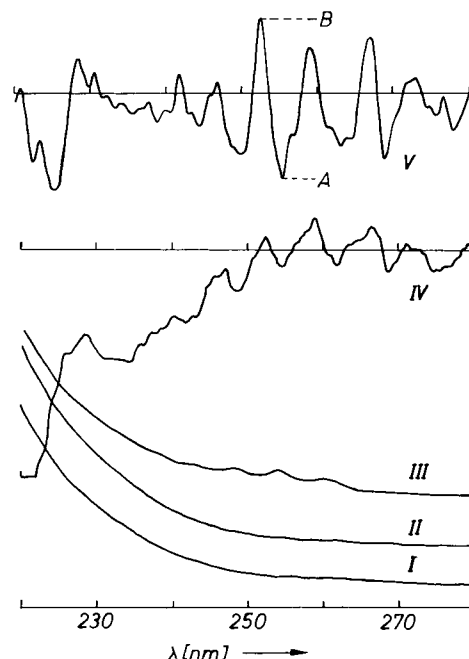


Abb. 10. Quantitative Bestimmung von Spuren Benzol in Ethanol. Bereich 1 E. SD 1 cm, Spalt 1 nm. I: Grundspektrum Ethanol „Uvasol“; II: Grundspektrum mit 1 ppm Benzol; III: Grundspektrum mit 10 ppm Benzol; IV: 2. Ableitung von II (1 ppm Benzol), Scan 2 nm/s; V: 4. Ableitung von II (1 ppm Benzol), Scan 2 nm/s; AB ist der Benzolkonzentration proportional.

Auf ähnliche Weise kann man Arene in Abgasen und Abluft erfassen. Man saugt entweder die Gase und Dämpfe durch eine Absorptionsflüssigkeit wie Ethanol, Hexan oder Cyclohexan und untersucht diese oder man verfährt so, wie in Abschnitt 5.10 für „Gase und Dämpfe“ angegeben.

Anilin und Phenol sind häufig in industriellen Abwässern vorzufinden. Mit der Derivativspektrophotometrie lassen sich diese Verbindungen sehr rasch und einfach und, wenn nötig, auch kontinuierlich noch in geringen Konzentrationen quantitativ bestimmen (2–5 ppm). Dabei stören selbst wechselnde Mengen an Trübstoffen oder Färbungen in den meisten Fällen nicht, da der Untergrund durch die Differenzierung eliminiert werden kann.

Abbildung 11, Kurve III, zeigt die 3. Ableitung des Spektrums der beiden Substanzen im Verhältnis 1:1 (je 5 ppm) in Wasser. Viel empfindlicher und besser lassen sie sich jedoch durch die 4. Ableitung erfassen (Kurve V). 2 ppm Phenol kann man z. B. noch mit $\pm 5\%$ Genauigkeit bestimmen.

Spektralphotometer mit eingebautem Timer erlauben die Überwachung des Abwassers in vorgegebenen Zeitintervallen.

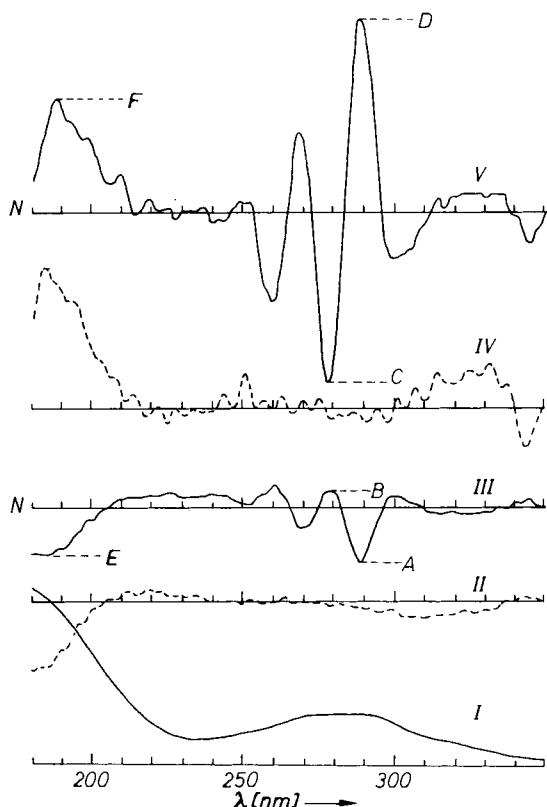


Abb. 11. Quantitative simultane Bestimmung von Anilin und Phenol in Abwasser. SD 1 cm, Spalt 1 nm, Scan 2 nm/s (vgl. H₂O). I: Grundspektrum mit je 5 ppm Anilin und Phenol; II: 3. Ableitung, 6 ppm Anilin; III: 3. Ableitung, je 5 ppm Anilin (EN; N=Null-Linie) und Phenol (AB); IV: 4. Ableitung, 6 ppm Anilin; V: 4. Ableitung, je 5 ppm Anilin (FN) und Phenol (CD).

Mit einer Schlauchpumpe wird die Durchflußküvette über einen Beipap mit dem Abwasser versorgt, und aus geeigneten Peak-Peak-Abständen der 3. oder 4. Ableitung läßt sich direkt die Schadstoffmenge ermitteln.

Murexid und Dithizon sind in der Spurenanalyse viel gebrauchte Reagentien zum Nachweis von Metallionen; die Erfassungsgrenze liegt bei 10 bis 100 ppm. Mit der Derivativspektrophotometrie höherer Ordnung kann man die Empfindlichkeit um mindestens eine Zehnerpotenz steigern. Auch auf andere Farbreaktionen läßt sich die Methode mit Erfolg anwenden.

5.2. Farbstoffe

Man kann die Derivativspektrophotometrie auch vorteilhaft zur Identitäts- und Reinheitsprüfung sowie zur quantitativen simultanen Bestimmung von Farbstoffgemischen anwenden, die bei der Herstellung von z. B. Tinten, Druckfarben und Textilfarbstoffen, aber auch von Diagnostika, Pharmaka, Kosmetika und Lebensmittelfarbstoffen Bedeutung haben. Aus dieser Gruppe haben wir untersucht: Kongorot/Kresolrot, Methylorange/Acridingelb, Rhodamin B, Trypaflavin, Methylblau, Brillantgrün und Chinosol. Es wurde die 3. bis 5. Ableitung verwendet.

5.3. Isomere Verbindungen und homologe Reihen

Folgende Systeme haben wir mit der DSHO-Methode analysiert:

- n*-Propanol/Isopropanol (unverdünnt, 4. Ableitung)
- n*-Butanol/Isobutanol (unverdünnt, 4. Ableitung)
- o*-Xylol/*p*-Xylol (1 % in Hexan). Die Grundspektren sagen wenig aus. Dagegen kann man in der 3. Ableitung die *o*- und *p*-Verbindung gut unterscheiden und auch quantitativ mit ± 4 % Genauigkeit nebeneinander bestimmen
- Methyl-, Ethyl- und Isoamylester der Essigsäure (unverdünnt und in Dampfzustand, 3. und 4. Ableitung)
- Benzol in Normal- und Superbenzin (0.1 % in Hexan). Durch die gesetzliche Auflage, den Bleigehalt in Kraftstoffen zu senken, gewann der Zusatz von Benzol, das die Octanzahl erhöht, besondere Bedeutung. Mit der 3. Ableitung (Abb. 12) wurden in Normalbenzin 2.8 ± 0.3 % und in Superbenzin 9.8 ± 0.3 % Benzol gefunden, was mit den Angaben des Herstellers gut übereinstimmt (2.5–3.5 % bzw. 9.5 bis 10.5 %).

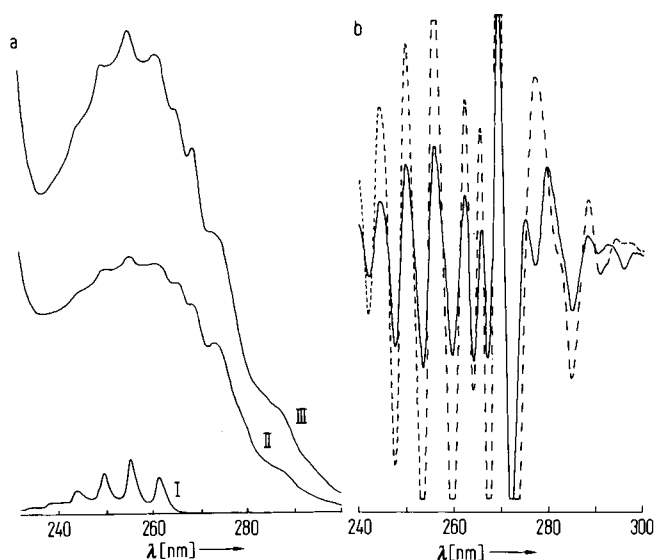


Abb. 12. Benzol in Benzin. SD 1 cm, Spalt 1 nm, Scan 2 nm/s (vgl. Hexan). a) Grundspektren; I: 100 ppm Benzol in Hexan; II: Normalbenzin (0.1 % in Hexan); III: Superbenzin (0.1 % in Hexan); b) 3. Ableitung von II (—) und III (---).

5.4. Lebens- und Genußmittel

Die Ableitungsspektrophotometrie ermöglicht z. B. eine einfache quantitative Bestimmung von Saccharin in Fruchtsäften. Durch geeignete Einstellung des Differentiators kann man den Untergrund, der von dem leicht trüben Fruchtsaft hervorgerufen wird, herausfiltern und erhält dann das ungestörte Derivativspektrum. 1 ppm Saccharin ließ sich so noch bestimmen.

Auch komplizierte Gemische wie etwa ober- und untergärige Biere lassen sich charakterisieren. Während man bis zur 3. Ableitung praktisch noch keine Unterschiede zwischen Vollbier und Weißbier feststellen kann, gelingt dies ab der 4. Ableitung (Abb. 13). Man kann sogar die Erzeugnisse mehrerer Hersteller identifizieren (Abb. 14). Hier bewährt sich die Auswertung des Quotienten $\overline{BC}:\overline{CD}$, der mit dem Faktor \overline{AB} , der für die beiden Sorten jeweils typisch ist, multipliziert wird. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen liegen die Kennzahlen aller von uns untersuchten Weißbiersorten (Weizenbiere) zwischen 25.7 und 31.0, die der Vollbiere zwischen 33.0 und 37.6.

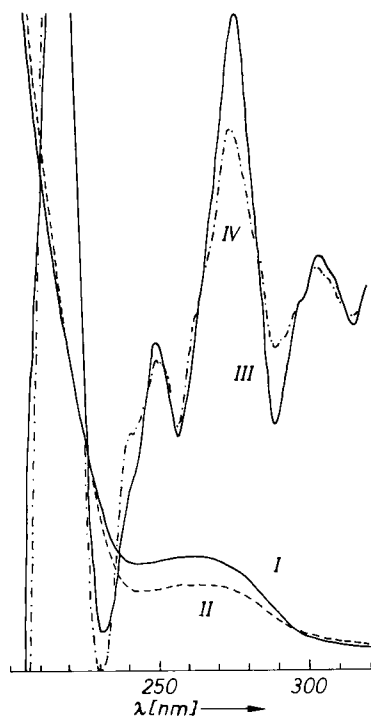


Abb. 13. Charakterisierung von Biersorten (0,4 % in H_2O , Bereich 2 E). I: Grundspektrum Vollbier hell; II: Grundspektrum Weizenbier; III: 4. Ableitung von I; IV: 4. Ableitung von II; Spalt 1 nm, Scan 5 nm/s, SD 1 cm.

Ähnlich kann man auch Milchsorten wie etwa unbehandelte Kuhmilch, H-Milch oder Magermilch untersuchen und den Proteingehalt bestimmen. Die DSHO-Methode läßt sich auch z. B. auf die Analyse ungesättigter Fettsäuren in Fetten anwenden (Hexan als Lösungsmittel).

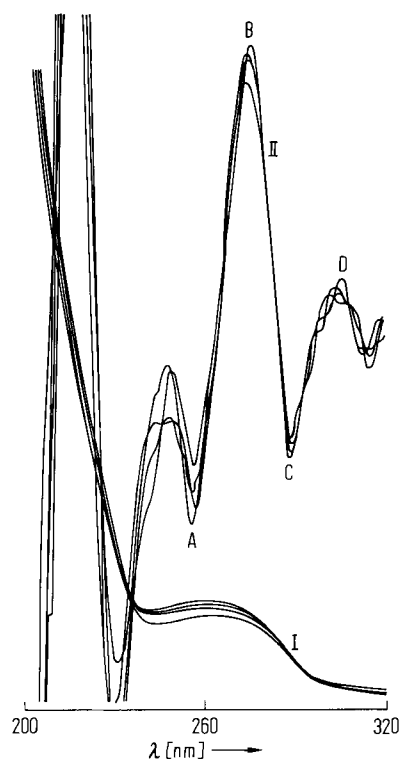


Abb. 14. Charakterisierung von Vollbier verschiedener Hersteller. I: Grundspektren (0,4 % in H_2O); II: 4. Ableitung; SD 1 cm, Spalt 1 nm, Scan 5 nm/s. Ausgewertet wurden die Extrema A, B, C, D.

5.5. Arzneimittel

Cysteamin (2-Aminoethanthiol) und Vitamin C (Ascorbinsäure) werden u. a. im Strahlenschutz sowie bei der Behandlung der Ketonurie verwendet. Beide Verbindungen reduzieren Iodlösung. Zwar kann man Vitamin C auch z. B. nach der Methylenblaumethode störungsfrei bestimmen, doch ist es einfacher, den Gehalt beider Substanzen simultan aus der fünften Ableitung zu entnehmen (Abb. 15). Eine so hohe Ordnung ist hier erforderlich, da sich das Cysteamin-Spektrum mit einem Teil des Vitamin-C-Spektrums sehr ungünstig überlagert. Man kommt dennoch zum Ziel, wenn man in der 5. Ableitung des Vitamin-C-Spektrums zuerst das Verhältnis von \overline{AB} zu $\overline{A'N}$ (N = Null-Linie) ermittelt, dann die 5. Ableitung des Spektrums des Gemisches aufnimmt, den Vitamin-C-Anteil des Maximums bei ≈ 200 nm über das im Vorversuch bestimmte Verhältnis berechnet und ihn abzieht ($\overline{DN} - \overline{A'N} = \overline{A'D} \sim \text{Cysteamin}$).

Wir haben die DSHO-Methode auch mit Erfolg bei der Untersuchung von Cortisonen, Azulen, Pflanzenextrakten und Teeaufgüssen angewendet.

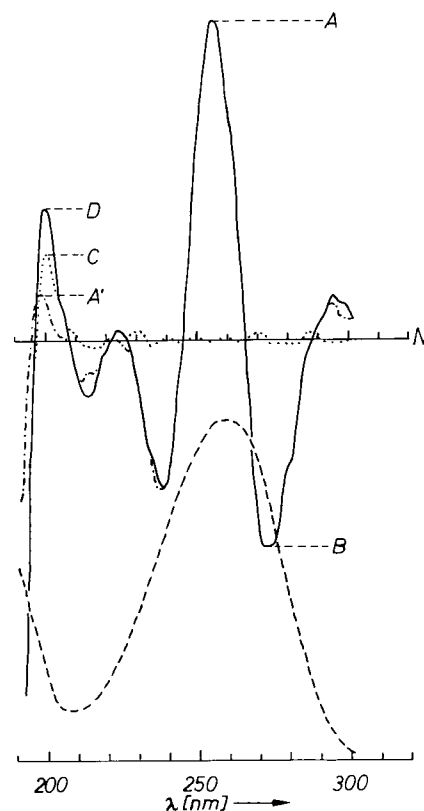


Abb. 15. Simultane Bestimmung des Gemisches von Cysteamin (Konz. 6 mg/l) und Vitamin C (Konz. 15 mg/l); SD 1 cm, Spalt 1 nm, Scan 5 nm/s. Grundspektrum des Gemisches (---); 5. Ableitung Vitamin-C-Spektrum (---); 5. Ableitung Cysteamin-Spektrum (.....); 5. Ableitung Gemisch-Spektrum (---) A, A', B, C, D, N siehe Text.

5.6. Aminosäuren

Neben dem im UV-Gebiet schwach absorbierenden Cystein sind Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp) im Bereich zwischen 200 und 300 nm aktiv. Während man die einzelnen Chromophore leicht bestimmen kann, gelingt dies in Gemischen von zwei oder drei dieser Aminosäuren wegen der teilweisen Überlagerung der Spektren nur unzurei-

chend oder gar nicht (Abb. 16). Gelegentlich ist es möglich, aus dem Verhältnis der Extinktionen bei zwei Wellenlängen auf die Zusammensetzung eines Zweiergemisches zu schließen (z. B. Tyr/Phe bei pH=10). Sicherlich ließe sich das Problem durch Computeranalyse der überlagerten Kurven, wie sie bei zahlreichen anderen Gemischen mit Erfolg durchgeführt wurde, weitaus besser als durch das Extinktionsverhältnis lösen.

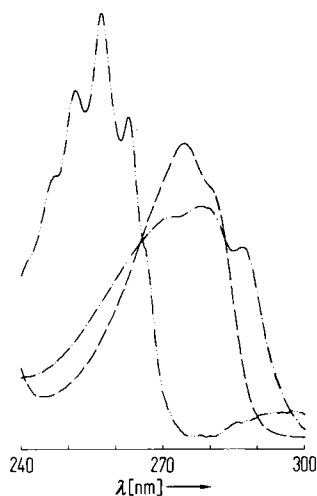


Abb. 16. Grundspektren von Tyr (---), Trp (— · — · —) und Phe (·····), Konz. jeweils $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l.

Mit digitaler Mehrkomponentenanalyse haben sich z. B. *Hirt et al.*^[84], *Kienitz*^[85], *Neuer*^[86], *Lübberts und Wodick*^[87], *Klabuhn et al.*^[88], *Junker und Bergmann*^[89] sowie *Fahr et al.*^[90] eingehend beschäftigt.

Matsushima et al.^[91] berichten über die Untersuchung von Aminosäuren und nativen Proteinen durch Derivativspektrophotometrie. Sie konnten die Empfindlichkeit der Bestimmung von Phe neben Tyr und Trp durch diese Methode wesentlich erhöhen. Auch *Ichikawa*^[91] zeigte, daß die 2. Ableitung des Tyr- und Trp-Spektrums die charakteristischen Banden des Spektrums von Phe im Bereich von 245 bis 270 nm nicht beeinflusst. *Schmitt*^[11] weist auf die als „Aromatenpeak“ bekannte breite Bande um 280 nm hin, die auf Phe, Tyr und Trp zurückzuführen ist und in der 2. Ableitung eine überraschend ausgeprägte Feinstruktur zeigt. Er erörtert auch die Möglichkeit, ob nicht die drei aromatischen Aminosäuren in unhydrolysierten Proteinen nebeneinander quantitativ erfaßbar wären, wenn das breite Maximum durch Derivativspektrophotometrie aufgelöst wird.

Tabelle 1. Simultane Zweikomponentenbestimmung von Tyr, Trp und Phe. Gesamtkonzentration der Aminosäuren $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l.

Mol-Verh.	Aminosäure	pH	Ableitung	max. Fehler [%]
Tyr – Trp				
10:1 – 2:1	Tyr	7	2.	96 ± 6
7:1 – 1:4	Tyr	10	1.	92 ± 5
7:1 – 1:2	Tyr	10	3.	105 ± 6
10:1 – 1:4	Trp	7	1.	106 ± 6
Phe – Tyr				
7:1 – 1:7	Phe	7	4.	90 ± 4
7:1 – 1:7	Tyr	7	0.–4.	100 ± 5
Phe – Trp				
4:1 – 1:4	Phe	7	4.	96.5 ± 4
4:1 – 1:4	Trp	7	0.–4.	100 ± 5

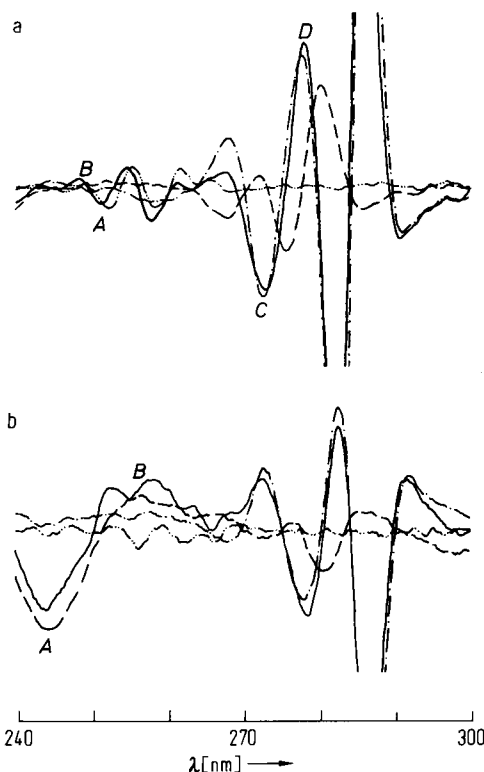


Abb. 17. Simultane Bestimmung von Phe, Trp und Tyr (Konz. je $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l). SD 1 cm, Spalt 1 nm, Scan 2 nm/s, Bereich 2 E; Tyr (---), Trp (— · — · —), Phe (·····), Gemisch von Tyr, Trp und Phe (—); a) 4. Ableitung, pH=7. AB ist der Konzentration von Phe, CD der von Trp proportional; b) 3. Ableitung, pH=10. AB ist der Konzentration von Tyr proportional.

Unsere bisherigen systematischen Untersuchungen haben ergeben, daß man bei Zweikomponentengemischen in bestimmten Grenzen molarer Verhältnisse sehr wohl befriedigende Resultate erzielen kann (Tabelle 1).

Tabelle 2. Simultane Dreikomponentenbestimmung von Tyr, Trp und Phe. Gesamtkonzentration der Aminosäuren $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Molverhältnis Tyr:Trp:Phe: 1:1:1, 4:1:1, 1:4:1, 1:1:4, 4:1:4, 4:4:1 oder 1:4:4.

Aminosäure	pH	Ableitung	max. Fehler [%]
Tyr	10	3.	Phe: Tyr ≤ 4:1 100 ± 10
			Phe: Tyr ≥ 4:1 107.5 ± 17.5
Trp	7	1.	112.6 ± 12
		4.	100 ± 10
Phe	7	4.	93 ± 10

Liegen Dreikomponentengemische vor, so bestimmt man Phe und Trp am besten aus der 4. Ableitung bei pH=7, Tyr dagegen aus der 3. Ableitung bei pH=10 (Gesamtkonzentration $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l; Tabelle 2, Abb. 16 und 17). Weitere Versuche müßten noch klären, ob man den maximalen Fehler der Bestimmung, der bei ± 10% liegt, verringern kann.

5.7. Peptide und Proteine

Wir haben auch geprüft, ob sich Phe, Tyr und Trp wie in Dreiergemischen der freien Aminosäuren auch in unhydrolysierten Peptiden und Proteinen direkt bestimmen lassen. Nach den bisherigen Ergebnissen scheint dies zumindest in wäßriger Lösung nicht ohne weiteres zu gelingen. In den mei-

sten Fällen findet man nämlich einen zu niedrigen Gehalt, wenn man mit den freien Aminosäuren eicht. Phe gibt noch die besten Werte (± 5 bis $\pm 10\%$ Abweichung). Schwierigkeiten bereitet vor allem die unterschiedliche chemische Umgebung der Chromophore, da dadurch sowohl eine Verschiebung der Maxima und Verbreiterung der Peaks als auch eine Änderung der ϵ -Werte eintreten kann. Vielleicht gelingt es aber durch Zusatz organischer Lösungsmittel, stark denaturierender Substanzen oder von Stoffen, die eine gleichmäßige Solvation und Durchdringung der Moleküle bewirken (Perturbationseffekt), zum Ziele zu kommen.

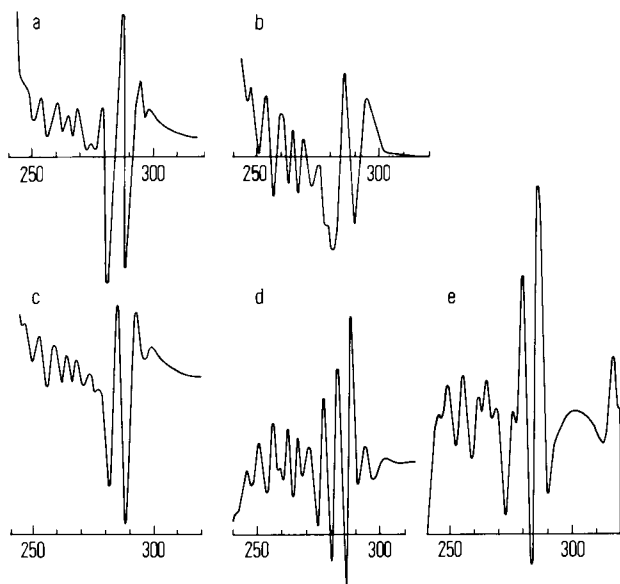


Abb. 18. Beispiele für „Fingerprint-Spektren“, jeweils 3. Ableitung, Konzentration 500 mg/l, SD 1 cm, Spalt 1 nm, Scan 2 nm/s. a) γ -Globulin aus Rinderserum (invertiert); b) Katalase (pH = 8, invertiert); c) Fibrinogen (invertiert); d) Aldolase aus Kaninchenmuskel; e) Cytochrom C aus Pferdeherz; Zahlenwerte: Wellenlänge λ in [nm].

Die Derivativspektrophotometrie, besonders die höherer Ordnung, eignet sich jedoch vorzüglich als „Fingerprint“ zur Charakterisierung, Reinheitsprüfung und Identifizierung von Proteinen anhand eines Spektrenkataloges. Eine kleine Auswahl an Spektren (3. Ableitung) – von γ -Globulin (Abb. 18a), Katalase (Abb. 18b), Fibrinogen (Abb. 18c), Aldolase (Abb. 18d) und Cytochrom C (Abb. 18e) – möge als Beispiel dienen.

Wir haben die DSHO-Methode auch erfolgreich beim Studium der Proteindenaturierung (Abb. 19a) sowie der Untersuchung modifizierter Proteine eingesetzt. Man kann so z.B. die Acetylierung von Trypsin verfolgen oder Albumine (Abb. 19b) charakterisieren. Auch ließ sich der Einfluß von Lösungsmitteln auf Proteine und deren Struktur studieren.

5.8. Trübe Lösungen, Suspensionen und Emulsionen

Trübe Lösungen und suspendierte oder emulgierte feste oder flüssige Stoffe erschweren spektrophotometrische Untersuchungen sehr stark. Durch die besonders im UV-Bereich auftretende Streuung wird das Spektrum der interessierenden Substanz einem mehr oder weniger starkem Untergrund überlagert und verliert darüber hinaus sehr an Intensität. Butler und Hopkins^[77–79] empfehlen z.B. zur Untersuchung von Pigmenten in Hefezellen und Chloroplasten wegen der höheren Lichtausbeute Einstrahlgeräte. Den Untergrund eliminieren sie mit einem Funktionssimulator^[79] oder berechnen digital off-line über einen Speicher die 2. und 4. Ableitung^[77, 78].

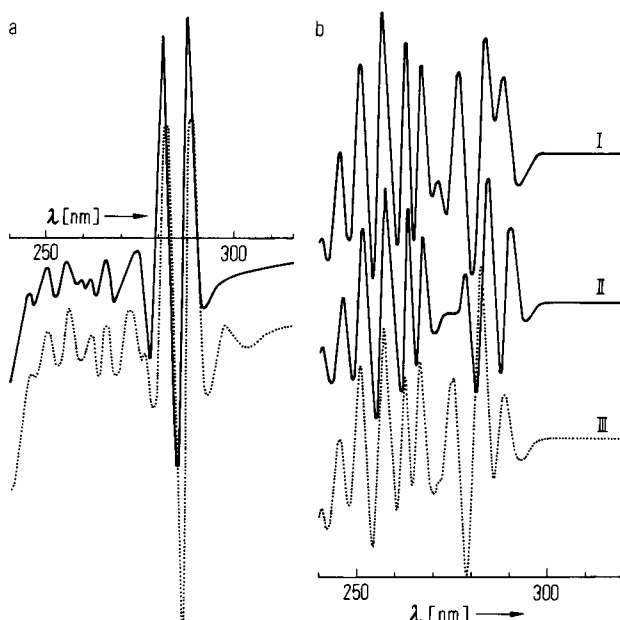


Abb. 19. a) Denaturierung von Rindertrypsin (Konz. 500 mg/l), 3. Ableitung; natives Enzym (---), in 6 M Harnstofflösung denaturiertes Enzym (—); SD 1 cm, Spalt 1 nm, Scan 2 nm/s; b) Spektren mehrerer Albumine (Konz. 500 mg/l), 3. Ableitung; SD 1 cm, Spalt 1 nm, Scan 2 nm/s; I: Rinderalbumin; II: Hühneralbumin; III: methyliertes Hühneralbumin.

Bei unseren Untersuchungen verwendeten wir ein Zwei-strahlgerät, dessen Probe- und Vergleichsstelle sich unmittelbar vor dem Multiplier befanden, wodurch die Energieausbeute bei stark streuenden Substanzen wesentlich erhöht werden konnte.

Je nach Schwierigkeit des Problems verwendeten wir die 3., 4. oder 5. Ableitung. Wir untersuchten mehrere Milchsorten, Sahne, Molke, Sauermilch, Joghurt und Speisequark, aber auch trübe Fruchtsäfte, Polysulfide, Kieselgur- und Bentonitaufschlämmungen.

5.9. Feststoffe

Eine sehr interessante und wirkungsvolle Anwendung findet die Derivativspektrophotometrie höherer Ordnung bei der Untersuchung von hochviskosen Flüssigkeiten, Gelen und festen Stoffen.

Für qualitative Untersuchungen genügt es, die fein pulverisierte Probe zwischen zwei Suprasil-Platten zu bringen, von denen die eine 0,2 mm tief eingeschliffen ist. Vorteilhaft sind auch hier Geräte, deren zweiter Probenraum sich unmittelbar vor dem Multiplier befindet. Pasten und hochviskose Flüssigkeiten kann man direkt in dünner Schicht auf ein Glas- oder Quarzplättchen aufbringen. Ebenso verfährt man mit Folien und Gelen, in die man auch z.B. unlösliche Stoffe einarbeiten kann.

Eine weitere Anwendung bildet die Untersuchung von Papier- und Dünnschichtchromatogrammen. Man sucht sich auf der Folie eine adsorbierende Stelle aus und nimmt hier ein Derivativspektrum auf. Aus dem „Fingerprint“ kann dann anhand eines Spektrenkataloges der infrage kommenden Substanzen die unbekannte Verbindung identifiziert werden.

Man kann auch Substanzen durch Adsorption an eine geeignete Säulenfüllung anreichern und den Feststoff dann, wie oben angegeben, analysieren.

Wir haben uns auch, ähnlich wie bei der IR-Spektroskopie, KBr-Preßlinge von konstantem Gewicht (300.0mg) und zur Erzielung gleicher Dicke unter konstantem Preßdruck hergestellt. Die bisherigen Ergebnisse lassen erwarten, daß das Problem der Quantifizierung gelöst werden kann. Durch Standardisierung der Tablettierungsbedingungen und Mittelung mehrerer Messungen in verschiedenen Tablettenpositionen versuchen wir, z. B. bei proteinhaltigen Proben den Proteingehalt direkt zu bestimmen, ohne vorher hydrolysieren oder den Gesamtstickstoff erfassen zu müssen. Abbildung 20a gibt die

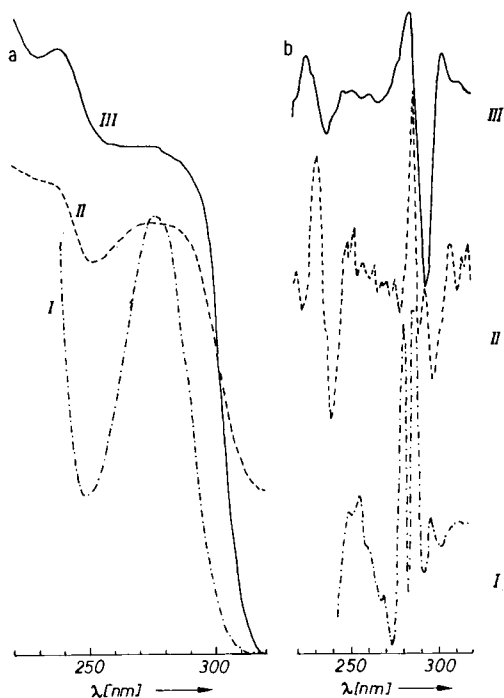


Abb. 20. a) Grundspektren von Rindertrypsin. I: wässrige Lösung (Konz. 500 mg/l); SD 1 cm; II: Pulver, SD 0.2 mm, III: KBr-Preßling (3 mg Protein in 300 mg KBr), SD 0.9 mm; b) 4. Ableitung der Spektren I bis III aus Abb. 20a. Spalt 1 nm, Scan 2 nm/s.

sehr wenig aussagenden Grundspektren von Rindertrypsin in wässriger Lösung, in Pulverform und als KBr-Preßling wieder. Dagegen bringt die 4. Ableitung der Spektren sehr differenzierte, für Trypsin charakteristische Fingerprints (Abb. 20b). Wir haben so auch wasserunlösliche trägergebundene Enzyme untersucht.

5.10. Gase und Dämpfe

Es sei auch noch auf die Anwendung der Derivativspektrophotometrie höherer Ordnung (DSHO-Methode) zur Analyse von Gasen und Dämpfen hingewiesen. Man bringt dazu z. B. einen Tropfen einer leicht verdampfenden Flüssigkeit in eine mit einem Schliffstöpsel dicht verschließbare Küvette und thermostatisiert auf Temperaturen oberhalb ca. 20°C oder saugt die gasförmigen Substanzen direkt in die evakuierte Küvette. Für kontinuierliche Untersuchungen pumpt man das Gas- oder Dampfgemisch z. B. mit einer Schlauchpumpe durch eine Durchflußküvette. Schließlich kann man auch Dämpfe an Folien binden, die mit Adsorptionsmitteln beschichtet sind und dann wie in Abschnitt 5.9 beschrieben verfahren.

5.11. Andere Anwendungsgebiete

Wir haben die DSHO-Methode auch zur Charakterisierung von Copolymeren sowie speziell zur Untersuchung von Azopolycarbonaten^[92] verwendet. Vorversuche zum Nachweis von Additiven in Polymeren verliefen erfolgversprechend.

Von Biopolymeren untersuchten wir außer den in Abschnitt 5.7 genannten Proteinen auch Ribonucleinsäuren.

Auf dem Gebiet der Klinischen Chemie sind Untersuchungen von Serum und Harn zu nennen (Gesamtporphyrin, Proteine, Nachweis von Metaboliten und Arzneimittelspuren).

Da die DSHO-Methode die Empfindlichkeit vieler Nachweisverfahren drastisch erhöhen kann, haben wir die Analogrecheneinheit auch vorteilhaft zur Untersuchung kinetischer Vorgänge, insbesondere der Kinetik von Enzymreaktionen sowie der des thermischen Zerfalls von Azoverbindungen^[92], verwenden können.

Zuletzt sei noch auf die Verwendung der Derivativspektrophotometrie höherer Ordnung zur Charakterisierung von Säuleneluatanten hingewiesen. Für die Differenzierung der Elutionsdiagramme selbst entwickeln wir derzeit einen Analogdifferenziator mit besonders großen Differentiationszeitkonstanten, der sich auch für sehr langsam ablaufende Vorgänge eignen sollte.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die angeführten Beispiele sind nur ein kleiner Ausschnitt aus den vielseitigen und breiten Anwendungsmöglichkeiten der DSHO-Methode. Diese verbesserte analoge on-line-Analysestechnik erschließt der UV/VIS-Spektrophotometrie eine neue Dimension der Aussagekraft und eröffnet mit relativ einfachen Mitteln neue Anwendungsgebiete.

Besondere Vorteile bietet die Derivativspektrophotometrie höherer Ordnung in folgenden Fällen:

Spurenanalysen, Reinheitsprüfungen, Qualitätskontrolle, Trennung überlagerter Spektren (Mehrkomponentenanalyse), Eliminierung von Untergrundadsorption, Untersuchungen trüber Lösungen und Suspensionen, Feststoffuntersuchungen und Charakterisierung von Substanzen und Substanzgemischen.

Außerdem kann die Derivativspektrophotometrie z. B. beim Studium reaktionskinetischer Vorgänge, bei der Untersuchung der Adsorption an Oberflächen von Katalysatoren oder Makromolekülen sowie bei der Prüfung des Einflusses von Lösungsmitteln und chemischer Umgebung auf chromophore Gruppen wertvolle Hilfe leisten.

Die Höhe der Ableitungsordnung wird von Fall zu Fall variieren. Optimale Verhältnisse sind im allgemeinen dann erreicht, wenn alle Schultern und Wendepunkte eines unipolaren Grundspektrums in bipolare Maxima und Minima übergeführt wurden. Dann gelingt auch die selektive Filterung höherfrequenter Störsignale (Rauschen) am besten, was zu sehr guter Reproduzierbarkeit und engen Fehlerbereichen trotz hoher spektraler Auflösung führt. Man erreicht dies in der Regel mit der 3., 4. oder 5. Ableitung. Derivativspektren noch höherer Ordnung bringen – wir haben dies kürzlich bis zur 9. Ordnung geprüft –, nur in Ausnahmefällen mehr Aussagekraft, da sich mit steigender Ordnung auch die Zahl der Extrema und damit die Kompliziertheit der Spektren erhöht (was manchmal für Fingerprints von Vorteil sein kann).

Die stürmische Entwicklung der Derivativspektrophotometrie höherer Ordnung wird voraussichtlich noch einige Zeit anhalten und zu neuen Geräten führen, bei denen man sowohl den einfacheren Weg über on-line-Analogverarbeitung als auch den aufwendigeren Weg digitaler Berechnungen über Zwischenspeicher mit all ihren Vor- und Nachteilen beschreiten wird. Sicherlich wird diese so leistungsfähige Methode nicht auf wenige Forschungslaboratorien beschränkt bleiben, sondern vor allem in Industrie- und Untersuchungslaboratorien sowie in Kliniken zunehmend eingeführt werden. Die Vorteile der Derivativspektrophotometrie höherer Ordnung lassen einen erweiterten Anwendungsbereich der sonst relativ wenig aussagekräftigen UV/VIS-Spektrophotometrie erwarten und werden sicher zur Erschließung vieler bisher schwer zugänglicher Probleme beitragen.

Eingegangen am 21. August 1978 [A 246]

- [1] V. J. Hammond, W. C. Price, *J. Opt. Soc. Am.* **43**, 924 (1953).
- [2] E. Tannenbauer, P. B. Merkel, W. H. Hamill, *J. Phys. Chem.* **21**, 311 (1953).
- [3] J. D. Morrison, *J. Chem. Phys.* **21**, 1767 (1953).
- [4] A. T. Giese, C. S. French, *Appl. Spectrosc.* **9**, 78 (1955).
- [5] A. Kotaki, N. Sugiura, K. Yagi, *Biochim. Biophys. Acta* **151**, 689 (1968).
- [6] B. Lee, F. Richards, *J. Mol. Biol.* **55**, 379 (1971).
- [7] S. Shibata, M., Furukawa, K. Goto, *Anal. Chim. Acta* **65**, 49 (1973).
- [8] J. F. Brands, L. J. Kaplan, *Biochemistry* **12**, 2011 (1973).
- [9] A. Matsushima, Y. Inoue, K. Shibata, *Anal. Biochem.* **65**, 362 (1975).
- [10] T. E. Cook, H. L. Pardue, R. E. Santini, *Anal. Chem.* **48**, 451 (1976).
- [11] A. Schmitt, Firmenschrift Bodenseewerk Perkin-Elmer „Angewandte UV-Spektroskopie, Derivativ-Spektroskopie“, Heft 1 (1977).
- [12] G. L. Collier, F. Singleton, *J. Appl. Chem.* **6**, 495 (1956).
- [13] I. G. McWilliam, *J. Sci. Instrum.* **36**, 51 (1959).
- [14] I. G. McWilliam, J. Overland et al., *Appl. Opt.* **6**, 457 (1967).
- [15] W. Kiefer, *Chem. Instrum.* **3**, 21 (1971).
- [16] I. G. McWilliam, *Anal. Chem.* **41**, 674 (1969).
- [17] C. H. Townes, A. L. Schawlow: *Microwave Spectroscopy*. Dover, New York 1975, Kap. 14 und 15.
- [18] G. Bonfiglioli, P. Brovetto, *Phys. Lett.* **5**, 248 (1963).
- [19] Analyticum. Methoden der analytischen Chemie und ihre theoretischen Grundlagen. Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig 1971, S. 304, 328.
- [20] F. Bär, A. Berndt, K. Dimroth, *Chem. Unserer Zeit* **9**, 18 (1975).
- [21] W. Snellemann, *Spectrochim. Acta B* **23**, 403 (1968).
- [22] *Instrum. News* **20** (1969) (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, Conn.).
- [23] R. C. Elsner, J. D. Winefordner, *Anal. Chem.* **44**, 698 (1972).
- [24] W. Snellemann et al., *Anal. Chem.* **42**, 394 (1970).
- [25] W. K. Fowler, D. O. Knapp, J. D. Winefordner, *Anal. Chem.* **46**, 601 (1974).
- [26] G. L. Green, T. C. O'Haver, *Anal. Chem.* **46**, 2191 (1974).
- [27] T. C. O'Haver, B. Keppler, Pittsburgh Conference on Anal. Chem. and Appl. Spectrosc. 1972, S. 305.
- [28] J. W. Ashley, C. N. Reilley, *Anal. Chem.* **37**, 626 (1965).
- [29] W. A. Riggs, *Anal. Chem.* **43**, 976 (1971).
- [30] C. V. Evis, S. P. Perone, *Anal. Chem.* **39**, 308 (1967).
- [31] R. A. Durst, J. K. Taylor, *Anal. Chem.* **39**, 1374 (1967).
- [32] McKee-Pedersen Instr. Appl. Notes **4**, 13 (1969).
- [33] P. E. Sturrock, *J. Elektroanal. Chem.* **8**, 425 (1964).
- [34] P. E. Sturrock, G. Privett, A. R. Tarpley, *J. Electroanal. Chem.* **14**, 303 (1976).
- [35] R. Kalvoda, R. G. Clem, McKee-Pedersen Instr. Appl. Notes **7**, 25 (1972).
- [36] Siehe [19], dort S. 157.
- [37] A. Trojanek, R. Kalvoda, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **38**, 2573 (1973).
- [38] K. Yagi, T. Ozawa, M. Harada, *Nature* **184**, 1938 (1959).
- [39] H. Kubo, T. Shiga, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **44**, 657 (1962).
- [40] V. Massey, H. Gunther, *Biochemistry* **4**, 1161 (1965).
- [41] D. E. Lester, *Anal. Biochem.* **36**, 253 (1970).
- [42] H. Watari, A. Isomoto, H. Oda, M. Kuroda, *Biochim. Biophys. Acta* **167**, 184 (1968).
- [43] J. W. Strojek, D. Yates, T. Kuwana, *Anal. Chem.* **47**, 1050 (1975).
- [44] D. T. Williams, R. N. Hager, *Appl. Opt.* **9**, 1597 (1970).
- [45] R. Stäudner, *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.* **13**, 212 (1976).
- [46] G. Talsky, L. Mayring, H. Kreuzer, *Angew. Chem.* **90**, 563 (1978); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **17**, 532 (1978).
- [47] G. Talsky, L. Mayring, *Z. Anal. Chem.*, im Druck (1978).
- [48] G. Talsky, *Dtsch. Pat.-Anm. P* 2806846.4 (1978); *G* 78 04802.9 (1978).
- [49] Siehe [19], dort S. 23.
- [50] I. G. McWilliam, *Anal. Chem.* **41**, 674 (1969).
- [51] A. E. Martin, *Nature* **180**, 231 (1957).
- [52] G. Bonfiglioli, P. Brovetto, *Appl. Opt.* **3**, 1417 (1964).
- [53] E. Gunders, Ben-Zion Kaplan, *J. Opt. Soc. Am.* **55**, 1094 (1965).
- [54] F. R. Stauffer, H. Sakai, *Appl. Opt.* **7**, 61 (1968).
- [55] R. N. Hagar, R. C. Anderson, *J. Opt. Soc. Am.* **60**, 1444 (1970).
- [56] T. C. O'Haver, G. L. Green, *Int. Lab.* **5/6**, 11 (1975).
- [57] T. C. O'Haver, G. L. Green, *Anal. Chem.* **48**, 312 (1976).
- [58] S. Rabbi, J. E. Fischer, *Surf. Sci.* **37**, 576 (1973).
- [59] J. P. Pemsler, *Rev. Sci. Instrum.* **28**, 274 (1957).
- [60] E. F. McFarren, R. J. Lishka, H. J. Parker, *Anal. Chem.* **42**, 358 (1970).
- [61] E. C. Olsen, C. D. Alway, *Anal. Chem.* **32**, 370 (1960).
- [62] M. P. Klein, E. A. Dratz, *Rev. Sci. Instrum.* **39**, 397 (1968).
- [63] R. Cook, Cary Instruments Tech. Memo UV-70-8 (1970).
- [64] M. J. Milano, H. L. Pardue, T. E. Cook et al., *Anal. Chem.* **46**, 374 (1974).
- [65] M. J. Milano, H. L. Pardue, *Anal. Chem.* **47**, 25 (1975).
- [66] C. S. French, A. B. Church, R. W. Eppley, *Carnegie Inst. Washington Yearb.* **53**, 182 (1945).
- [67] F. Asrmu, A. Rucci, *Rev. Sci. Instrum.* **37**, 1696 (1966).
- [68] I. Baslev, *Phys. Rev.* **143**, 636 (1966).
- [69] C. S. French, *Proc. Instrum. Soc. Am.* **8**, 83 (1957).
- [70] L. J. Sidel, *Arch. Biochem. Biophys.* **54**, 185 (1970).
- [71] S. Shibata, *Angew. Chem.* **88**, 750 (1976); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **15**, 673 (1976).
- [72] F. Grum, D. Paine, L. Zoeller, *Appl. Opt.* **11**, 93 (1972).
- [73] Y. Inoue, T. Ogawa, T. Kawai, K. Shibata, *Physiol. Plant.* **29**, 390 (1973).
- [74] A. Savitzky, M. Golay, *Anal. Chem.* **36**, 1627 (1964).
- [75] D. Lewis et al., *J. Chem. Phys.* **53**, 2750 (1970).
- [76] J. R. Morrey, *Anal. Chem.* **40**, 905 (1968).
- [77] W. L. Butler, D. W. Hopkins, *Photochem. Photobiol.* **12**, 439 (1970).
- [78] W. L. Butler, D. W. Hopkins, *Photochem. Photobiol.* **12**, 451 (1970).
- [79] W. L. Butler, *Methods Enzymol.* **24**, 3 (1972).
- [80] M. E. Korobkov, *Fiziol. Biokhim. Kult. Rast.* **7**, 211 (1975).
- [81] G. M. Hieftje, *Anal. Chem.* **44**, 81 A (1972).
- [82] G. M. Hieftje, *Anal. Chem.* **44**, 69 A (1972).
- [83] G. M. Hieftje, *Anal. Chem.* **45**, 253 (1973).
- [84] R. C. Hirt, F. T. King, H. G. Schmitt, *Anal. Chem.* **26**, 1270 (1954).
- [85] H. Kienitz, *Z. Anal. Chem.* **164**, 80 (1958).
- [86] H. Neuer, *Z. Anal. Chem.* **253**, 337 (1971).
- [87] D. W. Lübbers, R. Wodick, *Z. Anal. Chem.* **261**, 271 (1972).
- [88] B. Klabuhn, M. Kuck, H. Goetz, *Z. Anal. Chem.* **265**, 12 (1973).
- [89] A. Junker, G. Bergmann, *Z. Anal. Chem.* **272**, 267 (1974); **278**, 191, 273 (1976).
- [90] E. Fahr, E. Büttner, W. Dindorf, M. Schmid, Vortrag auf der Dechema Jahrestagung, 15. u. 16. Juni 1978.
- [91] T. Ichikawa, H. Terada, *Biochim. Biophys. Acta* **494**, 267 (1977).
- [92] G. Talsky, J. Gerum, O. Nuyken, noch unveröffentlicht.