



FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

# FTIR Spektroskopie an dynamischen Systemen – Beispiele aus Protein- und Lebensmittelanalytik

Bernhard Lendl

Institut für Chemische Technologien und Analytik,  
TU Wien, Österreich





# Elektromagnetisches Spektrum

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

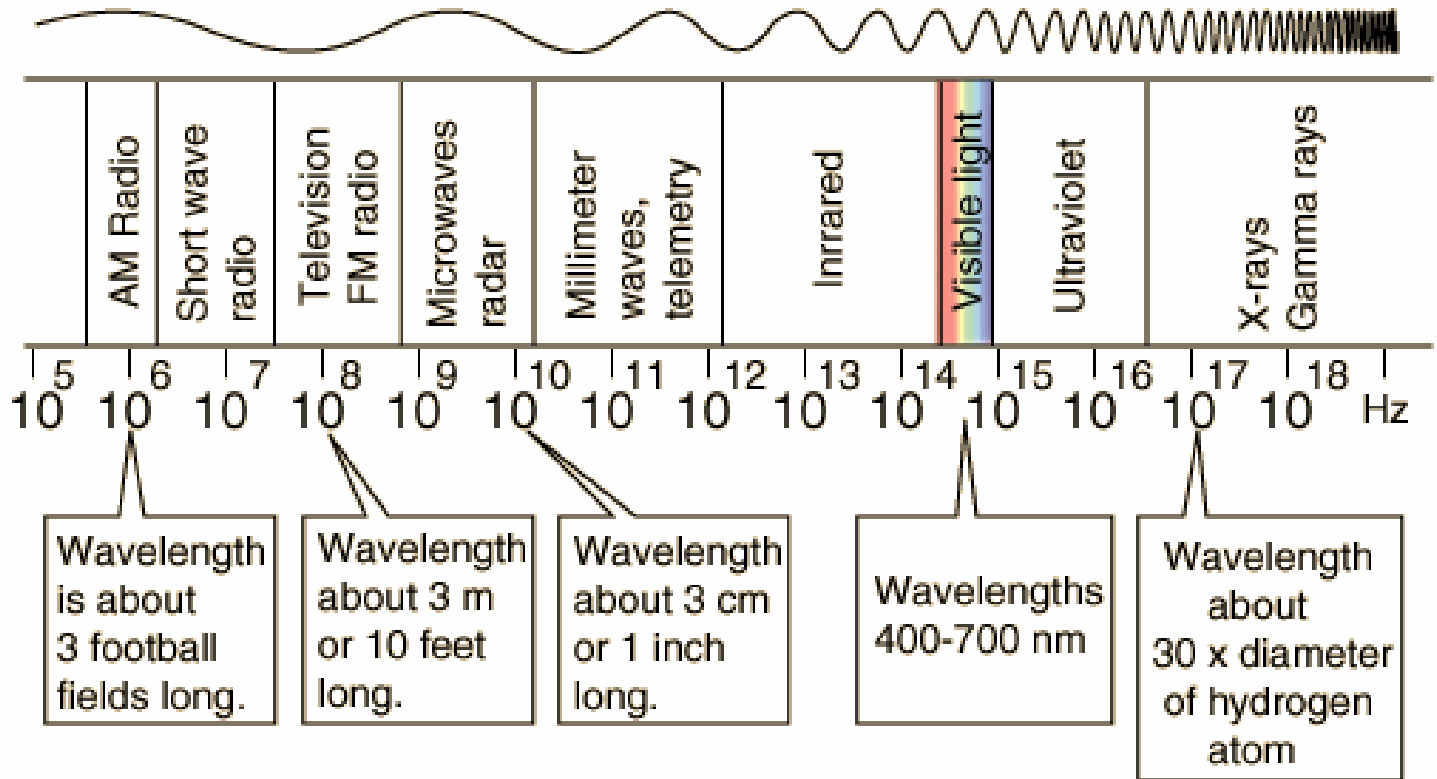
Infrarotspektroskopie

Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin



$$E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda$$

Infrarot: - Nahes IR: 0.7µm – 2.5 mm  
- Mittleres IR: 2.5 – 25 µm



# Informationsgehalt von Infrarot Spektren

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin

## ■ Funktionelle Gruppen, Fingerprint

- Identifizierung von Substanzen/Strukturelementen
- Quantitative Analyse auch Simultanbestimmungen

## ■ Inter- und Intramolekulare Wechselwirkungen

- Sekundärstrukturen von Proteinen
- Messung von Bio-ligand Wechselwirkungen

## ■ Zugang zu “latenten Variablen”

- z.B. Oktanzahl; Art der Weinsorte; Krebs ja/nein;





# Beispiel: Quantitative Multianalytbestimmung

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

## ■ On-line Fermentationsüberwachung

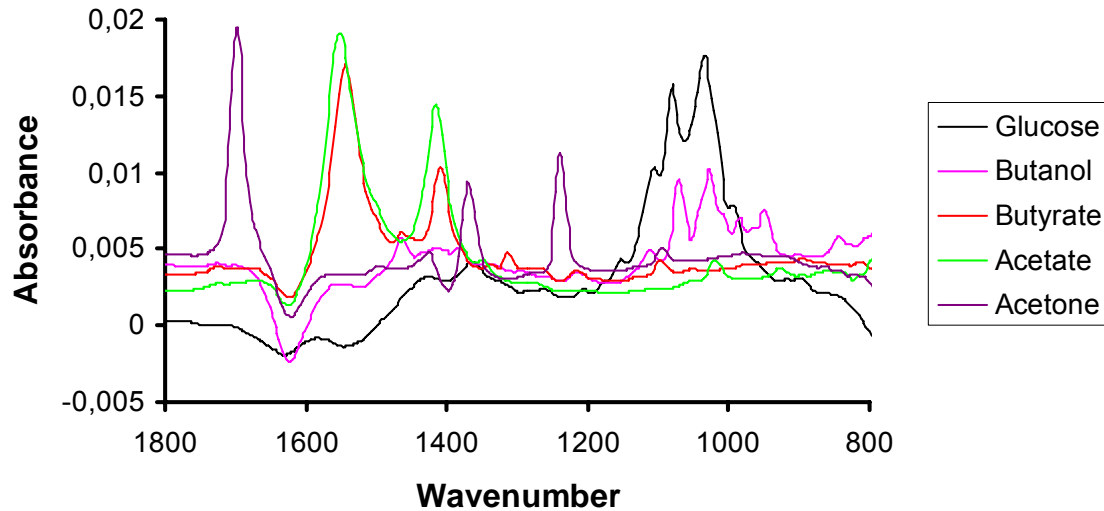
Infrarotspektroskopie

Weinsortenbestimmung

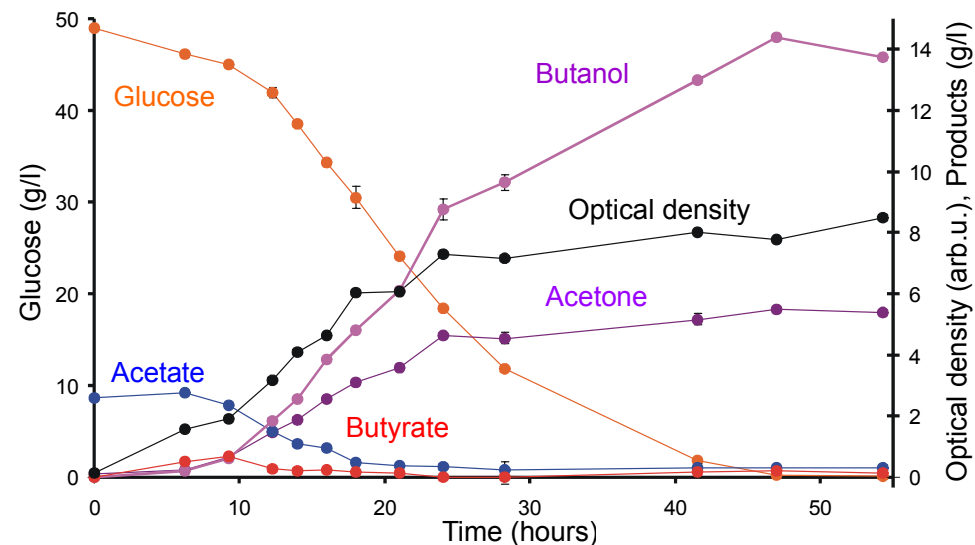
Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin



**Durch Multivariate  
Kalibration ist eine  
reagenzfreie  
Multianalytbestimmung  
(einfach) realisierbar!**





# Beispiel: Bestimmung von latenten Variablen Klassifizierung von Rotweinen - Konzept

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

Weinsortenbestimmung

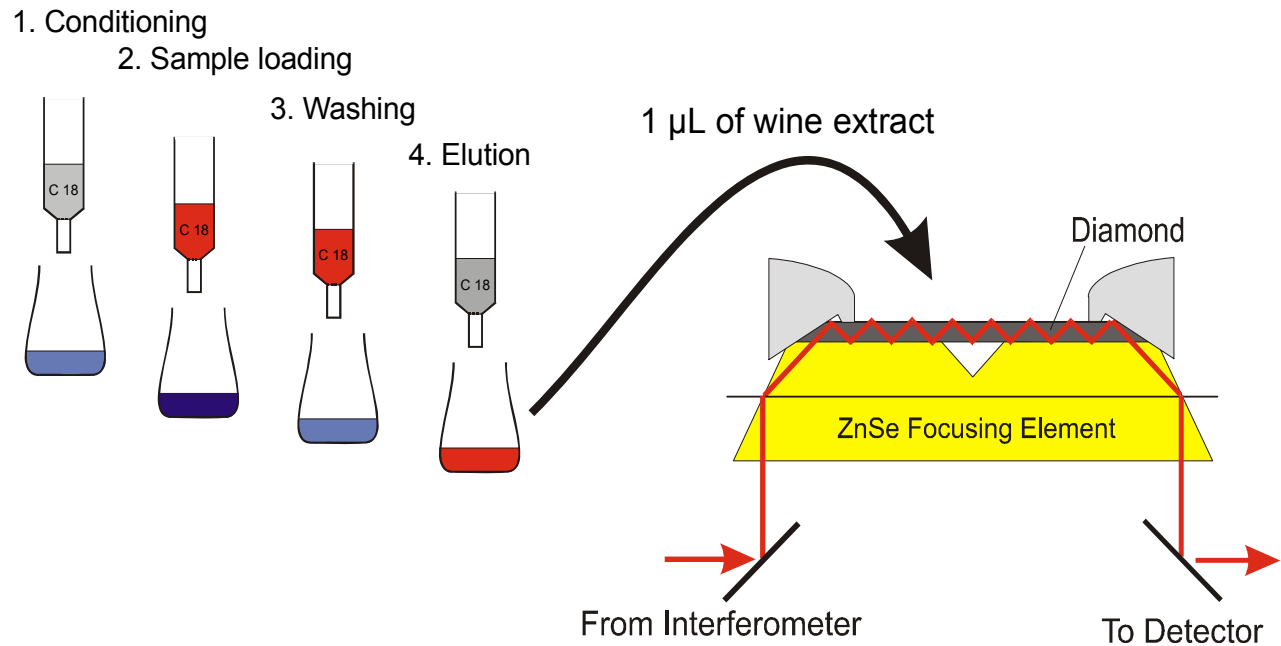
Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin

## Solid Phase Extraction

## FTIR Spectroscopy (Attenuated Total Reflection)



A. Edlmann, J. Diewok and B. Lendl *J. Agr. Food Chem.*, **49** (2001) 1139- 1145



# Klassifizierung von Rotweinen – Ergebnisse

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

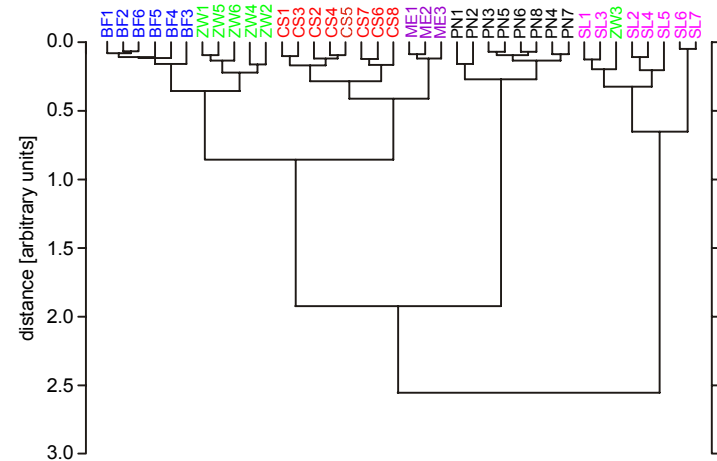
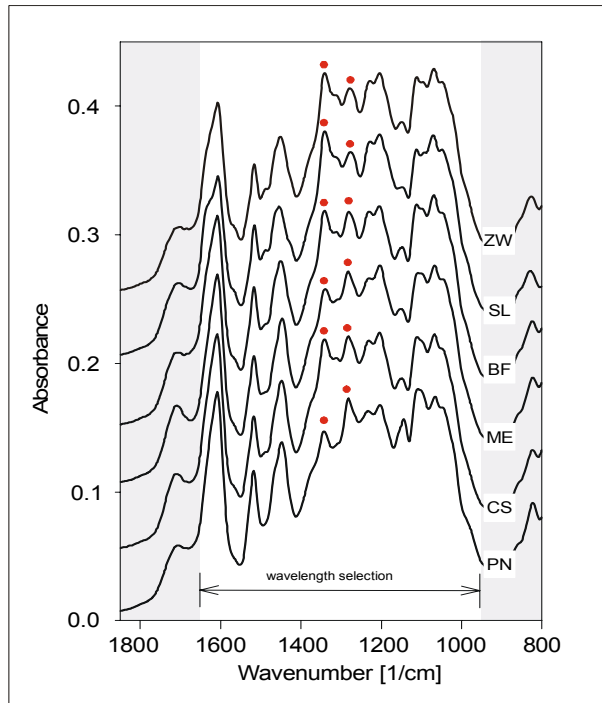
## Bsp für „latente“ Information

Infrarotspektroskopie

## Spektren der Extrakte

## Hierarchical clustering

Weinsortenbestimmung



ZW: Zweigelt, SL: St. Laurent, BF: Blaufränkis  
ME: Merlot, CS: Cabernet Sauvignon,  
PN: Pinot Noir





# Die „Optische Zunge“

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin

## Idee: Entwicklung eines „objektiven“ Geschmacksensors zur Unterstützung sensorischer Analysen

**Adstringenz** die Fähigkeit eines Weines, ein rauhes, pelziges  
Mundgefühl zu verursachen





# Quellen von Tanninen in Wein

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

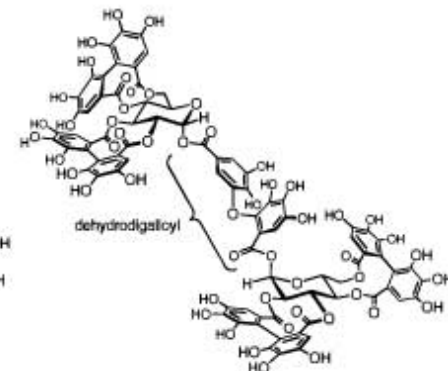
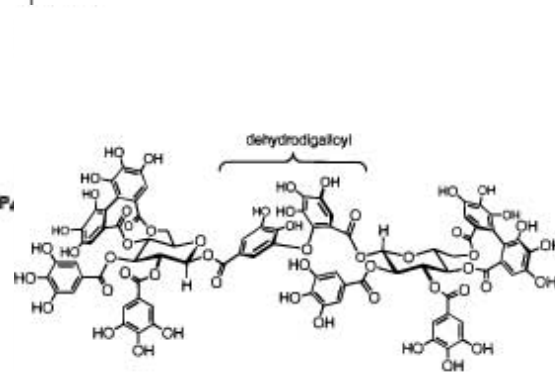
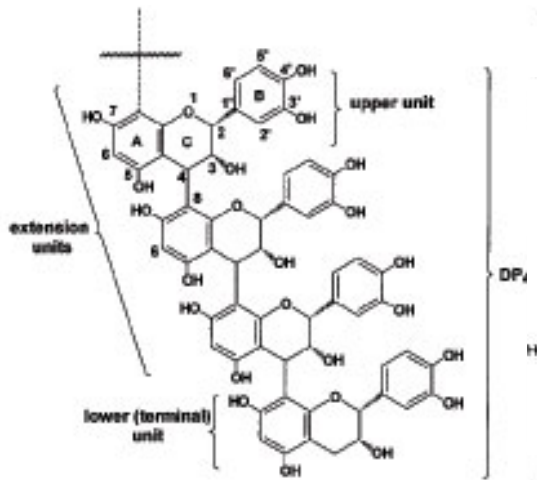
2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin

## Flavanoide



## Ellagi-(Gallo)tannins







# FTIR Spektren der Tanninbausteine

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

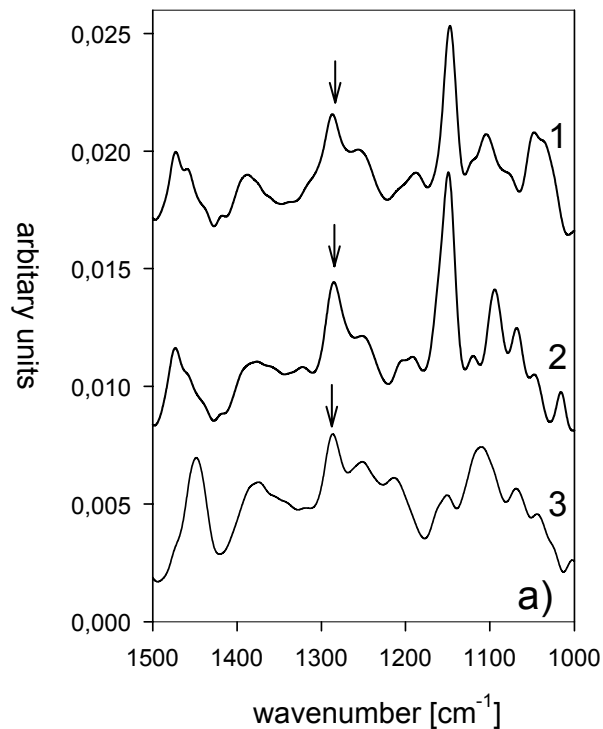
Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

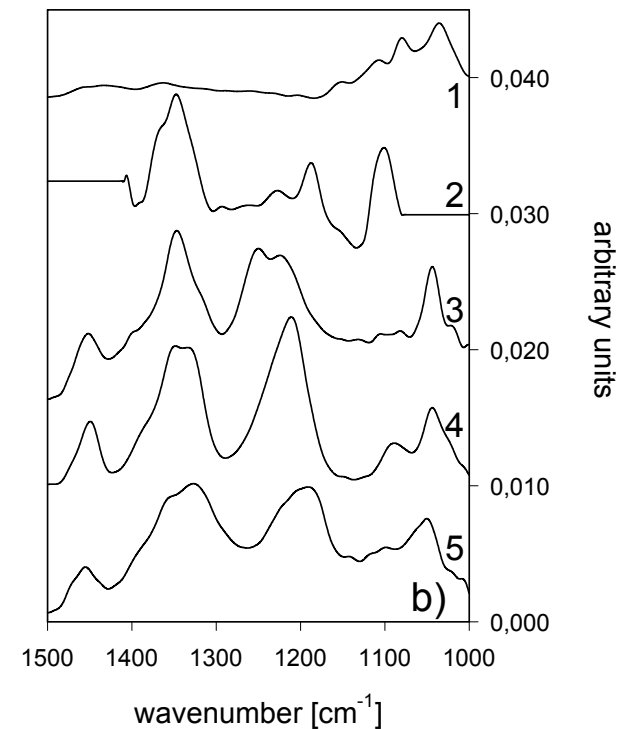
Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin

## Flavanoide (Procyanidins "grape" tannins)



1 Catechin; 2 Epicatechin  
3 Grape seed tannins

## Ellagi-(Gallo)tannins ("wood" tannins)



1 Glucose; 2 Ellagic acid  
3 Gallic acid; 4 Tannic acid  
5 Ellagitannins



# Bestimmung der Adstringenz - Konzept

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

Weinsortenbestimmung

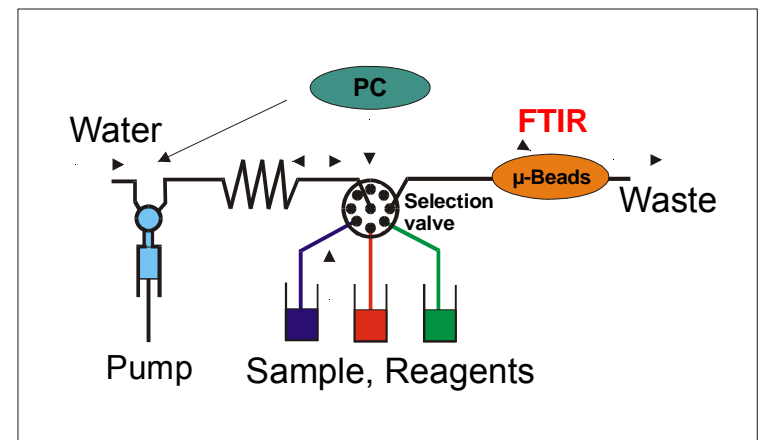
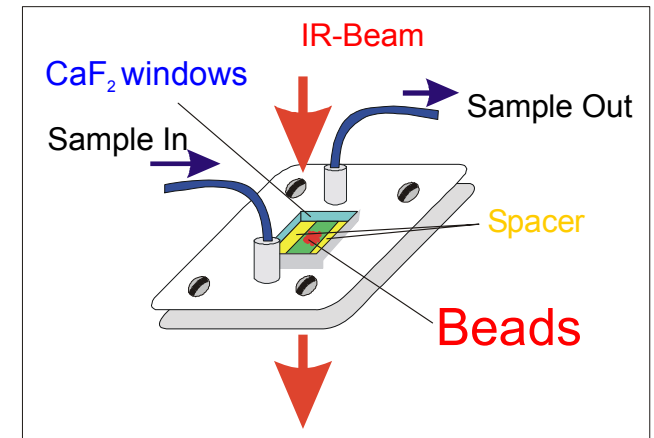
Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin

## Modellierung der Tannin-Protein Wechselwirkung

1. Immobilisierung von prolinreichen Proteinen (**gelatin**) auf einem inerten Substrat (**agarose beads**)
2. In-situ Beobachtung der Wechselwirkung zwischen Weintanninen und Proteinen mit FTIR Spektroskopie
3. Quantifizierung der Wechselwirkung





# Selektivität des Durchflusssensors

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

## Verhalten von Alkoholen, Zuckern, org. Säuren

Infrarotspektroskopie

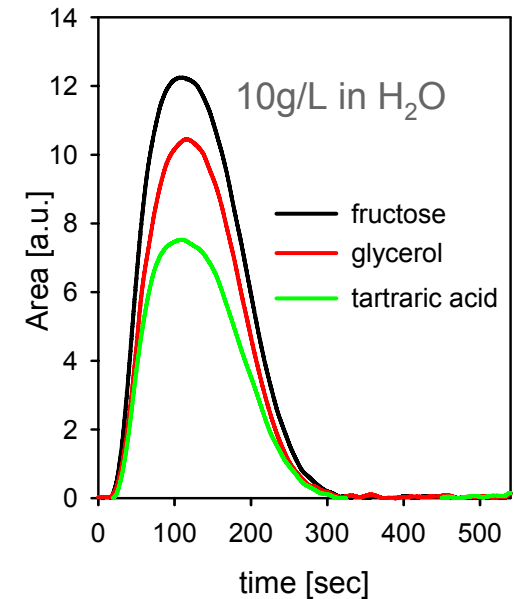
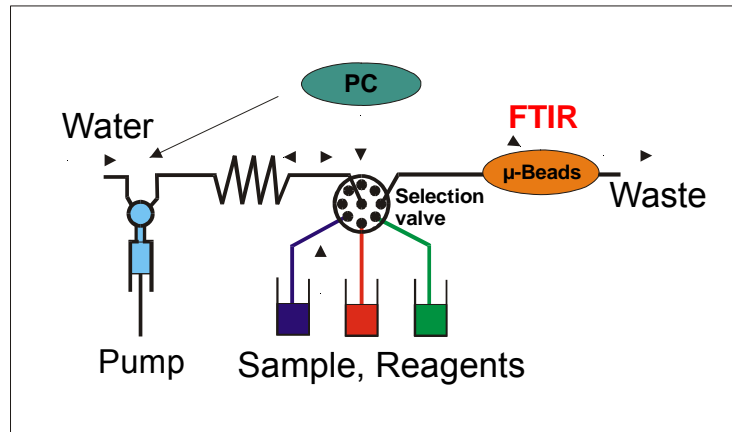
### ■ Automatisiertes Fließsystem

Weinsortenbestimmung

Zur definierten und reproduzierbaren  
Sensor – Analyte Interaktion

Keine Wechselwirkung

Optische Zunge





# Selektivität des Durchflusssensors

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

## Verhalten von Tanninen

Infrarotspektroskopie

Weinsortenbestimmung

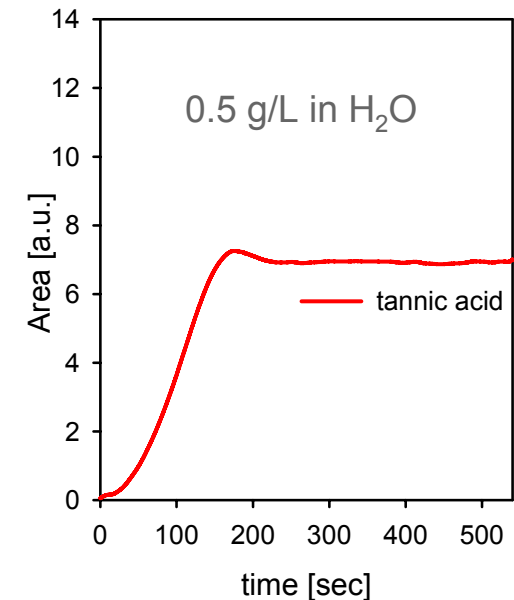
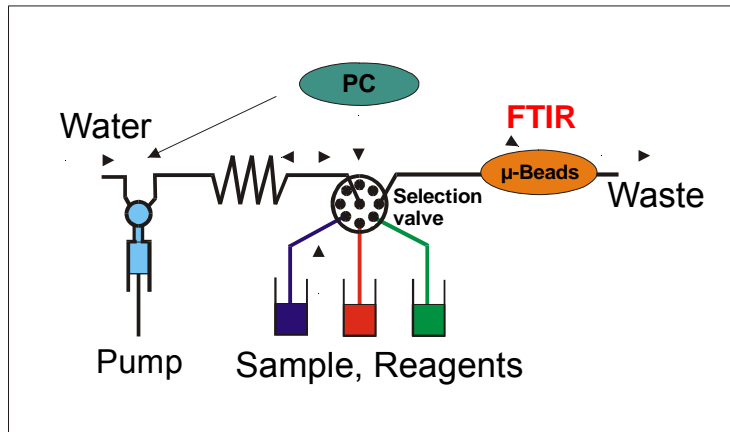
Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin

- Automatisiertes Fließsystem  
Zur definierten und reproduzierbaren  
Sensor – Analyte Interaktion

## Wechselwirkung





# Datensatz bei Analyse eines Rotweins

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

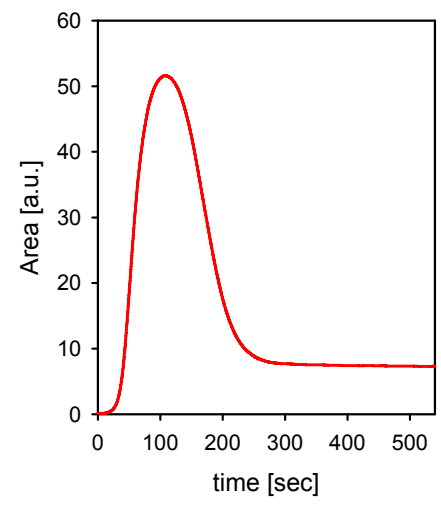
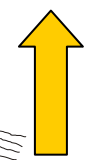
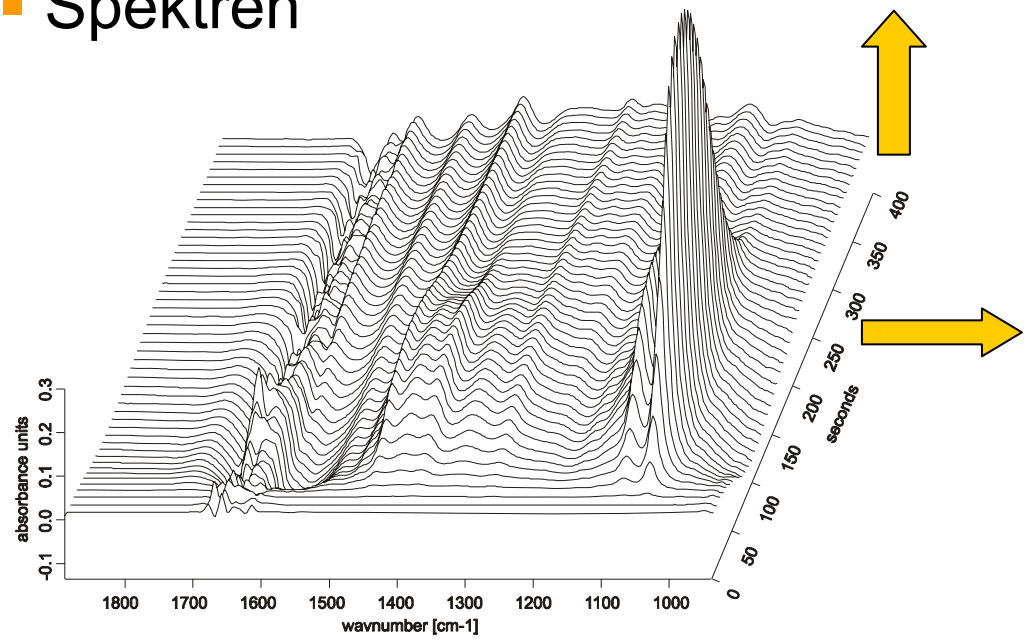
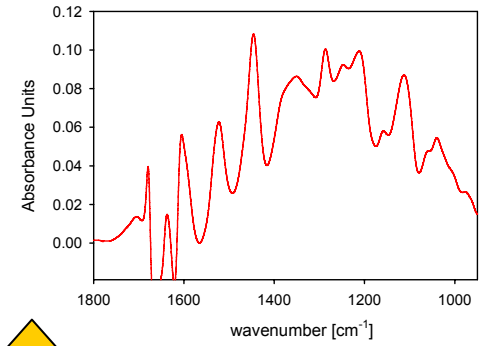
2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin

3D: Wellenzahl/Absorption/Zeit



- „Traces“ als  $f(\text{Zeit})$
- Spektren





# Standardaddition zu Rotwein

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

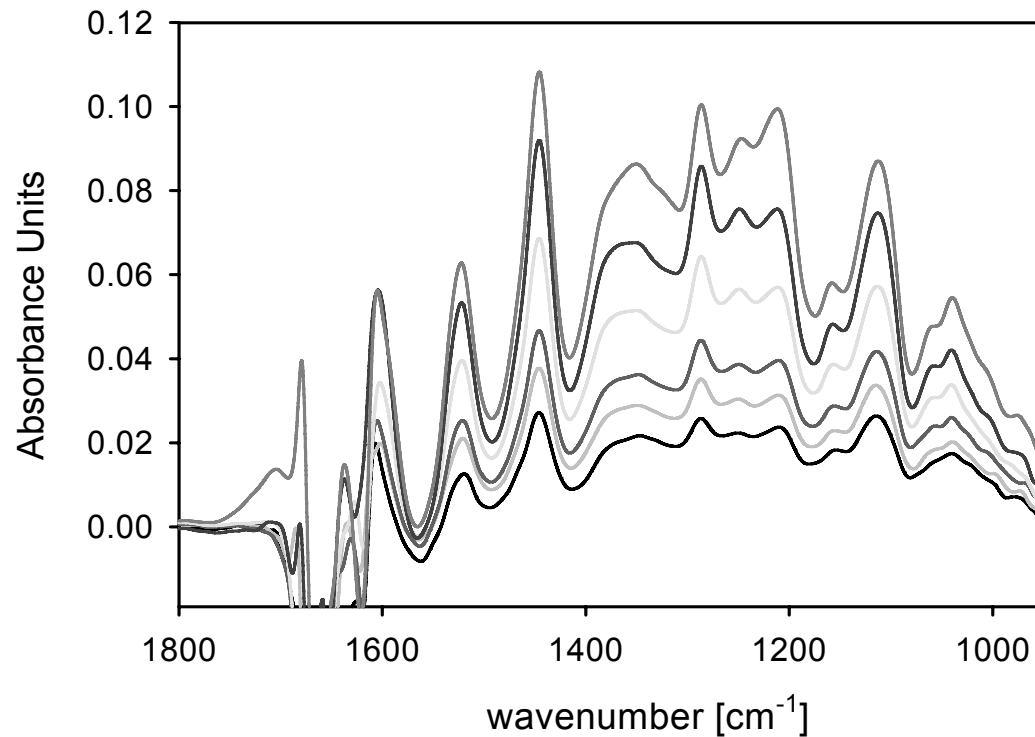
Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin

## Procyanidins example for a „grape“ tannin





# Standardaddition zu Rotwein

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

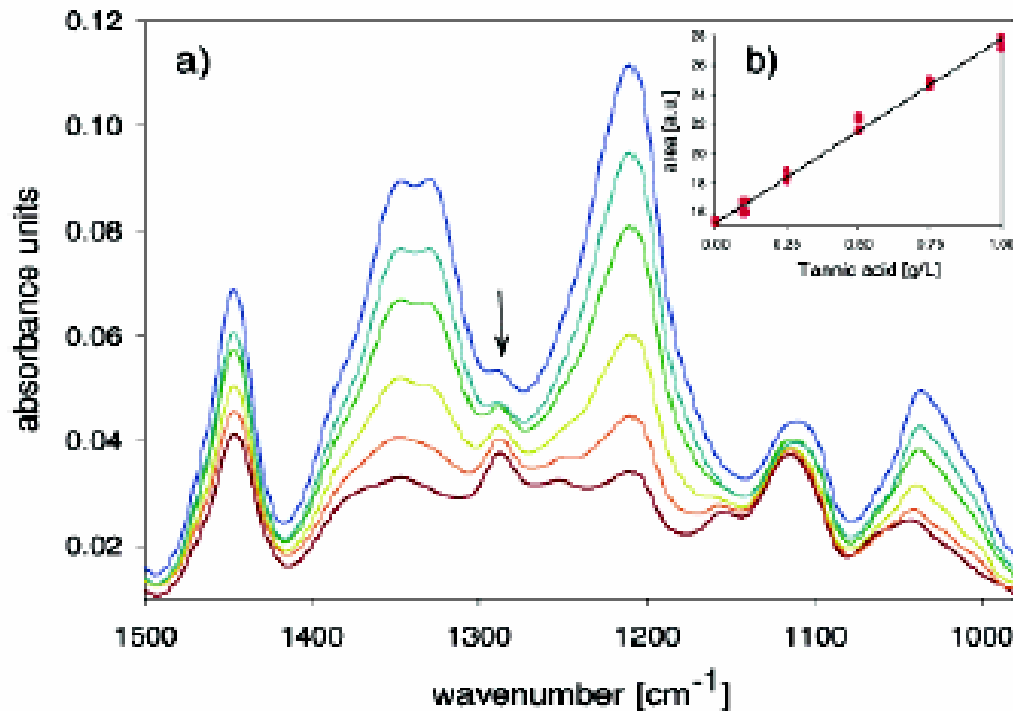
Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin

## Tannic acid example for a „wood“ tannin



Red wine was spiked with  
0.25 – 2g/L tannic acid



# Messung unterschiedlicher Rotweine

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

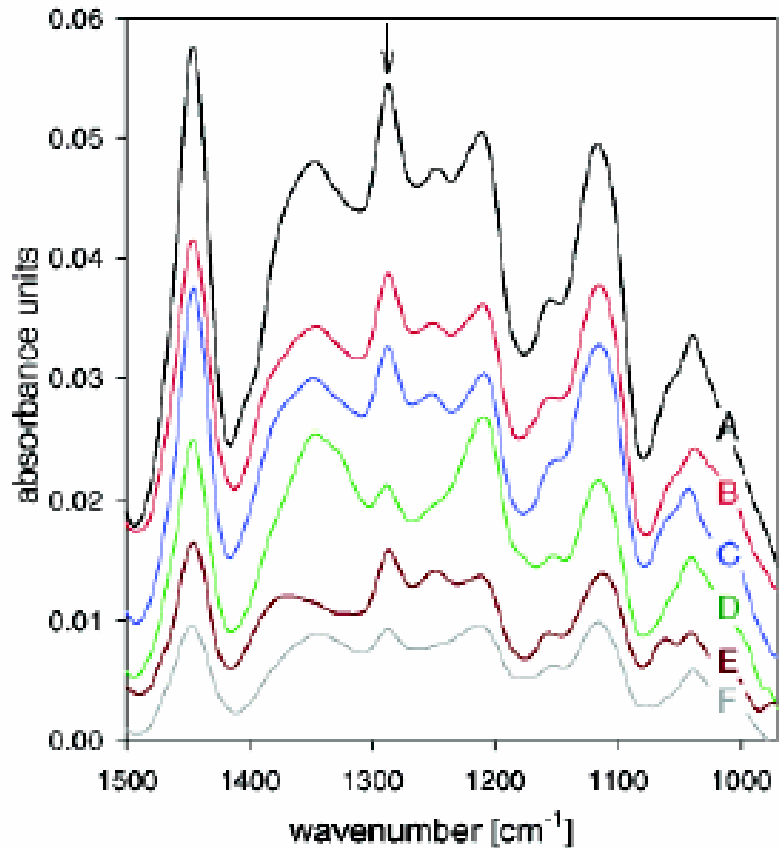
Infrarotspektroskopie

Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin



- A) *Cabernet Sauvignon*  
(1 month in new oak),
- B) *Merlot* table wine (2 years)
- C) *Zweigelt* during fermentation
- D) *Zweigelt*  
(9 month aged in new oak and  
tannin treatment)
- E) grape seed tannin 0.5 g/L  
in 10% ethanolic solution
- F) *Blauer Portugieser*  
(9 month, tannin treatment,  
already bottled).

JACS, (2002) **124**, 14741-14747





# Follow up einer japanischen Gruppe

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin



## SAUVIGNON BOT

This squat robot with a swiveling head can “taste” wine using infrared light sensors and a spectrometer in its left arm. When training its beam directly onto a bottle of, say, Sauvignon Blanc, the bot can analyze the chemical composition of the liquid inside to determine type, brand and flavor and then suggest a complementary cheese (it relays the info by speaking in a high-pitched voice). NEC’s mechanical sommelier is the latest robot with an “optical tongue” to emerge from the company’s research lab in Tokyo; the first, PaPeRo, unveiled last year, identifies ingredients in food.

**INVENTOR** NEC System Technologies and Mie University  
**AVAILABILITY** Prototype only **TO LEARN MORE** [necst.co.jp](http://necst.co.jp)

Material bei Dr. Hashimoto, Mie University, Japan



# Enzymatischen Hydrolyse von BSA mit Proteinase K

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

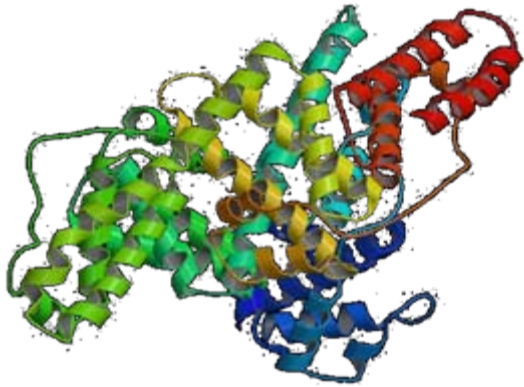
Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin

## Die enzymatische Reaktion erfordert eine erhöhte Temperatur



Erwärmung von BSA:  
Bis 50°C reversible Konformationsänderungen  
Entfalten der  $\alpha$ -Helix irreversibel von 52 - 60°C  
Weitere Temperaturerhöhung:  
Beginn einer  $\beta$ -Aggregation  
Ab 70°C Gelbildung

Sekundärstruktur:  
67%  $\alpha$ -Helix,  
10%  $\beta$ -Turn  
23% Extended chain,  
kein  $\beta$ -sheet

Proteinase K  
Familie der Subtilisin Proteinasen  
Keine besonderen Selektivität für best. AS  
Hohe Aktivität bei 50 – 60°C



FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

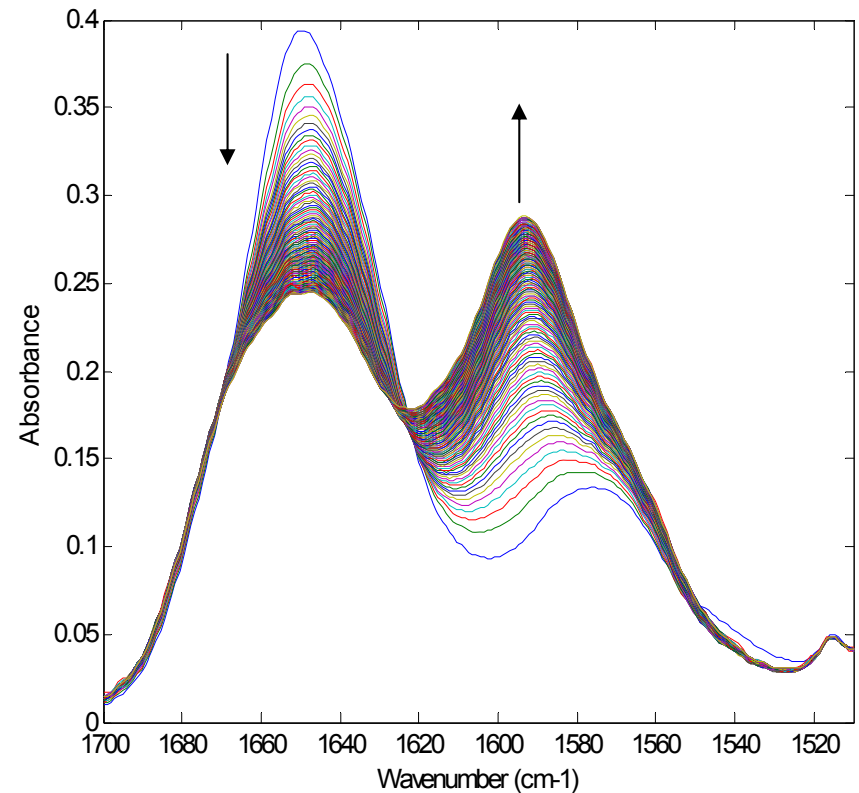
Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin

# Experimentelle Bedingungen – Daten

## FTIR Spektren spiegeln Vorgänge der enzymatischen Hydrolyse wider

30 mg/ml BSA  
0.5 mg/ml Proteinase K  
T = 60°C  
Phosphatpuffer pD 7.4  
Reaktionszeit: 320 min

50  $\mu\text{m}$  CaF<sub>2</sub>  
Spectr.Res.: 2 cm<sup>-1</sup>





# 2DCoS – Konzept

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

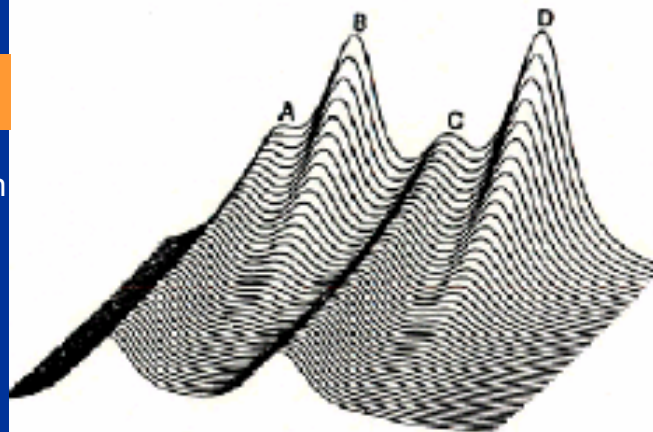
2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin

## Ermittlung von Korrelation im experimental Datensatz

Zeitaufgelöste Spektren

Zeit/Druck/  
Temperatur,...



Spektrale Variable

## Korrelationsanalyse

$$\begin{aligned} & \Theta(\nu_1, \nu_2) + i\Psi(\nu_1, \nu_2) \\ &= \frac{1}{\pi T} \int_0^{\infty} \bar{Y}_1(\omega) + i\bar{Y}_2(\omega) \end{aligned}$$



# 2DCoS - Output

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

Weinsortenbestimmung

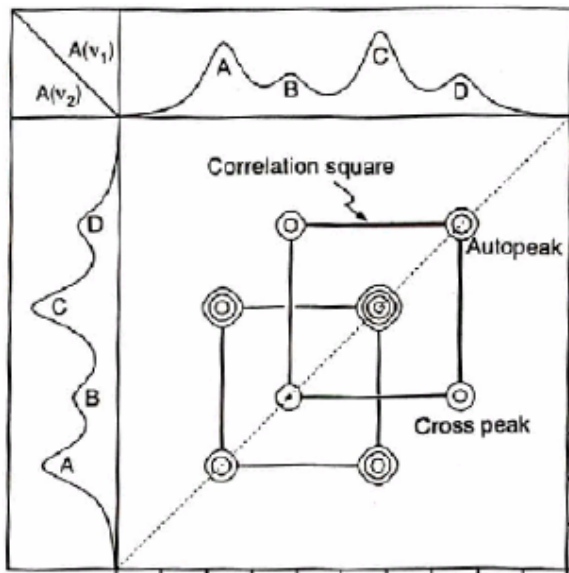
Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin

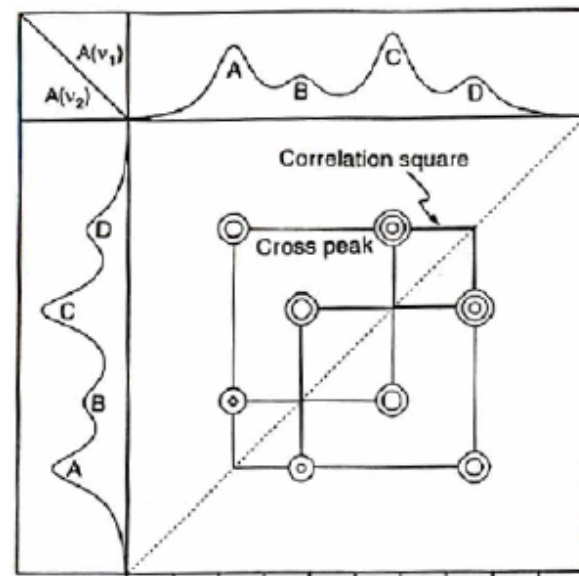
## Correlation Maps

Synchronous map



Spectral variable,  $v_1$

Asynchronous map



Spectral variable,  $v_1$

Spectral variable,  $v_2$



FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin



# Multivariate Curve Resolution (MCR-ALS)

## Konzept: Modellierung der experimentellen Datenmatrix $D$

- Multikomponentensysteme können sehr oft mit Hilfe eines linearen additiven Modells bestehend aus gewichteten Beiträgen von Einzelkomponenten beschreiben werden
- Einzige Bedingung: Lineare Struktur des Datensatzes

$$D = CS^T + E$$

$D(r \times c)$  ist die originale Datenmatrix

$C(r \times n)$  und  $S^T(n \times c)$  enthalten reinen Variationen der Komponenten bezüglich der Reihen ( $r$ ) und Spalten ( $s$ ) von  $D(r \times c)$

$E(r \times c)$  ist die Fehlermatrix



# Multivariate Curve Resolution

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

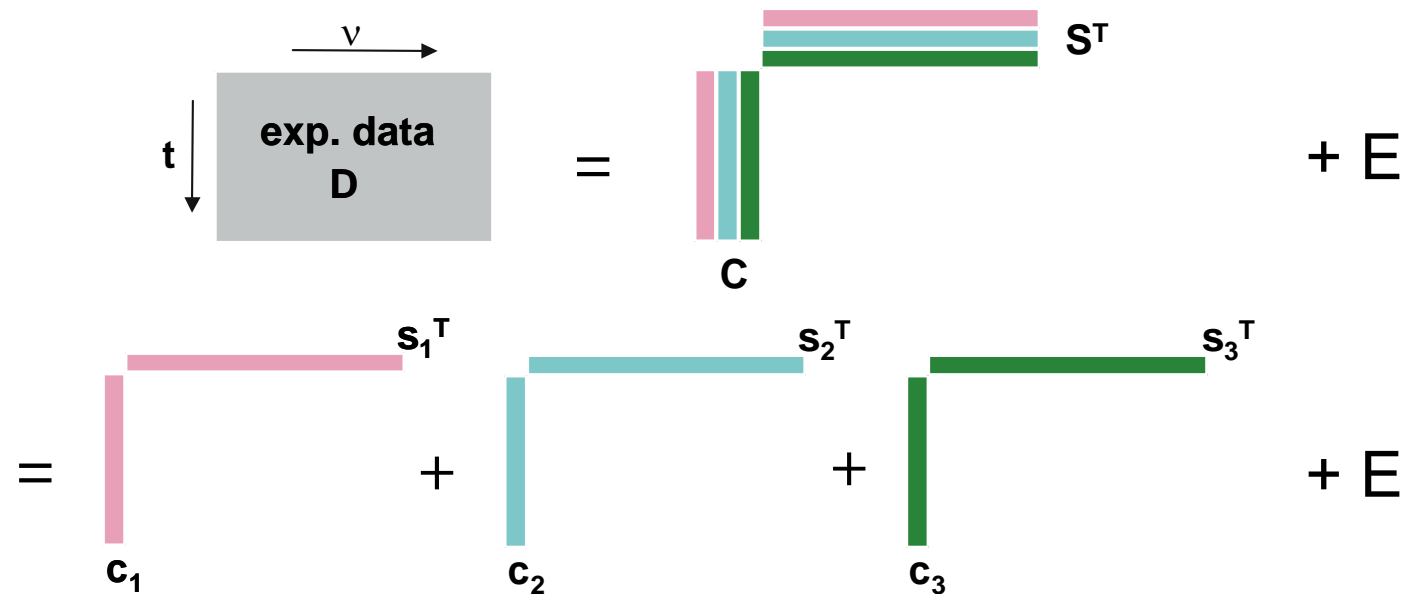
Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin

## Graphische Darstellung



$c_i$ ...concentration profiles with time     $s_i$ ...spectra of pure substances



FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin



# 2DCoS vs. MCR-ALS

Zwei komplementäre Ansätze welche hilfreich sind dynamische Datensätze besser verstehen zu lernen

## 2DCoS: Sucht Korrelationen im Datensatz

- Output: synchrone und asynchrone Korrelationsmappe
- verlangt Erfahrung im Lesen der Korrelationsmappen

## MCR-ALS: Modellierung des Datensatzes

- Output: Spektren und Konzentrationsprofile der Komponenten
- erfordert Definition der (Anzahl) der Komponenten
- objektive Kriterien zur Beurteilung des Erfolgs der MCR Analyse





# MCR-ALS Analyse I

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Laut PCA erklären 2 Komponenten 99,99 % der spektralen Varianz  
=> Annahme von 2 Komponenten

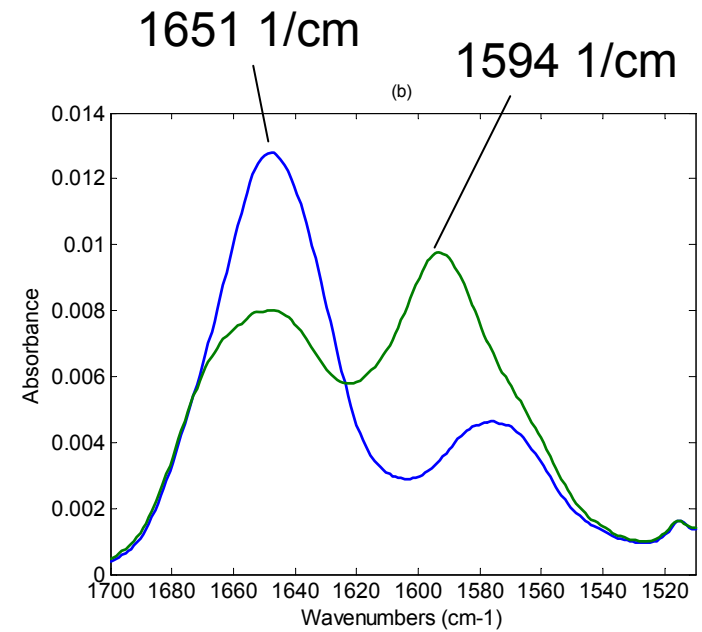
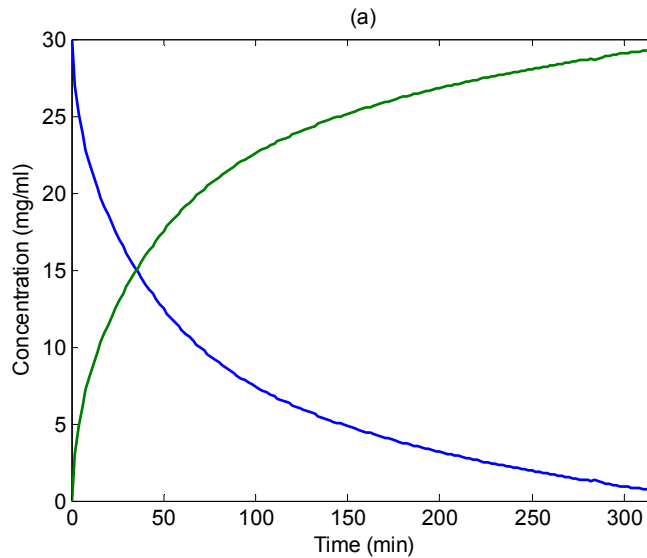
Infrarotspektroskopie

Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin





# 2DCoS Analyse

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

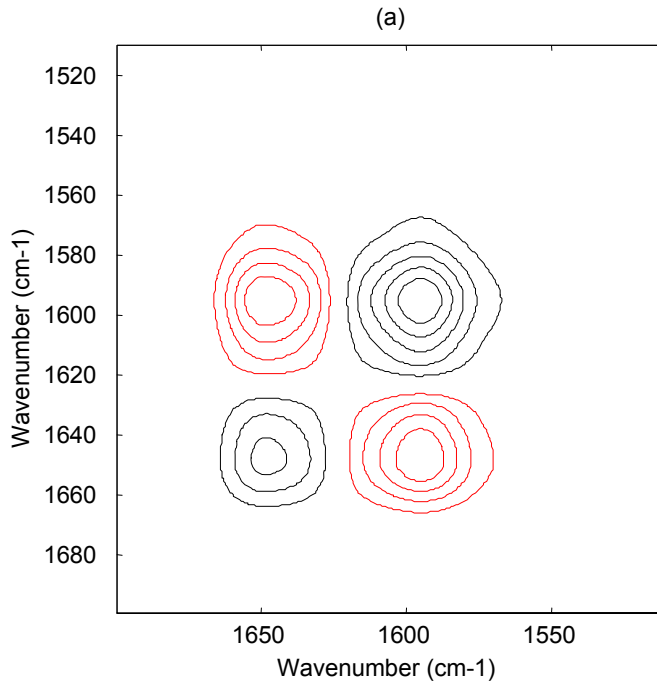
Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

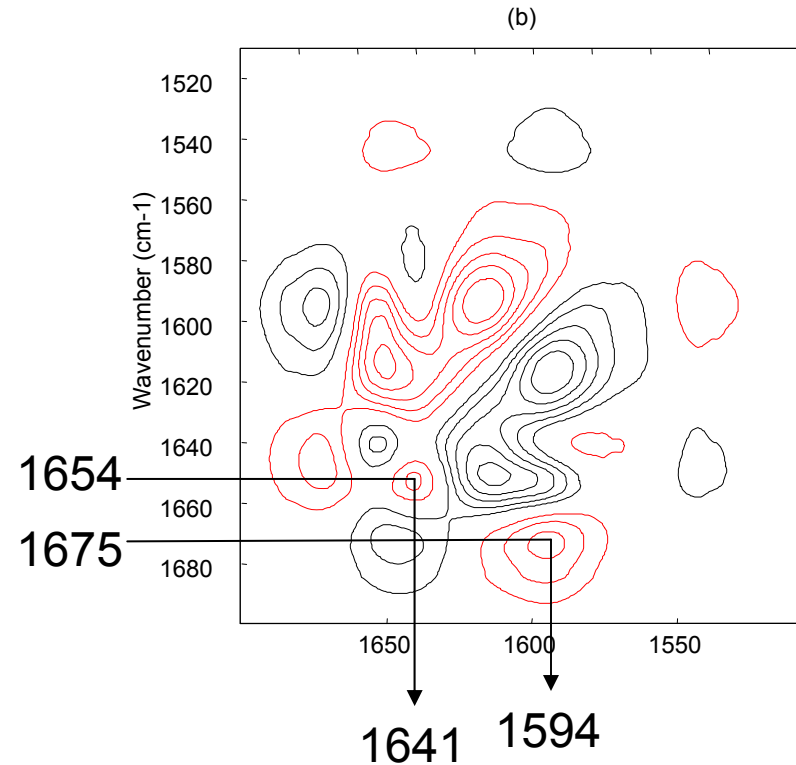
2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin

## Synchrone Mappe



## Asynchrone Mappe



- 1654:  $\alpha$ -Helix
- 1641: ungeordnet Str.
- 1594: Carboxylat
- 1675:  $\beta$ -turn
- 1616:  $\beta$ -Faltblatt

Offensichtlich mehr als 2 Komponenten!!

Nach „Noda Rules“ : 1654/1641 , 1594/1675 , 1616  
Syn + / asyn - =>  $v_1$  nach  $v_2$



# Blick auf die Residualmatrix $E$

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

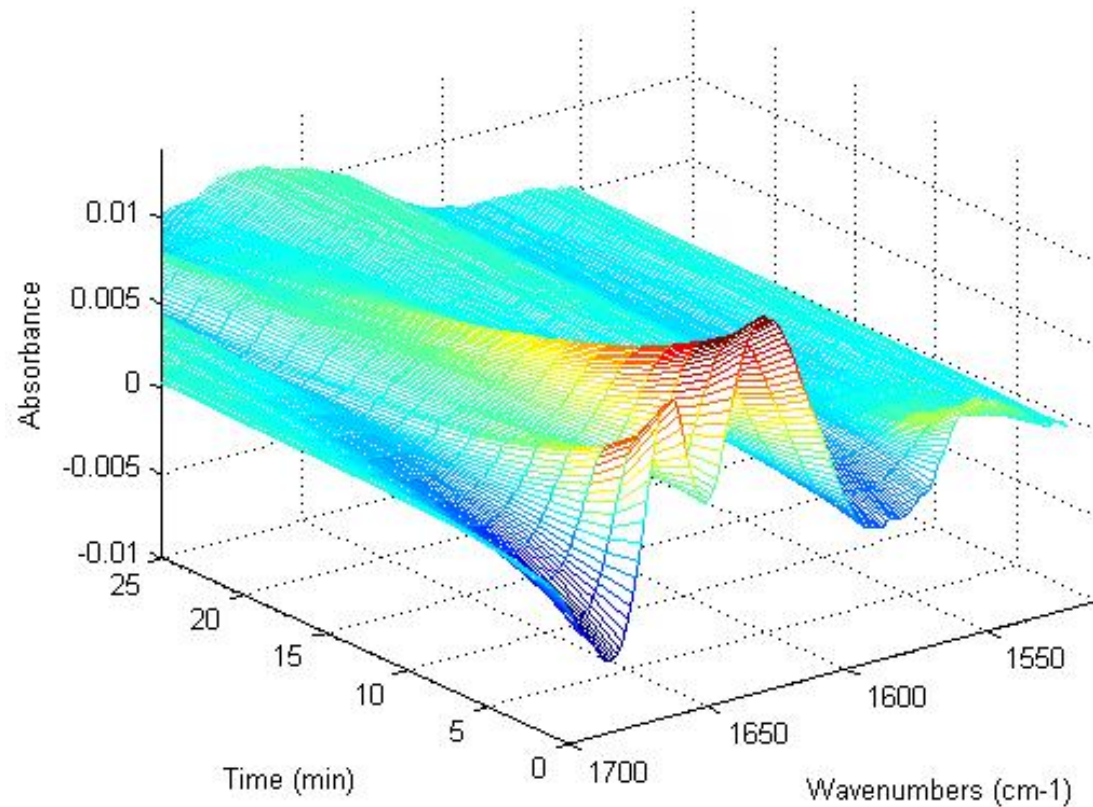
Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin

$$E(r,c) = D - (CS^T)$$





# Blick auf die Residualmatrix $E$ mit 2DCoS

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

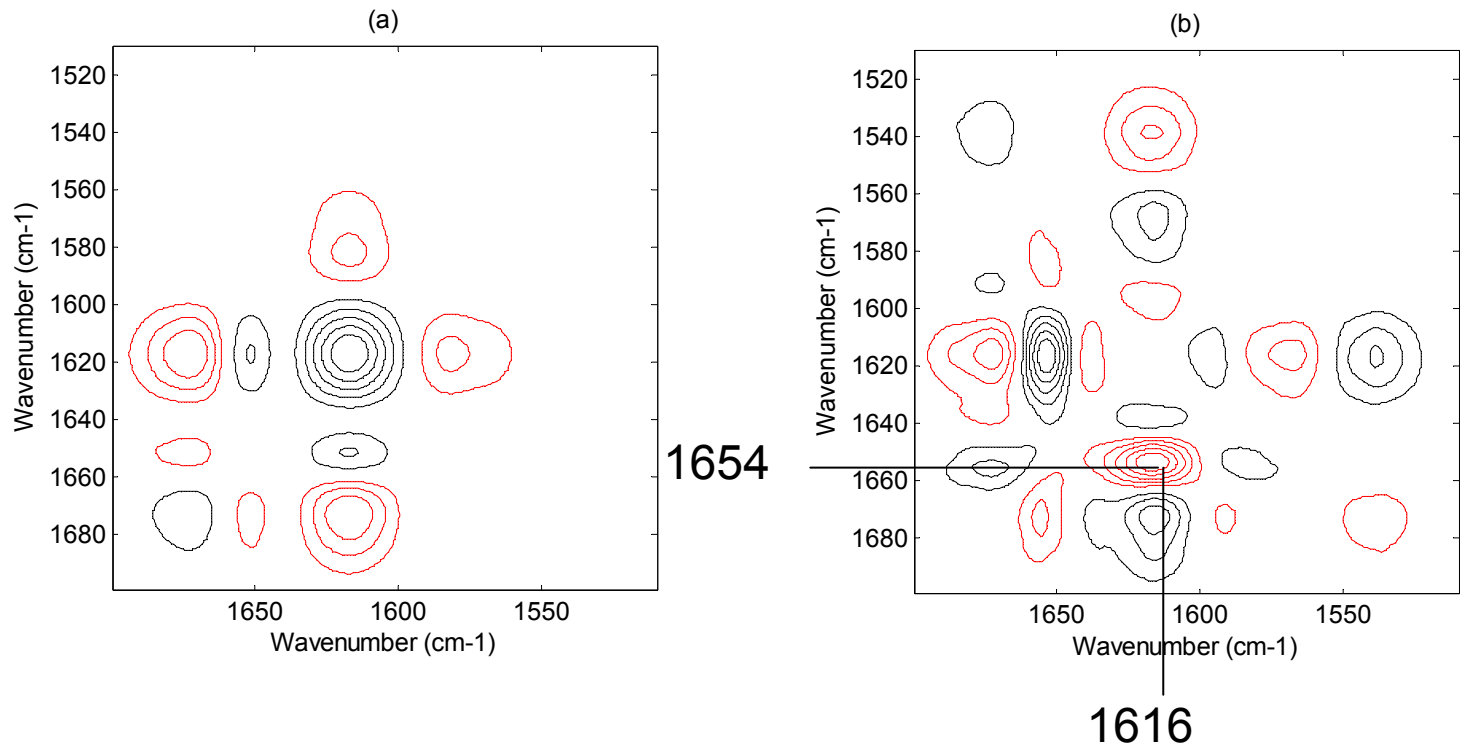
Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin

## Stärkste Bande bei 1616 1/cm



=> 2 weitere Komponenten



# MCR-ALS Analyse II

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

**Annahme von 3 Komponenten, PCA erklärt nun 99,999 %  
Analyse eines einzigen Experiments**

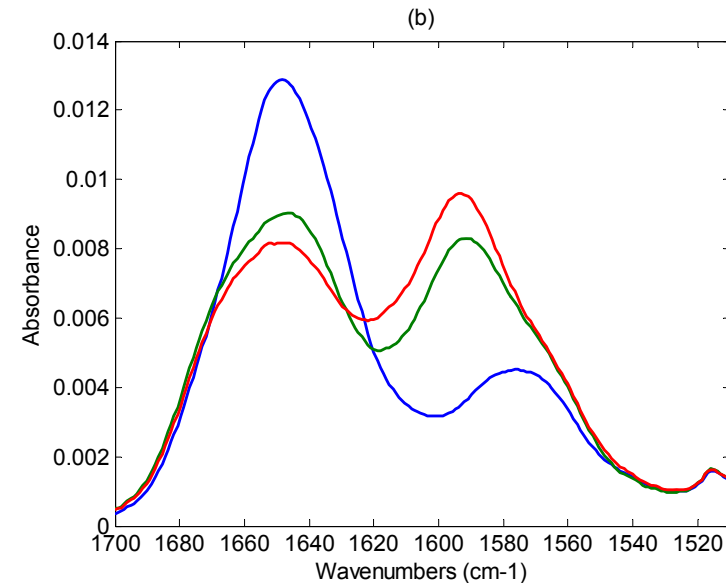
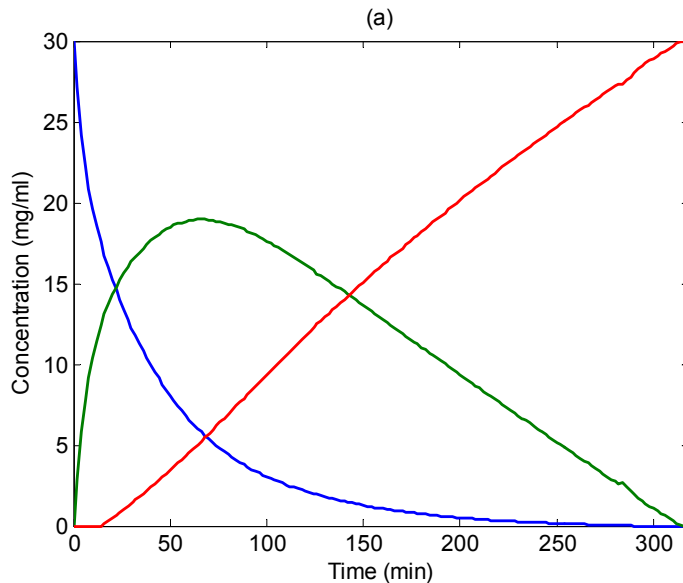
Infrarotspektroskopie

Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin



Scheinbar 2 Produkte: Zwischenprodukt sowie Endprodukt  
Dies ist jedoch von einem chemischen Standpunkt aus  
gesehen sehr unwahrscheinlich!



# MCR – ALS von Experiment ohne Enzym

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

## Nur temperaturinduzierte Effekte sichtbar

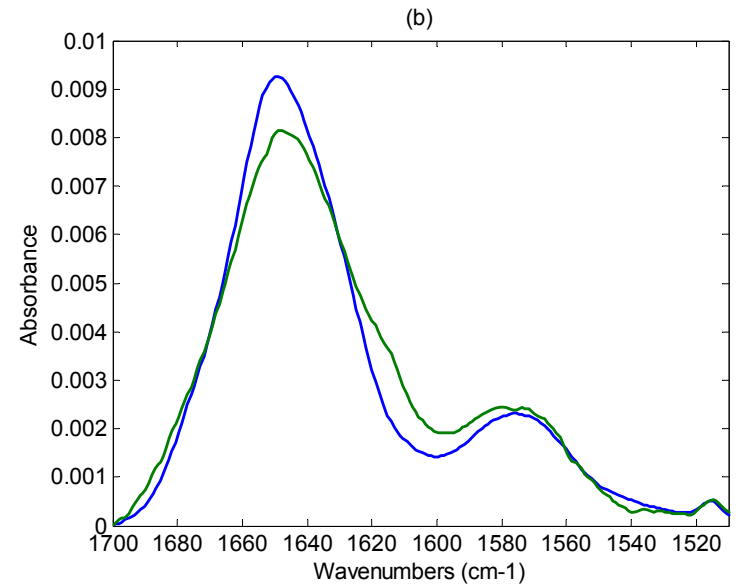
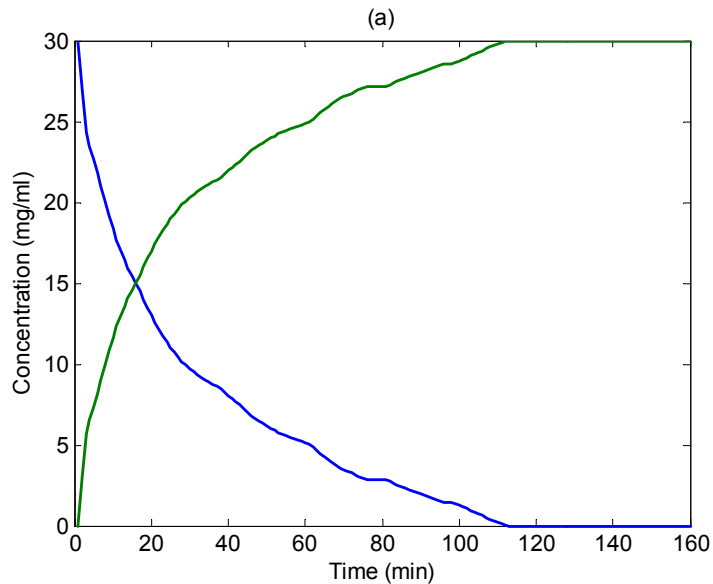
Infrarotspektroskopie

Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin



Denaturierung durch Temp. erhöht Anteil an ungeordneten Strukturen:

Amid I: 1654 -> 1651

Auch leichte Erhöhung des Anteils in  $\beta$ -Faltblattaggregation:

Schultern bei 1616 (stark) und 1685 entstehen



# Matrix Erweiterung

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

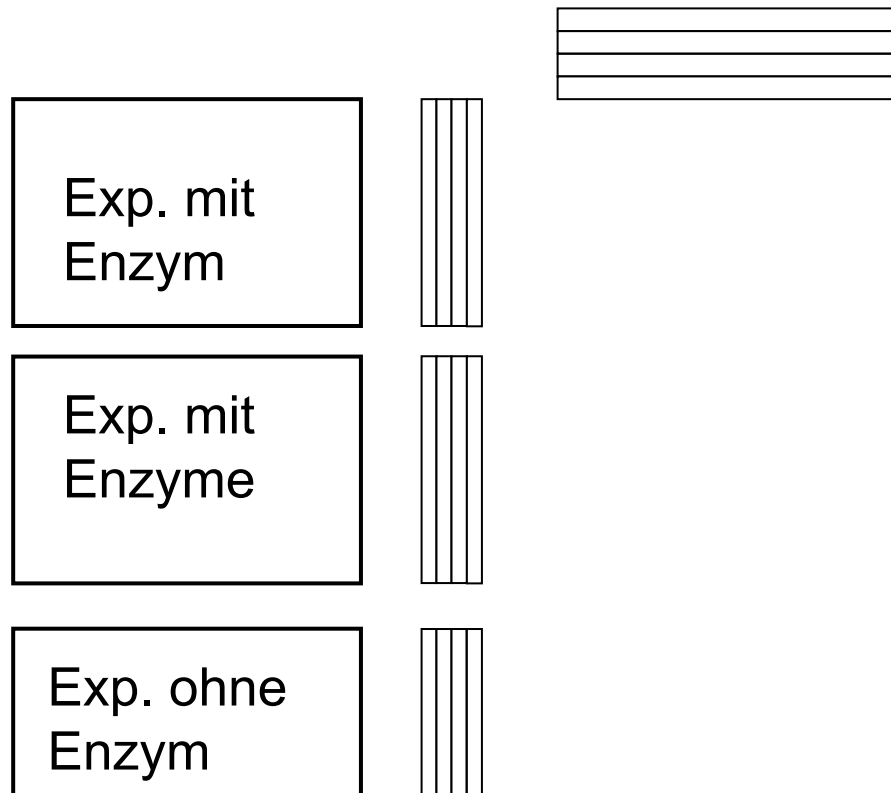
Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin

## Simultane Analyse von mehreren Experimenten





# Ergebnis MCR-ALS Matrix Erweiterung

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

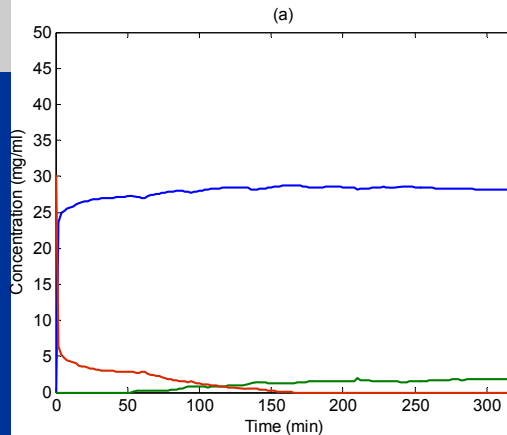
Infrarotspektroskopie

Weinsortenbestimmung

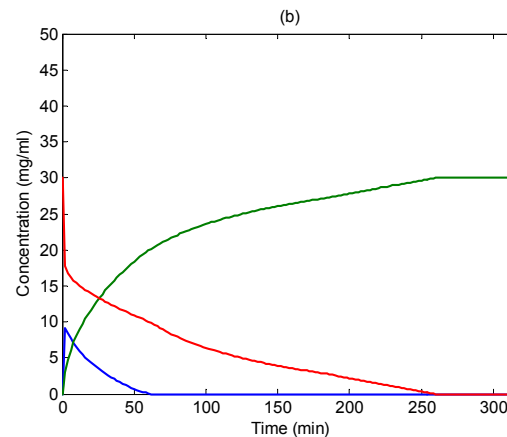
Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

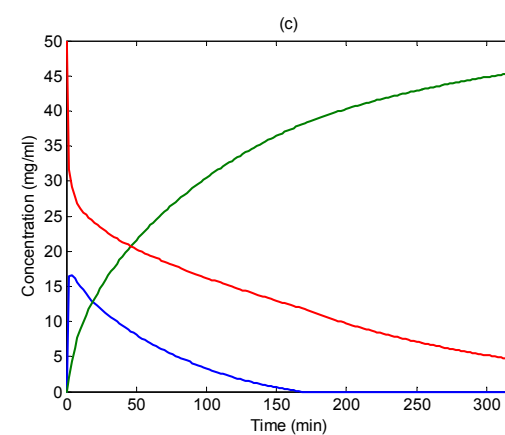
Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin



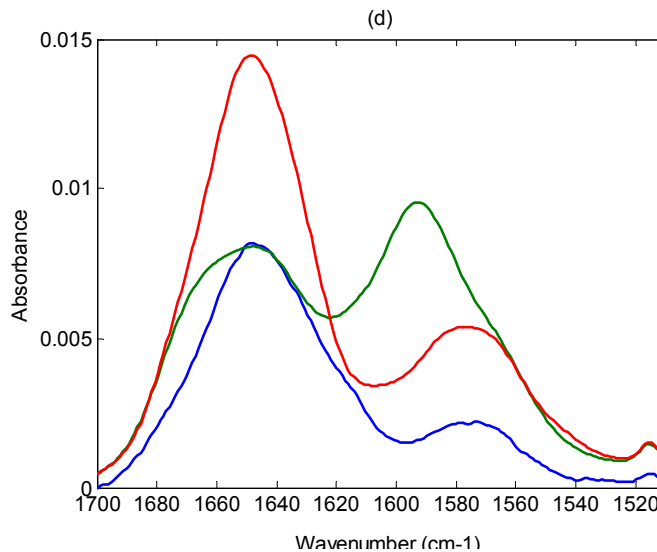
30 mg/ml Albumin



30 mg/ml Albumin  
0.5 mg/ml Enzym



50 mg/ml Albumin  
0.5 mg/ml Enzym



Natives Albumin

Entfaltete Albumin (ungeordnete  
Strukturen Verschiebung Richtung 1641)  
sowie  $\beta$ -Faltblatt

Reaktionsprodukt

Anal. Chem. 78 (2006) 3257-3264





# Zusammenfassung

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin

## „Take home messages“

- **Breite Anwendungsmöglichkeiten der FTIR Spektroskopie zur quantitativen als auch qualitativen Analyse**
- **(Erstaunlich) hoher Informationsgehalt in MIR Spektren welcher durch moderne Datenauswertetechniken auch leicht zugänglich ist**



# Danksagung

FTIR Spektroskopie  
an dynamischen  
Systemen

Infrarotspektroskopie

Weinsortenbestimmung

Optische Zunge

2DCoS vs. MCR

Enzymat. Hydrolyse von  
Albumin



**Maria Jose  
Ayora Canada**



**Ana Dominguez Vidal**



**Andrea Edelmann**

Bruker Optics,  
insb. Frau Dr. Dietl für die nette und immer hilfreiche  
Betreuung unserer Aktivitäten auf dem Gebiet der  
IR- und Raman- Spektroskopie