

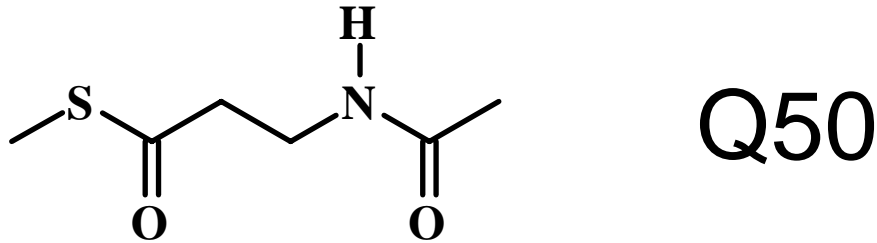
**Schriftliche Prüfung 2. Vordiplom
Frühling 2003****D – ANBI/BIOL****Musterlösung**

Vorname:..... Name:.....

- ◆ Jede Aufgabe wird separat bewertet. Die maximal erreichbare Punktzahl beträgt **36**. Die Maximalnote wird mit mindestens **30** Punkten erreicht.
- ◆ Zeit: **60 Minuten**. Teilen Sie sich Ihre Zeit gut ein!
- ◆ Unleserliche Texte, unklare Formulierungen oder unsaubere Skizzen können nicht bewertet werden. Bitte bemühen Sie sich um eine saubere Darstellung.
- ◆ Beginnen Sie jede Aufgabe auf einem neuen Blatt und schreiben Sie jedes abzugebende Blatt einzeln mit Ihrem Namen an.
- ◆ Dieses Deckblatt ist ausgefüllt abzugeben. Die Aufgabenstellung ist ebenfalls einzureichen.
- ◆ Wir bitten Sie um Fairness und wünschen Ihnen viel Erfolg!

Aufgabe 1 10 Punkte

Auf den folgenden Seiten finden Sie die IR-, Massen-, ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren der Verbindung Q50 mit der relativen Molmasse $M_r = 161$. Sie weist folgende Konstitution auf:



Zusätzlich zum gewöhnlichen ^1H -NMR-Spektrum (Spektrum A) finden Sie ein zweites ^1H -NMR-Spektrum (Spektrum B), das nach einer Vorbehandlung der Probe aufgenommen wurde: Die Lösung der Substanz Q50 in CDCl_3 wurde mit einer grossen Menge D_2O während einigen Stunden geschüttelt. Danach wurde die wässrige Phase abpipettiert. Mit der verbleibenden Lösung wurde das Spektrum B aufgenommen.

Einige Hinweise zu den Spektren:

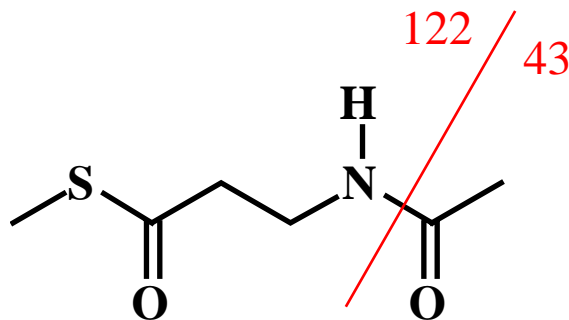
Im Massenspektrum von Q50 sind ausschliesslich einfach positiv geladene Ionen sichtbar.

Die Kopplungen der amidartigen N–H-Protonen mit anderen Protonen sind im ^1H -NMR-Spektrum sichtbar, wenn der Abstand zu den Kopplungspartnern höchstens 3 Bindungen beträgt.

Amidartige N–H-Protonen koppeln mit dem benachbarten ^{14}N -Kern. Dadurch wird das Signal dieser Protonen im ^1H -NMR-Spektrum stark verbreitert und ihre Feinstruktur ist dadurch nicht mehr sichtbar. Dieser Effekt hat keinen Einfluss auf andere Protonen.

- a) Rationalisieren Sie den Basispeak $m/z = 43$ im Massenspektrum! Nehmen Sie dazu die Fragmentierungsregeln zur Hilfe! (2 Punkte)

Sie kennen nur Regeln über direkte Fragmentierungen von Einfachbindungen. Die folgende Fragmentierung ist die einzige, die zu einem Bruchstück mit der Masse 43 führt,



Regel IV besagt, dass die zweite Bindung neben einem Heteroatom bevorzugt bricht. In diesem Fall: O=C–N. Das O-Atom steuert die Fragmentierung.

Wenn eine Bindung zwischen einem C-Atom und einem Heteroatom bricht, bleibt die Ladung gemäss Regel V bevorzugt auf der C-Seite. In diesem Fall erhält das Fragment mit der Masse 43 die Ladung und ist somit im Spektrum sichtbar.

b) Nennen Sie mindestens zwei eindeutige Argumente, dass das Fragment mit $m/z = 43$ im Massenspektrum kein Schwefelatom enthält! (2 Punkte)

1. Die Masse des häufigsten S-Isotops beträgt 32. Wenn das Fragment mit der Masse 43 Schwefel enthält, muss der Rest von 11 durch andere Atome von Q50 erklärt werden. Die einzige Möglichkeit sind 11 H-Atome. Dies ergäbe ein Fragment mit der Zusammensetzung SH_{11}^+ : Unsinn.

2. Im Schwefel kommt das Isotop mit der Masse 34 zu 4.5 % (bezogen auf 100 % ^{32}S) vor. Wenn das Fragment mit der Masse 43 Schwefel enthält, erscheint notwendigerweise auch die Masse 45 mit einer Intensität von mindestens 4.5 % der Intensität von 43. Da 43 der Basispeak ist, also auf die Intensität 100 % normiert ist, müsste die Masse 45 mit einer absoluten Intensität von mindestens 4.5 % (Skala links) erscheinen. Man findet die Masse 45 tatsächlich, aber mit einer Intensität von weniger als 3 %.

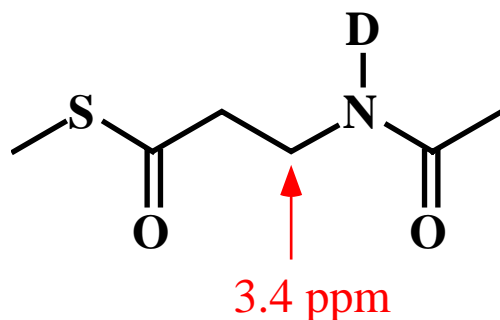
c) Erklären Sie die Unterschiede zwischen den beiden ^1H -NMR-Spektren A und B! Was hat die Behandlung mit D_2O bewirkt? Zeichnen Sie die Strukturformel der Verbindung Q50 nach der Behandlung! Rationalisieren Sie die Kopplungsmuster vor und nach der Behandlung! (3 Punkte)

Die Behandlung mit D_2O hat das amidartige H-Atom verschwinden lassen.

Das Signal bei 6.3 ppm im Spektrum A, das von diesem H stammt, ist im Spektrum B nicht mehr vorhanden.

Das Signal bei 3.4 ppm, das im Spektrum A als 4-Liniensystem erscheint, weist im Spektrum B nur noch 3 Linien auf. Einer der ursprünglichen Nachbarn muss verschwunden sein.

Durch das Schütteln mit D_2O wurde das amidartige H gegen Deuterium ausgetauscht:



- d) Im Vergleich zu anderen Carbonylverbindungen erscheint die Bande bei 1670 cm^{-1} relativ breit, besonders an der Spitze. Was für einen Grund könnte diese Verbreiterung haben? (2 Punkte)

1. Die Verbindung Q50 weist zwei Carbonylgruppen auf, die nicht die gleiche chemische Umgebung haben und daher auch nicht die gleiche Frequenz haben müssen. Es erscheinen also zwei Banden im Spektrum, die in diesem Fall aber so nahe beieinander liegen, dass nur eine Bandenverbreiterung resultiert.

2. Die Einfachbindungen in den Gruppierungen $\text{O}=\text{C}-\text{S}$ und $\text{O}=\text{C}-\text{N}$ weisen infolge von Konjugation mit der $\text{C}=\text{O}$ -Gruppe einen gewissen Doppelbindungscharakter auf. Dadurch ist die Rotation um diese Bindungen gehemmt. Daraus resultieren jeweils zwei bevorzugte planare Anordnungen der Carbonylumgebung. Im IR-Spektrum sieht man daher ein "Gemisch" von Konformeren, die leicht unterschiedliche Lagen für die Carbonylbanden aufweisen.

3. Moleküle mit Carbonylgruppen und polaren $\text{X}-\text{H}$ -Gruppen (X : O, N, S...) bilden leicht Dimere über Wasserstoffbrücken $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{X}$. Dadurch wird die Carbonylgruppe gestört. Ihre Frequenz ist nicht mehr klar definiert. Dies bewirkt eine Bandenverbreiterung.

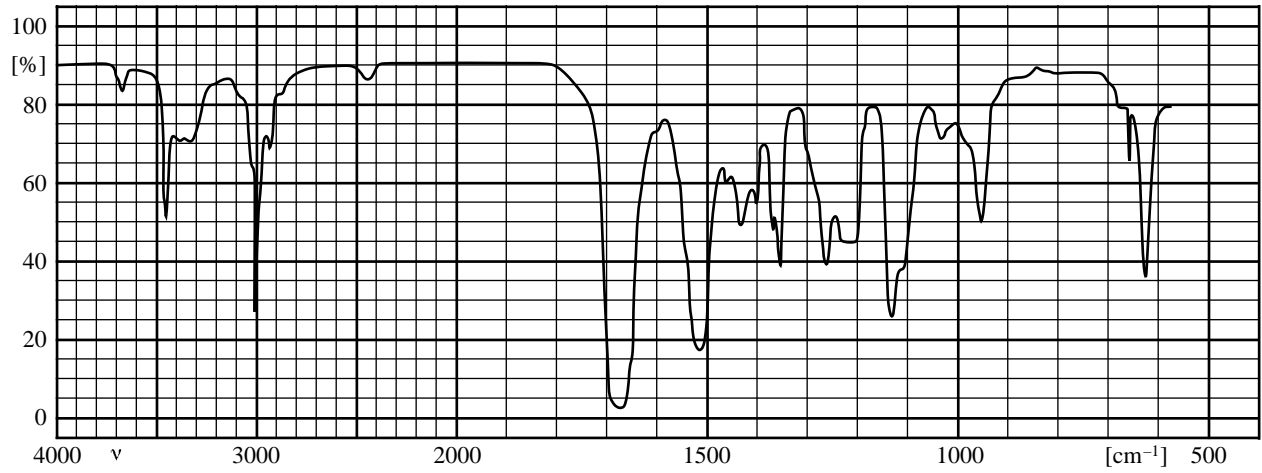
Hinweis: Erklärung 1 dürfte die richtige sein. Auch die zweite könnte einen Einfluss haben, Die dritte widerspricht meiner Erfahrung. Entscheidend ist aber für die Prüfung nicht die Wahrheit, (die wir oft selbst nicht kennen) sondern eine plausible Argumentation. Daher wurden alle drei Erklärungen als richtig angesehen.

- e) In den ^1H -NMR-Spektren finden Sie bei 7.3 ppm ein kleines Signal. Es stammt vom Lösungsmittel. Wie kommt dieses Signal zustande? (1 Punkt)

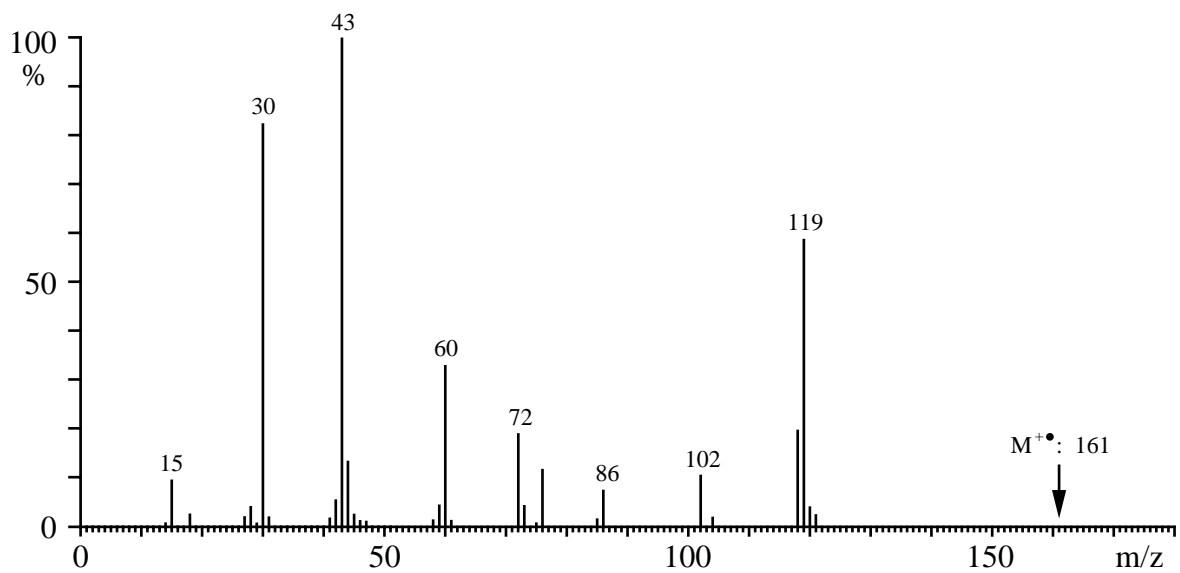
In einem ^1H -NMR-Experiment sieht man nur Protonen direkt als Signale. Kopplungspartner bestimmen zwar das Aufspaltungsmuster der Signale, aber ohne Protonen kann kein Signal erscheinen. Das zur Diskussion stehende Signal muss also von Protonen stammen. Käufliche deuterierte Lösungsmittel sind typischerweise zu 99.8 % deuteriert. Die restlichen Moleküle enthalten Protonen, die für das kleine Signal bei 7.3 ppm verantwortlich sind.

IR: Perkin-Elmer Modell 125
aufgenommen in CHCl_3
Schichtdicke 0.1 mm

Q50



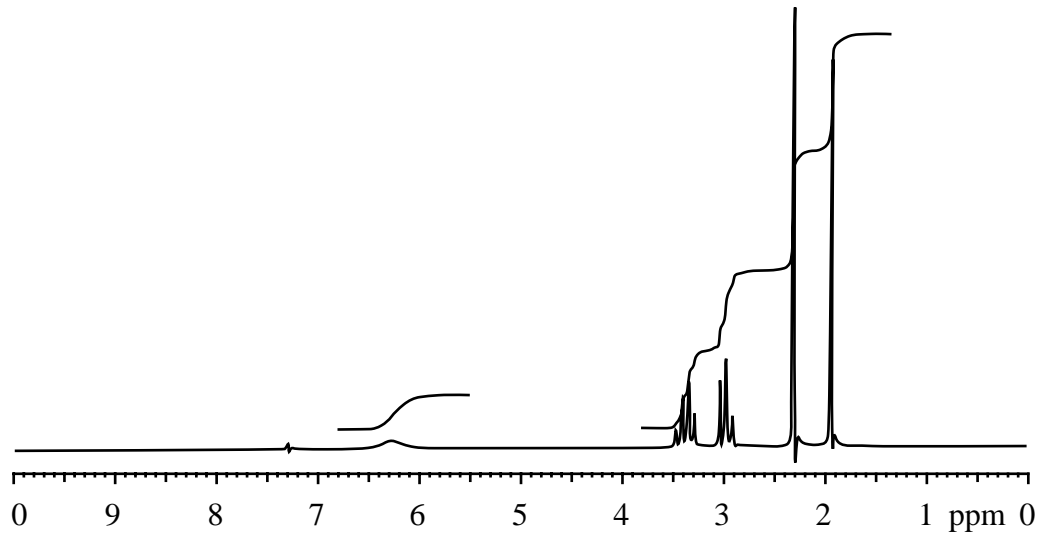
MS: EI, 70 eV



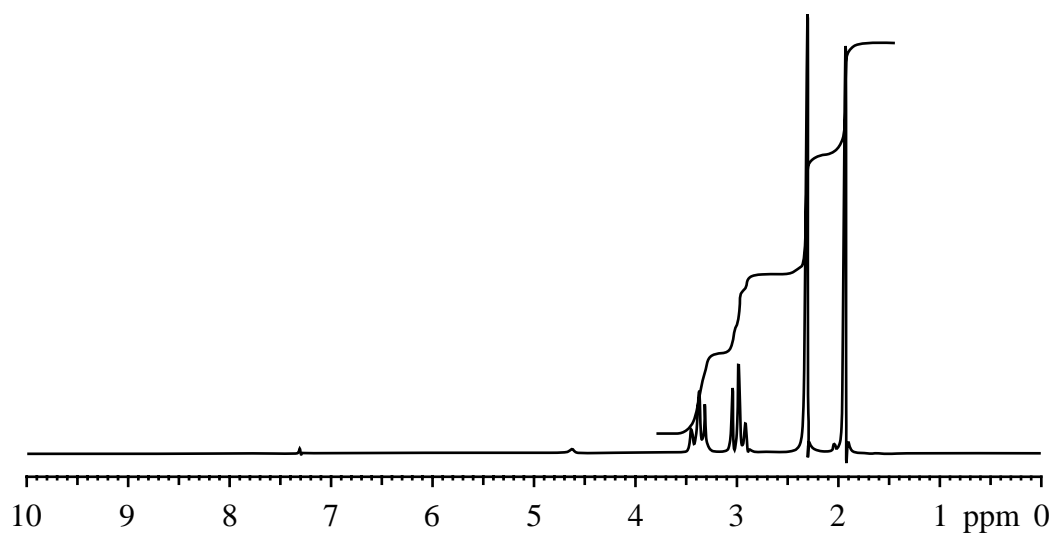
$^1\text{H-NMR}$: 60 MHz, aufgenommen in CDCl_3

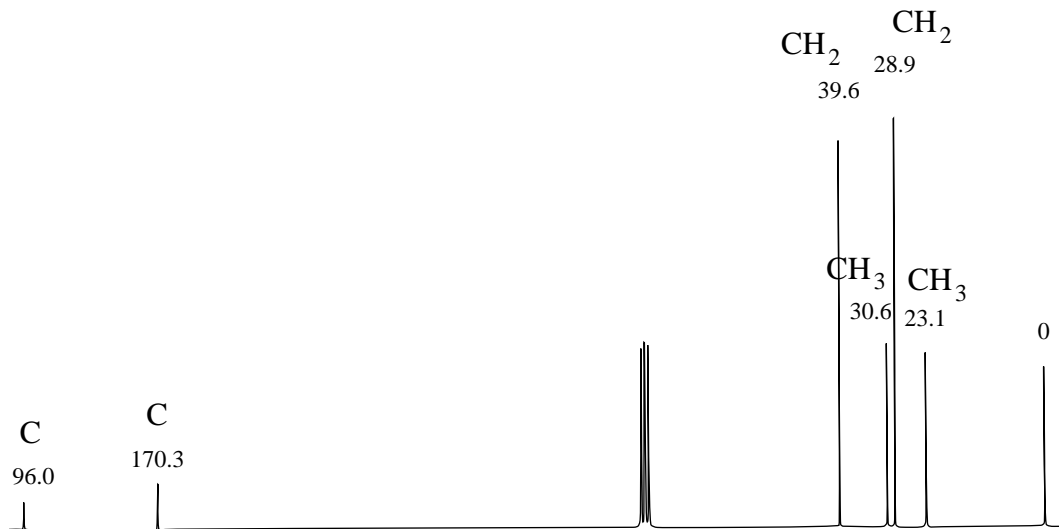
Q50

Spektrum A



Spektrum B



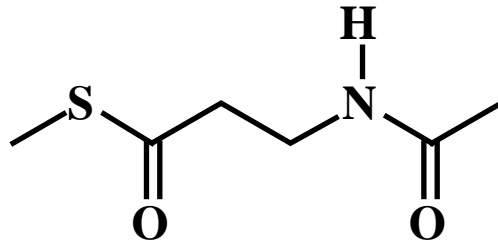
^{13}C -NMR:**Q50**50 MHz, breitbandenkoppelt, aufgenommen in CDCl_3 

Aufgabe 2 8 Punkte

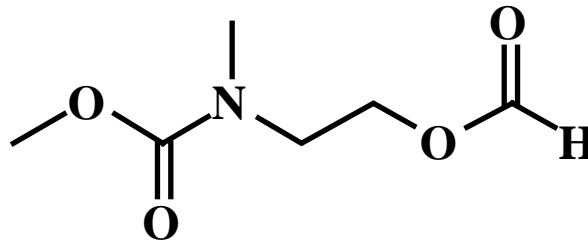
Für die Verbindung Q50 werden die alternativen Konstitutionen 1-4 vorgeschlagen. Finden Sie für jede Alternative mindestens zwei spektroskopische Argumente, die gegen sie sprechen.

(maximal 2 Punkte pro Alternative)

Q50

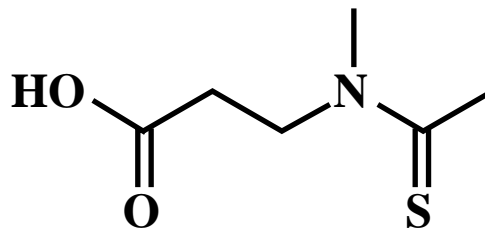


①



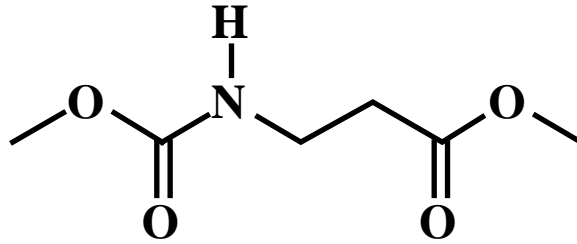
- Wie soll der Basispeak ($m/z=43$) im MS entstehen?
- Es gibt kein amidartiges H: wie soll im Spektrum B ein Signal verschwinden?
- Es gibt kein amidartiges H: wie soll im Spektrum B ein Signal sein Aufspaltungsmuster verändert haben?
- Wie soll ein 4-Liniensystem im Spektrum A entstehen? Welche Protonen haben 3 Nachbarn?
- In ^{13}C -NMR-Spektrum sind je zwei CH_3 -, CH_2 -, und C-Gruppen bezeichnet. Bei Alternative 1 würde man nur eine C-, dafür aber eine CH-Gruppe erwarten.

②



- Wie soll der Basispeak ($m/z=43$) im MS entstehen?
- Wo ist die Bande der O-H-Streckschwingung im IR-Spektrum bei ca. 3600 cm^{-1} ?
- Es gibt kein amidartiges H: wie soll im Spektrum B ein Signal verschwinden?
- Es gibt kein amidartiges H: wie soll im Spektrum B ein Signal sein Aufspaltungsmuster verändert haben?
- Wie soll ein 4-Liniensystem im Spektrum A entstehen? Welche Protonen haben 3 Nachbarn?

③

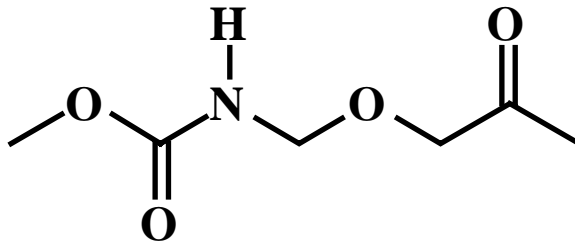


– Wie soll der Basispeak ($m/z=43$) im MS entstehen?

Es gibt kein weiteres, absolut disqualifizierendes Argument.

– Die chemische Verschiebung der beiden CH_3 -Gruppen wären grösser als jene der CH_2 -Gruppen, sowohl im ^1H - als auch im ^{13}C -NMR-Spektrum (gilt als zwei Argumente).

④



– Die CH_2 -Gruppe neben dem amidartigen N hat nur das Proton der Amidgruppe als Nachbar. Es sollte also im Spektrum A als Dublett erscheinen.

– Die CH_2 -Gruppe neben dem amidartigen N hat nur das Proton der Amidgruppe als Nachbar. Es sollte also im Spektrum B als Singlett erscheinen, da das Molekül dieses Proton nicht mehr enthält, mithin keinen Nachbar hat.

Aufgabe 3 6 Punkte

Das Regenwasser im Zentrum der Stadt Zürich weist oftmals grössere Konzentrationen an Säuren auf, besonders nach einer längeren niederschlagsfreien Periode. Der pH-Wert liegt deutlich unter 7. Dafür sind hauptsächlich die unten aufgeführten Mineralsäuren verantwortlich, die ihren Ursprung in den Abgasen von Fahrzeugen, Kehrlichtverbrennungsanlagen, Raumheizungen und anderen Quellen haben. Es finden sich auch kleine Mengen an organische Säuren im Regenwasser.

Sie haben die Aufgabe, die genannten Säuren quantitativ zu bestimmen. Die Kohlensäure H_2CO_3 stammt aus gelöstem CO_2 und kann nicht als Schadstoff bezeichnet werden. Auf ihre Bestimmung kann notfalls verzichtet werden.

Säuren im Regenwasser:

HCl HNO₃ HNO₂ H₂SO₄ H₂SO₃ H₂CO₃

Oxalsäure	HOOC-COOH
Malonsäure	HOOC-CH ₂ -COOH
Bernsteinsäure	HOOC-CH ₂ -CH ₂ -COOH
Ameisensäure	H-COOH
Essigsäure	CH ₃ -COOH

Was ist eine Säure? Säuren dissoziieren zu H^+ und dem entsprechenden Anion. Das Unterscheidungsmerkmal zwischen verschiedenen Säuren in wässriger Lösung ist also das Anion.

- a) Schlagen Sie eine Methode zur Trennung und Quantifizierung der Säuren vor! Welchen Detektor setzen Sie ein?

Trennmethode der Wahl: Ionenchromatographie. Leitfähigkeitsdetektor. Wenn man Carbonat als Elektrolyt verwendet, kann dieses unmittelbar vor dem Detektor durch einen mit H^+ beladenen Kationenaustauscher in Kohlensäure umgewandelt werden. Letztere zerfällt sofort in H_2O und CO_2 . Durch diese Massnahme wird die Leitfähigkeit des Laufmittels stark erniedrigt (Suppression). Natürlich kann die Kohlensäure im Regenwasser dann nicht bestimmt werden.

- b) Ist eine Vorbehandlung des Regenwassers notwendig?

Durch ein Mikrofilter filtrieren, um die Säule vor Kontaminationen zu schützen.

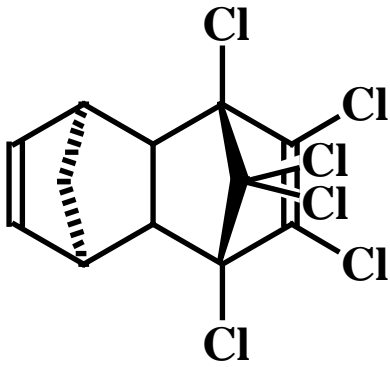
- c) Können Sie alle aufgeführten Säuren in einem einzigen Analysengang quantifizieren?

– Ja. Die Anionen sind wasserlöslich, Die Unterscheidung zwischen anorganisch und organisch ist nicht nötig.

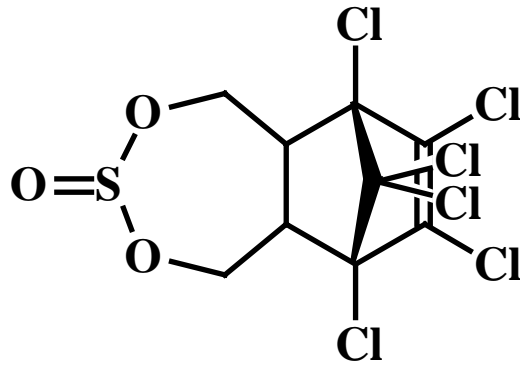
Hinweis: Auch andere Vorschläge wurden als richtig beurteilt. Es wurden gaschromatographische Verfahren vorgeschlagen, die nicht alle aufgeführten Ionen erfassen können. Insbesondere sind die Dicarbonsäuren Oxal-, Malon- und Bernsteinsäure sowie die Schwefelsäure nicht genügend flüchtig, also gaschromatographisch nicht zu erfassen. In Punkt c) wurde also die gegenteilige Ansicht als richtig anerkannt.

Aufgabe 4 12 Punkte

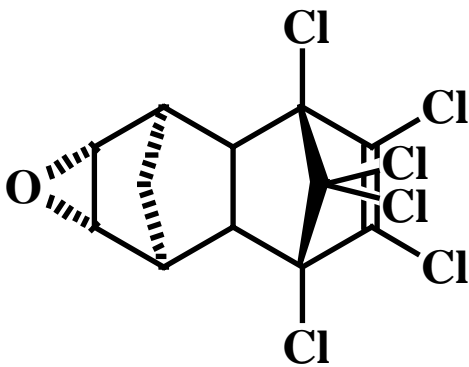
In jüngster Zeit wurden bei Routineuntersuchungen in einer Grundwasserfassung zur Produktion von Trinkwasser erhöhte Konzentrationen von chlorierten Kohlenwasserstoffen festgestellt. In unmittelbarer Nähe der Fassung befindet sich ein ehemaliger Produktionsbetrieb, in dem bis 1963 die unten dargestellten Insektizide in grossen Mengen hergestellt wurden.



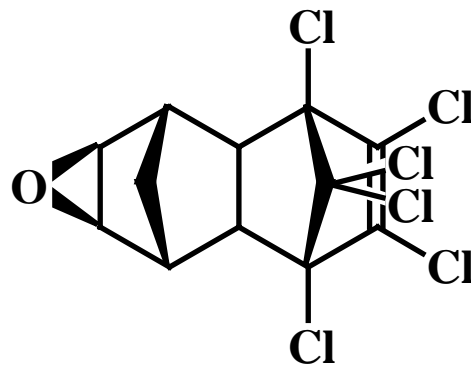
Aldrin



Endosulfan



Dieldrin



Endrin

Es besteht der Verdacht, dass Rückstände der Produktion, die möglicherweise illegal auf dem Werksgelände oder in seiner Umgebung deponiert wurden, ins Erdreich eingedrungen sind und nun das Grundwasser erreicht haben.

Sie haben die Aufgabe, die vier genannten Substanzen im Trinkwasser und im Erdreich der ehemaligen Produktionsstätte nachzuweisen und zu quantifizieren. Dazu steht Ihnen je ein Gramm der reinen Insektizide zur Verfügung. In der Literatur haben Sie auch eine Methode zur Trennung der fraglichen Substanzen gefunden (nächste Seite). Sie haben die Säule DB-5.625 beschafft und können damit die Methode nachvollziehen.

European Red List Semivolatiles

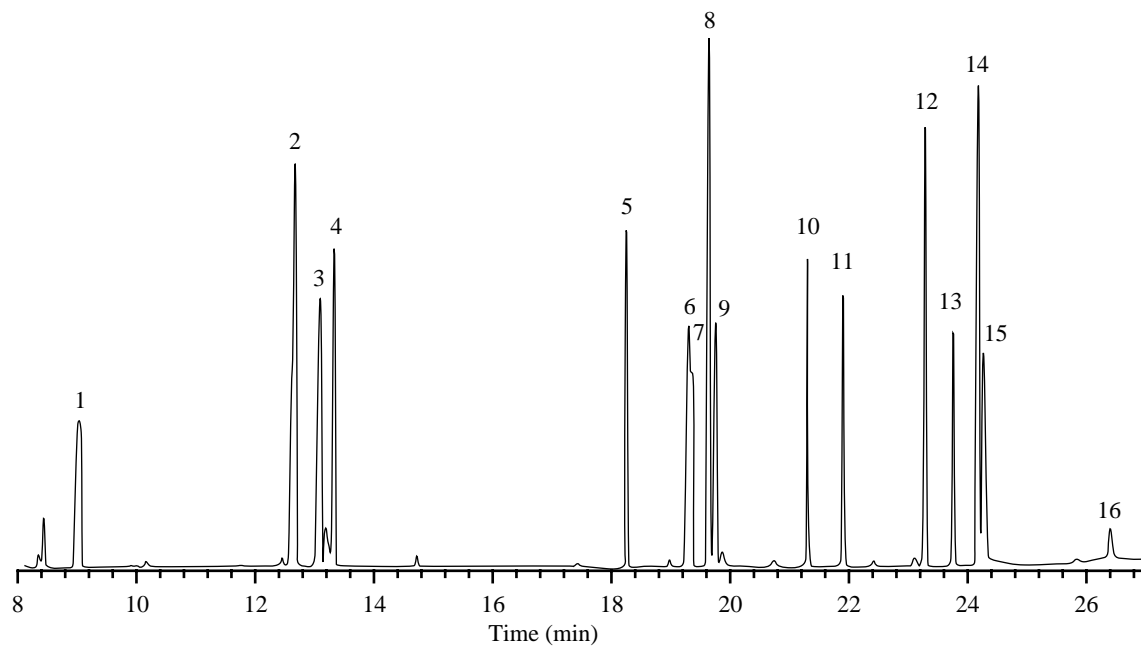
Column: DB-5.625
30 m length, 0.025 mm i.d., 0.5 µm film

Carrier: Helium at 35 cm/s, measured at 40° C

Oven: 40° C for 2 min
40° - 325° C at 12°/min
325° C for 2 min

Injector: splitless, 250° C
1 µl of 50-100 ng/µl standards in methanol

Detector: mass selective, 280° C transfer line
full scan at m/z 35 - 400



1	Chlorotoluene	9	Lindane
2	1,2,4-Trichlorobenzene	10	Malathion
3	Hexachlorobutadiene	11	Aldrin
4	Dichlorvos	12	Endosulfan
5	Trifluralin	13	Dieldrin
6	Simazine	14	Endrin
7	Atrazine	15	p,p'-DDT
8	Pentachlorophenol	16	Azinphos methyl

- a) Wie würden Sie die gegebene Methode auf Ihr spezielles Trennproblem ausrichten? Sehen Sie Möglichkeiten, Verbesserungen vorzunehmen? Welche? Was versprechen Sie sich von den jeweiligen Veränderungen? Welche Schwierigkeiten würden Sie sich möglicherweise dadurch einhandeln?

Die vier fraglichen Insektizide eluieren im Chromatogramm nach mehr als 20 Minuten innerhalb von weniger als 3 Minuten. Das Temperaturprogramm ist auf die Trennung aller aufgeführten Substanzen ausgerichtet, was im gegebenen Fall nicht nötig ist. Man erhöht also die Anfangstemperatur auf z. B. 300°. Vermutlich ist sogar ein isothermer Betrieb bei z. B. 310° möglich. Dadurch erspart man sich die Wartezeit durch das Abkühlen und Konditionieren des Ofens nach einem Experiment.

- b) Sie besitzen keinen massenselektiven Detektor. Schlagen Sie einen anderen Detektor vor! Begründen Sie Ihre Wahl! Bei welchen Schwierigkeiten würden Sie dennoch die Beschaffung des teuren Massenspektrometers erwägen? Was sind die besonderen Vorteile eines massenselektiven Detektors in der gegebenen Situation?

Die vier zu trennenden Substanzen enthalten jeweils 6 Halogenatome im Molekül. Der Detektor der Wahl ist der ECD (Electron Capture Detector). Er ist besonders empfindlich auf Halogene. Er ist dem FID (Flame Ionization Detector) in diesem Fall deutlich überlegen. Nachteil: Es ist damit zu rechnen, dass bei der Produktion der Insektizide viele andere Halogenverbindungen entstanden, die noch immer auf dem ehemaligen Werksgelände und auch im Grundwasser vorhanden sind, Zudem könnten innerhalb der 40 Jahre seit dem Ende der Produktion vielfältige Abbaureaktionen abgelaufen sein, die die Anzahl der Verbindungen noch erhöht hat. Es ist daher mit einer Vielfalt von Verunreinigungen zu rechnen, für die der ECD empfindlich ist. Dadurch könnte die Quantifizierung der vier Insektizide erschwert bis verunmöglicht werden. Wenn eine genügende Trennung der Insektizide von anderen Verbindungen durch Variation der Versuchsbedingungen nicht erreicht werden kann, müsste allenfalls doch ein massenselektiver Detektor eingesetzt werden. Im MS der Insektizide kann dann eine prominent erscheinende Masse ausgesucht und als einzige detektiert werden. Dadurch werden die meisten anderen Substanzen für den Detektor unsichtbar und müssen demnach auch nicht von den Insektiziden getrennt werden.

- c) Sie erwarten Konzentrationen von einigen Mikrogramm Insektizid pro Liter Trinkwasser. Wie isolieren Sie die Insektizide aus dem Wasser? Kann man allenfalls das Trinkwasser ohne Aufarbeitung direkt in den Gaschromatographen einspritzen? Wie sehen Sie die Chancen, mit einer HPLC-Methode zum Ziel zu gelangen?

Trinkwasser enthält nichtflüchtige Salze, die bei direkter Einspritzung das Trennsystem verschmutzen können. Dadurch müsste man den Einspritzblock regelmässig reinigen. Eine Quantifizierung ohne Anreicherung der Insektizide im Trinkwasser ist infolge der kleinen Konzentration sehr schwierig.

Zur Anreicherung kann man z. B. einen Liter Wasser mehrfach mit 20 ml eines apolaren Lösungsmittels wie Hexan ausschütteln. Die gesammelten Hexanfraktionen können dann eingedampft und durch eine definierte Menge Lösungsmittel, z. B. 1 ml, wieder aufgenommen

werden. Dadurch kann man die Konzentration der Insektizide um einen Faktor 1000 erhöhen und die nichtflüchtigen Anteile des Wassers fast vollständig entfernen.

Eine weitere Möglichkeit der Anreicherung besteht darin, etwa einen Liter Trinkwasser durch eine kleine Säule zu schicken, die die gleiche Phase enthält, wie eine HPLC-Säule (reversed phase). Alle apolaren Bestandteile des Wassers bleiben auf der Säule haften, insbesondere auch die gesuchten Insektizide. Nach dem Trocknen der Säule werden die Insektizide mit einem apolaren Lösungsmittel ausgewaschen. (Diese Methode steht nicht im Manuskript, wurde aber in einer Übung vorgestellt.)

Eine HPLC-Methode hat kaum eine Chance. Die gängigen HPLC-Säulen erreichen bei weitem nicht die Trennleistung einer GC-Kapillarsäule. Zudem besteht ein Detektionsproblem. Man müsste wohl ein MS einsetzen, um die nötige Selektivität und Empfindlichkeit zu erreichen. Die Kopplung HPLC-MS ist zwar eine etablierte Analysenmethode, kann aber nicht als Routine-methode bezeichnet werden. Eine massive Anreicherung wäre unabdingbar.

Zur Quantifizierung:

Es ist nicht möglich, die gesamte in der Probe vorhandene Menge Insektizid zu extrahieren. Ein Teil geht immer verloren. Man kann diesen Anteil bestimmen, indem man eine künstliche Probe mit einer bekannten Menge der Insektizide zubereitet und die Aufarbeitung durchführt: man bestimmt die Wiederfindungsrate.

Die Kalibration kann auf verschiedene Arten durchgeführt werden. Man kann eine Lösung mit einer bekannten Konzentration der Insektizide in Hexan herstellen und in den GC einspritzen. Man kann aber auch der Probe eine bekannte Menge Insektizid zusetzen (Aufstocken, Standard-Addition) und dann aufarbeiten. Dies ist zwar aufwendiger, erspart aber die Bestimmung der Wiederfindungsrate, die zudem Schwankungen unterworfen sein kann.

- d) Sie erwarten Konzentrationen von einigen Milligramm Insektizid pro Kilogramm Erdreich. Schlagen Sie Methoden vor, die Erdprobe aufzuarbeiten und die Insektizide zu quantifizieren! Welche Schwierigkeiten erwarten Sie? Würden Sie eine HPLC-Methode vorziehen?

Die Insektizide müssen aus dem Erdreich mit einem apolaren Lösungsmittel extrahiert werden. Dazu ist es sinnvoll, die Probe vorgängig zu trocknen. Dies sollte nicht durch Erhitzen geschehen, damit möglichst keine Verluste auftreten. Die Aufarbeitung des Erdreichs ist wesentlich aufwendiger als jene des Trinkwassers. Es ist auch damit zu rechnen, dass deutlich mehr Verunreinigungen aus dem Erdreich extrahiert werden, als dies beim Trinkwasser der Fall ist. Die tausendfach grössere Konzentration der Insektizide dürfte diese zusätzlichen Schwierigkeiten wettmachen.

Die Quantifizierung gestaltet sich ähnlich wie bei der Trinkwasserprobe. Man kann die Wiederfindungsrate bestimmen und sich darauf verlassen, dass sie einigermaßen konstant ist, oder man kann die Insektizide dem Erdreich zusetzen und die Aufarbeitung durchführen. Die Schwierigkeiten der Quantifizierung sind deutlich grösser als beim Trinkwasser. Mit entsprechend hohen Messfehlern ist zu rechnen.

Eine HPLC-Methode ist auch hier nicht geeignet. Das Trennproblem ist gegenüber dem Trinkwasser wesentlich verschärft, da das Extraktionsmittel viele zusätzliche Verunreinigungen in vergleichsweise grosser Konzentration aus dem Erdreich löst. Es wäre wiederum ein MS als Detektor unerlässlich.

Hinweis:

Auch andere Lösungsvorschläge wurden positiv bewertet, wenn sie in sich schlüssig waren. Uns interessiert nicht die letzte Wahrheit, die auch Experten nicht am Schreibtisch herausfinden können, sondern die grundsätzliche Fähigkeit, die Probleme zu benennen und Lösungsvorschläge zu unterbreiten.