

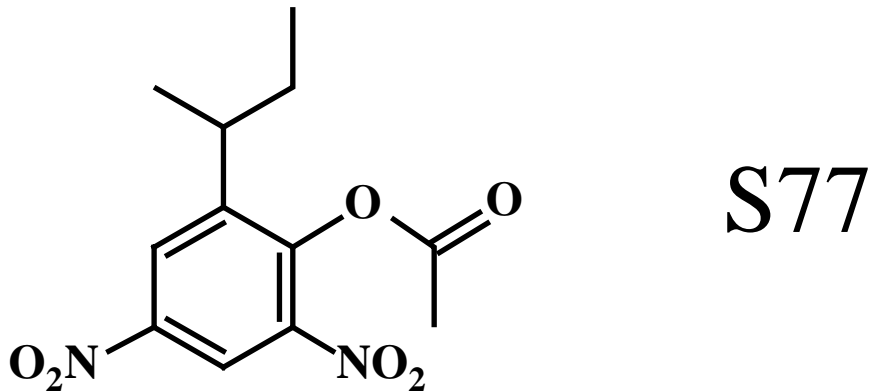
**Schriftliche Prüfung 2. Vordiplom
Frühling 2004****D – CHAB/BIOL****Musterlösung**

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.

Aufgabe 1 6 Punkte

Auf den folgenden Seiten finden Sie die IR-, Massen-, ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren der Verbindung **S77**. Sie weist folgende Konstitution auf:



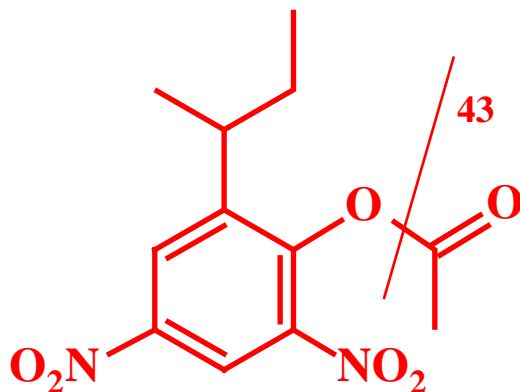
Die Verbindung hat die relative Molmasse $M_r = 282$.

Einige Hinweise zu den Spektren:

Beachten Sie die Skala des Massenspektrums. Sie reicht nur von 0-10 %. Der Basispeak ist also wesentlich höher als gezeigt.

- a) Erklären Sie den Basispeak im Massenspektrum. Nehmen Sie dazu mindestens zwei Fragmentierungsregeln zu Hilfe. (3 Punkte, einen für die Fragmentierung, je einen für eine richtig angewandte Regel)

Fragmentierung:

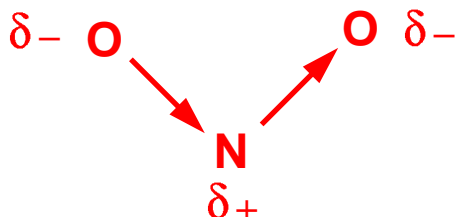


Regel IV: Die Fragmentierung wird vom doppelt gebundenen O-Atom gesteuert.

Regel V: Wenn die Bindung zu einem elektronegativen Heteroatom bricht, bleibt die Ladung bevorzugt auf der C-Seite. Das Fragment mit der Masse 43 ist also geladen und daher im Spektrometer sichtbar. Das ungeladene Fragment kann den Detektor nicht erreichen.

- b) Die Bande zwischen 1800 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} gehört zur Streckschwingung der C=O-Gruppe. Oftmals ist diese Bande die stärkste im Spektrum. In diesem Fall hingegen wird sie von der Bande bei 1530 cm^{-1} übertroffen, die zur asymmetrischen N=O-Streckschwingung der Nitrogruppen gehört. Erklären Sie die grosse Intensität der Bande. (2 Punkte)

Eine Bande ist dann besonders intensiv, wenn sich während der Schwingung das Dipolmoment des Moleküls stark ändert. Dies ist wiederum der Fall, wenn sich die Kerne von lokalen Dipolen stark bewegen. Die Nitrogruppe verfügt über zwei sehr starke Dipole, die beide schwingen. Zudem sind zwei Nitrogruppen und nur eine Carbonylgruppe im Molekül vorhanden.



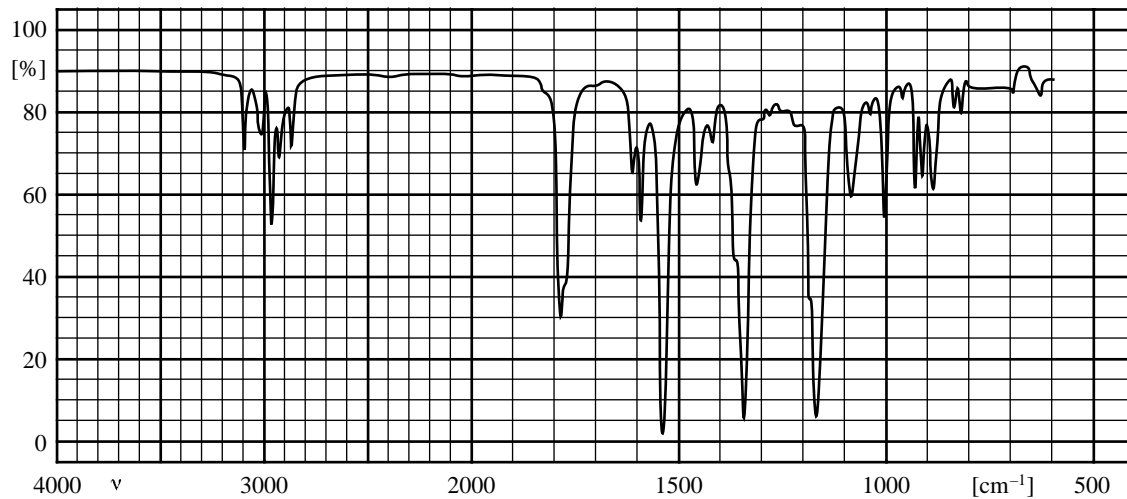
- c) Stellen Sie sich vor, Sie müssten die Struktur von **S77** anhand der Spektren aufklären. Sie vermuten, dass **S77** ein Bromatom enthält. Nennen Sie ein Argument, das dagegen spricht. (1 Punkt)

Das Isotopenmuster von Br ist sehr charakteristisch. Wenn **S77** ein Br-Atom enthielte, dann müsste im MS neben dem Peak des Molekülions auch noch ein Isotopensignal bei $M+2$, also $m/z=284$ erscheinen. Die Intensität von 284 wäre etwa gleich gross wie jene von 282. Dieses Signal findet man nicht.

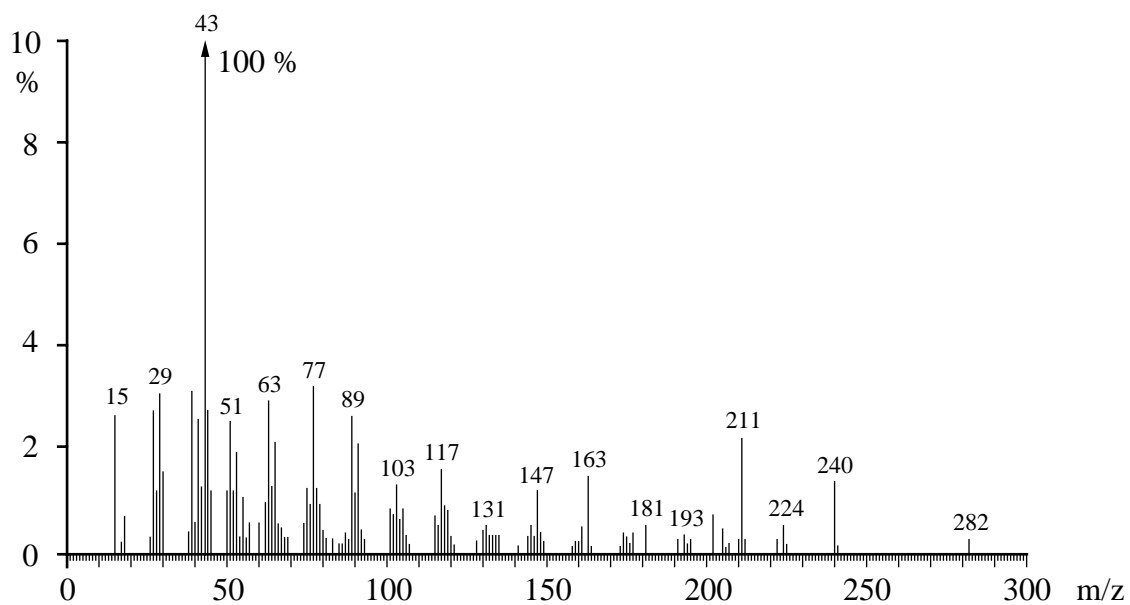
Die Anwesenheit eines Br-Atoms impliziert hingegen nicht, dass ein Signal bei 79/81 (für Br^+) oder 80/82 (für HBr) im Spektrum erscheint. Dies ist zwar möglich aber nicht notwendig.

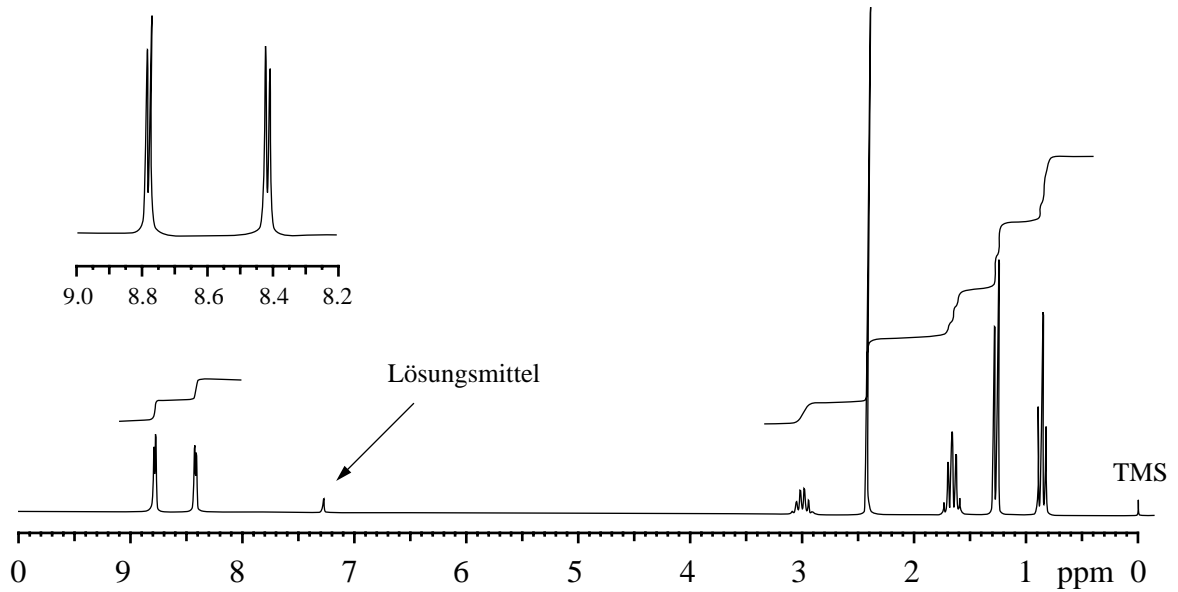
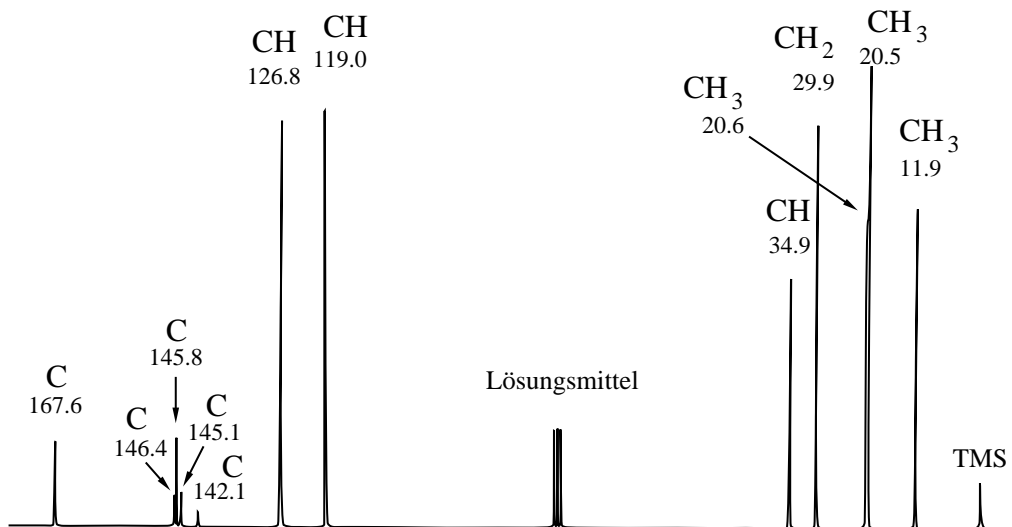
IR: Perkin-Elmer Modell 125
aufgenommen in CHCl_3 , Schichtdicke 0.1 mm

S77



MS: EI, 70 eV



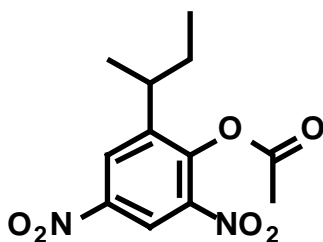
$^1\text{H-NMR}$:**S77**200 MHz, aufgenommen in CDCl_3  **$^{13}\text{C-NMR}$:****S77**50 MHz, protonen-breitbandentkoppelt, aufgenommen in CDCl_3 

Aufgabe 2 8 Punkte

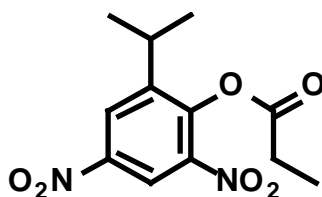
Für die Verbindung **S77** werden die alternativen Konstitutionen 1-4 vorgeschlagen. Finden Sie für jede Alternative mindestens zwei spektroskopische Argumente, die gegen sie sprechen.
(maximal 2 Punkte pro Alternative)

Hinweis: Im ^{13}C -NMR-Spektrum ist jeweils angegeben, ob es sich um C-, CH-, CH_2 - oder CH_3 -Umgebungen handelt. Diese Information bekommt man mit dem ^{13}C -NMR-Spektrum allein nicht. Dazu braucht es zusätzliche Experimente, z.B. DEPT-Spektren. Der Einfachheit halber wird darauf im Weiteren nicht eingegangen.

S77



①



Die beiden Methylgruppen der Isopropylgruppe sind symmetrisch angeordnet. Man fände im ^{13}C -NMR-Spektrum nur ein Signal, insgesamt also nur 2 CH_3 -Umgebungen statt 3.

Aus dem gleichen Grund müsste im ^1H -NMR-Spektrum ein Dublett mit Integral 6 erscheinen.

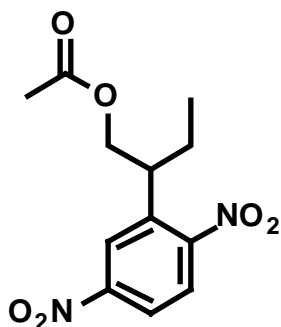
Im ^1H -NMR-Spektrum müsste ein 7-Liniensystem mit Integral 1 erscheinen.

Im ^1H -NMR-Spektrum müsste ein Quartett mit Integral 2 erscheinen.

Im ^1H -NMR-Spektrum dürfte kein Singlett mit Integral 3 erscheinen.

Der Basispeak im MS müsste durch die Abspaltung der Isopropylgruppe erklärt werden. Die sehr hohe Intensität des Basispeaks wird aber durch keine Fragmentierungsregel gestützt.

②



Man fände im ^{13}C -NMR-Spektrum nur 2 CH_3 -Umgebungen statt 3.

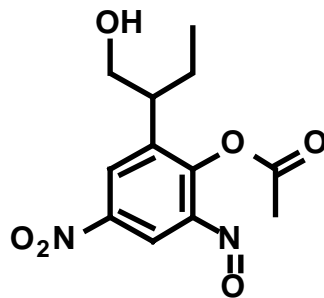
Man fände im ^{13}C -NMR-Spektrum 2 CH_2 -Umgebungen statt nur einer.

Im ^1H -NMR-Spektrum müsste ein Dublett mit Integral 2 erscheinen.

Im ^1H -NMR-Spektrum müsste ein 5-Liniensystem mit Integral 1 erscheinen.

Im aromatischen Ring befinden sich 3 CH-Gruppen statt 2. Man fände im ^{13}C -NMR-Spektrum 3 CH-Signale im Bereich der chemischen Verschiebungen oberhalb von 100 ppm statt 2 (1 Punkt). Zudem würden im ^1H -NMR-Spektrum im Bereich oberhalb von 6 ppm nicht zwei Dublette mit je Integral 1 erscheinen, sondern Signale mit einer wesentlich komplizierteren Aufspaltung und dem totalen Integral 3 (1 Punkt).

3



Hinweis zum ^1H -NMR-Spektrum: Es ist nicht klar, ob im Lösungsmittel CHCl_3 das Proton der OH-Gruppe mit der benachbarten CH_2 -Gruppe koppeln würde. Dies hängt von der Reinheit des Lösungsmittels und anderer Aufnahmebedingungen ab.

Man fände im ^{13}C -NMR-Spektrum nur 2 CH_3 -Umgebungen statt 3.

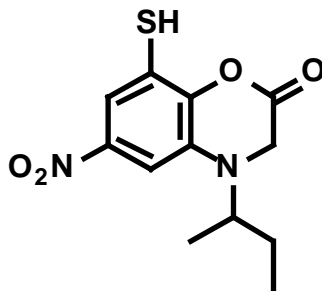
Man fände im ^{13}C -NMR-Spektrum 2 CH_2 -Umgebungen statt nur einer.

Im ^1H -NMR-Spektrum müsste ein 5-Liniensystem mit Integral 1 erscheinen.

Im ^1H -NMR-Spektrum müsste ein zusätzliches Signal mit Integral 1 erscheinen (OH-Gruppe)

Im IR-Spektrum müsste eine Bande bei ca. 3600 cm^{-1} für die O–H-Streckschwingung erscheinen.

4



Man fände im ^{13}C -NMR-Spektrum nur 2 CH_3 -Umgebungen statt 3.

Man fände im ^{13}C -NMR-Spektrum 2 CH_2 -Umgebungen statt nur einer.

Im ^1H -NMR-Spektrum dürfte kein Singlett mit Integral 3 erscheinen.

Im ^1H -NMR-Spektrum müsste ein zusätzliches Singlett mit Integral 1 erscheinen (SH-Gruppe).

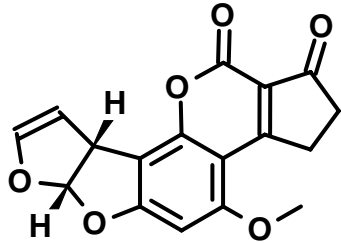
Im ^1H -NMR-Spektrum müsste ein Singlett mit Integral 2 erscheinen. Hinweis: Dies setzt die Isochronie der beiden H-Atome voraus. Dies ist aber durch die Nachbarschaft eines chiralen Zentrums (aliphatische CH-Gruppe) nicht garantiert. Es würde dann ein AB-System resultieren. Das Argument wird dennoch als richtig angesehen.

Der Basispeak im MS ist durch keine Fragmentierungsregel gestützt. (Dieses Argument wird bei Ringsystemen nur akzeptiert, wenn durch die Spaltung einer Einfachbindung eine Fragmentierung und nicht nur eine Ringöffnung erfolgen kann.)

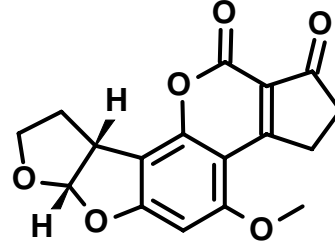
Im IR-Spektrum müsste eine Bande bei ca. 2550 cm^{-1} für die S-H-Streckschwingung erscheinen. (Bandenlage muss nicht bekannt sein). Dieses Argument ist nicht sehr stark. Die Bande ist oft sehr schwach und kann mit einem Oberton oder dergleichen verwechselt werden.

Aufgabe 3 12 Punkte

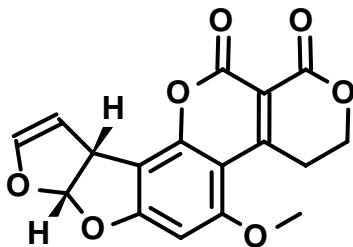
Aflatoxine sind eine Gruppe von etwa 20 Toxinen, die von Schimmelpilzen der Gattung *Aspergillus* gebildet werden. Vier der wichtigsten Aflatoxine haben folgende Strukturen:



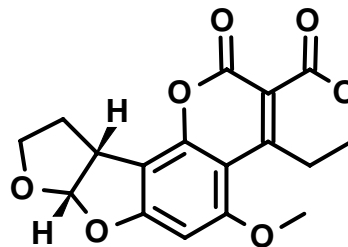
Aflatoxin B1



Aflatoxin B2



Aflatoxin G1



Aflatoxin G2

Aflatoxine sind die stärksten krebserregenden Substanzen natürlichen Ursprungs. Sie können hauptsächlich in Getreide, Gewürzen, Nüssen und Feigen gebildet werden. Für Aflatoxine in Lebensmitteln besteht ein gesetzlicher Höchstwert von wenigen $\mu\text{g}/\text{kg}$. Sie haben die Aufgabe, die Konzentration der Aflatoxine B1, B2, G1 und G2 in gemahlene Erdnüssen zu bestimmen.

Die Aflatoxine B1, B2, G1 und G2 haben folgende Eigenschaften:

Schmelzpunkt: $230^\circ\text{C} - 289^\circ\text{C}$

Absorptionsmaximum λ_{max} : $350\text{ nm} - 360\text{ nm}$

molarer Extinktionskoeffizient ϵ : $16400 - 21000$

löslich in Aceton, Acetonitril, Benzol, Chloroform, Methanol

schwerlöslich in Wasser, Hexan

Fluoreszenz: Anregung bei 365 nm , Emission bei 440 nm

Folgendes Material steht Ihnen zur Verfügung:

- 20 kg gemahlene Erdnüsse
- Mörser, Mixer, Glaswaren
- übliche Lösungsmittel und Reagenzien
- Je 1 mg der Aflatoxine B1, B2, G1, G2

- Immunoaffinitätssäulen zur hoch spezifischen Bindung der Aflatoxine B1, B2, G1, G2.
Angaben des Herstellers: Monoklonale Antikörper gegen die Aflatoxine sind kovalent an ein inertes Trägermaterial gebunden (stationäre Phase). Als mobile Phase kann nur Wasser verwendet werden. Der maximal mögliche Anteil an organischen Lösungsmitteln beträgt 5 %. Ein grösserer Anteil würde die Bindungsfähigkeit der Antikörper kompromittieren. Wird zum Beispiel reines Methanol auf die Säule gegeben, denaturieren die Antikörper und verlieren ihre Bindungsfähigkeit vollständig und permanent. Eine Säule kostet Fr. 20.--.
- Gaschromatograph mit den Detektoren FID, ECD, WLD und den üblichen Säulen
- HPLC-Anlage mit den Detektoren UV/VIS, Brechungsindex, Fluoreszenz und den üblichen Säulen
- CE-Apparatur mit den Detektoren UV/VIS, Brechungsindex, Fluoreszenz

Fragen:

- a) Entwerfen Sie eine Methode zur Extraktion und der anschliessenden Reinigung der Aflatoxine aus den gemahlene Erdnüssen. Geben Sie eine detaillierte Anleitung. Begründen Sie die einzelnen Schritte. (4 Punkte)

Erdnüsse enthalten nebst festem Material auch Wasser und Fett. Die Aflatoxine lösen sich nicht in Wasser und apolaren Lösungsmitteln, daher muss das Material mit einem polaren organischen Lösungsmittel behandelt werden. Im Hinblick auf eine spätere Verwendung der Immunoaffinitätssäulen wird ein Lösungsmittel verwendet, das sich mit Wasser in jedem Verhältnis mischt, z.B. Acetonitril oder Methanol. Die Aflatoxine sind sehr inhomogen in den gemahlene Erdnüssen verteilt, darum wird eine grosse Menge Material, mehrere Kilogramm, zur Extraktion verwendet (dieses Wissen wird nicht vorausgesetzt). Das Material wird mit einer entsprechenden Menge Lösungsmittel versetzt und intensiv gemischt. Dies kann mit einem Mixer oder einer Schüttelmaschine geschehen. Je besser die Durchmischung und allfällige weitere Zerkleinerung ist, desto kürzer kann die Extraktionszeit sein. Das entstehende Gemisch wird filtriert oder zentrifugiert. Vom Filtrat wird eine aliquote Menge genommen und weiter verarbeitet.

An dieser Stelle bieten sich mehrere Möglichkeiten des weiteren Vorgehens an. Im Handel befinden sich chromatographische Säulen, die nur einmal verwendet werden. Sie absorbieren einen grossen Teil der Verunreinigungen, lassen aber die Aflatoxine passieren (Festphasenextraktion). Das Eluat kann dann für die weitere chromatographische Trennung verwendet werden. Die Methode der Wahl ist aber die Verwendung der Immunoaffinitätssäulen. Sie binden hochspezifisch nur die Aflatoxine. Weil sie nur 5% organische Lösungsmittel vertragen, muss mit einer grossen Menge Wasser verdünnt werden. Diese Lösung wird auf die Säule gegeben. Das Eluat wird verworfen. Anschliessend wird die Säule mit reinem Wasser gespült. Gemäss Angaben des Herstellers können die Antikörper mit reinem Methanol denaturiert werden. Die Aflatoxine können also mit wenig Methanol aus der Säule gewaschen werden. Weil dadurch die Säule permanent zerstört wird, kann sie nur ein einziges Mal verwendet werden. Der bescheidene Preis von Fr. 20.-- rechtfertigt aber dieses Vorgehen.

- b) Beschreiben Sie ein möglichst geeignetes chromatographisches System zur Trennung und Detektion der vier Aflatoxine B1, B2, G1, G2. Begründen Sie die Eignung der einzelnen Komponenten. Falls mehrere Detektoren geeignet sind, welcher bietet die meisten Vorteile? (3 Punkte)

Der Schmelzpunkt von über 200° C zeigt, dass Aflatoxine nicht flüchtig sind. Eine Gaschromatographie kommt also nicht in Frage. Um eine elektrophoretische Methode verwenden zu können, müssten die Aflatoxine elektrisch geladen werden können. Dies erscheint nicht möglich.

Es bleibt demnach eine HPLC-Methode. Die Aflatoxine unterscheiden sich in einer Doppelbindung und einem O-Atom. Dadurch ergeben sich Unterschiede in der Polarität. Eine gewöhnliche Umkehrphasen-Methode dürfte also geeignet sein. Als Detektor eignen sich UV und Fluoreszenz. Der UV-Detektor ist zweifellos empfindlich, da die Aflatoxine über ein grosses konjugiertes System verfügen. Noch besser geeignet ist der Fluoreszenzdetektor, da bekannt ist, dass die Aflatoxine fluoreszieren. Er wird dadurch spezifischer auf die Aflatoxine, da viele noch verbleibende Verunreinigungen eine UV-Absorption aber keine Fluoreszenz zeigen. Der Fluoreszenzdetektor ist zudem empfindlicher als der UV-Detektor. (Hinweis: Es stellt sich heraus, dass nicht alle Aflatoxine unter diesen chromatographischen Bedingungen ausreichend fluoreszieren. Daher sind weitere Massnahmen wie Nachderivatisierung nötig. Dieses Wissen wird selbstverständlich nicht vorausgesetzt.)

- c) Wie bestimmen Sie die Konzentration der vier Aflatoxine in den Erdnüssen? Welche Art der Kalibration ist geeignet? Begründen Sie Ihre Ansicht. (1 Punkt)

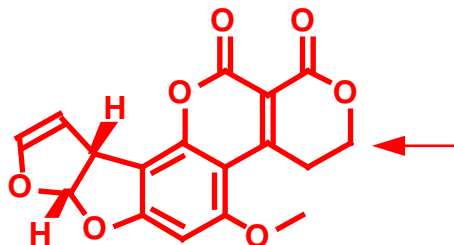
Es ist nicht damit zu rechnen, dass sich die Aflatoxine vollständig extrahieren lassen. Der extrahierbare Anteil ist also zu bestimmen. Dies geschieht durch Zugabe einer bekannten Menge Aflatoxin zur Probe und einer erneuten Aufarbeitung (Standardaddition). Alternativ kann ein interner Standard zu der Probe zugegeben werden, z. B. ein deuteriertes Aflatoxin. Die Linearität des Fluoreszenzdetektors ist ausgezeichnet. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Peakfläche im Chromatogramm proportional zur Menge Aflatoxin ist.

- d) Stellen Sie sich vor, Sie seien im Besitz des Massen-, und des ^1H -NMR-Spektrums des Aflatoxins B1. Könnten Sie die Unterschiede zu den entsprechenden Spektren des Aflatoxins G1 vorhersagen? Wenn ja, nennen Sie die Unterschiede. Wenn nein, begründen Sie, warum es nicht möglich ist. Geben Sie eine Antwort für jedes der beiden Spektren. (Je 2 Punkte für jedes Spektrum)

Die Struktur des Aflatoxins G1 unterscheidet sich von jener des Aflatoxins B1 durch die Anwesenheit eines zusätzlichen O-Atoms in einem Ring. Die folgenden Unterschiede sind dadurch in den Spektren zu erwarten:

Massenspektrum: Die Molmassen unterscheiden sich um 16 Masseneinheiten. Falls der Dampfdruck der Aflatoxine in der Ionenquelle des Spektrometers gross genug ist, kann ein EI-Spektrum aufgenommen werden. Dann besteht die Möglichkeit, dass die Molekülonen sichtbar sind. Beides ist aber nicht garantiert. Das Wissen über die Wahrheit wird nicht vorausgesetzt. Jede sinnvolle Antwort wird richtig gewertet. Über ein unterschiedliches Fragmentierungsverhalten kann nichts vorhergesagt werden. Die bekannten Regeln zeigen bestenfalls an, wo bevorzugt ein Ring geöffnet wird. Das führt aber noch nicht zu einer Fragmentierung.

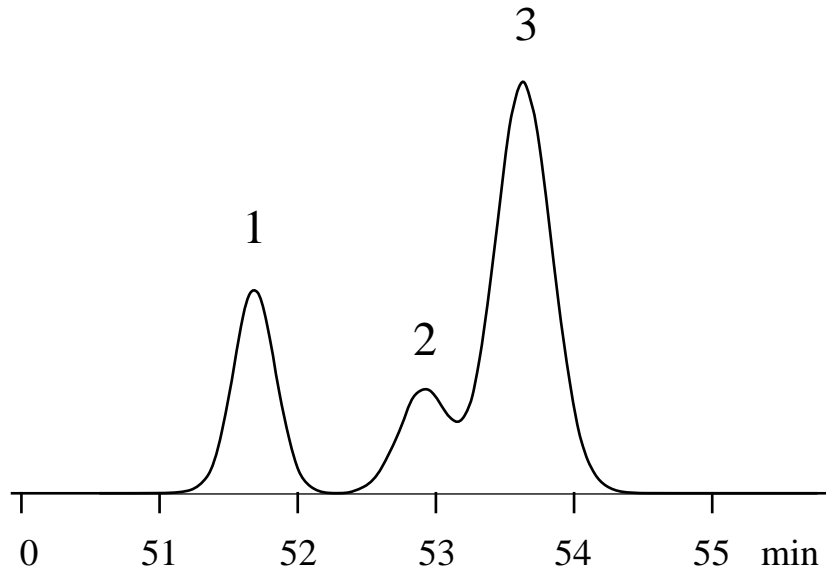
^1H -NMR-Spektrum:



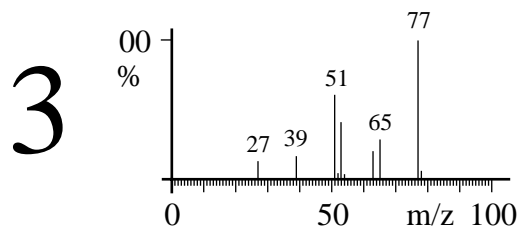
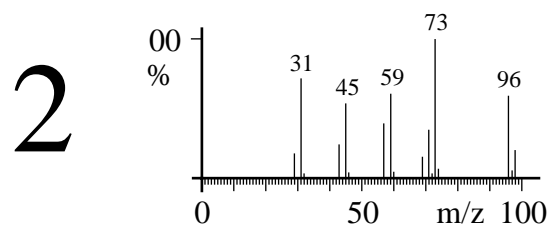
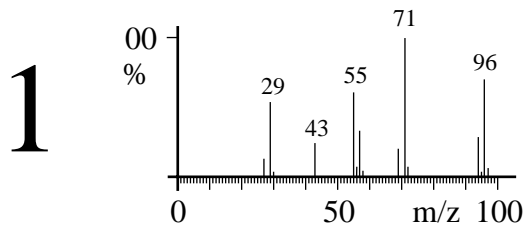
Das Aflatoxin G1 besitzt eine CH_2 -Gruppe (Pfeil), die einem O-Atom benachbart ist. Beim Aflatoxin B1 steht diese Gruppe neben einer Carbonylgruppe. Die zugehörigen Protonen unterscheiden sich deutlich in der chemischen Verschiebung, die im Fall des Aflatoxins G1 oberhalb von 4 ppm liegen dürfte. Beim anderen Toxin liegt sie unterhalb von 3 ppm. Es ist nicht nötig, die chemischen Verschiebungen absolut zu kennen. Wichtig ist die höhere chemische Verschiebung beim Aflatoxin G1 und die Begründung.

Aufgabe 4 4 Punkte

Sie haben die Aufgabe, die Konzentration von drei Substanzen in einem Gemisch zu bestimmen. Es ist Ihnen gelungen, ein Trennsystem zu finden und zu optimieren, das die drei Substanzen von allen anderen separieren kann. Das Resultat sehen Sie in untenstehendem Gaschromatogramm.



Zur Detektion wurde der totale Ionenstrom (TIC) eines Massenspektrometers verwendet. Die drei Substanzen, bezeichnet mit 1, 2 und 3, weisen folgende Massenspektren im Bereich unterhalb von $m/z=100$ auf:

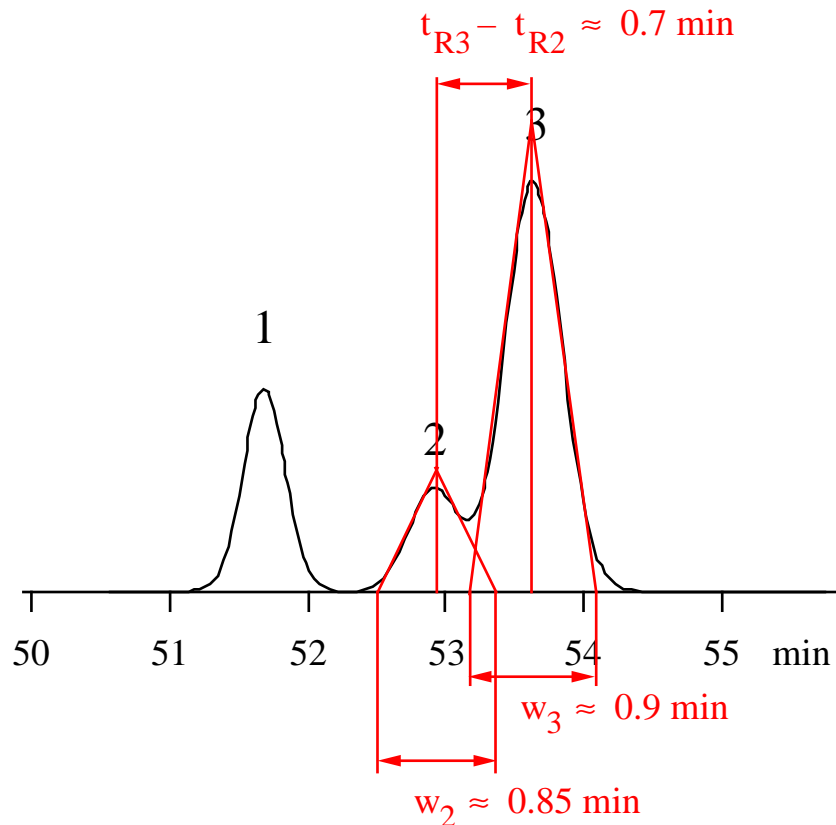


- a) Schätzen Sie die Auflösung zwischen den Substanzen 2 und 3 im Chromatogramm ab. (2 Punkte)

Die Auflösung wird nach folgender Formel berechnet:

$$R_S = \frac{t_{R3} - t_{R2}}{\frac{w_2}{2} + \frac{w_3}{2}}$$

Die Peakbreiten können nur abgeschätzt werden. Alle sinnvoll erscheinenden Werte wurden akzeptiert. Mit den unten eingezeichneten Grössen ergibt sich eine Auflösung von $R_S = 0.8$.



- b) Die Auflösung zwischen den Substanzen 2 und 3 ist für die Bestimmung ihrer Konzentration ungenügend. Schlagen Sie Massnahmen vor, die eine Quantifizierung ohne wesentlichen Mehraufwand ermöglichen. (2 Punkte)

Die einfachste Massnahme ist die Verwendung des Massenspektrometers als selektiven Detektor. Man verwendet nicht den Totalionenstrom, sondern registriert das Chromatogramm gleichzeitig bei drei Massen, wobei jede für eine Substanz charakteristisch ist. Für die drei Substanzen 1, 2 und 3 eignen sich z. B. die Massen 71, 96 und 77, wie man in den Massenspektren sieht. Da die Substanz 1 durch das Trennsystem gut von den anderen separiert ist, könnte man auch nur die Massen 96 und 77 verwenden. Bei Masse 96 würden dann die Substanzen 1 und 2 detektiert, bei Masse 77 die Substanz 3.

Alternativ kann auch versucht werden, durch Ändern der chromatographischen Parameter die Trennung zu verbessern. So könnte man ein flacheres Temperaturprogramm führen, die Flussgeschwindigkeit der mobilen Phase erniedrigen oder gar eine andere Säule verwenden. All diese Massnahmen sind jedoch mit einem wesentlichen Mehraufwand verbunden, was gemäss Aufgabestellung nicht erwünscht ist. Entsprechende Antworten wurden trotzdem bewertet.

Aufgabe 5 6 Punkte

Bei üblichen gaschromatographischen Trennungen mit apolarer stationärer Phase zeigen polare Aldehyde und Ketone oft stark verbreiterte, asymmetrische Peaks. Man kann sich mit einer Derivatisierung durch PFBHA oder DNPH behelfen, mit der die Polarität erniedrigt werden kann. Der Zeitaufwand durch die Derivatisierung ist allerdings erheblich.

Sie haben die Aufgabe, ein Gemisch von ausschliesslich polaren Aldehyden zu trennen.

- a) Beschreiben Sie ein alternatives Trennsystem, um eine Derivatisierung zu vermeiden. Welchen Detektor setzen Sie ein? (3 Punkte)

Es gibt für die Gaschromatographie auch polare stationäre Phasen, mit denen polare Substanzen gut getrennt werden können. Als Detektor eignet sich der Flammenionisationsdetektor oder ein Massenspektrometer. Es kann auch eine HPLC-Methode verwendet werden. Als Detektor eignen sich UV bei kleiner Wellenlänge oder Brechungsindex.

- b) Aldehyde können in sauren Lösungen unter Bildung von Acetalen zu leicht hydrolysierbaren Polymeren reagieren. Schlagen Sie ein Analysensystem vor, mit dem Sie die Acetal-Polymere voneinander trennen und ihre Molmasse bestimmen können. Wie kalibrieren Sie das System bezüglich Molmasse? (3 Punkte)

Als Trennsystem eignet sich Gelpermeationschromatographie, bei der die Moleküle nach ihrer Grösse getrennt werden. Die Molmasse lässt sich mittels Massenspektrometrie direkt bestimmen. Als Alternative können auch Polymere mit bekannten Molmassen verwendet werden.