

**Schriftliche Prüfung 2. Vordiplom  
Herbst 2003****D – CHAB/BIOL****Musterlösung**

---

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

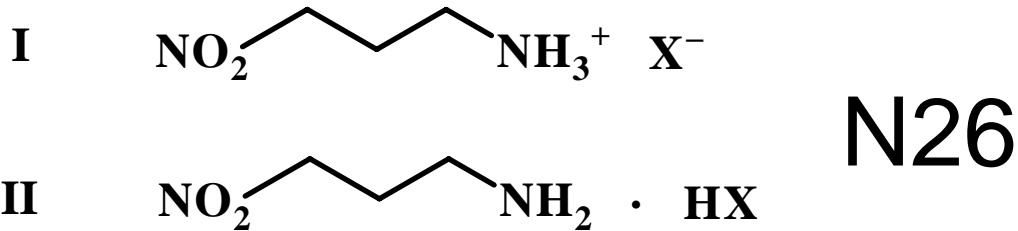
---

- ◆ 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.
- ◆ Wir bitten Sie um Fairness und wünschen Ihnen viel Erfolg!



## Aufgabe 1 10 Punkte

Auf den folgenden Seiten finden Sie die IR-, Massen-,  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren der Verbindung N26. Sie weist folgende Konstitution auf:



Die beiden Schreibweisen I und II können als äquivalent angesehen werden. Das Element X ist ein unbekanntes Halogen (F, Cl, Br, I). Das Amin (Schreibweise II ohne das HX) hat die relative Molmasse  $M_r = 104$ .

Einige Hinweise zu den Spektren:

Im Massenspektrum von N26 sind ausschliesslich einfach positiv geladene Ionen sichtbar.

In einem EI-Massenspektrum sieht man im Fall eines Ammoniumsalzes, wie im vorliegenden Fall, ein Gemisch des freienamins und der freien Säure, entsprechend Schreibweise II.

Zur Aufnahme der NMR-Spektren wurde sechsfach deuteriertes Dimethylsulfoxid (DMSO- $d_6$ ) als Lösungsmittel verwendet:  $\text{CD}_3\text{---SO---CD}_3$

Protonen, die an Heteroatome wie O oder N gebunden sind, bezeichnet man als austauschbar. Sie können ihre Position von einem Molekül zu einem anderen wechseln, wodurch Kopplungen zu anderen Protonen oft nicht sichtbar sind. Im Lösungsmittel DMSO hingegen bilden diese Protonen Wasserstoffbrücken zu den O-Atomen des Lösungsmittels und tauschen ihre Plätze nur noch sehr langsam. Sie werden gleichsam an ihrem Ort festgehalten. Dadurch werden Kopplungen zu anderen Protonen sichtbar, wenn der Abstand höchstens 3 Bindungen beträgt.

**Zusätzlicher Hinweis durch die Examinatoren zu Anfang der Prüfung bei der Besprechung der Aufgaben: Das breite Signal im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum bei 8.4 ppm stammt von den Protonen, die direkt an das N-Atom gebunden sind.**

- a) Um welches Halogen handelt es sich beim Atom X? Begründen Sie Ihre Wahl mit mindestens zwei Argumenten! (2 Punkte, einen für jedes Argument)

Im Massenspektrum sieht man ein Gemisch des freienamins und der freien Säure HX. Dabei ist aber nicht klar, ob HX zu Peaks mit nennenswerter Intensität führt. Es sind also alle Möglichkeiten zu überprüfen:

HF:  $m/z = 20$  nicht vorhanden

HCl:  $m/z = 36$  vorhanden

HBr:  $m/z = 80$  nicht vorhanden

HI;  $m/z = 128$  schwerer als Molekülion

Das Signal von HCl ist also das einzig mögliche für die freie Säure (Argument 1). Wenn  $m/z = 36$  wirklich HCl darstellt, dann muss auch ein Signal bei  $m/z = 38$  vorhanden sein. Die Isotopenverteilung von Chlor (35:37) beträgt ungefähr 3:1. Man findet tatsächlich ein Signal bei

$m/z = 38$  mit etwa einer Intensität von einem Drittel der Intensität von  $m/z = 36$  (Argument 2). Auch das Signal  $m/z = 35$  ist klar erkennbar. Wenn es sich dabei um Chlor handelt, muss auch das Isotop bei  $m/z = 37$  mit einer Intensität von einem Drittel der Intensität von  $m/z = 35$  auftreten. Dies ist der Fall (Argument 3).

- b) Liegt die Verbindung N26 im Lösungsmittel DMSO als Amin ( $-\text{NH}_2$ ) oder als Ammonium ( $-\text{NH}_3^+$ ) vor? Begründen Sie Ihre Ansicht mit mindestens zwei Argumenten! (2 Punkte, einen für jedes Argument)

Das Lösungsmittel DMSO wurde für die Aufnahme der NMR-Spektren verwendet. Daher müssen diese Spektren Auskunft geben. Es geht um die Frage, ob sich am N-Atom zwei oder drei Protonen befinden. Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum gibt keine Auskunft über Protonen, die sich an Heteroatomen befinden. Also muss das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum bemüht werden.

Die Integralverhältnisse der Signale beträgt 3:2:2:2. Die zusätzlichen Signale, die vom Lösungsmittel und vom gelösten Wasser stammen, dürfen nicht berücksichtigt werden. Es handelt sich um Artefakte. Die entsprechenden Peaks sind bezeichnet. Entscheidend ist das Integral der Protonen, die sich am N-Atom befinden. Es sind 3 Protonen, also liegt die Verbindung als Ammoniumsalz vor (Argument 1).

In beiden zu unterscheidenden Fällen erwartet man ein Signal, das in 3 Linien aufspaltet (4.8 ppm): die linke  $\text{CH}_2$ -Gruppe hat 2 Nachbarn. Ebenso klar führt die mittlere  $\text{CH}_2$ -Gruppe zu einem 5-Liniensystem (2.3 ppm), weil die entsprechende  $\text{CH}_2$ -Gruppe 4 Nachbarn hat. Der Unterschied liegt bei der  $\text{CH}_2$ -Gruppe, die dem N-Atom benachbart ist. Nachdem im Lösungsmittel DMSO die Kopplungen zwischen Protonen an Heteroatomen und anderen Protonen sichtbar sind, müssen die Protonen dieser  $\text{CH}_2$ -Gruppe das entsprechende Aufspaltungsmuster zeigen. Es ist ein zweites 5-Linien-Signal zu erwarten, wenn die Substanz als Amin vorliegt. Im Fall einer Ammoniumverbindung ist mit einem 6-Liniensystem zu rechnen. Letzteres trifft zu. Man findet das Signal bei 2.9 ppm, (Argument 2).

Falls das Amin und die freie Säure vorliegen, muss ein Signal erscheinen, das vom HCl stammt. Es gibt kein solches Singlett mit Integral 1 (Argument 3).

- c) Erklären Sie den Basispeak im Massenspektrum! Nehmen Sie dazu die Fragmentierungsregeln zu Hilfe! (2 Punkte)

Es wurden nur Regeln behandelt, die mit einer direkten Fragmentierung zu tun haben (zumindest in der Zusammenfassung, die für die Prüfung relevant ist). Es gibt nur eine Möglichkeit, durch die Spaltung einer Einfachbindung ein Fragment mit der Masse 30 zu erhalten: Beachten Sie, dass im Massenspektrum das freie Amin und die freie Säure als Gemisch im Verhältnis 1:1 zu sehen sind, nicht das Ammoniumsalz.



Die Fragmentierung wird durch das N-Atom gesteuert. Gemäss Regel IV bricht nicht die Bindung, die unmittelbar zum Heteroatom führt, sondern eine daneben liegende.

- d) Das IR-Spektrum wurde als KBr-Pressling aufgenommen. Sind dabei Sperrgebiete zu berücksichtigen? Warum wurde nicht eine Lösung in  $\text{CHCl}_3$  verwendet? (2 Punkte)

Bei einem KBr-Pressling sind keine Sperrgebiete zu berücksichtigen. KBr ist im ganzen relevanten Frequenzbereich ausreichend durchsichtig.

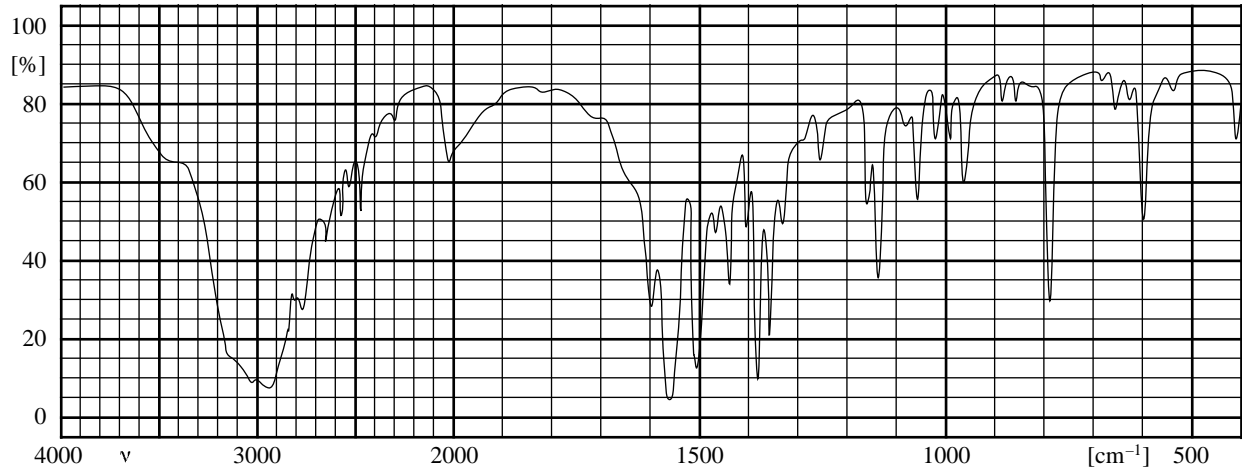
Die bevorzugte Aufnahmetechnik ist die Lösung in Chloroform, weil die Moleküle dann weitgehend voneinander getrennt sind und sich nicht übermäßig beeinflussen. Ein Salz ist in einem apolaren Lösungsmittel wie  $\text{CHCl}_3$  hingegen nicht ohne Weiteres löslich. Dann weicht man auf andere Aufnahmetechniken aus, für Festkörper z. B. den KBr-Pressling.

- e) Jemand empfiehlt Ihnen, zur Detektion von N26 in einem HPLC-Experiment einen UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 350 nm zu verwenden. Was halten Sie davon? (2 Punkte)

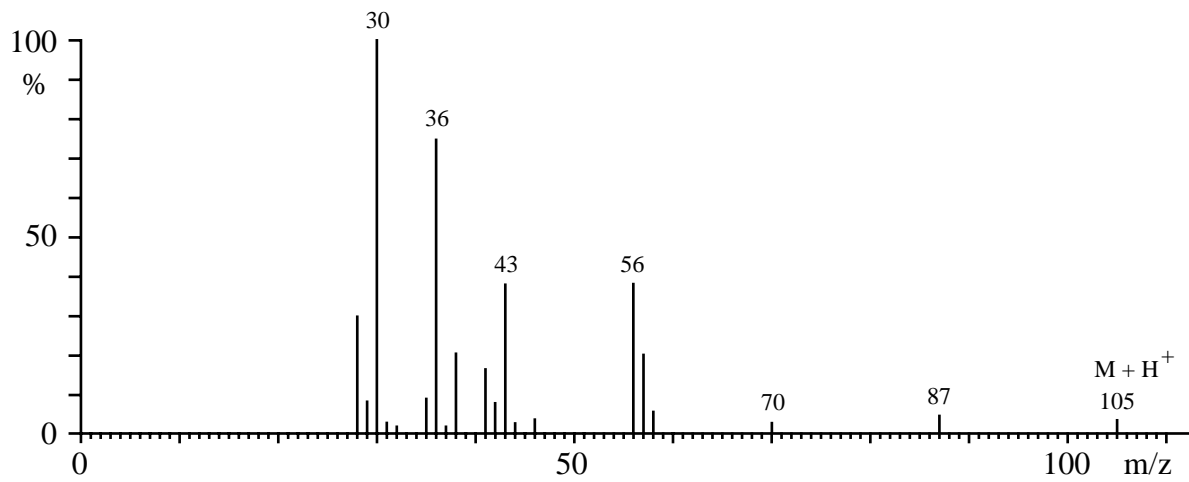
Damit eine Substanz UV-Licht von 350 nm absorbiert, muss sie mehrere konjugierte Doppelbindungen enthalten. Dies ist in der vorliegenden Verbindung nicht der Fall. Aliphatische Nitroverbindungen zeigen aufgrund der Nitrogruppe eine sehr schwache Absorptionsbande bei etwa 280 nm. Es ist aber nicht nötig, die Tabellen zu konsultieren, um zu erkennen, dass ein UV-Detektor bei 350 nm für die vorliegende Verbindung blind ist. Jede zusätzliche konjugierte Doppelbindung verschiebt das Absorptionsmaximum um etwa  $30 \text{ nm}$ .

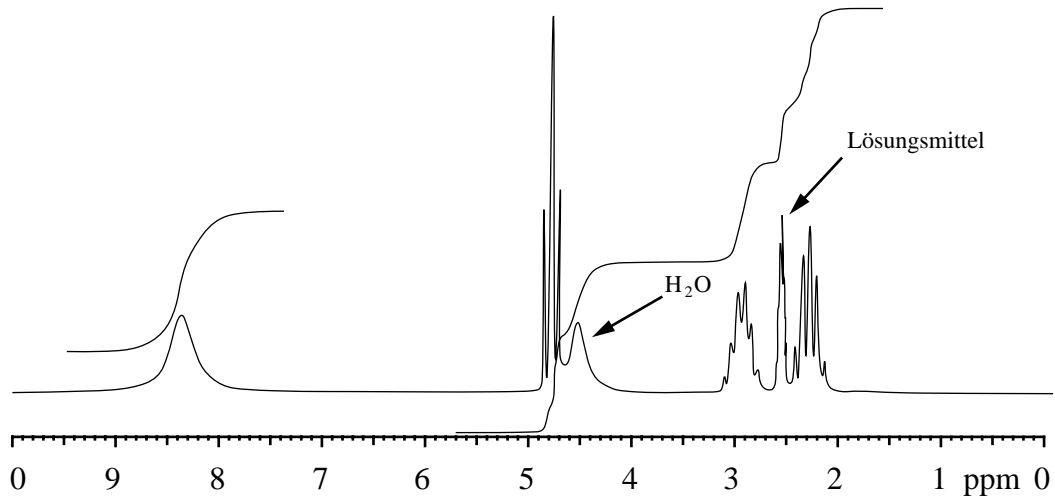
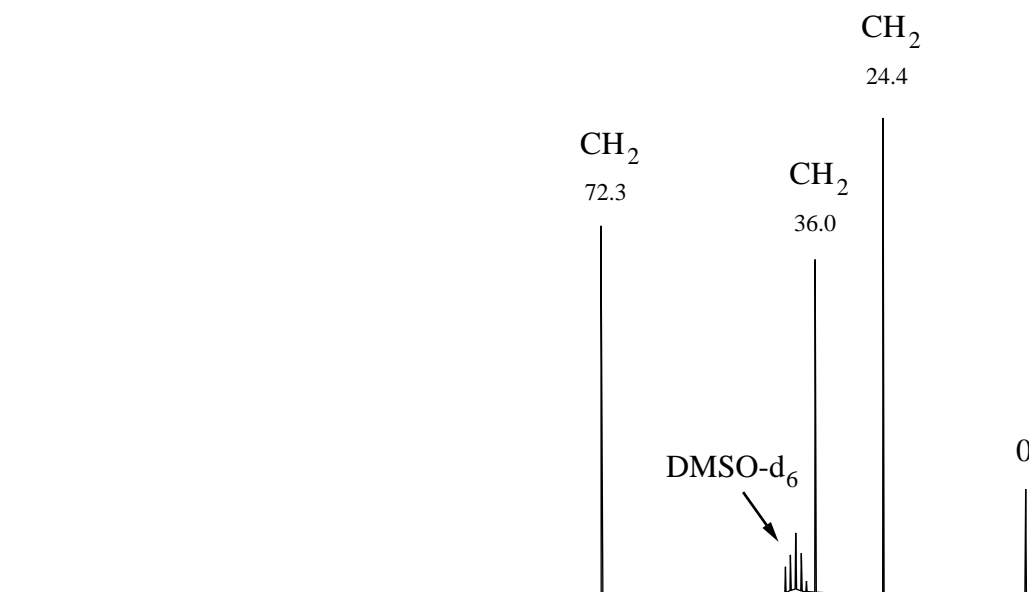
**IR:** Perkin-Elmer Modell 125  
aufgenommen als KBr-Pressling

**N26**



**MS:** EI, 70 eV

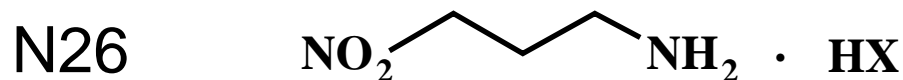


**$^1\text{H-NMR}$ :****N26**100 MHz, aufgenommen in  $\text{DMSO-d}_6$  **$^{13}\text{C-NMR}$ :****N26**22.5 MHz, protonen-breitbandentkoppelt, aufgenommen in  $\text{DMSO-d}_6$ 

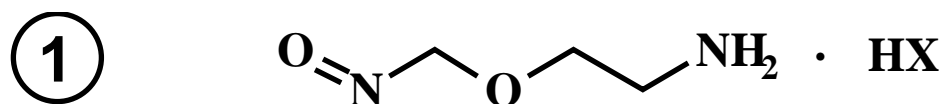
## Aufgabe 2 8 Punkte

Für die Verbindung N26 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)



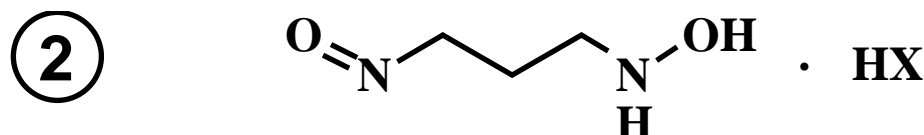
Hinweis zum  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum: Falls Frage 1b) falsch beantwortet wurde, also im Lösungsmittel DMSO das Amin postuliert wurde, wird in dieser Aufgabe ebenfalls davon ausgegangen, dass die Alternativen in der Aminform vorliegen. Dies verhindert eine ungewollte Abhängigkeit zwischen den Fragen. Im Folgenden wird angenommen, dass die Frage richtig beantwortet wurde. Das N-Atom trägt also bei allen Alternativen ein zusätzliches Proton.



Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum müsste ein Singlett mit Integral 2 bei grosser chemischer Verschiebung erscheinen, da eine der  $\text{CH}_2$ -Gruppen keine Nachbarn hat.

Es kann im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum kein Quintett erscheinen. Keine  $\text{CH}_2$ -Gruppe hat 4 Nachbarn.

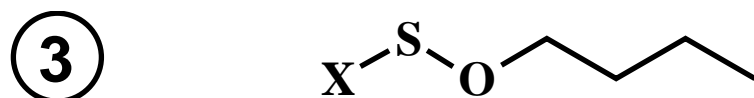
Der Basispeak im MS ist durch eine direkte Fragmentierung machbar ( $m/z=30$  durch NO). Die Spaltung ist gemäss Regel IV bevorzugt (gesteuert durch das Ether-O-Atom). Aufgrund von Regel V ist aber zu erwarten, dass die Ladung auf die C-Seite wandert und daher das Fragment mit der Masse 30 nicht so prominent sein sollte. (Regel V muss explizit erwähnt werden).



Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum kann kein breites Signal mit Integral 3 erscheinen, das zu den Protonen am N-Atom gehört (vgl. Hinweis der Examinatoren, ganz oben). Es müssten zwei Signale sein, eines mit Integral 2 (Protonen am N-Atom) und eines mit Integral 1 (die OH-Gruppe). Dies gilt als zwei Argumente, wenn klar ausformuliert (Integral falsch und zusätzliches Signal).

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum kann kein Sextett erscheinen. Keine  $\text{CH}_2$ -Gruppe hat 5 Nachbarn.

Der Basispeak im MS ist zwar durch eine direkte Fragmentierung machbar ( $m/z=30$  durch NO). Gemäss Regel IV ist die Spaltung aber nicht bevorzugt (2 Punkte, wenn die Regel erwähnt wurde). Aufgrund von Regel V ist zu erwarten, dass die Ladung auf die C-Seite wandert und daher das Fragment mit der Masse 30 nicht so prominent sein sollte. (2 Punkte, wenn Regel V erwähnt wurde).



Im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum würde man aufgrund der  $\text{CH}_3$ -Gruppe ein zusätzliches Signal erwarten.



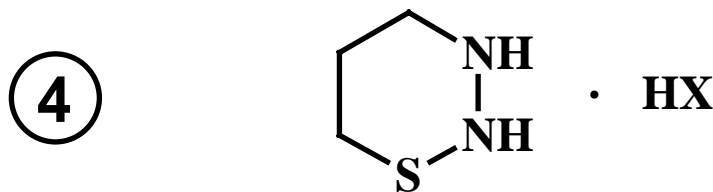
Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum kann kein breites Signal mit dem Integral 3 erscheinen.

Die relative Molmasse des Moleküls beträgt 140. Im Massenspektrum ist aber  $M+1$  mit  $m/z=105$  bezeichnet.

Der Basispeak im MS kann nicht erklärt werden.

Die sehr breite Bande mit Zentrum bei etwa  $3000\text{ cm}^{-1}$  im IR-Spektrum kann nicht erklärt werden. (Sie gehört zur N–H-Streckschwingung der Ammoniumgruppe).

Die Bande bei  $1560\text{ cm}^{-1}$  im IR-Spektrum kann nicht erklärt werden. (Sie gehört zur asymmetrischen N=O-Streckschwingung der Nitrogruppe).



Bemerkung: Es ist nicht klar, welches N-Atom durch die Säure protoniert wird.

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum kann kein breites Signal mit Integral 3 erscheinen, das zu den Protonen am N-Atom gehört (vgl. Hinweis der Examinatoren, ganz oben). Es müssten zwei Signale sein, eines mit Integral 2 (Protonen am einen N-Atom) und eines mit Integral 1 (Proton am anderen N-Atom). Dies gilt als zwei Argumente, wenn klar ausformuliert (Integral falsch und zusätzliches Signal).

Allgemeiner Hinweis zum  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum:

Da es sich bei diesem Molekül um eine Ringstruktur handelt, ist die Drehung um Einfachbindungen nicht unbeschränkt möglich. Protonen oberhalb der Ringebene können also nicht durch Drehung um Einfachbindungen unter die Ringebene gebracht werden. Daher ergibt sich ein sehr komplexes  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, da die Kopplungskonstanten zu Protonen oberhalb und unterhalb der Ringebene nicht gleich sind. Dieser Fall wurde in der Vorlesung nicht behandelt. Daher wird dieser Effekt nicht berücksichtigt.

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum kann kein Sextett erscheinen. Keine  $\text{CH}_2$ -Gruppe hat 5 Nachbarn.

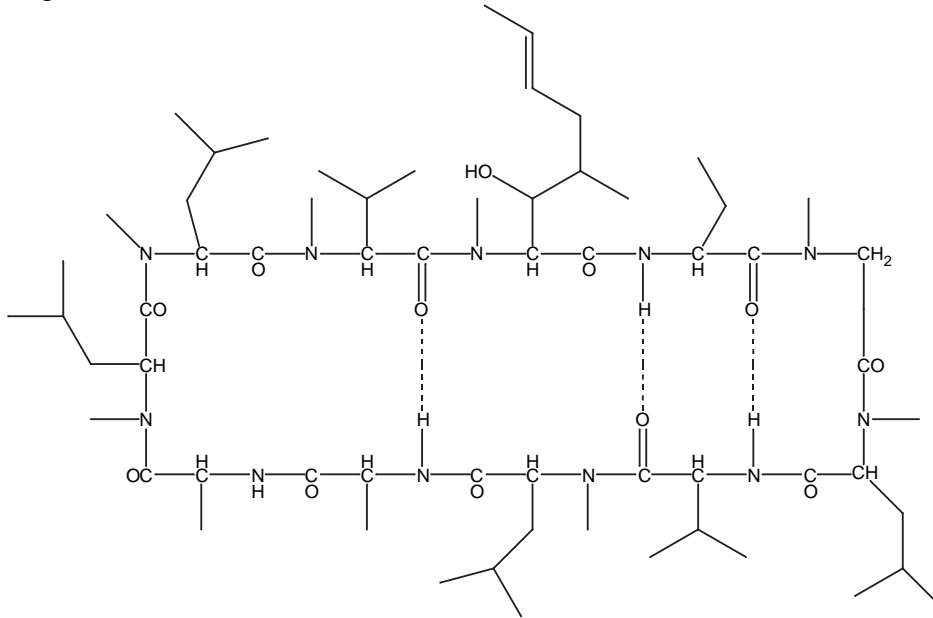
Die grosse chemische Verschiebung des Triplets bei 4.8 ppm kann nicht erklärt werden. Es gibt keine Nachbargruppe, die diesen enormen Effekt bewirken könnte.

Die Bande bei  $1560\text{ cm}^{-1}$  im IR-Spektrum kann nicht erklärt werden. (Sie gehört zur asymmetrischen N=O-Streckschwingung der Nitrogruppe).

(Massenspektrum: Die Regeln für die bevorzugte Spaltung von Bindungen führen im Fall einer Ringstruktur nicht zu einer eigentlichen Fragmentierung, sondern nur zu einer Ringöffnung. Da die Regeln nur ein einziges Mal angewendet werden dürfen, ist der Mechanismus der Fragmentierung nicht nachvollziehbar. Kein Argument aus dem Bereich der Massenspektrometrie wurde akzeptiert.)

### Aufgabe 3 5 Punkte

Cyclosporin ist eines der wirksamsten Medikamente für Transplantationspatienten zur Unterdrückung von Abstossungsreaktionen. Es wurde 1970 im Pilz *Tolypocladium inflatum* entdeckt. Unten ist die Struktur des cyclischen Peptids mit der relativen Molmasse 1203 dargestellt.



Cyclosporin löst sich in organischen Lösungsmitteln besser als in Wasser.

Es steht Ihnen eine weitgehend aufgearbeitete wässrige Pilzprobe zur Verfügung, die Cyclosporin neben Verunreinigungen in Form von anderen Peptiden enthält.

- a) Schlagen sie ein Trennsystem vor, um Cyclosporin von anderen Peptiden zu trennen! Welchen Detektor setzen Sie ein? Begründen Sie Ihre Ansicht! (2 Punkte)

Peptide und Proteine können durch einen pH-Puffer gezielt positiv oder negativ geladen werden. Bei kleinen pH-Werten werden die Aminogruppen protoniert und dadurch positiv geladen. Bei hohen pH-Werten werden die Carboxylgruppen deprotoniert und dadurch negativ geladen. An den Endpunkten eines Peptids befindet sich eine Carboxyl- bzw. eine Aminogruppe. Durch die Wahl eines bestimmten pH-Wertes mit einem Puffer kann das Verhalten eines Peptids bestimmt werden. Peptide können nicht nur an den Endpunkten geladen werden, sondern einige Aminosäuren verfügen auch über zusätzliche Amino- oder Carboxylgruppen in den Seitenketten. Jedes Protein oder Peptid trägt also bei einem bestimmten pH-Wert eine bestimmte (individuelle) totale Ladung.

In einem elektrischen Feld können geladene Spezies getrennt werden. Es drängt sich zur Lösung des Problems also eine elektrophoretische Methode auf.

Bei einer näheren Betrachtung des Cyclosporins fällt allerdings auf, dass dieses Molekül über keinerlei basische oder saure Gruppen verfügt. Die Enden der Kette haben sich zu einem Ring geschlossen, was weder Amino- noch Carboxylgruppen übriglässt. Keine der beteiligten Aminosäuren verfügt über eine zusätzliche Amino- oder Carboxylgruppe. Die Protonen der Amidgruppen sind nicht sauer genug, um durch milde basische Bedingungen deprotoniert zu werden. Das Cyclosporin kann also in seinem Verhalten durch einen Puffer kaum beeinflusst werden. Es verhält sich wie eine elektrisch neutrale Spezies.

Die Aufgabestellung lautet aber, dieses Molekül von anderen Peptiden zu trennen, deren Struktur nicht bekannt ist. Eine elektrophoretische Methode kann also dennoch die störenden Peptide zur Anode oder Kathode ziehen. Die nicht geladenen Spezies verharren etwa in der Mitte. Sie werden nur durch den elektroosmotischen Fluss bewegt.

Denkbar ist auch der Einsatz der Gelpermeations-Chromatographie. Dabei werden die Moleküle nach ihrer Grösse getrennt.

b) Was halten sie von einer Trennung mittels GC? Welchen Detektor würden Sie allenfalls verwenden? (1 Punkt)

Das Peptid ist so gross und polar, dass es nicht in die Gasphase gebracht werden kann. Eine Trennung mit GC ist daher nicht möglich. Die Frage nach dem Detektor erübrigt sich.

c) Mit welchen spektroskopischen Methoden würden sie versuchen, die Struktur dieses Peptids aufzuklären? Welche Methode liefert am meisten Information? (2 Punkte)

MS: Mit modernsten Laser-Desorptionsmethoden scheint eine Strukturaufklärung möglich, wenn man weiss, dass es sich um ein Peptid handelt. Diese Methoden wurden in der Vorlesung nicht explizit behandelt. Mit klassischer MS ist nichts auszurichten, da das Molekül nicht in die Gasphase gebracht werden kann.

IR: Es lassen sich die Banden der C–H-, N–H-, O–H-, und C=O-Streckschwingungen erkennen, die aber für ein Peptid unspezifisch sind, da sie immer auftreten.

<sup>1</sup>H-NMR: Mit dem klassischen eindimensionalen <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum lassen sich mit grosser Mühe die Seitenketten identifizieren. Wie die Aminosäuren verknüpft sind, lässt sich aber nicht feststellen, da nur Protonen innerhalb der Seitenketten miteinander koppeln können. (Mit zweidimensionalen Methoden können möglicherweise die Seitenketten rekonstruiert und allenfalls sogar die Aminosäure-Einheiten zusammengesetzt werden. Diese Methoden wurden aber in der Vorlesung nicht im Detail behandelt.)

<sup>13</sup>C-NMR: Es lassen sich nur die Anzahl Signale zählen. Durch zusätzliche Multipuls-Experimente kann noch zusätzlich bestimmt werden, ob es sich um C-, CH-, CH<sub>2</sub>-, oder CH<sub>3</sub>-Gruppen handelt. Über die Verknüpfung der C-Atome ist nichts weiter in Erfahrung zu bringen.

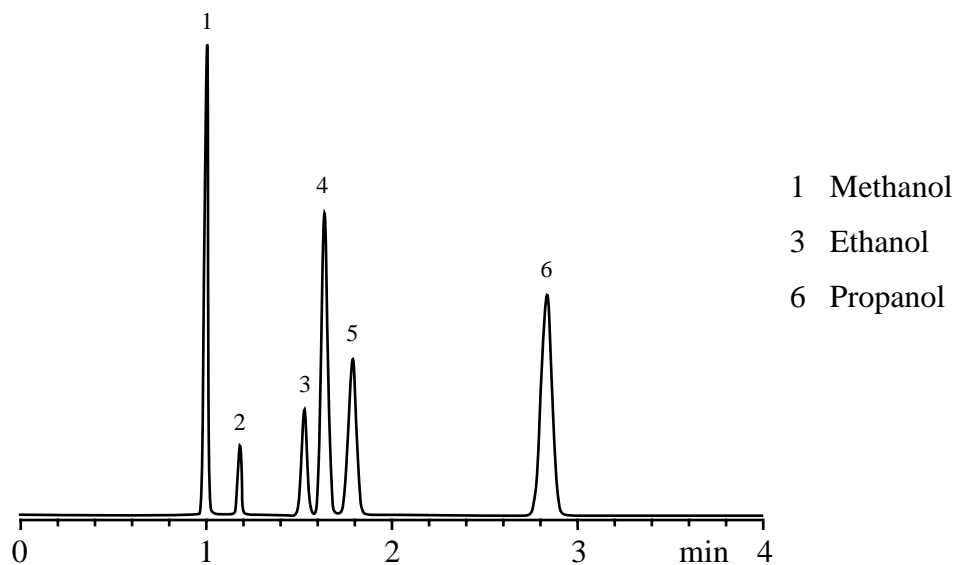
Nur das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum liefert überhaupt Information über die Verknüpfung von C-Atomen.

**Aufgabe 4      6 Punkte**

Die Bestimmung der Konzentration von Alkohol in Blut muss schnell und zuverlässig durchgeführt werden können. Das Blut wird in einem verschlossenen Röhrchen so lange stehen gelassen, bis die Konzentrationen von Alkohol im Blut und in der überstehenden Gasphase im Gleichgewicht stehen. Dann wird eine bestimmte Menge der Gasphase in den GC eingespritzt (Head-Space-Methode).

Sie haben die Aufgabe, ein Trennsystem zu finden, mit dem man pro Stunde so viele Analysen wie möglich durchführen kann.

In einem Katalog haben Sie untenstehendes Chromatogramm gefunden. Von den getrennten Substanzen interessieren Sie nur die drei Alkohole Methanol, Ethanol und Propanol.



Säule: Rtx-BAC2, 30 m Länge, 0.53 mm innerer Durchmesser, 2  $\mu$ m Schichtdicke  
Trärgas: He, 1 ml/min  
Injektortemperatur: 200° C  
Ofentemperatur: 40° C, isotherm

Das Trennsystem wurde so optimiert, dass alle gezeigten Peaks gerade noch basisliniengetrennt sind. Nachdem die Trennung von 3, 4 und 5 im vorliegenden Fall gar nicht bewerkstelligt werden muss, ist die Trennung der verbleibenden Peaks eigentlich zu gut. Man kann sich also eine gezielte Verschlechterung leisten.

Die Aufgabe besteht nicht darin, ein einzelnes Chromatogramm so schnell wie möglich zu beenden, sondern so viele Chromatogramme wie möglich in einer längeren Zeitperiode zu ermöglichen. Es ist also darauf zu achten, dass das Trennsystem nach einer Analyse möglichst schnell für die Bestimmung des nächsten Chromatogramms zur Verfügung steht.

- a) Welche Massnahmen stehen Ihnen zur Verfügung, um die Analysendauer von 3 Minuten pro Chromatogramm zu verkleinern? (2 Punkte)

Eine Erhöhung der Temperatur kann die Elution der Peaks beschleunigen. Dies ist die Methode der Wahl, da sie keine Änderung des Trennsystems erfordert. Ein Temperaturprogramm würde den Zeitvorteil wieder zunichte machen, da nach einer Analyse der Ofen des GC wieder auf die ursprüngliche Temperatur abgekühlt und danach einige Zeit konditioniert werden müsste. Dies dauert länger als 3 Minuten.

- b) Welchen chromatographischen Parameter müssen sie beachten, damit ihre Analyse weiterhin quantitativ auswertbar ist? (2 Punkte)

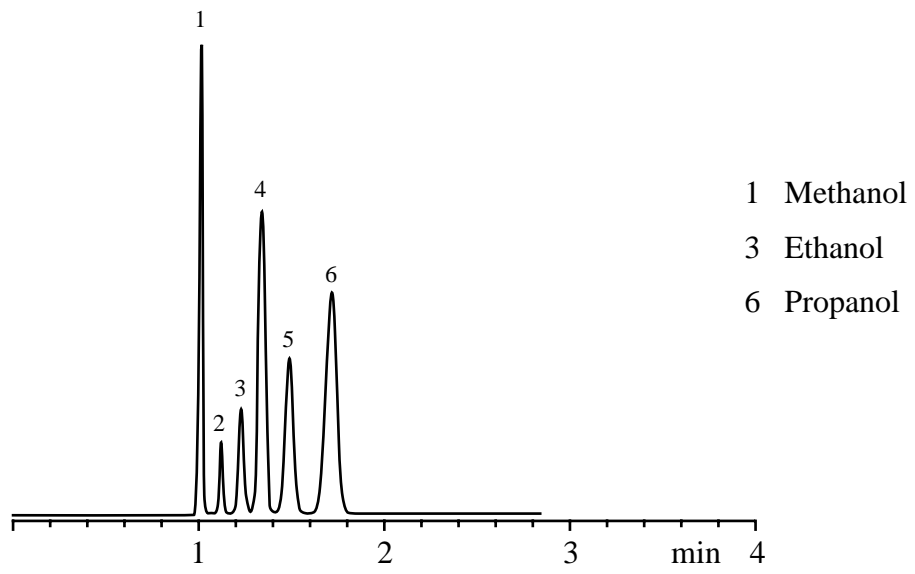
Die Auflösung zwischen den Peaks darf nicht zu klein werden. Anfang und Ende eines Peaks müssen auf der Basislinie liegen.

- c) Das untenstehende Chromatogramm zeigt das Resultat einer Analyse mit einem anderen Säulentyp. Hat sich die Anzahl theoretischer Böden bezüglich Peak 6 im Vergleich zu obigem Chromatogramm vergrößert oder verkleinert? Begründen Sie Ihre Ansicht! (2 Punkte)

Die Formel zur Berechnung der Bodenzahl  $N$  lautet:

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w} \right)^2$$

wobei  $t_R$  die Retentionszeit und  $w$  die Basisbreite bedeuten. Siehe Skript S. 12. Da die Basisbreite der Peaks etwa gleich ist, die Retentionszeit aber abgenommen hat, hat sich die Anzahl Böden verkleinert.



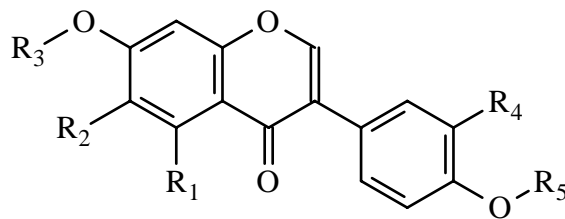
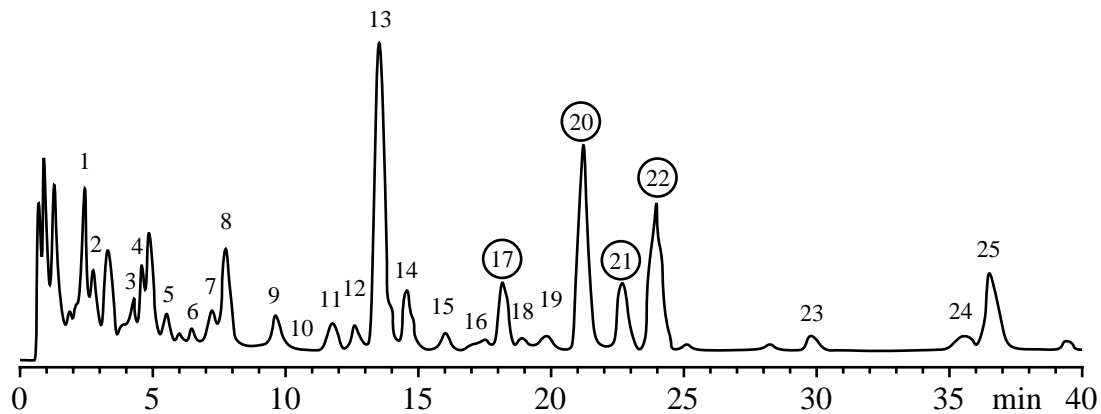
## Aufgabe 5 7 Punkte

Aus einer Kleeart wurden 25 verschiedene Verbindungen aus derselben Substanzklasse gewonnen und mit HPLC getrennt (siehe Chromatogramm und Strukturen unten).

Säule: Phenomenex Prodigy ODS3, 5µm Korngrösse, 150 mm Länge, 3.2 mm innerer Durchmesser.

Mobile Phase: Gemisch von Acetonitril und Wasser:

Linearer Konzentrationsgradient von 20 % bis 40 % Acetonitril



| Peak-Nr. | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> | R <sub>5</sub>  |
|----------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| 17       | OH             | OH             | H              | OH             | H               |
| 20       | OH             | H              | H              | H              | H               |
| 21       | unbekannt      |                |                |                |                 |
| 22       | H              | H              | H              | H              | CH <sub>3</sub> |

- a) Was für eine stationäre Phase wurde wohl für die Trennung dieser Substanzen verwendet? Begründen Sie Ihre Ansicht! (2 Punkte)

Nachdem als mobile Phase ein Gemisch von Acetonitril und Wasser verwendet wurde, also ein polares Laufmittel, handelt es sich um eine Umkehrphasen-Chromatographie. Die stationäre Phase ist also ein Silicagel, bei dem die OH-Gruppen durch lange Kohlenwasserstoffketten verethert wurden.

Betrachtet man die Strukturen der Substanzen 17, 20 und 22, so fällt auf, dass die Anzahl der OH-Gruppen, und damit die Polarität, in dieser Reihenfolge abnimmt. Die apolarste Verbindung 22 bleibt also am längsten auf der Säule, die damit ebenfalls apolar sein muss.

- b) Welche Detektionsmethode erscheint Ihnen geeignet für diese Substanzklasse? Warum? (1 Punkt)

Die Substanzgruppe hat mehrere konjugierte Doppelbindungen, was sie für die Detektion mit einem UV-Spektrometer sehr geeignet macht.

- c) Um das gezeigte Chromatogramm zu erhalten, musste das Pflanzenmaterial aufgearbeitet werden. Wie würden Sie dabei vorgehen? Welche Massnahmen müssen Sie ergreifen, um eine Kleepflanze so aufzuarbeiten, dass Sie einige  $\mu\text{l}$  Flüssigkeit in einen HPLC einspritzen können? (2 Punkte)

Mehrere Methoden können in Betracht gezogen werden. Das Pflanzenmaterial muss sicher zerkleinert werden. Dazu eignet sich z. B. ein schnell rotierender Stabmixer. Zusammen mit etwas Wasser oder einem mit Wasser mischbaren Lösungsmittel wird ein dünnflüssiger Brei erzeugt. Dieses Material wird geklärt, indem es zentrifugiert oder filtriert wird.

Denkbar ist auch, die Pflanzen zu trocknen und das wasserfreie Material in einer Soxhlet-Apparatur mit einem Lösungsmittel wie Ethanol, Acetonitril, Essigester oder Hexan zu extrahieren. Bei Verwendung eines apolaren Lösungsmittels könnte der Extrakt zur Trockene eingedampft und mit Acetonitril oder Laufmittel wieder aufgenommen werden.

In jedem Fall muss die einzuspritzende Flüssigkeit durch ein Mikrofilter filtriert werden, damit es die Trennsäule nicht verstopft. Zudem muss die Flüssigkeit mit dem Laufmittel in jedem Verhältnis mischbar sein.

Auch andere Aufarbeitungsmethoden wie eine Flüssig-flüssig-Extraktion oder dergleichen wurden als richtig akzeptiert.

- d) Sie interessieren sich im Wesentlichen nur für die Peaks 17, 20, 21 und 22. Zudem haben Sie den Verdacht, dass in den Peaks 21 und 22 jeweils mindestens zwei verschiedene Substanzen co-eluieren. Daher wollen Sie diesen Teil des Chromatogramms besonders detailliert untersuchen. Wie ändern Sie die chromatographische Methode, um dieses Ziel zu erreichen? (2 Punkte)

Diese Aufgabe ist am Schreibtisch nicht einfach zu lösen. Die vorgeschlagenen Methoden müssten im Labor ausprobiert werden. Daher wurden alle sinnvoll erscheinenden Massnahmen als richtig angesehen:

Die vorliegende Methode wurde dahingehend optimiert, möglichst viele der erscheinenden Peaks voneinander zu trennen. Ein Verändern des Konzentrationsgradienten oder ein isokratischer Betrieb drängen sich daher auf. Normalerweise wird der Vorschlag, einen Parameter zu "ändern", in einer solchen Prüfung nicht mit der vollen Punktzahl bewertet. Wir wollen wissen, auf welche Seite man einen Parameter ändern soll. Hier wurden alle Vorschläge als richtig anerkannt: das Laufmittel apolarer oder polarer machen oder "ändern", den Gradienten "anpassen".

Man könnte generell die Auflösung verbessern, indem die Anzahl Trennstufen durch eine längere Säule vergrößert wird. Diese Massnahme stösst aber schnell an ihre Grenzen. Die eingesetzte Säule hat bereits eine Länge von 15 cm. Um die Auflösung zu verdoppeln, müsste die Säulenlänge vervierfacht werden. Zwei 25 cm lange gestopfte Säulen hintereinander zu schalten, muss bereits als Verzweiflungstat bezeichnet werden. Die möglichen kleinen Flussraten führen zu einem sehr langen Chromatogramm.