

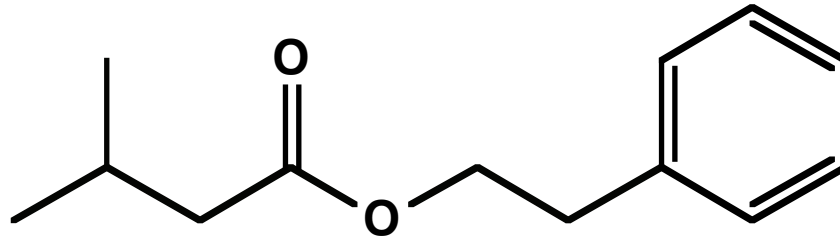
**Schriftliche Prüfung BSc
Frühling 2013****D – CHAB/BIOL****Musterlösung**

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.
- ◆ Schreiben Sie jedes abzugebende Blatt einzeln mit Ihrem Namen an.
- ◆ Dieses Deckblatt ist ausgefüllt abzugeben.
- ◆ Wir bitten Sie um Fairness: Disziplinarverordnung RSETH 361.1
- ◆ Viel Erfolg!

Aufgabe 1 16 Punkte

Auf den folgenden Seiten finden Sie das IR-, Massen-, ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung **Z18**. Sie hat folgende Konstitution:



Die Verbindung hat die relative Molmasse $M_r = 206$.

Hinweis zum ^1H -NMR-Spektrum: Die gedehnten Ausschnitte haben in der Horizontalen den gleichen Massstab. Die Dehnung in der Vertikalen ist hingegen individuell.

- a) Ordnen Sie die Protonen den Signalen im ^1H -NMR-Spektrum zu. Eine Begründung ist nicht notwendig. Die Protonen am aromatischen Ring können gemeinsam einer Signalgruppe zugeordnet werden. **6 x 0.5 Punkte**

Siehe Spektrum.

- b) Im ^1H -NMR-Spektrum erscheinen bei 2.18 ppm zwei nahe beieinander liegende Linien. Gehören diese Linien zusammen? Wenn ja, erklären Sie, wie die Linien entstehen, insbesondere das Intensitätsverhältnis. **2 Punkte**

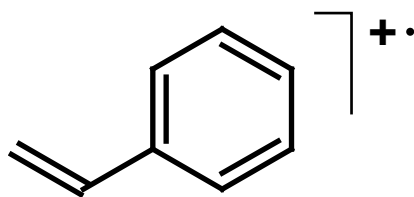
Es handelt sich um ein Dublett, aufgespalten aufgrund der Nachbarschaft eines Protons, dessen Signal bei 2.1 ppm erscheint. Der Unterschied in den chemischen Verschiebungen der Kopplungspartner ist kleiner als die zehnfache Kopplungskonstante (Linienabstand). Daher ist das Kriterium für erste Ordnung nicht erfüllt. Die höhere Ordnung macht sich durch den grossen Dacheffekt bemerkbar. Die beiden Linien des Dubletts werden dadurch unterschiedlich intensiv.

- c) Die Signalgruppe im ^1H -NMR-Spektrum oberhalb von 7 ppm zeigt ein komplexes Aufspaltungsmuster. Ist eine Rationalisierung sinnvoll möglich? Was ist der Grund für die Komplexität? Welche experimentellen Massnahmen könnte man ergreifen, um die Situation zu verbessern? **2 Punkte**

Die Signale gehören zu den Protonen am aromatischen Ring. Die grosse Ähnlichkeit der chemischen Verschiebungen führt zu Effekten höherer Ordnung und Überlagerung von Signalen. Daher ist eine Rationalisierung nicht sinnvoll möglich. Das Aufspaltungsmuster ist unverständlich.

Man könnte die Situation etwas entschärfen, wenn ein Spektrometer mit grösserer Magnetfeldstärke und dadurch bei höherer nominaler Frequenz verwendet wird. (Für Freaks: Durch Erhöhung der Feldstärke kann man nicht alle Effekte höherer Ordnung ausschalten. Zwei Paare von Protonen sind isochron und nicht magnetisch äquivalent. Deren Unterschied in der chemischen Verschiebung (null) ist immer klein verglichen mit der Kopplungskonstante.)

d) Der Basispeak im Massenspektrum entsteht durch eine Umlagerung:



Man kann dem Peak $m/z=104$ unmittelbar ansehen, dass das Fragment nicht durch die direkte Spaltung einer Einfachbindung von **Z18** entstanden ist. Wie erkennt man das?

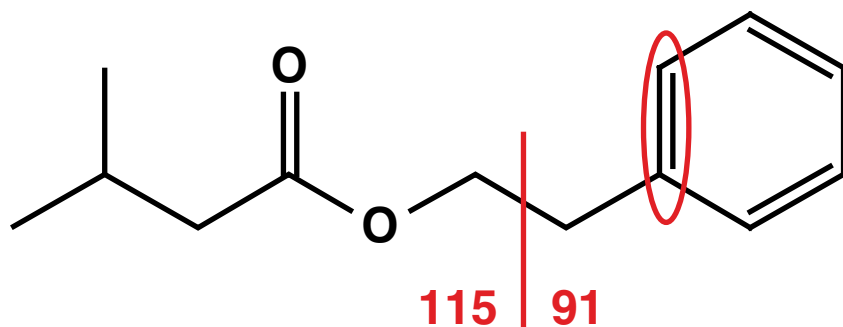
1 Punkt

Die nominale Masse ist eine gerade Zahl.

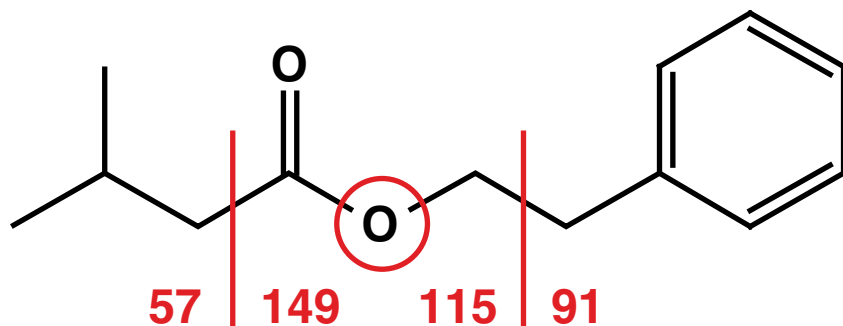
Bei Molekülen, die kein N-Atom (und keine exotischen Elemente) enthalten, ist die nominale Molmasse eine gerade Zahl. Fragmente von solchen Molekülen, die durch den Bruch einer Einfachbindung entstehen, haben ungerade nominale Massen.

e) Wenden Sie die Fragmentierungsregeln III, IV und V erschöpfend auf die Verbindung **Z18** an. Erklären Sie jeweils, welche Bindung gespalten wird, und welche strukturelle Eigenheit die Spaltung steuert. Welche Signale im Massenspektrum können Sie mit den Regeln rationalisieren? 6 Punkte

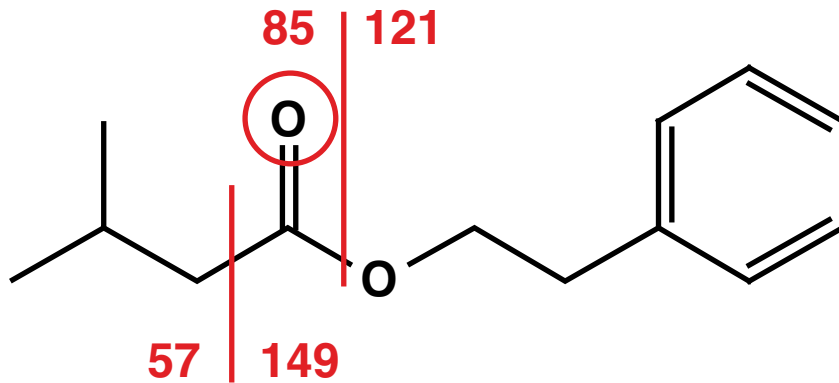
Regel III: Steuernde Einheit C=C eingekreist



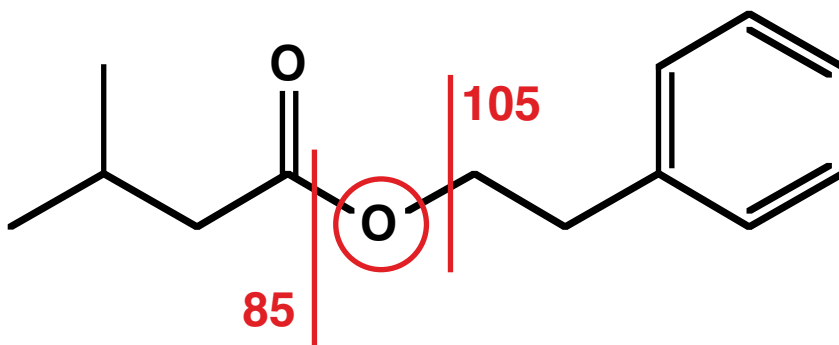
Regel IV: Steuernde Einheit O-Atom eingekreist



Regel IV: Steuernde Einheit O-Atom eingekreist



Regel V: Steuernde Einheit O-Atom eingekreist



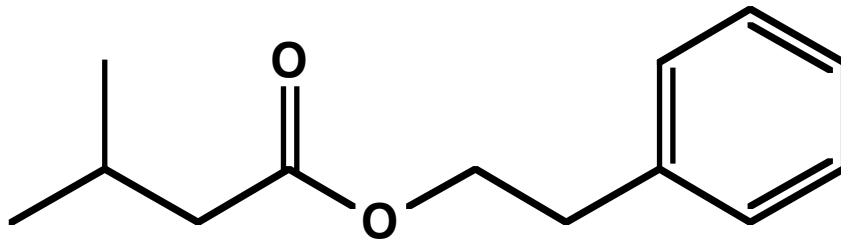
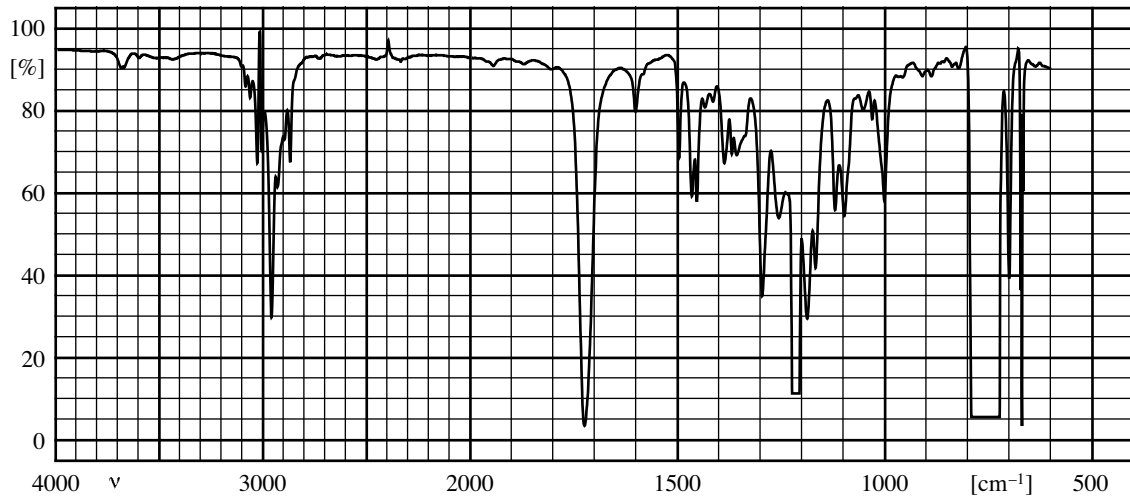
Insgesamt 7 Anwendungen einer Regel, maximal 6 Punkte.

- f) Im IR-Spektrum erscheint bei 3680 cm^{-1} eine kleine Bande. Kann es sich dabei um eine Oberschwingung der C=O-Streckschwingung handeln? Begründen Sie Ihre Ansicht.
2 Punkte

Die Grundschiwingung müsste bei der halben Frequenz erscheinen. Bei 1840 cm^{-1} erscheint aber keine Bande. Die C=O-Streckschwingung liegt bei 1721 cm^{-1} . Die Oberschwingung erscheint bei 3442 cm^{-1} oder eine Kleinigkeit weniger (wegen der Abweichung vom Modell des harmonischen Oszillators). Die Bande ist ganz schwach zu erkennen. Bei der Bande 3680 cm^{-1} handelt es sich um die asymmetrische O-H-Streckschwingung von Wasser als Verunreinigung.

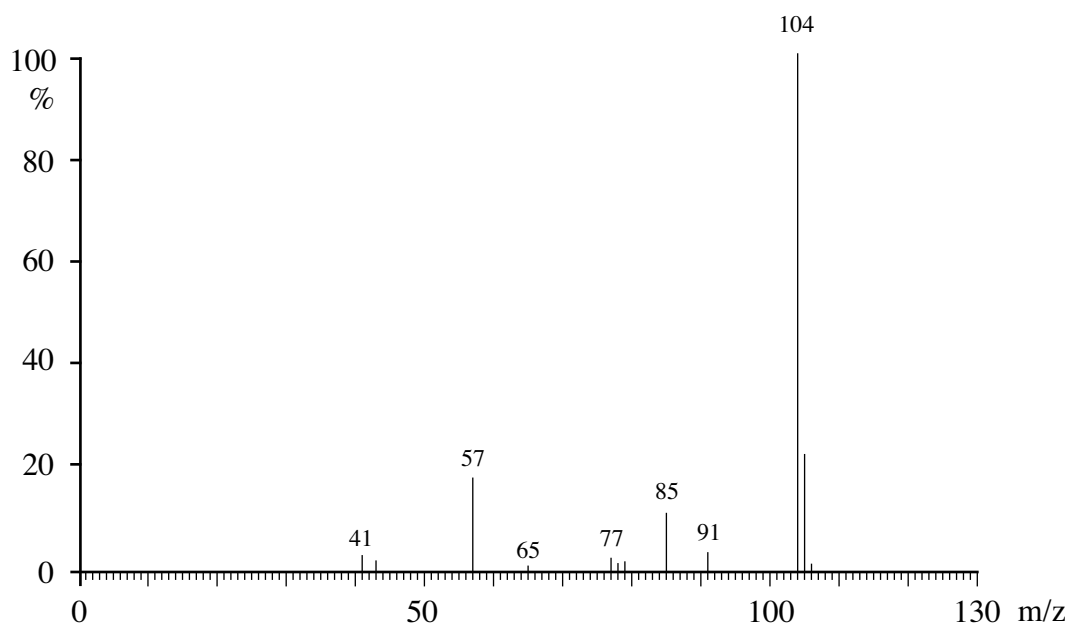
IR: aufgenommen als Chloroform-Lösung

Z18



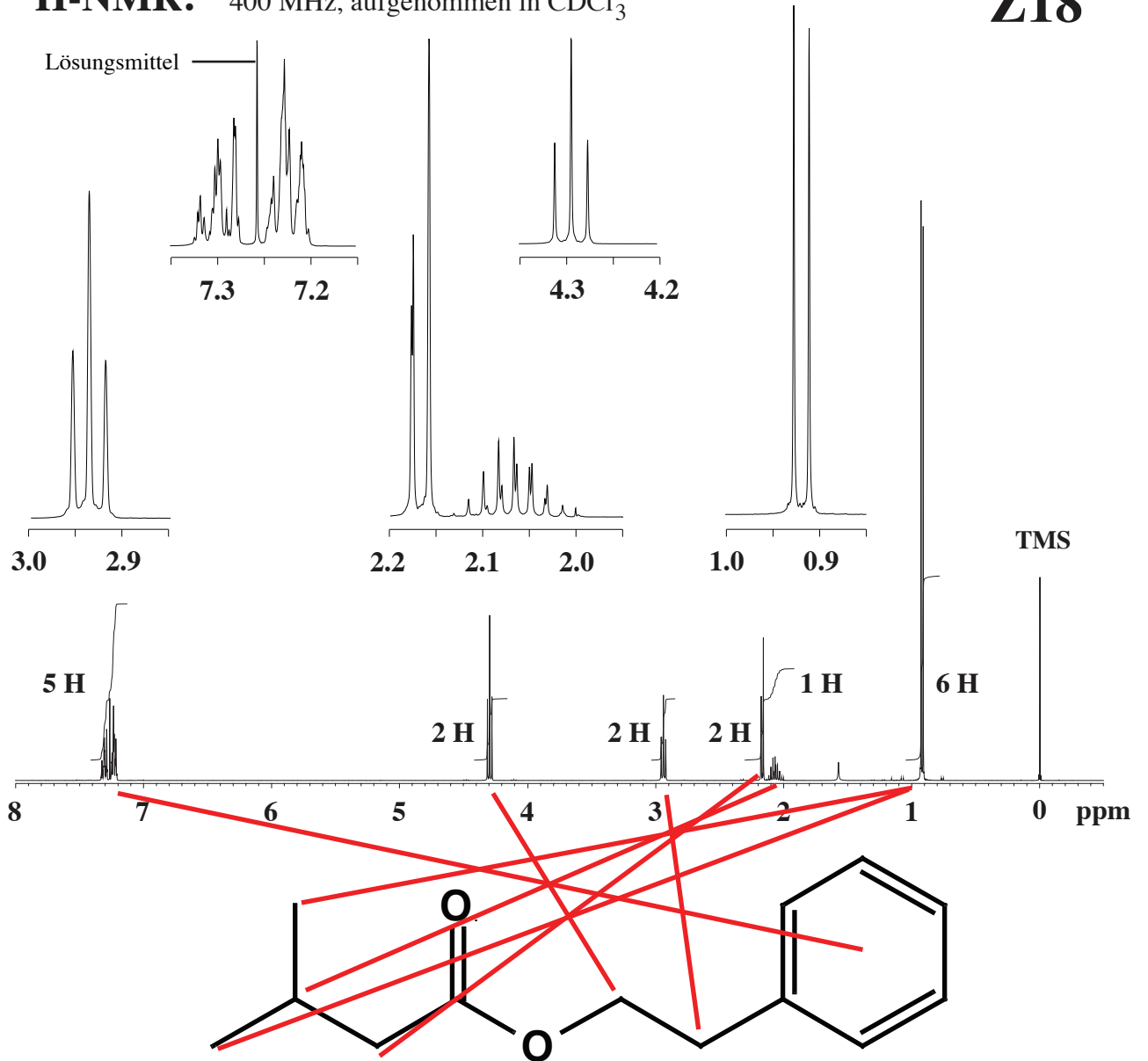
MS: EI, 70 eV

Z18



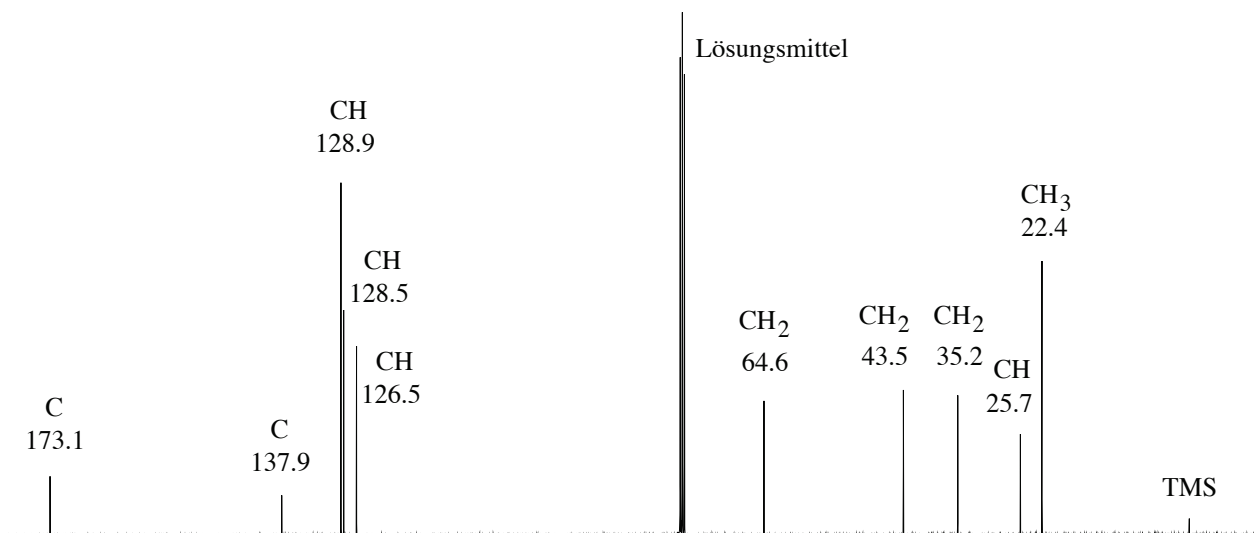
$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, aufgenommen in CDCl_3

Z18



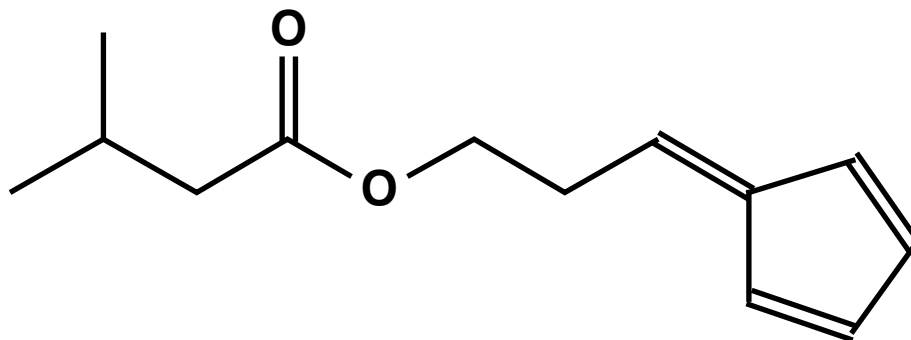
$^{13}\text{C-NMR}$: 100 MHz, protonen-breitbandentkoppelt
aufgenommen in CDCl_3

Z18



Aufgabe 2 2 Punkte

Inwiefern unterscheiden sich die NMR-Spektren von **Z18** von jenem der folgenden Verbindung, abgesehen von kleinen Änderungen der chemischen Verschiebung? Begründen Sie Ihre Ansicht.



¹³C-NMR-Spektrum:

Bei der Verbindung **Z18** kann der aromatische Ring (und die beiden Methylgruppen) durch Rotation um eine Einfachbindung so orientiert werden, dass die Blattebene eine Symmetrieebene für das Molekül ist. (Ringebene senkrecht zur Blattebene). Dadurch werden je zwei C-Atome des Rings isochron. Zudem ist die Rotation um die Bindung nicht gehemmt, wodurch die Isochronie auch durch Austausch der Positionen durch Rotation erreicht wird. Man findet also nur drei Signale für die CH-Gruppen im Ring. Beim vorliegenden Molekül gibt es keine Möglichkeit, den Ring aus der Symmetrieebene zu drehen. Man erwartet demnach für die CH-Gruppen im Bereich der C=C-Doppelbindungen (>100 ppm) die volle Anzahl Signale (fünf).

¹H-NMR-Spektrum:

Die CH₂-Gruppe neben der Doppelbindung könnte nicht mehr wie in **Z18** als Tripletts erscheinen. Man würde ein Quartett oder ein Dublett von Tripletten erwarten.

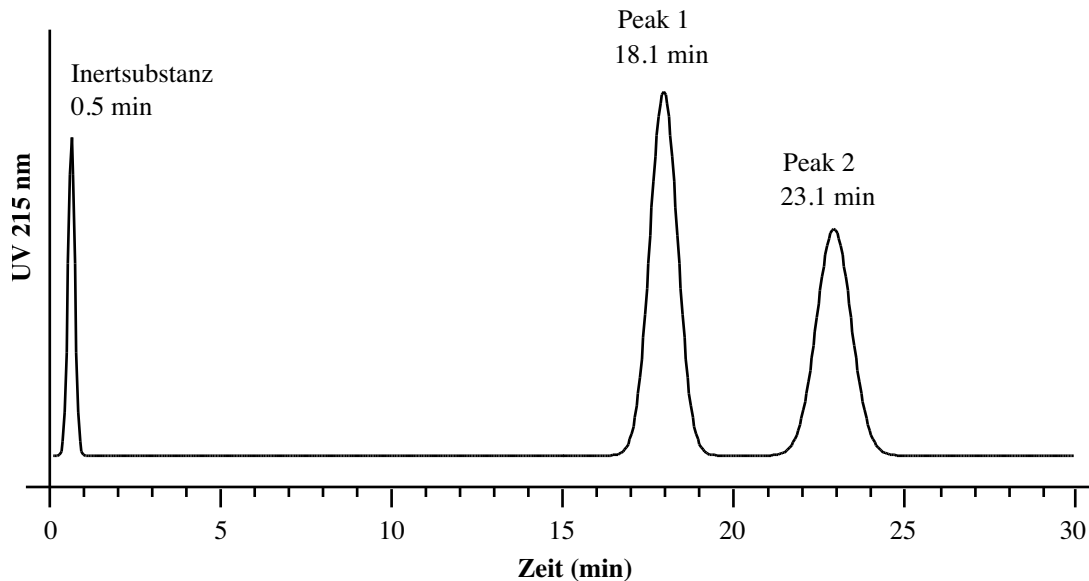
¹H-NMR-Spektrum:

Die CH-Gruppe der exocyclischen Doppelbindung würde als sauberes Tripletts erscheinen. Das Argument ist nicht ganz überzeugend. Das Tripletts könnte durch die Signale der CH-Gruppen des Rings überlagert sein und dadurch nicht zu erkennen.

Je 1 Punkt für ein Argument aus dem ¹H-NMR- und dem ¹³C-NMR-Spektrum.

Aufgabe 3 9 Punkte

Das unten abgebildete Chromatogramm einer HPLC-Trennung wurde von einem injizierten Peptidgemisch erhalten.



Die Trennung wurde bei folgenden Bedingungen durchgeführt:

Trennsäule: *Reversed Phase C18, 5 μ m Partikelgrösse*

Säulendimension: *250 mm x 4,6 mm*

Eluent A: *Wässrige Phase (H_2O , gepuffert mit 50 mM Ammoniumacetat, pH = 4,5)*

Eluent B: *Organische Phase (Acetonitril 99% + 1% H_2O)*

Trennung: *Isokratisch 10% Eluent B für 30 min bei einer Flussrate von 1 ml/min*

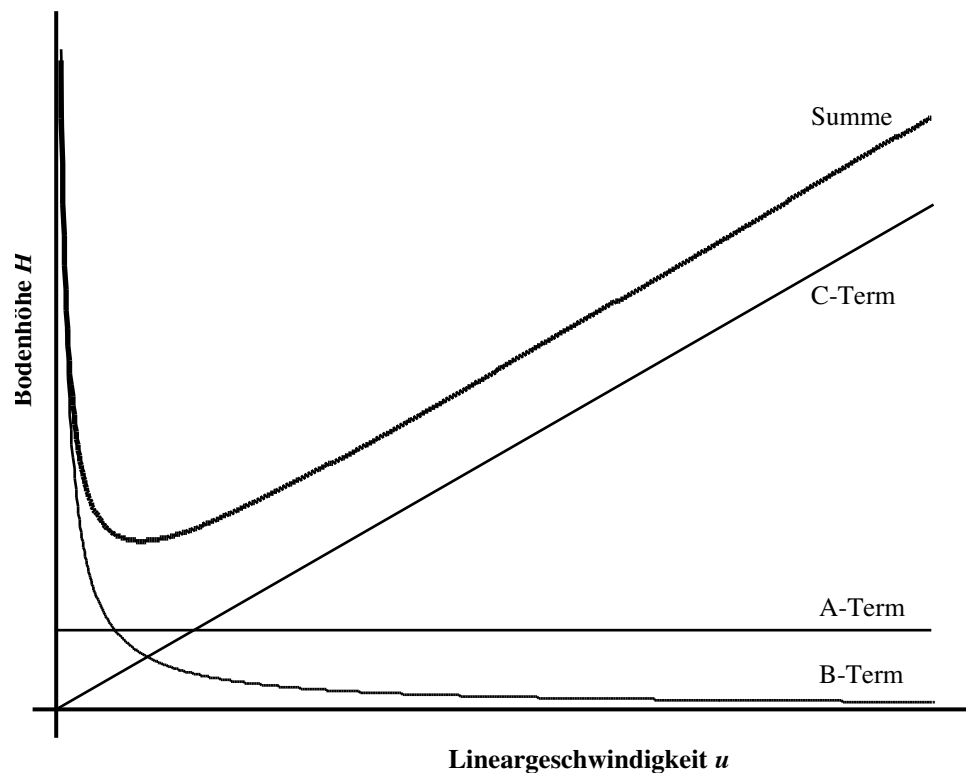
Detektor: *UV (215 nm)*

Die Trennung ist keineswegs optimiert. Das Chromatogramm ist das Ergebnis einer ersten schnellen Analyse. Ihre Aufgabe ist es, ausgehend von der obigen Trennung eine Routine-methode für eine grosse Anzahl von Proben zu erstellen.

- Berechnen sie die Auflösung von Peak 1 und 2 sowie die Anzahl der theoretischen Böden anhand von Peak 1. Geben Sie an, wie Sie die notwendigen Grössen bestimmt haben.
- Diskutieren Sie die Effizienz dieser Trennung und geben Sie an, wie Sie diese optimieren werden. Skizzieren Sie das Chromatogramm, wie es nach Ihrer Meinung aussehen sollte.

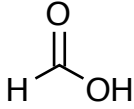
- c) Wie gehen Sie generell vor, wenn Sie den Verdacht auf Koelution von zwei Peaks haben? Wie können Sie die Selektivität beeinflussen? Diskutieren Sie alle Parameter.
- d) Die oben erwähnte Trennsäule arbeitet mit einer Partikelgröße von $5\ \mu\text{m}$. Welche Terme der van-Deemter-Gleichung werden beeinflusst, wenn man von $5\ \mu\text{m}$ auf $3\ \mu\text{m}$ Partikelgröße wechselt?

In welche Richtung verschiebt sich der optimale Wert der Lineargeschwindigkeit in der Summenkurve beim Wechsel der Partikelgröße von $5\ \mu\text{m}$ auf $3\ \mu\text{m}$?

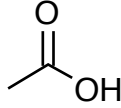


Aufgabe 4 9 Punkte

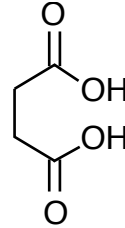
Die unten angeführten kleinen organischen Säuren wurden aus Pflanzenmaterial extrahiert. Diese kommen in freier Form vor und sind unter anderem Intermediate aus verschiedenen Stoffwechselzyklen, wie zum Beispiel dem Citratzyklus.



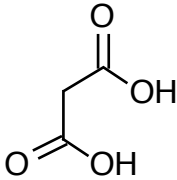
Ameisensäure
Smp.: 8°
Sdp.: 101°



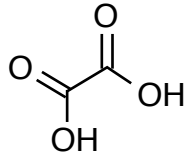
Essigsäure
Smp.: 17°
Sdp.: 118°



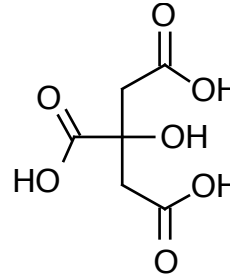
Bernsteinsäure
Smp.: 184°
Sdp.: 235°



Malonsäure
Smp.: 136°
Zersetzung: 140°



Oxalsäure
Zersetzung: 157°



Citronensäure
Smp.: 100° (Monohydrat)
Zersetzung: 175°

Die Analyten sind farblos, sauer und löslich in Wasser, aber unlöslich oder nur schlecht löslich in apolaren Lösungsmitteln.

- a) Ihre Aufgabe ist es, eine geeignete HPLC-Methode für diese Analyten zu finden. Beurteilen sie die Brauchbarkeit von Umkehrphase (reversed phase, RP) und Normalphase (normal phase, NP).

Welche andere chromatographische Methode eignet sich gut zur Trennung der Analyten? Spezifizieren sie diese Chromatographietechnik möglichst genau.

- b) Diskutieren sie die Möglichkeit, diese Analyten (direkt) per Gaschromatographie (GC) zu analysieren. Müssen Sie an den Analyten irgendwelche Schritte vornehmen, um eine Analyse zu ermöglichen? Benennen Sie auch einen geeigneten Detektor, falls Sie einer Analyse per GC zustimmen. Die Massenspektrometrie steht Ihnen aus Kostengründen nicht zur Verfügung. Begründen sie jeweils ihre Aussagen.

- c) Welche andere Trenntechnik bietet sich ausserdem an, kleine geladene Analyten zu analysieren? Spezifizieren Sie dabei eine Methode, und begründen Sie Ihre Wahl.

Aufgabe 3 (Gesamt 9 Punkte)

a) 2 Punkte

Auflösung von Peak 1 und 2:

$$R_S = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\left(\frac{w_{b1} + w_{b2}}{2}\right)} = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}} \quad \text{oder} \quad R_S \approx \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_b} = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{4\sigma}$$

Die Peakbreite w_i kann aus dem Chromatogramm durch Verlängern der Wendetangenten direkt abgeschätzt werden. In diesem Fall würde diese für beide Peaks ca. 2 min betragen. Die Retentionszeiten können direkt vom Chromatogramm ausgelesen werden und betragen 18.1 bzw. 23.1 min.

Durch Einsetzen der ermittelten Werte in die obenstehende Gleichung erhält man

$$\text{für } R_S = 2 \left(\frac{23.1 - 18.1}{2 + 2} \right) = 2.5$$

Anzahl der theoretischen Böden anhand von Peak 1:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 = 5.54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

Die Peakbreite w_i kann aus dem Chromatogramm wie oben beschrieben abgeschätzt werden. Die Retentionszeit (t_R) von Peak 1 findet man direkt im Chromatogramm.

Durch Einsetzen der ermittelten Werte in die oben genannte Gleichung erhält man für

$$N = 16 \left(\frac{18.1}{2} \right)^2 = 1310.4$$

b) 3 Punkte

Ziel der Trennung ist eine effektive Peakauflösung ($R_S > 1.5$) in möglichst kurzer Analysezeit zu erreichen.

Der erste Punkt (die ausreichende Peakauflösung) ist hier erfüllt. Die Analysezeit ist aber viel zu lange. Angebracht wäre hier eine Gradientenelution (z.B. von 10 auf 50% (B) ansteigend) oder eine isokratische Trennung, die bei höheren % organischen Anteil (B) eluiert (z.B. 25% B konstant).

Skizze: Wichtig ist hier die verringerte Retentionszeit (beide Peaks ca. unter 15 min), unter Beibehaltung der Basislinientrennung (die Auflösung darf sich leicht verringern, solange $R_S > 1.5$). Eine Peakverbreiterung sollte nicht stattfinden, im Gegenteil wird die Peakbreite sich eher verringern.

c) 2 Punkte

Im Wesentlichen kann man an den Parametern α und k der Auflösung drehen. N hat hier wohl den geringsten Einfluss. In der Praxis würde das bedeuten, dass man die Zusammensetzung der mobilen Phase ändert oder noch besser die stationäre Phase wechselt.

Sofern sich die Analyten in ihrer Masse unterscheiden, würde bei einer Koelution ein massenselektiver Detektor ebenfalls Klarheit schaffen.

Für α wird auch der Begriff Selektivität verwendet, wenn man die stationäre Phase wechselt um eine bessere Trennung der Analyten zu erreichen. Der allgemeine Begriff für α ist aber Trennfaktor.

d) 2 Punkte

Die Partikelgröße hat einen Einfluss auf den *A-Term* (Weglängenunterschiede durch die Säule werden geringer) und den *C-Term* (geringere Porendiffusion).

Der optimale Wert (niedrigstes H der Summenkurve in der Van-Deemter-Gleichung) verschiebt sich in Richtung grösserer linearer Flussgeschwindigkeiten u (in der Graphik also nach rechts).

Aufgabe 4 (Gesamt 9 Punkte)

a) 4 Punkte

Die kleinen organischen Säuren sind gut löslich in Wasser, aber schlecht löslich in apolaren Lösungsmitteln.

Es gilt immer die Einschränkung: Der Analyt muss ausreichend in der mobilen Phase löslich sein.

Die Analyten zeigen eine gute Löslichkeit in der polaren mobilen Phase der Umkehrphase, aber allgemein eine schlechte in der apolaren mobilen Phase der Normalphase.

Die Retention auf der apolaren stationären Phase der Umkehrphase ist allerdings gering.

Da die Analyten kleine organische Säuren sind, eignen sich diese aber sehr gut für die Ionenchromatographie. In unserem Fall brauchen wir die Anionenaustauscher chromatographie (die Deprotonierung der Säuregruppen ergibt Anionen).

b) 3 Punkte

Eine direkte Analyse per Gaschromatographie ist nicht bei allen Analyten möglich. Malonsäure, Oxalsäure und Zitronensäure zersetzen sich nämlich schon bevor sie sich verflüchtigen.

Abhilfe kann hier eine Derivatisierung schaffen (z.B. Alkylierung der Carbonsäuren).

Ein geeigneter Detektor wäre der WLD (Wärmeleitfähigkeitsdetektor) oder der AED (Atomemissionsdetektor). Der FID (Flammenionisationsdetektor) kann Ameisensäure nicht detektieren und ist somit nur bedingt geeignet.

c) 2 Punkte

Hier bietet sich die Elektrophorese an. Die Trennung passiert durch Migration gemäss Ladung und Grösse in einem elektrischen Feld. Für die kleinen organischen Säuren ist die Kapillarelektrophorese bzw. genauer die Kapillaronenelektrophorese am besten geeignet.