

# Quantitative Bestimmung von Ethanol in alkoholischen Getränken mittels $^1\text{H}$ -Kernresonanzspektroskopie ( $^1\text{H}$ -NMR)

## Zusammenfassung

Ziel dieses Versuchs ist die Analyse eines alkoholischen Getränks zur quantitativen Bestimmung des Ethanolgehalts. Des Weiteren soll das Getränk auf Spuren des Begleitalkohols Methanol untersucht werden. Anschließend soll eine unbekannt methanolhaltige Probe analysiert werden. Diese Analyse erfolgt mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR Spektroskopie). Dabei ist auch keine aufwendige Probenvorbereitung nötig. In diesem Versuch wird ein  $^1\text{H}$ -NMR Spektrometer mit einer Protonenresonanzfrequenz von 400 MHz eingesetzt.

## 1 Theorie

### 1.1 Grundlagen

Der Vorteil der NMR Spektroskopie liegt darin, dass die einzelnen Substanzen in der Lösung einfach unterschieden werden können. Darüber hinaus ist die Kernresonanzspektroskopie quantitativ, d.h. die relativen Konzentrationen von Ethanol zu Wasser können ermittelt werden. Das Spektrometer besteht zum einen aus einem Magneten, welcher die Kernspins (in diesem Versuch  $^1\text{H}$ -Isotope) relativ zum Magnetfeld ausrichtet. Dadurch entsteht die makroskopische Magnetisierung entlang der Z-Achse ( $M_Z$ ), welche durch die Summe aus parallel und antiparallelen orientierten Kernspins erzeugt wird. Im Probenkopf werden die  $^1\text{H}$ -Kernspins mittels hochfrequenter (HF) Radiowellenpulsen resonant angeregt, was zu einer Auslenkung der Kernspins führt. Dabei bestimmt die Pulslänge um welchen Winkel die Kernspins ausgelenkt werden. In der NMR Spektroskopie sind besonders  $90^\circ$  Pulse und  $180^\circ$  Pulse von Bedeutung. Bei einem  $90^\circ$  Puls wird die Magnetisierung entlang der Z-Achse in die Ebene senkrecht zu Z gedreht (XY-Ebene), abhängig von der Richtung der Einstrahlung. Der  $180^\circ$  dreht  $M_Z$  in die entgegengesetzte Richtung, folglich zu  $-M_Z$ .

### 1.2 Relaxation

Nach Ende des HF Pulses kehrt die entstandene Magnetisierung wieder zurück in die Ausgangsmagnetisierung. Diesen Prozess bezeichnet man als Relaxation und

wird durch zwei Bezugsgrößen beschrieben. Die longitudinale Relaxationszeit ( $T_1$ ) beschreibt die Rückkehrzeit der Magnetisierung ( $M_Z$ ) entlang des äußeren Magnetfeldes. Die transversale Relaxationszeit ( $T_2$ ) gibt an wie lange es dauert bis die Quermagnetisierung ( $M_X$  und  $M_Y$ ) abgeklungen ist. Eine Folge der Relaxation für die NMR Spektroskopie ist, dass nach jedem HF Puls gewartet werden muss bis die Magnetisierung wieder erreicht wird. Denn trifft der HF Puls nicht auf die vollständige Ausgangsmagnetisierung, so wird auch nicht der vollständige Anteil der Magnetisierung ausgelenkt, was zu einem Signalverlust und Entstehung von Fehlsignalen (Artefakte) einhergeht.

### 1.3 FID und Fourier Transformation

Die Auslenkung der Magnetisierung und der dadurch bedingten Präzession zurück in die Ausgangslage der verschiedenen Kernspins erzeugt eine elektronische Antwort, die im Spektrometer detektiert wird. Die Signale in der transversalen Ebene werden durch den freien Induktion Abfall (FID) aufgezeichnet. Anschließend erfolgt durch die Fourier Transformation (FT) die Umwandlung des zeitabhängigen Spektrums  $f(t)$  in das frequenzabhängige Spektrum  $g(\omega)$ , welches die Interpretation der Signale ermöglicht.

$$g(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \cdot e^{-i\omega t} dt \quad (1)$$

Dabei sind für die verschiedenen  $^1\text{H}$ -Kernspins die Resonanzbedingungen abhängig von der Umgebung der Kerne. So bewirken die Elektronen der Atomhülle, sowie die chemischen Bindungen zu benachbarten Atomen die Lage und Aufspaltung der Signale. Diese Bedingungen sind die Ursache der chemischen Verschiebung ( $\delta$ ) und der Multiplizität durch Spin-Spin Kopplung (J Kopplung).

### 1.4 Experimentelle Parameter

Um im Spektrum die chemische Verschiebung, sowie die Kopplungen zu erhalten, ist es notwendig die Parameter im Experiment anzupassen. Die Auflösung, oder auch Linienbreite, gibt an wie genau ein Signal von anderen Signalen unterschieden werden kann. Die Auflösung kann durch eine längere Aufnahme des FID realisiert werden (Acquisition Time AQ), denn je mehr Informationen aus dem Zeitsignal aufgezeichnet werden, desto mehr Informationen werden für das Frequenzsignal erzeugt. Die Empfindlichkeit (Signal:Noise) wird durch Wiederholung der Aufnahme realisiert. Somit können die Signale gegenüber dem Hintergrundrauschen besser diskriminiert werden, da das Rauschen durch die statistische Mittelung im geringeren Maße zunimmt als die Signale selbst. Darüber hinaus ist die Spektrale Breite (sweep width bzw. SW) ein wichtiger Parameter. Sie wird durch die sogenannte dwell time (DW) bestimmt, der Zeit zwischen zwei Punkten im FID.

Die Qualität der Spektren hängt, neben den optimalen Einstellungen der Aufnahme, von dem Spektrometer selbst ab. So muss während der Messung gewährleistet sein, dass der Magnet stabil bleibt und die Einstrahlfrequenz optimiert ist. Durch das sogenannte Tunen wird im Probenkopf die Senderfrequenz auf Resonanzfrequenz der zu untersuchenden Kernsorte abgestimmt. Beim Matchen wird die eingestrahlte Leistung angepasst. Um die magnetische Feldstärke während der Messung konstant zu halten wird der Frequenzlock verwendet. Dabei wird kontinuierlich das Deuteriumsignal des Lösungsmittels verwendet um die Stärke nachzuregulieren. Des Weiteren

wird das Deuteriumsignal verwendet um die Magnetfeldhomogenität durch Shimspulen zu stabilisieren.

## 1.5 Kontrollfragen

- Was ist die Ursache der chemischen Verschiebung? Wodurch wird die jeweilige Multiplizität verursacht? Wie hängt das mit der Resonanzfrequenz des Kerns zusammen?
- Was ist der Zusammenhang zwischen Pulslänge und Flipwinkel? Was ist ein  $90^\circ$  Puls?
- Wie entsteht der Free Induction Decay (FID)? Warum wird hier die Fourier Transformation durchgeführt?
- Was bedeutet Relaxation? Welche Relaxationsarten gibt es? Wie beeinflusst Relaxation das Experiment?
- Was ist Tunen und Matchen? Was bedeutet Lock? Warum müssen wir Shimmen?
- Wie stehen Acquisition Time (aq), Dwell Time (dw), Sweep Width (sw) und Linienbreite miteinander in Zusammenhang?
- Was ist die Auflösung? Was meint man mit Empfindlichkeit? Und wie können diese im Experiment verbessert werden?
- Wie ist das Spektrometer aufgebaut?

## 2 Versuchsdurchführung

### 2.1 Vorbereitung

Es werden  $600\mu\text{l}$  des zu untersuchenden alkoholischen Getränks, ohne Verdünnung direkt in ein NMR Röhrchen pipettiert. Das Getränk sollte wenig Fett und Zucker enthalten und hauptsächlich aus Alkohol und Wasser bestehen. Anschließend wird das verschlossene Röhrchen in einen Spinner gesteckt und in das Spektrometer eingelassen und in den Magneten geführt.

### 2.2 Spektrometereinstellungen

Die Bedienung erfolgt über das Programm TopSpin. Zuerst muss durch Tunen und Matchen die Sender- und Empfängerfrequenz des Probenkopfes eingestellt. Da in diesem Versuch kein deuteriertes Lösungsmittel eingesetzt wird, fällt das locken an diesem Punkt aus. Anschließend muss die Probe mit Hilfe der BSMS control suite manuell geschimmt werden.

Für die Aufnahme der Spektren müssen vor den jeweiligen Messungen alle Parameter eingestellt und angepasst werden. Anschließend werden die Peaks den jeweiligen Protonensignalen zugeordnet und die Integrale für die Auswertung bestimmt. Abschließend wird von den Spektren eine PDF erstellt.

### 3 Benötigte Kommandos für TopSpin

Kommando	Ausführung
<b>zg</b>	Start Experiment
<b>efp</b>	Fourier Transformation
<b>atma</b>	Automatisches Tunen und Matchen
<b>atmm</b>	Manuelles Tunen und Matchen
<b>gs</b>	Wiederholende Aufnahme ohne speichern
<b>bsmsdisp</b>	BSMS control suite öffnen
<b>edc</b>	Experiment und Parameter kopieren
<b>apk</b>	Automatische Phasenkorrektur
<b>abs n</b>	Automatische Basislinienkorrektur
<b>p1</b>	Pulslänge P1 einstellen
<b>rga</b>	Automatischer receiver gain einstellen
<b>ns</b>	Anzahl der scans einstellen
<b>d1</b>	Erholungs delay einstellen
<b>ased</b>	Reduzierten Parametersatz öffnen
<b>.ph</b>	Phasenkorrektur manuell
<b>.md</b>	Multidisplay
<b>.all</b>	Gesamtes Spektrum anzeigen
<b>.ret</b>	Fenster schließen
<b>.int</b>	Integrale bestimmen
<b>lock</b>	Lösungsmittel für den Lock bestimmen
<b>topshim gui</b>	Shimfenster öffnen
<b>rsh</b>	Shimparameter auslesen und übernehmen
<b>sx XX</b>	Probenwechsel Nummer XX

### 4 Protokoll

Das Protokoll soll folgende Punkte enthalten:

- Kurze Einleitung zur Theorie dieses Versuchs
- Erläuterung der Versuchsdurchführung (was wurde getan?)
- Alle Einstellungen die bei den Messungen vorgenommen wurden
- Die aufgenommenen Spektren mit der Zuordnung der Signale
- Der Rechenweg, sowie die Ergebnisse der Alkoholmengenbestimmung
- Bewertung der Ergebnisse mit Fehlerdiskussion
- Quellen und Abbildungsverzeichnis

## 5 Literaturvorschlag

- Friebolin, H. (2013): *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*. WILEY-VCH, Weinheim
- Günther, H. (1992): *NMR-Spektroskopie*. Thieme, Stuttgart
- Keeler, J. (2010): *Understanding NMR Spectroscopy*. WILEY, Chichester
- Lottspeich, F., Engels, J.W. (2012): *Bioanalytik*. Springer, Heidelberg