

Quantitative Bestimmung von Ethanol in alkoholischen Getränken mittels ^1H -Kernresonanzspektroskopie (^1H -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 ^1H -NMR Spektrometer mit einer Protonenresonanzfrequenz von 400 MHz eingesetzt.

Hinweis: Jede Gruppe bringt ein alkoholisches Getränk mit. Es werden etwa 1ml benötigt und das Getränk sollte hauptsächlich aus Wasser und Ethanol bestehen (z.B. Wodka, Gin, Obstbrände oä.)

1 Theorie

1.1 Grundlagen NMR Spektroskopie

Die Kernspinresonanzspektroskopie (engl.: *Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy*) ist eine Methode, die prinzipiell alle Isotope mit einem Kernspin > 0 analysieren kann. Vor allem in der organischen Chemie, Biologie und in der Medizinischen Diagnostik findet die Kernspinresonanz zahlreiche Anwendungen. 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 ^1H -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 ^1H -Kernspins mittels hochfrequenter (HF) Radiowellenpulsen resonant angeregt, was zu einer Auslenkung der Kernspins führt. Dabei bestimmt die Pulslänge bzw. die Pulsleistung um welchen Winkel die Kernspins ausgelenkt werden. In der NMR Spektroskopie sind besonders 90° Pulse und 180° Pulse von Bedeutung.

1.2 FID und Fourier Transformation

Die Auslenkung der Magnetisierung in die transversale Ebene bedingt eine Präzession um das Hauptmagnetfeld B_0 . Diese Rotation der Spins erzeugt ein elektronisches Zeitsignal im Detektor des Probenkopfs. Die Präzession der verschiedenen Kernspins zurück in die Ausgangslage wird FID (engl.: **F**ree **I**nduction **D**ecay, oder Freier Induktions Abfall) genannt. Anschließend erfolgt durch die Fourier Transformation 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 ^1H -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 (δ) und der Multiplizität durch skalare Spin-Spin Kopplung, auch J Kopplung genannt.

1.3 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 einhergeht.

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. Die unbekannte Probe wird durch die betreuende Person zur Verfügung gestellt. Anschließend wird das verschlossene Röhrchen in einen Spinner gesteckt und in das Spektrometer eingelesen und in den Magneten geführt. Die benötigten Befehle für TopSpin können in Kapitel 6 eingesehen werden

2.2 Spektrometereinstellungen

Die Bedienung erfolgt über das Programm TopSpin. Bevor die eigentliche Untersuchung der Proben beginnen kann müssen folgende Basisprozeduren durchgeführt werden. Diese Prozeduren sind notwendig für die Qualität der Analyse und müssen für jede Probe wiederholt werden. Zuerst muss durch das sogenannte *Tunen* und

Matchen die Sender- und Empfängerfrequenz des Probenkopfes eingestellt. Durch den Befehl **atma** erfolgt dies automatisch. 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 jede Gruppe wird ein Ordner in TopSpin erstellt, der die jeweiligen Experimente enthält. Die Experimente inkl. Parameter werden von den betreuenden Personen ausgewählt.

2.3 Experimentelle Parameter

Um im Spektrum die Signale der alkoholischen Proben 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**).

Die Empfindlichkeit, oder auch Sensitivität (Signal:Noise) wird durch Wiederholung der Aufnahme realisiert. Somit können die Signale gegenüber dem Hintergrundrauschen besser diskriminiert werden, da das Rauschen durch die statistische Mittlung im geringeren Maße zunimmt als die Signale selbst.

Darüber hinaus ist die Spektrale Breite (sweep width **SW**) ein wichtiger Parameter. Sie wird durch die sogenannte dwell time (**DW**) bestimmt, der Zeit zwischen zwei Punkten im FID. Folglich wird durch die Zeit zwischen zwei Punkten und die Anzahl der aufgenommenen Punkte (time domain **TD**) die Aufnahmezeit des FID bestimmt. Der FID wird mit dem Befehl **zg** aufgenommen.

Durch die Einstellung der oben genannten Parameter soll das NMR Spektrum optimal, unter Berücksichtigung auf die Aufgabenstellung, aufgezeichnet werden.

2.4 Auswertung

Nach Aufzeichnung des FID wird durch Befehl **efp** die Fourier-Transformation ausgeführt. Im Anschluss erfolgen Phasenkorrektur (**apk**) und Basislinienkorrektur (**absn**). Die Auswahl des Signale erfolgt manuell über ein neues Fenster mit dem Befehl (**.pp**). Analog werden im Folgendem die Integrale durch (**.int**) bestimmt. Zuletzt werden die Spektren im plot Editor bearbeitet und anschließend als PDF gespeichert und der Gruppe für die Ermittlung des Ethanol-, bzw. Methanolgehalts zur Verfügung gestellt.

3 Protokoll

Das Protokoll soll folgende Punkte enthalten:

- Kurze Einleitung zur Theorie dieses Versuchs
- Erläuterung der Versuchsdurchführung
- 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

4 Kontrollfragen

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

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
- Walla, P. J. (2014): *Modern biophysical chemistry*. WILEY-VHC, Weinheim

6 Benötigte Befehle für TopSpin

Befehl	Ausführung
zg	Start Experiment
efp	Fourier Transformation
atma	Automatisches Tunen und Matchen
atmm	Manuelles Tunen und Matchen
gs	Wiederholende Aufnahme ohne speichern
bsmsdisp	BSMS control suite öffnen
lockdisp	Lock display öffnen
edc	Experiment und Parameter kopieren
wrp	Prozessierungs Parameter kopieren
apk	Automatische Phasenkorrektur
abs	Automatische Basislinienkorrektur
p1	Pulslänge P1 einstellen
rga	Automatischer receiver gain einstellen
ns	Anzahl der scans einstellen
d1	Erholungs delay einstellen
o1p	Mitte des Spektrums einstellen
sw	sweep width einstellen
td	Anzahl digitaler Punkte einstellen
ased	Reduzierten Parametersatz öffnen
.ph	Phasenkorrektur manuell
.pp	Peakliste erstellen
.md	Multidisplay
.all	Gesamtes Spektrum anzeigen
.ret	Fenster schließen
.int	Integrale bestimmen
lock	Lösungsmittel für den Lock bestimmen
topshim gui	Shimfenster öffnen
rsh	Shimparameter auslesen und übernehmen
sx XX	Probenwechsel Nummer XX