

Bestimmung der Primärstruktur kleiner Moleküle mittels 1D-NMR-Spektroskopie

Zusammenfassung

Mit Hilfe von 1D ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren sowie Massenspektren wird die Primärstruktur zweier unbekannter Moleküle bestimmt. Dabei werden Informationen aus J -Kopplung, chemischer Verschiebung und Zerfallspeaks genutzt.

Das Spektrometer hat eine Protonenresonanzfrequenz von 400 MHz. Dieser Versuch baut auf dem Versuch „NMR Einführung“ auf. Die dabei erlernten Grundlagen, insbesondere zur Bedienung des Spektrometers, werden daher als bekannt vorausgesetzt.

1 Theorie

1.1 Chemische Verschiebung

Die primäre Information, welche die NMR-Spektroskopie in Flüssigkeiten liefert, ist die Resonanzfrequenz der einzelnen Kerne, die sogenannte Larmorfrequenz ν_L . Die Larmorfrequenz ist direkt proportional zum äußeren Magnetfeld B_0 .

$$\nu_L = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0 \quad (1)$$

γ : gyromagnetisches Verhältnis

Am Ort des Kerns wirkt allerdings nicht nur das äußere Magnetfeld. Die Elektronen, welche in einem Molekül den Kern umgeben, erzeugen ein schwaches Magnetfeld und schirmen den Kern geringfügig ab. Somit wirkt am Kernort in der Regel ein schwächeres Magnetfeld B_{eff} als das angelegte Magnetfeld B_0 .

$$B_{eff} = B_0 - \sigma B_0 \quad (2)$$

Ein Maß für die Stärke dieses Effekts ist die Abschirmkonstante σ , welche zu einem großen Teil von der Elektronenhülle des Kerns bestimmt wird. Die Ladungsdichte, und somit die Abschirmung des Kerns, kann durch induktive und mesomere Effekte von der chemischen Umgebung beeinflusst werden. Dabei verringern Substituenten mit hoher Elektronegativität die Abschirmung, indem sie die Elektronendichte bei dem betrachteten Kern verringern, wohingegen elektropositive Substituenten die Abschirmung durch eine Erhöhung der Elektronendichte verstärken. Des Weiteren wird die Abschirmkonstante durch die magnetische

Anisotropie von Nachbargruppen, Ringstromeffekte, elektrische Feldeffekte und intermolekulare Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken oder Lösungsmittelleffekte beeinflusst. So kann man für die organische Chemie einfache Regeln aufstellen, mit deren Hilfe sich die einzelnen Atome in einem Molekül bestimmten Frequenzbereichen zuordnen lassen.

Wird die charakteristische Resonanzfrequenz (ν) eines Kerns nun auf eine Referenzfrequenz (ν_{ref}) bezogen, so erhält man die chemische Verschiebung δ .

$$\delta (ppm) = 10^6 x \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \quad (3)$$

In vielen Lehrbüchern sind typische chemische Verschiebungen funktioneller Gruppen in tabellarischer Form aufgeführt.

1.2 Kopplung zwischen Kernen

Während die chemische Verschiebung hauptsächlich durch die Elektronenhülle beeinflusst wird, führen NMR-aktive Kerne in der Umgebung zu einem weiteren Effekt, der als Kopplung bezeichnet wird. Bei der NMR-Spektroskopie von Flüssigkeiten ist die sogenannte skalare Kopplung, traditionell als J -Kopplung bezeichnet, die wichtigste. Hierbei übertragen die Elektronen einer chemischen Bindung das magnetische Feld von einem Kern zum anderen. Das Resultat ist eine Aufspaltung der Signale gekoppelter Kerne. Die Zahl der Signale eines Multipletts, die sogenannte Multiplizität M berechnet sich nach folgender Gleichung:

$$M = 2nI + 1 \quad (4)$$

Dabei ist n die Zahl der äquivalenten Nachbarn und I der Kernspin. Für Kerne mit $I = \frac{1}{2}$ vereinfacht sich die Gleichung zur sogenannten $(n+1)$ -Regel. Je nach Multiplizität wird das resultierende Signal als Singulett, Dublett, Triplett, Quartett oder Multiplett bezeichnet. Die Intensität der Linien bestimmt sich aus der Anzahl der individuellen Spinkombinationen und entspricht somit den Binomialkoeffizienten, die man mit Hilfe des Pascalschen Dreiecks berechnen kann.

Die Größe der Kopplung wird durch die Kopplungskonstante J beschrieben, welche direkt aus dem Abstand der einzelnen Resonanzlinien ermittelt werden kann. Der Mittelpunkt der aufgespaltenen Signale wird weiterhin als chemische Verschiebung bezeichnet. Die Kopplungskonstante liefert wertvolle Informationen über die Art der Bindung zwischen Kernen, sowie in manchen Fällen auch über den Winkel der Bindungen zueinander. Die Kopplungskonstante zwischen zwei Kernen ist in beide Richtungen gleich groß, zwei Signale mit gleichen Kopplungskonstanten gehören oft zu benachbarten Kernen. Typische Kopplungskonstanten von H-H-Kopplungen sowie H-C-Kopplungen sind, ähnlich wie die chemischen Verschiebungen, in vielen Lehrbüchern zu finden.

1.3 Überblick Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine Untersuchungstechnik zur Bestimmung der Molmasse freier, gasförmiger Ionen im Hochvakuum. Der prinzipielle Aufbau eines Massenspektrometers wird in Abbildung 3 wiedergegeben.

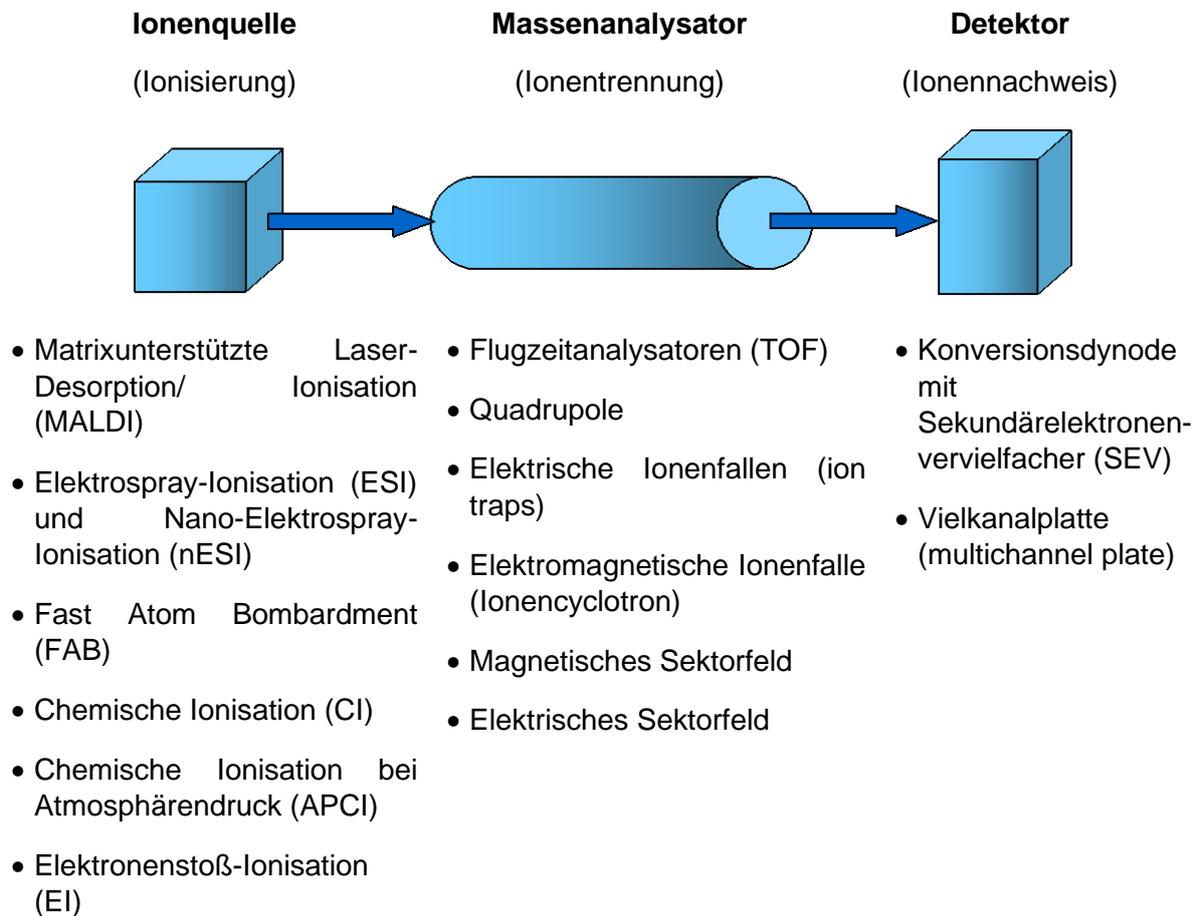


Abbildung 1: Komponenten eines Massenspektrometers

In der Ionenquelle wird aus einer Probe ein Strahl gasförmiger Ionen erzeugt. Diese werden in einem Massenanalysator hinsichtlich des Masse/Ladungs-Verhältnisses aufgetrennt. In einem nachgeschalteten Detektor wird mit entsprechender Datenverarbeitung ein Massenspektrum erzeugt.

1.4 Ionisierungstechniken

Zur Ionisierung von Molekülen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung (vgl. Abbildung 3). Durch die Aufnahme oder Abgabe eines Protons oder Elektrons werden die Analytmoleküle

ionisiert. Hierzu beschießt man die Probe beispielsweise mit Elektronen (Elektronenstoß-Ionisation, EI), mit Atomen oder Ionen (Fast atom bombardement, FAB) oder mit Photonen (Laser-Desorption/Ionisation, LDI). Ein anderer Weg zur Erzeugung von Ionen ist das Versprühen einer flüssigen Phase in einem elektrischen Feld (Elektrospray-Ionisation, ESI).

1.2.1 Matrixunterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI)

Die MALDI-MS zählt zu den „weichen“ Ionisierungsmethoden, da die Probenmoleküle bei der Ionisierung nicht in Fragmente zerfallen. Bei der Ionisierung entstehen vorrangig Ionen der Form $[M+H]^+$.

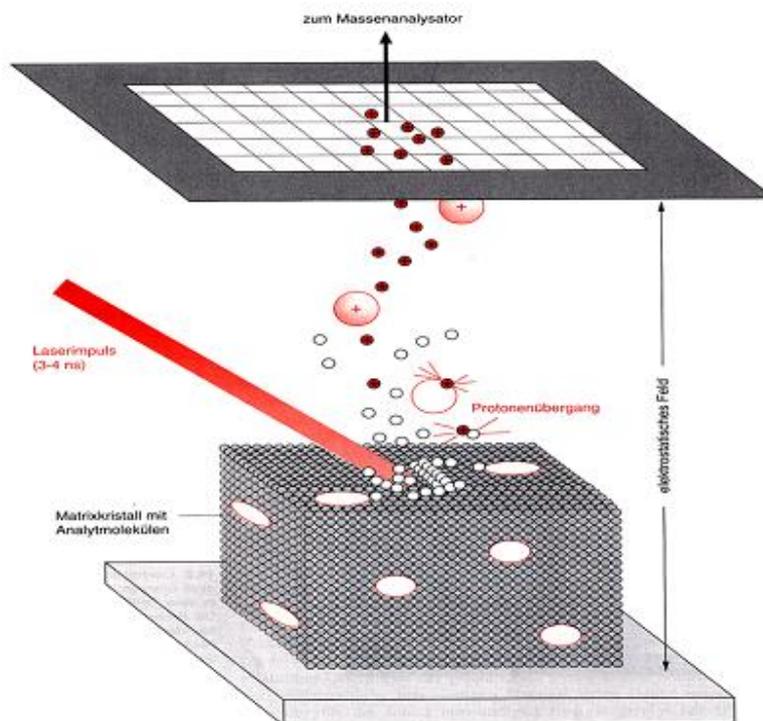


Abbildung 2: Prinzip des MALDI-Prozesses

Proben, die mittels MALDI analysiert werden, müssen zunächst mit einer Matrix gemischt und anschließend auf eine Edelstahlplatte als Probenträger aufgebracht werden. Beim Verdunsten der Lösungsmittelmoleküle kommt es zur Cokristallisation von Matrix und Probenmoleküle, d.h. die Analytmoleküle werden in das Kristallgitter der Matrixmoleküle eingebaut. Im Hochvakuum wird die präparierte Probe mit einem gepulsten UV-Laser beschossen. Als Laser werden meist Stickstofflaser ($\lambda = 337 \text{ nm}$) mit einer Impulsdauer von 3-5 ns oder Nd-YAG-Laser ($\lambda = 355 \text{ nm}$) mit einer Impulsdauer von 5-15 ns eingesetzt. Durch den Beschuss verdampfen und ionisieren die Probenmoleküle mit Hilfe der im Überschuss vorhandenen Matrix.

Die verwendeten Matrices sind meist kleine organische Moleküle, die bei der eingestrahlten Wellenlänge einen Großteil der zugeführten Energie absorbieren. Die Matrix, in die die Probe eingebettet ist, hat mehrere Aufgaben. Da sie die Energie aus dem Laserpuls absorbiert, wird die Probe vor photolytischer Zersetzung geschützt. Des Weiteren dient die Matrix der Übertragung der zur Desorption notwendigen Energie auf die Probe. Die für die Ionisierung erforderlichen Protonen werden von der beigefügten Trifluoressigsäure (TFA) zur Verfügung gestellt.

1.2.2 Elektrospray-Ionisierung (ESI)

Das Prinzip der ESI-Technik ist in folgender Abbildung dargestellt:

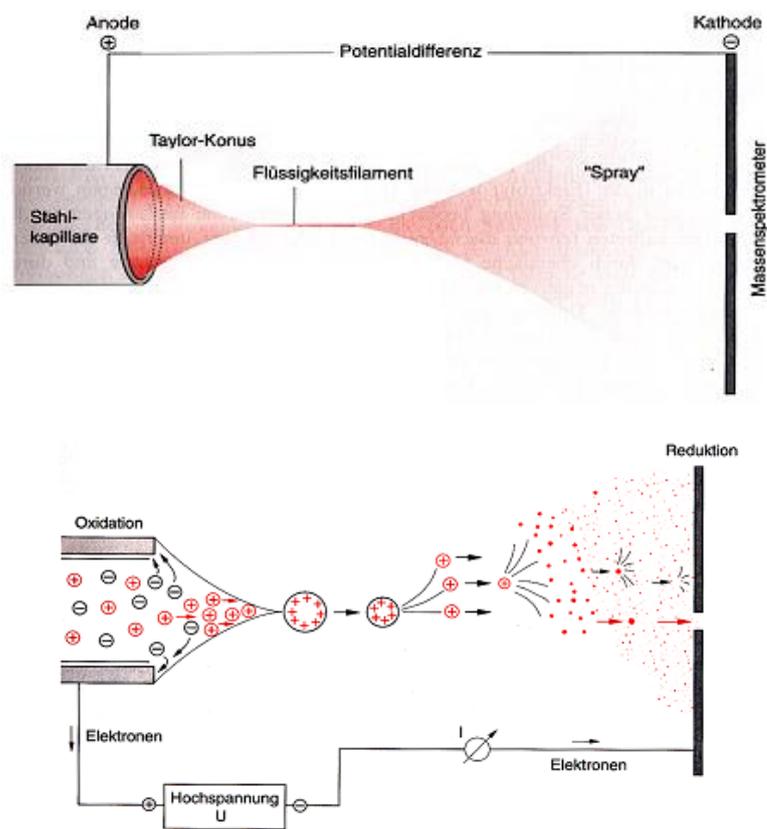


Abbildung 3: Prinzip der ESI

Bei dieser Ionisierungsart wird ein Flüssigkeitsstrom durch eine Kapillare, an der ein elektrisches Feld anliegt in das MS geleitet. Die Flüssigkeit bildet hierdurch beim Austreten aus der Kapillare einen Kegel aus, den Taylor-Konus. Je nach Feldrichtung bilden sich negative oder positive Ionen, die sich an der Spitze des Kegels ansammeln und geladene Tröpfchen bilden. Ist das anliegende elektrische Feld ausreichend groß, wird ein anhaltender Flüssigkeitsstrom von wenigen Mikrometern Durchmesser erzeugt.

Beim ESI-Prozess entstehen charakteristischerweise mehrfach geladene Ionen, Moleküle kleiner 1000 Da bilden mitunter nur einfach geladene Ionen. Die Elektrospray-Ionisierung zählt wie die Ionisierung mittels MALDI zu den „weichen“ Ionisierungsarten, d.h. auch hier tritt bei der Ionisierung kein Zerfall in Fragmente auf.

1.5 Massenanalytoren am Beispiel TOF

TOF-Analytoren (vom engl. time of flight) sind die am häufigsten eingesetzten Massenanalytoren in der MALDI-MS. Die Bestimmung der Ionenmassen erfolgt über die Messung der Zeit, die die Ionen zum Zurücklegen der Strecke von der Quelle bis zum Detektor benötigen. Schwere Ionen sind langsamer als leichte und treffen daher später am Detektor an. Den erzeugten Ionen wird durch ein elektrisches Feld eine bestimmte kinetische Energie zugeführt, sie werden hierdurch beschleunigt und treten in ein Flugrohr ein. Hierin durchlaufen sie eine feldfreie Driftstrecke und werden aufgetrennt. Diese Auftrennung erfolgt, da Ionen mit unterschiedlichen Masse/Ladungs-Verhältnissen in der Quelle die gleiche kinetische Energie zugeführt wird, sie hierdurch aber auf unterschiedliche Geschwindigkeiten beschleunigt werden. Die kinetische Energie der Ionen beträgt nach Durchlaufen der Beschleunigungsspannung U :

$$E_{kin} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = z \cdot e \cdot U$$

Hierin ist:

m = Masse des Ions

v = die Geschwindigkeit des Ions nach der Beschleunigungsstrecke

z = Ladungszahl

e = Elementarladung

Aus der Gesamtflugzeit t und der Länge L der feldfreien Driftstrecke des Flugrohres lässt sich die Geschwindigkeit v berechnen, gemäß:

$$v = \frac{L}{t}$$

Einsetzen in obige Gleichung und Umstellung nach m/z liefert:

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot e \cdot U}{L^2} \cdot t^2$$

Das Masse/Ladungsverhältnis ist in einem TOF-MS dem Quadrat der Flugzeit proportional, daher lässt sich aus der gemessenen Flugzeit die jeweilige Masse ermitteln. [1,4,5]

Es gibt zwei unterschiedliche Arten von Flugrohren (vgl. Abbildung 6):

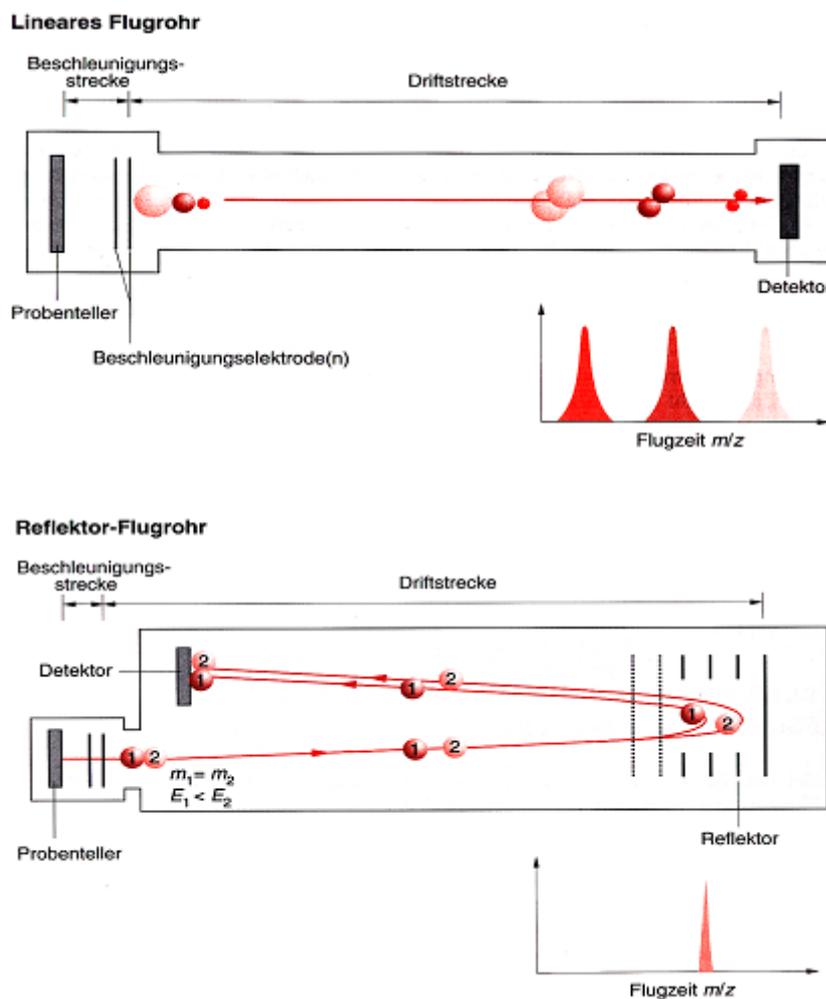


Abbildung 4: Prinzip eines linearen TOF-MS und eines Reflektor-TOF-MS

Bei einem linearen Flugrohr befindet sich der Detektor am Ende des Flugrohres. Mit dieser Methode lassen die Massen größerer Moleküle gut bestimmen, allerdings ist Auflösung in

diesem Modus nicht optimal. Die schlechte Auflösung kommt dadurch zustande, dass Ionen gleicher Massen mit einer gewissen Verteilungsbreite der Energie starten.

Bei einem Reflektor-Flugrohr wird die Auflösung der Peaks wesentlich verbessert, da der Unterschied in der zugeführten Energie gleich schwerer Teilchen durch den Einbau eines Reflektors kompensiert wird. In einem elektrischen Gegenfeld wird die Richtung der Ionen umgekehrt. Ionen mit gleicher Masse und höherer Geschwindigkeit dringen weiter in das Gegenfeld ein, legen einen weiteren Weg im Reflektor zurück und holen die langsameren Ionen auf dem Weg zum Detektor wieder ein. Bei richtiger Einstellung befindet sich an dieser Stelle der Detektor, beide Ionen werden gleichzeitig erfasst, was in einer besseren Auflösung resultiert.

1.6 Kontrollfragen

- Welche Einstellungen müssen vor der Aufnahme eines Spektrums vorgenommen werden? Warum?
- Was ist die Ursache der chemischen Verschiebung? Durch welche Effekte wird sie beeinflusst?
- Wodurch wird die Aufspaltung der Signale zu Multipletts verursacht? Wie bestimmt sich die Intensität der Linien?
- Wie groß sind typischerweise Kopplungskonstanten von J -Kopplungen? Welche Informationen kann man daraus für die Molekülstruktur gewinnen?
- Wie berechnet man Doppelbindungsäquivalente?
- Wie können wir von der Lage der Signale im Spektrum die Molekülstruktur bestimmen?
- Welche Informationen bekommen wir aus Massespektren?
- Wie werden Massespektren normalerweise aufgenommen bzw. welche Arten gibt es?

2 Versuchsdurchführung

2.1 Vorbereitung

Es werden zwei Proben zur Verfügung gestellt, welche jeweils ein organisches Molekül in deuteriertem Chloroform als Lösungsmittel enthalten. Die Proben werden vom Assistenten in den Probenwechsler gestellt und in den Magneten geführt. Zusätzlich erhaltet ihr bereits gemessene Massenspektren der einzelnen Moleküle.

2.2 NMR-Messung

Die Bedienung erfolgt über das Programm TopSpin. Für die Aufnahme der Spektren müssen vor den jeweiligen Messungen analog zum Versuch „NMR Einführung“ die entsprechenden Parameter eingestellt werden.

2.2.1 Spektrometereinstellungen

Zuerst wird die Lockfrequenz auf das verwendete Lösungsmittel eingestellt. Sowohl das Tunen und Matchen, als auch das Shimmen werden bei diesem Versuch automatisch durchgeführt. Die Aufnahmeparameter wie die spektrale Breite (SW), Dwell Time (DW), Sendefrequenz-Offset (O1P), Akquisitionszeit (AQ), Anzahl der aufgenommenen Punkte (TD) und Anzahl an Scans (NS) werden vom Assistenten eingestellt. Danach wird die Pulslänge automatisch bestimmt.

2.2.2 Spektren

Von beiden Proben wird je ein eindimensionales Protonenspektrum sowie ein ^{13}C -Spektrum aufgenommen. Danach wird eine Phasen- und Basislinienkorrektur durchgeführt.

3 Auswertung

3.1 Erstellen einer Peakliste

Die Auswertung der Spektren erfolgt mit Hilfe der Software TopSpin. Für beide Proben werden je zwei Peaklisten erstellt (^1H und ^{13}C). Folgende Werte sollen (sofern sinnvoll) für jedes Signal gemessen und in der Liste notiert werden.

- Chemische Verschiebung
- Struktur der Kopplungsaufspaltung (Multiplizität),
- Kopplungskonstanten (Teilweise können kompliziertere Kopplungsmuster mit mehreren Kopplungskonstanten auftreten, die jeweils notiert werden sollen)
- Integrale

Von den bearbeiteten Spektren (mit chemischer Verschiebung und Integralen) wird eine PDF-Datei erstellt.

Hinzu kommt eine Peakliste für beide Moleküle mit den Daten aus den Massenspektren. Wichtig sind hier alle Zerfallsprodukte richtig zuzuordnen, die in den Spektren sichtbar sind. Peaks, die sich nur aufgrund eines H-Atoms unterscheiden und die gleiche Gruppe darstellen, können zusammengefasst werden. Winzige Peaks müssen nicht beachtet werden, der Assistent hilft bei der Auswahl.

3.2 Strukturbestimmung

Die notierten Werte sollen anschließend interpretiert werden, um mögliche funktionelle Gruppen des Moleküls zu identifizieren. Hierbei können auch Tabellen zu chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten genutzt werden. Diese dienen aber nicht als wissenschaftliche Quelle, um Verschiebungen zu begründen. Wichtige Schritte, Überlegungen und Annahmen werden dabei notiert.

- Welche Informationen könnt ihr aus den Integralen gewinnen?
- Welche Informationen liefern euch chemische Verschiebung, Multiplizität (und Kopplungskonstanten)?
- Welche Information könnt ihr aus den Massenspektren gewinnen?
- Ordnet, wenn möglich, die Signale aus den ^1H - und ^{13}C -Spektren einander zu.

Anschließend werden die Molekülfragmente zu einem Gesamtmolekül zusammengesetzt.

- Stimmen eure Molekülfragmente aus den NMR Daten mit den Masse Daten überein?
- Wie viele Doppelbindungsäquivalente enthält das Molekül?

Gegebenenfalls werden mehrere Kandidaten, jeweils mit Begründung, formuliert.

- Sind die Daten ausreichend, um die Struktur eindeutig bestimmen zu können? Falls nicht, welche Informationen werden zusätzlich benötigt?

3.3 Berechnung der Doppelbindungsäquivalente

Aus der Summenformel lässt sich die Anzahl geschlossener Strukturelemente berechnen. Dies können Ringe oder Mehrfachbindungen sein. Benzol z. B. hat 4 DBE, drei Doppelbindungen und einen Ring. Aceton hat 1 DBE, eine C-O-Doppelbindung. Aus der Summenformel $\text{C}_c\text{H}_h\text{N}_n$ wird die Anzahl nach

$$DBE = \frac{2c - h + n + 2}{2} \quad (5)$$

berechnet.

4 Protokoll

Das Protokoll soll folgende Punkte enthalten:

- Kurze Einleitung zur verwendeten Methode (Die Theorie aus dem Versuch „NMR Einführung“ soll nicht erneut enthalten sein; stattdessen bitte auf chemische Verschiebung, Kopplung, Karplus und Besonderheiten des ^{13}C -NMR eingehen)
- Kurze Beschreibung grundlegender Theorie zur Massenspektrometrie. Welche Methoden gibt es? Wie wird grundsätzlich gemessen?
- Beschreibung des durchgeführten Versuchs (was wurde getan?)
- Die erhaltenen Spektren (mit chemischer Verschiebung und Integralen)
- Die erstellte Peakliste, sowie die Struktur des bestimmten Moleküls mit Zuordnung der Peaks zu den einzelnen Atomen.
- Begründung der Zuordnung (jedes Atom!!) und Herleitung der Strukturbestimmung (jede Annahme, die ihr trefft, muss nachvollziehbar sein!)
- Bewertung der Ergebnisse mit Diskussion
- Quellen- und Abbildungsverzeichnis

4 Literaturvorschlag

Grundlagen:

- Friebolin, H. (2013): *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*. WILEY-VCH, Weinheim
- Lottspeich, F., Engels, J.W. (2012): *Bioanalytik*. Springer, Heidelberg
- Stryer, L. (2018): *Biochemie*. Springer-Verlag GmbH, Deutschland
- Richter G. (2003): *Praktische Biochemie*, Thieme, Stuttgart

Weiterführende Literatur:

- Keeler, J. (2010): *Understanding NMR Spectroscopy*. WILEY, Chichester
- Günther, H. (1992): *NMR-Spektroskopie*. Thieme, Stuttgart

Benötigte Kommandos für TopSpin

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
edc	Experiment und Parameter kopieren
apk	Automatische Phasenkorrektur
abs n	Automatische Basislinienkorrektur

p1	Pulslänge P1 einstellen
rga	Automatischen receiver gain einstellen
ns	Anzahl der Scans einstellen
pulsecal	Puls p1 automatisch kalibrieren
ased	Reduzierten Parametersatz öffnen
.ph	Phasenkorrektur
.pp	Peak Auswahl/Peakliste erstellen
.md	Multidisplay
.all	Ganzes Spektrum anzeigen
.int	Integrale bestimmen
lock	Lösungsmittel lock einstellen
topshim gui	Shimfenster öffnen
sx XX	Wechsel Probennummer XX