

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.

Diese Analyse erfolgt mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR Spektroskopie). Die Spektren werden an einem NMR Spektrometer mit einer Protonenresonanzfrequenz von 400 MHz aufgenommen. Für diesen Versuch ist keine aufwendige Probenvorbereitung nötig. Die Anpassung der Spektrometereinstellungen erfolgt anhand einer unbekannt methanolhaltigen Probe, welche vom Assistenten bereitgestellt wird. Die Zusammensetzung dieser Probe soll ebenfalls analysiert werden

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 antiparallel orientierten Kernspins erzeugt wird. Im Probenkopf werden die ^1H -Kernspins mittels hochfrequenter Radiowellenpulse (RF-Pulse) 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° Pulse und 180° Pulse von Bedeutung. Bei einem 90° 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° Puls dreht M_z in die entgegengesetzte Richtung, folglich zu $-M_z$.

1.2 Relaxation

Nach Ende des RF-Pulses ist der Magnetisierungsvektor aus der Gleichgewichtslage ausgelenkt und präzediert mit der Larmor-Frequenz um die Z-Achse. Durch Relaxation kehrt das Spinsystem anschließend wieder in den Gleichgewichtszustand zurück. Dieser Prozess 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 RF-Puls gewartet werden muss bis die Ausgangsmagnetisierung wieder erreicht wird. Denn trifft der RF-Puls nicht auf die vollständige Ausgangsmagnetisierung, so wird auch nicht der vollständige Anteil der Magnetisierung ausgelenkt, was zu einem Signalverlust führt.

1.3 FID und Fourier Transformation

Die im Empfänger registrierte Abnahme der Quermagnetisierung wird FID (engl.: *Free Induction Decay*, oder Freier Induktions Abfall) genannt. Die Umwandlung des zeitabhängigen Spektrums $f(t)$ in das frequenzabhängige Spektrum $g(\omega)$ erfolgt durch die Fourier-Transformation, wodurch eine Interpretation der Signale ermöglicht wird.

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

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 (J Kopplung).

1.4 Spektrometereinstellungen

1.4.1 Akquisitionsparameter

Ein NMR-Experiment umfasst eine Sequenz von Pulsen und Delays, welche durch ein Pulsprogramm (**PULPROG**) definiert wird. Der Parameter **P1** [μs] gibt typischerweise die Pulslänge für den Standard 90° Anregungspuls wider. Dieser Wert muss für jede Probe neu bestimmt werden. Vor jedem Scan muss die Relaxationszeit (*Relaxation Delay*, **D1** [s]) eingehalten werden, damit die Kernspins wieder den Gleichgewichtszustand erreichen können.

Ein Maß für die Qualität eines Spektrums ist die Auflösung, bzw. Linienbreite der detektierten Signale. Die Auflösung kann durch eine Erhöhung der Anzahl an Datenpunkten, welche aufgenommen werden und digitalisiert den FID bilden (*Size of FID/Time Domain Size*, **TD**), verbessert werden. Realisiert wird dies durch eine Verlängerung der Aufnahmezeit des FID (*Acquisition Time*, **AQ** [s]).

Die spektrale Breite (*Spectral Width/Sweep Width*, **SWH** [Hz] bzw. **SW** [ppm]) ist ein Maß für die Breite des Frequenzspektrums. Sie wird durch die sogenannte *Dwell Time* (**DW**) bestimmt, der Zeit zwischen zwei Punkten im FID. Es werden nur Signale detektiert, deren Frequenzen innerhalb der gewählten spektralen Breite liegen. Wenn bekannt ist, wo die Resonanzfrequenzen der zu messenden Probe liegen, kann eine kleinere spektrale Breite gewählt werden. Dies hat den Vorteil, dass die spektrale Auflösung erhöht wird, führt aber auch zu einer längeren Akquisitionszeit **AQ**. Das Zentrum des Spektrums wird über den Sendefrequenz-Offset (**O1P** [ppm]) eingestellt. Die Sendefrequenz (**SFO1** [MHz]) welche zur Anregung benutzt wird, berechnet sich somit aus der Basis-Sendefrequenz für den beobachteten Kern (z.B. ^1H , ^{13}C) und dem Sendefrequenz-Offset.

Neben der Auflösung ist außerdem die Empfindlichkeit des Experiments (*Signal-to-Noise*, S/N) entscheidend für die Qualität eines Spektrums. Die Empfindlichkeit kann durch wiederholtes Aufnehmen und Aufsummieren der einzelnen FIDs erhöht werden. Durch die statistische Mittelung nimmt das Rauschen dabei weniger zu als die Signale selbst. Dabei wächst das S/N-Verhältnis proportional mit der Wurzel aus der Anzahl der Einzelmessungen (*Number of Scans*, **NS**).

1.4.2 Basisprozeduren

Die Qualität der Spektren hängt, neben der optimalen Einstellung der Aufnahmeparameter, von dem Spektrometer selbst ab. So muss während der Messung gewährleistet sein, dass das Magnetfeld stabil bleibt und die Einstrahlfrequenz optimiert ist.

Durch das sogenannte **Tunen** wird im Probenkopf die Sendefrequenz auf die 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 über einen getrennten Frequenzkanal üblicherweise die ^2H -Resonanz des deuterierten Lösungsmittels gemessen, um die Stärke des Magnetfelds mit Hilfe einer kleinen Spule nachregeln zu können.

Beim sogenannten **Shimmen** werden geringe Anpassungen des Magnetfeldes vorgenommen, bis die räumliche Homogenität des Feldes optimal ist. Dies führt zu einer Verbesserung der spektralen Auflösung. Ermöglicht wird dies durch einen Satz Shim-Spulen, die in die Magnetöffnung eingelassen sind.

1.5 Kontrollfragen

- Grundprinzip der NMR-Spektroskopie? NMR-aktive Kerne?
- Was ist der Zusammenhang zwischen Pulslänge und Flipwinkel? Was ist ein 90° Puls?
- Was bedeutet Relaxation? Welche Relaxationsarten gibt es? Wie beeinflusst Relaxation das Experiment?
- Wie entsteht der Free Induction Decay (FID)? Warum wird hier die Fourier Transformation durchgeführt?
- Wie ist das Spektrometer aufgebaut?
- Was ist Tunen und Matchen? Was bedeutet Lock? Warum müssen wir Shimmen?
- Wie stehen Time Domain Size (TD), Acquisition Time (AQ), Dwell Time (DW) und Spectral Width (SW) miteinander in Zusammenhang?
- Was ist die Auflösung? Was meint man mit Empfindlichkeit? Wie können diese im Experiment verbessert werden?

2 Versuchsdurchführung

2.1 Vorbereitung

Eine unbekannte methanolhaltige Probe wird vom Assistenten bereitgestellt. Als zweite Probe werden 600 µl des mitgebrachten 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 einem Spinner positioniert, mithilfe eines automatischen Probenwechslers auf die Magnetöffnung gesetzt und durch einen Luftstrom in den Magneten geführt.

2.2 NMR-Messung

Die Bedienung erfolgt über das Programm TopSpin. Für die Aufnahme der Spektren müssen vor den jeweiligen Messungen die im Theorieteil beschriebenen Parameter eingestellt werden. Dies erfolgt an der bereitgestellten Probe. Aufgrund der Ähnlichkeit der Proben können die Einstellungen für das mitgebrachte alkoholische Getränk übernommen werden.

2.2.1 Spektrometereinstellungen

Tunen/Matchen:

Dafür werden herkömmlicherweise jeweils eine Schraube für tune und match an der Unterseite des Probenkopfes bewegt. Bei dem verwendeten Spektrometer erfolgt dies elektronisch und kann entweder automatisch mit dem Befehl *atma*, oder manuell mit dem Befehl *atmm* durchgeführt werden.

Frequenzlock:

Durch den Befehl *lock* werden normalerweise Parameter wie Lock-Leistung, Verstärkung und Frequenz auf geeignete Werte für das jeweilige Lösungsmittel gesetzt. Bei diesem Versuch kann dieser Schritt nicht durchgeführt werden. (→ Warum?)

Shimmen:

Der Strom in den Shim-Spulen und damit das Feld innerhalb des Magneten kann automatisch mit Hilfe des Befehls *topshim*, oder manuell über die BSMS Control Suite (Befehl *bsmsdisp*) angepasst werden. Als Indikator für die Feldhomogenität dient dabei typischerweise das Lock-Signal, aber auch Form und Fläche des FID können als Maß betrachtet werden. Bei diesem Versuch wird das Shimmen manuell durchgeführt (→ Warum?). Es wird ein Spektrum davor und danach aufgenommen um die Verbesserung der Auflösung bewerten zu können.

Akquisitionsparameter:

Die zuvor beschriebenen Aufnahmeparameter wie die spektrale Breite (SW), Dwell Time (DW), Sendefrequenz-Offset (O1P), Akquisitionszeit (AQ), Anzahl der aufgenommenen Punkte (TD) und Anzahl an Scans (NS) müssen angepasst werden.

Bestimmung der Pulslänge

Die Bestimmung der Pulslänge kann entweder automatisch mit Hilfe des Befehls *pulsecal* oder manuell erfolgen. Für die manuelle Bestimmung der Pulslänge wird zunächst ein Spektrum mit einer typischen Pulslänge aufgenommen ("9 μ s" für einen 90°-Puls). Die Pulslänge wird nun auf das Vierfache verlängert, was einem 360°-Puls entspricht, und erneut ein Spektrum aufgenommen. Danach wird die Pulslänge so verändert, dass die Signalintensität des zentralen Signals annähernd Null ist. Zum schnellen Ändern der Pulslänge kann der Befehl *p1* verwendet werden. Aus dem bestimmten 360°-Puls kann nun wieder der 90°-Puls berechnet und eingetragen werden.

2.2.2 Datenstruktur in Topspin

Spektren werden in Topspin in Datensätze gegliedert, die durchnummeriert sind (Experiment Number, EXPNO). Jeder Datensatz enthält einen FID und kann mehrere daraus prozessierte Spektren erhalten, die wiederum durchnummeriert sind (Processing Number, PROCNO). Der Befehl *edc* legt einen neuen Datensatz an, hierbei können die Einstellungen des aktiven Datensatzes kopiert werden. *wrp n* kopiert das aktuelle Spektrum in eine neue Prozessierungsnummer (PROCNO).

2.2.3 Aufnahme der Spektren

Von beiden Proben soll je ein eindimensionales Protonenspektrum aufgenommen werden. Der Befehl *zg* führt das aktive Experiment aus, die Prozessierung erfolgt durch den Befehl *efp*. Danach muss eine Phasen- und Basislinienkorrektur durchgeführt werden (Befehle *apk* und *abs n*).

3 Auswertung

Mit Hilfe des Befehls `.pp` werden die einzelnen Peaks ausgewählt, außerdem werden die Integrale der verschiedenen Signale bestimmt (Befehl `.int`). Abschließend wird von den Spektren eine PDF-Datei erstellt.

- Welche Substanzen, neben Methanol, erwartet ihr in der bereitgestellten Probe?
- Ordnet die Signale den jeweiligen Protonen im Molekül zu.
- Welche Signale finden sich in der Probe des alkoholischen Getränks wieder? Was sagt das über euer Getränk aus?
- Berechnet mit Hilfe der Integrale die Zusammensetzung der unbekanntes methanolhaltigen Probe und den Ethanolgehalt des alkoholischen Getränks.

4 Protokoll

Das Protokoll soll folgende Punkte enthalten:

- Kurze Einleitung zur Theorie dieses Versuches (Inhalt wird am Versuchstag besprochen)
- Erläuterung der Versuchsdurchführung
- Alle Einstellungen, die bei den Messungen vorgenommen wurden
- Die aufgenommenen Spektren (bitte einen USB-Stick mitbringen) mit der Zuordnung der Signale
- Der Rechenweg, sowie die Ergebnisse der Alkoholmengenbestimmung
- Bewertung der Ergebnisse mit Fehlerdiskussion
- Quellen- und Abbildungsverzeichnis

5 Literaturvorschlag

Grundlagen:

- Friebolin, H. (2013): *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*. WILEY-VCH, Weinheim
- Lottspeich, F., Engels, J.W. (2012): *Bioanalytik*. Springer, Heidelberg

Weiterführende Literatur:

- Keeler, J. (2010): *Understanding NMR Spectroscopy*. WILEY, Chichester
- Günther, H. (1992): *NMR-Spektroskopie*. Thieme, Stuttgart
- Walla, P. J. (2014): *Modern biophysical chemistry*. WILEY-VCH, Weinheim

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
wrp	Prozessierungs Parameter kopieren
apk	Automatische Phasenkorrektur
abs n	Automatische Basislinienkorrektur
p1	Pulslänge P1 einstellen
rga	Automatischen receiver gain einstellen
ns	Anzahl der Scans einstellen
d1	Erholungs delay einstellen
ased	Reduzierten Parametersatz öffnen
.ph	Phasenkorrektur
.pp	Peak Auswahl/Peakliste erstellen
.md	Multidisplay
.all	Ganzes Spektrum anzeigen
.ret	Fenster schließen
.int	Integrale bestimmen
lock	Lösungsmittel lock einstellen
topshim gui	Shimfenster öffnen
rsh	Shimparameter lesen und übernehmen
sx XX	Wechsel Probennummer XX