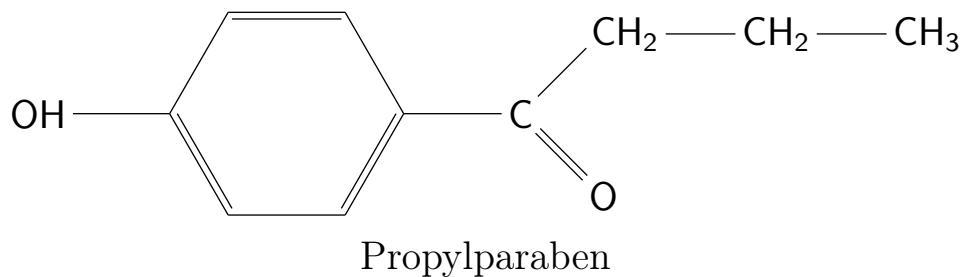
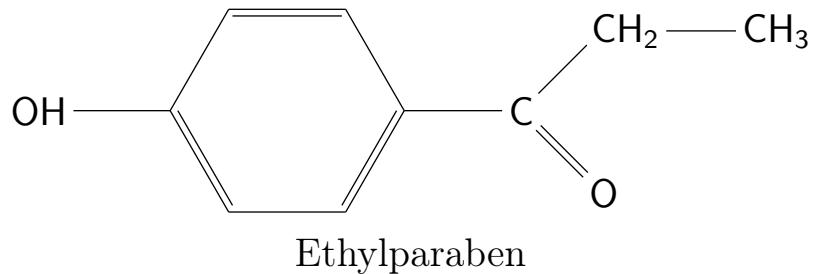


# KEMISK PRODUKTION

## Syntese af parabener

Oliver Nielsen Bager, 3.A, Traidium HTX

Vejledt af: Anders Kristensen & Kacper Januchta  
26/4-2024



# Indhold

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 Indledning</b>                        | <b>1</b>  |
| <b>2 Teori</b>                             | <b>2</b>  |
| 2.1 Parabener . . . . .                    | 2         |
| 2.1.1 Virkningsmekanisme . . . . .         | 3         |
| 2.1.2 Sundhedsmæssig indvirkning . . . . . | 4         |
| 2.1.3 Nedbrydning . . . . .                | 6         |
| 2.2 Synteseprocessen . . . . .             | 7         |
| 2.3 Smeltepunktsbestemmelse . . . . .      | 9         |
| 2.4 Tyndlagschromatografi . . . . .        | 9         |
| 2.5 Spektroskopi . . . . .                 | 10        |
| 2.5.1 H-NMR-spektroskopi . . . . .         | 12        |
| 2.5.2 Kemisk skift . . . . .               | 18        |
| 2.5.3 IR-spektroskopi . . . . .            | 20        |
| <b>3 Metoder</b>                           | <b>25</b> |
| 3.1 Syntese . . . . .                      | 25        |
| 3.2 Smeltepunktsbestemmelse . . . . .      | 30        |
| 3.3 TLC-analyse . . . . .                  | 30        |
| 3.4 NMR-spektroskopi . . . . .             | 31        |
| 3.5 IR-spektroskopi . . . . .              | 31        |
| 3.6 Hæmningsforsøg . . . . .               | 31        |
| 3.6.1 Agar-diffusion . . . . .             | 31        |
| 3.6.2 Fortyndingsrække . . . . .           | 33        |
| <b>4 Resultater &amp; diskussion</b>       | <b>37</b> |
| 4.1 Smeltepunkt og TLC . . . . .           | 37        |
| 4.2 H-NMR-spektroskopi . . . . .           | 38        |
| 4.3 IR-spektroskopi . . . . .              | 41        |
| 4.4 Hæmningsforsøg . . . . .               | 43        |
| 4.4.1 Agar-diffusion . . . . .             | 43        |
| 4.4.2 Fortyndingsrække . . . . .           | 45        |
| <b>5 Konklusion</b>                        | <b>47</b> |
| <b>6 Perspektivering</b>                   | <b>48</b> |

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| <b>A Flowchart</b>          | <b>50</b> |
| <b>B Mængdeberegninger</b>  | <b>50</b> |
| B.1 Ethylparaben . . . . .  | 50        |
| B.2 Propylparaben . . . . . | 50        |
| B.3 Dobbelsyntese . . . . . | 51        |
| <b>C TLC-plader</b>         | <b>51</b> |
| C.1 Syntese 1 . . . . .     | 51        |
| C.2 Syntese 2 . . . . .     | 52        |
| C.3 Dobbelsyntese . . . . . | 52        |
| <b>H-NMR-Spektre</b>        | <b>52</b> |
| C.4 Ethylparaben . . . . .  | 53        |
| C.4.1 Peaks . . . . .       | 54        |
| C.5 Propylparaben . . . . . | 55        |
| C.5.1 Peaks . . . . .       | 56        |
| <b>IR-Spektre</b>           | <b>57</b> |
| C.6 Ethylparaben . . . . .  | 57        |
| C.7 Propylparaben . . . . . | 58        |
| <b>D Risikovurdering</b>    | <b>59</b> |

## 1 Indledning

Konserveringen af fødevarer har gennem tiden spillet en enorm rolle for menneskets overlevelse som art. At kunnet bevare fødevarer gennem perioder med mangel, har gjort det muligt at have adgang til mad hele året rundt.

I nutiden, hvor forsyningen af mad ikke er et problem grundet globaliseringen, har præserveringen af mad fået en ny rolle: at muliggøre transportation og langvarig opbevaring af egnede fødevarer (Anderson, 2019).

Før i tiden benyttedes oftest “naturlige” metoder til at konserve fødevarer, eksempler på disse kunne være:

- saltning af kød, hvilket medfører dehydrering og derved værre miljø for bakterievækst
- tørring af frugt, grøntsager, medfører igen dehydrering
- syltning, placerer fødevaren i et syrligt miljø hvilket minimerer bakterievækst
- frysning, reducerer enzymaktiviteten drastisk og fryser vandet hvilket gør det ubrugeligt for mikroorganismer
- rygning, dræber overfladebakterier og tørrer overfladen ud, røg indeholder formaldehyd og alkohol som har bevarende virkning

Alle ovenstående ændrer på både fødevareernes smagsprofil – samt deres fysiske struktur og derved konsistens. Derudover egner de sig *ikke* til vandige fødevarer, hvilket gør dem enormt svære at præserve ved sådanne metoder.

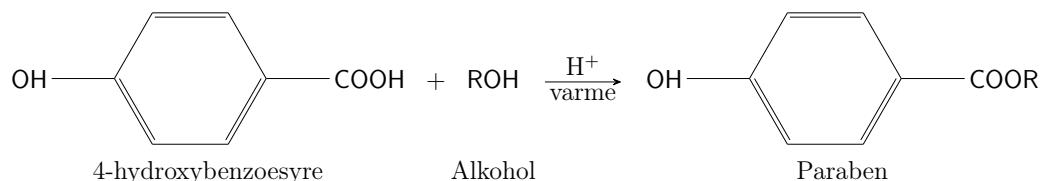
I dag benyttes ofte i stedet syntetiske konserveringsmidler der produceres i laboratorier, grundet deres bedre effektivitet, stabilitet og omkostning. En anden betydelig fordel ved disse er evnen til at præserve fødevarer uden at ændre på deres fysiske karakteristika eller smagsprofil, hvilket gør præservering af fødevarer ligegyldigt form muligt.

Demonisering af syntetiske tilsætningsstoffer har dog medført at mange er bange for de syntetiske konserveringsmidlers indvirkning på menneskets sundhed, på trods af manglende empirisk data der understøtter dette, hvilket har medført at producenter er begyndt at benytte mere “naturlige” (eller mindre omtalte), konserveringsmidler, hvilket på sigt kan have konsekvenser grundet den større eksponering til mindre velundersøgte stoffer.

## 2 Teori

### 2.1 Parabener

Parabener indgår i en gruppe af estere dannet ved kondensationsreaktion mellem 4-hydroxybenzoësyre og en vilkårlig alkohol. Afhængigt af alkoholen der anvendes vedhæftes forskellige alkylgrupper, hvilket ændrer egenskaberne af det endelige molekyle.



Figur 1: Kondensationsreaktion mellem 4-hydroxybenzoësyre og vilkårlig alkohol, dannet vandmolekyle udeladt.

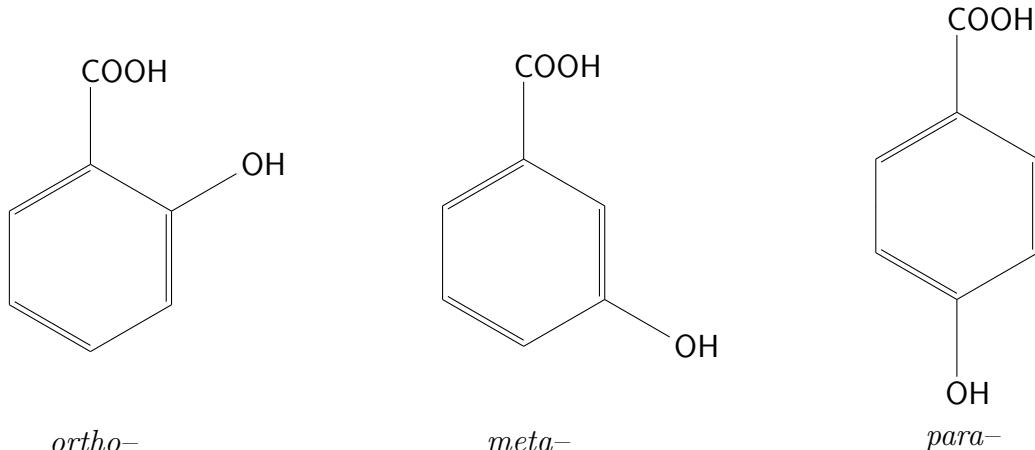
Afhængigt af i hvilke produkter parabnen skal benyttes, har de forskellige parabener deres egne fordele. Eksempelvis benyttes methylparaben ofte i fødevarer, da det er parabenen med den højeste vandopløselighed. Omvendt benyttes ofte parabener med længere alkylkæder i kosmetik, da cremer og lotions ofte er lipide.

Tabel 1: Fysiske egenskaber af forskellige parabener (NIH, u.d.).

| Paraben       | Opløselighed [mg/mL] |         |            |          |
|---------------|----------------------|---------|------------|----------|
|               | Vand                 | Ethanol | MV [g/mol] | SMP [°C] |
| Methylparaben | 2.5                  | 408     | 152.15     | 125      |
| Ethylparaben  | 0.85                 | 550     | 166.17     | 117      |
| Propylparaben | 0.5                  | 746     | 180.2      | 96       |
| Butylparaben  | 0.21                 | 1649    | 194.23     | 68       |

Alternativt kan typisk ester–navngivning også benyttes, dog angives parabener hyppigst ved navnet på deres alkylkæde efterfulgt af *paraben*, eksempelvis: *ethylparaben*. *Paraben* stammer fra navnet på 4-hydroxybenzoësyre. Alternativ navngivning jf. de relative molekylepositioner villet medføre at den

kaldes *para*-hydroxybenzoësyre, grundet hydroxygruppens placering i *para*-positionen ift. syregruppen. Derfra kommer *para*-hydroxybenzoësyre.



Figur 2: Illustration af forskellige positioner i aromatisk ring.

### 2.1.1 Virkningsmekanisme

Parabeners virkningsmekanisme er ikke veletableret, og det er endnu ikke fuldstændigt sikkert hvordan de hindrer mikroorganismers vækst. Nogle populære teorier bygger dog på at de (Valkova m.fl., 2001):

- forstyrrer membrantransportprocesser
- inhiberer DNA- og RNA-syntese
- inhiberer dannelsen af nødvendige enzymer som ATPase og fosfotransferase

Samtidigt ses også et sammenhæng mellem længden af den vedhæftede alkylkæde og deres haemmende effekt (Cashman & Warshaw, 2005). Dette begrundes i den faldende polaritet af molekylet i takt med at længden på alkylkæden stiger, hvilket gør det nemmere for den at interagere med den lipide cellemembran.

Dog er dette ufordelagtigt i en række af produkter, da det begrænser muligheden for at benytte dem i varer med vandige faser. Det samme observeres også i to-fasede produkter, hvor der ofte benyttes blandinger af parabener

med korte- og lange alkylkæder, for at sørge for at de ikke blot akkumulerer i fasen hvor de har lettest ved at forblive opløst og derved muliggøre mikroorganisme vækst i den modsatte fase.

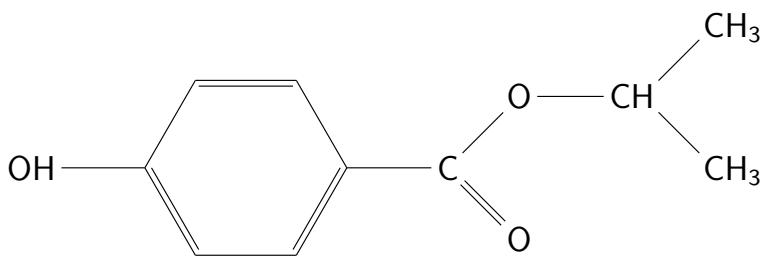
### 2.1.2 Sundhedsmæssig indvirkning

Bekymring for den sundhedsmæssige indvirkning af en lang række syntetiske produkter bringes ofte op i medierne, samt af offentligheden generelt. Dog er dette oftest uden belæg, og kan hovedsageligt tilskrives den *naturalistiske fejlslutning* (Waldegg, 2007) — troen på at “naturlige” produkter altid er bedre for en sundhedsmæssigt, end syntetiske alternativer, hvilket selvfølgelig ikke er sandt.

Dette understøttes også af den eksisterende empiriske data, hvor langt størstedelen deraf viser at parabener ikke har nogen negativ indvirkning på menneskets sundhed under realistiske forhold.

En stor del af frygten for parabener kan tilskrives tidligere studier der har påvist endokrin forstyrrelse i mus og rotter (Darbre & Harvey, 2008), samt fund af intakte parabener i kræftramt brystvæv (Darbre m.fl., 2004). Senere studier har dog påvist at der ikke lader til at være et kausativt samhæng mellem eksponering for parabener og udvikling af cancer (Hager, 2022), samtidigt med at den østrogeniske effekt af parabener *in vivo* er dokumenteret til i værste tilfælde at være  $10 \cdot 10^3$  gange lavere end endogent produceret estradiol (Routledge m.fl., 1998), og anses derfor for at være ubetydelig i realistiske eksponeringsmængder.

Nogle studier har dog også vist en forhøjet endokrin forstyrrende virkning hos parabener med længere- eller forgrenede alkylkæder (Karpuzoglu & Holladay, 2013), hvilket bidragede til at brugen af isopropyl- og butylparaben blev ulovliggjort i kosmetiske produkter beregnet til børn i Danmark (Miljøstyrelsen, 2013).



Figur 3: Isopropylparaben, en forgrenet paraben.

På baggrund af den manglende evidens for betydningsfulde sundhedsmæsige konsekvenser ved indtag af parabener er der dog mange der mener at de eksisterende grænseværdier (Committe, 2011) ikke har belæg. Samtidigt tager meget lidt af den empiriske data udgangspunkt i mennesker, og retningslinjerne er derfor udformet med udgangspunkt i dyrestudier (Libner, 2016).

Dog er brugen af methyl-, ethyl-, propyl- og butylparaben erklæret harmløst i kosmetik indenfor en grænseværdi af EUs videnskabskomite, mens det ikke har været muligt at drage definitive konklusioner for isopropyl-, isobutyl-, phenyl-, benzyl- og pentylparabener grundet manglende data (Jacobsen, 2013), og brugen deraf er derfor forbudt. En acceptabel daglig dosis for sammen af methyl- og ethylparaben fra levnedsmidler er 0 – 10mg/(kg · dag), mens propyl- og butylparaben reguleres individuelt grundet deres formodede større sundhedspåvirkning.

Disse værdier er i praksis nærmest umulige at overskride. Et spansk studie (Galvez-Ontiveros m.fl., 2020) fandt et gennemsnitligt parabenindhold på 73.86ng/g, ved undersøgelse af 98 forskellige fødevarer fra et supermarket. Dette medfører at en gennemsnitlig person ( $m = 70\text{kg}$ ) skulle indtage ca. 9.5t fødevarer for at nå grænseværdien på 700mg.

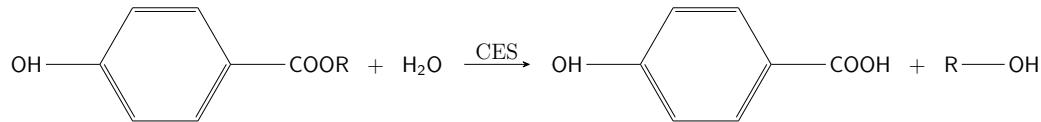
En stor del af den daglige eksponering kommer dog fra kosmetisk, hvor det kan være svært at opstille en daglig eksponeringsmængde. Med udgangspunkt i EUs retningslinjer ( $c_{\max} = 0.8\text{w/w\%}$ ), ville det være nødvendigt at benytte 87.5g kosmetik med maksimal parabenkoncentration for at nå grænseværdien for et gennemsnitligt individ ( $m = 70\text{kg}$ ). Dog er det også nødvendigt at inkorporere parabenerne fra fødevareindtag heri, og den reelle værdi villet derfor være en smule mindre. Dog er det usandsynligt at kosmetik vil indeholde så stor en parabenkoncentration da deres effektivitet er høj.

Med udgangspunkt i den eksisterende litteratur er det derfor svært at opstille et kausativt sammenhæng mellem brugen af parabener og en negativ sundhedsmæssig indvirkning, og på trods af konstant granskning siden deres første dokumenterede brug i 1920'erne (Liebert, 1984), eksisterer stadig ikke bevis for parabeners negative sundhedspåvirkning i mennesker, hvilket videre bidrager til argumentationen for deres brug i både kosmetik samt levnedsmidler som et sikkert, veltolereret og effektivt konserveringsmiddel.

Flere undersøgelser, specielt i mennesker, er dog nødvendige for at opstille en definitiv konklusion for indtagsgrænserne og potentielle følger af høje parabenindtag, og de er derfor sat relativt konservativt. Dog er de kategoriserede som GRAS (*Generally Recognized as Safe*) af Amerikas levnedsmiddelsstyrrelse (FDA, 2022).

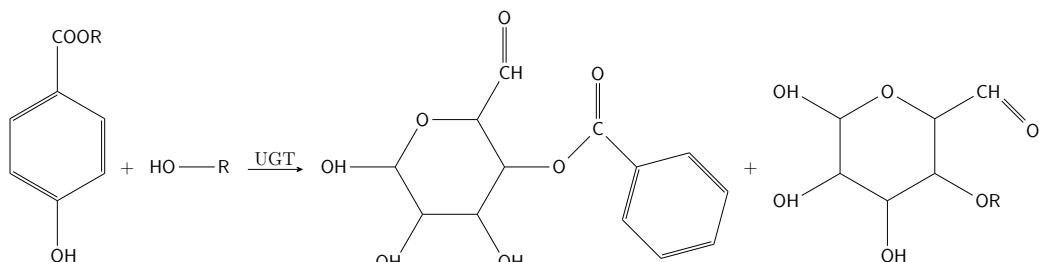
### 2.1.3 Nedbrydning

*In vivo* nedbrydes parabener hovedsageligt i leveren eller huden afhængigt af hvordan de er optagede (dermal applikation vs. levnedsmiddel) ved 2-faset metabolisering. I den første fase hydrolyseres molekylet ved enzymatisk reaktion med en carboxylesterase-isoform (CES-1 i leveren, CES-2 i huden) afhængigt af optagelsessitet, hvilket resulterer i omdannelsen til 4-hydroxybenzoesyre og den korresponderende alkohol der herefter udskilles gennem urinen.



Figur 4: Endogen hydrolysering af paraben ved enzymatisk reaktion med carboxylesterase.

Den 2. fase af metaboliseringen sker ved glukuronidation af de tilbageværende relativt upolære molekyler, katalyseret af glukuronosyltransferase-enzymet (UGT), hvilket medfører en polaritetsstigning hvorved de kan udskilles gennem urinen.



Figur 5: Glukoronidation af tilbageværende relative upolære molekyler, 2 vandmolekyler udeladt.

I plasma lader det til at parabener med kortere alkylgrupper er stabile, mens parabener med længere alkylgrupper degraderes over tid. Den effektive nedbrydning af parabener i leveren indikerer at de *ikke* akkumulerer i kroppen over tid, og i stedet eliminieres fuldstændigt (Abbas m.fl., 2010).

For kosmetiske produkter indeholdende parabener hydrolyseres de igen ved enzymatisk reaktion med carboxylesterase, dog denne gang ved isoform 2, CES2, hvilket medfører at kun en meget lille mængde af parabenen når at komme i cirkulation, hvorefter de igen eliminieres i leveren.

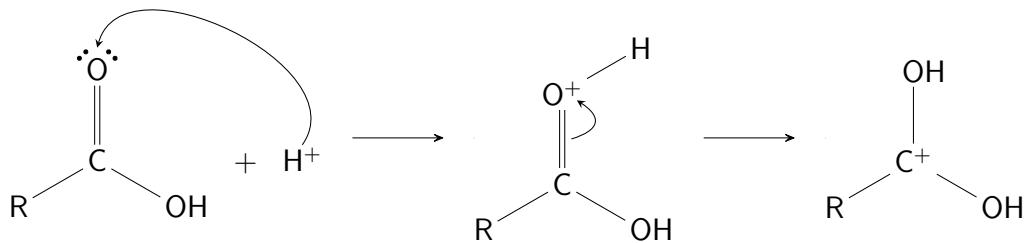
Samtidigt observeres det at parabener med længere alkylkæder generelt hydrolyseret hurtigere i huden, mens parabener med kortere alkylkæder hydrolyseres hurtigere i leveren. Dette er grundet forskellene på de 2 isoformer af carboxylesterase, hvor CES1 har en præference for korte alkylkæder og store acylgrupper, mens at CES2 har det omvendte (Lester m.fl., 2021).

## 2.2 Synteseprocessen

Parabener dannes ved syre–katalyseret esterificering af 4-hydroxybenzoesyre og en vilkårlig alkohol. Dette sker ved at protonen i carboxylsyregruppen fraspaltes under kondensationsreaktion med alkoholens hydroxygruppe, hvorved dets alkylkæde vedhæftes ved oxygenmolekylet ved fraspaltning af et vandmolekyle.

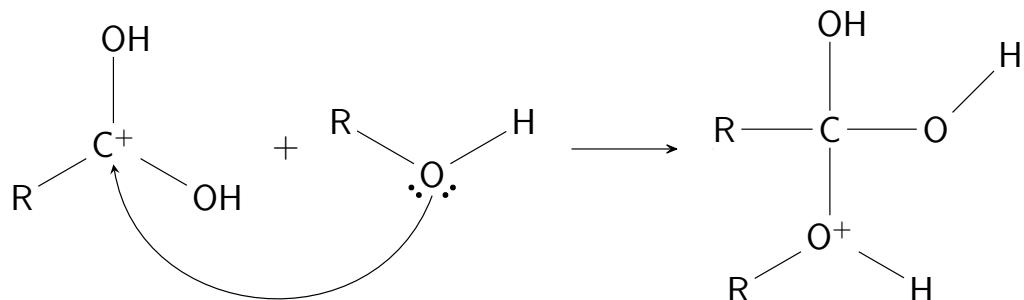
Som katalysator i denne proces benyttes koncentreret svovlsyre. Under en Fischer–esterificeringsreaktioner benyttes stærke organiske syrere for at fremme dannelsen af en carbokat–ion, hvilket muliggør nukleofil addition (Farmer, 2023).

Dette gøres ved at den stærke syre overfører en proton til det carbonyle oxygenatom hvilket er muligt grundet elektronegativitetsforskellen. Dette medfører en stigning i det carbonyle carbon-atoms elektrofilicitet ved dannelse af en carbokat-ion.



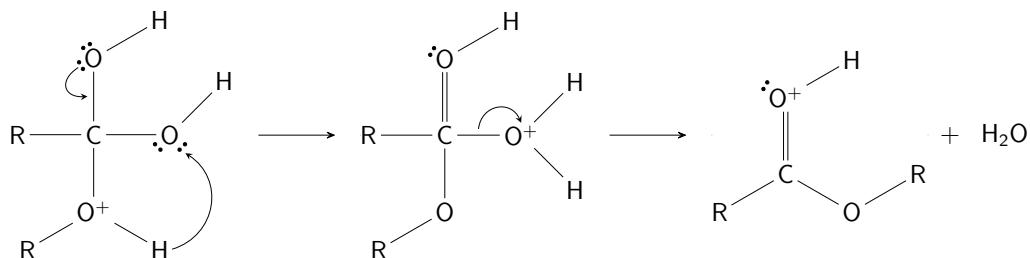
Figur 6: Dannelse af carbokat-ion under reaktion med stærk syre.

Alkoholen har i denne reaktion mulighed for at agere som et nukleofil grundet de frie elektronpar på oxygen-atomet. En nukleofil addition sker derfor ved carbokat-ionen, hvorved alkoholen vedhæftes, hvilket danner en oxonium-ion ved protonoverførsel.



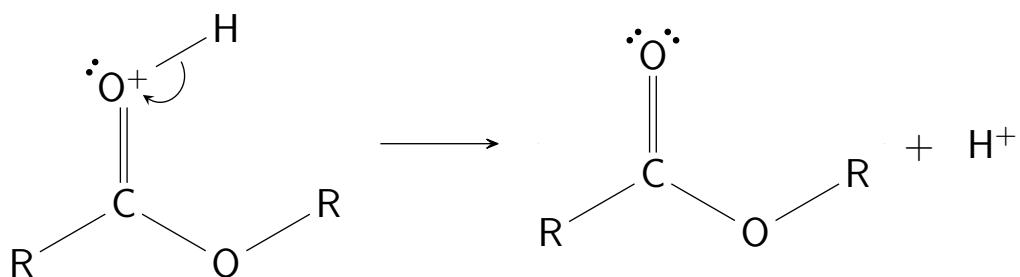
Figur 7: Nukleofil addition af alkoholmolekyle.

Den dannede ether er en dårlig leaving group, og protonen overføres derfor til den ene af hydroxygrupperne hvilket medfører dannelsen af et aktiveret kompleks hvorved vandmolekylet fraspaltes.



Figur 8: Dannelse af aktivt kompleks ved protonoverførsel til hydroxygruppe samt fraspaltning af vandmolekyle.

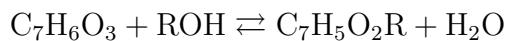
Det kovalente bånd mellem oxonium-ionen og hydrogen-atomet opløses, hvilket frigiver elektronen som optages af oxonium-ionen grundet elektronegativitetsforskellen, og neutraliserer ladningen.



Figur 9: Neutralisering af ladning ved frigivelse af hydron.

Da hydronerne ikke opbruges under reaktionen er det nødvendigt at neutralisere opløsningen for at gøre den sikker at håndtere.

Samtidigt er det nødvendigt at genkende at dette er en ligevægtsreaktion:



Hvilket medfører at det vil være optimalt at udføre et indgreb der forskyder ligevægten mod produktsiden. Ideelt villet vi kunnet fradestillere vandet under reaktionen, men grundet dets højere kogepunkt end de benyttede alkoholer er dette ikke en mulighed. Vi tilsætter derfor alkohol i overskud.

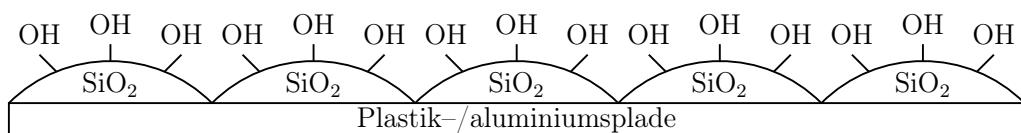
## 2.3 Smeltepunktsbestemmelse

Smeltepunktsbestemmelse gør det muligt at få en generel ide om et molekyles struktur. Et givent molekyles smeltepunkt er hovedsageligt bestemt af hvor tæt molekylet kan pakkes.

I forbindelse med parabener vil vi derfor forvente et fald i smeltepunkt i takt med at længden af alkylkæden stiger, da der er begrænset mulighed for at danne Londonbindinger siden den aromatiske ring optager en stor volumen i rummet.

## 2.4 Tyndlagschromatografi

Tyndlagschromatografi benyttes til at analysere renheden af- og identificere eventuelle urenheder i et givent produkt. Metoden benytter den sandsynlige polaritetsforskælf af dannede molekyler til at skille dem ad. Dette gøres ved at placere stoffet på en stærkt polær plade (oftest en plade coatet med silicagel grundet dets overfladiske hydroxygrupper):



Figur 10: Illustration af hydroxygrupper på silicagel-pålagt TLC-plade.

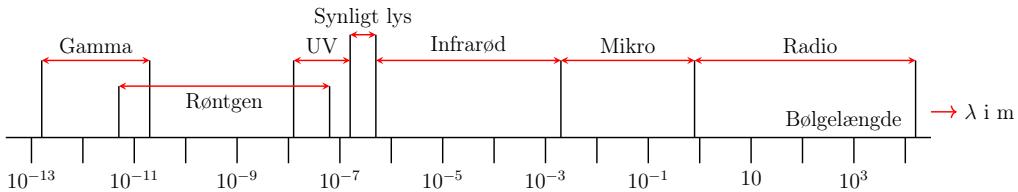
Ved at tilføje en løbevæske og lade den vandre op ad pladen, vil stofferne ”trækkes” forskellige afstande, da pladen vil holde bedre fast i de polære- end upolære stoffer.

Endvidere giver dette også mulighed for at samlinge med kommersielt indkøbte stoffer, hvor man er sikker på renhed, idet man- hvis det korrekte produkt er dannet, vil forvente ens løbelængder.

## 2.5 Spektroskopi

Spektroskopi er den videnskabelige disciplin der beskæftiger sig med måling- og studiet af frekvensspektra. Et frekvensspektrum dannes ved at undersøge

hvordan elektromagnetiske bølger (radiobølger, mikrobølger, infrarøde bølger, osv.) interagerer med eksempelvis molekyler (Sigurskjold m.fl., 2024). Afhængigt af deres bølgelænde tildeles de forskellige navne:



Figur 11: Det elektromagnetiske spektrum (Lund m.fl., 2012).

Tabel 2: Molekylær effekt og fysiske egenskaber af forskellige bølgetyper.

| Bølgetype | Bølgelængde [cm] | Energi [kcal/mol] | Molekylær effekt    |
|-----------|------------------|-------------------|---------------------|
| Gamma     | $10^{-9}$        | $10^6$            |                     |
| X-ray     | $10^{-7}$        | $10^4$            | Ionisering          |
| Vakuum UV | $10^{-5}$        | $10^{-9}$         |                     |
| Tæt UV    | $10^{-4}$        | $10^2$            |                     |
| Synlig    | $10^{-3}$        | 10                | Elektrontransistion |
| Infrarød  | $10^{-1}$        | $10^{-2}$         | Vibration           |
| Mikro     | $10^2$           | $10^{-4}$         | Rotation            |
| Radio     | $10^4$           | $10^{-6}$         | Spintransistion     |

Når en elektromagnetisk bølle rammer et molekyle er der en række forskellige muligheder, hvorved der konsekvent er mulighed for dannelsen af forskellige spektra der viser det enkelte molekyles spektrofotometriske egenskaber (Elvekjær & Benoni, 2020):

- 1) *Absorbtionsspektrum*, kontinuert spektrum der mäter et molekyles evne til at absorbere lys af en given bølgelængde (og derved energi). Gør det muligt at identificere bølgelængderne som et molekyle har mulighed for at optage.
- 2) *Emissionsspektrum*, det modsatte af et absorbtionsspektrum, mäter bølgelængderne (og derved igen energien) af den elektromagnetisk stråling

der emitteres fra molekylet ved at transistionere fra et højt energistadie, til et lavt energistadie.

Det har vist sig senere hen at lys i virkeligheden ikke opfører sig som udelukkende som en bølge, men i stedet både som en partikel og bølge, kendt som bølge-partikel-dualiteten. Energien af lys er derfor ikke kontinuært, men i stedet følger det kvantemekaniske regler. Dvs. at energien kommer i diskrete klumper, kaldet energikvanter (fotoner). Energien af disse kan bestemmes ved Einstein-Planck relationen givet ved:

$$E = hf$$

Hvor  $h$  er Plancks konstant, og  $f$  er frekvensen af lyset (Espita, 2022). Dette betyder samtidigt også at energistadierne i et molekyle må være kvantificerede, og derved diskrete (Andersen & Petresch, 2002), hvilket medfører at hvert molekyle har deres egne absorptions- og emissionsspektra grundet forskelle i deres struktur, da et molekyle udelukkende kan absorbere fotoner med en energi der svarer til energidifferensen mellem to kvantemekaniske energistadier. Denne egenskab gør det oplagt til kemisk analyse, da det gør det muligt at differentiere mellem forskellige molekyler afhængigt af frekvenserne de har mulighed for at optage.

Til dette formål benyttes specielt *kernemagnetisk resonans spektroskopi* (NMR, samt dets undertyper som H-NMR og C-NMR) og *infrarød spektroskopi* (IR), der har hver deres fordele og ulemper.

### 2.5.1 H-NMR-spektroskopi

H-NMR-spektroskopi undersøger overgangen mellem kvantemekaniske energistadier, der sker når et molekyle i et ydre magnetfelt udsættes for en elektromagnetisk frekvens af den rette bølgelængde. Ved at detektere et sådant spring mellem energistadierne kan et NMR-spektrum dannes, hvilket gør det muligt at undersøge strukturen af molekyler.

Den unikke interaktion mellem molekyler og ydre magnetfelter begrundes i deres *spin*, der minder meget om vinkelmomentet vi kender fra den makroskopiske verden. Hvor spin kommer fra er enormt kompletst, og endnu ikke definitivt beskrevet gennem fysikken (Cartlidge, 2015), det vides dog at spinnet for elektroner, protoner og neutroner er givet ved  $I = \frac{1}{2}$ .

For et givent system bestående af  $n$  dele der hver har et spin kan dets totale

spin,  $J$ , beskrives ved:

$$J = \left| \sum_{i=1}^n J_i \right|, \quad \left| \sum_{i=1}^n J_i \right| - 1, \quad \left| \sum_{i=1}^n -J_i \right|$$

Jf. dette er forskellige hydrogenisotopers spin givet ved:

- ${}^1\text{H}$ , indeholder en proton,  $J = \pm \frac{1}{2}$
- ${}^2\text{H}$  indeholder en proton og en neutron,  $J = \pm 1 \vee J = 0$

For større molekyler bliver dette umådeligt komplekst, og der er derfor opstilt generelle regler for hvad et molekyles spin vil være:

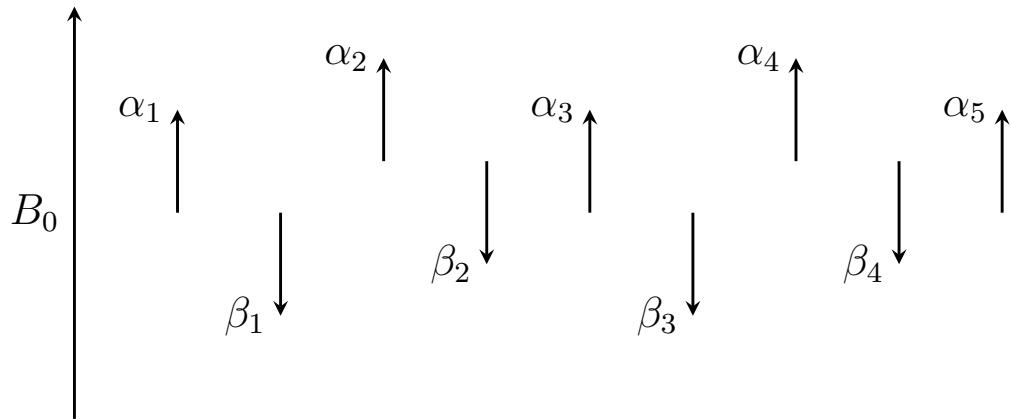
Tabel 3: Generelle regler for tilskrivning af molekylært spin.

| Massenummer | Antal protoner | Antal neutroner | Spin                | Eksempel          |
|-------------|----------------|-----------------|---------------------|-------------------|
| Lige        | Lige           | Lige            | 0                   | ${}^{16}\text{O}$ |
| Lige        | Ulige          | Ulige           | $ Z $               | ${}^2\text{H}$    |
| Ulige       | Ulige/lige     | Lige/ulige      | $ Z  + \frac{1}{2}$ | ${}^1\text{H}$    |

Da spin for atomkerner er analogt til vinkelmoment for makroskopiske objekter, må de kunnet beskrives som vektorere med en magnitude og retning. Dette betyder at deres enkelte magnetiske momenter præcesserer om  $z$ -aksen. Dog indeholder prøver altid en enorm mængde individuelle atomkerne, og det giver derfor mere mening at beskrive dem ved summen af deres magnetiske momenter, *bulk magnetiseringen*,  $M$ , der vil være en skalar af  $z$ -aksens enhedsvektor uden ydre påvirkning.

$$\vec{M} = \sum \vec{\mu} = c \cdot \hat{z}$$

Da vektorerne i det fri vil have vilkårlige retninger vil  $\vec{M} = 0$  uden ydre påvirkning. Hvis prøvematerialet derimod *ikke* er i det fri, men i stedet påvirket af et kraftigt ydre magnetfelt,  $B_0$ , vil atomkernernes individuelle gennemsnitlige magnetiske moment enten rette sig efter (lav energi,  $m = -\frac{1}{2}$ )– eller mod det (høj energi,  $m = \frac{1}{2}$ ).

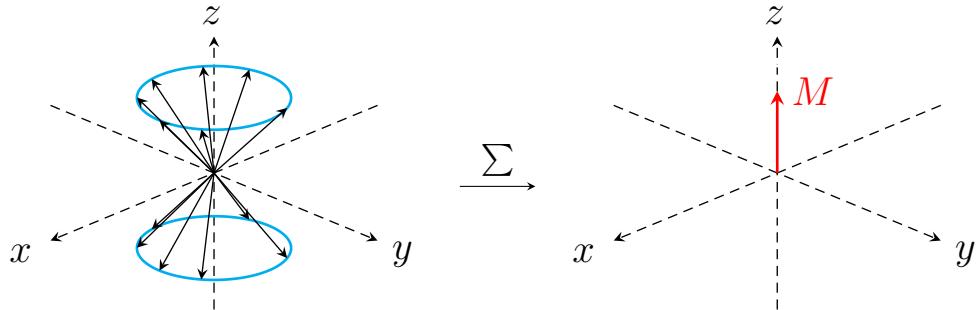


Figur 12: Molekylers magnetiske momenter rettet efter- eller mod magnetfeltet.

Da energidifferensen mellem de to niveauer er relativt lille, er populationsforskellen det også, da simple kollisioner mellem molekyler ofte vil være nok til at skubbe et molekyle op i et højere energistadie. Teoretisk kan populationsforskellen beskrives som en Boltzmann-fordeling givet ved:

$$\frac{n_{\text{høj}}}{n_{\text{lav}}} = e^{\frac{\Delta E}{kT}}$$

som medfører at  $M \neq 0$ , da der vil være en populationsforskel med bias mod det lave energistadie, hvilket medfører at vi har en bulk magnetiseringsektor givet ved en positiv skalar af en enhedsvektor langs  $z$ -aksen.



Figur 13: Omdannelse fra magnetiske momenter til bulk magnetisering ved summation. Antal molekyler i højt- og lavt energistadie repræsenterer ikke virkeligheden.

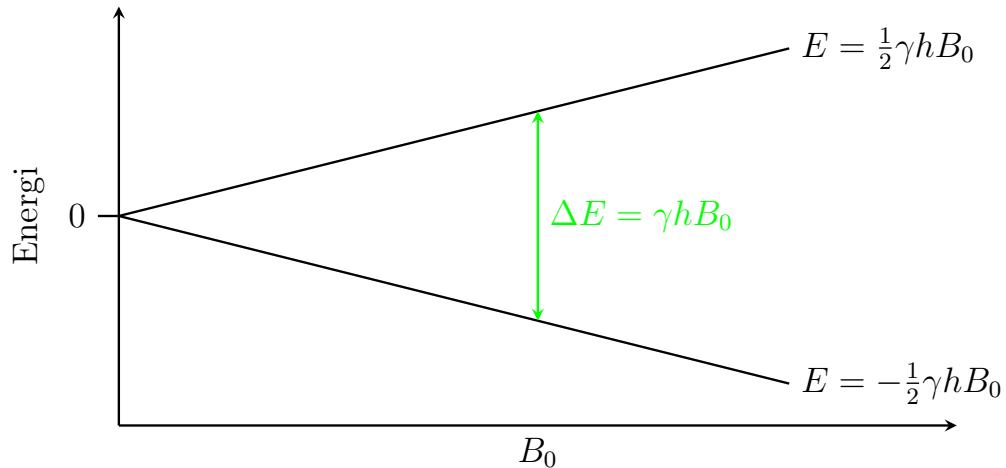
Molekylet der undersøges vil have en række mulige energiniveauer givet ved:

$$n_{\text{energistadier}} = 2I + 1$$

Dette er hvad der gør analyse af molekyler med  $I = \frac{1}{2}$  (eksempelvis  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) specielt fordelagtigt, da det skaber et simpelt tilfælde med 2 mulige energiestadier. Stadiernes energi, samt differensen mellem dem kan i det tilfælde beskrives ved:

$$E_{\text{lav}} = -\frac{1}{2}h\gamma B_0 \quad \Delta E = h\gamma B_0 \quad E_{\text{høj}} = \frac{1}{2}h\gamma B_0$$

Hvor  $h$  er Plancks konstant. Det er denne energidifferens der muliggør analysen af molekylerne, da vi ved at udsætte dem for elektromagnetisk stråling med energi svarende til energidifferensen kan forårsage et *spin flip*. Dvs. en overgang fra det lave energistadie til det høje, hvilket ændrer på bulk magnetiseringsvektoren.



Figur 14: Stigning i energidifferens som funktion af magnetfeltets styrke.

Jf. Einstein-Planck relationen ved vi at energien af en foton er givet ved:

$$E = hf$$

og da denne skal være lig energidifferens må:

$$\Delta E = hf \Leftrightarrow h\gamma B_0 = hf \Leftrightarrow \omega = \gamma B_0$$

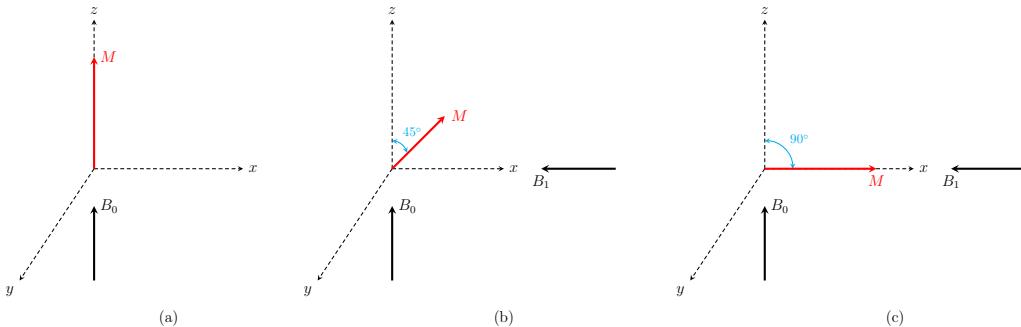
Denne frekvens kaldes *Larmor frekvensen*, noteret ved  $\omega$ , og angiver hypotetiskeren af bulk magnetiseringens præcession (Kaseman & Iyer, 2023; Kaseman m.fl., 2023).

Det er præcis denne præcession der kan måles under analyse, da præcessionen af de ladede atomkerner inducerer en strøm, der kan måles i en spole viklet omkring prøvebeholderen. For at forårsage denne præcession indsættes radiofrekvente bølger, hvis frekvens er omkring  $\omega$ , i prøven således at  $B_1 \perp B_0$ .

Dette medfører at vores bulk magnetiseringsvektor “tipper” ud af ækvilibrium, ved at ændre atomernes spin og derved vende deres enkelte magnetiske momenter. Afhængigt af hvor længe prøven udsættes for dette ydre magnetfelt for, desto mere tipper magnetiseringsvektoren, vinklen er givet ved:

$$\theta = \frac{\gamma B_1 \tau \cdot 180}{\pi}$$

Hvor  $\tau$  er tiden prøven udsættes for  $B_1$  og  $\gamma$  er det gyromagnetiske forhold.



Figur 15: (a) Magnetiseringsvektoren i afslappet position, ingen ydre påvirkning. (b) Magnetiseringsvektoren bøjet  $45^\circ$  grundet ydre påvirkning fra  $B_1$ . (c) Magnetiseringsvektoren bøjet  $90^\circ$  grundet ydre påvirkning fra  $B_1$ .

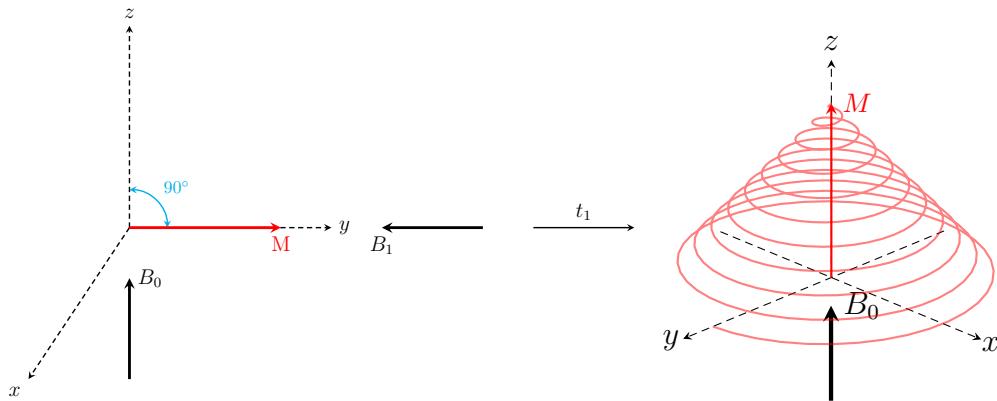
Når den kortvarige puls ophører () vil den begynde at præcessere omkring  $B_0$ . I denne forbindelse defineres 2 tidsintervaller:

- $t_1$ : *Spin-lattice relaxation time*, tiden det tager for bulk magnetiseringsvektoren at bevæge sig tilbage til startpositionen.
- $t_2$ : *Spin-spin relaxation time*, tiden det tager for  $xy$ -komponenterne af bulkmagnetiseringsvektoren igen at blive 0.

Generelt vil  $t_1 \geq t_2$ , dette er dog ikke en regel, og nedenstående vil derfor ikke altid være sandt, da spin-lattice relaxation tiden ikke altid vil være den begrænsende faktor.

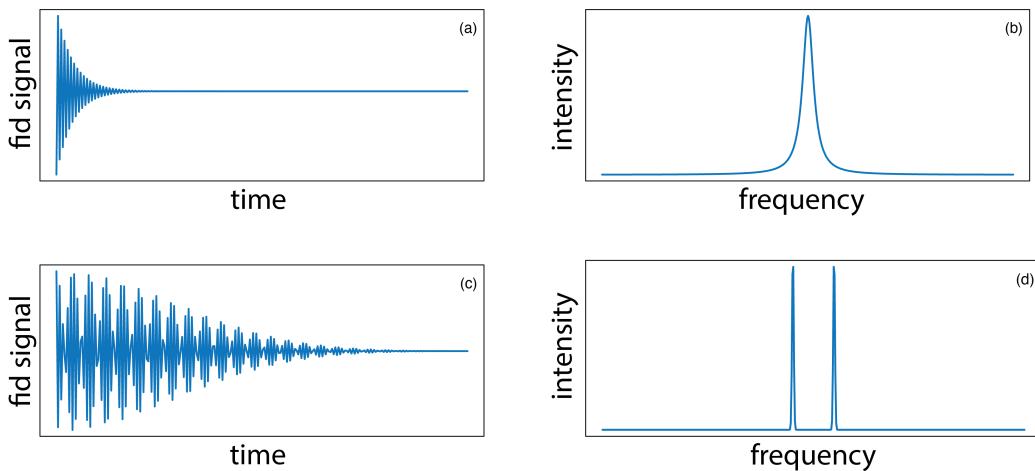
$$\vec{M} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ z \end{bmatrix} \xrightarrow{B_1} \vec{M} = \begin{bmatrix} x \\ y \\ 0 \end{bmatrix} \xrightarrow{t_1} \vec{M} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ z \end{bmatrix}$$

I takt med at magnetiseringsvektoren stabiliserer sig selv ved at præcessere, induceres en strøm grundet den spirallignende bevægelse i  $xy$ -planen, da det svarer til en ladning der bevæger sig.



Figur 16: Illustration af afslappelse fra exciteret tilstand ved præcession.

Grafen der dannes med udgangspunkt i den inducerede strøm kaldes *FID* (free induction decay), og giver os et eksponentielt faldende oscillerende signal, der ved Fourier transformation kan flyttes fra tidsdomænet, til frekvensdomænet (Harvey, 2022).



Figur 17: Eksempler på omdannelser fra FID-grafer til NMR-spektra.

Hvor det vil være muligt at separere forskellige kemisk ækvivalente grupperinger af protoner, da deres Larmor frekvenser (og derved kemisk skift) vil være forskellige grundet gensidig beskyttelse fra det lokale elektronmiljø.

### 2.5.2 Kemisk skift

Toppene der ses i et H-NMR-spektrum må altså afhænge af Larmor-frekvensen for en given del af molekylet som der er bundet protoner til. Dette angives i kemisk skift,  $\delta$ , som er en værdi der opnås ved at samligne Larmor-frekvensen for delen af molekylet med en standard defineret af IUPAC, nemlig at  $\delta_{\text{tetramethylsilan}} = 0 \text{ ppm}$  (Harris m.fl., 2009), hvilket muliggør beregning af kemisk skift ved:

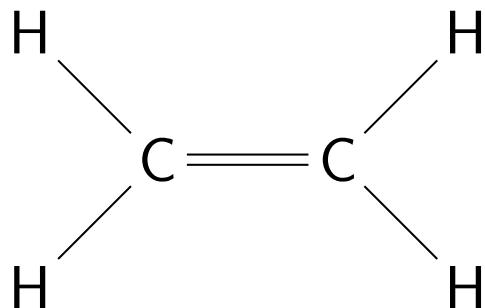
$$\delta = \frac{\omega_{\text{prøve}} - \omega_{\text{TMS}}}{\omega_{\text{TMS}}}$$

Hvis enhed er *ppm* (parts-per-million) da  $\omega_{\text{TMS}}$  normalt angives i MHz og  $\omega_{\text{prøve}}$  i Hz. I nyere tid er det dog også blevet normalt at benytte opløsningsmidlets kemiske skift som en standard, og det noteres derfor altid med spektret.

Umiddelbart lader det dog til at dette ville medføre at alle protonerne ville have ækvivalente kemiske skift, dette er dog ikke tilfældet, da de alle påvirkes af det ydre magnetiske felt forskelligt, grundet beskyttelse mod fra elektronerne der befinner sig omkring protonerne. Eftersom elektroner per defi-

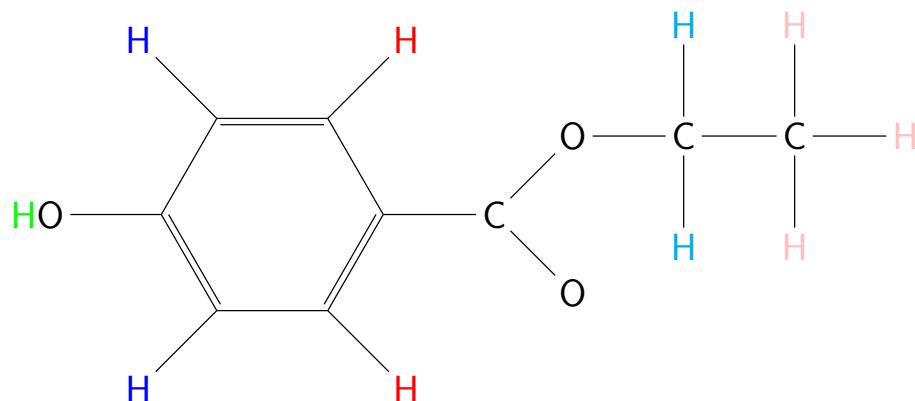
nition har et spin  $I = \frac{1}{2}$ , danner de nemlig deres eget mindre magnetfelt som er modsatrettet det ydre, og derved skaber interferens.

For at identificere protoner der vil have forskellige grader af beskyttelse grundet deres lokale elektrondensitet undersøges de *kemiske miljøer* der er tilstede i molekylet, dvs: "hvilke protoner vil have den samme mængde beskyttelse mod det ydre magnetfelt"? Dette afhænger af molekylets symmetri. Et simpelt eksempel herpå et alkener:



Figur 18: Ethenmolekyle.

De 4 protoner i dette molekyle er kemisk ækvivalente, og de vil derfor have den samme Larmorfrekvens. Jf. symmetrien begrundes det i at molekylet i sig selv er fuldstændigt symmetrisk, samtidigt er det også klart at hver proton er bundet til et dobbeltbundet carbon. I større, mere komplekse molekyler kan de blive sværere at identificere kemisk ækvivalens. Se eksempelvis ethylparaben:



Figur 19: Ethylparaben med markerede kemisk ækvivalente protoner.

Her er der 5 adskilte kemiske miljøer i molekylet. Åbenlyst nok har protoner bundet på det samme carbon kemisk ækvivalens, forskellen i de kemiske miljøer for carbon–atomerne i alkylkæden begrundes hovedsageligt i afstanden til oxygen–atomet, grundet dets større elektronegativitet og derved indvirkning på elektrondensiteten omkring de nærliggende molekyler.

I benzenringen er der to forskellige kemiske miljøer grundet dens symmetri, samt påvirkning fra oxygen–atomet på hydroxy–gruppen. Samtidigt er det også klart at protonen vedhæftet oxygen–atomet må påvirkes meget kraftigt af oxygen–atoms elektronegativitet.

Naboprotoner har også mulighed for at skabe elektromagnetisk interfereres. Dette begrundes i at protonerne til enhver tid kan befinde sig i både det positive– og negative spinstadie, hvorved de enten vil forstærke eller udligne det dannede magnetfelt.

En generel regel kan derfor opstilles om at mængden af spidser der korresponderer til et givent kemisk miljø vil være givet ved  $n + 1$  hvor  $n$  er antallet af naboprotoner. For ethylparaben vil det sige at protonen på hydroxy–gruppen vil have en enkelt spids, mens protonerne på methyl–gruppen vil have 3 (Nanalysis, 2020).

Dog er dette ikke altid tilfældet da der er mulighed for kompleks kobling mellem protoner på atomer, der ikke er lige ved siden af hinanden. Dette er specielt relevant når det kommer til aromatiske ringe.

### 2.5.3 IR–spektroskopi

Infrarød spektroskopi er en mindre selektiv spektroskopisk metode end H–NMR. Dog giver det stadig mulighed for identifikation af visse aspekter af et givent molekyle, hovedsageligt i form af funktionelle grupper.

Ligesom i NMR–spektroskopi er det nødvendigt for molekylet man ønsker at undersøge at have et magnetisk moment. Dvs. at undersøgelse af symmetriske ( $H_2$ ,  $N_2$ ,  $O_2$ , osv.)– samt monoatomige molekyler *ikke* er muligt, da deres magnetiske momenter enten vil udligne hinanden eller ikke eksistere.

Under IR–spektroskopi bestråles en prøve med infrarøde bølger. Hvis de præcis matcher enegidifferensen mellem molekylets grundstadie og excitedede stadie, sker der et spring i energiestadie:

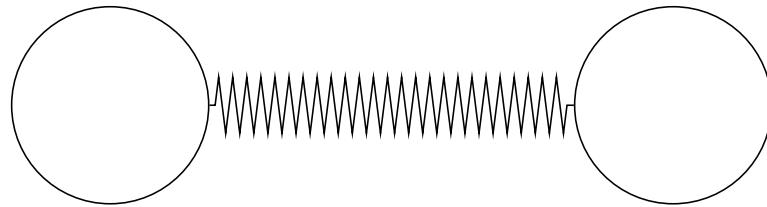
$$\Delta E_{1 \rightarrow 2}$$

Hvilket får dem til at vibrere. Disse vibrationer manifesteres som en gentagen bevægelse af det kovalente bånd mellem atomerne, hvilket ligesom i NMR medfører en ændring i molekylets magnetiske moment der kan måles. Afhængigt af molekylstrukturen er der dog flere forskellige muligheder for vibrationer:

Tabel 4: Mulige strækninger for molekyler af forskellige strukture.

|            | Symmetrisk |           | Asymmetrisk |           |
|------------|------------|-----------|-------------|-----------|
|            | Bøjning    | Strækning | Bøjning     | Strækning |
| Monoatomig | ✗          | ✗         | ✗           | ✗         |
| Diatomig   | ✗          | ✓         | ✗           | ✗         |
| Triatomig  | ✓          | ✓         | ✓           | ✓         |
| Polyatomig | ✓          | ✓         | ✓           | ✓         |

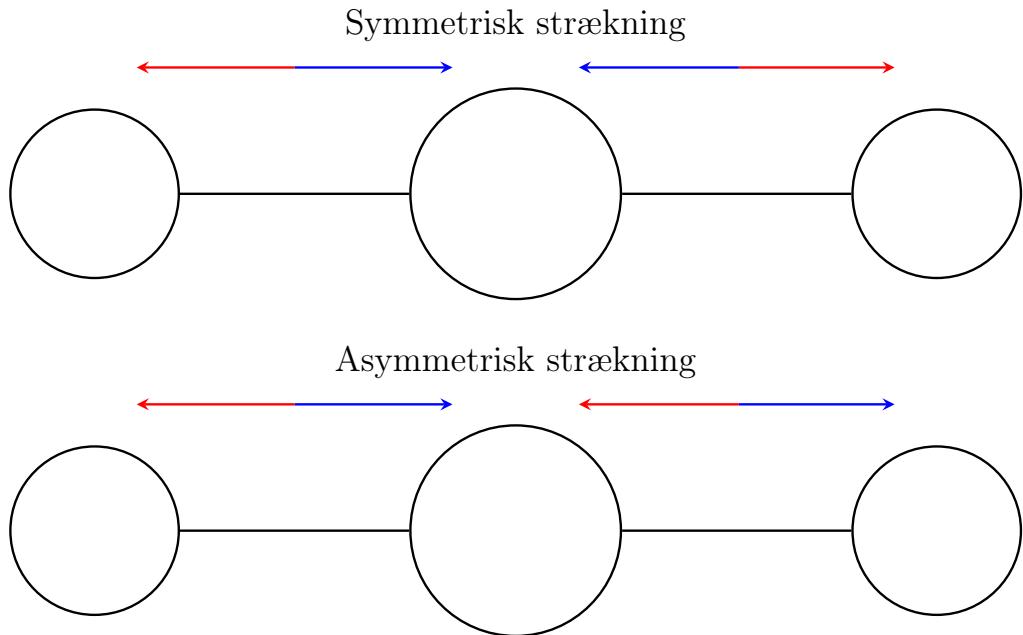
I tilfældet med diatomige molekyler det simpelt at illustrere den mulige vibration da det kovalente bånd mellem dem udelukkende kan strækkes eller komprimeres, hvilket medfører en fjeder-lignende vibration.



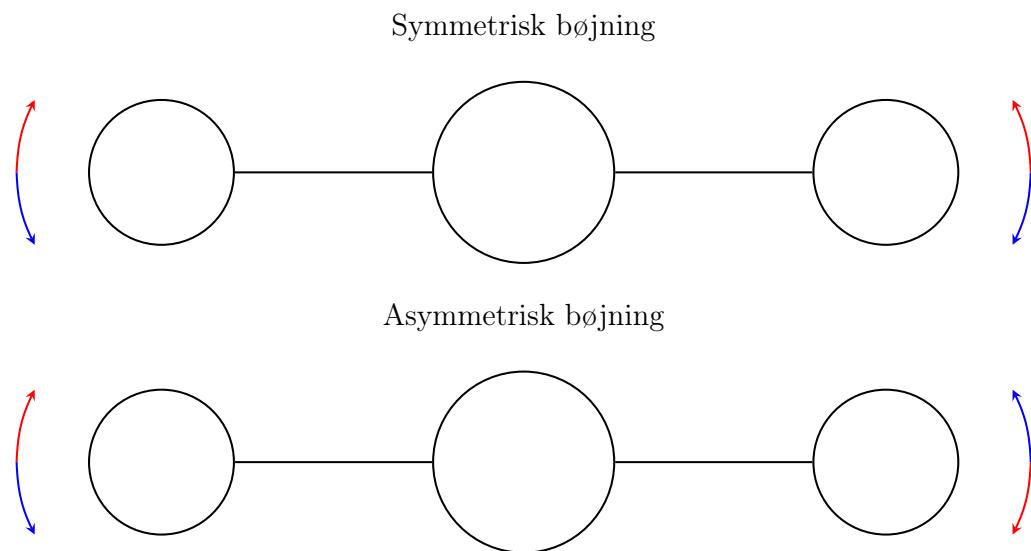
Figur 20: Kovalent bånd i diatomigt molekyle illustreret som fjeder.

For polyatomige molekyler bliver vibrationsmulighederne mere komplekse. Med udgangspunkt i triatomige molekyler kan mulighederne for de enkelte bånd dog illustres.

I takt med at flere atomer tilføjes kan vibrationerne dog kombineres på forskellige måder, samt påvirke hinanden, hvilket medfører en uendelig mængde mulige vibrationer.



Figur 21: Symmetrisk– og asymmetrisk strækning af kovalente bånd i triatomigt molekyle.



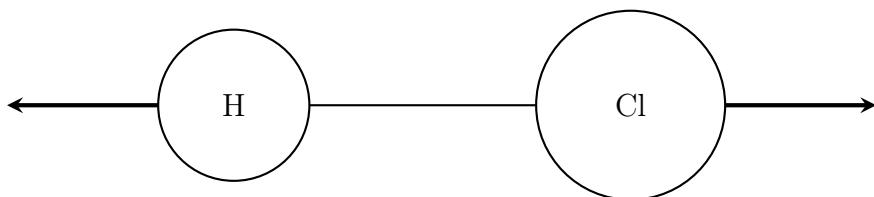
Figur 22: Symmetrisk– og asymmetrisk bøjning af kovalente bånd i triatomigt molekyle.

Bøjninger kan ske både i eget plan og vinkelret derpå hvis molekylet er lineært (eksempelvis  $\text{CO}_2$ ). Dvs. at nogle molekyler ikke udelukkende har mulighed for at bøje fra side til side, men også frem og tilbage. Disse vibrationer har dog ikke forskellige associerede energiniveauer, og de kan derfor være svære at identificere. Derudover bevæger det centrale molekyle sig også, da molekylets massemidtpunkt *ikke* kan forskydes af vibrationerne.

Mængden af mulige vibrationer er afhængigt af hvor mange frihedsgrader molekylet har. Idet atomer bevæger sig i et 3-dimensionelt rum, må hvert atom have 3 frihedsgrader, altså vil et molekyle have  $3n$  frihedsgrader, hvor  $n$  er mængden af atomer i molekylet.

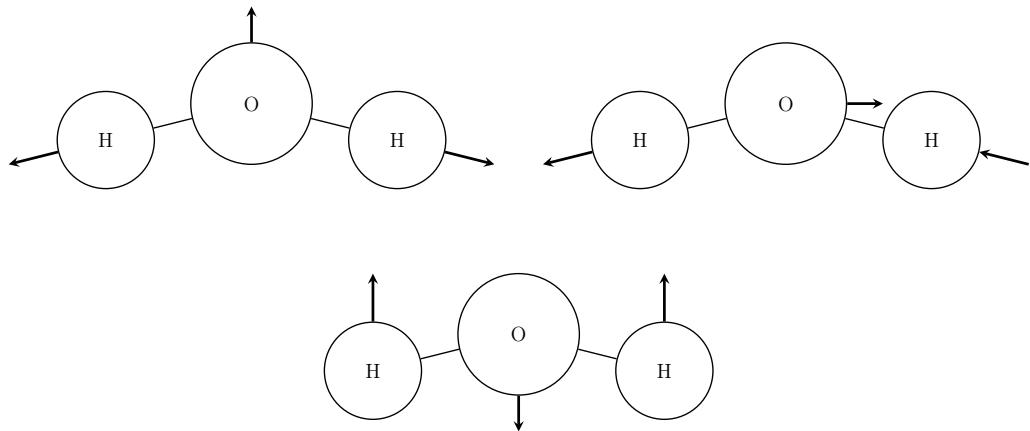
For udelukkende at undersøge de intermolekylære vibrationer fratrækkes de translatoriske- og rotoriske frihedsgrader, og vi får derfor at det for ikke-lineære molekyler må være  $3n - 6$  frihedsgrader, og for lineære molekyler  $3n - 5$ .

Kigger vi eksempelvis på et diatomigt molekyle som  $\text{HCl}$  bliver det har klart at molekylet er lineært, samt at  $n = 2$ . Der må altså være  $3 \cdot 2 - 5 = 1$  mulig vibration, hvilket stemmer, da den eneste mulige vibration er den fjederlignende bevægelse i det kovalente bånd.



Figur 23: Frihedsgrader for lineært diatomigt molekyle.

For et ikke-lineært triatomigt molekyle, eksempelvis  $\text{H}_2\text{O}$ , vil vi i stedet hve  $3 \cdot 3 - 6 = 3$  frihedsgrader, der korresponderer til hhv. den symmetriske- og asymmetriske strækning af de kovalente bånd, samt bøjning af bindingen til hydrogenatomerne (Theophanides, 2012).

Figur 24: Frihedsgrader for  $\text{H}_2\text{O}$  molekyle.

Indenfor IR-spektroskopi indføres et nyt mål for bølgelængden, *bølgenummeret*, givet ved:

$$\nu = \lambda^{-1}$$

Med udgangspunkt i disse opdeles IR-området i 3 forskellige “zoner” (Khan m.fl., 2018):

- 1) NIR,  $\nu \in [14000 - 4000\text{cm}^{-1}]$
- 2) MIR,  $\nu \in [4000 - 400\text{cm}^{-1}]$
- 3) FIR,  $\nu \in [400 - 40\text{cm}^{-1}]$

Til overordnet analyse benyttes ofte blot MIR-intervallet, da det er her man vil kunnet identificere de fleste funktionelle grupper og typer af bindinger, mens at FIR er langt mere komplekst og indeholder en stor mængde af vibrationer, hvilket gør det svært at type på. NIR korresponderer oftest til kombinationsvibrationer, eller “molekylære overtoner”, spring i flere energistadier af gangen (eksempelvis  $\Delta E_{1 \rightarrow 3}$ ), hvilket igen gør det enormt svært at tyde dem.

Tabel 5: Bølgernummerintervaller for nogle karakteristiske funktionelle grupper (Socrates, 2004).

|                | N—H / O—H | C—H       | C≡N / C≡C | C=O       |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Zone [ $\nu$ ] | 3200–4000 | 2800–3310 | 2000–2500 | 1550–1870 |

## 3 Metoder

### 3.1 Syntese

Med udgangspunkt i den fundne syntesevejledning (Nielsen & Axelsen, 2019) udføres syntesen for ethyl- og propylparaben grundet deres respektive alkoholers lavere farlighed end methanol.

Af samme grund benyttes ethanol som opløsningsmiddel under oprensningen, idet der herved helt undgås eksponering for methanol hvilket drastisk minimerer eksponeringen for farlige kemikalier under syntesen.

Det vælges at producere 2 parabener for at muliggøre samling af deres respektive H-NMR- og IR-spektre, og begrunde hvorfor disse er opstået, samt at benytte dem i forbindelse med kvalitativ analyse til at vurdere det dannede produkts renhed.

Derudover giver det også mening jf. et eventuelt hæmningsforsøg at fravælge methylparaben da den generelt ses som havende en lavere effektivitet grundet dens ringere evne til at reagere med mikroorganismernes cellemembraner pga. større polaritet.

Et flowdiagram for syntesen udarbejdes for at give overblik over syntesen, samt for at give bedre overblik gennem processen. Flowdiagrammet kan ses under bilag.

Ca. 5g 4-hydroxybenzoësyre afvejes i rundbundet kolbe med slib:



Figur 25: Afvejning af 4-hydroxybenzoesyre.

Da syntesen sker med et overskud af alkohol vil der ideelt ske en fuldstændig reaktion. På baggrund heraf bestemmes det teoretiske udbytte ved at sætte dets stofmængde lig stofmængden af 4-hydroxybenzoesyre:

$$n_{\text{4-hydroxybenzoesyre}} = \frac{5.1338 \text{ g}}{138.12 \text{ g/mol}} = 0.037169 \text{ mol} = n_{\text{ethylparaben}}$$

Den teoretiske stofmængde af dannet ethylparaben omregnes nu til en masse hvorved det fås at:

$$m_{\text{ethylparaben}} = 0.037169 \text{ mol} \cdot 166.17 \text{ g/mol} = 6.1745 \text{ g}$$

Et regneark udarbejdes til bestemmelsen af det teoretiske udbytte gennem de resterende synteser, en version med værdierne for denne syntese kan ses i bilag 2.

Der afmåles nu 30mL ethanol i måleglas, hvorefter det overføres til den rundbundede kolbe. Kolben rystes til 4-hydroxybenzoesyren er fuldstændigt opløst, hvorefter 2.5mL svovlsyre tilsættes dråbevist under konstant forsiktig omrystning.

Opløsningen placeres i en varmekappe og forsynes med et svalerør for at koge med reflux i ca. 1 time for at forhindre fordampningen af alkoholen.

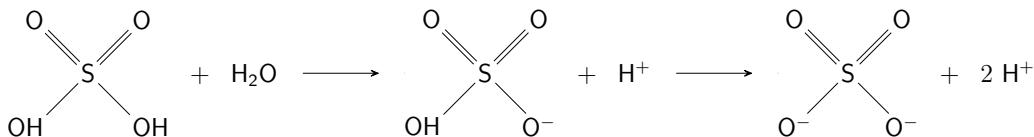


Figur 26: Forsøgsopstilling til syntesen.

Efter timen er gået slukkes varmekappen, hvorefter opløsningen nedkøles indtil det ikke længere er kogende og overføres til et 250mL bægerglas med 75mL demineraliseret vand. Bægerglasset placeres nu på en kogeplade og tilsættes en magnetomrører, hvorefter der sørges for moderat omrøring. Blandingen bestående af 10% natriumcarbonat tilsættes nu opløsningen indtil udviklingen af gas stopper, hvorved svovlsyren vil være neutraliseret.

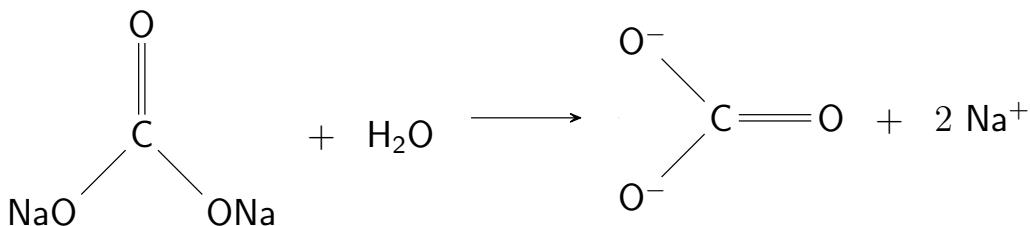
Idet det ikke indgår i forsøgsvejledningen, udregnes mængden af natriumcarbonat der vil være nødvendig for at neutralisere svovlsyren, dog vil der under processen gøres brug af natriumcarbonat i overskud da det ingen negativ virkning vil have, eftersom temperaturen vil være for lav til at forsæbning af parabenen vil kunnet ske.

Da svovlsyre har mulighed for at afgive 2 hydroner hvorved det reduceres til dets syrerest-ion,  $\text{SO}_4^{2-}$ , må den tilsatte base kunnet optage 2 hydroner for at neutralisere 1 svovlsyremolekyle:



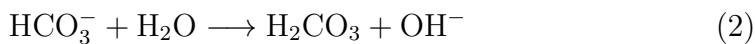
Figur 27: Dissociering af svovlsyre ved tilsættelse til vand.

Samtidig er det klart at natriumcarbonat har mulighed for at optage 2 hydroner da det ved tilsættelse til vand øjeblikkeligt dissocierer til natrium- og carbonat-ioner, der herefter reagerer videre for at danne natriumhydroxid.

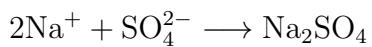
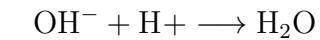


Figur 28: Dissociering af natriumcarbonat ved tilsættelse til vand.

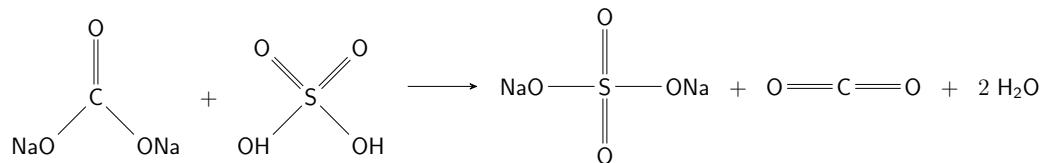
Carbonat-ionen har mulighed for at reagere med vand hvorved der dannes bicarbonat og en hydroxid-ion, bicarbonat-ionen reagerer videre med vand for at danne ustabil kultsyre og endnu en hydroxidion, hvorefter den ustabile kultsyre brydes hvilket medfører dannelsen af carbondioxid og vand.



De dannede hydroxidioner har nu mulighed for at reagere med hydronerne dannet af svovlsyren, mens natriumionerne har mulighed for at reagere med sulfationerne.



Dette muliggør opskrivning som en totalreaktion ved:



Figur 29: Totalreaktion mellem svovlsyre og natriumcarbonat i vandig opløsning.

Da det nu er klart at reaktionen mellem svovlsyre og natriumcarbonat foregår i forholdet 1:1 og at der under syntesen benyttes 2.5mL svovlsyre med en densitet på 1.84g/mL må det være nødvendigt at bruge:

$$n_{\text{svovlsyre}} = \frac{2.5\text{mL} \cdot 1.84\text{g/mL}}{98.08\text{g/mol}} = 0.04690\text{mol}$$

natriumcarbonat til at neutralisere svovlsyren. Stofmængden omregnes til en masse af natriumcarbonat, her er det vigtigt at pointere at der benyttes natriumcarbonatdecahydrat under fremstillingen af opløsningen, grundet dets effekt på molvægten.

$$m_{\text{natriumcarbonat}} = 0.04690\text{mol} \cdot 286.14\text{g/mol} = 13.4200\text{g}$$

Da det ikke skaber et problem at tilsætte natriumcarbonat i overskud laves opløsning ved brug af 15g natriumcarbonatdecahydrat og 150mL vand. En 10% opløsning benyttes for at reducere voldsomheden af reaktionen mellem den stærke syre og base, samt for at modvirke dens store eksotermicitet.

Den neutraliserede opløsning sugefiltreres og skylles 3 gange med demineralisert vand efter afkøling. Det isolerede krystallinske stof overføres til et 250mL bægerglas. Samtidigt opvarmes 50mL hhv. ethanol og vand til opvarmning i hvert deres bægerglas. Når ethanolen koger opløses det krystallinske stof i så lidt som muligt hvorefter varmt vand tilsættes til opløsningen bliver uklar.

Opløsningen stilles nu til frivillig nedkøling, hvorved parabenen igen udfældes og kan isoleres ved sugefiltrering i afvejet glasfilterdigel. Det dannede produkt stilles til tørring i glasfilterdiglen benyttet til filtreringen.

### 3.2 Smeltepunktsbestemmelse

Smeltepunktsbestemmelsen udføres først med udgangspunkt i et kommersielt indkøbt produkt for at have et teoretisk smeltepunkt hvilket gør det muligt at på forhånd undgå systematiske afvigelser. En smule af de kommersielt købte produkter stampes op i et lukket kapillærrør, hvorefter det “droppes” gentagne gange for at komprimere produktet. Det placeres nu i smeltepunktsbestemmesapparaget, som varmes op til en temperatur 10°C lavere end det forventede smeltepunkt, hvorefter vi langsomt varmer op indtil produktet smelter.

Figur 30: Teoretisk smeltepunkt for ethyl- og propylparaben.

| Prøve      | Smeltepunkt [°C] |               |
|------------|------------------|---------------|
|            | Ethylparaben     | Propylparaben |
| 1          | 117              | 97            |
| 2          | 115              | 94            |
| 3          | 117              | 95            |
| Gennemsnit | 116.3            | 95.3          |

Disse værdier benyttes fremadrettet som gældende tabelværdier. Prøven udføres nu på samme måde med produkterne fremstillet ved syntese for at muliggøre sammenligning af deres smeltepunkt.

### 3.3 TLC-analyse

Produkt dannet ved syntese samt dets kommersielle modstykke opløses i ethanol for at muliggøre påsætning på TLC-plade. Til dette formål benyttes en løbevæske bestående af 80% heptan og 20% ethylacetat (polaritetsindeks hhv. 0.0 og 4.4 (Phenomenex, u.d.)), da andre lod til at have success med dette forhold.

En streg tegnes ca. 1cm over TLC-pladens bund, og prøvemateriale påsættes pladerne med en åbent kapillærrør, hvorefter de placeres i et bægerglas med et lille lag løbevæske i bunden, og dækkes med et urglas.

Når løbevæskefronten når ca. 1cm fra toppen af TLC-pladen udtages de, og

lægges til tørring til løbevæsken er fordampet, hvorefter de bestråles med UV–lys og stofplaceringerne markeres.

### 3.4 NMR–spektroskopi

Prøven sendes til Aarhus Universitet som udfører analysen.

### 3.5 IR–spektroskopi

Prøven sendes til Aarhus Universitet som udfører analysen.

## 3.6 Hæmningsforsøg

Et hæmningsforsøg udføres også for at undersøge parabenernes hæmmende vækst på forskellige bakterier. Med udgangspunkt i litteraturen er det klart at parabener er mere effektive mod Gram–positive end Gram–negative bakterier (Lincho m.fl., 2021), grundet den øgede beskyttelse fra den ydre polypeptide cellemembran.

Derudover har tidligere studier undersøgt de effektive koncentrationer for væksthæmning ved de forskellige parabener for bakteriearterne (Barabasz m.fl., 2019). Grundet dette undersøges 2 forskellige bakterier, *bacillus cereus* og *escherichia coli*, for at muliggøre undersøgelse af både et gram–positivt og gram–negativt bakterie:

Tabel 6: Karakteristika, MIC og navn på udvalgte baktierier.

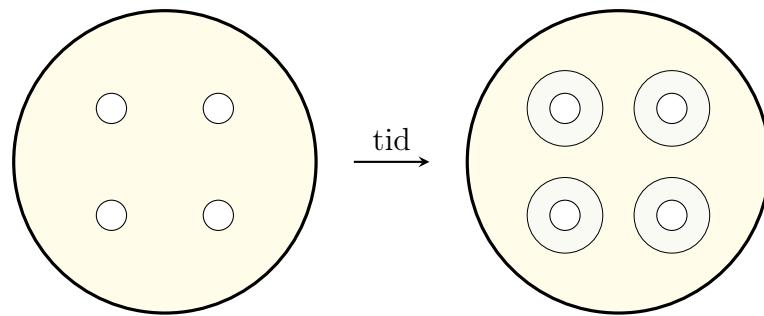
| Bakterieart             | Cellevægsstruktur | MIC [W/W%]   |               |
|-------------------------|-------------------|--------------|---------------|
|                         |                   | Ethyłparaben | Propylparaben |
| <i>bacillus cereus</i>  | Gram–positiv      | 0.1          | 0.0125        |
| <i>escherichia coli</i> | Gram–negativ      | 0.1–0.125    | 0.05–0.1      |

### 3.6.1 Agar–diffusion

I laboratorier benyttes agar–diffusion til at afprøve og sammenligne forskellige antibiotikas effekt på en isoleret bakteriekultur. Dette gøres ved at oplose antibiotikaet i et passende opløsningsmiddel som papirdiske derefter vædes i,

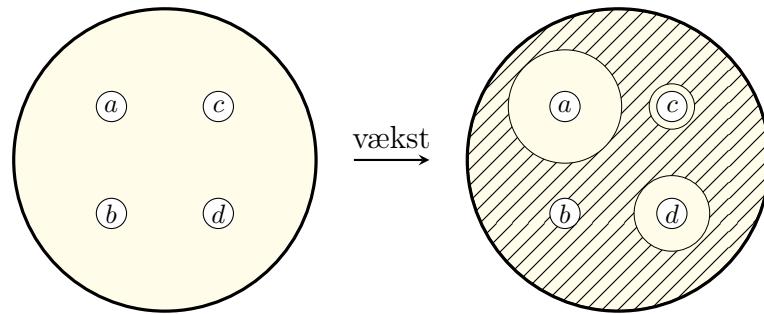
hvorefter de stilles til tørring. Disse spredes over en Muller–Hinton–agarplade podet med bakteriearten man ønsker at undersøge, og stilles så til inkubering.

Antibiotikaet der befinner sig i papirdisken vil *diffundere*, dvs. vandre fra papirdisken og ud i agaren, hvilket medfører ad der vil være en radius omkring diskens hvor der ingen vækst er (hvis det antibakterielle middel er effektivt).



Figur 31: Diffusion af stof indeholdt i papirdiske.

Den vækstfrie radius vil afhænge af antibiotikaens effektivitet, da koncentrationen vil falde i takt med at stoffet diffunderer længere og længere ud. Med udgangspunkt heri kan et kvalitativt gæt på den minimum inhibitoriske koncentration opstilles.



Figur 32: Illustration af hæmningsradius. MIC:  $b > c > d > a$ .

Det samme princip benyttes her med parabenerne. En mættet parabenopløsning bestående af ethanol og paraben fremstilles hvorefter de sterile papirdiske vædes deri, de stilles herefter til tørring for at minimere ethanolens egen bakteriehæmmende virkning.

Papirdiskene placeres på en poddet Mueller–Hinton–agarplade, hvorefter de let præsses ned på agarpladen med en flamme–steriliseret pincet for at sikre overfladekontakt. Pladerne stilles herefter til inkubering natten over, hvorefter radius af de hæmmende zoner måles.

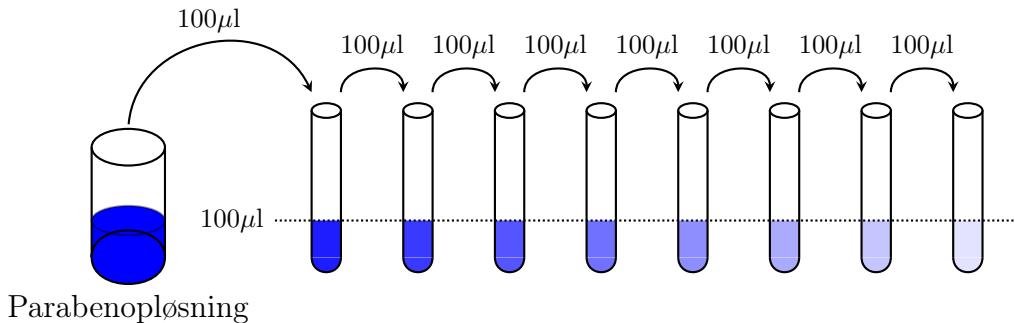


Figur 33: Poddet Muller–Hinton–agarplade med parabenvæddede papirdiske.

### 3.6.2 Fortyndingsrække

Modsat agar–diffusion benyttes fortyndingsrækker til at bestemme definitive værdier (eller værdi–intervaller) af den minimale inhibitoriske koncentration for forskellige antibakterielle midler (antibiotika, konserveringsmidler, osv.).

Dette gøres ved at opstille en fortyndingsrække i et bakteriefyldt medie med det antibakterielle stof man ønsker at undersøge. Ved at have forskellige koncentrationer af stoffet, og herefter følge udviklingen i OD<sub>600</sub> over tid, kan man undersøge hvordan de forskellige koncentrationer påvirker bakterievæksten.



Figur 34: Fortynding ved gentagen overførsel fra brønd til brønd.

Fortynding som illustreret ovenfor medfører en halvering af koncentrationen fra brønd til brønd, beskrevet ved rekursionsligningen:

$$c_n = c_{\text{opløsning}} \cdot 0.5^n, n \in \{1, 2, 3, \dots, n\}$$

Vi opstiller nu en fortyndingsrække hvor den 7. brønd svarer til den højeste teoretiske MIC:

$$1.25\text{mg/mL} = c_{\text{opløsning}} \cdot 0.5^7 \Leftrightarrow c_{\text{opløsning}} = \frac{1.25\text{mg/mL}}{0.5^7} = 160\text{mg/mL}$$

Da det er nødvendigt at vente på at ethanolen fordamper, ønsker vi at nå den nødvendige koncentration med så lille en mængde ethanol som muligt. En mættet opløsning af ethylparaben i ethanol indeholder 550mg/mL, dvs. at det må være nødvendigt at overføre:

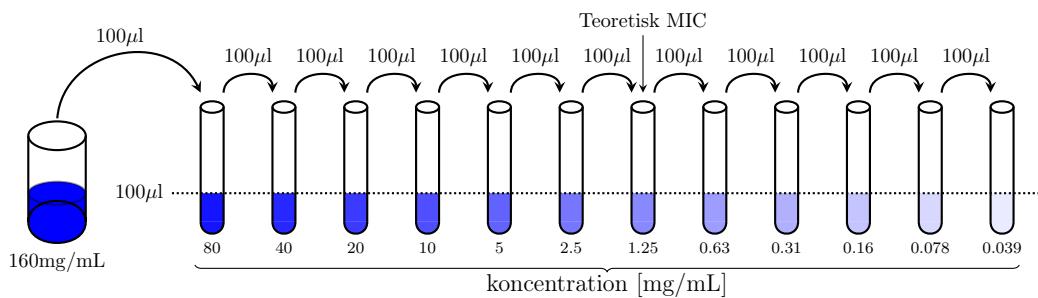
$$160\text{mg} = 550\text{mg/mL} \cdot V_{\text{ethanol}} \Leftrightarrow V_{\text{ethanol}} = \frac{160\text{mg}}{550\text{mg/mL}} = 290\mu\text{L}$$

Da vi arbejder med en brøndvolumen på 100μL benytter vi en 10. del af dette. En fortyndingsrække opstiles derfor ved at fylde brøndene med 29μL ren ethanol, hvorefter det fortyndes med den mættede opløsning.

De samme beregninger udføres for propylparaben hvorved vi har at:

$$160\text{mg} = 746\text{mg/mL} \cdot V_{\text{ethanol}} \Leftrightarrow V_{\text{ethanol}} = \frac{160\text{mg}}{746\text{mg/mL}} = 210\mu\text{L}$$

Altså benyttes 21μL under opstillingen af propylfortyndingsrækken, hvilket vil resultere i koncentrationer givet ved:

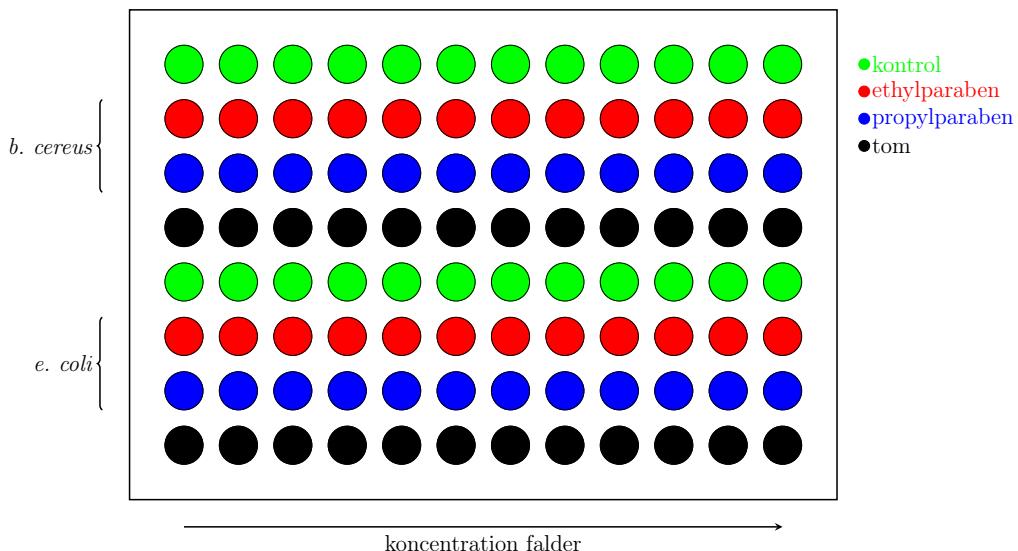


Figur 35: Koncentrationer i ELISA–brønde afrundet til 2 decimaler.

Efter ethanolen i brøndene er fordampet er vi efterladt med de korresponderende mængder af paraben. Måling af MIC ved svært opløselige produkter kan være svært, da det i praksis medfører at vi vil have et lag uopløst paraben liggende i bunden af brønden. For parabener gør dette sig også gældende ved teoretisk MIC, da den befinner sig over begge parabeners opløselighed i vand.

Dog er der nogle faktorer der medfører at opløseligheden ”stiger” i praksis. Bl.a. parabenernes evne til at reagere med de lipide bakteriecellemembraner, hvilket medfører en større opløselighed i mediet, samt at OD<sub>600</sub>–målingerne foregår ved højere temperatur (inkubationstemperatur, 30°C) end stuetemperatur.

100 $\mu$ L en–dags inkuberet LB–medie poddet med bakterierne vi ønsker at undersøge fortyndes til  $A_{600} \in [0.1; 0.2]$  og overføres til hver brønd. En skematisk illustration af opstillingen kan ses nedenfor:



Figur 36: Skematisk illustration af ELISA–opstilling.

Pladen placeres i ELISA–readeren hvorefter der udføres absorptionsmålinger ved 595nm (ca. OD600) hver 15. minut over 20 timer. Dette gør det muligt for os at følge bakterievæksten, og derved undersøge hvilken indvirkning parabenerne har derpå.

Med udgangspunkt heri bestemmes hhv. MIC90, MIC50 og MIC10, der svarer til parabenkoncentrationerne der medfører en vækstreduktion på 90%, 50% og 10%, hvilket herefter sammenlignes med teoretiske værdier fra opslag i litteraturen.

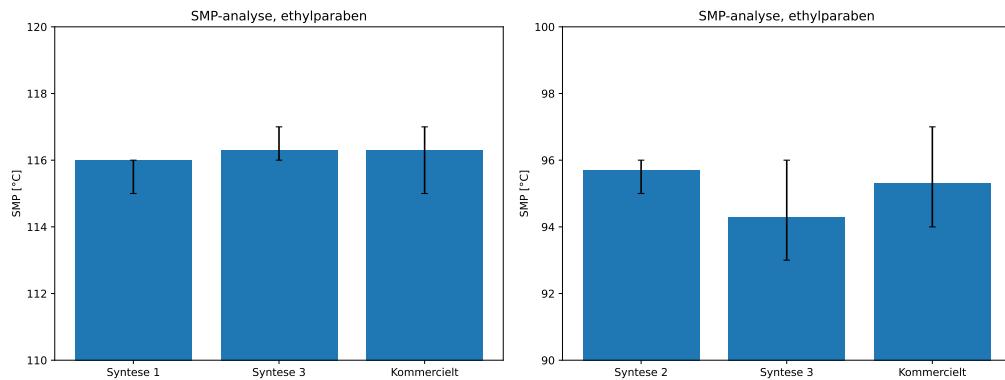
Umiddelbart har vi forventninger til nogle afgivende målinger i brøndene med højeste koncentrationer, da parabenen ikke kan holdes opløst og derfor vil ophobe sig på bunden af brøndene, hvilket vil gøre det nødvendigt at rydde op i de indsamlede data.

## 4 Resultater & diskussion

### 4.1 Smeltepunkt og TLC

Tabel 7: Smeltepunkt og RF (retentionsfaktor) for stof dannet ved de 3 synteser, samt sammenligning med teoretiske værdier for kommersiel stof.

| Prøve #       | Syntese 3 |      |           |      |       |      |        |      |
|---------------|-----------|------|-----------|------|-------|------|--------|------|
|               | Syntese 1 |      | Syntese 2 |      | Ethyl |      | Propyl |      |
|               | SMP       | RF   | SMP       | RF   | SMP   | RF   | SMP    | RF   |
| 1             | 116       | 0.24 | 95        | 0.63 | 116   | 0.50 | 96     | 0.49 |
| 2             | 115       | 0.20 | 96        | 0.67 | 116   | 0.49 | 93     | 0.45 |
| 3             | 116       | 0.21 | 96        | 0.59 | 117   | 0.49 | 94     | 0.45 |
| Teoretisk     | 116.3     | 0.22 | 95.3      | 0.63 | 116.3 | 0.49 | 95.3   | 0.46 |
| Gennemsnit    | 116       | 0.22 | 95.7      | 0.63 | 116.3 | 0.49 | 94.3   | 0.46 |
| Afvigelse [%] | -1        | 0    | -1        | 2    | -1    | 0    | -3     | 0    |



Figur 37: Praktiske smeltepunkter for egen og komemrciel ethyl- og propylparaben.

Med udgangspunkt i hhv. smeltepunkts- samt TLC-analysen vil det være rimeligt at antage at det dannede stof sandsynligvis er hvad vi tror det er. De relativt høje afvigelser for smeltepunktet hos propylparaben kan hov-

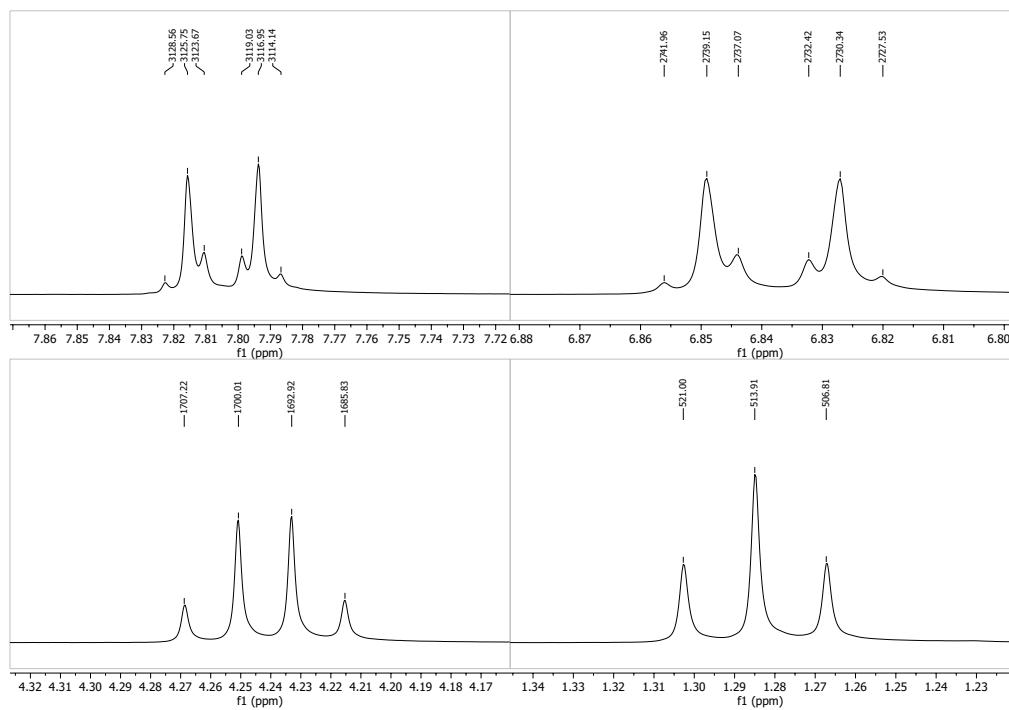
edsageligt tilskrives større partikelstørrelse, da pulveret var svært at knuse ordentligt hvilket medførte mindre tæt pakning.

Dog garanterer det ikke at produktet er hvad vi tror, da der altid er mulighed for at vi har dannet et biprodukt med lignende karakteristika og polaritet.

TLC-pladerne kan ses under bilag.

## 4.2 H–NMR–spektroskopi

Vi undersøger først spektret for ethylparaben og vurderer om det er sandsynligt at det dannede H NMR-spektrum passer til det vi ville forvente. Til dette formål kigger vi på de individuelle peaks da antallet af spidser kan give os en ide om hvilke atomer de korresponderer til.



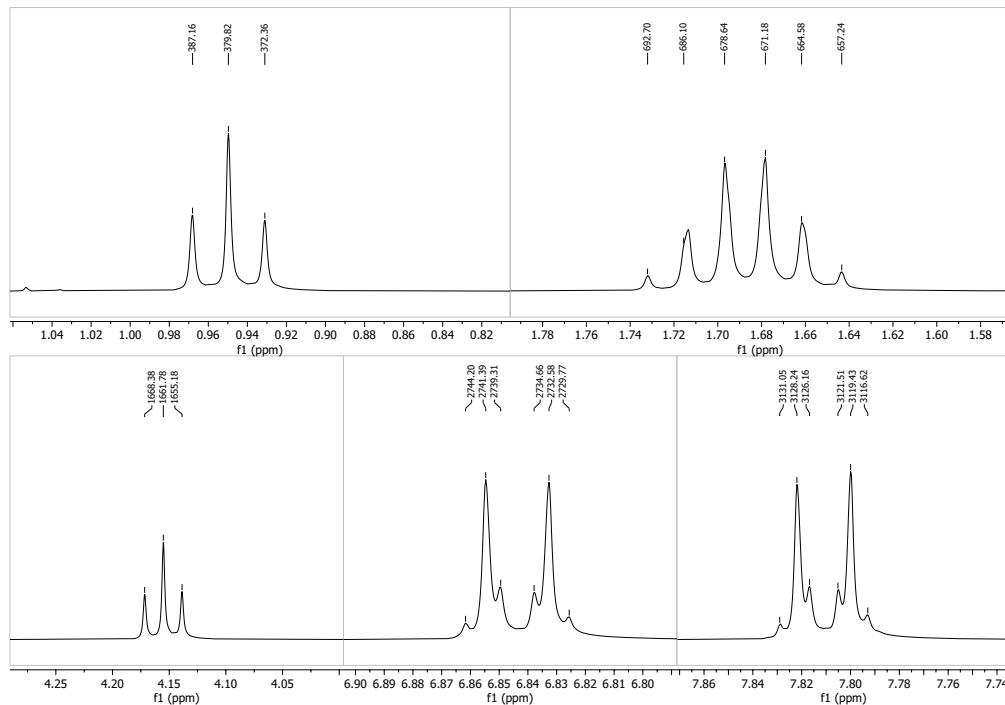
Figur 38: Peaks for H–NMR analyse af ethylparaben.

Peaket omkring  $\delta = 1.28\text{ppm}$  forventes at være tilsvarende methylgruppen på forgreningen der udgår fra benzenringen eftersom vi observerer 3 peaks,

må atomet hydrogenerne er bundet til have 2 naboprotoner, hvilket kun opfyldes af methylengruppen. Ved  $\delta = 4.25\text{ppm}$  ses 4 peaks, altså må det være methylengruppen idet den har 3 naboprotoner fra methylgruppen.

Omkring  $\delta = 6.84\text{ppm}$  forventer vi hydrogenerne bundet til carbonatomerne i meta-positionerne i benzenringen, idet de vil have et lavere kemisk skift end dem i ortho-positionen grundet den øgede elektronegativitet fra oxygenatomet der er til stede i phenolgruppen.

Dette medfører at deres elektronegativitet "mødes i midten", hvorved den lokale elektrondensitet på hydrogenatomet (og derved beskyttelsen mod  $B_0$ ) øges drastisk.



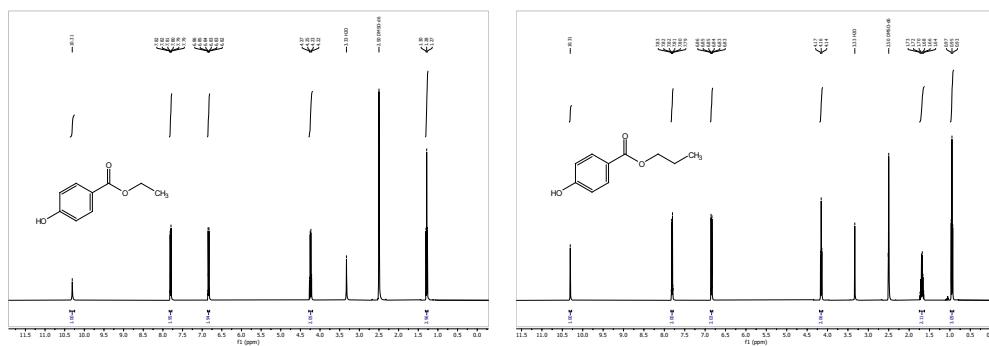
Figur 39: Peaks for H-NMR analyse af propylparaben.

Her forventes det at peaksne ved  $\delta = 0.95\text{ppm}$  igen stammer fra methylgruppe, mens det ved  $\delta = 1.69\text{ppm}$  forventes at stamme fra den 2. methylengruppe på forgreningen, da denne vil have 5 naboprotoner, mens at peaket

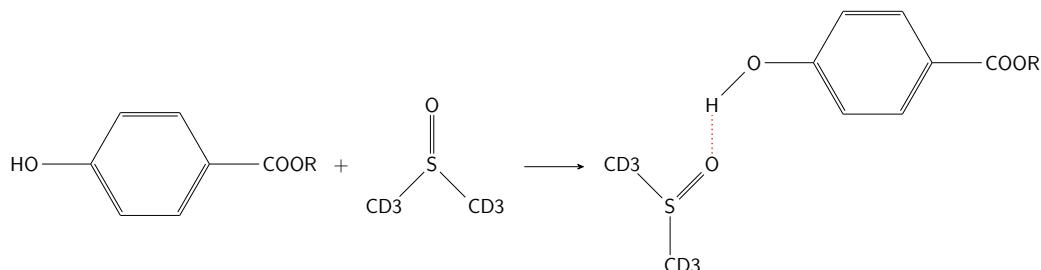
ved  $\delta = 4.15\text{ppm}$  stammer fra den 1. methylengruppe, da den kun har 2 naboprotoner.

Dette stammer sandsynligvis fra kompleks kobling mellem hydrogenerne på den aromatiske ring, da det også ses i andre praktiske spektra (SDBS, u.d.).

I selve spektret ses også en singlet ved  $\delta = 10.25\text{ppm}$ .



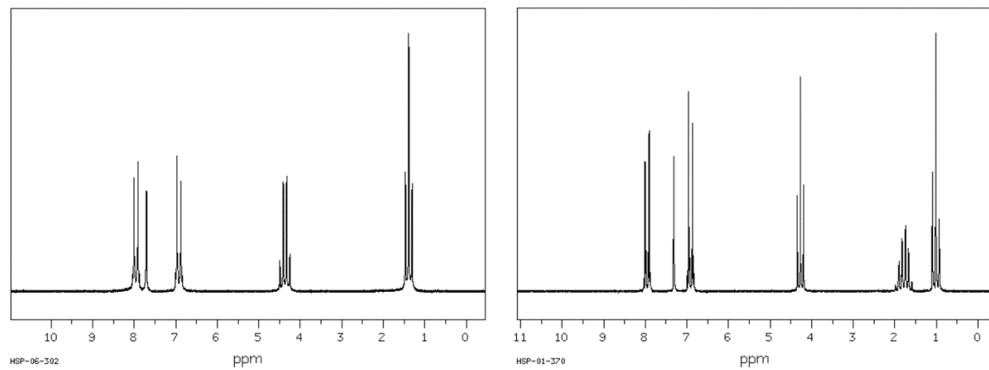
Dette kemiske skift er højere end hvad vi normalt vilte forvente for en phenolgruppe (der normalt vilte befinde sig omkring det aromatiske område, ligesom ortho- og meta-carbonatomerne). Dette kan begrundes i det benyttede opløsningsmiddel, DMSO-d6, da det har mulighed for at danne hydrogenbindinger med phenolgruppen (Abraham & Mobli, 2007)



Figur 40: Dannelsen af hydrogenbinding mellem DMSO-d6 og vilkårlig paraben.

Umiddelbart passer H-NMR-spektrene for begge produkter meget godt med hvad vi vilte forvente i teorien – samt ved sammenligning med praktiske spektre udarbejdet af laboratorier, og der vurderes derfor sandsynligt at det

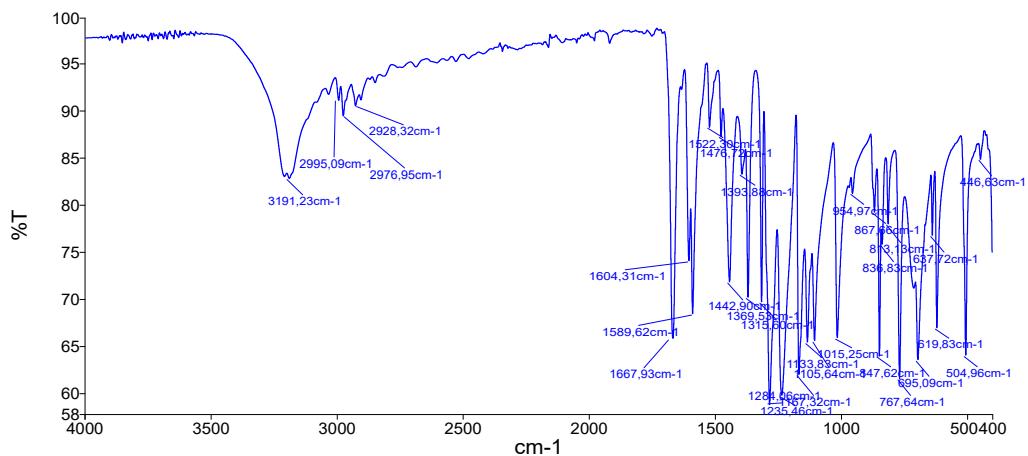
dannede produkt er hvad det burde være grundet NMR–spektroskopis høje selektivitet.



Figur 41: Praktiske H–NMR–spektre for hhv. ethyl- og propylparaben (SDBS, u.d.)

### 4.3 IR–spektroskopi

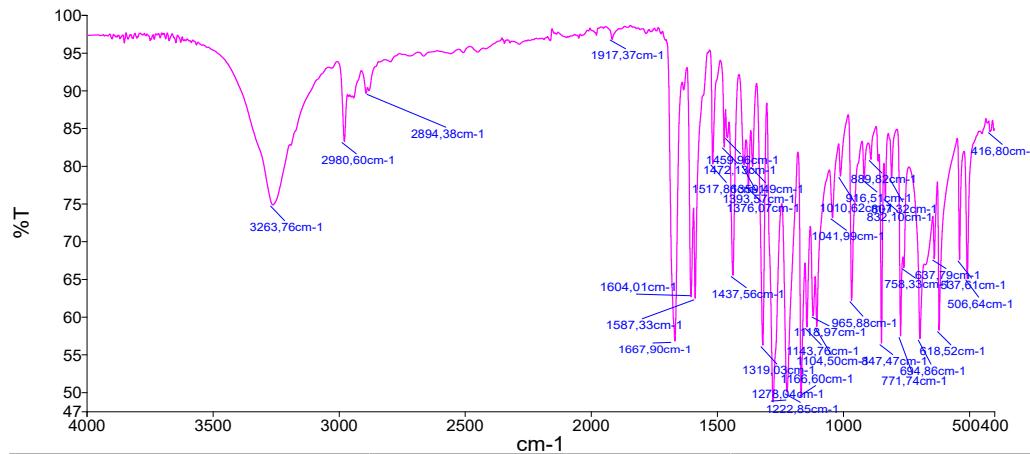
Først undersøges IR–spektret dannedt for ethylparaben for at forsøge at identificerer funktionelle grupper vi villet forvente at være tilstede.



Figur 42: IR–spektra for dannedt ethylparaben.

Der ses tydeligt den karakteristiske bøjninger der korresponderer til hydroxy–grupper, hvilket giver god mening da molekylet indeholder sådan en. Deru-

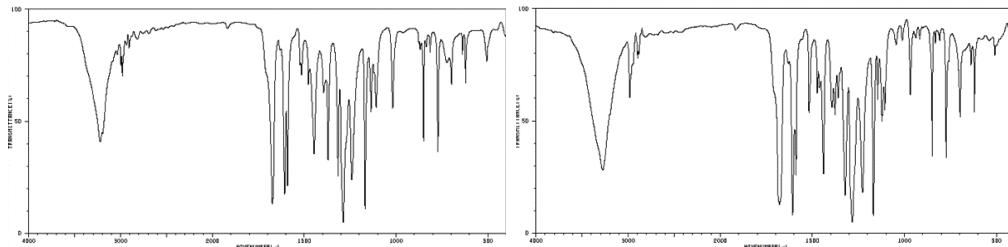
dover observeres det at der er et par udsvingninger i området svarende til C–H–bindinger hvilket igen giver mening jf. molekylstrukturen.



Figur 43: IR–spektra for dannet propylparaben.

Igen ses bøjningen korresponderende til hydroxy–gruppen samt bøjninger i området der associeres med C–H bindinger. Der er meget få betydningsfulde forskelle mellem spektrene, da molekylerne ligner hinanden meget og indeholder de samme funktionelle grupper.

Samtidigt er det også muligt at samligne de dannede spektre med teoretiske spektre fundet i databaser:



Figur 44: Teoretisk IR–spektre for hhv. ethyl– og propylparaben.

Disse stemmer også overens med dem produceret af Aarhus Universitet, da vi observerer O–H strækningen i dem begge, samt forskellenene i ”støjmængden” ved området svarende til C–H bindinger. Denne ensched mellem spektrene for

produktet dannet ved syntese og dem for et kendt rent produkt medfører større sikkerhed på at det korrekte produkt er dannet.

## 4.4 Hæmningsforsøg

### 4.4.1 Agar-diffusion

Efter agarpladerne har stået natten over, observeres de for at bestemme den hæmmende radius fra hver papirdisk.



Figur 45: Agarplader efter inkubering natten over.

For cereuskolonien fik vi at hæmning ved alle diskene væddet i parabeno-pløsning, og ingen hæmning ved kontrollen. Det er derfor relativt sikkert at ethanolen er fordampet, og at dets indvirkning derfor har været minimal:



Figur 46: Hæmningsradier for cereuskolonien.

Det samme observeredes for colikolonien:



Figur 47: Hæmningsradier for colikolonien.

Ved aflæsning af hæmningsradierne får vi at:

Tabel 8: Hæmningsradier for *bacillus cereus* og *escherichia coli*.

|                         | Hæmningsradius [cm] |               |          |
|-------------------------|---------------------|---------------|----------|
|                         | Ethylparaben        | Propylparaben | Blanding |
| <i>escherichia coli</i> | 0.75                | 0.77          | 0.90     |
| <i>bacillus cereus</i>  | 0.70                | 0.79          | 0.82     |

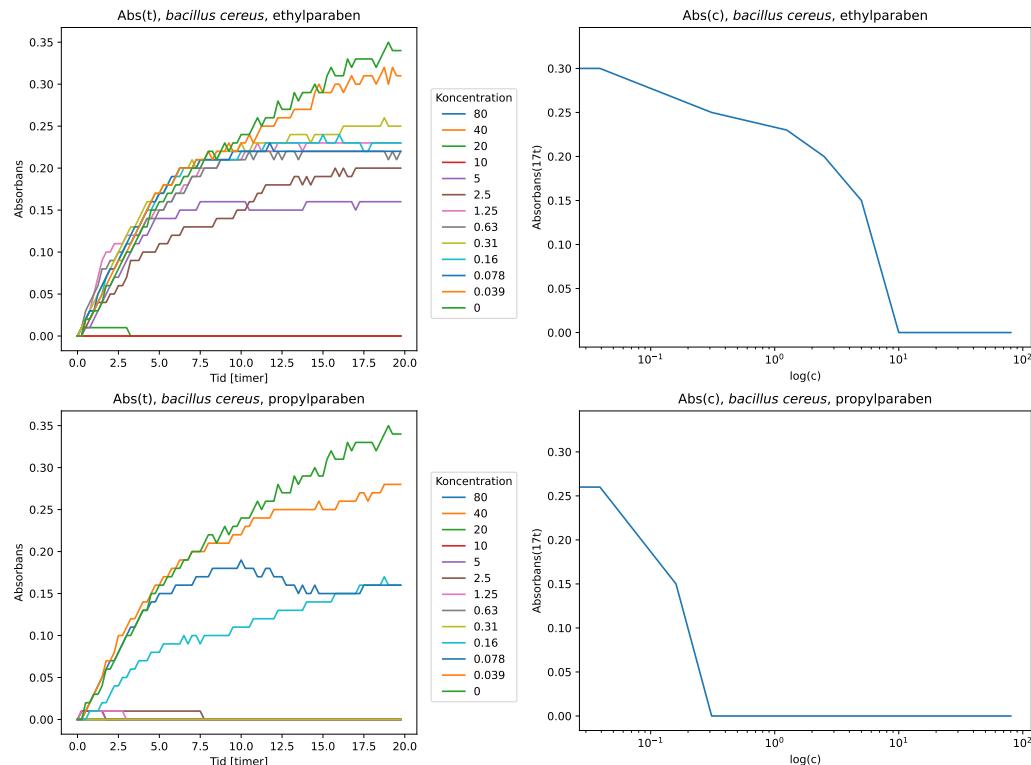
Med udgangspunkt heri observeres konsekvent at blandingen er mere effektiv end propylparaben, som er mere effektiv end ethylparaben. For ethyl- og propylparabenen giver dette giver også mening jf. teorien, da vi vil forvente at parabener med længere alkylkæder har en større hæmningseffekt.

For parabenblandingen kunne en mulig forklaring være at ethylparabenens større diffusionshastighed grundet mindre molekylestørrelse, samt større vanddopløselighed, medierer større diffusion af propylparabenen ved at "trække" den med sig når den diffunderer, hvilket medfører at den mere potente propylparaben diffunderer en større afstand end i dens selvstændige test, hvilket lader den virke over et større område.

Samtidigt giver dette også mulighed for at fremføre en hypotese om at MIC-værdien for propylparaben vil være lavere end ethylparaben under fortyndingsrækkeforsøget, hvilket passer med hvad vi har observeret i litteraturen.

#### 4.4.2 Fortyndingsrække

Efter den 20 timer lange målungsperiode eksporteres dataene, og behandles for at være letforståelige. Til dette formål fremstilles en hhv.  $\text{Abs}(t)$ - samt en  $\text{Abs}(c)$ -graf, der giver overblik over forløbet. Til fremstillingen af  $\text{Abs}(c)$ -grafen vælges det at benytte absorbansværdier fra  $t = 17$  timer, da kontrollen lod til at nå den stationære fase her.

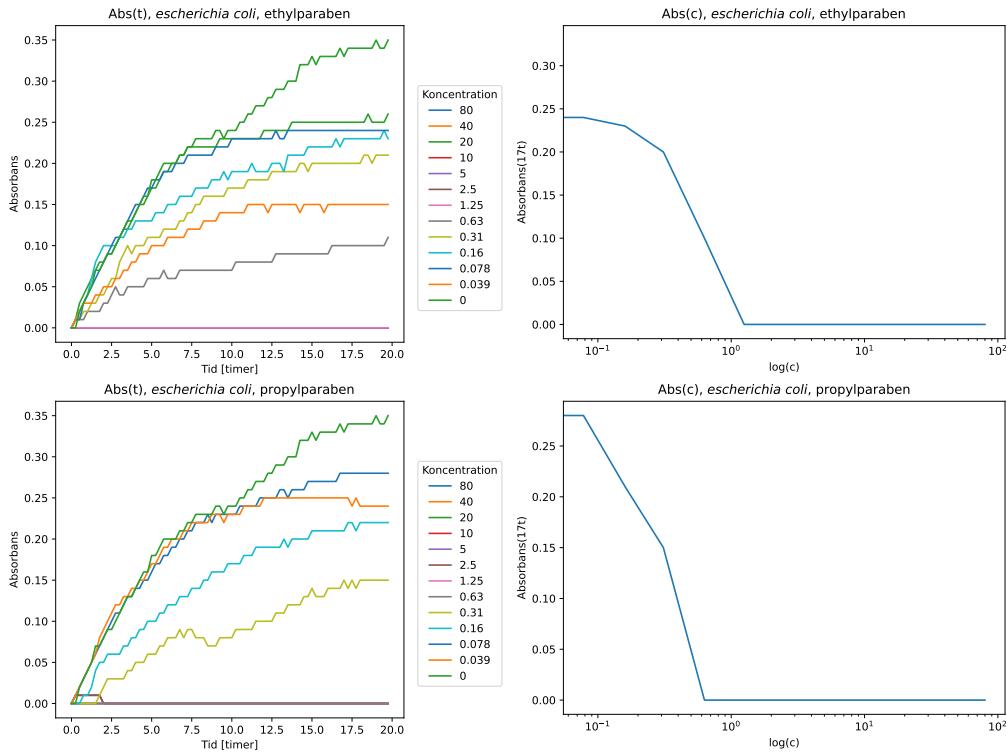


Figur 48:  $\text{Abs}(t)$ - og  $\text{Abs}(c)$ -grafer for ethyl- og propylparaben i medie poddet med *bacillus cereus*. MIC-grafer er enkeltlogaritmiske.

Ved analyse af figuren er det klart at ethylparabenen havde en hæmmende effekt på mikroorganismerne uanset koncentration, idet alle de parabenholdige brønde endte med en lavere OD600 end kontrollen. Med udgangspunkt i  $\text{Abs}(c)$  grafen er det muligt at identificere cut-off punktet for forskellige MIC-værdier:

Tabel 9: MIC90, MIC50, MIC10, samt hæmningsintervallet for ethyl- og propylparaben i *bacillus cereus*-pødet medie.

| Paraben | MIC [w/w%] |             |             |                 |
|---------|------------|-------------|-------------|-----------------|
|         | MIC90      | MIC50       | MIC10       | Interval [w/w%] |
| Ethyl   | 0.5–1      | 0.25–0.5    | 0.004–0.007 | < 0.004–1       |
| Propyl  | 0.015–0.03 | 0.004–0.007 | < 0.004     | < 0.004–0.02    |



Figur 49:  $\text{Abs}(t)$ – samt  $\text{Abs}(c)$ –grafer for ethyl- og propylparaben i medie poddet med *escherichia coli*. MIC–grafer er enkeltlogaritmiske.

Her er det igen klart at der har været en konsekvent hæmmende effekt ved alle parabenkoncentrationer:

Tabel 10: MIC90, MIC50, MIC10, samt hæmningsintervallet for ethyl- og propylparaben i *escherichia coli*-podet medie.

| Paraben | MIC [w/w%] |            |         | Interval [w/w%] |
|---------|------------|------------|---------|-----------------|
|         | MIC90      | MIC50      | MIC10   |                 |
| Ethyl   | 0.06–0.125 | 0.03–0.06  | < 0.004 | < 0.004–0.125   |
| Propyl  | 0.03–0.06  | 0.015–0.03 | < 0.004 | < 0.004–0.06    |

Modsat litteraturen observeres her en tilsyneladende *større* hæmningseffekt mod den gram-negative bakterieart end den gram-positive, hvilket vi umiddelbart ikke villet forvente.

En potentiel grund til dette kunnet være *bacillus cereus*' evne til at danne et beskyttende biofilm (Bottery m.fl., 2021; Caro-Astorga m.fl., 2020), der kunnet have en skærrende effekt mod parabenernes virkning ved at gøre det sværere for dem at nå cellemembranen, bl.a. grundet dets høje vandindhold (Sharma m.fl., 2023) som parabenerne villet være nødsaget til at bevæge sig gennem for at nå den lipide cellemembran.

*Escherichia coli* har den samme egenskab (Beloin m.fl., 2010), dog er det muligt at den kemiske sammensætning af de dannede biofilm øger dets beskyttende effekt ved det dannet af *bacillus cereus*.

Derudover er det også muligt at de kunnet have udviklet delvis antimikrobiel resistans, da analysen udførtes under den eksponentielle vækst-fase, hvilket muliggør hurtig evolution, og samhørtigt tilpasning til dets miljø, hvilket kunnet indikere at *bacillus cereus* har større kapacitet til at udvikle resistans overfor parabener.

Dette kunne igen muligvis kobles til dannelsen af biofilm, hvis fysiske egenskaber gennem evolutionen også kunnet ændre sig og gøre paraben-permeation endnu sværere.

## 5 Konklusion

Vores smeltepunkter for både det kommersielle- og produktet fremstilt ved syntese afveg meget lidt fra hinanden, hvilket er indikativt for renhed grundet

manglen på potentielle biprodukter. Derudover afveg vores TLC-analyser også meget lidt fra det for kommercielle produkt.

Samtidigt viste de mere selektive spektroskopiske analyser også minimale afvigelser fra teoretiske- og praktiske spektra, hvilket bekræfter vores mere kvantitative analysers i at det dannede produkt er det vi ønskede.

De hæmmende egenskaber af parabenerne var også som forventede. De bestemte MIC-værdier afveg relativt meget ved *bacillus cereus*-mediet, dog passede de nærmest en-til-en med *escherichia coli*-mediet.

Med udgangspunkt i undersøgelsen af de fysiske karakteristika-, spektroskopiske molekylinteraktioner samt den hæmmende effekt er det derfor sikkert at konkludere at det dannede produkt er hvad vi ønskede at danne ved syntesen, samt stor renhed.

## 6 Perspektivering

Under flere af undersøgelserne havde det været fordelagtigt at udføre forsøget flere gange for at få en bedre ide om konfidensintervallet for vores data. Dette er specielt sandt for MIC-målingen, da det villet øge reproducerbarheden af undersøgelsen drastisk, samt præcissere den indsamlede data til værdier der potentielt lagde nærmere dem fundet teoretisk.

Udførslen af flere agar-diffusionsforsøg kunne også have yderligere underbygget vores data, da der kunnet have været mere eksperimentering med parabenkoncentrationerne i papirdiskene, hvilket kunnet have bidraget til opstillingen af bedre estimerater for MIC-værdier, samt undersøgelse af den mindste effektive koncentration, da der generelt under MIC-forsøget observeredes en rimeligt drastisk stigning fra punktet svarende til MIC100 til den næste absorbansmåling, hvilket selvfølgelig giver mening da koncentrationen halveres fra brønd til brønd.

Undersøgelse af MIC-værdier for parabenblandinger, samt blandinger bestående af parabener og andre konserveringsmidler kunnet også have været interessant, da disse ofte benyttes i industrien. Derudover kunnet parabenernes effektivitet også visualiseres og kvantificeres i en større kontekst end blot deres egen molekylgruppe ved samligning med andre stoffer. Specielt undersøgelse med henblik på samligning af ”naturlige” konserveringsmidler (salt, citron-

syre, honning, osv.) og syntetiske konserveringsmidler kunnet være interessant for at få en ide om hvilke fordele (og ulemper?) de syntetiske produkter ift. de naturlige.

Dette kunnet dog have nogle begrænsninger, specielt ift. undersøgelsen af konserveringsmidlerne betydning for fødevarernes fysiske karakteristika og smag, da parabener er kategoriserede som værende potentielt sundhedsskadelige, hvilket villet gøre kvalitativ samligning af fødevarer præserved med naturlige vs. syntetiske konserveringsmidler svært.

## 7 Litteratur

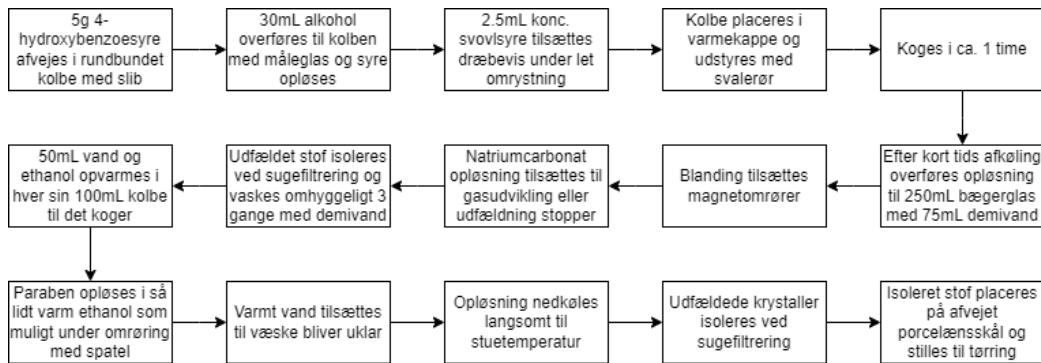
- Abbas, S., Greige-Gerges, H., Karam, N., Piet, M.-H., Netter, P., & Magdalou, J. (2010). Metabolism of parabens (4-hydroxybenzoic acid esters) by hepatic esterases and UDP-glucuronosyltransferases in man. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20930423/>
- Abraham, R. J., & Mobli, M. (2007). An NMR, IR and theoretical investigation of <sup>1</sup>H Chemical Shifts and hydrogen bonding in phenols. <https://www.modgraph.co.uk/Downloads/SCSPT25.pdf>
- Andersen, E., & Petresch, C. (2002). Bohr atommodel. <https://fysikleksikon.nbi.ku.dk/b/bohrmodel/>
- Anderson, E. (2019). Perservatives – Keeping our foods safe & fresh. <https://www.canr.msu.edu/news/preservatives-keeping-our-foods-safe-fresh>
- Barabasz, W., Pikulicka, A., Wzorek, Z., & Nowak, A. K. (2019). Ecotoxicological aspects of the use of parabens in the production of cosmetics. [https://www.researchgate.net/publication/338425394\\_Ecotoxicological\\_aspects\\_of\\_the\\_use\\_of\\_parabens\\_in\\_the\\_production\\_of\\_cosmetics](https://www.researchgate.net/publication/338425394_Ecotoxicological_aspects_of_the_use_of_parabens_in_the_production_of_cosmetics)
- Beloin, C., Roux, A., & Ghigo, J.-M. (2010). Escherichia coli biofilms. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2864707/>
- Bottery, M. J., Pitchford, J. W., & Friman, V.-P. (2021). Ecology and evolution of antimicrobial resistance in bacterial communities. <https://www.nature.com/articles/s41396-020-00832-7>
- Caro-Astorga, J., Frenzel, E., Perkins, J. R., Alvarez-Mena, A., de Vicente, A., Ranea, J. A. G., Kuipers, O. P., & Romero, D. (2020). Biofilm formation displays intrinsic offensive and defensive features of *Bacillus cereus*. <https://www.nature.com/articles/s41522-019-0112-7>
- Cartlidge, E. (2015). The spin of a proton. *Physics World*. <https://physicsworld.com/a/the-spin-of-a-proton/>
- Cashman, A. L., & Warshaw, E. M. (2005). Parabens: A Review of Epidemiology, Structure, Allergenicity, and Hormonal Properties. <https://www.medscape.com/viewarticle/508430>
- Committe, E. S. (2011). Parabens used in cosmetics. [https://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/docs/citizens\\_parabens\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/docs/citizens_parabens_en.pdf)
- Darbre, P. D., Aljarrah, A., Miller, W. R., Coldham, N. G., Sauer, M. J., & Pope, G. S. (2004). Concentrations of parabens in human breast

- tumours. [https://www.researchgate.net/publication/8900600\\_Concentrations\\_of\\_Parabens\\_in\\_human\\_breast\\_tumours](https://www.researchgate.net/publication/8900600_Concentrations_of_Parabens_in_human_breast_tumours)
- Darbre, P. D., & Harvey, P. W. (2008). Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jat.1358>
- Elvekjær, F., & Benoni, T. (2020). Fysik AB bogen.
- Espita, G. (2022). Quantum Properties of Light. [https://www.physicsbook.gatech.edu/Quantum\\_Properties\\_of\\_Light](https://www.physicsbook.gatech.edu/Quantum_Properties_of_Light)
- Farmer, S. (2023). Fischer Esterification. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Organic\\_Chemistry\)/Carboxylic\\_Acids/Reactivity\\_of\\_Carboxylic\\_Acids/Fischer\\_Esterification](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Organic_Chemistry)/Carboxylic_Acids/Reactivity_of_Carboxylic_Acids/Fischer_Esterification)
- FDA. (2022). Parabens in Cosmetics. [https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetic-ingredients/parabens-cosmetics#are\\_parabens\\_safe](https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetic-ingredients/parabens-cosmetics#are_parabens_safe)
- Galvez-Ontiveros, Y., Moscoso-Ruiz, I., Rodrigo, L., Aquilera, M., Rivas, A., & Zafra-Gomez, A. (2020). Presence of Parabens and Bisphenols in Food Commonly Consumed in Spain. <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/1/92>
- Hager, E. (2022). Minireview: Parabens Exposure and Breast Cancer. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8834979/>
- Harris, R. K., Becker, E. D., de Menezes, S. M. C., Goodfellow, R., & Granger, P. (2009). NMR nomenclature. Nuclear spin properties and conventions for chemical shifts (IUPAC Recommendations 2001). <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1351/pac200173111795/html>
- Harvey, D. (2022). *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. Libretexts. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Organic\\_Chemistry\)/Spectroscopy/Nuclear\\_Magnetic\\_Resonance\\_Spectroscopy](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Organic_Chemistry)/Spectroscopy/Nuclear_Magnetic_Resonance_Spectroscopy)
- Jacobsen, H. (2013). EU scientific committee clears parabens in cosmetics as ‘harmless’. <https://www.euractiv.com/section/health-consumers/news/eu-scientific-committee-clears-parabens-in-cosmetics-as-harmless/>
- Karpuzoglu, E., & Holladay, S. D. (2013). Parabens: Potential impact of Low-Affinity Estrogen receptor Binding chemicals on Human health. [https://www.researchgate.net/publication/255174651\\_Parabens\\_](https://www.researchgate.net/publication/255174651_Parabens_)

- Potential\_impact\_of\_Low-Affinity\_Estrogen\_receptor\_Binding\_chemicals\_on\_Human\_health
- Kaseman, D., & Iyer, R. S. G. (2023). *Introduction to NMR*. Libretexts. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Spectroscopy/Magnetic\\_Resonance\\_Spectroscopies/Nuclear\\_Magnetic\\_Resonance/Nuclear\\_Magnetic\\_Resonance\\_II](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Magnetic_Resonance_Spectroscopies/Nuclear_Magnetic_Resonance/Nuclear_Magnetic_Resonance_II)
- Kaseman, D., OZCAN, S., & Du, S. (2023). *NMR - Theory*. Libretexts. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Spectroscopy/Magnetic\\_Resonance\\_Spectroscopies/Nuclear\\_Magnetic\\_Resonance/NMR\\_-\\_Theory](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Magnetic_Resonance_Spectroscopies/Nuclear_Magnetic_Resonance/NMR_-_Theory)
- Khan, S. A., Khan, S. B., Khan, L. U., & Farooq, A. (2018). Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Application in Functional Groups and Nanomaterials Characterization. [https://www.researchgate.net/publication/327779563\\_Fourier\\_Transform\\_Infrared\\_Spectroscopy\\_Fundamentals\\_and\\_Application\\_in\\_Functional\\_Groups\\_and\\_Nanomaterials\\_Characterization](https://www.researchgate.net/publication/327779563_Fourier_Transform_Infrared_Spectroscopy_Fundamentals_and_Application_in_Functional_Groups_and_Nanomaterials_Characterization)
- Lester, C., Hewitt, N. J., Muller-Vierira, U., Mayer, M., Ellison, C., Duplan, H., Genies, C., Jacques-Jamin, C., Fabian, E., Sorrell, I., Lange, D., Schepky, A., & Gregoire, S. (2021). Metabolism and plasma protein binding of 16 straight- and branched-chain parabens in in vitro liver and skin models. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233320306032>
- Libner, E. (2016). Bliv klogere på parabenerne: sandt og falsk om parabener. <https://samvirke.dk/artikler/bliv-klogere-paa-parabenerne-sandt-og-falsk-om-parabener>
- Liebert, M. A. (1984). Final Report on the Safety Assessment of Methylparaben, Ethyl paraben, Propyl paraben, and Butylparaben. <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.3109/10915818409021274>
- Lincho, J., Martins, R. C., & Gomes, J. (2021). Paraben Compounds — Part I: An Overview of Their Characteristics, Detection, and Impacts. <https://www.mdpi.com/2076-3417/11/5/2307>
- Lund, B. M., Kraaer, J., & Holck, P. (2012). *Orbit b htx/eux*. Systime.
- Miljøstyrelsen. (2013). Survey of parabens. <https://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2013/04/978-87-93026-02-5.pdf>

- Nanalysis. (2020). Spin-Spin Coupling — Beyond Multiplicity. <https://www.nanalysis.com/nmready-blog/2020/2/11/spin-spin-coupling-beyond-multiplicity>
- Nielsen, O. V., & Axelsen, V. (2019). *Basiskemi A Xperimenter*. Praxis.
- NIH. (u.d.). PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Phenomenex. (u.d.). Solvent Miscibility Table. <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/30386d31-077e-4644-9f0d-43cd1796c75e.pdf>
- Routledge, E. J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J., & Sumpter, J. P. (1998). Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0041008X98985441>
- SDBS. (u.d.). Spectral Database for Organic Compounds. [https://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](https://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi)
- Sharma, S., Mohler, J., Mahajan, S. D., Schwartz, S. A., Bruggemann, L., & Aalinkeel, R. (2023). Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/6/1614>
- Sigurskjold, B. W., Henningsen, J. O., & Dietrich, O. W. (2024). spektroskopi. *Den Store Danske*. <https://denstoredanske.lex.dk/spektroskopi>
- Socrates, G. (2004). *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*. John Wiley & Sons.
- Theophanides, T. (2012). Introduction to Infrared Spectroscopy. [https://www.researchgate.net/publication/224831013\\_Introduction\\_to\\_Infrared\\_Spectroscopy](https://www.researchgate.net/publication/224831013_Introduction_to_Infrared_Spectroscopy)
- Valkova, N., Lepine, F., Valeanu, L., Dupont, M., Louisette, L., Bisaillon, J.-G., Beaudet, R., Shareck, F., & Villemur, R. (2001). Hydrolysis of 4-Hydroxybenzoic Acid Esters (Parabens) and Their Aerobic Transformation into Phenol by the Resistant Enterobacter cloacae Strain EM. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92888/>
- Waldegg, P. B. (2007). Den naturalistiske fejlslutning. <https://www.information.dk/2007/04/naturalistiske-fejlslutning>

## A Flowchart



## B Mængdeberegninger

### B.1 Ethylparaben

| Stof                   | Mængde [g √ mL] | Densitet [g/mL] | MV [g/mol] | Stofmængde [mol] |
|------------------------|-----------------|-----------------|------------|------------------|
| 4-hydroxybenzoic acid  | 5.1338          |                 | 138.12     | 0.0372           |
| Ethanol                | 30              | 0.79            | 46.07      | 0.514            |
| Teoretisk ethylparaben | 5.66            |                 |            |                  |
| Praktisk ethylparaben  | 2.2666          |                 |            |                  |
| Afvigelse              | -60%            |                 |            |                  |

### B.2 Propylparaben

| Stof                    | Mængde [g √ mL] | Densitet [g/mL] | MV [g/mol] | Stofmængde [mol] |
|-------------------------|-----------------|-----------------|------------|------------------|
| 4-hydroxybenzoic acid   | 5.0346          |                 | 138.12     | 0.0365           |
| Propanol                | 30              | 0.803           | 60.1       | 0.401            |
| Teoretisk propylparaben | 5.55            |                 |            |                  |
| Praktisk propylparaben  | 4.4144          |                 |            |                  |
| Afvigelse               | -20%            |                 |            |                  |

### B.3 Dobbeltsyntese

| Stof                   | Mængde [g ∨ mL] | Densitet [g/mL] | MV [g/mol] | Stofmængde [mol] |
|------------------------|-----------------|-----------------|------------|------------------|
| 4-hydroxybenzoesyre    | 5.0176          |                 | 138.12     | 0.0363           |
| Ethanol                | 30              | 0.79            | 46.07      | 0.514            |
| Teoretisk ethylparaben | 5.53            |                 |            |                  |
| Praktisk ethylparaben  | 2.4244          |                 |            |                  |
| Afvigelse              | -56%            |                 |            |                  |

| Stof                    | Mængde [g ∨ mL] | Densitet [g/mL] | MV [g/mol] | Stofmængde [mol] |
|-------------------------|-----------------|-----------------|------------|------------------|
| 4-hydroxybenzoesyre     | 5.0346          |                 | 138.12     | 0.0365           |
| Propanol                | 30              | 0.803           | 60.1       | 0.401            |
| Teoretisk propylparaben | 5.55            |                 |            |                  |
| Praktisk propylparaben  | 0.5692          |                 |            |                  |
| Afvigelse               | -90%            |                 |            |                  |

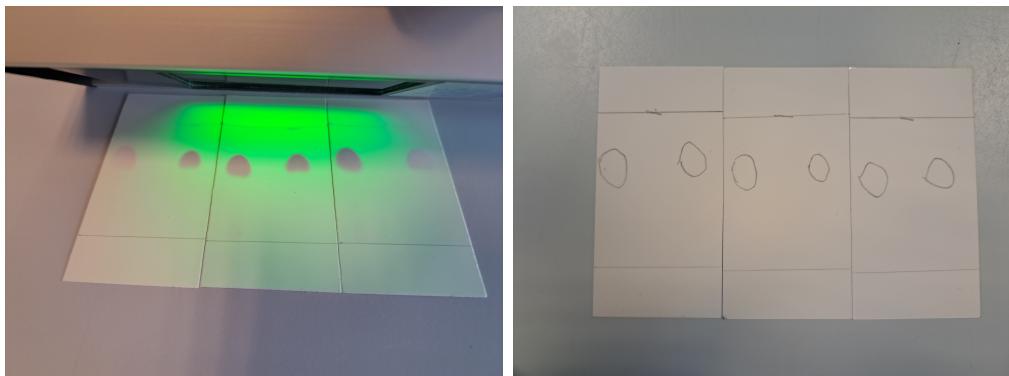
## C TLC-plader

### C.1 Syntese 1



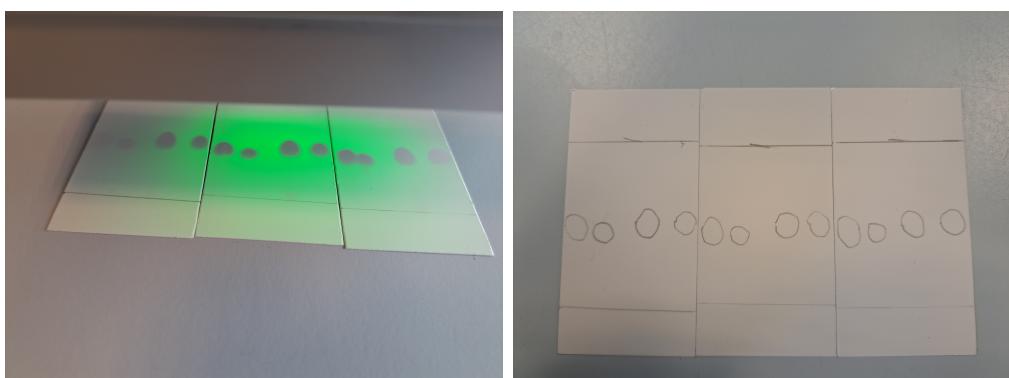
Figur 51: TLC-plader fra syntese 1, eget produkt til venstre og kommersielt til højre

## C.2 Syntese 2

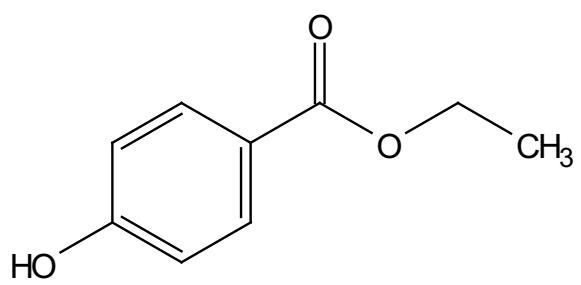


Figur 52: TLC-plader fra syntese 2, eget produkt til venstre og kommersIELT til højre

## C.3 Dobbeltsyntese



Figur 53: TLC-plader fra syntese 3, første 2 er ethylparaben, næste 2 er propylparaben, eget produkt til venstre og kommersIELT til højre



—10.31

7.82  
7.81  
7.80  
7.79  
7.79

6.86  
6.85  
6.84  
6.83  
6.83  
6.82

4.27  
4.25  
4.23  
4.22

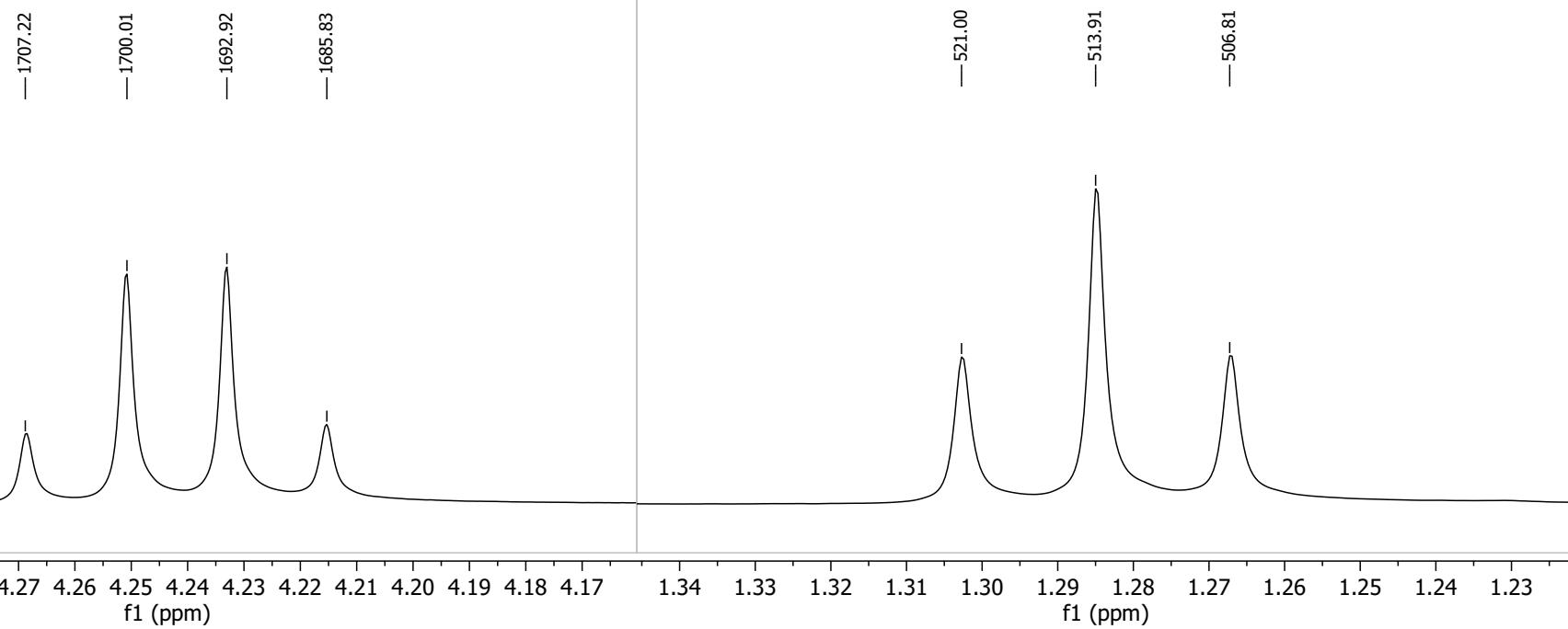
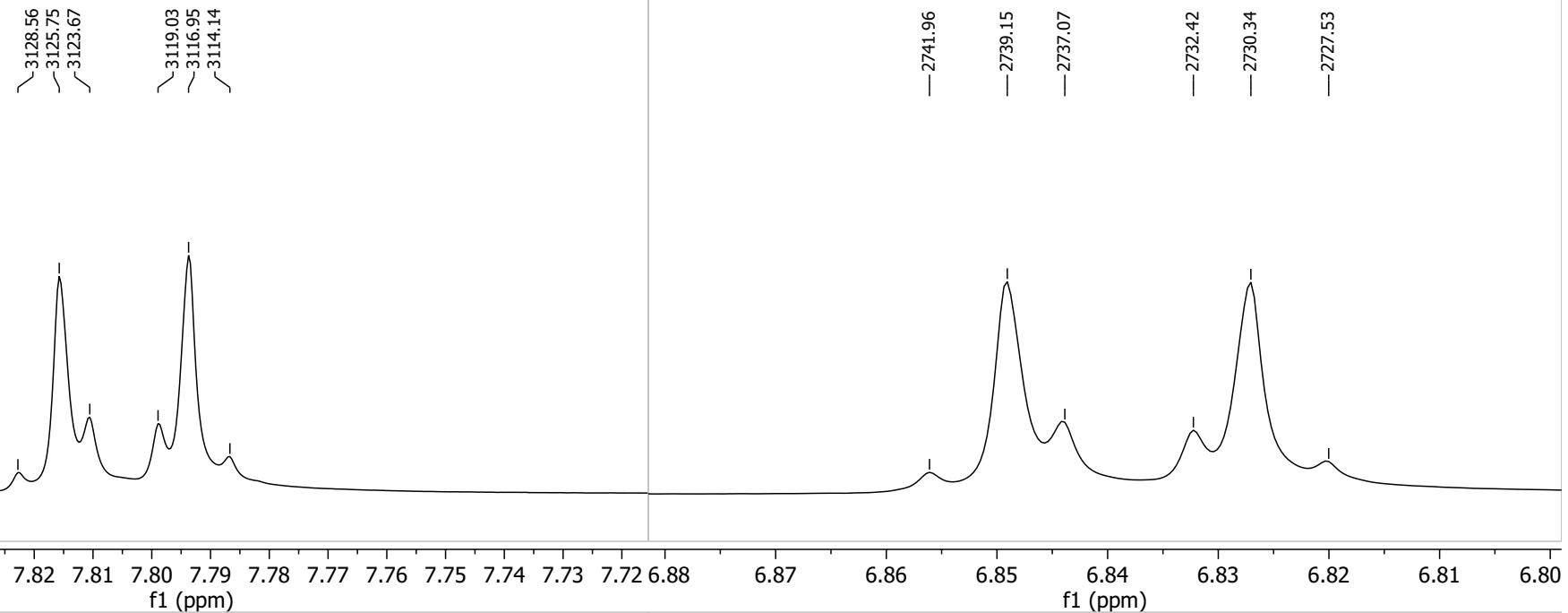
—3.33 H<sub>2</sub>O

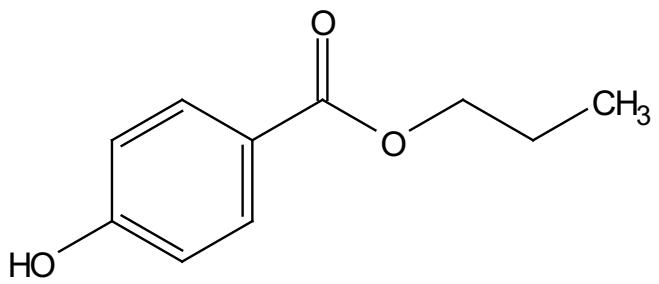
—2.50 DMSO-d<sub>6</sub>

1.30  
1.28  
1.27

11.5 11.0 10.5 10.0 9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0

f1 (ppm)





—10.31

7.83  
7.82  
7.81  
7.80  
7.79

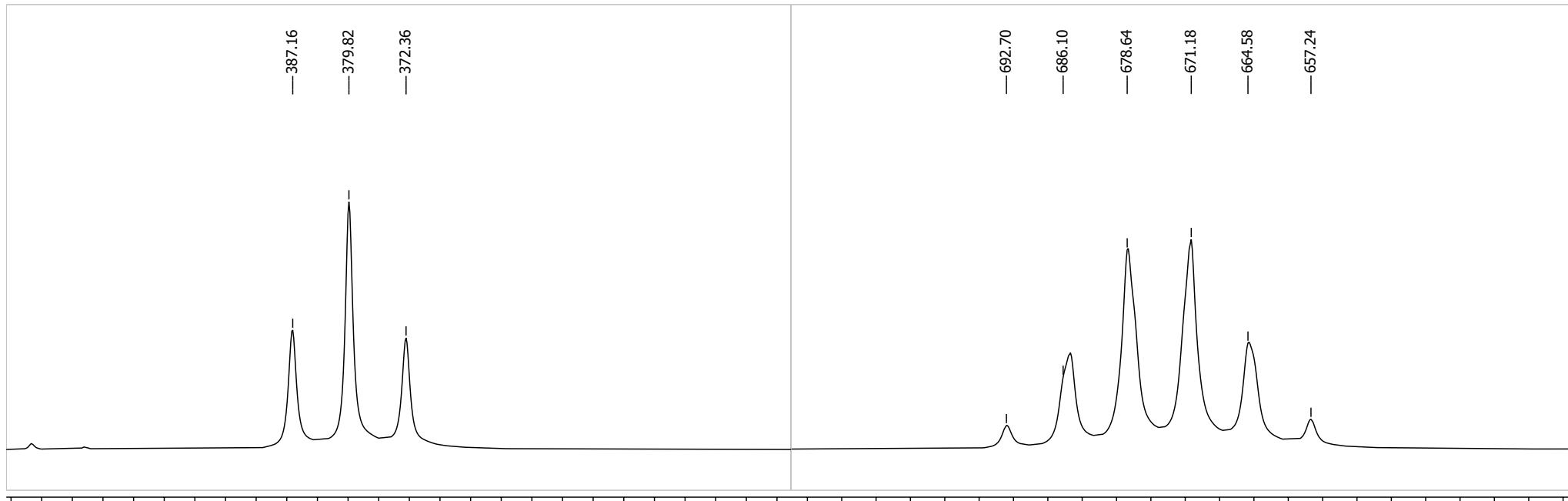
6.86  
6.85  
6.85  
6.84  
6.83  
6.83

4.17  
4.16  
4.14

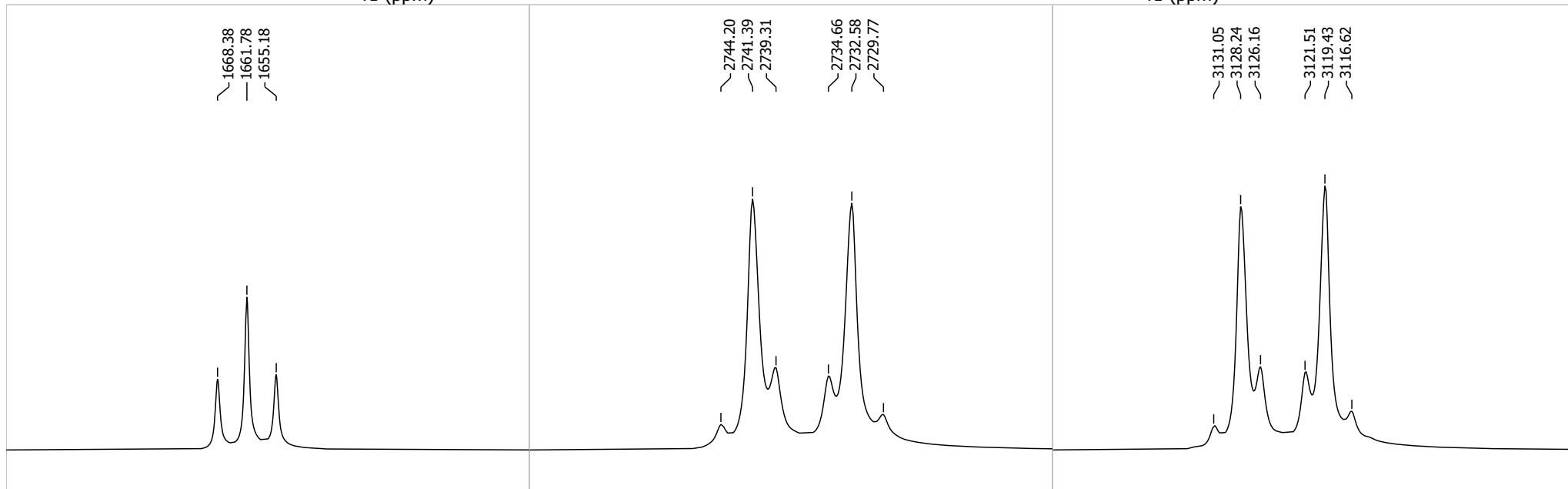
—3.33 H<sub>2</sub>O

1.73  
1.72  
1.70  
1.68  
1.66  
1.64  
0.97  
0.95  
0.93

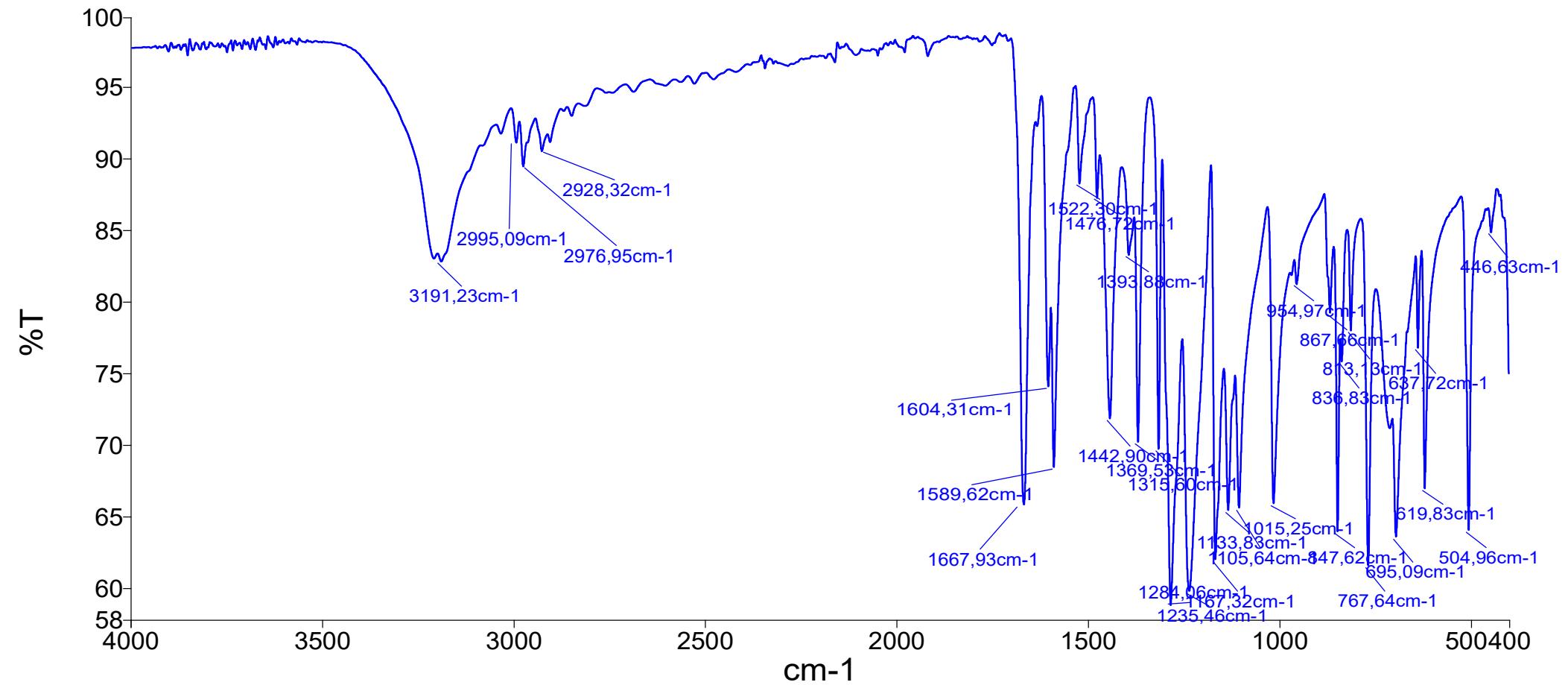


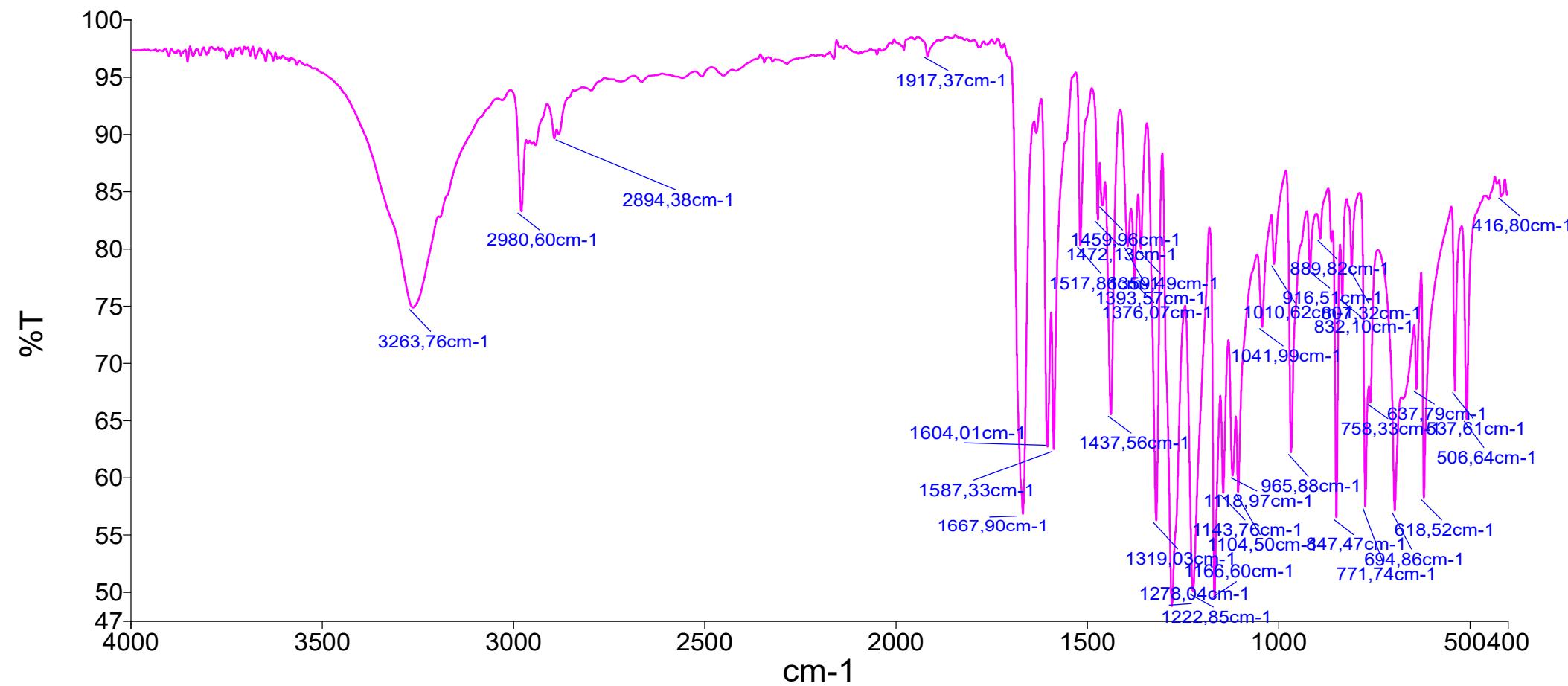


1.04 1.02 1.00 0.98 0.96 0.94 0.92 0.90 0.88 0.86 0.84 0.82 0.80 0.78 0.76 0.74 0.72 0.70 0.68 0.66 0.64 0.62 0.60 0.58  
f1 (ppm)



4.25 4.20 4.15 4.10 4.05 6.90 6.89 6.88 6.87 6.86 6.85 6.84 6.83 6.82 6.81 6.80 7.86 7.84 7.82 7.80 7.78 7.76 7.74  
f1 (ppm)





# Risikovurdering Kemiske



## Titel

Syntese af ethyl- og propylparaben

## Placering i organisationen

Kemi, proces, Biologi

## Beskrivelse

Formålet med syntesen er at fremstille hhv. ethyl- og propylparaben med henblik på videre undersøgelse og sammenligning af de dannede produkter ved forskellige analysemетодer (H-NMR, smeltepunktsanalyse, TLC), samt undersøgelse af deres væksthæmningsegenskaber.

Dannelsen af parabener sker ved en kondensationsreaktion mellem 4-hydroxybenzoesyre og dets korresponderende alkohol. Reaktionen katalyses af koncentreret svovlsyre.

Kemikalier:

- 4-hydroxybenzoesyre (99-96-7)
- ethanol (64-17-5)
- propan-1-ol (71-23-8)
- koncentreret svovlsyre (7664-93-9)
- 10% natriumcarbonat (497-19-8)
- ethylparaben (120-47-8)
- propylparaben (94-13-3)

Syntesen foregår i stinksak, her sker opvarmning med tilbagesvælg, udfældning af parabenen, isolering af parabenen ved sugefiltrering, senere en omkristallisering og herefter sugefiltrering igen. Produkter stilles herefter til tørring i stinksak.

Alt affald hældes i organisk affaltsdunk i stinksak.

De fremstillede parabener faremærkes når de hældes i præparatbeholder.

## Farlige egenskaber

- Alkoholerne er brandfarlige og farlige ved indtagelse, hudkontakt og indånding.
- 4-hydroxybenzoesyre er farlig ved indtagelse, hudkontakt og indånding.
- Konc. svovlsyre er stærkt ætsende.

## Eksponeringsgrad, -type og -varighed

Alt arbejde sker i stinksak med brug af sikkerhedsbriller og kittel. Der bruges nitrilhandsker for at minimere risici for hudkontakt, eksponeringsgraden vurderes lav.

Ved ophældning af alkoholer sker det i måleglas i stinksak, måleglas stilles til afdampning efter brug og evt. rester hældes i affaltsdunk.

Koncentreret svovlsyre afpipetteres forsigtigt og tilsættes med dræbepipette, pipette samt dræbepipette skyldes 3 gange i vand inden de lægges i affaltsbeholder, affald hældes i syre affaltsdunken i stinksak.

Der opsættes en pose til affald i stinksak, til brugte handsker og lignende. Posen skal blive i stinksak til afdampning. Næste dag lukkes posen og den lægges i almindelig affaltsbeholder.

## Virkninger af forebyggende foranstaltninger

Alt arbejde i laboratoriet skal foregå efter de ophængte laboratorie regler. Der er ophængt i alle laboratorierne.

<https://www.danskkemidatabase.dk/Riskmatrix.html#21>

## Inddragelse af undersøgelser

### Substitutionsovervejelser

Den originale syntesevejledning benyttede methanol som opløsningsmiddel til parabenerne, her benyttes i stedet ethanol da der herved helt kan undgås arbejde med det højest faremærkede kemikalie efter svovlsyren.

## Forbedringsforslag

Alle sikkerhedsforholdsregler er gældende.

## Opfølgningsdato

20-02-2027

## Oprettet dato

20-02-2024 Prøvelogin

## Ændret dato

20-02-2024 Prøvelogin

Produkter tilknyttet denne risikovurdering: 7

|   | Produkt                  | Leverandør                 | Farlighed | Miljø |   | Faresætninger   |  |
|---|--------------------------|----------------------------|-----------|-------|---|---|--|
| x | Svovlsyre konc. (885500) | Frederiksen Scientific A/S | ● ● ●     |       |  | H314<br>Forårsager svære ætsninger af huden og øjenskader.<br>H290 Kan ætse metaller. |  |

|                                     | Produkt                                    | Leverandør               | Farlighed | Miljø |   | Faresætninger  |
|-------------------------------------|--|--------------------------|-----------|-------|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> | 1-Propanol GPR RECTAPUR                    | VWR - Bie & Berntsen A/S | ● ●       |       | <br><br> | H225 Meget brandfarlig væske og damp.<br>H318 Forårsager alvorlig øjenskade.<br>H336 Kan forårsage sløvhed eller svimmelhed. |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Natriumcarbonatdecahydrat (1.06391)        | Merck Life Science ApS   | ●         |       |    | H319 Forårsager alvorlig øjenirritation.   |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 4-Hydroxybenzosyre (4-Hydroxybenzoic acid) | Thermo Fisher Scientific | ● ●       |       | <br>  | H318 Forårsager alvorlig øjenskade.<br>H335 Kan forårsage irritation af luftvejene.  |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 4-hydroxybenzoësyreethylester (111988)     | Merck Life Science ApS   | ●         |       |   |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 4-hydroxybenzoësyrepropylester             | Leverandøruafhængig      | ●         |       |   |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Ethanol 96%                                | Merck Life Science ApS   | ● ●       |       | <br>  | H225 Meget brandfarlig væske og damp.<br>H319 Forårsager alvorlig øjenirritation.  |