

**Quantitative Durchfluss-NMR-Spektroskopie und
Anwendungen der Durchfluss-NMR-Spektroskopie
in Lösung, in überkritischen Fluiden und in der
Gasphase**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2001

vorgelegt von

Holger Hermann Fischer

Tag der mündlichen Prüfung: 22. März 2001

Dekan: Professor Dr. H. Probst

1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Albert

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Häfelinger

*Meinen Eltern
und Najat
für eine gemeinsame Zukunft*

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Klaus Albert im Zeitraum von Oktober 1998 bis März 2001 am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Klaus Albert danke ich herzlich für die Themenstellung und für sein Interesse an dieser Arbeit. Seine großzügige Unterstützung ermöglichte mir die Teilnahme an zahlreichen internationalen Tagungen sowie an einem dreimonatigen Forschungsaufenthalt in den USA.

Mein spezieller Dank gilt meinen beiden Kollegen Stefan Bachmann und Dr. Markus Dachtler für die fabelhafte Freundschaft während der Studienzeit. Die zahlreichen Unternehmungen, wissenschaftlichen Diskussionen und unzähligen Gespräche "über Gott und die Welt" werden mir unvergesslich bleiben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen weiteren Kollegen:

Tobias Glaser und Dr. Jürgen Wegmann für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen.

Dr. Martin Raitza für die Einarbeitung in die Tiefen der Computer- und Netzwerkproblematik.

Dr. Rainer Brindle für die Hilfestellung zum IFR-Thema.

Christine Hellriegel und Annette Lienau für das eifrige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Gerd Fischer, Dr. Elke, Gesele, Dr. Heidi Händel, Manfred Krucker, Dr. Tanja Lacker, Renata Rabelo-Schefer, Alexandre Schefer, Christel Wolf und Daniel Zeeb sowie Paul Schuler und den Mitarbeitern der NMR-Abteilung für die vielen Diskussionen und wertvollen Ratschläge sowie das angenehme Arbeitsklima.

Ferner danke ich:

Herrn Prof. Dr. Harry C. Dorn für die Möglichkeit eines dreimonatigen Forschungsaufenthaltes in seiner Arbeitsgruppe am Virginia Polytechnic Institute and State University in Blacksburg, Virginia, USA und seine Gastfreundlichkeit. Der Einblick in seine Forschung war äußerst interessant und lehrreich. Ein weiterer Dank gilt dort Sandy Salido für die gute Zusammenarbeit.

Dem DFG-Graduiertenkolleg "Chemie in Interphasen" und seinem Sprecher Prof. Dr. E. Lindner für die Unterstützung meiner Arbeit und die Gewährung zweier Reisestipendien nach Blacksburg, VA, USA und London, GB.

Michael Seiler von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Bertagnolli am Institut für Physikalische Chemie an der Universität Stuttgart für die Messung und Interpretation der EXAFS-Spektren sowie allen weiteren Kollegen des Graduiertenkollegs für die Zusammenarbeit und wertvollen Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Hans Hasse vom Institut für Technische Thermodynamik und Technische Verfahrenstechnik an der Universität Stuttgart für die Teilfinanzierung und die Möglichkeit am NMR-Spektrometer zu messen. Dr. Michael Maiwald, Michael Ott, Dr. Young-Kyu Kim und Kay Braun danke ich für die interessante gemeinsame Arbeit und das tolle Arbeitsklima in Stuttgart.

Herrn Dr. Olle Gyllenhaal von AstraZeneca R&D, Mölndal, Schweden für die Bereitstellung von Proben und für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Heribert Schmitt-Willich für die Synthese und Anbindung der Gd-Komplexe an Kieselgel.

Herrn Dr. Ulrich Braumann, Bruker Analytik GmbH, Rheinstetten für die Ratschläge zur SFC-NMR-Kopplung.

Herrn Walter Schaal für die Hilfe bei den wirklich hartnäckigen Computerproblemen.

Der Firma Bischoff Analysentechnik und -geräte GmbH, Leonberg für die Bereitstellung von Kieselgelen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Projektes "Durchfluss-NMR-Spektroskopie mit immobilisierten freien Radikalen".

Mein größter Dank gebührt meiner Familie:

Meinen Eltern, die mich während des gesamten Studiums uneingeschränkt unterstützt haben und auf die ich mich in allen Situationen stets verlassen konnte.

Meiner "großen" Schwester Birgit für ihren Rat und ihren Erfahrungsschatz.

Meiner lieben Najat für ihre verständnisvolle und lebenswerte Art und ihre aufmunternden Worte in angespannten Momenten.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	PROBLEMSTELLUNG.....	3
3	DURCHFLUSS-NMR-SPEKTROSKOPIE.....	5
3.1	Allgemeine Grundlagen der Durchfluss-NMR-Spektroskopie	5
3.1.1	Theoretische Grundlagen.....	8
3.1.2	SFC-NMR-Durchflussprobenköpfe	11
3.1.3	¹³ C-NMR-Durchflussprobenkopf	12
3.2	Quantitative Durchfluss-NMR-Spektroskopie	14
3.2.1	Voraussetzungen der quantitativen Durchfluss-NMR-Spektroskopie	17
3.1.1.1	Spin-Gitter-Relaxation T ₁	18
3.1.1.2	Spin-Spin-Relaxation T ₂	21
3.1.1.3	Relative Anzahl der betrachteten Kerne.....	22
3.3	Dynamische Kernpolarisation (DNP)	23
3.1.1	Theorie der Dynamischen Kernpolarisation.....	24
3.1.2	Apparativer Aufbau der DNP-NMR-Kopplung	25
4	DER ÜBERKRITISCHE ZUSTAND, SFC UND SFC-NMR-KOPPLUNG	27
4.1	Überkritischer Zustand	27
4.2	Überkritische Fluid Chromatographie (SFC).....	29
4.3	SFC-NMR-Kopplung.....	32

5	ERGEBNISSE	35
5.1	Quantitative Durchfluss-¹³C-NMR-Spektroskopie und quantitative SFC-NMR-Spektroskopie.....	35
5.1.1	Synthese von immobilisierten freien Radikalen (IFR) und immobilisierten paramagnetischen Metallchelaten	35
5.1.1.1	Darstellung von aminopropylmodifiziertem Kieselgel (APS-Kieselgel)	35
5.1.1.2	Darstellung von immobilisierten freien Radikalen	36
5.1.1.3	Synthese der immobilisierten paramagnetischen Metallchelate	38
5.1.2	Charakterisierung der immobilisierten freien Radikale und paramagnetischen Metallchelate.....	39
5.1.2.1	¹³ C-CP/MAS-NMR-Spektroskopie	39
5.1.2.2	ESR-Spektroskopie	39
5.1.2.3	Röntgenabsorptionsspektroskopie.....	43
5.1.3	Quantitative Durchfluss- ¹³ C-NMR-Spektroskopie	48
5.1.4	Quantitative SFC-NMR-Spektroskopie.....	56
5.2	Dynamische Kernpolarisation in überkritischem CO₂ und Durchfluss-NMR-Detektion	64
5.3	Reaktionsverfolgung in überkritischen Fluiden	67
5.4	Verfolgung der Reaktionskinetik an den Systemen Formaldehyd/Wasser und Formaldehyd/Methanol.....	76
5.4.1	Grundlagen zur Berechnung von thermodynamischen Daten.....	79
5.1.2	Aufbau	80
5.1.3	Durchfluss-NMR-Messungen.....	83
5.5	Gasphasen-NMR-Spektroskopie	90
6	EXPERIMENTELLER TEIL	96
6.1	Geräte	96
6.1.1	NMR-Spektrometer:.....	96

6.1.2 SFC-DNP-NMR-Anlage:.....	96
6.1.3 SFC-Anlage: (Eigenbau)	97
6.1.4 Rührzellen-Apparatur:	97
6.1.5 EXAFS-Spektrometer:.....	97
6.1.6 Sonstiges:	98
6.2 Chemikalien	99
6.2.1 Chemikalien für die Synthese:.....	99
6.2.2 Chemikalien für Experimente:.....	99
6.3 Synthese.....	100
6.3.1 Aktivierung des Kieselgels.....	100
6.3.2 Synthese der Aminopropyl-Phase.....	100
6.3.3 Synthese der APS-TEMPO-Phase	100
6.3.4 Kupplungsumsatztest nach Kaiser.....	101
6.3.5 Synthese der SI-TEMPO-Phase.....	101
6.4 Durchfluss-NMR-Spektroskopie	102
6.4.1 Quantitative Durchfluss- ¹³ C-NMR-Experimente.....	102
6.4.2 Quantitative SFC- ¹ H-NMR-Experimente.....	102
6.4.3 SFC-DNP-NMR-Experimente	102
6.4.4 Reaktionsverfolgung in überkritischen Fluiden	103
6.4.5 Verfolgung der Reaktionskinetik Formdehyd/Wasser bzw. Formaldehyd/Methanol.....	103
6.4.6 Gasphasen-NMR-Experimente.....	104
7 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	105
8 LITERATURVERZEICHNIS	108

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN:

δ	Chemische Verschiebung
ρ_c	Kritische Dichte
τ	Lebensdauer (eines Zustandes)
τ	Aufenthaltszeit
τ_c	Korrelationszeit
μl	Mikroliter
1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
A	Verstärkungsfaktor der Dynamischen Kernpolarisation
APS	Aminopropylsilan-modifiziertes Kieselgel
B_0	Magnetische Flussdichte
BB	Breitband
CDCl_3	Chloroform- d_1
CE	Capillary Electrophoresis (Kapillarelektrophorese)
CEC	Capillary Electrochromatography (Kapillarelektrochromatographie)
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlendioxid
CP	Cross Polarization
CW	Continuous Wave
D_2O	Deuteriumoxid
DICI	Diisopropylcarbodiimid
D_m	Diffusionskoeffizient
DMF	Dimethylformamid
DNP	Dynamic Nuclear Polarization (Dynamische Kernpolarisation)
DTPA	Diethylentriaminpentaacetat-Komplexligand
ESR	Electron Spin Resonance (Elektronenspin Resonanz)
EXAFS	Extended X-Ray Absorption Fine Structure
FID	Free Induction Decay
FT	Fourier Transformation

G	Gauss
GC	Gaschromatographie
Gew.-%	Gewichtsprozent
GlyMeDOTA	Glycin-modifizierter, methylierter 1,4,7,10-Tetraza-cyclo-dodecyl-1,4,7,10-tetraacetat-Komplexligand
H ₂ O	Wasser
HOBT	Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
Hz	Hertz
I	Kernspin
IFR	Immobilized Free Radical (Immobilisierte freie Radikale)
IR	Infrarot
K	Kelvin
K	Quotient aus Hochfeld- zu Tieffeldmagnet (bei DNP)
LC	Liquid Chromatography
M	Masse
MAS	Magic Angle Spinning
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mP	Milli Poise (Einheit der Viskosität, kg/(m·s))
MRI	Magnetic Resonance Imaging (Kernmagnetische Bildgebung)
MS	Mass Spectrometry
MW	Mikrowelle
N ₂ O	Distickstoffoxid
NMR	Nuclear Magnetic Resonanz
NOE	Nuclear Overhauser Effect (Kern-Overhauser-Effekt)
NP	Normal Phase
OH	Hydroxygruppe
p	Druck

PC	Personal Computer
p_c	Kritischer Druck
PEEK	Polyetheretherketon
ppm	Parts per Million
RF	Radiofrequenz
RP	Reversed Phase
s	Sekunde
sc	Supercritical (Überkritisch)
scCO ₂	Überkritisches Kohlendioxid
SFC	Supercritical Fluid Chromatography (Überkritische Fluid Chromatographie)
SI	Dimethylsilyl-modifiziertes Kieselgel
SPIN	Silica Phase Immobilized Nitroxide
T	Temperatur
T ₁	Spin-Gitter-Relaxationszeit, longitudinale Relaxationszeit
T ₂	Spin-Spin-Relaxationszeit, transversale Relaxationszeit
T _c	Kritische Temperatur
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxid
TMS	Tetramethylsilan
UV	Ultraviolett
W	Signalhalbwertsbreite

1 Einleitung

Nach Arbeiten von Stern und Gerlach 1924 zur Richtungsquantelung des Elektronenspins^[1] und von Rabi und Mitarbeiter^[2, 3] zum Nachweis des Kernspins in einem Magnetfeld konnten die Gruppen von Purcell^[4] und Bloch^[5] 1945 den Kernresonanzeffekt auch an kondensierter Materie auffinden (Nobelpreis für Physik 1952). Obwohl dies damals noch nicht absehbar war, so hat sich die Kernmagnetische-Resonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie) bis heute zu einer der aussagekräftigsten qualitativen und quantitativen Analysemethoden in allen Bereichen der modernen Natur- und Biowissenschaften bis hin zur medizinischen Diagnostik entwickelt. Ein neues Forschungsfeld findet die NMR-Spektroskopie seit geraumer Zeit auch in den Ingenieurwissenschaften.

Das große Interesse der Chemiker an dem zunächst rein physikalisch bearbeiteten NMR-Phänomen begann mit der Entdeckung der chemischen Verschiebung^[6-8] Ende der 40er Jahre, denn damit ließ sich die NMR-Methode als praktische Spektroskopie zur Untersuchung chemischer Verbindungen einsetzen.

Der Vorteil der NMR-Spektroskopie liegt hierbei in der nicht invasiven, störungsfreien Messtechnik, dem sehr hohen Informationsgehalt, wie auch in der Tatsache, dass fast jedes Element des Periodensystems ein NMR-aktives Isotop besitzt, darunter die biologisch wichtigen Elemente ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O und ^{31}P .

Einen interessanten und frühverfolgten Zweig der NMR-Spektroskopie stellt die NMR-Detektion von fließenden und statischen Systemen im Durchfluss dar, die sogenannte Durchfluss-NMR-Spektroskopie^[9]. Sie ermöglicht, Analyten auf einfachem, schnellem, licht- und luftgeschütztem Weg der Detektion zuzuführen. Experimente auf diesem Gebiet wurden bereits seit Anfang der 50er Jahre durchgeführt, zunächst mit dem Ziel, die Signalintensität zu steigern^[10]. Später wurden Methoden entwickelt, um Flussraten und –profile sowie Diffusionskoeffizienten^[11-15] zu bestimmen. Weitere Entwicklungen in den 70er Jahren ermöglichten die Untersuchung von Intermediaten in chemischen Reaktionen^[16, 17].

Die Einführung der Puls-Fourier-Transform-Technik (PFT-Technik) durch Ernst und Anderson^[18] (Nobelpreis für Chemie 1991) Ende der 60er verschaffte der NMR-Spektroskopie, die im Vergleich zur Massenspektrometrie oder Fluoreszenzspektroskopie mit einem Mangel an Sensitivität kämpfen muss, Empfindlichkeitsgewinne um mehrere Zehnerpotenzen. Die PFT-NMR-Spektroskopie machte Messbereiche zugänglich, die bis dahin nicht erreichbar schienen. Sie verhalf letztendlich nicht nur der ¹³C-NMR-Spektroskopie zum Durchbruch, sondern ermöglichte auch die Entwicklung vieler weiterer Techniken, wie zum Beispiel die Kopplung mit der Chromatographie^[19, 20].

In den letzten Jahren hat sich dadurch vor allem die on-line Kopplung mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) zu einem aussagekräftigen Analyseverfahren in Industrie und Forschung entwickelt^[21-25]. Zudem sind Bestrebungen zur Etablierung von SFC-NMR-Systemen^[26-28] und CE/CEC-NMR Systemen^[29-31] im Gange.

Parallel dazu wurde die Durchfluss-NMR-Spektroskopie benutzt, um chemische Reaktionen unter ¹H-Detektion^[32-34] und ¹³C-Detektion^[35] zu beobachten. Im Bereich biochemischer Fragestellungen fanden zudem ²H, ¹⁹F, ²³Na, ³¹P, ⁴³Ca und ¹¹³Cd-Durchfluss-NMR-Untersuchungen statt, wozu auch Durchfluss-NMR-Untersuchungen mittels NMR-Bildgebung (Magnetic Resonance Imaging, MRI)^[36, 37] gehören.

Gerade die Vielfalt an Information und der einfache und schnelle Proben transfer machen die Durchfluss-NMR-Spektroskopie in einer Zeit, in der High-Throughput-Screening und schwierigste analytische Fragestellungen den Alltag eines analytischen Chemikers prägen, zu einer zwar teuren, aber äußerst effizienten analytischen Methode.

2 Problemstellung

Ziel der Experimente in dieser Arbeit ist die Verbesserung der Empfindlichkeit von Durchfluss- ^{13}C -NMR-Spektren allgemein und Durchfluss- ^1H -NMR-Spektren im überkritischen Zustand durch die Verwendung von immobilisierten paramagnetischen Verbindungen ("Immobilized Free Radical" Technik, IFR-Technik). Desweiteren soll die universelle Einsatzmöglichkeit der Durchfluss-NMR-Spektroskopie mittels eines speziellen SFC-NMR-Probenkopfes gezeigt werden.

Durch die Durchfluss-NMR-Spektroskopie sind schnelle Analysen von licht-, luft- und temperaturempfindlichen Substanzen mit hohem Probendurchsatz möglich. Jedoch ist dabei ein limitierender Faktor der NMR-Seite, der sich gerade bei der on-line-Kopplung mit der Chromatographie nachteilig auswirken kann, dass bestimmte Atome lange Spin-Gitter-Relaxationszeiten T_1 besitzen. Besonders in überkritischen Fluiden sind, aufgrund der kleineren Korrelationszeiten, die typischen T_1 -Relaxationszeiten von Protonen um den Faktor 3-10 höher als in herkömmlichen Lösemitteln. Ebenso besitzen ^{13}C -Atome eine lange T_1 -Relaxationszeit, was ihre Detektion im Durchfluss besonders erschwert.

Um ein NMR-Signal mit maximaler Intensität und quantitative NMR-Spektren zu erhalten, muss nach dem Einbringen der Probe in das Magnetfeld eine bestimmte Wartezeit eingehalten werden. Diese Wartezeit liegt in der Größenordnung der fünffachen T_1 -Relaxationszeit des am langsamsten relaxierenden Atomkerns. Im continuous-flow Verfahren wird die Probe jedoch ständig über eine Kapillare der NMR-Messzelle zugeführt, so dass diese Zeit nicht beliebig lang sein darf, ansonsten verläßt die Probe die Messzelle vor der Aufnahme eines Spektrums. Andererseits wirkt sich ein zu langsamer Fluss negativ auf die chromatographische Trennleistung aus. Dadurch sind die Anwendbarkeit der on-line-HPLC-NMR-, bzw. on-line-SFC-NMR-Kopplung Grenzen bei der Fließgeschwindigkeit gesetzt. Außerdem ist eine Quantifizierung der erhaltenen Spektren bei gewissem Fluss nicht möglich, wenn die untersuchten Atomkerne sehr unterschiedliche Spin-Gitter-Relaxationszeiten T_1 haben und deshalb die langsam relaxierenden Atome in

der Zeit vom Eintreten der Probe in den Magneten bis zur Detektion ihre volle z-Magnetisierung nicht erreichen. Eine Möglichkeit, die volle z-Magnetisierung bei langsam relaxierenden Kernen zu erreichen ist das Vorschalten eines Vormagnetisierungsvolumens. Dies kann allerdings auf chromatographischer Seite zu Rückvermischungseffekten führen, falls das Volumen zu groß ist^[38, 39].

Eine Möglichkeit, diese Probleme zu umgehen, besteht darin, die Spin-Gitter-Relaxationszeiten von Atomkernen durch das Einbringen von stabilen freien Radikalen (sog. Spin-Labels) oder paramagnetischen Reagenzien zu reduzieren. Wenn diese Spin-Labels in Lösung vorliegen, wird eine Verkürzung der Spin-Gitter-Relaxationszeiten der zu untersuchenden Atomkerne zwar erreicht, allerdings werden gleichzeitig auch deren transversale Spin-Spin-Relaxationszeiten T_2 verkürzt, was zu drastischen Linienverbreiterungen^[17] und somit zum Verlust der Auflösung in den NMR-Spektren führt. Die Zugabe der Relaxationsreagenzien kontaminiert zudem die Probe mit unerwünschter Substanz.

Diese Probleme können umgangen werden, indem die freien Radikale und paramagnetischen Verbindungen auf einem festen Träger immobilisiert werden. Durch Einbringen dieser dann immobilisierten freien Radikale (IFR) und immobilisierten paramagnetischen Verbindungen in das Vormagnetisierungsvolumen des Durchfluss-NMR-Systems wird erreicht, dass nur die Spin-Gitter-Relaxationszeiten der zu untersuchenden Kerne verkürzt werden. Die spezielle Immobilisierungstechnik verhindert so effektiv die Verkürzung der Spin-Spin-Relaxationszeiten und die damit verbundene Linienverbreiterung im NMR-Spektrum. Um sicherzustellen, dass die Radikale und paramagnetischen Verbindungen im Vormagnetisierungsvolumen verbleiben, werden diese auf feste Trägermaterialien chemisch angebunden. Die Anbindung geschieht durch eine klassische Oberflächenmodifizierung, die auch zur Darstellung chromatographischer Trennphasen eingesetzt wird. Zwischen Radikal und Trägermaterial wird zusätzlich ein Spacer eingeführt, der sowohl die Zugänglichkeit als auch die Beweglichkeit des immobilisierten freien Radikals und damit die Effektivität in Bezug auf die Verkürzung der Relaxationszeiten erhöht. Zur Charakterisierung der synthetisierten paramagnetischen Phasen werden die ESR-Spektroskopie sowie die EXAFS-Spektroskopie eingesetzt.

3 Durchfluss-NMR-Spektroskopie

3.1 Allgemeine Grundlagen der Durchfluss-NMR-Spektroskopie

Die Durchfluss-NMR-Spektroskopie bietet gegenüber der herkömmlichen „Röhrchen“-NMR-Spektroskopie den Vorteil der Schnelligkeit des Probentransfers in die Messzelle und der schonenden Probenbehandlung, so dass selbst licht- und luftempfindliche Substanzen der NMR-Messung artefaktfrei zugänglich sind. Dies wird in Abbildung 1 deutlich, bei der ein konventioneller Probenkopf und ein Durchflussprobenkopf gezeigt sind.

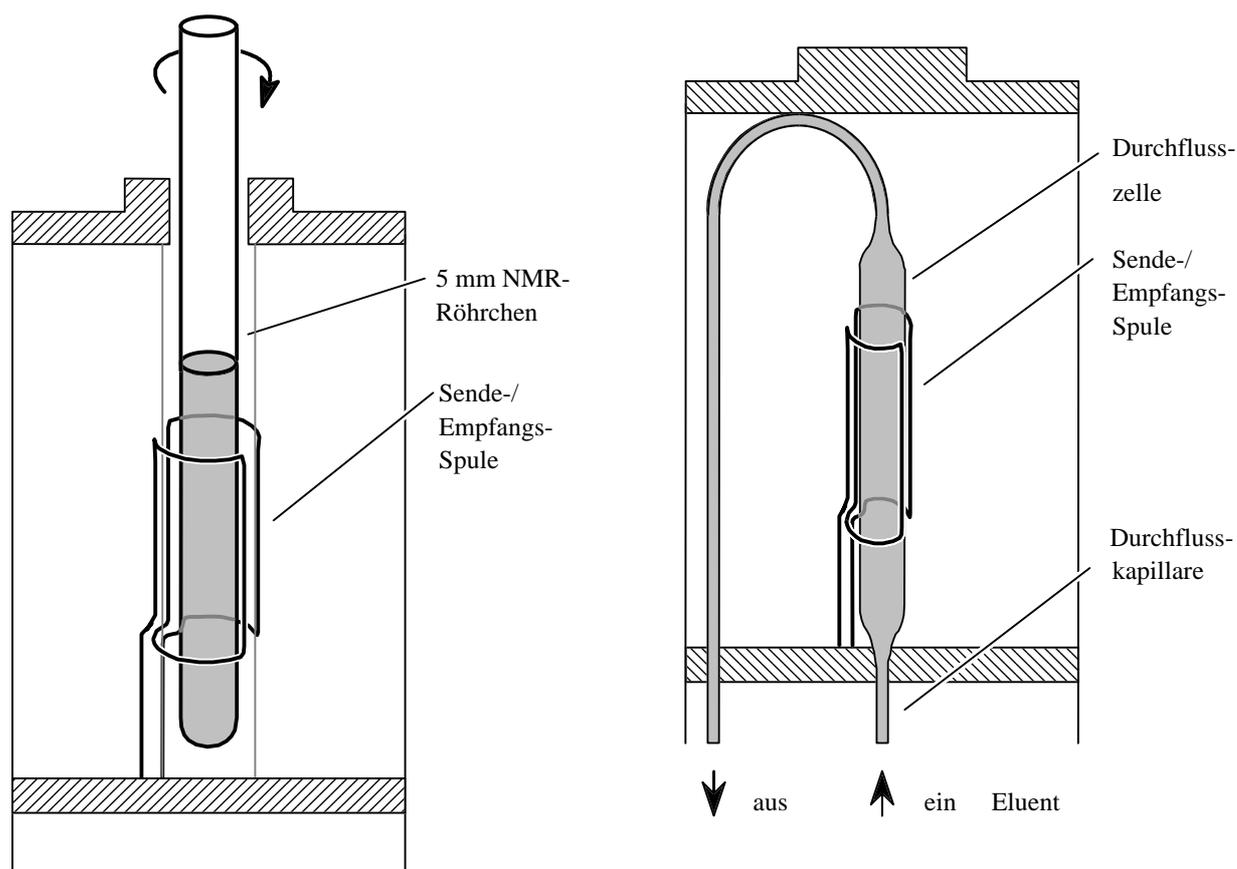


Abbildung 1: Vergleich zwischen konventionellem und Durchflussprobenkopf

Der Durchflussprobenkopf sollte folgende Eigenschaften haben:

- a) Die Geometrie der Messzelle soll einen laminaren Fluss ermöglichen.
- b) Wandeffekte (Memoryeffekte) müssen vermieden werden.
- c) Bei einem gegebenem Volumen soll die NMR-Empfindlichkeit möglichst hoch sein.
- d) Die erzielte Auflösung der NMR-Spektren soll die Interpretation auch komplexer Spin-Systeme ermöglichen.

Das Signal/Rauschen-Verhältnis (S/N) eines NMR-Messkopfes wird durch folgende Parameter definiert^[40]:

$$\text{Gleichung 1: } \frac{S}{N} \sim N\gamma \cdot I(I+1) \cdot \emptyset \cdot \frac{B_0^{3/2} \cdot (Q \cdot V_s)^{1/2}}{b^{1/2} \cdot T^{3/2} \cdot f}$$

N = Anzahl der Atome pro Volumeneinheit, γ = gyromagnetisches Verhältnis, I = Spinquantenzahl, \emptyset = Füllfaktor der Spule, B_0 = Magnetfeldstärke (eigentlich magnetische Flussdichte), Q = Gütefaktor der Spule, V_s = Detektionsvolumen, b = Bandbreite des Empfängers, T = Messtemperatur und f = Rauschzahl des Empfangskreises

Steigende Empfindlichkeitswerte können danach erzielt werden durch:

- a) Erhöhung der Anzahl N der Atomkerne pro Volumeneinheit
- b) Messung von Atomkernen mit hohem gyromagnetischem Verhältnis γ
- c) Messung von Atomkernen mit hoher Spinquantenzahl I
- d) Erhöhung der Magnetfeldstärke B_0
- e) Erhöhung des Füllfaktors \emptyset der NMR-Messspule, $\emptyset = V_s/V_C$, V_s = Volumen der Messprobe, V_C = Volumen der Messspule
- f) Erhöhung des Gütefaktors Q der NMR-Messspule
- g) Erhöhung des Volumens V_s der Messprobe
- h) Erniedrigung der Bandbreite b des Empfängers
- i) Erniedrigung der Messtemperatur T

j) Erniedrigung der Rauschzahl f des Empfangkreises

Wichtig für die Konstruktion von Probenköpfen^[41] sind die Punkte e, f und g. Bei Verwendung von Messspulen gleicher Geometrie und gleichen Materials ändern sich die Gütefaktoren nicht, damit bleiben als veränderliche Parameter das Volumen der Messprobe sowie der Füllfaktor der Messspule übrig. Im Gegensatz zur konventionellen Aufnahme sollte das Detektorvolumen möglichst gering sein, ein Ausgleich der somit niedrigeren Empfindlichkeitswerte kann nur durch Erhöhung des Spulenfüllfaktors \varnothing versucht werden. Dies ist möglich, indem die Spule direkt auf das Glas- oder Saphirrohr der Durchflusszelle aufgebracht wird. Damit unterscheiden sich Spulen- und Messproben-Volumina kaum noch, der Füllfaktor ist nahezu ideal. Bei der Konstruktion von Hochfeld-NMR-Messköpfen haben sich Doppelsattel-Helmholtz-Spulen unterschiedlicher Materialzusammensetzung bewährt^[42, 43]. Nach dem derzeitigen Stand der Entwicklung lassen sich diese Spulen direkt auf eine zylindrische Glas- oder Saphirzelle des Außendurchmessers von 2 bis 4 mm anbringen. Der Nachteil dieser Konzeption liegt darin, dass eine Rotation des Probenröhrchens nun nicht mehr durchgeführt werden kann, durch die in der konventionellen NMR-Spektroskopie Magnetfeldinhomogenitäten ausgemittelt werden. Die feste Anordnung der Probenzelle zieht andererseits beim Probenwechsel nur geringe Änderungen der Feldhomogenität nach sich. Dies verkürzt die Zeit zur Magnetfeld-Homogenisierung und gewährleistet einen hohen Probendurchsatz.

Die Wahl des optimalen Detektorvolumens einer Durchflusszelle hängt nun von verschiedenen Parametern ab. Aus der Sicht der Chromatographie wäre, zur Vermeidung von Dispersionseffekten, ein Volumen der Größenordnung 1-10 μl ideal. In der konventionellen, hochauflösenden NMR-Spektroskopie beträgt jedoch das zum Erreichen der notwendigen Empfindlichkeit verwendete Detektionsvolumen 250 μl (5-mm-NMR-Messröhrchen).

Neben Empfindlichkeitserwägungen muss die Abhängigkeit der Signalhalbwidths von der Fließgeschwindigkeit beachtet werden. Ausgehend von 4,6 x 25 cm-Säulen in der Chromatographie eignen sich Messzellen mit einem Volumen von 120 μl gut zur Kopplung mit der NMR-Spektroskopie, da die hier erreichbaren Auflösungs- und Empfindlichkeitswerte die NMR-

Registrierung chromatographischer Trennfraktionen in kurzen Messzeiten von 1 - 8 s ermöglichen.

3.1.1 Theoretische Grundlagen

Durch den ständigen Austausch des zu untersuchenden Mediums ergeben sich bei der Durchfluss-Detektion, im Vergleich zur statischen Detektion, besondere Effekte:

Konzentriert sich die Probe auf ein geringes Volumen, wie es in der Chromatographie der Fall ist, so steht durch die begrenzte Verweilzeit der Probe in der Messzelle auch nur eine begrenzte Zeit pro Chromatographiepeak zur Spektrenakkumulation zur Verfügung.

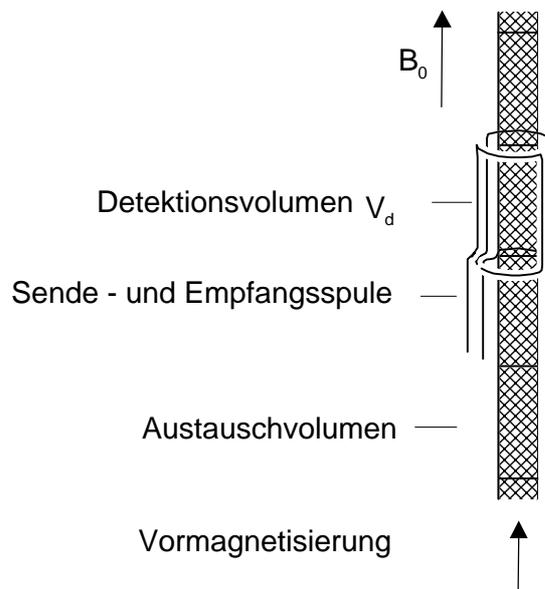


Abbildung 2: Durchfluss eines Kernensembles durch eine NMR-Messzelle

Bei konstanter Strömungsgeschwindigkeit erfolgt der vollständige Austausch des Kernensembles (Austauschvolumen) nach Ablauf der Aufenthaltsdauer (vgl. Abbildung 2). Der Bereich innerhalb des Magneten bis zur Detektionszelle wird als Vormagnetisierungsvolumen bezeichnet. Die Aufenthaltsdauer τ der Probe in der Messzelle des fließenden Systems ist durch das Volumen V_d der Messzelle und die Fließgeschwindigkeit u vorgegeben:

Gleichung 2:
$$\tau = V_d/u$$

In Tabelle 1 ist die berechnete Aufenthaltszeit τ einer Probe im Messbereich eines 190 μl Durchflussprobenkopfes, in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit, dargestellt.

Flussrate u in ml/min	Aufenthaltszeit τ im Messbereich in s	Flussrate u in ml/min	Aufenthaltszeit τ im Messbereich in s
0,0	∞	2	5,7
0,05	228	3	3,8
0,1	114	4	2,8
0,2	57	5	2,28
0,3	38	10	1,14
0,4	28,5	20	0,57
0,5	22,8	50	0,23
1	11,4	100	0,11

Tabelle 1: Aufenthaltszeit einer Probe im Messbereich eines 190 μl Probenkopfes in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit

Um Sättigung in der NMR-Spektroskopie zu vermeiden, muss vor der Aufnahme eines Signals (Free Induction Decay, FID) eine Wartezeit eingehalten werden, welche als Relaxationszeit bezeichnet wird. Dies gilt sowohl für das erstmalige Einbringen einer Probe in das Magnetfeld, als auch für alle folgenden FIDs. Für die Durchfluss-NMR-Spektroskopie bedeutet dieses, besonders die Zeit zwischen dem Eintreten der Probe in den Magneten bis zur Detektion zu beachten, d.h. der Fluss muss dem jeweiligen Vormagnetisierungsvolumen und den bestehenden Relaxationszeiten angepasst werden.

Eine kürzere Aufenthaltsdauer des Analyten in der Messzelle bewirkt eine Verkürzung der effektiven Lebensdauer $1/T_{n \text{ effektiv}}$ der einzelnen Spinzustände. Dadurch werden die Relaxationsraten, die die reziproken Relaxationszeiten darstellen, um den Wert $1/\tau$ erhöht:

Gleichung 3:
$$1/T_{n \text{ effektiv}} = \sum 1/T_i + 1/\tau$$

Der Einfluss der Fließgeschwindigkeit kann daher auch als ein Relaxationseffekt verstanden werden. Relaxationseffekte wirken sich sowohl auf die effektive Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 , welche im Durchfluss indirekt die Signalintensität bestimmt, als auch auf die Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 , welche umgekehrt proportional zur Linienbreite ist, aus. Es gilt:

Gleichung 4:
$$1/T_{1\text{ Fluss}} = 1/T_{1\text{ stationär}} + 1/\tau$$

Gleichung 5:
$$1/T_{2\text{ Fluss}} = 1/T_{2\text{ stationär}} + 1/\tau$$

Dies hat folgende Konsequenzen:

Die Gleichgewichtsmagnetisierung stellt sich durch den ständigen Zustrom nicht angeregter Kerne schneller wieder ein, als es allein durch die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 (*longitudinale* Relaxationszeit) der Fall wäre. Dadurch ist eine schnellere Pulswiederholungsrate möglich und führt somit zu einem Empfindlichkeitsgewinn.

Andererseits nimmt die Intensität des detektierten Signals durch das ständige Abfließen angeregter Kerne schneller ab, als es allein durch die Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 (*transversale* Relaxationszeit) der Fall wäre. Die Aufenthaltsdauer gegenüber statischen Messungen ist verkürzt. Nach der Heisenbergschen Unschärferelation

Gleichung 6:
$$\tau \cdot \Delta E = \frac{h}{4\pi}$$

führt eine verringerte Lebensdauer τ zu einer größeren Unbestimmtheit der Energie und somit zu einem breiteren NMR-Signal. Wie in Gleichung 7 beschrieben ist die Signalhalbwertsbreite W umgekehrt proportional zu T_2 :

Gleichung 7:
$$W = 1/\pi T_2$$

Daraus folgt für die Linienbreiten im Fluss:

Gleichung 8:
$$W_{\text{Fluss}} = W_{\text{stationär}} + 1/\tau$$

3.1.2 SFC-NMR-Durchflussprobenköpfe

Basierend auf den oben genannten Überlegungen wurden die in Abbildung 3 gezeigten Anordnungen zur Aufnahme von Durchfluss-NMR-Spektren in Kooperation mit der Firma Bruker entwickelt. Für das Detektionsvolumen der Durchfluss-NMR-Messzelle für SFC-Trennungen mit analytischen Trennsäulen (4,6 x 250 mm) wurde geeigneterweise ein Volumen von 120 μl gewählt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten zwei verschiedene SFC-NMR-Probenköpfe verwendet werden. Der *selektive* SFC- ^1H -NMR-Durchflussprobenkopf besitzt nur eine Spule, die auf die Detektion von Protonen abgestimmt ist. Er ist ansonsten baugleich mit dem im Folgenden beschriebenen inversen Probenkopf.

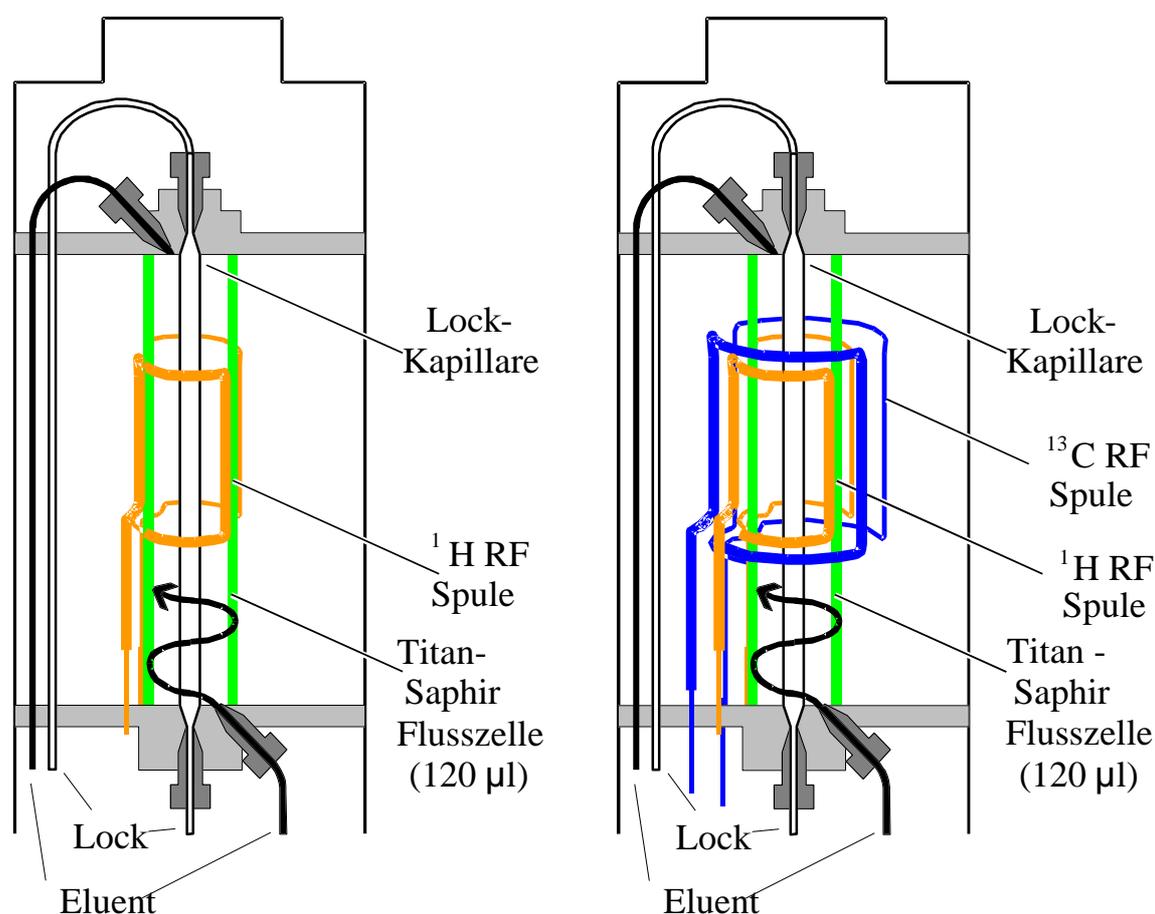


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des selektiven SFC- ^1H -NMR-Durchflussprobenkopfes (links) und des inversen SFC-NMR-Durchflussprobenkopfes (rechts)

Der *inverse* SFC-NMR-Durchflussprobenkopf besitzt zwei Doppelsattel-Helmholtz-Spulen, jeweils eine für die ^{13}C -NMR-Detektion (außen) und eine für die ^1H -NMR-Detektion (innen), diese Anordnung wird „invers“ genannt. Im Gegensatz zu dualen Probenköpfen besitzen inverse Probenköpfe aufgrund dieses Aufbaus eine höhere Empfindlichkeit für die Protonen.

Der Durchflussdetektor besteht aus einer senkrecht stehenden bis 350 bar druckstabilen Titan-Saphir-Durchflusszelle mit 120 μl aktivem Detektionsvolumen, auf der die zwei Doppelsattel-Helmholtzspulen angebracht sind. Die Messzelle selbst befindet sich in einem Glasdewar, in dem die Temperatur mit Hilfe eines Thermoelements überwacht werden kann (bis 80°C). Zu- und Ableitungen werden am Boden des Messkopfes über Titanleitungen nach außen geführt. Ein koaxial im Inneren der Saphirzelle angebrachter Lockcontainer kann über PEEK-Zuleitungen mit deuteriertem Lösemittel gefüllt werden und dient zur Feld-Frequenz-Stabilisierung.

Der Austausch von Routinemessköpfen durch den Durchflussprobenkopf ist in wenigen Sekunden durch das Lösen zweier Schrauben möglich. Generell wird die Messzelle entgegengesetzt zum Erdgravitationsfeld gefüllt und durchströmt, eventuell auftretende Luftblasen werden damit in Fließrichtung aus dem Detektor entfernt.

Die Qualität eines ^1H -NMR-Probenkopfes wird neben der Signalhalbwertsbreite hauptsächlich durch die Linienform in Höhe der ^{13}C -Satelliten von Chloroform (Hump-Test) charakterisiert. Im 120 μl SFC-Durchflussprobenkopf beträgt die Linienbreite in Höhe der ^{13}C -Satelliten (0,55 % des Hauptsignals) 13-17 Hz. Bei konventionellen Messbedingungen in Lösung können mit entgasten Testproben unter Rotation des Probenröhrchens Werte in der Größenordnung von 3-5 Hz erzielt werden.

3.1.3 ^{13}C -NMR-Durchflussprobenkopf

In der Untersuchung komplexer Reaktionsvorgänge ist die ^{13}C -NMR-Spektroskopie der ^1H -NMR-Spektroskopie überlegen, da durch den mehrfach größeren Verschiebungsbereich Signalüberlappungen nur sehr selten auftreten. Diesem großen Vorteil der Selektivität steht die geringe Empfindlichkeit der Messmethode (von 1/1000 zur Protonenresonanz) entgegen. Durch Einsatz ^{13}C -

markierter Verbindungen können Empfindlichkeitswerte von 1/60 der Protonenresonanz erzielt werden. In vielen Anwendungsfällen reicht jedoch das natürliche Isotopenverhältnis aus, indem die notwendige Messempfindlichkeit durch Verlängerung des Messzeitintervalls erzielt wird.

Die Messanordnung der dualen Durchflussprobenköpfe^[44] beruht ebenfalls auf den bereits erwähnten Konstruktions-Prinzipien. Dualprobenköpfe können sowohl zur Messung von ^1H -NMR- als auch von ^{13}C -NMR-Spektren über zwei coaxial angeordnete Messspulen verwendet werden. Die innere Spule dient zur Aufnahme der ^{13}C -NMR-Spektren sowie zur Feld/Frequenz-Stabilisierung (Lock), die äußere Spule kann entweder zur Protonenentkopplung oder zur Aufnahme von Protonen-Spektren verwendet werden. Die Empfindlichkeit der Protonenmessungen ist jedoch, bedingt durch den geringeren Füllfaktor, schlechter als bei selektiven Probenköpfen.

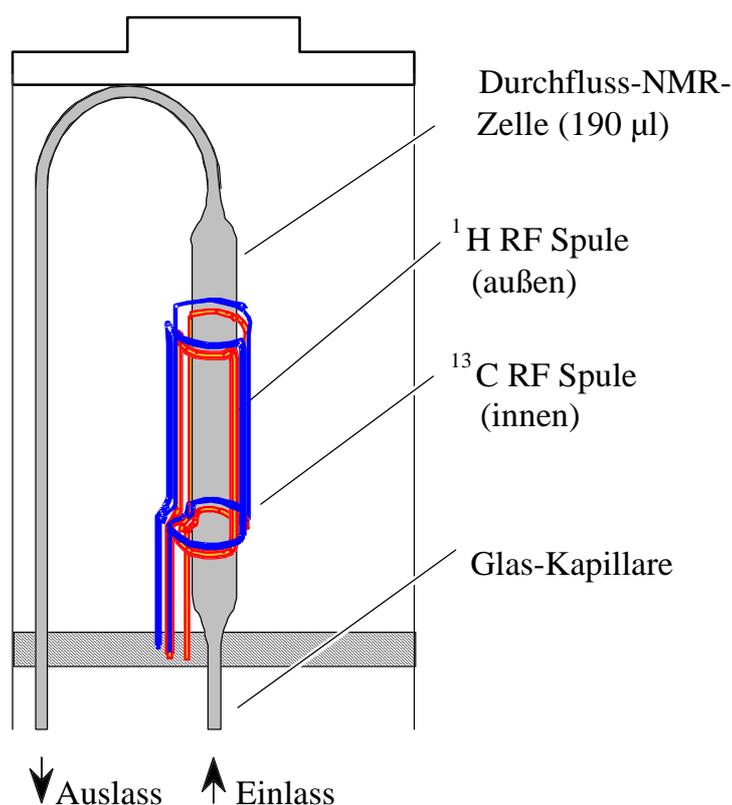


Abbildung 4: Schematische Darstellung des dualen ^{13}C -NMR-Durchflussprobenkopfes

Als Auflösungstest für ^{13}C -NMR-Probenköpfe dient das ^{13}C -NMR-Spektrum von Benzol unter Protonenentkopplung. Für den dualen ^{13}C -NMR-Durchflussprobenkopf beträgt die Signalhalbwertsbreite 0,22 Hz. Der Wert der entsprechenden rotierenden Anordnung bei einer entgasten Probe liegt bei 0,08 Hz. Dies zeigt, dass auch ohne Probenrotation eine sehr gute Linienform erzielbar ist.

Bei Verwendung der Entkopplerspule zur Aufnahme der Protonenspektren wird eine Linienbreite von 0,7 Hz erreicht. Damit kann die Aufnahme von Durchfluss- ^1H -NMR-Spektren ohne Informationsverlust in Hinblick auf Spin-Spin-Kopplungen auch mit diesem dualen Probenkopf erfolgen.

3.2 Quantitative Durchfluss-NMR-Spektroskopie

Obwohl die quantitative Analyse^[45] mittels NMR-Spektroskopie fast annähernd seit ihrer Entdeckung in den 50er Jahren betrieben wird, hat sie im Vergleich zu den anderen optischen Methoden (UV/Vis, IR, MW) keine vergleichbare Bedeutung in den Labors der Welt erreicht. Gründe sind sicherlich in den Kosten, aber auch in den Anforderungen der Methode selbst zu suchen. Dennoch ist gerade die NMR-Spektroskopie dafür prädestiniert, komplexe Mischungen in ihrer relativen Menge zu quantifizieren. Dies ist möglich, da der Absorptionskoeffizient der elektromagnetischen Strahlung für alle Kerne der selben Spezies identisch ist. Im Gegensatz zu den anderen genannten Methoden, ist somit eine Kalibrierung bei jeder Wellenlänge nicht notwendig. Die relative Menge einer Komponente in einer Mischung kann so mittels NMR bestimmt werden, ohne vorher die Komponente aus dieser Mischung separieren und den Absorptionskoeffizienten in einer Messung bestimmen zu müssen.

Die geringe Linienbreite der NMR-Signale und vor allem die Breite des optischen Spektralbereiches in der ^{13}C -NMR-Spektroskopie führt nur selten zu einer Überlappung der Signale der einzelnen Komponenten, so dass diese gut voneinander unterschieden und analysiert werden können.

Als Nachteil erweist sich jedoch dazu die geringe Empfindlichkeit der NMR-Methode, die durch die geringe Anregungsfrequenz der Kernspinübergänge im Vergleich zu den Elektronen-, Schwingungs- und Rotationsübergängen der optischen Methoden herrührt. Ebenso bewegt sich die NMR-Zeitskala im

Sekunden- und Millisekunden-Bereich, selten in dem von Mikrosekunden, während optische Methoden in Bereiche von Nano- und Picosekunden vorstoßen.

Die Verwendung der Durchfluss- ^{13}C -NMR-Spektroskopie ist aufgrund des kleinen gyromagnetischen Verhältnisses, der geringen natürlichen Häufigkeit und der langen T_1 -Zeiten keine Routinemethode. Aber in der Untersuchung komplexer Reaktionsvorgänge ist sie der Protonen-NMR-Spektroskopie aufgrund der viel höheren optischen Spektralbreite (ca. 220 ppm) deutlich überlegen. So wurde die Durchfluss- ^{13}C -NMR-Spektroskopie zur Untersuchung von Reaktionszwischenstufen^[46], elektrochemischen Reaktionen^[47] und *in vivo* Metabolismusstudien^[48] eingesetzt. Jedoch ist die Quantifizierbarkeit der in diesen Studien aufgenommenen Spektren schlecht, obgleich dieses zur Strukturaufklärung sehr hilfreich wäre.

Für die konventionelle ^{13}C -NMR-Spektroskopie sind einige Methoden bekannt die Quantifizierbarkeit zu erhöhen. Chromacetylacetonat ($\text{Cr}(\text{acac})_3$) wird oft verwendet um die T_1 -Relaxationszeit zu verkürzen und den Kern-Overhauser-Effekt (NOE) in protonenentkoppelten ^{13}C -NMR-Spektren zu eliminieren^[49-53]. Jedoch sind auch Probleme dieser Methode bei größeren Molekülen bekannt^[54].

Die Inverse-Gated-Decoupling-Methode kann ebenfalls als Methode zur Eliminierung des NOEs^[55, 56] verwendet werden. Bei dieser Methode ist der Entkoppler während der Aufnahme des FIDs eingeschaltet und während der Wartezeit ausgeschaltet. Dabei muss die Pulswiederholzeit, die aus der Aufnahmezeit AQ und der Wartezeit D1 besteht, wenigstens 3 bis 5 mal der Spin-Gitter-Relaxationszeit des am langsamsten relaxierenden C-Atoms entsprechen. Bei 3-facher T_1 -Zeit sind 95% und bei 5-facher T_1 -Zeit 99% der vollen z-Magnetisierung erreicht.

Einige Publikationen beschäftigen sich mit der Anwendung der quantitativen Analyse und Optimierungsschritten unter Verwendung der konventionellen ^{13}C -NMR-Spektroskopie^[55, 57, 58].

Die erste Anwendung der quantitativen Durchfluss- ^{13}C -NMR-Spektroskopie wurde von Laude und Wilkins beschrieben^[59], kurze Zeit später folgten weitere Anwendungen^[60, 61]. Quantifizierungen wurden in diesen Fällen mittels Einführen eines 30 ml Vormagnetisierungsvolumens unterhalb des Probenkopfes erzielt. Aber Vormagnetisierungsvolumen solch einer Größe

führen zu signifikanten Linienverbreiterungen in den Kapillaren bei Anwendungen wie der HPLC-NMR-Kopplung^[62].

Bruck und Fyfe^[63] verwendeten erstmals immobilisierte freie Radikale um das Vormagnetisierungsvolumen zu verringern, unter Vermeidung der gleichzeitig auftretende Linienverbreiterungen bei direkter Zugabe der Relaxationsreagenzien in die Lösung.

Wilkins^[64] und später Laude^[65] erweiterten diese Technik auf supraleitende Magneten (Abbildung 5) und zeigten so das Potential der immobilisierten freien Radikale für die quantitative ¹³C-NMR-Spektroskopie auf.

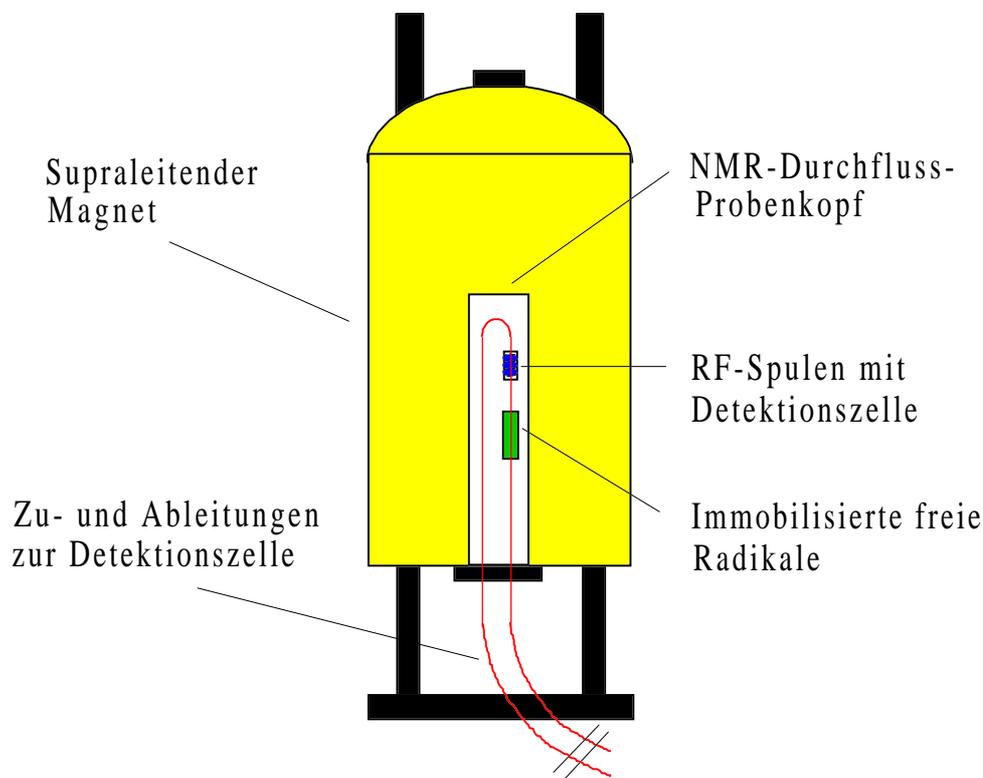


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Verwendung von immobilisierten freien Radikalen (IFR) in der Durchfluss-NMR-Spektroskopie

3.2.1 Voraussetzungen der quantitativen Durchfluss-NMR-Spektroskopie

Zur Durchführung der quantitativen NMR-Spektroskopie im Durchfluss müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein, die im Folgenden besprochen werden sollen.

Quantitative NMR-Spektren können nur erzielt werden, wenn

A: sowohl vor dem ersten Puls auf eine Probe, als auch zwischen allen weiteren Pulsen die volle z-Magnetisierung erreicht ist, das heißt, die Verteilung der Kernspins auf die Kernniveaus im Magnetfeld muss nach dem Gesetz der Boltzmann-Verteilung (Gleichung 9) erreicht sein.

Gleichung 9:
$$\frac{N_{\alpha}}{N_{\beta}} = e^{-\frac{E_{\alpha}-E_{\beta}}{RT}} \quad (\text{Boltzmannsches Verteilungsgesetz})$$

Die Verteilung der Kerne auf die entsprechenden Kernzustände α und β kann nur innerhalb des Magnetfeldes erfolgen, da nur dort Kernspinzustände erzeugt werden (vom Erdmagnetfeld abgesehen). Für die Durchfluss-NMR-Spektroskopie bedeutet dieses, dass die Zeit zwischen dem Eintreten der im Fluss befindlichen Probe in den Magneten bis zur Detektion ausreichend sein muss, um die vollständige Verteilung der Kernspins auf die Kernzustände α und β zu gewährleisten. Die dafür benötigte Zeit wird Relaxationszeit genannt und richtet sich immer nach der größeren Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 (es gilt stets: $T_1 \geq T_2$). Bei Kernen mit langen T_1 -Zeiten (z.B. ^{13}C) sind sehr lange Wartezeiten zwischen den einzelnen Pulsen einzuhalten, da sich, wie bereits erwähnt, die Pulswiederholzeit nach dem am langsamsten relaxierenden Atom in der Lösung richtet. Dies kann bei einer 3-5fachen T_1 -Zeit zu sehr langen Messzeiten führen. Zudem ist bei einer Methode, wie der Durchfluss-NMR-Spektroskopie eine beliebig lange Wartezeit nicht möglich, da sich die Substanz nur eine begrenzte Zeit in der Messzelle aufhält.

B: Die Auslenkung der z-Magnetisierung muss (bei langer T_1) nicht notwendigerweise 90° betragen. Der optimale Auslenkungswinkel in Bezug auf hohe Intensität und kurze Wartezeit ist der Ernst-Winkel α_E , benannt nach Richard Ernst.

Gleichung 10:
$$\cos\alpha_E = e^{-\frac{t_r}{T_1}}$$

Der Ernst-Winkel α_E berechnet sich nach Gleichung 10 aus der Pulswiederholzeit t_r und Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 des am langsamsten relaxierenden Atomkerns. Ein 90° -Puls erhöht jedoch die Signalintensität und somit das Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Damit ist die Integration des Peaks erleichtert und der dabei auftretende Fehler minimalisiert. Bei kleinen Auslenkungen muss somit oft wiederholt werden, um die gleiche Intensität wie bei 90° Pulsen zu erreichen. Folglich steigt auch hier der Messzeitaufwand ebenfalls stark an.

C: Durch das Einbringen von paramagnetischen Substanzen können die T_1 -Zeiten aller Kerne sehr stark verkürzt werden und somit können große Pulswinkel, eventuell zusammen mit einer kurzen Wartezeit, angewendet werden (IFR-Technik). Dies wird im Rahmen dieser Dissertation näher untersucht werden.

Im Folgenden sollen nochmals die wichtigsten Begriffe auf diesem Gebiet erklärt werden.

3.2.1.1 Spin-Gitter-Relaxation T_1

Die Spin-Gitter Relaxationszeit T_1 ist die Zeit, nach der einem Spinsystem zur vollständigen Relaxation noch $1/e$ der Gleichgewichtsmagnetisierung M_0 fehlt. Die Spin-Gitter-Relaxation bestimmt den Aufbau der makroskopischen Anfangsmagnetisierung M_0 nach einem Puls sowie beim erstmaligen Einbringen der Probe in das Magnetfeld. Bei der Relaxation in den Anfangszustand muss die vorher aufgenommene Energie, z.B. nach einem Radio-Frequenz Puls (RF-Puls), wieder an die Umgebung, das sogenannte Gitter, abgegeben werden, dieses ändert die Energie des Systems und somit ist die Spin-Gitter-Relaxation ein Enthalpie-Effekt. Für diesen Energietransfer müssen geeignete Partner (Wand, Moleküle) vorhanden sein.

Je nach Wechselwirkungsmechanismus unterscheidet man folgende Relaxationsmechanismen:

Dipolare Relaxation „DD“

Die dipolare Relaxation ist insbesondere für die ^{13}C -NMR-Spektroskopie der wichtigste Relaxationsmechanismus und wird durch Wechselwirkung der Kernmomente über den Raum hinweg verursacht. Infolge der Brown'schen Molekularbewegung aller Moleküle sind die beobachteten Kerne einem zeitlich fluktuierendem Zusatzmagnetfeld ausgesetzt. Wenn die Reorientierungszeit der Moleküle, auch Korrelationszeit τ_c genannt, in die Größenordnung der reziproken Larmor-Frequenz der ^{13}C -Kerne fällt, können diese in Resonanz mit den durch die Molekülbewegung hervorgerufenen lokalen Magnetfeldern B_{loc} treten und ihre Energie an das Gitter abgeben. T_1 und τ_c sind umgekehrt proportional, d. h. je schneller sich ein Molekül bewegt, um so länger ist die Relaxationszeit T_1 . Über die Stokes-Einstein-Beziehung (Gleichung 11) kann die Korrelationszeit τ_c abgeschätzt werden:

$$\text{Gleichung 11: } \tau_c = \frac{4\pi\eta r^3}{3kT}$$

τ_c ist also von der Viskosität η des Mediums, dem Radius r des Moleküls und der Temperatur T abhängig.

Der Betrag der lokalen Änderung der Feldstärke ist durch Gleichung 12 gegeben.

$$\text{Gleichung 12: } \Delta B = \frac{\mu_0}{4\pi} 3\mu \frac{(3\cos^2\theta - 1)}{r^3}$$

Das lokale, von Ort zu Ort variierende B-Feld ist u.a. vom Winkel θ der Kernverbindungslinien zur Richtung des B_0 -Feldes abhängig. In Lösung oder reinen Flüssigkeiten ist der Winkel θ wegen der schnellen Rotations- und Translationsbewegung der Moleküle zeitlich veränderlich, und der Ausdruck $(3\cos^2\theta - 1)$ verschwindet. Eine Linienverbreiterung infolge dipolarer Kopplung wird daher nicht beobachtet. Sie tritt jedoch dann auf, wenn das Molekül wie im Kristall zur Richtung des B_0 -Feldes eine feste Orientierung einnimmt. Die Linienbreiten in der Festkörper-NMR-Spektroskopie unterscheiden sich dadurch um mehrere Zehnerpotenzen von den Linienbreiten in der Hochauflösungs-NMR-Spektroskopie.

Spin-Rotations-Relaxation „SR“

Dieser Relaxationsprozeß wird durch intramolekulare dynamische Vorgänge wie die Rotationen von Methylgruppen hervorgerufen. Die schnelle Rotation der Bindungselektronen baut am Ort des Methyl-C-Atoms ein lokales Magnetfeld auf. Bei allen effektiven Stößen ändert sich der Rotationszustand der Methyl-Gruppe und somit die Größe des lokalen Zusatzfeldes. Liegen die Stoßfrequenzen in der Größenordnung der Larmor-Frequenz des ^{13}C -Atoms, so kann dieser Mechanismus zum Energieaustausch genützt werden.

Relaxation durch anisotrope Abschirmung „SA“

Der Effekt der anisotropen chemischen Verschiebung führt zu einer weiteren Relaxationsbeschleunigung. Die Abschirmungskonstante der chemischen Verschiebung ist ein Tensor. Von verschiedenen Raumrichtungen betrachtet, besitzen die Kohlenstoff-Atome unterschiedliche chemische Verschiebungswerte δ . Bedingt durch die Anisotropie dieses Tensors (shielding anisotropy, SA) ist daher mit der Molekülbewegung wiederum eine lokale Feldänderung gekoppelt, die zur Relaxation führen kann. Dieser Mechanismus ist vor allem bei Carbonyl- oder Acetylen-Gruppen, die eine relativ hohe Anisotropie von δ besitzen, von Bedeutung.

Quadrupolrelaxation „EQ“

Für Kerne mit einem Kernspin $I > \frac{1}{2}$ führt die nicht kugelsymmetrische Ladungsverteilung zu einem elektrischen Quadrupolmoment. Dieses kann mit den fluktuierenden elektrischen Feldgradienten der Umgebung des Kerns, etwa der betreffenden Elektronenhülle, in Wechselwirkung treten und auf die Weise auch magnetisch zur Relaxation des Kerns beitragen. Dieser Mechanismus ist bei den Halogenen Chlor, Brom und Iod so effektiv, dass diese Kerne, obwohl sie große magnetische Momente besitzen, für die hochauflösende Kernresonanz-Spektroskopie praktisch nicht magnetisch sind. Beim Stickstoff (^{14}N) und Deuterium (^2H) ist die Quadrupol-Relaxation weniger wirksam, so dass hier die Resonanzlinien, allerdings verbreitert, beobachtet werden können.

Relaxation durch skalare Kopplung „SC“

Befinden sich in der Nachbarschaft von ^{13}C -Atomen über skalare Wechselwirkungen gekoppelte Quadrupolkerne (^{35}Cl , ^{79}Br), so werden, durch

deren schnelle Relaxation am Ort des ^{13}C -Atoms, oszillierende lokale Magnetfelder erzeugt, die zur Spin-Gitter-Relaxation beitragen.

Paramagnetische Relaxation „E“

Können die Kernmomente über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen mit in der Lösung vorhandenen paramagnetischen Substanzen in Beziehung treten, so ist die longitudinale Relaxation besonders effektiv. Die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 ist dem Quadrat des magnetischen Momentes μ umgekehrt proportional ($T_1 \sim 1/\mu^2$). Das magnetische Moment des ungepaarten Elektrons ist um den Faktor 10^3 größer als die magnetischen Kernmomente selbst. T_1 wird dann kleiner als 10^{-1} s und die Resonanzlinien werden zusätzlich durch die Reduktion der T_2 -Relaxationszeiten stark verbreitert. Dies ist der Grund dafür, dass NMR-Spektren von Radikalen selbst nur schwer erhältlich sind. Bereits gelöster Sauerstoff führt durch seinen Paramagnetismus zu Linienverbreiterungen, welche aber durch Entgasen der Probe reduziert werden können.

Diesem Relaxationsmechanismus wird, im ersten Teil dieser Arbeit, die entscheidende Bedeutung zukommen.

3.2.1.2 Spin-Spin-Relaxation T_2

In der klassischen Beschreibung des NMR-Experimentes präzessieren im Laborkoordinatensystem nach einem 90° -Puls die Kernmomente in Phase, wodurch die Quermagnetisierung \mathbf{M}_{xy} entsteht. Im rotierenden Koordinatensystem werden die einzelnen magnetischen Momente durch den Puls gewissermaßen „gebündelt“. Die T_2 -Relaxationszeit bestimmt nun den Verfall dieser Phasenbeziehung durch magnetische Wechselwirkungen innerhalb des Spinsystems.

Bei der Spin-Spin-Relaxation ändern sich die Besetzungsverhältnisse der beiden Niveaus nicht, d. h. die Energie des Systems bleibt gleich; die Spin-Spin-Relaxation ist eine Entropie-Effekt.

Ein weiterer Beitrag zur T_2 -Relaxationszeit stammt aus der immer vorhandenen Inhomogenität des Magnetfeldes, die Unterschiede in den Larmorfrequenzen eigentlich äquivalenter Kerne verursacht.

Ein direktes Maß für die T_2 -Relaxationszeit ist die Linienbreite eines Spektrums (vgl. Gleichung 6). Für niederviskose Flüssigkeiten ist die T_2 -Relaxationszeit relativ groß und die „natürlichen Linienbreiten“ betragen im Protonenspektrum im allgemeinen weniger als 0,1 Hz, wohingegen für hochviskose Flüssigkeiten und in Festkörpern T_2 aufgrund von starken hetero- und homonuklearen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen oft sehr klein wird, so dass hieraus Linienbreiten im kHz-Bereich resultieren.

3.2.1.3 Relative Anzahl der betrachteten Kerne

Routinemäßig gelingt die Bestimmung der relativen Anzahl der Kerne aus messzeitlichen Gründen nur bei ^1H -NMR-Spektren. Durch Integration der NMR-Signale eines Spektrums ist die quantitative Bestimmung der Protonen eines Moleküls möglich. Über Kalibrierungsschritte können auch absolute Konzentrationen mittels der NMR-Spektroskopie bestimmt werden.

Für ^{13}C -NMR-Spektren muss, aufgrund der oft langen T_1 -Zeiten, dem kleinen gyromagnetischen Verhältnis und der geringen natürlichen Häufigkeit, ein großer Messzeitaufwand in Kauf genommen werden. Routinemäßig wird bei ^{13}C -NMR-Spektren die Breitband-Entkopplung (und verwandte Methoden) angewendet, um durch den Kern-Overhauser-Effekt (NOE) die Magnetisierung der Protonen auf die ^{13}C -Atome zu übertragen und somit die Signalintensität zu steigern. Dabei geht die Integrierbarkeit verloren, weil der Magnetisierungstransfer von der Anzahl der direkt gebundenen Protonen abhängt und so primäre C-Atome eine höhere Intensität haben als sekundäre oder gar tertiäre C-Atome. Quartäre C-Atome erfahren gar keinen Magnetisierungstransfer und kommen deshalb nur mit einer relativ geringen Intensität zum Vorschein, zudem haben quartäre C-Atome oft sehr lange T_1 -Zeiten. Dieser Nachteil soll im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls mittels der IFR-Technik verbessert werden.

3.3 Dynamische Kernpolarisation (DNP)

Die NMR-Spektroskopie gelangt bei Kernen mit kleinem gyromagnetischen Verhältnis und/oder kleiner natürlicher Häufigkeit immer wieder an die Grenzen ihrer Empfindlichkeit. Eine Möglichkeit, dieses Handikap zu verringern, bietet die Dynamische Kernpolarisation (DNP)^[66-70]. Die Kopplung der Dynamischen Kernpolarisation mit der Durchfluss-NMR-Spektroskopie ist eine ausgezeichnete Methode, um auch von NMR-aktiven Kernen mit kleinem gyromagnetischen Verhältnis und/oder kleiner natürlicher Häufigkeit in akzeptabler Zeit NMR-Spektren mit gutem Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten.

Dorn et. al.^[71, 72] konnten zeigen, dass die DNP als Messverfahren sowohl für recycled- und continuous-flow Experimente, als auch für die on-line Chromatographie eingesetzt werden kann. Hierbei konnten enorme Verstärkungsfaktoren in der Größenordnung von ein bis zwei Zehnerpotenzen erreicht werden.

Die Ursache für die DNP-Verstärkung ist der Overhauser-Effekt (Abbildung 6). Im Gegensatz zum Kern-Overhauser-Effekt (NOE), wird die Magnetisierung aber nicht von Kern zu Kern übertragen, sondern vom Elektron auf den Kern. Dies ist wichtig, da die gyromagnetischen Verhältnisse der beteiligten Elektronen und Kernspins mit in die Verstärkung eingehen.

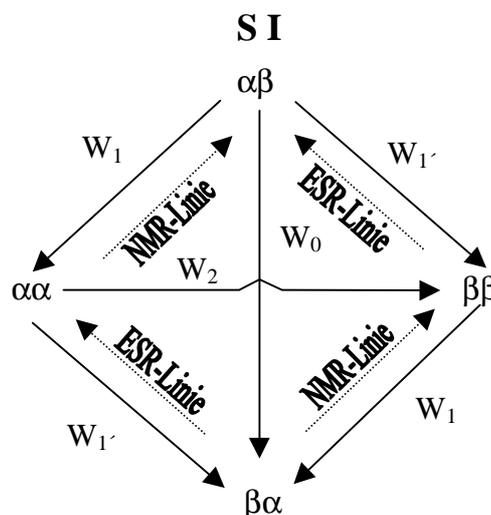


Abbildung 6: Solomon-Schema für ein Elektron-Kern Zwei-Spin-System

α und β sind die möglichen Kern- und Elektronenzustände des Zweispinsystems. Im α -Zustand ist der Spin parallel, im β -Zustand antiparallel, zum Magnetfeld ausgerichtet. Das bedeutet, dass für Kerne der α -Zustand und für Elektronen der β -Zustand der energiegünstigere Zustand ist. W_1/W_1 , W_0 und W_2 sind die Wahrscheinlichkeiten für die Einfach-, Null- und Doppelquantenübergänge für die Kernspins I und die Elektronenspins S. Ist die Wahrscheinlichkeit für die Relaxation über die Nullquantenübergänge größer als über die Doppelquantenübergänge, so sind durch Einstrahlen von Mikrowellenfrequenzen und daraus folgender Sättigung der ESR-Übergänge Verstärkung für die NMR-Signale möglich.

3.3.1 Theorie der Dynamischen Kernpolarisation

Die statische DNP-Verstärkung A kann durch Gleichung 13 wiedergegeben werden.

Gleichung 13:
$$A = \rho \cdot f \cdot s \cdot \frac{\gamma_S}{\gamma_I}$$
 wobei:

ρ = Kopplungsfaktor, Maß für die Wechselwirkung zwischen Radikal und Analyt (max. +0,5 für dipolare Kopplung und max. -1 für skalare Kopplung)

f = Leckfaktor, Maß für die Effektivität des Elektron-Kern-Überganges

s = Sättigungsfaktor, Maß für die ESR-Sättigung

γ_S, γ_I = gyromagnetisches Verhältnis von Radikal S und Kern I

Die theoretisch erreichbaren Verstärkungsfaktoren A_{dipolar} und A_{skalar} für das Elektron- ^{13}C -System sind für den dipolaren Kopplungsprozess, das heißt durch den Raum vermittelten Magnetisierungstransfer, $A_{\text{dipolar}} = -1320$ und den skalaren Kopplungsprozess, das heißt über den bindungsvermittelten Prozess $A_{\text{skalar}} = +2640$. Im Vergleich dazu wird die NOE-Verstärkung bei der routinemässigen Aufnahme von ^{13}C -NMR-Spektren ausgenutzt. Dabei wird Magnetisierung von Protonen auf ^{13}C -Atome übertragen. Das Verhältnis der gyromagnetischen Verhältnisse von Protonen und ^{13}C -Kernen hat den Wert 4,

was nach Gleichung 14 zu einer maximalen Verstärkung V_{\max} um den Faktor 2 führt.

$$\text{Gleichung 14: } V_{\max} = \gamma_A/2\gamma_X \quad A = \text{Proton, } X = \text{Heterokern (z.B. } ^{13}\text{C)}$$

Da im fließenden System der Ort der Detektion nicht dem Ort des Polarisierungstransfers entspricht, muss Gleichung 13 angepaßt werden. Daraus ergibt sich die beobachtete DNP-Verstärkung A_{obs} in Gleichung 15 zu:

$$\text{Gleichung 15: } A_{\text{obs}} = \left(\frac{A}{K} \right) (1 - E_{1a})(E_{1b})(E_{1c})$$

wobei $E_{1a} = e^{-\frac{t_a}{T_{1a}}}$, $E_{1b} = e^{-\frac{t_b}{T_{1b}}}$, $E_{1c} = e^{-\frac{t_c}{T_{1c}}}$ den Aufbau (E_{1a}) und Abfall (E_{1b} , E_{1c}) der Polarisierung in den Regionen A, B und C (Abbildung 7) repräsentieren.

t_a , t_b und t_c sind die Verweilzeiten für einen polarisierten Bolus in den Regionen A, B und C; T_{1a} , T_{1b} und T_{1c} die dazugehörigen Spin-Gitter-Relaxationszeiten der polarisierten Kerne.

Die Konstante K gibt das Magnetstärkenverhältnis zwischen Hochfeldmagnet und Tieffeldmagnet an. Im vorliegenden Fall ist $K=14$.

3.3.2 Apparativer Aufbau der DNP-NMR-Kopplung

Die Verstärkung des NMR-Signals selbst hängt auch von der Korrelationszeit τ_c des umgebenden Mediums ab und wird am größten, wenn das Produkt aus Korrelationszeit τ_c und Anregungsfrequenz ω sehr viel kleiner als 1 wird. In überkritischen Fluiden ist die Beweglichkeit von Molekülen größer und damit die Korrelationszeit herabgesetzt. Die Verwendung von überkritischen Fluiden als Eluent verspricht deshalb größere DNP-Verstärkungsfaktoren. In Abbildung 7 ist der verwendete Aufbau schematisch dargestellt. Als überkritisches Medium wird wiederum Kohlendioxid verwendet.

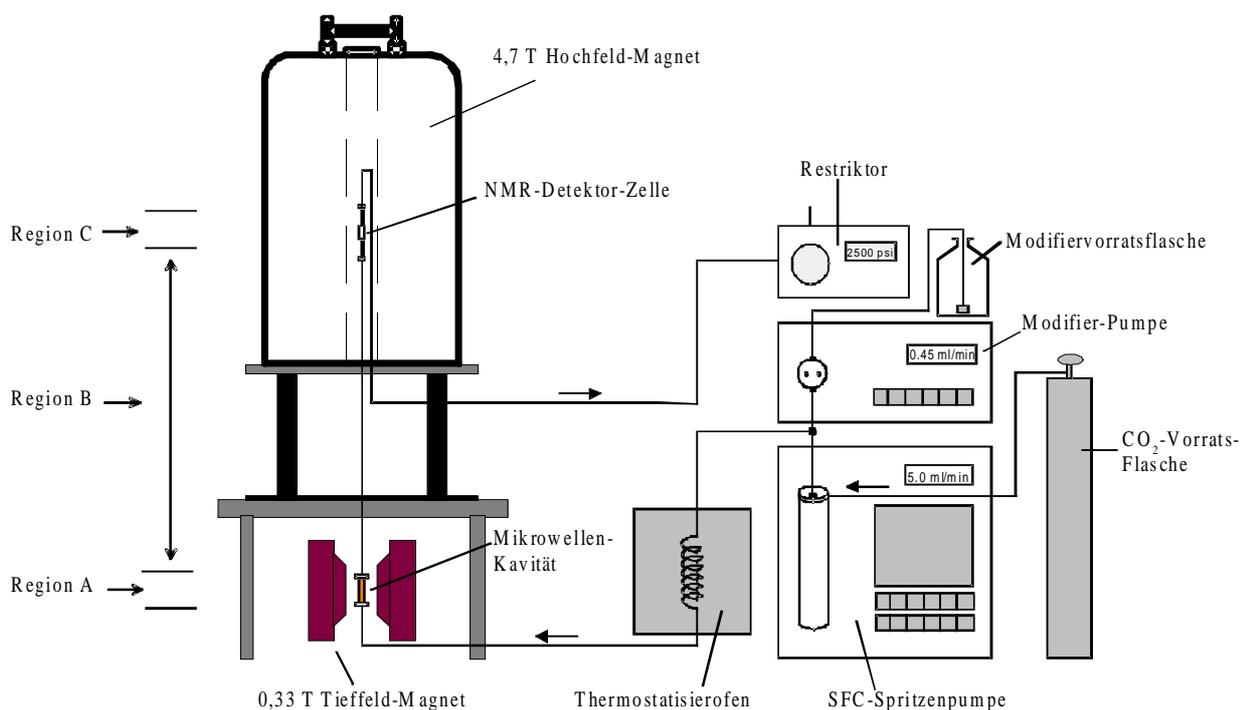


Abbildung 7: Aufbau für die $scCO_2$ -DNP-NMR-Kopplung

Der Aufbau besteht im wesentlichen aus drei Komponenten, dem Hochfeldmagnet zur Detektion, dem Tieffeldmagnet zur Polarisierung und dem SFC-Pumpensystem zur Erzeugung des überkritischen Mediums. Der Hochfeldmagnet besteht aus einem 9,4 T Magneten welcher auf einem etwa 50 cm hohen Eisenpodest steht und mit einer Durchflusszelle aus Eigenbau ausgerüstet ist. Darunter befindet sich der 0,34 T Eisenjochmagnet mit einer Durchfluss-Mikrowellenkavität, welche die Säule mit den immobilisierten freien Radikalen enthält. Das System zum Erzeugen und Pumpen des überkritischen Mediums, besteht aus einer SFC-Spritzenpumpe, einem Ofen und einem stufenlos einstellbaren Restriktor. Über eine Modifizierpumpe wird ein Analyt, in diesem Fall Benzol, zugeführt.

4 Der überkritische Zustand, SFC und SFC-NMR-Kopplung

4.1 Überkritischer Zustand

Hochverdichtete Gase besitzen die Fähigkeit, selbst anorganische Salze wie Eisenchlorid zu lösen. Ausgehend von den p/T -Phasendiagramme von Substanzen wird dieser Zustand als „überkritisch“ bezeichnet. Er liegt jenseits des kritischen Punktes, an dem die Grenzfläche zwischen flüssig und gasförmig verschwindet. Zur Veranschaulichung ist das Phasendiagramm von Kohlendioxid in Abbildung 8 gezeigt.

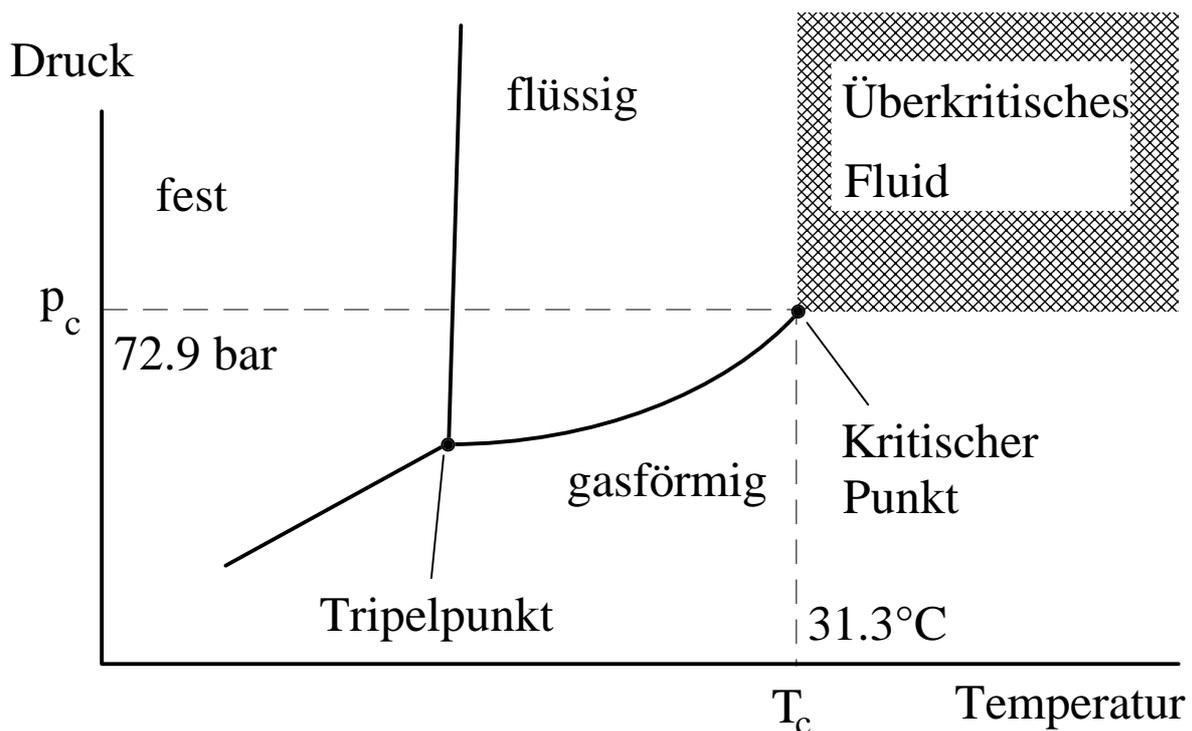


Abbildung 8: p/T -Phasendiagramm von CO_2

In Tabelle 2 sind die kritische Temperatur T_c , der kritische Druck p_c , die kritische Dichte ρ_c und das Dipolmoment einiger Lösemittel aufgeführt. Zu beachten ist, dass unter diesen Bedingungen die Fluide zunächst unerwartete Eigenschaften entwickeln, z.B. wird überkritisches Wasser zu einem hoch korrosiven Reagenz.

Fluid	T _c [°C]	p _c [bar]	ρ _c [g/ml]	Dipolmoment [Debye]
CO ₂	31,1	72	0,47	0
N ₂ O	36,5	70,6	0,45	0,2
NH ₃	132,51	112,5	0,23	1,5
SF ₆	45,5	38,0		0
CH ₄	-82	46	0,17	0
Propan	96,7	42,4	0,22	
H ₂	-240	12,6	0,03	
Xe	17	56,9	1,11	0
CCl ₂ F ₂	111,7	109,8	0,56	
H ₂ O	374,2	214,8	0,32	
Methanol	239	78,9	0,27	1,7
Aceton	235	47	0,28	

Tabelle 2: Kritische Daten einiger Lösemittel^[73]

In letzter Zeit wird versucht, immer mehr Reaktionen^[74-80] in überkritischen Fluiden durchzuführen, da diese dort schnell und in guter Ausbeute ablaufen. Der Vorteil liegt darin, dass durch Expansion des bei Raumtemperatur gasförmigen Lösemittels, das Produkt sehr rein gewonnen werden kann oder beispielsweise eine einfache Rückgewinnung eines Katalysators möglich ist^[81].

4.2 Überkritische Fluid Chromatographie (SFC)

Überkritische Fluide haben Eigenschaften, die ähnlich denen von Flüssigkeiten und denen von Gasen sind^[82]. Die Dichte ist ähnlich der einer Flüssigkeit, während die Viskosität mehr der eines Gases ähnelt. Charakteristische Werte für die Dichte, Viskosität und Diffusionskoeffizient für Gas, Flüssigkeit und Fluid sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Medium	Dichte [g/ml]	Viskosität [mP]	Eigendiffusionskoeffizient [cm ² /s]
Gas (30°C, 1atm)	0,6 - 2 x 10 ⁻³	0,1 – 0,3	0,1 - 0,4
Überkritisches Fluid	0,2 - 0,9	0,1 – 0,9	0,2 – 0,7 x 10 ⁻³
Flüssigkeit (30°C, 1atm)	0,6 - 1,6	2 - 30	0,2 – 2 x 10 ⁻⁵

Tabelle 3: Typische physikalische Eigenschaften von Gasen, überkritischen Fluiden und Flüssigkeiten

Die Diffusionskoeffizienten liegen typischerweise zwischen Gas und Flüssigkeit. Wie aus Abbildung 9 deutlich wird, überbrückt die SFC bei Betrachtung der Diffusionskoeffizient-Dichte-Abhängigkeit den Bereich zwischen den beiden Methoden GC und HPLC.

Die Anwendung von überkritischen Fluiden als mobile Phase in der Chromatographie wurde schon in den 60er Jahren demonstriert^[83], erlebte aber erst Ende der 80er Jahre den Durchbruch als routinemässig eingesetzte analytische Methode. Zu dieser Zeit sind einige Bücher über die Chromatographie mit überkritischen Fluiden (SFC, Supercritical Fluid Chromatography) erschienen^[84, 85]. In der SFC wird wegen seiner physikochemischen Eigenschaften (niedriger kritischer Druck und Temperatur) sowie aus ökologischen und ökonomischen Gründen heute hauptsächlich CO₂ als Eluent verwendet (scCO₂).

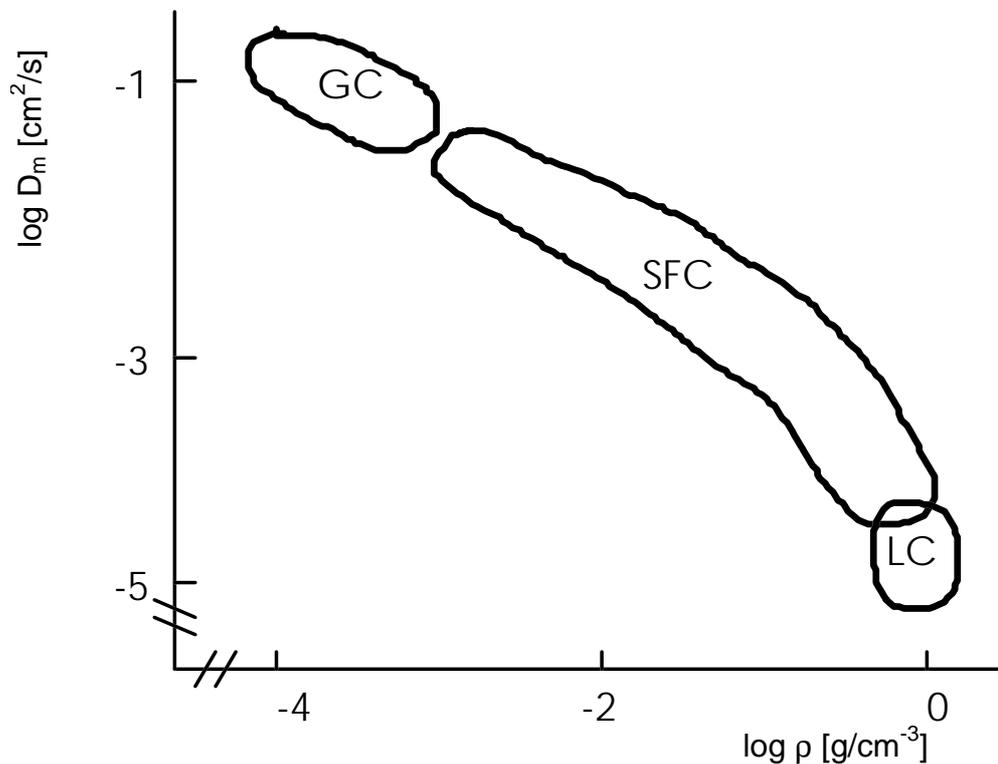


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Diffusionskoeffizient (D_m) und der Dichte (ρ) einer mobilen Phase in der GC, SFC und HPLC

Eine wichtige Eigenschaft des überkritischen Fluids, nicht nur in Bezug auf die Chromatographie, ist seine Dichte. Direkt mit ihr verknüpft ist die Fähigkeit, Substanzen zu lösen. Die Dichte kann leicht über den eingestellten Druck und die Temperatur kontrolliert werden, z. B. kann überkritisches CO_2 bei $40\text{ }^\circ\text{C}$ abhängig vom Druck (75-300 bar) eine Dichte von $0,25$ bis $0,8\text{ g/cm}^{-3}$ annehmen. Die Elutionskraft eines Fluids lässt sich somit einfach und stufenlos über die Dichte kontrollieren. Während eine Erhöhung des Druckes immer eine Erhöhung der Dichte und damit der Löslichkeit zur Folge hat, ist der Zusammenhang mit der Temperatur komplexer. Unter isobaren Bedingungen führt eine Temperaturerhöhung zu einer Verringerung der Dichte des Fluids, während sich andererseits der Dampfdruck des Analyten mit der Temperatur erhöht. Bezüglich der Löslichkeit des Analyten stellen sich also zwei gegenläufige Effekte ein, deren Auswirkungen nicht ohne weiteres vorherzusagen sind. Die Dichteänderung während eines chromatographischen Laufes entspricht der Lösemittelgradientenelution bei der HPLC und der Temperaturerhöhung bei der GC.

Als weiterer Effekt können starke Wechselwirkungen zwischen den polaren

Analyten und den aktiven Stellen der stationären Phase, wie z.B. Silanolgruppen, beobachtet werden. Da die Wechselwirkungen mit sinkender Temperatur zunehmen, können sie die Erhöhung der Elutionskraft des Eluenten teilweise oder ganz aufheben und damit zu verlängerten Retentionszeiten oder verbreiterten Peaks führen.

Für die herausragende Stellung der SFC sind zwei weitere Eigenschaften der überkritischen Fluide verantwortlich, die Diffusionskonstante und die Viskosität. So wie die genannten Eigenschaften zwischen denen von Flüssigkeiten und Gasen liegen (vgl. Abbildung 9), so vereinigt die SFC die Eigenschaften der GC und der HPLC. Die erhöhten Diffusionskoeffizienten ermöglichen einen hohen Massentransfer, wodurch sich das van-Deemter-Optimum zu größeren Flussraten hin verschiebt. Die Viskosität ist um den Faktor 10 – 100 geringer als in Flüssigkeiten. Dadurch ist die Beweglichkeit erhöht und die Korrelationszeit τ_c verringert. Die geringeren Viskositäten erlauben hohe Flussraten und zusätzlich können aufgrund des geringeren Druckabfalls über die Säule Säulenreihenschaltungen mit bis zu 8 x 25 cm-Säulen unterschiedlicher Selektivitäten genutzt werden, um schnelle und effiziente Trennungen analog zur GC durchzuführen. In machen Fällen kann mit der SFC, im Vergleich der drei Methoden, sogar die schnellste Trennung realisiert werden.

Während bei der GC verdampfbare, d.h. nur thermostabile Proben analysiert werden können, zeigen die überkritischen Fluide die Eigenschaft, Substanzen auch bei niedriger Temperatur lösen zu können. Es wird somit ein universeller Anwendungsbereich erfaßt, der dem der HPLC ähnelt.

Der größte chromatographische Vorteil der überkritischen Fluide gegenüber der LC besteht in der geringen Viskosität, den hohen Diffusionskoeffizienten und, mit diesen Eigenschaften einhergehend, der hohen Effizienz, der erhöhten Analysengeschwindigkeit und dem niedrigen Druckabfall über die Säule. Der größte Nachteil von CO_2 besteht, aufgrund seines äußerst kleinen Dipolmomentes (im zeitlichen Mittel Null), in der geringen Fähigkeit, polare Substanzen zu lösen. Die Löslichkeitsparameter bewegen sich zwischen dem von Heptan (CO_2 nahe am kritischen Punkt) bis hin zu dem von Chloroform bei einer CO_2 -Dichte von ca. 0,9 g/ml.

Um dennoch die Löslichkeit des scCO_2 zu erhöhen, werden in der SFC polare

Additive, sogenannte Modifier (meistens Methanol), im Konzentrationsbereich 1-5%, manchmal auch bis zu 20%, zugegeben. Zur Chromatographie von sauren und basischen Verbindungen werden auch ternäre Eluenten (0,1-1%) verwendet. Als Folge erhöhen sich die kritischen Parameter der entstehenden Mischung. Das Gemisch Methanol/CO₂ zeigt hierbei moderate Änderungen; eine Methanolzugabe von 20% resultiert in einem kritischen Druck p_c und kritischen Temperatur T_c von 77,7 bar und 72,2 °C (vgl. reines CO₂: 72 bar, 31,1 °C).

4.3 SFC-NMR-Kopplung

Die Direktkopplung der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit der Hochfeld-¹H-NMR-Spektroskopie hat sich in den letzten Jahren zu einer weitverbreiteten Kopplungstechnik in Industrie und Forschung entwickelt und ist eine der aussagekräftigsten Analysemethoden zur Strukturaufklärung unbekannter Verbindungen.

Nachteilig bei der HPLC-NMR-Kopplung ist die Verwendung von protonen tragenden Elutionsmitteln. Durch sie treten Signale auf, die ganze Bereiche des NMR-Spektrums überdecken und so Informationen über die zu untersuchenden Substanzen nicht zugänglich machen. Selbst mit aufwendigsten Lösemittelunterdrückungstechniken bleibt bei den meisten Elutionsmitteln ein Restsignal im Spektrum erhalten und die darunterliegenden Substanzsignale werden zudem ebenfalls unterdrückt. Zur Lösung dieses Problems wäre der Einsatz von volldeuterten Elutionsmitteln ein adäquates Mittel. Jedoch verbieten die Kosten der meisten deuterten Verbindungen dieses Vorhaben, solange der enorme Verbrauch von Lösemitteln durch neue Techniken nicht gesenkt werden kann. Die Kopplung von Kapillar-HPLC und der NMR-Spektroskopie, wird deshalb derzeit in verstärktem Maß betrieben. Hierfür ist eine Miniaturisierung der NMR-Messspule notwendig, was bislang zu Problemen bei der Auflösung der Spektren führt.

Eine interessante Alternative auf diesem Gebiet bietet die Chromatographie mit überkritischen Fluiden (SFC, Supercritical Fluid Chromatography). Hier stehen protonenfreie Verbindungen zur Verfügung, wie Kohlendioxid (CO₂) und Distickstoffoxid (Lachgas, N₂O), wodurch eine Lösemittelunterdrückung nicht mehr erforderlich ist ^[28]. Aus Gründen der leichteren Handhabbarkeit wird das

billige und nicht toxische Kohlendioxid bevorzugt.

Erste Versuche, die SFC mit der NMR zu koppeln, wurden bereits 1988 von Dorn et al.^[86] durchgeführt, jedoch war die Qualität der Spektren unzureichend für die Strukturaufklärung unbekannter Verbindungen. Erste hochaufgelöste SFC-NMR Spektren und Anwendungen auf reale Trennproblematiken wurden dann in den 90er Jahren beschrieben^[87-90].

Die Linienbreite eines Peaks in einem NMR-Spektrum ist von der Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 abhängig und diese ist wiederum mit der Korrelationszeit τ_c verknüpft. Gerade die überkritische Umgebung bietet für Quadrupolkerne ($I > 1/2$) aufgrund der verringerten Viskosität und somit kleineren Korrelationszeit in diesem Medium deutliche Vorteile (vgl. Gleichung 11). So können in überkritischen Fluiden Spektren mit geringer Linienbreite auch von Quadrupolkernen, wie ^{15}N , ^{55}Mn und ^{59}Co erhalten werden^[91].

Hierbei liegt der große Vorteil des überkritischen CO_2 in der Chromatographie-NMR-Kopplung in der Protonenfreiheit des Eluenten. Es entfallen damit die technisch aufwendigen Verfahren zur Unterdrückung der Lösemittelprotonen und der gesamte spektrale Bereich des NMR-Spektrums steht der Strukturaufklärung bzw. dem Informationsgewinn zur Verfügung.

Im Gegensatz zur Aufnahme von Quadrupolkernen ist bei der Detektion von Protonen allerdings die verlängerte Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 im überkritischen Medium von Nachteil, da durch Sättigungserscheinungen die Empfindlichkeit deutlich herabgesetzt ist. Während die temperaturbedingte Erhöhung von T_1 durch eine niedrigere Detektionstemperatur (im Vergleich zur Trenntemperatur) beeinflusst werden kann, ist die druckbedingte Erhöhung von T_1 durch den chromatographischen Trennprozess vorgegeben. Der Druck muss im gesamten System gehalten werden. Der druckbedingte Anstieg von T_1 betrifft hauptsächlich aromatische Protonen. Die Beeinflussung der Spin-Gitter-Relaxationszeit wird in dieser Arbeit beschrieben.

Ein weiterer Nachteil auf der NMR-Seite ist die Verwendung von Modifiern (evt. mit Zusätzen) in der SFC. Sie ergeben Lösemittelsignale, welche unterdrückt werden müssen. Im Gegensatz zur HPLC können in der SFC die Modifier jedoch durch volldeuterte Lösemittel ersetzt werden. Der Modifierverbrauch (Zusatz: 1-5%) einer typischen SFC-Trennung mit einer Flussrate von 2 ml/min und einer Dauer von 20-40 min liegt bei 0,4 – 4 ml.

Somit wird der Einsatz fast jedes Modifiers in deuterierter Form möglich. Eventuell auftretende Restsignale führen aber zu größeren Schwierigkeiten, da sowohl ein Druckgradient, als auch ein Konzentrationsgradient des Lösemittels (Modifiers), welcher am häufigsten in der SFC gebräuchlich ist, zu Signalverschiebungen der Lösemittelsignale auf der δ -Skala während der chromatographischen Trennung führt. Besonders Hydroxyl und Amin-Protonen zeigen eine ausgeprägte Signalverschiebung, sowohl bei Anlegen eines Druckgradienten als auch bei Veränderung der Modifikierkonzentration, wie beides in Abbildung 10 dargestellt. Dadurch wird die Lösemittelunterdrückung erschwert oder gar unmöglich gemacht.

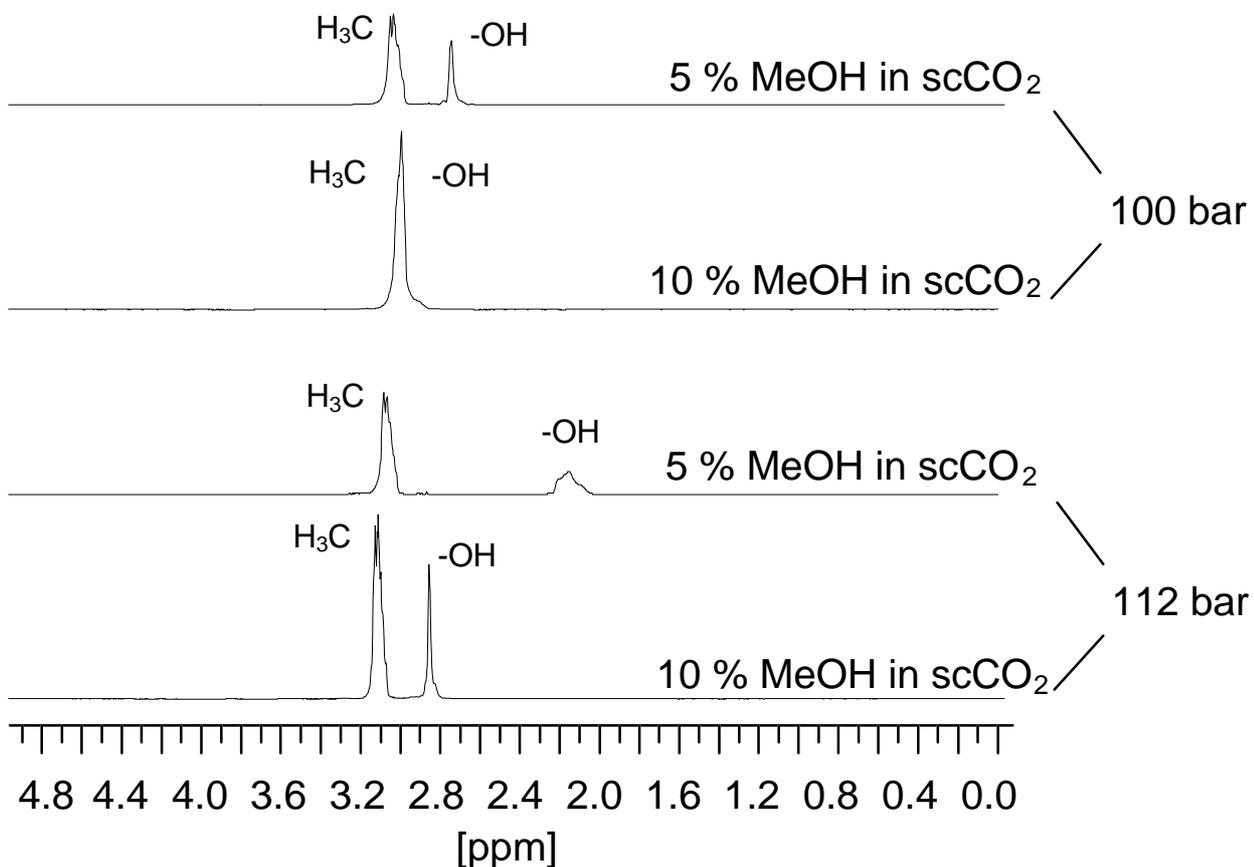


Abbildung 10: Konzentrations- und Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung einer Hydroxylgruppe (Methanol) in überkritischem CO₂

5 Ergebnisse

5.1 Quantitative Durchfluss-¹³C-NMR-Spektroskopie und quantitative SFC-NMR-Spektroskopie

5.1.1 Synthese von immobilisierten freien Radikalen (IFR) und immobilisierten paramagnetischen Metallchelaten

Wie bereits in 3.2.1.1 erwähnt, kann die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 von Probemolekülen verkürzt werden, indem der zu untersuchenden Lösung paramagnetische Substanzen hinzugefügt werden. Damit wird allerdings die Lösung mit einer zusätzlichen Komponente verunreinigt und zudem auch die T_2 -Zeit verkürzt, was zu einer unerwünschten Linienverbreiterung im NMR-Spektrum führt.

Um diese Probleme zu umgehen, werden die paramagnetischen Substanzen auf einer polymeren, anorganischen Matrix chemisch immobilisiert. Dies soll im Folgenden beschrieben werden.

Zur Synthese von immobilisierten freien Radikalen und paramagnetischen Metallchelaten wurden Reaktionen durchgeführt, die mit einer hohen Ausbeute ablaufen, um eine möglichst hohe Radikalkonzentration auf dem jeweils verwendeten Kieselgel zu erhalten. Als polymere Träger wurden in einem ersten Reaktionsschritt aminopropylfunktionalisierte Kieselgele hergestellt. Im zweiten Reaktionsschritt erfolgte dann die Anbindung der freien Radikale oder Metallchelate.

5.1.1.1 Darstellung von aminopropylmodifiziertem Kieselgel (APS-Kieselgel)

Für die Oberflächenmodifikation des nativen Kieselgels stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Zum einen kann die Anbindung des Organosilylrestes unter Verwendung eines Lösemittels nach dem Oberflächenpolymerisations- oder dem Lösemittelpolymerisations-Verfahren erfolgen^[92, 93].

Andererseits besteht die Möglichkeit die Methode der Trocken- oder Backreaktion nach Buszewski^[94-96], zu verwenden, wie bei der folgenden Synthese geschehen. Dabei werden bei der Umsetzung von Kieselgel mit Triethoxy-3-aminopropylsilan besonders hohe Oberflächenbelegungen erhalten, was die Voraussetzung für eine spätere hohe Radikalkonzentration auf dem Kieselgel ist (Abbildung 11). Es konnten sehr hohe Oberflächenbelegungen mit $\alpha_{\max} = 3,9$ erzielt werden.

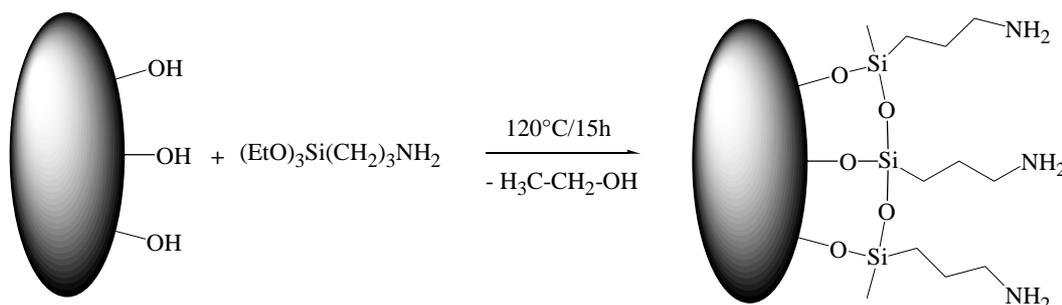


Abbildung 11: Syntheschema von Aminopropylkieselgel

5.1.1.2 Darstellung von immobilisierten freien Radikalen

Bei dem aminopropylfunktionalisierten Kieselgel (APS-Kieselgel) bietet sich die Knüpfung einer Peptidbindung^[97] zwischen Radikal und Oberfläche an, zumal carboxyfunktionalisierte freie Radikale käuflich erhältlich sind (Abbildung 12). Als freies Radikal wurde 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO) mit Diisopropylcarbodiimid (DICI) als Kupplungsreagenz und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) als Hilfsreagenz an das APS-Kieselgel gebunden^[98]. Das 1-Hydroxybenzotriazol bildet mit der Carboxylgruppe einen äußerst reaktiven 1-Hydroxybenzotriazolester, zudem wird die Bildung von Nebenprodukten (z.B. N-Acyl-Harnstoffe) unterdrückt. Diese Reaktion läuft in der Peptidsynthese in Lösung mit annähernd 100 % Ausbeute ab.

Eine andere Möglichkeit ist die Anbindung des Radikals an eine chlorid-modifizierte Kieselgeloberfläche über eine Hydroxy-Funktion (SI-TEMPO). Diese Zweistufenreaktion, in Abbildung 13 gezeigt, wird unter Schutzgas ohne Aufarbeitung der Zwischenstufe durchgeführt. Die Synthese dieses Systems wurde in den USA, an der Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.C. Dorn durchgeführt.

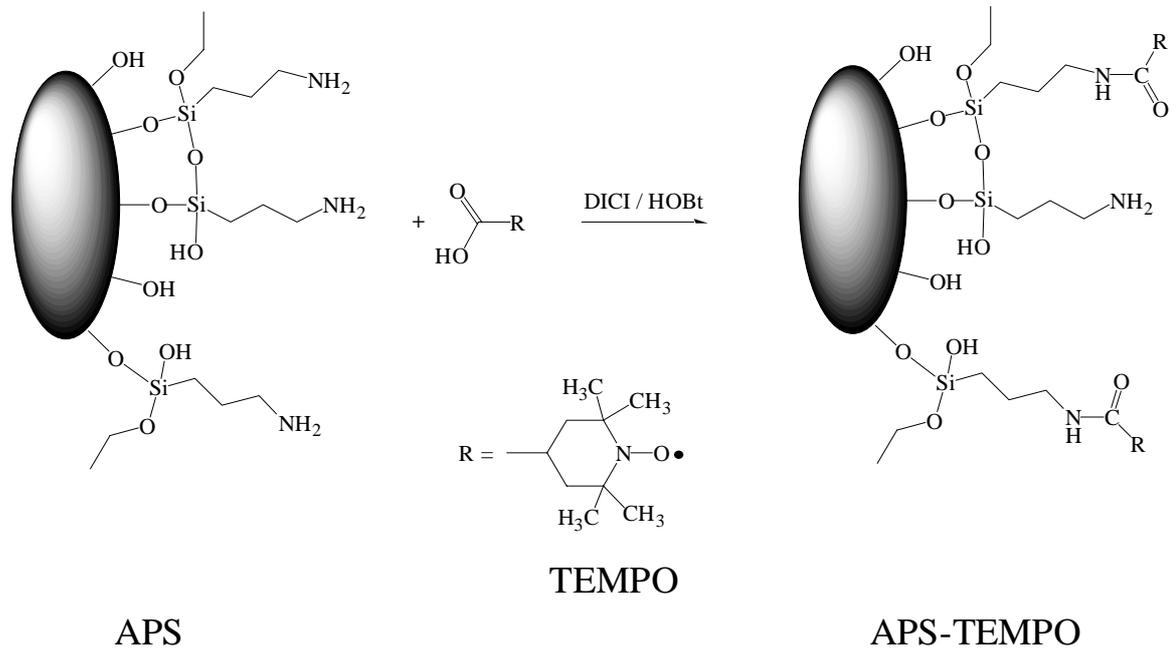


Abbildung 12: Syntheschema von TEMPO-modifiziertem Kieselgel (APS-TEMPO)

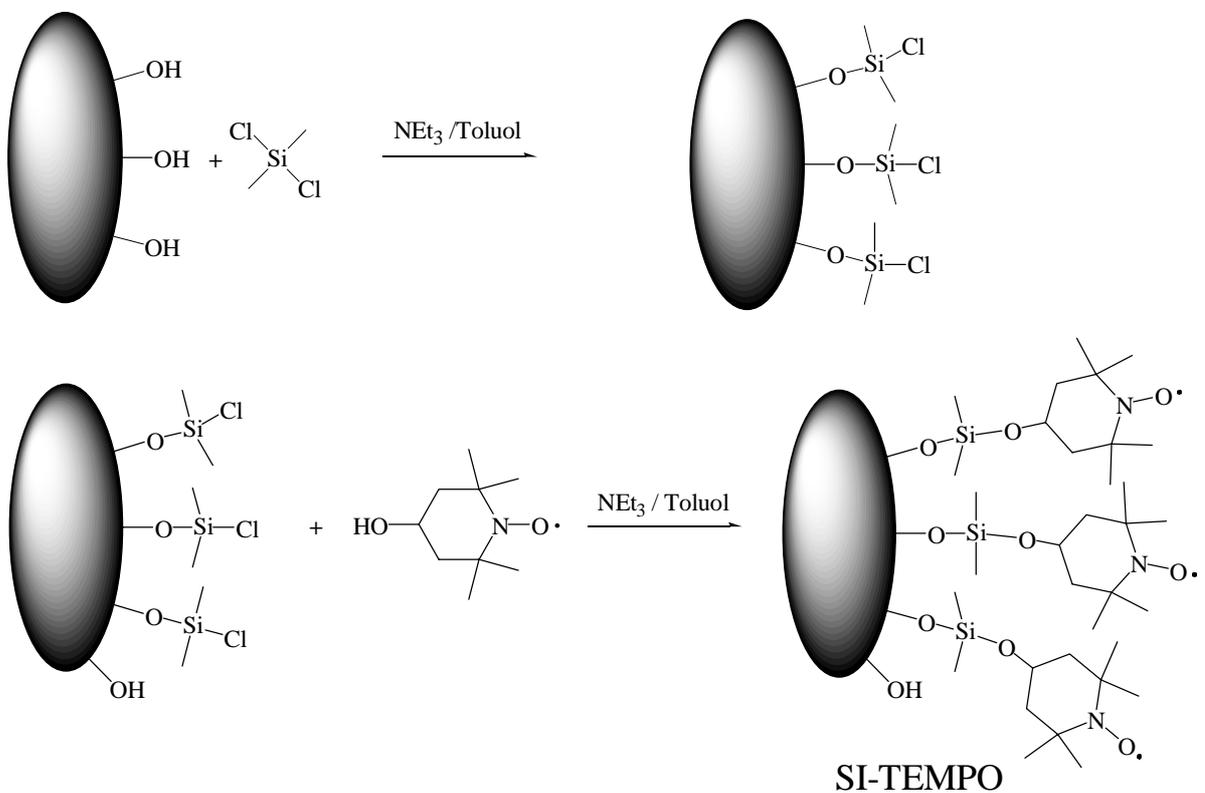


Abbildung 13: Syntheschema von SI-TEMPO

5.1.1.3 Synthese der immobilisierten paramagnetischen Metallchelate

Als paramagnetische Metallchelate wurden der Makrozyklus Gd-GlyMeDOTA und der Diethylentriaminkomplex Gd-DTPA ausgewählt. Die Strukturen sind in Abbildung 14 gezeigt. GlyMeDOTA steht für einen Glycin-modifizierten, methylierten Tetrazacyclododecyltetraessigsäure-Liganden (engl.: acetic acid, für Essigsäure) und DTPA für einen Diethylentriaminpentaessigsäure-Liganden. Diese Chelate werden in der Kernmagnetischen Bildgebung (MRI) als Wasser-Relaxationsreagenz (T_1 -Kontrastmittel) eingesetzt^[99, 100]. Dort sind Gadolinium-Chelatkomplexe sehr verbreitet und unterscheiden sich, je nach Zielort und Anwendungsgebiet im Körper, in der Art des Chelatliganden. Das Gd^{3+} -Ion besitzt mit seinen 7 ungepaarten Elektronen in der 4f-Schale den höchsten Paramagnetismus in stabilen Verbindungen und ist deshalb besonders effektiv bei der T_1 -Zeit-Verkürzung.

Die Immobilisierung auf APS-Kieselgel findet über eine Carboxy-Funktion statt. Die Synthese des Komplexes und die Anbindung wurde dankenswerterweise von Herrn Dr. Heribert Schmitt-Willich, Schering AG, Berlin übernommen.

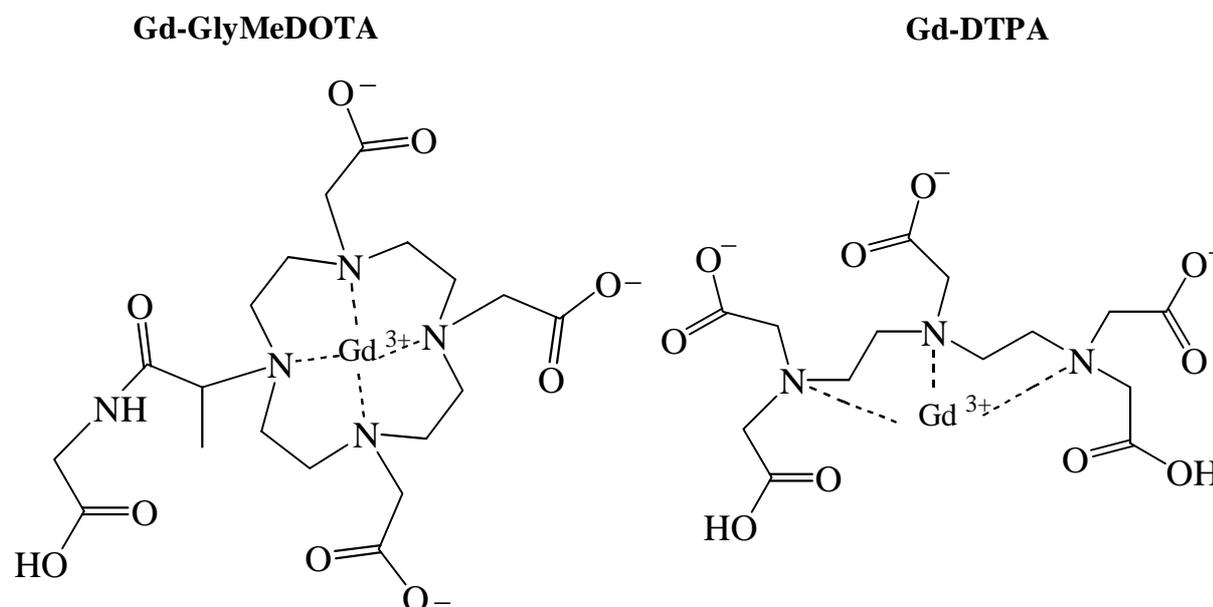


Abbildung 14: Struktur der freien Metallchelatkomplexe

5.1.2 Charakterisierung der immobilisierten freien Radikale und paramagnetischen Metallchelate

5.1.2.1 ^{13}C -CP/MAS-NMR-Spektroskopie

Die Charakterisierung der immobilisierten freien Radikale mit Hilfe von NMR-Methoden ist sehr schwierig. Durch die paramagnetische Relaxation werden die T_2 -Zeiten der beobachteten Kerne so stark verkürzt, dass der FID sehr schnell abfällt und somit fast keine Signale zu erkennen sind. Selbst bei der Akkumulation von 45.000 Transienten ist die Radikalkomponente nicht zu detektieren, nur die drei Signale der Kohlenstoffatome des im ersten Syntheseschritt angebondenen Aminopropylsilans erscheinen im ^{13}C -CP/MAS-NMR-Spektrum mit größerer Linienbreite^[101].

5.1.2.2 ESR-Spektroskopie

Aus der ESR-Spektroskopie^[102,103,104] sind im Vergleich zur NMR-Spektroskopie nur eingeschränkte Aussagen über die Konstitution an sich möglich, jedoch lassen die Signalformen aus verschiedenen Experimenten Rückschlüsse auf die Art der Bindung und die Anzahl der paramagnetischen Zentren zu.

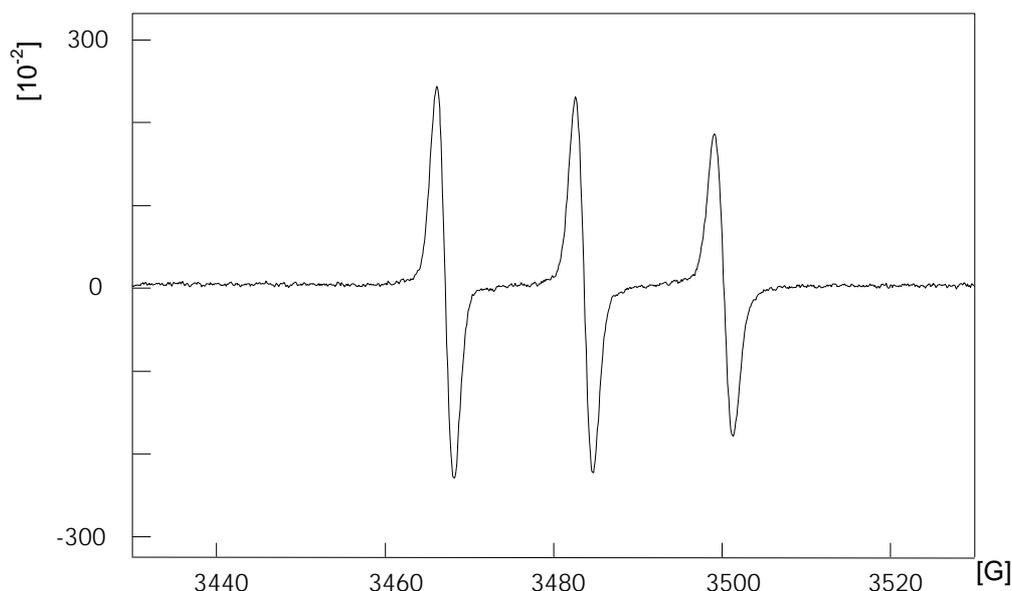


Abbildung 15: ESR-Spektrum des freien 4-Carboxy-TEMPO in DMF

Abbildung 15 zeigt das ESR-Spektrum des freien 4-Carboxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-Radikals (4-Carboxy-TEMPO-Radikal) in DMF.

Zu sehen ist ein Triplett mit den Intensitätsverhältnissen 1:1:1, welches durch die Kopplung des freien Elektrons mit dem ^{14}N -Kern (Kernspin $I = 1$) verursacht wird. Der hier erhaltene g -Faktor von $g = 2,005(7)$ ist charakteristisch für N-Oxyl-Radikale. Die Linienbreite der Zentrallinie beträgt 2,05 G.

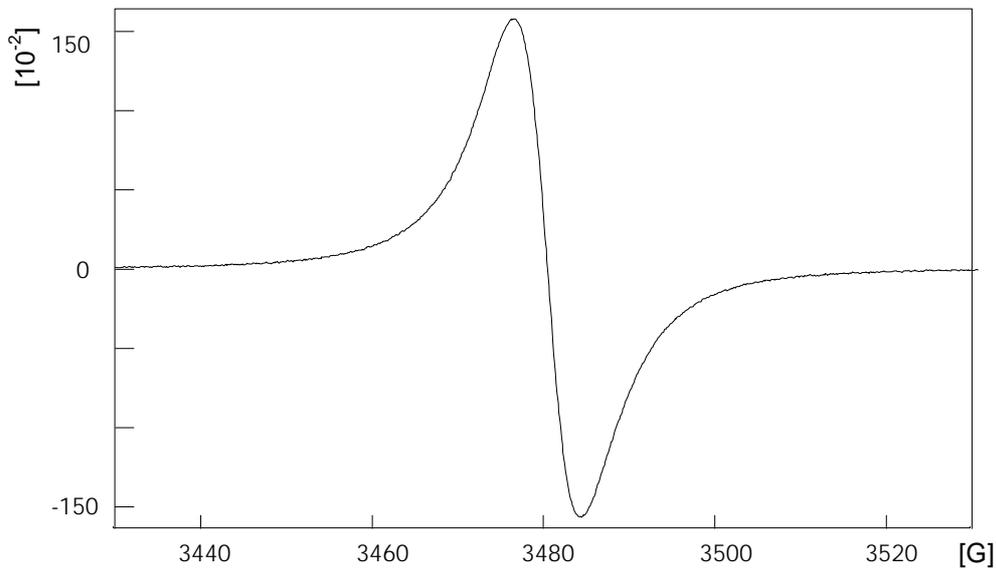


Abbildung 16: ESR-Festkörperspektrum von APS-TEMPO

Im Gegensatz hierzu ist in Abbildung 16 ein ESR-Festkörperspektrum von APS-TEMPO gezeigt. Die Aufspaltung durch den ^{14}N -Kern kann aufgrund der großen Linienbreite von 18 G nicht mehr aufgelöst werden.

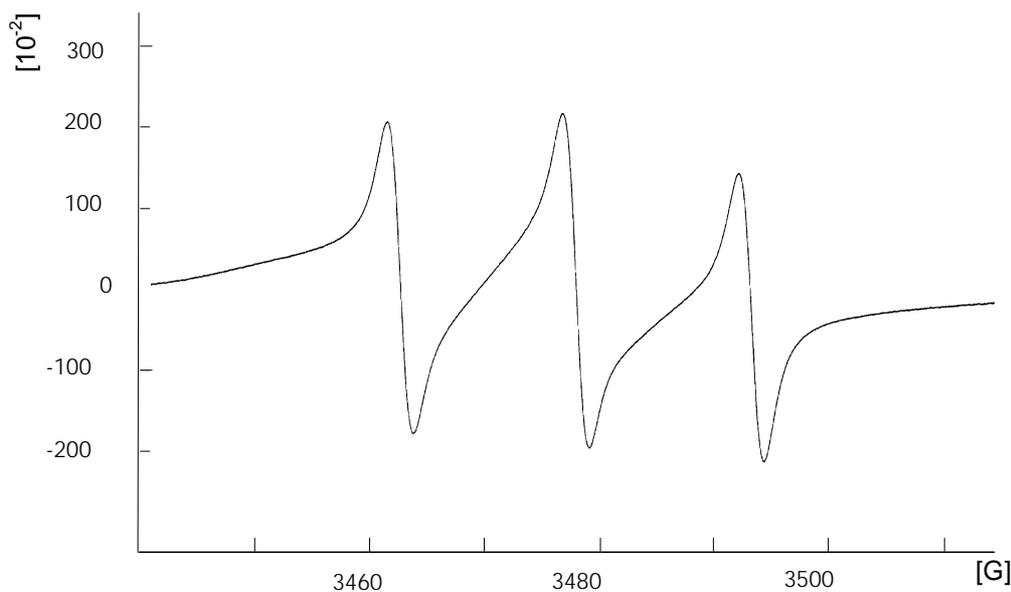


Abbildung 17: ESR-Festkörperspektrum von SI-TEMPO

Das Spektrum der SI-TEMPO-Phase liegt, im Vergleich zu den Spektren des freien TEMPO und des APS-TEMPO, in der Mitte (Abbildung 17), das Triplett ist noch aufgelöst, weist jedoch zum freien Radikal eine deutlich vergrößerte Linienbreite von ca. 2,4 G auf.

Für die sehr große Linienbreite der APS-TEMPO-Phase gibt es nun mehrere mögliche Erklärungen:

Zum einen reduziert die Immobilisierung der TEMPO-Radikale an der Kieselgeloberfläche deren Beweglichkeit drastisch. Zusätzlich können bei der APS-TEMPO-Phase über die Amidbindungen der Liganden Wasserstoffbrückenbindungen auftreten, was die Beweglichkeit weiter einschränkt.

Zum anderen könnte die räumliche Nachbarschaft zu weiteren radikalmodifizierten Kieselgelpartikeln zu einem verstärkten intermolekularen Elektron-Elektron-Austausch führen. Dies konnte jedoch durch Messungen ausgeschlossen werden, bei denen die radikalmodifizierten Kieselgelpartikel mit nichtmodifiziertem Kieselgel vermischt wurden. Hierbei trat keine verbesserte Auflösung auf.

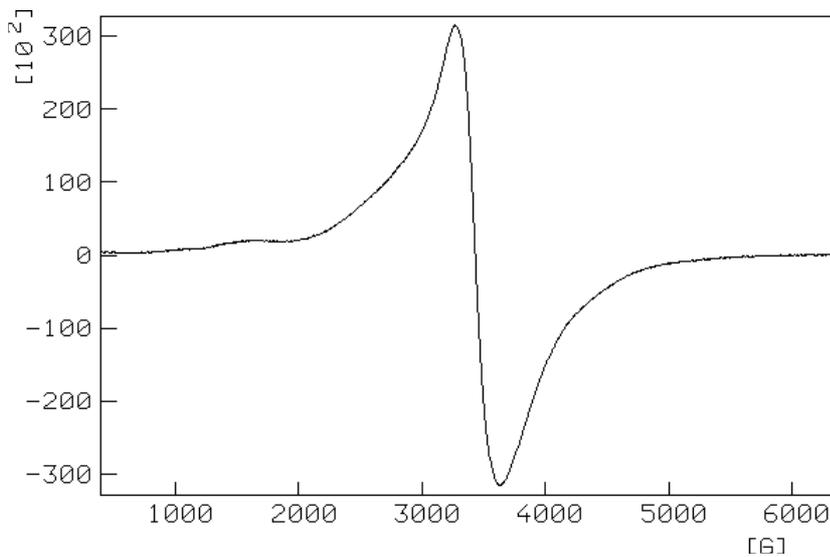
Als dritte und wichtigste Ursache ist die sehr hohe Belegungsdichte mit Radikalen der Kieselgelpartikel anzusehen. Dieses war schon durch die Farbe der verschiedenen Proben zu sehen, denn die Proben mit hoher Belegungsdichte wiesen eine deutliche Orangefärbung durch das farbige TEMPO auf. Vergleichsmessungen mit einer Vielzahl von immobilisierten freien Radikalen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dorn haben gezeigt, dass die Belegungsdichte der Kieselgele mit immobilisierten freien Radikalen tatsächlich sehr hoch ist. Hierdurch ist der Elektron-Elektron-Austausch innerhalb eines Kieselgelpartikels erhöht und führt folglich zu den großen Linienbreiten der APS-TEMPO-Phase.

Ein Teil der ESR-Messungen zu den TEMPO-Phasen wurde auch in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Gunnar Jeschke, Max-Planck Institut für Polymerforschung, Mainz durchgeführt.

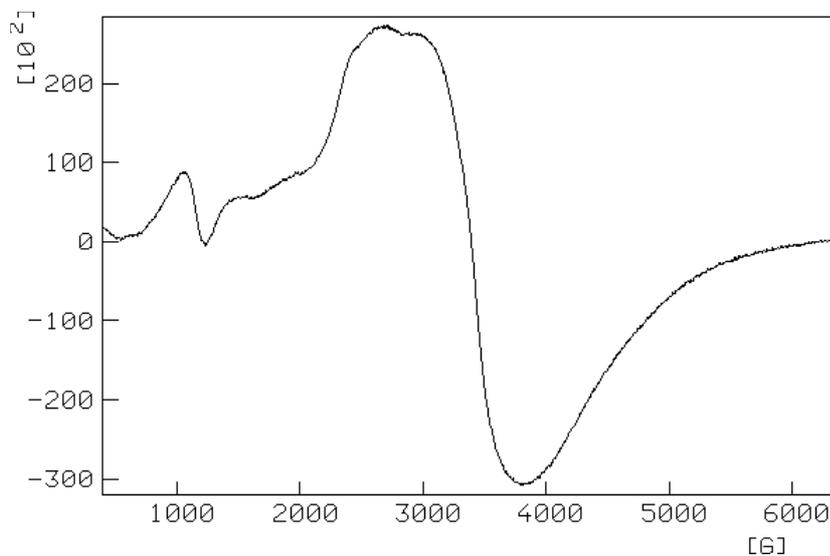
Die ESR-Spektren der immobilisierten Gadolinium-Komplexe sind von den ESR-Spektren der TEMPO-Phasen grundsätzlich verschieden. Hier liegt nun nicht mehr ein, über Sauerstoff und Stickstoff, delokalisiertes Elektron vor, sondern das Zentralatom des Komplexes weist einen Paramagnetismus mit 7

ungepaarten Elektronen auf. Entsprechend groß ist die Linienbreite der zugehörigen ESR-Spektren mit jeweils ca. 400 G. Die Spektren der beiden Gd-Komplexe sind in Abbildung 18 dargestellt. Tieftemperaturmessungen bei 77 K und Suspensionsmessungen in Chloroform und Ethanol haben keine signifikanten Änderungen des Spektrums ergeben. Daraus lässt sich schließen, dass die Einflüsse der Spacerbeweglichkeit und der Lösemittelumgebung keine entscheidende Rolle für die Linienbreite und damit für das Relaxationsverhalten spielen.

Abbildung 18: ESR-Spektren von immobilisiertem Gd-GlyMeDOTA und Gd-



Gd-GlyMeDOTA
bei RT



Gd-DTPA
bei RT

DTPA bei Raumtemperatur

In Tabelle 4 sind die ESR-spezifischen Daten der verschiedenen paramagnetischen Phasen noch einmal zusammenfassend dargestellt.

Verbindung	g-Faktor	Linienbreite [G]	Belegung
Freies TEMPO	2,005(7)	2,05	-
APS-TEMPO		18	$1 \cdot 10^{18}$ [Spins/g]
SI-TEMPO		2,4	$1 \cdot 10^{17}$ [Spins/g]
Gd-GlyMeDOTA	1,98	400	3,47 [Gew.-% Gd]
Gd-DTPA	1,98	400	2,94 [Gew.-% Gd]

Tabelle 4: ESR-spezifische Parameter der diversen Phasen

5.1.2.3 Röntgenabsorptionsspektroskopie

Die Röntgenabsorptionsspektroskopie im Bereich ab 50eV oberhalb der K- und der L-Absorptionskanten gibt wichtige Informationen über den atomaren Nahordnungsbereich und den Bindungszustand um ein absorbierendes Atom. Dieser Bereich wird EXAFS-Bereich (Extended X-Ray Absorption Fine Structure) genannt. Die theoretischen Grundlagen, Messtechnik und Anwendungsmöglichkeiten sind von Teo^[105] und Bertagnoli^[106] in Übersichtsartikeln behandelt.

Wird ein Festkörper mit Röntgenstrahlen bestrahlt, so kann diese absorbiert werden. Dadurch werden Rumpfelektronen entweder in unbesetzte Energieniveaus unterhalb des Vakuumniveaus angeregt oder sie werden photoemittiert. Ein emittiertes Photoelektron des energieabsorbierenden Atoms wechselwirkt mit den Atomen der Umgebung. Durch die aus- und rücklaufende Photoelektronenwelle ergibt sich konstruktive oder destruktive Interferenz. Amplitude und Frequenz der gedämpften, sinusförmigen Schwingung sind von der Art des Absorbers, des Bindungszustandes und den interatomaren Abständen abhängig.

Ein Röntgenstrahl mit der einfallenden Intensität $I_0(E)$ und der Energie E wird durch die Materie der Dicke d gemäß Gleichung 16 abgeschwächt:

Gleichung 16:
$$I(E) = I_0(E) \cdot e^{-\mu(E)d}$$

Hierbei ist $\mu(E)$ der energieabhängige lineare Röntgenabsorptionskoeffizient. Um den Zusammenhang zwischen den Größen, welche die Nahordnung um das Absorberatom charakterisieren, und dem Röntgenabsorptionskoeffizienten herstellen zu können, muss die Modulation $\mu(E)$ auf die Untergrundabsorption $\mu_0(E)$ (Absorption ohne Nachbaratome) bezogen werden. Daraus ergibt sich die Funktion $\chi(E)$ in Gleichung 17.

$$\text{Gleichung 17:} \quad \chi(E) = \frac{\mu(E) - \mu_0(E)}{\mu_0(E)}$$

Die Energie kann durch den Photoelektronenvektor k ausgedrückt werden:

$$\text{Gleichung 18:} \quad k = \frac{1}{\sqrt{\frac{8\pi^2 m_e}{h^2} (E - E_0)}}$$

Hierbei sind k der Photoelektronenwellenvektor [1/m], h die Plancksche Konstante [Js], m_e die Ruhemasse des Elektrons [kg], E die Energie des einfallenden Photons [J], E_0 die Energie der Absorptionskante [J].

Unter Berücksichtigung der Abhängigkeit der Oszillationen von der Art, Anzahl und Entfernung der Nachbaratome des Absorbers ergibt sich die erwartete relative Änderung des Absorberkoeffizienten $\chi_{\text{theo}}(k)$. Die EXAFS-Funktion im k -Raum enthält zwar die gesamte Information, ist aber nicht anschaulich zu interpretieren. Die Fourier-Transformation von $\chi(k)$ ergibt die radiale Verteilungsfunktion $F(r)$, die Maxima und damit eine Verteilung der Rückstreuer anzeigt.

Mit den EXAFS-Untersuchungen soll geklärt werden, ob sich der Abstand der Nachbaratome um das Gd-Atom durch die Immobilisierung verändert. Dies ist möglich, da die EXAFS-Spektroskopie im Gegensatz zur Röntgenkristallstrukturanalyse auch amorphe und flüssige, gelöste Proben untersuchen kann. Leider ist es technisch zur Zeit noch nicht möglich, EXAFS-Untersuchungen an Festkörpern in Suspension durchzuführen.

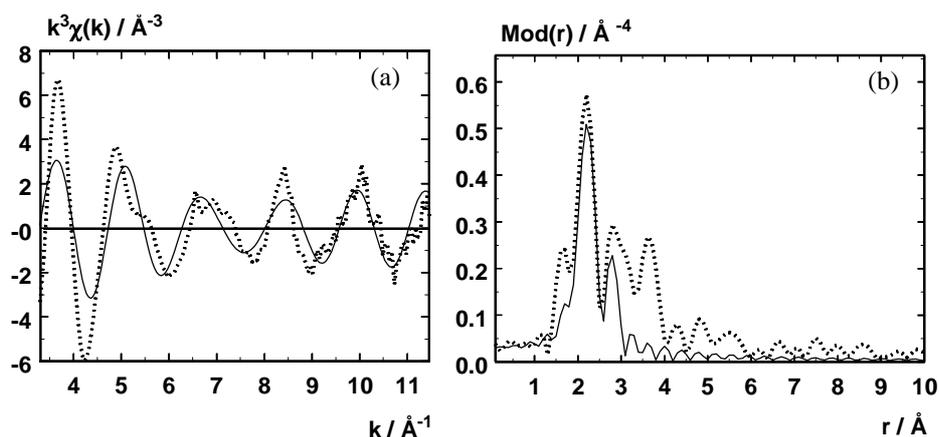


Abbildung 19: Experimentelle (gepunktete Linie) und berechnete (durchgezogene Linie) $k^3 \chi(k)$ Funktion (a) und ihre Fourier-Transformierte (b) für den **freien Gd-DOTA-Komplex**

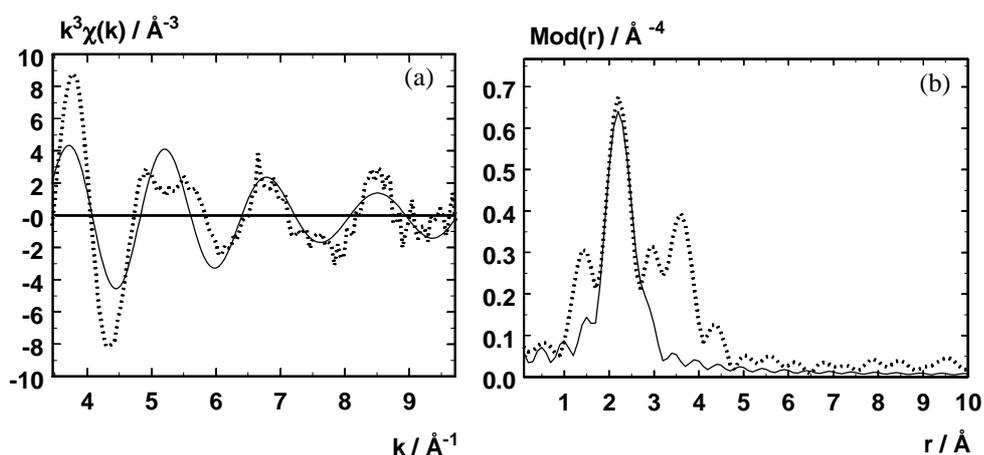


Abbildung 20: Experimentelle (gepunktete Linie) und berechnete (durchgezogene Linie) $k^3 \chi(k)$ Funktion (a) und ihre Fourier-Transformierte (b) für den **immobilisierten Gd-DOTA-Komplex**

Atome	N	Freies Gd-GlyMeDOTA		Immobilisiertes Gd-GlyMeDOTA	
		r, Å	σ , Å	r, Å	σ , Å
Gd-O	4	2.38 ± 0.02	0.077 ± 0.012	---	---
	5	---	---	2.32 ± 0.02	0.074 ± 0.015
Gd-N	4	2.62 ± 0.03	0.067 ± 0.010	2.54 ± 0.03	0.081 ± 0.012

Tabelle 5: Strukturparameter für die Gd-GlyMeDOTA-Komplexe

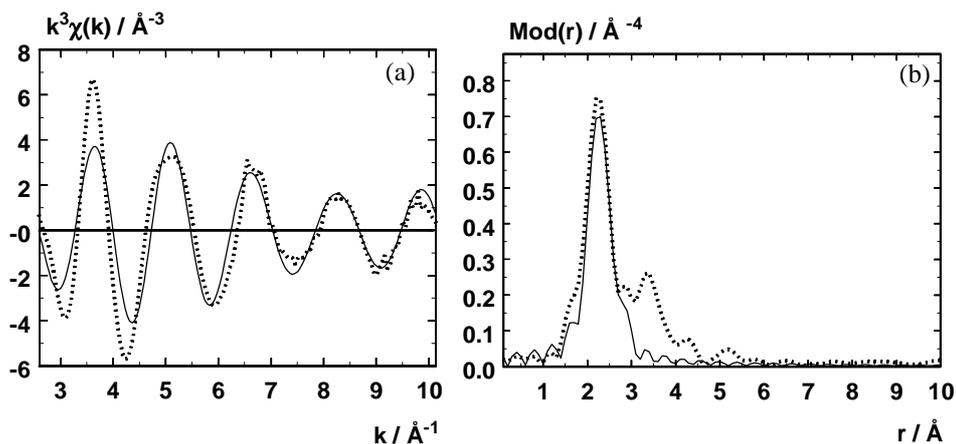


Abbildung 21: Experimentelle (gepunktete Linie) und berechnete (durchgezogene Linie) $k^3 \chi(k)$ Funktion (a) und ihre Fourier-Transformierte (b) für den **freien Gd-DTPA-Komplex**

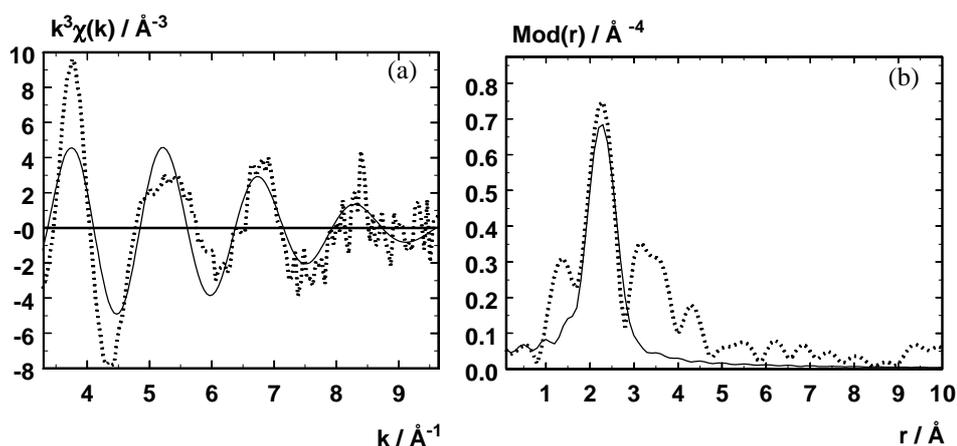


Abbildung 22: Experimentelle (gepunktete Linie) und berechnete (durchgezogene Linie) $k^3 \chi(k)$ Funktion (a) und ihre Fourier-Transformierte (b) für den **immobilisierten Gd-DTPA-Komplex**

Atome	N	Freies Gd-DTPA		Immobilisiertes Gd-DTPA	
		r, Å	σ , Å	r, Å	σ , Å
Gd-O	5	2.38 ± 0.02	0.070 ± 0.011	2.33 ± 0.02	0.084 ± 0.016
Gd-N	3	2.62 ± 0.03	0.063 ± 0.006	---	---
	4	---	---	2.51 ± 0.03	0.081 ± 0.012

Tabelle 6: Strukturparameter für die Gd-DTPA-Komplexe

Die Koordination und die ungefähren Abstände der Komplexe waren aus Röntgenkristallstrukturuntersuchungen bereits bekannt. Ausgehend von diesen Röntgenkristallstrukturdaten konnten aus den EXAFS-Funktionen die in Tabelle 5 für Gd-GlyMeDOTA und in Tabelle 6 für Gd-DTPA dargestellten Koordinationszahlen N , Absorber-Rückstreuer-Abstände r und Debye-Waller-Faktoren σ für die beiden Komplexe gefunden werden. Sowohl bei der Immobilisierung des freien Gd-GlyMeDOTA- als auch des freien Gd-DTPA-Komplexes tritt eine Abstandsverkürzung von $0,06$ bzw. $0,05 \text{ \AA} \pm 0,02 \text{ \AA}$ für die Sauerstoffabstände und von $0,08$ bzw. $0,11 \text{ \AA} \pm 0,03 \text{ \AA}$ für die Stickstoffabstände ein.

Aus den EXAFS-Daten konnten die in Abbildung 23 und Abbildung 24 gezeigten Strukturen konstruiert werden.

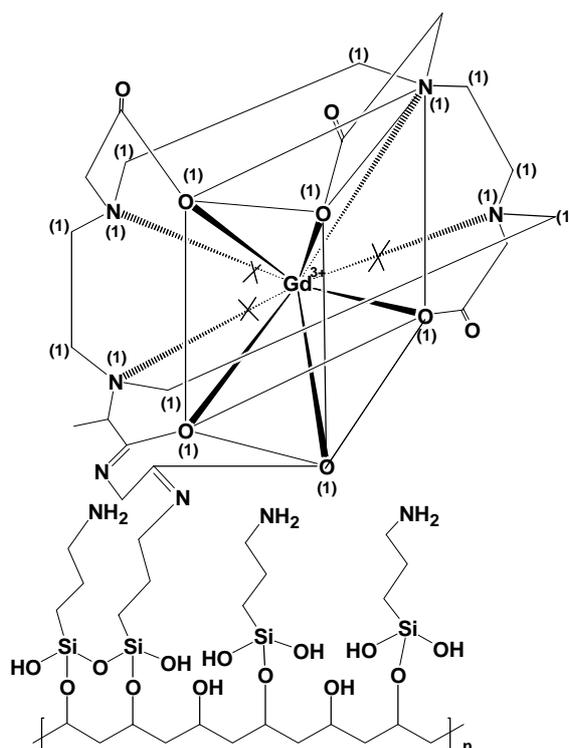


Abbildung 23: Räumliche Struktur des Gd-GlyMeDOTA-Komplexes

Der Gd-GlyMeDOTA-Komplex liegt 9-fach koordiniert, in Form eines verzerrten, dreifach überkappten trigonalen Prismas, vor. Die Ergebnisse korrelieren mit den Röntgenkristallstrukturdaten einer kristallinen Probe. Es wurden 4 gleiche Stickstoff- und 5 gleiche Sauerstoff-Abstände gefunden.

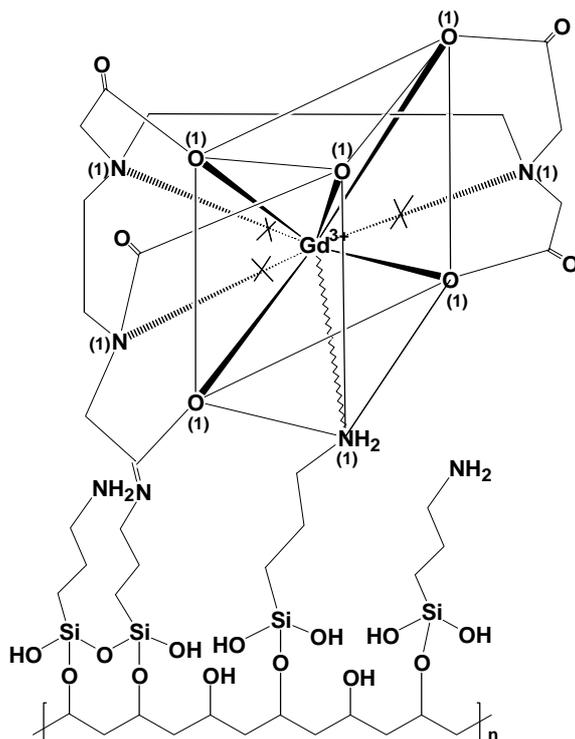


Abbildung 24: Räumliche Struktur des Gd-DTPA-Komplexes

Der Gd-DTPA-Komplex liegt ebenfalls 9-fach koordiniert, in Form eines verzerrten, dreifach überkappten, trigonalen Prismas, vor. Dieses Ergebnis korreliert ebenfalls mit Röntgenkristallstrukturdaten einer kristallinen Probe. Es wurden 4 gleiche Stickstoff- und 5 gleiche Sauerstoff-Abstände gefunden. Um die Koordinationszahl von neun zu erreichen muss zusätzlich ein Stickstoffatom einer freien Aminopropylgruppe an den Komplex koordinieren.

5.1.3 Quantitative Durchfluss- ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Wie bereits in Abschnitt 3.2.1.3 beschrieben, sind in der Durchfluss- ^{13}C -NMR-Spektroskopie die langen Spin-Gitter-Relaxationszeiten ein Problem. Die Zeit vom Eintreten der Probe in den Magneten bis zur Detektion ist bereits bei kleinen Flüssen nicht mehr ausreichend, um die volle z-Magnetisierung aufzubauen. Dies wirkt sich vor allem auf quartäre, aromatische C-Atome aus, deren T_1 -Zeiten oft sehr lange sind. Wie in Abbildung 25 deutlich zu sehen, nimmt das Signal des quartären C-Atoms von Ethylbenzol bei 146 ppm (mit dickem Pfeil gekennzeichnet) bis zu hohen Flüssen sehr stark ab.

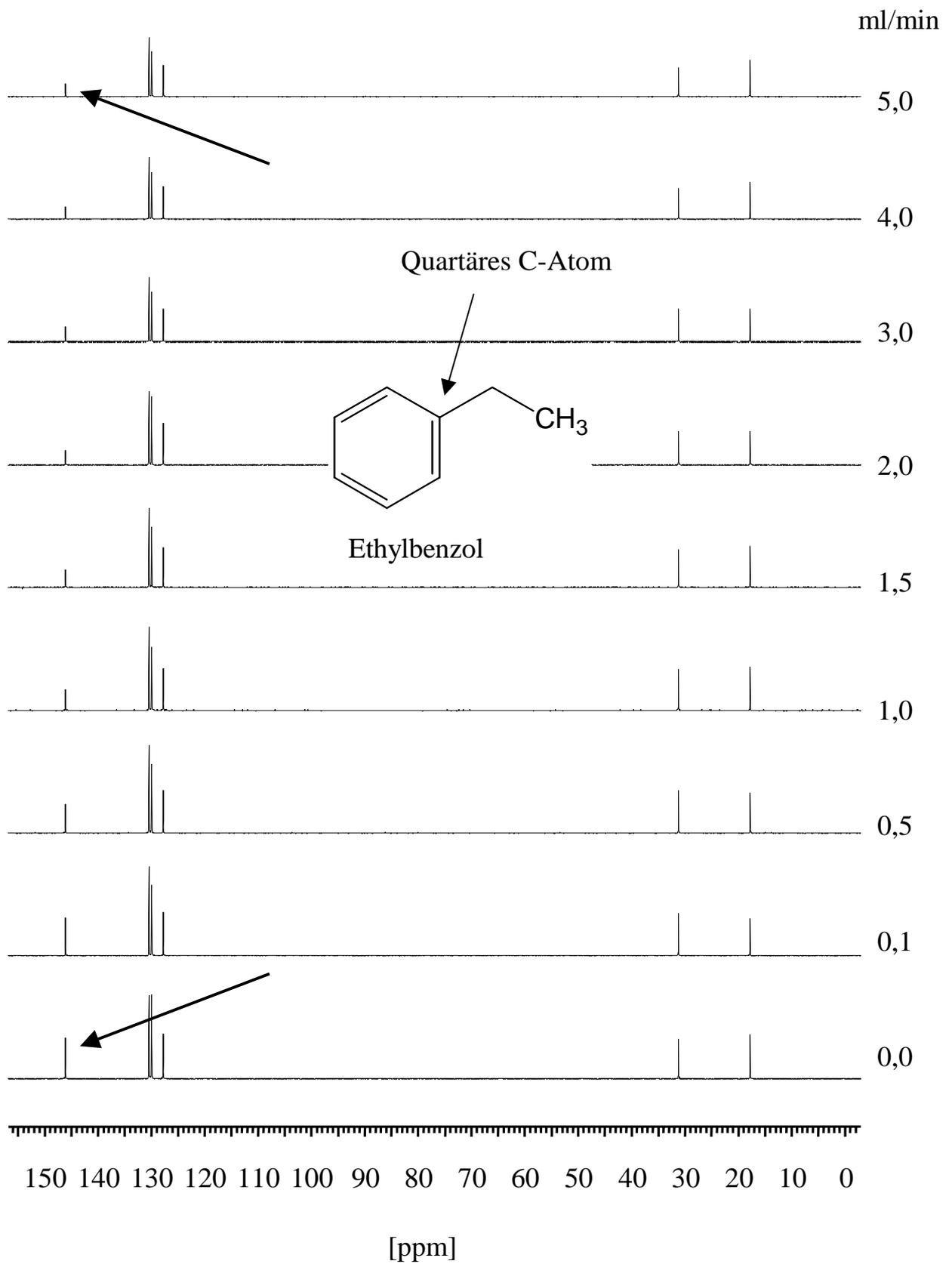


Abbildung 25: Durchfluss- ^{13}C -NMR-Spektren von Ethylbenzol bei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten

Mittels der Verwendung von immobilisierten freien Radikalen bzw. paramagnetischen Metallchelaten soll nun eine Verkürzung der Spin-Gitter-Relaxationszeiten erwirkt werden, um so höhere Signalintensitäten und gegebenenfalls eine vollständige Integrierbarkeit zu erreichen.

Als Analyt wurde reines Ethylbenzol gewählt, da dort sowohl schnell relaxierende aliphatische C-Atome, aromatische CH-Gruppen als auch ein aromatisches, quartäres C-Atom mit sehr langer Spin-Gitter-Relaxationszeit (T_1 -Zeit > 35 s) vorliegen. In Abbildung 26 ist der Aufbau und die Position der angebenen Radikale und Metallchelate in der Messzelle für die Durchfluss- ^{13}C -NMR-Messungen gezeigt.

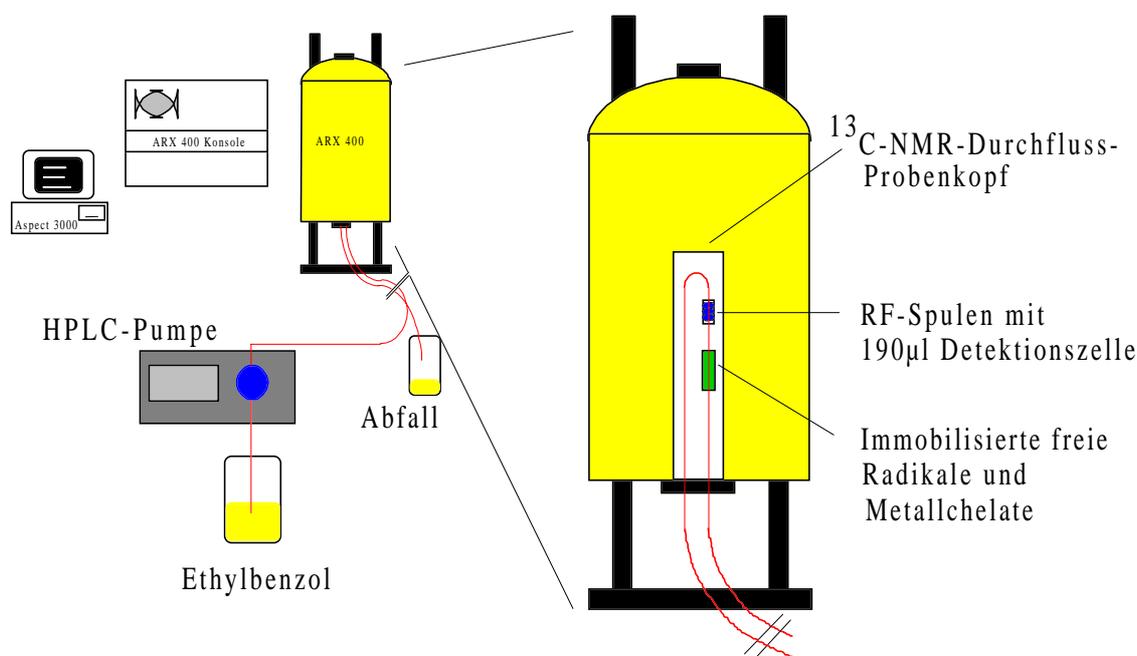


Abbildung 26: Apparativer Aufbau für die Durchfluss- ^{13}C -NMR-Experimente

Eine mit immobilisierten freien Radikalen und paramagnetischen Metallchelatenkomplexen gepackten PEEK-Säulen wurden etwa 6 cm unterhalb der NMR-Messspule im Probenkopf plziert. Ein Wechsel der Säule war demzufolge mit erhöhtem Aufwand verbunden, da jedesmal der Probenkopf ausgebaut, aufgeschraubt, die Säule gewechselt, zugeschraubt, eingebaut und anschließend die Homogenität des Magneten wieder hergestellt werden musste.

Die Messungen wurden an einem Bruker ARX 400 NMR-Spektrometer durchgeführt. Der Analyt wurde mit einer normalen HPLC-Pumpe im recycled-flow Modus durch den Probenkopf gepumpt. Hierbei betrug die Distanz zwischen Pumpe und Magnet ungefähr 2 m; die Verbindung zwischen Pumpe und Durchflussprobenkopf erfolgte über Edelstahlkapillaren. Die Durchfluss- ^{13}C -NMR-Spektren von Ethylbenzol wurden bei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten im "Inverse-Gated-Decoupling"-Modus aufgenommen. Pro Spektrum wurde dabei nur ein Transient akkumuliert. Zur Referenzmessung wurde eine Säule mit reinem aminopropylmodifiziertem Kieselgel gefüllt und dann bei den gleichen Messbedingungen untersucht. Somit lassen sich Effekte aufgrund eventuell verlängerter Aufenthaltszeiten im Vormagnetisierungsvolumen berücksichtigen. Es wurde jeweils auf das Integral der Methylgruppe des entsprechenden Spektrums referenziert.

Abbildung 27 zeigt eine Spektrenfolge, die unter IFR-Messbedingungen mit einer APS-TEMPO-Phase aufgenommen wurde. Eine Abnahme der Signalintensität am quartären C-Atom ist zwar ebenfalls zu beobachten, jedoch in deutlich geringerem Maße. Abbildung 28 belegt dieses anhand der Integralwerte des quartären C-Atoms von Ethylbenzol unter IFR- und Referenz-Messbedingungen in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit.

Aus Abbildung 28 ist der Einfluss der IFR-Messbedingungen auf die Signalintensität des quartären Kohlenstoffatoms von Ethylbenzol klar zu erkennen. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,7 ml/min beginnen die Integralwerte zwischen IFR- und Referenz-Experiment zu differieren. Eigentlich ist eine genaue Integration gerade bei niedrigen Fließgeschwindigkeiten unter dem Einfluss der Radikale zu erwarten, jedoch spielen gerade bei niedrigen Fließgeschwindigkeiten Relaxationseffekte auf dem Transferweg von der Radikalsäule in die Messzelle eine Rolle.

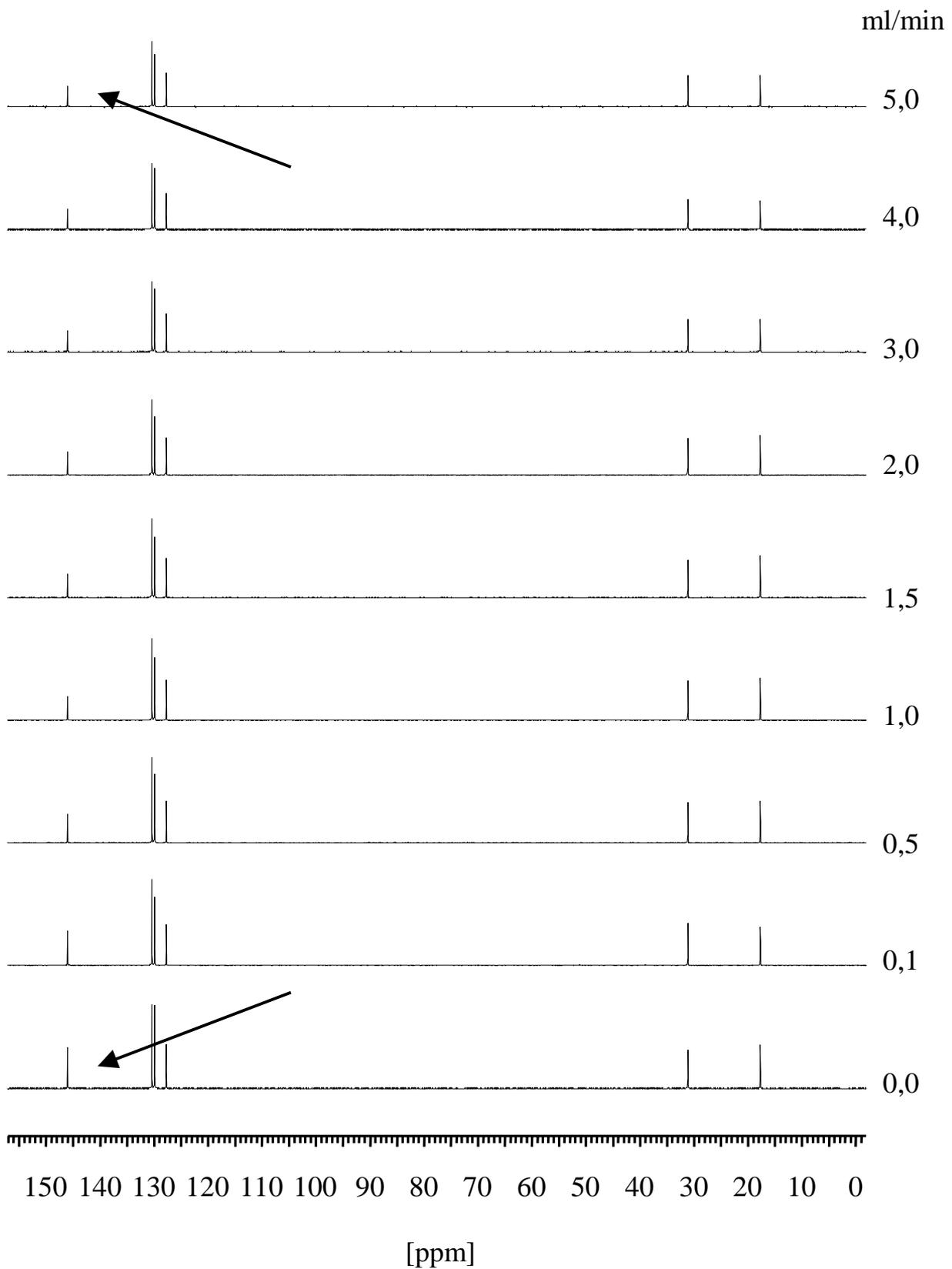


Abbildung 27: Durchfluss- ^{13}C -NMR-Spektren von Ethylbenzol unter Einfluss der APS-TEMPO-Phase, bei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten

Nähere Untersuchungen hierzu waren aufgrund der vorhandenen Probenkopfmessanordnung nicht möglich. Unter Verwendung von neu zu entwickelnden Probenköpfen mit verändertem Design, vor allem Kapillar-NMR-Probenköpfe, sind weiterführende Untersuchungen geplant. Hierbei sollen die auf der Kapillarwand immobilisierten freien Radikale ohne Transfervolumina direkt vor die NMR-Messzelle in das Durchfluss-System eingebracht werden.

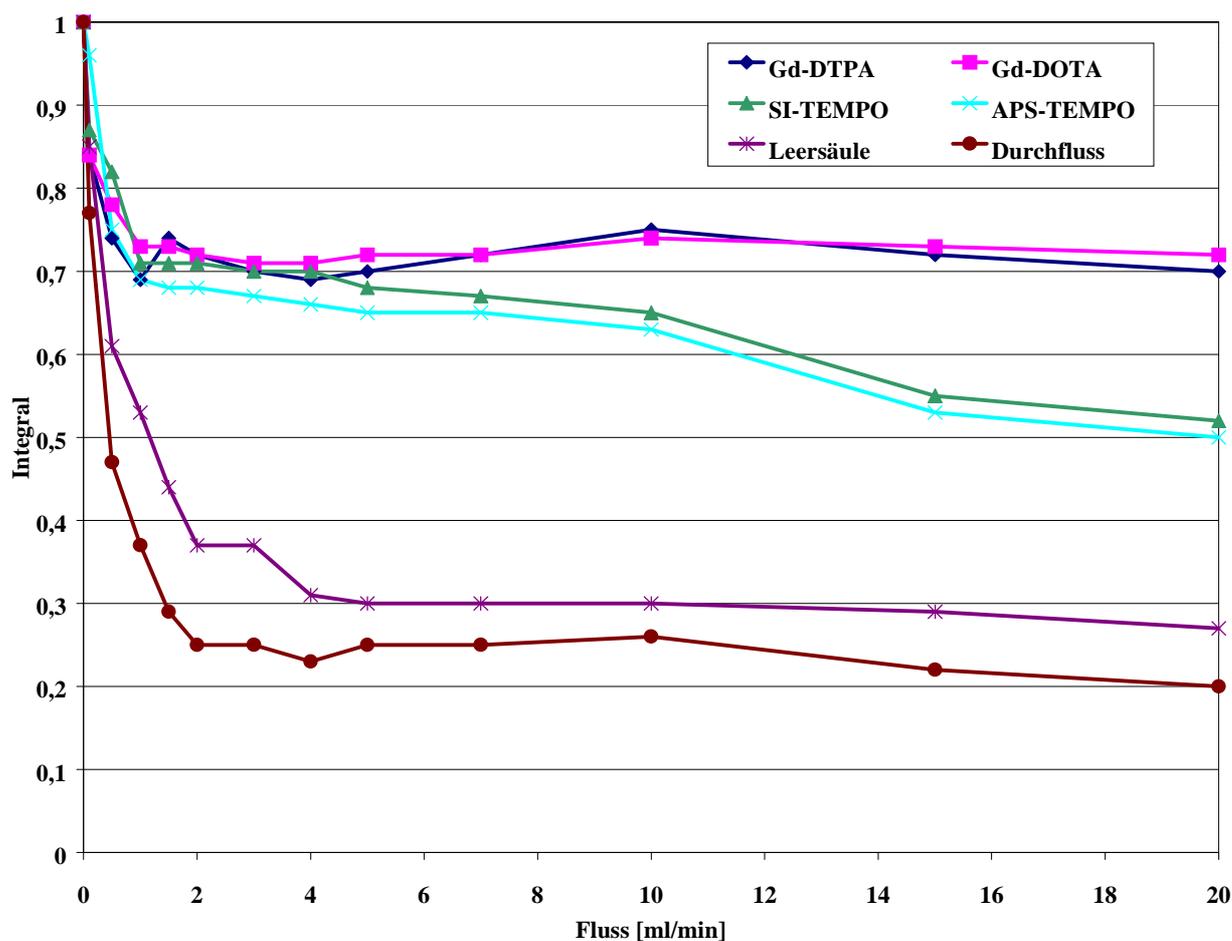


Abbildung 28: Integralwerte des quartären C-Atoms von Ethylbenzol in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit

Die APS-TEMPO-Phase und die SI-TEMPO-Phase sind in ihrer Relaxationseigenschaft annähernd gleich und weisen gegenüber der Leersäule oder dem reinen Durchflussexperiment deutliche Steigerung der Intensitäten auf. Bei sehr hohen Flüssen ab 5 ml/min nehmen die Intensitäten jedoch deutlich ab. Im Gegensatz dazu zeigen die paramagnetischen Metallchelatekomplexe auch bei den sehr hohen Flüssen eine gute Relaxationstendenz.

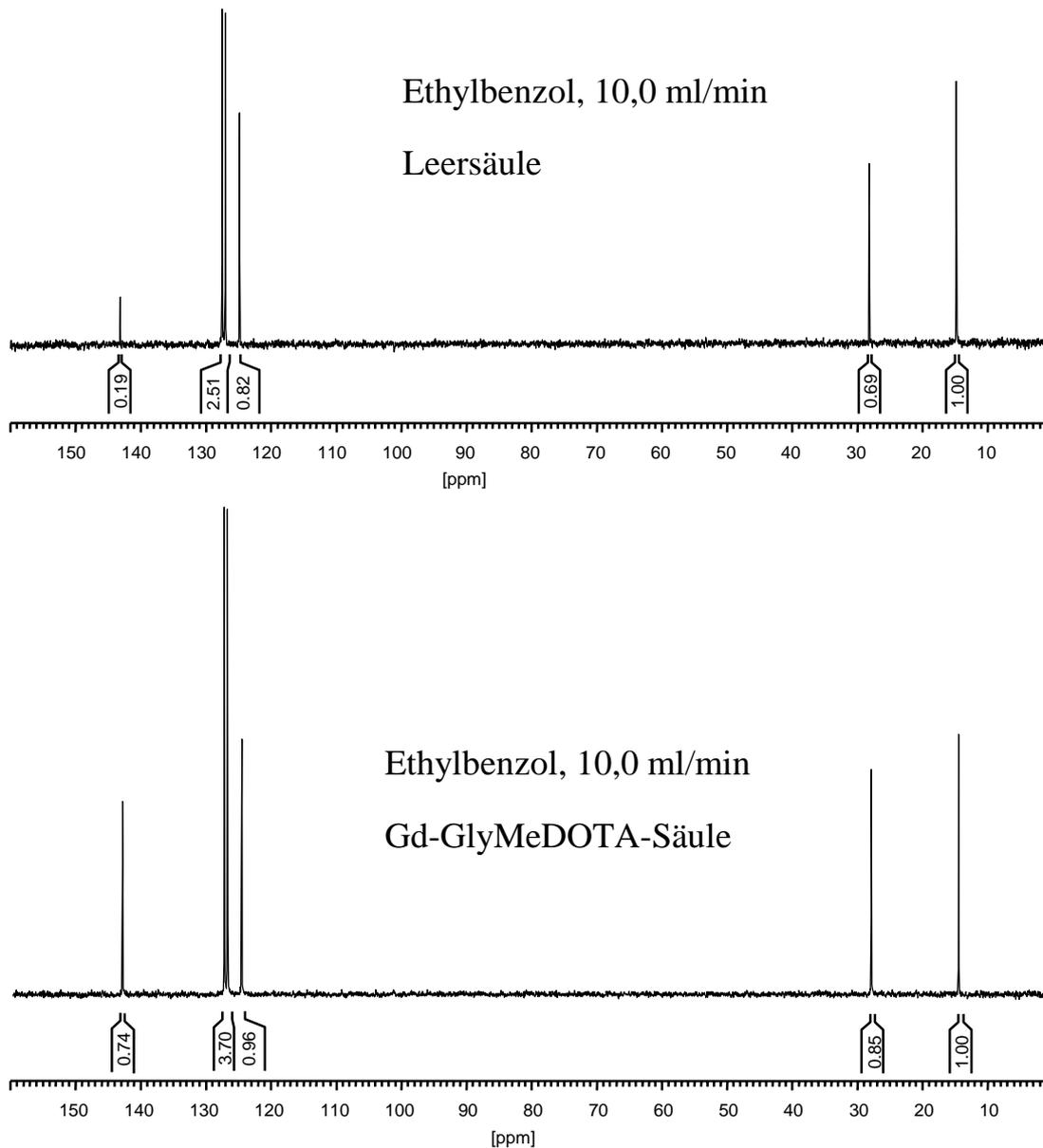


Abbildung 29: Integrierte ^{13}C -NMR-Spektren von Ethylbenzol mit Leer- (oben) und Gd-GlyMeDOTA-Säule (unten) bei einem Fluss von 10 ml/min

In Abbildung 29 sind nochmals beispielhaft die Spektren von zwei Experimenten herausgegriffen. Gerade bei einer hohen Flussrate von 10 ml/min wird der große Einfluss des paramagnetischen Metallchelatkomplexes auf die Signalintensität im Vergleich zu dem Spektrum deutlich, welches nur mit der Leersäule aufgenommen worden ist. Die Steigerung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses S/N der immobilisierten freien Radikale und paramagnetischen Metallchelate pro Zeiteinheit lässt sich aus Gleichung 19 ableiten:

$$\text{Gleichung 19: } S/N = \frac{60}{\tau} \cdot \text{Integralwert}$$

Hierbei ist τ die Aufenthaltszeit der Probe in der Durchflusszelle (190 μ l). Aus Gleichung 19 sind die Faktoren für die Steigerung der Signal-zu-Rausch-Verhältnisse in Abhängigkeit des Flusses und der verwendeten immobilisierten Relaxationsreagenzien für das quartäre Kohlenstoffatom im Ethylbenzol berechnet und in Abbildung 30 dargestellt.

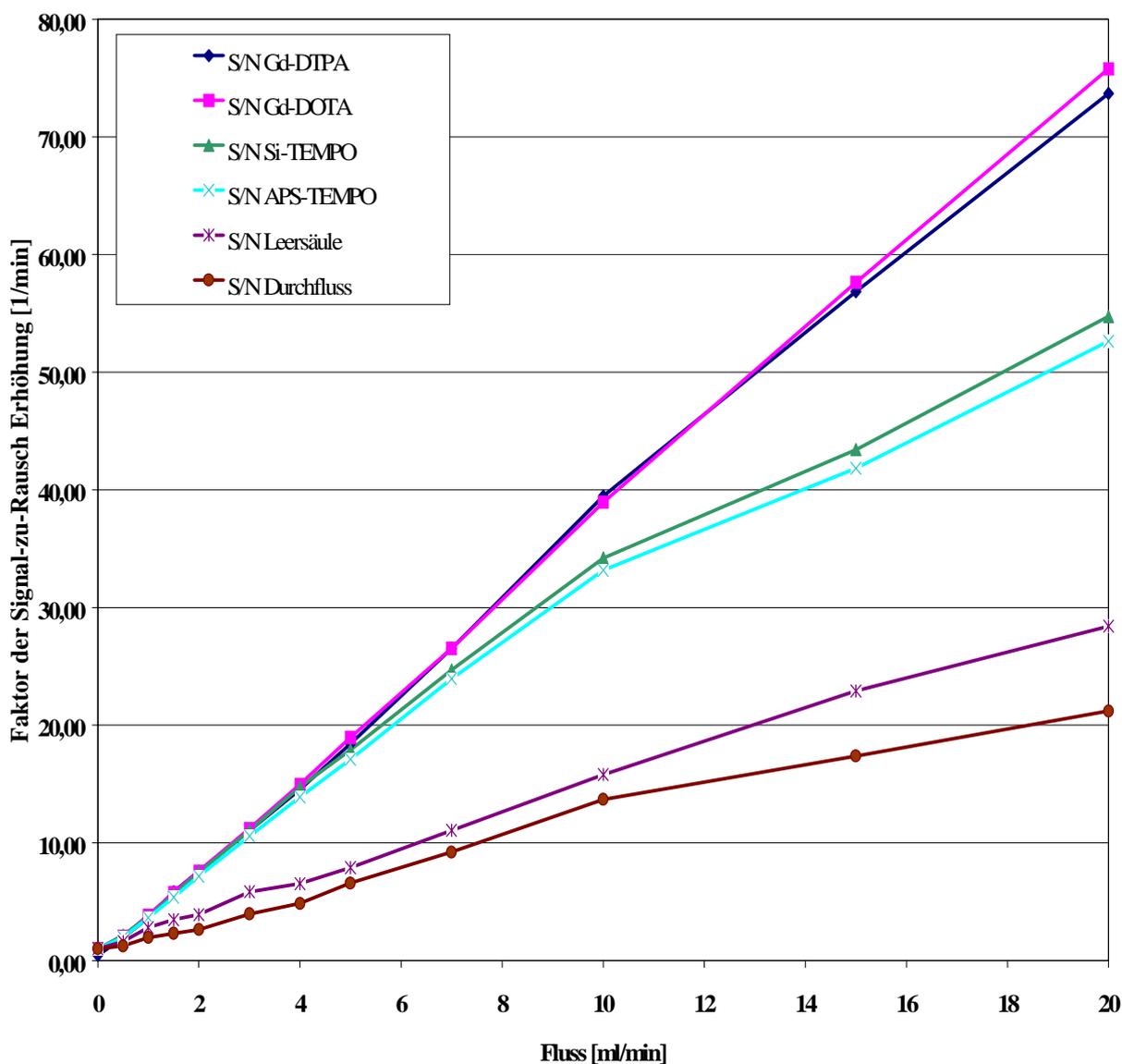


Abbildung 30: Steigerung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses pro Zeiteinheit in Abhängigkeit des angelegten Flusses und der Art der immobilisierten paramagnetischen Reagenzien

Ausgehend von der statischen Messung (Fluss = 0 und S/N-Faktor = 1) steigt durch die Verwendung der reinen Durchfluss-Methode (Linie mit Kreisen) bis zu einer Flussrate von 20 ml/min das S/N-Verhältnis um den Faktor 20 an. Die

Berücksichtigung des vergrößerten Vormagnetisierungsvolumens der verwendeten Säulen durch die Messung mit der Leersäule bringt dabei einen Faktor von 28 ein. Die IFRs verdoppeln diesen Faktor fast auf 53-55. Den größten Faktor für den S/N-Anstieg verursachen die paramagnetischen Metallchelate mit bis zu 77 bei einer Flussrate von 20 ml/min.

Wird diese Steigerung der S/N-Faktoren unabhängig vom Fluss betrachtet, so ist bei der Verwendung der paramagnetischen Metallchelate jeweils eine Steigerung um den Faktor 4 im Vergleich zum reinen Durchflussexperiment festzustellen.

Der erhöhte Integralwert und das starke Ansteigen des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses des IFR-Experimentes belegt also deutlich den Einfluss der verwendeten immobilisierten freien Radikale und paramagnetischen Metallchelate auf die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 . Mit Hilfe des IFR-Experimentes wird eine Quantifizierung von "Inverse-Gated"-entkoppelten ^{13}C -NMR-Spektren in fließenden Systemen ermöglicht. Mit dem Einsatz der immobilisierten paramagnetischen Substanzen wird durch den paramagnetischen Relaxationseffekt eine besonders starke T_1 -Zeitverkürzung erreicht, welches aus den ESR-Spektren zu erwarten war.

5.1.4 Quantitative SFC-NMR-Spektroskopie

Wie in 4.3 beschrieben, sind die T_1 -Zeiten auch in überkritischen Fluiden verlängert. Das ist gerade in der Strukturaufklärung mittels SFC-NMR-Kopplung von großem Nachteil, da die Integration der Spektren dann nicht mehr möglich ist. Die Integration liefert jedoch einen wichtigen Beitrag bei der Strukturanalyse unbekannter Verbindungen. Von der Verlängerung der Spin-Gitter-Relaxationszeit sind vor allem aromatische Protonen betroffen.

Die Verwendung der IFR-Technik kann auch in überkritischen Medien analog zur ^{13}C -NMR-Spektroskopie gehandhabt werden und ist auch hier ein probates Mittel, das Problem der langen T_1 -Zeiten zu lösen^[107].

SFC-NMR-Experimente werden mit einer speziellen experimentellen Anordnung durchgeführt, welche in Abbildung 31 abgebildet ist. Zusätzlich zu einer Spezialpumpe zur Förderung der überkritischen mobilen Phase wird ein, dem SFC-NMR-Probenkopf nachgeschalteter Rückdruckregler benötigt, um

den überkritischen Zustand auch in der Messzelle zu gewährleisten.

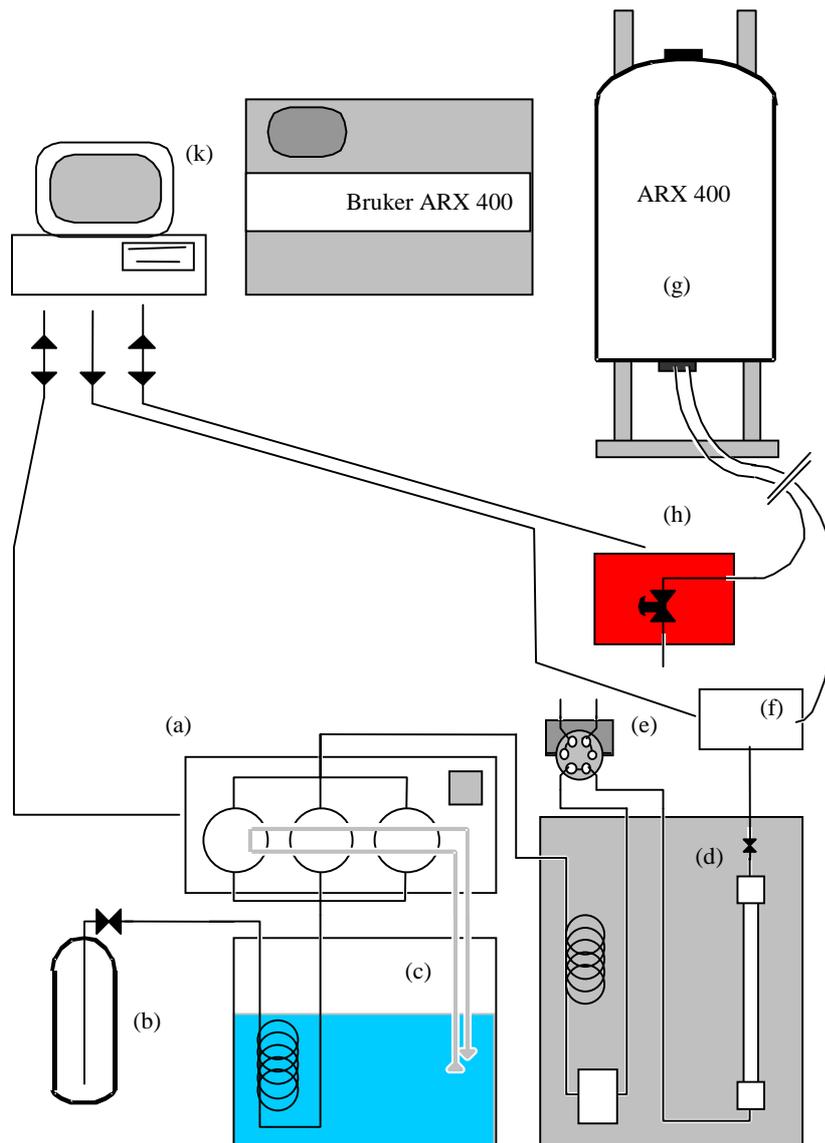


Abbildung 31: Messaufbau für die SFC-NMR-Kopplung: Gilson SFC-Pumpe (a), CO₂-Flasche mit Steigrohr (b), Kühlbad (c), GC-Ofen mit Temperiereinheit, Mischkammer und Trennsäule (d), Valco Einspritzventil (e), HP UV-Detektor mit druckstabiler Flusszelle (f), Hochfeld-Magnet (g), Jasco Rückdruckregler (h), Konsole (i) und Steuerrechner (k)

In ersten Experimenten wurde, analog zu den Durchfluss-¹³C-NMR-Experimenten, Ethylbenzol als Analyt verwendet. Für jedes continuous-flow Experiment wurde dabei eine Menge von ca. 10 mg Ethylbenzol eingespritzt.

Die folgende Abbildung 32 zeigt die Integralwerte, welche sich aus dem Vergleich von Spektren mit und ohne den Einsatz von immobilisierten freien Radikalen bei einer Flussrate von 3 ml/min ergeben. In Tabelle 7 sind die Werte nochmals zusammengestellt.

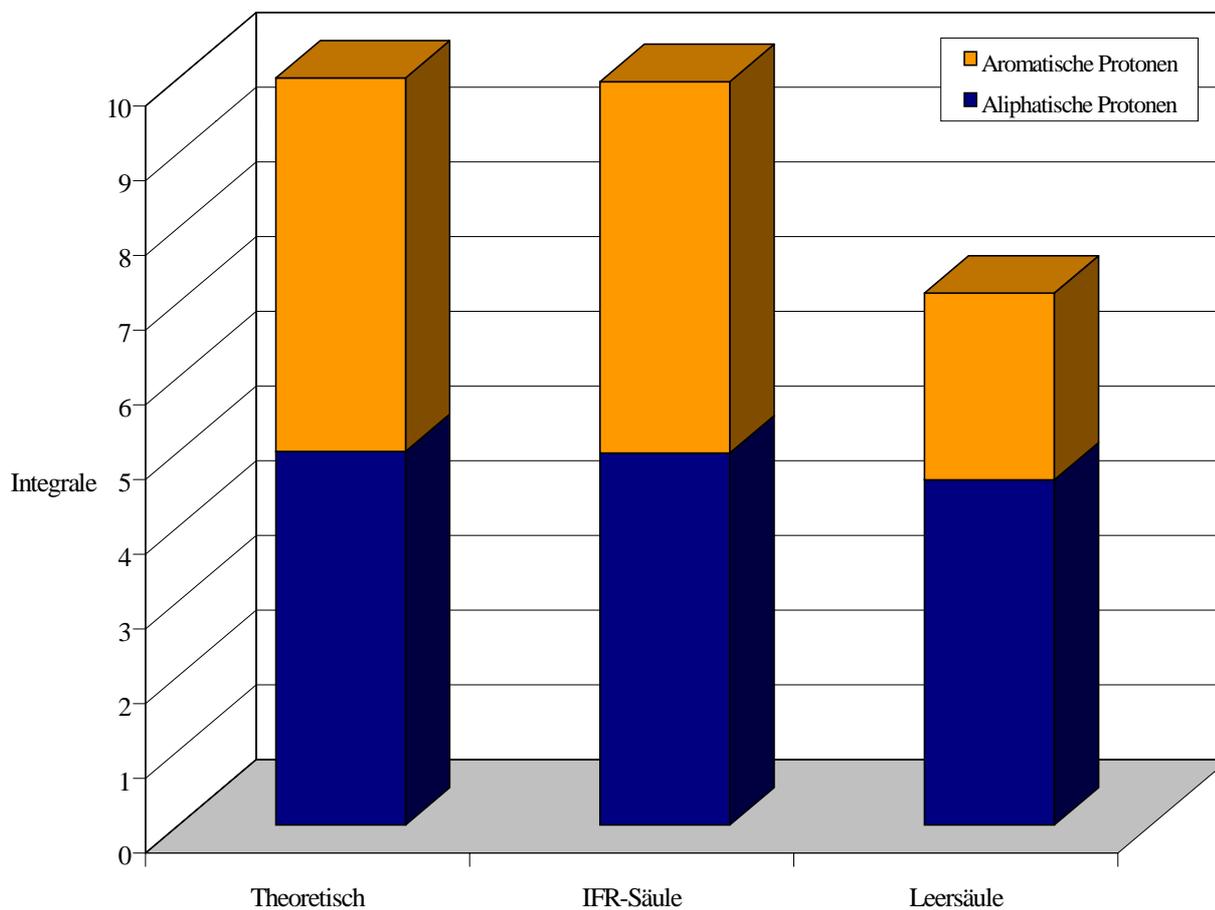


Abbildung 32: Integralwerte der aliphatischen und aromatischen Protonen von Ethylbenzol in überkritischem CO₂ im Vergleich mit und ohne immobilisierte freie Radikale (3 ml/min Fluss)

Integral/Gruppen	Aliphatische Protonen	Aromatische Protonen
Theoretisch	5,0	5,0
IFR-Säule	4,98	4,97
Referenzsäule	4,62	2,5

Tabelle 7: Integralvergleich von aliphatischen zu aromatischen Protonen im Ethylbenzol, mit und ohne immobilisierte freie Radikale

Hierbei wird deutlich, dass das Verhältnis zwischen aliphatischen und aromatischen Protonen im herkömmlichen SFC-Durchfluss- ^1H -NMR-Spektrum eine Integration nicht zulässt. Die aromatischen Protonen sind mit einem Integralwert von 2,5 - zu theoretisch 5 - eindeutig unterrepräsentiert. Bei Verwendung der immobilisierten freien Radikale im Vormagnetisierungsvolumen können hingegen integrierbare Durchfluss-SFC- ^1H -NMR-Spektren mit einem Wert von 4,97 für die aromatischen Protonen erhalten werden. Abbildung 33 zeigt ein ^1H -NMR-Spektrum von Ethylbenzol im überkritischen Zustand unter Durchführung des IFR-Experimentes. Hierbei wurde im Vormagnetisierungsvolumen eine APS-TEMPO-Säule eingebracht. Die mit Sternchen (*) bezeichneten Peaks sind Restsignale des Locklösemittel d_4 -Methanol.

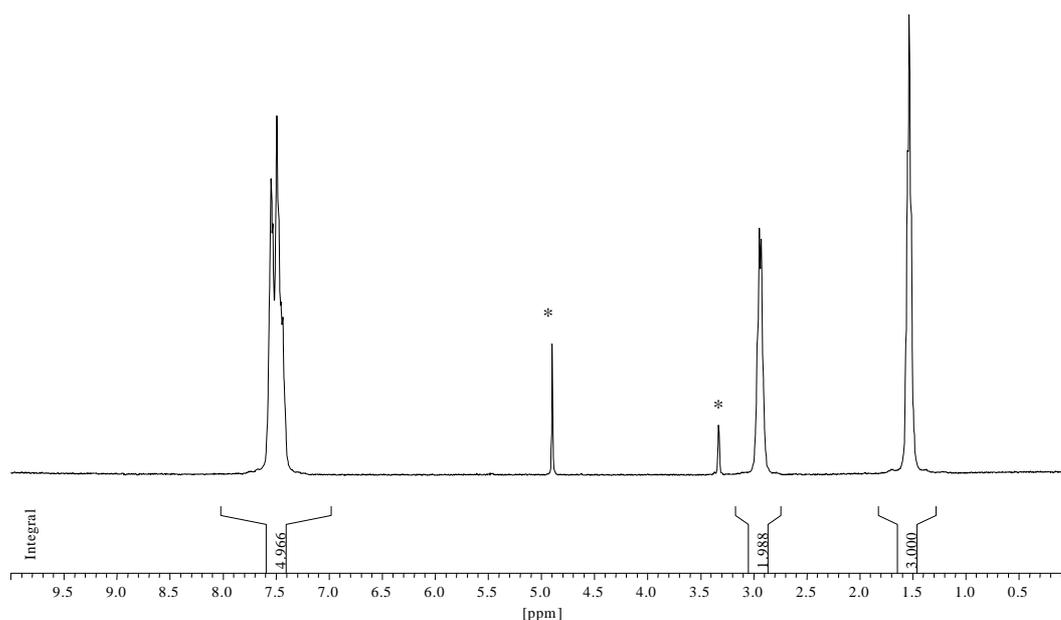


Abbildung 33: ^1H -NMR-Spektrum von Ethylbenzol im überkritischen Zustand mit TEMPO-Säule

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss der immobilisierten freien Radikale auf eine Mischung von industrierelevanten Substanzen, den Phthalaten, welche als Weichmacher in zahlreichen Polymeren eine breite Anwendung finden, untersucht.

Als Trennsäule wurde eine ProntoSIL C₁₈-Säule der Firma Bischoff verwendet. Das Analytgemisch bestand aus äquimolaren Mengen von Diallylphthalat und Dibutylphthalat in Dichlormethan. Bei jedem continuous-flow Lauf wurde eine Menge von ca. 300 µg pro Komponente eingespritzt.

Abbildung 34 zeigt einen solchen on-line continuous-flow-SFC-¹H-NMR-Lauf. Im Vormagnetisierungsvolumen wurde ebenfalls eine APS-TEMPO-Säule verwendet.

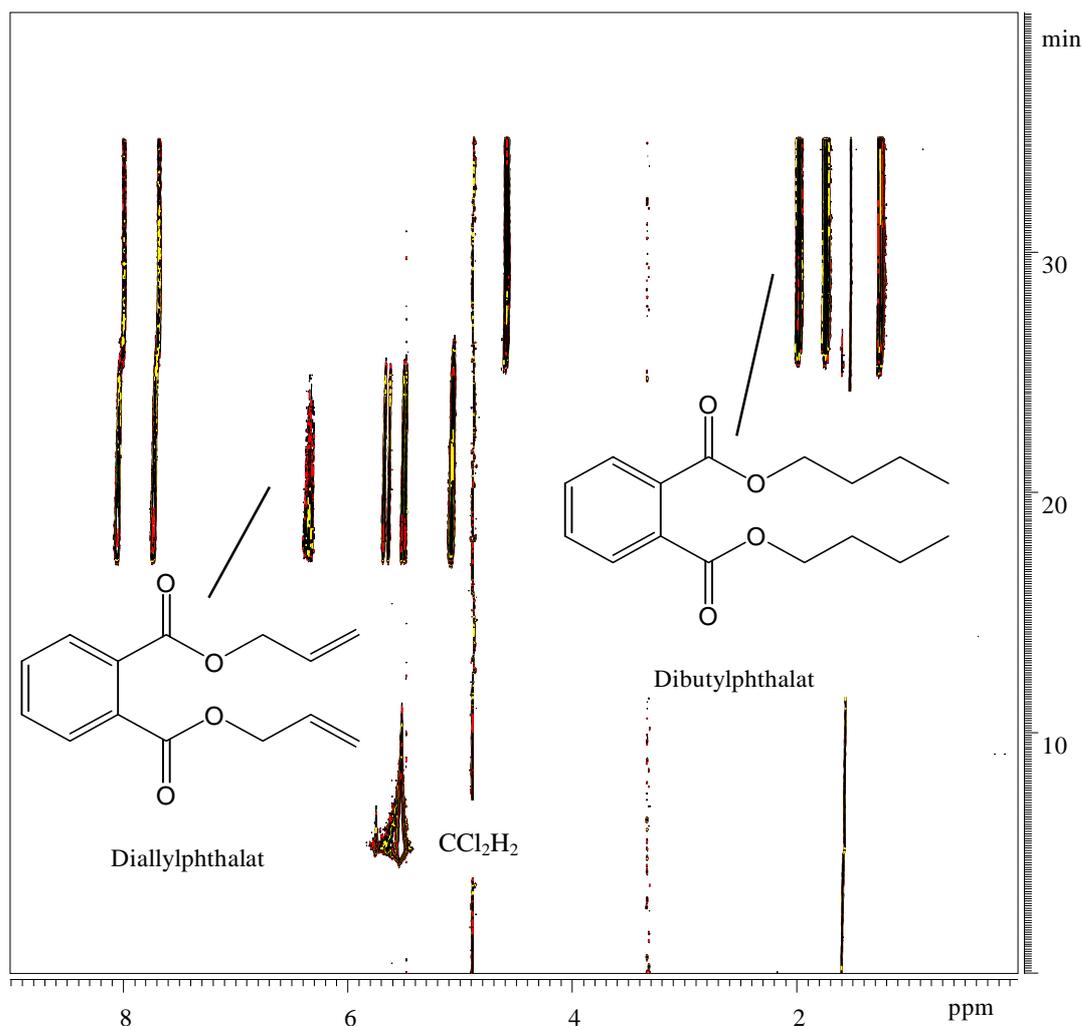


Abbildung 34: On-line continuous-flow SFC-¹H-NMR Spektrum einer Phthalatmischung (Fließgeschwindigkeit 3,0 ml/min)

Die beiden Komponenten sind getrennt, werden jedoch durch die Wechselwirkungen mit den verschiedenen, chromatographisch aktiven Gruppen der Radikalsäule, wie OH- und NH₂-Gruppen des nativen bzw. modifizierten Kieselgels, sowie durch das Radikal selbst, verschleppt. Der kleine Peak bei 1,2 ppm wird durch eine Verunreinigung im CO₂ verursacht. Die Signale bei 3,3 ppm und 4,9 ppm rühren von d₄-Methanol her, welches als Lock-Lösemittel verwendet wurde.

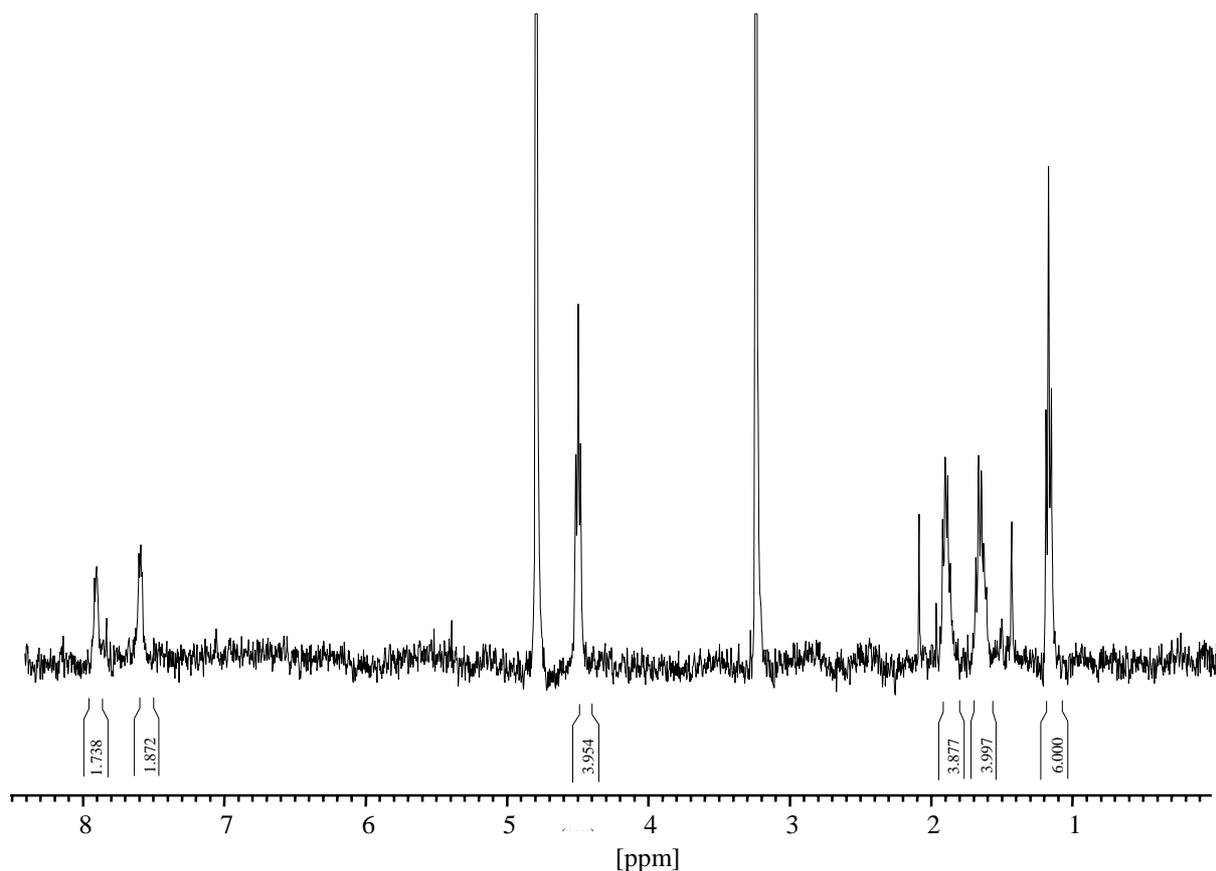


Abbildung 35: Extrahiertes Dibutylphthalatspektrum bei 27,8 min

Aus dem on-line-Lauf (Abbildung 34) wurde ein Spektrum von Dibutylphthalat bei 27,8 min extrahiert. Es ist in Abbildung 35 gezeigt.

Die Integrale stimmen deutlich besser mit der tatsächlichen Anzahl an H-Atomen überein, als bei den Spektren, die nur mit der Referenzsäule erhalten wurden. Dies geht aus Abbildung 36 und den Werten in Tabelle 8 hervor. Es wurden ebenfalls aliphatische mit aromatischen Protonen verglichen.

Integral/Gruppen	Aliphatische Protonen	Aromatische Protonen
Theoretisch	18,0	4,0
APS-TEMPO-Säule	17,94	3,30
Referenzsäule	17,45	2,82

Tabelle 8: Integralvergleich von aliphatischen zu aromatischen Protonen in überkritischem CO₂ von Dibutylphthalat

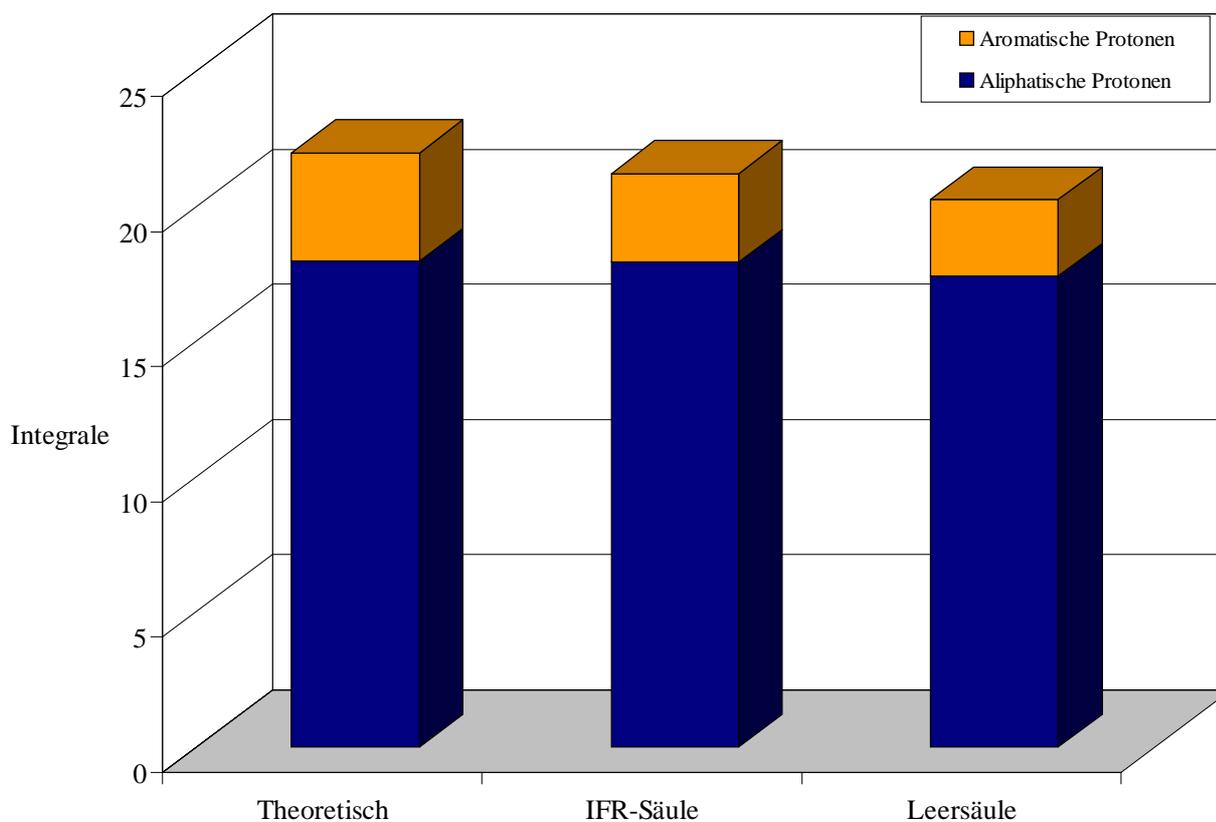


Abbildung 36: Integralwerte der aliphatischen und aromatischen Protonen von Dibutylphthalat in überkritischem CO₂ im Vergleich mit und ohne immobilisierte freie Radikale (3 ml/min Fluss)

Abbildung 37 und Tabelle 9 zeigen diesen Vergleich im Falle von Diallylphthalat. Auch hier ist bei Verwendung der immobilisierten freien Radikale im Vormagnetisierungsvolumen eine bessere Integrierbarkeit der aromatischen Protonen gegeben.

Integral/Gruppen	Aliphatische Protonen	Aromatische Protonen
Theoretisch	10,0	4,0
TEMPO-Säule	9,34	3,41
Referenzsäule	8,58	2,82

Tabelle 9: Integralvergleich von aliphatischen zu aromatischen Protonen im Diallylphthalat

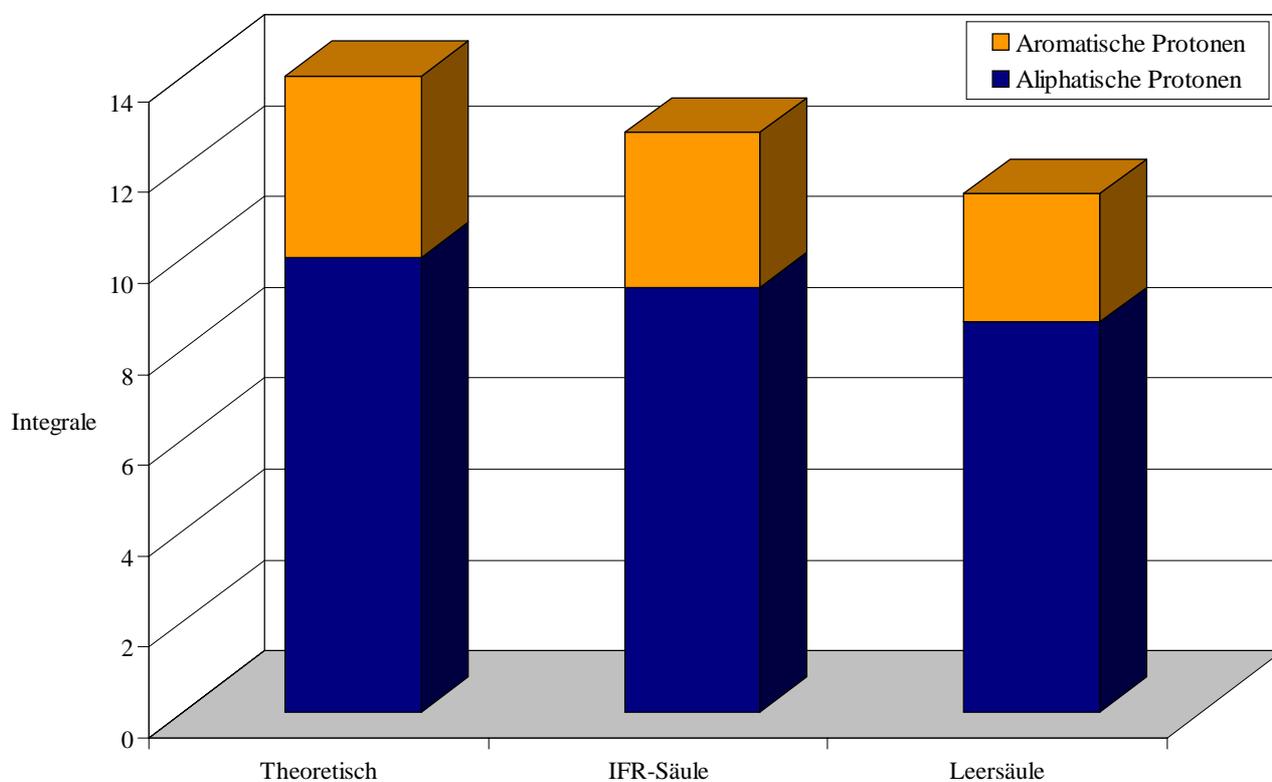


Abbildung 37: Integralwerte der aliphatischen und aromatischen Protonen von Diallylphthalat in überkritischem CO₂ im Vergleich mit und ohne immobilisierte freie Radikale (3 ml/min Fluss)

Es ist also eindeutig zu erkennen, dass bei der Verwendung von immobilisierten freien Radikalen im Vormagnetisierungsvolumen eine Quantifizierung der ¹H-NMR-Spektren aus on-line continuous-flow SFC-¹H-NMR-Experimenten möglich wird.

5.2 Dynamische Kernpolarisation in überkritischem CO₂ und Durchfluss-NMR-Detektion

Die Dynamische Kernpolarisation (DNP) ist aufgrund der sehr großen Empfindlichkeitssteigerung eine interessante Methode, Kerne mit kleinem gyromagnetischem Verhältnis und geringer natürlicher Häufigkeit der Durchfluss-NMR-Messung zugänglich zu machen. Zur Durchführung dieses Experimentes werden, neben einer entsprechenden apparativen Ausrüstung (vgl. 3.3.2), spezielle immobilisierte freie Radikale benötigt.

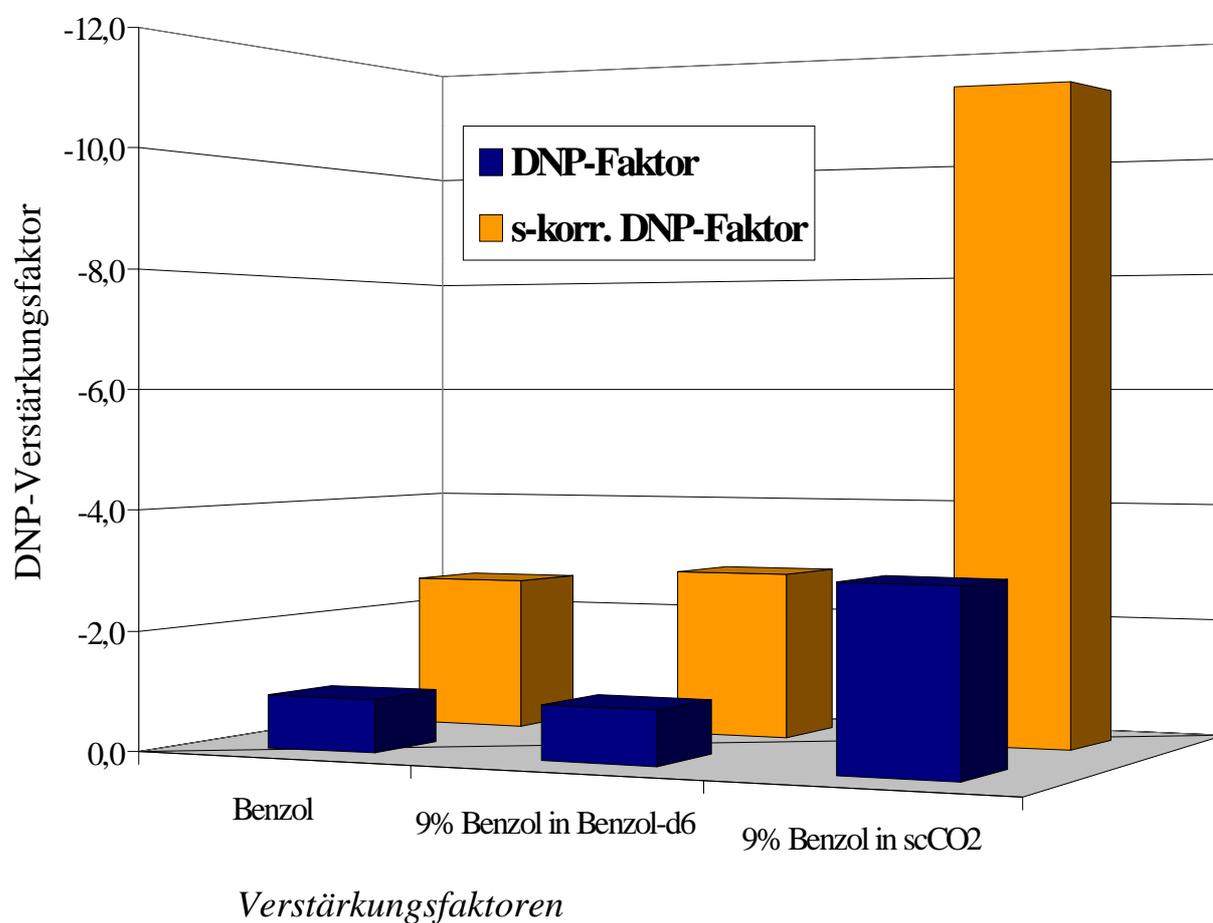
Bei der Synthese der "Silica Phase Immobilized Nitroxide" Systeme (SPIN-Systeme) für die Dynamische Kernpolarisation muss ein Kompromiss zwischen hoher Belegungsichte und dem Sättigungsfaktor s gemacht werden. Eine zu hohe Radikal-Belegung des Kieselgels verursacht eine ESR-Linienverbreiterung durch erhöhten Heissenberg-Austausch und erschwert somit die Sättigung des Elektronenüberganges. Das in Tübingen synthetisierte APS-TEMPO weist eine zu hohe Belegung auf, weshalb eine Sättigung der ESR-Übergänge nicht möglich war. Die Sättigung lag bei der APS-TEMPO-Phase bei einem sehr niedrigen Wert von $s = 0,01$. Die Belegung des für das Experiment verwendeten SPIN-Systems (SI-TEMPO) liegt im Bereich von ca. $1 \cdot 10^{17}$ Spins/g Kieselgel (vgl. hierzu Abbildung 16, Abbildung 17 und Tabelle 4). Die Linienbreite der Zentrallinie von SI-TEMPO beträgt 2,4 G und die damit erreichten Sättigungsfaktoren liegen bei $s = 0.3$.

Um den Vergleich zwischen der DNP in Flüssigkeit und DNP in überkritischem Zustand machen zu können, wurde zunächst reines Benzol mit Hilfe der Modifizierpumpe durch die Messapparatur gepumpt und NMR-spektroskopisch vermessen. Anschließend wurde das gleiche Experiment mit einer 9%igen Lösung von Benzol in deuteriertem Benzol (d₆-Benzol) aufgenommen. Nun wurde die selbe Konzentration, nämlich 9% Benzol in überkritischem CO₂, verwendet, um die Messwerte für die DNP-Verstärkung im überkritischen Medium aufzunehmen.

In Abbildung 38 sind die Ergebnisse der scCO₂-DNP-NMR-Kopplung graphisch aufgearbeitet. Die für Kohlenwasserstoffe beobachtete dipolare DNP-Verstärkung liegt für verdünntes Benzol mit $A_{\text{obs}} = -0.9$ in der gleichen

Größenordnung wie für reines Benzol. Die DNP-Verstärkung in überkritischem CO_2 ist mit $A_{\text{obs}} = -3.0$ mehr als dreimal so hoch wie in Flüssigkeiten. Werden diese Werte auf den Sättigungsfaktor $s = 1$ korrigiert, zeigt sich, dass die DNP-Verstärkung beim Übergang von Flüssigkeiten zu überkritischen CO_2 vier mal größer ist. Aufgrund der kleineren Korrelationszeiten in überkritischen Fluiden können also, durch die Verwendung von überkritischem CO_2 in der DNP-NMR-Kopplung, viermal höhere DNP-Verstärkungsfaktoren erhalten werden als bei Verwendung von Flüssigkeiten.

Abbildung 38: Gemessene und auf Sättigung $s = 1$ korrigierte DNP-



Die hier, im Vergleich zu den theoretisch sehr hohen DNP-Verstärkungsfaktoren, erhaltenen niedrigen Werte sind hauptsächlich durch den Faktor K bedingt, der das Magnetstärkeverhältnis von Hochfeld- (NMR) zum Tieffeld- (ESR) Magnet angibt. Er beträgt im vorliegenden Fall $K = 14$.

Im Zuge der technischen Weiterentwicklung könnten jedoch spezielle DNP-Probenköpfe gebaut werden, die den Polarisationstransfer im Hochfeldmagneten ermöglichen. Für die Sättigung der ESR-Frequenzen müssten dann Infrarot-Laser eingesetzt werden. Die experimentellen DNP-Verstärkungsfaktoren würden so sehr viel näher an die theoretisch erreichbaren Werte heranreichen.

Die DNP-Messungen wurden während eines dreimonatigen Aufenthaltes in den USA an der Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.C. Dorn in Zusammenarbeit mit M.Sc. Sandy Salido durchgeführt.

5.3 Reaktionsverfolgung in überkritischen Fluiden

Die Auffassung, dass aliphatische Amine und überkritisches Kohlendioxid zueinander inkompatibel sind, ist im Bereich der Überkritischen Fluid-Chromatographie weit verbreitet. Demnach reagieren primäre und sekundäre Amine mit CO_2 unter Bildung von Carbaminsäuren und Harnstoffderivaten, wie in Abbildung 39 schematisch dargestellt.

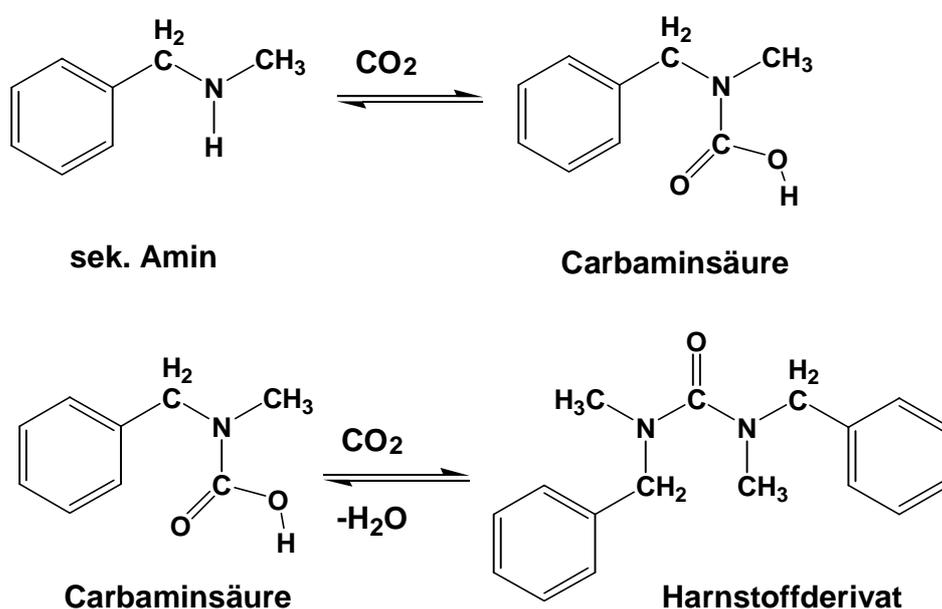


Abbildung 39: Schema der Carbaminsäure- und Harnstoffbildung aus sekundären Aminen in überkritischem CO_2

In der Kapillar-SFC sind Beispiele bekannt, bei denen die Trennung von aliphatischen Aminen in scCO_2 und scN_2O in Bezug auf Selektivität und Linienform zu den selben Resultaten führen^[108, 109]. Unter bestimmten chromatographischen Voraussetzungen (Hypercarb®-Trennsäule Ofentemperatur, Struktur des Analyten, Modifizierzusatz) wurde jedoch ein Anstieg der Basislinie gefunden; vermutlich aufgrund der Wechselwirkung der Amine mit dem überkritischen Kohlendioxid.

Bayer et al.^[110] untersuchten mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie die Bildung einer Harnstoffderivatphase, indem sie einer Aminopropylphase über Nacht CO_2 bei einem Druck von 150 bar aufpressten. Die Phase wurde

anschließend zur Trennung ungesättigter Triglyceride eingesetzt. Pinkston und Baker untersuchten Amine mittels SFC-MS-Kopplung. Da CO₂ jedoch auch in der Ionenquelle vorlag, konnte das Auftreten eines M+44 Signals nicht die Bildung der Carbaminsäure durch das scCO₂ beweisen^[111].

Leitner et al.^[81] berichten bei der Iridium-katalysierten enantioselektiven Hydrierung von Iminen in überkritischen CO₂ von der substituentenabhängigen Bildung eines weißen unlöslichen Feststoffes, der jedoch aufgrund der Unlöslichkeit nicht mit der vorhandenen NMR-Hochdruckzelle untersucht werden konnte. Es wird die Bildung des Harnstoffderivates angenommen. Die zwei untersuchten Amine waren N-Phenyl-1-phenylethylamin und N-Benzyl-1-phenylethylamin, wobei der weiße Niederschlag nur beim Benzylderivat eintrat.

Im Rahmen der in dieser Doktorarbeit durchgeführten Untersuchungen soll nun der Frage nachgegangen werden, welche strukturellen Voraussetzungen zur Bildung oder gegebenenfalls zur Nichtbildung der Carbaminsäure oder der Harnstoffderivate führen. Die Untersuchungen wurden in Kooperation mit Dr. Olle Gyllenhaal und Prof. Dr. Jörgen Vessman, AstraZeneca R & D Mölndal, Mölndal, Schweden durchgeführt.

Der SFC-NMR-Probenkopf sowie der in Abbildung 31 beschriebene Aufbau wurden mit der Änderung, dass im Ofen keine Trennsäule eingesetzt und zwischen UV-Detektor und NMR-Magnet ein Schaltventil zwischengeschaltet wurde, verwendet. Ausgehend von Metoprolol, einem medizinischen Wirkstoff mit einer Isopropylseitengruppe am Amin (Struktur in Abbildung 40), werden bei N-Benzylaminderivaten die sterische Einflüsse von vier unterschiedlichen Substituenten auf die Bildung der Carbaminsäure untersucht.

In Abbildung 40 sind zwei Spektren von Metoprolol gezeigt. Das obere Spektrum wurde in deuteriertem Chloroform aufgenommen, das untere zeigt Metoprolol in scCO₂. Zur Aufnahme des Spektrums in scCO₂ wurde Metoprolol in wenig Dichlormethan gelöst und mittels des Injektionsventils dem Analysesystem zugeführt. Das Schaltventil wurde umgelegt, sobald die Probe die Messzelle erreicht hatte, dazu wurden laufend NMR-Spektren im gs-Modus aufgenommen. Nach dem Schalten des Ventils waren die Zuleitungen des Probenkopfes verschlossen.

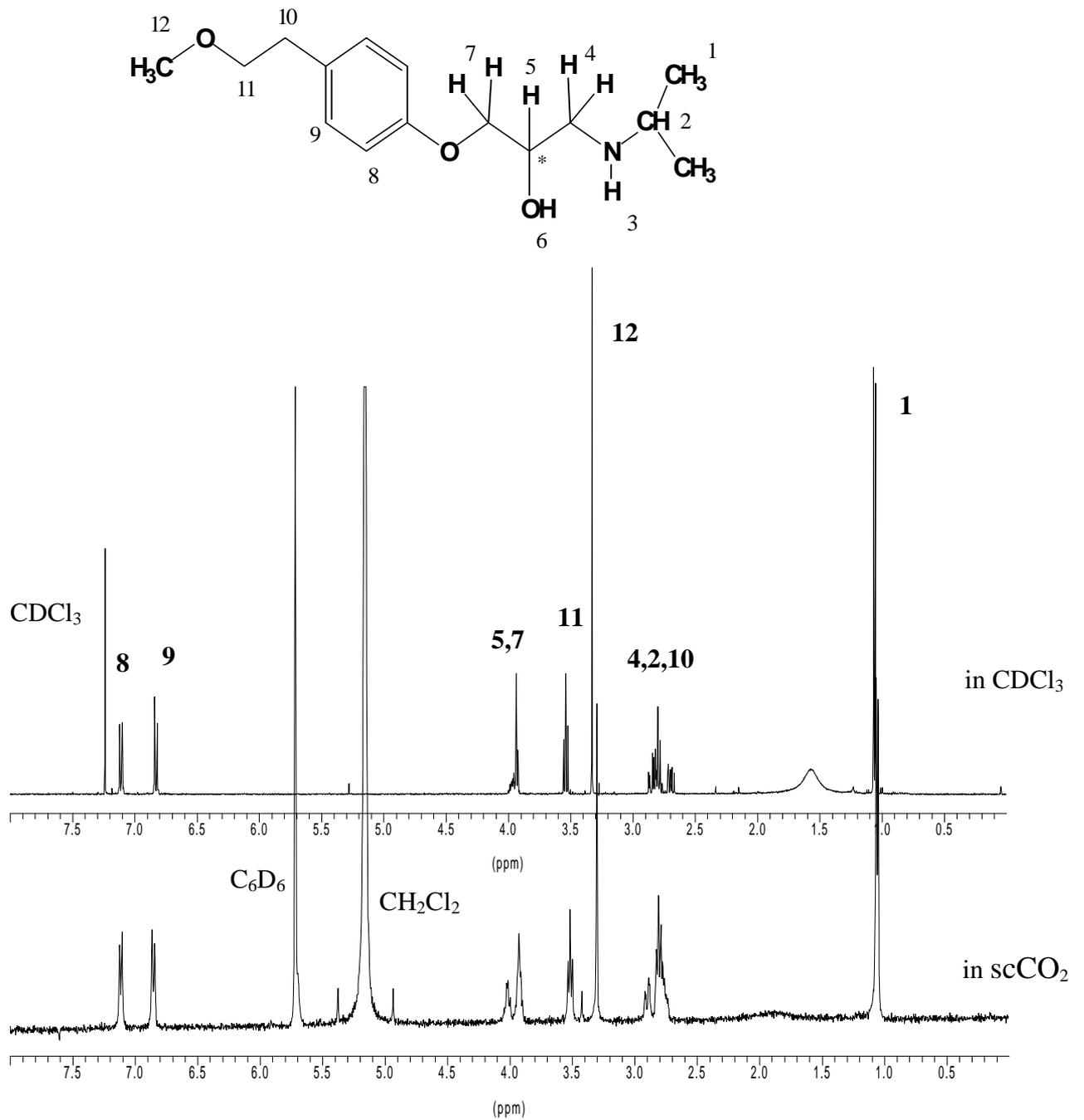


Abbildung 40: Metoprolol: Vergleich der Spektren in Lösung (CDCl₃, oben) und in überkritischem Zustand (scCO₂, unten)

Im scCO_2 -Spektrum sind leichte Änderungen der chemischen Verschiebung im Vergleich zum Flüssigkeitsspektrum bei den Signalen festzustellen, die in nächster Nachbarschaft zu einer polaren Gruppe stehen (Signale 2, 4, 5, 7, 11 und 12). Die polaren Gruppen werden vom CO_2 solvatisiert, wodurch sich ihre chemische Verschiebung ändert. Die Bildung einer Carbaminsäure ist nicht festzustellen.

Auf diesem Ergebnis aufbauend, wurden drei sekundäre N-Benzylamine mit je einer Methyl-, einer Isopropyl- und einer *tert.*-Butylgruppe sowie das tertiäre N-Benzyl-N,N-dimethylamin untersucht. Die Substanzen wurden jeweils in deuteriertem Dichlormethan gelöst und ebenfalls über das Injektionsventil dem Analysesystem zugeführt. Abbildung 41 zeigt die bei 180 bar CO_2 -Druck und 80°C Ofentemperatur (50°C Detektionstemperatur) erhaltenen Spektren der N-Benzylaminderivate.

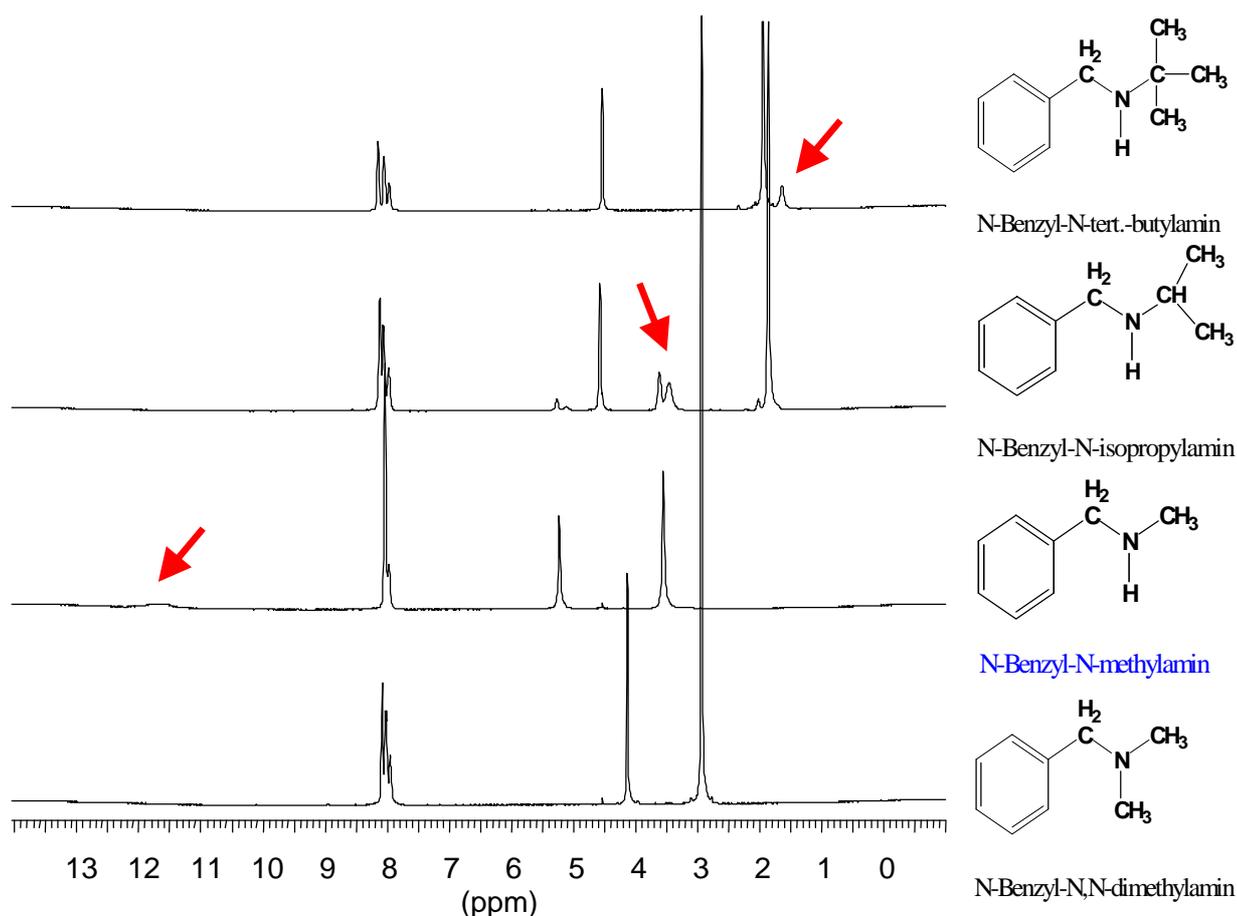


Abbildung 41: Spektren verschiedener N-Benzylamine in überkritischem CO_2

Das N-Benzyl-N-*tert.*-butylamin, bei dem das Amin-Proton stark durch den *tert.*-Butylrest abgeschirmt ist, zeigt keine Bildung einer Carbaminsäure. Das Aminproton gibt ein Signal bei 1,7 ppm. Ebenso ist das Aminproton im N-Benzyl-N-isopropylamin durch die Isopropylgruppe abgeschirmt, so dass auch hier keine Reaktion zur Carbaminsäure auftritt. Die chemische Verschiebung liegt hier bei 3,5 ppm.

Im Spektrum des Methyl-substituierten N-Benzylamins in Abbildung 41 tritt jedoch ein breites Signal bei ca. 11,8 ppm auf, was der chemischen Verschiebung eines Carbonsäureprotons entspricht, während das Signal für das Aminproton, das zwischen 1 und 6 ppm liegen müsste, nicht zu sehen ist. Dies spricht für die Bildung einer Carbaminsäure aus N-Benzyl-N-Methylamin. Die Erklärung dafür ist, dass die Methylgruppe im Vergleich zu der *tert.*-Butyl- und der Isopropylgruppe sterisch anspruchslos ist und das Amin-Wasserstoffatom somit nicht ausreichend vor dem Angriff des CO₂ schützen kann. Durch die im Folgenden beschriebene Beobachtung wird diese Interpretation erhärtet.

Bei einem der ersten Experimente wurde das primäre N-Benzylamin, gelöst in Dichlormethan, injiziert. Die Substanz konnte jedoch nicht in die Messzelle transportiert werden, sondern fiel als Festsubstanz in den Kapillaren aus, was zu einer Verstopfung des Systems führte. Der Versuch wurde mehrfach bei unterschiedlichsten Bedingungen, mit und ohne Modifier wiederholt, führte aber nicht zum gewünschten Erfolg. Hier liegt die Vermutung nahe, dass sich nicht die Carbaminsäure, sondern der unlösliche Dibenzylharnstoff gebildet hat. Dies ist möglich, da das primäre Amin genügend Platz für die Reaktion mit Kohlendioxid und einem weiteren primären Amin bietet. Ähnlich der Arbeit von Leitner^[81] konnte auch hier keine spektroskopische Charakterisierung stattfinden.

Das Spektrum des tertiären N-Benzyl-N,N-dimethylamins in Abbildung 41 zeigt erwartungsgemäß keine Änderung beim Übergang von Lösung in scCO₂.

Nach dem Beweis für die Reaktion des N-Benzyl-N-Methylamins mit überkritischem CO₂ sollte geklärt werden, bei welchen Bedingungen die Reaktion stattfindet und ob im Falle der beiden sterisch geschützten Amine Bedingungen gefunden werden konnten, die eine Reaktion zur Carbaminsäure zuließen.

In Abbildung 42 sind sieben Spektren von N-Benzyl-N-methylamin unter scCO₂-Bedingungen bei verschiedenen Drücken (80 bis 200 bar) und 80°C Ofentemperatur (50°C Detektionstemperatur) gezeigt. Bei allen Spektren ist das Carboxylproton (Pfeil) zwischen 11 und 12 ppm zu sehen, wobei sich die chemische Verschiebung in Abhängigkeit von der druckabhängigen Solvationsstärke und des scCO₂ ändert. Hieraus wird deutlich, dass die Bildung der Carbaminsäure bei N-Benzyl-N-methylamin unter jeder der untersuchten Bedingungen auftritt.

Vergleichend hierzu sind in Abbildung 43 die sieben, unter identischen Bedingungen wie beim N-Benzyl-N-methylamin aufgenommen, Spektren von N-Benzyl-N-isopropylamin dargestellt. Bei keinem der, bei diesen Druck- und Temperaturbedingungen aufgenommenen, Spektren ist die Bildung einer Carbaminsäure festzustellen, die durch NMR-Signale zwischen 11 und 12 ppm angezeigt würde. Statt dessen wandert das Aminproton, je nach Solvationsstärke des scCO₂, sehr stark zwischen 3,3 und 4,1 ppm. Dies zeigt, dass CO₂ noch recht nahe an das Aminproton heranreicht und Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen zeigt, aber nicht nahe genug, um mit dem Wasserstoffatom zu reagieren.

In Abbildung 44 ist nochmals exemplarisch das Spektrum von N-Benzyl-N-*tert.*-butylamin bei 100 bar und 80°C Ofentemperatur (50°C Detektionstemperatur) gezeigt. Die Änderung des Drucks nach den gleichen Bedingungen wie bei den beiden anderen Aminen brachte die erwarteten Resultate. Die chemische Verschiebung des Aminprotons zeigt über den gesamten untersuchten Druckbereich einen gleichbleibenden Wert von 1,6 ppm. Das scCO₂ kann also nicht in die Nähe des Aminproton gelangen, da dieses durch die sterisch sehr anspruchsvolle *tert.*-Butylgruppe wirkungsvoll abgeschirmt ist.

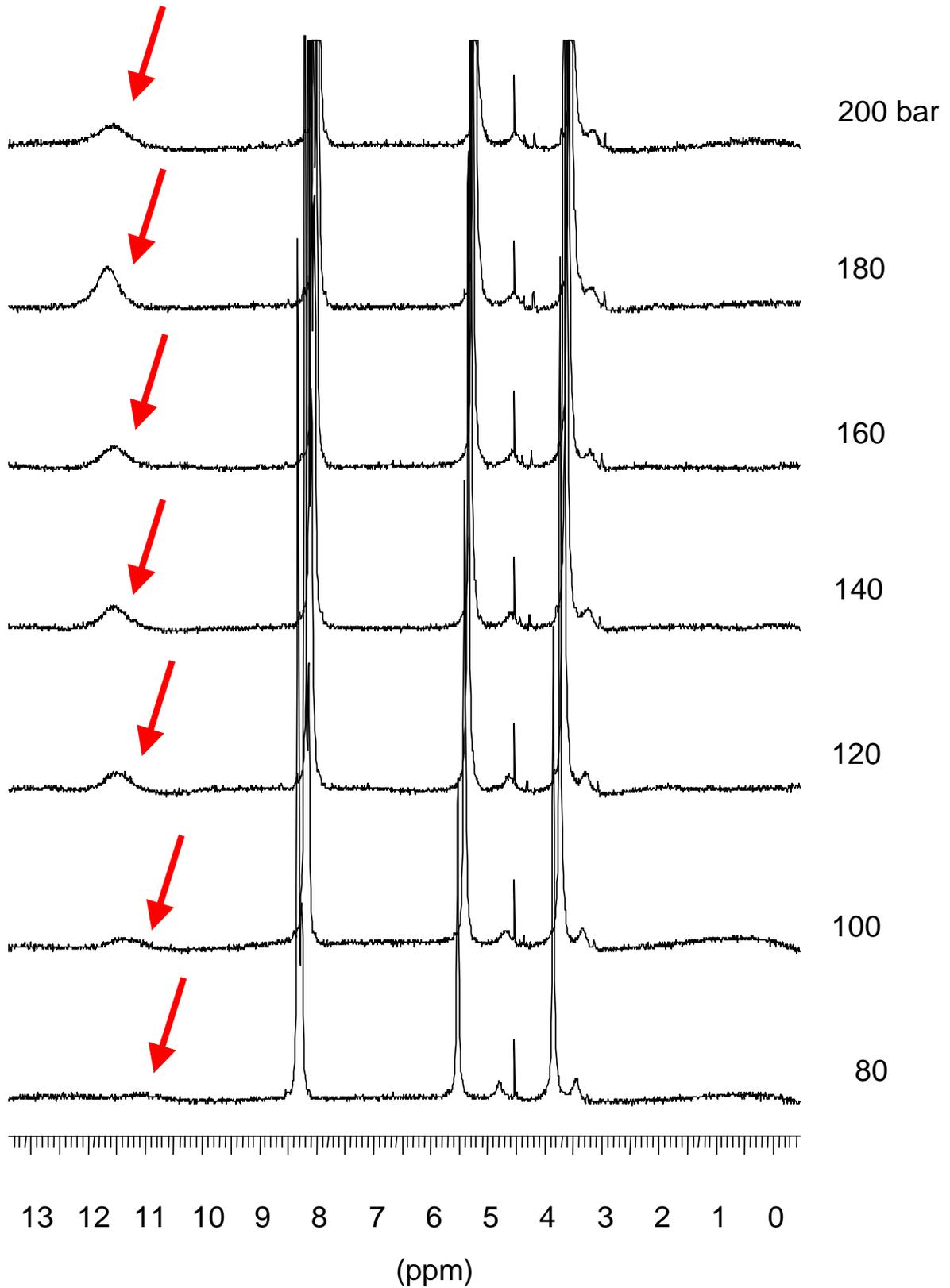


Abbildung 42: Druckabhängigkeit der Carbaminsäurebildung bei *N*-Benzyl-*N*-methylamin

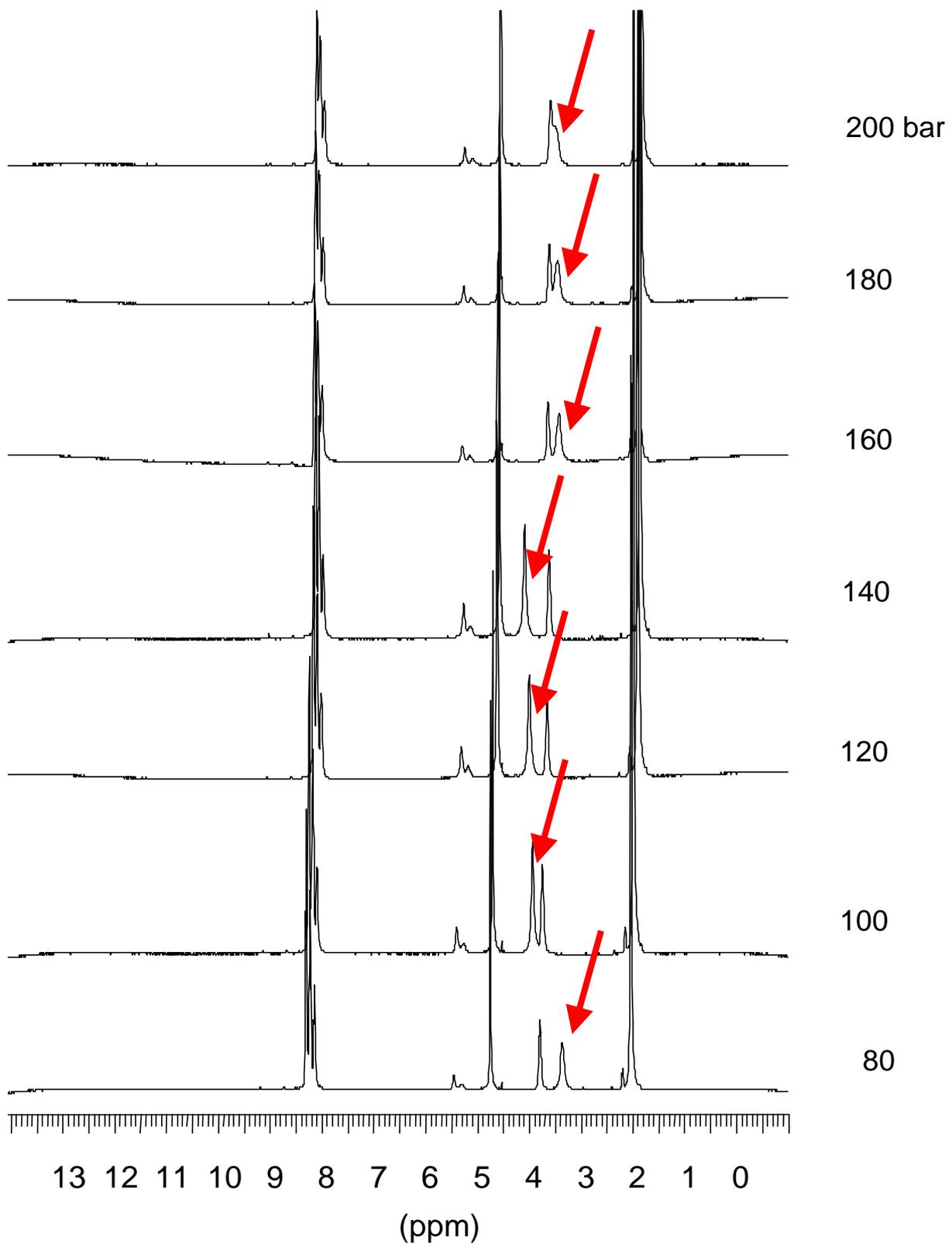


Abbildung 43: Druckabhängigkeit der möglichen Carbaminsäurebildung bei N-Benzyl-N-isopropylamin

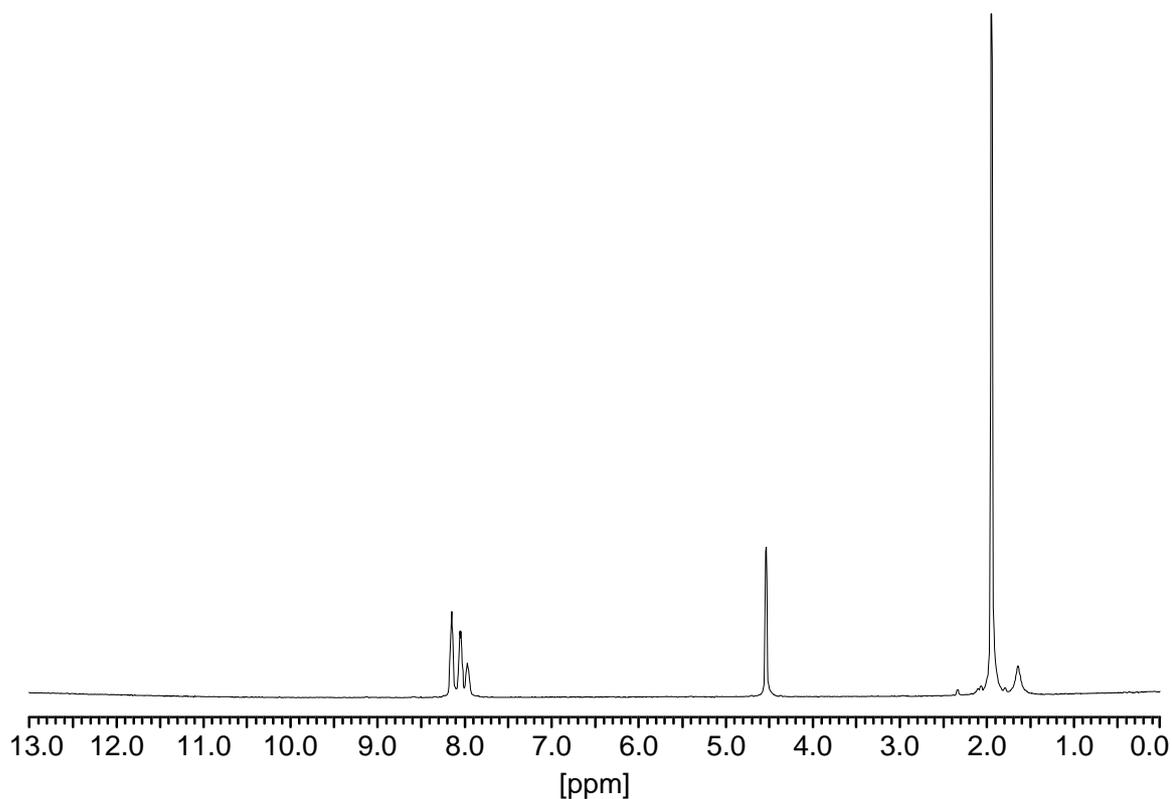


Abbildung 44: Spektrum von bei *N*-Benzyl-*N*-tert.-butylamin bei 100 bar CO₂-Druck

Das letzte Resultat untermauert nochmals die Erkenntnis, dass die Reaktion der hier untersuchten sekundären Amine mit CO₂ zu Carbaminsäuren und Harnstoffderivaten dem Effekt der sterischen Hinderung unterworfen sind. So können auch die Resultate von Leitner^[81] nachträglich interpretiert werden. Das *N*-Benzyl-1-phenylethylamin kann, aufgrund der Zugänglichkeit des Aminprotons für das scCO₂, zum Harnstoffderivat abreagieren, während das beim *N*-Phenyl-1-phenylethylamin, wegen der sterischen Abschirmung durch die Phenylgruppe, nicht möglich ist.

Abschließend kann gesagt werden, dass die sterische Abschirmung einer Isopropylgruppe dafür verantwortlich ist, dass das Metoprolol bei den untersuchten Bedingungen nicht zur Carbaminsäure oder gar zum Harnstoffderivat abreagiert.

5.4 Verfolgung der Reaktionskinetik an den Systemen Formaldehyd/Wasser und Formaldehyd/Methanol

Aus quantitativen NMR-Daten können direkt thermodynamisch wichtige Daten, wie die Konzentration eines Stoffes und die Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion, bestimmt werden. Die NMR-Spektroskopie ist dabei in der Lage durch die Empfindlichkeit der chemischen Verschiebung auf Änderungen der chemischen Umgebung von Atomen selbst komplexe Mischungen ohne Auftrennung des Gemisches zu analysieren. Gerade weil die NMR-Spektroskopie Daten über Stoffeigenschaften liefern kann, ist sie für alle Wissenschaften, die mit komplexen Stoffgemischen arbeiten, interessant. In Zusammenarbeit mit der Verfahrenstechnikern der Gruppe von Prof. Hasse vom Institut für Technische Thermodynamik und Thermische Verfahrenstechnik (ITT) der Universität Stuttgart wurden deshalb Messungen an technisch wichtigen Stoffgemischen, wie wässrigen und methanolischen Formaldehydlösungen, durchgeführt.

Formaldehyd ist eines der wichtigsten Zwischenprodukte der organischen Chemie und wird insbesondere in der Kunststoff- und Holzwerkstoffindustrie eingesetzt (Weltjahresproduktion ca. 8 Millionen Tonnen). Aufgrund der hohen Reaktivität wird Formaldehyd aber nicht in Reinform, sondern chemisch gebunden in wässriger methanolhaltiger Lösung, verwendet. Wegen der Oligomerenbildung (Abbildung 45 und Abbildung 46) und der daraus entstehenden Vielzahl an Reaktionsprodukten in diesen Mischungen^[112] ist eine Beschreibung des thermodynamischen Verhaltens und der chemischen Reaktionskinetik sehr komplex. Es existieren eine Vielzahl an Untersuchungen (auch mit NMR-spektroskopischen Methoden) zum chemischen Gleichgewicht dieser Mischungen^[113-117], jedoch ist die Kenntnis der chemischen Reaktionskinetik für die Berechnung und Simulation thermischer Prozesse wichtig, da sich innerhalb der üblichen Verweilzeiten in technischen Apparaten das chemische Gleichgewicht nicht einstellt.

NMR-Untersuchungen zur chemischen Reaktionskinetik auf diesem Gebiet liegen zwar vor^[118-120], sollten jedoch im Rahmen dieser Kooperation erweitert und verifiziert werden.

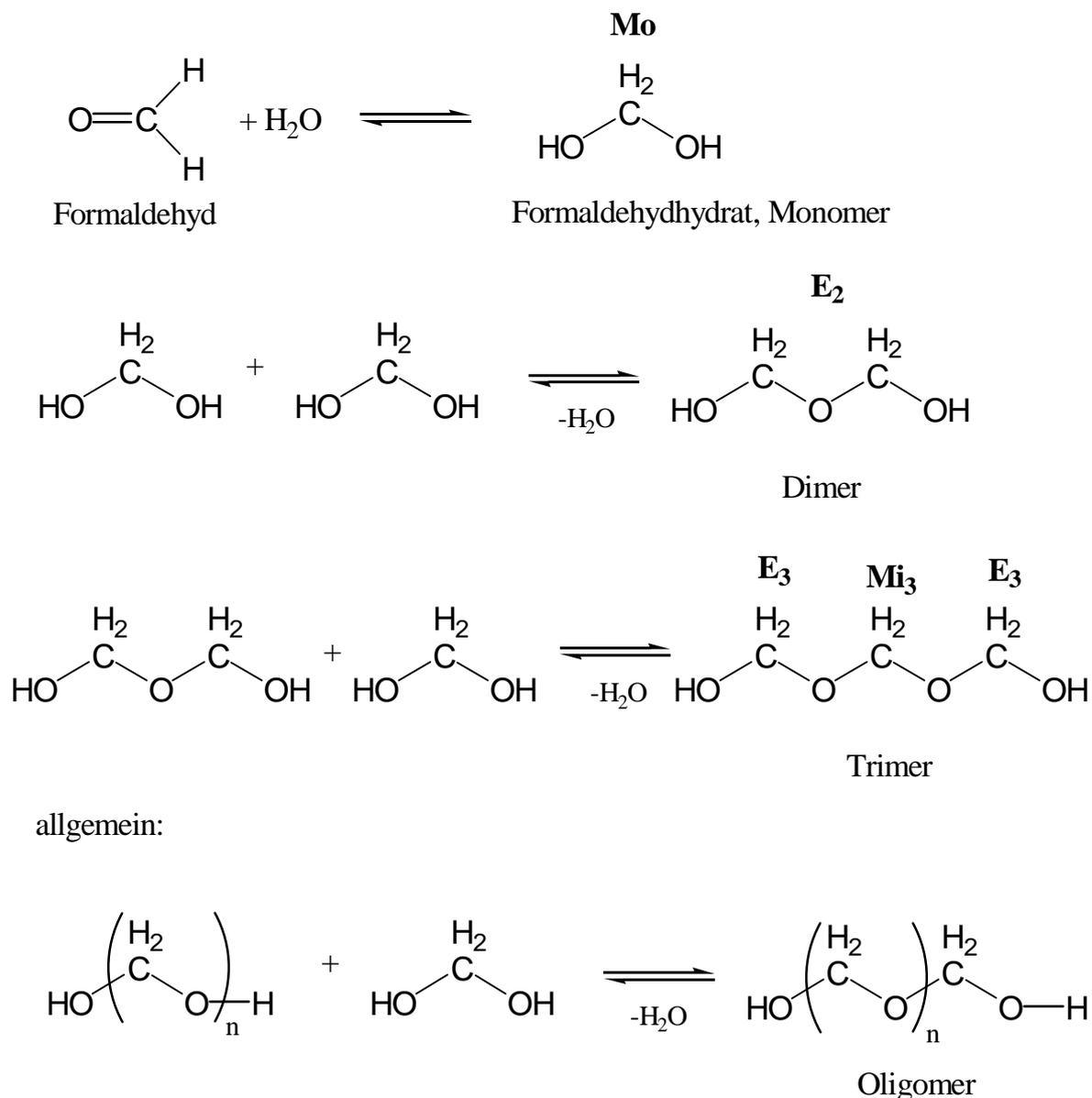


Abbildung 45: Schematische Darstellung der Bildung von Oligomeren in wässriger Formaldehydlösung (die nachfolgend verwendeten Bezeichnung der NMR-Signale sind fett gedruckt)

Formaldehyd an sich ist in wässriger oder methanolischer Lösung nur in sehr geringer Konzentration vorhanden, im NMR-Spektrum ist deshalb bei Raumtemperatur kein entsprechendes Signal detektierbar. Es liegt hauptsächlich in seiner monomeren Form als Formaldehydhydrat bzw. Hemiformal vor, wobei die Löslichkeit in Methanol deutlich besser als in wässriger Lösung ist. Durch Kondensation unter Wasser- bzw. Methanolabspaltung bilden sich Oligomere. Die Reaktion des Formaldehyds mit Wasser bzw. Methanol ist sowohl von der Temperatur als auch vom pH-Wert abhängig. Werden die Geschwindigkeits-

konstanten k der Hinreaktion gegen den pH-Wert bei konstanter Temperatur aufgetragen, so ergibt sich eine U-förmige Kurve. Das Gleichgewicht ist in wässriger Lösung bei höheren Temperaturen zu Gunsten des Monomeren verschoben, in methanolischer Lösung zu Gunsten der Oligomere. Die Geschwindigkeitskonstante k in methanolischer Lösung ist bei gleicher Temperatur um den Faktor 1000 kleiner als in wässriger Lösung. Um die Löslichkeit zu erhöhen und das Ausfallen von Oligomeren und Paraformaldehyd zu verlangsamen, wird deshalb der technischen wässrigen Formaldehydlösung Methanol zugesetzt.

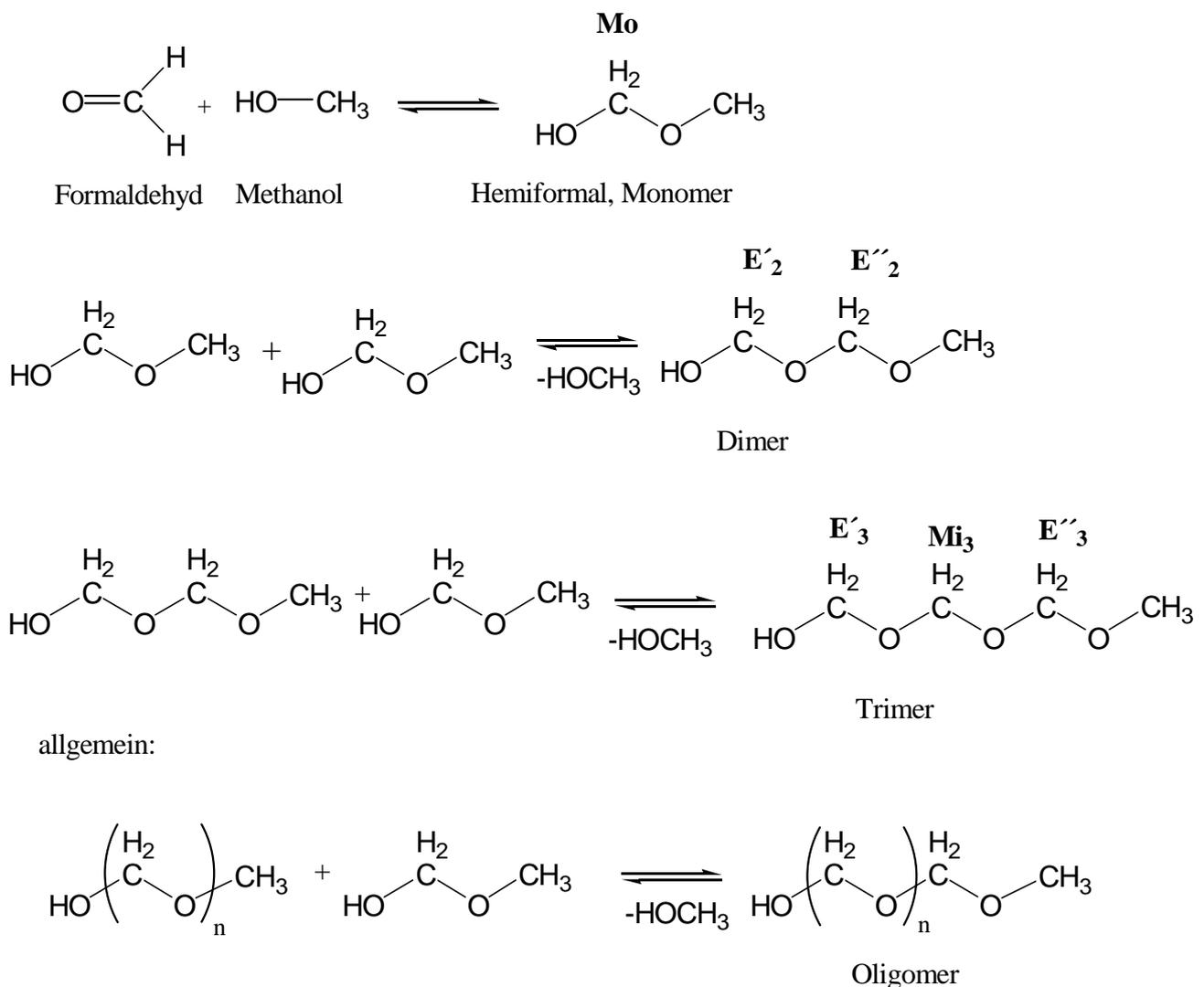


Abbildung 46: Schematische Darstellung der Bildung von Oligomeren in methanolischer Formaldehydlösung (die nachfolgend verwendeten Bezeichnung der NMR-Signale sind fett gedruckt)

5.4.1 Grundlagen zur Berechnung von thermodynamischen Daten

Im Weiteren wird kurz die formale Berechnung der Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten aus NMR-Daten beschrieben.

Die hier ablaufenden Reaktionen sind vom Typ $A + B \xrightleftharpoons[k']{k} C + D$, bei dem k

und k' die Geschwindigkeitskonstanten für die Hin- bzw. Rückreaktion darstellen. Die sich daraus ergebende Gleichgewichtskonstante K ist in Gleichung 20 dargestellt, wobei f_i die Aktivitätskoeffizienten der Komponenten A,B,C und D sind.

$$\text{Gleichung 20:} \quad K = \frac{k}{k'} = \frac{x_C \cdot x_D}{x_A \cdot x_B} \cdot \frac{f_C^\infty \cdot f_D^\infty}{f_A^\infty \cdot f_B^\infty}$$

Die zeitliche Änderung des Molenbruchs einer Komponente ist gegeben durch Gleichung 21.

$$\text{Gleichung 21:} \quad \frac{dx_A}{dt} = \frac{dx_B}{dt} = -\frac{dx_C}{dt} = -\frac{dx_D}{dt} = -kx_Ax_B + k'x_Cx_D$$

Unter der Annahme, dass die Peakfläche A_A unter dem Peak A proportional zu der Molzahl an Protonen ist (Gleichung 22), ergibt sich für den Peakflächenanteil ζ_A , welcher definiert ist als die Peakfläche des Peaks A bezogen auf die Summe der Flächen aller Peaks, die Gleichung 23.

$$\text{Gleichung 22:} \quad A_A = c n \quad , \text{ wobei } c = \text{const.}$$

$$\text{Gleichung 23:} \quad \zeta_A = \frac{A_A}{\sum_{i=A} A_i}$$

Der Zusammenhang zwischen Peakflächenanteil und wahren Molenbruch wird dann durch Gleichung 24 beschrieben.

$$\text{Gleichung 24:} \quad \zeta_A = \frac{x_A}{x_A + x_B + x_C + x_D}$$

Da die wahren Molenbrüche aus chemischen Gleichgewichtskonstanten berechnet werden können, ermöglicht die Bestimmung der Peakflächenanteile aus quantitativen NMR-Spektren die Berechnung dieser Konstanten.

Für den Fall der Formaldehyd/Wasser-Mischungen und Formaldehyd/Methanol-Mischungen, müssen aber alle Folgereaktionen berücksichtigt und die oben genannten Gleichungen entsprechend erweitert werden (Details in ^[119, 120]).

5.4.2 Aufbau

Im Rahmen dieser Arbeit wird erstmalig die Durchfluss-NMR-Spektroskopie dazu verwendet, die Reaktionskinetik der wässrigen und methanolischen Formaldehydlösungen zu bestimmen. Als Reaktionsgefäß wurde die in Abbildung 47 gezeigte voll thermostatisierbare Rührzelle verwendet.

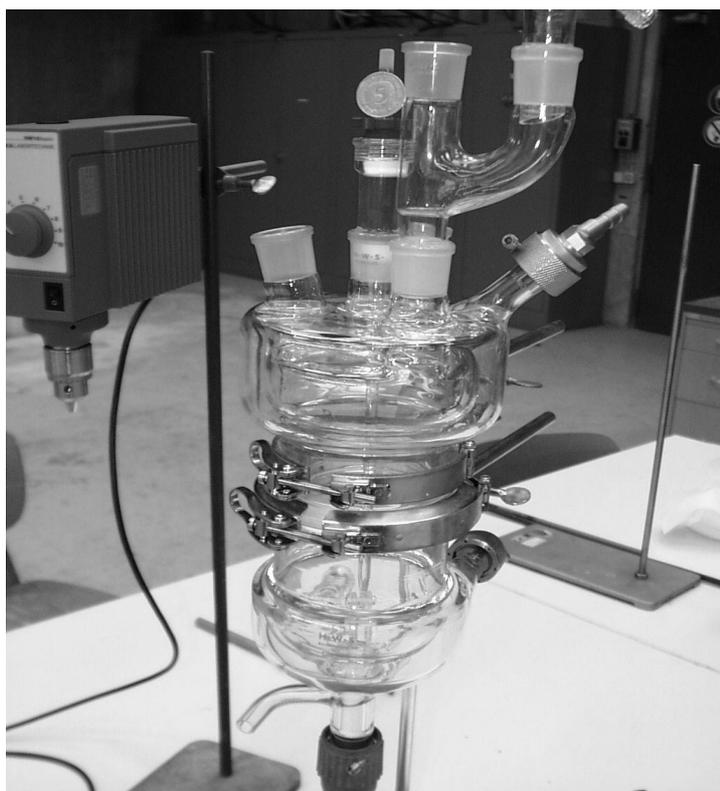


Abbildung 47: Thermostatisierbare Rührzelle

In Zusammenarbeit wurde von M. Maiwald und K. Braun vom ITT, Universität Stuttgart, eine fahrbare Apparatur konstruiert, welche die Rührzelle und alle zusätzlichen Komponenten, wie Pumpe, Thermostat, (Sicherheits-)Ventile, Thermometer und Druckmesser, enthält, und somit der Messanordnung

größtmögliche Mobilität garantiert (Abbildung 48). Die Ventile und Sicherheitsventile werden vor allem dazu benötigt, die Apparatekomponenten vor zu hohen Drücken durch eventuell ausfallende Oligomere zu schützen und um die gesamte Apparatur nach dem Messen spülen zu können. In Abbildung 49 ist das Schaltbild für den gesamten Aufbau dargestellt.

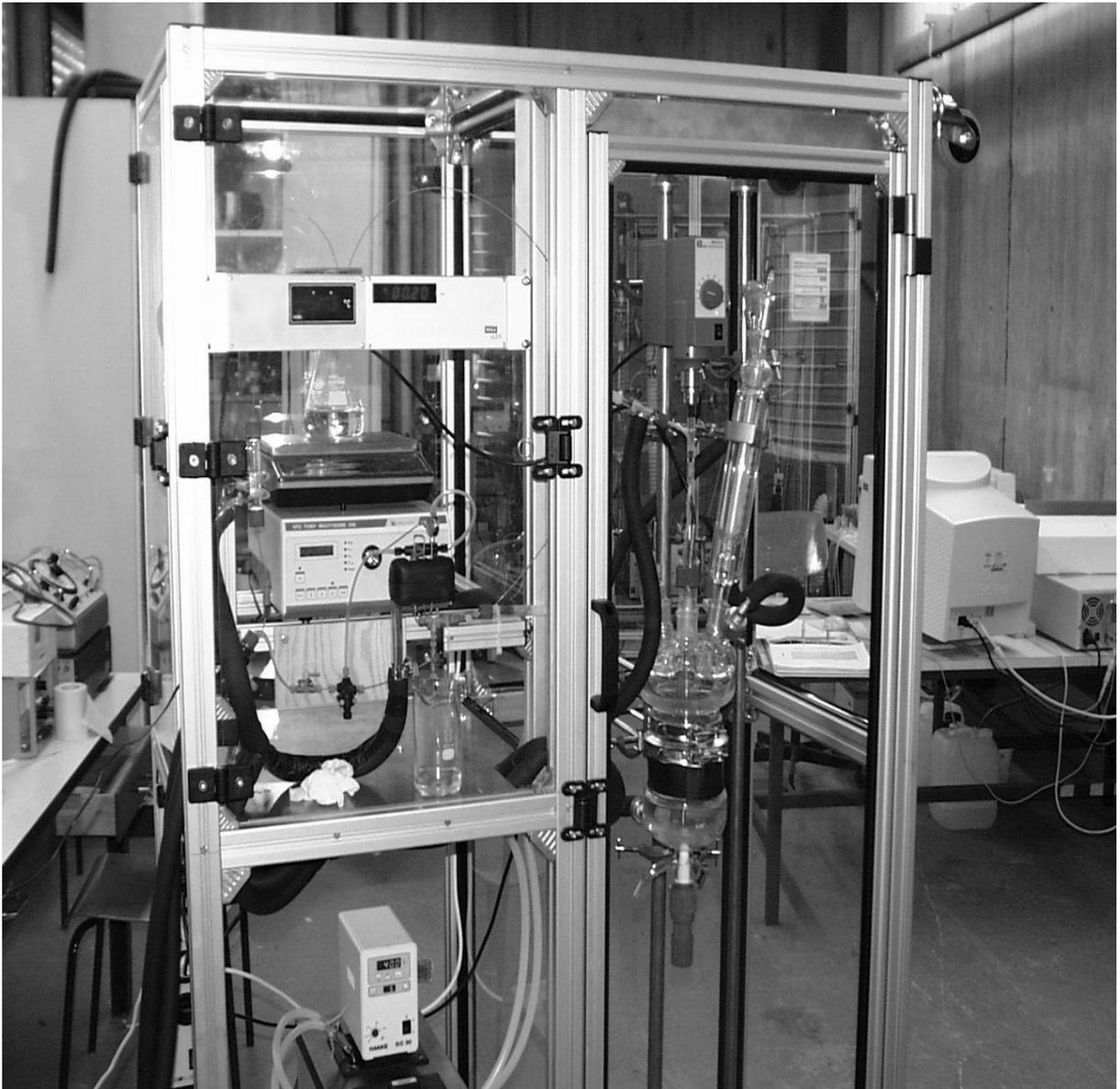


Abbildung 48: Mobiler Aufbau der Messanordnung (rechter Teil: Rührzelle mit Tropftrichter und Rührmotor; linker Teil: Druckmesser, Waage, Pumpe und Thermostat)

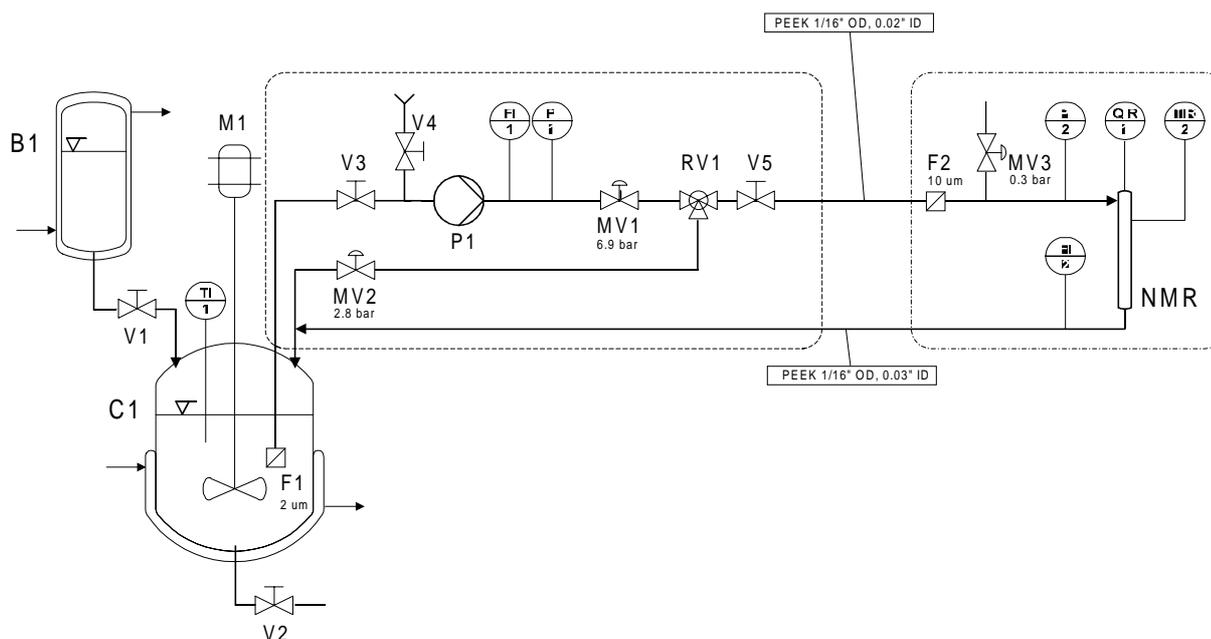


Abbildung 49: Schaltbild der kompletten Messanordnung

Die Rührzelle C1 ist voll thermostatisiert, ebenso wie der Tropftrichter B1 mit Hahn V1, durch den thermostatisierte Flüssigkeit zugegeben werden kann. Der Ablaufhahn V2 dient dazu, die vermessene Lösung auf einfache Weise wieder zu entfernen. Die Rührzelle ist mit einem Rührer M1 und zusätzlich mit einem Thermoelement T11 ausgestattet. Durch den Filter F1 wird mittels der Pumpe P1 die Lösung durch eine 0,02'' ID PEEK-Kapillare zum thermostatisierten NMR-Probenkopf gepumpt, welcher nochmals durch einen zweiten Filter F2 vor kleinen Partikeln geschützt wird (Rückleitung: 0,03'' ID PEEK-Kapillare). Zwischen Rührzelle und Probenkopf sind etliche Ventile V3, V4, V5, Sicherheitsventil MV3 und Rückdruckregler MV1, MV2 angebracht, die den reibungslosen und sicheren Ablauf des Experimentes garantieren sollen. Die mit einer hohen Flussrate aus der Rührzelle gepumpte Lösung wird mittels eines justierbaren Splitventils RV1 den NMR-Messbedingungen angepasst. Die PEEK-Zuleitungen sind auf dem gesamten Hin- und Rückweg zum Probenkopf thermostatisiert. Die Messungen wurden am ARX400-Spektrometer mit dem inversen SFC-NMR-Probenkopf (vgl. Abbildung 3) durchgeführt. Das Vorhandensein der mit deuteriertem Wasser gefüllten Lockkapillare ermöglicht die Feld-Frequenzstabilisierung und das Homogenisieren des Magnetfeldes ohne die zu vermessende Lösung mit deuteriertem Lösemittel versehen zu müssen. Dadurch wird gewährleistet, dass die Reaktionskinetik allein durch die vorgelegte Mischung bestimmt wird.

5.4.3 Durchfluss-NMR-Messungen

Da die Reaktion temperatur- und pH-abhängig ist, müssen mehrere Experimente bei verschiedenen Temperaturen und Wasserstoffionen-konzentrationen durchgeführt werden. Die entsprechenden Werte werden so gewählt, dass sie die vorhandenen Daten^[119] ergänzen. In Tabelle 10 sind die Wertepaare zusammengefasst.

Formaldehyd / Wasser		Formaldehyd / Methanol	
Temperatur in K	pH-Wert	Temperatur in K	pH-Wert
333	2	303	2,5
333	3,6	303	4,5
333	5	323	2,5
333	6,5	343	2
353	2	338	3,5
353	3,6	338	5
353	5	338	6,5
353	6,5		

Tabelle 10: Bei den Messungen berücksichtigte pH und Temperaturwerte

Die Reaktionskinetik wird aus Verdünnungsexperimenten bestimmt, dabei wird einer exakt vorgelegten Menge an Gemisch eine genau bestimmte Menge an Wasser oder Methanol zugegeben. Das Formaldehyd/Wasser-Gemisch enthielt 22,6 Gew.-% Formaldehyd. Die vorgelegte Lösung (100g) wurde mit Ameisensäure oder konz. Salzsäure für niedrige pH-Werte bzw. mit Natronlauge auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt. Das Formaldehyd/Methanol-Gemisch enthielt 42,9 Gew.-% Formaldehyd; vorgelegt wurden 100g Lösung, die mit Ameisensäure bzw. Natriummethanolat auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt wurden. Der genaue pH-Wert konnte mittels eines pH-Meter mit AgCl/KCl-Glas-Elektrode bestimmt werden.

Die Mischungen wurden jeweils auf die zu messende Temperatur in der Rührzelle temperiert, wobei eine Wartezeit eingehalten wurde, die weitestgehend der Gleichgewichtseinstellung des jeweiligen Systems entsprach (45 min für Formaldehyd/Wasser und 120 min für Formaldehyd/Methanol). Aufgrund der sehr langen Gleichgewichtseinstellung der methanolischen Formaldehydlösung wurde diese nach der pH-Einstellung in einem zweiten,

separaten Thermostaten temperiert. Parallel dazu wurden 100 g entionisiertes Wasser bzw. absolutiertes, über Molekularsieb getrocknetes Methanol abgewogen und im Tropftrichter der Apparatur temperiert. Zuvor wurde ebenfalls auf die oben beschriebene Art und Weise das zur Verdünnung benutzte Wasser bzw. Methanol auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt. Das Einlaufen des Wassers bzw. Methanols aus dem Tropftrichter in die Rührzelle dauerte ca. 20 Sekunden, dabei und während der gesamten Messung wurde die Lösung stark gerührt, um die Mischung schnell zu homogenisieren.

Die ^1H -NMR-Spektren wurden mit dem Pseudo-2D-Pulsprogramm "lc2" ohne Unterdrückung aufgenommen. Von den wässrigen Formaldehydlösungen wurden bei einem Fluss von 3,5 ml/min jeweils 4 Scans pro Spektrum aufgenommen, was einer Aufnahmezeit von 16,7 s entsprach. Insgesamt wurden über einen Zeitraum von 35 min Spektren aufgenommen.

Von den methanolischen Formaldehydlösungen wurden bei einem Fluss von 1,5 ml/min jeweils 8 Scans pro Spektrum aufgenommen, was eine Aufnahmezeit von 42 s ergibt. Insgesamt wurden 172 Reihen akkumuliert, dieses entspricht einer Gesamtmesszeit von 120 min.

In Abhängigkeit vom pH-Wert und der Temperatur rutscht das Wassersignal, welches in der wässrigen Formaldehydlösung auftritt, mit der linken Flanke unter die Monomer- und Oligomerenpeaks, was die normale Auswertung dieser Spektren unmöglich macht (Abbildung 50). Es mussten jedoch unbedingt quantitativ auswertbare Spektren aufgenommen werden. Die Unterdrückung des Wassersignals war also nicht möglich, da Pulssequenzen, wie die cpmg-Methode, aufgrund zu ähnlicher Spin-Spin-Relaxationszeiten ausgeschlossen waren und die sonstigen Unterdrückungsmethoden (normale und NOESY-Vorsättigung, Zero Excitation) die CH_2 -Signale des Monomeren und der Oligomere mehr oder weniger in Mitleidenschaft gezogen haben.

Aus den erhaltenen Pseudo-2D-NMR-Spektren werden nun zu den in Tabelle 11 angegebenen Zeiten 1D-NMR-Spektren extrahiert. Diese müssen dann zunächst phasiert und anschließend basislinienkorrigiert werden.

Formaldehyd / Wasser		Formaldehyd / Methanol	
Reihe	Zeit in s	Reihe	Zeit in s
1	0	1	0
4	66	4	169
7	117	8	338
11	183	12	507
14	234	16	676
18	300	20	845
21	351	24	1014
25	417	28	1183
29	484	34	1436
32	535	40	1690
36	601	47	1985
43	718	54	2281
50	835	61	2577
57	952	68	2873
64	1070	75	3169
72	1203	84	3549
83	1387	93	3929
94	1571	105	4436
104	1738	120	5070
115	1922	135	5704
126	2106	150	6338
128	2140	170	7183
		192	8112
		220	9295
		256	10817

Tabelle 11: Reaktionszeiten zu denen aus den Pseudo-2D-NMR-Spektren 1D-NMR-Spektren extrahiert wurden

Die nun folgende Integration ist oft sehr schwierig, da trotz des 9,4 T-Magneten (400 MHz Protonenresonanzfrequenz) die spektrale Breite im ^1H -NMR-Spektrum nicht ausreicht, die Peaks basisliniengetrennt aufzulösen und, wie beschrieben, eine Überlagerung durch das Wassersignal auftritt. Deshalb muss bei den meisten Spektren auf die Peakdeconvolution zurückgegriffen werden, um Informationen für die einzelnen Signalgruppen zu erhalten. Aus Einheitlichkeitsgründen werden aber alle Spektren der Peakdeconvolution unterzogen.

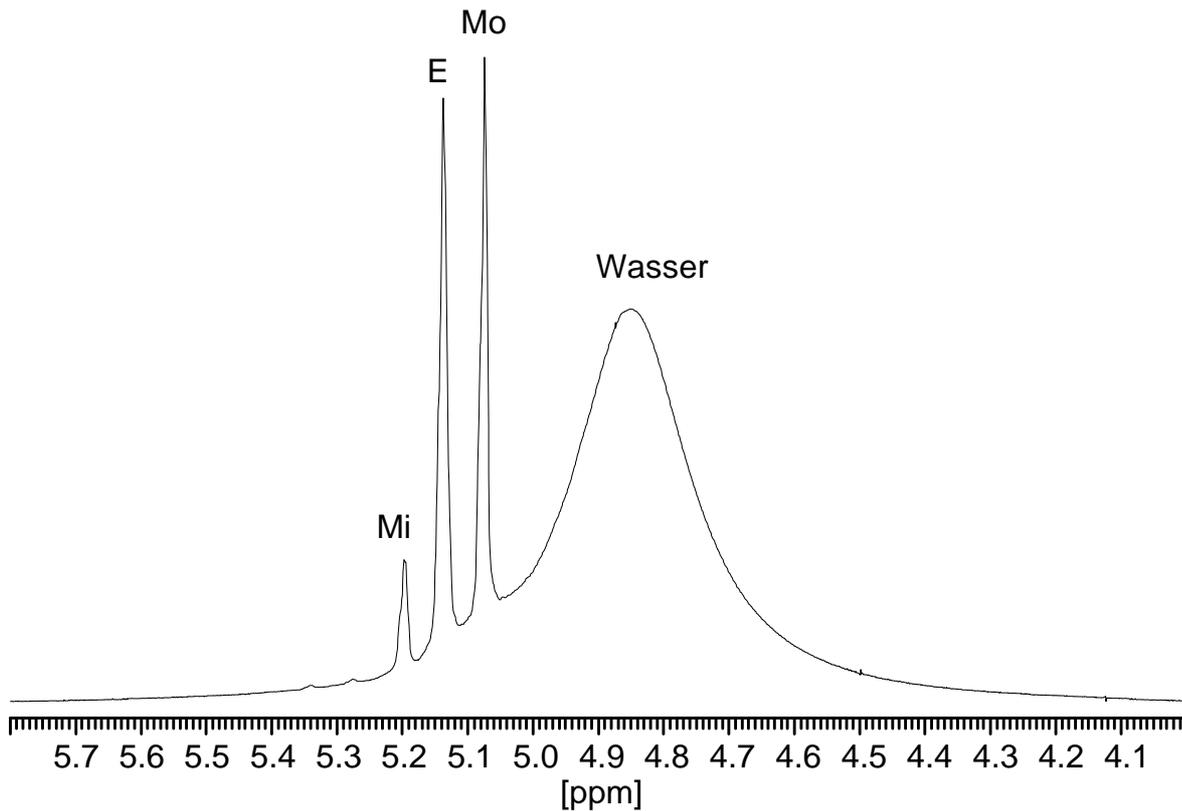


Abbildung 50: Extrahiertes 1D-NMR-Spektrum einer Formaldehyd/Wasser-Mischung mit Zuordnung ($\text{pH} = 3,6$; $T = 333 \text{ K}$)

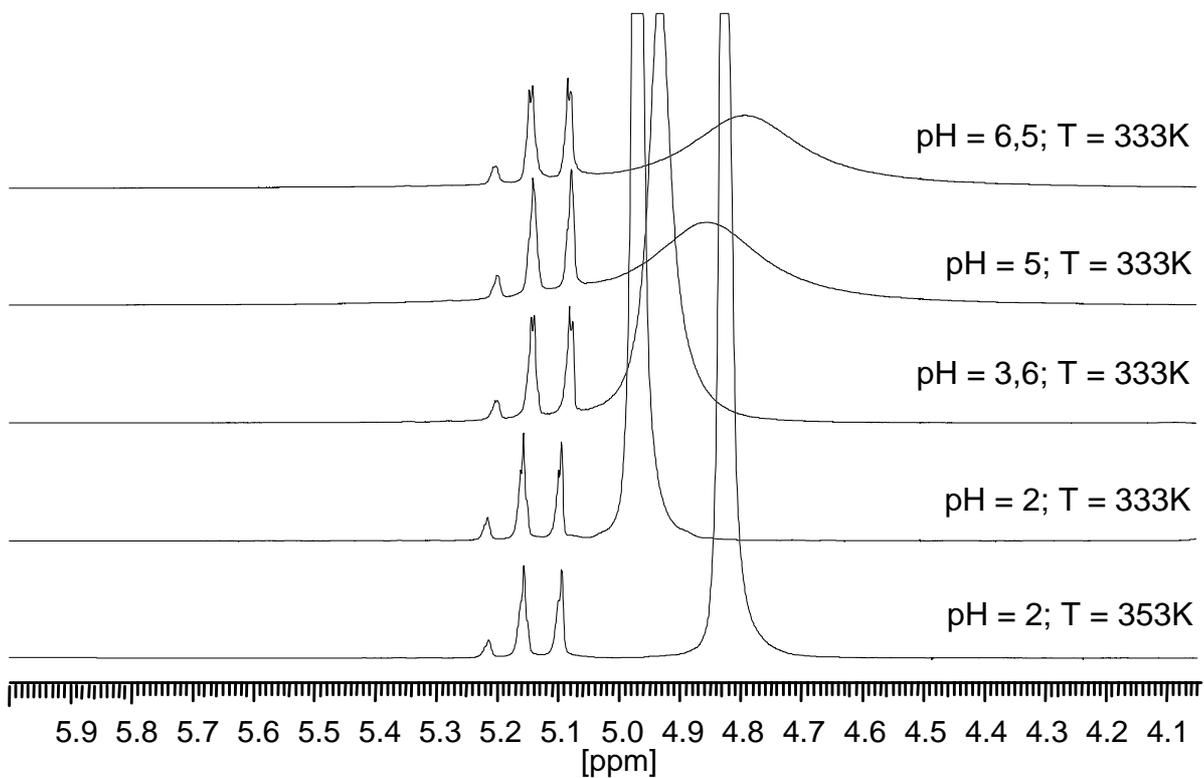


Abbildung 51: Extrahierte 1D-NMR-Spektren der Formaldehyd/Wasser-Mischung bei verschiedenen pH- und Temperaturbedingungen

Abbildung 50 zeigt ein extrahiertes 1D-Spektrum einer Formaldehyd/Wasser-Mischung. Mo steht für das CH₂-Signal des Monomeren, E für die Endgruppen und Mi für die Mittelgruppen der Oligomere (vgl. Abbildung 45). Die End- und Mittelgruppen der einzelnen Oligomere lassen sich bei der Formaldehyd/Wasser-Mischung hier nicht mehr sauber auflösen. Deutlich ist die Überlagerung des Wassers mit den CH₂-Signalen des Monomeren- und der Oligomere signale zu sehen. Eine Vorsättigung würde hauptsächlich das Monomere signal mitunterdrücken, womit eine Quantifizierung des Spektrums nicht mehr der tatsächlichen Konzentration der Komponenten entspräche.

Die extrahierten Spektren in Abbildung 51 zeigen den Einfluss von Temperatur und pH-Wert auf die Signallage und die Peakbreite des Wassersignals. Bei niedrigem pH-Wert wird das Wassersignal schärfer und die hohe Temperatur bewirkt eine Hochfeldverschiebung des Signals, weg von den Monomer- und Oligomere signalen, so dass diese Spektren leichter auszuwerten sind. Höhere pH-Werte lassen das Wassersignal breiter werden und verursachen ebenfalls eine Hochfeldverschiebung, jedoch überlagern weiterhin Anteile des Signals die Monomer- und Oligomere signale, so dass hier die einfache Auswertung nicht mehr möglich ist.

In Abbildung 52 ist das extrahierte 1D-Spektrum einer Formaldehyd/Methanol-Mischung dargestellt. Das Signal bei 3,35 ppm rührt von den CH₃-Gruppen von Methanol und der Hemiformale her. Auch hier bezeichnet Mo das CH₂-Signal des Monomeren. Im Gegensatz zu der Formaldehyd/Wasser-Mischung treten aber verschiedene End- und Mittelgruppen auf, diese sind mit E' und E'' bzw. Mi₃, Mi' und Mi'' bezeichnet. Der Zahlenindex gibt an, von welchem Oligomer, das Signal stammt, wobei 2 für das Dimere, 3 für das Trimere, etc. steht (vgl. Abbildung 46).

Aus Abbildung 53 geht der Reaktionsverlauf eines Verdünnungsexperimentes hervor. Deutlich ist bei 4,83 ppm die Abnahme der Mi_{>3}- und Mi₃-Signale zu sehen. Gleichzeitig reduzieren sich die Signale der E'_{>2} und E''_{>2}-Gruppen bei 4,78 ppm bzw. 4,67 ppm. Auch die Signale der E'₂ und E''₂-Gruppen bei 4,76 ppm und 4,69 ppm nehmen zu Gunsten des Monomere signals bei 4,62 ppm ab. Aus den Werten der Integration der Signale bei verschiedenen Reaktionszeiten kann somit die Geschwindigkeitskonstante berechnet werden.

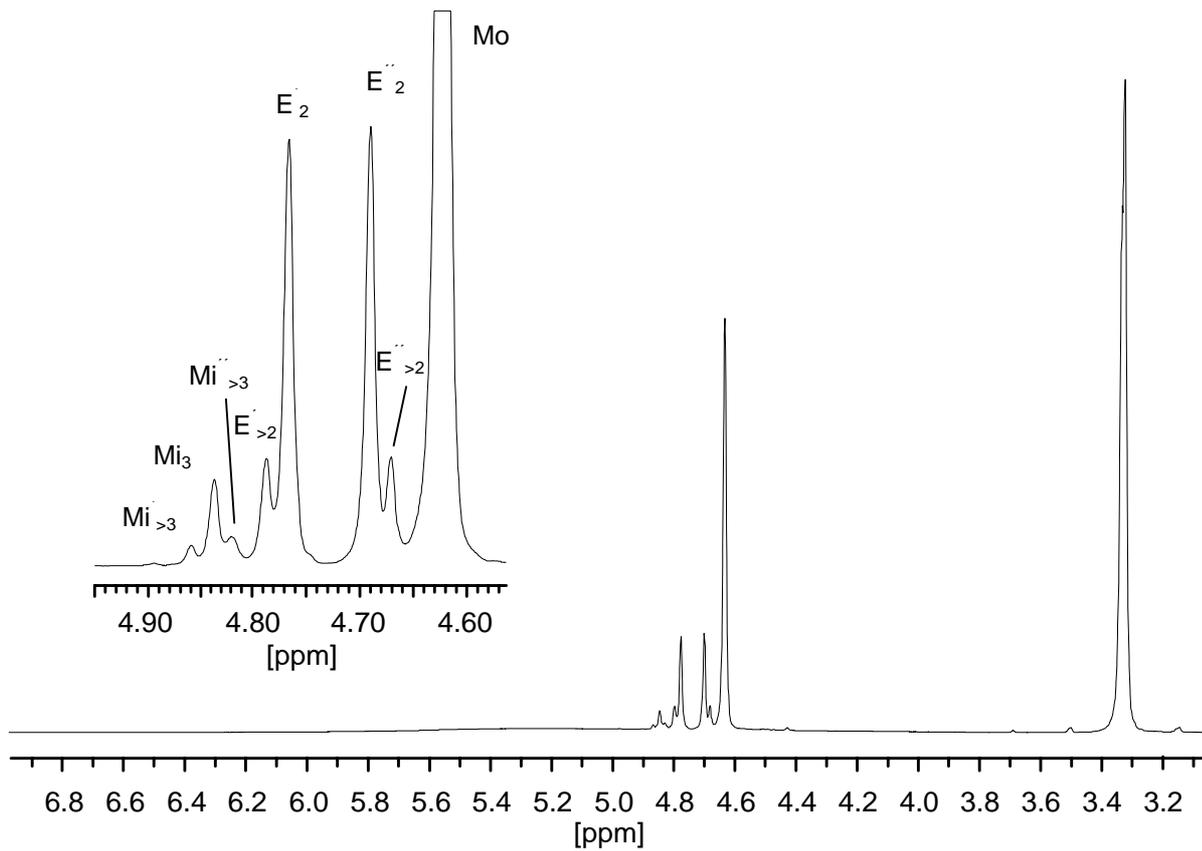


Abbildung 52: Extrahiertes 1D-NMR-Spektrum einer Formaldehyd/Methanol-Mischung mit Zuordnung ($\text{pH} = 3,5$; $T = 338 \text{ K}$)

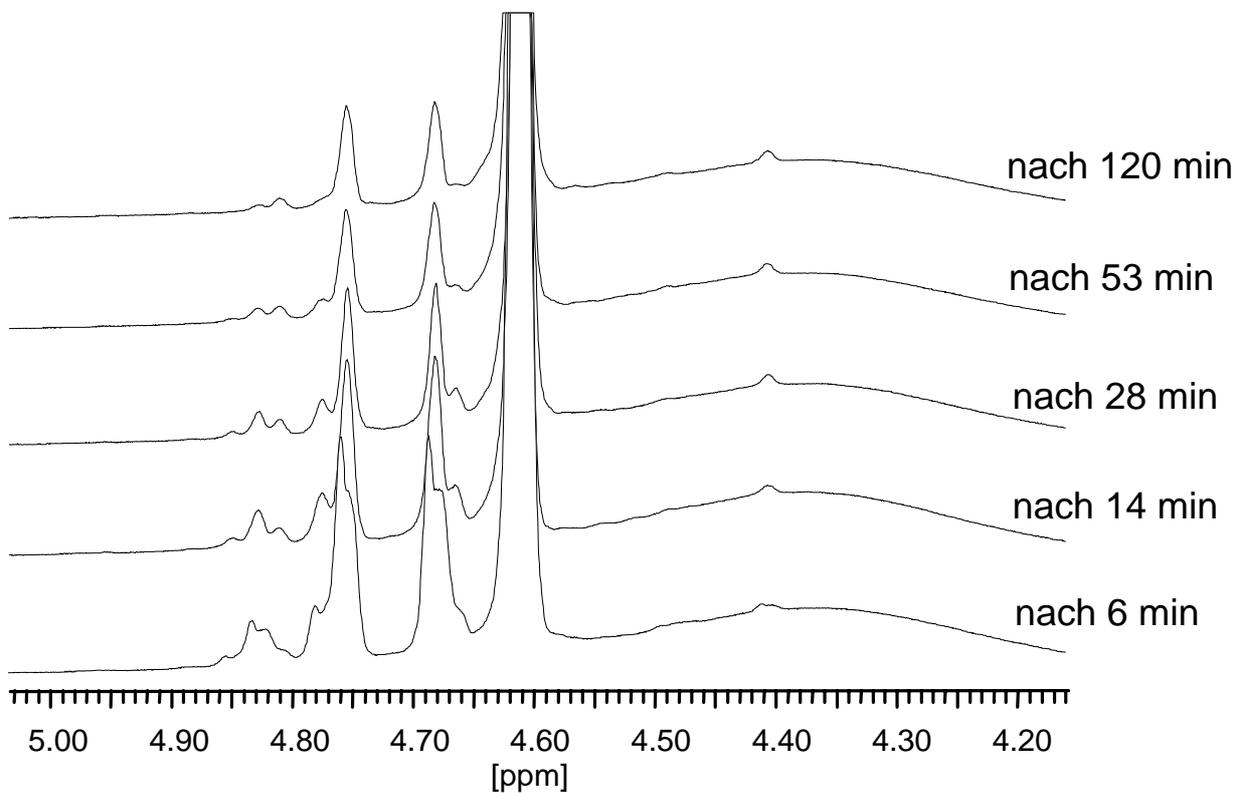


Abbildung 53: Reaktionsverlauf einer verdünnten Formaldehyd/Methanol-Mischung ($\text{pH} = 3,5$; $T = 338 \text{ K}$)

Insgesamt müssen nach Tabelle 10 und Tabelle 11 343 NMR-Spektren interpretiert werden. Aufgrund dieser sehr großen Zahl und der Tatsache, dass noch weitere Messungen dieser Art auch mit ganz anderen Systemen folgen werden, werden in der Arbeitsgruppe von Prof. Hasse zur Zeit Programme entwickelt, die einen Großteil dieser Arbeit übernehmen und automatisieren können. Aus diesem Grund ist eine Auswertung der aufgenommenen Spektren im Hinblick auf Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten bislang nicht erfolgt, so dass Ergebnisse hierzu im Rahmen dieser Dissertation nicht vorlegt werden können.

Zusammenfassend läßt sich zu den bisherigen Ergebnissen aus den Untersuchungen zur Reaktionskinetik sagen, dass sich der verwendete SFC-NMR-Durchflussprobenkopf und die entwickelte Rührzellenapparatur sehr gut bewährt haben. Die Lockkapillare des Probenkopfes ermöglicht die Verwendung von deuterierten Lösemitteln zur Feld-Frequenzstabilisierung und zum Homogenisieren des Magnetfeldes ohne dabei das deuterierte Lösemittel in die Reaktionslösung geben zu müssen, so dass dessen Einfluss auf die Reaktionskinetik ausgeschlossen werden kann. Die Rührzelle und die Thermostatisierung der gesamten Apparatur inklusive der Zu- und Ableitungen gewährleistet die Durchführung der Untersuchungen unter den gewünschten und somit vergleichbaren Bedingungen.

5.5 Gasphasen-NMR-Spektroskopie

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Häfelinger wurden NMR-Spektren von verschiedenen Substanzen in der Gasphase aufgenommen. Die Messungen werden zur Bestimmung der chemischen Verschiebung durchgeführt, welche als experimentelle Werte zum Vergleich für die, in der Arbeitsgruppe Häfelinger theoretisch berechneten chemischen Verschiebungswerte, dienen. Es existieren in der Literatur zwar einige Angaben über ^{13}C -chemische Verschiebungswerte organischer Moleküle in der Gasphase^[121, 122] jedoch überraschenderweise wenig zuverlässige Angaben über chemische Verschiebungen von Protonen.

Mit dem in Abbildung 54 gezeigten Aufbau ist eine schnelle Bestimmung der chemischen Verschiebungswerte möglich. Die Apparatur besteht aus dem NMR-Magnet mit dem SFC-NMR-Durchflussprobenkopf, zwei verschalteten Valco-Injektionsventilen mit Zuleitungen zum Probenkopf sowie zur Gasflasche und der Gasflasche selbst. Letztere lässt sich leicht und schnell durch das Ab- und Anschrauben des Gasflaschenventils austauschen.

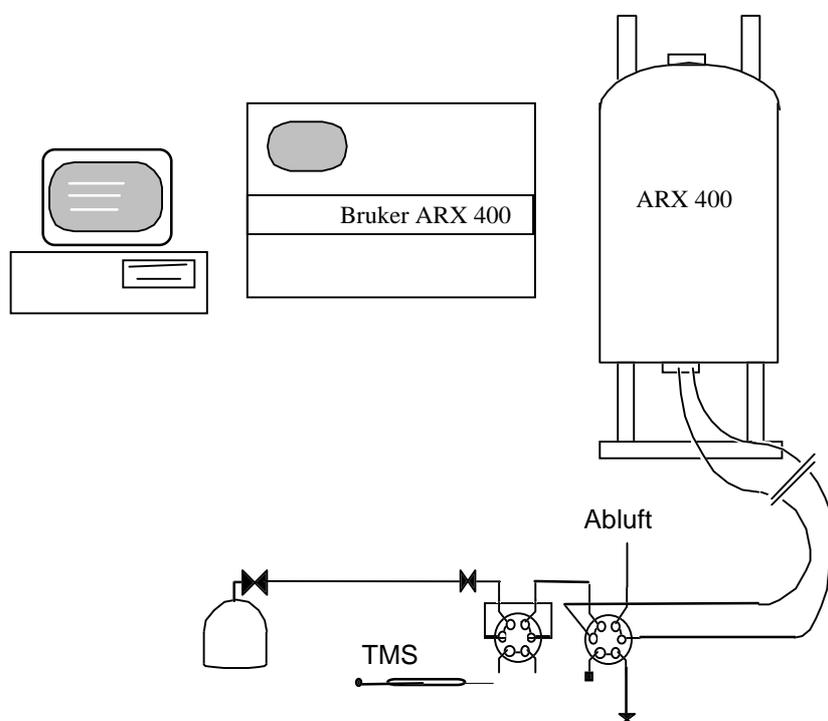


Abbildung 54: Aufbau für die Gasphasen-NMR-Messungen

Die Lockkammer des SFC-NMR-Probenkopfes wurde mit D₂O oder d₆-Benzol gefüllt, um das Spektrometer bei der Messung zu stabilisieren und um Suszeptibilitätsprobleme im Probenkopf zu umgehen. Geshimt wurde auf das jeweilige fouriertransformierte Spektrum der gasförmigen Probe. Der Probenkopf ermöglicht auch hier, wie bei der Messung der Kinetiken im Kapitel zuvor, die Feld-Frequenz-Stabilisierung des Spektrometers ohne die zu messende Probe auf irgendeine Art und Weise zu beeinflussen.

Die Spektren können jedoch nicht auf das Lock-Lösemittel referenziert werden, da die chemische Verschiebung des Locklösemittels derjenigen in Lösung entspricht und nicht der in der Gasphase. Ausgehend von den Erfahrungen aus der SFC, ist die chemische Verschiebung von Signalen in überkritischen Fluiden gegenüber Flüssigkeiten um ca. 1-2 ppm und in Gasen um 2-3 ppm zu tieferem Feld verschoben. Deshalb müssen die Spektren wie in der früher üblichen Weise direkt auf TMS (Tetramethylsilan) referenziert werden. Hierbei fungiert das zu untersuchende Gas als Carrier für den TMS-Standard in die Messzelle.

Die Zugabe des TMS-Standards zum Gas mittels des 1. Injektionsventils bereitete anfangs Schwierigkeiten, da TMS einen Siedepunkt von 27°C hat und der hohe Dampfdruck das Aufziehen auf die HPLC-Injektionspritze unmöglich machte. Deshalb wurden das TMS-Gefäß und die Spritze im Gefrierfach auf -18°C abgekühlt. Das Tragen von Lederhandschuhen verhinderte zudem die rasche Erwärmung der Spritze durch die Körperwärme der Hände. Das zweite Injektionsventil diente zum Schließen der Gaszuleitung zum Probenkopf. Der Auslass des Probenkopfes war nach dem Schließen zunächst offen, so dass sich eventuell entstehender Überdruck abbauen konnte, dann wurde auch dieser Auslass verschlossen.

In der ersten Messreihe wurden die bereits bei Raumtemperatur gasförmigen Proben Methan, Ethan, Propan und Ethen vermessen. In Abbildung 55 sind die NMR-Spektren der genannten Gase mit den dazugehörigen chemischen Verschiebungen der einzelnen NMR-Signale abgebildet. Alle Spektren sind auf das TMS-Signal bei 0,00 ppm referenziert.

Beim Spektrum von Methan ist noch das HDO-Restsignal des Locklösemittels zu sehen, welches normalerweise bei 4,5 ppm erscheint, hier aber aufgrund der Referenzierung auf gasförmiges TMS bei 2,0 ppm auftritt. Die chemische

Verschiebung ändert sich hier also um 2,5 ppm beim Übergang vom flüssigen in den gasförmigen Zustand.

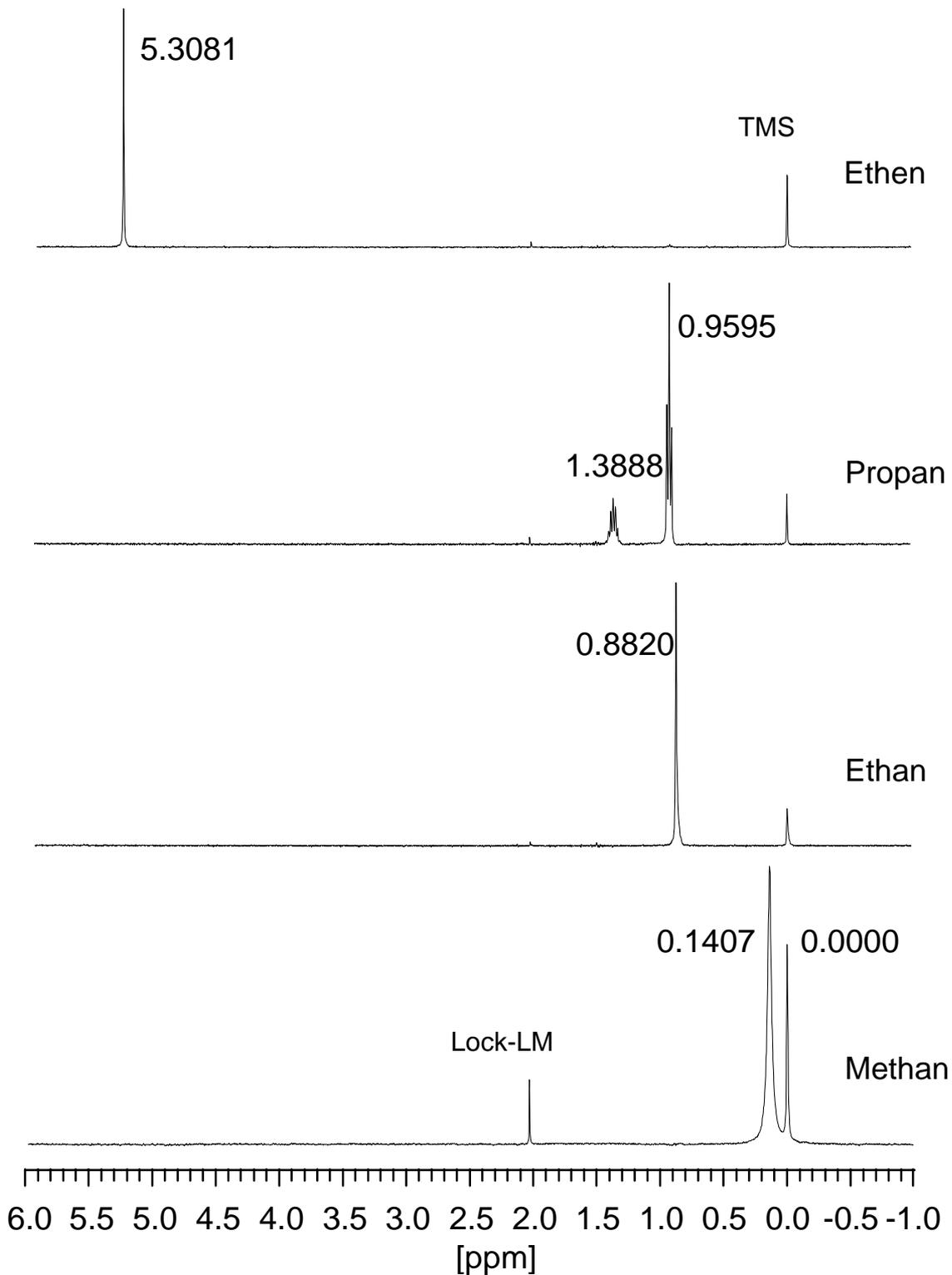


Abbildung 55: $^1\text{H-NMR}$ -Gasphasen-Spektren von Methan, Ethan, Propan und Ethen, referenziert auf Tetramethylsilan (TMS)

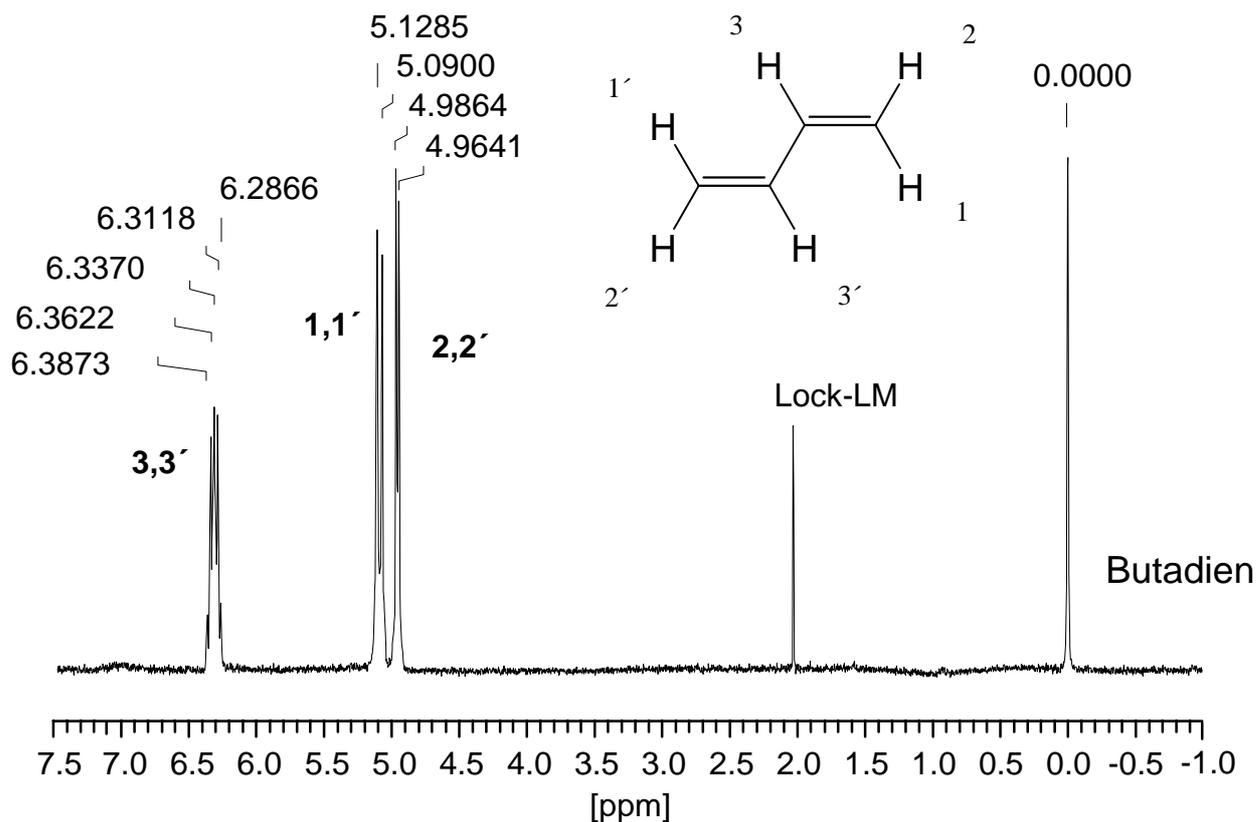


Abbildung 56: $^1\text{H-NMR}$ -Gasphasen-Spektren von Butadien, referenziert auf Tetramethylsilan (TMS)

In Abbildung 56 ist das Spektrum von Butadien, ebenfalls referenziert auf Tetramethylsilan, gezeigt. Die Probe konnte analog der zuvor beschriebenen Methode vermessen werden.

Aufgrund der kleineren cis-Kopplungskonstanten von 9 Hz kann das Signal bei 4,79 ppm den Protonen 2 und 2' zugeordnet werden, während das Dublett bei 5,11 ppm mit einer trans-Kopplungskonstanten von 15 Hz von den Protonen 1 und 1' verursacht wird. Die geminale Kopplung ist nicht aufgelöst.

Die Signale bei 6,34 ppm rühren von den Protonen 3 und 3' her. Da Butadien kein reines Spektrum erster Ordnung liefert, müssen zur Bestimmung der Signallage der Protonen 3 und 3' Computersimulationen des Spinsystems durchgeführt werden.

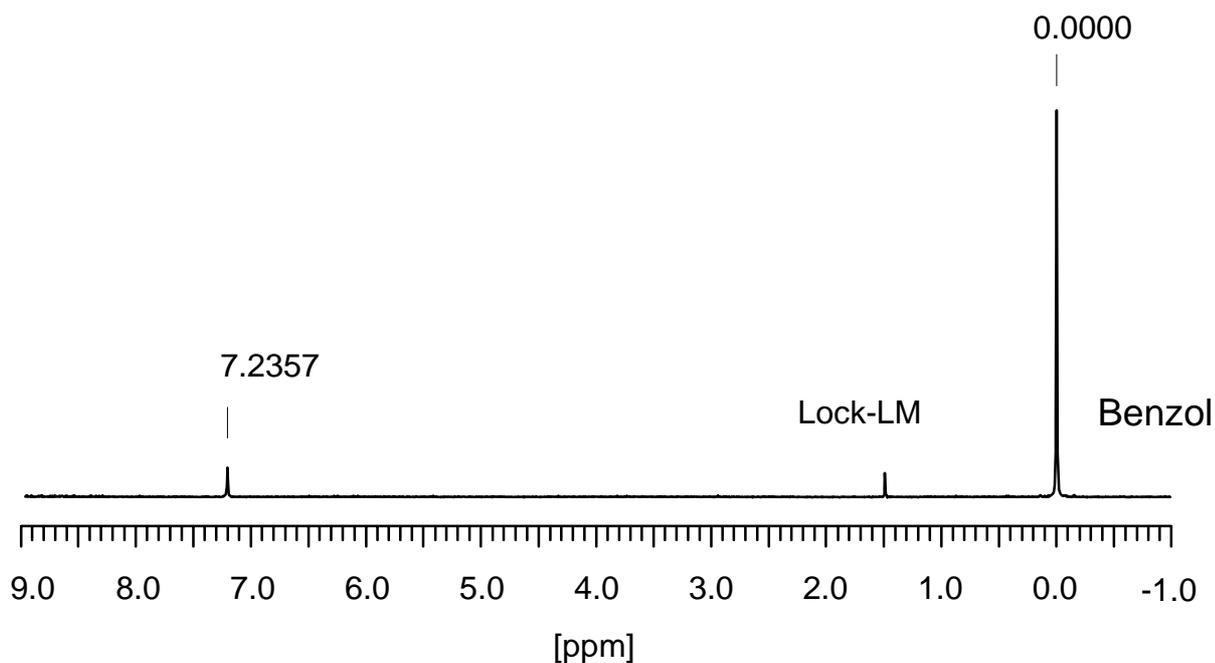


Abbildung 57: ^1H -NMR-Gasphasen-Spektren von Benzol bei 80°C , referenziert auf Tetramethylsilan (TMS)

Abbildung 57 zeigt das Gasphasen-Spektrum von Benzol bei einer Probenkopftemperatur von 80°C , ebenfalls referenziert auf Tetramethylsilan.

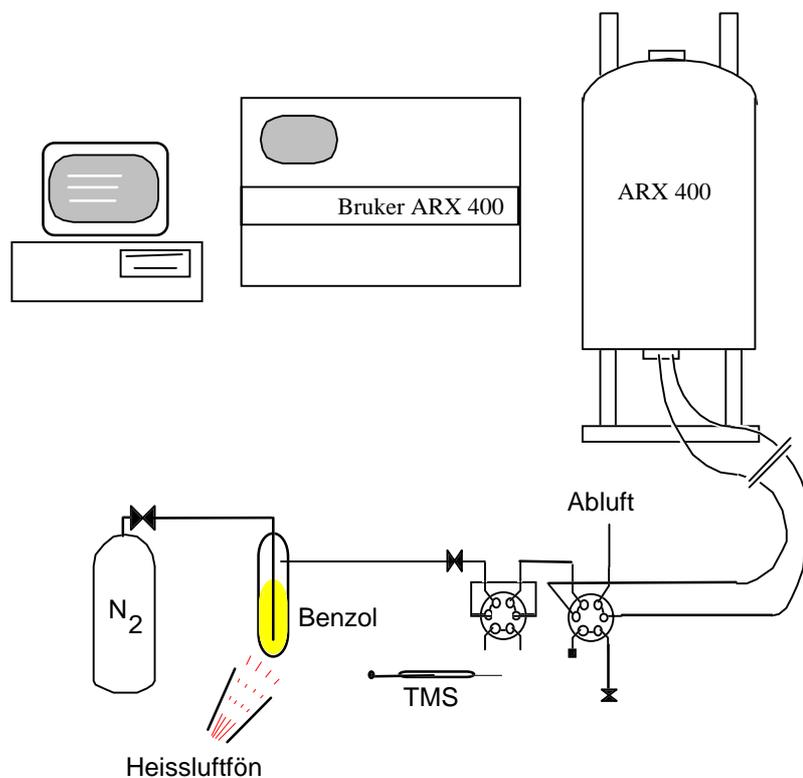


Abbildung 58: Aufbau für Gasphasen-NMR-Messung für Proben die bei Raumtemperatur nicht gasförmigen sind (hier: Benzol)

Die Beschickung des Probenkopfes mit dampfförmigem Benzol gelang mittels eines etwas modifizierten Aufbaus (Abbildung 58). Hierzu wurde ein mit Benzol beschicktes Gärröhrchen vor den 2 Schaltventilen angebracht. Als Carrier wurde gasförmiger Stickstoff verwendet. Das Gärröhrchen wurde mit einem Heissluftfön bis zum Sieden des Benzol beheizt, so dass Benzoldampf durch den Stickstoffstrom in die Messzelle gelangte. Der Probenkopf war auf 80°C, dem Siedepunkt von Benzol geheizt.

In Tabelle 12 sind nochmals alle erhaltenen chemischen Verschiebungen in ppm- und in Hz-Einheiten für die verschiedenen Proben zusammengefasst.

Substanz	Chem.Verschiebung [ppm]	Chem.Verschiebung [Hz]
Methan	0,141	56,29
Ethan	0,882	352,92
Propan	1,389 / 0,960	555,72 / 382,93
Ethen	5,308	2126,88
Butadien	4,975 / 5,109 / 6,337	1990,75 / 2044,40 / 2535,60
Benzol	7,236	2895,23

Tabelle 12: Chemische Verschiebung der Protonen aus den $^1\text{H-NMR}$ -Gasphasen-Spektren in Einheiten von ppm und Hz

An dieser Stelle sei nochmals auf den schnellen und einfachen Probentransfer und kurze Messzeit hingewiesen. Die vier in Abbildung 55 gezeigten Spektren konnten innerhalb weniger Minuten aufgenommen werden, zumal die Sensitivität des inversen Probenkopfes hervorragend ist und alle Spektren mit nur einem Transienten aufgenommen werden konnten.

Zusammen mit der Miniaturisierung der NMR-Messzellegeometrie, wie sie im Bereich der Kapillar-HPLC-NMR-Kopplung betrieben wird, kann sicherlich die von Buddrus begonnene Arbeit Anfang der 80er Jahre auf dem Gebiet der GC-NMR-Kopplung nochmals überdacht und weiterentwickelt werden^[123, 124].

6 Experimenteller Teil

6.1 Geräte

6.1.1 NMR-Spektrometer:

Bruker ARX 400: 9,4 T, Protonenresonanzfrequenz 400,13 MHz

Alle Durchflusseperimente in Tübingen wurden am ARX 400 durchgeführt. Die Durchfluss- ^{13}C -NMR-Experimente mit den immobilisierten freien Radikalen und den paramagnetischen Metallchelaten wurden mit einem 190 μl Dual- ^{13}C -NMR-Durchflussprobenkopf aus Eigenbau aufgenommen. Für die IFR-Experimente in überkritischen Kohlendioxid wurde ein selektiver SFC- ^1H -NMR-Probenkopf mit einer druckstabilen Titan-Saphir-Zelle (350 bar, 80 °C) verwendet. Für alle anderen Experimente - Reaktionsverfolgung in überkritischen Fluiden, Untersuchungen der Reaktionskinetik in Lösung und Aufnahme der Gasphasen-Spektren - wurde der, mit einer druckstabilen Titan-Saphir-Zelle (350 bar, 80 °C) ausgerüstete, inverse SFC- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR-Durchflussprobenkopf eingesetzt.

Das Spektrometer wurde anfangs über eine Aspect-Workstation (Bruker, Rheinstetten), später über eine O₂-Workstation von SGI (Silicon Graphics Inc., Mountain View, CA, USA), beide mit XWINNMR-Software (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) ausgerüstet, gesteuert. Die Datenauswertung wurde sowohl an einer INDY-Workstation mit XWINNMR-Software als auch am PC mit 1D WINNMR-Software (Software: Bruker Daltonik GmbH, Bremen) durchgeführt.

6.1.2 SFC-DNP-NMR-Anlage:

Tiefeld: Modifizierter Varian E-3 EPR-Eisenmagnet (X-Band, 0,33 T) mit TE₁₀₂-Kavität; Klystronquelle (Bruker Mikrowellenbrücke) mit TWT Verstärker (Varian)

Hochfeld: JEOL FX-200 Konsole; Oxford-Magnet, 4,7 T, Protonenresonanzfrequenz 200,13 MHz; Apple/Macintosh PC

6.1.3 SFC-Anlage: (Eigenbau)

Gilson SFC-Pumpe M308 (Abimed Analysentechnik GmbH, Langenfeld) mit Pumpenkopf bis 10 ml/min, Thermostat Haake G (Haake, Karlsruhe), Dani 3800 Gaschromatograph mit Mischkammer und C18-RP-Trennsäule (Bischoff Chromatography, Leonberg), Valco Einspritzventil, HP UV-Detektor 1050 mit druckstabiler Flusszelle (Hewlett-Packard, Waldbronn), Jasco 880-81 Rückdruckregler (Jasco, Japan), PC mit Chromstar-Software (Bruker Daltonik GmbH, Bremen)

6.1.4 Rührzellen-Apparatur:

Bosch-Profile (Robert Bosch Automationstechnik, Stuttgart), Temperierbare Rührzelle: 250 ml Planschliff-Reaktionsgefäß mit temperierbarem 100 ml Tropftrichter (HWS Labortechnik Mainz), Thermostat N8-C41 (Haake, Karlsruhe), IKA Rührmotor RW 16 basic(I mit Eigenbau-Rührer, HPD Multitherm 200 Pumpe mit Hasteloy-Pumpenkopf (Bischoff Chromatography, Leonberg), Upchurch Rückdruckregler und Ventile (Upchurch), Thermofühler Pt 100 mit Jumo-Digitalanzeige, WIKA Druckmesser mit Piezodruckaufnehmer Wikatronic

6.1.5 EXAFS-Spektrometer:

Die EXAFS-Spektren wurden an der Gd-L₃-Kante bei 7243 eV und 20 °C im X1.1-Strahl des Hamburger Synchrotron-strahlenlabor (HASYLAB) am DESY, Hamburg, mit Si(111) Doppelkristall-Monochromator aufgenommen. Die Beschleunigerspannung betrug 5,46 GeV bei einer Stromstärke von 98 mA. Die Daten wurden in Transmission in einer Ionenkammer gesammelt. Die Energiekalibrierung wurde an einer 20 µm dünnen Gadolinium-Metall-Folie an der L₃-Kante bei 7243 eV durchgeführt. Alle Messungen fanden unter Schutzgasatmosphäre statt. Die Daten wurden mit einem speziellen Programmpaket ausgewertet. Hierbei wurde das Programm AUTOBK der Universität Washington zur Untergrundkorrektur herangezogen, mit EXCURV92 wurde die XAFS-Funktion ausgewertet.

6.1.6 Sonstiges:

ESR-Spektrometer:

Bruker ESP 300, Magnetfeldstärke 3400 G (0,34 T); Bruker Field Frequency Lock ER 033 R; Bruker Microwave Bridge ER 041 MR (Bruker, Rheinstetten)

Elementaranalyse:

Carlo Erba Elemental Analyser 1104 und 1106 (Carlo Erba, Italien)

Pumpen:

Bischoff-HPLC-Pumpe mit präparativem Pumpenkopf bis 20 ml/min (Bischoff, Leonberg)

Bischoff-HPLC-Pumpe mit analytischem Pumpenkopf bis 5 ml/min (Bischoff, Leonberg)

Packpumpe:

Knauer Pneumatik HPLC-Pumpe (Knauer, Berlin), mit 30 ml Füllrohr zum Packen der PEEK-Säulen

0,6 g des modifizierten Kieselgels werden in 28 ml Isopropanol 5 min im Ultraschallbad suspendiert und anschließend in das Slurry-Reservoir gefüllt. Durch Spülen mit Methanol bei 500 bar Druck wird die Säule gepackt.

Ultraschallbad:

ELMA-Transtonic T470/H (Vetter, Ammerbuch)

PEEK-Leersäulen:

PEEK-Säulen 50 mm x 4,0 mm ID (Bischoff, Leonberg)

pH-Meter:

Microprocessor pH Meter, ph 537 (WTW, Weilheim)

6.2 Chemikalien

6.2.1 Chemikalien für die Synthese:

ProntoSil 60-2540-Si (Bischoff, Leonberg)

Aminopropyltriethoxysilan (ABCR, Karlsruhe)

4-Carboxy-TEMPO (Aldrich, Steinheim)

DMF für die Peptidsynthese (Fluka, Neu-Ulm)

1-Hydroxybenzotriazol (Aldrich, Steinheim)

Diisopropylcarbodiimid (Aldrich, Steinheim)

Davisil, grade 644 (Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, USA)

Toluol (Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, USA)

4-Hydroxy-TEMPO (Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, USA)

Dichlordimethylsilan (Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, USA)

Triethylamin (Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, USA)

6.2.2 Chemikalien für Experimente:

CO₂ in Gasflasche, grade 5.5 (Messer Griesheim, Krefeld)

Gd-DTPA und Gd-DOTA auf APS-Kieselgel immobilisiert (Heribert Schmitt-Willich, Schering AG, Berlin)

Ethylbenzol (Aldrich, Steinheim)

Dibutylphthalat, Diallylphthalat (Aldrich, Steinheim)

Metoprolol (Olle Gyllenhaal, AstraZeneca R&D Mölndal, Mölndal, Schweden)

N-Benzyl-N-methylamin, N-Benzyl-N-isopropylamin, N-Benzyl-N-tert.-butylamin, N-Benzyl-N,N-dimethylamin, N-Benzylamin (Fluka, Neu-Ulm)

Wässrige und methanolische Formaldehydlösung (aus Paraformaldehyd, Merck, Darmstadt; Methanol, Merck, Darmstadt)

Methan, Ethan, Propan, Ethen, Butadien in 1 kg Gasbomben (Aldrich, Steinheim)

Benzol (Merck, Darmstadt)

Deuterierte Lösemittel (Merck, Darmstadt)

Grundchemikalien (Aldrich, Steinheim; Fluka, Neu-Ulm; Merck, Darmstadt)

6.3 Synthese

6.3.1 Aktivierung des Kieselgels

5 g Kieselgel werden in einem Stickstoffkolben mit aufgesetztem Frittenstück (Pore 4) mit Hahn bei 180 °C im Hochvakuum (zuerst Vakuum anlegen, dann aufheizen) 4 Stunden getrocknet. Die Belüftung darf nicht bei 180 °C erfolgen. Zweckmäßigerweise wird das Kieselgel direkt vor der Synthese aktiviert und sofort umgesetzt.

6.3.2 Synthese der Aminopropyl-Phase

Nachdem das Kieselgel auf 120 °C abgekühlt ist, wird der Kolben belüftet und mit 3 eq des entsprechenden Aminopropylsilans (hier: 3-Aminopropyltriethoxysilan) umgesetzt. Der Hahn des Frittenstückes wird mit einem mit Blaugel gefüllten Trockenrohr versehen. Das Gemisch reagiert über Nacht bei 120 °C ab.

Nachdem das modifizierte Kieselgel auf Raumtemperatur abgekühlt ist, wird es mit 20 ml Toluol aufgeschlämmt, über eine Fritte mit Porengröße 4 abgefrittet, mit Toluol, Methanol und Petrolether (30-50) gewaschen und anschließend bei 60 °C 1 Stunde im Hochvakuum getrocknet.

6.3.3 Synthese der APS-TEMPO-Phase

1,25 mmol des säurederivatisierten freien Radikals werden in 8 ml DMF (für die Peptidsynthese) vorgelegt und mit 1,5 mmol HOBt versetzt. Nach Entstehen einer klaren Lösung wird auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wird die Lösung so

langsam mit 1,25 mmol DICl in 5 ml DCM versetzt, dass die Temperatur nicht über 2 °C steigt. Nach Entfernung des Eisbades wird 20 min weitergerührt. Daraufhin wird die Menge an 3-Aminopropylphase hinzugegeben, die einer Menge von 1,25 mmol freien NH₂-Gruppen entspricht. Es wird solange gerührt, besser geschüttelt (eventuell wird das Kieselgel sonst zermahlen), bis der Kaiser-Test auf freie NH₂-Gruppen unverändert bleibt.

Das Reaktionsprodukt wird über eine Fritte mit Porengröße 4 abgezogen, mit DMF, Methanol und n-Hexan mehrmals gewaschen und schließlich bei 60 °C im Hochvakuum 1 Stunde getrocknet.

6.3.4 Kupplungsumsatztest nach Kaiser

Eine Spatelspitze des Kieselgels wird aus der Reaktionslösung entnommen, mit Methanol gewaschen und mit 2-3 Tropfen jeder der unten aufgeführten Lösungen versetzt. Die Mischung wird in einem Druckfläschchen 5 min auf 100 °C erhitzt.

Je fortgeschrittener die Amidkupplung, desto schwächer die Blaufärbung des Kieselgels und der Lösung. Sollte die Reaktion nicht vollständig ablaufen, so wird abgebrochen, nachdem zwei Tests im Abstand von 1 Stunde keine Farbveränderung ergeben haben.

6.3.5 Synthese der SI-TEMPO-Phase

Das Kieselgel (Davisil, grade 644, 100-200 mesh, 150 Å, 300 m²/g) wird 20 min mit konz. HCl bei Raumtemperatur gewaschen, mit deionisiertem Wasser gespült und anschließend 5 Stunden bei 600°C im Stickstoffstrom ausgeheizt.

In einen 100 ml Rundkolben werden 2 g getrocknetes Kieselgel mit 2,5 ml trockenem Triethylamin in 40 ml absolutem Toluol vorgelegt. Dazu wird tropfenweise 0,42 ml Dichlordimethylsilan und 0,5 ml Triethylamin in 9 ml absolutem Toluol gegeben. Die Mischung wird für 24 Stunden unter Rückfluss erhitzt und dann abgekühlt. Anschließend wird 0,203 g 4-Hydroxy-TEMPO in 10 ml absolutem Toluol zugegeben und für weitere 20 Stunden erhitzt. Die Mischung wird gefiltert und mit je 150 ml Chloroform, Toluol und Methanol auf dem Filter gewaschen.

6.4 Durchfluss-NMR-Spektroskopie

6.4.1 Quantitative Durchfluss-¹³C-NMR-Experimente

Die Durchfluss-¹³C-NMR-Spektren von Ethylbenzol wurden bei verschiedenen Fließgeschwindigkeiten im "Inverse-Gated-Decoupling"-Modus mit dem Pulsprogramm "zgig" aufgenommen. Jeweils ein Transient pro Spektrum, bei 32k Datenpunkten und einer spektralen Breite von 18518 Hz, wurden akkumuliert, dabei wurde eine Pulslänge von 90° verwendet. Alle Spektren wurden bei 300 K aufgenommen. Die Spektren wurden anschließend an einem PC mit XWINNMR-Software (Bruker Daltonics, Bremen) ausgewertet. Dabei wurden die Integrale auf die Methylgruppe im jeweiligen Spektrum referenziert.

6.4.2 Quantitative SFC-¹H-NMR-Experimente

Bei den Experimenten mit Ethylbenzol wurden ca. 10 mg Ethylbenzol eingespritzt. Pro Spektrum wurde ein Transient (90° Pulswinkel) mit einem spektralen Bereich von 4518 Hz und 16k Datenpunkten bei 323 K aufgenommen. Die Spektren wurden anschließend an einem PC mit XWINNMR-Software (Bruker Daltonics, Bremen) ausgewertet. Dabei wurden die Integrale auf die Methylgruppe im jeweiligen Spektrum referenziert.

Für die SFC-NMR-Experimente wurde als Trennsäule eine ProntoSIL C₁₈-Säule der Firma Bischoff verwendet. Das Analytgemisch bestand aus äquimolaren Mengen von Diallylphthalat und Dibutylphthalat in Dichlormethan. Bei jedem continuous-flow Lauf wurde eine Menge von ca. 1 mg pro Komponente eingespritzt. Die Spektren wurden mit dem Pulsprogramm "lczg", bei einem Transienten pro Spektrum (90° Pulswinkel), 8k Datenpunkten und einer spektralen Breite von 4590 Hz aufgenommen und an einer INDY-Workstation prozessiert. Die Messtemperatur im Probenkopf betrug 323 K.

6.4.3 SFC-DNP-NMR-Experimente

Die flüssigen Benzol-Lösungen für die Experimente wurden bereits vorher zusammengemischt, während die 9%ige Benzolmischung in scCO₂ durch Pumpenzugabe des Benzols zum überkritischen Kohlendioxid erhalten wurde.

Die SPIN's wurden in eine PEEK-Säule gepackt und im Bereich des Tieffeldmagneten in der Kavität installiert. Es wurde jeweils ein Transient pro Spektrum mit DNP und 16 Transienten pro Spektrum ohne DNP aufgenommen. Die Messungen wurden an einem Apple/Macintosh-Computer ausgewertet.

6.4.4 Reaktionsverfolgung in überkritischen Fluiden

Die freie Base des Metoprolol wurde aus dem Metoprolol-Tartrat durch Extraktion mit Dichlormethan aus einem schwachen Natriumcarbonatpuffer gewonnen. Die organische Phase wurde anschließend im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingedampft. In Dichlormethan gelöst, wurden 20 µl einer konzentrierten Metoprolol-Lösung eingespritzt. Bei einer spektralen Breite von 7352 Hz und 32k Datenpunkten wurden 32 Transienten aufgenommen.

Von den, in deuteriertem Chloroform gelösten, N-Benzylaminen wurden jeweils 20 µl einer konzentrierten Lösung eingespritzt. 4 Transienten pro Spektrum, mit einer spektralen Breite von 6000 Hz und 32k Datenpunkten bei einer Probenkopftemperatur von 323 K, wurden akkumuliert. Die Spektren wurden anschließend an einem PC mit XWINNMR-Software (Bruker Daltonics, Bremen) ausgewertet.

6.4.5 Verfolgung der Reaktionskinetik Formdehyd/Wasser bzw. Formaldehyd/Methanol

Die wässrigen und methanolischen Formaldehydlösungen wurden durch mehrstündiges Kochen unter Rühfluss aus Paraformaldehyd und dem entsprechenden Lösemittel hergestellt. Wobei das Methanol zuvor drei Stunden mit 0,1 nm Molekularsieb getrocknet wurde.

Für die Messung des Formaldehyd/Wasser-Gemisches wurden 100 g Lösung vorgelegt und mit Ameisensäure oder konz. Salzsäure für niedrige pH-Werte bzw. mit Natronlauge auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt. Für die Formaldehyd/Methanol-Mischung wurden ebenfalls 100 g Lösung, die mit Ameisensäure bzw. Natriummethanolat auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt wurden, vorgelegt. Der genaue pH-Wert wurde mittels eines pH-Meter mit AgCl/KCl-Glas-Elektrode bestimmt.

Die Mischungen wurden jeweils auf die zu messende Temperatur in der

Rührzelle temperiert, wobei eine Wartezeit eingehalten wurde, die weitestgehend der Gleichgewichtseinstellung des jeweiligen Systems entsprach (45 min für Formaldehyd/Wasser und 120 min für Formaldehyd/Methanol). Aufgrund der sehr langen Gleichgewichtseinstellung der methanolischen Formaldehydlösung wurde diese nach der pH-Einstellung in einem zweiten, separaten Thermostaten temperiert. Parallel dazu wurden 100 g entionisiertes Wasser bzw. absolutiertes, über Molekularsieb getrocknetes Methanol abgewogen und im Tropftrichter der Apparatur temperiert. Zuvor wurde ebenfalls auf die oben beschriebene Art und Weise das zur Verdünnung benutzte Wasser bzw. Methanol auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt.

Die Spektren wurden mit dem Pseudo-2D-Pulsprogramm "1c2" ohne Unterdrückung aufgenommen. Von den wässrigen Formaldehydlösungen wurden bei einem Fluss von 3,5 ml/min jeweils 4 Scans pro Spektrum mit jeweils 32k Datenpunkten und einem spektralen Bereich von 4032 Hz aufgenommen, was einer Aufnahmezeit von 16,7 s entsprach. Insgesamt wurden 128 Reihen akkumuliert, dieses ergab eine Gesamtmesszeit von 35 min.

Von den methanolischen Formaldehydlösungen wurden bei einem Fluss von 1,5 ml/min jeweils 8 Scans pro Spektrum mit jeweils 32k Datenpunkten und einem spektralen Bereich von 4032 Hz aufgenommen, was eine Aufnahmezeit von 42 s ergab. Insgesamt wurden 172 Reihen akkumuliert, dieses entsprach einer Gesamtmesszeit von 120 min. Die Auswertung fand ebenfalls an einem PC mit XWINNMR-Software (Bruker Daltonics, Bremen) statt.

6.4.6 Gasphasen-NMR-Experimente

Die Gase wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Es wurde 1 Transient pro Spektrum, mit einer spektralen Breite von 8064 Hz und 16k Datenpunkten bei einer Probenkopftemperatur von 298 K (Benzol bei 353 K), aufgenommen.

7 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anwendung der Durchfluss-NMR-Spektroskopie als Detektionsmethode aufgezeigt. Der breite Anwendungsbereich der Durchfluss-NMR-Spektroskopie liefert qualitative und quantitative Informationen von und aus gasförmigen, überkritischen und flüssigen Medien. Sie ermöglicht neben den allgemein bekannten Informationen aus NMR-Spektren auch die Beobachtung von Reaktionen sowie die Untersuchung von Reaktionskinetiken.

Durch die Anwendung der IFR-Technik konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von quantitativ auswertbaren Durchfluss- ^1H -NMR-Spektren in der SFC-NMR-Kopplung und von quantitativen ^{13}C -NMR-Spektren im *continuous-flow* Modus möglich ist. Bereits die einfachen TEMPO-Phasen eignen sich für diese Methode, aber besonders die paramagnetischen Gadoliniumkomplexe zeichnen sich durch ihren hohen Relaxationseffekt aus. Die Ursache dafür ist der hohe Paramagnetismus aufgrund der 7 ungepaarten Elektronen des Gd^{3+} -Ions. Bei der Steigerung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses konnte durch die Verwendung der TEMPO-Phasen und einer Fließgeschwindigkeit von 20 ml/min ein Faktor von 55 im Vergleich zur statischen NMR-Messung erreicht werden. Bei den angebundenen Gadoliniumkomplexen wurde hierbei sogar ein Faktor von 75 erzielt. Unabhängig vom Fluss ergibt sich so eine Steigerung um den Faktor 2,6 für die TEMPO-Phasen und ein Faktor 3,8 für die Gadoliniumkomplexe.

Die Aufnahme quantitativ auswertbarer Durchfluss- ^{13}C -NMR-Spektren löst jedoch noch nicht das Empfindlichkeitsproblem bei der Aufnahme von ^{13}C -NMR-Spektren von Komponenten aus chromatographischen Trennfraktionen. Dieses Problem kann langfristig nur durch ein kombiniertes ESR- und NMR-Experiment unter Verwendung der Dynamischen Kernpolarisation (DNP) gelöst werden. Neue Probenkopfontwicklungen mit modernsten elektronischen Komponenten können dieser Methode und damit auch der Detektion von Heterokern-NMR-Spektren aus chromatographischen und sonstigen Prozessen zum Durchbruch verhelfen. Zur Durchführung dieses Experimentes sind immobilisierte freie Radikale von essentieller Bedeutung.

Die Miniaturisierung von Kopplungsverfahren ist für Forschungsvorhaben der Biotechnologie von großer Wichtigkeit. Kapillartrennmethode wie die Kapillar-HPLC aber auch die Kapillar-SFC spielen hierbei eine große Rolle. Die Kombination aus Miniaturisierung der Messzellegeometrie und Verwendung von gepackten Mixed-Mode-Kapillaren (IFR- und RP-Phasen), führt zu einer höheren Empfindlichkeit des NMR-Experimentes.

Mittels der Durchfluss-NMR-Spektroskopie und eines speziellen, druckstabilen NMR-Probenkopfes konnte die Reaktion von Aminen in überkritischem Kohlendioxid unter Bildung von Carbaminsäuren nachgewiesen werden, die Bildung der Harnstoffderivate aus primären Aminen kann aufgrund der experimentellen Erfahrung nur vermutet werden. Die erhaltenen Erkenntnisse wurden dazu verwendet, Beobachtungen aus der Untersuchung von medizinischen Wirkstoffen mittels Überkritischer Fluid Chromatographie (SFC) zu interpretieren.

Für die Untersuchung von Reaktionskinetiken, die im Bereich von mehreren Minuten und Stunden liegen, ist die Durchfluss-NMR-Spektroskopie hervorragend geeignet. Die Empfindlichkeit der chemischen Verschiebung auf strukturelle Änderungen ermöglicht es komplexe Mischungen, wie die hier untersuchten, technisch relevanten Gemische aus Formaldehyd/Wasser und Formaldehyd/Methanol, zu analysieren und auszuwerten. Hierbei hat sich der SFC-Durchflussprobenkopf bewährt. Die Druck- sowie Temperaturstabilität kann weite Bereich abdecken und die Möglichkeit die externe Lockkapillare mit deuteriertem Lösemittel zu befüllen, gewährleistet die Feld-Frequenzstabilisierung des Magneten, ohne die zu untersuchende Mischung in ihrer Reaktionskinetik zu stören. Ein Problem ist sicherlich die exakte Auswertung und Bearbeitung der Datenflut, die sich aus solchen Messungen ergibt.

Die technische Entwicklung der NMR-Probenköpfe ist mittlerweile soweit fortgeschritten, dass selbst gasförmige Substanzen schnell und mit hoher Empfindlichkeit nachgewiesen werden können. Am Beispiel der hier untersuchten gasförmigen Alkane und Olefine, deren chemische Verschiebungswerte zu Zwecken theoretischer Berechnungen aufgenommen wurden, wird das Potential der NMR im Bereich der gasförmigen Verbindungen deutlich. Qualitative und quantitative Untersuchungen von Mischungen wie z.B. Leuchtgas mittels kombinierter IFR-Durchfluss-NMR-Spektroskopie sind

ebenso denkbar wie die Weiterentwicklung der Kopplung von Gaschromatographie und NMR-Spektroskopie.

Insgesamt verdeutlichen die durchgeführten Experimente das große Potential und die breite Anwendbarkeit der Durchfluss-NMR-Spektroskopie in weiten Teilen der modernen Wissenschaft, angefangen von den Naturwissenschaften über die pharmazeutische Industrie bis hin zu den Ingenieurwissenschaften.

8 Literaturverzeichnis

- ¹ Gerlach, W.; Stern, O., *Ann. Phys.* **1924**, 74, 673.
 - ² Rabi, I.I.; Zacharias, J.R.; Millman, S.; Kusch, P., *Phys. Rev.* **1938**, 53, 318.
 - ³ Rabi, I.I.; Zacharias, J.R.; Millman, S.; Kusch, P., *Phys. Rev.* **1939**, 55, 526.
 - ⁴ Purcell, E.; Torrey, H.C.; Pound, R.V., *Phys. Rev.* **1946**, 69, 37.
 - ⁵ Bloch, F.; Hansen, W.W.; Packard, M., *Phys. Rev.* **1946**, 69, 127.
 - ⁶ Knight, W.D., *Phys. Rev.* **1949**, 76, 1259.
 - ⁷ Proctor, W.G.; Yu, F.C., *Phys. Rev.* **1950**, 77, 717.
 - ⁸ Dickinson, W.C., *Phys. Rev.* **1950**, 77, 736.
 - ⁹ Dorn, H.C., in *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*, John Wiley and Sons Ltd; Chichester, New York, **1996**, 2026-2037.
 - ¹⁰ Suryan, G., *Indian Acad. Sci.* **1951**, 33A, 107.
 - ¹¹ Singer, J.R., *Science* **1972**, 175, 794.
 - ¹² Packer, K.J., *Mol. Phys.* **1969**, 17, 355.
 - ¹³ Stejskal, J., *Chem. Phys.* **1965**, 43, 3597.
 - ¹⁴ Garroway, A.N., *J. Phys. D: Appl. Phys.* **1974**, 7, L159.
 - ¹⁵ DeJager, P.A.; Hemminga, M.A.; Sonneveld, A., *Rev. Sci. Instrum.* **1978**, 49, 1217.
 - ¹⁶ Grimaldi, J.J.; Sykes, B.D., *J. Biol. Chem.* **1975**, 250(5), 1618.
 - ¹⁷ Fyfe, C.A.; Cocivera, M.; Damji, S.W.H., *Acc. Chem. Res.* **1978**, 11, 277.
 - ¹⁸ Ernst, R.R.; Anderson, W.A., *Rev. Sci. Instrum.* **1966**, 37, 93.
 - ¹⁹ Watanabe, N.; Niki, E., *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.* **1978**, 54, 194.
 - ²⁰ Bayer, E.; Albert, K.; Nieder, M.; Grom, E.; Keller, T., *J. Chromatogr.* **1979**, 186, 497.
 - ²¹ Albert, K., *J. Chromatogr. A* **1995**, 703, 123.
 - ²² Lindon, J.C.; Nicholson, J.K.; Wilson, I.D., *Progr. NMR Spectrosc.* **1996**, 29, 1.
 - ²³ Strohschein, S., *Dissertation*, Universität Tübingen, **1997**.
 - ²⁴ Schlotterbeck, G., *Dissertation*, Universität Tübingen, **1997**.
 - ²⁵ Dachtler, M., *Diplomarbeit*, Universität Tübingen, **1998**.
 - ²⁶ Albert, K.; Braumann, U.; Tseng, L.-H.; Nicholson, G.; Bayer, E.; Spraul, M.; Hoffmann, M.; Dowle, C.; Chippendale, C., *Anal. Chem.* **1994**, 66, 3042.
-

-
- ²⁷ Albert, K.; Braumann, U.; Streck, R.; Spraul, M.; Ecker, R., *Fresenius J. Anal. Chem.* **1995**, 352, 521.
- ²⁸ Albert, K., *J. Chromatogr. A* **1997**, 785, 65-83.
- ²⁹ Gfrörer, P.; Schewitz, J.; Pusecker, K.; Tseng, L.-H.; Albert, K.; Bayer, E., *Electrophoresis* **1999**, 20, 3-8.
- ³⁰ Olson, D.L.; Lacey, M.E.; Webb, A.G.; Sweedler, J.V., *Anal. Chem.* **1999**, 71, 3070-3076.
- ³¹ Pusecker, K.; Schewitz, J.; Gfrörer, P.; Tseng, L.-H.; Albert, K.; Bayer, E., *Anal. Chem.* **1998**, 70, 3280-3285.
- ³² Asahi, Y.; Mizuta, E., *Talanta* **1972**, 19, 567.
- ³³ Tan, L.K.; Cocivera, M., *Can. J. Chem.* **1982**, 60(6), 778.
- ³⁴ Cocivera, M.; Effio, A., *J. Org. Chem.* **1980**, 45(3), 415.
- ³⁵ Albert, K.; Dreher, E.-L.; Straub, H.; Rieker, A., *Magn. Reson. Chem.* **1987**, 25, 919-922.
- ³⁶ Ackerman, J.J.H.; Grove, T.H.; Wong, G.G.; Gadian D.G.; Radda, G.K., *Nature* **1980**, 283, 167.
- ³⁷ Eleff, S.M.; Schnall, M.D.; Ligetti, L.; Osbakken, M.; Subramanian, V.H.; Chance, B.; Leigh, Jr., J.S., *Magn. Reson. Med.* **1988**, 7(4), 412.
- ³⁸ Laude, Jr., D.A.; Lee, R.W.K.; Wilkins, C.L., *Anal. Chem.* **1985**, 57, 1286.
- ³⁹ Günther, U.; Sudmeier, J.L.; Albert, K.; Bachovchin, W.W., *J. Magn. Reson. A* **1995**, 117, 73.
- ⁴⁰ Albert, K., *Habilitationsschrift*, Universität Tübingen, **1988**.
- ⁴¹ Albert, K.; Bayer, E., *AMI (Analytical Methods and Instrumentation)* **1995**, 2, 302.
- ⁴² Sudmeier, J.; Günther, U.; Albert, K.; Bachovchin, W., *J. Magn. Reson. A* **1996**, 118, 145.
- ⁴³ Bayer, E.; Albert, K.; Nieder, M.; Grom, E.; Wolff, G.; Rindlisbacher, M., *Anal. Chem.* **1982**, 54, 1747.
- ⁴⁴ Bayer, E.; Albert, K., *J. Chromatogr.* **1984**, 312, 91.
- ⁴⁵ Shoolery, J.N. in *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*, John Wiley and Sons Ltd; Chichester, New York, **1996**, 3907f.
- ⁴⁶ Fyfe, C.A.; Cocivera, M.; Damji, S.W.H., *Acc. Chem. Res.* **1978**, 11, 277.
- ⁴⁷ Albert, K.; Dreher, E.-L.; Straub, H.; Rieker, A., *Magn. Reson. Chem.* **1987**, 25, 919.
- ⁴⁸ Albert, K.; Kruppa, G.; Zeller, K.-P.; Bayer, E., *Z. Naturforsch.* **1984**, 39, 859.
- ⁴⁹ LaMar, G.N., *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 1040.
- ⁵⁰ Hawkes, G.E.; Herwig, K.; Roberts, J.D., *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 1017.
- ⁵¹ Leibfritz, D.; Roberts, J.D., *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 4996.
-

- ⁵² Martin, L.L.; Chang, C.-J.; Floss, H.G.; Mabe, J.A.; Hagaman, E.W.; Wenkert, E., *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 8942.
- ⁵³ Tanabe, F.M.; Suzuki, K.T.; Jankowski, W.C., *Tetrahedron Lett.* **1973**, 4723.
- ⁵⁴ Levy, G.C.; Edlund U., *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4482.
- ⁵⁵ Shoolery, J.N., *Prog. NMR Spectrosc.* **1977**, *11*, 79.
- ⁵⁶ Freeman, R.; Hill H.D.W.; Kaptein R., *J. Magn. Reson.* **1972**, *7*, 327.
- ⁵⁷ Forsyth, D.A.; Hediger, M.; Mahmoud, S.S.; Glessen, B.C., *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 1896.
- ⁵⁸ Cookson, D.J.; Smith, B.E., *J. Magn. Reson.* **1984**, *57*, 355.
- ⁵⁹ Laude, Jr., D.A.; Lee, R.W.K.; Wilkins, C.L., *J. Magn. Reson.* **1984**, *60*, 453.
- ⁶⁰ Laude, Jr., D.A.; Lee, R.W.K.; Wilkins, C.L., *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 1286.
- ⁶¹ Albert, K.; Nieder M.; Bayer E., *J. Chromatogr.* **1985**, *346*, 17.
- ⁶² Bayer, E.; Albert, K., *J. Chromatogr.* **1984**, *312*, 91.
- ⁶³ Bruck, D.; Dudley R.; Fyfe C.A.; Van Delden J., *J. Magn. Reson.* **1981**, *42*, 51.
- ⁶⁴ Laude, Jr., D.A.; Lee R.W.K. Wilkins C.L., *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 1281-1286.
- ⁶⁵ Zhang, Y.; Laude, Jr. D.A., *J. Magn. Reson.* **1990**, *87*, 46.
- ⁶⁶ Müller-Warmuth, W.; Meise-Gresch, K., *Adv. Magn. Reson.* **1983**, *2*, 1-45.
- ⁶⁷ Dorn, H.C.; Gitti, R.; Tsai, K.H.; Glass T.E., *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *155*, 227-232.
- ⁶⁸ Tsai, K.H.; Glass, T.E.; Dorn, H.C., *J. Magn. Reson.* **1990**, *89*, 362-366.
- ⁶⁹ Dorn, H.C.; Glass, T.E.; Gitti, R.; Tsai, K.H., *Appl. Magn. Reson.* **1991**, *2*, 9.
- ⁷⁰ Dorn, H.C.; Gu J.; Bethune, D.S.; Johnson, R.D.; Yannoni, C.S., *Chem. Phys. Lett.* **1993**, *203*, 549-554.
- ⁷¹ Stevenson, S.; Dorn, H.C., *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2993-2999.
- ⁷² Stevenson, S.; Glass, T.; Dorn, H.C., *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2623-2628.
- ⁷³ Luque de Castro, M.D.; Valcárcel, M. und Tena, M.T., *Analytical Supercritical Fluid Extraction*, Springer, Berlin, Heidelberg, **1994**.
- ⁷⁴ Sako, T.; Kamizawa, C.; Sone, M.; Inui, A., *Chorinkai Saishin Gijutsu* **2000**, *4*, 41-44.
- ⁷⁵ Mori, T.; Okahata, Y., *Chorinkai Saishin Gijutsu* **2000**, *4*, 36-40.
- ⁷⁶ Poliakoff, M.; Smail, F.; Meehan, N.; Gray, K.W.; Hitzler M.G.; Ross, S.K., *Wiss. Ber. - Forschungszent. Karlsruhe* **1999**, (FZKA 6271, High Pressure Chemical Engineering), 131-132.
- ⁷⁷ Wu, B.C.; Klein M.T.; Sandler, S.I., *Ind. Eng. Chem. Res.* **1991**, *30(5)*, 822-828.
- ⁷⁸ Nakamura, K., *Trends Biotechnol.* **1990**, *8(10)*, 288-292.
-

- ⁷⁹ Pommier, C.; Chhor, K.; Bocquet, J.F.; Bari, M., *Mater. Res. Bull* **1990**, 25(2), 213-221.
- ⁸⁰ Subramaniam, B.; McHugh, M.A., *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* **1986**, 25, 1.
- ⁸¹ Kainz, S.; Brinkmann, A.; Leitner, W.; Pfaltz, A., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6421-6429.
- ⁸² Yuan, H.; Olesik, S.V. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Application, Theory and Instrumentation*, R.A. Meyers ed., John Wiley and Sons Ltd, Chichester, New York, Weinheim, **2000**, 11472f.
- ⁸³ Klepser, E.; Corwin, A.H.; Turner D.A., *J. Org. Chem.* **1962**, 27, 700-701.
- ⁸⁴ Milton, L.L. Markides, K.E., *Analytical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction*, Chromatography Conferences Inc., Provo, Utah, **1990**.
- ⁸⁵ Smith, R.M., *Supercritical Fluid Chromatography*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1990**.
- ⁸⁶ Allen, L.A.; Glass, T.E.; Dorn, H.C., *Anal. Chem.* **1988**, 60, 390.
- ⁸⁷ Albert, K.; Braumann, U.; Tseng, L.-H.; Nicholson, G.; Bayer, E.; Spraul, M.; Hoffmann, M.; Dowle, C.; Chippendale, M., *Anal. Chem.* **1994**, 66, 3042.
- ⁸⁸ Albert, K.; Braumann, U.; Streck, R.; Spraul, M.; Ecker, R., *Fresenius J. Anal. Chem.* **1995**, 352, 521.
- ⁸⁹ Braumann, U.; Händel, H.; Strohschein, S.; Spraul, M.; Krack, G.; Ecker, R.; Albert, K., *J. Chromatogr. A* **1997**, 761, 336.
- ⁹⁰ Braumann, U., *Dissertation*, Universität Tübingen, **1995**.
- ⁹¹ Rathke, J.; Klinger, R.; Kraus, T., *Organometallics* **1991**, 10, 1350-1355.
- ⁹² Sander, L. C.; Wise, S. A., *Anal. Chem.* **1995**, 67, 3284.
- ⁹³ Pursch, M.; Sander, L.; Albert, K., *Anal. Chem.* **1996**, 68, 4107.
- ⁹⁴ Buszewski, B.; Schmid, J.; Albert, K.; Bayer, E., *J. Chromatogr.* **1991**, 552, 415.
- ⁹⁵ Buszewski, B.; Lodkowski, R., *J. Liq. Chrom.* **1991**, 14, 1185.
- ⁹⁶ Buszewski, B., *Chromatographia* **1992**, 34, 573.
- ⁹⁷ Wendelberger, G., *Synthese von Peptiden, Methoden der Organischen Chemie*, Houben-Weyl-Müller, Band XV/1 und 2, G. Thieme Verlag Stuttgart, **1974**.
- ⁹⁸ König, W.; Geiger, R., *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788.
- ⁹⁹ Lauffer, R.B., *Chem. Rev.* **1987**, 87, 901.
- ¹⁰⁰ Weinmann, H.-J.; Mühler, A.; Radüchel, B., in *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*, John Wiley and Sons Ltd; Chichester, New York, **1996**, 2166.
- ¹⁰¹ Wrackmeyer, B., *Chemie in unserer Zeit* **1988**, 21, 100.
- ¹⁰² Norman, R. O. C., *Electron Spin Resonance*, Vol. 1, The Chemical Society, **1973**.
- ¹⁰³ Bär, F.; Berndt, A.; Dimroth, K., *Chemie in unserer Zeit* **1975**, 1, 18.
-

-
- ¹⁰⁴ Bär, F.; Berndt, A.; Dimroth, K., *Chemie in unserer Zeit* **1975**, 2, 18.
- ¹⁰⁵ Teo, B.K., *EXAFS: Basic Principles and Data Analysis*, Springer Verlag, Berlin, **1986**.
- ¹⁰⁶ Bertagnolli, H.; Ertel, T.S., *Angew. Chem.* **1994**, 106, 15.
- ¹⁰⁷ Fischer, H.; Tseng, L.H.; Raitza, M.; Albert, K., *Magn. Reson. Chem.* **2000**, 38, 336-342.
- ¹⁰⁸ Gyllenhaal, O.; Vessman, J., *J. Chromatogr.* **1990**, 516, 415-426.
- ¹⁰⁹ Baastoe, M.B.; Lundanes, E., *J. Chromatogr.* **1991**, 558, 458-463.
- ¹¹⁰ Zhang, S.; Nicholson, G.; Schindler, B.; Bayer, E. *18th Int. Symp. on Capillary Chromatogr.*, Riva del Garda, Italy, **1996**, pp 1785-1790.
- ¹¹¹ Pinkston, J. D.; Baker, T.R., *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **1995**, 9, 1087.
- ¹¹² Albert, K.; Peters, B.; Bayer, E., *Z. Naturforsch.* **1986**, 41b, 351-358.
- ¹¹³ Hall, M.W.; Piret, E.L., *Ind. Eng. Chem.* **1949**, 41, 1277-1286.
- ¹¹⁴ Bell, R.P., *Adv. Phys. Org. Chem.* **1966**, 4, 1-29.
- ¹¹⁵ Koberstein, E.; Müller, K.P.; Nonnenmacher, G., *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.* **1971**, 75, 549-553.
- ¹¹⁶ Gorrie, T.M.; Raman, S.K.; Rouette, H.K.; Zollinger, H., *Helv. Chim. Acta* **1973**, 56, 175-195.
- ¹¹⁷ Dankelman, W.; Daemen, J.M., *Anal. Chem.* **1976**, 48, 401-404.
- ¹¹⁸ Hasse, H.; Maurer, G., *Ind. Eng. Chem. Res.* **1991**, 30, 2195-2000.
- ¹¹⁹ Hahnenstein, I.; Hasse, H.; Kreiter, C.; Maurer, G., *Ind. Eng. Chem. Res.* **1994**, 33, 1022-1029.
- ¹²⁰ Hahnenstein, I.; Albert, M.; Hasse, H.; Kreiter, C.; Maurer, G., *Ind. Eng. Chem. Res.* **1995**, 34, 440-450.
- ¹²¹ Jameson, A.K.; Jameson, C.J., *Chem. Phys. Lett.* **1987**, 134, 461.
- ¹²² Fleyfel, F.; Song, K.Y.; Kook, A.; Martin, R.; Kobayashi, R., *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 6722.
- ¹²³ Buddrus, J.; Herzog, H., *Org. Magn. Reson.* **1981**, 15, 211-312.
- ¹²⁴ Herzog, H.; Buddrus, J., *Chromatographia* **1984**, 18, 31-33.
-

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, E. Bayer, H. Bertagnolli, D. Christen, H. Eckstein, H.-J. Egelhaaf, G. Gauglitz,
W. Göpel, G. Häfeling, H.-P. Hagenmaier, M. Hanack, D. Hoffmann, V. Hoffmann,
G. Jung, S. Kemmler-Sack, W. Koch, D. Krug, N. Kuhn, E. Lindner, M. E. Maier,
H. A. Mayer, K. Müller, U. Nagel, H. Oberhammer, D. Oelkrug, G. Pausewang, E. Plies, J.
Rademann, V. Schurig, F. F. Seelig, H. U. Siehl, B. Speiser, H. Stegmann, J. Strähle,
W. Voelter, U. Weimar, K.-P. Zeller, C. Ziegler

Lebenslauf

Fischer
Holger Hermann
14. Januar 1973
Tübingen
deutsch
evangelisch

Ausbildung

1979 - 1983	Grundschule Kilchberg/Weilheim
1983 - 1992	Keplergymnasium Tübingen
16. Juni 1992	Allgemeine Hochschulreife
1992-1998	Studium an der Universität Tübingen Fachrichtung Chemie/Diplom
5. Oktober 1994	Diplomvorprüfung in Chemie
März 1998 – Sep.1998	Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. Klaus Albert: "Immobilisierte freie Radikale: Synthese und Anwendung in der Durchfluß-NMR-Spektroskopie"
14. September 1998	Diplom in Chemie
seit September 1998	Seit 15. September 1998 Promotion am Institut für Organische Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. Klaus Albert mit dem Thema: "Quantitative Durchfluss-NMR-Spektroskopie und Anwendung der Durchfluss-NMR-Spektroskopie in Lösung, in überkritischen Fluiden und in der Gasphase"