

**Miniaturisierte Trennverfahren  
und ihre On-line-Kopplung  
mit der NMR-Spektroskopie:  
Entwicklung und Anwendungen**

**DISSERTATION**

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften**

**2004**

vorgelegt von

**Erdmann Rapp**

Tag der mündlichen Prüfung:

12. November 2004

Dekan:

Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. K. Albert

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. V. Schurig

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ernst Bayer und Herrn Prof. Dr. Klaus Albert am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen angefertigt. Der praktische Teil wurde unter der Leitung des, für uns alle viel zu früh verstorbenen, Prof. Dr. Ernst Bayer († 31.1.2002) in der Zeit von September 1997 bis Dezember 2000 durchgeführt und die Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. Klaus Albert bis November 2004 fertiggestellt.

Meinem verehrten Lehrer, Prof. Dr. E. Bayer, danke ich für die interessante Themenstellung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen, seine großzügige und freundliche Unterstützung und sein stetes Interesse an dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. Klaus Albert für die bereitwillige Übernahme der Betreuung meiner Arbeit, seinem mir damit entgegengebrachten Vertrauen und seiner wohlwollenden Geduld bei der Fertigstellung.

## Danksagung

Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen aus den Arbeitskreisen von Prof. E. Bayer und Prof. K. Albert für die kollegiale Aufnahme, das gute Arbeitsklima und die vielen wertvollen - wenn auch nicht immer wissenschaftlichen - Diskussionen und Anregungen. Während der gesamten Zeit war immer auf Ihre Hilfsbereitschaft Verlass.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Petra Gfrörer, Frau Dr. Li-Hong Tseng und Herrn Dr. Alexandre Bezerra Schefer für die hervorragende und fruchtbare Zusammenarbeit bei der NMR-Kopplung. Erst dadurch wurden die in Kapitel 4 dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse möglich.

Herrn Dr. Manfred Spraul, Herrn Dr. Ulrich Braumann, Herrn Martin Hofmann und Herrn Hartmut Grauner von der Firma Bruker (Rheinstetten), danke ich für die freundliche Bereitstellung von Kapillar-NMR-Probenköpfen und des Bruker DRX 600 NMR-Gerätes

Frau Dr. Dorothee Wistuba und Herrn Prof. Dr. Volker Schurig danke ich für die Herstellung und Überlassung der benötigten Materialien bei der cHPLC-NMR on-line-Kopplung zur Trennung und Analyse von Gemischen chiraler Verbindungen.

Frau Straub danke ich ganz herzlich für ihre Hilfsbereitschaft bei der Bewältigung von organisatorischen Problemen aller Art.

Vor allem möchte ich mich aber bei meiner Frau Yvonne, meinen Kindern Maximilian und Lennart und meinen Eltern für ihr Verständnis und ihre liebevolle Unterstützung bedanken.

Für meine Frau Yvonne und meine Eltern



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Historie .....	2
1.2	Kapillartrennmethoden .....	4
1.2.1	Kapillar-Hochleistungsflüssigchromatographie .....	4
1.2.2	Kapillarelektrophorese .....	5
1.2.3	Kapillarelektrochromatographie .....	8
1.3	<i>On-line</i> Detektion und Identifizierung in Kapillaren .....	10
<b>2</b>	<b>Problemstellung</b> .....	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Kapillartrenntechniken und Hardwareentwicklung</b> .....	<b>13</b>
3.1	Theoretische Grundlagen .....	15
3.1.1	Elektrophorese.....	15
3.1.1.1	Elektrolytische Doppelschicht .....	16
3.1.1.2	Elektroosmose und elektroosmotischer Fluss.....	19
3.1.2	Vergleich der Flussprofile elektrokinetischer und hydrodynamischer Trennmethoden .....	21
3.1.3	(Elektro-)Chromatographie .....	24
3.1.3.1	Retention, Totzeit und Kapazität.....	24
3.1.3.2	Trennleistung, Auflösung und Selektivität .....	26
3.1.3.3	Bandenverbreiterung .....	28
3.2	Apparatur.....	34
3.2.1	Auf CEC adaptierbare kommerzielle CE-Anlage .....	35
3.2.2	Druckunterstützbare Gradienten-cHPLC/(p)CEC-Anlage mit presplitt Injektion.....	36
3.2.3	Druckunterstützbare Gradienten-cHPLC/(p)CEC-Anlage mit postsplitt Injektion .....	38
3.2.4	Druckunterstützbare splittlose cHPLC/(p)CEC-Anlage .....	39
3.3	Kapillar-Säulen .....	41
3.3.1	Kapillarsäulenkonzepte.....	41
3.3.2	Verwendete Kapillarsäulenkonzepte.....	46
3.3.3	Experimentelle Ergebnisse .....	48
3.3.3.1	Zu den Innenkonussen, den Oberflächen der Kapillarenden und den Verbindungsstücken .....	48

3.3.3.2	Abstimmung der Innendurchmesser der Kapillarsegmente bezüglich Fließgeschwindigkeit und Bandenverbreiterung .....	50
3.3.3.3	Vergleich verschiedener Kapillarsäulendesigns .....	55
3.4	Einfluss der Druckunterstützung auf die Trennleistung der pCEC .....	57
3.5	Auftrennung eines Alkaloid-Extraktes des Mutterkorn Schimmelpilzes ( <i>extractum secalis cornuti</i> ) .....	63
<b>4</b>	<b>NMR-Kopplung .....</b>	<b>67</b>
4.1	Grundlagen der LC-NMR-Kopplung .....	70
4.1.1	Das NMR-Experiment .....	70
4.1.2	NMR-Spektroskopie in fließenden Systemen .....	72
4.1.3	Praktische Aspekte der <i>on-line</i> NMR-Detektion .....	74
4.1.3.1	Elution und Lösungsmittelunterdrückung .....	74
4.1.3.2	Zeitauflösung und Frequenzstabilisierung .....	75
4.1.3.3	Betriebsarten .....	76
4.2	Experimenteller Aufbau für die Kopplung kapillarer Trennmethode mit der NMR .....	78
4.2.1	Durchfluß-NMR-Kapillarprobenköpfe und Spulenanordnung .....	78
4.2.1.1	Solenoidspule .....	79
4.2.1.2	Doppelsattelspule .....	81
4.2.2	Detektionskapillaren .....	82
4.2.3	Universeller Aufbau zur splittlosen Kapillartrennmethode-NMR <i>On-line</i> -Kopplung mit stromloser Detektionszelle .....	87
4.3	Experimentelle Ergebnisse und Applikationen .....	90
4.3.1	Vergleich des alten mit dem neuen Setup .....	90
4.3.1.1	Qualität und Empfindlichkeit der Detektionszellen .....	90
4.3.1.2	Einfluss der applizierbaren Feldstärke auf die chromatographische Trennleistung des jeweiligen Setups .....	92
4.3.1.3	Vergleichende Auftrennung von Benzoesäureestern und <i>on-line</i> NMR-Detektion .....	96
4.3.2	Vergleich der beiden neuen Setups mittels <i>on-line</i> Analytik von Fettsäure-Methylestern .....	100
4.3.3	Vergleich der Bandenverbreiterung der Betriebsarten <i>continuous</i> - vs. <i>stopped-flow</i> .....	113
4.3.4	cHPLC-NMR <i>on-line</i> -Kopplung zur Zuckeranalyse .....	117



4.3.5	cHPLC-NMR <i>on-line</i> -Kopplung zur Trennung und Analyse von Gemischen chiraler Verbindungen.....	121
4.3.6	Naturstoffanalytik mittels cHPLC-NMR <i>on-line</i> -Kopplung am Beispiel eines Extraktes des Käfers <i>palembus ozularis</i> .....	123
4.3.7	<i>On-line</i> Naturstoffanalytik mittels eines NMR-Kapillarprobenkopfes mit integrierter UV-Detektion .....	127
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil</b> .....	<b>132</b>
5.1	Geräte .....	132
5.2	Chemikalien und Materialien .....	133
5.3	Substanzen .....	134
5.4	Methoden .....	135
5.4.1	Herstellung der Kapillarsäulen .....	135
5.4.1.1	Herstellung von Kapillarsäulen mit zwei Fritten .....	135
5.4.1.2	Herstellung von Kapillarsäulen mit einer Fritte.....	138
5.4.1.3	Herstellung der frittenlosen Kapillarsäulen.....	140
5.4.1.4	Herstellung der Kapillarsäulen zur NMR-Kopplung.....	142
5.4.2	Vorbereitung der Eluenten.....	142
5.5	Messbedingungen / Experimentelle Parameter .....	143
5.5.1	Kapillare Trennmethoden .....	143
5.5.2	NMR-Kopplung .....	147
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>166</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>169</b>



## Abkürzungen, Akronyme, Begriffe und Symbole

A	A-Term der Van Deemter-Gleichung
B	Konstante im B-Term der Van Deemter-Gleichung
$B_0$	Magnetfeld
b	Bandbreite des Empfängers
C	Konstante im C-Term der Van Deemter-Gleichung
$c / c_i$	molare Konzentration / molare Konzentration der Ionensorte „i“
$D_m$	Diffusionskoeffizient des Analyten in der mobilen Phase
$D_{sz}$	Diffusionskoeffizient des Analyten in der stationären Phase
$d_c$	Innendurchmesser der Säule
$d_p$	Partikeldurchmesser
E	elektrische Feldstärke
$\Delta E$	Energiedifferenz
$e_0$	Elementarladung
F	Faradaykonstante
$F_{el}$	Beschleunigungskraft des elektrischen Feldes
$F_R$	Stokessche Reibungskraft
f	Füllfaktor
H	theoretische Bödenhöhe
$H_{aust}$	Beiträge der Dispersion durch Austauschvorgänge zur theoretischen Bödenhöhe
$H_{ax}$	Beiträge der axialen Dispersion zur theoretischen Bödenhöhe
$H_{col}$	Beiträge der Trennsäule zur theoretischen Bödenhöhe
$H_{det}$	Beiträge durch Dispersion bei der Detektion zur theoretischen Bödenhöhe
$H_{e,diff}$	Beiträge durch „Eddy-Diffusion“ zur theoretischen Bödenhöhe
$H_{ext}$	externe Beiträge zur theoretischen Bödenhöhe
$H_{ges}$	Gesamtbödenhöhe
$H_{i,diff}$	Beitrag zur theoretischen Bödenhöhe durch intrapartikuläre Diffusion des Analytmoleküls
$H_{inj}$	Beitrag durch Dispersionsvorgänge bei der Injektion zur theoretischen Bödenhöhe
$H_{kin}$	Beitrag der Wechselwirkungskinetik zwischen Probe und stationärer Phase zur theoretischen Bödenhöhe
$H_{l,diff}$	Beitrag durch Molekulardiffusion in Längsrichtung zur theoretischen Bödenhöhe
$H_{t,diff}$	Beitrag zur theoretischen Bödenhöhe durch Stoffaustausch zwischen den Beads durch die Kornzwischenräume hindurch
$H_{th}$	Beitrag zur theoretischen Bödenhöhe durch thermische Effekte
$H_{w,diff}$	Beitrag zur theoretischen Bödenhöhe durch den Widerstand, den das Probenmolekül bei der Diffusion durch die Grenzfläche des Partikel überwinden muß
h	reduzierte Bödenhöhe
oder	Plancksches Wirkungsquantum
I	Ionenstärke oder Stromstärke
oder	Kernspinquantenzahl
k	Boltzmannkonstante
$k'$	Kapazitätsfaktor

$L_{\text{eff}}$	effektive Länge der Trennsäule (Abstand von der Injektionsstelle bis zum Detektor)
$L_{\text{ges}}$	Gesamtlänge der Kapillare
$M_0$	Gleichgewichtsmagnetisierung
$M_y$	transversale Magnetisierung
$N$	Zahl der theoretischen Böden
	oder
$N_x$	Anzahl der Kerne
$n$	Besetzungszahl
$n$	Stoffmenge in mol
$P$	Druckfaktor
$Q$	Qualitätsfaktor
$R$	ideale Gaskonstante
$R_s$	chromatographische Auflösung
$r$	Radius des solvatisierten Teilchens
$T$	absolute Temperatur
$T_1$	Spin-Gitter-Relaxationszeit
$T_2$	Spin-Spin-Relaxationszeit
$t_0$	Totzeit
$t_m$	Migrationszeit eines Ions
$t_R$	Retentionszeit
$U$	elektrische Spannung
$u$	(lineare) Fließgeschwindigkeit
$\bar{u}$	mittlere Fließgeschwindigkeit
$u_{\text{eo}}$	lineare Geschwindigkeit des EOF
$u_{\text{ep}}$	elektrophoretische Geschwindigkeit
$u_P$	Geschwindigkeit des hydrodynamischen Flusses
$V_d$	Detektorvolumen
$V_s$	Detektionsvolumen
$W$	Signalhalbwertsbreite
$x$	Abstand von der Oberfläche
$z / z_i$	Ladungszahl / Ladungszahl der Ionensorte „i“
AB	„acid base deactivated“
ACN	Acetonitril
CE	capillary electrophoresis (Kapillarelektrophorese)
CEC	capillary electrochromatography (Kapillarelektrochromatographie)
CGE	capillary gel electrophoresis (Kapillargelelektrophorese)
cHPLC	capillary HPLC (kapillar-HPLC)
cLC	capillary liquid chromatography (Kapillarflüssigchromatographie)
CW	continuous wave
CZE	capillary zone electrophoresis (Kapillarzonenelektrophorese)
DC	Dünnschichtchromatographie
EC	Elektrochromatographie
EOF	elektroosmotischer Fluss
FE	„fully endcapped“
FEP	Fluorethylenpropylen
FID	Free Induction Decay
FS	fused silica (Quarzglas)
GC	Gaschromatographie

HEPT	height equivalent to a theoretical plate
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
ID	inner diameter (Innendurchmesser)
LC	liquid chromatography (Flüssigchromatographie)
mAU	„milli absorption unit“
min	Minute
MEKC	mizellare elektrokinetische Chromatographie
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernresonanz)
OD	outer diameter (Außendurchmesser)
OT	open tubular (offene/ungepackte Kapillare)
OT-ID	open tubular inner diameter (Innendurchmesser offene Kapillare)
OTEC	open tubular electrochromatography
pCEC	pressurized CEC (druckunterstützte CEC)
PEEK	Polyetheretherketon
PFT	pulsed fourier transformation
pH	potentia hydrogenii
PI	Polyimid
PS/DVB	Polystyrol/Divinylbenzol
PT	packed tube (gepackte Kapillare)
PTFE	Polytetrafluorethylen
PT-ID	packed tube inner diameter (Innendurchmesser gepackte Kapillare)
REM	Raster-Elektronen-Mikroskop
SDS	sodium dodecylsulfate
SFC	supercritical fluid chromatographie (Superkritische Flüssigchromatographie)
Slurry	Aufschlemmung
SS	stainless steel (rostfreier Stahl)
TFA	„trifluoro acetic acid“
UV	ultraviolette Strahlung
%v.v.	Volumenprozent
%w.v.	Gewicht/Volumen-Prozent
$\alpha$	Selektivitätskoeffizient ( Trennfaktor )
$\Delta p$	Druckabfall längs der Säule
$\Delta\phi_{\text{starr}}$	Potentialdifferenz zwischen Oberfläche und äußerer Helmholtzfläche
$\Delta\phi_{\text{diffus}}$	Potentialdifferenz zwischen äußerer Helmholtzfläche und Lösungsinerem
$\delta$	Schichtdicke der diffusen Schicht
$\epsilon_0$	Dielektrizitätskonstante des Vakuums
$\epsilon_r$	relative Dielektrizitätskonstante des Mediums
$\gamma$	Labyrinthfaktor
oder	gyromagnetischen Verhältnis
$\eta$	Viskosität des Mediums
$\kappa$	Wärmeleitfähigkeit
$\lambda$	Empirische Konstante bei $H_{e,\text{diff}}$

$\lambda_m$	Äquivalentleitfähigkeit der mobilen Phase
$\mu_{eo}$	elektroosmotische Mobilität
$\mu_{ep}$	elektrophoretische Mobilität
$\nu$	Frequenz der Strahlung
$\varphi$	elektrisches Potential
$\varphi_{\text{äH}}$	Potential der äußeren Helmholtzfläche
$\varphi_F$	Potential der Festkörperoberfläche
$\varphi_{\text{iH}}$	Potential der inneren Helmholtzfläche
$\varphi_L$	Potential des Lösungsinnen
$\Phi$	Ernst-Winkel
$\varnothing$	Durchmesser
$\sigma$	Oberflächen- bzw. Überschussladungsdichte
$\tau$	Aufenthaltsdauer
$\bar{\tau}$	Lebensdauer
$\zeta$	Zeta-Potential

# 1 Einleitung

In der modernen Analytik ist die Identifizierung und Strukturaufklärung unbekannter Substanzen noch immer eine der großen Herausforderungen. Der Anwendungsbereich von leistungsfähigen Trennmethode wird immer größer und erstreckt sich neben der Chemie auch auf die Medizin, Pharmazie, Biochemie, Biologie und andere Naturwissenschaften. Im Laufe der Zeit eröffneten sich immer wieder neue Bereiche, die Umweltanalytik in den achtziger Jahren, die Hochdurchsatzanalytik der kombinatorischen Chemie, der Bereich der Genomforschung in den neunziger Jahren und die sich im neuen Millennium rasant entwickelnde Protein- und Peptidanalytik im Bereich der Proteomforschung.

Hinsichtlich des hohen Probenaufkommens in diesen Forschungsbereichen sollte die gewählte Analysenmethode automatisierbar sein und der Aufwand für die Probenvorbereitung so gering wie möglich. Die dabei zur Verfügung stehenden Probenmengen sind üblicherweise eher gering. Daher wird von den verwendeten Trennmethode neben einer hohen Reproduzierbarkeit und einer kurzen Analysenzeit auch ein möglichst geringer Probenverbrauch und eine hohe Empfindlichkeit gefordert. Die Miniaturisierung etablierter Trennverfahren wie der Chromatographie und der Elektrophorese ist somit eine logische Konsequenz der sich verändernden Anforderungen an die heutige Analytik. Die Kopplung dieser Trennmethode mit leistungsfähigen und empfindlichen Detektoren ermöglicht es, neben der reinen Trennung auch direkt eine Identifizierung und Quantifizierung der zu untersuchenden Proben vorzunehmen. Routinemäßig werden dabei zur Quantifizierung UV-Detektoren verwendet, während die Kopplung mit Massenspektrometrie (MS) und Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) eine Strukturaufklärung erlaubt. Der immer geringer werdende Probenverbrauch und die sich ständig verbessernde Empfindlichkeit der Detektoren tragen dazu bei, dass in Zukunft die Untersuchung der Inhaltsstoffe und Metaboliten einzelner Zellen oder Zellverbänden ins Auge gefasst werden kann.

## 1.1 Historie

Die Auftrennung und Identifizierung von Inhaltsstoffen war schon von jeher eine der Herausforderungen in den Naturwissenschaften. Bereits die Philosophen des Altertums kannten Trennmethode wie Destillation, Kristallisation, Filtration und Extraktion, welche erst Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts durch zwei weitere Methoden ergänzt wurden, durch Chromatographie und Elektrophorese.

Der russische Botaniker Michael Tswett trennte 1906 Chlorophyllfarbstoffe auf einer mit dem Polysaccharid Inulin gefüllten Glassäule, indem er einen Pflanzenblattextrakt aufgab, mit Petrolether eluierte [1,2] und so die verschiedenen Chlorophyllfarbstoffe voneinander abtrennen konnte. Tswett gab seiner Methode, der chromatographischen Analyse den Namen und nannte das Ergebnis - die getrennten Farbstoffe in der Säule - Chromatogramm. Das ungeheure Potential und die praktische Relevanz seiner Arbeiten wurde jedoch erst 1931 erkannt, als die Methode von Kuhn und Lederer wieder aufgegriffen und weiterentwickelt wurde [3]. Seit den fünfziger Jahren entwickelten sich von dortaus mehrere chromatographische Varianten, wie die der Gas- (GC) [4,5] und Dünnschichtchromatographie (DC) [6], sowie später die Superkritische (*supercritical fluid chromatography*, SFC) [7] und die Hochleistungsflüssigchromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) [8,9,10].

Die Elektrophorese wurde 1930 von Tiselius zur Analyse von Proteinen entwickelt [11]. Die, (durch Anlegen einer Spannung) über ein mit Elektrolyt gefülltes U-Rohr, separierten Banden wurden durch abfotografieren der Apparatur im UV-Licht aufgezeichnet. Als nachteilig stellte sich schon damals die, durch Joulesche Wärmeentwicklung verursachte, thermische Konvektion heraus, die teilweise zur Rückvermischung der Banden im relativ niederviskosen Medium führte. In den darauffolgenden Jahren wurden elektrophoretische Trennungen überwiegend in konvektionsstabilisierten Medien wie Papier oder Gelen durchgeführt. Aufgrund ihrer Leistungsfähigkeit und Anwenderfreundlichkeit haben sich daraus die Agarose- und Polyacrylamid-Gelelektrophorese [12,13] zu Routinemethoden entwickelt. Ein anderer Ansatz die thermische Konvektion zu minimieren, ist eine optimale Wärmeableitung aus der Matrix. Dieses Prinzip wird seit Anfang der achtziger Jahre erfolgreich als Kapillarelektrophorese (*capillary electrophoresis*, CE) angewandt [14,15,16,17], bei welcher das äußerst vorteilhafte Oberfläche/Volumen-Verhältnis die Wärmeableitung begünstigt.



Die Elektrochromatographie, die Kombination von Chromatographie und Elektrophorese, ist die jüngste Entwicklung der Trennmethode. Schon 1974 haben Pretorius et al. [18] den Transport des Eluenten in gepackten Säulen durch den elektroosmotischen Fluss (*electroosmotic flow*, EOF) beschrieben. Jedoch konnten, aufgrund der damals noch nicht zur Verfügung stehenden Injektoren und Detektoren, nicht die notwendigen experimentellen Anordnungen aufgebaut werden, um eine wirkliche Trennung durchzuführen. Nachdem erst 1981 die instrumentellen Probleme von Jorgenson und Lukacs [15,16] erfolgreich gelöst werden konnten, waren es vor allem die theoretischen und praktischen Arbeiten von Knox und Grant [19,20], die das allgemeine wissenschaftliche Interesse an dieser neuen Methode weckten und den Weg für die Kapillarelektrochromatographie (*capillary electrochromatography*, CEC) ebneten.

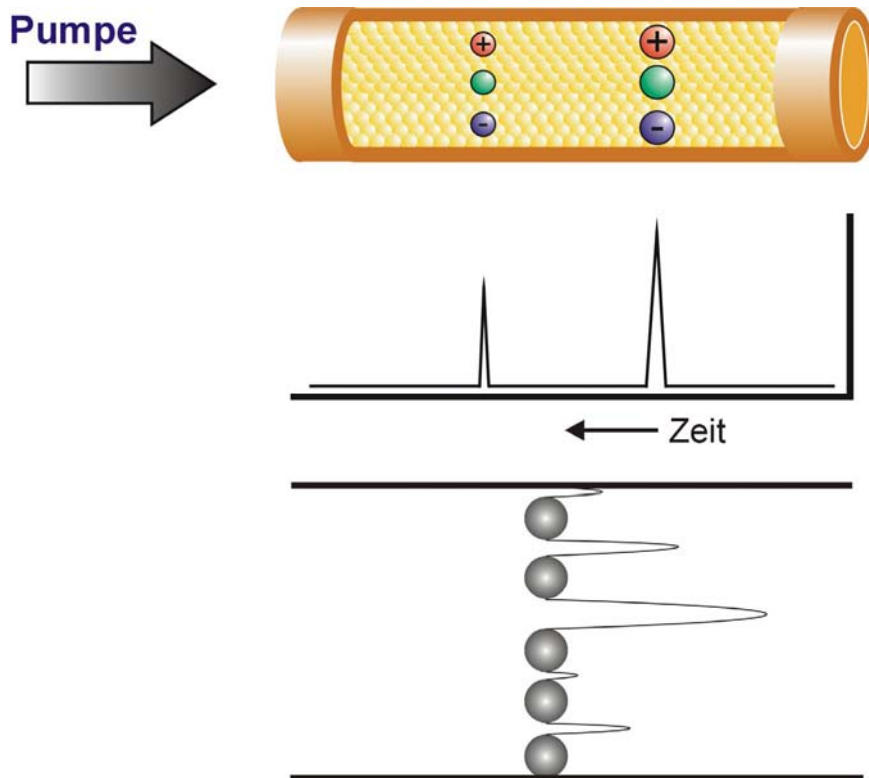
Apparativ gesehen wurde die Detektion relativ spät in die Trennmethode und somit noch später in die miniaturisierten Trennverfahren implementiert. Während sich Tswett noch ausschließlich auf die sensorischen Fähigkeiten seiner Augen verlassen musste, konnte Tiselius ein Viertel Jahrhundert später bereits UV-aktive Substanzen untersuchen. Die heute gebräuchlichen *on-line* Detektionssysteme, wie z.B. UV/Vis-, Brechungsindex- oder auch Fluoreszenz-Detektoren, liefern nur unzureichende strukturelle Informationen über die aufgetrennten Substanzen. Deshalb findet die eigentliche Strukturaufklärung häufig immer noch *off-line* statt. Für die direkte *on-line* Strukturaufklärung unbekannter Substanzen wird in den analytischen Untersuchungslaboratorien hauptsächlich die *on-line*-Kopplung der Trennmethode (vornehmlich der HPLC) mit der Massenspektrometrie (MS) und der Kernresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance* NMR) eingesetzt. Während das Massenspektrometer erfolgreich und in zunehmenden Maße auch routinemäßig zur *on-line*-Kopplung mit kapillaren Trennmethode eingesetzt wird, steckt die Entwicklung der *on-line*-Kopplung kapillarer Trennmethode mit dem NMR-Spektrometer immernoch in den Kinderschuhen.

## 1.2 Kapillartrennmethoden

### 1.2.1 Kapillar-Hochleistungsflüssigchromatographie

[21,22,23,24,25,26,27,28,29,30]

Während Gemische aus niedermolekularen, leichtflüchtigen Verbindungen mit Hilfe der Gaschromatographie aufgetrennt werden, wird die konventionelle Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) vor allem bei nichtflüchtigen Verbindungen, insbesondere zur Trennung von Biopolymeren eingesetzt. Das Einsatzgebiet ist sehr weitreichend und erstreckt sich von der Produktaufreinigung über die Stoffanreicherung bis hin zur Auftrennung komplexer Gemische. Die HPLC verfügt, aufgrund der Vielzahl der ihr zur Verfügung stehenden stationären Phasen, über eine hohe Selektivität. Überwiegend wird heutzutage jedoch die sogenannte *reversed-phase* (Umkehrphasen) Chromatographie eingesetzt, basierend auf sphärischen porösen Kieselgelpartikeln mit einer üblichen Korngröße zwischen 3-10 µm und einer durch kovalent gebundene C18-Alkylketten hydrophobisierten Oberfläche. Die Auftrennung der einzelnen Komponenten eines Gemisches gelingt aufgrund der verschieden ausgeprägten Wechselwirkungen der Analyten mit der stationären Phase, was zu unterschiedlichen Verteilungsgleichgewichten dieser Analyten zwischen mobiler und stationärer Phase führt. In der konventionellen HPLC werden Trennsäulen von 12-25 cm und 2-5 mm eingesetzt, während in der Kapillar-HPLC (*capillary HPLC*, cHPLC) üblicherweise Quarzglaskapillaren mit einem Innendurchmesser von 20-500 µm verwendet werden. Die Trennleistung konventioneller bzw. Kapillar-HPLC Säulen liegt bei maximal 30.000 Böden pro Säule und ist damit im Vergleich zur Kapillarelektrophorese oder der Kapillargaschromatographie eher gering. Dieser Nachteil kann allerdings durch die große Anzahl an stationären Phasen mit unterschiedlichsten Selektivitäten kompensiert werden, da sie die erreichbare Auflösung einer Trennung maßgeblich bestimmt. Ein weiterer Pluspunkt für die HPLC ist zusätzlich die große Auswahl an einsetzbaren mobilen Phasen und die Möglichkeit der Gradientenelution. Durch die richtige Wahl des Eluenten, speziell mittels Gradientenelution, lässt sich die Selektivität weiter optimieren. Die mit der HPLC erreichbare chromatographische Auflösung ist dadurch mit der der Kapillarelektrophorese durchaus vergleichbar. Aufgrund dessen konnte sich die HPLC trotz ihrer relativ geringen Trennleistung zur meist angewandten Trennmethode entwickeln.



**Abbildung 1-1:** Schematische Darstellung des Trennprinzips der Kapillar-HPLC.

Die Miniaturisierung der HPLC in Form der cHPLC ist vor allem aufgrund der damit verbundenen Reduktion des Eluenten und Probenverbrauchs und der deutlichen Verringerung der für eine Säule benötigten (oftmals sehr teuren) Packungsmaterialien attraktiv. Aus ökologischen und ökonomischen Gründen ist die Miniaturisierung also durchaus wünschenswert, was durch die Vielzahl der Veröffentlichungen seit den 80er Jahren belegt wird. Trotz des inzwischen (auch für die cHPLC) kommerziell erhältlichen vollautomatisierten Instrumentariums, ist sie aufgrund ihrer noch mangelnden Robustheit in der industriellen Routineanalytik noch lange nicht angekommen. Nur in Teilbereichen, wie z.B. der *on-line*-Kopplung mit der Elektrosprayionisierungs-Massenspektrometrie, verdrängt sie zunehmend die konventionelle HPLC.

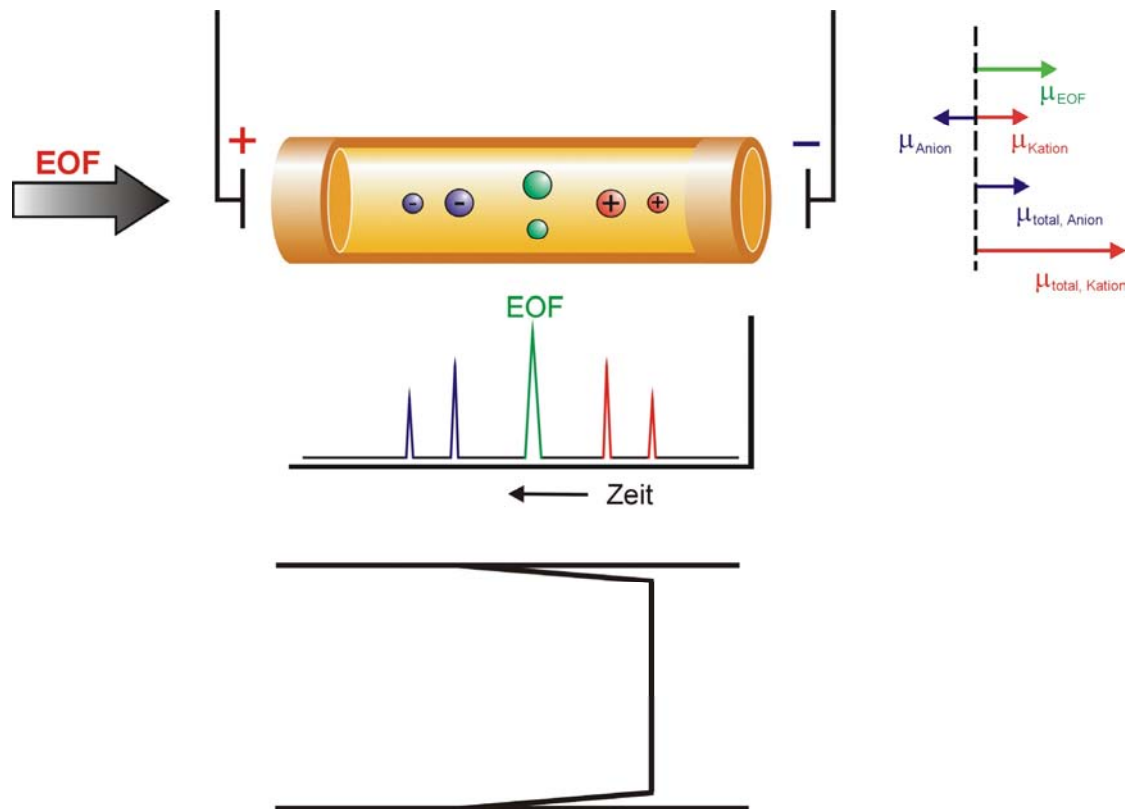
### 1.2.2 Kapillarelektrophorese [17,31]

Durch die Entwicklung der Kapillarelektrophorese (CE) gelang es, alle aus der konventionellen Elektrophorese bekannten Trennmechanismen auf Kapillaren zu übertragen. Damit erhielt man eine Methode, die eine *on-column* Detektion mittels

UV/VIS- oder Fluoreszenzdetektoren zulässt, automatisierbar ist und deren Trennleistungen denen der Kapillar-Gaschromatographie entsprechen. Das Spektrum der möglichen Anwendungen erstreckt sich dabei von einfachen Ionen über Biopolymere, wie Peptide und Proteine, Oligonukleotide und Polynukleotide, bis hin zu Zellorganellen, Bakterien und Viren.

Bei dieser kapillaren Trennmethode werden die elektrokinetischen Phänomene der Elektrophorese und bisweilen auch der Elektroosmose zum Stofftransport und zur Stofftrennung ausgenutzt. Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung von in flüssiger Phase gelösten oder kolloidal verteilten, bzw. dispergierten, geladenen Teilchen im elektrischen Feld. Elektroosmose in Elektrolyten ist auf die Ausbildung der elektrolytischen Doppelschicht [32] auf geladenen Oberflächen durch Adsorption und Ansammlung von Gegenionen aus der Elektrolytlösung zurückzuführen. Legt man längs der Kapillaroberfläche eine elektrische Spannung an, so migrieren die weniger fest gebundenen Überschussionen in der Doppelschicht samt des sie umgebenden Eluenten entlang des elektrischen Feldes zur Gegenelektrode. Die bei der Migration auftretenden Scherkräfte bewirken, dass sich die Flüssigkeitssäule in der Kapillare (bzw. in der Packung; siehe Kapitel 3.1.2) als Ganzes in Bewegung setzt. Dadurch entsteht der sogenannte elektroosmotische Fluss (EOF) mit dem auch neutrale gelöste Moleküle, sowie Lösungsmittelmoleküle transportiert werden können. Aufgrund der, durch den Ionenstrom entstehenden, Jouleschen Wärme ist man in der Anwendung auf offene Kapillaren (bzw. Kapillar-Trennsäulen; siehe Kapitel 3.1.3.3) mit maximal 250 µm Innendurchmesser beschränkt.

Der Sammelbegriff Kapillarelektrophorese (CE) fasst die elektrokinetischen Trennverfahren Kapillarzonenelektrophorese (CZE) [15,33], Kapillargelelektrophorese (CGE) [34,35] und mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC) [36,37] zusammen. Die Kapillarzonenelektrophorese nutzt den elektroosmotischen Fluss und die Elektrophorese zum Transport. Getrennt werden können in der CZE allerdings nur Ionen, die aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeiten verschiedene Migrationsgeschwindigkeiten besitzen, welche vom EOF überlagert werden. Mit der Kapillargelelektrophorese lassen sich geladene Makromoleküle durch den sogenannten Siebeffekt trennen. Die Analyten werden je nach Molekülgröße durch die Polymergelmatrix in ihrer Migration unterschiedlich stark behindert. Die Elektroosmose wird bei der CGE vollständig unterdrückt. In der mizellaren elektrokinetischen Chromatographie wird der mobilen Phase ein



**Abbildung 1-2:** Schematische Darstellung des Trennprinzips der Kapillarenzonelektrophorese.

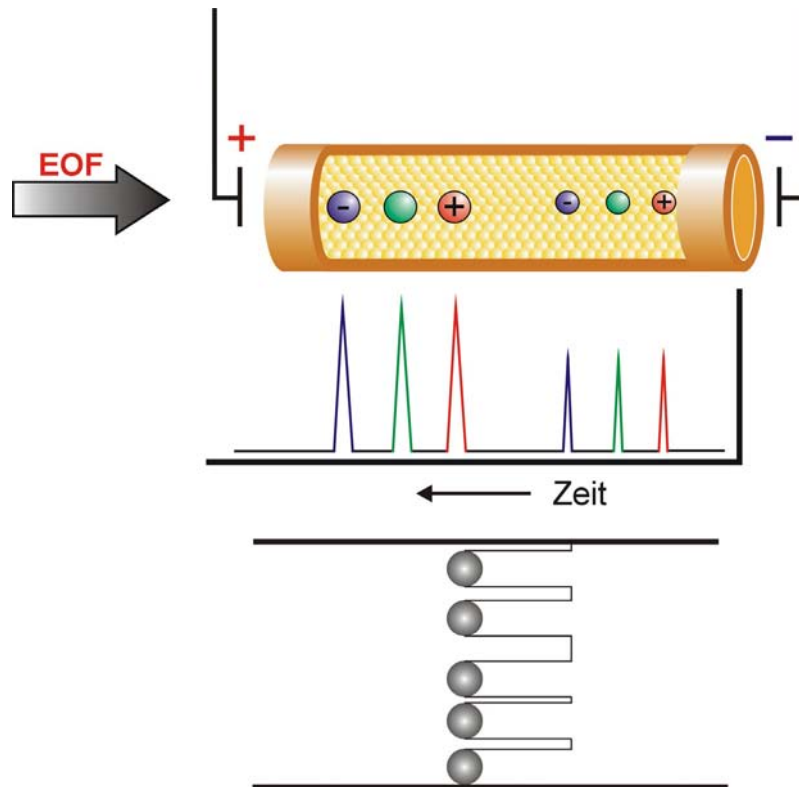
geladenes Detergens (z.B. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) beigemischt. Oberhalb einer bestimmten SDS-Konzentration (kritische Mizellenbildungskonzentration) aggregieren die SDS-Moleküle zu kugelförmigen, an der Oberfläche negativ geladenen Mizellen. Diese wandern aufgrund ihrer Ladung im elektrischen Feld in Richtung Anode. Diese Wanderung wird aber im Allgemeinen vom entgegengesetzt gerichteten EOF überlagert und kompensiert. Neutrale Analyte halten sich bei ihrer Wanderung mit dem EOF aufgrund ihrer unterschiedlichen Hydrophobizität unterschiedlich lange im Innern der hydrophoben Mizellen auf. Sie werden also mit Hilfe dieser pseudostationären mizellaren Phase unterschiedlich stark retardiert und somit getrennt.

Die Kapillarelektrophorese bietet die Möglichkeit, äußerst geringe Probenvolumina (unterer nI-Bereich) mit einer äußerst hohen Trenneffizienz zu untersuchen. Aufgrund des zur *reversed-phase* HPLC orthogonalen Trennprozesses ergänzt sie diese, da dort polare geladene Substanzen aufgrund ihrer geringen Wechselwirkung mit der stationären Phase nur schlecht aufgetrennt werden.

### 1.2.3 Kapillarelektrochromatographie [64]

Die Elektrochromatographie [EC] ist die jüngste Entwicklung der miniaturisierten Trennmethode[n] [19,20,38,39,40,41,42,43,44,45,46,]. Sie bietet die Möglichkeit der Kombination des chromatographischen Trennprinzips der hydrodynamischen Trennverfahren mit dem elektrophoretischen Trennprinzip der elektrokinetischen Trennverfahren, während der Transport der mobilen Phase durch den EOF gewährleistet wird. Neutrale Analyten werden nur chromatographisch getrennt, während geladene zusätzlich elektrophoretisch aufgetrennt werden. Das durch den EOF erzeugte stempelförmige Strömungsprofil ermöglicht wesentlich höhere Trenneffizienzen als in der HPLC - im Idealfall die der CE.

Die CEC lässt sich entweder in offenen oder in mit feinkörnigem Packungsmaterial gefüllten Kapillaren (analog zur cHPLC) durchführen. In der Elektrochromatographie mit offenen Kapillaren, der „open tubular electrochromatography“ (OTEC) [31,47], werden an der Innenoberfläche chemisch modifizierte Quarzkapillaren verwendet. Um hohe Effizienzen zu erreichen, müssen sie einen Innendurchmesser unter 30  $\mu\text{m}$  haben. Der kleine Kapillarinndurchmesser führt allerdings zu Detektionsproblemen. Eine Möglichkeit, die Probenaufgabekapazität und den Innendurchmesser zu vergrößern, ist die Beschichtung der Kapillarinnenoberfläche. In der Elektrochromatographie mit gepackten Kapillaren, der Kapillarelektrochromatographie (CEC), werden im Allgemeinen analog zur cHPLC, feinkörnige unpolare Umkehrphasen als Packungsmaterial eingesetzt. Durch die Packung wird die Probenaufgabekapazität stark vergrößert. Außerdem können Kapillaren bis zu 250  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser verwendet werden, wodurch Detektionsprobleme deutlich vermindert werden können. Die Kombination der hydrodynamischen (cHPLC) mit der elektrokinetischen (CEC) Kapillartrennmethode ist die druckunterstützte Elektrochromatographie (pCEC) [40,48]. Hier tragen sowohl Druck, wie auch Elektroosmose und Elektrophorese zum Stofftransport bei.



**Abbildung 1-3:** Schematische Darstellung des Trennprinzips der Kapillarelektrochromatographie.

### 1.3 *On-line* Detektion und Identifizierung in Kapillaren

Die *on-line* Kopplungsverfahren einer Trenntechnik mit einer aussagekräftigen spektroskopischen bzw. spektrometrischen Identifizierungsmethode haben neben dem hohen Informationsgehalt noch andere Vorteile. Zum einen sind diese Verfahren weniger zeitaufwendig als Trennungen mit nachfolgender *off-line* Strukturaufklärung, da zusätzliche Probenaufbereitung und Fraktionierung wegfallen. Zum anderen werden durch das geschlossene System Fehlerquellen durch Einschleppen von Verunreinigungen oder durch Probenzersetzung aufgrund von Licht- und Lufteinwirkung weitgehend vermieden. Das Hauptproblem bei der Direktkopplung ist meist die Unverträglichkeit der Detektionsmethode mit den für die erfolgreiche Auftrennung notwendigen Substanzen.

Die Methoden zur Detektion, Identifizierung und Strukturaufklärung unbekannter Substanzen haben sich in den letzten 50 Jahren rasant entwickelt. Die UV/Vis-Spektroskopie ist aufgrund der vielseitigen Anwendbarkeit und der geringen Kosten die bei Kapillar-HPLC und Kapillarelektrophorese am häufigsten verwandte Detektionsmethode. Höhere Empfindlichkeiten können z.B. mittels Fluoreszenzdetektion erhalten werden, diese Methode ist jedoch in ihrer Anwendung auf fluoreszierende Moleküle beschränkt [49]. Häufig ist daher eine Derivatisierung der Analyten mit einem Fluoreszenzmarker notwendig. Auch mit Chemolumineszenz [50] und elektrochemischen Detektoren [51] können einzelne Substanzen sehr selektiv und empfindlich nachgewiesen werden. Für die direkte *on-line* Strukturaufklärung unbekannter Substanzen stehen heute vor allem die Massenspektrometrie (MS) und die Kernresonanzspektroskopie (NMR) zur Verfügung. Obwohl die NMR-Spektroskopie aufgrund der relativ einfachen Interpretierbarkeit ihrer Spektren und der hohen Strukturinformation ihrer Daten eines der wichtigsten Hilfsmittel der modernen Analytik ist, konnte die *on-line*-Kopplung von Trennung und NMR-Detektion aufgrund der intrinsisch geringen Empfindlichkeit bislang nur für konventionelle analytische HPLC-Säulen routinemäßig etabliert werden. Im Gegensatz dazu, hat sich die Elektrosprayionisierungs-Massenspektrometrie aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit und der Übereinstimmung der optimalen Flussraten von Trenn- und Detektionssystem zu einer weiteren Standarddetektionsmethode für Kapillar-HPLC, Kapillarelektrophorese und Kapillarelektrochromatographie entwickelt.



## 2 Problemstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Weiterentwicklung und Anwendung miniaturisierter Trennverfahren, sowie ihrer *on-line*-Kopplung mit der NMR-Spektroskopie zur Strukturaufklärung von Naturstoffen.

Kapillare Trennmethoden sind sehr leistungsstarke, ökonomisch und ökologisch vorteilhafte miniaturisierte Analysemethoden. Speziell die Elektrochromatographie vereint als Hybrid von cHPLC und Kapillarelektrophorese die Vorteile beider Trennverfahren. Aufgrund praktischer Probleme mit der Säulenteknologie, den Apparaturen und der experimentellen Durchführung ist die Elektrochromatographie bislang größtenteils immer noch auf isokratische Trennungen von Testgemischen beschränkt. Gradienten Trennungen oder druckunterstützter EOF sind immer noch die Ausnahme und werden bislang nur durch gesplittete Pumpsysteme bewerkstelligt. Dies stellt jedoch gerade bei der *on-line*-Kopplung mit der NMR-Spektroskopie, wo der Einsatz von sehr teuren volldeuterierten Lösungsmitteln einen enormen Vorteil brächte, eine große Einschränkung dar.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher zunächst die Kapillarsäulen- und das Geräte-Setup weiterentwickelt werden, so dass mit robusten langlebigen Säulen reproduzierbare Trennungen durchgeführt werden können. Die optimale Abstimmung und die Qualität dieser segmentierten Kapillarsäulen sollte überprüft werden. Darüber hinaus sollte der Anwendungsbereich der kapillaren Trennmethoden durch ungesplittete druckunterstützbare (Gradienten)-Elution erweitert werden. Hierzu sollte zunächst eine Apparatur aufgebaut und mit den nach neuem Konzept hergestellten Kapillarsäulen anhand von Beispieltrennungen getestet werden. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Variante der druckunterstützten Kapillarelektrochromatographie (pCEC) gelegt. Sie ermöglicht nicht nur eine einfache Stabilisierung des ansonsten oft anfälligen Trennsystems, sondern erlaubt aufgrund der Kombination des elektroosmotischen und des druckgetriebenen Flusses wesentlich kürzere Analysenzeiten – bei relativ hoher Trennleistung. Die Trennleistung der pCEC liegt jedoch zwischen derjenigen der reinen Kapillarelektrochromatographie und der Kapillar-HPLC, da sich das stempelförmige elektrokinetische Flussprofil der Elektrochromatographie mit dem parabolischen hydrodynamischen Flussprofil der HPLC überlagert. Daher sollte zunächst untersucht werden, welchen Einfluss der zusätzliche Druck auf die Trennleistung hat, um die geeigneten Parameter für die Anwendung zu ermitteln.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Kopplung von Kapillar-Hochleistungsflüssigchromatographie (cHPLC), Kapillarelektrochromatographie (CEC) und druckunterstützter Kapillarelektrochromatographie (pCEC) mit der Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie und deren Anwendung zur Strukturaufklärung von Naturstoffen weiterentwickelt werden. Ziel dieses Teils der Arbeit war, durch Modifizierung eines Mikro-HPLC-NMR-Systems die splittlose Kopplung aller wichtigen kapillaren Trennmethoden (insbesondere der pCEC) mit der NMR-Spektroskopie ermöglichen. Durch die Optimierung der in den Mikroprobenkopf (Prototyp mit 2mm Spule, alternativ mit integriertem UV-Detektor) zu implementierenden segmentierten Detektionskapillare sollte die Homogenität des Magnetfeldes, der Füllfaktor und damit die spektrale Auflösung und die Empfindlichkeit deutlich verbessert werden. Die verschiedenen Entwicklungsstufen sollten dahingehend miteinander verglichen werden, um so die Leistungsfähigkeit des neuen Setups aufzeigen zu können. Die einfache Handhabung des neuen Systems und seine Leistungsfähigkeit sollten anhand der Auftrennung, Identifizierung und Strukturaufklärung verschiedener Naturstoffe und Pharmazeutika demonstriert werden. Die Möglichkeit auch zweidimensionale NMR-Experimente zur Strukturaufklärung durchführen zu können stand dabei im Vordergrund.

### 3 Kapillartrenntechniken und Hardwareentwicklung

Die Miniaturisierung von Trennsystemen speziell im Hinblick auf den Säulendurchmesser wird bereits seit mehr als 35 Jahren vorangetrieben [52,53,54,55,56]. Dieser stetig anhaltende Trend, der in den letzten Jahren vor allem durch apparative Neuentwicklungen und letzten Endes auch durch die Kapillarelektrochromatographie zusätzlichen Schub erhalten hat, wird hauptsächlich durch die zunehmende Notwendigkeit auch kleinste Mengen komplexer biochemisch bzw. physiologisch relevanter Proben untersuchen zu können, vorangetrieben. Die Verringerung des Trennsäulendurchmessers, von der analytischen Dimension über die *Narrow-bore-LC* und die Mikro-LC bis hin zur Kapillar-LC oder gar zur Nano-LC mit Flussraten im Nanoliter/Minute- Bereich [siehe Tabelle 3-1], bringt diesbezüglich nicht von der Hand zu weisende Vorteile:

- Eine verbesserte Massensensitivität (in Verbindung mit massensensitiven Detektoren) durch verringerte chromatographische Verdünnung.
- Die Möglichkeit, bei konstanter mittlerer Flussrate Partikel mit kleinerem Durchmesser als Packungsmaterial zu verwenden, führt aufgrund des verbesserten Massentransfers im stagnanten Anteil der mobilen Phase zur Erhöhung der Trenneffizienzen.
- Die Erreichbarkeit hoher Trenneffizienzen pro Zeiteinheit und Druckabfall führt zu einer niedrigen Trennimpedanz [57].
- Ein deutlich verringerter Verbrauch von stationärer und mobiler Phase erlaubt den Einsatz exotischer und teurer Phasen (z.B. maßgeschneiderte chirale stationäre Phasen oder volldeuterierte mobile Phasen bei der *on-line* NMR-Kopplung).
- Die optimale Übereinstimmung bezüglich der erforderlichen Flussraten zur *on-line*-Kopplung mit dem Massenspektrometer mittels Nano- bzw. Mikroelektrospray Interface.
- Die Möglichkeit den Transport von Molekülen durch eine Trennsäule zusätzlich bzw. ausschließlich mittels hoher elektrischer Felder elektroosmotisch und/oder elektrophoretisch zu unterstützen bzw. vollständig zu realisieren.

Dieser letzte Aspekt war der Anstoß eines in den letzten 15 Jahren stetig zunehmenden Interesses an der Kapillarelektrochromatographie, welche die Retentionsmechanismen und Selektivitäten der HPLC zusammen mit dem Miniaturisierungspotential und dem zur Chromatographie orthogonalen Trennmechanismus der Kapillarelektrophorese in sich vereint [58,59,60,61,62,63,64].

<b>Regime</b>	<b>Säulentyp</b>	<b>Säulendurchmesser, Querschnittsfläche</b>	<b>Flussraten</b>	<b>Typische Injektionsmengen</b>
<b>Analytische LC</b>	<i>normal-bore</i> Säule	5.0-3.9 mm, 20-12 mm <sup>2</sup>	5-1.5 ml/min	2-10 mg
<b>Narrow-bore LC</b>	<i>narrow-bore</i> Säule	3.9-2.1 mm, 12-3.5 mm <sup>2</sup>	1.5-0.2 ml/min	0.5-2 mg
<b>Mikro LC</b>	<i>micro-bore</i> Säule	2.1-0.5 mm, 3.5-0.2 mm <sup>2</sup>	300-10 µl/min	50-500 µg
<b>Kapillar LC</b>	Gepackte Kapillare	0.5-0.15 mm, 0.2-0.02 mm <sup>2</sup>	15-1 µl/min	1-50 µg
<b>Kapillar LC bzw. Nano LC</b>	Gepackte Kapillare	< 0.15 mm, < 0.02 mm <sup>2</sup>	< 1 µl/min	< 1 µg

**Tabelle 3-1:** Nomenklaturvorschlag für die verschiedenen Regimes in der flüssigchromatographischen Praxis [65,66,67,68].

## 3.1 Theoretische Grundlagen

### 3.1.1 Elektrophorese

Das Phänomen Elektrophorese beschreibt die Wanderung von in flüssiger Phase gelösten oder kolloidal verteilten bzw. dispergierten geladenen Teilchen im elektrischen Feld.

Ein sich in Lösung befindliches Ion wird - aufgrund des durch die angelegte Spannung vorhandenen elektrischen Feldes - mit der Kraft ( $F_{el}$ ) in Richtung seiner Gegenelektrode beschleunigt (Gl. 3-1). Durch die seiner Bewegung entgegengerichtete, mit der Migrationsgeschwindigkeit zunehmende, Stokessche Reibungskraft ( $F_R$ , (Gl. 3-2)) kommt es zu einem Kräftegleichgewicht (Gl. 3-3). Danach bewegt sich das Ion mit konstanter Geschwindigkeit ( $u_{ep}$ ) auf die Gegenelektrode zu.

$$F_{el} = z \cdot e_0 \cdot E \quad (\text{Gl. 3-1})$$

$$F_R = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot u_{ep} \quad (\text{Gl. 3-2})$$

$$z \cdot e_0 \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot u_{ep} \quad (\text{Gl. 3-3})$$

$$u_{ep} = \frac{z \cdot e_0 \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (\text{Gl. 3-4})$$

$z$	<i>Ladungszahl</i>	$\eta$	<i>Viskosität des umgebenden Mediums</i>
$e_0$	<i>Elementarladung</i>	$r$	<i>Radius des solvatisierten Teilchens</i>
$E$	<i>Feldstärke</i>	$u_{ep}$	<i>elektrophoretische Geschwindigkeit</i>

Die elektrophoretische Geschwindigkeit ist also die für jede Ionensorte charakteristische Transportgeschwindigkeit. Sie wird im Allgemeinen als die vom elektrischen Feld unabhängige elektrophoretische Mobilität ( $\mu_{ep}$ ) angegeben:

$$\mu_{ep} = \frac{z \cdot e_0}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} = \frac{u_{ep}}{E} = \frac{L_{eff} / t_m}{U / L_{ges}} = \frac{L_{eff} \cdot L_{ges}}{t_m \cdot U} \quad (\text{Gl. 3-5})$$

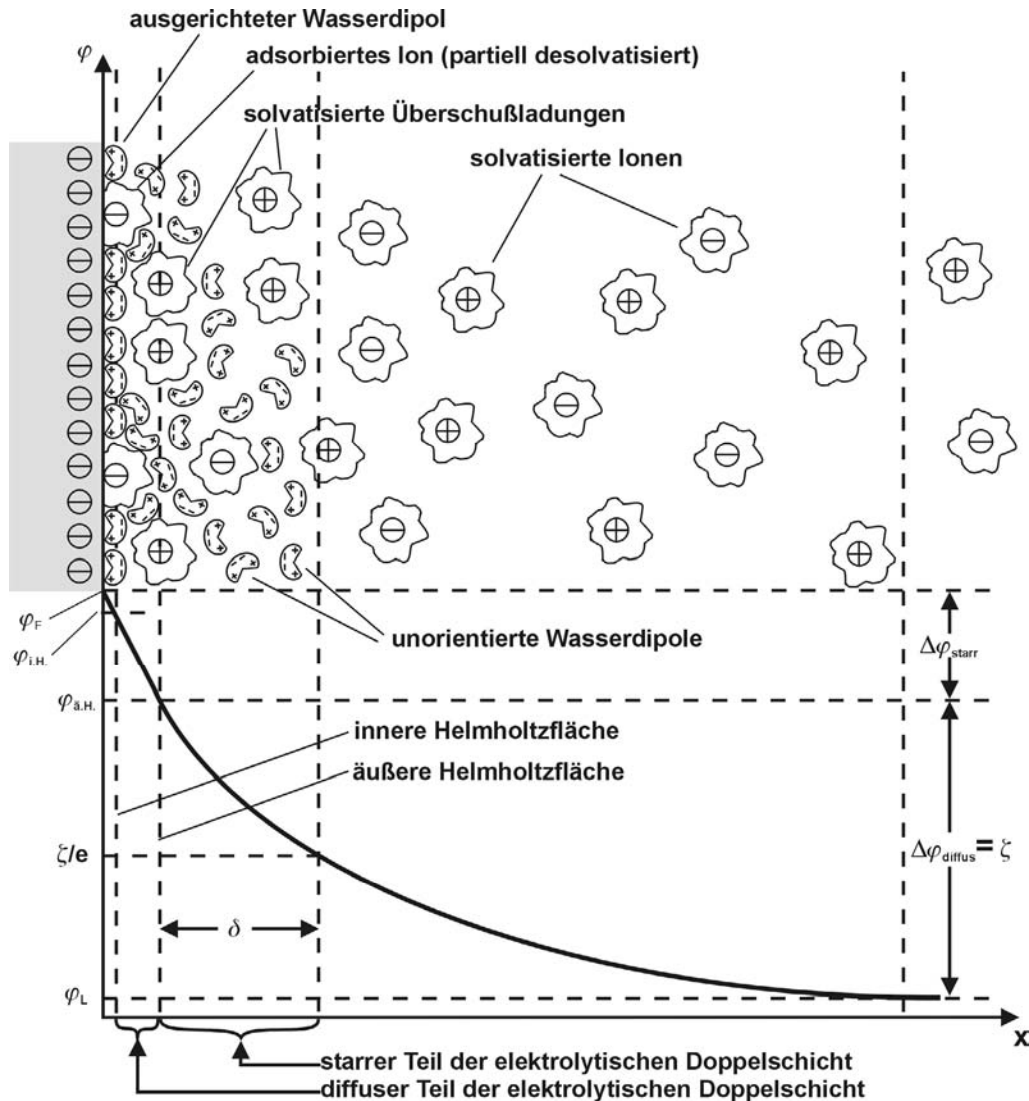
$L_{eff}$	<i>Abstand (Injektor ↔ Detektor)</i>	$t_m$	<i>Migrationszeit des Ions</i>
$L_{ges}$	<i>Gesamtlänge der Kapillare</i>	$U$	<i>elektrische Spannung</i>

Mit (Gl. 3-5) lässt sich  $\mu_{ep}$  anhand der gut zugänglichen Parameter  $L_{eff}$ ,  $L_{ges}$ ,  $U$  und  $t_m$  experimentell einfach bestimmen.

### 3.1.1.1 Elektrolytische Doppelschicht

Die elektrolytische Doppelschicht bildet sich immer auf der Oberfläche eines Festkörpers aus, wenn dieser in eine Elektrolytlösung getaucht wird. Bei Quarzglas oder Kieselgelpartikeln sitzen negative Ladungen an der Grenzfläche zur Flüssigkeit. Die  $\text{SiO}_2$ -Modifikationen Quarz und Kieselgel besitzen diese negativen Oberflächenladungen in Form von teilweise dissoziierten Silanolgruppen ( $-\text{SiO}^-$ ). Diese Oberflächenladungen werden durch ein Äquivalent von Überschussladungen der Flüssigkeit (Elektrolyt) ausgeglichen. Die Zone, in der sich die Überschussladungen befinden, ist sehr schmal und kann in zwei Schichten unterteilt werden, den starren (Stern-Layer) und den diffusen Teil (Gouy-Chapman-Layer) der elektrolytischen Doppelschicht.

Die starre Schicht befindet sich direkt an der Grenzfläche zwischen der inneren und der äußeren Helmholtz-Fläche. Die innere Helmholtz-Fläche ist definiert als die Ebene durch die Ladungsschwerpunkte der (durch Van-der-Waals- oder Coulomb-Wechselwirkungen) an der Grenzfläche adsorbierten Ionen, Lösungsmitteldipole sowie neutralen Moleküle.



**Abbildung 3-1:** Potentialverlauf durch die elektrolytische Doppelschicht ( $\varphi$  elektrisches Potential,  $\zeta$  Zeta-Potential,  $x$  Abstand von der Oberfläche).

Besonders Anionen neigen zu solchen unspezifischen Adsorptionen (schwache Solvathülle, leicht polarisierbar) und können deshalb auch auf negativ geladenen Oberflächen adsorbiert werden. Die Grenze zwischen der starren und der diffusen Schicht, die äußere Helmholtz-Fläche, ist als die Ebene durch die Mittelpunkte der solvatisierten Überschussionen definiert. Ihr Abstand von der Grenzfläche entspricht somit dem Radius der solvatisierten Gegenionen und liegt in der Größenordnung von 0,5-30 nm. Der Potentialverlauf in der starren Schicht ist linear. Die Potentialdifferenz zwischen äußerer Helmholtz-Fläche und Lösungsinnerem wird als Zeta-Potential ( $\zeta$ ) bezeichnet und hat einen exponentiellen Verlauf. Die diffuse Schicht befindet sich zwischen der äußeren Helmholtz-Fläche und dem Abstand, bei dem das  $\zeta$ -Potential auf  $1/e$  seines Betrages abgesunken ist. Ihre Dicke wird mit  $\delta$  bezeichnet.

Für univalente Elektrolyte kann man die Schichtdicke ( $\delta$ ) der diffusen Schicht mit Hilfe der Debye-Hückel Gleichung berechnen:

$$\delta = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot R \cdot T}{2 \cdot c \cdot F^2}} \quad (\text{Gl. 3-6})$$

$\varepsilon_0$	Dielektrizitätskonstante des Vakuums	$T$	absolute Temperatur
$\varepsilon_r$	relative Dielektrizitätskonstante des Mediums	$R$	Gaskonstante
$c$	molare Konzentration des Elektrolyten	$F$	Faradaykonstante

Das  $\zeta$ -Potential und die Schichtdicke stehen in folgender Beziehung zueinander [69]:

$$\zeta = \frac{\delta \cdot \sigma}{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r} \quad (\text{Gl. 3-6}) \text{ eingesetzt ergibt: } \zeta = \sqrt{\frac{R \cdot T}{2 \cdot c \cdot F^2 \cdot \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r}}$$

(Gl. 3-7) (Gl. 3-8)

wobei  $\sigma$  die Überschussladungsdichte in der Gouy-Chapman-Schicht ist. Das  $\zeta$ -Potential und damit auch die Schichtdicke hängen somit von der Natur der Festkörperoberfläche und der Beschaffenheit des Lösungsmittels ab. Polare (z.B.  $\text{SiO}_2$ ) sowie unpolare Oberflächen (z.B. Graphit, Teflon [70]) weisen in Kontakt mit polaren Lösungsmitteln ein  $\zeta$ -Potential zwischen 10 und 100 mV auf. Für univalente Elektrolyte wurden für verschiedene Konzentrationen folgende  $\delta$ -Werte berechnet [38]:

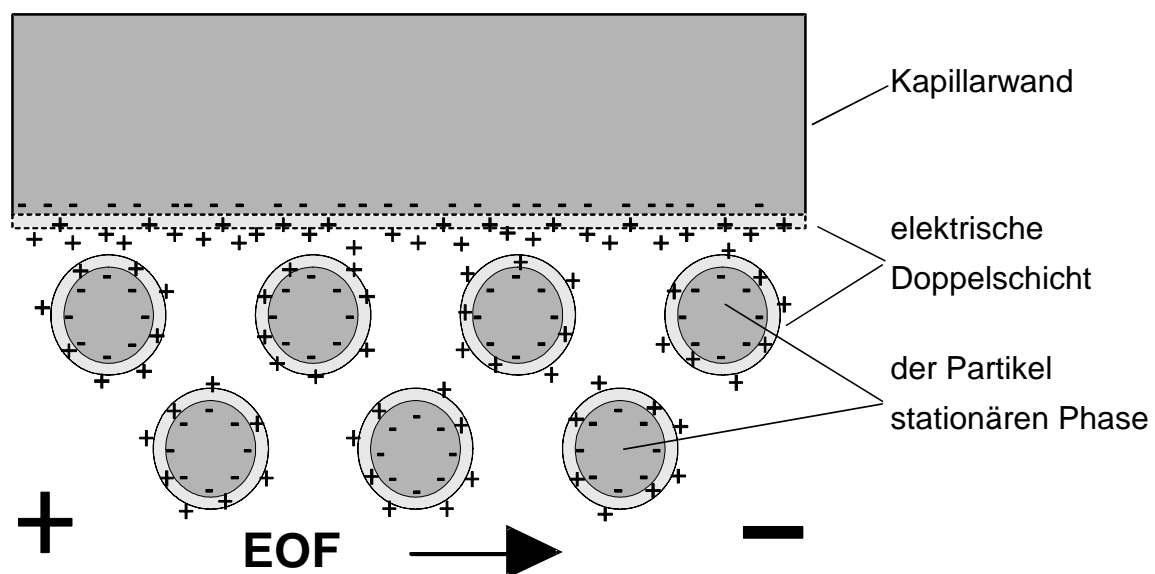
Elektrolytkonzentration [mol/l]	Schichtdicke $\delta$ [ $\mu\text{m}$ ]
0,1	0,001
0,01	0,003
$10^{-3}$	0,01
$10^{-4}$	0,03
$10^{-5}$	0,1
$10^{-6}$	0,3

**Tabelle 3-2:** Abhängigkeit der Schichtdicke  $\delta$  von der Elektrolytkonzentration.



### 3.1.1.2 Elektroosmose und elektroosmotischer Fluss

Elektroosmose in Elektrolyten ist auf die Ausbildung der im vorigen Kapitel beschriebenen elektrolytischen Doppelschicht auf geladenen Oberflächen durch mehr oder weniger feste Adsorption von Ionen aus der Lösung zurückzuführen. Legt man nun parallel zur Oberfläche Spannung an, so wandern die weniger fest gebundenen Ionen der Überschussladung des diffusen Teils der Doppelschicht (Gouy-Chapman-Layer) mitsamt ihrer Hydrathülle in Richtung ihrer Gegenelektrode. Die bei der Migration auftretenden Scherkräfte bewirken, dass sich, bei nicht zu großem Oberflächenabstand, die Flüssigkeitssäule in der Kapillare bzw. der Packung als Ganzes in Bewegung setzt. Dadurch entsteht der sogenannte elektroosmotische Fluss (EOF), mit dem auch neutrale gelöste Moleküle und Lösungsmittelmoleküle transportiert werden können.



**Abbildung 3-2:** Entstehung des elektroosmotischen Flusses.

Die lineare Geschwindigkeit des EOF ( $u_{eo}$ ) wird durch die Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung beschrieben:

$$u_{eo} = \frac{l_{eff}}{t_0} = \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot \zeta \cdot E}{\eta} \quad (\text{Gl. 3-8}) \text{ eingesetzt ergibt: } u_{eo} = \frac{\sigma \cdot E}{\eta} \cdot \sqrt{\frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot R \cdot T}{2 \cdot c \cdot F^2}} \quad (\text{Gl. 3-10})$$

(Gl. 3-9)

(Gl. 3-10)

Die Geschwindigkeit des EOFs ist demnach von der Oberflächenladungsdichte  $\sigma$ , der Beschaffenheit des Eluenten, der Konzentration (besser Ionenstärke  $I$ ), dem pH-Wert, der Temperatur und von der Feldstärke abhängig.

Um den EOF von Trennungen mit unterschiedlichen Feldstärken besser miteinander vergleichen zu können, wird die lineare Geschwindigkeit des EOFs im allgemeinen als von der Feldstärke unabhängige, elektroosmotische Mobilität ( $\mu_{eo}$ ) angegeben.

$$\mu_{eo} = \frac{u_{eo}}{E} = \frac{l_{eff} / t_0}{U / I_{ges}} = \frac{l_{eff} \cdot I_{ges}}{t_0 \cdot U} \quad (\text{Gl. 3-11})$$

setzt man (Gl. 3-9) bzw. (Gl. 3-10) ein, ergibt sich:

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot \zeta}{\eta} \quad (\text{Gl. 3-12})$$

$$\mu_{eo} = \frac{\sigma}{\eta} \cdot \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot R \cdot T}{2 \cdot c \cdot F^2}} \quad (\text{Gl. 3-13})$$

mit (Gl. 3-7) erhält man:  $\mu_{eo} = \frac{\delta \cdot \sigma}{\eta} \quad (\text{Gl. 3-14})$

Der EOF lässt sich somit durch folgende Faktoren beeinflussen:

- Durch die Oberflächenladungsdichte ( $\sigma$ ). Diese hängt z.B. bei *reversed phase* Materialien auf Kieselgelbasis stark von Derivatisierungsgrad und -art der Silanolgruppen ab.
- Durch die Zugabe von organischen Lösungsmitteln zum wässrigen Elektrolyten ( z.B. ACN, DMSO, Aceton, MeOH, EtOH, PrOH ) wird die Ionenkonzentration verringert und die Dielektrizitätskonstante ( $\varepsilon_r$ ) und die Viskosität ( $\eta$ ) verändert.
- Mit der Zunahme der Ionenstärke ( $I$ ) des Elektrolyten (meist ein Puffer, um den pH-Wert konstant zu halten ) sinkt  $\mu_{eo}$ ,

$$I = \frac{1}{2} \sum z_i^2 \cdot c_i \quad (\text{Gl. 3-15})$$

$z_i$      *Ladungszahl der Ionensorte „i“*  
 $c_i$      *molare Konzentration der Ionensorte „i“*

da das  $\zeta$ -Potential aufgrund der höheren Ladungsdichte in der elektrolytischen Doppelschicht schneller abfällt und sich damit die Schichtdicke ( $\delta$ ) verringert [37,71,72].

- Bei stationären Phasen auf Kieselgelbasis weist die elektroosmotische Mobilität ( $\mu_{eo}$ ) eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert auf. Die Zunahme von  $\mu_{eo}$  mit steigendem pH-Wert ist auf den damit wachsenden Dissoziationsgrad der Silanolgruppen der Oberfläche und die dadurch zunehmende Oberflächenladungsdichte ( $\sigma$ ) zurückzuführen.
- Mit steigender Temperatur nehmen die Schichtdicke ( $\delta$ ) und das  $\zeta$ -Potential zu, während die Viskosität ( $\eta$ ) abnimmt und sich somit die elektroosmotische Mobilität ( $\mu_{eo}$ ) vergrößert.

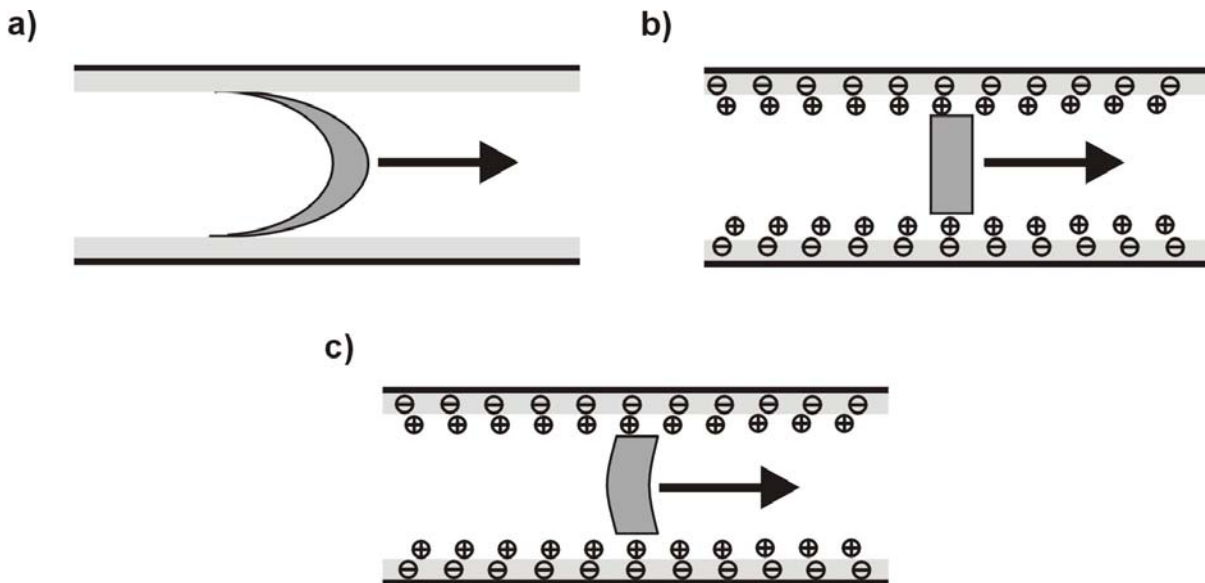
Die optimale mobile Phase sollte also ein großes  $\zeta$ -Potential und damit Schichtdicke, eine niedrigere Viskosität und eine möglichst geringe Leitfähigkeit aufweisen, um die durch die Joulesche Wärme geförderte Gasblasenbildung zu verhindern (vgl. Kapitel 3.1.3.3).

### 3.1.2 Vergleich der Flussprofile elektrokinetischer und hydrodynamischer Trennmethode

Der zuvor beschriebene - durch das Anlegen eines elektrischen Feldes entstehende - elektroosmotische Fluss elektrokinetischer Trennmethode, generiert ein für eine geringe Dispersion wesentlich vorteilhafteres Flussprofil, als der Druck bei hydrodynamischen Trennmethode.

Die Geschwindigkeit steigt von 0 an der äußeren Helmholtz-Fläche innerhalb der Schicht der Dicke  $\delta$  auf ihren Maximalwert an. Im Elektrolytinneren, wo kein Ladungsüberschuss mehr vorliegt, heben sich die durch die Migration der Ionen entstehenden Kräfte aufgrund der dort herrschenden Elektroneutralität auf. Die durch

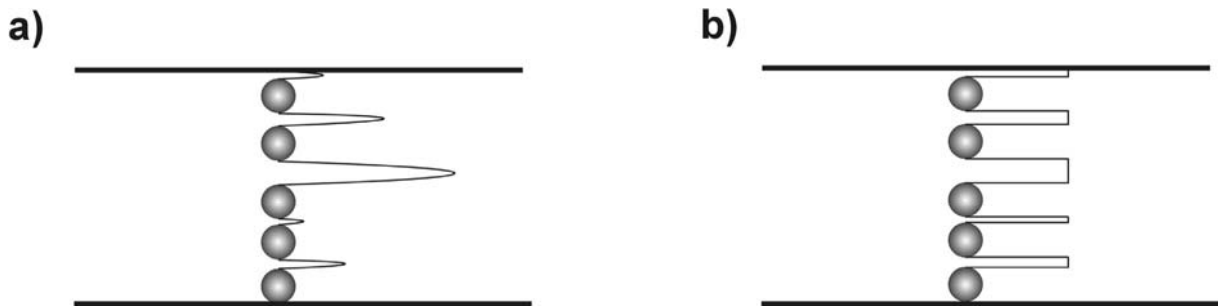
die Viskosität der Lösung auftretenden, auf innere Reibung zurückzuführenden Scherkräfte bewirken, dass die von der diffusen Schicht eingeschlossene Flüssigkeitssäule in der Kapillare (bzw. der Packung) als Ganzes in Bewegung gesetzt wird. Der dadurch entstehende elektroosmotische Fluss (EOF) hat nach Pretorius [18] ein flaches nahezu kolbenförmiges, in der Literatur als *plug-flow* bezeichnetes Geschwindigkeitsprofil.



**Abbildung 3-3:** Flussprofile: **a)** Poiseuille-Profil des laminaren Flusses, **b)** *plug-flow*-Profil des EOFs nach Pretorius, **c)** Flussprofil des EOFs nach Tsuda.

Tsuda [40,73] hingegen zeigte anhand von Videoaufnahmen eines durch EOF transportierten Farbstoffes eine leichte Abweichung vom *plug flow*. Im Vergleich mit dem, bei hydrodynamischen Trennmethode durch laminaren Fluss entstehenden, parabolischen Flussprofil, ist die von ihm beobachtete Abweichung vom idealen *plug-flow* Profil jedoch vernachlässigbar gering.

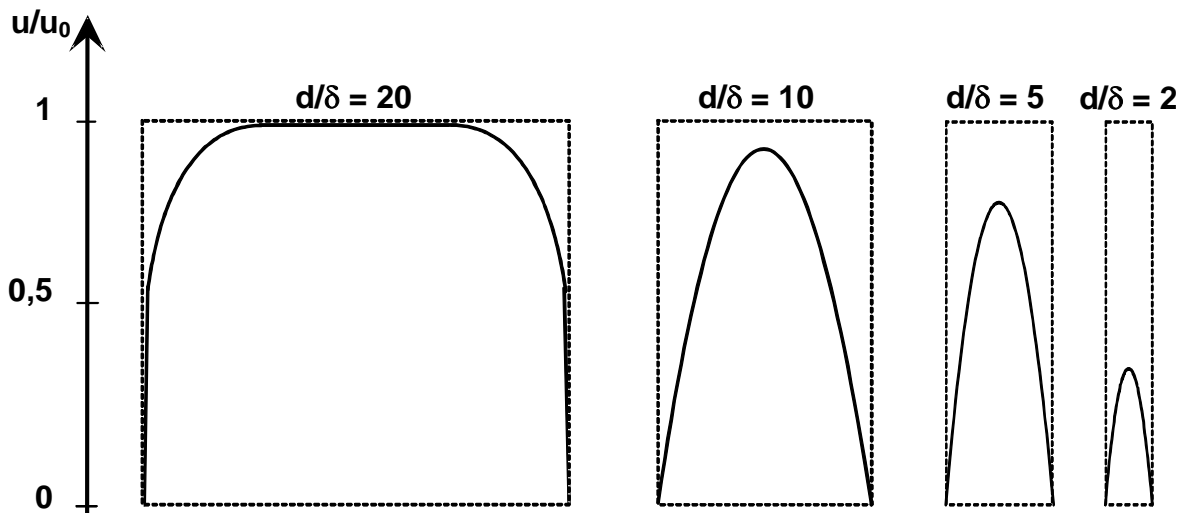
Das Modell des bei elektrokinetischen Trennmethode durch den EOF entstehenden, kolbenförmigen Flussprofils lässt sich nicht nur auf Methoden mit offenen Kapillaren (z.B. CZE), sondern auch auf Methoden mit gepackten Kapillarsäulen (z.B. CEC) übertragen [38].



**Abbildung 3-4:** Schematische Darstellung der Fließgeschwindigkeitsprofile in gepackten Säulen: **a)** laminarer Fluss mit Poiseuille“-Profil, **b)** elektroosmotischer Fluss mit plug-flow-Profil.

Die Vorteile des kolbenförmigen Flussprofils durch den EOF zwischen den Partikeln der Packung bei elektrokinetischem Antrieb, gegenüber dem parabolischen Flussprofil zwischen den Partikeln bei hydrodynamischem Antrieb, werden durch den mikroskopischen Vergleich beider Systeme deutlich. Da die interpartikulären Kanäle verschiedene Durchmesser aufweisen, kommt es bei druckbetriebenen Systemen wie der HPLC aufgrund des parabolischen Flussprofils zu Fließgeschwindigkeitsunterschieden zwischen den Kanälen und in den Kanälen selbst. Nach dem Modell der laminaren Strömung ist die Geschwindigkeit an den Wänden bzw. den Partikeloberflächen gleich Null. In der Kanalmitte ist sie das Zweifache der mittleren Geschwindigkeit ( $\bar{u}$ ). Da diese mit dem Kanaldurchmesser quadratisch wächst, ist sie umso höher, je größer der Kanaldurchmesser ist (vgl. Abbildung 3-4a). Die parabolische Geschwindigkeitsverteilung führt somit zur verstärkten Peakdispersion. Bei EOF betriebenen Systemen wie der CEC ist die Fließgeschwindigkeit aufgrund des kolbenförmigen Flussprofils über weite Bereiche unabhängig vom Durchmesser der interpartikulären Kanäle [38]. Die Geschwindigkeitsverteilung ist sowohl für den einzelnen Kanal und somit für das gesamte Kanalsystem der Packung einheitlicher als beim druckbetriebenen System (vgl. Abbildung 3-4b). Dies führt aufgrund der geringeren Peakdispersion zu einer höheren Trennleistung. Die Unabhängigkeit des elektroosmotischen Flusses bzw. der Fließgeschwindigkeit und des kolbenförmigen Flussprofils vom Kapillardurchmesser (CZE), bzw. dem Durchmesser der interpartikulären Kanäle (CEC), ist nach Rice und Whitehead [74] nur in gewissen Grenzen gegeben. Diese Unabhängigkeit gilt nur, wenn die Dicke der elektrolytischen Doppelschicht gegenüber dem Kapillar- bzw. Kanaldurchmesser vernachlässigbar klein ist. Nach Rice und Whitehead muss der Durchmesser größer als

$20 \delta$  sein (vgl. Abbildung 3-5), damit es nicht zu einer Überlappung der Doppelschichten kommt. Dies entspricht nach Knox und Grant [38] einer Mindestpartikelgröße von  $40 \delta$ .

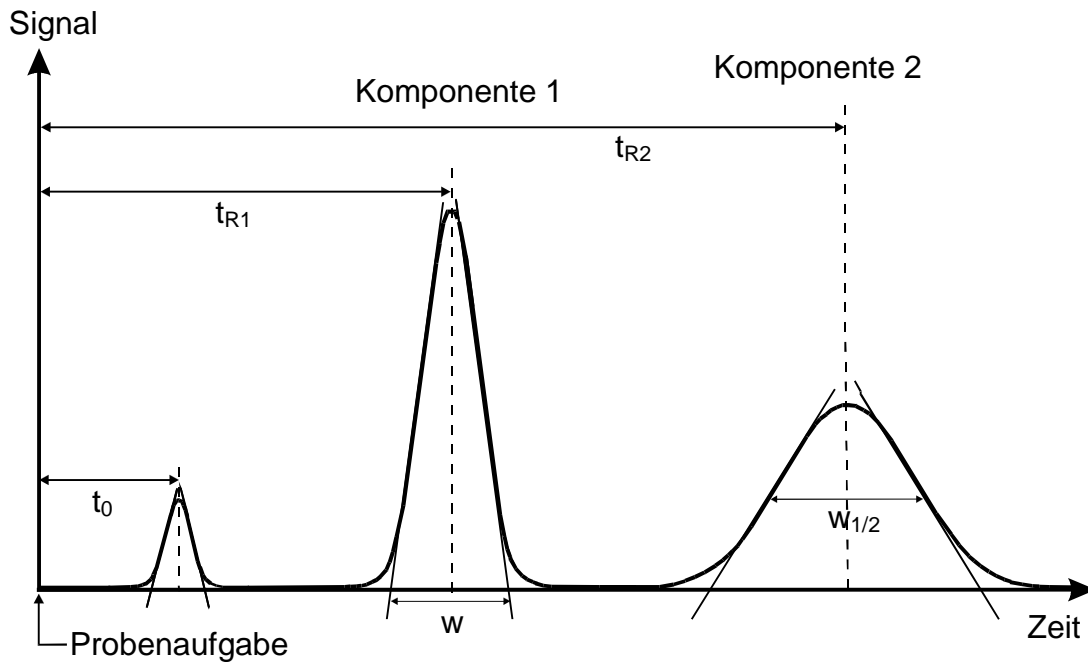


**Abbildung 3-5:** Fließgeschwindigkeitsprofile in Abhängigkeit vom  $d/\delta$ -Verhältnis ( $u/u_0$  Verhältnis von  $u$  bei Wandabständen  $\approx \delta$  zu  $u_0$  bei Wandabständen  $\gg \delta$ ;  $d/\delta$  Verhältnis des Wandabstandes  $d$  zur Ausdehnung  $\delta$  der diffusen Doppelschicht).

### 3.1.3 (Elektro-)Chromatographie

#### 3.1.3.1 Retention, Totzeit und Kapazität

In der Chromatographie wird ein Analytgemisch, nachdem es auf das Sorbens aufgebracht wurde, mit der mobilen Phase über eine Trennstrecke transportiert, um sie möglichst effizient aufgetrennt wieder zu verlassen. Das Chromatogramm stellt den zeitlichen Verlauf des Detektorsignals einer solchen chromatographischen Trennung dar. Die Signale der eluierten Substanzen werden im Idealfall basisliniengetrennt als Gaußkurve, dem sogenannten Peak, angezeigt (Abbildung 3-6).



**Abbildung 3-6:** Simuliertes Chromatogramm mit Gaußprofilen.

Die Zeit, die die mobile Phase benötigt, um einmal das Volumen zwischen Injektor und Detektor auszutauschen, wird als Totzeit ( $t_0$ ) bezeichnet. Sie wird in der Regel mit Hilfe eines nicht retardierten  $t_0$ -Markers bestimmt. Für Analyten die durch die Wechselwirkung mit der stationären Phase zurückgehalten, d.h. retardiert werden, wird analog die Retentionszeit ( $t_R$ ) erhalten. Beide, sowohl Totzeit als auch Retentionszeit, sind von verschiedenen Faktoren abhängig. Dazu gehören unter anderem die Säulenlänge, die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase und apparative Faktoren. Die Retentionszeit einer Substanz ist somit nur bei Einhaltung derselben chromatographischen Bedingungen zu deren Identifizierung geeignet. Um die Identifizierung auch bei Benutzung unterschiedlicher Systeme zu ermöglichen, wurde der unabhängige Kapazitätsfaktor ( $k'$ ) eingeführt. Er lässt sich nach folgender Gleichung aus dem Chromatogramm berechnen:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (\text{Gl. 3-16})$$

### 3.1.3.2 Trennleistung, Auflösung und Selektivität

Unter isokratischen Bedingungen ist das Ausmaß der Bandenverbreiterung (mathematisch ausgedrückt die Peakvarianz ( $\sigma_L^2$ )) proportional zur Säulenlänge (L).

$$\sigma_L^2 = H \cdot L \quad (\text{Gl. 3-17})$$

Die Proportionalitätskonstante (H) ist die sogenannte theoretisch Bodenhöhe, ein Maß für die Trennleistung einer Säule.

Ebenfalls Maß für die Trennleistung, d.h. der Qualität einer Säule, ist die Zahl der theoretischen Böden (N), welche sich nach folgender Gleichung aus einem Chromatogramm berechnen lässt:

$$N = 5,54 \cdot \left( \frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (\text{Gl. 3-18})$$

$w_{1/2}$     *Signalhalbwertsbreite*

Je höher die Bodenzahl, desto größer ist die Trennleistung der Säule und desto schmaler sind die eluierten Peaks. Beide Parameter sind über die Säulenlänge miteinander verknüpft:

$$H = \frac{L}{N} \quad (\text{Gl. 3-19})$$

Nachdem N mit (Gl. 3-18) und den aus dem Chromatogramm entnehmbaren Werten Retentionszeit und Halbwertsbreite berechnet werden kann, lässt sich so auch H für eine gegebene Säulenlänge berechnen. Anschaulich betrachtet ist H die Strecke, auf der sich das chromatographische Gleichgewicht einmal einstellt.

Die Komponenten einer Probe werden von einem chromatographischen System nur dann getrennt, wenn sie sich in ihren Kapazitätsfaktoren unterscheiden. Ein Maß für die Abtrennung zweier Peaks voneinander ist die chromatographische Auflösung ( $R_S$ ). Sie ist definiert als der Abstand zweier Peakmaxima in Relation zur Peakbreite:



$$R_S = \frac{t_{R1} - t_{R2}}{4\sigma_1} \quad (\text{Gl. 3-20})$$

Die Peaktrennung - auch Zonenverbreiterung genannt - ist als die Selektivität der Säule definiert und ist von der Natur der stationären und mobilen Phase abhängig. Die Selektivität wird durch die relative Trennung zweier Peaks bestimmt und quantitativ durch den Selektivitätskoeffizienten ( $\alpha$ ) - auch Trennfaktor genannt - ausgedrückt. Dieser ist als das Verhältnis der Kapazitätsfaktoren der beiden Peaks definiert:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad \text{mit } k'_2 > k'_1 \quad (\text{Gl. 3-21})$$

Die Beeinflussung von  $\alpha$  ist durch Veränderungen in der mobilen Phase (Polarität, pH-Wert, Ionenstärke), Wechsel der stationären Phase (Porengröße, Oberfläche) oder durch eine Änderung der Temperatur ( $k' = f(T)$ ) möglich.

Die chromatographische Auflösung ( $R_S$ ) ist sowohl von der Effizienz, als auch von der Selektivität und der Kapazität der Säule abhängig.  $R_S$  lässt sich als Funktion von  $k'$ ,  $N$  und  $\alpha$  darstellen, wobei  $\alpha$  selbst von  $k'$  abhängig ist:

$$R_S = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left( \frac{k'}{1 + k'} \right) \quad (\text{Gl. 3-22})$$

a)      b)      c)

a) *Dispersionsterm*    b) *Selektivitätsterm*    c) *Verzögerungsterm*

Hat man demnach eine geringe Selektivität und damit einen kleinen Selektivitäts-term, so wird eine hohe Bodenzahl (Trennleistung) benötigt, um eine hohe Trennschärfe (Effizienz) und damit eine ausreichende Auflösung zu erhalten. Es ist jedoch wirkungsvoller die Selektivität zu optimieren, da eine Verdopplung von  $N$  (z.B. durch Verlängerung der Trennsäule, Verwendung von feinkörnigerem Packungsmaterial) die Auflösung nur um das 1,41-fache erhöht. Der Verzögerungsterm vergrößert sich mit zunehmenden  $k'$ -Werten. Diese sollten den Wert 10 nicht überschreiten, um unnötig lange Retentionszeiten zu vermeiden.

Der  $R_S$  -Wert sollte  $>1$  sein, da sich die Peakflächen bei diesem Wert nur noch um 3% überlappen. Bei  $R_S = 1,5$  erhält man eine Basislinientrennung der Peaks. Eine darüber hinausgehende Auflösung ist nicht sinnvoll und geht auf Kosten der Analysezeit.

### 3.1.3.3 Bandenverbreiterung

Die optimale Peakform ist die einer Gaußkurve. Sie stellt die aufgrund dispersiver Prozesse verbreiterte Bande des Analyten dar. Die Peaks entsprechen nur selten exakt der symmetrischen Form der Gaußkurve, sondern weisen eine durch *tailing* oder seltener *fronting* hervorgerufene Verschiebung des Schwerpunktes der Peakfläche auf.

Verursacht werden diese Effekte z.B. durch Inhomogenitäten in der Packung, Überladung des Systems oder Wandadsorption des Analyten. Die symmetrische Bandenverbreiterung während der (elektro)chromatographischen Trennung kann, wie zuvor erwähnt, mit der theoretischen Bodenhöhe ( $H$ ) beschrieben werden. Es lässt sich zeigen, dass  $H$  die Summe einzelner Beiträge ist.

Die Gesamtbodenhöhe ( $H_{\text{ges}}$ ) kann in die Beiträge zur Bandenverbreiterung durch die Trennsäule ( $H_{\text{col}}$ ) und die externen Beiträge ( $H_{\text{ext}}$ ) aufgeteilt werden:

$$H_{\text{ges}} = H_{\text{col}} + H_{\text{ext}} \quad (\text{Gl. 3-23})$$

Die externen Beiträge (z.B. durch Dispersionsvorgänge bei der Injektion ( $H_{\text{inj}}$ ) oder der Detektion ( $H_{\text{det}}$ )) sind in guten chromatographischen Systemen vernachlässigbar klein.

$$H_{\text{ext}} = H_{\text{inj}} + H_{\text{det}} \quad (\text{Gl. 3-24})$$

Die Beiträge der Trennsäule zur Bandenverbreiterung ( $H_{\text{col}}$ ) lassen sich in drei Hauptgruppen aufteilen, die Beiträge der axialen Dispersion ( $H_{\text{ax}}$ ), die Beiträge der Dispersion durch Austauschvorgänge ( $H_{\text{aust}}$ ) und den Beitrag durch thermische Effekte ( $H_{\text{th}}$ ).

$$H_{\text{col}} = \overbrace{H_{\text{l,diff}} + H_{\text{e,diff}}}^{H_{\text{ax}}} + \overbrace{H_{\text{w,diff}} + H_{\text{i,diff}} + H_{\text{kin}} + H_{\text{t,diff}}}^{H_{\text{aust}}} + H_{\text{th}} \quad (\text{Gl. 3-25})$$

Der Beitrag der axialen Dispersion ( $H_{ax}$ ) entsteht durch die Molekulardiffusion in Längsrichtung ( $H_{l,diff}$ ) und die Streudiffusion, der sogenannten Eddy-Diffusion ( $H_{e,diff}$ ). Das Inkrement zur Längsdiffusion ( $H_{l,diff}$ ) lässt sich mit Hilfe des Diffusionskoeffizienten ( $D_m$ ) des Analyten in der mobilen Phase als Funktion der linearen Fließgeschwindigkeit ( $u$ ) darstellen:

$$H_{l,diff} = \frac{2 \cdot \gamma \cdot D_m}{u} \quad (\text{Gl. 3-26})$$

$\gamma$  *Labyrinthfaktor (Berücksichtigt die notwendigen Umwege, die im gepackten Teil im Vergleich zur freien Lösung gemacht werden müssen).*

Die Bandenverbreiterung durch Eddy-Diffusion ( $H_{e,diff}$ ) ist nach der klassischen Theorie unabhängig von der linearen Fließgeschwindigkeit ( $u$ ).  $H_{e,diff}$  ist auf Unterschiede in der Weglänge der Probenmoleküle (z.B. verursacht durch wechselnde Form und Größe der Partikel) sowie Unterschiede der Fließgeschwindigkeiten in den Kanälen der Packung zurückzuführen.

Nach Knox [38] ist die Eddy-Diffusion in der CEC aufgrund des kolbenförmigen Strömungsprofils des EOF wesentlich geringer, als in der druckbetriebenen HPLC mit parabelförmigen Flussprofil. Sie kann nach (Gl. 3-27) durch die Verwendung einer feinkörnigeren und homogeneren Packung weiter verringert werden.

$$H_{e,diff} = 2 \cdot \lambda \cdot d_p \quad (\text{Gl. 3-27})$$

$d_p$  *Partikeldurchmesser,*  
 $\lambda$  *Empirische Konstante, die die statistischen Unregelmäßigkeiten der Packung berücksichtigt.*

Der Beitrag der Dispersion durch Stoffaustauschvorgänge ( $H_{aust}$ ) lässt sich in vier Inkremente unterteilen. Alle vier führen zu einer unterschiedlichen Verzögerung des Austausches der Analytmoleküle zwischen mobiler und stationärer Phase (Retention):

- $H_{t,diff}$  ist das Inkrement zur Bodenhöhe aufgrund des Stoffaustausches zwischen den Beads durch die Kornzwischenräume hindurch.
- $H_{w,diff}$  ist der Beitrag durch den Widerstand, den das Probenmolekül bei der Diffusion durch die Grenzfläche des Partikel überwinden muss.

- $H_{i,diff}$  ist das Inkrement zur Bodenhöhe aufgrund intrapartikulärer Diffusion des Analytmoleküls bei porösen Partikeln.
- $H_{kin}$  beschreibt den Beitrag der Kinetik der Wechselwirkungen zwischen Probe und stationärer Phase.

Der Beitrag zur Bandenverbreiterung durch thermische Effekte ist in der CEC um Größenordnungen höher als in der HPLC. Das *self heating* des Elektrolyten durch das angelegte elektrische Feld führt im ungünstigsten Fall sogar zur Bläschenbildung und ist eines der Hauptprobleme in der CEC. Das Inkrement zur Bodenhöhe ( $H_{th}$ ) wurde von Knox [19,20], der den Einfluss der Jouleschen Wärme auf die Bandenverbreiterung ausführlich diskutierte, wie folgt definiert:

$$H_{th} = 10^{-8} \cdot \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot \delta}{D_m \cdot \eta \cdot \kappa^2} \cdot E^5 \cdot d_c \cdot \lambda_m^2 \cdot c^2 \quad \text{(Gl. 3-28)}$$

$d_c$  Innendurchmesser der Säule       $\lambda_m$  Äquivalentleitfähigkeit der mobilen Phase  
 $\kappa$  Wärmeleitfähigkeit des Eluenten       $D_m$  Diffusionskoeffizient der mobilen Phase

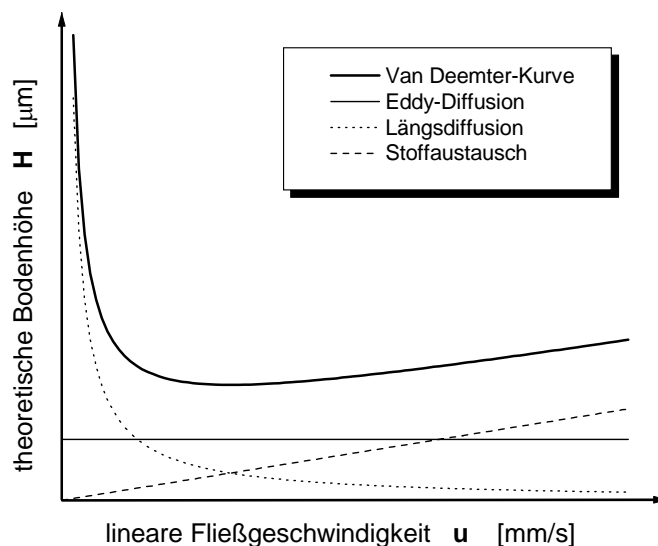
Mit (Gl. 3-28) wird deutlich, dass vor allem das elektrische Feld, der Säulendurchmesser, die Konzentration des Elektrolyten und die Art der mobilen Phase auf die Trennleistung Einfluss nehmen können. Die Hauptursache für eine mögliche Blasenbildung und dem damit verbundenen Zusammenbruch des EOFs sind die Fritten [41,75,76], respektive deren Qualität. Sind sie zu stark gesintert und aus diesem Grunde zu wenig durchlässig, entstehen durch die Kompression der mobilen Phase in der Fritte und der sich anschließenden Expansion feine Gasbläschen. Dies kann unter Umständen zu einer Unterbrechung des Stromkreises führen. Da die einzelnen Inkremente des Beitrages der Trennsäule ( $H_{col}$ ) zur Bandenverbreiterung experimentell kaum zu bestimmen sind, wird die minimale theoretische Bodenhöhe in der Praxis mit der sogenannten van-Deemter-Gleichung [77] bestimmt. Sie verknüpft die theoretische Bodenhöhe ( $H$ ) mit der linearen Fließgeschwindigkeit ( $u$ ) der mobilen Phase.

Ihre einfachste Form lautet:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (\text{Gl. 3-29})$$

A, B und C sind Konstanten, u und H sind experimentell leicht zu bestimmen.

- Der A-Term berücksichtigt die Eddy-Diffusion (vgl. (Gl. 3-27) und ist von der Fließgeschwindigkeit unabhängig.
- Der B-Term (vgl. (Gl. 3-26) beinhaltet die Molekulardiffusion in Längsrichtung der Trennstrecke. Sein Anteil an der Bodenhöhe (H) nimmt reziprok mit steigender Fließgeschwindigkeit (u) ab.
- Der C-Term berücksichtigt die Störungen bei der Einstellung des Gleichgewichtes des Stoffaustausches zwischen mobiler und stationärer Phase, die durch den Fluss verursacht werden. Er entspricht dem Beitrag der Stoffaustauschvorgänge ( $H_{\text{aust}}$ ) zur Bodenhöhe und nimmt linear mit der Fließgeschwindigkeit (u) zu.



**Abbildung 3-7:** Van-Deemter-Kurve und die einzelnen dispersiven Beiträge

Die Kurve weist ein Minimum der Bodenhöhe bei der optimalen Fließgeschwindigkeit auf. Praktisch wird oft auf Kosten der Trennleistung bei höheren Fließgeschwindig-

keiten gearbeitet, um kürzere Analysezeiten zu erreichen. Mit Hilfe der oben aufgeführten Inkremente zur Bodenhöhe lässt sich eine aussagekräftigere Form der van-Deemter-Gleichung aufstellen [20]:

$$H = \underbrace{2 \cdot \lambda \cdot d_p}_A + \underbrace{\frac{2 \cdot \gamma \cdot D_m}{u}}_{\frac{B}{u}} + \underbrace{\frac{1}{30} \frac{k'}{(1+k')^2} \frac{d_p^2 \cdot u}{D_{sz}}}_{C \cdot u} \quad (\text{Gl. 3-30})$$

$D_{sz}$  Diffusionskoeffizient des Analyten in der stationären Phase

Durch (Gl. 3-30) wird die große Abhängigkeit der Bodenhöhe (H) von der Korngröße ( $d_p$ ) deutlich. Deshalb ist es sinnvoll bei der Bewertung der Effizienz einer Säule den Partikeldurchmesser zu berücksichtigen. Um die Qualität zweier Säulen mit Packungen unterschiedlicher Korngröße miteinander vergleichen zu können, wird häufig die reduzierte Bodenhöhe (h) als Maßzahl angegeben:

$$h = \frac{H}{d_p} \quad (\text{Gl. 3-31})$$

Da die Fließgeschwindigkeit in der CEC von  $d_p$  weitestgehend unabhängig ist und die Beiträge des A- und C-Terms zur Bodenhöhe (H) bei Korngrößen im Submikron-Bereich vernachlässigbar klein werden, trägt nach Knox [20] im Idealfall nur noch die Längsdiffusion (B-Term) zur Bodenhöhe bei. Die Effizienzen solcher Kapillarsäulen sollten dann mit denen der CZE vergleichbar sein.

Ein weiterer Vorteil der CEC, aber vor allem der pCEC ist die weitestgehende Unabhängigkeit des EOFs gegenüber dem Durchmesser der Durchflusssporen. Im Gegensatz dazu ist der Einsatz von Packungsmaterial mit sehr geringer Korngröße in der HPLC (noch stärker als in der cHPLC) aufgrund des durch die Packung verursachten Druckabfalles limitiert.

$$u_p = \frac{d_p^2 \cdot \Delta p}{P \cdot \eta \cdot L} \quad (\text{Gl. 3-32})$$

$u_p$  Geschwindigkeit des hydrodynamischen Flusses,  $\Delta p$  Druckabfall längs der Säule,  $P$  Druckfaktor

Wie aus (Gl. 3-32) zu ersehen steigt der Druckabfall umgekehrt proportional mit dem Quadrat des Partikeldurchmessers an. Da man mit den üblichen HPLC-Pumpen auf einen Maximaldruck von 400 bar beschränkt ist, muss in der HPLC schon bei 3  $\mu\text{m}$  Partikeln die Säulenlänge gekürzt werden, um noch einen zufriedenstellenden hydrodynamischen Fluss zu erhalten. Die lineare Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses ( $u_{eo}$ ) ist hingegen nach (Gl. 3-6) bis (Gl. **3-10**) von der Partikelgröße unabhängig, solange die elektrolytischen Doppelschichten einen Abstand von mindestens  $40 \delta$  voneinander aufweisen (siehe Kapitel 3.1.2). Somit ist bei der CEC auch der Einsatz von Submikron-Partikeln als stationäre Phase möglich, ohne deshalb die Säulenlänge verringern zu müssen. Mit der CEC sind dadurch in der Praxis 5- bis 10-fach höhere Trennleistungen [45] als mit der Kapillar-HPLC zu erreichen.

## 3.2 Apparatur

Neben den in 3.1.2 genannten Schwierigkeiten gewinnt mit zunehmender System-Miniaturisierung die Eliminierung von Totvolumina im System und die Notwendigkeit der schnellen und effektiven Durchmischung von Laufmitteln zur Gradientenelution zunehmend an Bedeutung. In der Praxis sind diese Aspekte speziell für die cHPLC und die pCEC eng mit dem Problem der Erzeugung und der Kontrolle von Mikro- und Nanoliter Flussraten gekoppelt.

Während für die cHPLC und die CE seit einigen Jahren schon kommerzielle Geräte verfügbar waren, gab es für die CEC bis vor kurzem nur darauf adaptierte CE-Geräte, welche, vor allem in Bezug auf mögliche Druckunterstützung und Gradientenelution, nur bedingt dafür geeignet sind.

Um das Potential und die Möglichkeiten der CEC voll auszuschöpfen, ist es aber notwendig, die Option der Gradientenelution zu haben, um somit die Peak-Kapazitäten erhöhen, die Trennung beschleunigen und vor allem um auch komplexere Trennungen ermöglichen zu können. Neben Temperatur- und Spannungsgradienten [78,79] (welche auch mit kommerziellen CE Geräten appliziert werden können) ist die aus der HPLC bekannte stufenlose Laufmittelgradientenelution das leistungsfähigste Werkzeug des Chromatographen. Um diese Geräte-Lücke zu schließen, wurden in den letzten Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen eine ganze Reihe von Eigenbauanlagen entwickelt. Die praktikablen Systeme darunter lassen sich in zwei Hauptkategorien aufteilen, in sogenannte presplitt- bzw. postsplitt-Injektionssysteme. Unter den weniger praktikablen Lösungen gab es allerdings auch einige sehr interessante Entwicklungen, wie das von Yan et al. [80,81] entwickelte System mit rein elektrokinetisch generiertem Laufmittelgradienten oder das Ultrahochspannungs-System von Hutterer und Jorgenson [82] mit welchem Spannungen bis zu 120000 Volt angelegt werden können. In jüngster Zeit sind nun auch die ersten kommerziellen  $\mu$ /cHPLC-(p)CEC-Kombi-Geräte erhältlich (z.B.: Unimicro [83] *TriSep<sup>TM</sup> 2000GV*; Micro-Tech [84] *Ultra-Plus II<sup>TM</sup>*; ProLab [85] *Evolution 200*).

Gerade für die *on-line*-Kopplung kapillarer Trenntechniken mit der NMR-Spektroskopie ist die splittlose Generierung von Flussraten im unteren Mikroliter-Flussratenbereich vor allem in finanzieller Hinsicht äußerst interessant. Neben der einfachen da direkten Kontrolle von Flussrate und der empfindlichen Detektierbarkeit eventueller Leckage oder (partiell) Säulenverschluss durch plötzliche System-



druckerniedrigung bzw. -erhöhung ist der drastisch reduzierte Laufmittelverbrauch bei teuren deuterierten Lösungsmitteln ein schlagkräftiges Argument. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Systeme verwandt:

### 3.2.1 Auf CEC adaptierbare kommerzielle CE-Anlage

Kommerzielle, ursprünglich für die CE entwickelte Geräte sind eigentlich nicht optimal für den Einsatz in der CEC geeignet. Vor allem die erste Generation dieser Geräte ist diesbezüglich nur sehr bedingt geeignet. Im Gegensatz zur CE ist die Blasenbildung in der CEC mit gepackten Kapillarsäulen ein echtes Problem. Neben einer verrauschten Basislinie und störenden *Spikes* können sie durch Unterbrechung des Stromkreises zum Zusammenbruch des EOFs führen [86,87,88,89]. Die fehlende bzw. unzureichende Druckunterstützung wurde von einigen Arbeitsgruppen (wie z. B. Smith und Evans [88,90], Boughtflower et al. [87] oder später von Smith und Carter-Finch [91] nochmals detailliert beschrieben) durch Gerätemodifikationen nachträglich installiert. Diese Arbeitsgruppen modifizierten CE-Geräte von ABI [92] bzw. Prince [93] und hatten so die Möglichkeit bis zu 35 bar auf das Einlass- und/oder Auslass-Pufferreservoir anzulegen.

Die jüngste Generation kommerzieller CE-Geräte (Agilent Technologies [94]: *CE*, Beckmann Coulter [95]: *P/ACE MDQ*, Prince Technologies [93]: *PinCE-C 660*) erlaubt nun das Anlegen von Druck (He, N<sub>2</sub> oder Luft) auf das Einlass- und/oder Auslass-Pufferreservoir, aber nur bis zu maximal 7-12 bar (je nach Hersteller). Dies mag ausreichend sein um Blasenbildung zu unterdrücken, aber sicherlich nicht um gepackte Kapillarsäulen in einem akzeptablen Zeitfenster von einigen Minuten hydrodynamisch zu spülen und zu equilibrieren. Auch mit dieser Generation von CE-Geräten ist nur eine gestufte Laufmittelgradientenelution möglich. Mit Ausnahme des Systems von Agilent Technologies, mit dem durch (allerdings nicht kommerziell erhältliche) Gerätemodifikationen die stufenlose Laufmittelgradientenelution möglich ist [96,97,98,99].

Um allerdings automatisiert fortlaufende Serien von isokratischen CEC-Trennungen mit hinreichender Reproduzierbarkeit abzuarbeiten, sind diese Geräte vorzüglich geeignet, weswegen ein solches Gerät (Beckmann Coulter: *P/ACE MDQ*) auch zur Vermessung der van-Deemter-Kurven in Kapitel 3.3.3 eingesetzt wurde. Diese Geräte besitzen die Möglichkeit der exakten Temperaturregelung, der genauen

Einstellung der Injektionsmenge und des Anlegens sehr konstanter Hochspannungen, was die gute Reproduzierbarkeit erst ermöglicht. Weitere Vorteile sind die im Gerät integrierten automatisierten Proben- und Puffer-Gefäßwechsler, durch die ein hoher Probendurchsatz ermöglicht wird. Zudem erlaubt die dazugehörige Software die manuelle Gerätesteuerung, die Sequenzprogrammierung zur automatisierten Gerätesteuerung, die Datenerfassung und die Datenverarbeitung.

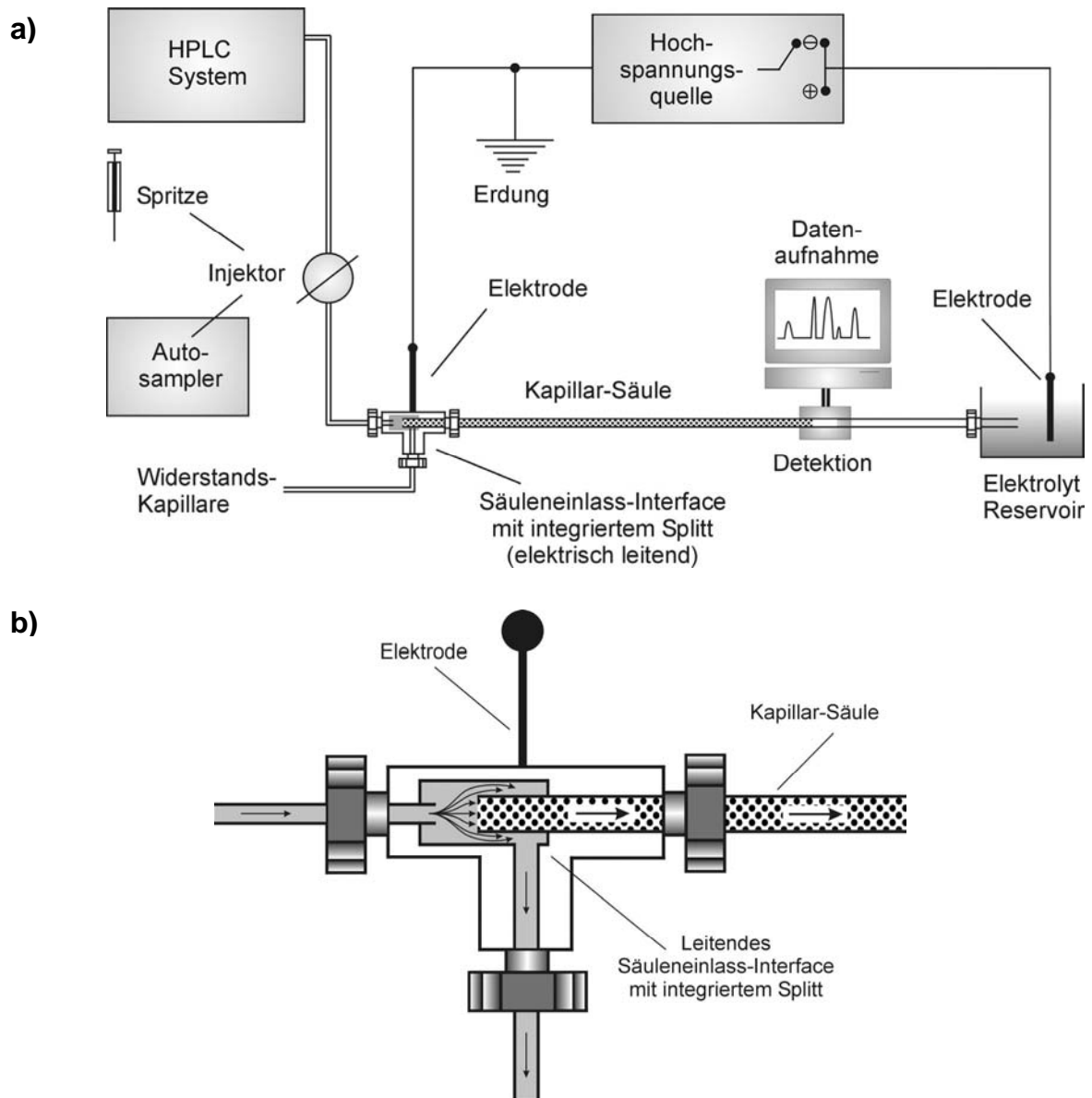
### **3.2.2 Druckunterstützbare Gradienten-cHPLC/(p)CEC-Anlage mit presplitt Injektion**

Das presplitt-injektions-Setup (dargestellt in Abbildung 3-8a) eignet sich sehr gut, um ein druckunterstützbares Gradienten-cHPLC/(p)CEC-System aufzubauen. Die Probenaufgabe kann optional automatisiert werden und das System ist sehr praktikabel im täglichen Gebrauch und wenig stör anfällig bezüglich des EOFs. Aufgrund des modularen Aufbaus aus einzelnen Komponenten (Gradienten HPLC-Pumpe, Injektor, Fluss-Splitter, Hochspannungsquelle und Detektor) ist es relativ einfach das System mit einem Autosampler nachzurüsten um so auch ganze Sequenzen abarbeiten lassen zu können. Dies ist allerdings nur aufgrund des post-injektions Splitters praktikabel, da das System dadurch eine sehr hohe Toleranz gegenüber „großen“ (1-10  $\mu$ l) Injektionsvolumen zeigt, welches die kleinsten mit den momentan verfügbaren Autosamplern injizierbaren Volumina sind. Um unnötige Bandenverbreiterungen zu vermeiden, ist es notwendig, die Transfer-Volumina zwischen Splitter und Kapillarsäuleneinlass und zwischen Kapillarsäulenauslass und Detektor so gering wie möglich zu halten.

Das presplitt-injektions-Setup zeigt leider auch einige Unzulänglichkeiten:

Die Flussrate durch die Kapillarsäule und damit auch die injizierte Probenvolumen resp. Probenmengen können nur nach Ermittlung des aktuellen Splitverhältnisses bestimmt werden. Flussratenänderungen durch die Kapillarsäule verursacht durch Viskositätsänderungen der mobilen Phase (bei Gradientenelution) oder durch partiell verstopfte Säuleneinlässe, sind im unteren  $\mu$ l/min oder gar nl/min-Bereich nur sehr aufwendig und mühsam zu bestimmen. Wenn sich aber das Splitverhältnis ändert, verändert sich auch die Fließgeschwindigkeit in der Kapillarsäule. Dies kann z.B. bei mit der Zeit auftretendem zunehmendem Verstopfen des Säuleneinlasses die Reproduzierbarkeit von Lauf zu Lauf erheblich beeinträchtigen. Das ist allerdings ein

Problem bei allen nicht kontrollierten resp. unregulierten Flüssen. Der größte Nachteil des presplitt-injektions-Setups ist allerdings die enorme Probenverschwendung durch den post-injektions Splitter, was bei limitierter Probenmenge ein echtes Problem sein kann.



**Abbildung 3-8:** **a)** Schematischer Aufbau einer druckunterstützbaren Gradienten-chHPLC/(p)CEC-Anlage mit presplitt Injektion. **b)** Vergrößerte Querschnittszeichnung der Geometrie des Säuleneinlass-Interfaces mit angedeutetem Strömungsprofil.

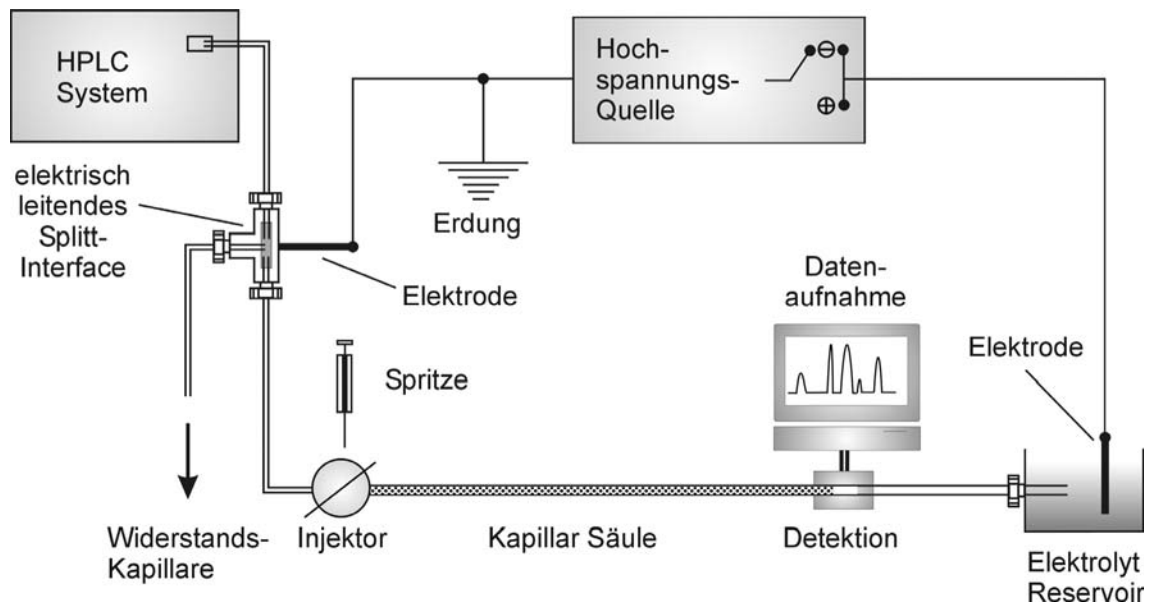
Das presplitt-injektions-Design wurde von Behnke und Bayer 1994 vorgestellt [100]. Darauf folgend wurde ein ähnliches Setup von Eimer et al. [101] präsentiert. Weiterentwicklungen dieses Setups wurden von Huber et al. [102], Kitawaga et al.

[103] und Zhang et al. [104] vorgenommen. In jüngerer Zeit wurden weiter optimierte Setups mit minimierten Totvolumen, *Inline*-Filtern (Verhindert das Zusetzen des Säuleneinlasses) und Restriktorkapillare am Auslass, um Blasenbildung zu unterdrücken, vorgestellt [83,105,106,107,108,109]. Nahezu alle Publikationen bestätigten die Wichtigkeit einer optimalen Geometrie resp. Anordnung der aufeinander treffenden Kapillaren (d.h.: Zuleitung, Splittkapillare und Kapillarsäule) am Säuleneinlass-Interface der Anlage (dargestellt in Abbildung 3-8b). Dieses Interface, welches eine der beiden Hochspannungselektroden beinhaltet oder gar darstellt, sollte sowohl hochdruck- und hochspannungsstabil, als auch möglichst totvolumenarm sein. Zugleich ist dies auch der Flusssplitter, der nach Bedarf mit unterschiedlichen Fließwiderständen versehen werden kann. Die innere Geometrie des Interfaces sollte so gestaltet sein, dass Laufmittel und Probe den Kapillareinlass koaxial umströmen und das Interface größtenteils (je nach Splitttrate) durch den „stromabwärts“ platzierten Splitt wieder verlassen. Durch eine solche Anordnung (dargestellt in Abbildung 3-8b) können Bandenverbreiterungen aufgrund von Probenverschleppung im Interface vermieden werden. Blasen, die z.B. aufgrund der Hochspannung durch Elektrodenprozesse entstehen können, werden auf die gleiche Weise durch den koaxialen Pumpenfluss sofort nach dem Entstehen aus dem System gespült, ohne dass sie den Säuleneinlass erreichen können.

### **3.2.3 Druckunterstützbare Gradienten-cHPLC/(p)CEC-Anlage mit postsplitt Injektion**

Verglichen mit dem presplitt-injektions-Setup sind der Injektor und das Säuleneinlass-Interface beim postsplitt-injektions-Setup (dargestellt in Abbildung 3-9) in umgekehrter Reihenfolge angeordnet. Aufgrund dessen müssen hier die Totvolumina zwischen Splitt, Injektor und Säuleneinlass minimiert werden. Für dieses System ist es auch relativ schwierig einen Autosampler zu integrieren, da sein Einbau zusätzliches Totvolumen und damit Gradientenverzögerung, Druckabfall und Bandenverbreiterung mit sich bringt. Ansonsten gelten für dieses Setup fast die gleichen Vor- und Nachteile wie für die presplitt-injektions Variante. Allerdings ist der Probenverbrauch bei dieser Variante drastisch reduziert, und damit ein klares Argument für die postsplitt-injektions Variante bei Anwendungen mit limitierter Probenmenge. Dieses Design wurde erstmals 1991 von Verheij et al. [110], gefolgt

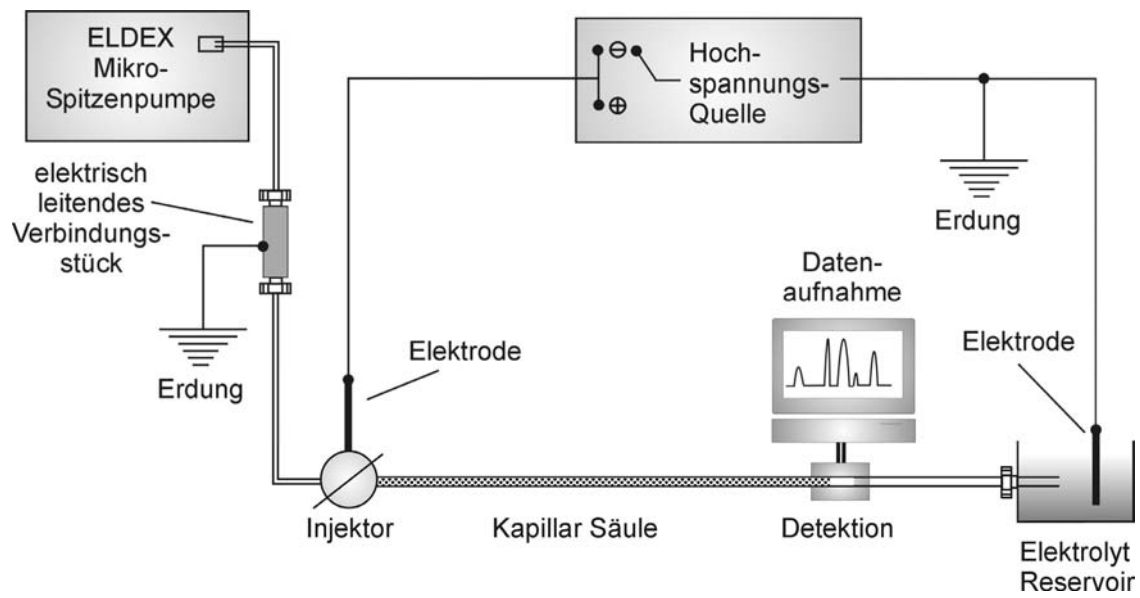
von Tsuda [111] und Behnke et al. [112] vorgestellt. Vor kurzem wurde dieses Setup von Anderson und Bloomberg [113] und von Sander [114] erneut aufgegriffen. Wirkliche pCEC-Gradientenelution wird allerdings nur in zwei [110,114] dieser Publikationen beschrieben.



**Abbildung 3-9:** Schematischer Aufbau einer druckunterstützbaren Gradienten-chPLC/(p)CEC-Anlage mit postsplitt Injektion.

### 3.2.4 Druckunterstützbare splittlose chPLC/(p)CEC-Anlage

Für diese Arbeit wurde speziell für die *on-line*-Kopplung kapillarer Trenntechniken mit der NMR-Spektroskopie ein splittloses Setup aufgebaut (dargestellt in Abbildung 3-10). Die splittlose Generierung von Flussraten im unteren Mikroliter-Flussratenbereich ist hier vor allem in finanzieller Hinsicht äußerst interessant. Neben der einfachen, da direkten Kontrolle von Flussrate und der empfindlichen Detektierbarkeit eventueller Leckage oder (partiell) Säulenverschluss durch plötzliche Systemdruckerniedrigung bzw. -erhöhung, ist der drastisch reduzierte Laufmittelverbrauch bei teuren deuterierten Lösungsmitteln ein schlagkräftiges Argument. Eine genaue Beschreibung der Funktionsweise dieser Anlage erfolgt in Kapitel 4.2.3.



**Abbildung 3-10:** Schematischer Aufbau einer druckunterstützbaren splittlosen cHPLC/(p)CEC-Anlage.

### 3.3 Kapillar-Säulen

Die Trennsäulen, die üblicherweise bei Kapillartrennmethode zum Einsatz kommen, werden in Quarzglas Kapillaren (*fused silica* (FS)) gepackt. Genau wie GC-Säulen oder CE-Kapillaren sind sie außen mit einer Polyimidschicht überzogen, was ihnen eine hohe mechanische Belastbarkeit und Flexibilität verleiht und somit eine bequeme Handhabung erlaubt. Gegenüber Kapillaren aus anderen Materialien (z.B.: Polytetrafluorethylenpropylen (PTFE), Fluorethylenpropylen (FEP), Polyetheretherketon (PEEK) oder Edelstahl (*stainless steel*, SS)) haben sie entscheidende Vorteile. So sind sie im Gegensatz zu anderen Kapillaren auch mit sehr geringen Innendurchmessern kommerziell erhältlich. Des Weiteren ermöglicht ihre Druckstabilität das Packen und den Betrieb bei hohen Drücken (bis 1000 bar) und somit auch die Herstellung und den Einsatz längerer Kapillarsäulen. Dazu kommt die hervorragende UV-Transparenz von Quarzglas, so dass nach Entfernen der Polyimidschicht im Detektionsbereich die in der LC übliche UV-Detektion direkt auf bzw. nach der Packung in der Kapillare stattfinden kann. Die Eignung von Quarzglas als elektrischer Isolator ist jedoch die vielleicht wichtigste Eigenschaft für den Einsatz bei elektrophoretischen und elektrochromatischen Trennmethode.

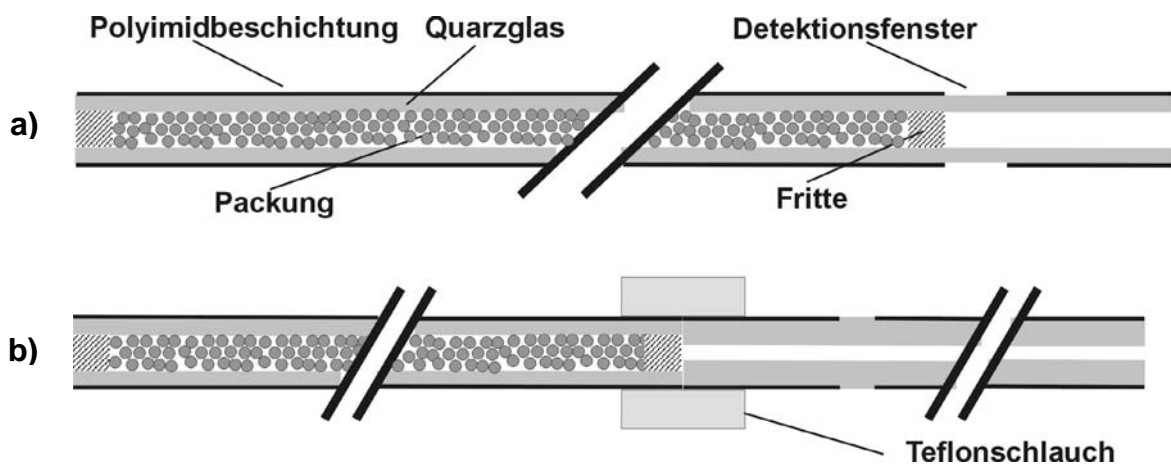
In der CEC werden üblicherweise Kapillarsäulen mit einer Länge zwischen 15 und 30 cm betrieben, wobei durchaus auch Säulenlängen von 5–100 cm verwendet werden. Standard Außen- und Innendurchmesser sind 365 bzw. 100 µm. Die Durchmesser können jedoch je nach Anwendung variiert werden, und so sind die verschiedensten Dimensionen zu finden (ID: 10-340 µm; OD: 144-440 µm). Da die Materialkosten zur Herstellung von Kapillarsäulen sehr gering sind, werden sie bis heute von den meisten Anwendern selbst produziert. Der hohe Anteil an Eigenproduktion führte zu einer verspätet angelaufenen kommerziellen Produktion und Entwicklung von CEC-Säulen. So sind heute für cHPLC und CE eine Vielzahl verschiedener kommerzieller Trennkapillaren verfügbar, während für die CEC nur eine begrenzte kommerzielle Auswahl zur Verfügung steht.

#### 3.3.1 Kapillarsäulenkonzepte

Trotz ihrer unbestreitbaren Vorteile hat die CEC bislang keinen Einzug als Routineapplikation in analytische Laboratorien gehalten. Die Gründe liegen neben anderen in den technischen Problemen, die mit der CEC verbunden sind:

- Die Haltbarkeit gesinterter Fritten, welche üblicherweise das Packungsmaterial in der Kapillare fixieren, ist begrenzt und teilweise schlecht reproduzierbar.
- Die durch den Sintervorgang verursachte Beschädigung der an die Oberfläche gebundenen Phase kann zur Zerstörung einer ansonsten möglicherweise geglückten Trennung führen.
- Die Wahl des Packungsmaterials ist limitiert durch die notwendige Fähigkeit des Materials einen EOF zu generieren und mit ihr Fritten zu sintern. Falls sich das Packungsmaterial nicht sintern lässt, muss ein anderes dafür geeignetes Material an dieser Stelle platziert und gesintert werden (u.U. sehr aufwendig). Auch diese erzwungenermaßen eingeführte Fremdoberfläche kann zur Zerstörung oder zumindest Verschlechterung einer Trennung durch Bandenverbreiterung führen (Rebscher et al [115]).
- Durch nicht ausreichend entgaste mobile Phase, Inhomogenitäten in der Auslass-Fritte (durch das Sintern zu stark veränderte Porosität bzw. Tortuosität) und durch teilweise starken Druckabfall in der mobilen Phase beim Verlassen der Packung in das offene Kapillarsegment kommt es zu Blasenbildung [116,117,118]. Schon bei geringer Blasenbildung wird eine zuverlässige Detektion nahezu unmöglich, bei zunehmender Blasenbildung kann es durch eine Unterbrechung des Stromkreises zum Zusammenbruch des EOFs kommen.
- Die Lebensdauer einer CEC-Säule mit gesinterter Ein- und Auslassfritte (Abbildung 3-11a) ist im Vergleich mit analytischen HPLC-Säulen deutlich verkürzt. Zum einen ist es die Fragilität der Fritten und vor allem des UV-Fensters zum anderen die schlechte Beständigkeit der Kapillaren gegenüber Acetonitril (ACN). ACN lässt das Polyimid aufquellen, führt damit zur Ablösung desselben von der Quarzglasoberfläche und damit zur erhöhten Bruchempfindlichkeit. Durch nach dem Quellen überstehendes Polyimid kann es auch zum Verschluss der Kapillare kommen. Die Problematik der UV-Fensterfragilität kann entschärft werden, indem die gepackte Kapillare nach der Endfritte abgeschnitten und (z.B.: mittels eines Teflonschlauches [119]) an eine OT-Detektionskapillare gesteckt wird (Abbildung 3-11b). Diese Variante weist allerdings bislang auch Defizite auf (siehe unten).





**Abbildung 3-11:** gepackte Kapillarsäulen für die cHPLC und (p)CEC mit gesinterter Ein- und Auslassfritte: **a)** Kapillarsäule aus einem einzigen Kapillarstück, **b)** Zweigeteilte Kapillarsäule, offenes und gepacktes Segment mittels Teflonschlauch verbunden.

Trotz der Probleme findet die Herstellung von gepackten Kapillarsäulen mit zwei gesinterter Fritten, die so genannte *Slurry*-Packmethode [116,120,121] und ihre Varianten [117,122,123] bislang die breiteste Anwendung. Dies ist auf den dafür notwendigen geringen apparativen Aufwand und die geringen Materialkosten zur Herstellung von Kapillarsäulen nach dieser Methode zurückzuführen. Abbildung 3-11a zeigt den schematischen Aufbau einer solchen Kapillar-Trennsäule. Neben dieser Methode, mit gesinterter Fritten aus dem gleichen schon oberflächenmodifizierten Material, gab es auch Versuche zur Herstellung von Kapillarsäulen mit nativen Kieselgel [124], Silikat [125,126,127], Kieselgel/Silikat [128,129,130] oder Sol-Gel [131] Fritten. Aus den zuvor aufgeführten Punkten ist ersichtlich, dass das größte Problem jedoch die Fritten selbst sind. So ist allein ihre Herstellung schon mit Schwierigkeiten verbunden. Werden sie zu lange gesintert, besteht die Gefahr, dass sie undurchlässig werden. Ein zu kurzes Sintern verringert ihre mechanische Stabilität und erhöht die Wahrscheinlichkeit des Brechens der Fritten unter Belastung und das Ausspülen des Packungsmaterials aus der Säule. Um die durch die Fritten verursachten Probleme zu beheben bzw. zu umgehen, wurden in den letzten Jahren verschiedene alternative Kapillarsäulenkonzepte entwickelt. Zum einen die Fixierung der Packung mit Hilfe des sogenannten Brückensteineffektes (siehe Abbildung 3-12), zum anderen die Verwendung durchgehend fixierter Packungen (bzw. monolithischer

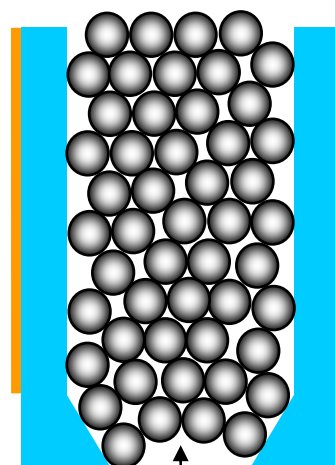
Strukturen). Das Prinzip des kontinuierlichen chromatographischen Bettes kann in verschiedene Typen klassifiziert werden: Poröse monolithische Kapillarsäulen auf Basis anorganischer Sol-Gele (Polysilicate) [132,133,134,135,136], poröse monolithische Kapillarsäulen auf Basis organischer Polymere, z.B. Polyacrylamide [137,138,139,140,141], Polymethacrylate [142,143,144,145,146], PS/DVB [147, 148]), Kapillarsäulen mit vollständig gesinterter partikulärer Packung [149,150], partikuläre Kapillarsäulen mit - durch Einschluss der einzelnen Teilchen in eine Silikat- [151] oder Silan-Matrix [152,153,154,155,156] - fixierter Packung und in Mikrochips geätzte monolithische Mikrostrukturen [157,158,159]. Da im Rahmen dieser Arbeit keine Kapillarmonolithen verwendet wurden, soll im Folgenden nur auf die Fixierung der Packung mittels gesinterter Fritten und die Herstellung von Kapillarsäulen unter Ausnutzung des Brückensteineffektes eingegangen werden.

a)



b)

Gepackte FS-Kapillarsäule  
 ID = 50-250  $\mu\text{m}$   
 OD = 365  $\mu\text{m}$



Kapillarrinnenkonus  
 mit  
 Brückensteineffekt

**Abbildung 3-12:** Anwendungsbeispiele für den Brückensteineffekt: **a)** Klassische Anwendung des Brückensteineffektes bei der Konstruktion von Steinbrücken, **b)** Ausnutzung des Brückensteineffektes zur Rückhaltung von Packungsmaterial in Kapillaren.

Ein effektiver Weg zur flexiblen und reproduzierbaren Herstellung robuster leistungsfähiger Kapillarsäulen ist die prinzipielle Vermeidung von gesinterter Fritten.

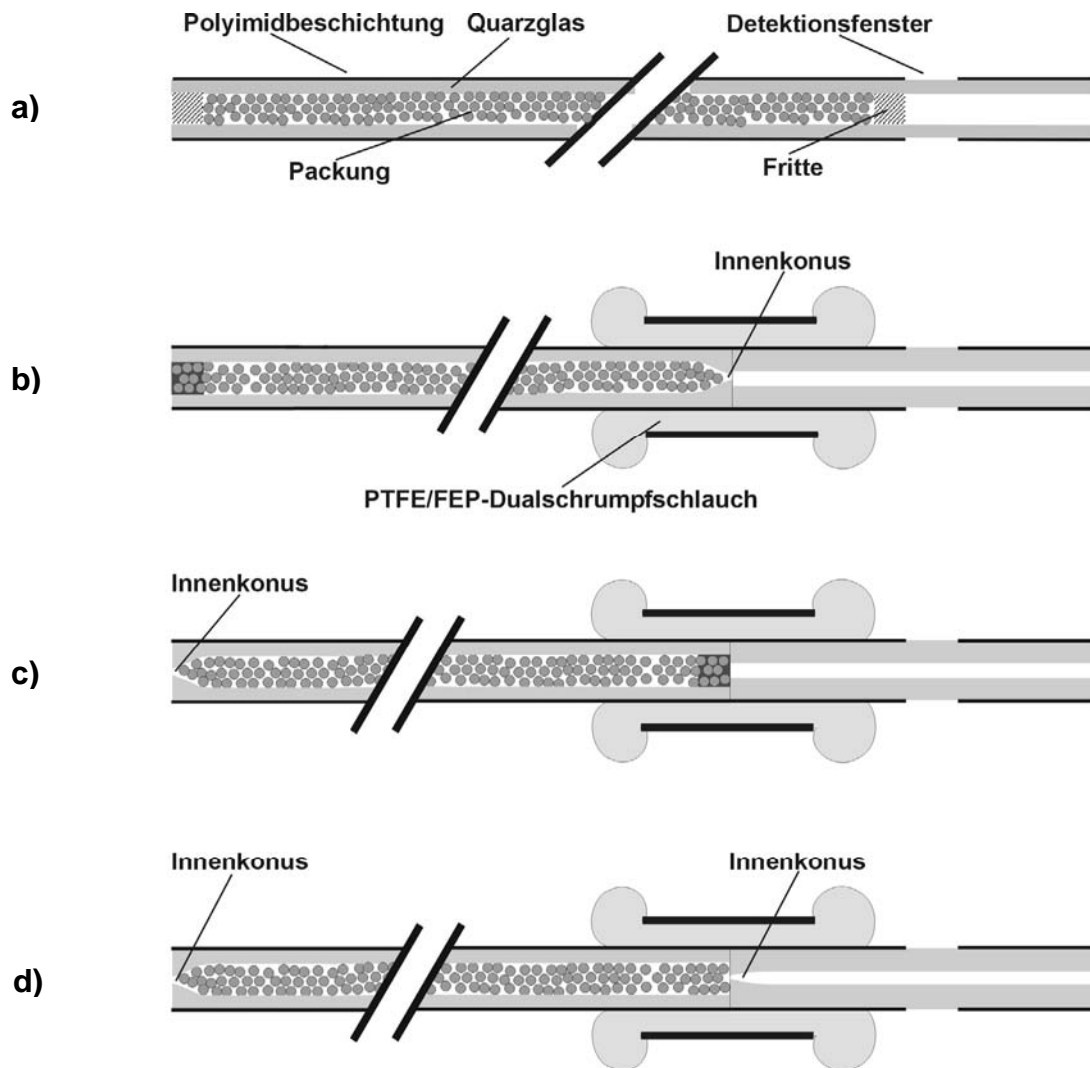
Eine Möglichkeit sind die oben aufgeführten Beispiele durchgehend fixierter Packungen bzw. monolithischer Strukturen. Ein alternativer Schritt in diese Richtung mit partikulär gepackten Betten ist das Säulenkonzept mit nur einer gesinterten Fritte. Die Vermeidung der Auslassfritte verringert das Risiko der Blasenbildung und verhindert die Beschädigung der stationären Phase im Frittenbereich, was wiederum das Risiko der Bandenverbreiterung durch eingeführte Fremdoberfläche senkt. Um zum Beispiel partikuläre Packungen aus auf organischem Polymer basierendem Packungsmaterial zu fixieren, ist ein komplett frittenloses Kapillarsäulenkonzept notwendig. Nur so kann das Einbringen von Fremdmaterial in die Polymer-Packung vermieden werden, da z.B. zum Sintern von Fritten zusätzliches Kieselgel-Packungsmaterial notwendig wäre. Die Ausnutzung des Brückensteineffektes zur Rückhaltung von Packungsmaterial in Kapillaren an dort angebrachten Engstellen (siehe Abbildung 3-12b) wurde schon verschiedentlich demonstriert [160,161,162, 163]. Resultierend aus diesem Brückensteineffekt werden durch solche Konusse auch Partikel zurückgehalten, die selbst wesentlich kleiner sind als die Lochweite der Engstelle. Somit wird an dieser Stelle das Sintern einer Fritte oder das Einbringen eines *Inline*-Filters überflüssig. Es wurde auch gezeigt [160,162], dass 3 µm Teilchen durch doppelseitige Engstellen in Kapillaren oder angekoppelte Widerstands-Kapillaren mit einem Durchmesser von je 10 µm zurückgehalten werden. Die dort beschriebenen Konfigurationen erlauben allerdings kein Ersetzen eines gebrochenen UV-Detektionsfensters. Da das UV-Detektionsfenster und die gesinterte Auslassfritte die fragilsten Stellen einer FS-Kapillarsäule sind, wäre es wünschenswert das gepackte Kapillarsegment mittels eines robusten, totvolumenfreien, druckstabilen, einfach austauschbaren Kapillarverbinders zu ersetzen. Um das UV-Fenster möglichst nahe der Packung platzieren zu können und den Einsatz solcher Kapillaren auch in kommerziellen (vollautomatisierten) CE(C)-Geräten zu ermöglichen, muss der Kapillarverbinder so klein wie möglich gewählt werden. Bislang vorgestellte Lösungen weisen noch Defizite auf, die da wären: eine Drucklimitierung auf 6 bar [164], eine Limitierung auf relativ geringe elektrische Feldstärken aufgrund mangelnder Dichtigkeit bzw. Durchschlagsfestigkeit [165], sowie die Tatsache das solche Kapillarverbindungen oft nicht wirklich totvolumenfrei sind [164]. Alle bisherigen Ansätze beschäftigen sich aber nur mit einem oder zwei der genannten Probleme. Außerdem wurden die numerischen Grenzen des Kapillarlochweite/ Teilchendurchmesser-Verhältnisses noch nicht näher untersucht.

Im Gegensatz zu den oben genannten Konfigurationen [160,162,164,165], sind die im Folgenden beschriebenen segmentierten Kapillarsäulen robust, druckstabil und durchschlagsfest und somit vielseitig einsetzbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich solche *slurry*-gepackten Kapillarsäulen verwendet. Es wurde sowohl die Herstellung von Kapillarsäulen mit zwei gesinterten Fritten weiterentwickelt als auch die Entwicklung von Kapillarsäulen mit nur einer bzw. ohne Fritte unter Ausnutzung des sogenannten „Brückensteineffektes“ [166] vorangetrieben. Auf die Herstellung dieser drei Varianten wird im Folgenden allgemein und in Kapitel 5.4.1 im Speziellen eingegangen:

### 3.3.2 Verwendete Kapillarsäulenkonzepte

Die gängigste Variante zur Herstellung von Kapillarsäulen ist das Befüllen der Kapillare mit einer stationären Phase analog zur HPLC. Dadurch eröffnet sich die breite Palette der für die HPLC hergestellten Materialien, so dass man für nahezu jedes Trennproblem eine selektive Phase findet. Einzig die notwendige Fähigkeit des Materials, einen EOF zu generieren, limitiert die Auswahl. Meistens werden C8-, C18- oder C30-Phasen auf Kieselgel Basis verwendet, aber auch Ionenaustauschermaterialien, chirale und Aminophasen wurden schon eingesetzt.

Die verwendeten Packungsprozeduren der einzelnen Arbeitsgruppen sind sich im Wesentlichen sehr ähnlich. Zur Herstellung von Kapillarsäulen für die vorliegende Arbeit wurden die in Kapitel 5 im Detail beschriebenen Varianten des sogenannten Druckfiltrationsverfahrens (Nasspackverfahren) [167] angewandt. Bei dieser Methode wird in geeignetem Lösungsmittel suspendiertes, feinkörniges Packungsmaterial (*Slurry*) entweder mit Hilfe einer Pumpe oder elektrokinetisch [122] in die Kapillare gefüllt. In dieser Arbeit ist diese am Ende mit einem HPLC-*Inline*-Filter oder einem Innenkonus versehen, um die Packung zurückzuhalten (vgl. 5.4.1.1, 5.4.1.2 und 5.4.1.3). Robson et al. [123] zeigten, dass auch der Einsatz von superkritischen CO<sub>2</sub> als Lösungsmittel möglich ist. Zur optimalen Verdichtung der Packung in der Kapillare wurde diese während des Packens in ein Ultraschallbad getaucht. Danach wurde die Packung, je nach Eignung des Materials mit ihr Fritten zu sintern, in der Regel durch das Sintern einer Einlass- und/oder einer Auslass-Fritte oder durch einen zweiten Innenkonus fixiert (vgl. Abbildung 3-13).



**Abbildung 3-13:** Verwendete Kapillarsäulenkonzepte: **a)** Kapillarsäule mit zwei gesinterten Fritten, **b)** Kapillarsäule mit einem Innenkonus (als Säulenauslass) und einer gesinterten Einlass-Fritte, **c)** Kapillarsäule mit einem Innenkonus (als Säuleneinlass) und einer gesinterten Auslass-Fritte, **d)** Kapillarsäule mit zwei Innenkonussen (als Säuleneinlass und Säulenauslass).

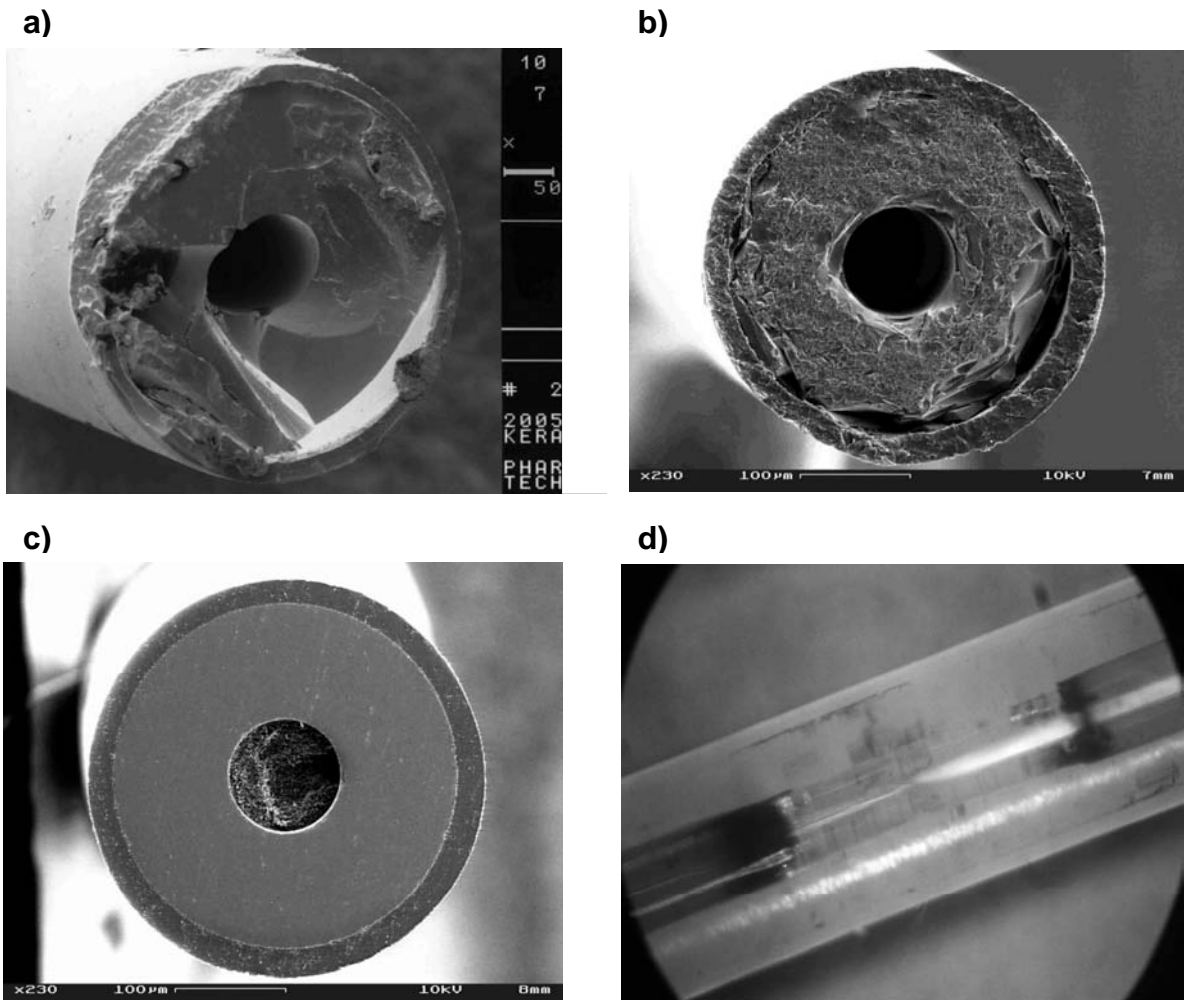
Zuletzt wurde ein Detektionsfenster hergestellt, indem das Polyimid entweder weggebrannt oder weggeschnitten oder durch Behandlung mit starken Säuren aufgequollen und dann mittels eines Skalpell entfernt wurde. Die in Abbildung 3-13 dargestellten Kapillarsäulen wurden nach den in Kapitel 5 beschriebenen Packprozeduren mit Hilfe der in Abbildung 5-2 dargestellten Packapparatur hergestellt.

### 3.3.3 Experimentelle Ergebnisse

#### 3.3.3.1 Zu den Innenkonussen, den Oberflächen der Kapillarenden und den Verbindungsstücken [166]

Zuerst wurde der Bereich der Lochweite für Innenkonusse untersucht, innerhalb dessen sich (je nach Korngröße des Packungsmaterials) ein stabiler Brückensteineffekt ausnutzen lassen kann. Packungsmaterial mit einer Korngröße von 3  $\mu\text{m}$  kann noch mit einer Lochweite von 25  $\mu\text{m}$  verlässlich zurückgehalten werden, bisweilen sogar bei Lochweiten bis zu 35  $\mu\text{m}$ . Das heißt, die Lochweite kann mehr als das 10-fache der Korngröße betragen. Auf der anderen Seite kommt es bei zu kleinen Lochweiten (d.h.  $< 10 \mu\text{m}$ ) häufig zu nicht behebbarem Verstopfen der Engstelle; vor allem beim Schleifen, Spülen und Trocknen der Kapillare. Der optimale Durchmesser für Packungen mit 3  $\mu\text{m}$  Korngröße liegt zwischen 15 und 25  $\mu\text{m}$ . Mit Innenkonussen in diesem Bereich können Kapillarsäulen mit einer Lebensdauer von mindestens 100 Betriebsstunden gepackt werden. Für 1,5  $\mu\text{m}$  Teilchen auf Kieselgel-Basis konnte eine Lochweite von bis zu 16  $\mu\text{m}$  verwendet werden (wiederum Faktor 10), während für 6  $\mu\text{m}$  Teilchen auf PS-DVB-Basis nur bis 45  $\mu\text{m}$  ein stabiler Brückenstein Effekt erzielt werden konnte. Dies ist eventuell auf die engere Korngrößenverteilung des Polymermaterials zurückzuführen.

Des Weiteren wurde untersucht, wie groß die minimale Wandstärke sein muss, um noch stabile Innenkonusse zu produzieren. In Standard Kapillaren mit einem Außendurchmesser von ca. 365  $\mu\text{m}$  können sehr robuste Konusse für Kapillarinne Durchmesser von bis zu 150  $\mu\text{m}$  implementiert werden. Es ist möglich auch Konusse in Kapillaren mit bis zu 250  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser herzustellen. Das entspricht (nach Abzug der PI-Schichtdicke) einer FS-Wandstärke von ca. 40  $\mu\text{m}$ . Dies ist allerdings weitaus schwieriger und es wird wesentlich mehr Ausschuss produziert, da diese dünnwandigen Kapillaren beim Schleifen sehr leicht ausreißen oder gar brechen (zur Herstellung der Kapillarsäulen für die *on-line* NMR-Kopplung war dies aber notwendig). Die Beschaffenheit der Oberfläche der aneinander zu stoßenden Kapillarenden ist von großer Bedeutung. Eine möglichst glatte Oberfläche kann, wie in Abbildung 3-14 verdeutlicht, nur mit der geeigneten Bearbeitungsmethode erhalten werden. Mit einer raueren Oberfläche als in Abbildung 3-14c war es nicht möglich totvolumenfreie, druckstabile und langlebige Kapillarverbindungen herzustellen.



**Abbildung 3-14:** (a-c) Rasterelektronenmikroskopaufnahmen, (d) Lichtmikroskopaufnahme von: **a)** FS-Kapillarende mit Keramikplättchen geschnitten, **b)** FS-Kapillarende nachbearbeitet mit Schleifpapier (P320 Körnung) nass geschliffen, **c)** FS-Kapillarende nachbearbeitet mit Schleifpapier (P4000 Körnung) nass geschliffen, **d)** Totvolumenfreie PTFE-FEP-Dualschumpfschlauch-Verbindung des konusgepackten Kapillarsegments (rechts) mit dem offenen Detektionskapillarsegments (links), 67-fache Vergrößerung.

Neben den erfolgreich verwendeten PTFE-FEP-Dualschumpfschläuchen (vgl. Abbildung 3-14d) zeitigte die Verwendung anderer PTFE-Kapillarverbinder nicht den gewünschten Erfolg. So waren mit nicht schrumpfenden PTFE Schlauchstücken (OD 1,6 mm / ID 0,3 mm / Länge 8-10 mm) verbundene Kopplungsstellen nicht druckstabil und nicht immer totvolumenfrei. Dahingegen fehlte es den Kapillarkopplungen, die mittels eines einfachen und damit relativ dünnwandigen PTFE-Schumpfschlauches erzeugt wurden, an der nötigen mechanischen Stabilität gegen seitliches Abknicken.

### 3.3.3.2 Abstimmung der Innendurchmesser der Kapillarsegmente bezüglich Fließgeschwindigkeit und Bandenverbreiterung [166]

Am Auslassende gepackter Betten kann es leicht zur Blasenbildung kommen [19,43], falls es beim Übergang vom gepackten in das offene Segment aufgrund der abrupten Zunahme des effektiven Kapillar-Querschnittes zu einem zu starken Druckabfall kommt. Aufgrund ihrer - durch den Sinterprozess unter Umständen sehr stark verringerten - Durchlässigkeit (d.h. veränderte Porenstruktur und Porosität) kann natürlich auch die Fritte selbst der Entstehungsort sein. In den in 5.4.1.2 und 5.4.1.3 beschriebenen Kapillarsäulenkonzepten ohne Auslassfritte dient das offene Segment neben der UV-Detektion auch als Widerstandskapillare und vermindert somit den Druckabfall an der Kopplungsstelle. Der Innendurchmesser der offenen Kapillare wurde so gewählt, dass die Querschnittsfläche der offenen Kapillare möglichst genau der effektiven (interpartikulären) Querschnittsfläche des Zwischenkornraumes im gepackten Segment entspricht. Die externe Porosität solch einer ungeordneten Kugelpackung liegt bei ungefähr 0,4 [168]. Dieser Wert wurde im Folgenden verwandt, um die zum gepackten Segment korrespondierenden Durchmesser für die offenen Segmente zu berechnen (vgl. Tabelle 3-3)

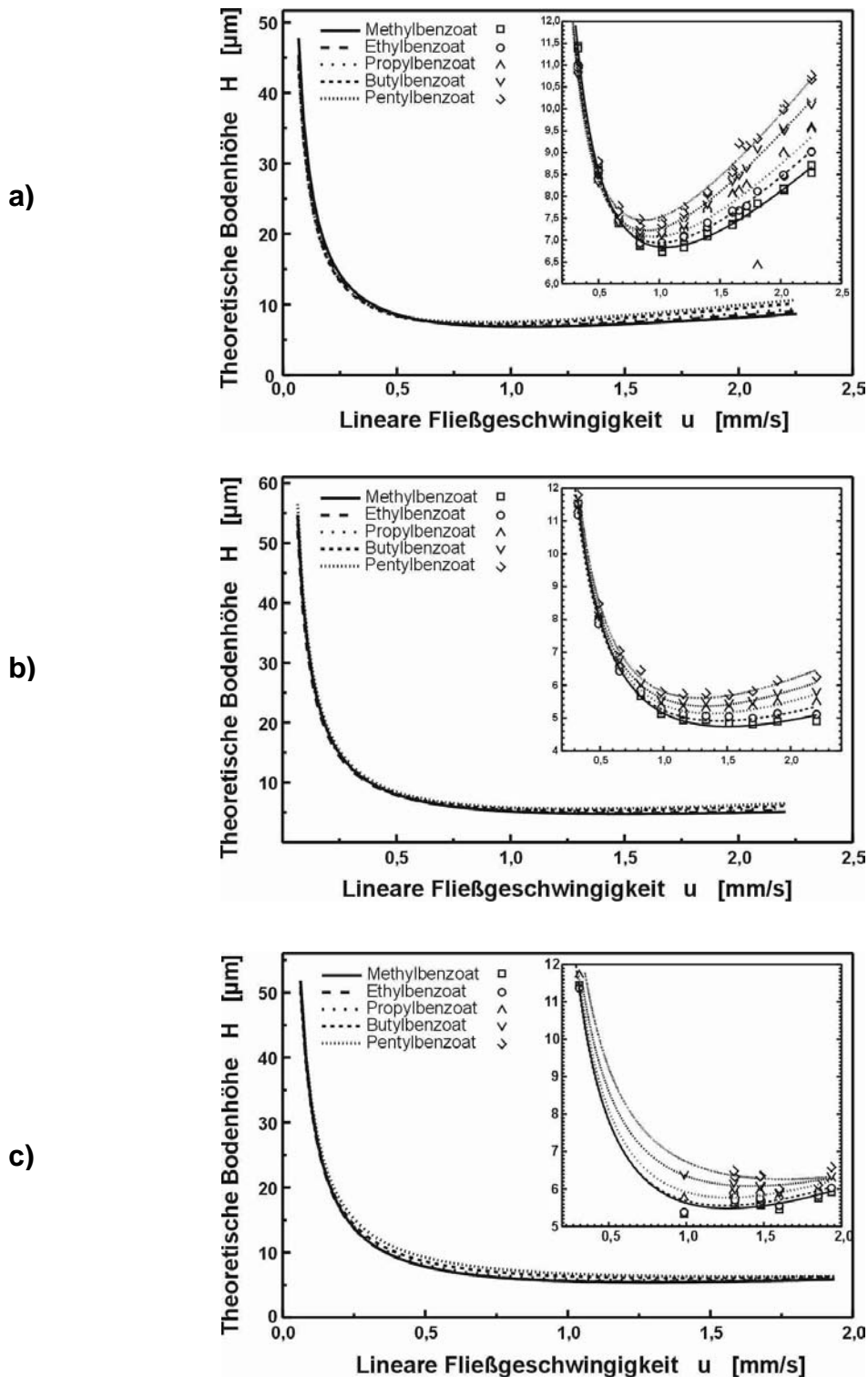
<b>ID<sub>100%</sub> [µm]</b>	<b>Ø<sub>100%</sub> [µm<sup>2</sup>]</b>	<b>Ø<sub>40%</sub> [µm<sup>2</sup>]</b>	<b>ID<sub>40%</sub> [µm]</b>	<b>ID<sub>praktikabel</sub> [µm]</b>
<b>250</b>	49087.40	19634.95	158.12	150
<b>180</b>	25466.90	10178.80	113.84	100
<b>150</b>	17671.46	7068.58	94.86	75
<b>100</b>	7853.98	3141.59	63.24	50
<b>75</b>	4417.86	1767.15	47.44	30
<b>50</b>	1963.50	785.40	15.81	10

**Tabelle 3-3:** Berechnete optimale IDs der Detektionskapillare relativ zum gepackten Segment und die in der Praxis erhältlichen und eingesetzten IDs ( $ID_{100\%}$  = Innendurchmesser des gepackten Kapillarsegments,  $\varnothing_{100\%}$  = Querschnittsfläche des gepackten Kapillarsegments,  $\varnothing_{40\%}$  = Interpartikuläre Querschnittsfläche des gepackten Kapillarsegments,  $ID_{40\%}$  = Innendurchmesser des offenen UV-Detektions-segments einer der interpartikulären Querschnittsfläche des gepackten Kapillarsegments entsprechenden Querschnittsfläche,  $ID_{praktikabel}$  = Nächst kleinerer kommerziell erhältlicher ID als  $ID_{40\%}$ ).

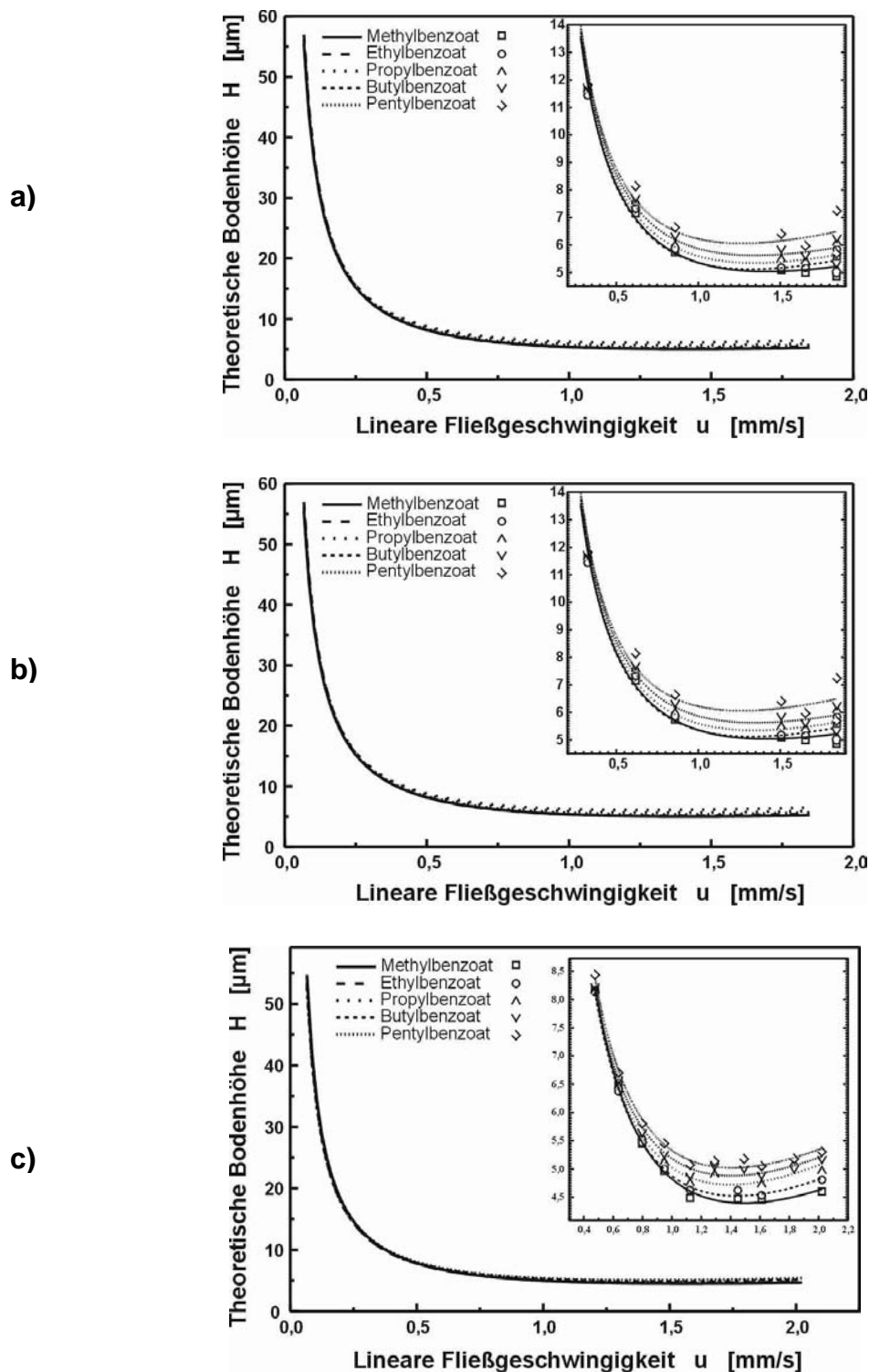


Im Experiment wurde gefunden, dass der optimale Durchmesser für die offene Kapillare etwas kleiner sein sollte als der berechnete. So wurde der auf den berechneten Wert folgende, nächst kleinere, kommerziell erhältliche Innendurchmesser gewählt (vgl.  $ID_{\text{praktikabel}}$ ). Größere Durchmesser (z.B.:  $75 \mu\text{m } ID_{\text{offen}}$  an  $100 \mu\text{m } ID_{\text{gepackt}}$ ) führten zu einer Zunahme der Bodenhöhe und einem steileren Anstieg im rechten Ast der H/u-Kurve (vgl. Abbildung 3-15a). Diese zusätzliche Bandenverbreiterung kann dem Druckabfall am Säulenauslass zugeschrieben werden. Der Druckabfall ist das Ergebnis der nicht angeglichenen Querschnittsflächen des offenen und des gepackten Segments [169] und verursacht möglicherweise sogar Flussturbulenzen. Dass die Zunahme der Bodenhöhe kein Resultat eines schlecht gepackten Bettes ist, wurde überprüft, indem das zu große offene UV-Detektionssegment gegen ein geeignetes Segment mit kleinerem Innendurchmesser (z.B.  $50 \mu\text{m } ID_{\text{offen}}$ ) ausgetauscht wurde (vgl. Abbildung 3-15b). Mit diesem passenden Innendurchmesser ist die Druckveränderung vernachlässigbar klein und sowohl Blasenbildung als auch Bandenverbreiterung werden unterdrückt, ohne zu einer Verringerung des elektroosmotischen Flusses zu führen. Dieser Druckausgleich ist auch für Kapillaren mit  $150 \mu\text{m}$  Innendurchmesser im gepackten Segment und  $75 \mu\text{m}$  Innendurchmesser im gepackten Segment gegeben (vgl. Abbildung 3-15c). Bei gelungenem Druckausgleich konnte auch kein Unterschied für verschiedene Abstände ( $0,5$  bzw.  $2,0 \text{ cm}$ ) des UV-Detektionsfensters vom gepackten Segment festgestellt werden (vgl. Abbildung 3-15b und Abbildung 3-16a). Dies ist von erheblicher praktischer Bedeutung, da der Anwender (beim Einsatz segmentierter Kapillarsäulen) je nach vorhandenem kommerziellen CE-Gerät dazu gezwungen ist, das UV-Fenster bis zu zwei Zentimeter hinter der Packung zu platzieren.

Bei Versuchen, Kapillaren mit  $10$ ,  $20$  oder auch  $30 \mu\text{m}$  Innendurchmesser an ein gepacktes  $100 \mu\text{m}$  ID Segment zu koppeln, war es nicht notwendig die Packung am Säulenauslass mittels eines Innenkonusses zurückzuhalten, der Brückenstein-Effekt bildete sich auch ohne denselbigen aus. Für diese, verglichen mit dem berechneten Optimum, doch signifikant kleineren Durchmesser, wurden allerdings auch deutlich geringere maximale EOF-Geschwindigkeiten erreicht. Im Vergleich zu den als optimal befundenen  $50 \mu\text{m}$  ID, wurden für  $20$  bzw.  $30 \mu\text{m}$  ID Kapillaren (gekoppelt an ein gepacktes Segment mit  $100 \mu\text{m}$  ID)  $3,0$ - bzw.  $1,5$ -fach geringere Flussraten gefunden.



**Abbildung 3-15:** Van-Deemter-Kurven verschiedener Kapillarsäulen-Setups: **a)** Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (Einlass), PT-ID  $100\ \mu\text{m}$ ; OT-ID  $75\ \mu\text{m}$ , UV-Detektion  $2,0\ \text{cm}$  nach der Packung. **b)** Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (Einlass), PT-ID  $100\ \mu\text{m}$ ; OT-ID  $50\ \mu\text{m}$ , UV-Detektion  $2,0\ \text{cm}$  nach der Packung. **c)** Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (Einlass), PT-ID  $150\ \mu\text{m}$ ; OT-ID  $75\ \mu\text{m}$ , UV-Detektion  $2,0\ \text{cm}$  nach der Packung.



**Abbildung 3-16:** Van-Deemter-Kurven verschiedener Kapillarsäulen-Setups: **a)** Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (Einlass), PT-ID  $100 \mu\text{m}$ ; OT-ID  $50 \mu\text{m}$ , UV-Detektion  $0,5 \text{ cm}$  nach der Packung. **b)** Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (Einlass) und ohne Konus am Auslass, PT-ID  $100 \mu\text{m}$ ; OT-ID  $30 \mu\text{m}$ , UV-Detektion  $2,5 \text{ cm}$  nach der Packung. **c)** Segmentierte Kapillarsäule ohne Fritten (Konus am Einlass und Auslass), PT-ID  $100 \mu\text{m}$ ; OT-ID  $50 \mu\text{m}$ , UV-Detektion  $2,0 \text{ cm}$  nach der Packung.

Dies kann nicht auf den sich in diesen zu engen Kapillaren aufbauenden Gegendruck zurückgeführt werden, da ein in einer geeigneten Packung generierter EOF Gegendrucke von bis zu 700 bar ohne weiteres überwinden kann [170]. Vielmehr ist dieses Phänomen mit dem Ohmschen Gesetz zu erklären.

$$U = R \cdot I \quad \text{(Gl. 3-33)}$$

*Annahme:*

Für ein 20 cm gepacktes Segment (100  $\mu\text{m}$  ID)  $\emptyset_{\text{effektiv}} = 3141,59 \mu\text{m}^2$  gilt:

$$U_1 = R_1 \cdot I_1 \quad \text{(Gl. 3-34)}$$

Für ein 10 cm offenes Segment (20  $\mu\text{m}$  ID)  $\emptyset_{\text{absolut}} = 314,16 \mu\text{m}^2$  gilt:

$$U_2 = R_2 \cdot I_2 \quad \text{(Gl. 3-35)}$$

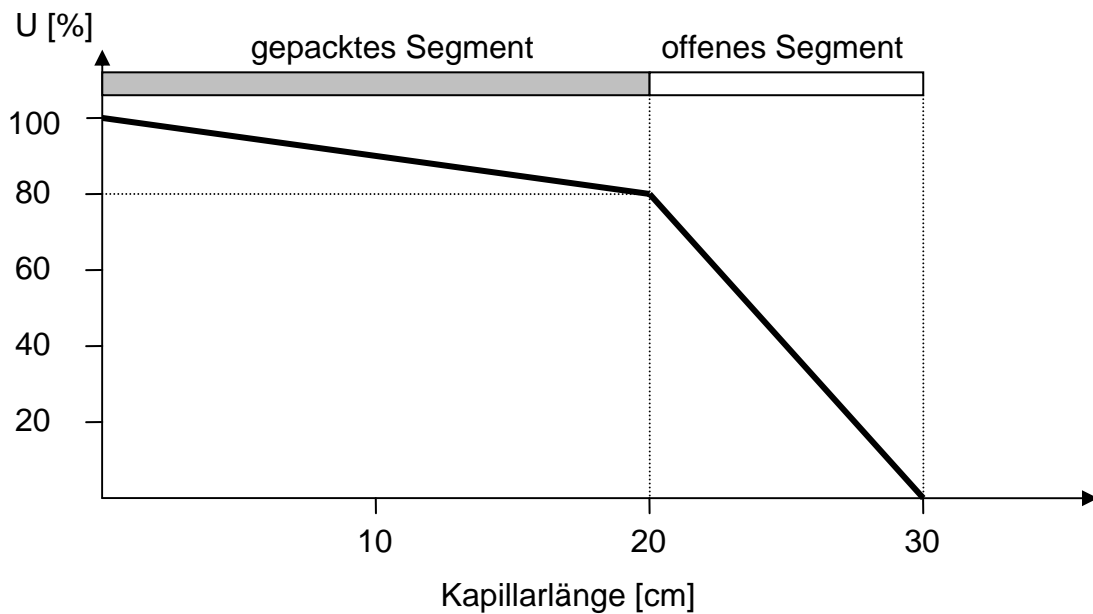
Koppelt man die beiden Segmente, muss die Bedingung  $I_1 = I_2$  erfüllt sein (Stromkonstanz), daraus folgt:

$$U_1 / R_1 = U_2 / R_2 \quad \text{(Gl. 3-36)}$$

Somit ergibt sich aus den angenommenen Kapillarlängen und Querschnittsflächen:

$$R_2 = 5R_1 \quad \text{(Gl. 3-37)}$$

Dies hat zur Folge (einsetzen in (Gl. 3-36), dass der Spannungsabfall im offenen Segment 5 mal größer sein muss als im gepackten Segment und somit nur 1/5 des angelegten elektrischen Feldes auf die Packung wirkt (vgl. Abbildung 3-17), welche Aufgrund ihres (im Vergleich zum offenen Segment) immens hohen Oberfläche/Volumen-Verhältnisses nahezu ausschließlich für die Generierung des EOFs verantwortlich zu zeichnen ist. Somit können bei dieser Anordnung 4/5 der angelegten Spannung nicht zur Erzeugung des EOFs genutzt werden.



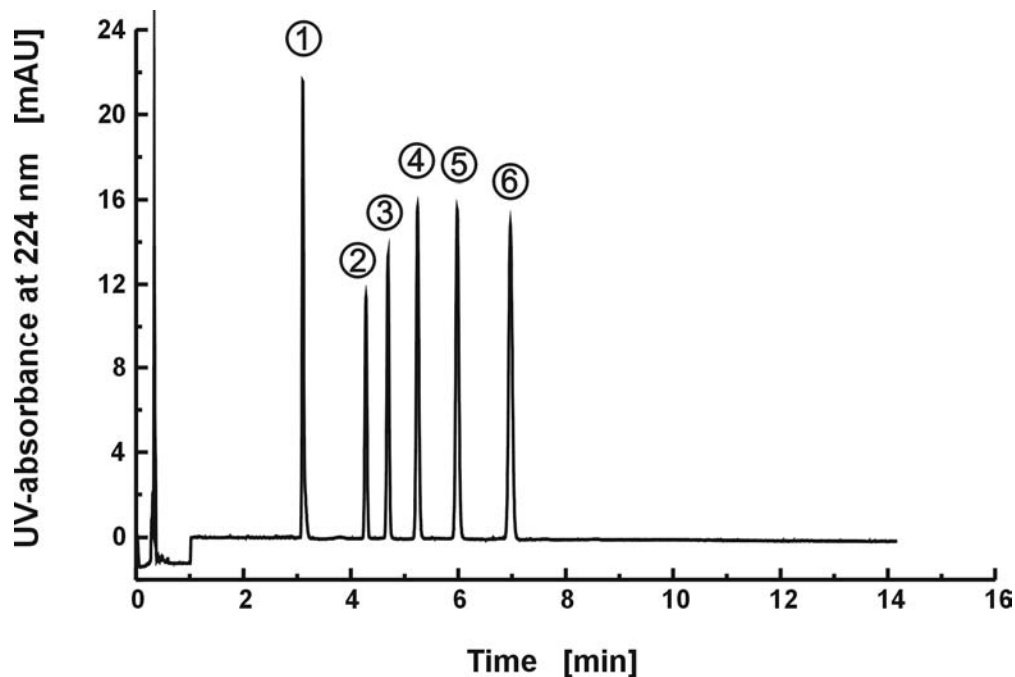
**Abbildung 3-17:** Verlauf des Spannungsabfalls über eine segmentierte Kapillarsäule mit den o.g. Dimensionen.

Die H/u-Kurven einer solchen Kapillarsäule (PT-ID 100  $\mu\text{m}$ ; OT-ID 30  $\mu\text{m}$ ) sind in Abbildung 3-16b dargestellt. Die daraus ersichtliche vergrößerte theoretische Bodenhöhe ist vermutlich ein Resultat von Störungen des *plug-flow* Profils des reinen EOFs. Dies kann durch ein (durch Gegendruck erzeugtes) negatives laminares Flussprofil und/oder durch Fluss-Asymmetrien im nicht ganz rotationssymmetrisch geweiteten UV-Detektionsfenster (*bubble-cell*) verursacht worden sein. Die Weitung des UV-Fensters zur Verlängerung des Lichtweges im Detektionsfenster ist notwendig, um für UV-Detektionskapillaren mit sehr kleinem Innendurchmesser annehmbare Sensitivitäten zu erreichen.

### 3.3.3.3 Vergleich verschiedener Kapillarsäulendesigns [166]

Die Effizienzen einer optimierten Kapillarsäule mit nur einer Fritte sind in der Regel besser oder zumindest vergleichbar mit den üblichen Kapillarsäulendesigns mit zwei Fritten. Mit ihnen können ohne weiteres reduzierte theoretische Bodenhöhen von 1,57 (dies entspricht 212000 Böden/Meter) mit einer Packung aus 3  $\mu\text{m}$  Teilchen erreicht werden (vgl. Abbildung 3-15b&c). Das Frittenlose Kapillarsäulendesign erlaubt die Herstellung von Säulen mit exzellenter Trennleistung. Die Effizienz dieser

Kapillarsäulen kann anhand einiger van-Deemter-Kurven (vgl. Abbildung 3-16c) mit reduzierten theoretischen Bodenhöhen bis zu  $1,44 \mu\text{m}$  (dies entspricht 232000 Böden/Meter mit einer Packung aus  $3 \mu\text{m}$  Teilchen) demonstriert werden. Die beeindruckende Trennleistung einer solchen Kapillarsäule sei nochmals in Abbildung 3-18 dargestellt, einer Trennung der homologen Reihe von fünf Benzoesäurealkylestern. Nach dem Konditionieren einer Säule konnten mit ihr über 100 dieser Trennungen mit guter Reproduzierbarkeit absolviert werden.



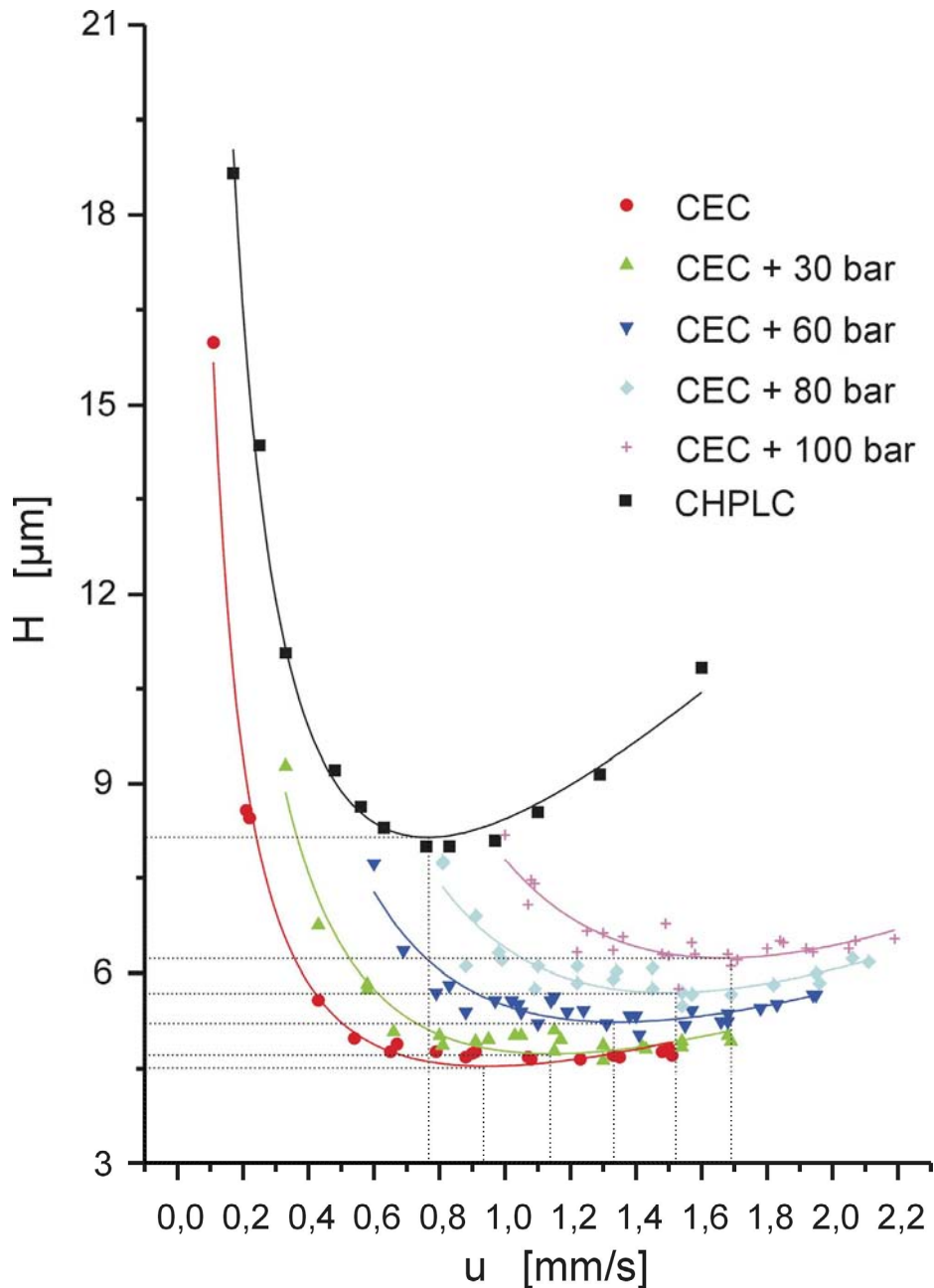
**Abbildung 3-18:** Elektrochromatogramm einer Benzoatmischung, aufgetrennt mit einer frittenlosen Kapillarsäule. Die Analyten in Reihenfolge ihrer Elution: ① Thioharnstoff ( $t_0$ ), ② Methyl-, ③ Ethyl-, ④ Propyl-, ⑤ Butyl- and ⑥ Pentylbenzoat.

### 3.4 Einfluss der Druckunterstützung auf die Trennleistung der pCEC [194]

Wie im Einleitungskapitel 1.2.3 angeführt, besitzt die druckunterstützte Kapillarelektrochromatographie (pCEC) gegenüber der reinen CEC deutliche Vorteile. Sie ist ein flexibler, robuster und leistungsfähiger Hybrid aus der rein elektrokinetisch betriebenen CEC und der rein hydrodynamisch betriebenen cHPLC. Zum einen können elektrokinetische Systeme durch den zusätzlichen Druck stabilisiert und somit Probleme aufgrund von Blasenbildung verringert bzw. komplett vermieden werden. Zum anderen erlaubt die dazu notwendige zusätzliche Pumpanlage einen schnellen Wechsel des Eluenten (z.B. Spülschritte, Stufengradienten oder kontinuierliche Gradientenelution), ohne dass die Kapillare aus dem System ausgebaut und dabei der Gefahr einer Beschädigung ausgesetzt werden muss. Durch Kombination von Druck und EOF werden deutlich höhere Flussraten ermöglicht, wodurch sich die Analysenzeit ganz erheblich verkürzen lässt. Der einzige Nachteil der pCEC gegenüber der reinen CEC ist die verringerte Trennleistung. Mit zunehmendem Druck überlagert sich das elektrokinetische stempelartige Flussprofil des EOFs der reinen CEC mit dem hydrodynamischen parabolischen Flussprofil des Druckbetriebes und somit verringert sich die Gesamttrennleistung. Daher liegen die Bodenzahlen der pCEC immer zwischen denen der reinen CEC und der reinen cHPLC. Bislang gab es kaum Untersuchungen darüber, welchen Einfluss die zusätzlich angelegten Drücke auf die Bodenzahl und damit auf die Trennleistung haben. Behnke [171] konnte zwar zeigen, dass wie erwartet mit zunehmendem Druck die Bodenzahl abnimmt, jedoch wurden keine differenzierteren Angaben darüber hinaus gemacht. Die verwendeten Drücke waren eher hoch ( $> 80$  bar) und lagen deutlich über denen, die zur Stabilisierung des Systems notwendigen wären. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ab wann der hydrodynamische Fluss mit seinem laminaren Flussprofil das Gesamtflussprofil deutlich beeinflusst und zu einer drastischen Verringerung der Zahl der theoretischen Böden führt. Die Ermittlung optimaler Trennbedingungen für die praktische Anwendung sollte dadurch erleichtert werden.

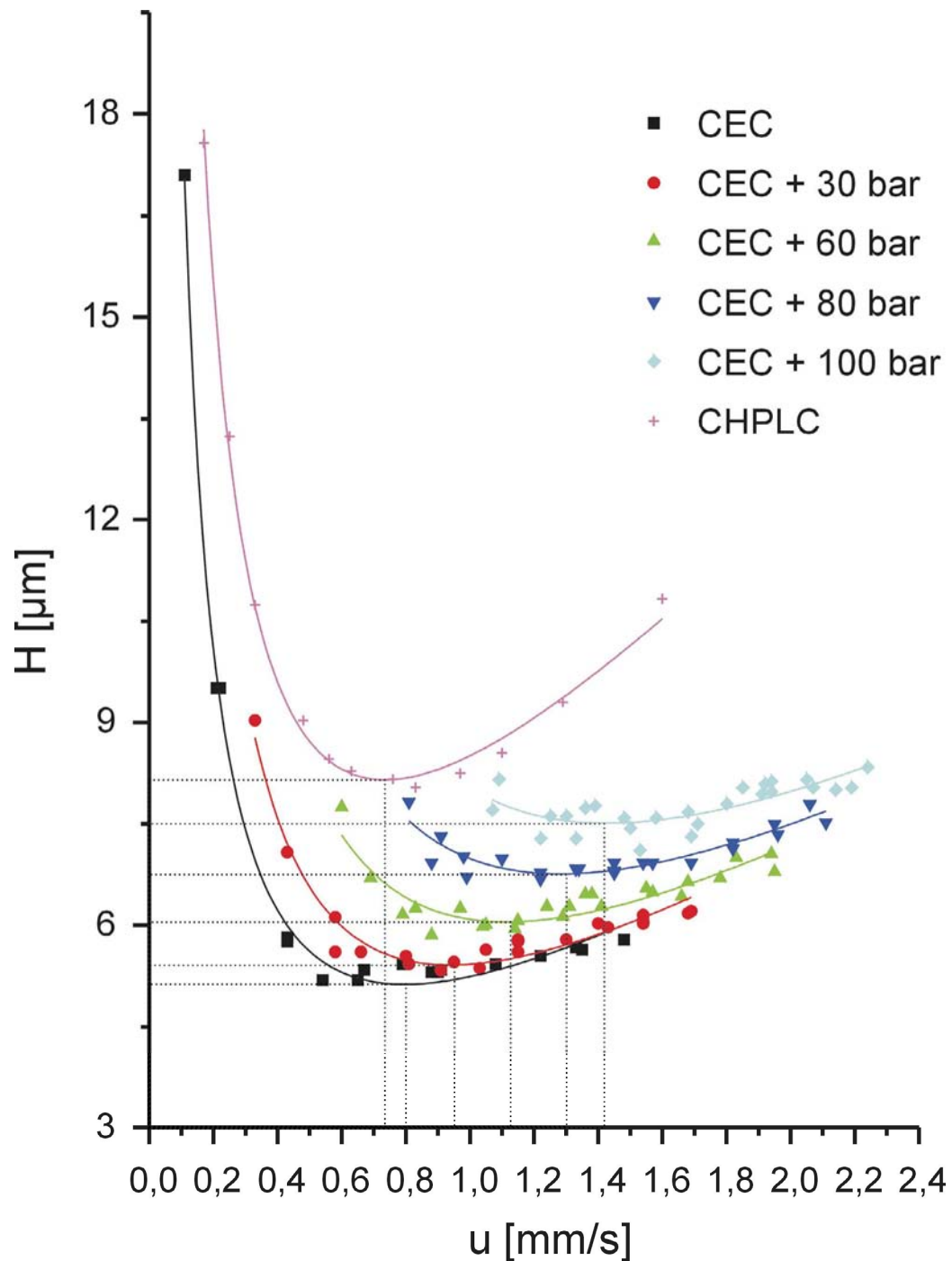
In Abbildung 3-19 sind die H/u-Kurven für die nur schwach retardierte Substanz Methylbenzoat ( $k' = 0,4$ ) und in Abbildung 3-20 sind die H/u-Kurven für eine stärker retardierte Verbindung (Butylbenzoat,  $k' = 1,1$ ) für verschiedene Kombinationen von druckbetriebenem und elektroosmotischem Fluss dargestellt. Zur besseren Übersicht

sind reduzierte Bodenhöhen ( $h$ ), Bodenzahlen ( $N$ ) und lineare Fließgeschwindigkeiten ( $u$ ) der Kurvenminima aus Abbildung 3-19 und Abbildung 3-20 in Tabelle 3-4 und Tabelle 3-5 aufgelistet.



**Abbildung 3-19:** Vergleich der Bodenhöhen als Funktion der Fließgeschwindigkeit unter cHPLC-, CEC- und pCEC-Bedingungen (Methylbenzoat).

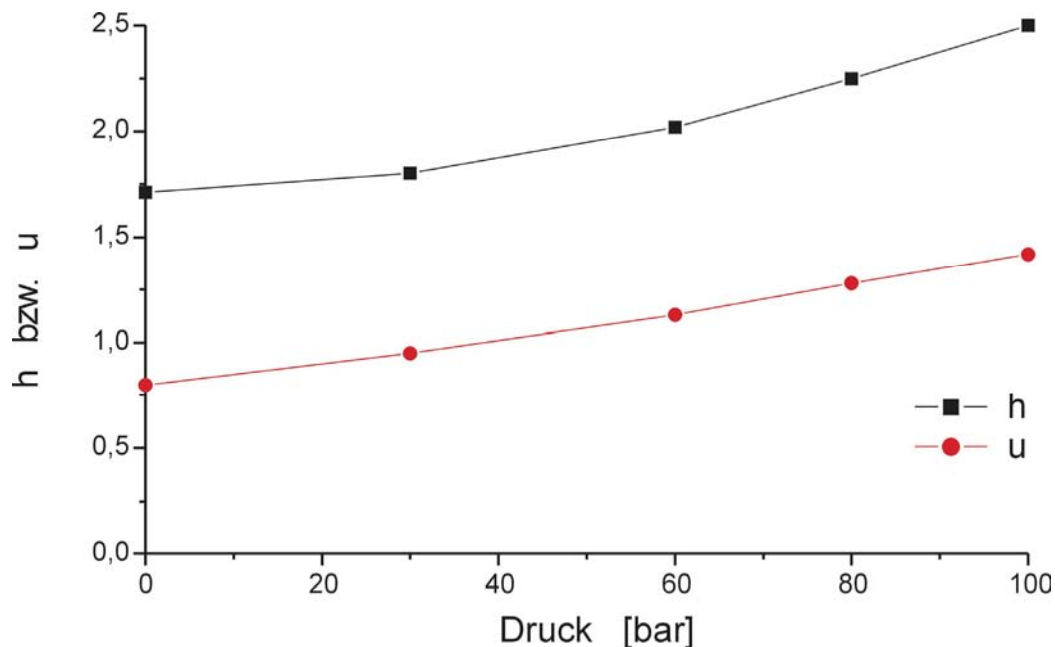




**Abbildung 3-20:** Vergleich der Bodenhöhen als Funktion der Fließgeschwindigkeit unter CHPLC-, CEC- und pCEC-Bedingungen (Butylbenzoat).

Für beide Substanzen nehmen die theoretischen Bodenhöhen wie erwartet mit größer werdendem Druck zu. Dieser Effekt ist jedoch bei einem angelegten Druck von 30 bar eher gering, so dass die Bodenzahlen für Methylbenzoat noch 96%, bzw. für Butylbenzoat 94% der reinen CEC-Kurve betragen. Dieser Druck reicht aus, um das System zu stabilisieren, d.h. Blasenbildung zu vermeiden. Unter diesen

Bedingungen ist es also möglich, stabile pCEC-Trennungen mit einer etwas verkürzten Analysenzeit durchzuführen, welche eine annähernd gleiche Trennleistung wie die CEC-Läufe aufweisen. Mit höherem Einlass-Druck, der für eine signifikante Verkürzung der Analysendauer notwendig ist, nimmt die reduzierte Bodenhöhe überproportional zu, während sich für die Fließgeschwindigkeit ein annähernd linearer Verlauf ergibt (Abbildung 3-21). Dennoch liegt  $h$  selbst bei hohen Drücken (100 bar) noch deutlich unter den Werten für die cHPLC. Bei Trennungen, welche unter diesen Bedingungen durchgeführt werden, steht nicht mehr die Stabilisierung des Systems oder die hohe Trennleistung im Vordergrund, sondern die resultierenden hohen Flussraten und die damit verkürzten Analysenzeiten der pCEC.



**Abbildung 3-21:** Reduzierte Bodenhöhe  $h$  und Fließgeschwindigkeit  $u$  der pCEC-Messungen (im Kurvenminimum, Abbildung 3-20) in Abhängigkeit vom angelegten Druck.

Aufgrund der längeren Verweilzeit auf der Säule und den damit verbundenen Diffusionsprozessen sind die Peaks später eluierender Substanzen breiter und weisen geringere Bodenzahlen auf. Vergleicht man die beiden hier untersuchten Substanzen, so zeigt sich in Übereinstimmung zu obiger Annahme, dass die Bodenzahlen für Methylbenzoat immer über denen für Butylbenzoat liegen. Die Bodenzahlen unter reinen CEC-Bedingungen sind für das Methylbenzoat um 80% besser als in der cHPLC und nur um 59% besser für Butylbenzoat. Mit

zunehmendem Druck vergrößern sich die reduzierten Bodenhöhen für die stärker retardierende Verbindung wesentlich schneller als für die schwächer retardierende Substanz. So ist die Bodenzahl für Methylbenzoat bei Anlegen von 100 bar immer noch um 31% besser als unter cHPLC-Bedingungen und liegt genau zwischen den Bodenzahlen der CEC und cHPLC. Für das Butylbenzoat dagegen ergibt sich nur noch eine Verbesserung um ca. 8%. Bei schwächer retardierenden Substanzen hat also der zusätzliche Druck der pCEC einen wesentlich geringeren Einfluss auf die Trennleistung als für stärker retardierende Verbindungen. Vergleicht man die Flussraten, so zeigt sich, dass der zusätzliche Druck bei Methylbenzoat das Optimum etwas stärker zu höheren Flussraten verschiebt als bei Butylbenzoat. Bei 100 bar zusätzlichem Druck erhält man - im Vergleich zur reinen CEC - für Methylbenzoat eine um 80% und für Butylbenzoat eine um 73% verkürzte Analysendauer.

	<b>u [mm/s]</b>	<b>N [Böden/m]</b>	<b>reduzierte Bodenhöhe h</b>
<b>cHPLC</b>	0,76	123.000	2,71
<b>CEC</b>	0,93	222.200	1,50
<b>pCEC (30 bar)</b>	1,13	212.300	1,57
<b>pCEC (60 bar)</b>	1,32	192.700	1,73
<b>pCEC (80 bar)</b>	1,51	176.400	1,89
<b>pCEC (100 bar)</b>	1,68	161.000	2,07

**Tabelle 3-4:** Lineare Fließgeschwindigkeiten  $u$ , Bodenzahlen  $N$  und reduzierte Bodenhöhen  $h$  der Kurvenminima aus Abbildung 3-19.

	<b>u [mm/s]</b>	<b>N [Böden/m]</b>	<b>reduzierte Bodenhöhe h</b>
<b>cHPLC</b>	0,74	123.000	2,71
<b>CEC</b>	0,80	196.100	1,71
<b>pCEC (30 bar)</b>	0,95	185.200	1,80
<b>pCEC (60 bar)</b>	1,13	165.000	2,02
<b>pCEC (80 bar)</b>	1,31	148.200	2,25
<b>pCEC (100 bar)</b>	1,42	133.300	2,5

**Tabelle 3-5:** Lineare Fließgeschwindigkeiten  $u$ , Bodenzahlen  $N$  und reduzierte Bodenhöhen  $h$  der Kurvenminima aus Abbildung 3-20.

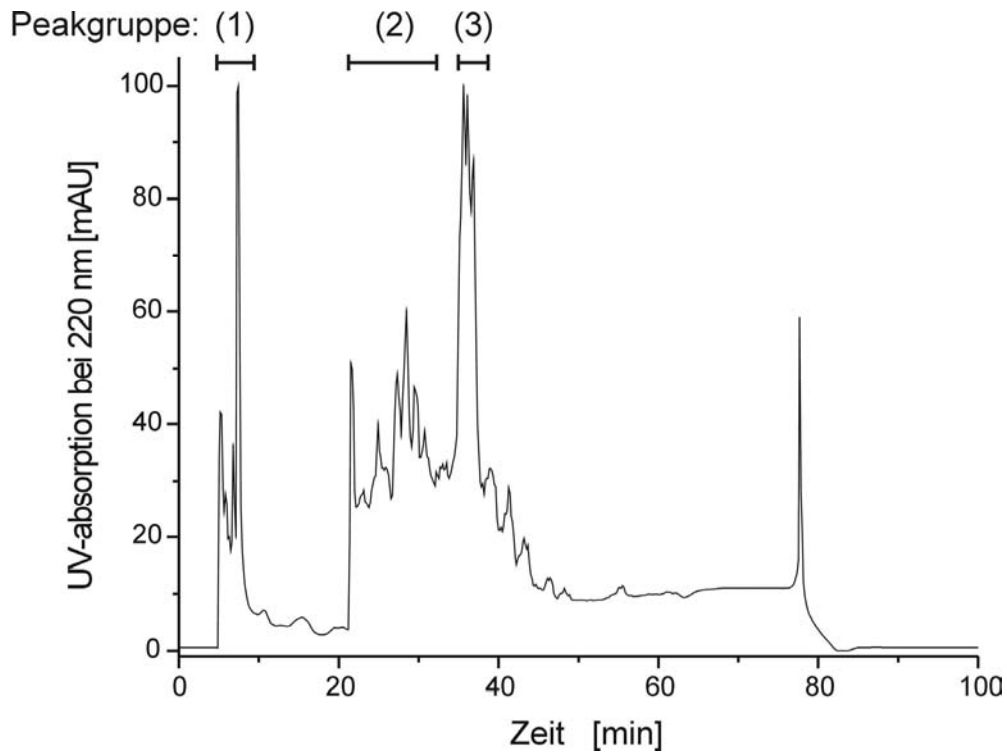
Die durchgeführten Messungen zeigen, dass bei niedrigen Drücken ( $< 60$  bar) die pCEC durchaus mit der CEC bezüglich der Trennleistung konkurrieren kann. Bei höheren Drücken nimmt die Bodenzahl für stärker retardierte Substanzen zwar fast bis auf den Wert der cHPLC ab ( $>100$  bar), jedoch ist dies auch mit einer erheblichen Verkürzung der Analysenzeit verbunden. Gegenüber der reinen CEC und der cHPLC besitzt die pCEC den Vorteil, dass durch eine größere Anzahl von Parametern (Druck und Spannung), die Trennbedingungen für jedes Analysenproblem optimiert werden können. Liegen die Retentionszeiten der zu trennenden Substanzen weit auseinander, so kann auf die hohe Trennleistung der CEC zugunsten der kürzeren Analysezeiten der pCEC verzichtet werden. Sind die Peaks in der cHPLC nur angetrennt, kann eine Reduktion des Drucks und ein Anlegen von Spannung zu einer besseren Auflösung führen.

### 3.5 Auftrennung eines Alkaloid-Extraktes des Mutterkorn Schimmelpilzes (*extractum secalis cornuti*)

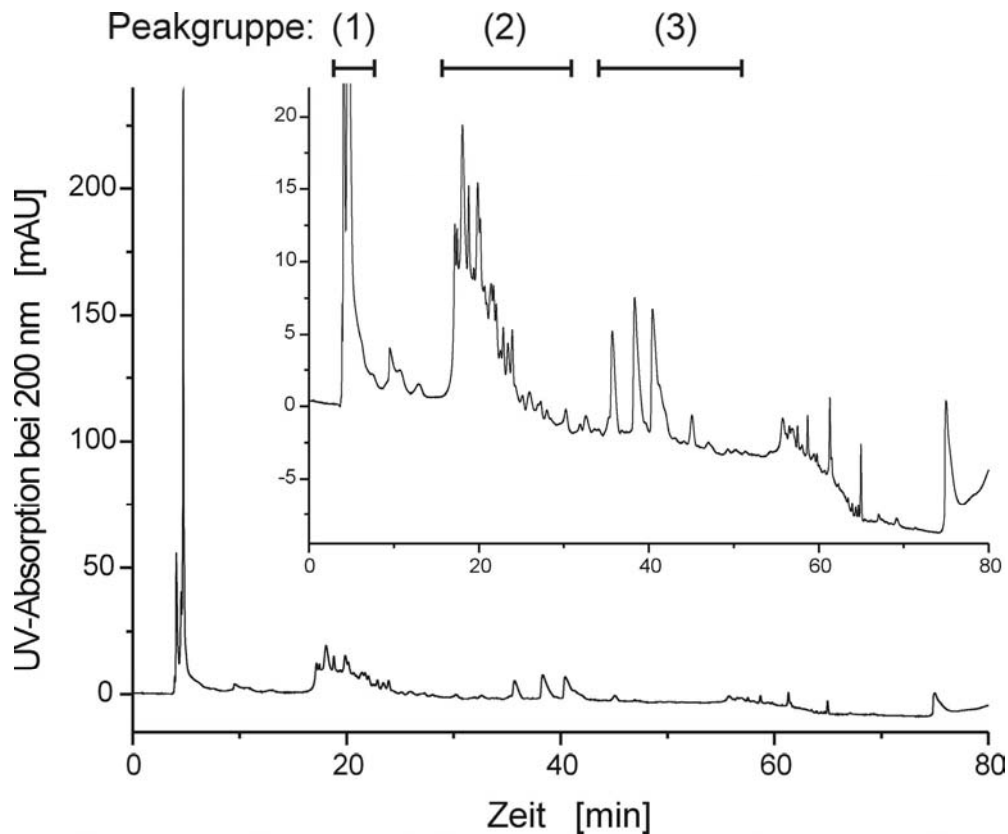
Wie schon in Kapitel 1 & 3 erläutert, bietet die CEC gegenüber cHPLC und CE entscheidende Vorteile, da sie die neben dem - all diesen Methoden gemeinsamen Miniaturisierungspotential - die Retentionsmechanismen und Selektivitäten der Chromatographie und den dazu orthogonalen Trennmechanismus der Elektrophorese in sich vereint. Die druckunterstützte Kapillarelektrochromatographie (pCEC) besitzt neben dem im vorigen Kapitel untersuchten Nachteil der verringerten Trennschärfe gegenüber der reinen CEC auch deutliche Vorteile. So ist sie wesentlich flexibler und robuster als die rein elektrokinetisch betriebene CEC, aber dennoch deutlich leistungsfähiger als die rein hydrodynamisch betriebene cHPLC. Gerade die Gradientenelution kann in Kombination mit der pCEC zu einer deutlichen Verbesserung in der Auftrennung komplexer Naturstoff-Proben führen, da sowohl der Transport, aber eben auch die Auftrennung der einzelnen Substanzen durch eine Trennsäule zusätzlich durch das elektrische Feld elektroosmotisch und/oder elektrophoretisch unterstützt werden.

Die wirkliche Ausnutzung des Potentials der Gradienten-pCEC konnte bislang nur selten gezeigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Leistungsfähigkeit der Methode anhand vergleichender Trennungen (Gradienten-HPLC, Gradienten-cHPLC, isokratische CE und Gradienten-pCEC) eines Mutterkornalkaloid-Extraktes demonstriert.

Mit der CE war es nicht möglich, stabile und reproduzierbare Trennungen bei direkter Injektion des nicht weiter vorgereinigten Alkaloid-Extraktes (*extractum secalis cornuti*) des Mutterkorn Schimmelpilzes (*ergot fungus*) durchzuführen. Der Versuch der Auftrennung des Extraktes mittels analytischer *reversed phase* Gradienten-HPLC war aufgrund der enormen Komplexität der Probe und der Ähnlichkeit der aufzutrennenden Alkaloide nur unbefriedigend. Der Extrakt konnte aber durch optimierte Gradientenelution reproduzierbar in drei (in sich allerdings nur angetrennte) Peakgruppen aufgetrennt werden (siehe Abbildung 3-22).

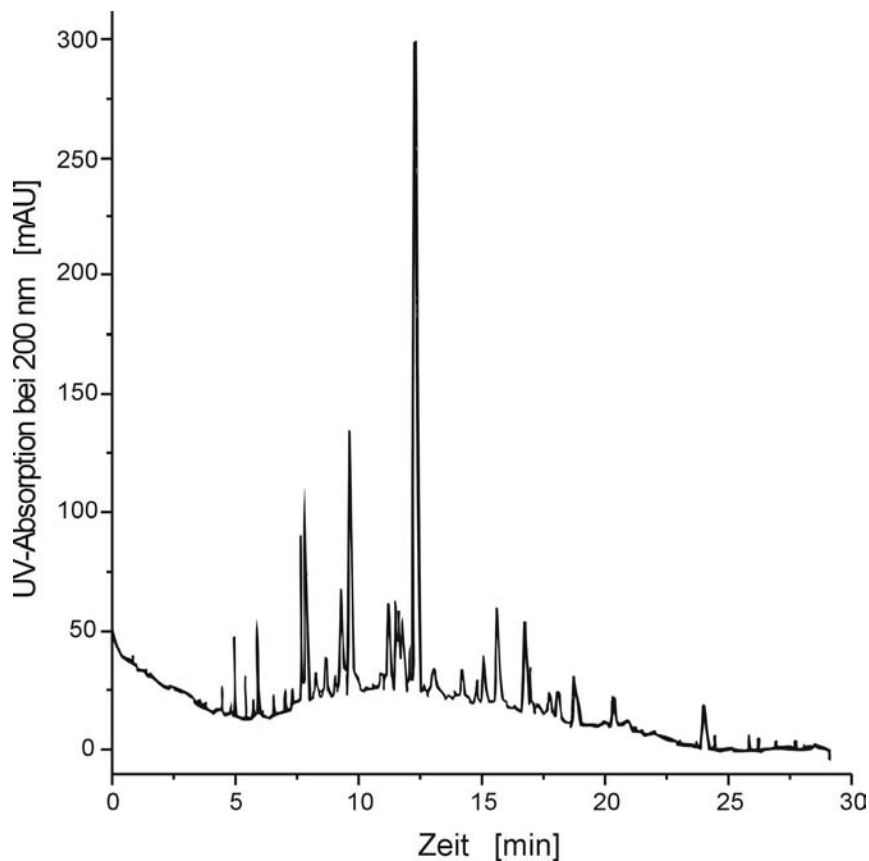


**Abbildung 3-22:** Trennung eines Mutterkorn Schimmelpilz Alkaloid-Extraktes (*extractum secalis cornuti*) mittels analytischer Gradienten-HPLC.



**Abbildung 3-23:** Trennung eines Mutterkorn Schimmelpilz Alkaloid-Extraktes (*extractum secalis cornuti*) mittels Gradienten-chPLC.

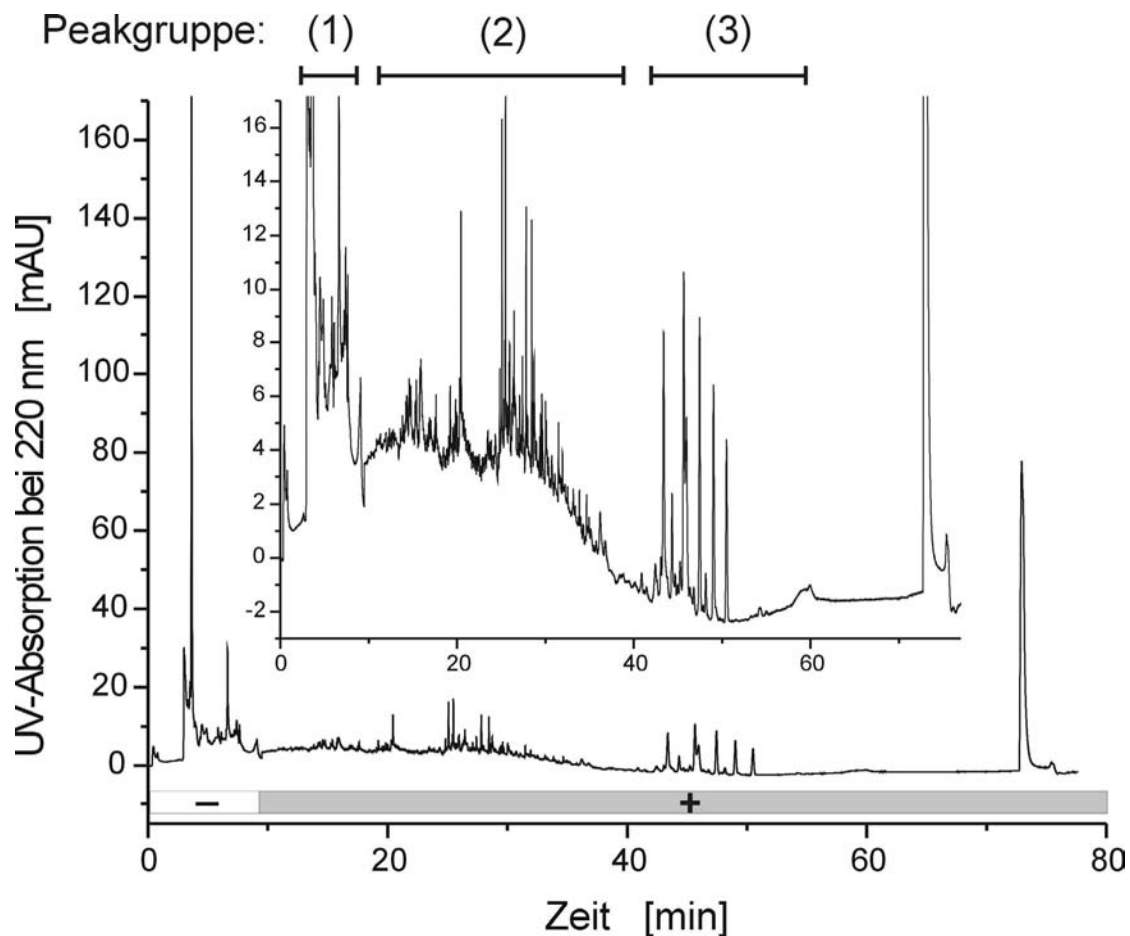
Die Auftrennung des Extraktes konnte mit dem Einsatz einer mit feinkörnigerem *reversed phase* Material gepackten cHPLC-Säule (3  $\mu\text{m}$  Teilchenpackung anstelle der 5  $\mu\text{m}$  Teilchenpackung der HPLC-Säule) und der auf diese Säule erneut optimierten Gradientenelution deutlich verbessert werden (siehe Abbildung 3-23). Aber auch hier konnten nur wenige (scheinbare) Einzelpeaks innerhalb der drei Peakgruppen basisliniengetreunt werden. Um die Komplexität der Probe zu demonstrieren wurde der größte Peak der Peakgruppe (1) aus mehreren HPLC-Läufen gesammelt und elektrophoretisch mit der dazu orthogonalen Trennmethode CE nochmals aufgetrennt. Mittels des elektrophoretischen Trennmechanismus konnte der vermeintliche Einzelsubstanz-Peak nach Optimierung der Trennparameter in über 30 Peaks aufgetrennt werden (siehe Abbildung 3-24).



**Abbildung 3-24:** Trennung der Substanzen unter dem größten Peak der Peakgruppe (1) der analytischen HPLC-Trennung (siehe Abbildung 3-22) des Alkaloid-Extraktes durch Kapillarzonenelektrophorese (CZE).

Die Kombination der beiden Trennmechanismen sollte also eine mit den Einzelmethode unerreichbare Trennleistung ermöglichen. Die Optimierung der Trennparameter für die Gradienten-pCEC ergab die Notwendigkeit der Umpolung des elektrischen Feldes inmitten des Laufes, was jedoch mit dem im Rahmen dieser

Arbeit entwickelten modularen Setup (vgl. Abbildung 3-10) problemlos zu bewerkstelligen war. So wurden die positiv geladenen Einzelsubstanzen in der Peakgruppe (1) durch Anlegen eines negativen Feldgradienten in Flussrichtung elektroosmotisch gleichförmig, aber je nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) elektrophoretisch verschieden stark beschleunigt, und somit deutlich besser aufgetrennt (bzw. die negativ geladenen wurden verzögert). Danach (9. Minute) wurde das Feld umgepolt, ohne den chromatographischen Lauf zu stoppen, so dass nun die positiv geladenen Einzelsubstanzen der Peakgruppen 2 & 3 durch Anlegen eines positiven Feldgradienten elektroosmotisch gleich, aber wiederum je nach  $\pm m/z$ -Verhältnis elektrophoretisch verschieden stark verzögert bzw. beschleunigt wurden. Die Anzahl und die Trennschärfe der mit dieser Methode aufgelösten Peaks demonstriert die Überlegenheit der Gradienten-pCEC (siehe Abbildung 3-25) im Vergleich mit den rein elektrophoretischen bzw. rein chromatographischen Trennmethode bei hoch komplexen Naturstoffproben.



**Abbildung 3-25:** Trennung eines Mutterkorn Schimmelpilz Alkaloid-Extraktes (*extractum secalis cornuti*) mittels Gradienten-pCEC.



## 4 NMR-Kopplung

Durch die Entdeckung der kernmagnetischen Resonanz (*nuclear magnetic resonance*, NMR) durch Purcell und Bloch im Jahre 1946 [172,173] wurde eine Tür zu einem Gebiet in der Spektroskopie aufgestoßen, welches sich zu einem der bedeutsamsten Instrumente für die Strukturaufklärung unbekannter Substanzen entwickelt hat [174]. Nicht nur in der Chemie, sondern auch in der Biologie, Biochemie, Physik und in der Medizin wird diese spektroskopische Methode in den verschiedensten Varianten und Anwendungen genützt, und wie die zahlreichen Veröffentlichungen auf diesem Gebiet zeigen ist die Entwicklung in diesem Gebiet noch lange nicht abgeschlossen. Im Gegensatz zur Massenspektrometrie ist es mit Hilfe der NMR-Spektroskopie relativ einfach stereochemischen Informationsgehalt zur Unterscheidung von Konfigurations- und Konformationsisomeren aus den Spektren zu gewinnen. Dies ermöglicht in der Regel eine direkte und eindeutige Identifizierung auch völlig unbekannter Substanzen. Die Strukturaufklärung einzelner Komponenten in komplexeren Gemischen (Realproben) ist jedoch durch die Überlagerung der NMR-Signale der verschiedenen Komponenten stark erschwert bzw. unmöglich. Eine eindeutige qualitative und ggf. auch quantitative Analyse der einzelnen Substanzen in einem Gemisch ist meist nur mittels einer vorgeschalteten Trennmethode möglich. Eine solche Trennung kann zeitlich und räumlich getrennt von der Untersuchungsmethode (*off-line*) oder direkt gekoppelt an ebendiese (*on-line*) erfolgen. Die *off-line*-Kopplung ist für viele empfindliche Substanzklassen jedoch nicht geeignet, da die Gefahr einer Zersetzung, Isomerisierung oder Kontaminierung besteht. Hinzu kommt noch der oft erhebliche Zeitaufwand solcher entkoppelter Isolierungsschritte. Als ideale Lösung bietet sich daher die direkte *on-line*-Kopplung der Untersuchungsmethode mit einer Trennmethode an. Da die Auftrennung eines Gemisches, die Detektion und die Identifizierung der einzelnen Komponenten in einem geschlossenen System und innerhalb eines engen Zeitrahmens stattfinden, werden die Fehlerquellen durch eventuelles Einschleppen von Verunreinigungen, oder durch Zersetzung (durch z.B. Luft-, bzw. Lichteinwirkung) der zu untersuchenden Substanzen eliminiert. Dies trifft in besonderem Maße für die NMR-Spektroskopie zu, da es sich hierbei um eine zerstörungsfreie Untersuchungsmethode handelt. Die Verwendung von speziellen Durchfluss-NMR-Zellen [175] ermöglichte, dass die Ende der 70er Jahre entwickelte *on-line* HPLC-NMR-Kopplung,

zur Routinemethode avancierte [176,177]. Ein Nachteil der NMR-Spektroskopie besteht jedoch in der, im Vergleich zu anderen Untersuchungsverfahren (wie z.B. der Massenspektrometrie) geringeren Empfindlichkeit. Diese wird weiter herabgesetzt durch die störenden Resonanzen protonierter Lösungsmittel. Allerdings ist die NMR weitgehend tolerant gegenüber anorganischen Zusätzen (Puffersalzen) in der mobilen Phase. Weiterhin ist die NMR-Spektroskopie eine kostenintensive und aufwendige Methode, deren Implementierung in ein chromatographisches Labor schwierig ist. Die Tatsache, dass sich die *on-line* HPLC-NMR-Kopplung dennoch in zunehmendem Maße als Routinemethode etabliert hat, beruht in erster Linie darauf, dass sie bei weitem die aussagekräftigsten Strukturinformationen aller bekannten Detektoren liefern kann. Neuere Entwicklungen, z.B. auf dem Gebiet der Anwendersoftware vereinfachen zudem die Arbeit mit dieser Methode zunehmend.

Die anfänglichen Schwierigkeiten mit protonierten Lösungsmitteln und der geringen Empfindlichkeit der NMR-Spektroskopie konnten durch den gezielten Einsatz von Pulsfolgen zur NMR-Signalunterdrückung und durch die Entwicklung und den Einsatz von leistungsfähigen Kryomagneten [178,179,180,181,182] zumindest teilweise überwunden werden. Das Hauptproblem der konventionellen HPLC-NMR-Kopplung (mit analytischen 4,6 mm ID HPLC-Säulen) bleibt die Notwendigkeit der Unterdrückung von NMR-Signalen protonenhaltiger Lösungsmittel und der damit verbundene Verlust an Informationen im unterdrückten Frequenzbereich. Eine zusätzliche Schwierigkeit ergibt sich hier bei der Anwendung der Lösungsmittelgradientenelution, da die chemischen Verschiebungen der Lösungsmittelsignale von der Zusammensetzung des Lösungsmittelgemisches abhängig sind, d.h. die zu unterdrückende Frequenz verändert sich im Laufe der Trennung. Analog zu anderen Kopplungsmethoden, wie z.B. der Kopplung mit der Massenspektrometrie, zeichnet sich auch hier ein Trend hin zur Miniaturisierung ab. Eine miniaturisierte Kopplungstechnik ist nicht nur vom wissenschaftlichen, sondern auch vom ökologischen und ökonomischen Gesichtspunkt her betrachtet interessant, da der Materialverbrauch bei gleichbleibender oder gar verbesserter Trennleistung drastisch gesenkt werden kann [56]. Zum einen eröffnet der wesentlich geringere Probenverbrauch der Kapillartrenntechniken neue Einsatzmöglichkeiten, so z.B. in der kombinatorischen Chemie oder der klinischen Medizin, wo oft nur geringste Mengen zur Analyse zur Verfügung stehen. Zum anderen macht der äußerst geringe Lösungsmittelverbrauch (unterer  $\mu\text{l}/\text{min}$  bis  $\text{nl}/\text{min}$  Bereich), den Einsatz teurer

volledeuterierter Lösungsmittel finanziell tragbar, was zu einer erheblichen Vereinfachung der NMR-Experimente führt.

Im Vergleich zur Massenspektrometrie, wo die Anwendungsbreite der Microbore- oder cHPLC-MS-Kopplung im Vergleich zur konventionellen HPLC-MS-Kopplung rasant zunimmt, steckt die Kopplung kapillarer Trennmethode mit der NMR-Spektroskopie immer noch in den Kinderschuhen. Der Arbeitsgruppe um Professor Sweedler gelang 1994 zum ersten Mal die Kopplung der Kapillarelektrophorese [183,184,185] und 1995 die Kopplung mit der Microbore-HPLC [186] (Trennsäulen mit 1 mm ID) mit der NMR-Spektroskopie. Sie verwendeten dazu Solenoidspulen, welche direkt auf Quarzglas-Kapillaren gewickelt waren und somit ein Detektionsvolumen von nur 5 nl (CZE) bzw. 50 nl ( $\mu$ HPLC) besaßen. Dieser Aufbau ermöglichte zwar ein niedriges Detektionslimit für sehr kleine Probenmengen, die Anordnung ist jedoch für Routineanalysen mit hohem Probenaufkommen eher ungeeignet. Diesbezüglich ist das von den Arbeitsgruppen Prof. Bayer und Prof. Albert [187] entwickelte System, welches auf einer Doppelsattel-Helmholtz-Spule basiert, besser geeignet. Es ermöglichte die Kopplung der Gradienten-cHPLC mit einem 600 MHz NMR-Spektrometer. Durch eine Weiterentwicklung dieses Aufbaus ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen, ein Kopplungssystem zu entwickeln, welches es erlaubt, mit einem System neben cHPLC, CZE, CEC [188,189,190,191,192,193,194] zum ersten mal auch die splittlose cHPLC, CEC als auch pCEC mit deutlich verbesserter Sensitivität mit der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie zu koppeln [195].

## 4.1 Grundlagen der LC-NMR-Kopplung

### 4.1.1 Das NMR-Experiment

Für Atomkerne der Kernspinquantenzahl  $I = \frac{1}{2}$  (wie z. B.:  $^1\text{H}$  oder  $^{13}\text{C}$ ) existieren im äußeren Magnetfeld  $B_0$  zwei Spinzustände unterschiedlichen Energieniveaus, deren Energiedifferenz  $\Delta E$  vom gyromagnetischen Verhältnis  $\gamma$  sowie der Stärke des Magnetfeldes  $B_0$  abhängig ist:

$$\Delta E = \gamma \cdot \frac{h}{2\pi} \cdot B_0 \quad (\text{Gl. 4-1})$$

Das Phänomen der kernmagnetischen Resonanz beruht auf zwei Effekten:

1. der Ausrichtung und Aufteilung von magnetisch aktiven Atomkernen in einem äußeren Magnetfeld auf unterschiedliche Energieniveaus und
2. der Aufnahme und Abgabe von Radiowellenergie entsprechend der Einstein-Gleichung:

$$\Delta E = h \cdot \nu \quad (\text{Gl. 4-2})$$

Der Unterschied in den Besetzungszahlen  $N_1$  und  $N_2$  beider Energieniveaus für  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Kerne (Kernspinquantenzahl  $I = \frac{1}{2}$ ) folgt aus der Boltzmann-Statistik:

$$\frac{N_1}{N_2} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \quad (\text{Gl. 4-3})$$

Aus dem Unterschied in der Besetzungszahl im angeregten Zustand ( $N_1$ ) sowie im Grundzustand ( $N_2$ ) resultiert eine Gleichgewichtsmagnetisierung  $M_0$ . Mit dem Einbringen der Messprobe in das Magnetfeld erfolgt die Ausbildung der Gleichgewichtsmagnetisierung über die Spin-Gitter-Relaxation unter Einstellung der Boltzmann-Verteilung. Die Einstrahlung der Radiowellenergie für die verschiedenen Übergänge in einer Messprobe kann nun monochromatisch im CW- (*continuous wave*) oder polychromatisch im PFT-Verfahren (*pulsed fourier transform*) erfolgen. Im

CW-Verfahren wird in jedem Augenblick der Spektrenaufnahme nur eine Frequenz angeregt und empfangen. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der Möglichkeit, Teilbereiche des Protonenspektrums ohne Störung anderer Signale (beispielsweise des Wassersignals) zu beobachten. Im Standard-PFT-Verfahren erfolgt durch einen Rechteckimpuls der Dauer  $t_p$  die Mehrfachanregung des Frequenzbereiches  $\nu \pm 1/t_p$  entsprechend einer  $\sin x/x$  - Funktion mit Nulldurchgängen im Abstand  $2/t_p$ . Bei genügend kleiner Wahl von  $t_p$  (10  $\mu$ s) können Frequenzbereiche bis zu 50000 Hz uniform mit Puls-Wiederholungszeiten im Sekundenbereich angeregt werden. Durch wiederholte Aufnahme des zu untersuchenden Spektrums verbessert sich das Signal/Rausch-Verhältnis (S/N) mit der Quadratwurzel aus der Zahl der Wiederholungen. Im PFT-Verfahren ist die maximale Überführung der Gleichgewichtsmagnetisierung  $M_0$  in die transversale Magnetisierung  $M_y$  durch einen  $90^\circ$ -Radiowellenfrequenzimpuls möglich.

Hierbei wird für einen einzelnen Messvorgang ein optimales Signal/Rausch-Verhältnis erreicht. Der Abfall der transversalen Magnetisierung mit der Spin-Spin-Relaxationszeit  $T_2$  wird in der NMR-Messspule als *Free Induction Decay* (FID) registriert. Der Wiederaufbau der Gleichgewichts-Magnetisierung erfolgt durch Spin-Gitter-Relaxation mit der Zeitkonstanten  $T_1$ . Die Spin-Gitter-Relaxationszeit  $T_1$  ist die Zeit, nach der einem Spinsystem zur vollständigen Relaxation noch  $1/e$  der Gleichgewichtsmagnetisierung  $M_0$  fehlt. Damit ist die Magnetisierung zum Zeitpunkt  $t$  exponentiell von der Gleichgewichtsmagnetisierung abhängig:

$$M_t = M_0 \left( 1 - e^{-\frac{t}{T_1}} \right) \quad \text{(Gl. 4-4)}$$

Nach der Wartezeit von  $5 \cdot T_1$  zwischen den einzelnen Interferogrammen wird vollständige Gleichgewichtsmagnetisierung erzielt, nach der Zeit von  $3 \cdot T_1$  beläuft sich  $M_t$  auf 95 % von  $M_0$ .

Bei langen Spin-Gitter-Relaxationszeiten (z.B.: 30-300 s bei quarternären Kohlenstoffatomen) muss bei  $90^\circ$ -Pulswinkelanregung extrem lang zwischen den einzelnen Anregungspulsen gewartet werden. Die Wartezeiten können nach Ernst [196] dadurch verkürzt werden, dass anstelle des  $90^\circ$ -Anregungswinkels ein kleinerer Pulswinkel  $\Phi$  verwendet wird.

$$\Phi = \arccos e^{-\frac{t}{T_1}} \quad (\text{Gl. 4-5})$$

In der veranschaulichten Vorstellung eines Kernspins als rotierendes Koordinatensystem bewirkt die kürzere Auslenkung des Magnetisierungsvektors  $M_0$  eine Verringerung der Wegstrecke in der zy-Ebene, dadurch wird weniger Zeit zur Rückbildung der Gleichgewichtsmagnetisierung benötigt. Der optimale Wert des Ernst-Winkels  $\Phi$  ist vom Verhältnis der Spin-Gitter-Relaxationszeit  $T_1$  zur Puls-wiederholungszeit  $t$  abhängig. Für kurze Spin-Gitter-Relaxationszeiten von Protonen im Bereich von 1-10 s und Puls-Wiederholungszeiten von 5 s können  $\Phi$ -Werte von 52-90° verwendet werden. Bei langen  $^{13}\text{C}$ -Spin-Gitter-Relaxationszeiten von 10-100 s ergeben sich  $\Phi$ -Werte von 8-25° bei Wiederholungszeiten von 1 s. Gleichung 4-5 gilt jedoch nur für den stationären Zustand einer statischen Messprobenanordnung in einem Magnetfeld. Für oszillierende oder kontinuierlich fließende Systeme ist die Beziehung wegen der hinzugekommenen Zeitabhängigkeit nicht zu verwenden.

#### 4.1.2 NMR-Spektroskopie in fließenden Systemen

Atomkerne eines definierten Volumens fließenden Mediums besitzen nur eine bestimmte Aufenthaltsdauer  $\tau$  innerhalb der Kernresonanz-Messspule. Die Aufenthaltsdauer  $\tau$  entspricht der benötigten Zeit zum vollständigen Austausch des Kernensembles und wird durch das Verhältnis von Detektorvolumen  $V_d$  zur Fließgeschwindigkeit  $u$  bestimmt [197]:

$$\tau = \frac{V_d}{u} \quad (\text{Gl. 4-6})$$

Eine Verkürzung der Aufenthaltsdauer  $\tau$  in der NMR-Messspule bewirkt eine kürzere effektive Lebensdauer  $1/T_{n,\text{effektiv}}$  der einzelnen Spinzustände und somit eine Erhöhung der Relaxationsraten  $1/T_i$  um den Wert  $1/\tau$ :

$$\frac{1}{T_{n,\text{effektiv}}} = \sum_{i=1}^{i=n} \frac{1}{T_i} + \frac{1}{\tau} \quad (\text{Gl. 4-7})$$

Der Einfluss der Fließgeschwindigkeit kann daher auch als ein Relaxationsphänomen beschreiben werden. Damit wirkt sich in fließenden Systemen die Aufenthaltsdauer  $\tau$  in der NMR-Messspule auf die effektiven Spin-Spin ( $T_2$ )- und Spin-Gitter ( $T_1$ )-Relaxationszeiten aus. Somit nimmt hier die Fließgeschwindigkeit direkten Einfluss auf das Relaxationsphänomen, d.h. die Aufenthaltsdauer  $\tau$  in der NMR-Messspule beeinflusst die effektiven Spin-Spin ( $T_2$ )- und Spin-Gitter ( $T_1$ )-Relaxationszeiten:

$$\frac{1}{T_{1,\text{Fluss}}} = \frac{1}{T_{1,\text{stationär}}} + \frac{1}{\tau} \quad (\text{Gl. 4-8})$$

$$\frac{1}{T_{2,\text{Fluss}}} = \frac{1}{T_{2,\text{stationär}}} + \frac{1}{\tau} \quad (\text{Gl. 4-9})$$

Nach der Heisenbergschen Unschärferelation

$$\bar{\tau} = \frac{h}{4\pi \cdot \Delta E} \quad (\text{Gl. 4-10})$$

führt eine Verringerung der Lebensdauer  $\bar{\tau}$  zu einer Vergrößerung der Energieunbestimmtheit  $\Delta E$  und damit zu breiteren NMR-Linien. Die Signalhalbwertsbreite  $W$  ist der Spin-Spin-Relaxationszeit umgekehrt proportional:

$$W = \frac{1}{\pi \cdot T_2} \quad (\text{Gl. 4-11})$$

Damit lässt sich der Einfluss der Fließgeschwindigkeit auf die Linienbreite der NMR Signale beschreiben:

$$W_{\text{Fluss}} = W_{\text{stationär}} + \frac{1}{\tau} \quad (\text{Gl. 4-12})$$

Der Effekt ist zwar bei Standard-HPLC-NMR- Durchflusszellen (Volumen 60-200  $\mu\text{L}$ ; Flussrate  $< 1 \text{ mL/min}$ ) vernachlässigbar gering, bei sehr kleinen Durchflusszellen und hohen Flussraten kann es jedoch durchaus zu signifikanten Linienverbreiterungen kommen.

### 4.1.3 Praktische Aspekte der *on-line* NMR-Detektion

#### 4.1.3.1 Elution und Lösungsmittelunterdrückung

Die Wahl eines geeigneten Eluenten ist von entscheidender Bedeutung für den Erfolg einer LC-NMR-Kopplung. Das verwendete Lösungsmittelgemisch muss sowohl eine Auftrennung der Analyten ermöglichen, als auch für die Durchführung von NMR-Experimenten geeignet sein. Auf den Einsatz von volldeutierten Lösungsmitteln muss bei der konventionellen HPLC-NMR-Kopplung aus Kostengründen oft verzichtet werden, d.h. die intensiven Signale der Lösungsmittel müssen unterdrückt werden, um eine Detektion der Analytsignale überhaupt zu ermöglichen. Bei der Kopplung mit Kapillartrennmethode hingegen kann aufgrund des äußerst geringen Eluentenverbrauchs komplett mit volldeutierten Lösungsmitteln gearbeitet werden. Doch selbst hier ist meistens eine Unterdrückung der Restsignale wegen der im Vergleich dazu geringen Analytkonzentrationen erforderlich. Daraus ergeben sich aus Sicht der NMR-Spektroskopie verschiedene Anforderungen an das Eluentensystem:

- Das verwendete Lösungsmittelgemisch sollte möglichst wenige und nicht aufgespaltene NMR-Signale besitzen, um eine gute Unterdrückung zu ermöglichen.
- Die Analytsignale sollten sich nicht mit den Lösungsmittelsignalen überschneiden, da dies einen Verlust von Strukturinformation mit sich bringt.
- Die Lösungsmittel sollten möglichst rein sein.

Lösungsmittelgemische aus Acetonitril und Wasser (resp. ACN- $d_3$  und  $D_2O$ ), die üblicherweise in der RP-HPLC verwendet werden, erfüllen diese Anforderungen optimal.  $D_2O$  besitzt noch ein nicht störendes Restsignal (Deuteriumsignal) welches zur Stabilisierung des Magnet-Feldes verwendet werden kann (siehe Kapitel 4.1.3.2). Je nach Trennproblem können auch andere volldeuterte Lösungsmittel wie Aceton- $d_6$  oder Methanol- $d_4$  eingesetzt werden. Oft muss zur Stabilisierung und Optimierung des chromatographischen bzw. elektro-phoretischen Prozesses mit einem Puffersystem gearbeitet werden. Der Einsatz anorganischer Säuren, Basen oder Salzen ist in der Regel unproblematisch, organische Zusätze können als volldeuterte oder perfluorierte Derivate zugegeben werden (z.B. Ameisensäure- $d_2$  (DCOOD) oder Trifluoressigsäure (TFA)). Bei der Gradientenelution in *continuous-*



*flow* Experimenten muss berücksichtigt werden, dass sich die Lage der Lösungsmittelsignale mit der Zusammensetzung des Eluenten ändert.

Unterdrückt man bei der HPLC-NMR Kopplung die Signale protonenhaltiger Lösungsmittel, kann (gegenüber dem Messung ohne Lösungsmittelunterdrückung) bei ansonsten gleichen Bedingungen eine 100-fache Verbesserung des S/N-Verhältnisses erreicht werden. Techniken zur effektiven Lösungsmittelunterdrückung lassen sich wie folgt kategorisieren [198,199,200]:

- Vorsättigung
- Ausnutzung von Relaxationseffekten
- Selektive Anregung
- Unterdrückung durch  $B_0$ -Feldgradienten

#### 4.1.3.2 Zeitauflösung und Frequenzstabilisierung

Bei konventioneller UV-Detektion liegt die Datenrate einer chromatographischen Trennung normalerweise zwischen 5-50 Hz. Die dadurch erzielte zeitliche Auflösung liegt im Millisekundenbereich. Bei der NMR-Spektroskopie hängt die Aufnahmedauer eines Spektrums proportional von der Güte der digitalen Auflösung, der Anzahl der Transienten, der Vorsättigungszeit und der Wartezeit ab. Mit einer Vorsättigungszeit von 500 ms und einer Datenaufnahmezeit von 500 ms beträgt somit die minimale Zeitauflösung für ein NMR-Spektrum mit acht akkumulierten Transienten im Durchfluss ca. 8 s. Um die Empfindlichkeit bzw. das S/N-Verhältnis zu verbessern, werden jedoch häufig mehr als acht Transienten akkumuliert. Die Zeitauflösung in der LC-NMR-Kopplung wird daher vor allem bei Kapillartrennmethode von der maximal injizierbaren Substanzmenge limitiert. Bei zu hoher Transienten-Akkumulation kann es so zu drastischen Auflösungsverlusten von chromatographisch sauber getrennten Peaks kommen. Es muss daher ein Kompromiss zwischen digitaler Auflösung, Signal-Rausch-Verhältnis, chromatographischer Trennung, Fließgeschwindigkeit, sowie Zeitauflösung der NMR-Spektren gefunden werden.

Zur Feldfrequenzstabilisierung (*lock*) wird in der NMR-Spektroskopie als Referenzsignal die Frequenz der Deuteriumresonanz des bei Kapillartrenntechniken standardmäßig verwendeten deuterierten Lösungsmittels (meist  $D_2O$ ) verwendet. Deuterium ( $^2H$ ) ist ein NMR-aktiver Kern, daher verfügen die Spektrometer über

einen  $^2\text{H}$ -Kanal zur Anregung und Detektion der Lösungsmittelresonanz. Im Spektrometer selbst existiert eine elektronische Schaltung, welche die Resonanz dieses  $^2\text{H}$ -Signals auf Dauer gewährleistet. Dazu werden jegliche Resonanzabweichungen detektiert, die z.B. durch innere *Drifts* des Magneten oder durch Schwankungen der Raumtemperatur hervorgerufen werden. Kleine Spannungen, welche durch Zusatz-Spulen im Magneten erzeugt werden, liefern bei Abweichung ein Fehlersignal, mit welchem das Magnetfeld zurück zur Resonanzstelle gebracht wird. Dieses Vorgehen ist als Feldfrequenz-Lock-Stabilisierung bekannt. Dadurch werden alle aufeinanderfolgenden Scans einer *on-line*-Kopplung bei exakt derselben Feldfrequenz aufgezeichnet.

#### 4.1.3.3 Betriebsarten

Die jüngsten technischen Fortschritte erlauben nun die folgenden 3 Arten der LC-NMR-Kopplung:

- *continuous-flow*: Direkte *on-line* NMR-Detektion der HPLC-Eluenten [201,202,203,204,205]. Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgt hierbei kontinuierlich während der chromatographischen Trennung. Vor allem bei Kapillartrenntechniken ist eine extrem hohe Beladung der chromatographischen Trennsäule vonnöten, da es sich bei der NMR-Spektroskopie zwar um eine aussagekräftige, aber unempfindliche Methode handelt. Eine dadurch verursachte Verschlechterung der chromatographischen Trennleistung (*peak-tailing*) kann durch die nun vorhandene zweite Dimension, die NMR-chemische Verschiebung, ausgeglichen werden [206]. Die Darstellung erfolgt als Konturplot, in dem die einzelnen NMR-Spektren konsekutiv aufgetragen werden. In der F2-Dimension (Horizontale) befindet sich das NMR-Spektrum, während die F1-Dimension (Vertikale) die chromatographischen Retentionszeiten wiedergibt. Im *continuous-flow* Modus können allerdings keine 2D-NMR-Experimente durchgeführt werden. Durch eine Aufsummierung der Intensitäten der NMR-Signale ist eine Rekonstruktion der chromatographischen Trennung möglich.
- *stopped-flow*: Der LC-Prozess wird zu bestimmten Zeiten angehalten. Diese Technik [207] eignet sich zur Untersuchung geringer Substanzmengen oder weniger gut löslichen Verbindungen. Die Zeit, die zur Aufnahme von NMR-Spektren zur Verfügung steht, ist für diese Betriebsart (im Gegensatz zur

*continuous-flow*-Technik) nicht begrenzt. Die chromatographische Trennung wird hierbei gestoppt, sobald eine Analytbande die NMR-Durchflusszelle erreicht hat. Daher können im *stopped-flow*-Modus theoretisch alle gängigen, zeitaufwendigen zwei-dimensionalen Experimente wie COSY, TOCSY oder heteronuklear korrelierte Spektren (HMQC, HSQC) aufgenommen werden [208,209,210,211]. Nach Beendigung des 2D-Experiments kann die chromatographische Trennung fortgesetzt und weitere Banden NMR-spektroskopisch untersucht werden. Bei Unterbrechung der Trennung von 1-2 Stunden kommt es nur zu geringer Peakdispersion, der sich noch auf der Trennsäule befindlichen Substanzen, da die Diffusionskoeffizienten der Analyten relativ gering sind [212] (siehe auch Kapitel 4.3.3).

- Peakspeicherung: Eluierte Fraktionen können in Kapillarschleifen für spätere, ausführliche Untersuchungen mit der NMR-Spektroskopie aufbewahrt werden. (Diese sehr anwenderfreundliche Variante ist bislang allerdings ausschließlich der NMR-Kopplung mit analytischen und *microbore* Chromatographiesäulen vorbehalten.)

## 4.2 Experimenteller Aufbau für die Kopplung kapillarer Trennmethoden mit der NMR

### 4.2.1 Durchfluß-NMR-Kapillarprobenköpfe und Spulenanordnung

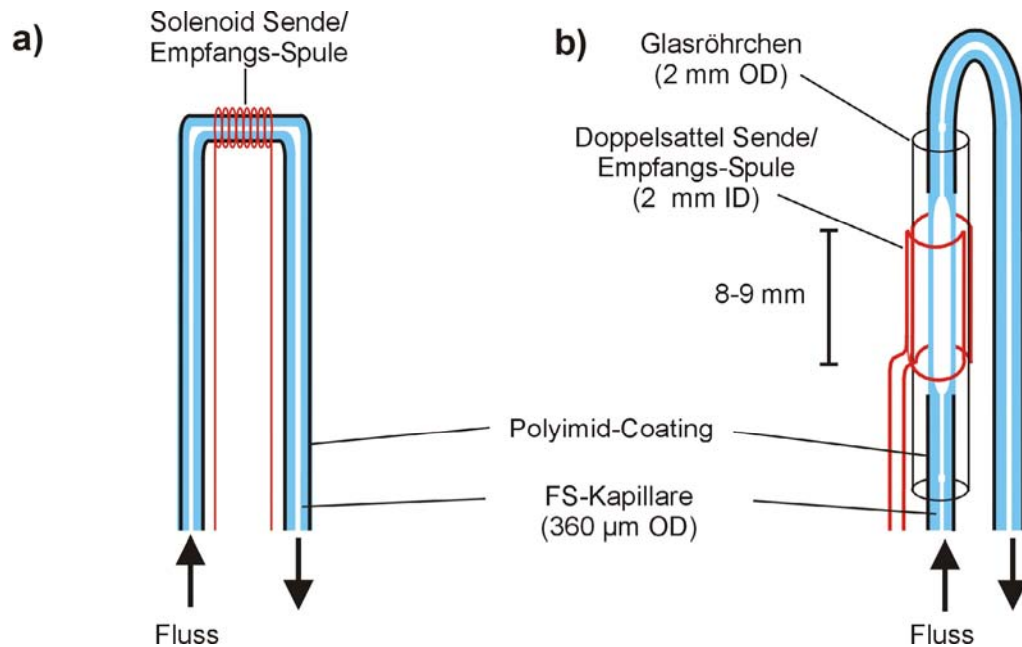
Das Kopplungselement der Trenntechniken mit der NMR-Spektroskopie muss ein geeigneter und somit ebenfalls ein miniaturisierter Probenkopf sein. Bei der Entwicklung eines solchen Interfaces muss die Spulendimensionierung auf die der Detektionskapillare möglichst exakt abgestimmt werden und trotzdem eine leichte Handhabbarkeit gewährleistet sein. Der für diese Arbeit verwendete  $^1\text{H}$ -Kapillarprobenkopf ist mit einer Doppelsattel-Helmholtz-Sende/Empfangs-Spule bestückt, welche einen vergleichsweise einfachen Austausch der Detektionskapillare erlaubt. Im Vergleich zur konventionellen HPLC-NMR-Kopplung ist die Verwendung von Kapillartrennmethoden mit einer Verkleinerung des NMR-Detektionsvolumens um einen Faktor 1000 verbunden. Besonders wichtig ist das Detektionslimit eines Analysesystems. Das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) eines NMR-Detektors ist nach folgender Gleichung direkt proportional zum Füllfaktor  $f$  der Spule [212,213], welcher als Verhältnis aus Detektionsvolumen  $V_S$  und dem Volumen innerhalb der Spule  $V_C$  definiert ist:

$$\frac{S}{N} = \gamma \cdot N \cdot I \cdot (I + 1) \cdot \left(\frac{B_0}{T}\right)^{\frac{3}{2}} \cdot f \cdot \left(\frac{Q \cdot V_S}{b}\right)^{\frac{1}{n-1}} \quad (\text{Gl. 4-13})$$

$\gamma$  = gyromagnetisches Verhältnis,  $N$  = Anzahl der Kerne,  $I$  = Spinquantenzahl,  $Q$  = Qualitätsfaktor,  $V_S$  = Detektionsvolumen,  $B_0$  = Magnetfeld,  $T$  = Temperatur und  $b$  = Bandbreite des Empfängers.

Bei Verwendung eines bestimmten Probenkopfes und NMR-Spektrometers kann man die meisten der Parameter als konstant betrachten. Da die Dimension der Spule bei dem verwendeten Probenkopf gegeben war, ließ sich der Füllfaktor und damit die Sensitivität nur durch eine Vergrößerung der Kapillare im Detektionsbereich verbessern (siehe Kapitel 4.2.2 und 4.3.1.1). Kapillaren, die normalerweise bei Kapillartrennmethoden ihren Einsatz finden, haben jedoch Innendurchmesser zwischen 50 und 100  $\mu\text{m}$ , welcher einen eher geringen Füllfaktor  $f$  aufweisen würden. Nach obiger Gleichung erzielte man mit einem so bestückten Probenkopf

eine relativ schlechte Empfindlichkeit. Bisher wurden für die Konstruktion von Kapillar-HPLC-NMR-Probenköpfen zwei Spulenordnungen verwendet, die sich grundsätzlich voneinander unterscheiden:



**Abbildung 4-1:** Radiofrequenzspulen in der Kapillar-LC-NMR-Spektroskopie: **a)** Solenoidspule, **b)** Doppelsattelspule.

#### 4.2.1.1 Solenoidspule [214,215,216,217,218,219,220]

Die von der Arbeitsgruppe von Prof. Sweedler bei cHPLC-NMR-Kopplungen verwendete Solenoidspule (Abbildung 4-1a) bietet den Vorteil hoher Empfindlichkeit. Dies gilt speziell bei Kapillarprobenköpfen, da die Spule direkt auf die Detektionskapillare gewickelt wird und dadurch ein optimaler Füllfaktor erreicht werden kann. Somit können extrem kleine Probenmengen ( $< 100$  ng) in sehr kleinen Probenvolumina (5 nL) untersucht werden.

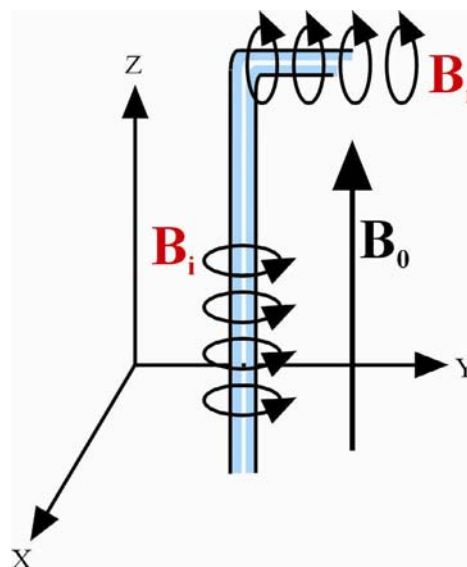
In der Praxis sind mit dieser Anordnung jedoch eine Reihe von Problemen verbunden. Ein wesentlicher Nachteil sind Suszeptibilitätssprünge, die durch die Nähe der Spule zu den kleinen Probenvolumina entstehen können. Diese Störungen fanden sich in den ersten veröffentlichten Spektren in großen Linienbreiten (10-20 Hz) [214,216]. Durch eine Imprägnierung der Radiofrequenzspule mit perfluorierten Kohlenwasserstoffen konnte eine Suszeptibilitätsangleichung zwischen Probe und Spule erreicht werden und damit eine Reduktion der Linienbreiten und eine

verbesserte Peakform [215]. Durch den Einsatz perfluorierter Kohlenwasserstoffe kamen jedoch neue Schwierigkeiten durch Hintergrundsignale [219], sowie der Korrosion der Spule in der sie umgebenden perfluorierten Flüssigkeit hinzu. Desweiteren muss bei der Verwendung von Solenoidspulen für jede neue Kapillare eine neue Spule gewickelt werden. Das Wickeln und Abgleichen der Spule, sowie das anschließend notwendige *Shimmen* des NMR-Gerätes sind jedoch sehr zeit- und arbeitsintensiv. Ein weiterer Nachteil ist die geringe Aufenthaltsdauer  $\tau$  (siehe Kapitel 4.1.2) der Analytbande in der Detektionszelle aufgrund des kleinen Zellvolumens. Dies führt bei *continuous-flow* Experimenten zu einer deutlichen Reduktion der  $T_2$ -Zeit und somit zu einer Verbreiterung der Signale. Dieser Effekt, der in der konventionellen HPLC-NMR-Kopplung aufgrund der Größe der Detektionszelle nahezu vernachlässigbar ist, kann bei Nanoliterzellen entscheidend sein. Rein rechnerisch ergibt sich für eine 5 nl-Zelle bei einer Flussrate von 2  $\mu\text{l}/\text{min}$  eine zu erwartende Linienverbreiterung von 6,7 Hz [221]. Zudem muss die Solenoidspule im Winkel von  $90^\circ$  zur Vorzugsrichtung des Magneten eingebaut werden, um das Einstrahlen des  $B_1$ -Feldes entlang der Spule und damit senkrecht zum  $B_0$ -Feld zu ermöglichen. Bei kapillarelektrophoretischen Trennmethode in offenen Kapillaren (z.B.: CZE [188,189,190,191,192]) besteht jedoch die Notwendigkeit den EOF und damit das elektrische Feld über das gesamte Kapillarsystem zu generieren, da aufgrund des schlechten Oberfläche/Volumen-Verhältnisses in offenen Kapillaren ein EOF von nur geringer Kraft entsteht. Dieser erlaubt es nicht, das elektrische Feld nur über eine relativ kurze Trennkapillare außerhalb des Magneten anzulegen und die Analytbanden mit einer Transferkapillare deutlich kleineren IDs in den Probenkopf zu überführen, da der in offenen Kapillaren generierte EOF zu schwach ist um den, durch die Transferkapillare generierten Gegendruck zu überwinden. Dies war mit dem alten Setup auch für die (p)CEC-NMR-Kopplung der Fall. Das Problem konnte jedoch mit dem neuen Setup im Rahmen dieser Arbeit eliminiert werden. Das elektrische Feld in einer solchen stromdurchflossenen Kapillare induziert zudem ein Magnetfeld, welches Komponenten in der  $B_0$ -Richtung besitzt (siehe Abbildung 4-2), welche ihrerseits bei der Kopplung mit der NMR-Spektroskopie zu Störungen der Homogenität des Magnetfeldes führen. Zusammenfassend ergibt sich, dass die Solenoidspulenanordnung bislang schwierig zu handhaben war, aber ein großes Potential bezüglich der gerade für die NMR-Spektroskopie so wichtigen Sensitivität bereithält.

#### 4.2.1.2 Doppelsattelspule [187,188,189,190,191,192,193,194,195]

Viele der Probleme, mit denen man bei der Verwendung der Solenoidspule konfrontiert wird, lassen sich bei Verwendung einer Doppelsattel-Helmholtz-Spule vermeiden (Abbildung 4-1b). Für die vorliegende Arbeit wurde eine solche Spule mit einem Innendurchmesser von 2 mm verwendet. Aufgrund des Abstandes der Spule von der Detektionskapillare ( $< 420 \mu\text{m OD}$ ) waren Suszeptibilitätsstörungen nicht zu erwarten. Im Aufbau wurden Kapillarköpfe mit einer Spulenlänge von 8 mm und 9 mm verwendet.

Die Kapillare ist bei dieser Anordnung parallel zum  $B_0$ -Feld angeordnet. Bei der Kopplung elektrophoretischer Methoden mit der NMR-Spektroskopie befindet sich das induzierte Magnetfeld um den stromdurchflossenen Leiter und somit in der xy-Ebene des NMR-Magneten. Daher besitzt es keine Komponente in  $B_0$ -Richtung (siehe Abbildung 4-2), wodurch eine Störung des  $B_0$ -Feldes nicht zu befürchten ist.



**Abbildung 4-2:** Einfluss des durch einen stromdurchflossenen Leiter induzierten Magnetfeldes  $B_i$  auf das  $B_0$ -Feld des NMR Magneten.

Der wesentliche Nachteil dieser Anordnung gegenüber der Solenoidspule ist die geringere Empfindlichkeit. Sie lässt sich teilweise durch eine Aufweitung der Detektionskapillare kompensieren, was zu einem größeren Detektionsvolumen und somit zu einem verbesserten Füllfaktor führt. Aus der Aufweitung ergeben sich außerdem längere Aufenthaltszeiten  $\tau$  und eine erhöhte Lösungsmittelmenge im

Detektionsbereich. Es resultiert eine geringere Linienverbreiterung durch den Fluss und eine erleichterte Frequenzstabilisierung durch den Lock.

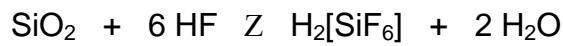
## 4.2.2 Detektionskapillaren

In Standard-HPLC-Anlagen sind analytische bzw. *narrow-bore* LC-Säulen (ID: 2,1-5,0 mm; vgl. Tabelle 3-1) durch Kapillaren mit deutlich geringerem ID mit der Detektionszelle im NMR-Probenkopf verbunden, und auch diese hat einen geringeren Durchmesser als die Säule.

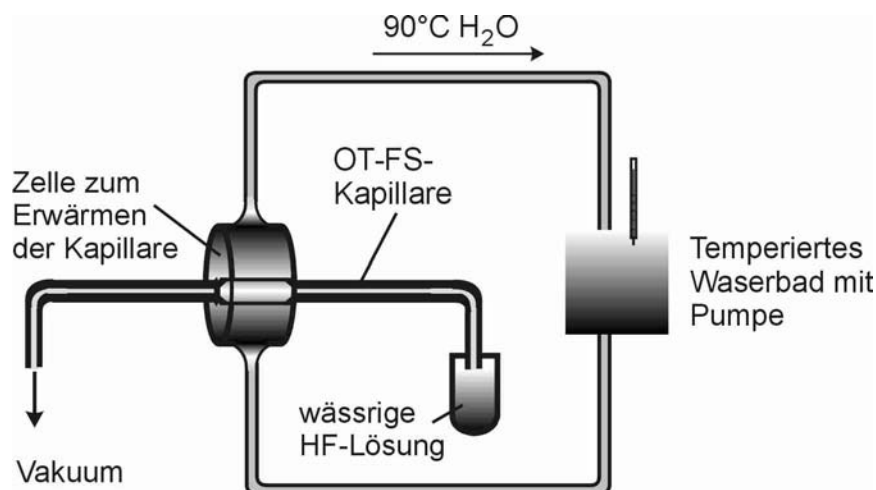
Bei der *on-line*-Kopplung mit Kapillartrennmethode sollten diese Größenverhältnisse nach Möglichkeit beibehalten werden, um unnötige Bandenverbreiterungen durch die Transferkapillare oder die Detektionszelle selbst zu vermeiden (d.h. bis zu 1000-fach verkleinertes NMR-Detektionsvolumen). Dadurch tritt der größte Nachteil der NMR-Spektroskopie, im Vergleich zu anderen Untersuchungsverfahren, die geringere Empfindlichkeit, noch stärker in den Vordergrund. Es muss also ein Kompromiss zwischen möglichst hoher Sensitivität (große Detektionszelle) und möglichst geringer zusätzlicher Bandenverbreiterung (kleine Detektionszelle) gefunden werden. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit vier verschiedene Detektionszellen untersucht und miteinander verglichen (siehe Abbildung 4-4 und Kapitel 4.3.1.1). Die erste Variante ist eine einfache FS-Kapillare mit 360  $\mu\text{m}$  OD und 75  $\mu\text{m}$  ID (vgl. Abbildung 4-4a). Hier ist zwar aufgrund des geringen Volumens eine geringe Bandenverbreiterung, aber ebenso eine äußerst geringe Sensitivität zu erwarten. Die Sensitivität zu verbessern, ohne die Trennleistung der Kapillartrennmethode durch zuviel zusätzliches Totvolumen zu stark zu verringern, kann erreicht werden, indem nur die Detektionsstelle und nicht die Transferkapillare aufgeweitet wird. Dies kann durch Aufweiten der Kapillare an der Detektionsstelle auf den gewünschten ID oder durch Ankoppeln eines Detektionssegments mit größerem ID erreicht werden. In der CE sind Kapillaren mit erweitertem Detektionsbereich zur UV-Detektion, sogenannte *Bubble-Cells* [222], weit verbreitet. Durch die Verlängerung des Lichtweges erhält man nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ( $A = \epsilon \cdot c \cdot d$ ) ein stärkeres Signal. Solche *Bubble-Cells* erhält man, wenn bei gleichzeitig angelegtem  $\text{N}_2$ -Druck die Kapillare an einer Stelle kurz angeschmolzen wird. Die Symmetrie der so erhaltenen Zellen ist für die NMR-Detektion jedoch ungenügend. Bei einem Versuch war ein *Shimmen* (d. h. eine Homogenisierung des Magnetfeldes) nicht möglich. Eine Möglichkeit, die



Kapillare an einer bestimmten Stelle aufzuweiten, ohne die Symmetrie merklich zu verschlechtern, ist das Aufätzen der Kapillare mit Fluorwasserstoffsäure. Dabei macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass  $\text{SiO}_2$  bei der Behandlung der Oberfläche der Quarzglaskapillaren mit einer Fluorwasserstoffsäure von der Kapillarwand gelöst wird und diese Reaktion temperaturabhängig ist.



So lässt sich die Reaktion durch Erwärmen eines Teils der Kapillare (die spätere Detektionszelle) in diesem Bereich derart beschleunigen, dass dort ein aufgeweitetes symmetrisches Segment entsteht, während der Rest der Kapillare nur wenig aufgeweitet wird (vgl. Abbildung 4-4b). Die zur Herstellung solcher Zellen benutzte Apparatur ist in Abbildung 4-3 dargestellt:



**Abbildung 4-3:** Schematischer Aufbau der Ätzapparatur zur Herstellung geätzter Detektionskapillaren mit aufgeweitetem Detektionsbereich.

Das Kernstück dieser Anlage ist eine 2 cm lange Flusszelle, welche von 90°C heißem Wasser durchflossen wird. Eine 2 m lange FS-Kapillare wird mittels eines Septums in diese Flusszelle eingespannt. Ein Wasserstrahlvakuum saugt eine wässrige 10%ige Flusssäurelösung durch die Kapillare. Durch den entstehenden Temperaturgradienten und den gleichmäßigen Fluss der Säure erhält man 1,5 cm lange symmetrische Detektionszellen. Je nach Ätzdauer lassen sich so die Innendurchmesser der Zellen variieren. Dabei ist darauf zu achten, dass sich mit

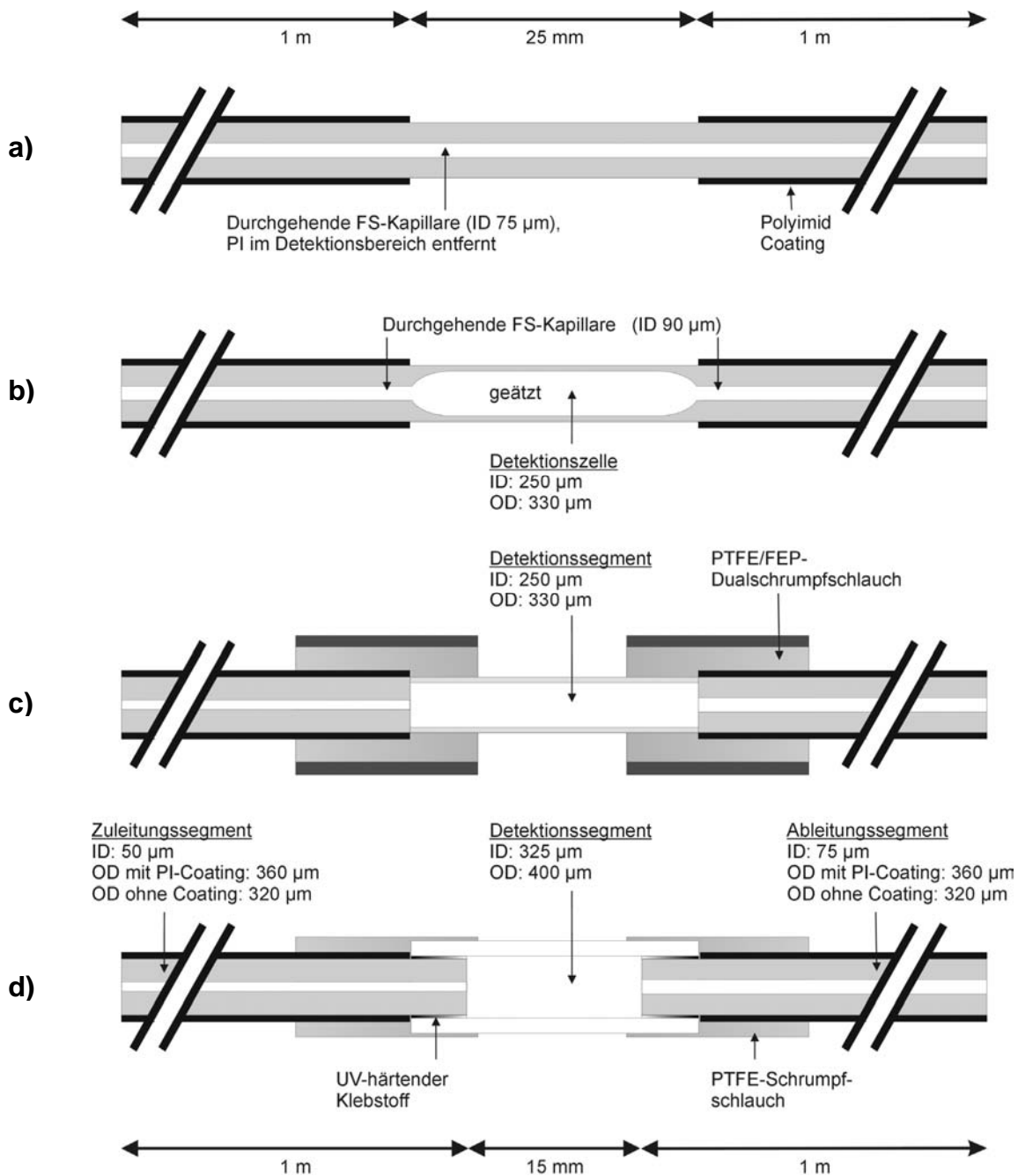
zunehmendem Innendurchmesser die Wandstärke verringert und die Kapillare in diesem Bereich äußerst bruchempfindlich wird. Bei Kapillaren mit 360  $\mu\text{m}$  Außendurchmesser haben sich Zellen mit einem Innendurchmesser von 250  $\mu\text{m}$  als gerade noch praktikabel erwiesen. Der ungefähre Innendurchmesser lässt sich mittels Vergleichsmessungen mit Kapillaren bekannten Innendurchmessers bestimmen. Nach Entfernen der Polyimidschicht mit Hilfe des Glühdrahtes des Frittenbrenners (vgl. Kapitel 5.4.1.1) und anschließender Reinigung, kann die Kapillare in den Probenkopf einbaut werden. Durch zwei PTFE-Stecker (OD 1,59 mm / ID 0,4 mm) wird die Kapillare oben und unten im Glasröhrchen (OD 2,0 mm / ID 1,6 mm) des Probenkopfes zentriert und im Bereich der Detektionsspule fixiert. Somit wird gewährleistet, dass die Detektionszelle parallel zum  $B_0$ -Feld ausgerichtet ist. Eine weitere Möglichkeit, nur die Detektionsstelle und nicht die Transferkapillare aufzuweiten, ist das Ankoppeln eines Detektionssegments mit größerem ID an Transferkapillaren mit deutlich kleinerem ID. Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene segmentierte Detektionskapillaren (vgl. Abbildung 4-4c+d) hergestellt und untersucht. Die Unterschiede liegen neben der unterschiedlichen Herstellungsweise hauptsächlich in der Dimensionierung der eigentlichen Detektionszelle. Die den beiden (in drei Teile segmentierten) Detektionskapillaren gemeinsamen Vorteile gegenüber der einteiligen geätzten Zelle sind:

- Der  $ID_{\text{Zuleitungstransferkapillare}}$  ist frei wählbar ( $ID < 75 \mu\text{m}$ ), so kann die Bandenverbreiterung durch den Transfer von der Trennsäule zur Messspule minimiert werden.
- Der  $ID_{\text{Ableitungstransferkapillare}}$  ist frei wählbar ( $ID > 75 \mu\text{m}$ ), so kann ein Druckaufbau in der Detektionszelle vermieden und damit das Risiko des Zellbruchs minimiert werden.
- Die Symmetrie der so erhaltenen Zellen ist nahezu ideal, was das *Shimmen* des NMR-Spektrometers gegenüber der geätzten Zelle nochmals deutlich vereinfacht und verbessert und dadurch die Linienbreite der Signale verringert.
- Die Haltbarkeit dieser Detektionskapillaren ist nicht limitiert, während die aufgeätzten Detektionskapillaren aufgrund der nichtdeaktivierbaren Fluorwasserstoffsäurereste in den Nanoporen der FS-Kapillarwand immer

weitergeätzt werden und aus Sicherheitsgründen nach einer gewissen Zeit (ca. 3 Monate) ausgetauscht werden müssen.

- Detektionsvolumina, die mit den "Bubble-Cell"-Kapillaren nur abgeschätzt werden konnten, können nun exakt berechnet werden.
- Die Kopplung der Segmente nach dem im Folgenden beschriebenen Verfahren ist reproduzierbar, totvolumenfrei, druckstabil, und durchschlagsfest gegen Hochspannung.

Durch die Segmentierung können die Querschnittsflächen der Transfer- und der NMR-Detektions-Kapillare an die Querschnittsfläche der Trennsäule angepasst werden. Damit wird die Bandenverbreiterung in den einzelnen Segmenten minimiert und Peakdiffusion der Segmente bei "Stopped-Flow"-Experimenten verhindert. Die zu verbindenden, später aneinander stoßenden Enden der Kapillarsegmente werden rechtwinklig zur Kapillarachse plangeschliffen und poliert (analog Kapitel 5.4.1 „Herstellung der Kapillarsäulen“). Im Setup wie in Abbildung 4-4c werden die Kapillarsegmente mit Hilfe eines xyz-Manipulators zueinander ausgerichtet und aneinandergesetzt. Danach werden die Segmente durch Aufschrumpfen je eines 5 mm Stückes PTFE/FEP-Dualschrumpfschlauches miteinander verbunden (vgl. Abbildung 4-38). Das Detektionskapillarsegment (Länge 6 cm / ID 250  $\mu\text{m}$  / OD 365  $\mu\text{m}$ ) wird zuvor vom Polyimid befreit. Sein Gesamtvolumen beträgt 2,9  $\mu\text{L}$  während der Detektionsbereich (Länge 9 mm) ein Volumen von 400 nL umfasst. Das Detektionskapillarsegment wird durch die beiden PTFE/FEP-Dualschrumpfschlauch-Kopplungen (OD 1,59 mm) selbst im Glasröhrchen des Probenkopfes zentriert und das Ende der Zuleitungskapillare (ID 50  $\mu\text{m}$ ) möglichst nahe der Detektionsspule fixiert (vgl. Abbildung 4-1b). Somit wird wiederum gewährleistet, dass die Detektionszelle parallel zum  $B_0$ -Feld ausgerichtet ist und die Bandenverbreiterung durch die zurückgelegte Wegstrecke der Analyten in der Detektionskapillare bis zur Detektionsspule möglichst gering gehalten wird. Im Setup wie in Abbildung 4-4d werden die Kapillarsegmente ineinander geschoben und mit einem chemikalien- und lösungsmittelbeständigen UV-aushärtenden Klebstoff miteinander verbunden. Zuvor werden das Detektionskapillarsegment (Länge 1,5 cm / ID 325  $\mu\text{m}$  / OD 400  $\mu\text{m}$ ), sowie die in die Detektionskapillare einzuführenden Enden der Transferkapillarsegmente (OD<sub>mit PI</sub> 365  $\mu\text{m}$  / OD<sub>ohne PI</sub> 320  $\mu\text{m}$  / ID<sub>Zuleitung</sub> 50  $\mu\text{m}$  / ID<sub>Ableitung</sub> 75  $\mu\text{m}$ ) vom Polyimid befreit.



**Abbildung 4-4:** Schematische Darstellung der verschiedenen Detektionszellen: **a)** Einteilige FS-Kapillare (durchgehend OD 360  $\mu\text{m}$  / ID 75  $\mu\text{m}$ ), **b)** Einteilige aufgeätzte FS-Kapillare (OD 365  $\mu\text{m}$ , durchgehend / ID<sub>Transfer</sub> 90  $\mu\text{m}$  / ID<sub>Detektion</sub> 240-280  $\mu\text{m}$ ), **c)** Segmentierte FS-Transfer- und Detektionskapillare (OD 365  $\mu\text{m}$ , durchgehend / ID<sub>Zuleitung</sub> 50  $\mu\text{m}$  / ID<sub>Ableitung</sub> 75  $\mu\text{m}$  / ID<sub>Detektion</sub> 250  $\mu\text{m}$ ), **d)** Segmentierte FS-Transfer- und Detektionskapillare (OD 365  $\mu\text{m}$ , durchgehend / ID<sub>Zuleitung</sub> 50  $\mu\text{m}$  / ID<sub>Ableitung</sub> 75  $\mu\text{m}$  / ID<sub>Detektion</sub> 320  $\mu\text{m}$ ).

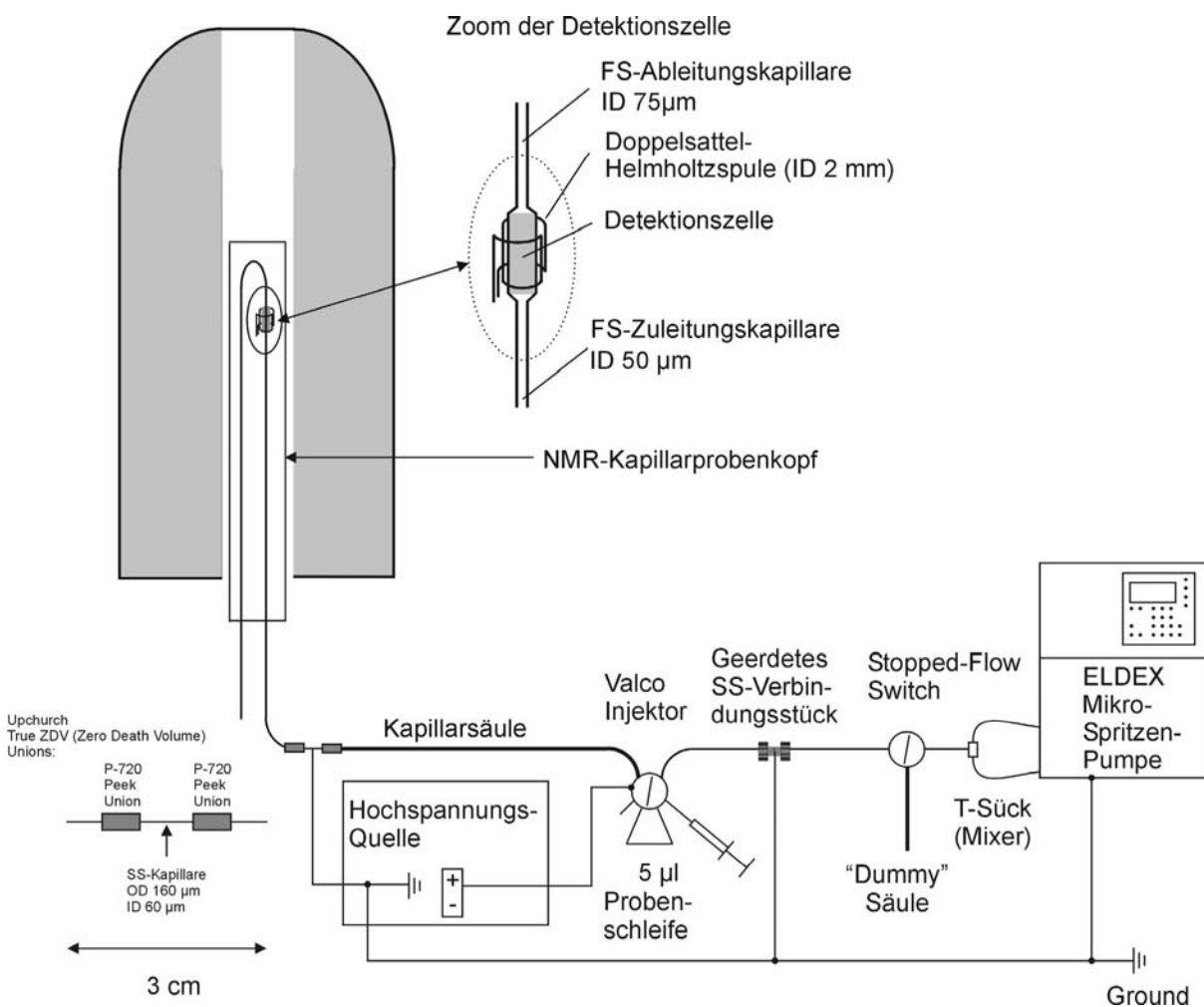
Das Gesamtvolumen des Detektionskapillarsegments beträgt nur noch 1,25  $\mu\text{L}$ , während die Detektionsspule (Länge 9 mm) nun ein Volumen von 750 nL umfasst. Das Detektionskapillarsegment wird an den geklebten Kopplungsstellen zusätzlich durch zwei jeweils 5 mm lange PTFE-Schrumpfschlauchstücke stabilisiert und abgedichtet ( $\text{OD}_{\text{geschrumpft}}$  500  $\mu\text{m}$ ). Die Zentrierung und Fixierung der Detektionskapillare im Bereich der Detektionsspule wird wie bei der geätzten Zelle durch zwei PTFE-Stecker (OD 1,59 mm / ID 0,4 mm) gewährleistet. Dieses Setup erlaubt es bei höchster Homogenität und Symmetrie der Detektionszelle, die Zuleitungskapillare (ID 50  $\mu\text{m}$ ) bis nahezu ganz an die Detektionsspule heranzuführen. So kann bei geringer NMR-Signalbreite und minimierter Bandenverbreiterung eine deutlich gesteigerte Sensitivität erreicht werden (siehe 4.3.1.1).

### **4.2.3 Universeller Aufbau zur splittlosen Kapillartrennmethode- NMR *On-line*-Kopplung mit stromloser Detektionszelle**

Der Einsatz eines 600-MHz NMR-Spektrometers zur *on-line*-Kopplung mit Kapillartrennmethode (cHPLC, CE und CEC) wurde in der jüngeren Vergangenheit schon mehrfach demonstriert [187,188,189,190,191,192,193,223,224]. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Aufbau (siehe Abbildung 4-5) zur *on-line*-Kopplung kapillarer Trennmethode (cHPLC, CEC, pCEC) mit der NMR-Spektroskopie unterscheidet sich von seinem Vorgänger im Prinzip dadurch, dass die mobile Phase durch eine Mikro-Spritzenpumpe geliefert wird und somit ein extrem lösungsmittel-sparender splittloser Betrieb möglich ist [195]. Des Weiteren ist beim neuen Setup aufgrund der Elektrodenanordnung eine stromlose Detektionszelle gegeben, was die Gefahr der Gerätebeschädigung deutlich verringert und zusätzlich die Möglichkeit der Spulenordnung senkrecht zum  $B_0$ -Feld eröffnet (siehe Abbildung 4-1 und Abbildung 4-2 ). Dies würde nun auch den Einsatz der empfindlicheren Solenoid-Spulen bei der *on-line*-Kopplung mit elektrokinetischen Trennmethode erlauben (vgl. 4.2.1.1). Zudem waren im stromführenden Vorgängermodell sehr große Elektrodenabstände gegeben (ca. 2 m, aufgrund der Dimensionierung des NMR-Gerätes). Damit ergaben sich sehr geringe Feldstärken für die elektrokinetischen Trennmethode und damit äußerst lange Analysenzeiten.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, durch ein optimiertes Setup (stromlose Detektionszelle, minimiertes Totvolumen und geringerer Elektrodenabstand [194,195]) die

Analysenzeiten zu verkürzen, sowie die Auflösung und die Empfindlichkeit zu erhöhen. Dazu wurde die segmentierte Detektionskapillare mittels zweier totvolumenfreier PEEK-Kupplungen über eine Edelstahlkapillare (SS / Länge 3 cm / ID 60  $\mu\text{m}$  / OD 160  $\mu\text{m}$ ) mit der Kapillartrennsäule verbunden. Die SS-Kapillare diente im weiteren Verlauf als Elektrode und erlaubte es, direkt nach dem Säulenende zu erden. Damit konnte das elektrische Feld (V/cm), bei gleicher angelegter Spannung, im Vergleich zum alten Aufbau um eine 10er-Potenz erhöht werden.



**Abbildung 4-5:** Schematischer Aufbau zur splittlosen on-line-Kopplung von Kapillartrenntechniken (cHPLC, CEC und pCEC) mit der NMR-Spektroskopie.

Um eine Beeinflussung des Magnetfeldes zu vermeiden, ist es notwendig, sämtliche elektrischen und magnetischen bzw. magnetisierbaren Geräte und Bauteile, wie Hochspannungsquelle und LC-Pumpe in einem Mindestabstand von 2 bis 3 m zum

Kryomagneten aufzustellen. Im Gegenzug verhindert man dadurch auch, dass das starke Magnetfeld die elektronischen Bausteine dieser Systeme stört oder gar zerstört und gewährleistet damit deren einwandfreien Betrieb. Dies gelingt nur mit einem modularen Trennsystem; d.h. die Injektions-, Elektroden- und Säuleneinheit dürfen weder magnetisch bzw. magnetisierbar sein und müssen vom Pump- und Hochspannungssystem abgekoppelt werden, um möglichst nahe am Probenkopf installiert werden zu können, ohne die Homogenität des magnetischen Feldes zu stören. Der Kapillarsäuleneinlass wird direkt in ein *microbore* Valco Handinjektionsventil eingekoppelt, welches mit seinem SS-Stator zugleich als Hochspannungselektrode dient. Um die Pumpe vor der Hochspannung zu schützen wird die FS-Zuleitungskapillare auf halber Strecke durch eine SS-Kupplung unterbrochen und über diese geerdet. Um den Operator selbst vor Elektroschocks zu schützen, muss der Hebel des Handinjektors aus Isolatormaterial bestehen. So kann je nach Betriebsart die Hochspannung zu- (CEC, pCEC) oder abgeschaltet (cHPLC) werden. Aufgrund des durch den splittlosen Betrieb äußerst geringen Lösungsmittelverbrauchs (10-100 mL / Woche bei 24 h Dauerbetrieb mit einer Flussrate von 1-10 µl/min) ist es auch beim Arbeiten mit voll deuterierten Lösungsmitteln vertretbar, die Doppelspritzenpumpe zwischen den einzelnen Läufen bzw. bei *stopped-flow* Experimenten nicht anzuhalten (und somit eine evtl. zeitkonsumierende Rekonditionierung des kapillaren Trennsystems in Kauf zu nehmen), sondern einfach weiterlaufen zu lassen. Der Pumpen-Fluss wird stattdessen mit Hilfe eines zweiten *microbore* Valco Schaltventils über eine der eigentlichen Trennsäule identischen (ID / OD / Länge / Packungsmaterial) „Dummy“-Kapillarsäule umgeleitet. Dadurch fällt der Druck im Trennsystem nahezu zeitgleich auf Atmosphärendruck ab und die Elutionsbanden (z.B. bei *stopped-flow* Experimenten) verharren am gewünschten Ort (in der Detektionszelle), während sich für das Pumpsystem nichts verändert, da durch die zweite Kapillarsäule der gleiche Gegendruck zu überwinden ist. Der Probenkopf war für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen immer mit einer der in Kapitel 4.2.2 vorgestellten Detektionszellen bestückt.

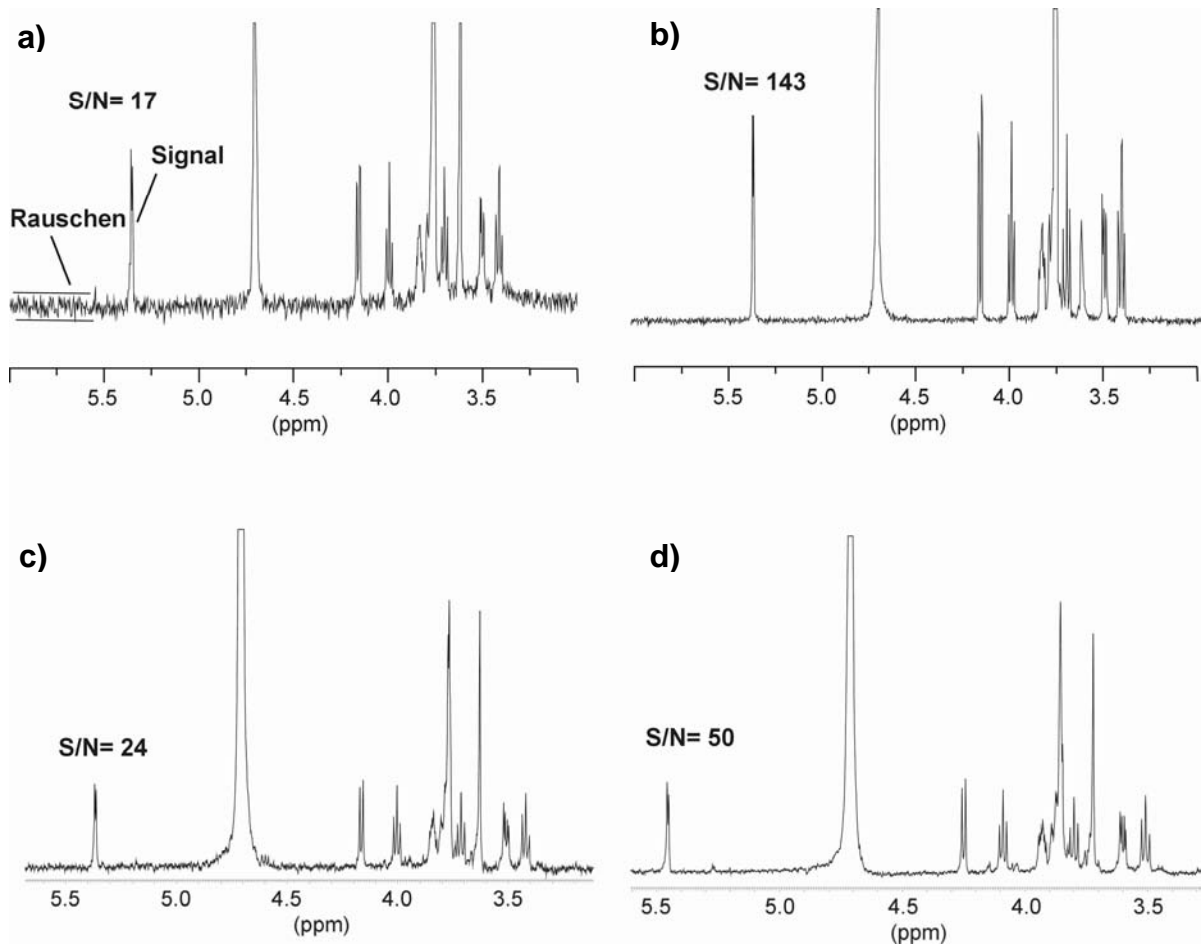
## 4.3 Experimentelle Ergebnisse und Applikationen

### 4.3.1 Vergleich des alten mit dem neuen Setup

#### 4.3.1.1 Qualität und Empfindlichkeit der Detektionszellen

Die Linienform-Qualität eines  $^1\text{H}$ -NMR-Probenkopfes und seiner Detektionszelle wird durch die Signalhalbwertsbreite, sowie durch die Linienbreite in Höhe der  $^{13}\text{C}$ -Satelliten (Hump-Test) [209] charakterisiert. Dazu wurde in dieser Arbeit die Halbwertsbreite des  $^1\text{H}$ -Chloroformsignals als Bezugspunkt genommen. Ist das Signal aufgrund von Feldinhomogenitäten verbreitert (schlechter *Shim* aufgrund von Suszeptibilitätsproblemen durch eine unzureichende Symmetrie der Detektionszelle), führt dies zu einer vergrößerten Signalhalbwertsbreite und damit zu einem niedrigeren S/N-Verhältnis. Mit den 250  $\mu\text{m}$  ID Detektionszellen (dargestellt in Abbildung 4-4b+c) konnten Halbwertsbreiten um 1 Hz erreicht werden. Die *Shim*-Prozedur für die geätzte Zelle gestaltete sich jedoch teilweise als sehr schwierig und langwierig, während sich die segmentierte Zelle deutlich einfacher auf einen Wert  $\leq 1\text{Hz}$  *shimmen* ließ. Dies weist auf eine bessere Symmetrie (z.B. glattere Oberfläche) der nicht geätzten segmentierten Zellen hin. Mit den 320  $\mu\text{m}$  ID Detektionszellen (dargestellt in Abbildung 4-4d) konnten sogar regelmäßig Halbwertsbreiten unter 0,7 Hz erreicht werden (teilweise auch unter 0,6 Hz). Um die Sensitivitäten der einzelnen Systeme miteinander vergleichen zu können, wurden für eine 200 mM Saccharose-Lösung in  $\text{D}_2\text{O}$  die Signal-Rausch-Verhältnisse für das anomere Proton bestimmt:





**Abbildung 4-6:** Vergleich der erreichbaren Empfindlichkeiten für die verschiedenen kapillaren Detektionszellen mit dem Kapillarprobenkopf (Spulenlänge: 9 mm / Spulen ID: 2 mm). Probe: 200 mM Saccharose (45,6 g/l) in D<sub>2</sub>O. **a)** Einteilige FS-Kapillare (durchgehend OD 360  $\mu\text{m}$  / ID 75  $\mu\text{m}$ ). **b)** Einteilige aufgeätzte FS-Kapillare (OD 365  $\mu\text{m}$ , durchgehend / ID<sub>Transfer</sub> 80  $\mu\text{m}$  / ID<sub>Detektion</sub> 280  $\mu\text{m}$ ). **c)** Segmentierte FS-Transfer- und Detektionskapillare (OD 365  $\mu\text{m}$ , durchgehend / ID<sub>Zuleitung</sub> 50  $\mu\text{m}$  / ID<sub>Ableitung</sub> 75  $\mu\text{m}$  / ID<sub>Detektion</sub> 250  $\mu\text{m}$ ). **d)** Segmentierte FS-Transfer- und Detektionskapillare (OD 365  $\mu\text{m}$ , durchgehend / ID<sub>Zuleitung</sub> 50  $\mu\text{m}$  / ID<sub>Ableitung</sub> 75  $\mu\text{m}$  / ID<sub>Detektion</sub> 320  $\mu\text{m}$ ).

[Für a) und b) wurden jeweils 16 Transienten aufsummiert während für c) und d) nur 1 Transient aufgezeichnet wurde. Das S/N wurde nach Normierung auf die Transientenzahl 1 entsprechend Kapitel 4.1.1 berechnet.]

- a) Einteilige Detektionskapillare-Kapillare (durchgehend OD 360  $\mu\text{m}$  / ID 75  $\mu\text{m}$ , vgl. Abbildung 4-4a)  
S/N = 4,25 (bei NS = 1 / LB = 1 Hz) dies entspricht dem aus Abbildung 4-6a bestimmten S/N = 17 (bei NS = 16 / LB = 1 Hz).
- b) Einteilige aufgeätzte FS-Kapillare (OD 365  $\mu\text{m}$ , durchgehend / ID<sub>Transfer</sub> 80  $\mu\text{m}$  / ID<sub>Detektion</sub> 280  $\mu\text{m}$ , vgl. Abbildung 4-4b):

$S/N = 35,75$  (bei  $NS = 1 / LB = 1$  Hz) dies entspricht dem aus Abbildung 4-6b bestimmten  $S/N = 143$  (bei  $NS = 16 / LB = 1$  Hz).

- c) Segmentierte FS-Transfer- und Detektionskapillare (OD  $365\mu\text{m}$ , durchgehend /  $ID_{\text{Zuleitung}} 50\mu\text{m}$  /  $ID_{\text{Ableitung}} 75\mu\text{m}$  /  $ID_{\text{Detektion}} 250\mu\text{m}$ , vgl. Abbildung 4-4c):

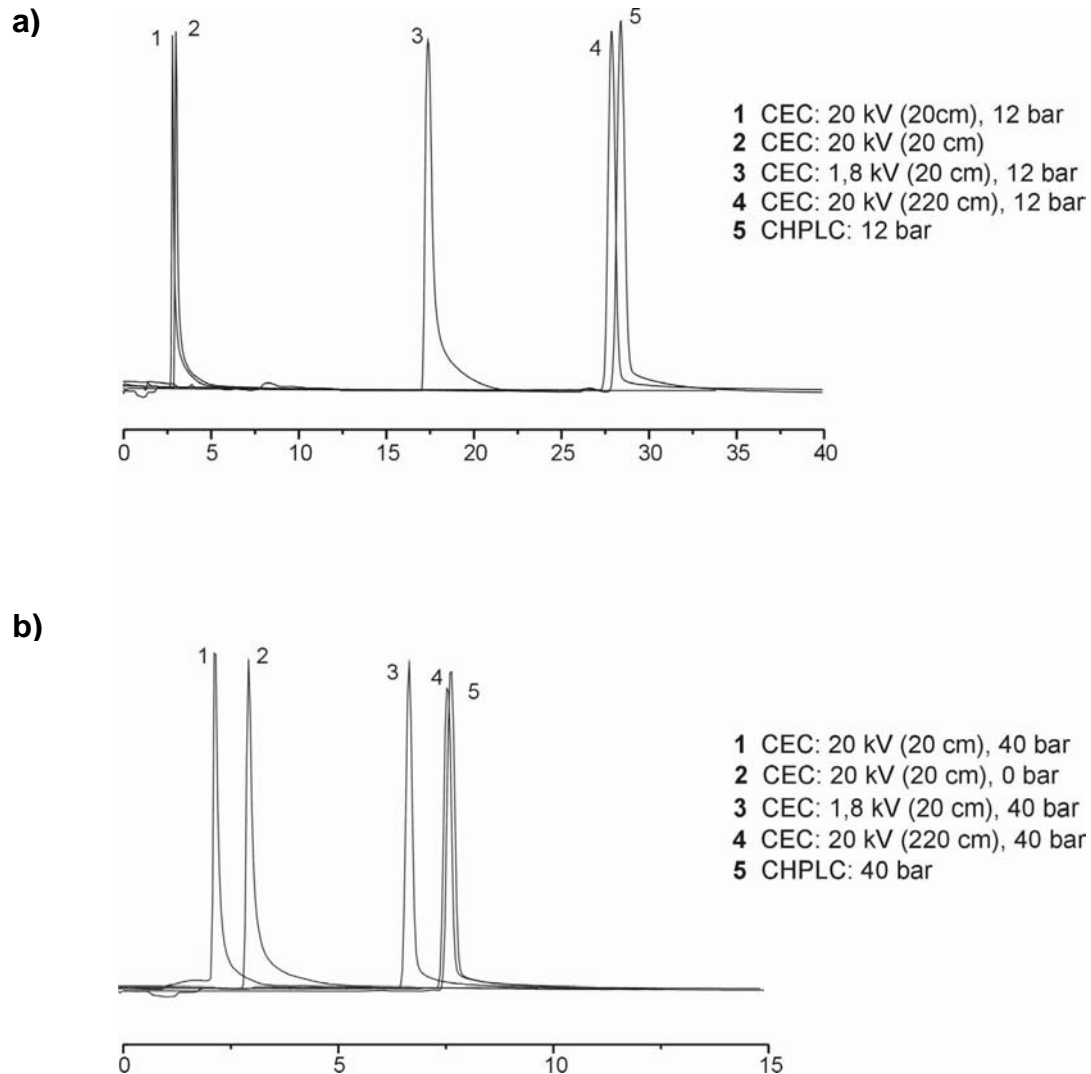
$S/N = 24$  (bei  $NS = 1 / LB = 1$  Hz), siehe Abbildung 4-6c.

- d) Segmentierte FS-Transfer- und Detektionskapillare (OD  $365\mu\text{m}$  bzw,  $400\mu\text{m}$  /  $ID_{\text{Zuleitung}} 50\mu\text{m}$  /  $ID_{\text{Ableitung}} 75\mu\text{m}$  /  $ID_{\text{Detektion}} 320\mu\text{m}$ , vgl. Abbildung 4-4d):

$S/N = 50$  (bei  $NS = 1 / LB = 1$  Hz), siehe Abbildung 4-6d.

#### **4.3.1.2 Einfluss der applizierbaren Feldstärke auf die chromatographische Trennleistung des jeweiligen Setups** **(Untersuchung mittels UV-Detektion)**

Bevor das neue System in NMR-Kopplungen zum Einsatz kam, wurde es mittels UV-Messungen getestet. Dazu wurde eine gepackte Kapillarsäule (Säuleneinlass: Innenkonus / Säulenauslass: gesinterte Fritte /  $ID 250\mu\text{m}$  /  $OD 365\mu\text{m}$ ) mit Hilfe einer Edelstahlkupplung mit einer 2 Meter langen Quarzglas-Kapillare ( $ID 75\mu\text{m}$ , ein Detektionsfenster in der Mitte; vgl. Abbildung 4-4a) verbunden. Mit Thioharnstoff (als  $t_0$ -Marker) wurde zuerst die Totzeit des Systems unter cHPLC- Bedingungen bestimmt. Dazu wurden Pumpendrucke von 12 bzw. 40 bar angelegt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 4-7 dargestellt. Die zugehörigen  $t_0$ -Zeiten sind in Tabelle 4-1 und Tabelle 4-2 zusammengefasst. Zuerst wurden die  $t_0$ -Zeiten der reinen cHPLC-Läufe erfasst (jeweils Lauf Nr. 5) und danach die  $t_0$ -Zeiten der CEC (jeweils Lauf Nr. 2) und pCEC-Läufe (jeweils Lauf Nr. 1, 3 und 4) ermittelt. Beim Testen des alten Systems (Elektrodenabstand von 220 cm) wurde bei angelegter Spannung von 20 kV im reinen CEC-Modus (jeweils Lauf Nr. 6), selbst nach 80 min kein Thioharnstoff von der Säule eluiert, daraufhin wurde der Lauf abgebrochen. Anschließend wurde das alte System unter pCEC-Modus getestet (jeweils Lauf Nr. 4). Dazu wurden Pumpendrucke von 12 bzw. 40 bar und analog zur reinen CEC eine Spannung von 20 kV über die gesamte Länge von 220 cm angelegt.



**Abbildung 4-7:** Gegenüberstellung des alten (Elektrodenabstand 220 cm) und des neuen (Elektrodenabstand 20 cm) Setups, anhand von Totzeitbestimmungen (Thioharnstoff als  $t_0$ -Marker) mittels chPLC-, CEC- und pCEC-Läufen. **a)** 12 bar Pumpen-Druck, **b)** 40 bar Pumpen-Druck.

Wie man Abbildung 4-7 entnehmen kann, ergibt sich nur ein minimaler Geschwindigkeitsgewinn durch die zusätzlich angelegte Spannung (vgl. jeweils Lauf Nr. 4 und 5). Daraus ist auch zu entnehmen, dass der Geschwindigkeitsgewinn mit zunehmendem Druck abnimmt. Bei allen folgenden Messungen wurde entsprechend dem in Kapitel 4.2.3 vorgestellten und in Abbildung 4-5 gezeigten neuen Aufbaus nach 20 cm mittels der SS-Kupplung geerdet. Hier ergibt eine zusätzlich angelegte Spannung von 20 kV bei einem Pumpendruck von 12 bar (vgl. Abbildung 4-7a, Lauf Nr. 1) eine Verringerung der Analysenzeit um 90%. Bei einem erhöhten Pumpendruck von 40 bar ergibt sich bei angelegter Spannung (vgl. Abbildung 4-7b, Lauf Nr. 1) immer noch eine Verbesserung um ca. 70 %. Vergleicht man die pCEC-

Ergebnisse mit denen der reinen CEC (vgl. jeweils Lauf Nr. 2), so erkennt man den deutlichen Einfluss des Pumpendruckes auf die Fließgeschwindigkeit. Während bei 12 bar Pumpendruck der CEC- und der pCEC-Lauf annähernd gleich schnell sind, ergibt sich bei 40 bar ein Geschwindigkeitsgewinn im pCEC-Modus gegenüber dem CEC-Modus um 25 %.

Lauf Nr.	Methode (Angelegte Spannung, Elektrodenabstand, Druck)	$t_0$ [min]
1	pCEC (20 kV, 20 cm, 12 bar)	2,81
2	CEC (20 kV, 20 cm)	3,00
3	pCEC (1,8 kV, 20 cm, 12 bar)	17,34
4	pCEC (20 kV, 220 cm, 12 bar)	27,84
-	chPLC (12 bar)	28,36

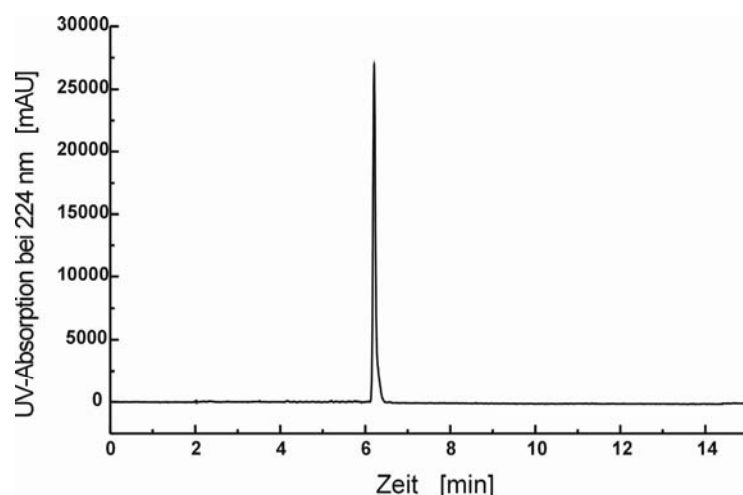
**Tabelle 4-1:**  $t_0$ -Zeiten der chPLC-, CEC- und pCEC-Läufe bei 12 bar angelegtem Pumpen-Druck.

Peak Nr.	Methode (Angelegte Spannung, Elektrodenabstand, Druck)	$t_0$ [min]
1	pCEC (20 kV, 20cm, 40 bar)	2,24
2	CEC (20 kV, 20 cm)	3,00
3	pCEC (1,8 kV, 20 cm, 40 bar)	6,76
4	pCEC (20 kV, 220 cm, 40 bar)	7,62
-	chPLC (40 bar)	7,65

**Tabelle 4-2:**  $t_0$ -Zeiten der chPLC-, CEC- und pCEC-Läufe bei 40 bar angelegtem Pumpen-Druck.

Um den Einfluss der langen Transferkapillare mit kleinerem Innendurchmesser auf den EOF zu untersuchen, wurde wiederum am Ende der Trennsäule geerdet (20 cm), es wurde jedoch nur noch eine Elektrodenspannung von 1,8 kV angelegt (vgl. jeweils Lauf Nr. 3). Dies entspricht der elektrischen Feldstärke (V/cm) des alten Setups bei 20 kV angelegter Spannung und einem Elektrodenabstand von 220 cm.

Es zeigte sich bei beiden eingestellten Pumpendrücken, dass beim neuen Setup trotz vermeintlich gleicher Feldstärke eine erhebliche Verkürzung der Totzeit ( $\approx$  Faktor 2 bei 12 bar Pumpendruck) auftrat (vgl. jeweils Lauf Nr. 3 und 4). Dies lässt sich auf die in 3.3.3.2 beschriebene und in Abbildung 3-17 dargestellte ungleiche Verteilung des Spannungsabfalls zurückführen. Diese unproportionale Verteilung (d.h. der Spannungsabfall über die gepackte Kapillare ist deutlich kleiner als 1,8 kV, was dem proportional berechneten Anteil entspräche) hat zur Folge, dass der Großteil des elektrischen Feldes und damit des EOFs in der offenen Transfer- und Detektionskapillare (ID 75  $\mu\text{m}$ ) und nicht in der gepackten Trennkapillare generiert wird. Das offene Transfer- und Detektionskapillarsegment bietet im Vergleich zum gepackten Trennkapillarsegment ein äußerst schlechtes Oberfläche/Volumen-Verhältnis. Dadurch ist der im OT-Segment generierte EOF im Vergleich zum im gepackten Segment generierten EOF von so geringer hydrodynamischer Kraft, dass der Gesamtfluss durch das System ausschließlich durch den EOF des gepackten Segments limitiert wird. D.h. die Restriktorwirkung der Packung ist für den EOF der offenen Transfer- und Detektionskapillare so erheblich, dass er keinen Beitrag zum Gesamtfluss leisten kann. Somit ist eine Elektrodenkontaktierung direkt nach dem gepackten Segment (neues Setup) dem alten Aufbau eindeutig vorzuziehen. Das neue System führte jedoch bei den UV-Chromatogrammen, wie in Abbildung 4-7 deutlich zu erkennen, zu einem starken Tailing der Peaks.

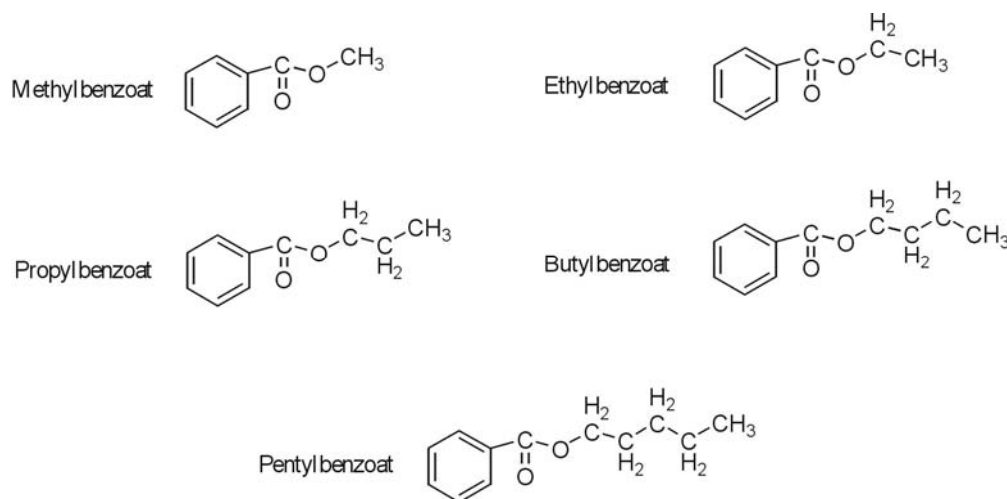


**Abbildung 4-8:** CEC-Lauf mit neuem Setup (Elektrodenabstand 20 cm, Thioharnstoff als  $t_0$ -Marker, Pumpen-Druck 0 bar, Spannung 20 kV) aber mit verringertem Totvolumen (Kupplungseinheit: SS Kapillare ID 60  $\mu\text{m}$ , ID<sub>Transferkapillare</sub> 50  $\mu\text{m}$  (analog Aufbau Abbildung 4-5)).

Dies ließ sich jedoch auf das zu große Totvolumen der SS-Kupplung und den zu großen Durchmesser der Transferkapillare zurückführen. Durch eine Optimierung der Kupplungseinheit (SS Kapillare ID 60  $\mu\text{m}$ , Abbildung 4-5) und eine Verringerung des Innendurchmessers der Transferkapillare auf 50  $\mu\text{m}$  konnte die Peakform deutlich verbessert werden (siehe Abbildung 4-8). Ein gewisser Beitrag zur Bandenverbreiterung aufgrund des laminaren Flussprofils in der Transferkapillare bleibt natürlich unvermeidlich.

#### 4.3.1.3 Vergleichende Auftrennung von Benzoessäureestern und *on-line* NMR-Detektion

Um einen direkten *on-line* LC-NMR-Kopplungs-Vergleich durchzuführen, wurde zunächst ein Standardgemisch (bestehend aus der homologen Reihe des Methyl- bis Pentylbenzoessäureesters, siehe Abbildung 4-9) mit den verschiedenen Kapillartrennmethode aufgetrennt und die *on-line* NMR-Konturplots mit denen des alten Systems [188] verglichen.



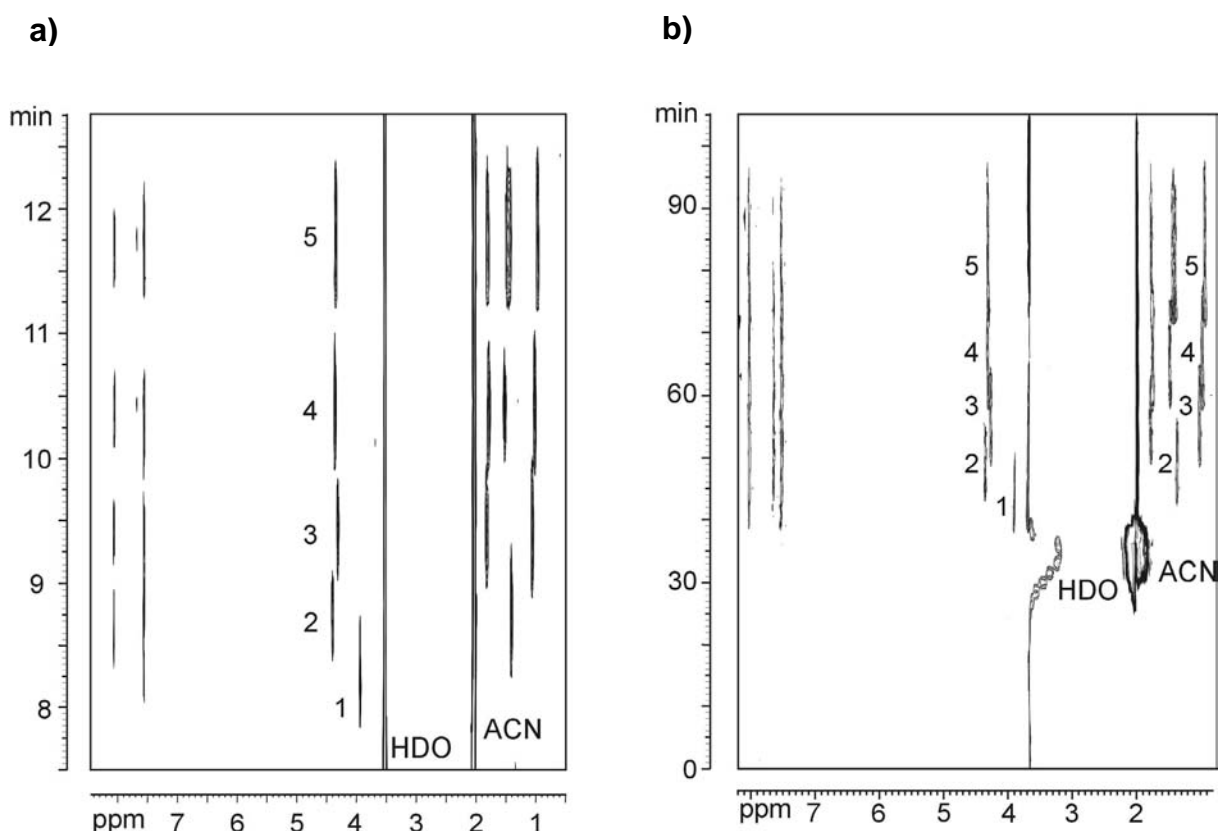
**Abbildung 4-9:** Strukturformeln der homologen Reihe der Alkylbenzoessäureester.

Dazu wurde wiederum eine gepackte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (Säuleneinlass: Innenkonus / Säulenauslass: gesinterte Fritte / ID 250  $\mu\text{m}$  / OD 365  $\mu\text{m}$ ) mit Hilfe eines Edelstahlkapillarstückes totvolumenfrei an die neue Detektionskapillare (ID<sub>Zuleitung</sub> 50  $\mu\text{m}$ , ID<sub>Detektionszelle</sub> 320  $\mu\text{m}$ ; vgl. Abbildung 4-4d & Abbildung 4-5)

gekoppelt. Für jede Kopplungstechnik wurden die verschiedenen chromatographischen Parameter und die wichtigsten NMR-Einstellungen optimiert, um die bestmögliche Qualität für die *on-line* NMR-detektierten Testtrennungen zu gewährleisten.

#### *cHPLC-Trennung:*

In Abbildung 4-10a ist der Konturplot eines optimierten cHPLC-Laufes mit dem neuen Setup (siehe Abbildung 4-4d) dargestellt.



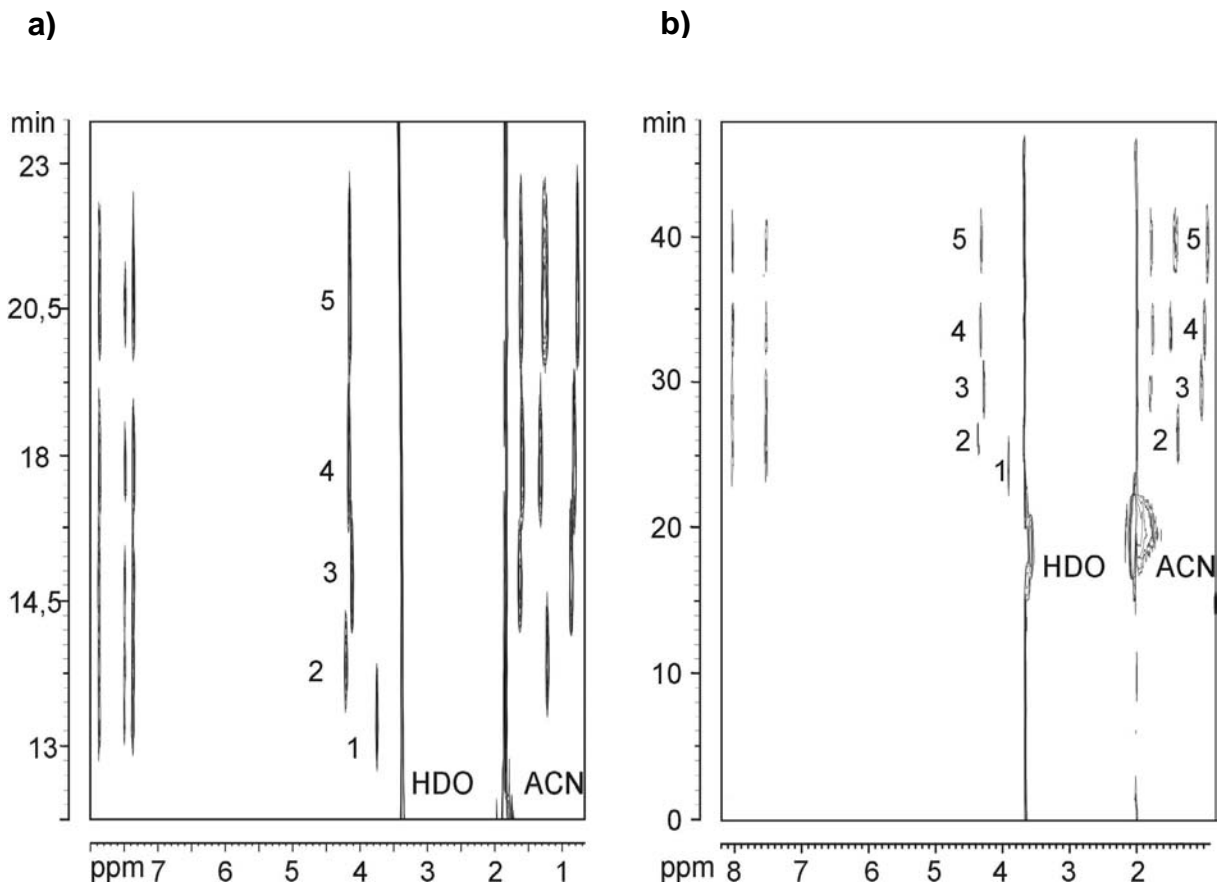
**Abbildung 4-10:** *cHPLC-NMR-Konturplots der Trennung von 5 Alkylbenzoaten (1 Methyl-, 2 Ethyl-, 3 Propyl-, 4 Butyl-, 5 Pentylbenzoat). a) NMR Experiment mit neuem Setup. b) NMR Experiment mit altem Setup.*

Die injizierte Menge der einzelnen Ester (12,5 nmol Methyl- bis 25 nmol Pentylbenzoesäureester) ist bei vergleichbarer Signalintensität 8-fach geringer als die notwendige Injektionsmenge mit dem alten Setup (Abbildung 4-4b), bei dem mindestens 100-200 nmol der einzelnen Benzoate injiziert werden mussten [188], um einen Konturplot mit ausreichendem Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten (siehe Abbildung 4-10b).

Aufgrund der höheren Empfindlichkeit konnte die Injektionsmenge bei einer 4,5-fach kürzeren Aufnahmezeit/Spektrum (d.h.  $4,5 \times$  höhere Zeitauflösung), deutlich verringert und die bislang notwendige starke Überladung der Kapillartrennsäulen nahezu eliminiert werden. Dies ermöglichte zusammen mit der verbesserten Qualität und Haltbarkeit der Kapillartrennsäulen eine deutlich verbesserte Trennleistung und damit die Verkürzung der Analysenzeit um den Faktor 8 auf unter 13 Minuten bei immer noch fast vollständiger Basislinientrennung.

*pCEC-Trennung:*

In Abbildung 4-11a ist der Konturplot eines optimierten pCEC-Laufes mit dem neuen Setup dargestellt.



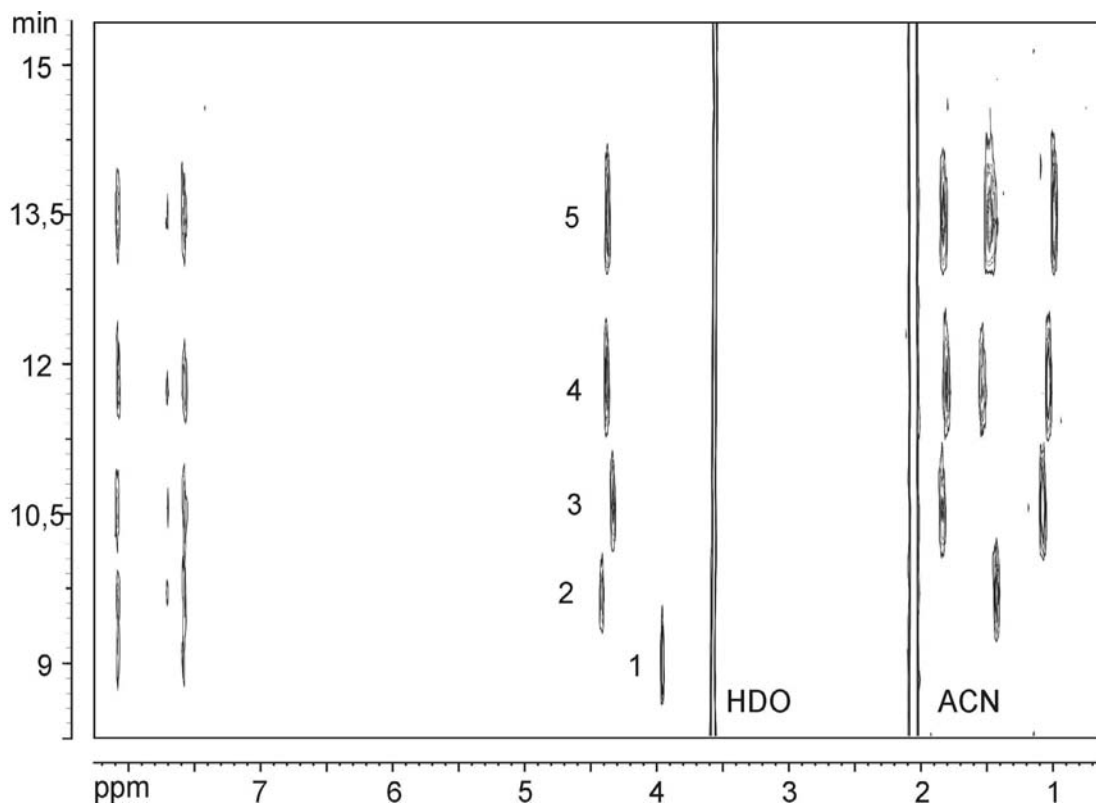
**Abbildung 4-11:** *pCEC-NMR-Konturplots der Trennung von 5 Alkylbenzoaten (1 Methyl-, 2 Ethyl-, 3 Propyl-, 4 Butyl-, 5 Pentylbenzoat). a) NMR Experiment mit neuem Setup. b) NMR Experiment mit altem Setup.*



Aufgrund der durch den EOF verringerten Bandenverbreiterung (d.h. höhere Peakkonzentration) konnte die injizierte Menge der einzelnen Ester (8,3 nmol Methyl- bis 16,6 nmol Penthylbenzoesäureester), bei im Vergleich zur cHPLC-Trennung verbesserter Signalintensität, weiter verringert werden. Im Vergleich zum alten Setup konnte nun, bei einer 3-fach kürzeren Aufnahmezeit/Spektrum (d.h.  $3 \times$  höhere Zeitauflösung), eine über 12-fach geringere Probenmenge injiziert werden, um einen Konturplot mit einem immer noch besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten (vgl. Abbildung 4-11 a&b). Die deutlich verringerte Beladung der Kapillartrennsäule ermöglichte wiederum eine deutlich verbesserte Trennleistung und damit die Verkürzung der Analysenzeit um den Faktor 2 auf unter 23 Minuten bei fast vollständiger Basislinientrennung.

#### *CEC-Trennung:*

In Abbildung 4-12 ist der Konturplot eines optimierten CEC-Laufes mit dem neuen Setup dargestellt. Im reinen CEC-Modus findet der Transport der mobilen Phase durch die Trennsäule ausschließlich durch den EOF statt.



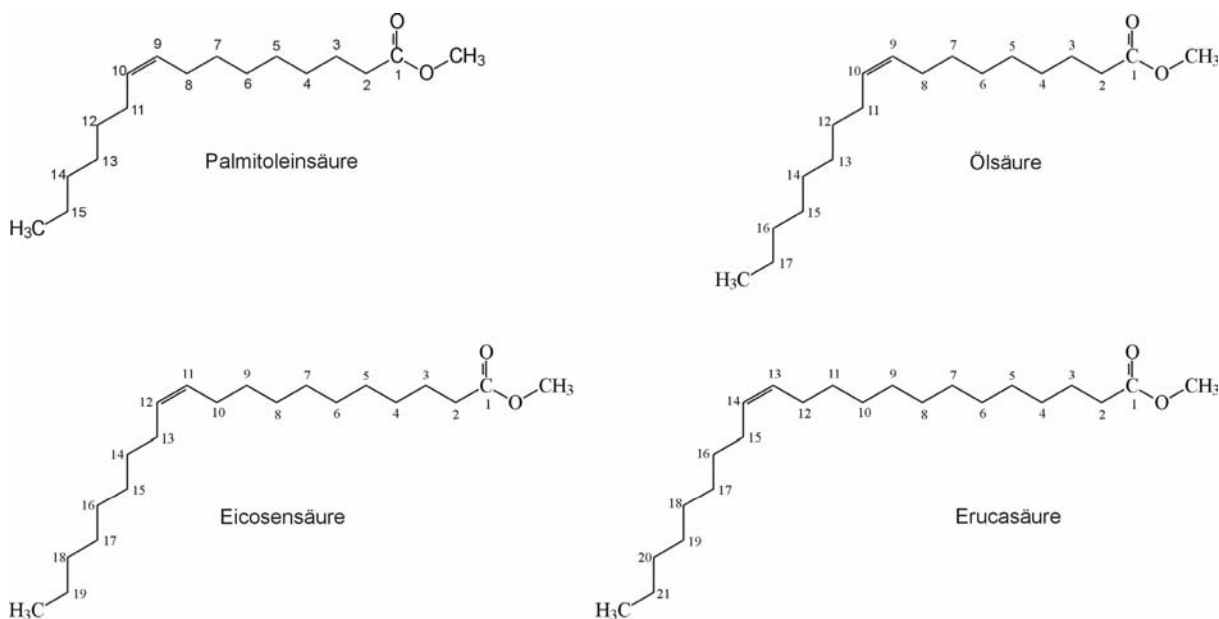
**Abbildung 4-12:** CEC-NMR-Konturplot der Trennung von 5 Alkylbenzoaten. (1 Methyl-, 2 Ethyl-, 3 Propyl-, 4 Butyl-, 5 Pentylbenzoat) mit neuem Setup.

Aufgrund seines dem Druckfluss überlegenen pfropfenförmigen Flussprofils und der dadurch weiter verringerten Bandenverbreiterung (d.h. noch höhere Peakkonzentration), konnte bei gleicher injizierter Menge der einzelnen Ester (8,3 nmol Methyl- bis 16,6 nmol Penthylbenzoesäureester), die Signalintensität der pCEC-Trennung trotz verkürzter Aufnahmedauer gehalten werden. Im Vergleich mit dem cHPLC-Lauf mit neuem Setup konnte so im CEC-Modus, bei halbiertes Aufnahmezeit/Spektrum (und damit 2-fach höherer Zeitauflösung), eine über 1,5-fach geringere Probenmenge injiziert werden, um einen Konturplot mit vergleichbarem Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten (vgl. Abbildung 4-10a & Abbildung 4-12). Die verringerte Beladung der Kapillartrennsäule und die durch den EOF verbesserte Trennleistung erlaubte nun bei identischer Analysenzeit eine Auftrennung der Benzoate mit vollständiger Basislinientrennung.

Im Vergleich zum alten Setup, wo durchwegs 64 Transienten pro Spektrum vonnöten waren, können mit dem neuen Setup für alle drei Kapillartrennmethode(n) (mit einer bislang unerreichten Empfindlichkeit) bessere Signalintensitäten bei verringerter Probenmenge, erhöhter spektraler Auflösung und verbesserter Zeitauflösung erreicht werden. Dies lässt wiederum eine deutliche Verkürzung der Analysenzeiten zu.

### **4.3.2 Vergleich der beiden neuen Setups mittels *on-line* Analytik von Fettsäure-Methylestern**

Um die Einsatzmöglichkeit einer 320  $\mu\text{m}$  ID Detektionszelle in Verbindung mit einer 250  $\mu\text{m}$  ID Kapillartrennsäule zu überprüfen, wurden mit dem neuen System (siehe Abbildung 4-5) sowohl mit der 250  $\mu\text{m}$  ID (Abbildung 4-4c, Gesamtvolumen: 2,9  $\mu\text{l}$ , Detektionsvolumen 400 nl) als auch mit der 320  $\mu\text{m}$  ID Detektionszelle (Abbildung 4-4d, Gesamtvolumen: 1,25  $\mu\text{l}$ , Detektionsvolumen 750 nl) *on-line*-Kopplungs cLC-NMR-Experimente durchgeführt und miteinander verglichen. Dazu wurden vier Fettsäuremethylester (siehe Abbildung 4-13) mittels einer gepackten Kapillarsäule mit nur einer Fritte (Säuleneinlass: Innenkonus / Säulenauslass: gesinterte Fritte / ID 250  $\mu\text{m}$  / OD 365  $\mu\text{m}$ ) aufgetrennt und *on-line* im NMR Spektrometer detektiert (Abb 4-15/16/17/18) und analysiert (Abb 4-19/20/21). Die Fettsäuremethylester wurden als Beispielsubstanzen ausgewählt, da viele ungesättigte Verbindungen in lebenden Organismen eine entscheidende, oft lebenswichtige Rolle spielen [225].

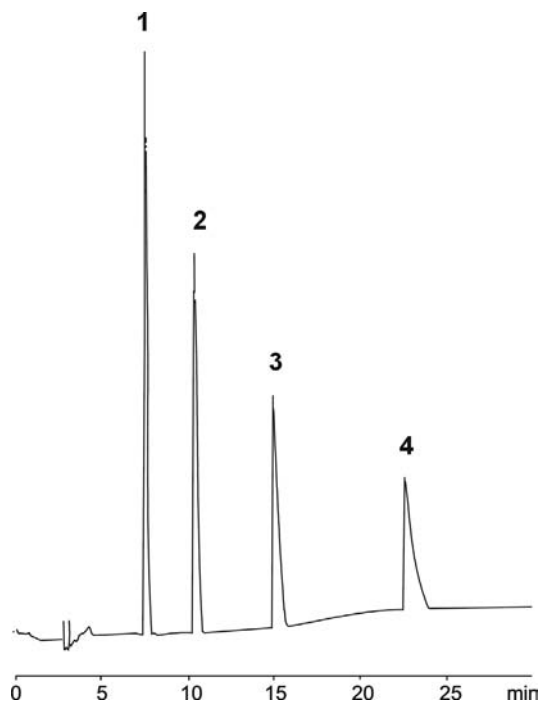


**Abbildung 4-13:** Strukturformeln der verschiedenen einfach ungesättigten Fettsäuremethylester.

Da diese Verbindungen teilweise schon in sehr geringen Konzentrationen biologisch aktiv sind, ist die Entwicklung von spezifischen und empfindlichen Methoden zur Trennung, Identifizierung und Quantifizierung von allgemeinem Interesse. Bisher wurden ungesättigte Fettsäuremethylester mit Papier-, Dünnschicht- und Gaschromatographie, sowie mit RP-HPLC [226,227,228] und Silberionen-HPLC [229,230] getrennt. Letztere wird vor allem im Hinblick auf die Trennung von cis/trans Isomeren verwendet [231], wobei die ungesättigten Fettsäuremethylester eine sehr hohe Affinität gegenüber Silberionen zeigen und damit bestens für eine Kopplung mit CIS-MS (*coordination-ion-spray*) als Detektor geeignet sind [232]. Der Vorteil der Kopplung mit NMR gegenüber der Kopplung mit MS ist die theoretische Möglichkeit, cis/trans-Isomere voneinander unterscheiden zu können.

Zur Vorbereitung von Kopplungsexperimenten wurde die Trennung des Substanzgemisches mittels eines kommerziellen CEC-Gerätes (PACE/MDQ Beckman) optimiert. Das erhaltene Elektrochromatogramm ist in Abbildung 4-14 dargestellt. Neben den chromatographischen Parametern wurden für jede Kopplungstechnik die NMR-Einstellungen optimiert, um die bestmögliche Qualität für die *on-line* NMR-detektierten Trennungen zu gewährleisten. Obwohl der gewählte Kapillarsäulendurchmesser für CEC-Säulen relativ groß ist, konnte auch ohne zusätzliche Kühlung bei Spannungen bis 30 kV über mehrere Stunden ein stabiler

EOF generiert werden, ohne dass Joulsche Wärmeentwicklung in Form von Blasenbildung zum Problem geworden wäre.



**Abbildung 4-14:** CEC/UV-Trennung der vier einfach ungesättigten Fettsäuremethylester: 1 Palmitoleinsäuremethylester; 2 Ölsäuremethylester; 3 Eicosensäuremethylester; 4 Erucasäuremethylester.

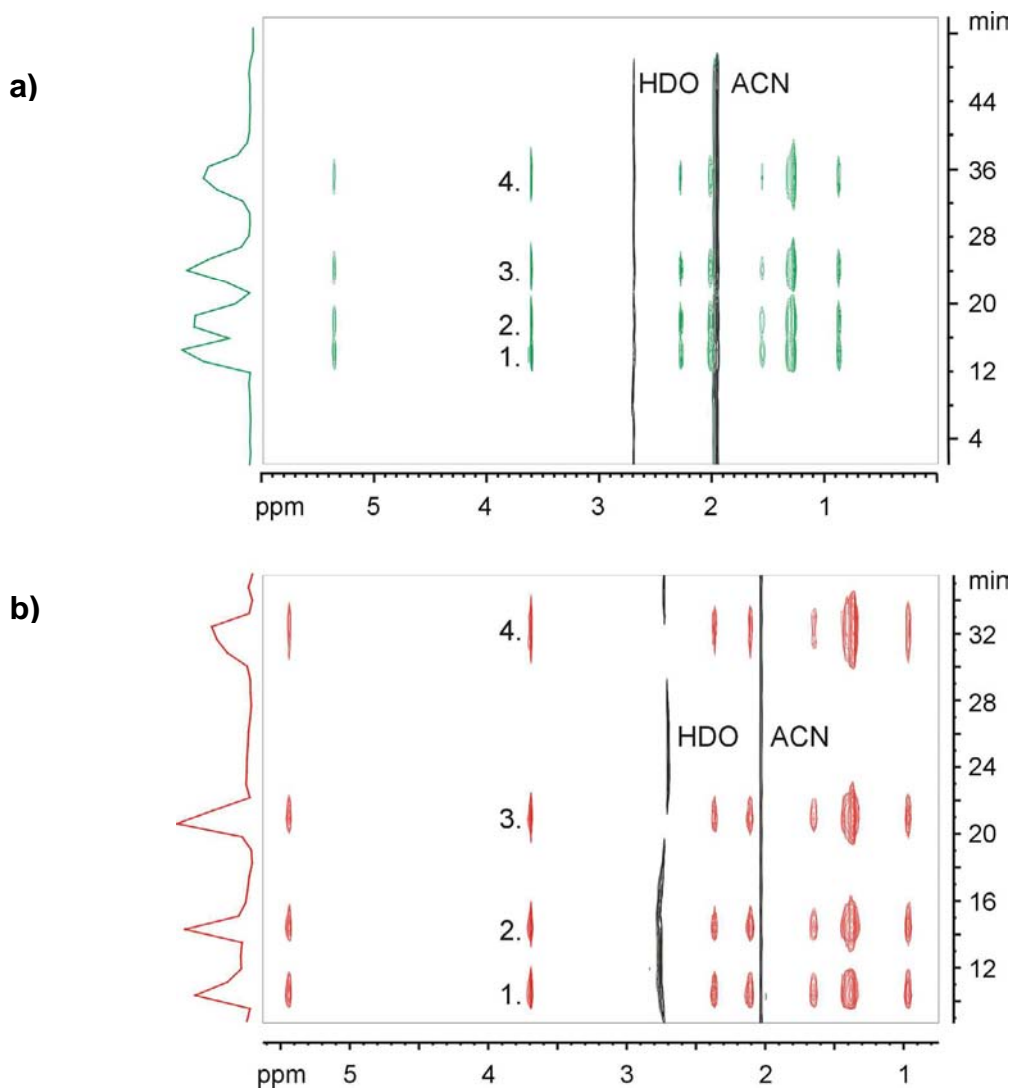
Für die einzelnen Messungen, speziell die *stopped-flow* Messungen, wurde keine überproportionale Bandenverbreiterung beobachtet, d.h. alle Bauteile des Systems (Injektor, Kapillarsäule, Kupplungen, Transferkapillaren und Detektionszellen) sind miteinander kompatibel. Das sofortige Anhalten bzw. Starten oder Weiterfahren einer Trennung konnte durch Hin- und Zurückschalten des Pumpenflusses von der Trennsäule auf die „Dummy“-Säule problemlos bewerkstelligt werden und ermöglichte die Durchführung von Langzeit-Experimenten (z.B.: 1D- und 2D-*stopped-flow* Messungen) ohne nennenswerte Verschlechterung des Geräte-Shims. Vor allem zur Analyse unbekannter, oft nur in geringer Konzentration vorliegender, Substanzen in Extrakten biologischer Proben, ist die Möglichkeit zu Langzeitmessungen mittels *stopped-flow* Experimenten bei der LC-NMR Kopplung ein wichtiges Instrument zur Strukturaufklärung.

Obwohl beide Zellen sehr symmetrisch und im Vergleich zu geätzten Zellen eine deutlich glattere Innenoberfläche aufweisen, zeigte die 320 µm ID Detektionszelle im Vergleich mit der 250 µm ID Zelle aufgrund ihres besseren Füllfaktors eine nochmals

verbesserte Empfindlichkeit. So konnte mit der 320  $\mu\text{m}$  ID Zelle eine 8,4-fach geringere Menge der Fettsäuremethylester injiziert werden ohne dabei an Signalhöhe einzubüßen. Dadurch war es im Gegensatz zu den Messungen mit der 250  $\mu\text{m}$  ID Detektionszelle möglich, die Kopplungskonstanten der cis-ständigen Protonen der Doppelbindung der einzelnen Fettsäuremethylester zu bestimmen.

*cHPLC-Trennung:*

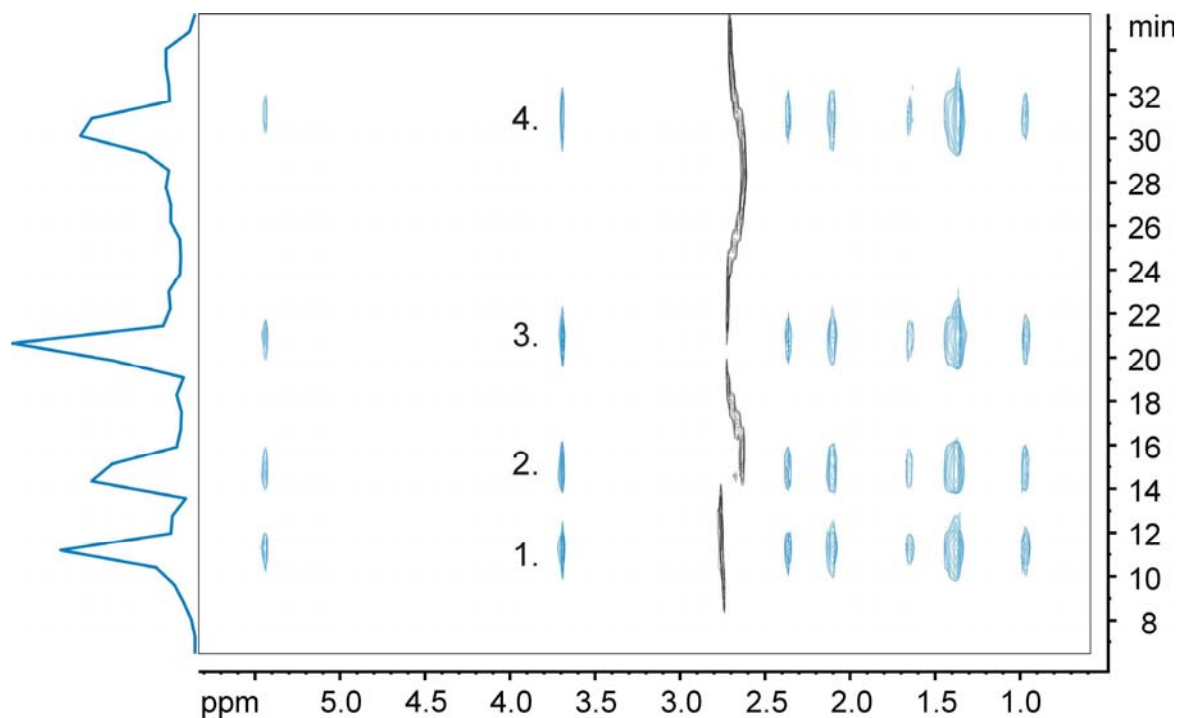
In Abbildung 4-15 sind die Konturplots der optimierten cHPLC-Läufe mit dem neuen Setup (a) 250  $\mu\text{m}$  ID Detektionszelle (Detektionsvolumen 400 nl), b) 320  $\mu\text{m}$  ID Detektionszelle (Detektionsvolumen 750 nl)) dargestellt. Im Konturplot der Trennung mit der 320  $\mu\text{m}$  ID Zelle ist bei vergleichbarer Signalintensität eine deutlich verbesserte Auflösung der Peaks zu erkennen. Dies ist auf die deutlich verringerte Injektionsmenge und die dadurch verringerte Überladung der Kapillartrennsäule zurückzuführen.



**Abbildung 4-15:** cHPLC-NMR-Konturplots der Trennung (F.I.R.: 2  $\mu\text{l}/\text{min}$ ; p: 40 bar) eines Gemisches der einfach ungesättigten Fettsäuremethylester der: (1) Palmitoleinsäure (C16:1, cis-9), (2) Ölsäure (C18:1, cis-9), (3) Eicosensäure (C20:1, cis-11), (4) Erucasäure (C22:1, cis-13) mit **a)** 250  $\mu\text{m}$  ID Detektionszelle (je 84  $\mu\text{g}$  Fettsäuremethylester injiziert), **b)** 320  $\mu\text{m}$  ID Detektionszelle (je 10  $\mu\text{g}$  Fettsäuremethylester injiziert).

*CEC-Trennung:*

In Abbildung 4-16 ist der Konturplot eines CEC-Laufes mit einer den cHPLC-Läufen identischen Flussrate von 2  $\mu\text{l}/\text{min}$  dargestellt. Allerdings mit einem Gegendruck von ca. 0 bar, da der komplette Pumpenfluss vom EOF in der gepackten Kapillare übernommen wird. Dies ist an den deutlich schmaleren Elutionsbanden und der dadurch erhöhten Peakkonzentration zu erkennen, da im reinen CEC-Modus der Transport der mobilen Phase durch die Trennsäule ausschließlich durch den EOF stattfindet.

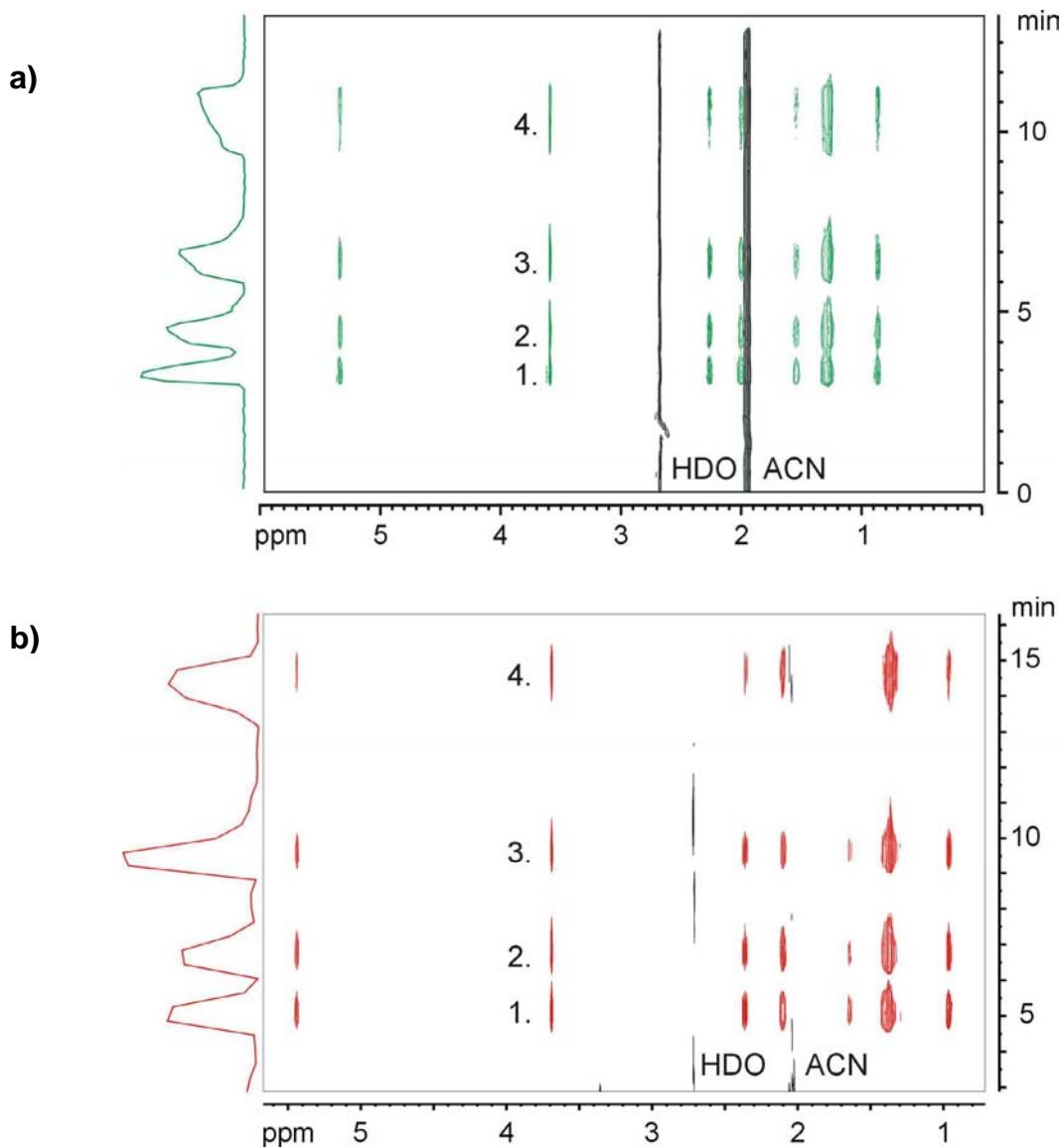


**Abbildung 4-16:** CEC-NMR-Konturplot der Trennung (Fl.R.: 2  $\mu\text{l}/\text{min}$ ;  $p$ : 2 bar) eines Gemisches der einfach ungesättigten Fettsäuremethylester der: (1) Palmitoleinsäure (C16:1, *cis*-9), (2) Ölsäure (C18:1, *cis*-9), (3) Eicosensäure (C20:1, *cis*-11), (4) Erucasäure (C22:1, *cis*-13) mit der 320  $\mu\text{m}$  ID Detektionszelle (je 10  $\mu\text{g}$  Fettsäuremethylester injiziert).

*pCEC-Trennung:*

In Abbildung 4-17 sind die Konturplots der pCEC-Läufe mit dem neuen Setup (a) 250  $\mu\text{m}$  ID Detektionszelle, b) 320  $\mu\text{m}$  ID Detektionszelle) dargestellt. Aufgrund des zur Hälfte durch den EOF übernommenen Säulenflusses und der damit verbundenen geringeren Bandenverbreiterung, konnte die Trennung bei gleichem Gegendruck, aber doppelter Flussrate und dadurch resultierend, mit verbesserter Signalintensität und halbiertes Analysendauer durchgeführt werden. Der Vergleich der Konturplots

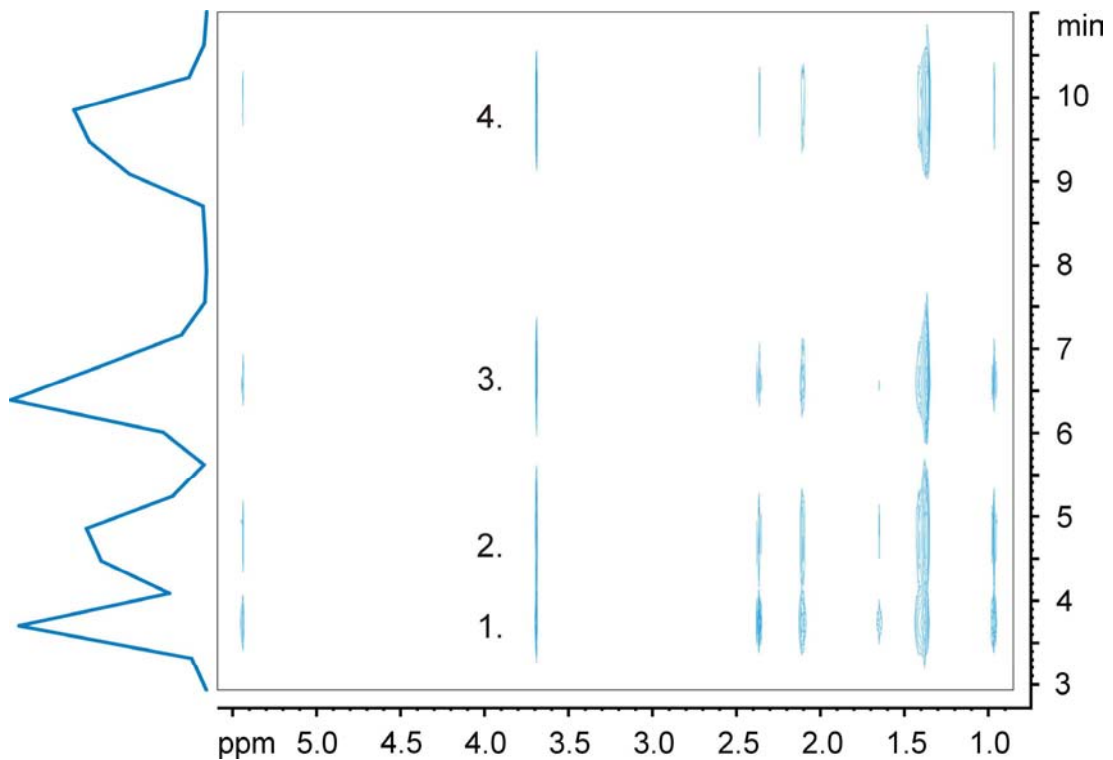
der beiden Detektionskapillaren zeigt wiederum, dass mit der 320  $\mu\text{m}$  ID Zelle bei vergleichbarer Signalintensität eine deutlich verbesserte Auflösung der Peaks zu erkennen ist. Dies ist wiederum auf die deutlich verringerte Injektionsmenge und die dadurch verringerte Überladung der Kapillartrennsäule zurückzuführen.



**Abbildung 4-17:** pCEC-NMR-Konturplots der Trennung (Fl.R.: 4  $\mu\text{l}/\text{min}$ ; p: 40 bar; U: 17 kV) eines Gemisches der einfach ungesättigten Fettsäuremethylester der: (1) Palmitoleinsäure (C16:1, cis-9), (2) Ölsäure (C18:1, cis-9), (3) Eicosensäure (C20:1, cis-11), (4) Erucasäure (C22:1, cis-13) mit **a)** 250  $\mu\text{m}$  ID Detektionszelle (je 84  $\mu\text{g}$  Fettsäuremethylester injiziert), **b)** 320  $\mu\text{m}$  ID Detektionszelle (je 10  $\mu\text{g}$  Fettsäuremethylester injiziert).



In Abbildung 4-18 ist der Konturplot einer pCEC-Trennung der Fettsäuremethylester (320  $\mu\text{m}$  ID Detektionszelle) in nur 10 Minuten abgebildet. Hier wird wiederum die Hälfte des Gesamtflusses von 6  $\mu\text{l}/\text{min}$  durch den EOF übernommen und die Trennung bei einem (der hydrodynamischen Flussrate von 3  $\mu\text{l}/\text{min}$  entsprechenden) Gegendruck von 60 bar durchgeführt (vgl Tabelle 4-3).



**Abbildung 4-18:** pCEC-NMR-Konturplot der Trennung (Fl.R.: 6  $\mu\text{l}/\text{min}$ ; p: 60 bar; U: 25,5 kV) eines Gemisches der einfach ungesättigten Fettsäuremethylester der: (1) Palmitoleinsäure (C16:1, cis-9), (2) Ölsäure (C18:1, cis-9), (3) Eicosensäure (C20:1, cis-11), (4) Erucasäure (C22:1, cis-13) mit der 320  $\mu\text{m}$  ID Detektionszelle (je 10  $\mu\text{g}$  Fettsäuremethylester injiziert).

Das splittlose Setup ermöglicht eine einfache Bestimmung der durch den EOF bzw. durch den Druckfluss übernommenen Flussratenanteile (siehe Tabelle 4-3). In beiden cHPLC-Läufen wurde bei einer Flussrate von 1-3  $\mu\text{l}/\text{min}$  ein Gegendruck von 20-60 bar durch die Kapillartrennsäule generiert. Dieselben Flussraten werden im reinen CEC-Modus allein vom EOF erreicht. Hier wird der Pumpenfluss, ohne den Aufbau eines nennenswerten Gegendruckes, komplett vom EOF durch die Kapillarsäule transportiert. Sowohl im cHPLC- als auch im CEC-Modus werden vergleichbare Analysenzeiten erreicht, die sich umgekehrt proportional zur steigenden Flussrate verkürzen. Jedoch konnten weder im cHPLC- noch im CEC-

Modus Flussraten über 3  $\mu\text{l}/\text{min}$  appliziert werden. Während im cHPLC-Modus aufgrund der im Vergleich zum CEC-Modus 2-fach schlechteren Trennleistung (vgl. Tabelle 4-4) bei höheren Flussraten keine Basislinientrennung der einzelnen Fettsäuremethylester mehr gegeben wäre, ist die Fließgeschwindigkeit im reinen CEC-Modus rein apparativ durch die maximal applizierbare Elektroden-Spannung von 30 kV limitiert.

Fluss rate	cHPLC	CEC	pCEC
	Druck/Dauer [bar] / [min]	Druck/Dauer/Spannung/Strom [bar] / [min] / [kV] / [ $\mu\text{A}$ ]	Druck/Dauer/Spannung/Strom [bar] / [min] / [kV] / [ $\mu\text{A}$ ]
1 $\mu\text{l}/\text{min}$	20 / 66	2 / 65 / +8,5 / <1	
2 $\mu\text{l}/\text{min}$	40 / 33	2 / 32 / +17 / <1,5	
3 $\mu\text{l}/\text{min}$	60 / 22	2 / 20,5 / +25,5 / <3	
4 $\mu\text{l}/\text{min}$			41 / 15 / +17 / <1,5
6 $\mu\text{l}/\text{min}$			62 / 10 / +25,5 / <3

**Tabelle 4-3:** Vergleich der Gegendrücke und Laufzeiten der cHPLC-, CEC- und pCEC-Modi.

Abbildung 4-15 (reine cHPLC mit 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ )	Abbildung 4-16 (reine CEC mit 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ )	Abbildung 4-17 (pCEC mit 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ )	Abbildung 4-18 (pCEC mit 6 $\mu\text{l}/\text{min}$ )
N 500 - 1000	1600 - 2100	700 - 900	450 - 550

**Tabelle 4-4:** Vergleich der Zahl der Theoretischen Böden (N) am Beispiel der Trennung von einfach ungesättigten Fettsäuremethylestern bei verschiedenen chromatographischen Bedingungen. (N wurde aus den am rechten Rand der Konturplots abgebildeten chromatographischen Gesamtsignalplots bestimmt; aufgrund der niedrigen Datenrate (0,02 Hz) kann N nur sehr grob bestimmt werden).

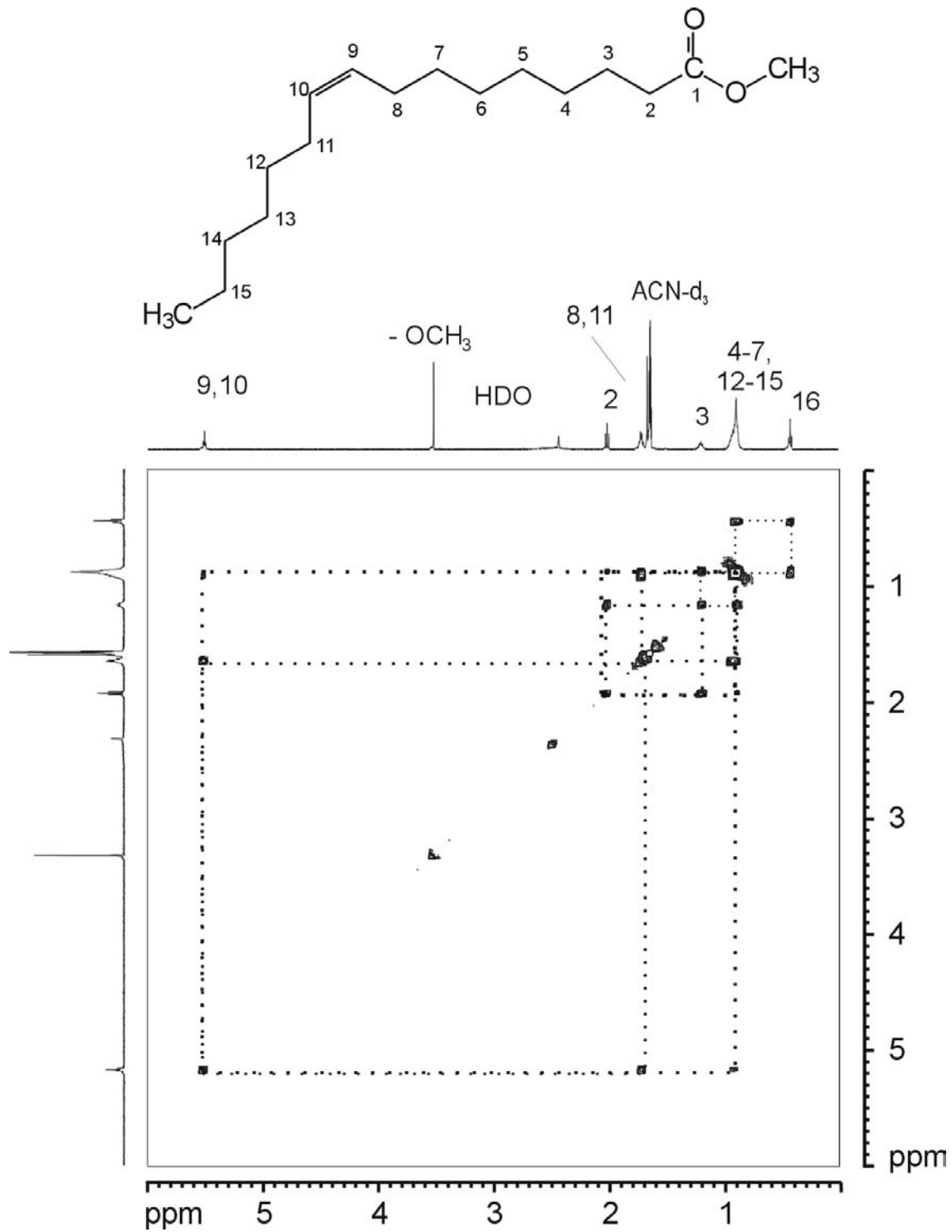
Im pCEC-Modus sind Flussraten von 4 und 6  $\mu\text{l}/\text{min}$  und eine damit deutlich verkürzte Analysenzeit möglich. Zum einen gelingt dies aufgrund des anteiligen EOFs (hier 50 %, d.h.: 2 bzw 3  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) und seines, dem Druckfluss überlegenen

pfropfenförmigen Flussprofils, zum anderen kann die Limitierung der Flussrate durch die applizierbare Hochspannung mit Hilfe des zusätzlichen pumpengenerierten Druckflusses erweitert werden. Die verringerte Beladung der Kapillartrennsäule (ermöglicht durch die verbesserte Sensitivität der 320  $\mu\text{m}$  Detektionszelle) und die durch den EOF verbesserte Trennleistung erlauben nun eine Auftrennung der einzelnen Fettsäuremethylester mit vollständiger Basislinientrennung bei Analysenzeiten von 10 Minuten.

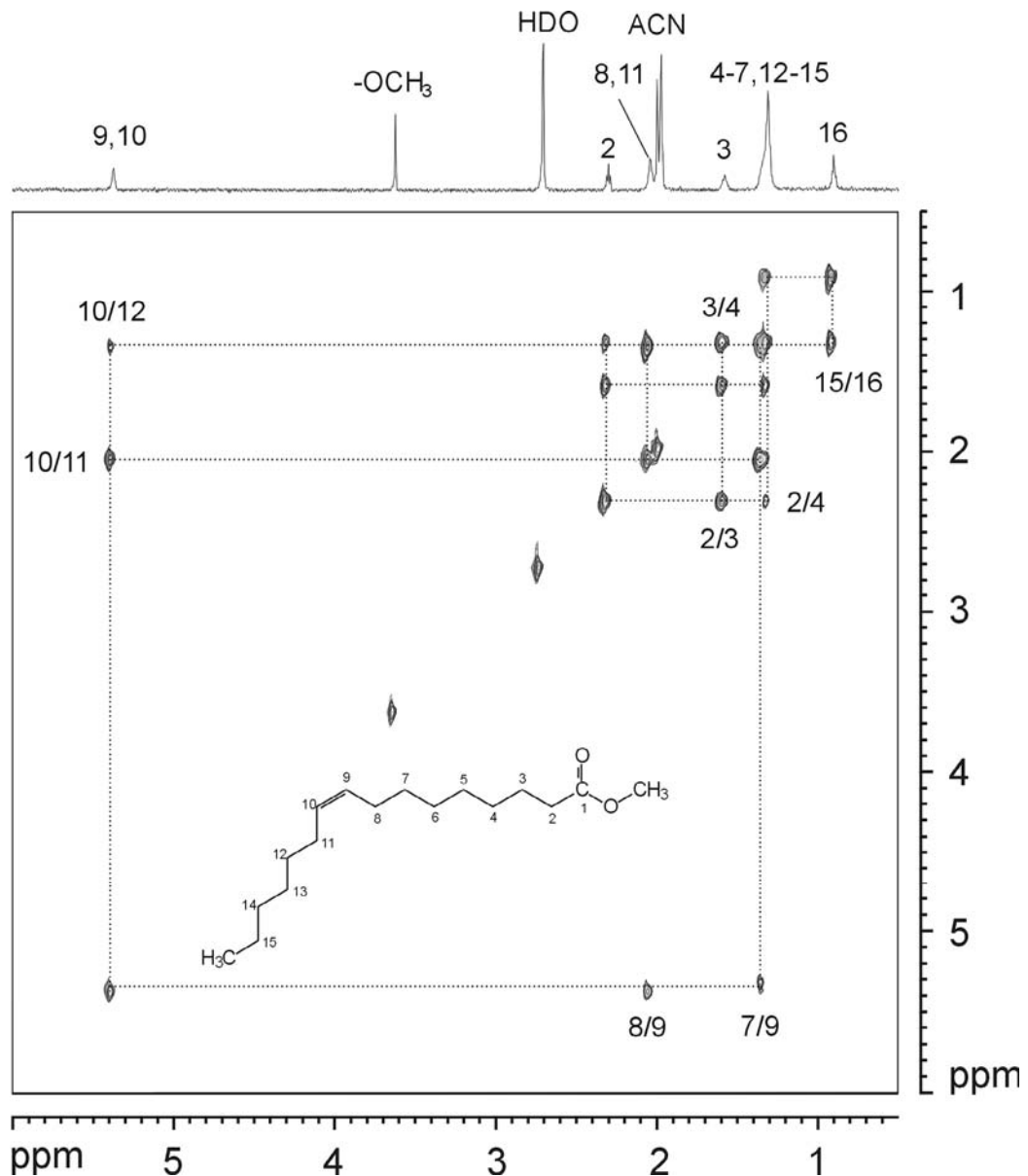
#### *Stopped-flow Experimente / Messungen*

Die *on-line*-Kopplung kapillarer Trennmethode mit der NMR-Spektroskopie erlaubt im *stopped-flow* Modus auch die Aufnahme zeitaufwendigerer 1D- und 2D-Experimente, welche wichtige Informationen wie Anzahl der Kerne mit der identischen chemischen Umgebung, die exakte chemische Verschiebung unterschiedlicher Molekülgruppen oder die Bestimmung von Kopplungskonstanten liefern.

Auch hinsichtlich der Durchführung von *stopped-flow* Messungen ist die durch das neue Setup verkürzte Analysenzeit von Vorteil. Die zu untersuchende Substanz wird schneller in die Detektionszelle transportiert, unnötig lange Wartezeiten werden verringert, und die zu vermessenden Banden besitzen eine höhere Peakkonzentration. Das H,H-COSY- und das H,H-TOCSY-NMR-Spektrum einer pCEC-NMR-Trennung sind in Abbildung 4-19 und Abbildung 4-20 abgebildet. Im 2D-COSY-Spektrum erkennt man Konnektivitäten zwischen direkt benachbarten Protonen. Im 2D-TOCSY-Spektrum sind auch Kopplungen zwischen weiter entfernten Protonen eines Spinsystems, je nach Länge der verwendeten Mischzeit, zu erkennen.

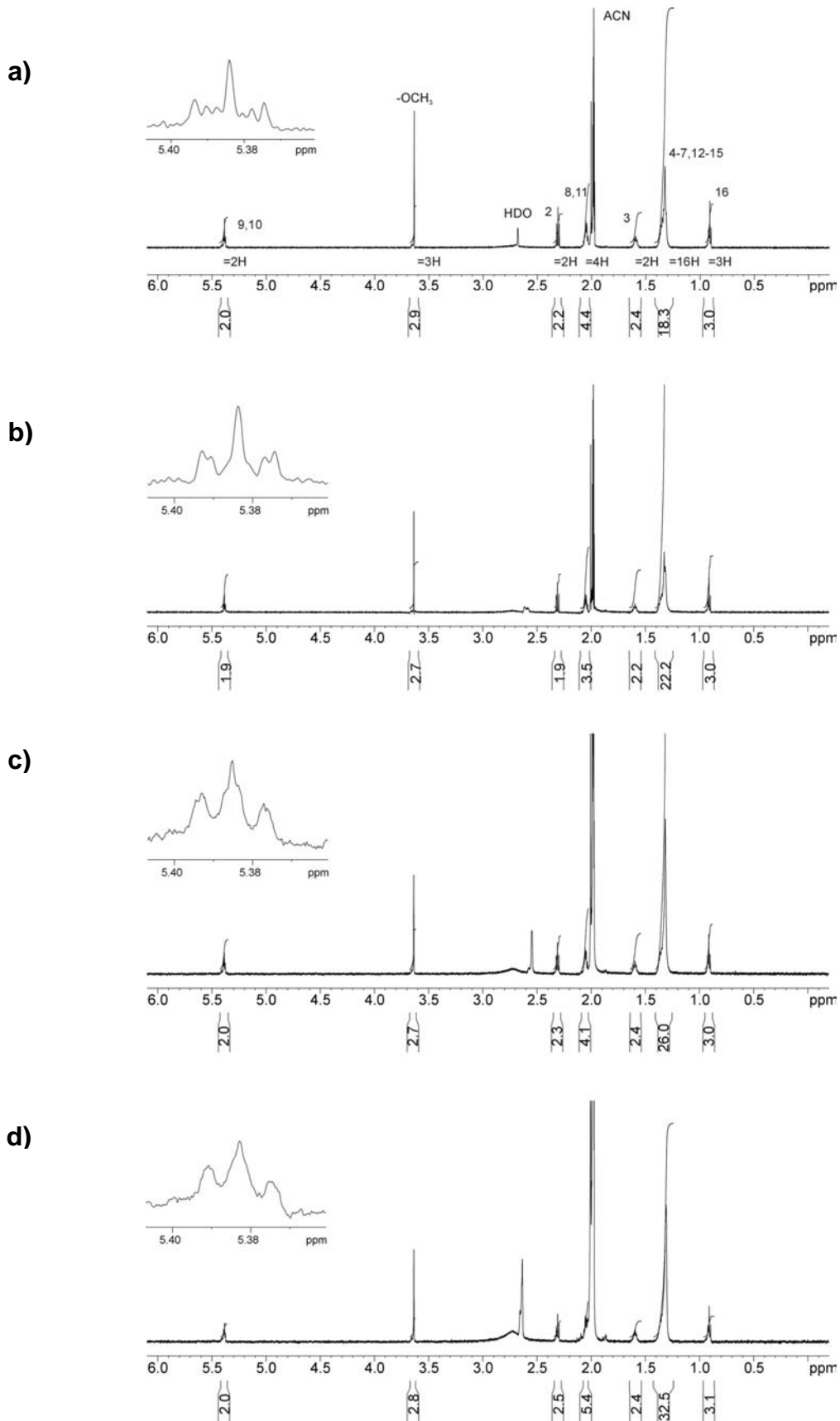


**Abbildung 4-19:** Stopped-flow 2D-<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY-Spektrum des Palmitoleinsäuremethylesters (C<sub>16</sub>:1, cis-9).



**Abbildung 4-20:** Stopped-flow 2D- $^1\text{H},^1\text{H}$ -TOCSY-Spektrum des Palmitoleinsäuremethylesters (C16:1, cis-9).

Die Unterscheidung der einzelnen Fettsäuremethylester ist in diesem Fall, da die Bestandteile des Gemisches bekannt sind, anhand der Retentionszeiten möglich. Bei unbekanntem Substanzen dieser Verbindungsklasse liefert die Integration über die einzelnen aliphatischen Signale die gesuchte Kettenlänge [233]. Als Beispiel sind in Abbildung 4-21 die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der vier Fettsäuremethylestern unterschiedlicher Kettenlänge (C16:1 bis C22:1) mit zugehörigen Integralen dargestellt.



**Abbildung 4-21:** Stopped-flow  $1D-^1H$ -NMR-Spektren mit Integration der Protonensignale und Zoom des DB-Signals zur Identifizierung der ungesättigten Fettsäuremethylester der: **a)** Palmitoleinsäure, **b)** Ölsäure, **c)** Eicosensäure, **d)** Erucasäure.

Aufgrund der hohen spektralen Auflösung, die mit dem neuen Setup erreicht wurde, war es möglich, Kopplungskonstanten bis knapp unter 1 Hz zu bestimmen. In Abbildung 4-21 sind die Spektren der *stopped-flow* 1D-Experimente der einzelnen Fettsäuremethylester (siehe Abbildung 4-13) mit dem herausvergrößerten Signal der *cis*-ständigen Protonen der Doppelbindung dargestellt.

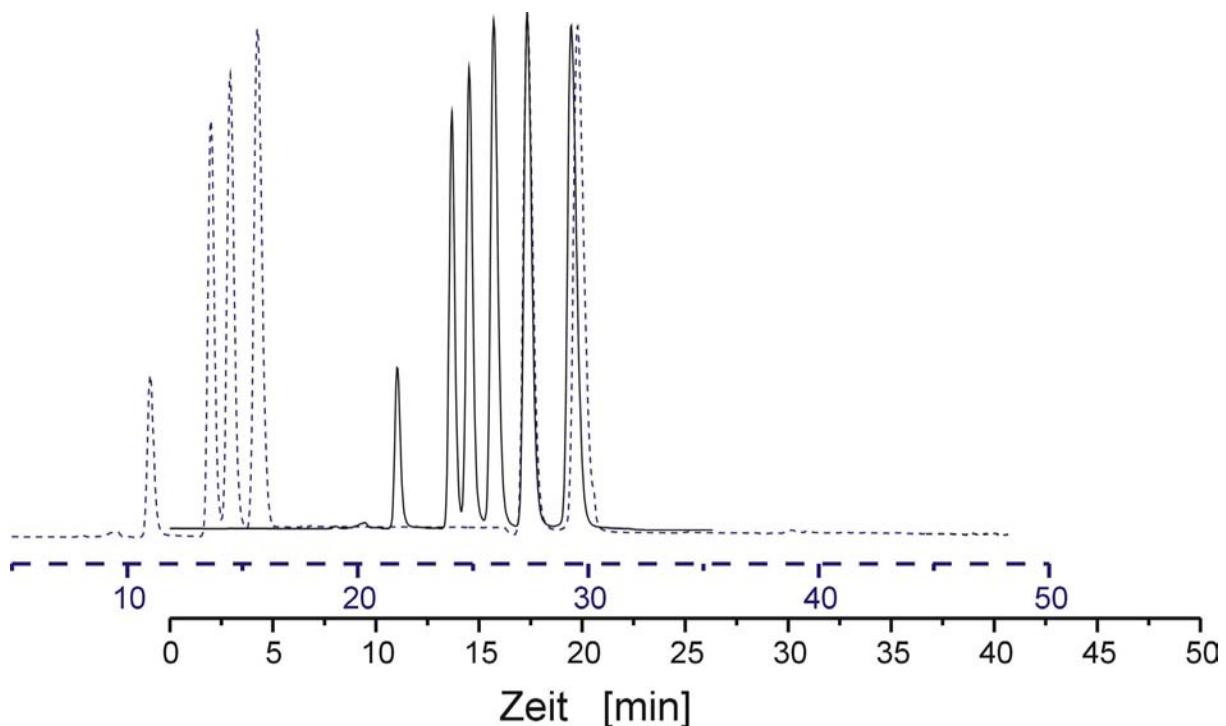
Alle *stopped-flow* Experimente wurden konsekutiv innerhalb eines einzigen chromatographischen Laufes durchgeführt. Aufgrund der axialen Diffusion, die zusätzlich zur (mit steigender Retentionszeit zunehmenden) diffusiven Bandenverbreiterung auch bei gestopptem Lauf zur Peakverbreiterung beiträgt, wurde das S/N-Verhältnis von Peak zu Peak schlechter. Allein die *stopped-flow* 1D- und 2D-Experimente auf dem ersten Peak (dem Palmitoleinsäuremethylester) dauerten über 10 Stunden. Jedes *stopped-flow* 1D-Experiment auf den darauf folgenden Peaks dauerte wiederum 1,5 Stunden. So wurde es mit zunehmender Bandenverbreiterung und dadurch bedingter abnehmender Peakkonzentration immer schwieriger, die Kopplungskonstanten der ohnehin schon relativ kleinen Protonensignale der Doppelbindung zu bestimmen.

### 4.3.3 Vergleich der Bandenverbreiterung der Betriebsarten *continuous- vs. stopped-flow*

Wie schon in Kapitel 4.3.2 angeführt, ist es bei *on-line*-Kopplungen durchaus interessant auch *stopped-flow* Experimente durchführen zu können. Analog zur LC-NMR-Kopplung ist es auch für die Kopplung kapillarer Trennmethode mit der NMR notwendig, die Trennung zu jedem Zeitpunkt anhalten zu können (durch die bislang geringere Empfindlichkeit gilt dies sogar eher noch in verstärktem Maße). So gewinnt man die nötige Zeit, 1D- und 2D-Experimente auf einem Substanz-Peak durchzuführen. Danach kann die Trennung weitergefahren werden, bis der nächste Peak untersucht werden soll.

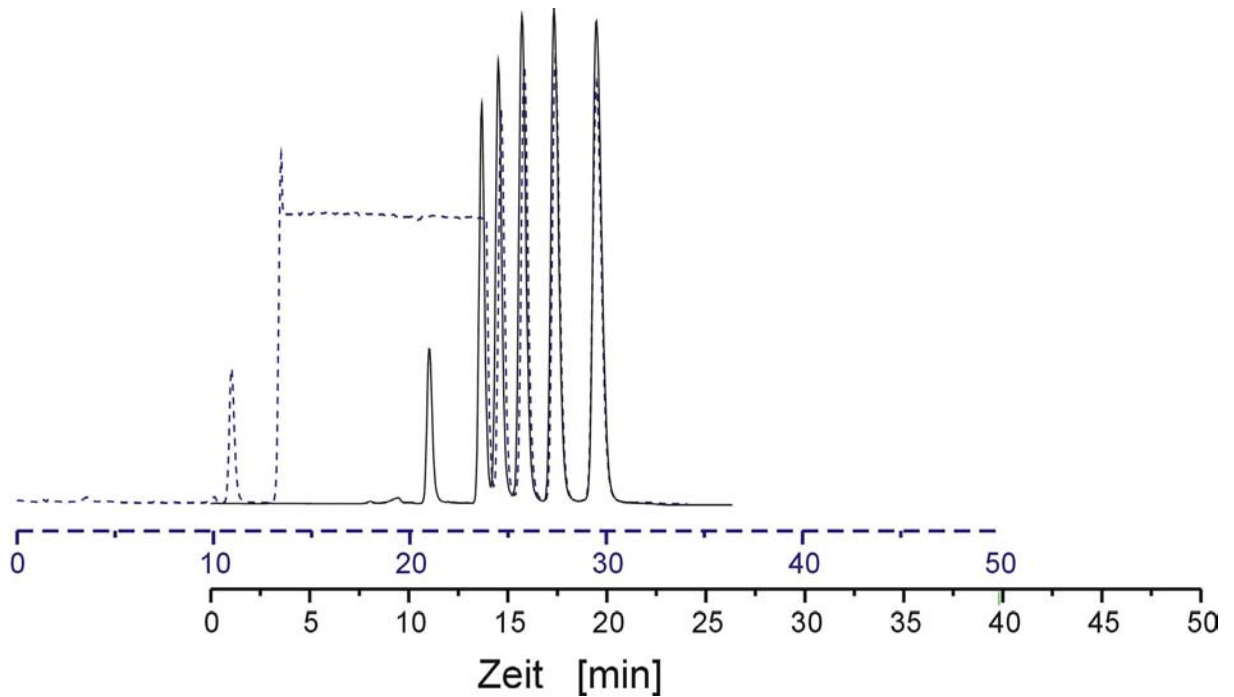
Um die Trennung bei *stopped-flow* Experimenten anzuhalten wird der Pumpen-Fluss (wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben) mit Hilfe eines *microbore* Valco Schaltventils über eine „Dummy“-Kapillarsäule umgeleitet (Abbildung 4-5) und die Doppelspritzenpumpe einfach weiterlaufen gelassen. Damit fällt der Druck im Trennsystem im Bruchteil einer Sekunde auf Atmosphärendruck ab und die Elutionsbanden verharren am gewünschten Ort. Währenddessen ändert sich für das Pumpsystem nichts, da

durch die zweite Kapillarsäule der gleiche Gegendruck zu überwinden ist. Im Zusammenhang mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten 1D- und 2D-Experimente war es von Interesse, die durch die *stopped-flow* Messungen hinzukommende Bandenverbreiterung zu untersuchen. Die Funktionalität der dazu verwendeten Säulenschaltung wurde mit der Trennung von Thioharnstoff und fünf homologen Alkylbenzoaten getestet. Beim Umschalten des Flusses von der Trennsäule auf die „Dummy“-Säule wurde keine nennenswerte Druckveränderung vom Drucksensor der Pumpe registriert und die Trennung konnte sofort gestoppt bzw. weitergefahren werden. Eine nicht unterbrochene Trennung wurde mit Trennungen die für 10 min (Abbildung 4-22 und Abbildung 4-23), 20 min (Abbildung 4-24) oder sogar für 15 h (Abbildung 4-25) verglichen. Auch bei einer mehrfach unterbrochenen Trennung (Abbildung 4-26) konnten kaum Bandenverbreiterungen festgestellt werden.

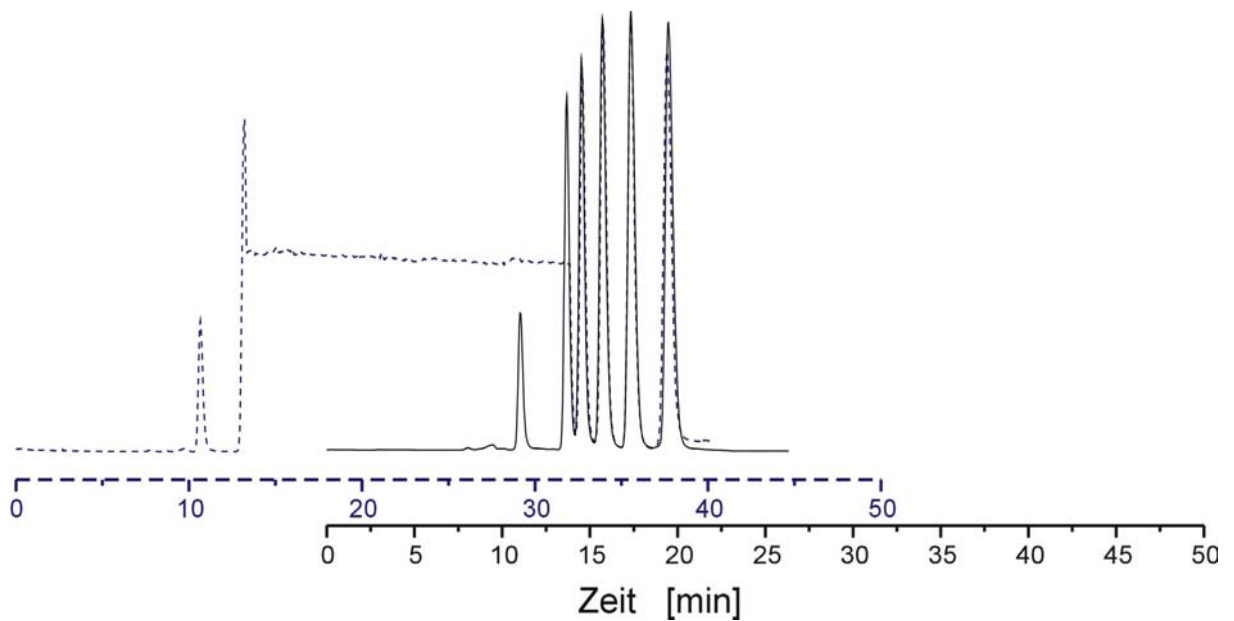


**Abbildung 4-22:** Vergleich der Trennung von Thioharnstoff und fünf homologen Alkylbenzoaten: **a)** nicht unterbrochene Trennung (—), **b)** Trennung nach dem 4. Peak für 10 min gestoppt (---).

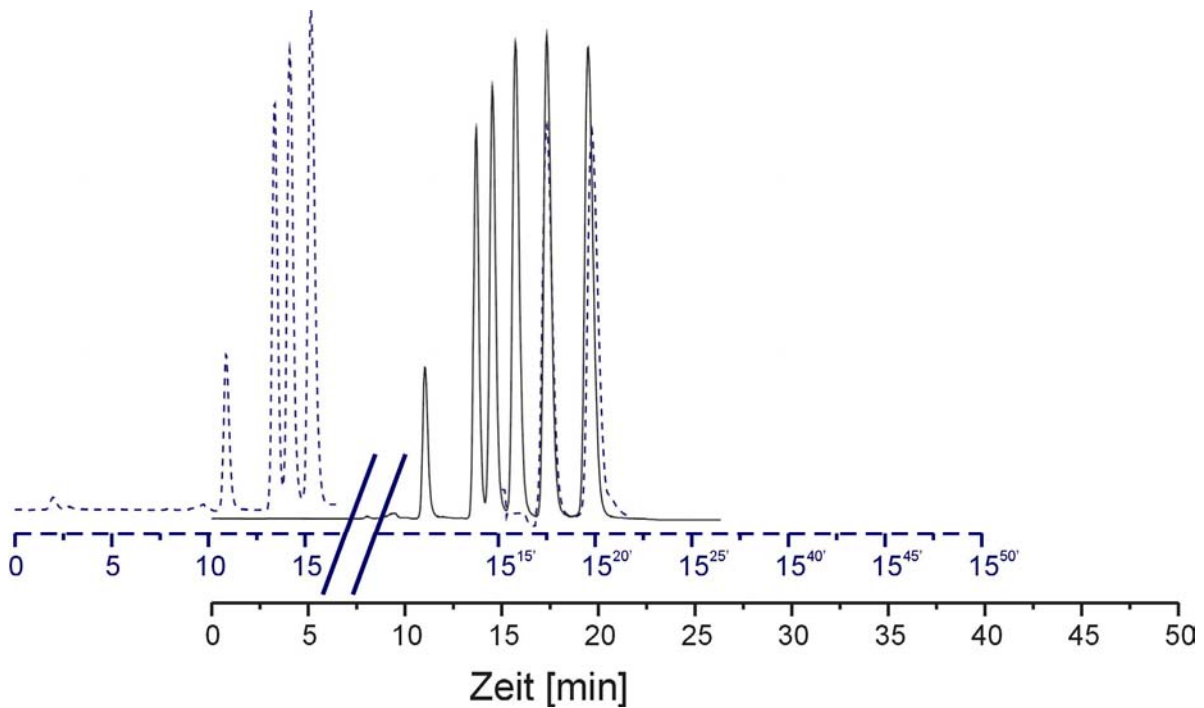




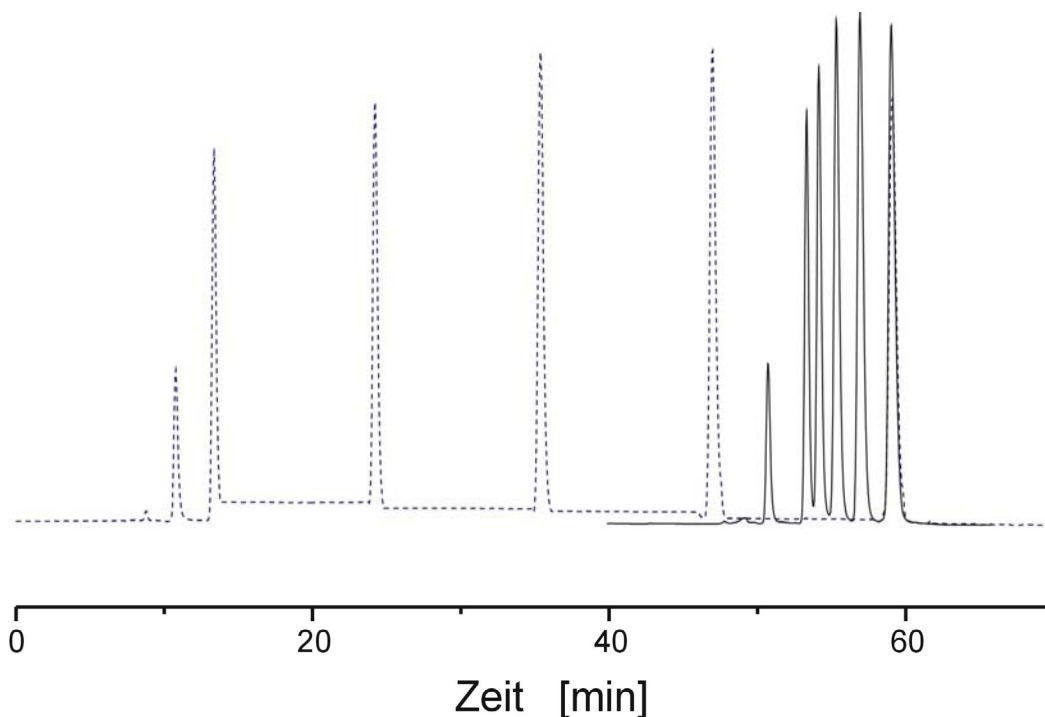
**Abbildung 4-23:** Vergleich der Trennung von Thioharnstoff und fünf homologen Alkylbenzoaten: **a)** nicht unterbrochene Trennung (—), **b)** Trennung auf dem 2. Peak für 10 min gestoppt (---).



**Abbildung 4-24:** Vergleich der Trennung von Thioharnstoff und fünf homologen Alkylbenzoaten: **a)** nicht unterbrochene Trennung (—), **b)** Trennung auf dem 2. Peak für 20 min gestoppt (---).



**Abbildung 4-25:** Vergleich der Trennung von Thioharnstoff und fünf homologen Alkylbenzoaten: **a)** nicht unterbrochene Trennung (—), **b)** Trennung nach dem 4. Peak für 15 h gestoppt (---).



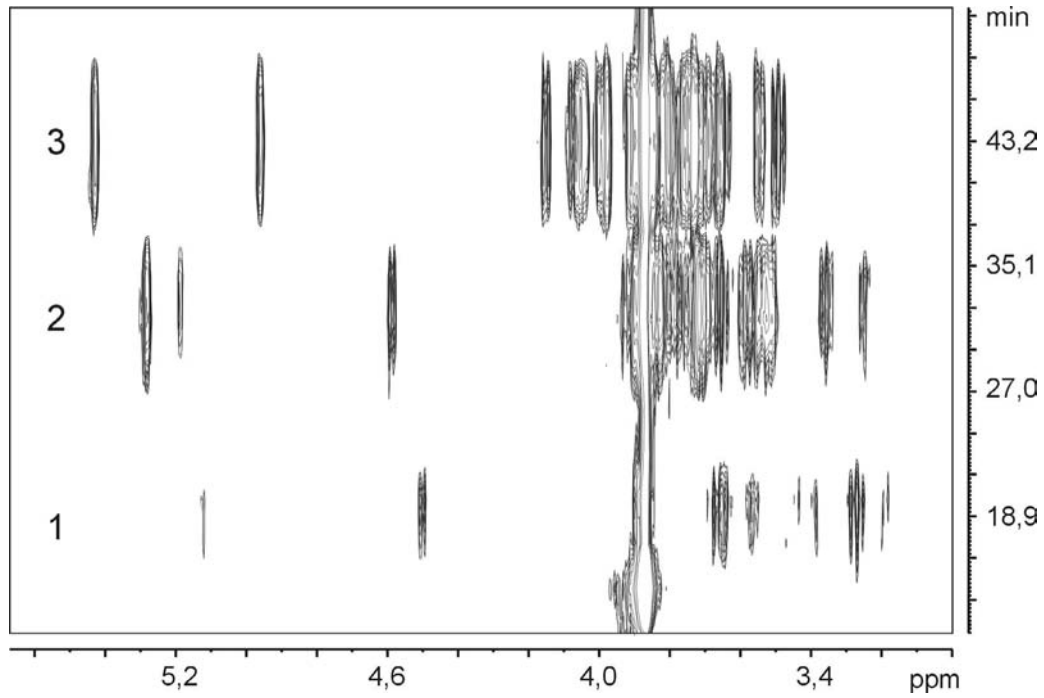
**Abbildung 4-26:** Vergleich der Trennung von Thioharnstoff und fünf homologen Alkylbenzoaten: **a)** nicht unterbrochene Trennung (—), **b)** Trennung nach 2., 3., 4. und 5. Peak für jeweils 10 min gestoppt (---).

#### 4.3.4 cHPLC-NMR *on-line*-Kopplung zur Zuckeranalyse

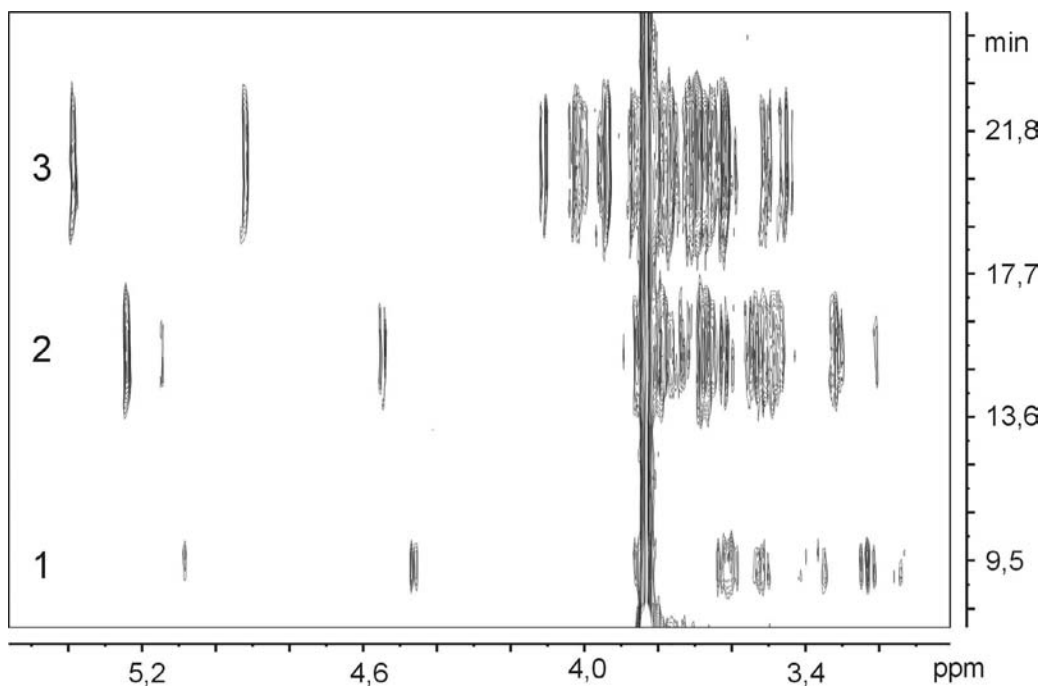
Um die Tauglichkeit des neuen Setups auch für „relativ“ niedrig konzentrierte Proben mit stärker aufspaltenden Signalen und komplexeren Spektren als denen der Benzoate zu demonstrieren, wurde eine Lösung aus drei verschiedenen Zuckern (D-(+)-Xylose, D-(+)-Maltose und D-(+)-Raffinose) in zwei Konzentrationen (je 375 mM bzw. 187,5 mM) aufgetrennt und analysiert.

Zucker spielen bei vielen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle, z.B. in der Zell-Zell-Wechselwirkung und in der Anbindung von infektiösen Bakterien, Viren, Toxinen und Hormonen. Ihre Analyse ist daher von großer Bedeutung, jedoch ist ihre Detektion oft sehr schwierig. Aufgrund ihrer geringen UV-Absorption werden sie in der HPLC meist refraktometrisch (mit RI-Detektoren) nachgewiesen. Dieses Verfahren ist allerdings nur schwer auf Kapillartrennmethode übertragbar. Eine andere Methode, die Fluoreszenzdetektion ist zwar eine sehr empfindliche Methode, erfordert aber eine zeitaufwendige und technisch anspruchsvolle Derivatisierung der Zucker. Zur Zuckeranalytik kann sich die *on-line*-Kopplung kapillarer Trennmethode mit der NMR-Spektroskopie durchaus als eine sinnvolle Alternative erweisen.

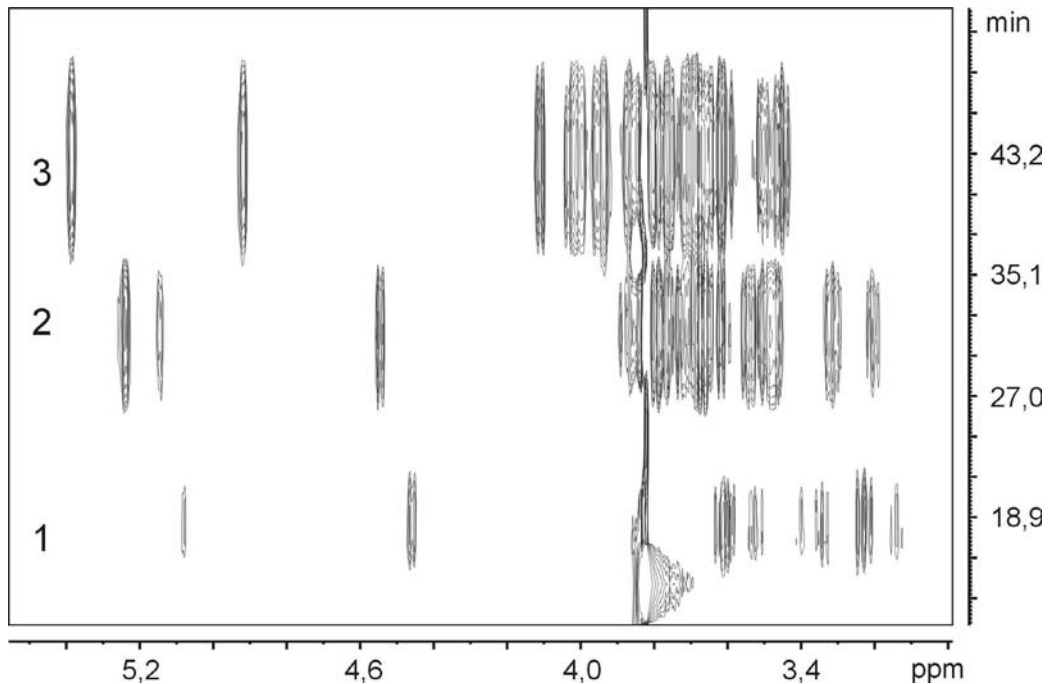
Die Trennungen wurden mit einer nach Kapitel 5.4.1.2 selbst hergestellten, mit Amino-Phase gepackten Kapillarsäule (mit nur einer Fritte) durchgeführt. Da diese Phase sowohl positive (Amino-Gruppen) als auch negative (Rest-Silanolgruppen) Oberflächenladungen aufweist, konnte mit der für eine erfolgreiche Trennung notwendigen mobilen Phase (pH 6-7) kein signifikanter EOF realisiert werden. Aufgrund dessen konnten weder im CEC noch im pCEC-Modus Verbesserungen (Verringerung der Bandenverbreiterung oder Verkürzung der Analysendauer) im Vergleich zum cHPLC-Modus erreicht werden. In den Abbildungen 4-27 bis 4-29 sind drei unterschiedliche *on-line* cHPLC-NMR Läufe dargestellt.



**Abbildung 4-27:** Konturplot der chHPLC-Trennung eines 375 mM Gemisches aus drei verschiedenen Zuckern ((1) D-(+)-Xylose, (2) D-(+)-Maltose und (3) D-(+)-Raffinose) mit einer Flussrate von 1,0 µl/min.



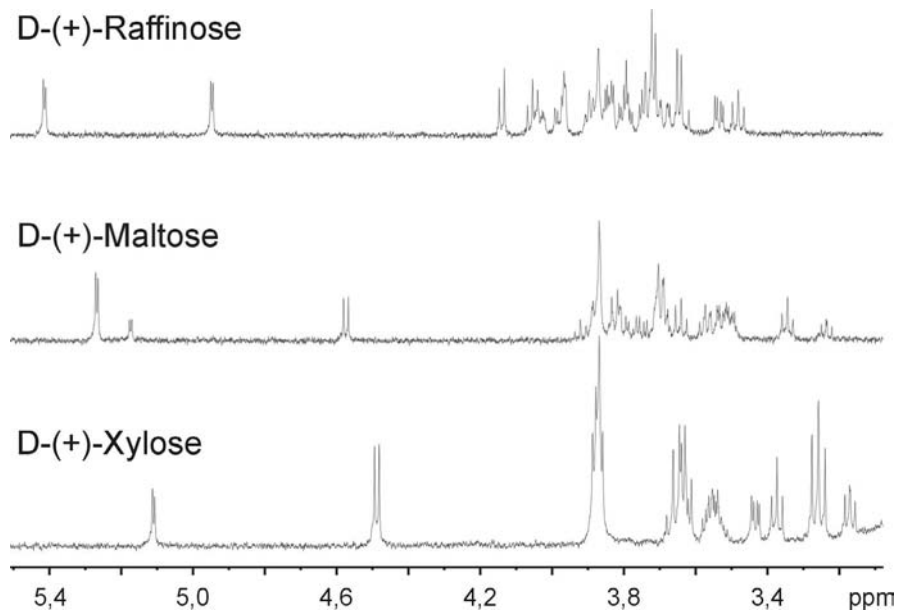
**Abbildung 4-28:** Konturplot der chHPLC-Trennung eines 375 mM Gemisches aus drei verschiedenen Zuckern ((1) D-(+)-Xylose, (2) D-(+)-Maltose und (3) D-(+)-Raffinose) mit einer Flussrate von 2,0 µl/min.



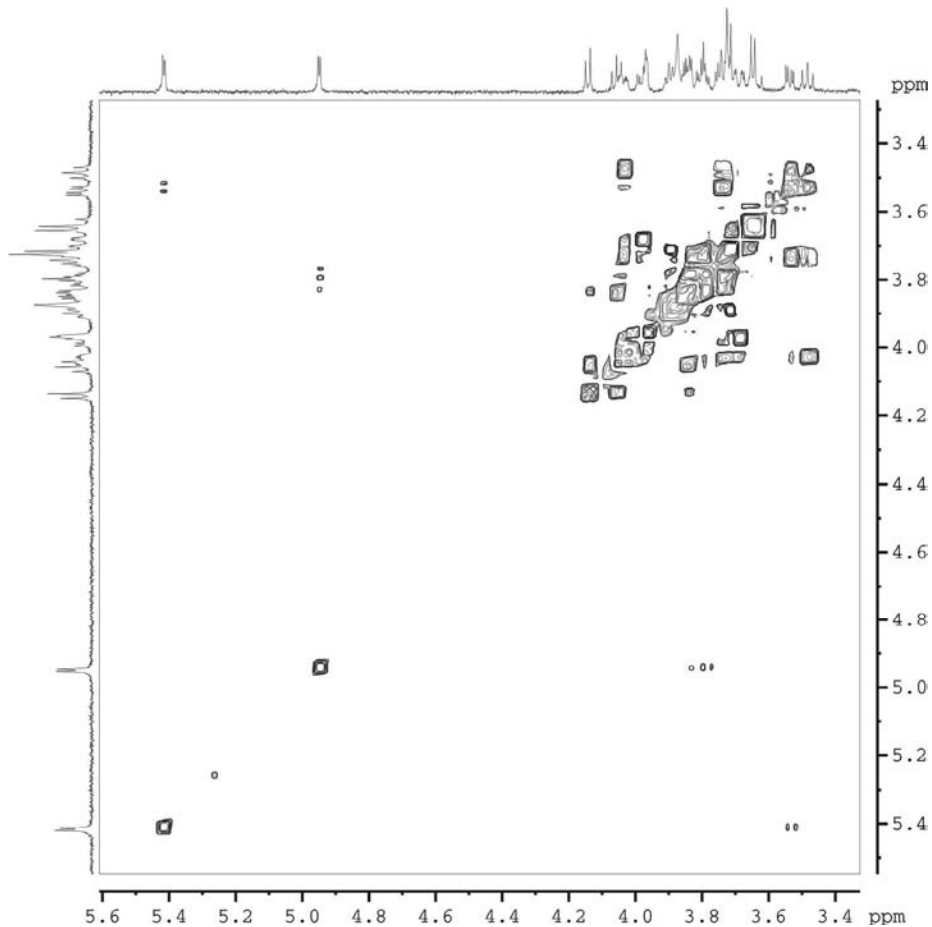
**Abbildung 4-29:** Konturplot der chPLC-Trennung eines 187,5 mM Gemisches aus drei verschiedenen Zuckern ((1) D-(+)-Xylose, (2) D-(+)-Maltose und (3) D-(+)-Raffinose) mit einer Flussrate von 1,0  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

In Abbildung 4-27 wurden bei einer Flussrate von 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  jeweils 150 nmol der drei Zucker injiziert (375 mM Lösung) und innerhalb von 50 min aufgetrennt und mit einem für alle Signale mehr als ausreichenden S/N-Verhältnis detektiert. In Abbildung 4-28 wurden bei doppelter Flussrate von 2  $\mu\text{l}/\text{min}$  wiederum 150 nmol der drei Zucker injiziert, aber innerhalb von 24 min basisliniengetrennt. Mit Abbildung 4-29 kann gezeigt werden, dass auch mit der Injektion von nur 75 nmol des jeweiligen Zuckers (187,5 mM Lösung) Signale mit ausreichendem S/N-Verhältnis erhalten werden.

Die *stopped-flow* Experimente wurden alle innerhalb eines weiteren chPLC Laufes durch Anhalten der Trennung auf dem jeweiligen Peakmaximum realisiert. Nach Durchführung der 1D- und 2D-Experimente wurde die Trennung, wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben, wieder angefahren und auf dem nächsten Peakmaximum wieder gestoppt. Die Retentionszeiten waren durch die vorangegangenen chPLC-Läufe bekannt, so konnten die Peakmaxima erfolgreich vorausberechnet werden. Die *stopped-flow* 1D- $^1\text{H}$ -Spektren der drei einzelnen Zuckerkomponenten (siehe Abbildung 4-30) wurden mit einer spektralen Auflösung von 32K komplexen Datenpunkten aufgenommen.



**Abbildung 4-30:** Stopped-flow  $1D\text{-}^1\text{H}$ -NMR-Spektren der einzelnen Zuckerkomponenten (Aufnahmedauer jeweils 8 min).

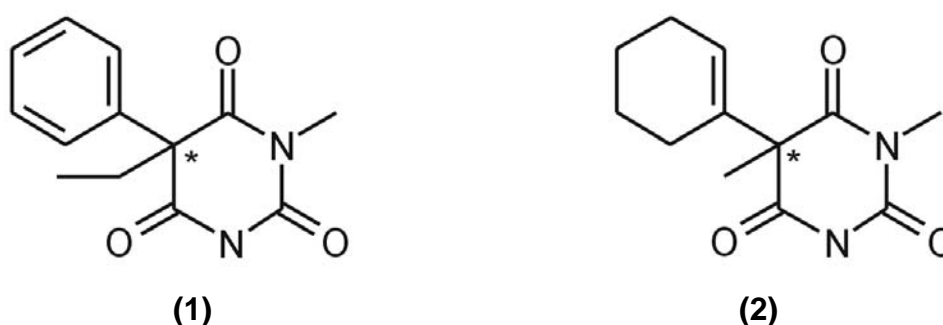


**Abbildung 4-31:** Stopped-flow  $2D\text{-}^1\text{H},^1\text{H}$ -TOCSY-Spektrum von  $D\text{-}(+)\text{-Raffinose}$  (Aufnahmedauer: 1h36min).

Dies zeigt, dass mit diesem Setup Peakkonzentrationen resultieren, mit denen auch geringe Probenmengen bei hohen spektralen Auflösungen in akzeptablem Zeitrahmen vermessen werden können und somit auch *on-line* Analysen und Strukturaufklärung unbekannter Substanzen möglich sind (Beispiele: Kapitel 4.3.6 und 4.3.7). Um dies zu verdeutlichen wurde auf dem ersten Peak (Xylose) im selben Lauf noch ein 1,5 Stunden dauerndes 2D- $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -TOCSY Experiment durchgeführt (Abbildung 4-31).

#### 4.3.5 cHPLC-NMR *on-line*-Kopplung zur Trennung und Analyse von Gemischen chiraler Verbindungen

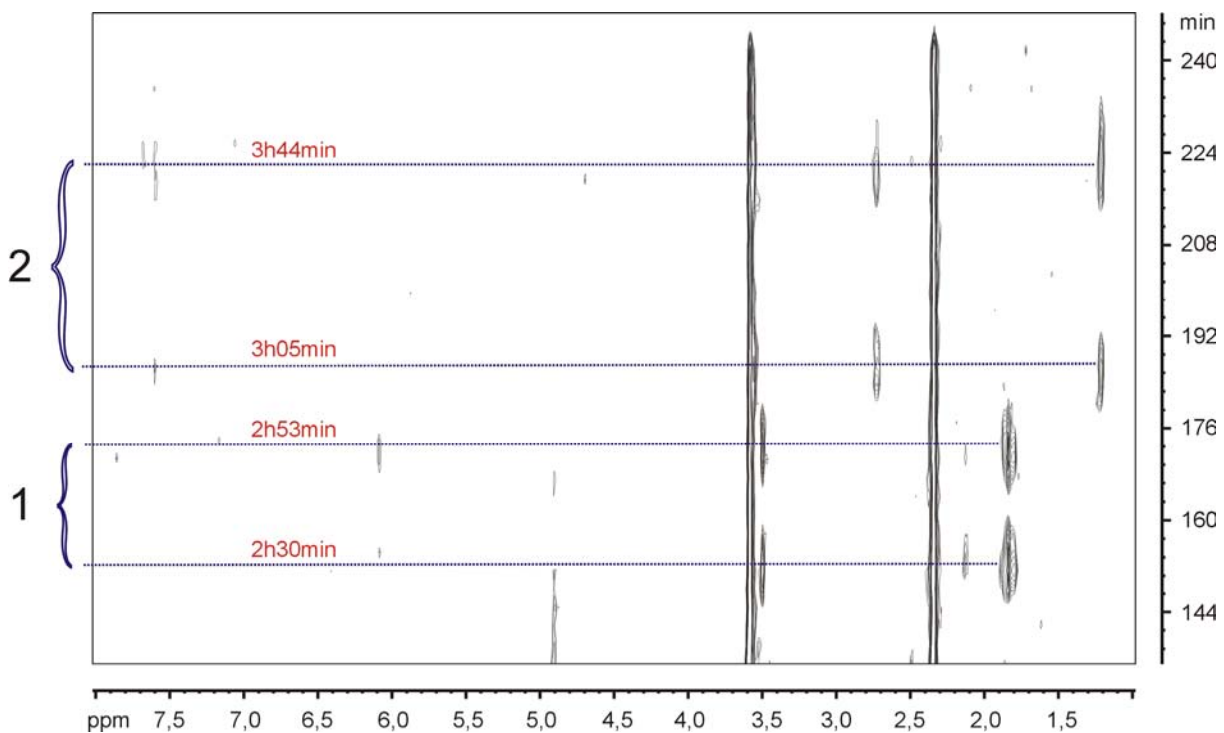
Um bei einer Trennung eines Gemisches verschiedener chiraler Verbindungen die Enantiomerenpaare eindeutig zuordnen zu können ist die *on-line*-Kopplung mit der NMR-Spektroskopie geradezu ideal, während durch die Aufnahme von UV-Spektren mittels eines DAD-Detektors nur sehr limitiert Strukturinformationen zu erhalten sind. Um die Tauglichkeit des Setups auch für solche Gemische zu demonstrieren sollte dazu ein Gemisch aus zwei verschiedenen Enantiomerenpaaren aufgetrennt und analysiert werden. Als pharmazeutische Modellschubstanzen wurden die Barbiturate R/S-Mephobarbital und R/S -Hexobarbital gewählt.



**Abbildung 4-32:** Strukturformeln von (1) R/S-Mephobarbital und (2) R/S-Hexobarbital.

Die Trennungen wurden mit einer nach 5.4.1.2 selbst gepackten Kapillarsäule (mit nur einer Fritte) durchgeführt. Die Chira-Dex-Silica-Phase wurde freundlicherweise vom AK Prof. Schurig (Dr. D. Wistuba) hergestellt [234,235] und ebenso wie die

Barbiturate zur Verfügung gestellt. Da chirale Phasen im Vergleich zu Umkehrphasen eine relativ geringe Beladbarkeit aufweisen, musste die Trennung auf der überladenen Kapillarsäule sehr langsam gefahren werden, um eine Basislinientrennung der 2 Enantiomerenpaare zu erreichen. Über die für eine erfolgreiche Trennung notwendige Analysendauer von mehreren Stunden konnte mit gegebener mobiler und stationärer Phase kein stabiler EOF realisiert werden (Blasenbildung nach 2-3 h). Aufgrund dessen wurde die Trennung nur für den cHPLC-Modus optimiert und durchgeführt. In Abbildung 4-33 ist der Konturplot der Auftrennung und Zuordnung der Enantiomerenpaare von Mepho- und Hexobarbital dargestellt



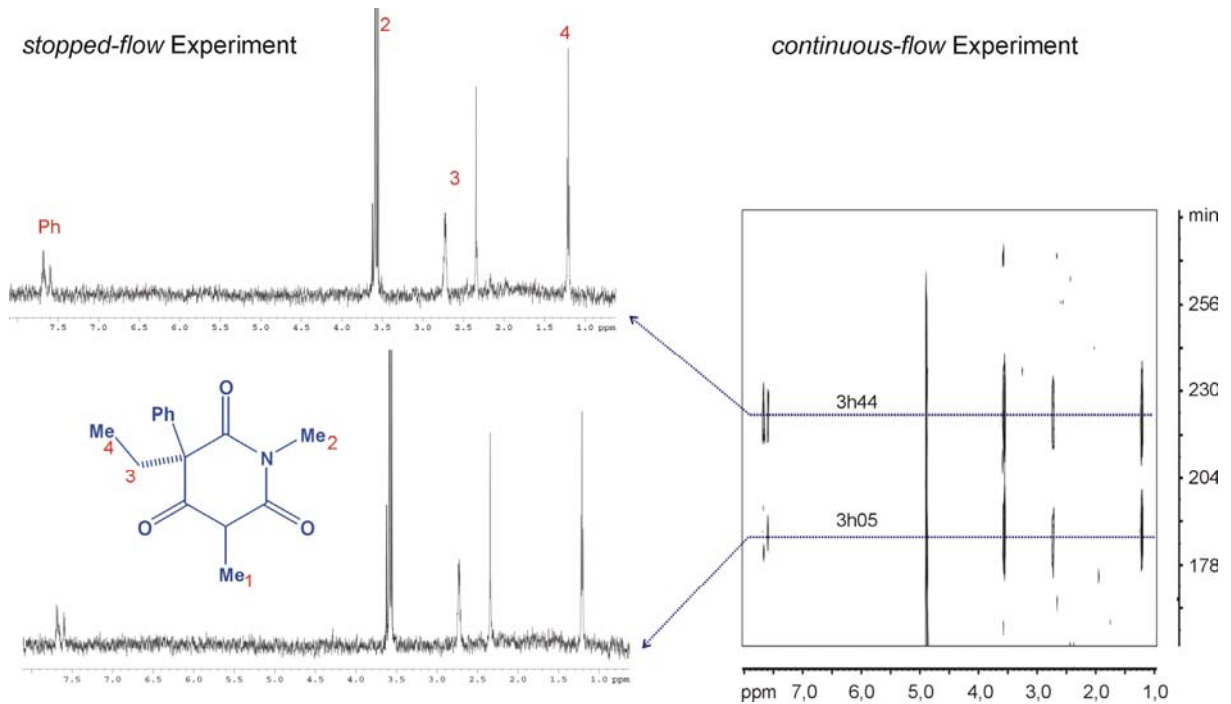
**Abbildung 4-33:** Konturplot der cHPLC-Trennung eines ca. 14,5 mM Gemisches aus zwei verschiedenen Enantiomerenpaaren ((1) R/S-Hexobarbital, (2) R/S-Mephobarbital) mit einer Flussrate von 0,2  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Bei einer Flussrate von 0,2  $\mu\text{l}/\text{min}$  wurden jeweils 700 ng (d.h.: < 3 nmol) der vier Komponenten injiziert (14,3/14,9 mM Lösung) und innerhalb von 4 Stunden aufgetrennt und mit einem für alle Signale gerade noch ausreichendem S/N-Verhältnis detektiert.

Um für die Enantiomerenidentifizierung und Strukturbestätigung ein besseres S/N-Verhältnis im Spektrum zu erreichen, wurden (wie in den vorigen Kapiteln



beschrieben) durch Anhalten der Trennung zu den im ersten Lauf bestimmten Zeitpunkten, in einem zweiten cHPLC-Lauf auf allen Peakmaxima *stopped-flow* 1D-Experimente durchgeführt. Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von R/S-Mephobarbital sind in Abbildung 4-34 exemplarisch dargestellt.



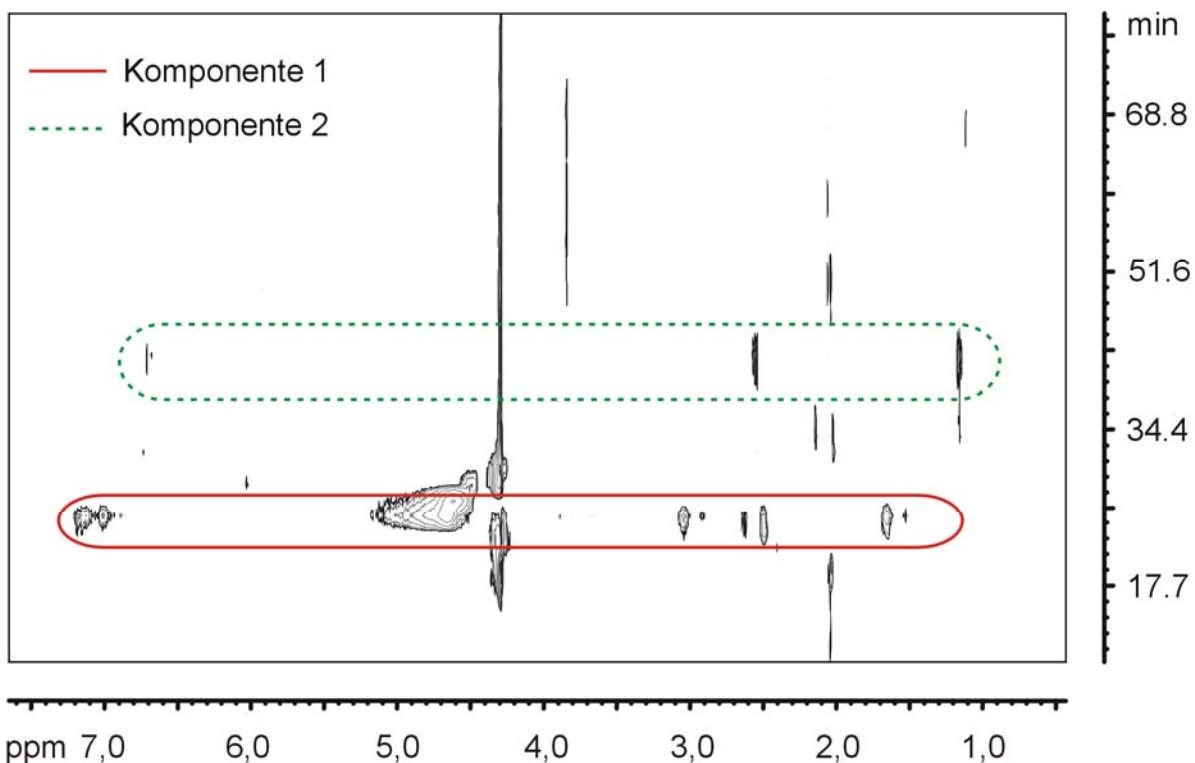
**Abbildung 4-34:** *Stopped-flow* 1D- $^1\text{H}$ -NMR-Spektren des aufgetrennten D- und L-Enantiomerenpaares von Mephobarbital (Aufnahmedauer jeweils 2 h).

#### 4.3.6 Naturstoffanalytik mittels cHPLC-NMR *on-line*-Kopplung am Beispiel eines Extraktes des Käfers *palembus ozularis*

Als eine typische Naturstoffprobe wurde der methanolische Extrakt der Drüsen des *palembus ozularis*, eines schwarzen in Südamerika vorkommenden Käfers, als Beispiel genommen. Dieser Käferart wird in der südamerikanischen Naturmedizin eine entzündungshemmende Wirkung zugesprochen. Dort werden die Käfer traditionell in warmer Milch extrahiert und der Sud oral z.B. zur Asthma-Behandlung appliziert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, die möglicherweise enthaltenen entzündungshemmenden Wirkstoffe mittels cHPLC-NMR *on-line* Analytik zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden mehrere hundert dieser Drüsen präpariert und in Methanol extrahiert. Um die Probe NMR kompatibel zu machen, wurde die

Probe lyophilisiert und nun erneut möglichst hoch konzentriert in volldeutertem Methanol- $d_4$  wieder aufgenommen.

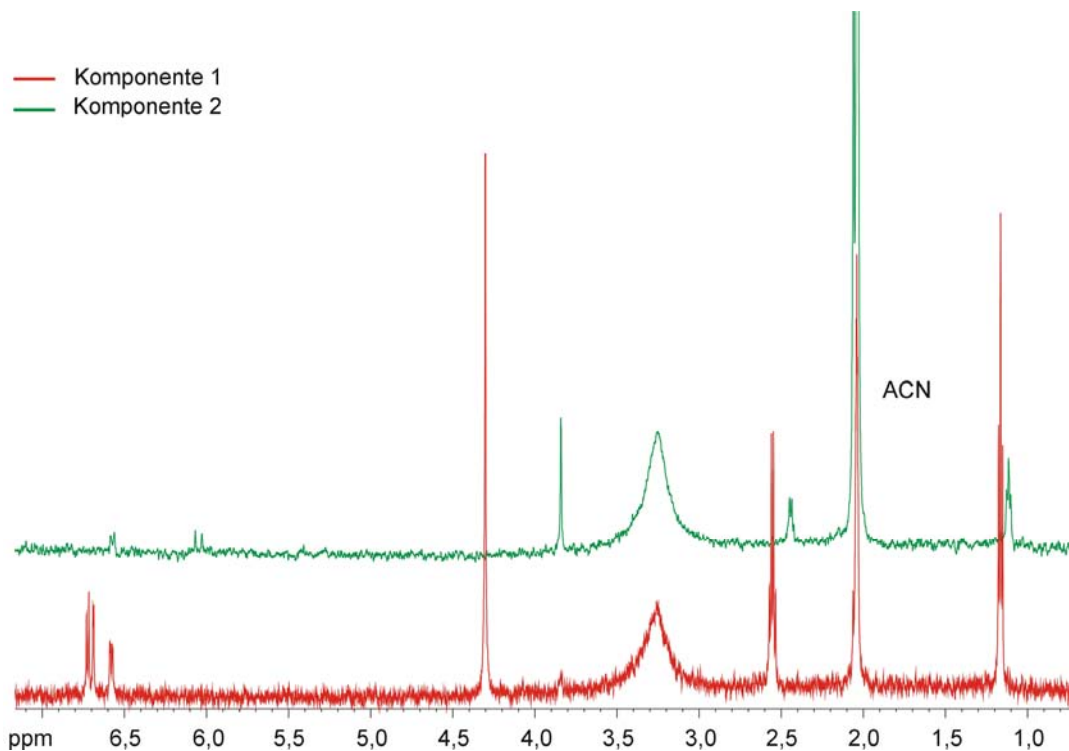
Nach Optimierung der chromatographischen Parameter wurde zunächst ein *continuous-flow* Experiment durchgeführt. Der pseudo-2D-Konturplot ist in Abbildung 4-35 dargestellt. Das *continuous-flow* Experiment zeigte das Vorhandensein zweier Hauptkomponenten. Die erste Substanz eluierte nach 22 min während nach 36 min eine zweite Substanz detektiert werden konnte. Die vorhergehende Optimierung der Trennung war trotz des äußerst limitierten Probenvolumens möglich, da aufgrund der Kapillardimension des verwendeten *on-line*-kopplungs LC-NMR-Setups pro Lauf nur 2,25  $\mu$ l Probe injiziert werden mussten, um eine zur NMR-Detektion genügend hohe Peakkonzentration zu erhalten.



**Abbildung 4-35:** cHPLC-NMR-Konturplot der zwei Hauptkomponenten einer Trennung des Drüsen-Extraktes des Käfers „palembus ozularis“ (Retentionszeiten: 22.min Komponente 1, 36.min Komponente 2).

Darauffolgend wurde (zu den im ersten Lauf bestimmten Zeitpunkten der beiden Peakmaxima) in einem zweiten Lauf, zur Verbesserung des S/N-Verhältnisses im Spektrum und zur Strukturaufklärung der detektierten Substanzen, jeweils ein *stopped-flow* 1D- und ein 2D-Experiment durchgeführt. Vor jedem *stopped-flow* Experiment wurden die NMR-Parameter (z.B. erneutes *Shimmen* auf das  $D_2O$  lock-

Signal und Nachjustierung des Transmitterkanals) erneut optimiert. Da die Trennung mit volldeuterten Lösungsmitteln und Eluenten durchgeführt wurde, konnte auf eine Lösungsmittelunterdrückung verzichtet werden, die Restsignale des Wassers und des Acetonitrils würden sich nicht störend auf die Substanzsignale auswirken. Um dies zu demonstrieren, wurde zumindest für die *stopped-flow* Messungen des ersten Peaks auf die Signalunterdrückung verzichtet und die Spektren mit maximaler Detektorempfindlichkeit aufgenommen. Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der beiden Komponenten sind in Abbildung 4-36 dargestellt. Um die Möglichkeit und den Effekt der Signalunterdrückung kleiner Lösungsmittel-Restsignale zu demonstrieren, wurden (obwohl nicht notwendig) die beiden Lösungsmittelsignale während der *stopped-flow* Messungen des zweiten Peaks unterdrückt.

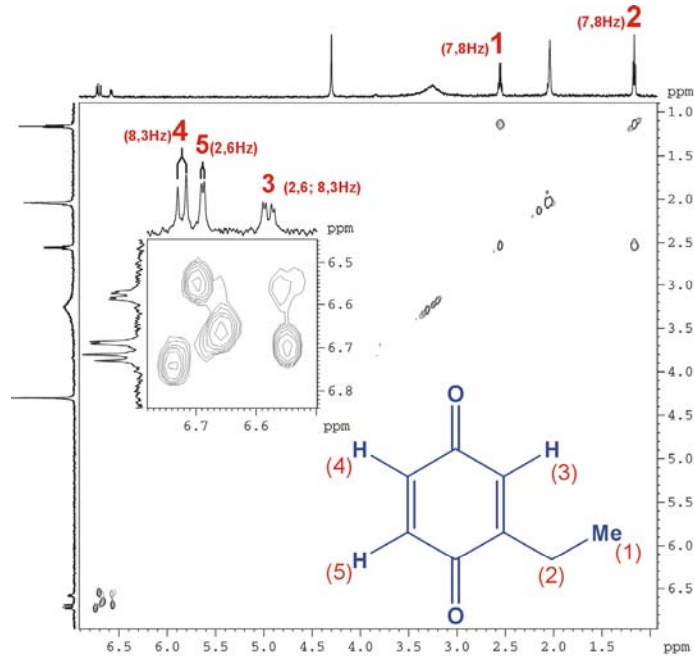


**Abbildung 4-36:** *Stopped-flow* 1D- $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der beiden aufgetrennten Hauptkomponenten des Drüsen-Extraktes des Käfers „palembus ozularis“ (Aufnahmedauer: 26min Komponente 1, 42min Komponente 2).

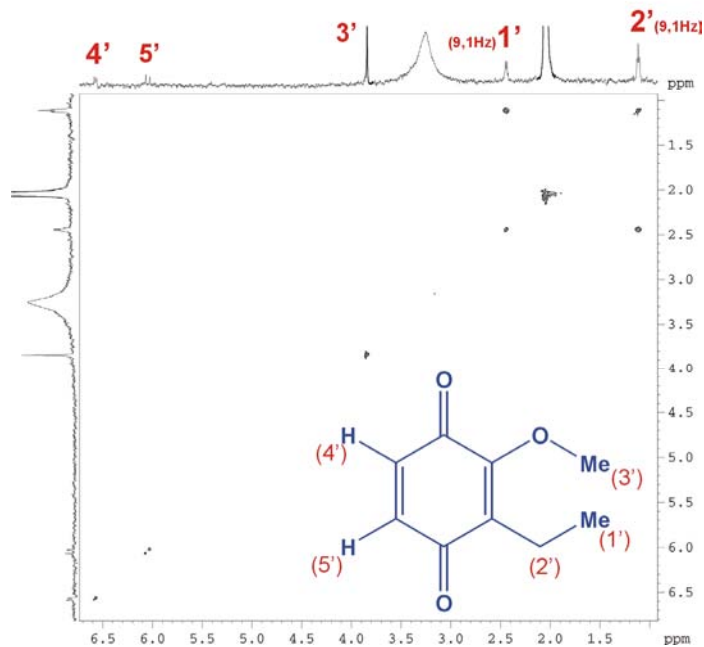
Die 1D- $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der beiden Substanzen weisen eine große Ähnlichkeit auf, was auf eine gemeinsame Substanzklasse schließen lässt. Dies gilt natürlich auch für die 2D- $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -NMR-Spektren, dennoch konnte anhand der Spektren eine erfolgreiche Strukturaufklärung erfolgen. Dies war möglich, da es aufgrund der mit diesem Setup im *stopped-flow* Modus frei wählbaren Aufnahmedauer (hier insgesamt

20,5 h) möglich ist, mit der notwendigen hohen spektralen Auflösung genügend Einzelspektren aufzusummieren, um auswertbare 2D-Konturplots zu generieren (siehe Abbildung 4-37 a&b). Der erste Peak konnte als 2-Ethyl-Benzochinon-1,4 und der zweite Peak als 2-Ethyl-3-Methoxy-Benzochinon-1,4 identifiziert werden.

a)



b)



**Abbildung 4-37:** Stopped-flow 2D- $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -TOCSY-Spektren der beiden aufgetrennten Hauptkomponenten des Drüsen-Extraktes des Käfers „palembus ozularis“: **a)** 2-Ethyl-Benzochinon-1,4 **b)** 2-Ethyl-3-Methoxy-Benzochinon-1,4. (Aufnahmedauer: (a) 3h47min, (b) 15h29min).

### 4.3.7 *On-line* Naturstoffanalytik mittels eines NMR-Kapillarprobenkopfes mit integrierter UV-Detektion

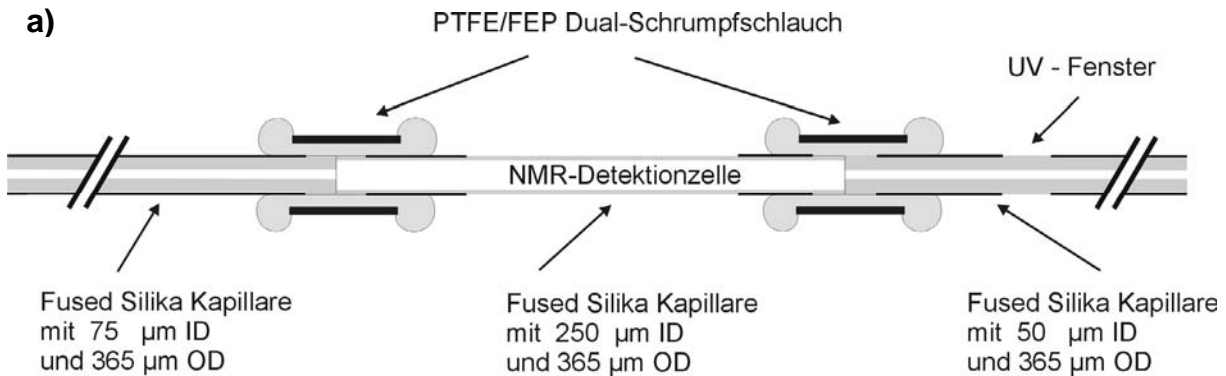
#### *(Am Beispiel eines salvia miltiorrhiza Extraktes)*

Aufgrund der für niedrig konzentrierte Naturstoffproben ungenügenden Empfindlichkeit der 2 mm Doppelsattel-Helmholtz-Spule, wurde in den Kapillarprobenkopf noch eine UV-Detektionseinheit integriert, die mittels 2m langen Glasfaser-Lichtleitern mit einem externen UV-Detektor verbunden werden konnte. Mit diesem neuen NMR-Probenkopf mit integrierter UV-Zelle, sollte die *on-line* cLC-UV-NMR Analytik von Realproben (mit einer für die NMR-Detektion eigentlich zu geringen Konzentration) möglich sein. Bei Detektion eines Substanzpeaks mit dem wesentlich empfindlicheren UV-Detektor wird die Trennung (unter Berücksichtigung der durch Transfervolumen und Flussrate bestimmten zeitlichen Verzögerung) wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben angehalten, um so genügend Zeit zu haben, die zur Strukturauflösung notwendigen 1D- und 2D- Experimente mit dem unempfindlicheren NMR-Spektrometer durchzuführen.

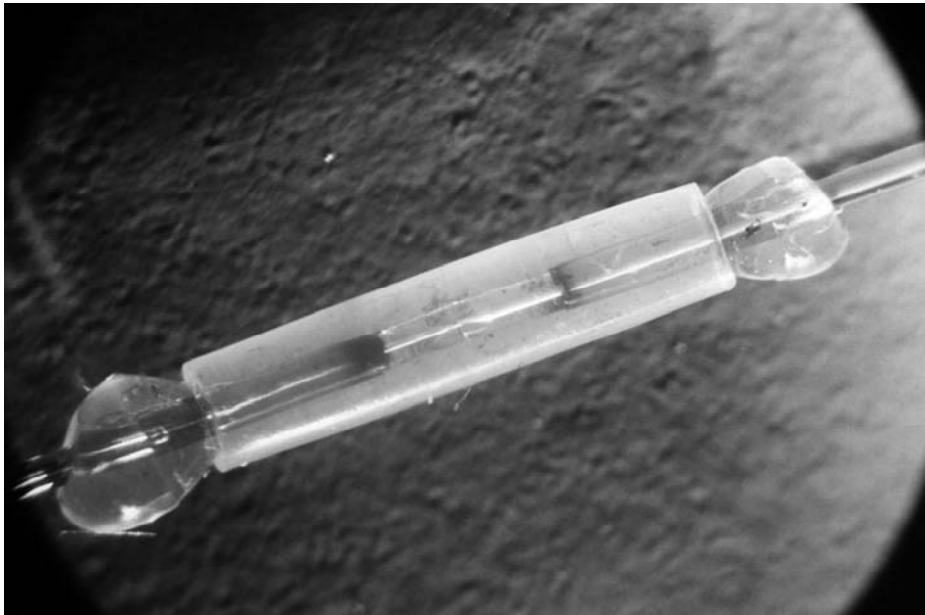
Für diesen UV-NMR-Kapillarprobenkopf musste eine spezielle segmentierte UV-NMR-Detektionskapillare angefertigt werden. Hierzu wurden eine Kapillare mit UV-Detektionsfenster und eine Kapillare mit NMR-Detektionsfenster direkt aneinander gekuppelt (siehe Abbildung 4-38). Der Abstand der beiden Detektionsfenster beträgt 7 cm, die 2 mm Doppelsattel-Helmholtz-Spule hat eine Länge von 8 mm. Mit diesem Kapillarprobenkopf wurde mit einer 250  $\mu\text{m}$  ID UV/NMR Detektionszelle (dargestellt in Abbildung 4-38) eine Halbwertsbreite knapp  $\leq 1$  Hz erreicht (*Shimming* mit 3% Hump-Test), was dem ermittelten Wert für die entsprechende Zelle mit dem 9 mm langen NMR-Kapillarprobenkopf entspricht (vgl. Kapitel 4.3.1.1).

Um die Sensitivitäten der beiden Probenköpfe miteinander vergleichen zu können, wurde auch mit diesem Probenkopf das S/N-Verhältnis des anomeren Protons einer 200 mM Saccharose-Lösung in  $\text{D}_2\text{O}$  bestimmt. Auch hier wurde nur 1 Transient aufgezeichnet. Für die segmentierte FS-Transfer- und Detektionskapillare (OD 365 $\mu\text{m}$ , durchgehend / ID<sub>Zuleitung</sub> 75 $\mu\text{m}$  / ID<sub>Ableitung</sub> 100 $\mu\text{m}$  / ID<sub>Detektion</sub> 250  $\mu\text{m}$ , vgl. Abbildung 4-6) wurde ein Signal/Rausch-Verhältnis von 20 bestimmt (bei NS = 1 / LB = 1 Hz).

Die Funktionalität dieses Probenkopfes in Bezug auf Realproben wurde anhand eines taiwanesischen *salvia miltiorrhiza* Extraktes getestet. *Salvia miltiorrhiza* wird seit Jahrhunderten in der traditionellen chinesischen Medizin verwendet.



**b)**

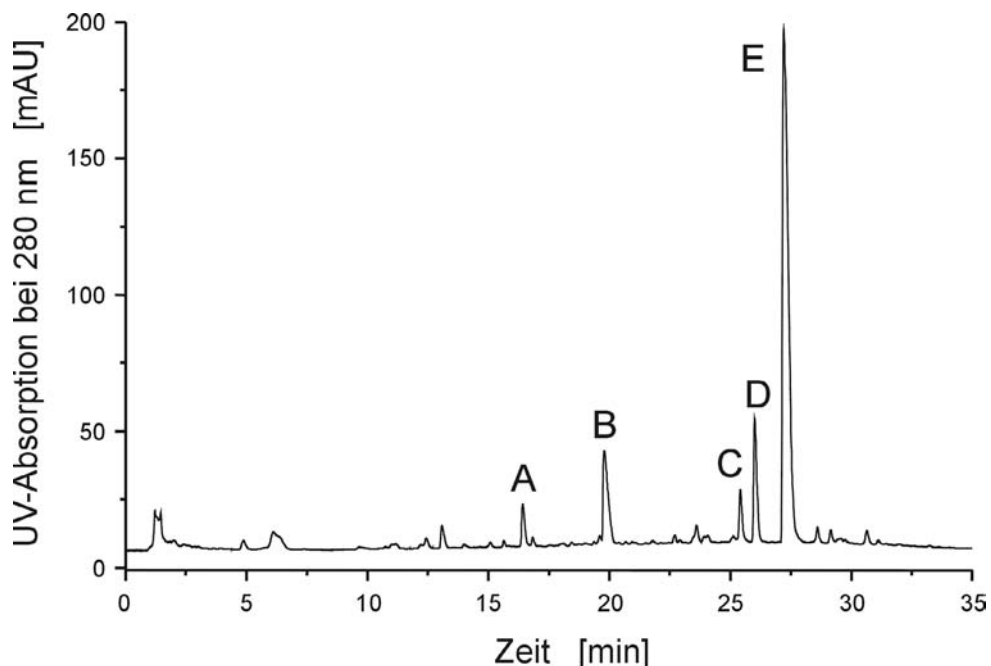


**Abbildung 4-38:** Transfer-, UV-Detektions- und NMR-Detektions-Segmente der Kombinierten UV/NMR-Detektionskapillare (gekuppelt mittels PTFE/FEP Dual-Schrumpfschlauch): **a)** Schematische Zeichnung, **b)** 18-fach vergrößerte Lichtmikroskopaufnahme der PTFE/FEP Kupplungsstelle einer segmentierten Detektionskapillare (links: Zuleitungs/UV-Detektionssegment, rechts: NMR-Detektionssegment).

Der wasserlösliche Extrakt von *salvia miltiorrhiza* wird in China zur Behandlung bestimmter Krankheiten, wie *angina pectoris* und chronischer Hepatitis klinisch eingesetzt [236,237]. Sowohl der wasserlösliche Anteil als auch mehrere fettlösliche Verbindungen, die aus *salvia miltiorrhiza* isoliert wurden, zeigen vielfache pharmakologische Aktivitäten. So sind beispielsweise Biomembranen durch

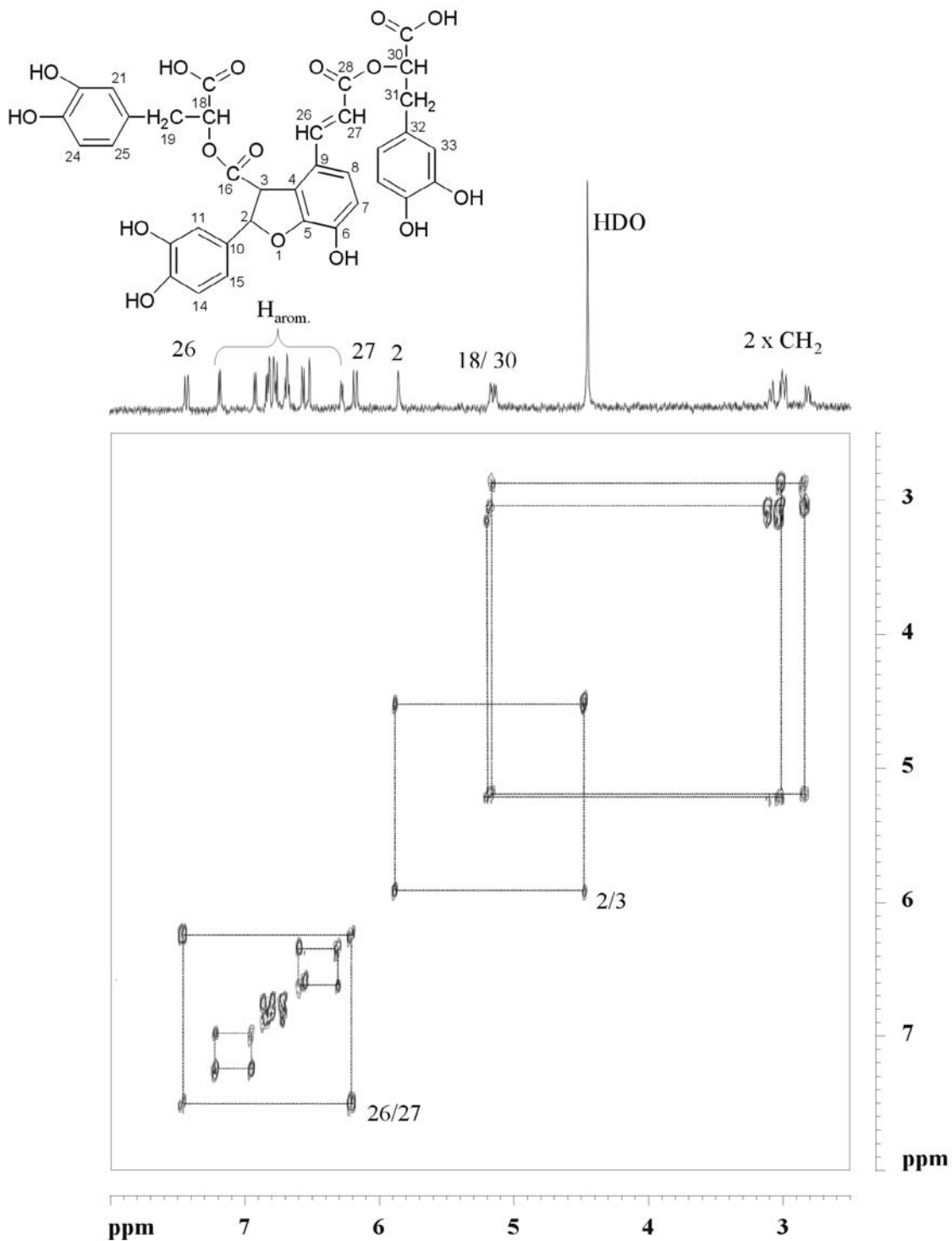
Salvianolsäure A (Sai A) hochwirksam gegen peroxidative Schäden geschützt [238]. Salvianolsäure B (Sai B) ist ein wasserlösliches Antioxidans, welches LDL (*low density lipoprotein*) vor  $\text{Cu}^{2+}$ -induzierten, oxidativen Schäden schützt und die Entwicklung von Arteriosklerose hemmt [239].

Die getrockneten Wurzeln von *salvia miltiorrhiza* werden 24 Stunden bei Raumtemperatur mit einer Ethanol-Wasser-Mischung (1:4, v/v) extrahiert. Der aufkonzentrierte Extrakt wurde bis zur Verwendung bei 4 °C unter Stickstoff gelagert. Zunächst wurde von einem *salvia miltiorrhiza*-Extrakt die Anzahl der Hauptinhaltsstoffe mittels cHPLC bestimmt. Vom fünften und intensivsten der Hauptpeaks wurde dann die Struktur bestimmt. Auf eine vollständige Strukturaufklärung aller enthaltenen, möglicherweise unbekannt Substanzen, wurde im Rahmen dieser Arbeit, bei der mehr die technische Seite im Vordergrund stand, jedoch verzichtet. Abbildung 4-39 zeigt das cHPLC-UV-Chromatogramm des Extraktes. Im folgenden Lauf wurde Peak E für die *stopped-flow* NMR-Experimente ausgewählt. Aus dem 2D- $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum in Abbildung 4-40 erhält man dieselben Ergebnisse wie bei der konventionellen HPLC-NMR-Spektroskopie (vgl. [240]), das Volumen der Detektionszelle beträgt jedoch nur 400 nL gegenüber 120  $\mu\text{L}$  bei der konventionellen HPLC-NMR.



**Abbildung 4-39:** cHPLC-UV-Trennung des *salvia miltiorrhiza* Extraktes (Peaks A-E die Hauptkomponenten des Extraktes, sind Derivate der Salvianolsäure).

Abbildung 4-40 zeigt das *stopped-flow* 2D- $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY-Spektrum von Peak E (Sai B), aufgenommen während einer Wiederholung der cHPLC-Trennung. Da bei der cHPLC/NMR-Kopplung nur deuterierte Lösungsmittel ( $\text{D}_2\text{O}$ /Acetonitril- $\text{d}_3$ ) verwendet wurden, war (im Gegensatz zur konventionellen HPLC/NMR-Kopplung) keine Lösungsmittelunterdrückung notwendig.

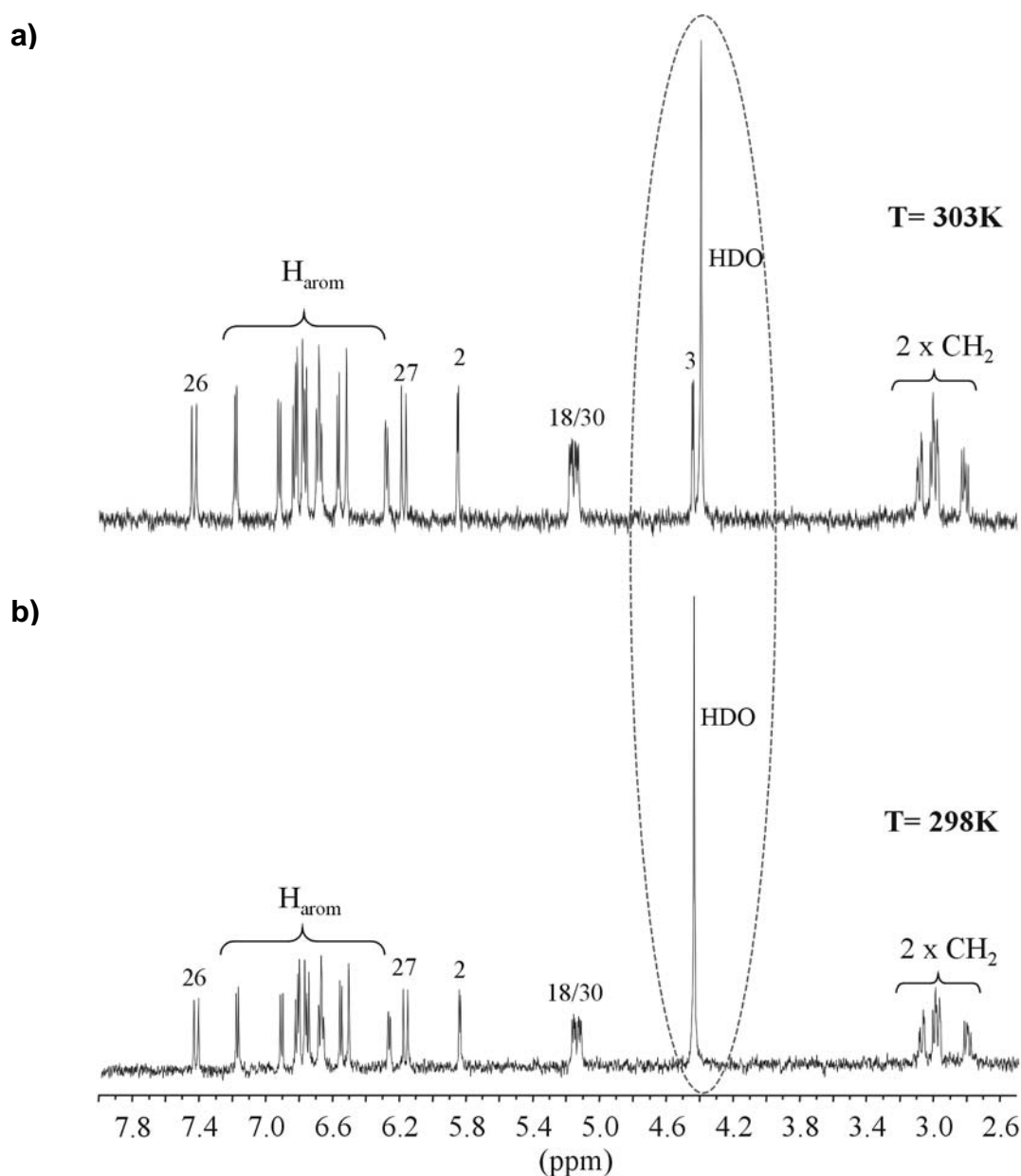


**Abbildung 4-40:** Stopped-flow 2D- $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY-Spektrum von Peak E (Sai B) bei 298 K.



Durch die Veränderung der Lösungsmittelzusammensetzung während des cHPLC-Gradienten, kam es allerdings zu einer Verschiebung des Protonensignals (3), so dass dieses nur im 2D-H,H-COSY-Spektrum als *Crosspeak* zu sehen ist, während es im cHPLC-1D-NMR-Spektrum durch den HDO-Peak komplett verdeckt wird (vgl. Abbildung 4-41a).

Diesem Effekt kann durch Temperaturerhöhung entgegengewirkt werden. Durch Erhöhung der Temperatur um 5 K (d. h. Erniedrigung der Lösungsmittelviskosität) ist das Protonensignal (3) wieder im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum selbst erkennbar und wird nicht mehr durch den HDO-Peak verdeckt (vgl. Abbildung 4-41b).



**Abbildung 4-41:** 1D- $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von Peak E (Sai B) bei verschiedenen Temperaturen: **a)** 298 K, **b)** 303 K.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Geräte

- Kapillartrennsysteme: (Eigenbau)
- Modulare druckunterstützbare Gradienten-cHPLC/(p)-CEC -Anlage mit presplitt Injektion: Sykam 1100 HPLC-Pumpe (Sykam), Hochspannungsquelle  $\pm 0-30$  kV,  $\pm 0-0.2$  mA (F.u.G.), UV/VIS 205 Detektor (Linear), Valco "Cheminert, two position, 6-port, microbore valve C2-1006" (VICI AG), ChromStar Datenaufnahme/-verarbeitungs Hard-/Software (SunChrom).
  - Modulare druckunterstützbare Gradienten-cHPLC/(p)-CEC-Anlage mit postsplitt Injektion: Sykam 1100 HPLC-Pumpe (Sykam), Hochspannungsquelle  $\pm 0-30$  kV,  $\pm 0-0.2$  mA (F.u.G.), UV/VIS 205 Detektor (Linear), Valco "Cheminert, two position, 6-port, microbore valve C2-1006" (VICI AG), ChromStar Datenaufnahme/-verarbeitungs Hard-/Software (SunChrom).
  - Modulare druckunterstützbare splittlose cHPLC/(p)CEC-Anlage: ELDEX MicroPro Spritzenpumpensystem (SunChrom), Hochspannungsquelle  $\pm 0-30$  kV,  $\pm 0-0.2$  mA (F.u.G.), UV/VIS 205 Detektor (Linear), Valco "Cheminert, two position, 6-port, microbore valve C2-1006" (VICI AG), ChromStar Datenaufnahme/-verarbeitungs Hard-/Software (SunChrom).
- Kommerzielle auf CEC adaptierbare CE-Anlage: Gradienten-HPLC-Anlage:
- Kapillarelektrophorese-System P/ACE-System MDQ, UV/VIS-, DAD-Detektoren mit CEC-Zusatzfunktion (Beckman).
- S8100-Pumpe (Sykam), UV/VIS 250 Detektor, Datensystem: Paramid Chromatography Manager (Axxiom).
- Analytische HPLC-Säule:
- Nuceosil C18 5 $\mu$ m 250x4,6 mm (Grom)

NMR-Geräte:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bruker AMX 600, 14.1 Tesla, Protonenfrequenz 600.13 MHz (Bruker).</li> <li>• Bruker DRX 600, 14.1 Tesla, Protonenfrequenz 600.13 MHz (Bruker).</li> </ul>
NMR-Probenköpfe:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 mm-selektiv-Kapillar-LC-Probenkopf (9mm lange Spule).</li> <li>• 2 mm-selektiv-Kapillar-LC-Probenkopf mit integrierter UV-Detektionseinheit (8mm lange Spule).</li> </ul>
Packpumpe:	Shandon 628 X51 (Shandon).
Ultraschallbad:	Sonorex RK 102H (Bandelin).
Frittenbrenner:	Eigenbau (Elektronikwerkstatt, Uni. Tübingen).
Microflame Brenner:	Model B (Microflame Limited).
Nassschleifmaschine:	Buehler METASERV/Grinder-Polisher (Buehler).
pH-Meter:	CG828 (Schott).
Reinstwasseranlage:	MilliQ185 Plus (Millipore).
Wasserkreislauf:	Thermomix 1441 (B. Braun).
Lichtmikroskop:	Carl Zeiss Standard WL (Zeiss).

## 5.2 Chemikalien und Materialien

Lösungsmittel:	„LiChrosolv“ (Merck, Darmstadt) „CHROMASOLV“ (Riedel-de Haën, Seelze)
Deuterierte Lösungsmittel:	Deutero, Herresbach
Wasser:	Bidest, Milli-Qplus Wasserreinigungssystem
Stationäre Phasen:	Grom (Herrenberg) & Arbeitskreis Prof. Dr. Schurig
Quarzglaskapillaren:	Polymicro Technology
Nassschleifpapier:	Silicon Carbid P 4000 /5 µm Korngröße (Wirtz-Buehler GmbH)
PTFE-Schrumpfschlauch:	IFK-Isofluor
PTFE-FEP Dual	
Schrumpfschlauch:	IFK-Isofluor
Verschraubungen, Verbinder, T-Stücke, Kreuze, Kapillarrohre aus PEEK bzw. SS:	Upchurch Scientific

Alle weiteren Chemikalien (z.B. Puffersalze) hatten den Reinheitsgrad „*pro analysis*“ oder höher und wurden von den Firmen Merck, Fluka oder Sigma bezogen.

### 5.3 Substanzen

Benzoate: wurden als Standardtestgemisch für HPLC-Säulen von der Firma Grom (Herrenberg) bezogen.

Thioharnstoff: wurde von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen (p.a.)

Mutterkornalkaloid  
Extrakt: Der ethanolische Alkaloid-Extrakt (*extractum secalis cornuti*) des Mutterkorn Schimmelpilzes (*ergot fungus*) wurde von der Chemischen Fabrik Dr. Hetterich (Fürth) bezogen.

Saccharide: wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen (p.a.)

Fettsäuremethylester: F.A.M.E. Mix GLC 50 (Reinsubstanzen) wurde von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen. Nach Angaben der Firma sind gleiche Mengen (gewichtsbezogen) aller vier Verbindungen enthalten

Chirale Verbindungen: Mephobarbital und Hexobarbital wurde uns freundlicherweise vom Arbeitskreis von Prof. Dr. Schurig (Chemisches Institut, Universität Tübingen) überlassen.

Drüsen-Extrakt des  
*palembo ozularis*: Der methanolische Extrakt der Drüsen des *palembo ozularis* wurde uns freundlicherweise von M. Wahrendorf (AK Prof. Dr. Wink) Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Heidelberg überlassen.

*Salvia miltiorrhiza*

Extrakt: Die Probe stammt aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Shiao, Department of Medical Research and Education, Veterans General Hospital Taipei, Taiwan

## 5.4 Methoden

### 5.4.1 Herstellung der Kapillarsäulen

#### 5.4.1.1 Herstellung von Kapillarsäulen mit zwei Fritten

Ausgangsprodukte zur Herstellung der elektrochromatographischen Kapillarsäulen waren FS-Kapillaren und verschiedene Packungsmaterialien. Zwischen 30-60 mg des Packungsmaterials wurden in 200-300 µl Aceton suspendiert und 10 min lang im Ultraschallbad homogenisiert (vgl. Abbildung 5-1a).

Währenddessen wurde eine zuvor auf Unversehrtheit des Polyimidmantels getestete Quarzkapillare in die Packapparatur zwischen den Injektor und einen HPLC *Inline*-Filter gekoppelt (siehe Abbildung 5-2).

Das homogenisierte *Slurry* wurde sofort nach Entnahme aus dem Ultraschallbad in eine Spritze gezogen und in die Vorratssäule (SS mit Glas-Inlay, 500µm ID, 250 mm Länge) injiziert. Das *Slurry* wurde nun schnellstmöglich mit 500 bar Wasserdruck in die Kapillare katapultiert. Die gesamte Quarzkapillare wurde nun mit weiterhin angelegtem Wasserdruck für 60 min in ein Ultraschallbad getaucht, um die Dichte der Packung zu maximieren (vgl. Abbildung 5-1b&c).

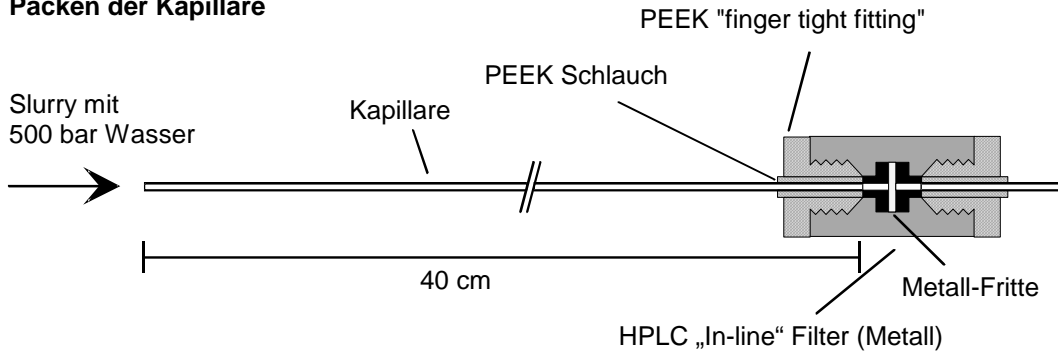
Anschließend wurden zwei Fritten gesintert, welche das Material an der gewünschten Stelle in der Säule halten. Die Fritten wurden im Abstand der gewünschten Säulenlänge mit Hilfe eines selbst gebauten Transformators (mit Temperaturanzeige und -regler, Abbildung 5-3) und eines speziell dafür konzipierten Sinterwerkzeugs erzeugt. Die dafür vorgesehenen Stellen wurden damit 6-14 mal (je nach Packungsmaterial und Säulendurchmesser) für je 5 Sekunden auf 500°C erhitzt, während die Kapillare von Wasser mit 500 bar Druck durchströmt wurde. Zuerst wurde die spätere Einlassfritte möglichst nahe des HPLC *Inline*-Filters gesintert und danach „stromaufwärts“ die spätere Auslassfritte (vgl. Abbildung 5-1d). Nach dem Sintern der Einlass- und Auslassfritte wurde der HPLC *Inline*-Filter entfernt und dabei die überschüssigen Beads hinter der späteren Einlassfritte durch den noch angelegten Wasserdruck ausgespült (vgl. Abbildung 5-1e).

Nach zügigem Druckabbau über einen T-Hahn (vgl. Abbildung 5-2) wurde die Kapillare mit dem ausgespülten Ende an eine HPLC-Pumpe gekoppelt und nun in umgekehrter Richtung mit Aceton bei 250 bar gespült. Das noch nicht ausgespülte Ende wurde bis zur Ablösung der überschüssigen Beads von der Endfritte in ein Ultraschallbad getaucht (vgl. Abbildung 5-1f).

**a) Slurry-Herstellung**

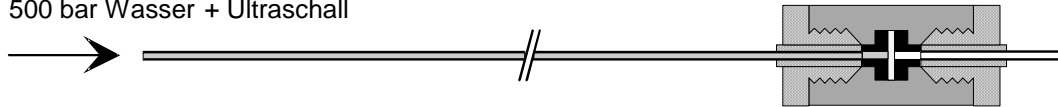
30 - 60 mg Beads suspendiert in 200-300  $\mu$ l  
30 min in Ultraschallbad

**b) Packen der Kapillare**

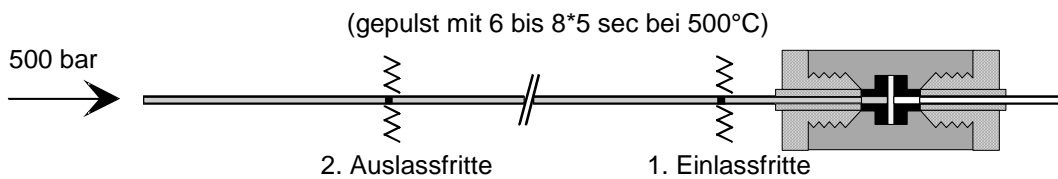


**c) Verdichten der Beads**

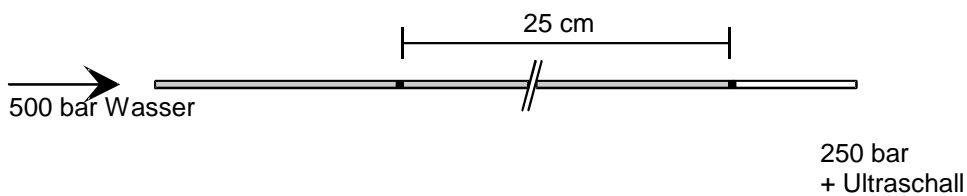
Für 60 min  
500 bar Wasser + Ultraschall



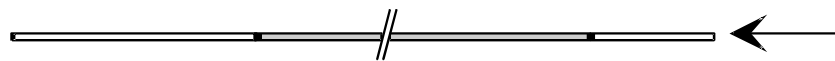
**d) Brennen der Fritten**



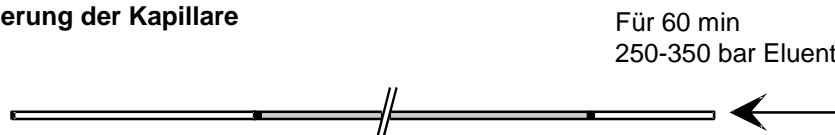
**e) Ausspülen der überschüssigen Beads**



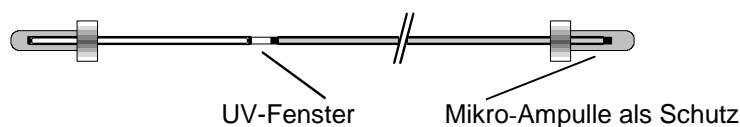
**f)**



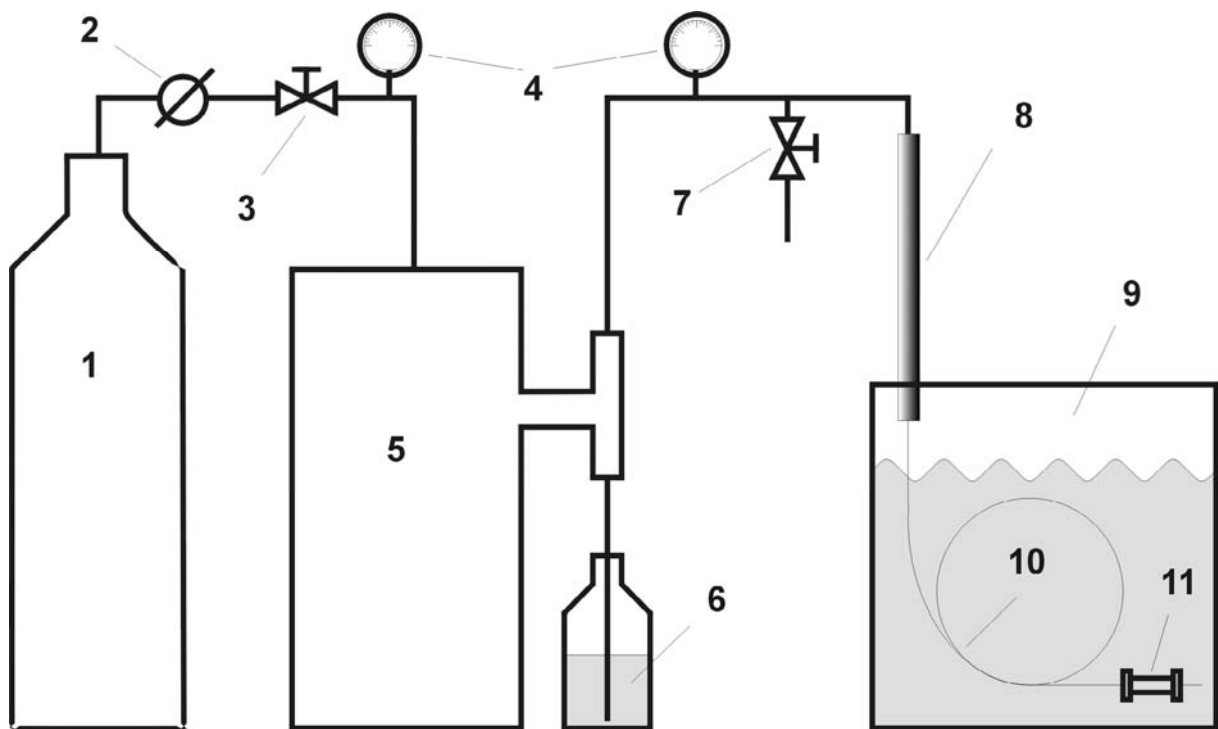
**g) Konditionierung der Kapillare**



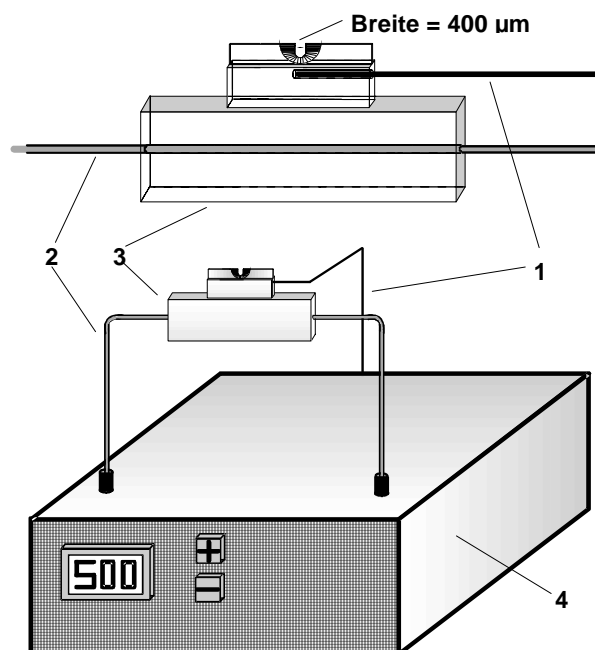
**h) Lagerung der Kapillare und Einbringen des UV-Fensters**



**Abbildung 5-1:** Schematische Darstellung der Packprozedur zur Herstellung von Kapillarsäulen mit zwei gesinterten Fritten.



**Abbildung 5-2:** Apparativer Aufbau zur Herstellung gepackter Kapillarsäulen (1  $N_2$ -Druckgasflasche, 2 Hahn, 3 Ventil, 4 Manometer, 5 gasgetriebene Packpumpe, 6 Reservoir mit  $H_2O_{(dest)}$ , 7 T-Stück mit Ventil (zum schnellen Druckabbau), 8 Slurry-Reservoir, 9 Ultraschallbad, 10 FS-Kapillare, 11 HPLC-Inline-Filter).



**Abbildung 5-3:** Schematische Darstellung des Sinterwerkzeugs und des Transformators (1 Temperaturfühler, 2 Glühdraht, 3 Sinterwerkzeug, 4 Transformator mit Temperaturregulierung).

Danach wurde die Kapillare mit einem Kapillarschneider möglichst nahe der Einlassfritte geritzt und der überschüssige Teil der Kapillare abgebrochen. Entweder wurde die Kapillare nun zur sofortigen Verwendung konditioniert (vgl. Abbildung 5-1g) oder zur Lagerung mit 12 bar N<sub>2</sub>-Druck trockengeblasen. Nun konnte direkt hinter der Endfritte das für die UV-Detektion benötigte Fenster gefertigt werden. Dazu wurde das Polyimid entweder weggebrannt, mit Hilfe einer flach geführten, neuen Einweg-Skalpellklinge weggeschnitten oder durch Behandlung mit starken Säuren aufgequollen und dann mittels eines Skalpells weggeschoben. Der ungepackte Teil mit UV-Fenster wurde dann auf die benötigte Länge gekürzt (vgl. Abbildung 5-1h).

#### 5.4.1.2 Herstellung von Kapillarsäulen mit einer Fritte

Kapillarsäulen mit Konus-Design werden analog der in 5.4.1.1 beschriebenen *Slurry*-Packmethode hergestellt.

Zur Anfertigung der Innenkonusse wird eine FS-Kapillare (von doppelter später benötigter Länge) genau in der Mitte mit Hilfe eines Mikro-Schweißbrenners geschmolzen und somit zu einem doppelten Innenkonus verschlossen (vgl. Abbildung 5-4a). So können durch exaktes Schneiden der Kapillare an dieser Stelle gleich zwei Kapillarstücke mit Innenkonus erhalten werden. Die bis zum Verschluss verjüngten Enden und die Enden der später daran zu koppelnden Kapillaren werden nun plan und glatt geschliffen. Dazu werden die Enden so in einem SS-Block fixiert, dass nur ein bis zwei Zehntel daraus hervorstehen. Dies ermöglicht das exakte Abschleifen der Enden im rechten Winkel zur Kapillarachse. Durch vorsichtiges Nachschieben des Innenkonusses konnte so mit einiger Übung die gewünschte Konus-Lochweite geformt werden. Auf diese Weise ist es möglich, reproduzierbar robuste dickwandige Innenkonusse zu produzieren und ihr Ende und auch das Ende nicht verjüngter Kapillaren plan zu schleifen. Die Qualität der Oberfläche hängt, wie in Abbildung 3-14 zu sehen, stark von der Bearbeitungsmethode ab. Eine Oberflächenqualität wie in Abbildung 3-14c ist notwendig, um spätere Totvolumina durch verbleibende Spalten und Risse an der Kopplungsstelle zu vermeiden und so die Dichtigkeit bis zu 550 bar zu gewährleisten.



a) **Herstellung des Innenkonusses**

FS-Kapillare mit Microflame Brenner in der Mitte zuschmelzen.

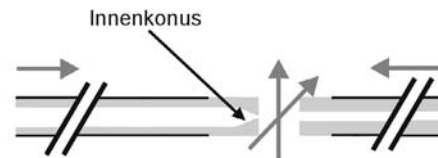
Genau in der Mitte durchschneiden

Alle Kapillarenden planschleifen, das zugeschmolzene innenverjüngte Ende solange bis der gewünschte ID erreicht ist (10-50  $\mu\text{m}$ ).

b) **Totvolumenfreies Ankuppeln der Segmente**

Die geschliffenen Enden werden exakt aufeinander ausgerichtet und aneinander gestoßen.

Die duale PTFE/FEP-Verbindung wird aufgeschumpft

c) **Slurry-Herstellung**

10 -20 mg Packungsmaterial werden 20 min in 70-150  $\mu\text{l}$  Aceton (oder MeOH) ultrageschallt.

d) **Packen der Kapillare**

Das *Slurry* wird in die Kapillare gedrückt.

Nachverdichten der Packung mit Druck und Ultraschall.

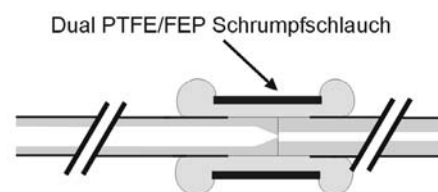
Langsamer Druckabfall.

Spülen der Kapillare mit  $\text{H}_2\text{O}$

$\Delta P = 500 \text{ bar}$   
Slurry

30 min U-Schall  
 $\Delta P = 500 \text{ bar}$   
Acetone  
(resp. MeOH)

30 min U-Schall  
 $\Delta P = 500 \text{ bar}$   
 $\text{H}_2\text{O}$

e) **Frittensintern ( T=500°C)**

$\Delta P = 500 \text{ bar}$   
 $\text{H}_2\text{O}$

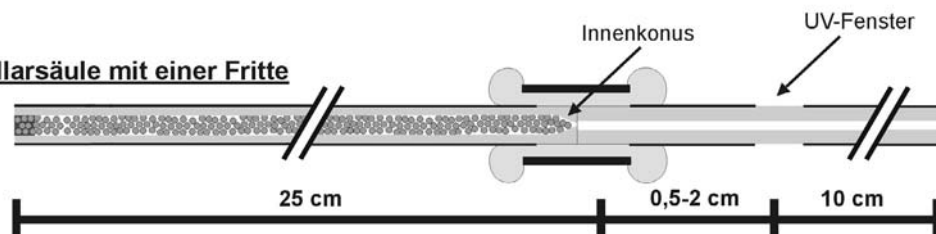
f) **UV-Fenster brennen**g) **Konditionieren**

Säule 20 min mit mobiler Phase spülen ( $p = 150 \text{ bar}$ ) danach:

elektrokinetische Konditionierung: 45 min bei 10 kV mit 25 min Spannungsrampe  
45 min bei 15 kV mit 5 min Spannungsrampe

h) **Lagerung**

analog der Kapillarsäulen mit zwei gesinterten Fritten

i) **Kapillarsäule mit einer Fritte**

**Abbildung 5-4:** Schematische Darstellung der konsekutiven Schritte zur Herstellung einer Kapillarsäule mit nur einer gesinterten Fritte.

Eine Kapillarsäule mit nur einer Fritte besteht aus zwei Kapillarstücken, einem Gepackten (Trennsäule) und einem Offenen (zur UV-Detektion). Das gepackte Segment besitzt anstelle der Auslassfritte den oben beschriebenen Innenkonus. Die Herstellungsprozedur ist schematisch in Abbildung 5-4 dargestellt. Zuerst werden das glatt geschliffene Ende der Detektionskapillare und das ebenso glatte Kapillarende mit dem Innenkonus mit Hilfe eines XYZ-Manipulators ausgerichtet und aneinander gestoßen. (Abbildung 5-4b). Während der *Slurry*-Bereitung wird ein 5 mm langes Stück PTFE/FEP Dualschrumpfschlauch an der Stoßstelle positioniert und bei 330°C (mittels eines Heißluftföns) aufgeschrumpft. Bei diesen Bedingungen schmilzt der innere FEP-Schlauch und verbindet sich mit der Oberfläche, während sich der äußere PTFE-Schlauch über den aneinander gestoßenen Kapillarenden zusammenzieht. Nun wird die Kapillare wie in 5.4.1.1 beschrieben gepackt (vgl. Abbildung 5-4d) und mit einer gesinterten Einlassfritte versehen (vgl. Abbildung 5-4e). Zuletzt wird noch an der gewünschten Stelle das UV-Fenster angebracht (vgl. Abbildung 5-4f), bevor die Kapillarsäule (vgl. Abbildung 5-4i) zur direkten Verwendung konditioniert oder zur späteren Verwendung gelagert werden kann.

#### 5.4.1.3 Herstellung der frittenlosen Kapillarsäulen

Die frittenlosen Kapillarsäulen können entweder aus zwei (gepacktes Segment und Detektionskapillare (vgl. Abbildung 5-5h) oder drei Kapillarstücken (gepacktes Segment, Konussegment und Detektionssegment (vgl. Abbildung 5-5i)) zusammengesetzt sein. Diese Kapillarsäulen haben sowohl Einlass- als auch Auslasskonusse und benötigen somit keine Fritten oder Filter. Die Herstellungsprozedur der aus zwei Kapillarstücken bestehenden frittenlosen Kapillarsäulen (vgl. Abbildung 5-5a-g) ist analog zur Herstellungsprozedur der Kapillarsäulen mit nur einer Fritte (vgl. 5.4.1.2) mit dem Unterschied, dass diese Kapillarsäulen *slurry*-gepackt werden bevor die Segmente durch Dualschrumpfschläuche aneinander gekoppelt werden. Die Säule wird später umgekehrt zur Packrichtung betrieben, so dass die während des Packens als Rückhaltekonus benutzte Verjüngung dann als Einlasskonus fungiert. Auch die anzukoppelnde Detektionskapillare ist mit einem geeigneten Innenkonus versehen. Mit diesem zweiten Konus wird beim Ankoppeln des Detektionssegments an das gepackte Segment der Auslasskonus implementiert und somit die Packung zwischen den beiden Konussen fixiert.

- a) **Herstellung des Innenkonusses**  
(analog Abb. 5-4a)
- b) **Slurry-Herstellung**  
(analog Abb. 5-4c)
- c) **Packen der Kapillare**  
Das *Slurry* wird in die Kapillare gedrückt.  
Nachverdichten der Packung mit Druck und Ultraschall.  
Langsamer Druckabfall.  
Trocknen über Nacht
- d) **Totvolumenfreies Ankuppeln der Segmente**  
Die geschliffenen Enden werden exakt aufeinander ausgerichtet und aneinander gestoßen.  
Die duale PTFE/FEP-Verbindung wird aufgeschrumpft
- e) **UV-Fenster brennen**
- f) **Konditionierung**  
(analog Abb. 5-4g)
- g) **Storage**  
(analog Abb. 5-4h)
- h) **Zweiteilige Frittenlose Kapillarsäule**
- i) **Dreiteilige Frittenlose Kapillarsäule**
- 
- FS-Kapillare  
Innenkonus
- $\Delta P = 500 \text{ bar}$   
Slurry
- 60 min U-Schall  
 $\Delta P = 500 \text{ bar}$   
Aceton (resp. MeOH)
- Dual PTFE/FEP Schrumpfschlauch
- Innenkonus  
UV-Fenster
- 25 cm 2 cm 10 cm
- Innenkonus  
UV-Fenster
- 25 cm 1-2 cm 0,5-2 cm 10 cm

**Abbildung 5-5:** Schematische Darstellung der konsekutiven Schritte zur Herstellung einer Kapillarsäule ohne Fritten.

Die Herstellungsprozedur der dreiteiligen frittenlosen Kapillarsäulen ist im Grunde genommen die Gleiche. Jedoch werden die Funktionen des offenen Kapillarsegments (Auslass-Rückhalte-Konus und UV-Detektionsfenster) entkoppelt, indem es in zwei Segmente aufgeteilt wird. Dieses frittenlose dreiteilige Kapillarsäulendesign (ebenso wie das Kapillarsäulendesign mit nur einer Fritte) ermöglicht den einfachen Austausch des UV-Detektionssegments ohne die Qualität der Packung zu beeinflussen.

#### **5.4.1.4 Herstellung der Kapillarsäulen zur NMR-Kopplung**

Für die Herstellung von NMR-Kapillarsäulen wurden FS-Kapillaren mit 250 µm ID und 360 µm OD verwendet. Die Packungsprozedur und das Brennen von Eingangs- und Endfritte verliefen analog zur Herstellung von UV-Kapillaren. Da in diesem Fall jedoch kein Detektionsfenster notwendig ist, wurde die überschüssige Kapillare direkt vor der Eingangsfritte und nach der Endfritte entfernt.

#### **5.4.2 Vorbereitung der Eluenten**

Alle Eluenten wurden vor dem Einsatz frisch sterilfiltriert. Die reinen Eluenten wurden zuerst mit Helium entgast. Danach wurde im Ultraschallbad so lange Wasserstrahlvakuum angelegt, bis sich keine Luftblasen mehr bildeten. Nun wurden die Eluenten vorsichtig gemischt und unter Heliumatmosphäre aufbewahrt. Bei Verwendung eines Gradientenmischers (z.B. für cHPLC- und Gradienten-(p)CEC) wurden die entgasten Eluentenflaschen einzeln an die Anlage angeschlossen und unter Heliumatmosphäre gehalten.

## 5.5 Messbedingungen / Experimentelle Parameter

### 5.5.1 Kapillare Trennmethoden

#### Abbildung 3-15

Gerät:	P/ACE-System MDQ (Beckmann) im CEC-Modus.
Eluent:	80% ACN / 20% 5 mM Natriumtetraborat <sub>(aq)</sub> , pH=9.
Probe:	50 mM Thioharnstoff, 20 mM Methyl-, 25 mM Ethyl-, 30 mM Propyl-, 35 mM Butyl- und 40 mM Pentylbenzoat, gelöst in mobiler Phase.
Injektion:	3kV, 3s.
Trennungsspannung:	1-30 kV.
Säulentemperatur:	30 °C
UV-Detektion:	224 nm.
Stationäre Phase:	Grom-Sil ODS-0 AB, $d_p = 3 \mu\text{m}$ .
a) Säule:	Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte, 365 $\mu\text{m}$ OD. Gepacktes Segment 100 $\mu\text{m}$ ID, offenes Segment 75 $\mu\text{m}$ ID, Auslass-Konus 27,5 $\mu\text{m}$ ID. Effektive Länge 25 cm, Gesamtlänge 37 cm, Detektion 2,0 cm nach der Packung.
b) Säule:	Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte, 365 $\mu\text{m}$ OD. Gepacktes Segment 100 $\mu\text{m}$ ID, offenes Segment 50 $\mu\text{m}$ ID, Auslass-Konus 27,5 $\mu\text{m}$ ID. Effektive Länge 25 cm, Gesamtlänge 37 cm, Detektion 2,0 cm nach der Packung.
c) Säule:	Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte, 365 $\mu\text{m}$ OD. Gepacktes Segment 150 $\mu\text{m}$ ID, offenes Segment 75 $\mu\text{m}$ ID, Auslass-Konus 22 $\mu\text{m}$ ID. Effektive Länge 25 cm, Elektrodenabstand / Gesamtlänge 37 cm, Detektion 2,0 cm nach der Packung.

#### Abbildung 3-16

Gerät:	P/ACE-System MDQ (Beckmann).
Eluent:	80% ACN / 20% 5 mM Natriumtetraborat <sub>(aq)</sub> , pH=9.

- Probe: 50 mM Thioharnstoff, 20 mM Methyl-, 25 mM Ethyl-, 30 mM Propyl-, 35 mM Butyl- und 40 mM Pentylbenzoat, gelöst in mobiler Phase.
- Injektion: 3kV, 3s.
- Trennungsspannung: 1-30 kV.
- Säulentemperatur: 30 °C
- UV-Detektion: 224 nm.
- Stationäre Phase: Grom-Sil ODS-0 AB,  $d_p = 3 \mu\text{m}$ .
- a) Säule: Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte, 365  $\mu\text{m}$  OD. Gepacktes Segment 100 $\mu\text{m}$  ID, offenes Segment 50  $\mu\text{m}$  ID, Auslass-Konus 20  $\mu\text{m}$  ID. Effektive Länge 25 cm, Gesamtlänge 35,5 cm, Detektion 0,5 cm nach der Packung.
- b) Säule: Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte und *Bubble*-Zelle, 365  $\mu\text{m}$  OD. Gepacktes Segment 100 $\mu\text{m}$  ID, offenes Segment 30  $\mu\text{m}$  ID, kein Auslass-Konus. Effektive Länge 25 cm, Gesamtlänge 37,5 cm, Detektion 2,5 cm nach der Packung.
- c) Säule: Segmentierte Kapillarsäule ohne Fritte. Gepacktes Segment 100 $\mu\text{m}$  ID, offenes Segment 50  $\mu\text{m}$  ID, Auslass-Konus 26  $\mu\text{m}$  ID. Effektive Länge 25 cm, Elektrodenabstand / Gesamtlänge 37 cm, Detektion 2,0 cm nach der Packung.

### Abbildung 3-18

- Gerät: P/ACE-System MDQ (Beckmann).
- Eluent: 80% ACN / 20% 5 mM Natriumtetraborat<sub>(aq)</sub>, pH=9.
- Probe: 50 mM Thioharnstoff, 20 mM Methyl-, 25 mM Ethyl-, 30 mM Propyl-, 35 mM Butyl- und 40 mM Pentylbenzoat gelöst in mobiler Phase.
- Injektion: 3kV, 3s.
- Trennungsspannung: 22,5 kV.
- Säulentemperatur: 30 °C
- UV-Detektion: 224 nm.
- Stationäre Phase: Grom-Sil ODS-0 AB,  $d_p = 3 \mu\text{m}$ .
- Säule: Segmentierte Kapillarsäule ohne Fritte, 365  $\mu\text{m}$  OD. Gepacktes Segment 100 $\mu\text{m}$  ID, offenes Segment 50  $\mu\text{m}$  ID, Auslass-Konus

26  $\mu\text{m}$  ID. Effektive Länge 25 cm, Elektrodenabstand / Gesamtlänge 37 cm, Detektion 2,0 cm nach der Packung.

#### Abbildung 3-19 und Abbildung 3-20

Gerät: Modulare druckunterstützbare Gradienten-cHPLC/(p)-CEC - Anlage mit presplitt Injektion.

Eluent: 80% ACN / 20% 5 mM BisTris<sub>(aq)</sub>, pH=7,5.

Probe: 50 mM Thioharnstoff, 20 mM Methyl-, 25 mM Ethyl-, 30 mM Propyl-, 35 mM Butyl- und 40 mM Pentylbenzoat gelöst in mobiler Phase.

Injektion: 20kV, 3s.

Trennungsspannung: cHPLC: 0 kV / CEC: 2,5-30 kV / pCEC: 2,5-30 kV.

Trenndruck: cHPLC: 20-180 bar / CEC: 0 bar / pCEC: 30, 60, 80, 100 bar.

Säulentemperatur: Raumtemperatur.

UV-Detektion: 214 nm.

Stationäre Phase: Grom-Sil ODS-0 AB,  $d_p = 3 \mu\text{m}$ .

Säule: Einteilige Kapillarsäule mit zwei Fritten. 365  $\mu\text{m}$  OD, 100  $\mu\text{m}$  ID, effektive Länge 25 cm, Elektrodenabstand / Gesamtlänge 35 cm, Detektion 0,1 cm nach der Packung.

#### Abbildung 3-22

Gerät: Gradienten-HPLC-Anlage.

Eluent: A: ACN mit / B: 0,1% (v/v) TFA<sub>(aq)</sub>, pH=2.

Gradient: 0/0 – 3/0 – 15/40 – 25/45 – 35/100 [min / %B].

Probe: Vorfiltrierter ethanolischer Alkaloid-Extrakt (*extractum secalis cornuti*) des Mutterkorn Schimmelpilzes (*ergot fungus*).

Injektion: 500  $\mu\text{l}$ .

Flussrate: 1,0 ml/min.

Trenndruck: 80-100 bar.

Säulentemperatur: Raumtemperatur.

UV-Detektion: 220 nm.

Stationäre Phase: Nucleosil 100, C18,  $d_p = 5 \mu\text{m}$ .

Säule: Analytische HPLC-Säule, 250x4,6 mm (Grom)

Abbildung 3-23

Gerät:	Modulare druckunterstützbare splittlose Gradienten-cHPLC/(p)-CEC-Anlage im cHPLC-Modus.
Eluent:	A: ACN mit / B: 0,1% (v/v) TFA <sub>(aq)</sub> , pH=2.
Gradient:	0/1 – 5/30 – 20/30 – 50/40 – 60/80 – 61/99 [min / %B]
Probe:	Vorfiltrierter ethanolischer Alkaloid-Extrakt ( <i>extractum secalis cornuti</i> ) des Mutterkorn Schimmelpilzes ( <i>ergot fungus</i> ).
Injektion:	150 nl.
Flussrate:	2 µl/min.
Trenndruck:	120-200 bar.
Säulentemperatur:	Raumtemperatur.
UV-Detektion:	200 nm.
Stationäre Phase:	Grom-Sil ODS-0 AB, d <sub>p</sub> = 3 µm.
Säule:	Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (analog Abbildung 3-13c), 365 µm OD. Gepacktes Segment 250µm ID, offenes Segment 50 µm ID, Einlass-Konus 35 µm ID. Effektive Länge 25 cm, Gesamtlänge 40 cm, Detektion 10 cm nach der Packung.

Abbildung 3-24

Gerät:	P/ACE-System MDQ (Beckmann) im CE-Modus.
Eluent:	20 mM Zitronensäure <sub>(aq)</sub> , 15 mM NaCl <sub>(aq)</sub> , pH=2.
Probe:	Vorfiltrierter ethanolischer Alkaloid-Extrakt ( <i>extractum secalis cornuti</i> ) des Mutterkorn Schimmelpilzes ( <i>ergot fungus</i> ).
Injektion:	20kV, 10s.
Trennungsspannung:	20 kV.
Säulentemperatur:	30 °C
UV-Detektion:	200 nm.
CE-Kapillare:	Offene FS-Kapillare (Vorbehandlung: mit 1M HCl, 1M NaOH, H <sub>2</sub> O und Eluent jeweils 10 min gespült) 365 µm OD, 50µm ID, effektive Länge 62,5 cm, Elektrodenabstand / Gesamtlänge 70 cm.



Abbildung 3-25

Gerät:	Modulare druckunterstützbare splittlose Gradienten-cHPLC/(p)-CEC-Anlage in pCEC-Modus.
Eluent:	A: ACN mit / B: 0,1% (v/v) TFA <sub>(aq)</sub> , pH=2.
Gradient:	0/1 – 10/1 – 30/35 – 35/35 – 55/99 [min / %B].
Probe:	Vorfiltrierter ethanolischer Alkaloid-Extrakt ( <i>extractum secalis cornuti</i> ) des Mutterkorn Schimmelpilzes ( <i>ergot fungus</i> ).
Injektion:	150 nl.
Trennungsspannung:	0/-10 – 9/-10 – 9,01/+5 – 78/+5 [min / ±kV].
Strom:	bei +10 kV: 30 bis 180 µA, bei -5 kV: -35 bis 7 µA.
Flussrate:	2 µl/min.
Trenndruck:	60-100 bar
Säulentemperatur:	Raumtemperatur.
UV-Detektion:	220 nm.
Stationäre Phase:	Grom-Sil ODS-0 AB, d <sub>p</sub> = 3 µm.
Säule:	Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (analog Abbildung 3-13b), 365 µm OD. Gepacktes Segment 250µm ID, offenes Segment 50 µm ID, Auslass-Konus 34 µm ID. Effektive Länge 25 cm, Elektrodenabstand / Gesamtlänge 40 cm, Detektion 10 cm nach der Packung.

### 5.5.2 NMR-Kopplung

Abbildung 4-7

Gerät:	Modulare druckunterstützbare Gradienten-cHPLC/(p)-CEC - Anlage mit presplitt Injektion.
Eluent:	80% ACN / 20% 5 mM BisTris <sub>(aq)</sub> , pH=7,5.
Probe:	50 mM Thioharnstoff in Eluent gelöst.
Injektion:	10µl (gesplittet).
Trennungsspannung:	cHPLC: 0 kV / CEC: 20 kV / pCEC: 1,8 bzw. 20 kV.
Trenndruck:	cHPLC: 12 bzw. 40 bar / CEC: 0 bar / pCEC: 12 bzw. 40 bar.
Säulentemperatur:	Raumtemperatur.
UV-Detektion:	224 nm.
Stationäre Phase:	Grom-Sil ODS-0 AB, d <sub>p</sub> = 5 µm.

### Säule und

Transferkapillare: Einteilige Kapillarsäule mit zwei Fritten (analog Abbildung 3-13a) 365  $\mu\text{m}$  OD, 250 $\mu\text{m}$  ID. Offene Transferkapillare 75  $\mu\text{m}$  ID mit SS-Verbinder an Kapillarsäule gekoppelt (dient als Durchflusselektrode). Effektive Länge 20 cm, UV-Detektion 100 cm nach der Packung, Elektrodenabstand 20 cm bzw. 220 cm, Gesamtlänge 220 cm.

### Abbildung 4-8

Gerät: Modulare druckunterstützbare splittlose Gradienten-cHPLC/(p)-CEC-Anlage im cHPLC-Modus.

Eluent: 80% ACN- $d_3$  / 20% 5 mM Natriumtetraborat in  $\text{D}_2\text{O}$ , pH=9.

Probe: 50 mM Thioharnstoff in Eluent gelöst.

Injektion: 0,1  $\mu\text{l}$  ungesplittet.

Trennungsspannung: 20 kV.

Flussrate: 1,0  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Trenndruck: 0 bar.

UV-Detektion: 224 nm.

Säulentemperatur: Raumtemperatur.

Stationäre Phase: Grom-Sil ODS-0 AB,  $d_p = 5 \mu\text{m}$ .

### Säule und

Transferkapillare: Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (analog Abbildung 3-13c), 365  $\mu\text{m}$  OD. Gepacktes Segment 250 $\mu\text{m}$  ID, offenes Segment 50  $\mu\text{m}$  ID (& 3 cm lange 60  $\mu\text{m}$  ID SS-Kapillare als Durchflusselektrode), Einlass-Konus 35  $\mu\text{m}$  ID. Effektive Länge 20 cm, UV-Detektion 100 cm nach der Packung, Elektrodenabstand 20 cm, Gesamtlänge 220 cm.

### Abbildung 4-10a

Chromatographische Bedingungen:

Gerät: Modulare druckunterstützbare splittlose Gradienten-cHPLC/(p)-CEC-Anlage im cHPLC-Modus.

Eluent: 80% ACN- $d_3$  / 20% 5 mM Natriumtetraborat in  $\text{D}_2\text{O}$ , pH=9.

Probe: 50 mM Methyl-, 62,5 mM Ethyl-, 75 mM Propyl-, 87,5 mM Butyl- und 100 mM Pentylbenzoat gelöst in mobiler Phase.  
 Injektion: 10 s (ungesplittet)  $\zeta$  0,25  $\mu$ l  $\zeta$  12,5-25 nmol Benzoat.  
 Trennungsspannung: 0 kV.  
 Strom: 0  $\mu$ A.  
 Flussrate: 1,5  $\mu$ l/min.  
 Trenndruck: 70 bar.  
 Säulentemperatur: Raumtemperatur.  
 Stationäre Phase: Grom-Sil ODS-0 AB,  $d_p = 5 \mu$ m.  
 Säule und  
 Transferkapillare: Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (analog Abbildung 3-13b), 365  $\mu$ m OD. Gepacktes Segment 250 $\mu$ m ID, offenes Segment 50  $\mu$ m ID (& 3 cm lange 60  $\mu$ m ID SS-Kapillare), Auslass-Konus 35  $\mu$ m ID. Effektive Länge 20 cm, NMR-Detektion 100 cm nach der Packung, 750 nl Detektorzelle (ID 320  $\mu$ m analog Abbildung 4-4d), Gesamtlänge 220 cm.

#### NMR-Parameter:

NMR Experiment mit neuem Setup: 300  $T_1$ -Inkrementen mit je 24 Transienten mit 8K komplexen Datenpunkten und einer Spektrenbreite von 9615,38 Hz (d.h.: Gesamt-Relaxations-Delay: 1,23 s; Pseudo-Akquisitionszeit: 32 s/Spektrum; Pulswinkel: 60°). Die Daten wurden als 2D-Matrix verarbeitet und die Fourier-Transformation wurde nur in  $T_2$ -Richtung durchgeführt.

#### Abbildung 4-10b

##### Chromatographische Bedingungen:

Gerät: Modulare druckunterstützbare Gradienten-cHPLC/(p)-CEC - Anlage mit presplitt Injektion im cHPLC-Modus.  
 Eluent: 80% ACN- $d_3$  / 20% 20 mM Natriumtetraborat in  $D_2O$ , pH=9.  
 Probe: 100 mM Methyl-, 125 mM Ethyl-, 150 mM Propyl-, 175 mM Butyl- und 200 mM Pentylbenzoat gelöst in mobiler Phase.  
 Injektion: gesplittet  $\approx$  1  $\mu$ l  $\zeta$  100-200 nmol Benzoat.  
 Trennungsspannung: 0 kV.  
 Strom: 0  $\mu$ A.  
 Flussrate: unbestimmt

Trenndruck: 8 bar.  
Säulentemperatur: Raumtemperatur.  
Stationäre Phase: Grom-Sil ODS-0 AB,  $d_p = 5 \mu\text{m}$ .  
Säule und  
Transferkapillare: Einteilige Kapillarsäule mit zwei Fritten (analog Abbildung 3-13a) 365  $\mu\text{m}$  OD, 250  $\mu\text{m}$  ID. Offene Transferkapillare 60  $\mu\text{m}$  ID an Kapillarsäule gekoppelt. Effektive Länge 20 cm, NMR-Detektion 100 cm nach der Packung, 240 nl Detektorzelle (ID 190  $\mu\text{m}$  analog Abbildung 4-4b), Gesamtlänge 220 cm.

NMR-Parameter:

NMR Experiment mit altem Setup: 128 FIDs mit je 64 Transienten mit 8K komplexen Datenpunkten und einer Spektrenbreite von 6024 Hz (d.h.: Relaxations-Delay 0,8 s; Pseudo-Aquisitionszeit 1 min 34 s/Spektrum; Pulswinkel: 60°). Die Daten wurden als 2D-Matrix verarbeitet und die Fourier-Transformation wurde nur in  $F_2$ -Richtung durchgeführt.

#### Abbildung 4-11a

Chromatographische Bedingungen:

Gerät: Modulare druckunterstützbare splittlose Gradienten-cHPLC/(p)-CEC-Anlage im pCEC-Modus.  
Eluent: 80% ACN- $d_3$  / 20% 5 mM Natriumtetraborat in  $D_2O$ , pH=9.  
Probe: 50 mM Methyl-, 62,5 mM Ethyl-, 75 mM Propyl-, 87,5 mM Butyl- und 100 mM Pentylbenzoat gelöst in mobiler Phase.  
Injektion: 10 s (ungesplittet)  $\varphi$  0,17  $\mu\text{l}$   $\varphi$  8,3-16,6 nmol je Benzoat.  
Trennungsspannung: 10 kV.  
Flussrate: 1,0  $\mu\text{l}/\text{min}$ .  
Trenndruck: 230 psi (16 bar).  
Säulentemperatur: Raumtemperatur.  
Stationäre Phase: Grom-Sil ODS-0 AB,  $d_p = 5 \mu\text{m}$ .  
Säule und  
Transferkapillare: Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (analog Abbildung 3-13b), 365  $\mu\text{m}$  OD. Gepacktes Segment 250  $\mu\text{m}$  ID, offenes Segment 50  $\mu\text{m}$  ID (& 3 cm lange 60  $\mu\text{m}$  ID SS-Kapillare als Durchflusselektrode), Auslass-Konus 35  $\mu\text{m}$  ID. Effektive Länge

20 cm, NMR-Detektion 100 cm nach der Packung, 750 nl Detektorzelle (ID 320  $\mu\text{m}$  analog Abbildung 4-4d), Elektrodenabstand 20 cm, Gesamtlänge 220 cm.

**NMR-Parameter:**

NMR Experiment mit neuem Setup: 256  $T_1$ -Inkrementen mit je 24 Transienten mit 8K komplexen Datenpunkten und einer Spektrenbreite von 9615,38 Hz (d.h.: Gesamt-Relaxations-Delay: 1,23 s; Pseudo-Aquisitionszeit: 32 s/Spektrum; Pulswinkel: 60°). Die Daten wurden als 2D-Matrix verarbeitet und die Fourier-Transformation wurde nur in  $T_2$ -Richtung durchgeführt.

Abbildung 4-11b

**Chromatographische Bedingungen:**

**Gerät:** Modulare druckunterstützbare Gradienten- $\text{cHPLC}/(\text{p})\text{-CEC}$  - Anlage mit presplitt Injektion im pCEC-Modus.

**Eluent:** 80%  $\text{ACN-d}_3$  / 20% 20 mM Natriumtetraborat in  $\text{D}_2\text{O}$ , pH=9.

**Probe:** 100 mM Methyl-, 125 mM Ethyl-, 150 mM Propyl-, 175 mM Butyl- und 200 mM Pentylbenzoat gelöst in mobiler Phase.

**Injektion:** gesplittet  $\approx 1 \mu\text{l}$   $\zeta$  100-200 nmol Benzoat.

**Trennungsspannung:** 20 kV.

**Flussrate:** unbestimmt

**Trenndruck:** 8 bar.

**Säulentemperatur:** Raumtemperatur.

**Stationäre Phase:** Grom-Sil ODS-0 AB,  $d_p = 5 \mu\text{m}$ .

**Säule und**

**Transferkapillare:** Einteilige Kapillarsäule mit zwei Fritten (analog Abbildung 3-13a) 365  $\mu\text{m}$  OD, 250  $\mu\text{m}$  ID. Offene Transferkapillare 60  $\mu\text{m}$  ID an Kapillarsäule gekoppelt. Effektive Länge 20 cm, NMR-Detektion 100 cm nach der Packung, 240 nl Detektorzelle (ID 190  $\mu\text{m}$  analog Abbildung 4-4b), Elektrodenabstand 220cm, Gesamtlänge 220 cm.

**NMR-Parameter:**

NMR Experiment mit altem Setup: 64 FIDs mit je 64 Transienten mit 8K komplexen Datenpunkten und einer Spektrenbreite von 6024 Hz (d.h.: Relaxations-Delay: 0,8 s; Pseudo-Aquisitionszeit: 1 min 34 s/Spektrum; Pulswinkel: 60°). Die Daten wurden als

2D-Matrix verarbeitet und die Fourier-Transformation wurde nur in  $F_2$ -Richtung durchgeführt.

#### Abbildung 4-12

Chromatographische Bedingungen:

Gerät: Modulare druckunterstützbare splittlose Gradienten-cHPLC/(p)-CEC-Anlage im CEC-Modus.

Eluent: 80% ACN- $d_3$  / 20% 5 mM Natriumtetraborat in  $D_2O$ , pH=9.

Probe: 50 mM Methyl-, 62,5 mM Ethyl-, 75 mM Propyl-, 87,5 mM Butyl- und 100 mM Pentylbenzoat gelöst in mobiler Phase.

Injektion: 6,5 s (ungesplittet)  $\varphi$  0,17  $\mu$ l  $\varphi$  8,3-16,6 nmol je Benzoat.

Trennungsspannung: 30 kV.

Flussrate: 1,5  $\mu$ l/min.

Trenndruck: 0 bar.

Säulentemperatur: Raumtemperatur.

Stationäre Phase: Grom-Sil ODS-0 AB,  $d_p = 5 \mu$ m.

Säule und

Transferkapillare: Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (analog Abbildung 3-13b), 365  $\mu$ m OD. Gepacktes Segment 250 $\mu$ m ID, offenes Segment 50  $\mu$ m ID (& 3 cm lange 60  $\mu$ m ID SS-Kapillare als Durchflusselektrode), Auslass-Konus 35  $\mu$ m ID. Effektive Länge 20 cm, NMR-Detektion 100 cm nach der Packung, 750 nl Detektorzelle (ID 320  $\mu$ m analog Abbildung 4-4d), Elektrodenabstand 20 cm, Gesamtlänge 220 cm.

NMR-Parameter:

NMR Experiment mit neuem Setup: 300  $T_1$ -Inkrementen mit je 12 Transienten mit 8K komplexen Datenpunkten und einer Spektrenbreite von 9615,38 Hz (d.h.: Gesamt-Relaxations-Delay: 1,26 s; Pseudo-Aquisitionszeit: 16,2 s/Spektrum; Pulswinkel: 60°). Die Daten wurden als 2D-Matrix verarbeitet und die Fourier-Transformation wurde nur in  $T_2$ -Richtung durchgeführt.

#### Abbildung 4-14

Gerät: Modulare druckunterstützbare Gradienten-cHPLC/(p)-CEC - Anlage mit postsplitt Injektion in reinen CEC-Modus.

Eluent:	95% ACN / 5% 20 mM BisTris <sub>(aq)</sub> , pH=7,5.
Probe:	Methylester der Palmitolein-, Öl-, Eicosen- und Erucasäure in mobiler Phase gelöst.
Injektion:	10kV, 10 s (gesplittet).
Trennungsspannung:	20 kV.
Trenndruck:	0 bar.
Säulentemperatur:	Raumtemperatur.
UV-Detektion:	210 nm.
Stationäre Phase:	Grom-Sil ODS-0 AB, $d_p = 3 \mu\text{m}$ .
Säule und	
Transferkapillare:	Einteilige Kapillarsäule mit zwei Fritten (analog Abbildung 3-13a) 365 $\mu\text{m}$ OD, 100 $\mu\text{m}$ ID. Effektive Länge 25 cm, UV-Detektion 0,1 cm nach der Packung, Elektrodenabstand/Gesamtlänge 35 cm.

#### Abbildung 4-15a

##### Chromatographische Bedingungen:

Gerät:	Modulare druckunterstützbare Gradienten-cHPLC/(p)-CEC - Anlage mit presplitt Injektion im cHPLC-Modus.
Eluent:	95% ACN-d <sub>3</sub> / 5% 10 mM NH <sub>4</sub> OAc in D <sub>2</sub> O, pH=6,7.
Probe:	50%-ige Lösung (v/v) der Methylester der Palmitolein-, Öl-, Eicosen- und Erucasäure in mobiler Phase.
Injektion:	10s, 100bar, gesplittet $\approx 0,83 \mu\text{l}$ $\zeta$ 84 $\mu\text{g}$ je Fettsäureester.
Trennungsspannung:	0 kV.
Flussrate:	$\approx 2 \mu\text{l}/\text{min}$ .
Trenndruck:	45 bar.
Säulentemperatur:	Raumtemperatur.
Stationäre Phase:	Grom-Sil ODS-0 AB, $d_p = 5 \mu\text{m}$ .
Säule und	
Transferkapillare:	Einteilige Kapillarsäule mit zwei Fritten (analog Abbildung 3-13a) 365 $\mu\text{m}$ OD, 250 $\mu\text{m}$ ID. Offene Transferkapillare 75 $\mu\text{m}$ ID mit SS-Verbinder an Kapillarsäule gekoppelt. Effektive Länge 20 cm, NMR-Detektion 100 cm nach der Packung, 400 nl Detektorzelle (ID 250 $\mu\text{m}$ analog Abbildung 4-4c), Gesamtlänge 220 cm.

## NMR-Parameter:

NMR Experiment mit neuem Setup: 160 FIDs mit je 32 Transienten mit 8K komplexen Datenpunkten und einer Spektrenbreite von 9260 Hz (d.h.: Relaxations-Delay: 1,0 s; Aquisitionszeit: 0,442 s; Pseudo-Aquisitionszeit: 48 s/Spektrum; Pulswinkel: 30°). Die Daten wurden als 2D-Matrix verarbeitet und die Fourier-Transformation wurde nur in  $F_2$ -Richtung durchgeführt.

Abbildung 4-15b

## Chromatographische Bedingungen:

Gerät:	Modulare druckunterstützbare splittlose Gradienten-cHPLC/(p)-CEC-Anlage im cHPLC-Modus.
Eluent:	95% ACN- $d_3$ / 20% D <sub>2</sub> O, pH=6,6.
Probe:	10%-ige Lösung (v/v) der Methylester der Palmitolein-, Öl-, Eicosen- und Erucasäure in mobiler Phase.
Injektion:	15 s (ungesplittet) $\varphi$ 0,5 $\mu$ l $\varphi$ 10 $\mu$ g je Fettsäureester.
Trennungsspannung:	0 kV.
Flussrate:	2,0 $\mu$ l/min.
Trenndruck:	540 psi / 40 bar.
Säulentemperatur:	Raumtemperatur.
Stationäre Phase:	Grom-Sil ODS-0 AB, $d_p = 5 \mu$ m.
Säule und	
Transferkapillare:	Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (analog Abbildung 3-13c), 365 $\mu$ m OD. Gepacktes Segment 250 $\mu$ m ID, offenes Segment 50 $\mu$ m ID (& 3 cm lange 60 $\mu$ m ID SS-Kapillare), Einlass-Konus 33 $\mu$ m ID. Effektive Länge 20 cm, NMR-Detektion 100 cm nach der Packung, 750 nl Detektorzelle (ID 320 $\mu$ m analog Abbildung 4-4d), Gesamtlänge 220 cm.

## NMR-Parameter:

NMR Experiment mit neuem Setup: 300  $T_1$ -Inkrementen mit je 32 Transienten mit 8K komplexen Datenpunkten und einer Spektrenbreite von 9259,26 Hz (d.h.: Gesamt-Relaxations-Delay: 1,44 s; Pseudo-Aquisitionszeit: 48 s/Spektrum; Pulswinkel: 30°). Die Daten wurden als 2D-Matrix verarbeitet und die Fourier-Transformation wurde nur in  $T_2$ -Richtung durchgeführt.



Abbildung 4-16

Chromatographische Bedingungen:

Gerät:	Modulare druckunterstützbare splittlose Gradienten-cHPLC/(p)-CEC-Anlage im reinen CEC-Modus.
Eluent:	95% ACN-d <sub>3</sub> / 20% D <sub>2</sub> O, pH=6,6.
Probe:	10%-ige Lösung (v/v) der Methylester der Palmitolein-, Öl-, Eicosen- und Erucasäure in mobiler Phase.
Injektion:	15 s (ungesplittet) $\varphi$ 0,5 $\mu$ l $\varphi$ 10 $\mu$ g je Fettsäureester.
Trennungsspannung:	17 kV.
Strom:	1,5 $\mu$ A.
Flussrate:	2,0 $\mu$ l/min.
Systemdruck:	30 psi / 2,1 bar.
Säulentemperatur:	Raumtemperatur.
Stationäre Phase:	Grom-Sil ODS-0 AB, d <sub>p</sub> = 5 $\mu$ m.

Säule und

Transferkapillare: Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (analog Abbildung 3-13c), 365  $\mu$ m OD. Gepacktes Segment 250 $\mu$ m ID, offenes Segment 50  $\mu$ m ID (& 3 cm lange 60  $\mu$ m ID SS-Kapillare als Durchflusselektrode), Einlass-Konus 33  $\mu$ m ID. Effektive Länge 20 cm, NMR-Detektion 100 cm nach der Packung, 750 nl Detektorzelle (ID 320  $\mu$ m analog Abbildung 4-4d), Elektrodenabstand 20cm, Gesamtlänge 220 cm.

NMR-Parameter:

NMR Experiment mit neuem Setup: 300 T<sub>1</sub>-Inkrementen mit je 32 Transienten mit 8K komplexen Datenpunkten und einer Spektrenbreite von 9259,26 Hz (d.h.: Gesamt-Relaxations-Delay: 1,44 s; Pseudo-Aquisitionzeit: 48 s/Spektrum; Pulswinkel: 30°). Die Daten wurden als 2D-Matrix verarbeitet und die Fourier-Transformation wurde nur in T<sub>2</sub>-Richtung durchgeführt.

Abbildung 4-17a

Chromatographische Bedingungen:

Gerät:	Modulare druckunterstützbare Gradienten-cHPLC/(p)-CEC-Anlage mit presplitt Injektion im pCEC-Modus.
Eluent:	95% ACN-d <sub>3</sub> / 5% 10 mM NH <sub>4</sub> OAc in D <sub>2</sub> O, pH=6,7.

Probe: 50%-ige Lösung (v/v) der Methylester der Palmitolein-, Öl-, Eicosen- und Erucasäure in mobiler Phase.  
 Injektion: 10s, 100bar, gesplittet  $\approx 0,83 \mu\text{l}$   $\zeta$  84  $\mu\text{g}$  je Fettsäureester.  
 Trennungsspannung: 20 kV.  
 Strom: 1,5  $\mu\text{A}$ .  
 Flussrate:  $\approx 4 \mu\text{l}/\text{min}$ .  
 Trenndruck: 45 bar.  
 Säulentemperatur: Raumtemperatur.  
 Stationäre Phase: Grom-Sil ODS-2 AB,  $d_p = 5 \mu\text{m}$ .  
 Säule und  
 Transferkapillare: Einteilige Kapillarsäule mit zwei Fritten (analog Abbildung 3-13a) 365  $\mu\text{m}$  OD, 250 $\mu\text{m}$  ID. Offene Transferkapillare 75  $\mu\text{m}$  ID mit SS-Verbinder an Kapillarsäule gekoppelt (dient als Durchflusselektrode). Effektive Länge 20 cm, NMR-Detektion 100 cm nach der Packung, 400 nl Detektorzelle (ID 250  $\mu\text{m}$  analog Abbildung 4-4c), Elektrodenabstand 20cm, Gesamtlänge 220 cm.

#### NMR-Parameter:

NMR Experiment mit neuem Setup: 160 FIDs mit je 32 Transienten mit 8K komplexen Datenpunkten und einer Spektrenbreite von 9260 Hz (d.h.: Relaxations-Delay: 1,0 s; Aquisitionszeit: 0,442 s; Pseudo-Aquisitionszeit: 48 s/Spektrum; Pulswinkel: 30°). Die Daten wurden als 2D-Matrix verarbeitet und die Fourier-Transformation wurde nur in  $F_2$ -Richtung durchgeführt.

#### Abbildung 4-17b

##### Chromatographische Bedingungen:

Gerät: Modulare druckunterstützbare splittlose Gradienten-chPLC/(p)-CEC-Anlage im pCEC-Modus.  
 Eluent: 95% ACN- $d_3$  / 20% D<sub>2</sub>O, pH=6,6.  
 Probe: 10%-ige Lösung (v/v) der Methylester der Palmitolein-, Öl-, Eicosen- und Erucasäure in mobiler Phase.  
 Injektion: 7,5 s (ungesplittet)  $\zeta$  0,5  $\mu\text{l}$   $\zeta$  10  $\mu\text{g}$  je Fettsäureester.  
 Trennungsspannung: 17 kV.  
 Strom: 1,5  $\mu\text{A}$ .

Flussrate: 4,0 µl/min.  
Trenndruck: 550 psi / 41 bar.  
Säulentemperatur: Raumtemperatur.  
Stationäre Phase: Grom-Sil ODS-0 AB,  $d_p = 5 \mu\text{m}$ .  
Säule und  
Transferkapillare: Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (analog Abbildung 3-13c), 365 µm OD. Gepacktes Segment 250µm ID, offenes Segment 50 µm ID (& 3 cm lange 60 µm ID SS-Kapillare als Durchflusselektrode), Einlass-Konus 33 µm ID. Effektive Länge 20 cm, NMR-Detektion 100 cm nach der Packung, 750 nl Detektorzelle (ID 320 µm analog Abbildung 4-4d), Elektrodenabstand 20cm, Gesamtlänge 220 cm.

#### NMR-Parameter:

NMR Experiment mit neuem Setup: 300  $T_1$ -Inkrementen mit je 32 Transienten mit 8K komplexen Datenpunkten und einer Spektrenbreite von 9259,26 Hz (d.h.: Gesamt-Relaxations-Delay: 1,44 s; Pseudo-Aquisitionszeit: 48 s/Spektrum; Pulswinkel: 30°). Die Daten wurden als 2D-Matrix verarbeitet und die Fourier-Transformation wurde nur in  $T_2$ -Richtung durchgeführt.

#### Abbildung 4-18

##### Chromatographische Bedingungen:

Gerät: Modulare druckunterstützbare splittlose Gradienten-cHPLC/(p)-CEC-Anlage im pCEC-Modus.  
Eluent: 95% ACN- $d_3$  / 20%  $D_2O$ , pH=6,6.  
Probe: 10%-ige Lösung (v/v) der Methyl ester der Palmitolein-, Öl-, Eicosen- und Erucasäure in mobiler Phase.  
Injektion: 5 s (ungesplittet)  $\varphi$  0,5 µl  $\varphi$  10 µg je Fettsäureester.  
Trennungsspannung: 25,5 kV.  
Strom: 3,0 µA.  
Flussrate: 6,0 µl/min.  
Trenndruck: 840 psi / 62 bar.  
Säulentemperatur: Raumtemperatur.  
Stationäre Phase: Grom-Sil ODS-0 AB,  $d_p = 5 \mu\text{m}$ .

Säule und

Transferkapillare: Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (analog Abbildung 3-13c), 365  $\mu\text{m}$  OD. Gepacktes Segment 250 $\mu\text{m}$  ID, offenes Segment 50  $\mu\text{m}$  ID (& 3 cm lange 60  $\mu\text{m}$  ID SS-Kapillare als Durchflusselektrode), Einlass-Konus 33  $\mu\text{m}$  ID. Effektive Länge 20 cm, NMR-Detektion 100 cm nach der Packung, 750 nl Detektorzelle (ID 320  $\mu\text{m}$  analog Abbildung 4-4d), Elektrodenabstand 20cm, Gesamtlänge 220 cm.

NMR-Parameter:

NMR Experiment mit neuem Setup: 300  $T_1$ -Inkrementen mit je 32 Transienten mit 8K komplexen Datenpunkten und einer Spektrenbreite von 9259,26 Hz (d.h.: Gesamt-Relaxations-Delay: 1,44 s; Pseudo-Aquisitionszeit: 48 s/Spektrum; Pulswinkel: 30°). Die Daten wurden als 2D-Matrix verarbeitet und die Fourier-Transformation wurde nur in  $T_2$ -Richtung durchgeführt.

#### Abbildung 4-19

*Stopped-flow* COSY:  $F_1$ -Dimension: 240  $T_1$ -Inkrementen mit je 32 Transienten und einem spektralen Bereich von 4807 Hz.  $F_2$ -Dimension: 2K komplexe Datenpunkte in einem spektralen Bereich von 4807 Hz. Vor der Fourier Transformation wurde in beiden Dimensionen eine Apodisierung mit einer verschobenen Sinus-Filterfunktion (SSB=0) durchgeführt und ein *Zerofilling* auf 512 Datenpunkte in der  $F_1$ -Dimension angewendet. Die Gesamtaquisitionsdauer war 4 h.

#### Abbildung 4-20

*Stopped-flow* TOCSY:  $F_1$ -Dimension: 256  $T_1$ -Inkrementen mit je 144 Transienten; Spektraler Bereich: 4716 Hz.  $F_2$ -Dimension: 4K komplexe Datenpunkte; Spektraler Bereich: 4716 Hz. Vor der Fourier Transformation wurde in  $F_1$  ein *Zerofilling* auf 2 K Datenpunkte mit einem *Linebroadening* um 3 Hz in beiden Dimensionen durchgeführt.

#### Abbildung 4-21

*Stopped-flow*  $^1\text{H}$ : 128 Transienten mit 32K komplexen Datenpunkten und einer Spektrenbreite von 9259,26 Hz (d.h.: Gesamt-Relaxations-Delay: 1,44 s; Pseudo-Aquisitionszeit: 48 s/Spektrum; Pulswinkel: 30°). Die Fourier-Transformation wurde

mit einem *Linebroadening* um 1 Hz durchgeführt. Die Gesamtaquisitionsdauer war 102 min pro Fettsäuremethylester.

#### Abbildung 4-22 bis Abbildung 4-26

Chromatographische Bedingungen:

Gerät:	Modulare druckunterstützbare splittlose Gradienten-cHPLC/(p)-CEC-Anlage im cHPLC-Modus.
Eluent:	80% ACN-d <sub>3</sub> / 20% 5 mM Natriumtetraborat in D <sub>2</sub> O, pH=9.
Probe:	50 mM Thioharnstoff, 20 mM Methyl-, 25 mM Ethyl-, 30 mM Propyl-, 35 mM Butyl- und 40 mM Pentylbenzoat gelöst in mobiler Phase.
Injektion:	10 s (ungesplittet) $\varphi$ 0,25 $\mu$ l $\varphi$ 5-10 nmol je Benzoat.
Flussrate:	1,5 $\mu$ l/min.
Trenndruck:	35 bar.
UV-Detektion:	224 nm.
Säulentemperatur:	Raumtemperatur.
Stationäre Phase:	Grom-Sil ODS-0 AB, d <sub>p</sub> = 5 $\mu$ m.
Säule und Transferkapillare:	Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (analog Abbildung 3-13c), 365 $\mu$ m OD. Gepacktes Segment 250 $\mu$ m ID, offenes Segment 50 $\mu$ m ID (& 3 cm lange 60 $\mu$ m ID SS-Kapillare), Einlass-Konus 36 $\mu$ m ID. Effektive Länge 20 cm, UV-Detektion 100 cm nach der Packung, Gesamtlänge 220 cm.

#### Abbildung 4-27

Chromatographische Bedingungen:

Gerät:	Modulare druckunterstützbare splittlose Gradienten-cHPLC/(p)-CEC-Anlage im cHPLC-Modus.
Eluent:	70% ACN-d <sub>3</sub> / 20% D <sub>2</sub> O, pH=6,6.
Probe:	D-(+)-Xylose, D-(+)-Maltose und D-(+)-Raffinose jeweils 375 mM gelöst in mobiler Phase.
Injektion:	24 s (ungesplittet) $\varphi$ 400 nl $\varphi$ 150 nmol je Zucker.
Flussrate:	1,0 $\mu$ l/min.
Trenndruck:	50 bar.

Säulentemperatur: Raumtemperatur.

Stationäre Phase: Grom-Sil N1,  $d_p = 5 \mu\text{m}$ .

Säule und

Transferkapillare: Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (analog Abbildung 3-13b),  $365 \mu\text{m}$  OD. Gepacktes Segment  $250 \mu\text{m}$  ID, offenes Segment  $50 \mu\text{m}$  ID (& 3 cm lange  $60 \mu\text{m}$  ID SS-Kapillare), Auslass-Konus  $30 \mu\text{m}$  ID. Effektive Länge 25 cm, NMR-Detektion 100 cm nach der Packung, 750 nl Detektorzelle (ID  $320 \mu\text{m}$  analog Abbildung 4-4d), Gesamtlänge 220 cm.

NMR-Parameter:

NMR Experiment mit neuem Setup: 64  $T_1$ -Inkrementen mit je 64 Transienten mit 8K komplexen Datenpunkten und einer Spektrenbreite von 8474,58 Hz (d.h.: Gesamt-Relaxations-Delay: 2,4 s; Pseudo-Aquisitionszeit: 162 s/Spektrum; Pulswinkel:  $30^\circ$ ). Die Daten wurden als 2D-Matrix verarbeitet und die Fourier-Transformation wurde nur in  $T_2$ -Richtung durchgeführt.

#### Abbildung 4-28

Chromatographische Bedingungen:

Gerät: Modulare druckunterstützbare splittlose Gradienten-cHPLC/(p)-CEC-Anlage im cHPLC-Modus.

Eluent: 70% ACN- $d_3$  / 20%  $D_2O$ , pH=6,6.

Probe: D-(+)-Xylose, D-(+)-Maltose und D-(+)-Raffinose jeweils 375 mM gelöst in mobiler Phase.

Injektion: 12 s (ungesplittet)  $\varphi$  400 nl  $\varphi$  150 nmol je Zucker.

Flussrate: 2,0  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Trenndruck: 100 bar.

Säulentemperatur: Raumtemperatur.

Stationäre Phase: Grom-Sil N1,  $d_p = 5 \mu\text{m}$ .

Säule und

Transferkapillare: Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (analog Abbildung 3-13b),  $365 \mu\text{m}$  OD. Gepacktes Segment  $250 \mu\text{m}$  ID, offenes Segment  $50 \mu\text{m}$  ID (& 3 cm lange  $60 \mu\text{m}$  ID SS-Kapillare), Auslass-Konus  $30 \mu\text{m}$  ID. Effektive Länge 25 cm, NMR-Detektion

100 cm nach der Packung, 750 nl Detektorzelle (ID 320  $\mu\text{m}$  analog Abbildung 4-4d), Gesamtlänge 220 cm.

NMR-Parameter:

NMR Experiment mit neuem Setup: 64  $T_1$  –Inkrementen mit je 16 Transienten mit 8K komplexen Datenpunkten und einer Spektrenbreite von 8474,58 Hz (d.h.: Gesamt-Relaxations-Delay: 2,4 s; Pseudo-Aquisitionszeit: 41 s/Spektrum; Pulswinkel: 30°). Die Daten wurden als 2D-Matrix verarbeitet und die Fourier-Transformation wurde nur in  $T_2$ -Richtung durchgeführt.

#### Abbildung 4-29

Chromatographische Bedingungen:

Gerät: Modulare druckunterstützbare splittlose Gradienten-cHPLC/(p)-CEC-Anlage im cHPLC-Modus.

Eluent: 70% ACN- $d_3$  / 20%  $D_2O$ , pH=6,6.

Probe: D-(+)-Xylose, D-(+)-Maltose und D-(+)-Raffinose jeweils 187,5 mM gelöst in mobiler Phase.

Injektion: 24 s (ungesplittet)  $\epsilon$  400 nl  $\epsilon$  75 nmol je Zucker.

Flussrate: 1,0  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Trenndruck: 50 bar.

Säulentemperatur: Raumtemperatur.

Stationäre Phase: Grom-Sil N1,  $d_p = 5 \mu\text{m}$ .

Säule und

Transferkapillare: Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (analog Abbildung 3-13b), 365  $\mu\text{m}$  OD. Gepacktes Segment 250 $\mu\text{m}$  ID, offenes Segment 50  $\mu\text{m}$  ID (& 3 cm lange 60  $\mu\text{m}$  ID SS-Kapillare), Auslass-Konus 30  $\mu\text{m}$  ID. Effektive Länge 25 cm, NMR-Detektion 100 cm nach der Packung, 750 nl Detektorzelle (ID 320  $\mu\text{m}$  analog Abbildung 4-4d), Gesamtlänge 220 cm.

NMR-Parameter:

NMR Experiment mit neuem Setup: 64  $T_1$  –Inkrementen mit je 64 Transienten mit 8K komplexen Datenpunkten und einer Spektrenbreite von 8474,58 Hz (d.h.: Gesamt-Relaxations-Delay: 2,4 s; Pseudo-Aquisitionszeit: 162 s/Spektrum; Pulswinkel: 30°). Die Daten wurden als 2D-Matrix verarbeitet und die Fourier-Transformation wurde nur in  $T_2$ -Richtung durchgeführt.

Abbildung 4-30

*Stopped-flow*  $^1H$ : über 10 Transienten mit 32K komplexen Datenpunkten und einer Spektrenbreite von 8474,58 Hz (d.h.: Gesamt-Relaxations-Delay: 1,44 s; Pseudo-Aquisitionszeit: 48 s/Spektrum; Pulswinkel: 30°). Die Fourier-Transformation wurde mit einem *Linebroadening* um 1 Hz durchgeführt. Die Gesamtaquisitionsdauer war 8 min pro Fettsäuremethylester.

Abbildung 4-31

*Stopped-flow* COSY:  $F_1$ -Dimension: 96  $T_1$ -Inkrementen mit je 32 Transienten und einem spektralen Bereich von 4807 Hz.  $F_2$ -Dimension: 2K komplexe Datenpunkte in einem spektralen Bereich von 4807 Hz. Vor der Fourier Transformation wurde in beiden Dimensionen eine Apodisierung mit einer verschobenen Sinus-Filterfunktion (SSB=0) durchgeführt und ein *Zerofilling* auf 512 Datenpunkte in der  $F_1$ -Dimension angewendet. Die Gesamtaquisitionsdauer war 96 min.

Abbildung 4-33

Chromatographische Bedingungen:

Gerät:	Modulare druckunterstützbare splittlose Gradienten-CHPLC/(p)-CEC-Anlage im cHPLC-Modus.
Eluent:	50% Methanol- $d_4$ / 50% $D_2O$ , pH=6,6.
Probe:	28,5 mM D/L-Hexobarbital (d.h. 14,25 mM pro Enantiomer) und 29,5 mM D/L-Mephobarbital (d.h. 14,75 mM pro Enantiomer) gelöst in mobiler Phase.
Injektion:	1min (ungesplittet) $\epsilon$ 200 nl $\epsilon$ 2,85 nmol bzw. 2,95 nmol je Enantiomer.
Flussrate:	0,2 $\mu$ l/min.
Trenndruck:	28 bar.
Säulentemperatur:	Raumtemperatur.
Stationäre Phase:	Chira-Dex-Silica, $d_p = 5 \mu$ m (hergestellt von Dr. D. Wistuba analog [234,235]).
Säule und Transferkapillare:	Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (analog Abbildung 3-13c), 365 $\mu$ m OD. Gepacktes Segment 250 $\mu$ m ID, offenes Segment 50 $\mu$ m ID (& 3 cm lange 60 $\mu$ m ID SS-Kapillare),



Einlass-Konus 30  $\mu\text{m}$  ID. Effektive Länge 25 cm, NMR-Detektion 100 cm nach der Packung, 750 nl Detektorzelle (ID 320  $\mu\text{m}$  analog Abbildung 4-4d), Gesamtlänge 220 cm.

NMR-Parameter:

NMR Experiment mit neuem Setup: 128  $T_1$ -Inkrementen mit je 96 Transienten mit 4K komplexen Datenpunkten und einer Spektrenbreite von 8474,58 Hz (d.h.: Gesamt-Relaxations-Delay: 2,0 s; Pseudo-Aquisitionszeit: 3,2 min/Spektrum; Pulswinkel: 30°). Die Daten wurden als 2D-Matrix verarbeitet und die Fourier-Transformation wurde nur in  $T_2$ -Richtung durchgeführt.

#### Abbildung 4-34

*Stopped-flow*  $^1\text{H}$ : 512 Transienten mit 32K komplexen Datenpunkten und einer Spektrenbreite von 7143 Hz (d.h.: d.h.: Aquisitionszeit: 14,1 s/Transient; Pulswinkel: 90°). Die Fourier-Transformation wurde mit einem *Linebroadening* um 1 Hz durchgeführt. Die Gesamtaquisitionsdauer war 2h pro Enantiomer.

#### Abbildung 4-35

Chromatographische Bedingungen:

Gerät: Modulare druckunterstützbare splittlose Gradienten-cHPLC/(p)-CEC-Anlage im cHPLC-Modus.

Eluent: 40% ACN- $d_3$  / 60%  $\text{D}_2\text{O}$ , pH=6,6.

Probe: Methanolischer *palebmbus ozularis* Drüsen-Extrakt

Injektion: 1,5min (ungesplittet)  $\varphi$  750 nl.

Flussrate: 0,5  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Trenndruck: 35 bar.

Säulentemperatur: Raumtemperatur.

Stationäre Phase: Grom-Sil ODS-0 AB,  $d_p = 5 \mu\text{m}$ .

Säule und Transferkapillare: Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (analog Abbildung 3-13c), 365  $\mu\text{m}$  OD. Gepacktes Segment 250 $\mu\text{m}$  ID, offenes Segment 50  $\mu\text{m}$  ID (& 3 cm lange 60  $\mu\text{m}$  ID SS-Kapillare), Einlass-Konus 30  $\mu\text{m}$  ID. Effektive Länge 25 cm, NMR-Detektion 100 cm nach der Packung, 750 nl Detektorzelle (ID 320  $\mu\text{m}$  analog Abbildung 4-4d), Gesamtlänge 220 cm.

NMR-Parameter:

NMR Experiment mit neuem Setup: 128  $T_1$ -Inkrementen mit je 64 Transienten mit 8K komplexen Datenpunkten und einer Spektrenbreite von 9616 Hz (d.h.: Gesamt-Relaxations-Delay: 1,2 s; Pseudo-Aquisitionszeit: 87 s/Spektrum; Pulswinkel: 90°). Die Daten wurden als 2D-Matrix verarbeitet und die Fourier-Transformation wurde nur in  $T_2$ -Richtung durchgeführt.

#### Abbildung 4-36

*Stopped-flow*  $^1H$ : Komponente 1: 258 Transienten mit 32K komplexen Datenpunkten und einer Spektrenbreite von 7143 Hz (d.h.: Aquisitionszeit: 2,9 s/Transient; Pulswinkel: 90°), Gesamtaquisitionsdauer 26 min. Komponente 2: 512 Transienten mit 32K komplexen Datenpunkten und einer Spektrenbreite von 48087 Hz (d.h.: Aquisitionszeit: 3,4 s/Transient; Pulswinkel: 90°), Gesamtaquisitionsdauer 42 min. Die Fourier-Transformation wurde mit einem *Linebroadening* um 1 Hz durchgeführt.

#### Abbildung 4-37

a) *Stopped-flow* TOCSY von 2-Ethyl-Benzochinon-1,4:  $F_1$ -Dimension: 223  $T_1$ -Inkrementen mit je 16 Transienten; Spektraler Bereich: 7143 Hz.  $F_2$ -Dimension: 1K komplexe Datenpunkte; Spektraler Bereich: 7143 Hz. Die Gesamtaquisitionsdauer war 3h 47min. Die Fourier-Transformation wurde in  $F_1$  ein *Zerofilling* auf 512 Datenpunkte mit einem *Linebroadening* um 3 Hz in beiden Dimensionen durchgeführt.

b) *Stopped-flow* TOCSY von 2-Ethyl-3-Methoxy-Benzochinon-1,4:  $F_1$ -Dimension: 512  $T_1$ -Inkrementen mit je 64 Transienten; Spektraler Bereich: 4808 Hz.  $F_2$ -Dimension: 1K komplexe Datenpunkte; Spektraler Bereich: 4808 Hz. Die Gesamtaquisitionsdauer war 15h 29min. Die Fourier-Transformation wurde in  $F_1$  ein *Zerofilling* auf 1K Datenpunkte mit einem *Linebroadening* um 3 Hz in beiden Dimensionen durchgeführt.

#### Abbildung 4-39

Chromatographische Bedingungen:

Gerät: Modulare druckunterstützbare splittlose Gradienten-*chPLC*/(p)-CEC-Anlage im *chPLC*-Modus.

Eluent: A: 0,1% (v/v) TFA<sub>(aq)</sub>, pH=2 / B: ACN mit 0,1% (v/v) TFA.

Gradient:	0/3 – 3/3 – 50/60 [min / %B]
Probe:	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Extrakt.
Injektion:	10 s (ungesplittet) $\varphi$ 250 nl.
Flussrate:	1,5 $\mu$ l/min.
Trenndruck:	105 -70 bar.
Säulentemperatur:	Raumtemperatur.
UV-Detektion:	280 nm (UV-Detektionseinheit im NMR-Kapillarprobenkopf integriert).
Stationäre Phase:	Grom-Sil ODS-4 HE, $d_p = 5 \mu$ m.
Säule:	Segmentierte Kapillarsäule mit nur einer Fritte (analog Abbildung 3-13c), 365 $\mu$ m OD. Gepacktes Segment 250 $\mu$ m ID, offenes Segment 50 $\mu$ m ID, Einlass-Konus 31 $\mu$ m ID. Effektive Länge 25 cm, UV-Detektion 93 cm nach der Packung (ID 50 $\mu$ m analog Abbildung 4-38), NMR-Detektion 100 cm nach der Packung, 400 nl Detektorzelle (ID 250 $\mu$ m analog Abbildung 4-4c), Gesamtlänge 220 cm.

#### Abbildung 4-40

*Stopped-flow* COSY:  $F_1$ -Dimension: 440  $T_1$ -Inkrementen mit je 8 Transienten und einem spektralen Bereich von 12019 Hz.  $F_2$ -Dimension: 2K komplexe Datenpunkte in einem spektralen Bereich von 12019 Hz. Vor der Fourier Transformation wurde in beiden Dimensionen eine Apodisierung mit einer verschobenen Sinus-Filterfunktion (SSB=0) durchgeführt und ein *Zerofilling* auf 512 Datenpunkte in der  $F_1$ -Dimension angewendet. Die Gesamtaquisitionsdauer war 2 h 12 min.

#### Abbildung 4-41

*Stopped-flow*  $^1H$ : 128 Transienten mit 32K komplexen Datenpunkten und einer Spektrenbreite von 12019 Hz. Lösungsmittelunterdrückung erfolgte mit einer *Shaped-Puls*-Vorsättigung (Rechteckpuls) während einer Mischzeit von 100 ms und des *Recyclingdelays* von 3s. Die Fourier-Transformation wurde mit einem *Linebroadening* von 1 Hz durchgeführt.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die Entwicklung und Anwendung modularer Apparaturen für den flexiblen Einsatz miniaturisierter Trennmethoden wie cHPLC, CEC und Gradienten-(p)CEC vorgestellt. Zum anderen wurde eine Methode weiterentwickelt, die es ermöglicht, frittenlose strapazierfähige (elektro-)chromatographische Kapillarsäulen apparativ einfach und rationell, in reproduzierbarer Qualität herzustellen und dabei eine hohe Variabilität in der Wahl des Packungsmaterials und der Säulenlänge gewährleistet. Im letzten Teil dieser Arbeit wird die Entwicklung der *on-line*-Kopplung von Kapillartrenntechniken mit der NMR-Spektroskopie beschrieben. Hier gelang zum ersten Mal die splittlose Kopplung mit der cHPLC, CEC und der pCEC.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Konzept zur Herstellung von Kapillarsäulen mit einer Fritte sowie von Kapillarsäulen ohne jegliche Fritte entwickelt. Beide erlauben den Austausch gebrochener UV-Detektionsfenster und eignen sich sowohl zur *on-line*-Kopplung von CEC, pCEC und cHPLC mit der NMR Spektroskopie, als auch mit der Massenspektrometrie. Ihre Herstellung wurde im Detail beschrieben. Die Qualität der selbst hergestellten (elektro-)chromatographischen Kapillarsäulen wurde mit Hilfe eines Benzoessäureester-Testgemisches überprüft. Dazu wurde eine Serie von van-Deemter-Kurven vermessen, um die Trennleistung der Kapillarsäulen demonstrieren zu können. Des Weiteren wurde der Einfluss des Druckes auf die Trennleistung der pCEC untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Trenneffizienzen bei moderaten Drücken durchaus mit denen der reinen CEC konkurrenzfähig sind und Analysen somit in kürzerer Zeit und mit einem stabileren System durchgeführt werden können. Die Vorteile der Gradienten-pCEC gegenüber der HPLC bzw. der cHPLC konnten anhand der Auftrennung eines Mutterkorn-Alkaloid-Extraktes demonstriert werden.

Durch die im zweiten Teil dieser Arbeit vorgestellte Entwicklung der Kopplung der cHPLC, CEC und pCEC mit der NMR-Spektroskopie konnte die Einsatzfähigkeit miniaturisierter Trennverfahren zur *on-line* Strukturaufklärung aufgezeigt werden. Mit den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten modularen Apparaturen und der Entwicklung verbesserter Detektionskapillaren gelang zum ersten Mal die splittlose *on-line*-Kopplung kapillarer Trennsysteme mit der NMR-Spektroskopie. Das Kernstück des in dieser Arbeit entwickelten Systems war die speziell dafür

entwickelte druckstabile Detektionskapillare mit hoher Symmetrie und vergrößertem Detektionsvolumen, welche eine sichere und einfache Handhabung gewährleistet, eine deutlich gesteigerte Empfindlichkeit aufweist und einen einfachen Wechsel zwischen den verschiedenen Trennmethode n erlaubt. Die höhere Trennleistung der CEC gegenüber der cHPLC und die gesteigerte Sensitivität des neuen Setups im Vergleich zum Alten wurde durch die Untersuchung von Benzoessäureestern und Fettsäuremethylestern demonstriert. Aufgrund der besseren Auflösung und der schärferen Peaks war es möglich, 2D-Spektren der Reinsubstanzen aufzunehmen. Aufgrund des verbesserten neuen Setups gelang es, die Analysenzeiten bei verbesserter Trennleistung und gesteigerter Empfindlichkeit drastisch zu verkürzen. Anhand von Beispielsubstanzen konnte auch das Potential der *on-line*-Kopplung kapillarer Trennsysteme mit der NMR-Spektroskopie in der Zucker- und Enantiomeren-Analytik aufgezeigt werden. Eine Möglichkeit das im Vergleich zur HPLC/NMR-Kopplung immer noch höhere Detektionslimit weiter abzusenken, ist die Durchführung von *stopped-flow* Experimenten. Diese sind vor allem zur Aufnahme von 2D-Spektren unabdingbar, da sie die dazu notwendigen Messzeiten auf einem Substanzpeak ermöglichen. UV-Untersuchungen zur Möglichkeit von *stopped-flow* Experimenten mit Kapillartrennmethode n während eines *on-line* Laufes zeigten keine nennenswerten Bandenverbreiterungen mit dem vorgestellten Setup, so dass diese Möglichkeit nahezu uneingeschränkt zu verwenden war. Das System war mit Hilfe der *stopped-flow* Messungen empfindlich genug, um reale Proben, wie in Käferdrüsen- oder Pflanzen-Extrakten enthaltene Wirkstoffe aufzutrennen, zu detektieren und ihre Struktur aufzuklären.

Insgesamt verdeutlichen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente das große Potential der miniaturisierten Trennverfahren, vor allem das der druckunterstützten Elektrochromatographie, sowohl mit UV-Detektion, als insbesondere auch bei NMR-Kopplungsexperimenten. Die Untersuchungen der Modellsubstanzen wie auch die der Naturstoffproben demonstrieren die Leistungsfähigkeit dieser Methoden. In allen Fällen konnte gezeigt werden, dass die (p)CEC gegenüber der cHPLC eine höhere Trennschärfe aufweist und kürzere Analysenzeiten ermöglicht.

Die zunehmende Zahl an Veröffentlichungen auf dem Gebiet der kapillaren (Elektro-) Chromatographie weist auf das wachsende Interesse an der Miniaturisierung hin. Da vor allem die Variante der druckunterstützten Elektrochromatographie die Vorteile

der hydrodynamischen mit denen der elektrokinetischen Trennmethoden in sich vereint, war die Untersuchung dieser Methode hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit als alleinstehende Analysenmethode, als auch der Möglichkeit zur *on-line*-Kopplung mit der NMR-Spektroskopie das Hauptziel dieser Arbeit. Mit den durchgeführten Analysen konnte gezeigt werden, dass die Kapillarelektrochromatographie in der industriellen Forschung, Entwicklung und Analytik durchaus schon zum jetzigen Zeitpunkt ihre Anwendung finden könnte.

## 7 Literatur

- 1 L.S. Ettre, K.O. Sakodynskii, *Chromatographia* **1993**, 35, 223.
- 2 L.S. Ettre, K.O. Sakodynskii, *Chromatographia* **1993**, 35, 329.
- 3 R. Kuhn, E. Lederer, *Chem. Ber.* **1931**, 19, 1355.
- 4 E. Bayer, *Gaschromatographie*, Springer, Berlin **1959**.
- 5 G. Schomburg, *Gaschromatographie*, VCH, Weinheim, 2. Aufl. **1987**.
- 6 H.P. Frey, K. Zielloff, *Qualitative und Quantitative Dünnschichtchromatographie*, VCH, Weinheim, **1992**.
- 7 M.L. Lee, K.E. Markides, *Analytical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction*, Chromatography Conferences Inc. **1990**.
- 8 C. Horváth, W.R. Melander in *Chromatography*, Hrsg. H. Heftmann, J. Chromatogr. Library Vol. 22A, Elsevier, Amsterdam, **1983**.
- 9 K.K. Unger (Hrsg.), *Handbuch der HPLC*, GIT Verlag, Darmstadt, **1989**.
- 10 V.R. Maier, *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, Salle + Sauerländer, Frankfurt am Main, 6. Aufl. **1990**.
- 11 O. Vesterberg, *J. Chromatogr.* **1989**, 480, 3.
- 12 S. Raymond, L. Weinlaub, *Science* **1959**, 130, 711.
- 13 S. Hjerten, *Biochem. Biophys. Acta* **1961**, 53, 514.
- 14 F.E.P. Mikkers, F.M. Everaerts, *J. Chromatogr.* **1977**, 169, 11.
- 15 J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *Anal. Chem.* **1981**, 53, 1298.
- 16 J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *J. Chromatogr.* **1981**, 218, 209.
- 17 H. Engelhardt, B. Beck, T. Schmitt, *Kapillarelektrophorese, Methoden und Möglichkeiten*, Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft, Braunschweig / Wiesbaden **1994**.
- 18 V. Pretorius, H. J. Hopkins, J. D. Schieke, *J. Chromatogr.* **1974**, 99, 23.
- 19 J. H. Knox, I. H. Grant, *Chromatographia* **1987**, 24, 135.
- 20 J. H. Knox, *Chromatographia* **1988**, 26, 329.
- 21 T. Tsuda, M. Novotny, *Anal. Chem.* **1978**, 50, 271-275.
- 22 F. J. Yang, *J. Chromatogr.* **1982**, 236, 265-277.
- 23 J. C. Gluckmann, A. Hirose, V. L. McGuffin, M. Novotny, *Chromatographia* **1983**, 17, 303-309.
- 24 D. C. Shelly, J. C. Gluckmann, M. V. Novotny, *Anal. Chem.* **1984**, 56, 2990-2992.
- 25 D. Ishii (Ed), *Introduction to Microscale High-Performance Liquid Chromatography*, VCH, Weinheim **1988**.
- 26 K.-E. Karlsson, M. Novotny, *Anal. Chem.* **1988**, 60, 1662.
- 27 R. T. Kennedy, J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.* **1989**, 61, 1128-1135.
- 28 H. J. Cortes, J. R. Larson, G. M. McGowan, *J. Chromatogr.* **1992**, 607, 131-134.
- 29 H. J. Gaus, A. G. Beck-Sickinger, E. Bayer, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1399-1405.
- 30 J. P. C. Vissers, H. A. Claessens, J. Laven, C. A. Cramers, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2103-2109.
- 31 R. Weinberger, *Practical Capillary Elektrophoresis*, Academic Press Ap inc., Boston/San Diego/N.Y., **1993**.
- 32 C.H. Hamann, W. Vielstich, *Elektrochemie*, 2. überarbeitete Auflage, VCH Weinheim, **1985**.

- 33 M.J. Gordon, X. Huang, S.L. Pentoney, R.N. Zare, *Science* **1988**, 397, 224.
- 34 A.S. Cohen, B.L. Karger, *J. Chromatogr.* **1987**, 397, 409.
- 35 A. Guttmann, A.S. Cohen, D.N. Heiger, B.L. Karger, *Anal. Chem.* **1990**, 67, 137.
- 36 S. Terabe, *Trends. Anal. Chem.* **1989**, 8, 129.
- 37 J. Vindevogel, P.J. Sandra, *Introduction to Micellar Electrokinetic Chromatography*, Hüthig Buch Verlag, Heidelberg, **1992**.
- 38 J.H. Knox, I.H. Grant, *Chromatographia* **1991**, 32, 317.
- 39 H. Yamamoto, J. Baumann, F. Erni, *J. Chromatogr. A* **1992**, 593, 313.
- 40 T. Tsuda, *LC•GC Int.* **1992**, 5, 26.
- 41 H. Rebscher, U. Pyell, *Chromatographia* **1994**, 38, 737.
- 42 C. Yan, D. Schaufelberger, F. Erni, *J. Chromatogr. A* **1994**, 670, 15.
- 43 N.W. Smith, M.B. Evans, *Chromatographia* **1994**, 38, 649.
- 44 B. Behnke, E. Bayer, *J. Chromatogr. A* **1994**, 680, 93.
- 45 M.M. Dittmann, K. Wienand, F. Bek, G.P. Rozing, *LC•GC* **1995**, 13, 800.
- 46 R.J. Boughtflower, T. Underwood, C.J. Paterson, *Chromatographia* **1995**, 40, 329.
- 47 G.J.M. Bruin, P.P.H. Tock, J.C. Kraak, H. Poppe, *J. Chromatogr.* **1990**, 517, 557.
- 48 E.R. Verheij, U.R. Tjaden, W.M.A. Niessen, J. van der Greef, *J. Chromatogr.* **1991**, 554, 339.
- 49 A.A. Abbas, D.C. Shelly, *J. Chromatogr. A* **1995**, 691, 37.
- 50 N.G.F.M. Lammers, J.H.M. Van den Berg, M. Verzele, C. Dewaele, *J. Chromatogr.* **1990**, 499, 541.
- 51 A. Siddiqui, D.C. Shelly, *J. Chromatogr. A* **1995**, 691, 55.
- 52 Cs. Horváth, B.A. Preiss, S.R. Lipsky, *Anal. Chem.* **1967**, 39, 1422.
- 53 Cs. Horváth, S.R. Lipsky, *Anal. Chem.* **1969**, 41, 1227.
- 54 R.P.W. Scott, P. Kucera, *J. Chromatogr.* **1976**, 125, 251.
- 55 D. Ishii, K. Asai, K. Hibi, T. Jonokuchi, M. Nagaya, *J. Chromatogr.* **1977**, 144, 157.
- 56 D. Ishii (Ed), *Introduction to Microscale High-Performance Liquid Chromatography*, VCH, Weinheim **1988**.
- 57 P.A. Bristow, J.H. Knox, *Chromatographia* **1977**, 10, 279.
- 58 J.H. Knox, I.H. Grant, *Chromatographia* **1991**, 32, 317.
- 59 M.M. Dittmann, K. Wienand, F. Bek, G.P. Rozing, *LC•GC* **1995**, 13, 800.
- 60 A.L. Crego, A. González, M.L. Marina, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **1996**, 26, 261.
- 61 L.A. Colón, K.J. Reynolds, R. Alicea-Maldonado, A.M. Fermier, *Electrophoresis* **1997**, 18, 2162.
- 62 C. Fujimoto, *Trends Anal. Chem.* **1999**, 18, 291.
- 63 L.A. Colón, G. Burgos, T.D. Maloney, J.M. Citrón, R.L. Rodriguez, *Electrophoresis* **2000**, 21, 3965.
- 64 Z. Deyl, F. Svec (Eds), *Capillary Electrochromatography*, Journal of Chromatography Library, vol. 62, Elsevier, Amsterdam **2001**.
- 65 J.P.C. Vissers, H.A. Claessens, C.A. Cramers, *J. Chromatogr. A* **1997**, 779, 1.
- 66 J.P.C. Vissers, *J. Chromatogr. A* **1999**, 856, 117.
- 67 J. Abian, A.J. Oosterkamp, E. Gelpi, *J. Mass Spectrom.* **1999**, 34, 244.



- 68 G.P. Rozing, M. Serwe, H.-G. Weissgerber, B. Glatz, *Am. Lab.* **2001**, 33, 26.
- 69 R.J. Hunter, *Zetapotential in Colloid Science*, Academic Press, London, **1981**.
- 70 K.D. Lukacs, J.W. Jorgenson, *HRC* **1985**, 8, 407.
- 71 S. Fujiwara, S. Honda, *Anal. Chem.* 1986, 58, 1811.
- 72 K. Altria, C. F. Simpson, *Chromatographia* 1987, 24, 527.
- 73 T. Tsuda, M. Ikedo, G. Jones, R. Dadoo, R.N. Zare, *J. Chromatogr.* **1993**, 632, 201.
- 74 C.L. Rice, R. Whitehead, *J. Phys. Chem.* **1965**, 69, 4017.
- 75 H. Rebscher, U. Pyell, *Chromatographia* **1996**, 42, 171.
- 76 M. T. Dulay, C. Yan, D. J. Rakestraw, R. N. Zare, *J. Chromatogr.* **1996**, 725, 361.
- 77 J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, *Chem. Ing. Science* **1956**, 5, 271.
- 78 E. Wen, R. Asiaie, Cs. Horváth, *J. Chromatogr. A* **1999**, 855, 349.
- 79 B. Xin, M.L. Lee, *J. Microcol. Sep.* **1999**, 11, 271.
- 80 C. Yan, R. Dadoo, R.N. Zare, D.J. Rakestraw, D.S. Anex, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2726.
- 81 R. Dadoo, C. Yan, R.N. Zare, D.S. Anex, D.J. Rakestraw, G.A. Hux, *LC•GC* **1997**, 15, 630.
- 82 K.M. Hutterer, J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 1293.
- 83 Unimicro Technologies Inc., Pleasanton, CA; <http://www.unimicrotech.com>
- 84 Micro-Tech Scientific, Sunnyvale, CA; <http://www.microlc.com>
- 85 ProLab Instruments GmbH, Reinach, Switzerland; <http://www.prolab.ch>
- 86 H. Poppe, *J. Chromatogr. A* **1997**, 781, 3.
- 87 R.J. Boughtflower, T. Underwood, C.J. Paterson, *Chromatographia* **1995**, 40, 329.
- 88 N.W. Smith, M.B. Evans, *Chromatographia* **1994**, 38, 649.
- 89 M.M. Dittmann, G.P. Rozing, *J. Chromatogr. A* **1996**, 744, 63.
- 90 N.W. Smith, M.B. Evans, *Chromatographia* **1995**, 41, 197.
- 91 N.W. Smith, A.S. Carter-Finch, *J. Chromatogr. A* **2000**, 892, 219.
- 92 Jetzt: Applied Biosystems, Foster City, CA; <http://www.appliedbiosystems.com> (Das CE-Gerät ist nicht mehr erhältlich.)
- 93 Prince Technologies, Emmen, The Netherlands; <http://www.princetechnologies.nl>
- 94 Agilent Technologies, Waldbronn, Germany; <http://www.chem.agilent.com>
- 95 Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA; <http://www.beckmancoulter.com>
- 96 M.M. Dittmann, G.P. Rozing, G. Ross, Th. Adam, K.K. Unger, *J. Cap. Elec.* **1997**, 4, 201.
- 97 A. Apfel, H. Yin, W.S. Hancock, D. McManigill, J. Frenz, S.-L. Wu, *J. Chromatogr. A* **1999**, 832, 149.
- 98 G. Choudhary, W. Hancock, K. Witt, G. Rozing, A. Torres-Duarte, I. Wainer, *J. Chromatogr. A* **1999**, 857, 183.
- 99 G.P. Rozing, A. Dermaux, P. Sandra, in: Z. Deyl, F. Svec (Eds), *Capillary Electrochromatography*, Journal of Chromatography Library, vol. 62, Elsevier, Amsterdam 2001, p. 39.
- 100 B. Behnke, E. Bayer, *J. Chromatogr. A* 1994, 680, 93.
- 101 Th. Eimer, K.K. Unger, T. Tsuda, *Fresen. J. Anal. Chem.* **1995**, 352, 649.
- 102 C.G. Huber, G. Choudhary, Cs. Horváth, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 4429.
- 103 S. Kitagawa, A. Tsuji, H. Watanabe, M. Nakashima, T. Tsuda, *J. Microcol. Sep.* **1997**, 9, 347.

- 104 Y. Zhang, W. Shi, L. Zhang, H. Zou, *J. Chromatogr. A* **1998**, 802, 59.
- 105 M.R. Taylor, P. Teale, *J. Chromatogr. A* **1997**, 768, 89.
- 106 M.R. Taylor, P. Teale, S.A. Westwood, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2554.
- 107 B. Behnke, J.W. Metzger, *Electrophoresis* **1999**, 20, 80.
- 108 D.B. Strickmann, B. Chankvetadze, G. Blaschke, C. Desiderio, S. Fanali, *J. Chromatogr. A* **2000**, 887, 393.
- 109 J.N. Alexander, J.B. Poli, K.E. Markides, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 2398.
- 110 E.R. Verheij, U.R. Tjaden, W.M.A. Niessen, J. van der Greef, *J. Chromatogr.* **1991**, 554, 339.
- 111 T. Tsuda, *LC•GC Int.* **1992**, 5, 26.
- 112 B. Behnke, E. Grom, E. Bayer, *J. Chromatogr. A* **1995**, 716, 207.
- 113 M.B.O. Anderson, L.G. Blomberg, *J. Sep. Sci.* **2001**, 24, 304.
- 114 L.C. Sander, M. Pursch, B. Märker, S.A. Wise, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 3477.
- 115 H. Rebscher, U. Pyell, *J. Chromatogr. A* **1996**, 737, 171.
- 116 H. Rebscher, U. Pyell, *Chromatographia* **1994**, 38, 737.
- 117 S.E. van den Bosch, S. Heemstra, J.C. Kraak, H. Poppe, *J. Chromatogr. A*, **1996**, 755, 165.
- 118 M. T. Dulay, C. Yan, D. J. Rakestraw, R. N. Zare, *J. Chromatogr.* **1996**, 725, 361.
- 119 C. Yan, D. Schaufelberger, F. Erni, *J. Chromatogr. A* **1994**, 670, 15.
- 120 N.W. Smith, M.B. Evans, *Chromatographia*, 38 (1994) 649.
- 121 R. J. Boughtflower, T. Underwood, C. J. Paterson, *Chromatographia* **1995**, 40, 329.
- 122 C. Yan, R. Dadoo, H. Zhao, R.N. Zare, D.J. Rakestraw, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2026.
- 123 M. M: Robson, S. Roulin, S. M. Shariff, M. W. Raynor, K. D. Bartle, A. A. Clifford, P. Myers, M. R. Euerby, C. M. Johnson, *Chromatographia* **1996**, 43, 313.
- 124 H. Rebscher, U. Pyell, *Chromatographia* **1996**, 42, 171.
- 125 H.J. Cortes, T.S. Pfeiffer, B.C. Richter, T.S. Stevens, *J. High Resolut. Chromatogr.* **1987**, 10, 446.
- 126 W. Malik, D. Li, M.L. Lee, *J. Microcol. Sep.* **1993**, 5, 361.
- 127 K.W. Whitaker, M.J. Sepaniak, *Electrophoresis* **1994**, 15, 1341.
- 128 R.T. Kennedy, J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.* **1989**, 61, 1128.
- 129 H. Yamamoto, J. Baumann, F. Erni, *J. Chromatogr. A* **1992**, 593, 313.
- 130 D. Tong, K.D. Bartle, A.A. Clifford, *J. Microcol. Sep.* **1994**, 6, 249.
- 131 M. Schmid, R. Bäuml, A.P. Kohne, T. Welsch, *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, 22, 438.
- 132 H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 3498.
- 133 N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, K. Hosoya, N. Tanaka, *J. High Resol. Chromatogr.* **1998**, 21, 477.
- 134 C. Fujimoto, *Analysis* **1998**, 26, M49.
- 135 N. Tanaka, H. Nagayama, H. Kobayashi, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Isizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Cabrera, D. Lubda, *J. High Resol. Chromatogr.* **2000**, 23, 111.
- 136 C. Fujimoto, *J. High Resol. Chromatogr.* **2000**, 23, 89.
- 137 C. Fujimoto, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2050.
- 138 C. Fujimoto, J. Kino, H. Sawada, *J. Chromatogr. A* **1995**, 716, 107.
- 139 C. Fujimoto, Y. Fujise, E. Matsuzawa, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2753.

- 140 Ch. Ericson, J.-L. Liao, K. Nakazato, S. Hjertén, *J. Chromatogr. A* **1997**, 767, 33.
- 141 A. Palm, M.V. Novotny, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 4499.
- 142 J.-L. Liao, N. Chen, Ch. Ericson, S. Hjertén, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 3468.
- 143 E.C. Peters, M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 3646.
- 144 E.C. Peters, M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2288.
- 145 E.C. Peters, M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2296.
- 146 F. Svec, E.C. Peters, D. Skyora, C. Yu, J.M.J. Fréchet, *J. High Resol. Chromatogr.* **2000**, 23, 3.
- 147 I. Gusev, X. Huang, Cs. Horváth, *J. Chromatogr. A* **1999**, 855, 273.
- 148 B. Xiong, L. Zhang, Y. Zhang, H. Zou, J. Wang, *J. High Resol. Chromatogr.* **2000**, 23, 67.
- 149 R. Asiaie, X. Huang, D. Farnan, Cs. Horváth, *J. Chromatogr. A* **1998**, 806, 251.
- 150 D. Wistuba, V. Schurig, *Electrophoresis* **2000**, 21, 3125-3159.
- 151 G. Chirica, V.T. Remcho, *Electrophoresis* **1999**, 20, 50.
- 152 M.T. Dulay, R.P. Kulkarni, R.N. Zare, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 5103.
- 153 Q. Tang, B. Xin, M.L. Lee, *J. Chromatogr. A* **1999**, 837, 35.
- 154 Q. Tang, N. Wu, M.L. Lee, *J. Microcol. Sep.* **1999**, 11, 550.
- 155 Q. Tang, M.L. Lee, *J. High Resol. Chromatogr.* **2000**, 23, 73.
- 156 Q. Tang, N. Wu, M.L. Lee, *J. Chromatogr. A* (in press **2000**).
- 157 B. He, N. Tait, F.E. Regnier, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 3790.
- 158 B. He, J. Ji, F.E. Regnier, *J. Chromatogr. A* **1999**, 853, 257.
- 159 F.E. Regnier, *J. High Resol. Chromatogr.* **2000**, 23, 19.
- 160 M. Mayer, E. Rapp, C. Marck, G.J.M. Bruin, *Electrophoresis* **1999**, 20, 43.
- 161 H. Alborn, G. Stenhagen, *J. Chromatogr.* **1985**, 323, 47.
- 162 G.A. Lord, D.B. Gordon, P. Myers, B.W. King, *J. Chromatogr. A* **1997**, 768, 9.
- 163 G. Choudhary, C. Horváth, J.F. Banks, *J. Chromatogr. A* **1998**, 828, 469.
- 164 R.A. Carney, M.M. Robson, K.D. Bartle, P. Myers, *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, 22, 29.
- 165 B. Behnke, E. Grom, E. Bayer, *J. Chromatogr. A* **1995**, 716, 207.
- 166 E. Rapp, E. Bayer, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 887, 367.
- 167 I.C. Gluckmann, A. Hirose, V.L. Mc Guffin, M. Novotny, *Chromatographia*.
- 168 G. Guiochon, S. Golshan-Shirazi, A.M. Katti, *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, Academic Press, Boston, MA, **1994**.
- 169 A.S. Rathore, Cs. Horváth, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 3069.
- 170 E. Rapp, U. Tallarek, *J. Sep. Sci.* **2003**, 26, 10-16.
- 171 B. Behnke, *Dissertation*, Universität Tübingen, **1996**.
- 172 E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound, *Phys. Rev.* **1946**, 69, 37.
- 173 F. Bloch, W.W. Hansen, M. Packard, *Phys. Rev.* **1946**, 69, 127.
- 174 H. Friebolin, *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, **1998**.
- 175 K. Albert, *Habilitationsschrift*, Universität Tübingen, **1988**.
- 176 N. Watanabe, E. Niki, *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **1978**, 54, 194.
- 177 E. Bayer, K. Albert, M. Nieder, E. Grom, T. Keller, *J. Chromatogr. A* **1979**, 186, 497.

- 178 H.C. Dorn, *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 747A-758A.
- 179 D.A. Laude, C.L. Wilkins, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 546-551.
- 180 K. Albert, M. Kunst, E. Bayer, M. Spraul, W. Bermel, *J. Chromatogr.* **1989**, *463*, 355-363.
- 181 M. Spraul, M. Hoffmann, P. Dvortsak, J.K. Nicolson, I. D. Wilson, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 327-330.
- 182 S. Stevenson, H.C. Dorn, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2993-2999.
- 183 N. Wu, T.L. Peck, A.G. Webb, R.L. Magin, J.V. Sweedler, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3849.
- 184 N. Wu, T.L. Peck, A.G. Webb, R.L. Magin, J.V. Sweedler, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *116*, 7929.
- 185 D.L. Olson, T.L. Peck, A.G. Webb, R.L. Magin, J.V. Sweedler, *Science* **1995**, *270*, 1967.
- 186 N. Wu, A.G. Webb, T.L. Peck, J.V. Sweedler, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3101.
- 187 B. Behnke, G. Schlotterbeck, U. Tallarek, S. Strohschein, L.-H. Tseng, T. Keller, K. Albert, E. Bayer, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1110.
- 188 K. Pusecker, J. Schewitz, P. Gfrörer, L.-H. Tseng, K. Albert, E. Bayer, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3280.
- 189 P. Gfrörer, J. Schewitz, K. Pusecker, L.-H. Tseng, K. Albert, E. Bayer, *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3.
- 190 K. Pusecker, J. Schewitz, P. Gfrörer, L.-H. Tseng, K. Albert, E. Bayer, I. D. Wilson, N.J. Bailey, G.B. Scarfe, J.K. Nicholson, J.C. Lindon, *Anal. Comm.* **1998**, *35*, 213.
- 191 J. Schewitz, P. Gfrörer, K. Pusecker, L.-H. Tseng, K. Albert, E. Bayer, I.D. Wilson, N.J. Bailey, G.B. Scarfe, J.K. Nicholson, J.C. Lindon, *Analyst* **1998**, *123*, 2835.
- 192 J. Schewitz, K. Pusecker, P. Gfrörer, U. Götz, L.-H. Tseng, K. Albert, E. Bayer, *Chromatographia* **1999**, *50*, 333.
- 193 P. Gfrörer, J. Schewitz, K. Pusecker, E. Bayer, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 315A.
- 194 P. Gfrörer, L.-H. Tseng, E. Rapp, K. Albert, E. Bayer, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3234-3239.
- 195 E. Rapp, A. Jakob, A.B. Schefer, E. Bayer, K. Albert, *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376*, 1053-1061.
- 196 R.R. Ernst, W.A. Anderson, *Rev. Sci. Instrum.* **1966**, *37*, 93.
- 197 C. A. Fyfe, M. Cocivera, A. W. H. Damji, *Acc. Chem. Res.* **1978**, *11*, 277.
- 198 P. J. Hore, *Meth. Enzymol.* **1989**, *176*, 64-77.
- 199 W. E. Hull in W. R. Croasmun, R. M. K. Carlson (Editors), *Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, **1994**, VCH, Weinheim.
- 200 M. Guéron, P. Plateau, M. Decorps, *Progr. NMR Spectr.* **1991**, *23*, 135-209.
- 201 E. Bayer, K. Albert, M. Nieder, E. Grom, *J. Chromatogr.* **1979**, *18*, 685-691.
- 202 K. Albert, M. Nieder, E. Bayer, *J. Chromatogr.* **1985**, *346*, 17-24.
- 203 J. F. Haw, T. E. Glass, H. C. Dorn, *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 1135-1140.
- 204 J. Buddruss, H. Herzog, *Org. Magn. Res.* **1980**, *13*, 153-155.
- 205 D. A. Laude, C. L. Wilkins, *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 2471-2475.
- 206 K. Albert, G. Schlotterbeck, U. Braumann, H. Händel, M. Spraul, G. Krack, *Angew. Chem.* **1995**, *707*, 1102-1104.
- 207 S. Strohschein, G. Schlotterbeck, J. Richter, M. Pursch, L.-H. Tseng, H. Händel, K. Albert, *J. Chromatogr. A* **1997**, *765*, 207-214.

- 208 J. K. Sanders, B. K. Hunter, *Modern NMR Spectroscopy, a Guide for Chemists*, **1993**, Oxford University Press, Oxford.
- 209 A. E. Derome, *Modern NMR-Techniques for Chemistry Research*, **1987**, Pergamon Press Oxford.
- 210 S. Braun, H.-O. Kalinowski, S. Berger, *750 and More Basic NMR Experiments*, **1998**, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.
- 211 H. Friebolin, *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, **1998**, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.
- 212 J. C. Lindon, J.K. Nicolson, I. D. Wilson, *Adv. Chrom.* **1996**, *36*, 315-382.
- 213 D. I. Hoult, R. E. Richards, *J. Magn. Reson.* **1976**, *24*, 71-85.
- 214 N. Wu, T. L. Peck, A. G. Webb, R. L. Magin, J. V. Sweedler, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7929-7930.
- 215 D. L. Olsen, T.L. Peck, A. G. Webb, R. L. Magin, J. V. Sweedler, *Science*, **1995**, *270*, 1967-1969.
- 216 N. Wu, T. L. Peck, A. G. Webb, R. L. Magin, J. V. Sweedler, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3849-3857.
- 217 D. L. Olson, M. E. Lacey, J. V. Sweedler, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 645-650.
- 218 A. G. Webb, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1997**, *31*, 1-42.
- 219 D. L. Olson, M. E. Lacey, J. V. Sweedler, *Trends Anal. Chem.* **1998**, *70*, 257A-264A.
- 220 M. E. Lacey, R. Subramanian, D. L. Olson, A. G. Webb, J. V. Sweedler, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 3133-3152.
- 221 G. Schlotterbeck, Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Tübingen, **1997**.
- 222 G. B. Gordon, United States Patent 5 061 361, Oktober 29, **1991**.
- 223 K. Albert, G. Schlotterbeck, L.-H. Tseng, U. Braumann *J. Chromatogr. A* **1996**, *750*, 303-309.
- 224 G. Schlotterbeck, L.-H. Tseng, H. Händel, U. Braumann, K. Albert *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1421-1425.
- 225 Römpp, *Chemie Lexikon*, 9. Aufl. 1995, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- 226 A.T. Diplock, K.A. Balasubramanian, M. Manohar, V.I. Mathan, D. Ashton, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *962*, 42-50.
- 227 C.I. Baker, J.H. Melhuish, *J. Chromatogr.* **1984**, *284*, 251-256.
- 228 J.T. Lin, T.A. McKeon, A.E. Stafford, *J. Chromatogr. A* **1995**, *699*, 85-91.
- 229 B. Nikolova-Damyanova, W.W. Christie, B. Herslöf, *J. Chromatogr. A* **1995**, *693*, 235-239.
- 230 R.O. Adlof, *J. Chromatogr. A* **1994**, *659*, 95-99.
- 231 H. K. Mangold, *CRC Handbook of Chromatography, Lipids*, CRC Press, Boca Raton, FL, **1984**.
- 232 E. Bayer, P. Gfrörer, C. Rentel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 992-995.
- 233 H. Günther, *NMR-Spektroskopie* 1992, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- 234 D. Wistuba, H. Czesla, M. Roeder, V. Schurig, *J. Chromatogr. A* **1998**, *815*, 183-188.
- 235 D. Wistuba, V. Schurig, *Electrophoresis* **1999**, *20*, 2779-2785.
- 236 W.-Z. Chen, *Pharmacology of Salvia Miltiorrizza: Acta Pharm. Sin.* **1984**, *19*, 876-880.
- 237 "Pharmacopoeia of the People's Republic of China", Beijing, China, **1977**, /, 114.
- 238 G.-T. Liu, T.-M. Zhang, B.-E. Wang, Y.-W. Wang, *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 147-152.
- 239 Y.-J. Wu, C.-Y. Hong, S.-J. Lin, M.-S. Shiao, *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology* **1998**, *18*, 481-486.
- 240 L.-H. Tseng, Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Tübingen, **2000**.



Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, E. Bayer, H.-H. Brintzinger, D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, W. Göpel, G. Häfelinger, H.-P. Hagenmaier, B. Hamprecht, M. Hanack, D. Hoffmann, V. Hoffmann, W. Jäger, G. Jung, S. Kemmler-Sack, W. Koch, K.-A. Kovar, D. Krug, N. Kuhn, E. Lindner, M. E. Maier, H. A. Mayer, D. Mecke, H. J. Meyer, U. Nagel, W. Nakel, H. Pommer, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, M. Przybylski, B. Rieger, V. Schurig, E. Schweda, F. F. Seelig, H.-U. Siehl, B. Speiser, H. Stegmann, J. Strähle, W. Voelter, K.-P. Zeller, C. Ziegler.





# Lebenslauf

## Persönliche Angaben:

Name: Erdmann Rapp, geboren am 19. März 1968 (Ravensburg),  
Staatsangehörigkeit: deutsch, verheiratet, zwei Kinder.

## Schulbildung:

1974 -1978	Grundschule Bad Schussenried
1978 - 1988	Gymnasium Aulendorf
6. Mai 1988	Allgemeine Hochschulreife
Aug. 1988 – Mär. 1990	Zivildienst in der Schussental-Klinik (Aulendorf)
Apr. 1990 – Sep. 1990	Weiterbeschäftigung in der Schussental-Klinik als Hilfspfleger im Tag- und Nachtdienst

## Studium:

Okt. 1990 - Sep. 1991	Universität Konstanz, Studiengang Chemie-Diplom
Okt. 1991 – Dez. 1996	Eberhard-Karls Universität Tübingen, Studiengang Chemie-Diplom
09. Jan. 1997	Mündliche Diplomhauptprüfung
Feb. 1997 – Jul. 1997	Diplomarbeit: „Problemorientierte Anwendung der Kapillarelektrochromatographie und Untersuchungen zur Kopplung mit der Mikro-Elektrospray-Ionisierung“, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Bayer (Institut für Organische Chemie, Universität Tübingen) in Kooperation mit der Novartis Pharma AG (Basel, Schweiz)
Aug. 1997 – Dez. 2000	Experimenteller Teil der Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Bayer und Herrn Prof. Dr. K. Albert, Institut für Organische Chemie, Universität Tübingen: „Miniaturisierte Trennverfahren und ihre On-line-Kopplung mit der NMR-Spektroskopie: Entwicklung und Anwendungen“
Jan. 1998 – Dez. 2000	Stipendiat und Kollegiat im DFG Graduierten Kolleg „Analytische Chemie“ an der Universität Tübingen

## Berufstätigkeit:

Dez. 1996 - Aug. 1997	Forschungs-Praktikant in der Abteilung für bioanalytische Forschung der Novartis Pharma AG (Basel, CH) unter der Leitung von Dr. A. Paulus und Dr. G.J.M. Bruin
Jan. 2001 – Jan. 2003	Wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Chemische Verfahrenstechnik (Prof. Dr.-Ing. A. Seidel-Morgenstern) des Institutes für Verfahrenstechnik der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
seit Feb. 2003 bis heute	Wissenschaftlicher Angestellter am Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme (Magdeburg)

