

Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Sensitivitätssteigerung in der HPLC-*benchtop* NMR Kopplung

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Markus Matz (M. Sc.)

aus Bad Bergzabern (Pfalz)

1. Referent:	Prof. Dr. Manfred Wilhelm
2. Referent:	Prof. Dr. Thomas Kuballa
Tag der mündlichen Prüfung:	25. Oktober 2024

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 2020 bis September 2024 unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Manfred Wilhelm am Institut für Technische Chemie und Polymerchemie (ITCP) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) angefertigt.

Ich versichere hiermit wahrheitsgemäß, die Arbeit selbstständig verfasst, alle benutzten Hilfsmittel vollständig und genau angegeben und alles kenntlich gemacht zu haben, was aus Arbeiten anderer unverändert oder mit Abänderungen entnommen wurde sowie die Satzung des KIT zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet zu haben. Darüber hinaus versichere ich, dass die in der Arbeit verwendeten Ergebnisse in dem vom Prüfungsausschuss festgelegten Zeitraum der Arbeit entstanden sind.

Markus Matz, Karlsruhe, den 09. September 2024

*Werd ich zum Augenblicke sagen:
Verweile doch! du bist so schön!
Dann magst du mich in Fesseln schlagen,
Dann will ich gern zugrunde gehn!*

Faust, in Faust I, Vers 1699 – 1702, Johann Wolfgang von Goethe, **1808**.

Danksagung

Die vorliegende Doktorarbeit wäre ohne die Unterstützung vieler Menschen nicht möglich gewesen. Zuerst möchte ich meine Dankbarkeit gegenüber **Prof. Dr. Manfred Wilhelm** ausdrücken. Es war eine großartige Chance, in seinem Arbeitskreis meine Promotion zu einem so interessanten und vielseitigen Thema durchführen zu dürfen. Sein ansteckender Enthusiasmus und sein kreatives und kritisches Denken haben mich sehr inspiriert. Prof. Wilhelm verstand es, Wissen zu vermitteln, das weit über das Forschungsthema hinausging. Besonders schätzte ich die Freiheit, die er mir in meiner Forschungsarbeit gewährte und die diversen Aufgaben, die mich herausforderten. Jetzt, am Ende meiner Promotion, blicke ich zurück auf eine der schönsten, ereignisreichsten, einprägsamsten und vor allem lehrreichsten Zeiten meines bisherigen Lebens.

Eine Promotion ohne Gehalt wäre nicht möglich gewesen. Für die Finanzierung danke ich daher der Firma **Magritek** und dem **Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz** für das AIF-ZIM Projekt KK5384402 sowie der **Deutsche Forschungsgemeinschaft** für das Projekt WI 1911/35-1.

Als ich im Arbeitskreis Wilhelm startete, wurde mir mit **Dr. Carlo Botha** ein sehr sympathischer, kompetenter und engagierter Betreuer zur Seite gestellt. Erst durch das Wissen, das er mir vermittelte, konnte die Arbeit, wie sie hier vorliegt, bearbeitet werden. Ich danke ihm für all seine Hilfe, seinen Rat und die Zeit, die ich mit ihm innerhalb und außerhalb des universitären Umfelds verbringen durfte.

Für das Interesse und die Unterstützung meiner Forschung möchte ich **Prof. Dr. Wolf Hiller**, **Prof. Dr. Daniel Wefers**, **Prof. Dr. Thomas Kuballa** und **Dr. Vera Gottstein** danken.

Bei dieser Gelegenheit möchte ich auch **Prof. Dr. Svein Are Mjøs** und **Prof. Dr. Bjørn Grung** danken, für die Gelegenheit an der Universität Bergen zu forschen. Ohne ihr Engagement und ihre Zeit hätte ich diese aufregende Zeit nicht erleben können. Zum Glück wurde ich mit **Mathias Brevik** und **Dr. Dag Helge Hermundsgård** in einem Büro untergebracht. Gemeinsam hatten wir so manche lustige Diskussion, Kaffeexzesse und amüsante Abende, wofür ich Mathias und Dag sehr dankbar bin. In diesem Kontext möchte ich auch dem **Karlsruher House of Young Scientists** für deren finanziellen Zuschuss während des Forschungsaufenthalts danken, ohne die ich dieses Erlebnis nicht so genießen hätte können.

Ein ganz besonderer Dank gilt dem gesamten Arbeitskreis Wilhelm für die angenehme Atmosphäre, die anregenden Gespräche in den Mittagspausen und abendlichen Grillveranstaltungen. **Sabine Weiland**, **Dr. Nico Dingenouts** und **Ingrid Zeller**, möchte ich danken, für die Hilfe mich im Bürokratie-Dschungel des KITs zurechtzufinden. **Daniel Zimmermann** danke ich für dessen herausragenden IT Kenntnisse, der bei jeder "Herausforderung", auch nicht IT-betreffend, immer einen guten Rat parat hatte. Insbesondere möchte ich dem "Mann für alles", **Dr. Christopher Klein** (aka Kiki) danken. Kiki stand mir immer mit Rat und Tat beiseite, dabei war es ganz egal um was es ging. Vor allem hat mich sein Wissen über unbekannte Geräte im Arbeitskreis und Vogelbräu-Spezialitäten, sowie sein unerschöpflicher Vorrat an hervorragendem kretischen Raki beeindruckt. Kiki ist einer der freundlichsten, kommunikativsten und lebensfrohesten Menschen, die ich bisher kennenlernen durfte. Ohne die Abende mit ihm im Vogel, die Schorle- und Glühweinwanderungen mit ihm und dem Arbeitskreis, natürlich stets begleitet mit anregenden Diskussionen, hätte ein wesentlicher Bestandteil meiner Promotion gefehlt.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich mich bei **Anne-Sophie Mollenkopf**, **Anika Goecke**, **Helene Niess**, **Johanna Tratz**, **Max Schußmann**, **Sarah Palloks**, **Tamara Meyer**, **Tim Schüle**

und **Tobias Schwan** bedanken. Erst durch deren sprachliches Feingefühl und hilfreichen Ratschläge konnte die Arbeit vollendet werden.

Ein besonderer Dank geht raus an meine aktuellen oder ehemaligen Bürokollegen, für all die schönen Momente im "bureau des bonnes odeurs". Ich schätzte sehr die spontanen Gespräche über den Bürotisch hinweg und die nachmittäglichen Kaffee-Päuschen, die als durchaus nötig waren, um neue Kraft für die anstehende Forschung zu generieren. Neben den bereits namentlich erwähnten Personen möchte ich an dieser Stelle noch **Huan Zhang**, **Dr. Lorenz Faust** und **Dr. Simon Petrick** nennen.

Außerdem danke ich dem ehemaligen "SEC-X" und dem "the golden NMR Subgroup Team" für all die Ratschläge bei den regelmäßigen Treffen und die lustigen Momente in der Freizeit. Namentlich ergänzen möchte ich an dieser Stelle **Dr. Michael Pollard**, **Dr. Marianne Gaborieau** und **Dr. Ahmet Üzümcü**.

Diese Arbeit hätte ich ohne den nötigen freizeitleichen Ausgleich nicht durchführen können. Daher möchte ich meinen Freunden **Dr. Alexandra Sink**, **Danushan Paramsothy**, **Denis Debroize**, **Emre Erb**, **Henrique Figura**, **Jonas Bowers**, **Lukas Burry**, **Maica Grainer**, **Martin Link**, **Moritz Rheinhardt**, **Nico Ehrhardt**, **Nicola (Kalle) Grimm**, **Tatjana Lumpp** und **Peko Marmit** danken, für all die herzlichen, erheiternden und inspirierenden Momente, die wir bisher gemeinsam erleben durften. Von ganzem Herzen gilt mein Dank meiner Familie für die kontinuierliche, bedingungslose, vielseitige Unterstützung sowie den Rückhalt, den sie mir geben oder gegeben haben. Vor allem gilt mein Dank meiner Partnerin **Teresa Göttel**, ohne deren aufbauenden Worte, Feingefühl und akribischen Korrekturen diese Arbeit wohl nicht zustande gekommen wäre. Ebenso möchte ich meinen Eltern **Sabine** und **Thomas Matz**, meinen Geschwistern **Patrick** und **Tanja** sowie meinen Großeltern **Dorle** und **Robert Spitznagel** und **Karin** und **Günther Matz** danken. Ohne diese Personen hätte ich den Weg, den ich bisher gegangen bin, nicht bewältigen können.

Zum Schluss möchte ich all denjenigen danken, die hier nicht namentlich erwähnt wurden, aber durch ihre Unterstützung, Ermutigung und Freundlichkeit zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Abstract

The hyphenation of HPLC to benchtop NMR is described. Due to the NMR detection, a spectrally resolved chromatogram is obtained providing direct access to chemical information. The aim of this thesis is to increase sensitivity and, thus, allowing a wider range of users to benefit from the hyphenated methodology.

This thesis is divided into three subject areas. First, the development and optimization of online and onflow HPLC-NMR hyphenation is described, utilizing an ^1H optimized benchtop NMR spectrometer with a B_0 field of $B_0 = 1.9\text{ T}$ (corresponding to a ^1H Larmor frequency of 80 MHz). The method was optimized on a model system of parabens (alkyl esters of para-hydroxybenzoic acid), which were isocratically separated using liquid adsorption chromatography. By optimizing the NMR acquisition method (nutating angle, repetition time, solvent suppression), injection parameters, signal averaging during analyte elution through chromatographic filtering, and manual signal averaging, sensitivity was increased by a factor of 123. After full optimization, the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) are determined, expressed in terms of the injected analyte concentration. For the methoxy signal of methyl paraben $LOD = 0.010\text{ g L}^{-1}$ and $LOQ = 0.031\text{ g L}^{-1}$ and for the aromatic signals of pentyl paraben $LOD = 0.038\text{ g L}^{-1}$ and $LOQ = 0.134\text{ g L}^{-1}$ and are, thus, within the range of published values of an online and onflow LAC-500 MHz NMR hyphenation.[1] Using the optimized hyphenated methodology, a binary paraben mixture with a concentration of a factor 4 below the legal limits in cosmetic products is analyzed with a $SNR \approx 90$ for each paraben. In a measurement with chromatographically incomplete separation, the spectral resolution is used to resolve the individual elution profiles separately.

The second part of this thesis deals with the development of a chromatographic method with a continuous sample injection with oscillating concentration profile to increase sensitivity, named Fourier transformation liquid chromatography (FT-LC). The FT-LC was developed using size exclusion chromatography (SEC) with polystyrene standards and UV detection. Additionally, it was applied to analyze a binary paraben mixture in LAC-NMR. It is shown that the retardation in SEC and LAC is independent of the injection method and the presence of an additional analyte. In the SEC with UV detection the FT-LC increased the SNR per square root measurement time by a factor of 50 compared to conventional injection. In LAC with NMR detection, however, the application of FT-LC only showed a sensitivity increase by a factor of 1.6. This factor is lower because the sensitivity of the LAC-NMR with conventional injection method was already significantly increased by method optimization.

Finally, the development of a signal suppression method in NMR spectra is described. NMR spectra of an analyte solution and neat solvent, each recorded separately under static conditions, are alternately arranged in a data matrix. The analyte signals are filtered out of the spectra by Fourier transformation along the arranged spectra. Although solvent suppression was already applied, the residual solvent signals could be further reduced by a factor of 18 using the Fourier filtering (FF) method.

The methodologies are described in detail to facilitate the transfer of the optimized method to other analyte or separation systems.

Zusammenfassung

Die Kopplung der HPLC mit einem *benchtop* NMR wird beschrieben. Dadurch wird ein spektral aufgelöstes Chromatogramm erhalten, das direkten Zugang zu chemischen Informationen ermöglicht. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Sensitivität zu steigern und damit diese Methodik einem breiteren Anwenderspektrum zugänglich zu machen. Dafür ist diese Arbeit in drei Themenbereiche unterteilt. Zunächst wird die Entwicklung und Optimierung der *online* und *onflow* HPLC-NMR Kopplung beschrieben. Zur Kopplung wurde ein ^1H optimiertes *benchtop* NMR Spektrometer mit einem B_0 -Feld von $B_0 = 1,9 \text{ T}$ (entspricht einer ^1H Larmorfrequenz von 80 MHz) verwendet. Die Methode wurde an einem Modellsystem bestehend aus Parabenen (Alkylester der *para*-Hydroxybenzoesäure) optimiert, wobei die Auftrennung in der *liquid adsorption chromatography* (LAC) unter isokratischen Bedingungen stattfand. Indem die NMR Aufnahmemethode (Rotationswinkel, Wiederholzeit, Lösungsmittelunterdrückung), die Injektionsparameter sowie die Datenprozessierung optimiert wurden, konnte die Sensitivität um einen Faktor 123 gesteigert werden. Nach vollständiger Optimierung wurde für das Modellsystem die Detektions- (*LOD*) und Bestimmungsgrenze (*LOQ*), bezogen auf die injizierte Konzentration, bestimmt. Für das Methoxysignal von Methylparaben betragen $LOD = 0,010 \text{ g L}^{-1}$ und $LOQ = 0,031 \text{ g L}^{-1}$ und für die aromatischen Signale von Pentylparaben $LOD = 0,038 \text{ g L}^{-1}$ und $LOQ = 0,134 \text{ g L}^{-1}$ und liegen damit im Bereich publizierter Werte einer *online* und *onflow* LAC-500 MHz NMR Kopplung.[1] Mit der optimierten gekoppelten Methodik wurde demonstriert, dass eine binäre Parabenmischung, deren Konzentration einen Faktor 4 unter der erlaubten Höchstmenge in kosmetischen Produkten liegt, mit einer Sensitivität von jeweils $SNR \approx 90$ analysiert werden konnte. Bei einer Messung chromatographisch überlappender Signalen wurde die spektrale Auflösung verwendet, um die einzelnen Elutionsprofile separat auszuwerten.

Der zweite Themenbereich behandelt die Entwicklung einer chromatographischen Methode mit kontinuierlicher Injektion eines oszillierenden Analytkonzentrationsprofils zur Steigerung der Sensitivität, genannt Fourier-Transformation *liquid chromatography* (FT-LC). Die FT-LC wurde in der *size exclusion chromatography* (SEC) mit PS-Standards und UV Detektion etabliert und zusätzlich zur Analyse einer binären Parabenmischung in der LAC-NMR angewandt. Dabei wurde aufgezeigt, dass die Retardierung in der SEC und der LAC unabhängig von der Injektionsmethode und der Anwesenheit eines weiteren Analyten ist. Mit der FT-LC konnte in der SEC mit UV Detektion das SNR pro Quadratwurzel Messzeit um einen Faktor 50 gesteigert werden. In der LAC mit NMR Detektion wurde allerdings nur eine Sensitivitätssteigerung um einen Faktor 1,6 festgestellt. Dieser Faktor fällt geringer aus, da die Sensitivität der LAC-NMR mit konventioneller Injektionsmethode durch die Methodenoptimierung signifikant gesteigert wurde.

Abschließend wird die Entwicklung einer Methode zur Signalunterdrückung in NMR Spektren beschrieben, die unter statischen Bedingungen aufgenommen wurden. Hierfür wurden NMR Spektren einer Analytlösung und des Lösungsmittels, mit dem die Analytlösung hergestellt wurde, abwechselnd in einer Datenmatrix angeordnet. Die Analytsignale wurden aus den Spektren herausgefiltert, indem entlang der Spektrenanordnung eine Fourier-Transformation durchgeführt wurde. Trotz bereits erfolgter Lösungsmittelunterdrückung konnte mit der Fourier-Filterung (FF) die verbleibenden Lösungsmittelsignale um einen weiteren Faktor 18 reduziert werden.

Indem die entwickelten und optimierten Methoden im Detail beschrieben werden, wird ein Transfer auf weitere Anwendungsgebiete und Fragestellungen erleichtert.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	iv
Abstract	v
Zusammenfassung	vii
I. Einleitung und Motivation	1
1. Einleitung und Motivation	3
1.1. Einführung	3
II. Theoretische Grundlagen	5
2. Grundlagen der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	7
2.1. Geschichte und Bedeutung der Flüssigkeitschromatographie	7
2.2. Prinzipien der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	8
2.2.1. Grundlagen der Adsorptionschromatographie	10
2.2.2. Grundlagen der Größenausschlusschromatographie	10
2.3. Bandenverbreiterung und die Van-Deemter Kurve	12
2.4. Detektion in der HPLC	14
2.4.1. Funktionsweise eines UV/VIS Detektors	15
2.4.2. Funktionsweise eines Brechungsindexdetektor	15
3. Grundlagen der magnetischen Kernspinresonanzspektroskopie	17
3.1. Geschichte und Bedeutung der NMR-Spektroskopie	17
3.2. Beschreibung des Phänomens der magnetischen Kernspinresonanz	18
3.2.1. Visualisierung eines NMR Experiments als Pulssequenz	21
3.2.2. Relaxationsmechanismen in der NMR Spektroskopie	21
3.2.3. Ursprung der chemischen Verschiebung	24
3.2.4. Strukturinformationen durch die Spin-Spin Kopplung	24
3.3. Definition der Fourier-Transformation und der diskreten Fourier-Transformation	25
3.3.1. Eigenschaften der Fourier-Transformation	26
3.4. Datenprozessierung in der NMR Spektroskopie	28
3.5. <i>benchtop</i> NMR Spektrometer	29
3.5.1. Einordnung und Vorteile von <i>benchtop</i> NMR Spektrometer	29
3.5.2. Technische Aspekte von <i>benchtop</i> NMR Spektrometern	29
4. Grundlagen und Durchführung der HPLC-NMR Kopplung	31
4.1. Bedeutung der HPLC-NMR Kopplung	31
4.2. Umsetzung der Kopplung eines NMR Spektrometer mit der HPLC	33

4.3.	Phänomene bei <i>onflow</i> NMR Messungen	34
4.4.	Lösungsmittel und Lösungsmittelunterdrückungsmethoden	35
4.5.	Datenstruktur in der <i>onflow</i> HPLC-NMR Kopplung und das Konzept der Bilinearität	36
III. Verwendete Methoden		39
5.	Verwendete Methoden	41
5.1.	Aufbau der <i>onflow</i> LAC-NMR Kopplung	41
5.2.	NMR Messungen ohne chromatographische Separation	44
5.3.	Experimenteller Ablauf zur Aufnahme von 1D NMR Spektren und Spektrenmatrizen	45
5.4.	Vorbereitung für die NMR Messung	47
5.4.1.	Äquilibrationszeit des NMR Spektrometers	47
5.4.2.	Shimmen	48
5.4.3.	Manuelle Kalibrierung der Empfängerverstärkung	48
5.5.	Methoden zur Bestimmung der Relaxationszeiten	50
5.5.1.	Bestimmung der longitudinalen Relaxationszeit	50
5.5.2.	Bestimmung der transversalen Relaxationszeit	51
5.6.	Verbesserung der Empfindlichkeit durch Steigerung der Signalakkumulation	51
5.7.	Lösungsmittelunterdrückung durch Präsaturation, PRESAT	52
5.8.	Datenprozessierungsmethoden	53
5.8.1.	Prozessierung der NMR Spektren ohne chromatographischer Separation	53
5.8.2.	Datenprozessierung der NMR Spektren mit chromatographischer Separation	54
IV. Ergebnisse und Diskussion		57
6.	Ergebnisse und Diskussion zur LAC-NMR Kopplung	59
6.1.	Definition und Charakterisierung des Modellsystems	59
6.1.1.	Beschreibung des verwendeten Modellsystems: Parabene	59
6.1.2.	Chromatographische Methodenentwicklung und Charakterisierung des Modellsystems	59
6.1.3.	Spektroskopische Charakterisierung des Modellsystems	61
6.2.	Steigerung der Sensitivität der NMR Detektion	67
6.2.1.	Optimierung der Lösungsmittelunterdrückungseffizienz der PRESAT Pulssequenz	67
6.2.2.	Anwendung des Ernst Winkels zur Steigerung der Sensitivität	70
6.2.3.	Reduzierung der Wiederholzeit durch <i>paramagnetic relaxation enhancement</i> , PRE	71
6.2.4.	Vergleich der relativen Sensitivität unterschiedlicher NMR Aufnahmemethoden	73
6.3.	Etablierung der LAC-NMR Kopplung	76
6.3.1.	Flusszellen Optimierung	76
6.3.2.	Effekt der Flussrate auf LAC-NMR Messungen	79
6.3.3.	Auswirkung des Injektionsvolumens und der Signalmittelung auf die Sensitivität	81
6.3.4.	Chromatographische Filterung durch Fensterfunktionen	85
6.3.5.	Bestimmung der Sensitivitätsgrenzen der LAC-NMR Kopplung für Parabene	88
6.4.	Applikationsbeispiele der LAC-NMR (80 MHz) Kopplung	91
6.4.1.	Parabeanalyse unter relevanten Konzentrationen und Auflösung chromatographisch überlappender Peaks	91
6.4.2.	Oligomeranalyse von Styrol bezüglich der Taktizität mittels LAC-NMR (80 MHz)	93
6.5.	Zusammenfassung zur LAC-NMR (80 MHz) Kopplung	99

7. Ergebnisse und Diskussion zur Entwicklung der Fourier-Transformation <i>liquid chromatography</i>	103
7.1. Hintergrund und Umsetzung der kontinuierlichen Injektionsmethode	103
7.1.1. Erhöhung der Sensitivität durch alternative Injektionsprofile	103
7.1.2. Umsetzung der FT-SEC Methodik	106
7.1.3. Theoretische Grundlagen der FT-SEC	108
7.1.4. Datenprozessierung einer FT-SEC Messung und SNR Definition im Fourier-Raum	110
7.2. Entwicklung der Fourier-Transformation <i>liquid chromatography</i>	113
7.2.1. Erstellen einer Molekulargewichtskalibrierung	113
7.2.2. Analyse von Polymermischungen mittels FT-SEC	115
7.2.3. Auswirkung der Periode auf das SNR	118
7.2.4. Sensitivitätsvergleich am Konzentrationsüberladungslimit der Säule	120
7.2.5. Anwendung der FT-LC in der LAC-NMR Kopplung	123
7.3. Zusammenfassung zur FT-LC Methodenentwicklung	129
8. Numerische Signalunterdrückung in NMR Spektren durch Fourier-Filterung, FF	131
8.1. Konzept der Signalunterdrückung durch Fourier-Filterung	131
8.2. Umsetzung und Auswertung der Fourier-Filterung	132
8.2.1. Optimierung der exponentiellen Apodisierung	133
8.2.2. Quantifizierung der Effektivität der Signalunterdrückung und Sensitivität der FF	133
8.3. Zusammenfassung zur Fourier-Filterung	137
V. Fazit und Ausblick	139
9. Zusammenfassung der Ergebnisse	141
10. Ausblick auf zukünftige Entwicklungen und Forschungsbedarf	145
Abkürzungsverzeichnis	147
Abbildungsverzeichnis	151
Tabellenverzeichnis	155
Literatur	157
A. Anhang: Verwendete Chemikalien, Instrumente und Software	169
A.1. Verbrauchsmaterialien	169
A.2. Instrumente	170
A.2.1. HPLC	170
A.2.2. NMR Spektrometer	170
A.3. Software	171
B. Anhang: Experimentelle Parameter und Zusatzinformationen für die Ergebnisse der LAC-NMR Kopplung	173
B.1. Experimenteller Ablauf der Pulssequenzen	173
B.2. Flusszellenkalibrierung für <i>onflow</i> 80 MHz NMR Messungen	176
B.3. Kalibrierung der Empfängerverstärkung	177
B.4. Abschätzung des linearen Konzentrationsbereich in der LAC	177
B.5. Kalibrierung der 90° Pulslänge für Polystyrol in Acetonitril	178

B.6. Lösungsmittelunterdrückung während einer Gradientenelution	179
C. Anhang: Experimentelle Durchführung und Zusatzinformationen zur FT-LC	181
C.1. Durchführung einer FT-LC Messung	181
C.1.1. Herstellung der Verbindung zur UDC-Box	181
C.1.2. Vorbereiten der FT-LC Messung	182
C.2. Linearitätsgrenze der UV Detektoren für PS-Standards	184
C.3. Effekt gelöster Gaskomponenten auf eine FT-SEC Messung	186
C.4. Einfluss der Periode auf die Amplitude des Antwortchromatogramms	188

Teil I.

Einleitung und Motivation

1. Einleitung und Motivation

Magnetische Kernspinresonanz (NMR) Spektrometer gehören zu den informationsreichsten Detektoren für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und ermöglichen einzigartige Einblicke in die chemische Struktur der Analyten. Mit dem Aufkommen der benchtop NMR Spektrometer ist dieser Detektor potentiell einem breiten Anwenderspektrum zugänglich. Allerdings sind die Anwendungsmöglichkeiten derzeit aufgrund der begrenzten Sensitivität der benchtop NMR Spektrometer stark eingeschränkt. Daher werden in dieser Dissertation Methoden zur Sensitivitätssteigerung in der HPLC-benchtop NMR Kopplung unter Verwendung von protonierten HPLC Lösungsmitteln entwickelt.

1.1. Einführung

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) ist eine Trennmethode zur Isolierung und Identifizierung von Analyten in Gemischen.[2] Bei der HPLC werden die getrennten Analyten üblicherweise anhand ihrer Retentionszeiten identifiziert, was einen Vergleich mit Referenzmaterialien erfordert.[3] Zur Steigerung der Effizienz dieser Analytik wird an der Kombination der HPLC mit Charakterisierungsmethoden geforscht, um die molekulare Auftrennung und Charakterisierung in einem Messvorgang zu ermöglichen.[4–6] Zu den informationsreichsten Detektoren gehören magnetische Kernspinresonanz- (*nuclear magnetic resonance*, NMR), Infrarot- (IR) sowie Massenspektrometer (MS). Diese Detektoren erlauben Rückschlüsse auf die chemische Struktur der Analyten und ermöglichen somit die Identifizierung von Analyten unabhängig von der Retentionszeit. Obwohl MS die höchste Empfindlichkeit aufweist, hat die HPLC-MS Kopplung mit Elektrosprayionisation einige Nachteile, wie z. B. undefinierte Fragmentierung, Beschränkung auf flüchtige Puffer, limitierten Molekulargewichtsbereich sowie lösungsmittelabhängige Analyt-ionisierung.[7–10]. Diese Nachteile gelten nicht für NMR Spektrometer. Die NMR Spektroskopie ermöglicht Einblicke in die molekulare Struktur und ist unter bestimmten Einschränkungen bei den Messparametern quantitativ. Der wesentliche Nachteil der NMR Spektroskopie ist jedoch die geringe Sensitivität.

Die HPLC-NMR Kopplung wird häufig mit Hochfeld NMR Geräten durchgeführt, da eine hohe Empfindlichkeit erforderlich ist, um die niedrige Analytkonzentration nach der HPLC Trennung zu kompensieren.[11, 12] Seit etwa 2010 sind auf Permanentmagneten basierende Niederfeld *benchtop* NMR Spektrometer kommerziell erhältlich. Derzeit werden diese Geräte mit Magnetfeldstärken bis etwa 2,3 T (entspricht einer ^1H Larmor Frequenz von 100 MHz) für 5 mm NMR Röhrchen und bis zu 2,9 T (entspricht einer ^1H Larmor Frequenz von 125 MHz) für schmale Kapillarröhrchen angeboten.[13–15] Im Vergleich zu Hochfeld NMR Spektrometern benötigen *benchtop* NMR Spektrometer wesentlich weniger Platz für den Betrieb und haben deutlich geringere Anschaffungs- und Betriebskosten.[16, 17] Ein weiterer Vorteil dieser Geräte ist das horizontale B_0 -Feld, das den Einsatz gewundener Magnetspulen ermöglicht, die einen Faktor 2 – 3 sensitiver sind als die in Hochfeld NMR Spektrometer verwendeten Helmholtzspulen.[18] Die Sensitivität kann mit einem ^1H -optimierten Probenkopf zusätzlich um den Faktor 2 – 3 verbessert werden. Beide Sensitivitätssteigerungen werden in dieser Dissertation genutzt.

Folglich ermöglichen *benchtop* NMR Spektrometer potenziell einem breiteren Anwenderspektrum von der NMR Methodik zu profitieren.

Die effizienteste Durchführung der HPLC-NMR Kopplung ist die *online* Kopplung mit einer NMR Detektion unter *onflow* Bedingungen. Dabei wird von jeder Elutionsvolumeneinheit ein NMR Spektrum aufgenommen, sodass das Chromatogramm spektral aufgelöst werden kann.[19, 20] Die begrenzte Verweilzeit im NMR Detektionsvolumen, die Flusseffekte, die unvollständige Präpolarisierung sowie die Sensitivität limitieren am stärksten die Anwendung der HPLC-*benchtop* NMR Kopplung im *onflow* Modus.[21, 22] Die Bestimmung gering konzentrierter Analyten wird zusätzlich durch die hohe ^1H Konzentration der protonierten Lösungsmittel erschwert.[23] Daher liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Sensitivitätssteigerung und Lösungsmittelunterdrückung in der HPLC-*benchtop* NMR Kopplung.

Dazu werden zunächst in den Kapiteln 2, 3 und 4 die Grundlagen der HPLC, NMR und HPLC-NMR Kopplung dargelegt. Nachfolgend werden in Kapitel 5 die in dieser Arbeit verwendeten Methoden erläutert, bevor in Kapitel 6 die Etablierung und Optimierung der *online* und *onflow* Kopplung eines ^1H optimierten 80 MHz *benchtop* NMR Spektrometers mit der HPLC beschrieben wird. Im Kapitel 7 wird die Entwicklung einer neuen chromatographischen Methode behandelt, mit der zugleich die Sensitivität und Lösungsmittelunterdrückung in der *online* und *onflow* HPLC-NMR Kopplung gesteigert werden kann. Anschließend wird im Kapitel 8 eine Methode vorgestellt, die zur Lösungsmittelunterdrückung in unter statischen Bedingungen aufgenommenen NMR Spektren angewandt werden kann. Diese Methode kann in *offline* HPLC-NMR Messungen mit Fraktionierung verwendet werden, um Signale von Lösungsmitteln oder Kontaminationen zu reduzieren. Abschließend werden im Kapitel 9 die wichtigsten Ergebnisse der Arbeit zusammengefasst und im Kapitel 10 ein Ausblick auf mögliche zukünftige Entwicklungen gegeben.

Teil II.

Theoretische Grundlagen

2. Grundlagen der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ist eine vielseitige Trennmethode, die zur Aufreinigung, Charakterisierung und Quantifizierung molekularer Verbindungen in einer Probe verwendet wird. Dadurch ist diese Methode ein unverzichtbares Werkzeug in der instrumentellen Analytik. Im folgenden Kapitel werden die Grundlagen der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie erläutert, wobei der Schwerpunkt aufgrund der breiten Anwendung auf der Größenausschlusschromatographie und der Adsorptionschromatographie liegt.

2.1. Geschichte und Bedeutung der Flüssigkeitschromatographie

Die Geschichte der Flüssigkeitschromatographie (*liquid chromatography*, LC) begann Anfang des 20. Jahrhunderts. Damals beschrieb M. S. Tswett die Trennung von Pflanzenpigmenten auf einem Cellulose Filterpapier unter Verwendung organischer Lösungsmittel.[24, 25] Diese Methode nannte er Chromatographie, welches zusammengesetzt ist aus den griechischen Wörtern *chroma* (Farbe) und *graphein* (schreiben) und dem deutschen Wort "Farbschreiben"gleichsteht. Die aufgetrennten Substanzen auf der Cellulose nannte er Chromatogramm. Er folgerte, dass die Substanzen aufgrund unterschiedlicher adsorptiven Wechselwirkungen mit der Cellulose aufgetrennt wurden. Diese Adsorptionschromatographie (*liquid adsorption chromatography*, LAC) wurde in den darauf folgenden Jahren weiter entwickelt.[25] Eine bedeutende Neuerung war der Einsatz von Glasröhren, welche mit dem Adsorptionsmittel befüllt wurden.[26] Die Probenlösung wird von oben auf das Adsorbens aufgegeben und mittels unterschiedlichen Lösungsmitteln durch die Säule transportiert. Da das Adsorptionsmittel stationär bleibt, wird dieses als die stationäre Phase bezeichnet, während das Lösungsmittel als mobile Phase bezeichnet wird. Verglichen mit der ursprünglichen Beschreibung von M. S. Tswett verbleiben die aufgetrennten Substanzen nicht mehr auf dem Adsorptionsmittel, sondern werden eluiert. Da die mobile Phase lediglich durch Gravitation oder leichten Druck am Säuleneingang durch die stationäre Phase befördert wird, betrug die Messzeit mehrere Stunden und die Retentionszeiten der Analyten waren schwer reproduzierbar. Aus diesem Grund wurde diese Methode zunächst nur als Trennmethode genutzt.[26] Die aus der Säule austretenden Eluate wurden fraktioniert und im Nachgang charakterisiert. In den darauffolgenden Jahren wurden weitere stationäre Phasen entwickelt, welche Substanzgemische mit unterschiedlichen Mechanismen auftrennten. In den 1950er Jahren wurden erstmals Trennverfahren beschrieben, die auf dem Prinzip des Größenausschlusses beruhen. Diese wurden zunächst als Gelfiltrationschromatographie und Gelpermeationschromatographie bezeichnet, später aber unter dem Begriff Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) zusammengefasst.[25, 27] Die stationären Phasen für die SEC bestanden damals aus vernetzten Dextran-, Acrylamid- und Polystyrolgelen.[25, 28] Technische Verbesserungen ermöglichten schließlich in den 60er Jahren den Einsatz von Pumpen zum Transport der mobilen Phase durch die Säule. Außerdem wurde die Beschaffenheit

der stationären Phase zu sphärischen Partikeln mit geringer Größenverteilung weiterentwickelt, was zu einer höheren und reproduzierbareren Trennleistung führte.[19] Dadurch wurde die Messzeit erheblich verkürzt. Die Retentionszeit konnte nun zur Charakterisierung des Analyten verwendet werden. Zur Bestimmung der Retentionszeit wurde hinter der Säule ein Detektor installiert, der kontinuierlich die physikalischen oder chemischen Eigenschaften der mobilen Phase maß und aufzeichnete. Der vom Detektor aufgezeichnete Elutionsverlauf wird als Chromatogramm bezeichnet. Aufgrund des deutlich höheren Probendurchsatzes wurde die Methode als Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) bezeichnet.[26]

Heutzutage wird standardmäßig die HPLC durchgeführt, weshalb der Begriff LC und HPLC synonym verwendet werden.[29] Die HPLC ist heute die am weitesten verbreitete Methode zur Trennung und Analyse von Gemischen und hat erheblich zum Fortschritt der modernen Gesellschaft beigetragen.[19] Durch die Vielzahl unterschiedlicher Trennmethode, die hohe Empfindlichkeit verbunden mit der Möglichkeit der quantitativen Bestimmung findet die HPLC in vielen Bereichen breite Anwendung. Einige Bereiche davon sind die Pharmazie, Lebensmittelanalytik, Umweltanalytik, klinische Diagnostik und chemische Industrie. Sie wird unter anderem zur Arzneimittelentwicklung, Qualitätskontrolle, Protein- und Kohlenhydratforschung, Identifizierung von Verunreinigungen und in der Polymeranalytik eingesetzt.[3]

2.2. Prinzipien der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die HPLC ist eine Methode zur Trennung von löslichen Stoffgemischen. Dies geschieht durch die Verteilung der Analyten zwischen zwei, miteinander nicht mischbaren, Phasen. Eine Phase ist stationär (stationäre Phase) und die andere mobil (mobile Phase). Moderne stationäre Phasen bestehen häufig aus sphärischen, porösen Partikeln in einer Säule. Die Moleküle diffundieren in die Poren der Partikel und wechselwirken mit deren Oberfläche. Die mobile Phase dient dazu, die gelöste Probe durch die stationäre Phase zu transportieren und besteht aus einem Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch. Durch die Wechselwirkung zwischen den Analytmolekülen und der stationären Phase werden diese, abhängig von der molekularen Beschaffenheit, zwischen den zwei Phasen verteilt. Zur Beschreibung der Analytverteilung wird der in Gleichung 2.2.1 beschriebene Verteilungskoeffizient K_d verwendet, welcher der Quotient aus der Analytkonzentration in der stationären Phase c_{stat} und in der mobilen Phase c_{mob} ist,[30]

$$K_d = \frac{c_{\text{stat}}}{c_{\text{mob}}}. \quad (2.2.1)$$

Der K_d hängt von der Beschaffenheit der stationären Phase und der mobilen Phase ab sowie von den chemisch-physikalischen Analyteigenschaften. Eine thermodynamische Beschreibung des K_d Wertes ist durch die Gibbs Helmholtz Gleichung 2.2.2 gegeben,[31]

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S = -R \cdot T \cdot \ln(K_d), \quad (2.2.2)$$

mit dem thermodynamischen Potential ΔG , der Enthalpie ΔH , der Entropie ΔS , der absoluten Temperatur T , und der idealen Gaskonstante R . [31] Durch Umstellen der Gleichung 2.2.2 nach K_d wird die Gleichung 2.2.3 erhalten,[31]

$$\ln(K_d) = \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{R \cdot T}. \quad (2.2.3)$$

Abhängig vom Einfluss von ΔH und ΔS auf die Trennung ist eine Einordnung der HPLC Methoden in drei Kategorien möglich: (1) die Adsorptionschromatographie (*liquid adsorption chromatography*, LAC), bei der die Trennung hauptsächlich durch die Enthalpie ΔH erfolgt, (2) die Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC), bei der die Trennung hauptsächlich aufgrund der

Entropie ΔS geschieht und (3) die Flüssigchromatographie am kritischen Punkt (*liquid chromatography at critical conditions*, LCCC), bei der $\Delta H/T = \Delta S$ und ΔG somit Null ist.[31]

Abhängig vom K_d Wert unterscheidet sich die Intensität der Wechselwirkung des Analyten mit der Säule (Retardierung). Aufgrund unterschiedlicher K_d Werte wird ein Analytgemisch in voneinander getrennte Banden separiert. Sobald die Banden von der Säule eluieren, werden diese mit einem Detektor analysiert. Die Zeit von der Probeninjektion bis zur Detektion des Maximums der jeweiligen Analytbande wird als Retentionszeit bezeichnet.[19] Falls der Detektor keine chemischen Informationen bereitstellt, erfolgt die Charakterisierung des Analyten durch einen Vergleich der Retentionszeiten mit einem bekannten Standard. Je mehr das Verteilungsgleichgewicht auf der Seite der stationären Phase liegt, desto länger wird der Analyt retardiert, wodurch die Retentionszeit zunimmt.

In einem realen chromatographischen System geschieht die Trennung immer sowohl durch ΔH als auch durch ΔS . Daher wird zur Beschreibung des Retentionsvolumens V_{ret} sowohl der Verteilungskoeffizienten für die SEC K_{SEC} als auch für die LAC K_{LAC} verwendet, wie in Gleichung 2.2.4 dargestellt,[10]

$$V_{ret} = V_0 + V_p \cdot K_{SEC} + V_{stat} \cdot K_{LAC}, \quad (2.2.4)$$

mit dem interpartikulären Volumen V_0 , dem Porenvolumen V_p und dem für die Adsorption zur Verfügung stehenden aktiven Volumen der stationären Phase V_{stat} .

Der Zusammenhang zwischen dem V_{ret} und der Retentionszeit t_{ret} ist durch die Flussrate der mobilen Phase F gegeben, wie in Gleichung 2.2.5 beschrieben,[11]

$$t_{ret} = \frac{V_{ret}}{F}. \quad (2.2.5)$$

Neben der verwendeten HPLC Methode wird der Elutionsverlauf durch das Molekulargewicht der Analyten beeinflusst. In Abbildung 2.1 sind typische Elutionskurven als Funktion des Molekulargewichts für die LAC, SEC und LCCC skizziert. Da in dieser Arbeit die LAC und SEC verwendet wurden, wird im Folgenden auf beide Methoden weiter eingegangen.

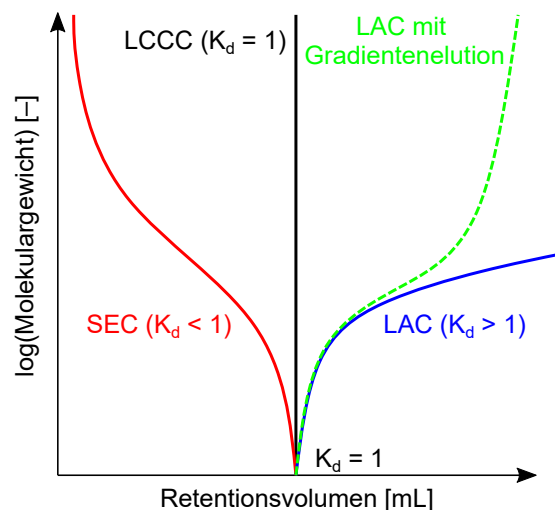


Abbildung 2.1: Einfluss des Molekulargewichts auf das Retentionsvolumen für die Größenausschlusschromatographie (SEC), die Adsorptionschromatographie (LAC) und die Flüssigchromatographie am kritischen Punkt (LCCC). Für die LAC wurde neben dem Verlauf für eine isokratische Messung zusätzlich der Verlauf für eine Gradientenelution aufgezeigt. Bei der Gradientenelution wird die Zusammensetzung der mobilen Phase während der Trennung verändert, um die Elutionsstärke zu erhöhen.[22, 31]

2.2.1. Grundlagen der Adsorptionschromatographie

Die Trennung der Analyten in der idealen LAC erfolgt durch enthalpische Wechselwirkungen zwischen dem Analyten und der stationären Phase, wie z. B. Van-der-Waals Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen sowie Dipol-Dipol und elektrostatische Wechselwirkungen.[32, 33] Wie in Abbildung 2.1 gezeigt, nimmt in der LAC das Elutionsvolumen für Polymere mit dem Molekulargewicht zu. Dies ist darauf zurückzuführen, dass mit zunehmender Kettenlänge die enthalpischen Wechselwirkungen zunehmen.[31] Aufgrund dessen wird diese Methode oft für die Trennung kleiner Moleküle angewandt. Die Ausbildung der enthalpischen Wechselwirkungen hängt von den Analyteigenschaften sowie der Beschaffenheit der stationären und mobilen Phase ab. Die Fähigkeit der mobilen Phase, den Analyt von der stationären Phase zu lösen wird Elutionsstärke genannt. Stationäre Phasen für die LAC bestehen oft aus Partikeln basierend auf Silicagel. Diese weisen unterschiedliche Modifikationen auf, wodurch die Polarität der stationären Phase beeinflusst wird. Ist die Polarität der stationären Phase höher als die der mobilen Phase, wird von der Normalphasen (*normal phase*, NP)-LAC gesprochen. Ist der Polaritätsunterschied umgekehrt, wird von der Umkehrphasen (*reversed phase*, RP)-LAC gesprochen. Die häufigste genutzte HPLC Methode ist die RP-LAC, weshalb die Begriffe HPLC und RP-LAC oft synonym verwendet werden.[26] Bei der RP-LAC werden die Silanolgruppen (SiOH) der Silicagel-Partikel mit Organosilanen umgesetzt, wobei die Modifizierung mit $\text{Cl-Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}_{18}$ die am häufigsten gewählte Modifizierung ist.[19] Bei der RP-LAC geschieht die Trennung aufgrund hydrophober Wechselwirkungen (Van-der-Waals Kräfte).[32] Deshalb nimmt die Retardierung zu, je unpolarer das Molekül ist. Als mobile Phase wird ein Lösungsmittelgemisch bestehend aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel verwendet, wobei die Elutionsstärke mit dem Gehalt an organischen Lösungsmitteln zunimmt. Die Elutionsstärke des organischen Lösungsmittels steigt mit abnehmender Polarität an und kann aus Tabellen in entsprechenden Fachbüchern entnommen werden (vgl. S. 228, Tabelle 10.1, in[19]). Bleibt die Lösungsmittelzusammensetzung während einer HPLC Messung konstant, wird von isokratischen Bedingungen gesprochen. Da in der LAC, wie in Abbildung 2.1 gezeigt, das Retentionsvolumen mit dem Molekulargewicht zunimmt, wird die Trennung oft durch Anpassung der Lösungsmittelzusammensetzung während des Trennvorgangs verbessert. Dies wird dann als Gradientenelution bezeichnet.[19] Die Gradientenelution kann auch angewandt werden, um die Trennung von Analyten mit stark unterschiedlichen Polaritäten zu verbessern.[19, 34] Dadurch werden die Gesamtmesszeit reduziert und die Analytbanden fokussiert.[34]

2.2.2. Grundlagen der Größenausschlusschromatographie

In der SEC werden Moleküle aufgrund ihres hydrodynamischen Volumens V_h durch partiellen sterischen Ausschluss in der stationären Phase aufgetrennt. Die stationären Phasen für die SEC bestehen aus semirigiden partikulären Materialien mit definierten Porengrößenverteilungen, im Bereich von 30 – 4000 Å.[10] Für Proben in organischen Lösungsmitteln werden dafür beispielsweise Copolymere aus Polystyrol und Divinylbenzol genutzt (*styrene divinylbenzene copolymer*, SDV), wohingegen für wasserlösliche Proben hydrophile Polymere genutzt werden, wie z. B. Gele aus Polyacrylamid, Polyglycerylmethacrylat, Polyvinylalkohol oder Polystyrolsulfonat.[35, 36] Da die Moleküle aufgrund des hydrodynamischen Volumens getrennt werden, wird diese Methode hauptsächlich für die Bestimmung von Molekulargewichtsverteilungen von Makromolekülen und Polymeren genutzt.[29] Bei idealer SEC erfolgt die Trennung ausschließlich durch den Größenausschlussmechanismus, wie in Gleichung 2.2.6 beschrieben wird,

$$K_d = K_{\text{SEC}}. \quad (2.2.6)$$

In Abhängigkeit von V_h ist unterschiedlich viel Porenvolumen V_p zugänglich, vgl. Gleichung 2.2.4, S. 9, so dass mit abnehmenden V_h die Diffusionsstrecke und damit die Retentionszeit zunimmt. Ist V_h so

klein, dass das gesamte V_p zur Verfügung steht, ist $K_{SEC} = 1$. Das Retentionsvolumen entspricht dann der Summe aus V_p und dem interpartikulären Volumen V_0 und ist maximal. Das Molekulargewicht bei diesem V_h wird als Permeationsgrenze bezeichnet. Mit steigendem V_h steht weniger V_p zur Verfügung, weshalb die Retentionszeit für größere Moleküle abnimmt. Ist V_h größer als die Porengröße, so ist $K_d = 0$, womit das Retentionsvolumen V_0 entspricht. Diese Molekülgröße wird als Ausschlussgrenze bezeichnet. Eine effektive Trennung einer Probe in die Bestandteile findet somit statt, wenn die V_h innerhalb der Porengrößenverteilung liegen und somit $0 < K_{SEC} < 1$ gilt.

Zur Molekulargewichtsbestimmung einer Polymerprobe wird zuerst eine Molekulargewichtskalibrierung erstellt. Hierfür werden Polymer-Kalibrierstandards gemessen und das Molekulargewicht am Peakmaximum M_p gegen das entsprechende Retentionsvolumen V_{ret} aufgetragen, wie in Abbildung 2.2a dargestellt. Für die Auswertung einer Probemessung wird mithilfe der Kalibrierung die Molekulargewichtsverteilung errechnet, gezeigt in Abbildung 2.2b.

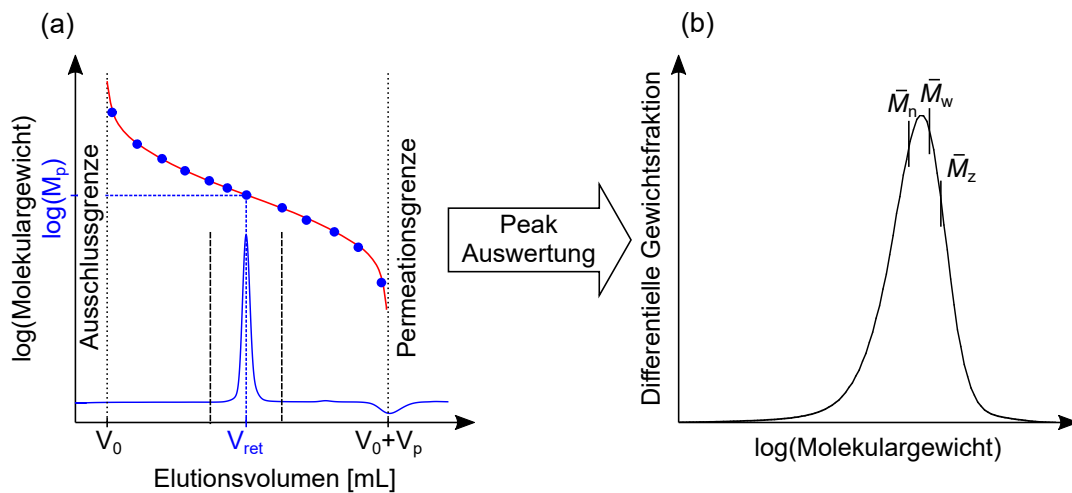


Abbildung 2.2: Darstellung einer Molekulargewichtsbestimmung mittels SEC. (a) Eine Molekulargewichtskalibrierung wird erstellt, indem von verschiedenen Polymerstandards das Molekulargewicht am Peakmaximum M_p gegen das Elutionsvolumen aufgetragen wird. Beispielhaft ist ein Chromatogramm einer SEC Messung eines Polymerstandards mit markierten M_p gezeigt. Die Permeationsgrenze kann durch den negativen Systempeak definiert werden. Der Systempeak entsteht durch die Elution von gelösten Luftbestandteilen, wie H_2O , N_2 und O_2 . [37] (b) Zur Molekulargewichtsbestimmung wird der Peak im Chromatogramm ausgewählt (schwarze, gestrichelte Linie in (a)) und mithilfe der Molekulargewichtskalibrierung das Elutionsvolumen in das entsprechende Molekulargewicht umgerechnet. Die Molekulargewichtsverteilung wird durch unterschiedliche Größen beschrieben. Eingezeichnet ist das Zahlenmittel \bar{M}_n , Gewichtsmittel \bar{M}_w und das "Z" Mittel \bar{M}_z des Molekulargewichts. [10]

Zur Charakterisierung der Molekulargewichtsverteilung wird oft das Zahlenmittel \overline{M}_n , das Gewichtsmittel \overline{M}_w und das "Z" Mittel \overline{M}_z der Molekulargewichte sowie der Dispersitätsindex \mathcal{D} herangezogen, die mit den Gleichungen 2.2.7, 2.2.8, 2.2.9 und 2.2.10 berechnet werden,[38]

$$\overline{M}_n = \frac{\sum(N_i \cdot M_i)}{\sum(N_i)}, \quad (2.2.7)$$

$$\overline{M}_w = \frac{\sum(N_i \cdot M_i^2)}{\sum(N_i \cdot M_i)}, \quad (2.2.8)$$

$$\overline{M}_z = \frac{\sum(N_i \cdot M_i^3)}{\sum(N_i \cdot M_i^2)}, \quad (2.2.9)$$

$$\mathcal{D} = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n}, \quad (2.2.10)$$

wobei N_i die Anzahl der einzelnen Polymerketten mit dem jeweiligen Molekulargewicht M_i und \mathcal{D} ein Maß für die Uneinheitlichkeit von \overline{M}_n und \overline{M}_w ist.

2.3. Bandenverbreiterung und die Van-Deemter Kurve

Für die Probenanalyse mittels HPLC wird typischerweise ein kleines Probenvolumen im Bereich von ca. 10 – 1000 μL in die Säule injiziert.[19] Wie in Abbildung 2.3 dargestellt, kann dieses Injektionssignal als rechteckiges Konzentrations-Volumen-Profil dargestellt werden, wobei die Höhe der Probenkonzentration und die Breite dem Injektionsvolumen entspricht.[39] Die blau eingezeichnete Fläche (Integral) entspricht der injizierten Masse.

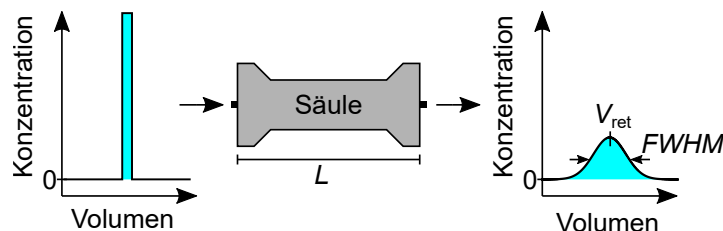


Abbildung 2.3: Die Bandenverbreiterung beschreibt das Phänomen der Verbreiterung des rechteckigen Konzentrationsprofils der injizierten Probenlösung während der HPLC Trennung. Die Verbreiterung innerhalb der Säule wird für Konzentrationen im linearen Konzentrationsbereich sowie für isokratisch und isotherm aufgenommene Messungen durch die Van-Deemter Kurve beschrieben (siehe Abbildung 2.4). Zur Charakterisierung der Bandenverbreiterung wird die Bodenhöhe H mit Gleichung 2.3.2 in Verbindung mit Gleichung 2.3.1 bestimmt. Dafür wird das Retentionsvolumen V_{ret} , die Halbwertsbreite $FWHM$ und die Säulenlänge L ausgewertet.[40]

Die reale Form des Injektionssignals weicht von dieser idealisierten Darstellung ab und wird von der Flussrate, dem Injektionsvolumen und der Viskosität der mobilen Phase beeinflusst.[19] Nach der Injektion wird das Injektionssignal durch Diffusionsprozesse verbreitert. Die Bandenverbreiterung ist ein wichtiger Parameter in der HPLC, da diese sich negativ auf die chromatographische Auflösung und

die Empfindlichkeit auswirkt. Die Bandenverbreiterung wird durch die theoretische Bodenzahl N und die Bodenhöhe H charakterisiert, wie in den Gleichung 2.3.1 und 2.3.2 dargestellt,

$$N = 5,55 \cdot \left(\frac{V_{\text{ret}}}{FWHM} \right)^2, \quad (2.3.1)$$

$$H = \frac{L}{N}, \quad (2.3.2)$$

mit dem Retentionsvolumen V_{ret} , der Halbwertsbreite $FWHM$ (*full width at half maximum*) und der Säulenlänge L .

Die Bandenverbreiterung tritt sowohl außerhalb als auch innerhalb der Säule auf.[41, 42] Die Bandenverbreiterung außerhalb der Säule entsteht durch unterschiedliche Strömungsgeschwindigkeiten des laminaren Flussprofils sowie durch radiale Diffusion im Totvolumen des Injektors, der Kapillaren, den Kapillarverbindungsstücken und der Detektorflusszellen.[19, 43] Die Bandenverbreiterung innerhalb der Säule ist abhängig von der Flussrate F und wird durch die Van-Deemter Gleichung 2.3.3 beschrieben und erfolgt durch die Eddy Diffusion A , der Längsdiffusion B und den Stoffaustauschphänomenen C , [28, 29]

$$H = A + \frac{B}{F} + C \cdot F. \quad (2.3.3)$$

Der von Van-Deemter beschriebene Zusammenhang zwischen der Bodenhöhe H und der Flussrate F ist in Abbildung 2.4 dargestellt.[30] Die Van-Deemter Kurve in Abbildung 2.4 besitzt bei der Flussrate F_{opt} ein Minimum H_{min} , bei welcher die chromatographische Bande am schmalsten ist.

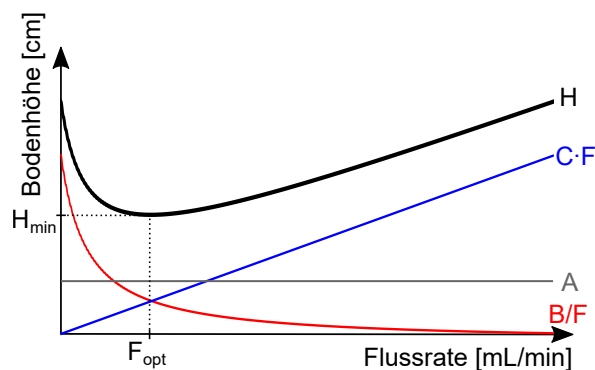


Abbildung 2.4: Beschreibung des Zusammenhangs zwischen der Bandenverbreiterung und der Flussrate anhand der Van-Deemter Gleichung 2.3.3. Die Bodenhöhe H ist ein Maß für die Bandenverbreiterung und steht durch Gleichungen 2.3.1 und 2.3.2 in direktem Zusammenhang zur chromatographischen Peakbreite. Wesentlich für die Bandenverbreiterung ist die Eddy Diffusion A , die Längsdiffusion B , und die Stoffaustauschphänomene C . Die Van-Deemter Kurve besitzt bei einer Flussrate F_{opt} ein Minimum, bei welchem die Bandenverbreiterung minimal ist.[30]

Die Eddy Diffusion beschreibt die Bandenverbreiterung aufgrund der unterschiedlichen Diffusionswege der Analytmoleküle durch die porösen Partikel in der Säule. Die Längsdiffusion beschreibt die Bandenverbreiterung aufgrund der brownischen Molekularbewegung, wodurch Analytmoleküle entlang der Säule diffundieren. Die Stoffaustauschphänomene treten beim Übergang von Analytmolekülen zwischen der stationären und der mobilen Phase auf. Hierbei entsteht die Bandenverbreiterung durch die stark unterschiedlichen Strömungsgeschwindigkeiten zwischen der stationären und der mobilen Phasen. Die Stoffaustauschphänomene hängen von der Diffusionszeit ab, welche die Analytmoleküle benötigen um zwischen den Phasen zu wechseln.

Voraussetzung für die Gültigkeit der Van-Deemter Gleichung ist, dass die HPLC Messung unter isokratischen und isothermen Bedingungen aufgenommen wird und dass die Probenkonzentration im linearen Konzentrationsbereich liegt. Unter dem linearen Konzentrationsbereich wird der Konzentrationsbereich verstanden, in welchem der Verteilungskoeffizient in Gleichung 2.2.1, S. 8, konstant ist.[10, 43]

2.4. Detektion in der HPLC

Detektoren messen chemische oder physikalische Eigenschaften der eluierenden Fraktionen. Ein Detektor erzeugt ein Voltsignal, das mit einem Analog-Digital-Wandler (*analog to digital converter*, ADC) digitalisiert und als Funktion des Elutionsvolumens als Chromatogramm dargestellt wird. Der ideale HPLC Detektor besitzt eine hohe Sensitivität und Selektivität. Zudem sollte er robust, quantitativ, nicht destruktiv und anwenderfreundlich sein, mit einem weiten linearen Bereich. Der lineare Bereich ist der Bereich, in dem das Detektorsignal linear mit der Analytkonzentration ansteigt, wie in Abbildung 2.5 dargestellt.

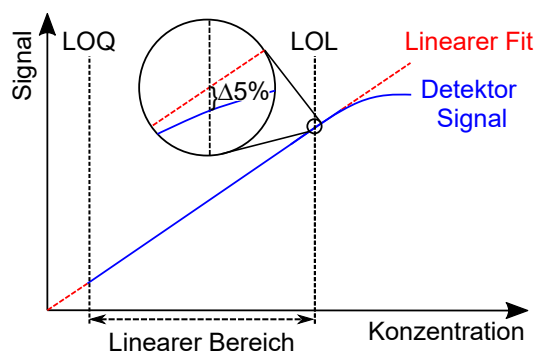


Abbildung 2.5: Definition des linearen Bereichs eines konzentrationsabhängigen HPLC Detektors. Im linearen Bereich steigt das Signal linear mit zunehmender Konzentration an und wird von der Bestimmungsgrenze (LOQ) und der Linearitätsgrenze (LOL) begrenzt. Der ideale Detektor sollte einen möglichst weiten linearen Bereich besitzen.[29, 30]

Der lineare Bereich ist abhängig vom Detektor sowie von den Analyteigenschaften.[30] Im linearen Bereich steigt das Detektorsignal linear mit zunehmender Probenkonzentration an und wird von der Bestimmungsgrenze (*limit of quantification*, LOQ) und der Linearitätsgrenze (*limit of linearity*, LOL) begrenzt. Die LOL ist die Konzentration, bei der das Detektorsignal eine Abweichung von über 5 % von der linearen Zunahme zeigt.[29, 30] Die untere Grenze ist durch das LOQ gegeben. Das LOQ ist die Probenkonzentration, bei der ein Signal-zu-Rausch Verhältnis (*signal to noise ratio*, SNR) von $SNR = 10$ erhalten wird.

HPLC Detektoren können in zwei Kategorien eingeteilt werden: (1) universelle und (2) selektive Detektoren. In Tabelle 2.1 sind häufig genutzte Detektoren aufgelistet.[19, 29, 31] Universaldetektoren messen die Eigenschaften der mobilen Phase, wohingegen selektive Detektoren Informationen über die chemische Identität der Analytmoleküle bereitstellen.

Der UV/VIS Detektor und der Brechungsindexdetektor (*refractive index*, RI) wurden in der vorliegenden Arbeit genutzt, weshalb im Folgenden auf die Funktionsweise dieser Detektoren eingegangen wird.

Tabelle 2.1: Häufig verwendete HPLC Detektoren, unterteilt in universelle und selektive Detektoren, mit typischen Nachweisgrenzen (*limit of detection*, LOD) und Größen der linearen Konzentrationsbereiche.[19, 29, 31]

Selektiv			Universell		
Detektor	LOD	Linearität	Detektor	LOD	Linearität
UV/VIS	pg – ng	10 ⁴	DRI ^c	ng – µg	10 ³
Fluoreszenz	fg – pg	10 ⁵	Lichtstreuung	ng – µg	10 ⁵
MS ^a	fg – pg	10 ⁵			
FTIR ^a	ng – µg	10 ³			

^a Massenspektrometrie, ^b Fourier-Transformation Infrarot Spektroskopie, ^c Differentialbrechungsindex (*differential refractive index*)

2.4.1. Funktionsweise eines UV/VIS Detektors

Die UV/VIS Detektion basiert auf der Adsorption von elektromagnetischer Strahlung im ultravioletten (UV) und sichtbaren (*visible*, VIS) Bereich von etwa 190 – 600 nm.[44] Im UV/VIS Detektor durchläuft das Eluat eine Flusszelle, die mit der UV/VIS Strahlung durchstrahlt wird. Die Absorption der Strahlung basiert auf dem Lambert Beer'schen Gesetz, welches in Gleichung 2.4.1 dargestellt ist,

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon \cdot c \cdot d, \quad (2.4.1)$$

mit der Absorption A , der Anfangsintensität der Strahlung I_0 , der Strahlungsintensität nach Durchgang der Flusszelle I , dem Extinktionskoeffizient ϵ , der Konzentration c , und der Weglänge durch die Flusszelle d .[44]

Die Verwendung eines UV/VIS Detektors ist wegen seiner hohen Empfindlichkeit (typischer LOD im pg – ng Bereich, siehe Tabelle 2.1), seines großen linearen Bereichs, seiner Robustheit und seiner relativ geringen Anschaffungs- und Betriebskosten weit verbreitet.[45] Für die Detektion ist es notwendig, dass der Analyt ein Chromophor besitzt, das UV oder sichtbares Licht absorbiert. Chromophore können beispielsweise ein aromatisches System, eine Doppelbindung oder Carbonylgruppe sein.[46] Die UV/VIS Detektion liefert daher nur begrenzte chemisch selektive Informationen. Neben dem Vorhandensein von Chromophoren ist eine Voraussetzung für den Einsatz eines UV/VIS Detektors, dass das Lösungsmittel bei der verwendeten Wellenlänge möglichst nicht absorbiert.[47]

2.4.2. Funktionsweise eines Brechungsindexdetektor

Ein Differentialbrechungsindex (DRI) Detektor misst Änderungen des Brechungsindex der mobilen Phase. Wenn sich die Zusammensetzung der mobilen Phase verändert, beispielsweise durch die Elution vom Analyten, ändert sich der Brechungsindex. Der Brechungsindex ist definiert als der Unterschied der Lichtgeschwindigkeit im Vakuum v_0 , zu der im Medium i , v_i , wie in Gleichung 2.4.2 dargestellt,

$$n_i = \frac{v_0}{v_i}. \quad (2.4.2)$$

Wie in Gleichung 2.4.3 beschrieben ist die Änderung des Brechungsindex bei der Probenelution abhängig von der Probenkonzentration,[35]

$$n_{i,c} = n_0 + (n_i - n_0) \cdot c_i, \quad (2.4.3)$$

mit dem Brechungsindex $n_{i,c}$ bei der Elution der Substanz i mit der Konzentration c_i , dem Brechungsindex der mobilen Phase n_0 , dem Brechungsindex der Probe i , n_i . Die Differenz von $n_{i,c}$ und n_0 wird mittels zwei Flusszellen, einer Mess- und einer Referenzzelle, gemessen. Während die Referenzzelle mit der mobilen Phase mit konstanter Lösungsmittelzusammensetzung befüllt ist, wird die Messzelle kontinuierlich mit dem Eluat durchflossen. Beide Flusszellen werden mit derselben Lichtquelle durchstrahlt. Ändert sich durch die Analytelution der Brechungsindex in der Messzelle, ändert sich somit der Austrittswinkel des Lichtes aus der Messzelle, welches mittels Photodioden in ein Detektorsignal umgewandelt wird.[35]

Der DRI Detektor ist somit ein universeller Detektor, der Informationen über die mittlere Elektronendichte bereitstellt. Die Voraussetzung für die Anwendung des DRI Detektors ist, dass der Brechungsindex des Lösungsmittels von dem des Analyten unterschiedlich ist. Die Anwendbarkeit eines DRI ist auf isokratische HPLC Messungen beschränkt. Zudem ist die Detektionsmethode relativ unempfindlich (typischer LOD im Bereich $\text{ng} - \mu\text{g}$, siehe Tabelle 2.1, S. 15). Zudem ist der DRI Detektor anfällig für Temperatur- und Druckschwankungen.[29]

3. Grundlagen der magnetischen Kernspinresonanzspektroskopie

Die NMR Spektroskopie ist eine leistungsstarke Methode, welche in vielen unterschiedlichen Bereichen eingesetzt wird, darunter in der Analytik, Medizin, Forschung und Industrie. Bei dieser Methode werden Kernspinübergänge in Molekülen beobachtet, wodurch Informationen über die molekulare Struktur, Dynamik und deren Quantität sowie über intermolekulare Wechselwirkungen zugänglich werden. In diesem Kapitel werden die grundlegenden Konzepte der NMR Spektroskopie dargelegt. Ein Schwerpunkt liegt auf benchtop NMR Spektrometer, da diese Geräte im Vergleich zu Hochfeld NMR Spektrometern günstiger, platzsparender und benutzerfreundlicher sind, was sie für ein breiteres Anwenderspektrum zugänglich macht.

3.1. Geschichte und Bedeutung der NMR-Spektroskopie

Die NMR Spektroskopie wurde Mitte des 20. Jahrhunderts zum ersten Mal von Felix Bloch und Edward Purcell experimentell untersucht.[48, 49] Damals wurde erkannt, dass Atomkerne in einem Magnetfeld elektromagnetische Strahlung absorbieren und dass die Frequenz, bei der die Strahlung absorbiert wird (Resonanzfrequenz), von den chemischen Bindungen des Kerns abhängt.[50] Die Veränderung der Resonanzfrequenzen wurde als chemische Verschiebung bezeichnet und wurde neben der Spin-Spin Kopplung bereits in den 1950er Jahren genutzt, um molekulare Strukturen aufzuklären. Damals wurde die *continuous wave* (CW) Methode verwendet, bei der jede Resonanzfrequenz einzeln gemessen wurde. Da diese Methode eine relativ lange Messzeit benötigte und eine geringe Empfindlichkeit aufwies, wurde diese in den 1960er Jahren durch die gepulste Fourier-Transformation (FT)-NMR Spektroskopie abgelöst.[51] Bei der FT-NMR Spektroskopie wird ein multifrequenter Puls eingestrahlt und das gesamte Spektrum auf einmal gemessen. Dadurch ist die FT-NMR Methode wesentlich schneller und empfindlicher als die CW-NMR Methode, weshalb NMR Messungen heute überwiegend mit der FT-NMR Methode aufgenommen werden.[52] Daher werden nachfolgend die Begriffe NMR und FT-NMR synonym verwendet.

Bis in die 1970er Jahre besaßen die NMR Spektrometer Magnetfeldstärken von maximal 2,1 T, was einer ^1H Larmorfrequenz von etwa 90 MHz entspricht. Nach heutigen Maßstäben handelte es sich damals um geringe Magnetfeldstärken, weshalb diese NMR Spektrometer als Niederfeld NMR Spektrometer einzustufen sind. Mit der Einführung supraleitender Magneten in den 1970er Jahren stiegen die Feldstärken signifikant an.[50, 53] Supraleitende Magneten werden heutzutage standardmäßig in Hochfeld NMR Spektrometern verwendet und sind, stand 2024, mit Feldstärken von bis zu 28 T (1,2 GHz ^1H Larmorfrequenz) erhältlich.[54] Mit dem Anstieg der Magnetfeldstärke nahm die Empfindlichkeit zu, wodurch die Messung von ^{13}C Kerne ermöglicht wurde.[55] In den 1980er Jahren wurden unterschiedliche mehrdimensionale NMR Experimente entwickelt, wodurch eine weitere Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Atomkernen durch chemische Bindungen oder durch den Raum

vorgenommen werden konnte. Zusätzlich konnten chemische Austauschprozesse genauer untersucht werden.[50] Darüber hinaus wurden erste Versuche zur Kopplung der NMR Spektroskopie mit der HPLC beschrieben.[50, 56] In den 1990er Jahren wurden kryogen gekühlte Spulen entwickelt, die in Probenköpfen eingesetzt werden können. Dadurch wird das thermische Rauschen deutlich reduziert, was die Empfindlichkeit um einen weiteren Faktor 3 – 5 steigert.[57]

Aufgrund der technologischen Verbesserungen im Magnetdesign und der Elektronik wird seit den 2010er Jahren eine stetige Zunahme der Verwendung der deutlich kompakteren und günstigeren Niederfeld NMR Spektrometern beobachtet.[13] Diese werden mit Permanentmagneten betrieben und sind mit Feldstärken von bis zu 2,3 T (100 MHz ^1H Larmorfrequenz) für 5 mm NMR Röhren und von bis zu 2,9 T (125 MHz ^1H Larmorfrequenz) für kleinere Kapillarschläuche erhältlich.[13, 14] Da diese NMR Geräte auf einer Laborbank betrieben werden können, werden diese auch als *benchtop* NMR Spektrometer bezeichnet. Während die Bezeichnung "Niederfeld NMR Spektrometer" sowohl diese kompakten NMR Spektrometer als auch die ersten NMR Spektrometer aus den Jahren 1950 – 1970 einschließt, bezieht sich "*benchtop* NMR Spektrometer" auf die modernen kompakten NMR Spektrometer. Aufgrund dieser Eindeutigkeit wird daher im Folgenden die Bezeichnung *benchtop* NMR Spektrometer verwendet.

Die NMR Spektroskopie ist heute die vielseitigste und aussagekräftigste spektroskopische Methode zur Aufklärung und Quantifizierung molekularer Strukturen und Dynamiken.[50] Die untersuchten Proben können dabei feste, flüssige oder gasförmige Aggregatzustände aufweisen.[29] Aufgrund des nicht-invasiven Charakters und der Einzigartigkeit der Information, findet die NMR Spektroskopie breite Anwendung in den Bereichen der Physik, Chemie, Biologie und Medizin.[58]

3.2. Beschreibung des Phänomens der magnetischen Kernspinresonanz

Das Phänomen der Kernspinresonanz basiert auf der Wechselwirkung von Atomkernen in einem starken Magnetfeld mit einer elektromagnetischen Strahlung. Atomkerne bestehen aus Protonen und Neutronen und abhängig von der Zusammensetzung des Atomkerns ergibt sich eine Kernspinquantenzahl I , wie in Tabelle 3.1 dargestellt.[59, 60]

Tabelle 3.1: Zusammenhang zwischen der Atomkernzusammensetzung und der Kernspinquantenzahl I . [59, 60]

Zahl Protonen	Zahl Neutronen	I	Isotop
Gerade	Gerade	Null	^{12}C , ^{16}O , ^{32}S
Ungerade	Ungerade	Ganzzahlig	^2H , ^{14}N
Ungerade	Gerade/ Null	Halbzahlig	^1H , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P
Gerade	Ungerade	Halbzahlig	^{13}C , ^{17}O

Die Kernspinquantenzahl I kann null, halbzahlig oder ganzzahlig sein. Nur Atomkerne mit einer Kernspinquantenzahl ungleich null sind NMR aktiv. Für solche Atomkerne bildet sich ein magnetisches Moment $\vec{\mu}$ aus, wie in Gleichung 3.2.1 beschrieben,[61]

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \hbar \cdot \vec{I}, \quad (3.2.1)$$

mit dem gyromagnetischen Verhältnis γ , der reduzierten Planck-Konstante \hbar und dem Operator des Bahndrehimpulses \vec{I} . [60] In Tabelle 3.2 sind die Eigenschaften der wichtigsten NMR-aktiven Isotopen zusammengefasst.[60, 62] Die möglichen Orientierungen des magnetischen Moments $\vec{\mu}$ wird durch die Magnetquantenzahl m_I beschrieben und kann die Werte in Gleichung 3.2.2 annehmen,[60]

$$m_I = I, I - 1, \dots, -I. \quad (3.2.2)$$

Tabelle 3.2: Eigenschaften der wichtigsten Isotope für die NMR Spektroskopie.[60, 62]

Isotop	Natürliche Häufigkeit [%]	Spin	γ [MHz T ⁻¹]
¹ H	99,98	1/2	42,58
² H	0,02	1	6,54
¹⁰ B	18,83	3	4,58
¹¹ B	81,17	3/2	13,66
¹³ C	1,11	1/2	10,71
¹⁴ N	99,64	1	3,08
¹⁵ N	0,36	1/2	4,32
¹⁹ F	100,00	1/2	40,06
²⁹ Si	4,70	1/2	8,46
³¹ P	100,00	1/2	17,24

Somit können die magnetischen Momente $\vec{\mu}$ insgesamt $2 \cdot I + 1$ Ausrichtungen annehmen. Da in der Arbeit ausschließlich ¹H Kerne mittels NMR Spektroskopie untersucht wurden, wird im Folgenden auf ¹H Kerne eingegangen.

Ein ¹H Kern besitzt, wie in Tabelle 3.2 angegeben, einen Kernspin von $I = 1/2$. Die Magnetquantenzahlen für $I = 1/2$ sind $m = +1/2, -1/2$. Wird ein ¹H Kern in ein statisches Magnetfeld B_0 gebracht, so richten sich die magnetischen Momente $\vec{\mu}$ entlang ($m = +1/2$) oder entgegen ($m = -1/2$) den Feldlinien aus, was zu einer Aufspaltung der Energieniveaus beider Zustände führt, wie in Abbildung 3.1a gezeigt.

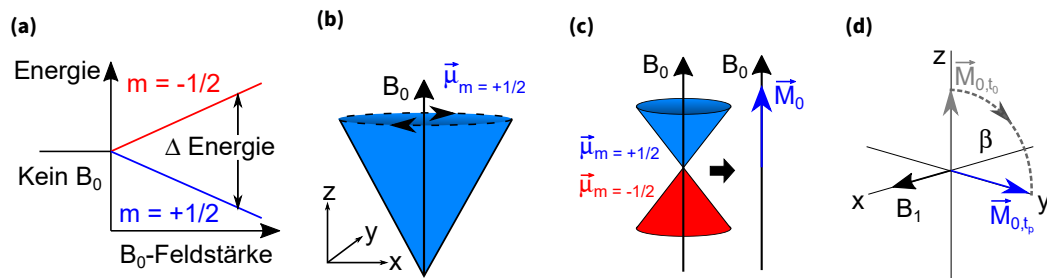


Abbildung 3.1: (a) Energieaufspaltung aufgrund der unterschiedlichen Magnetquantenzahlen m des Kernspins, abhängig von der B_0 -Feldstärke.[62] (b) Das magnetische Moment $\vec{\mu}$ eines Atomkerns mit $m = +1/2$ präzediert im B_0 -Feld mit der Larmorfrequenz ν_L auf einem Kegelmantel (blau eingefärbt) um die Feldlinie.[60] (c) Aufgrund der Energieaufspaltung, gezeigt in (a), gibt es einen Überschuss der $\vec{\mu}$ mit $m = +1/2$, wodurch sich eine makroskopische Magnetisierung \vec{M}_0 entlang des B_0 -Feldes, der z -Achse, ausbildet.[50] (d) Darstellung der \vec{M}_0 im rotierenden Koordinatensystem. Die Auslenkung von \vec{M}_0 um den Winkel β erfolgt durch die Einstrahlung eines weiteren Magnetfeldes B_1 mit der Pulsdauer t_p . [50]

Die Energiedifferenz ΔE zwischen den beiden Energieniveaus nimmt mit der Stärke des anliegenden B_0 -Feldes zu. Mit der Gleichung 3.2.3 kann ΔE als Funktion des B_0 -Feldes berechnet werden,[60]

$$\Delta E = \hbar \cdot \gamma \cdot B_0. \quad (3.2.3)$$

Die magnetischen Momente $\vec{\mu}$ präzedieren mit der Larmorfrequenz ν_L auf einer Kegelfunktion, die entweder parallel ($m = +1/2$) oder antiparallel ($m = -1/2$) zu den B_0 -Feldlinien ausgerichtet ist, wie in Abbildung 3.1b skizziert.[60] Die Larmorfrequenz hängt von der B_0 -Feldstärke ab und ist mit Gleichung 3.2.4 berechenbar,[62]

$$\nu_L = \gamma \cdot B_0. \quad (3.2.4)$$

Aufgrund der unterschiedlichen Energieniveaus der beiden möglichen Orientierungen ergibt sich ein Besetzungsüberschuss für die energieärmere $m = +1/2$ Orientierung. Dieser Besetzungsüberschuss kann mit Gleichung 3.2.5 berechnet werden,[63]

$$\frac{N_{m = +1/2}}{N_{m = -1/2}} = \exp\left(\frac{\Delta E}{k_B \cdot T}\right), \quad (3.2.5)$$

mit der Populationsanzahl N , der Boltzmannkonstante k_B und der absoluten Temperatur T in Kelvin. Aus Gleichung 3.2.5 in Kombination mit Gleichung 3.2.3 ist ersichtlich, dass der Populationsunterschied mit der B_0 -Feldstärke zunimmt. Beispielfhaft liegt bei einem Magnetfeld von 1,88 T (entspricht für ^1H Kerne $\nu_L = 80$ MHz) und 300 K ein Überschuss von 0,0013 % im energieärmeren $N_{m = +1/2}$ Zustand vor, wohingegen es bei 28,2 T (entspricht für ^1H Kerne $\nu_L = 1,2$ GHz) und 300 K 0,0192 % sind.

Durch den Besetzungsunterschied bildet sich nach Gleichung 3.2.6 ein makroskopischer Magnetisierungsvektor \vec{M}_0 entlang der B_0 -Feldrichtung aus, welcher schematisch in Abbildung 3.1c gezeigt ist.[50, 64]

$$\vec{M}_0 = \sum_{i=1}^n \vec{\mu}_i. \quad (3.2.6)$$

Je größer der Populationsunterschied, desto größer ist \vec{M}_0 und damit letztlich auch das NMR Messsignal. Die zeitlich abhängige Präzession von $\vec{M}_0(t)$ im statischen B_0 -Feld wird durch die Bloch-Gleichungen 3.2.7 beschrieben,[64]

$$\vec{M}_0(t) = \begin{pmatrix} M_x(t) \\ M_y(t) \\ M_z(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} M_x(0) \cos(\omega_L t) - M_y(0) \sin(\omega_L t) \\ M_y(0) \cos(\omega_L t) + M_x(0) \sin(\omega_L t) \\ M_z(0) \end{pmatrix}, \quad (3.2.7)$$

mit $\omega_L = 2\pi\nu_L$.

Für die weitere Diskussion wird \vec{M}_0 im rotierenden Koordinatensystem betrachtet. Zur Umorientierung von \vec{M}_0 wird ein, mit ω_L oszillierendes, Magnetfeld B_1 für die Pulsdauer t_p senkrecht zum B_0 -Feld eingestrahlt. Dadurch wird ein Drehmoment auf \vec{M}_0 ausgeübt und die Ausrichtung geändert, wie in Gleichung 3.2.8 veranschaulicht wird,[65]

$$\frac{d\vec{M}_0}{dt} = 2\pi\gamma \left[\begin{pmatrix} M_x \\ M_y \\ M_z \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} B_1 \cos(\omega_L t) \\ -B_1 \sin(\omega_L t) \\ B_0 \end{pmatrix} \right] = \begin{pmatrix} 2\pi\gamma(M_y B_0 + M_z B_1 \sin(\omega_L t)) \\ 2\pi\gamma(M_z B_1 \cos(\omega_L t) - M_x B_0) \\ 2\pi\gamma(-M_x B_1 \sin(\omega_L t) - M_y B_1 \cos(\omega_L t)) \end{pmatrix}. \quad (3.2.8)$$

In Abbildung 3.1d ist dies illustriert für den Fall, dass das B_1 -Feld entlang der x-Achse eingestrahlt wird. Der Rotationswinkel von \vec{M}_0 wird durch Gleichung 3.2.9 beschrieben und hängt von der B_1 -Feldstärke und der Pulslänge t_p ab,

$$\beta = 2\pi\gamma \cdot B_1 \cdot t_p. \quad (3.2.9)$$

Nachdem \vec{M}_0 um den gewünschten Winkel β von der z-Achse (B_0 -Feld Richtung) in die x,y-Ebene ausgelenkt ist, wird das B_1 -Feld wieder ausgeschaltet. In der x,y-Ebene befindet sich eine Detektionsschleife, in der durch die Präzession von \vec{M}_0 eine Spannung durch Induktion erzeugt wird. Das gemessene Volt-Signal oszilliert daher und besitzt die maximale Intensität, wenn \vec{M}_0 komplett in der x,y-Ebene ist.[66]

Der Zusammenhang des Signal-zu-Rausch Verhältnisses (SNR) eines NMR Signals mit der B_0 -Feldstärke ist in Gleichung 3.2.10 dargestellt,[67, 68]

$$SNR \propto B_0^{3/2} \cdot \gamma^{5/2} \cdot ns^{1/2} \cdot c, \quad (3.2.10)$$

wobei ns die Anzahl der Messungen (*number of scans*) und c die Probenkonzentration ist. Wie aus Gleichung 3.2.10 hervorgeht, steigt das SNR proportional zur Quadratwurzel der Anzahl der Scans. Dies

ist darauf zurückzuführen, dass durch die Signalmittelung das stochastische Rauschen proportional zur Quadratwurzel der Anzahl der Scans abnimmt. Da die Anzahl der Scans durch die Messzeit begrenzt ist, wird zur Abschätzung der Empfindlichkeit einer NMR Methode das SNR der NMR Messung auf die Quadratwurzel der Messzeit normiert.

Nach dem B_1 -Puls finden Relaxationsprozesse statt, wodurch sich \vec{M}_0 entlang der z -Achse wieder aufbaut und in der x,y -Ebene abnimmt. Daher nimmt das NMR Signal mit zunehmender Messzeit ab. Das abnehmende Messsignal wird deshalb auch als freier Induktionszerfall (*free induction decay*, FID) bezeichnet.

3.2.1. Visualisierung eines NMR Experiments als Pulssequenz

Die Beschreibung der experimentellen Durchführung einer NMR Messung wird Pulssequenz genannt. Der Ablauf einer Pulssequenz kann durch das Aneinanderreihen graphischer Elemente veranschaulicht werden.[50] Beispielhaft ist in Abbildung 3.2 die Pulssequenz einer einfachen ^1H NMR Messung dargestellt.

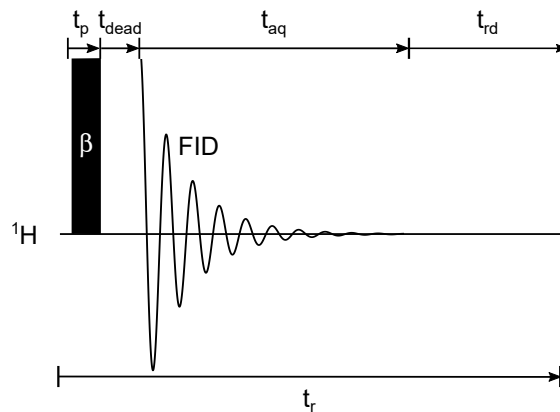


Abbildung 3.2: Visualisierung einer Pulssequenz für ^1H Kerne. Die Wiederholzeit t_r beschreibt die Gesamtdauer der Pulssequenz (eines Scans) und ist die Summe aus der Pulsdauer t_p (für $\beta = 90^\circ$, $t_p = 9 \mu\text{s}$), der Totzeit t_{dead} von $100 \mu\text{s}$ zwischen dem Puls und dem Beginn der Datenaufnahme, der Datenaufnahmezeit t_{aq} zwischen $0,26$ und $4,0$ s sowie einer Wartezeit am Ende t_{rd} von $0,1$ s, die zur Verarbeitung der Daten benötigt wird.

Der B_1 -Puls, dargestellt als schwarzes Rechteck, mit der Dauer t_p rotiert \vec{M}_0 um β , entsprechend Gleichung 3.2.9, S. 20. Nach einer kurzen Totzeit t_{dead} beginnt die Datenerfassung des FIDs mit der Dauer t_{aq} . Die Totzeit wird benötigt um Artefakte durch das abklingende B_1 -Feld in der Detektionsspule zu vermeiden. Es folgt eine kurze Wartezeit am Ende t_{rd} , die zur Datenverarbeitung benötigt wird. Die Gesamtdauer der Pulssequenz entspricht der Wiederholzeit t_r . Die einmalige Durchführung der Pulssequenz wird Scan genannt.

3.2.2. Relaxationsmechanismen in der NMR Spektroskopie

Wird die \vec{M}_0 durch einen B_1 -Puls aus dem Gleichgewicht gebracht, finden Relaxationsprozesse statt, die longitudinale Relaxation (auch Spin-Gitter Relaxation oder T_1 Relaxation genannt) und die transversale Relaxation (auch Spin-Spin Relaxation oder T_2 Relaxation genannt). Die T_1 Relaxation beschreibt den Wiederaufbau von \vec{M}_0 entlang der z -Achse (in Richtung des B_0 -Felds) und die T_2 Relaxation beschreibt

den Verlust der Phasenkohärenz der $\vec{\mu}$, was zu einer Abnahme der transversalen Magnetisierung $\vec{M}_{x,y}$ führt. Um dies zu beschreiben wird Gleichung 3.2.8, S. 20, zu Gleichung 3.2.11 erweitert,[65]

$$\frac{d\vec{M}_0}{dt} = \begin{pmatrix} 2\pi\gamma(M_y B_0 + M_z B_1 \sin(\omega_L t)) - \frac{M_x}{T_2} \\ 2\pi\gamma(M_z B_1 \cos(\omega_L t) - M_x B_0) - \frac{M_y}{T_2} \\ 2\pi\gamma(-M_x B_1 \sin(\omega_L t) - M_y B_1 \cos(\omega_L t)) - \frac{M_z - M_0}{T_1} \end{pmatrix}. \quad (3.2.11)$$

Nachfolgend wird auf die T_1 und T_2 Relaxation unter statischen Messbedingungen genauer eingegangen.

3.2.2.1. Longitudinale Relaxation, T_1

Durch Einstrahlung des B_1 -Feldes werden die Besetzungsunterschiede der Energieniveaus verändert, wodurch sich die Auslenkung von \vec{M}_0 ändert.[50] Die Beschreibung der Besetzungsunterschiede der Energieniveaus ist in Gleichung 3.2.5. S. 20, enthalten. Die T_1 Relaxation beschreibt den Wiederaufbau von \vec{M}_0 entlang der z-Achse. Der zeitabhängige Anteil von \vec{M}_0 entlang der z-Achse \vec{M}_z kann mit Gleichung 3.2.12 beschrieben werden,[50]

$$|\vec{M}_z| = |\vec{M}_0| \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right) \right), \quad (3.2.12)$$

mit der longitudinalen Relaxationszeit T_1 . In Abbildung 3.3a ist die Auslenkung von \vec{M}_0 in die x,y-Ebene mit anschließender Relaxation skizziert. Der zeitabhängige Wiederaufbau von \vec{M}_0 entlang der z-Achse ist in Abbildung 3.3b dargestellt. Nach einem $\beta = 90^\circ$ Puls ist für eine fast vollständige Relaxation ($> 99\%$) eine Wartezeit von $t \geq 5 \cdot T_1$ erforderlich.[50]

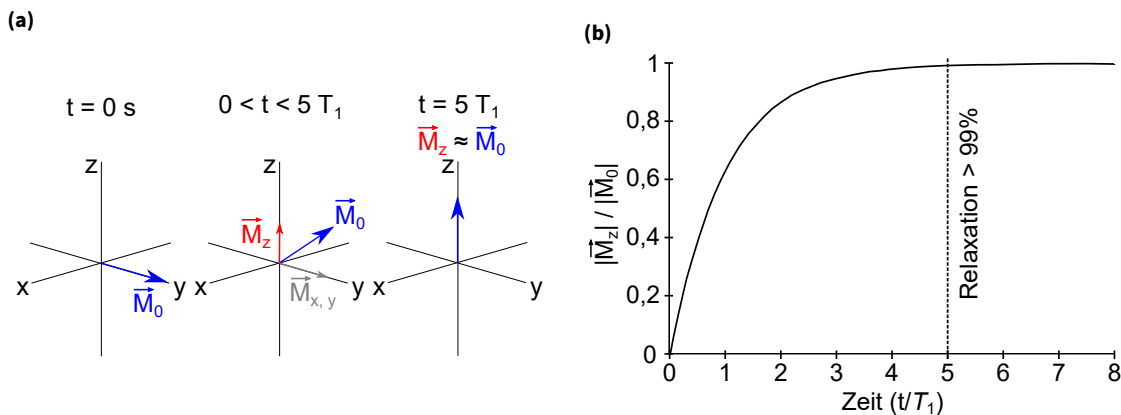


Abbildung 3.3: (a) Direkt nach einem $\beta = 90^\circ$ Puls bei $t = 0 \text{ s}$ befindet sich die \vec{M}_0 in der x,y-Ebene und entspricht somit der transversalen Magnetisierung $\vec{M}_{x,y}$. Die T_1 Relaxation führt zum Rückgang der $\vec{M}_{x,y}$ und zum Wiederaufbau der longitudinalen Magnetisierung \vec{M}_z . [50] (b) Darstellung des zeitlichen Wiederaufbaus von \vec{M}_z relativ zur \vec{M}_0 , beschrieben durch die Zeitkonstante T_1 in Gleichung 3.2.12. [50]

Bei der Relaxation wird Energie von den angeregten ^1H Kernen über oszillierende Magnetfelder an die Umgebung abgegeben. Dieser Energieübertrag ist am effektivsten, wenn die Frequenz der oszillierenden Magnetfelder der Larmorfrequenz ν_L entspricht. Die Magnetfelder entstehen durch die magnetische Dipol-Dipol Wechselwirkung, Anisotropie der chemischen Verschiebung, skalare Kopplung, Spin-Rotation Wechselwirkung, quadrupolare Mechanismen sowie Paramagnetismus. [50]

Durch molekulare Bewegungen oszillieren diese, wobei hauptsächlich die rotatorische Bewegung in der Größenordnung von ν_L liegt. Für ^1H Kerne in flüssigen Proben stellt die homonukleare Dipol-Dipol Wechselwirkung den wichtigsten T_1 Relaxationsmechanismus dar.[50] Die Bestimmung von T_1 erfolgte in dieser Arbeit mittels der *inversion recovery* Pulssequenz, die in Abschnitt 5.5, S. 50, näher beschrieben wird.

3.2.2.2. Transversale Relaxation, T_2

Durch das eingestrahlte B_1 -Feld werden die magnetischen Momente der ^1H Kerne in Phasenkohärenz gebracht. Die T_2 Relaxation beschreibt den Verlust der Phasenkohärenz der magnetischen Momente, wodurch die transversale Magnetisierung $\vec{M}_{x,y}$ abnimmt. Durch den Rückgang von $\vec{M}_{x,y}$ nimmt der FID exponentiell ab, wobei der Rückgang durch die T_2^* Zeitkonstante nach Gleichung 3.2.13 beschrieben wird, [69]

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_{2, \Delta B_0}}. \quad (3.2.13)$$

Der Rückgang der transversalen Magnetisierung $\vec{M}_{x,y}$ ist schematisch in Abbildung 3.4a gezeigt und erfolgt durch zwei Prozesse: (1) einem Energieaustausch zwischen zwei Kernen mit unterschiedlichen Magnetquantenzahlen m (natürlicher transversaler Relaxationsprozess, beschrieben durch die Zeitkonstante T_2) und (2) durch Magnetfeldinhomogenitäten, die zu unterschiedlichen Larmorfrequenzen führen, beschrieben durch die Zeitkonstante $T_{2, \Delta B_0}$. Die maximale Länge von T_2 entspricht T_1 .

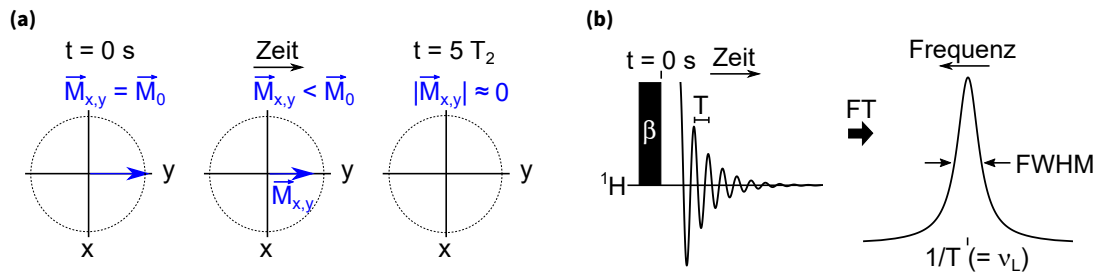


Abbildung 3.4: (a) Die T_2 Relaxation führt zum Verlust der Phasenkohärenz der magnetischen Momente, wodurch das mit der Periode T oszillierende NMR Signal exponentiell abnimmt, gezeigt in (b).[50] Nach der Auswertung des FIDs mittels Fourier-Transformation (FT) wird eine Lorentzkurve bei der Larmorfrequenz ν_L erhalten. Die Halbwertsbreite ($FWHM$) der Lorentzkurve ist inverse proportional zur T_2^* Zeitkonstante und kann mit der Gleichung 3.2.14 berechnet werden.[69]

Nach der Datenaufnahme wird der FID mittels Fourier-Transformation ausgewertet. Wie in Abbildung 3.4b skizziert, wird aufgrund des exponentiellen Abfalls des FIDs eine Lorentzkurve mit dem Maximum bei ν_L erhalten. Eine weiterführende Diskussion der Fourier-Paare von wichtigen Funktionen in der NMR Spektroskopie ist in Abschnitt 3.3, S. 25, enthalten. Die Breite der Lorentzkurven, gemessen als die Halbwertsbreite ($FWHM$) ist, wie in Gleichung 3.2.14 gezeigt, invers zur T_2^* Zeit. Mit der $FWHM$ lässt sich mit der Gleichungen 3.2.15 die Breite der Lorentzkurve bei 0,55 % der Peakhöhe berechnen,[52, 69]

$$FWHM = \frac{1}{\pi \cdot T_2^*}, \quad (3.2.14)$$

$$Breite_{@0,55\%} = FWHM \cdot 13,5, \quad (3.2.15)$$

$$(3.2.16)$$

Diese Relation ergibt sich aus der Definition der Lorentzkurve in Gleichung 3.3.15, S. 27. Die Höhe bei 0,55 % wird ausgewertet, da dies der Höhe der ^{13}C Satelliten eines Chloroformsignals entspricht. Die Bestimmung von T_2 erfolgte in dieser Arbeit mittels der Carr-Purcell-Maiboom-Gill (CPMG) Pulssequenz, die im Abschnitt 5.5, S. 50, erläutert wird.

3.2.3. Ursprung der chemischen Verschiebung

In einem Molekül besitzen die ^1H Kerne abhängig von der chemischen Umgebung unterschiedliche Larmorfrequenzen ν_L . Der Grund hierfür ist, dass in einem B_0 -Feld lokale, bewegungsgemittelte Elektronenwolken durch Induktion ein lokales Magnetfeld σ erzeugen, das dem B_0 -Feld entgegengesetzt ist. Das daraus resultierende, effektive lokale magnetische Feld B_{loc} lässt sich durch Gleichung 3.2.17 berechnen,[62]

$$B_{\text{loc}} = B_0(1 - \sigma). \quad (3.2.17)$$

Mit dem in Gleichung 3.2.18 geltenden Zusammenhang ergeben sich durch die von σ abhängigen B_{loc} unterschiedliche ν_L ,[62]

$$\nu_L = \gamma \cdot B_{\text{loc}}. \quad (3.2.18)$$

Über die Abhängigkeit der ν_L von der lokalen chemischen Umgebung ist es möglich, aus den unterschiedlichen ν_L der ^1H Kerne eines Moleküls Informationen über dessen molekulare Struktur oder intermolekulare Wechselwirkungen zu gewinnen. Hierfür wird die Verschiebung von ν_L , auch chemische Verschiebung δ genannt, relativ zu einem internen Standard referenziert. Ein häufig verwendeter interner Standard ist Tetramethylsilan (TMS), das aufgrund der symmetrischen Struktur 12 chemisch äquivalente ^1H Kerne (gleiche chemische Umgebung) und damit ein intensives Singulett Signal besitzt. Die chemische Verschiebung δ_i eines ^1H Kerns i relativ zu TMS, wird mit Gleichung 3.2.19 berechnet,[50, 70, 71]

$$\delta_i = \frac{\nu_{L,i} - \nu_{L,\text{TMS}}}{\nu_{L,\text{TMS}}}. \quad (3.2.19)$$

Standardmäßig wird δ in ppm (*parts per million*) angegeben, da die Unterschiede zwischen $\nu_{L,i}$ und $\nu_{L,\text{TMS}}$ im Hz – kHz Bereich liegen und $\nu_{L,\text{TMS}}$ im MHz Bereich ist. Durch die Definition in Gleichung 3.2.19 ist die chemische Verschiebung δ unabhängig von der B_0 -Feldstärke. Die Position der NMR Signale im NMR Spektrum ist nur abhängig von der lokalen chemischen Umgebung. Für typische chemische Verschiebungen funktioneller Gruppen wird auf die Fachliteratur verwiesen.[46, 47]

3.2.4. Strukturinformationen durch die Spin-Spin Kopplung

Neben der chemischen Verschiebung werden Informationen über die Molekülstruktur durch die Kopplung der Kernspins über kovalente Bindungen erhalten. Dieses Phänomen wird Spin-Spin Kopplung oder auch J-Kopplung genannt. Dabei werden Informationen über die Orientierung der Kernspins ($m = \pm 1/2$) der ^1H Kerne über die Bindungselektronen ausgetauscht. Die Kopplung führt zu einer Veränderung der ν_L um eine Kopplungskonstante von J [Hz], deren Wert in Hz unabhängig vom B_0 -Feld ist.[62] Dadurch kommt es zu spezifischen Kopplungsmustern (Aufspaltung von NMR Signalen in Multipletts), die Rückschlüsse über die Anzahl und Distanz der Kopplungspartner zulassen. Bei der Kopplung eines ^1H Kerns mit n chemisch äquivalenten, benachbarten ^1H Kernen wird ein NMR Signal erhalten, das ein Kopplungsmuster von $n + 1$ Signalen aufweist.[62]

3.3. Definition der Fourier-Transformation und der diskreten Fourier-Transformation

Der aufgenommene FID wird mittels Fourier-Transformation (FT) ausgewertet. Dabei wird das Signal von der Zeitdomäne in die Frequenzdomäne umgewandelt. Die FT zwischen dem Fourier-Paar der Zeit $f(t)$ und Frequenz $F(\omega)$ für kontinuierliche Funktionen ist in den Gleichungen 3.3.1 und 3.3.2 definiert,[64]

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \cdot \exp(-i\omega t) dt, \quad (3.3.1)$$

$$f(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} F(\omega) \cdot \exp(i\omega t) d\omega, \quad (3.3.2)$$

mit der imaginären Einheit i und der Kreisfrequenz ω . In Gleichung 3.3.3 ist der Zusammenhang zwischen ω und der Frequenz ν gegeben,

$$\nu = \frac{\omega}{2\pi}. \quad (3.3.3)$$

Der digitalisierte FID ist keine kontinuierliche Funktion, sondern ein diskreter Datensatz, bestehend aus N Datenpunkten, die in einem zeitlichen Abstand von t_{dw} (*dwell time*) aufgenommen respektive integriert werden. Das Produkt aus N und t_{dw} ergibt die FID Aufnahmezeit t_{aq} (*acquisition time*). Zur FT eines solchen Datensatzes wird die diskrete Fourier-Transformation (DFT) in Gleichung 3.3.4 genutzt,[64]

$$F(k) = \frac{1}{N} \sum_{j=0}^{N-1} f(j) \exp(-i\omega_f k j t_{\text{dw}}), \quad (3.3.4)$$

$$f(j) = \sum_{k=0}^{N-1} F(k) \exp(i\omega_f k j t_{\text{dw}}), \quad (3.3.5)$$

mit der Anzahl an komplexen Datenpunkten in der Zeitdomäne N sowie der Grundfrequenz ω_f , mit $\omega_f = 2\pi/t_{\text{aq}} = 2\pi/(N t_{\text{dw}})$. Die komplexen spektralen Komponenten $F(k)$ sind dabei stets ein ganzzahliges Vielfaches von ω_f ($F_k = F(\omega_f k)$, mit $k = 0, \dots, N-1$) und das komplexe Zeitsignal, $f(j)$, ein Vielfaches von t_{dw} ($f_j = f(j t_{\text{dw}})$, mit $j = 0, \dots, N-1$). Bei der DFT wird angenommen, dass sich der diskrete Datensatz periodisch wiederholt.[64]

Um bei der Anwendung der DFT die Rechenzeit zu reduzieren, wurde der *fast Fourier transform* (FFT) Algorithmus entwickelt.[72, 73] Bei der FFT wird ein Datensatz in kleinere Datensätze zerteilt, wobei jedes separat einer DFT unterzogen wird, wodurch die Anzahl an nötigen Rechenoperationen von N^2 auf $N \log_2(N)$ reduziert wird.[72] Aufgrund der Funktionsweise des FFT Algorithmus ist es erforderlich, dass der diskrete Datensatz 2^n Datenpunkte besitzt.[64, 72]. Ein neuerer Algorithmus ist der *fastest Fourier transform in the west* (FFTW) Algorithmus, der einen Datensatz auch in kleine Fragmente spaltet, wobei die jeweiligen Fragmentgrößen variieren und auf die Computerarchitekturen angepasst werden.[74] Durch die variable Größe der Datenfragmente kann der FFTW Algorithmus auch für Datensätze mit einer beliebigen Anzahl an Datenpunkten angewandt werden. Der FFTW Algorithmus wird derzeit in der Datenprozessierungssoftware MATLAB verwendet.[75]

3.3.1. Eigenschaften der Fourier-Transformation

Eine komplexe spektrale Frequenzkomponente $F(\omega)$ mit $F(\omega) = R(\omega) + i \cdot I(\omega)$ kann durch die Euler Relation in Gleichung 3.3.6 in Sinus- und Kosinusanteile dargestellt werden,

$$F(\omega) = M(\omega) \exp(i\varphi) = M(\omega)(\cos(\varphi) + i \cdot \sin(\varphi)), \quad (3.3.6)$$

mit dem Betragsquadrat der komplexen Zahl M (Magnitude) und der Phase φ , die aus Gleichungen 3.3.7 und 3.3.8 erhalten werden,[76, 77]

$$M(\omega) = \sqrt{R(\omega)^2 + I(\omega)^2}. \quad (3.3.7)$$

$$\varphi(\omega) = \arctan\left(\frac{I(\omega)}{R(\omega)}\right), \quad (3.3.8)$$

In der NMR Spektroskopie entspricht $R(\omega)$ bzw. $\cos(\varphi)$ dem Absorptionssignal und $I(\omega)$ bzw. $\sin(\varphi)$ dem Dispersionssignal.

Ein reales NMR Signal besteht aus einer Überlagerung mehrerer spektraler Komponenten. Eine Überlagerung von Wellenfunktionen kann anhand des Superpositionsprinzips berechnet werden.[78] Das Superpositionsprinzip besagt, dass die Überlagerung von Wellenfunktionen die Summe der einzelnen Wellen ist. Im Fall der Überlagerung zweier Wellen s_1 und s_2 , mit gleichem ω , aber unterschiedlichen φ , kann die Magnitude M_{s_1, s_2} und Phase φ_{s_1, s_2} der resultierenden Sinuskurve mit den Gleichungen 3.3.9 und 3.3.10 berechnet werden,[78]

$$M_{s_1, s_2} = \sqrt{M_{s_1}^2 + M_{s_2}^2 + 2 \cdot M_{s_1} \cdot M_{s_2} \cdot \cos(\varphi_{s_2} - \varphi_{s_1})}, \quad (3.3.9)$$

$$\varphi_{s_1, s_2} = \arctan\left(\frac{I_{s_1} + I_{s_2}}{R_{s_1} + R_{s_2}}\right) = \arctan\left(\frac{M_{s_1} \cdot \sin(\varphi_{s_1}) + M_{s_2} \cdot \sin(\varphi_{s_2})}{M_{s_1} \cdot \cos(\varphi_{s_1}) + M_{s_2} \cdot \cos(\varphi_{s_2})}\right), \quad (3.3.10)$$

mit $s_1 = M_{s_1} \cdot \sin(\omega t + \varphi_{s_1})$ und $s_2 = M_{s_2} \cdot \sin(\omega t + \varphi_{s_2})$.

Der Zusammenhang zwischen dem Zeitversatz einer Sinuswelle und der resultierenden Phase ist in Gleichung 3.3.11 aufgezeigt,[79]

$$f(t - z) \xleftrightarrow{FT} F(\omega) \cdot \exp(-i\omega z). \quad (3.3.11)$$

Die FT ist eine lineare Operation. Das bedeutet, dass eine Superposition von Zeitsignalen auch einer Superposition der Fourier-transformierten entspricht, wie in Gleichung 3.3.12 dargestellt,[64, 76]

$$a \cdot f(t) + b \cdot g(t) = a \cdot F(\omega) + b \cdot G(\omega). \quad (3.3.12)$$

Zusätzlich besagt das Faltungstheorem, dass die Faltung zweier Funktionen gleich dem Produkt der Fourier-transformierten entspricht, siehe Gleichung 3.3.13,[80]

$$H(\omega) = F(\omega) * X(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} F(\tilde{\omega}) \cdot X(\omega - \tilde{\omega}) d\tilde{\omega} \xleftrightarrow{FT} \frac{1}{2\pi} (f(t) \cdot x(t)), \quad (3.3.13)$$

wobei $*$ eine Faltung der Funktionen bedeutet. Das Faltungstheorem bildet die Grundlage für die Anwendung der Apodisierungsfunktionen, die im Abschnitt 3.4, S. 28, näher diskutiert werden. Um den Effekt der Apodisierungsfunktionen auf das NMR Spektrum zu verstehen, sind in den Gleichungen 3.3.14 – 3.3.19 die für die NMR Spektroskopie wichtigsten Fourier-Paare aufgelistet.[64]

- Sinuswelle $\exp(i\tilde{\omega}t)$ \xleftrightarrow{FT} Delta-Peak (δ) bei $\tilde{\omega}$

$$\int_{-\infty}^{\infty} \exp(i\tilde{\omega}t) \exp(-i\omega t) dt = 2\pi\delta(\omega - \tilde{\omega}) \quad (3.3.14)$$

- Exponentialfunktion \xleftrightarrow{FT} Lorentz

$$\int_0^{\infty} \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \exp(-i\omega t) dt = \frac{1}{i\omega + 1/\tau} \quad (3.3.15)$$

- Gauß \xleftrightarrow{FT} Gauß

$$\int_{-\infty}^{\infty} \exp\left(-\frac{t^2}{2\sigma_t^2}\right) \exp(-i\omega t) dt = (2\pi)^{1/2} \sigma_t \exp\left(-\frac{\omega^2 \sigma_t^2}{2}\right) \quad (3.3.16)$$

- Halbseitiger Gauß \xleftrightarrow{FT} Gauß mit dispersivem Anteil

$$\int_0^{\infty} \exp\left(-\frac{t^2}{2\sigma_t^2}\right) \exp(-i\omega t) dt = (2\pi)^{1/2} \sigma_t \frac{1}{2} \exp\left(-\frac{\omega^2 \sigma_t^2}{2}\right) \left\{1 + \operatorname{erf}\left(\frac{i\omega \sigma_t}{2^{1/2}}\right)\right\} \quad (3.3.17)$$

- Symmetrische Rechteckfunktion $[-t_0, \dots, t_0]$ \xleftrightarrow{FT} Sinc

$$\int_{-t_0}^{t_0} \exp(-i\omega t) dt = 2 \frac{\sin(\omega t_0)}{\omega} \quad (3.3.18)$$

Für eine Rechteckfunktion $[0, \dots, t_0]$

$$\int_0^{t_0} \exp(-i\omega t) dt = \frac{\sin(\omega t_0)}{\omega} + i \frac{\cos(\omega t_0) - 1}{\omega} \quad (3.3.19)$$

Aus dem Faltungstheorem in Gleichung 3.3.13 und den Fourier-Paaren der Sinus- und Exponentialfunktion in den Gleichungen 3.3.14 und 3.3.15, folgt, dass in einem NMR Spektrum bei den Frequenzen der Zeitsignale Lorentz-förmige Signale auftreten, wie bereits in Abbildung 3.4b, S. 23, skizziert.

In einem Spektrum entspricht der Datenpunktabstand, auch spektrale Auflösung $\Delta\nu$ genannt, dem inversen der Datenaufnahmezeit t_{aq} , wie in Gleichung 3.3.20 beschrieben,[77]

$$\Delta\nu = \frac{1}{t_{\text{aq}}} = \frac{1}{t_{\text{dw}} \cdot N} = \frac{s_r}{N}, \quad (3.3.20)$$

mit der Datenabtastrate s_r . Die spektrale Breite wird von der Nyquist Frequenz ν_{Nyq} begrenzt, siehe Gleichung 3.3.21,[29]

$$\nu_{\text{Nyq}} = \frac{1}{2 \cdot t_{\text{dw}}} = \frac{s_r}{2}. \quad (3.3.21)$$

Der Wert von ν_{Nyq} muss sorgfältig gewählt werden, da ν_{Nyq} die höchste eindeutig messbare Frequenz in $f(t)$ begrenzt.[29]

3.4. Datenprozessierung in der NMR Spektroskopie

Phasierung Nach dem Anregungspuls muss vor der FID Datenaufnahme eine kurze Zeit (im μs Bereich) gewartet werden, um Artefakte im NMR Spektrum durch das abklingende B_1 -Feld in der Spule zu vermeiden. Diese Wartezeit wird als *dead time* oder *acquisition delay* bezeichnet und führt nach Gleichung 3.3.11, S. 26, zu einem frequenzabhängigen Phasenversatz der präzedierenden makroskopischen Magnetisierung \vec{M}_0 . Zudem besitzt die Empfängerspule eine konstante Phase, die zu einem zusätzlichen konstanten Phasenversatz von \vec{M}_0 führt. In einem NMR Spektrum werden typischerweise die Realanteile der Frequenzkomponenten dargestellt. Wie in Gleichung 3.3.8, S. 26, beschrieben, resultiert ein Phasenversatz in einer Änderung der Amplituden von Real- und Imaginärteil. Um möglichst hohe, symmetrische und schmale Signale zu erhalten, ist es daher wichtig eine Phasenkorrektur durchzuführen, die den Realanteil maximiert. Der konstante Phasenversatz wird mit einer Phasenkorrektur nullter Ordnung φ_0 und der frequenzabhängige Phasenversatz mit der Phasenkorrektur erster Ordnung φ_1 angepasst. Somit ergibt sich für die gesamte Phasenkorrektur Φ für die Frequenzkomponente ν_k Gleichung 3.4.1,[81, 82]

$$\Phi = \varphi_0 + \varphi_1 \cdot \nu_k. \quad (3.4.1)$$

Zero filling Während der Datenaufnahme in der NMR Spektroskopie nimmt der FID exponentiell ab. Da das Rauschen nahezu konstant bleibt, nimmt der relative Informationsgehalt mit zunehmender Aufnahmedauer ab.[50] Zur Verbesserung der spektralen Auflösung $\Delta\nu$, ist es üblich, an das Ende des FIDs weitere Datenpunkte mit dem Wert Null anzuhängen. Dadurch wird die Aufnahmezeit ohne zusätzlichen Zeitaufwand künstlich verlängert. Dieser Prozess wird *zero filling* (zf) genannt. Durch das Hinzufügen von Nullen wird der Informationsgehalt zwischen dem Real- und dem Imaginärteil vermischt, was zu einer *SNR* Verbesserung von maximal $2^{1/2}$ führt.[83, 84] Dieser Effekt wird bis zu einem zf von Faktor 2 beobachtet. Ein weiteres Hinzufügen von Nullen führt lediglich zu einer genaueren Darstellung der Signale durch die höhere Datenpunktdichte, jedoch nicht zu einer Erhöhung des Informationsgehalts.[84, 85]

Apodisierung Ist der FID während der Datenaufnahme nicht auf Null abgeklungen, entsteht durch das zf eine Stufe zwischen dem Ende des FID und den angefügten Nullen. Diese Stufe führt durch die FT zu Sinc-Artefakten, wie in Gleichung 3.3.18, S. 27, beschrieben ist. Um dies zu vermeiden, wird der FID nach dem zf mit einer Apodisierungsfunktion multipliziert, was gleich einer Faltung der Fourier-Paaren ist. Dadurch wird der Zahlenwert der letzten Datenpunkte des FID reduziert, sodass keine Stufe durch das zf entsteht und somit keine Sinc-Artefakte auftreten.[50] Zusätzlich kann das Rauschen durch Apodisierungsfunktionen reduziert werden.[50] Zur Rauschreduktion häufig verwendete Apodisierungsfunktionen sind die Exponentialfunktion oder die halbseitige Gaußfunktion. Die mathematischen Definitionen dieser Funktionen sowie deren Fourier-Paaren sind in Gleichung 3.3.15, S. 27, und Gleichung 3.3.17, S. 27, aufgelistet. Indem der FID mit diesen Funktionen multipliziert wird, wird der FID entsprechend der Intensität der Apodisierungsfunktionen gewichtet. Dadurch wird der hintere Teil des FIDs, der verglichen zum vorderen Teil des FIDs ein niedriges *SNR* besitzt, weniger stark gewichtet, was zu einer Verringerung des Rauschens im NMR Spektrum führt. Wie beim Faltungstheorem in Gleichung 3.3.13, S. 26, beschrieben, beeinflusst die Wahl der Apodisierungsfunktion auch die spätere Peakform im NMR Spektrum, insbesondere falls die Faltungsfunktion breiter als die natürliche Linienbreite ist.[64]

3.5. *Benchtop* NMR Spektrometer

3.5.1. Einordnung und Vorteile von *benchtop* NMR Spektrometer

Seit der Einführung der NMR Spektrometer wurde kontinuierlich daran gearbeitet, die Feldstärke zu erhöhen, da mit steigender Feldstärke die Sensitivität ($SNR \propto B_0^{3/2}$, siehe Gleichung 3.2.10, S. 20) und die Auflösung ($B_0 \propto \nu_L$, siehe Gleichungen 3.2.4, S. 19, und 3.2.19, S. 24) zunimmt. Die notwendigen technischen Bedingungen, um solch hohe B_0 -Felder zu erreichen, führen jedoch zu einigen bedeutenden Nachteilen: (1) hohe Kosten in der Anschaffung und im Betrieb, (2) hoher Platzbedarf für das Spektrometer und die dazugehörige Infrastruktur, (3) starke magnetische Streufelder, (4) ein hohes Maß an erforderlicher Expertise.[55] Infolgedessen blieb die Zugänglichkeit der NMR Spektroskopie lange Zeit auf Forschungslabore oder große Industriebetriebe beschränkt.[13]

Seit etwa 14 Jahren werden *benchtop* NMR Spektrometer auf der Basis von Permanentmagneten kommerziell angeboten.[13] Durch die Verwendung von Permanentmagneten werden keine flüssigen Kryogene benötigt. Dadurch weisen diese Geräte deutlich geringere B_0 -Feldstärken auf, sind aber wesentlich kompakter gebaut (20 – 80 kg) und deutlich günstiger in Anschaffung und Betrieb.[15, 86] Aktuell werden *benchtop* NMR Spektrometer mit B_0 -Feldstärken von bis zu 2,9 T angeboten, womit diese als Niederfeld NMR Geräte einzuordnen sind. Verglichen mit Hochfeld NMR Spektrometern sind *benchtop* NMR Spektrometer deutlich günstiger in Anschaffung und Betrieb. Zusätzlich ist die Steuerung benutzerfreundlicher, sodass eine Bedienung der *benchtop* NMR Spektrometer von Nicht-Experten möglich ist. Aufgrund der geringen B_0 -Feldstärken besitzen *benchtop* NMR Spektrometer, verglichen zu Hochfeld NMR Spektrometern, eine reduzierte Sensitivität und Auflösung.[15, 55] Daher ist eine Analyse komplexer, niedrig konzentrierter Proben mit *benchtop* NMR Spektrometern nur begrenzt möglich.[13] Dennoch werden *benchtop* NMR Spektrometer aufgrund der besseren Zugänglichkeit vermehrt in der Überwachung von chemischen Reaktionen oder biologischen Prozessen, in der Lebensmittel- oder Pharmaindustrie zur Qualitätskontrolle und Profiling, sowie in Bildungseinrichtungen zur Lehre verwendet.[13, 15, 55]

3.5.2. Technische Aspekte von *benchtop* NMR Spektrometern

Die Permanentmagnete der *benchtop* NMR Spektrometer bestehen aus Samarium-Cobalt (SmCo) oder Neodym-Eisen-Bor (NdFeB) Legierungen und sind stabil im Temperaturbereich von 20 – 30 °C.[13, 87, 88] Die B_0 -Felder von Permanentmagneten sind empfindlich gegenüber Temperaturschwankungen, weshalb die Permanentmagnete mit einer Kombination aus einem Peltierelement und Ventilatoren mit einer Präzision von 0,05 K temperiert werden.[89] Die Magnete in *benchtop* NMR Spektrometern sind in einem Halbach angeordnet, gezeigt in Abbildung 3.5a.[90]

Aufgrund der zylindrischen Anordnung überlagert das Magnetfeld in der Mitte konstruktiv und außerhalb der Anordnung destruktiv.[91, 92] Infolgedessen ist das Streufeld der *benchtop* NMR Spektrometer mit < 2 mT sehr gering.[22, 93] Die Verwendung der Halbach Anordnung erlaubt die Verwendung gewundener Spulen, die einen Faktor 3 sensitiver sind als die in der Hochfeld NMR üblichen Helmholtz-Spulen.[18, 19, 94] Die Halbach Anordnung ist für die Kopplung mit der HPLC vorteilhaft, da Flusszellen vertikal hindurchgeführt werden können. Dabei liegt das B_0 horizontal, wie in Abbildung 3.5b gezeigt.

Um Veränderungen in der Larmorfrequenz aufgrund B_0 -Feldveränderung auszugleichen, sind NMR Spektrometer mit einem Lock-System ausgestattet. Dabei wird parallel zur Probe ein Referenzsignal gemessen und die Veränderung in der Frequenz der Locksonde genutzt, um das B_0 -Feld durch eine

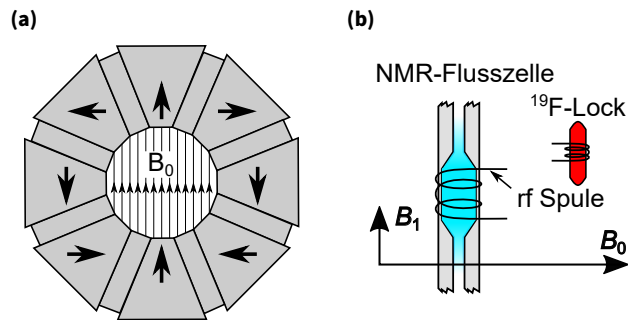


Abbildung 3.5: (a) Die Halbach Anordnung der Permanentmagneten führt zu einem homogenen B_0 -Feld in der Mitte der zylindrischen Anordnung und zu einem geringen Streufeld (< 2 mT) außerhalb der Anordnung. Modifiziert nach Danieli et al. 2014.[90] (b) Die Probe und die externe ^{19}F -Locksonde befinden sich im horizontalen B_0 -Feld.[22]

weitere Spule zu korrigieren. Hochfeld NMR Spektrometer verwenden typischerweise einen internen Deuterium-Lock, da dieser eine präzise Korrektur des B_0 -Feldes erlaubt.[62] Dafür ist es nötig deuterierte Lösungsmittel zur Probe hinzuzugeben.[52, 62] Die meisten *benchtop* NMR Spektrometer besitzen externe ^{19}F -Locksonden, welche es ermöglichen, Proben ohne die Zugabe von deuteriertem Lösungsmittel zu messen. Die ^{19}F -Locksonde ist verschlossen und befindet sich im Spektrometer neben der Probe im homogenen Bereich des B_0 -Feldes. Dies ist bei der Kopplung mit der HPLC von Vorteil, weil protonierte Lösungsmittel günstiger sind als die deuterierte Alternative.

4. Grundlagen und Durchführung der HPLC-NMR Kopplung

Die Kombination von HPLC und NMR stellt eine Methode dar, mit der Analytmischungen in einer einzigen Messung getrennt und gleichzeitig NMR spektroskopisch charakterisiert werden können. In diesem Kapitel werden verschiedene Ausführungen der HPLC-NMR Kopplung erläutert, wobei der Schwerpunkt auf onflow HPLC-NMR Messungen liegt. Dabei werden auch Effekte aufgezeigt, die bei nicht-statischen NMR Messungen auftreten. Anschließend wird die Datenstruktur von onflow HPLC-NMR Messungen betrachtet und das Konzept der Bilinearität solcher Datensätze diskutiert.

4.1. Bedeutung der HPLC-NMR Kopplung

Bei der HPLC-NMR Kopplung wird eine Probe chromatographisch aufgetrennt und anschließend mittels NMR gemessen, wodurch von den separierten Probenbestandteilen wichtige strukturelle und stereochemische Informationen aus der chemischen Verschiebung, den Kopplungsmustern und den Integralen der NMR Signale gewonnen werden.[19] NMR Spektrometer sind universelle, nicht-destruktive und quantitative Detektoren.[19, 95] Obwohl die Kopplung der HPLC mit der NMR Spektroskopie eine der leistungsfähigsten Methoden zur chemischen Charakterisierung komplexer Proben darstellt, wird diese Methode nur sehr begrenzt eingesetzt, wie Abbildung 4.1a skizziert.[9, 11] Abbildung 4.1a zeigt die Anzahl der wissenschaftlichen Publikationen auf dem Gebiet der HPLC-NMR Kopplung und Abbildung 4.1b deren thematische Verteilung.¹

Die erste Kopplung der HPLC mit einem NMR Spektrometer wurde 1978 von Watanabe und Niki durchgeführt.[56] Die Forscher beschrieben die *online* Kopplung eines 60 MHz NMR Spektrometers mit der HPLC, wobei die Messungen unter *stop flow* Bedingungen stattfanden. Die erste *onflow* HPLC-NMR Messung wurde ein Jahr später von Bayer et al. unter Verwendung eines 90 MHz NMR Spektrometers durchgeführt.[97] Die erste *onflow* HPLC-NMR Messung mit einem NMR Spektrometer mit supra-leitenden Magneten wurde 1980 von Haw et al. beschrieben.[98] Dennoch blieben die Anzahl an wissenschaftlichen Publikationen pro Jahr gering, siehe Abbildung 4.1a. Dies liegt vermutlich an den hohen Kosten und der geringen Empfindlichkeit der NMR Spektrometer sowie an der technischen Umsetzung der gekoppelten Methodik.[9, 19] Partielle Abhilfe dieser Nachteile versprechen *benchtop* NMR Spektrometer. Aufgrund ihrer geringen Größe und Kosten ist eine Anschaffung dieser attraktiver als die eines Hochfeld NMR Spektrometers.[99–101] Obwohl die Markteinführung der *benchtop* NMR Geräte aktuell etwa 20 Jahre zurück liegt, werden diese bisher kaum als HPLC Detektoren verwendet, siehe Abbildung 4.1a. Grund dafür ist vermutlich die geringe Sensitivität dieser Geräte, was den Bedarf an Methoden zur Verbesserung der Sensitivität verdeutlicht. Erste Publikationen zur HPLC-*benchtop*

¹ Die Darstellung soll einen groben Überblick über die wissenschaftliche Entwicklung auf dem Gebiet der HPLC-NMR geben. Aufgrund der sehr eng gefassten Suche werden nicht alle Publikationen in diesem Bereich erfasst, weshalb die tatsächlichen Populationszahlen höher liegen sollte.

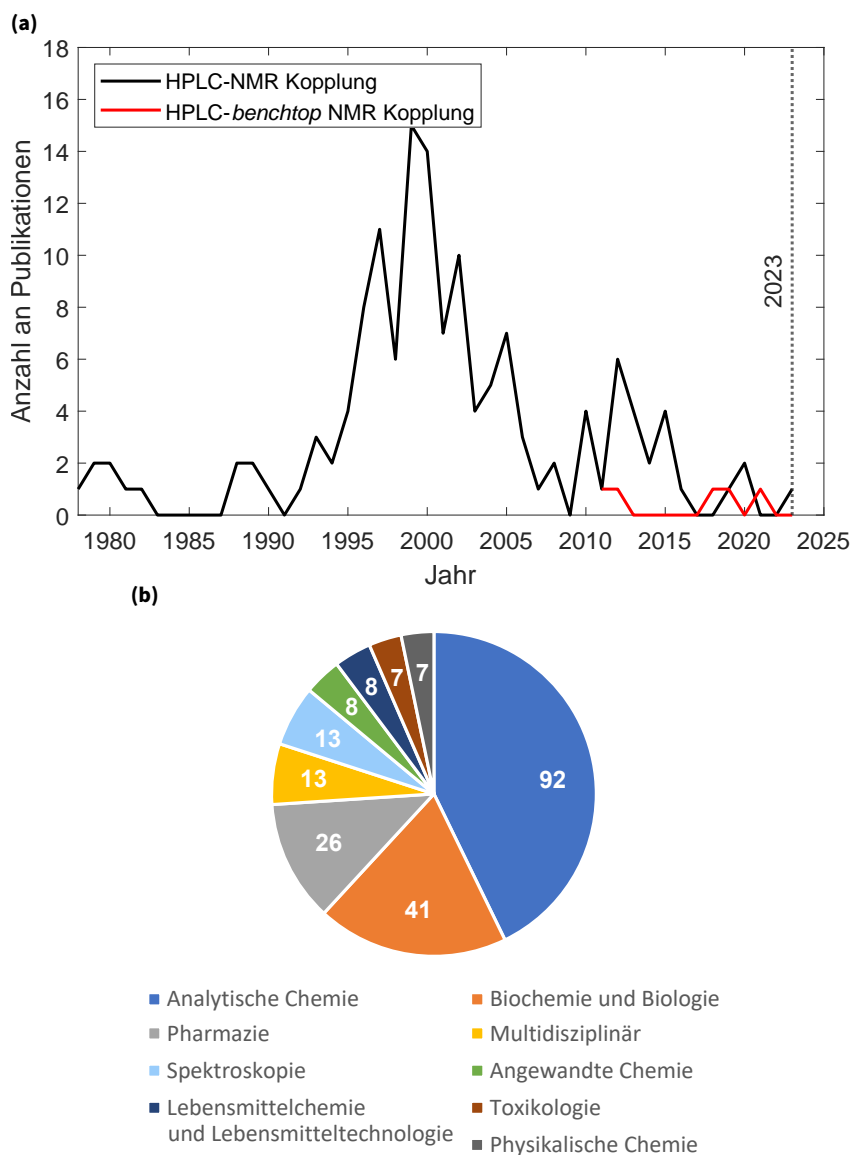


Abbildung 4.1: (a) Anzahl an Publikationen im Zeitraum von 1978 bis 2023 für die HPLC-NMR Kopplung im Allgemeinen sowie die HPLC-benchtop NMR Kopplung im Speziellen. Die Überschriften der Publikationen in der Datenbank von Web of Science wurden mit folgenden Begriffen durchsucht.[96] Für die HPLC-NMR Kopplung: (HPLC OR "liquid chromatography" OR SEC OR "size exclusion chromatography") AND (NMR OR "nuclear magnetic resonance") AND (hyphenation OR coupling OR "online detector"). Für die HPLC-benchtop NMR Kopplung: (HPLC OR "liquid chromatography" OR SEC OR "size exclusion chromatography") AND (NMR OR "nuclear magnetic resonance") AND (hyphenation OR coupling OR "online detector") AND ("low field" OR "medium resolution" OR "MR" OR "benchtop").(b) Thematische Einordnung der Publikationen zur HPLC-NMR Kopplung in (a). Die Kategorisierung wurde von Web of Science übernommen.[96]

NMR Kopplung wurden 2011 und 2012 von Cudaj et al. und später im Jahr 2018 von Höpfner et al. und 2019 von Botha et al. veröffentlicht.[20, 102–105] Die Forscher analysierten Polymere und nutzten für die Auftrennung die SEC, wobei ein Fokus der Arbeiten stets auf der Verbesserung der Sensitivität lag. Im Bereich LAC-benchtop NMR Kopplung wurde bisher noch keine Publikationen gefunden. Im Folgenden werden mögliche technische Umsetzungen der HPLC-NMR Kopplung behandelt.

4.2. Umsetzung der Kopplung eines NMR Spektrometers mit der HPLC

Die Kopplung eines NMR Spektrometers mit HPLC kann auf unterschiedliche Weise realisiert werden. Drei Möglichkeiten sind in Abbildung 4.2 aufgeführt.[11, 19, 103, 106]

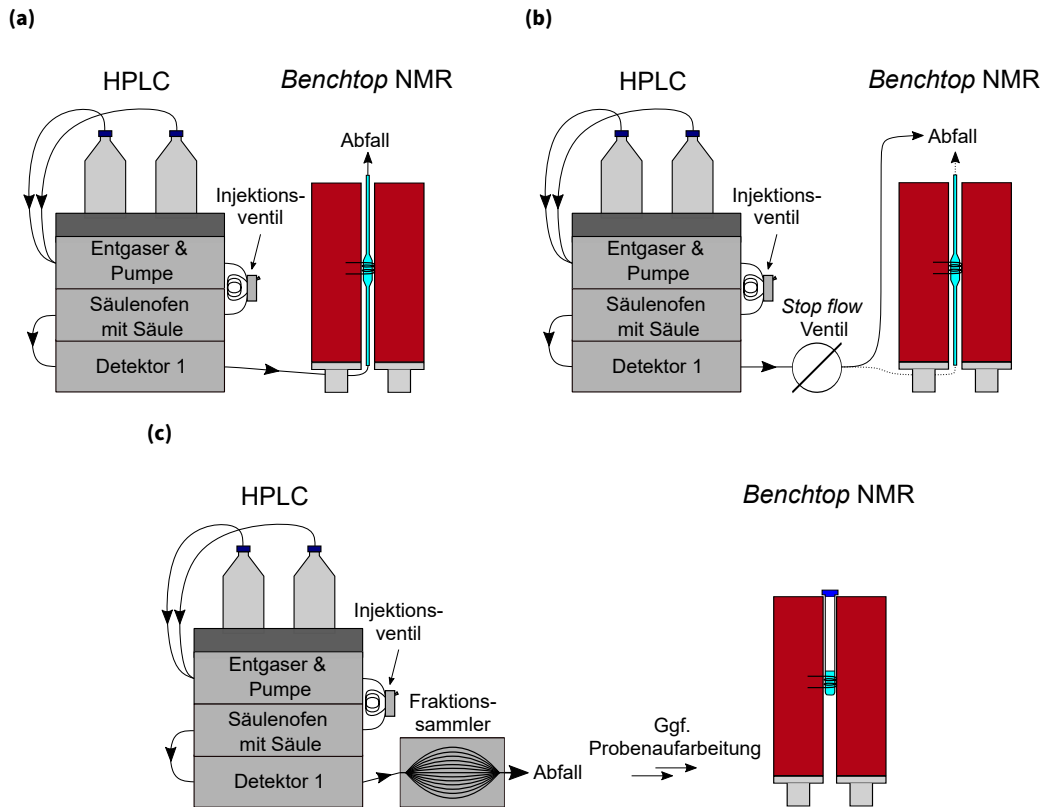


Abbildung 4.2: Mögliche Durchführungen der HPLC-NMR Messungen. (a) *Online* und *onflow*: Das Eluat wird direkt durch das NMR geleitet und gemessen. Der Detektor 1 kann vor oder nach dem NMR platziert sein. (b) *Online* und *stop flow*: Sobald der Analyt im Detektionsbereich des NMRs ist, wird durch ein *stop flow* Ventil der Fluss umgeleitet. Die Analytbande wird im NMR unter stationären Bedingungen gemessen. (c) *Offline*: Mit einem Fraktionssammler werden die einzelnen Analytfraktionen getrennt gesammelt. Nach einer eventuellen Probenaufarbeitung werden die Fraktionen statisch, z. B. in 5 mm NMR Röhren, gemessen.[11, 19, 103]

Bei jedem Aufbau wird neben dem NMR Spektrometer die Verwendung eines weiteren Detektors (Detektor 1) empfohlen, der eine hohe Empfindlichkeit besitzt und eine Vielzahl an Analyten detektieren kann. Geeignet hierfür ist ein UV- oder DRI Detektor.[19, 66] Bei der *online* und *onflow* Kopplung (Abbildung 4.2a) werden die eluierenden Analytfraktionen direkt durch das NMR Spektrometer geleitet und dabei gemessen. Der Detektor 1 kann dabei vor oder nach dem NMR Spektrometer installiert werden und dient zur Aufnahme eines vollständigen Chromatogramms.[103] Dieser Ansatz stellt die effizienteste Umsetzung der Kopplung dar, da keine weiteren Arbeitsschritte oder Probenaufarbeitung für die NMR Messung erforderlich sind.[19] Dieser Ansatz wird in der vorliegenden Arbeit verwendet. Durch die begrenzte Messzeit ist die Sensitivität, verglichen mit den anderen Durchführungen, am geringsten. Um die Sensitivität zu verbessern, wird der von der HPLC kommende Volumenfluss durch ein *stop flow* Ventil umgeleitet, sobald sich die Analytbande im Detektionsvolumen des NMR Spektrometers befindet. Die NMR Messung erfolgt anschließend unter stationären Bedingungen.[11] Dieser *online* aber *stop flow* Ansatz ist in Abbildung 4.2b dargestellt. Der Detektor 1 befindet sich bei diesem Aufbau vor dem *stop flow* Ventil und dient dazu die Analytelution festzustellen. Nach einem definierten Zeitversatz, der

benötigt wird damit die Analytbande von Detektor 1 in das Detektionsvolumen des NMR Spektrometers gelangt, wird das *stop flow* Ventil betätigt. Dieser Ansatz wird verwendet, wenn eine längere Messzeit benötigt wird, um somit die Sensitivität zu steigern. Verglichen zur *onflow* Messung erfordert diese Durchführung ein zusätzliches *stop flow* Ventil sowie eine Kalibrierung des Zeitversatzes zwischen dem Detektor 1 und der NMR Flusszelle. Zusätzlich kann mit dieser Methode nur eine begrenzte Anzahl an Analytfraktionen pro HPLC Messung gemessen werden. Falls mehrere Analytbanden von Interesse sind, kann das *stop flow* Ventil auch gegen ein Fraktionssammler ausgetauscht werden, wie in Abbildung 4.2c gezeigt.[19, 107] Die Fraktionen können nach der HPLC Trennung zur stationären NMR Messung unter Verwendung der HPLC Pumpe in die NMR Flusszelle geleitet werden (nicht dargestellt). Alternativ kann nachträglich eine Aufarbeitung der Fraktionen erfolgen. Die NMR Messung wird dann *offline* in NMR Röhren durchgeführt. Mögliche Probenaufarbeitungsschritte sind Aufkonzentrierung und Lösungsmittelaustausch der protonierten mit deuterierten Lösungsmitteln, beispielsweise durch eine Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) oder Lösungsmittelverdampfung.[7, 8, 19] Die Geometrie der NMR Flusszelle hat einen wesentlichen Einfluss auf die chromatographische Auflösung und die spektroskopische Sensitivität. Daher ist es notwendig, das Detektionsvolumen der Flusszelle, das typischerweise zwischen 60 und 500 μL liegt, an die jeweiligen chromatographischen und spektroskopischen Bedingungen anzupassen.[11] Typische Flusszellegeometrien sind in Abbildung 4.3 dargestellt. Oft sind die Flusszellen für Hochfeld NMR Spektrometer U-förmig (Abbildung 4.3a) und für *benchtop* NMR Spektrometer linear (Abbildung 4.3b).[21, 103]

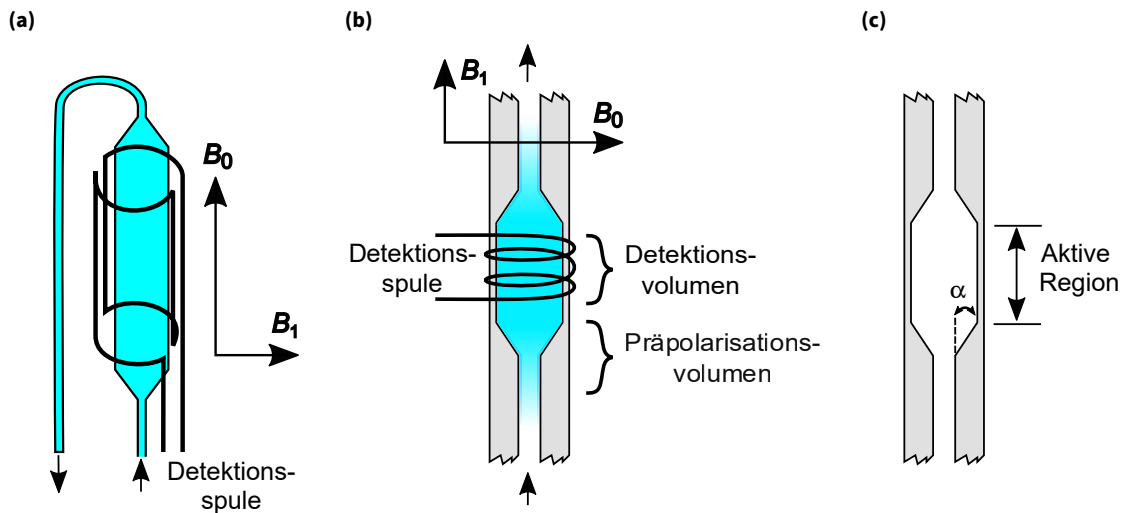


Abbildung 4.3: Typische Flusszellegeometrien für (a) Hochfeld und (b) *benchtop* NMR Spektrometer. Bei *onflow* Messungen werden die ^1H Kerne bereits im Magnetfeld vor der Detektionsspule präpolarisiert, angedeutet in (b). (c) Bei der Flusszellegeometrie sind der Öffnungswinkel des Konus α sowie das Volumen der aktiven Region V_{aktiv} wichtige Parameter.[103] Die Parameter der in dieser Arbeit verwendeten Flusszellen sind in Tabelle 6.6, S. 77, zusammengefasst.

4.3. Phänomene bei *onflow* NMR Messungen

Bei NMR Messungen unter *onflow* Bedingungen verbleibt der Analyt nur für ein paar Sekunden in der NMR Detektionsspule. Die effektive Verweilzeit τ hängt vom Detektionsvolumen V_{coil} (siehe Abbildung 4.3b), und der Flussrate F ab und kann mit Gleichung 4.3.1 berechnet werden,[21]

$$\tau = \frac{V_{\text{coil}}}{F}. \quad (4.3.1)$$

Durch die begrenzte Verweilzeit in der Detektionsspule wird effektiv die T_1 und T_2 Relaxation der Kernspins verkürzt, wie in Gleichung 4.3.2 und 4.3.3 dargestellt,[21]

$$\frac{1}{T_1^*} = \frac{1}{T_1} + \frac{1}{\tau}, \quad (4.3.2)$$

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_2, \Delta B_0} + \frac{1}{\tau}. \quad (4.3.3)$$

Die Reduzierung der Relaxationszeiten ermöglicht eine schnellere Datenaufnahme (kürzere Wiederholzeit t_r der Pulssequenz), aber auch eine Verbreiterung der NMR Signale (siehe Gleichung 3.2.14, S. 23).

Für eine quantitative Bestimmung mehrerer NMR Signale mit unterschiedlichen T_1 Zeiten ist es wichtig, dass die in das Detektionsvolumen fließende ^1H Kerne vollständig polarisiert sind. Dies ist gegeben, wenn diese eine Verweilzeit in dem Präpolarisierungsvolumen von $t_r = 5 \cdot T_1$ der längsten T_1 Zeit besitzen.[11, 95] Falls dies nicht gegeben ist, ist es erforderlich eine Konzentrationskalibrierung für jedes Signal zu erstellen.[11]

Bei HPLC-NMR Messungen wird mit unterschiedlichen Lösungsmitteln, Temperaturen, pH-Werten und Konzentrationen gearbeitet. All diese Parameter führen zu Veränderungen in den intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen und als Folge zu einer Veränderung der chemischen Verschiebung.[108] Daher sollte versucht werden, *onflow* HPLC-NMR Messungen unter isothermen und isokratischen Bedingungen durchzuführen.[109]

4.4. Lösungsmittel und Lösungsmittelunterdrückungsmethoden

Durch den externen ^{19}F -Lock ist es möglich für die HPLC-NMR Kopplung protonierte Lösungsmittel zu nutzen. Diese sind wesentlich günstiger als deuterierte Äquivalente. Die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels für die mobile Phase ist wichtig, da protonierte Lösungsmittel als intensive und breite Signale im NMR Spektrum erscheinen und potentiell mit den Analytsignalen überlagern und so eine Auswertung dieser erschweren.[11] Um den Signalüberlapp zu reduzieren ist es ratsam Lösungsmittel zu wählen, die nur ein einziges NMR Signal (am besten ein Singulett) mit einer anderen chemischen Verschiebung als die des Analyten aufweisen. Gängige HPLC Lösungsmittel mit einem Singulett NMR Signal sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.[19, 110]

Tabelle 4.1: Zusammenfassung von für die HPLC-NMR Kopplung geeignete Lösungsmittel. Die aufgeführten Lösungsmittel besitzen ein Singulett NMR Signal. Die jeweiligen chemische Verschiebungen δ und Siedepunkte (Sdp) sind angegeben. Die tatsächliche chemische Verschiebung kann abweichen, abhängig von der Lösungsmittelzusammensetzung, der Temperatur und dem pH-Wert.[19, 110]

Lösungsmittel	δ [ppm]	Sdp [°C]	Lösungsmittel	δ [ppm]	Sdp [°C]
Aceton	2,22 ^a	56,3	Dichlormethan	5,30 ^b	40,0
Acetonitril	2,06 ^a	81,6	Dimethylsulfoxid	2,71 ^a	189,0
Chloroform	7,26 ^b	61,2	Methanol	4,79, 3,34 ^{a,c}	64,7
Cyclohexan	1,43 ^b	80,7	Wasser	4,79 ^a	100,0

^a gemessen in D_2O (pH = 7), ^b gemessen in CDCl_3 , ^c in einer binären Mischung mit H_2O überlagert das -OH Signal des Methanols mit dem H_2O Signal, wodurch nur ein Singulett der - CH_3 Gruppe erscheint.

Bei einer HPLC-NMR Messungen mit protonierten Lösungsmitteln muss aufgrund der hohen ^1H Konzentration die Empfängerverstärkung im Vorverstärker verringert werden, was die Genauigkeit der

Digitalisierung von NMR Signalen verringert und auch dazu führen kann, dass schwache Analytsignale bezüglich der Intensität nicht aufgelöst werden.[111] Zusätzlich verursachen die intensiven und breiten Lösungsmittelsignale Instabilitäten der Basislinie im NMR Spektrum aufgrund des Totzeitproblems.[64] Das Totzeitproblem beschreibt das Auftreten von Sinc-Artefakten aufgrund der Rekonstruktion der ersten Datenpunkte des FIDs. Die Amplitude der Sinc-Artefakten skaliert proportional zur Signalfäche bei der jeweiligen Frequenz.[64, 112, 113] Um diese Effekte zu reduzieren werden Lösungsmittelunterdrückungsmethoden angewandt. Durch die Anwendung spezieller Pulssequenzen ist es möglich die Lösungsmittelsignale im NMR Spektrum erheblich zu reduzieren und somit eine bessere Digitalisierung und stabilere Basislinien zu erreichen.[11]

Es gibt eine Vielzahl an Lösungsmittelunterdrückungsmethoden, die für die HPLC-NMR Kopplung geeignet sind.[11, 113, 114] Zwei populäre Methoden sind die Präsaturation (PRESAT) und die *water suppression enhanced through T₁ effects* (WET).[114, 115] Bei der PREAST Methode wird das Lösungsmittel durch einen langen Puls mit niedriger Amplitude saturiert. Dies entspricht einer Gleichbesetzung der unterschiedlichen Energieniveaus der Spinzustände.[11] Die Pulssequenz ist in Abbildung 5.9, S. 53, visualisiert. Diese Pulssequenz zeichnet sich vor allem durch deren geringen Komplexität aus. Nachteilig ist, dass für die Saturierung der Lösungsmittelsignale ein relativ langer Saturierungspuls (im Sekundenbereich) benötigt wird. Etwas komplexer, aber dafür deutlich schneller ist die WET Pulssequenz, bei der vor dem Anregungspuls nacheinander vier selektive Pulse mit unterschiedlichen Rotationswinkeln eingestrahlt werden, wobei nach jedem Puls ein Spoil-Puls folgt, der die Phasenkohärenz der transversalen Magnetisierung zerstört. Nach der Pulssequenz sind die magnetischen Momente der Lösungsmittelkerne zerstreut und bilden somit direkt nach der Anwendung keine makroskopische Magnetisierung aus. Mit WET kann eine Lösungsmittelunterdrückung innerhalb 50 bis 100 ms erreicht werden, weshalb diese Methode für die *online* und *onflow* HPLC-NMR Kopplung besonders geeignet ist.[11, 113, 116] Ein Nachteil der WET Methode ist, dass für die Erzeugung der selektiven Pulse und der Spoil-Pulse spezielle Gradientenspulen erforderlich sind.

4.5. Datenstruktur in der *onflow* HPLC-NMR Kopplung und das Konzept der Bilinearität

Bei *onflow* HPLC-NMR Messungen wird für jede Elutionsvolumeneinheit ein NMR Spektrum gemessen, um ein spektral aufgelöstes Chromatogramm zu erhalten. Ein simuliertes spektral aufgelöstes Chromatogramm ist in Abbildung 4.4 zu sehen, wobei das NMR Spektrum insgesamt $\delta = 1, 2, \dots, K$ Datenpunkte besitzt und entlang des Elutionsprofils $t = 1, 2, \dots, J$ Spektren vorhanden sind. Die J NMR Spektren befinden sich in einem 2D Datenfeld, die als Matrix angesehen werden kann.[117, 118] Durch diese Anordnung ist es möglich Datenverarbeitungsmethoden entlang der NMR und HPLC Dimension anzuwenden, auf die in Abschnitt 5.8, S. 53, weiter eingegangen wird.

Im simulierten spektral aufgelösten Chromatogramm Abbildung 4.4a skaliert das Analytsignal proportional zur Analytkonzentration und besitzt eine konstante (konzentrationsunabhängige) chemische Verschiebung und Linienform. Ein solcher Datensatz wird als bilinear bezeichnet.[117] Für einen bilinearen Datensatz kann das Signal x_{t_j, δ_k} zu dem Zeitpunkt t_j für die chemische Verschiebung δ_k durch Gleichung 4.5.1 beschrieben werden,[117]

$$x_{t_j, \delta_k} = \delta_k \cdot t_j. \quad (4.5.1)$$

Um Gleichung 4.5.1 für alle δ und t Werte zu verallgemeinern wird die Matrix und Vektorschreibweise verwendet. Die Matrix X entspricht dem Produkt des Spaltenvektors \vec{t} und dem Zeilenvektor $\vec{\delta}$, wie in Gleichung 4.5.2 und in Abbildung 4.4b dargestellt,[117, 119]

$$X = \vec{t} \cdot \vec{\delta}. \quad (4.5.2)$$

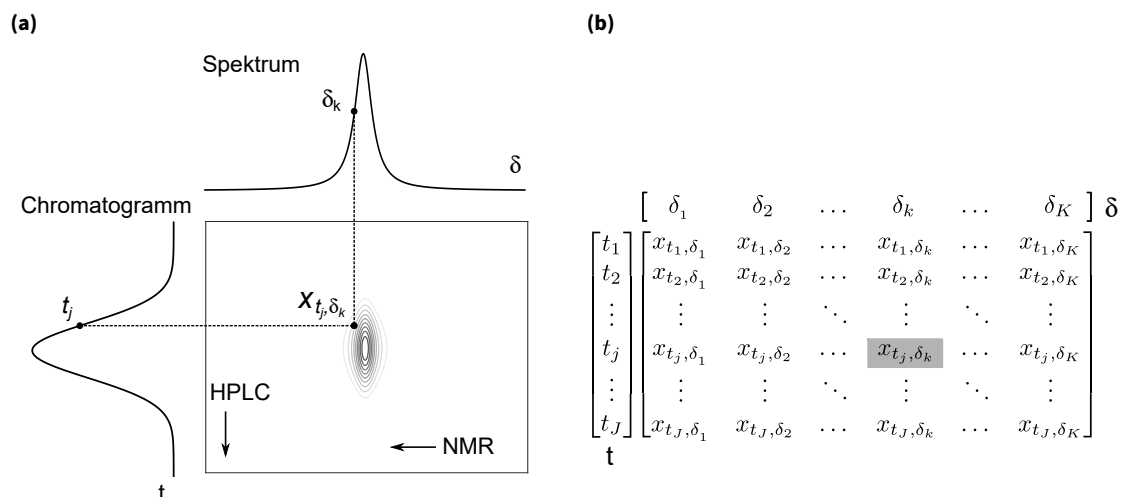


Abbildung 4.4: Simuliertes spektral aufgelöstes Chromatogramm (a), dargestellt als Konturdiagramm und (b) als Matrix.[117] Bei jeder Elutionszeit t ist ein NMR Spektrum δ vorhanden.

Die Matrix X hat entsprechend J Zeilen und K Spalten. Für bilineare Daten ist es möglich, mit der Matrix X und dem Zeit-Konzentrationsprofil der HPLC oder dem Analytspektrum, die entsprechende fehlende Information (Analytspektrum oder Zeit-Konzentrationsprofil) zu bestimmen, indem das lineare Gleichungssystem nach der fehlenden Information aufgelöst wird.[117]

Obwohl die Intensität der Analytsignale in NMR Spektren proportional zur Analytkonzentration ist, ist ein realer HPLC-NMR Datensatz nur teilweise bilinear. Durch Rauschen, Veränderungen der NMR Linienform und Drifts in der chemischen Verschiebung werden Zahlenwerte erhalten, die nicht aus dem Produkt in Gleichung 4.5.2 erklärt werden können. Diese Residuen werden mit einer Fehlermatrix E beschrieben.[103, 118] Demnach gilt für einen realen HPLC-NMR Datensatz Gleichung 4.5.3,

$$X_{\text{real}} = X + E. \quad (4.5.3)$$

Teil III.

Verwendete Methoden

5. Verwendete Methoden

In diesem Kapitel wird der experimentelle Aufbau der onflow LAC-NMR Kopplung sowie von NMR Messungen ohne chromatographische Separation beschrieben. Zudem werden die notwendigen Schritte zur Vorbereitung des NMR Spektrometers sowie verschiedene Methoden zur Erhöhung der Sensitivität erläutert. Weiterhin wird auf die Pulssequenzen eingegangen, die zur Bestimmung von Relaxationszeiten und zur Lösungsmittelunterdrückung verwendet wurden. Zusätzlich werden Datenprozessierungsmethoden beschrieben, die zur Auswertung der NMR Datensätze ohne und mit chromatographischer Separation verwendet wurden.

5.1. Aufbau der onflow LAC-NMR Kopplung

Der verwendete Aufbau für die LAC-NMR (80 MHz) Kopplung ist in Abbildung 5.1 dargestellt und basiert auf dem Aufbau für die SEC-NMR (62 MHz) Kopplung, der in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe Wilhelm et al. beschrieben wurde.[22, 103, 104, 113] Weitere technische Informationen zum LAC-NMR Aufbau inklusive der verwendeten Chemikalien, Geräte und Säulen sind im Anhang A, S. 169, aufgelistet. Zur Probeninjektion wurde ein manuelles Injektionsventil mit den Injektionsvolumina $V_i = 20, 100, 500$ und $1000 \mu\text{L}$ genutzt. In Abschnitt 6.3.3, S. 81, wird detaillierter auf den Einfluss des Injektionsvolumens auf die LAC-NMR Messung eingegangen. Für LAC-NMR Messungen wurde eine semipräparative C_{18} Säule (250×10 mm Innendurchmesser) genutzt. Im Vergleich zu einer analytischen LAC Säule mit einem Innendurchmesser von 4,6 mm ist die Querschnittsfläche um ein Faktor 4,5 größer, so dass bei gleicher Trennleistung ein Faktor 4,5 mehr Analyt injiziert werden kann und somit die Sensitivität der NMR Detektion verbessert wird.[22] Zudem ist der Peak im Volumen verbreitert, wodurch die Verdünnung in der NMR-Flusszelle reduziert und die Messzeit verlängert wird.[22] In Kapitel 7 wird die Entwicklung einer chromatographischen Methode beschrieben, die Fourier-Transformation *liquid chromatography* (FT-LC) genannt wird. Diese wurde in der SEC etabliert mit einer analytischen SDV Säule (300×8 mm Innendurchmesser). Die Temperatur des Säulenofens betrug, sofern nicht anders spezifiziert, $26,5^\circ\text{C}$, was der Temperatur der NdFeB-Permanentmagneten des 80 MHz *benchtop* NMR Spektrometers entsprach.[89] Bei dem in Abbildung 5.1 gezeigten Aufbau befand sich ein UV Detektor vor der Säule (UV Detektor 1) und nach der Säule neben dem 80 MHz NMR Spektrometer zwei weitere Detektoren (UV Detektor 2, DRI Detektor). Der UV Detektor 1 wurde ausschließlich für die Methodenentwicklung der FT-LC verwendet (siehe Abschnitt 7.1.2, S. 106). Die Messungen in dieser Arbeit wurden in der Regel bei einer Flussrate von 1 mL min^{-1} durchgeführt. Eine Untersuchung des Einflusses der Flussrate auf LAC-NMR Messungen ist in Abschnitt 6.3.2, S. 79, enthalten. In vorherigen Arbeiten wurden etwa 20 unterschiedliche Flusszellegeometrien hergestellt und entsprechend der spektroskopischen Sensitivität und der chromatographischen Auflösung in der SEC-NMR (62 MHz) Kopplung optimiert.[22, 103] Dabei konnten Botha et al. zeigen, dass die Flusszelle Nummer 9 (*flow cell*, FC-9, die Bezeichnung wurde von Botha et al. übernommen) die höchste spektroskopische Sensitivität bei gleichzeitig bester chromatographischer Auflösung besaß.[103] In Tabelle 6.6, S. 77, sind die Spezifikationen der Flusszelle

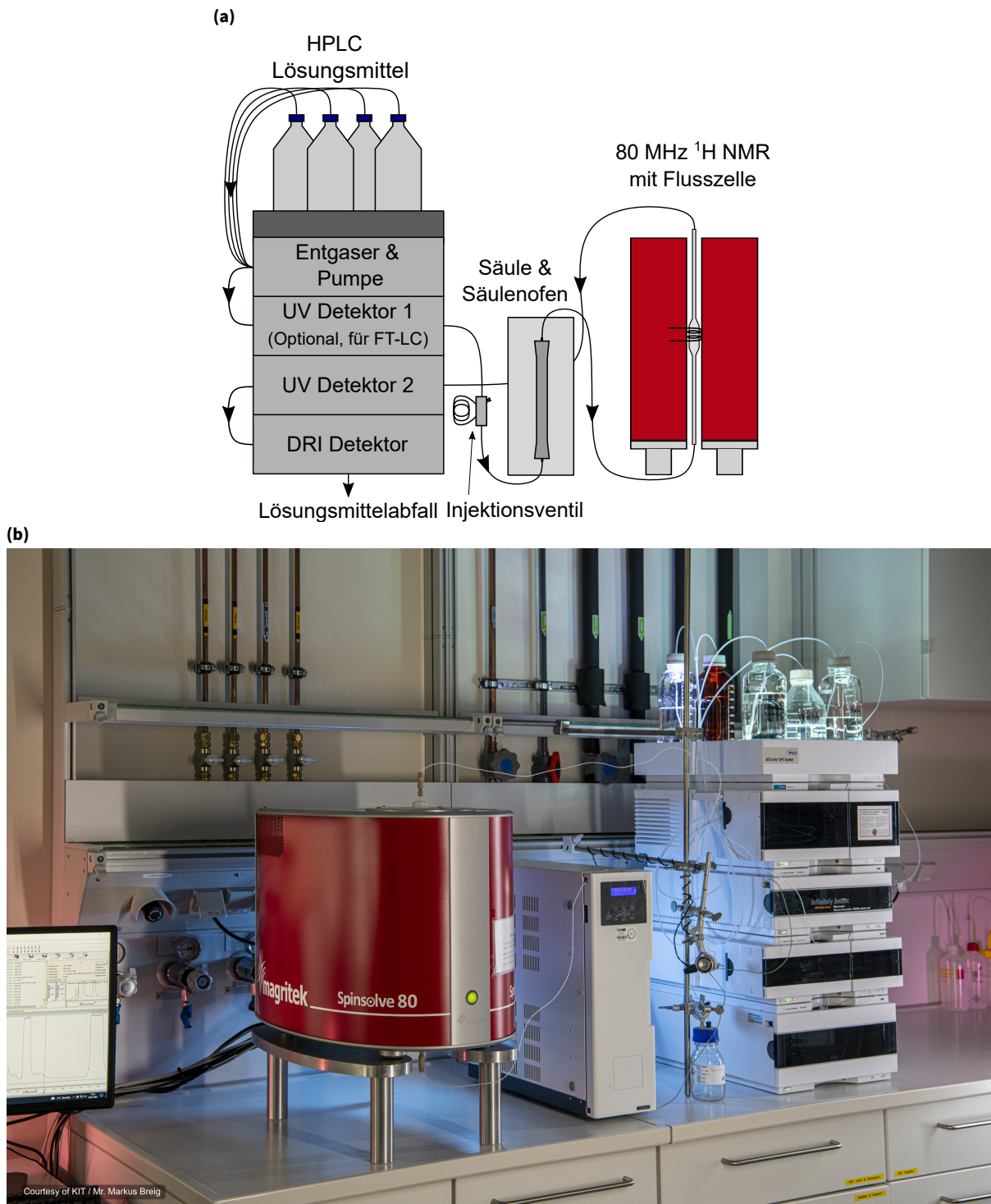


Abbildung 5.1: (a) Schematische Darstellung des verwendeten Aufbaus für die *onflow* LAC-NMR Kopplung und in (b) ein Bild des Aufbaus im Labor (Urheberrecht Markus Breig/KIT). Eine quaternäre Pumpe mit integriertem *in-line* Entgaser konnte mit bis zu vier Lösungsmittelreservoirs genutzt werden. Im Anschluss an die Säule befanden sich neben dem 80 MHz NMR Spektrometer noch zwei weitere Detektoren, ein UV Detektor (UV Detektor 2) und ein DRI Detektor. Vor der Säule befand sich ein UV Detektor (UV Detektor 1), der nur für die Methodenentwicklung der Fourier-Transformation *liquid chromatography* (FT-LC) verwendet wurde, die in Kapitel 7, S. 103, näher beschrieben wird.

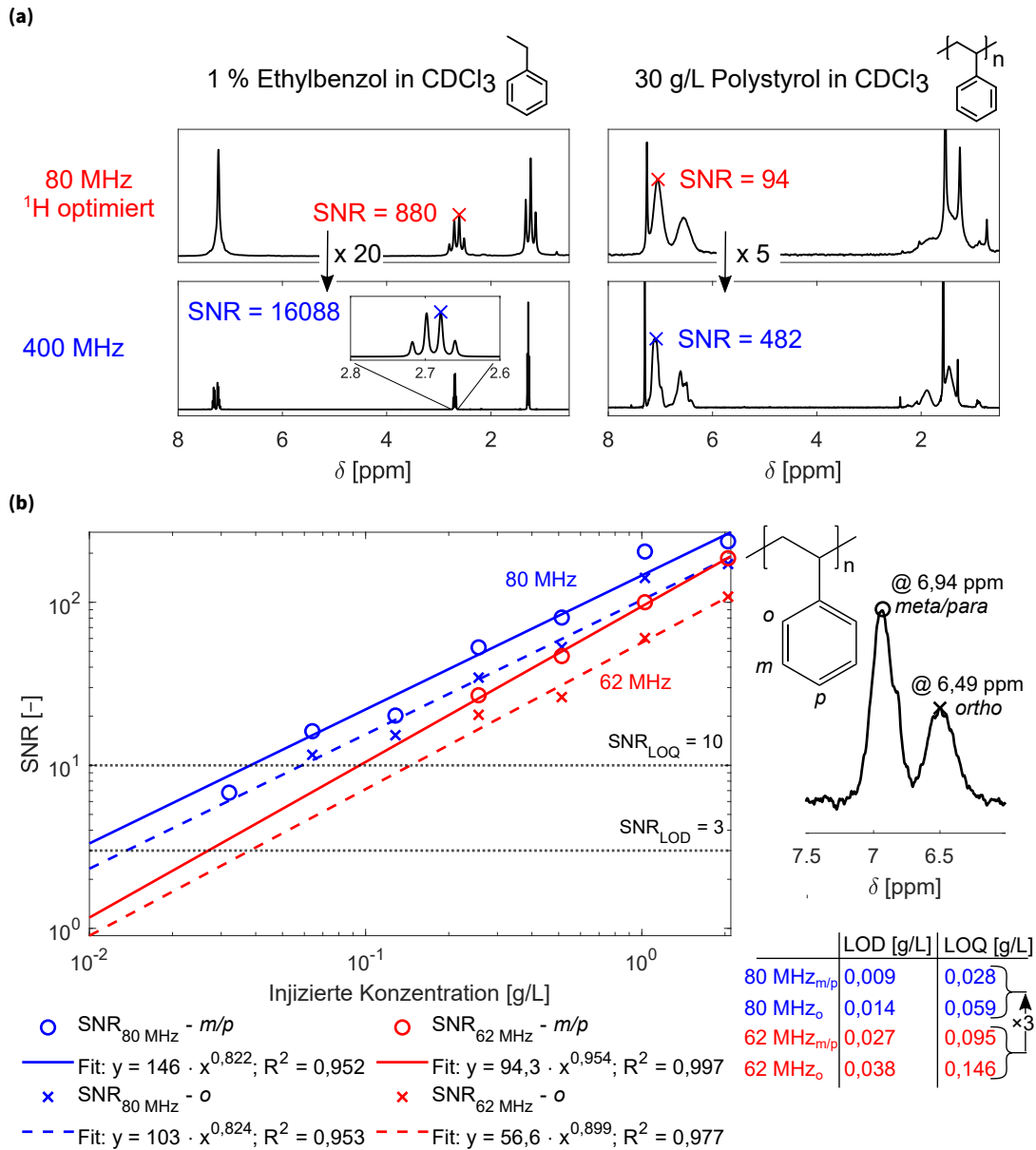


Abbildung 5.2: (a) Vergleich der NMR Spektren eines 80 MHz (¹H optimiert, Magritek) und eines 400 MHz (Bruker) NMR Spektrometer. Gemessen wurde eine 1 % (v/v%) Ethylbenzol und eine 30 g L⁻¹ Polystyrol ($M_p = 75,5 \text{ kg mol}^{-1}$) in CDCl₃ Lösung. Die Messungen wurden jeweils mit einem 90° Puls und 4 Scans (FID) aufgenommen. Die Spektren wurden basislinienkorrigiert und apodisiert mit einem 1 Hz Exponentialfilter. Das Rauschen wurde als einfache Standardabweichung eines signalfreien Bereichs berechnet. Die 400 MHz NMR Messungen wurden von Dr. Vera Gottstein durchgeführt. Modifiziert nach Matz et al. 2022.[120] (b) Bestimmung der Detektionsgrenzen in der SEC-NMR Kopplung. Verwendet wurden ein 62 MHz (alt, in Rot) und ein 80 MHz NMR Spektrometer (neu, in Blau), beide waren ¹H optimiert und von der Firma Magritek. Eine Konzentrationsreihe eines Polystyrol-Standards ($\bar{M}_n = 30\,300 \text{ g mol}^{-1}$, $D = 1,03$) in protoniertem THF wurde mit der bereits optimierten SEC-NMR Methodik zusammen mit Dr. Carlo Botha analysiert. Genutzt wurde eine semipräparative linear M SDV Säule (300 × 20 mm Innendurchmesser) mit einem Injektionsvolumen von $V_i = 500 \mu\text{L}$ und eine Flussrate von $F = 1 \text{ mL min}^{-1}$. Weitere Informationen zu dieser Analyse sind auf S. 202 der Dissertation von Dr. Carlo Botha zu finden.[22] Das 80 MHz ist im Mittel etwa ein Faktor 3 sensitiver, was neben der höheren Feldstärke vermutlich an einer Detektionsspule mit mehr Windungen liegt.

aufgeführt. Im selbigen Abschnitt wird zudem der Einfluss der Flusszellegeometrie auf die LAC-NMR (80 MHz) Kopplung beschrieben. Ähnlich zur SEC-NMR (62 MHz) Kopplung zeigte FC-9 auch in der LAC-NMR (80 MHz) Kopplung eine hohe spektrale Sensitivität bei geringer chromatographischer Bandenverbreiterung, weshalb diese für weitere LAC-NMR (80 MHz) Messungen eingesetzt wurde. Zur Einschätzung der Sensitivität des 80 MHz NMR Spektrometers (Magritek) ist in Abbildung 5.2a ein Vergleich mit einem 400 MHz NMR Spektrometer (Bruker) gezeigt. Gemessen wurde eine 1 % (v/v%) Ethylbenzol und eine 30 g L⁻¹ Polystyrol (PS, $M_p = 75,5 \text{ kg mol}^{-1}$) Lösung in CDCl₃ mit 4 Scans, einer FID Aufnahmezeit von 6,5 s und einer Wiederholzeit von 15,0 s. Das in Abbildung 5.2a gezeigte Spektrum einer Lösung bestehend aus 1 % Ethylbenzol in CDCl₃ wird allgemein als Referenz zur Einschätzung der Sensitivität für *benchtop* NMR Spektrometer genutzt.[121] Die PS-Lösung wurde gemessen, da die PS-Signale aufgrund der unterschiedlichen Stereochemie innerhalb einer Polymerkette in ppm verbreitert sind.[122] Die Spektren wurden mit einer 1 Hz Exponentialfunktion bearbeitet. Bei der 1 % Ethylbenzollösung ist das 400 MHz NMR Spektrometer um einen Faktor 20 sensitiver und bei der 30 g L⁻¹ PS-Lösung nur um einen Faktor 5, was auf die Streuung der isotropen chemischen Verschiebung in ppm zurückzuführen ist. In Abbildung 5.2b sind *LOD* und *LOQ* Werte der SEC-NMR Kopplung gezeigt unter Verwendung eines 62 MHz und eines 80 MHz NMR Spektrometers (beide ¹H optimiert). Analysiert wurde eine Konzentrationsreihe von Polystyrol ($\bar{M}_n = 30\,300 \text{ g mol}^{-1}$, $D = 1,03$) in Tetrahydrofuran (THF) entsprechend der Beschreibung von Botha et al.[22] Es wurden jeweils 500 μL injiziert. Die NMR Detektion erfolgte mit einem 90° Puls und einem T_1 Filter zur Lösungsmittelunterdrückung (Pulssequenz: 1-Puls-Spoil). Die *LOD* und *LOQ* Werte wurden sowohl für die aromatischen *meta/para* Protonen als auch für die *ortho* Protonen von Styrol bestimmt. Für weitere Details zur SEC-NMR Methodik wird auf die Dissertation von Dr. Carlo Botha verwiesen.[22] Das 80 MHz NMR Spektrometer ist im Mittel um etwa einen Faktor 3,0 sensitiver als das 62 MHz NMR Spektrometer. Da $SNR \propto B_0^{3/2}$ (siehe Gleichung 3.2.10, S. 20) wurde jedoch nur eine Sensitivitätssteigerung um den Faktor 1,5 erwartet. Da die Sensitivität mit dem Detektionsvolumen zunimmt, deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass sich im 80 MHz NMR Spektrometer eine Detektionsspule mit mehr Windungen befindet als im 62 MHz NMR Spektrometer.[112, 123]

5.2. NMR Messungen ohne chromatographische Separation

Für die spektroskopische Charakterisierung des Modellsystems sowie zur Optimierung der NMR Datenaufnahmeparameter wurden NMR Messungen ohne chromatographische Separation unter statischen und unter *onflow* Bedingungen durchgeführt. Der instrumentelle Aufbau für statische NMR Messungen ist in Abbildung 5.3a und für *onflow* NMR Messungen in Abbildung 5.3b skizziert.

Statische NMR Messungen Bei statischen NMR Messungen, gezeigt in Abbildung 5.3a, wurde die Probe in NMR Röhren mit einem Innendurchmesser von 4,09 mm und einem Außendurchmesser von 4,95 mm gefüllt und manuell in den NMR Probenkopf eingebracht. Im Gegensatz zu Hochfeld NMR Messungen rotierte das NMR Röhren während der Messung nicht, sondern blieb statisch. Weitere Informationen zu den NMR Röhren sind im Anhang A.1, S. 169, zu finden.

Onflow NMR Messungen Bei *onflow* NMR Messungen wurde ein zirkulärer Aufbau verwendet. Dieser entsprach dem LAC-NMR Aufbau ohne Detektoren und chromatographische Säule. Die gelöste Probe wurde mit der HPLC Pumpe zuerst durch den Entgaser, dann durch das NMR und letztlich wieder zurück ins Reservoir geleitet. Währenddessen wurden NMR Messungen der fließenden Probe aufgenommen.

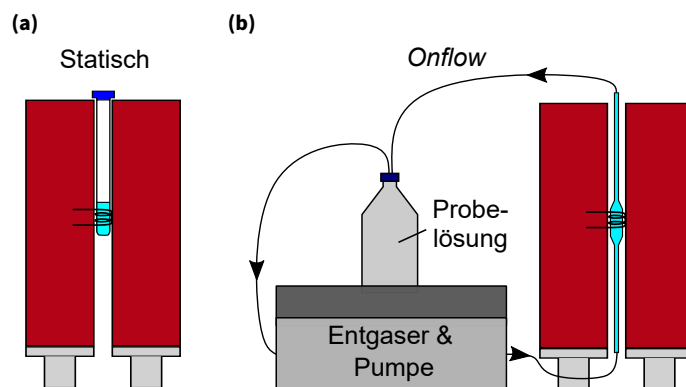


Abbildung 5.3: Durchführung der NMR Messungen ohne chromatographische Separation. (a) Bei statischen NMR Messungen wurde die Probe in ein NMR Röhrchen mit einem Innendurchmesser von 4,09 mm gefüllt und ohne vorherige Entgasung gemessen. (b) Bei *onflow* NMR Messungen wurde die Probelösung bei 1 mL min⁻¹ mit der HPLC Pumpe zuerst durch einen *in-line* Entgaser und anschließend durch die Flusszelle im NMR Spektrometer gepumpt. Die Probelösung wurde nach der NMR Messung zurück in das Reservoir der Probelösung geleitet. Die Spezifikationen der verwendeten NMR Röhrchen sind in Anhang A.1, S. 169, und die der NMR Flusszelle (FC-9) in Tabelle 6.6, S. 77, aufgeführt.

Dadurch ist es möglich, die auftretenden Flusseffekte (siehe Abschnitt 4.3, S. 34), die begrenzte Präpolarisationszeit sowie den O₂ Gehalt der mobilen Phase einer LAC-NMR Messung bestmöglich nachzubilden. Da das paramagnetische O₂ die Relaxation der ¹H Kerne beeinflusst,[50] werden damit ähnliche Relaxationszeiten erhalten wie bei der NMR-Detektion während einer LAC-NMR-Messung. Die verwendete NMR Flusszelle (FC-9) ist in Tabelle 6.6, S. 77, genauer spezifiziert. Sofern nicht anders angegeben, wurden *onflow* NMR Messungen bei einer Flussrate von 1 mL min⁻¹ durchgeführt, da diese Flussrate auch für LAC-NMR Messungen verwendet wurde.

5.3. Experimenteller Ablauf zur Aufnahme von 1D NMR Spektren und Spektrenmatrizen

Bei klassischen 1D NMR Experimenten wird ein einzelnes Spektrum aufgenommen, das zur Auswertung genutzt wird. Der experimentelle Ablauf ist in Abbildung 5.4a skizziert. Die Probe wird entsprechend der gewünschten Anzahl an Scans (nrScans) gemessen und der FID jeder Messung wird zunächst separat in einer Matrix zwischengespeichert. Die Matrix besitzt die Größe nrScans × npts, wobei npts die Anzahl an Datenpunkte pro FID ist. Die Dauer zwischen zwei aufeinanderfolgenden Scans entspricht der Wiederholzeit t_r der Pulssequenz. Nachdem die gewünschte Anzahl an Scans erreicht ist, werden alle FIDs in der temporär erstellten Matrix gemittelt, sodass ein gemittelter FID erhalten wird. Um ein Spektrum zu erhalten wird der gemittelte FID in einem weiteren Datenprozessierungsschritt Fourier-Transformiert.

Dieser experimentelle Ablauf wurde für die HPLC-NMR Kopplung modifiziert, da mehrere zeitdiskrete NMR Spektren aufgenommen werden müssen, um eine zeitliche Auflösung des spektralen Chromatogramms zu erhalten. Der modifizierte Ablauf ist in Abbildung 5.4b illustriert. Dafür wurde der Ablauf in Abbildung 5.4a um den Parameter der gewünschten Anzahl an Spektren (nrSpecs) erweitert, wobei jedes Spektrum wiederum mit einer gewünschten Anzahl an Scans aufgenommen werden kann. Entsprechend der Anzahl an Spektren wird der Ablauf in Abbildung 5.4a wiederholt und der gemittelte FID in einer Matrix abgespeichert, die die Größe nrSpecs × npts besitzt. Um eine genaue Zuordnung des chromatographischen Elutionsvolumens zum NMR Spektrum zu ermöglichen, wird der Messzeitpunkt zu Beginn der Aufnahme des jeweiligen FIDs gespeichert und zusammengefasst als eine Datenpunktliste

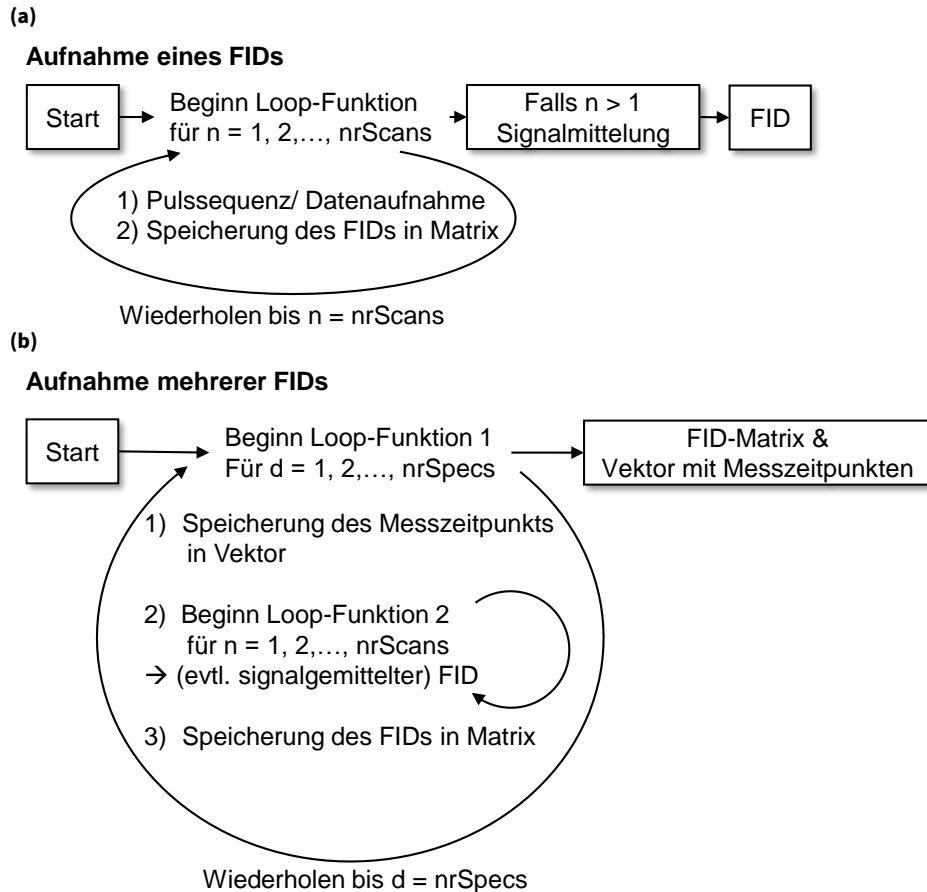


Abbildung 5.4: Experimenteller Ablauf zur Aufnahme (a) von 1D NMR Spektren und (b) von mehreren aufeinanderfolgenden gemessenen 1D NMR Spektren, die in Form einer FID-Matrix ausgegeben werden. (a) Bei einem 1D NMR Spektrum wird die Probe entsprechend der Anzahl der Scans ($nrScans$) gemessen. Die FIDs werden in einer Matrix zwischengespeichert und falls $n > 1$ gemittelt, sodass ein einziger FID erhalten wird. (b) Um mehrere NMR Spektren hintereinander aufzunehmen, wurde die Pulssequenz in (a) durch eine weitere *Loop*-Funktion erweitert. Entsprechend der gewünschten Anzahl von Spektren ($nrSpecs$), wird der Ablauf zur Aufnahme eines (eventuell signalgemittelten) FIDs wiederholt und in einer separaten Matrix gespeichert. Zusätzlich wird eine Datei mit den Messzeitpunkten erhalten, an denen die Aufnahme der jeweiligen $nrSpecs$ begonnen hat.

(Vektor) ausgegeben. Der Zeitabstand zwischen zwei signalgemittelten FIDs entspricht dem Produkt aus der Anzahl der Scans und der Wiederholzeit der Pulssequenz. Um eine hohe Zeitauflösung der chromatographischen Trennung zu erreichen, wurden die FIDs üblicherweise mit einem einzigen Scan aufgenommen, wodurch der Zeitabstand zwischen zwei FIDs in der FID-Matrix der Wiederholzeit der Pulssequenz entsprach.

Der experimentelle Ablauf in Abbildung 5.4b wurde auch zur Optimierung der NMR Aufnahmeparameter genutzt, da die Sensitivität aufgrund der kurzen Wiederholzeiten unter *steady state* Bedingungen beurteilt werden musste. Um sicherzustellen, dass sich die Gleichgewichtsmagnetisierung eingestellt hat, wurden mindestens die ersten fünf FIDs bei der Datenauswertung verworfen.

5.4. Vorbereitung für die NMR Messung

5.4.1. Äquilibrierungszeit des NMR Spektrometers

Der NdFeB-Permanentmagnet des 80 MHz *benchtop* NMR Spektrometers wird mit einer Kombination aus einem Peltierelement und Lüftern auf $26,50^{\circ}\text{C}$ temperiert. Durch das Einführen eines 5 mm NMR Röhrchens bei statischen NMR Messungen oder einer NMR Flusszelle bei *onflow* NMR oder LAC-NMR Messungen wird das thermische Gleichgewicht des Magneten gestört. Abbildung 5.5 zeigt die Magnettemperatur sowie die Frequenzkorrektur des ^{19}F Locks nach Einführen eines 5 mm NMR Röhrchens für eine statische NMR Messung oder einer NMR Flusszelle für eine *onflow* NMR Messung. Durch die Flusszelle wurde kontinuierlich THF mit 1 mL min^{-1} gepumpt, wobei die Temperatur des THFs der Raumtemperatur von etwa 20°C entsprach.

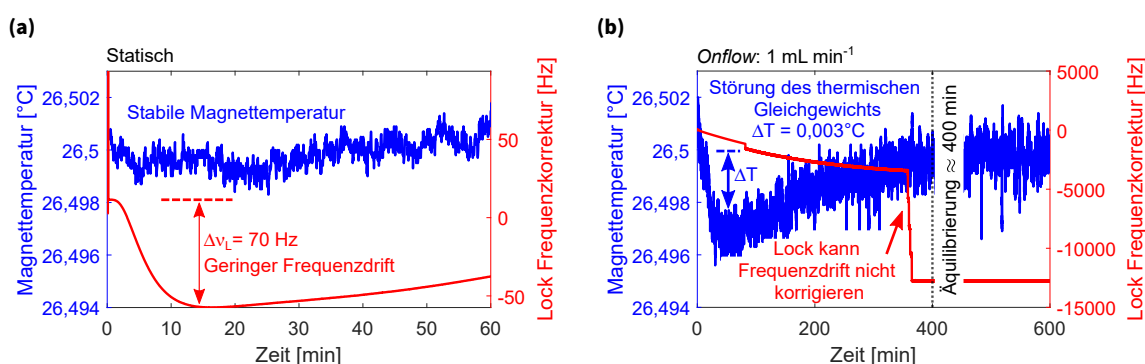


Abbildung 5.5: Magnettemperatur und Frequenzkorrektur des ^{19}F Locks nach Einführen eines (a) 5 mm Röhrchens oder (b) einer Flusszelle, bei $t \approx 0$ min. (a) Nach dem Einführen des NMR Röhrchens war das thermische Gleichgewicht des Magneten nur geringfügig gestört, sodass der Frequenzdrift vom Lock ausgeglichen werden konnte. (b) Durch die Flusszelle wurde THF mit einer Temperatur von etwa 20°C und einer Flussrate von 1 mL min^{-1} gepumpt. Als Folge des kontinuierlichen Volumenflusses war das thermische Gleichgewicht des Magneten stärker gestört, sodass der Lock den Frequenzdrift nicht mehr ausgleichen konnte, was zu den Stufen in der Frequenzkorrektur führte. Etwa 400 min nach Einbauen der Flusszelle war der Magnet wieder im thermischen Gleichgewicht. Dieses Experiment wurde durch die Ideen von Dr. Michael Pollard angeregt.

Nach dem Einbringen eines 5 mm NMR Röhrchens in das NMR Spektrometer war das thermische Gleichgewicht des Magneten nur geringfügig gestört. Wie in Abbildung 5.5a zu sehen, ist der maximale Betrag der Frequenzkorrektur etwa 70 Hz (rechte y-Achse). Da das Locksystem in der Lage ist solche Störungen auszugleichen, genügt für statische NMR Messungen nach dem Einbringen der Probe eine Wartezeit von etwa 5 – 10 min zum Temperieren der Probe, um thermische Konvektion in der Probenlösung zu reduzieren. Nach dem Einbringen der NMR Flusszelle in das NMR Spektrometer nahm die Magnettemperatur zunächst um etwa $0,003^{\circ}\text{C}$ ab, wie in Abbildung 5.5b zu sehen ist. Die Magnettemperatur sank, da das kontinuierlich durch die Flusszelle fließende THF eine Temperatur von etwa 20°C hatte und daher Wärme vom Magneten abführte. Durch diese Störung des thermischen Gleichgewichts veränderte sich die Stärke des B_0 -Feldes so stark, dass der Lock die Frequenzänderung nicht mehr ausgleichen konnte. Dies resultierte in zwei Stufenfunktionen in der Aufzeichnung der Lockfrequenzkorrektur bei etwa 100 und 350 min. Erst nach etwa 400 min hatte sich erneut ein thermisches Gleichgewicht im NMR Magneten eingestellt. Bei einer LAC-NMR Messung wird die Säule auf $26,5^{\circ}\text{C}$ temperiert. Jedoch kühlt die mobile Phase vor der NMR Detektion ab, da die Säule mit der NMR-Flusszelle durch einen etwa 50 cm langen Polytetrafluorethylen (PTFE)-Schlauch (0,25 mm Innendurchmesser) verbunden ist und die Temperatur der Raumluft 20°C beträgt. Daher wurde um

ein thermisches Gleichgewicht des NMR Magneten für *onflow* NMR und LAC-NMR Messungen zu gewährleisten, die Flusszelle am Vortag eingebaut. Somit wurde während einer LAC-NMR Messung das thermische Gleichgewicht des NMR Magneten lediglich von Fluktuationen der Raumtemperatur beeinflusst, die vom Locksystem ausgeglichen werden konnten.

Vorläufige Erkenntnisse von Dr. Michael Pollard deuten darauf hin, dass der in Abbildung 5.5b gezeigte Effekt auch beim Verändern der Flussrate auftritt, wobei das Ausmaß der Störung des thermischen Gleichgewichtes von der Flussartenänderung abhängt. Dieser Effekt wird minimiert, indem der PTFE-Schlauch zwischen der Säule (temperiert auf 26,5°C) und der NMR Flusszelle isoliert wird, um den Temperaturgradient zwischen der mobilen Phase und dem NMR Magneten zu verringern.

5.4.2. Shimmen

Zur Verbesserung der B_0 Magnetfeldhomogenität befindet sich im NMR Probenkopf neben der rf Spule ein Shimsystem. Dieses besteht aus mehreren stromdurchflossenen Spulen, durch die lokale Magnetfelder generiert werden. Das 80 MHz NMR Spektrometer besitzt die folgende Shims entsprechend den Legendre Polynomen: x , y , z , z^2 , zx , zy , x^2-y^2 , xy , z^3 , z^2x , z^2y , $z(x^2-y^2)$, zxy , x^3 , y^3 . Die Optimierung der Shims erfolgte iterativ mit Hilfe eines Algorithmus. Hierbei wurde die *FWHM* und die Breite bei 0,55 % des höchsten Peaks im Spektrum minimiert. Anschließend wurde der ^{19}F Lock relativ zu diesem Signal kalibriert.

Die Ersteinstellung der Shims erfolgte an jedem Messtag mit dem von Magritek bereitgestellten Shim-Standard bestehend aus 5 % H_2O in D_2O in einem NMR Röhrchen unter statischen Bedingungen. Die *FWHM* des H_2O Signals war dabei stets unter 0,5 Hz und bei 0,55 % der Peakhöhe unter 20 Hz. Anschließend wurde das Messgefäß (Röhrchen oder Flusszelle) in das NMR eingebracht, erneut auf das Lösungsmittelsignal geschimmt und referenziert. In Tabelle 5.1 sind die chemischen Verschiebungen und typischen *FWHM*-Werte der im Hauptteil dieser Arbeit verwendeten Lösungsmittel und Lösungsmittelmischungen aufgelistet.

Tabelle 5.1: Chemische Verschiebung δ und typische Halbwertsbreiten (*FWHM*) der NMR Signale (80 MHz) unter statischen und *onflow* Bedingungen für die in dieser Arbeit verwendeten Lösungsmittelsysteme.

Lösungsmittel	δ [ppm]	<i>FWHM</i> _{statisch} [Hz]	<i>FWHM</i> _{1 mL min⁻¹} [Hz] ^a
Acetonitril	2,10	2,3	1,1
Aceton/Wasser (60/40 v/v%)	4,79/2,43 ^b	2,3/2,6	1,3/2,6

^a Unter *onflow* Bedingungen ist die Linienbreite aufgrund der Entgasung geringer. ^b da δ von der Lösungsmittelzusammensetzung abhängt und das δ von Wasser auf 4,79 ppm gesetzt wurde, weicht die chemische Verschiebung δ des Acetons in der Wasser Mischung von dem δ des reinen Acetons, in Tabelle 4.1, S. 35, ab.

5.4.3. Manuelle Kalibrierung der Empfängerverstärkung

Der detektierte FID wird durch einen Analog-Digital-Wandler (ADC) digitalisiert.[50] Dabei wird die Spannung vom FID in einem festgelegten Spannungsbereich digitalisiert. Das genutzte 80 MHz NMR Spektrometer besitzt nach Herstellerangaben einen 16 bit ADC, wodurch dieser einen festen Spannungsbereich mit $2^{15}-1$ Werten digitalisieren kann.[50] Ist die Spannung des FIDs geringer als der Spannungsbereich des ADC, wird nur ein Teil der $2^{15}-1$ Digitalisierungsfenster genutzt. Dies kann dazu führen, dass Signale mit geringen Intensitäten ungenau oder, wenn die Intensitäten kleiner als die Hälfte eines Digitalisierungsfenster sind, gar nicht digitalisiert werden.[111] Ist dagegen die

Spannung des FIDs größer als der Digitalisierungsbereich des ADCs, wird der Teil des FIDs mit der zu hohen Spannung abgeschnitten und nur der Teil digitalisiert, der im Spannungsbereich des ADCs liegt. Dieses Phänomen wird in der Literatur als *FID clipping* bezeichnet und führt zu Sinc-Artefakten im NMR Spektrum.[50] Beide Szenarien führen zu einer geringeren Qualität der Spektren und sind daher zu vermeiden. Die Spannung des FIDs wird an den Digitalisierungsbereich des ADCs angepasst, indem diese durch einen Vorverstärker amplifiziert wird.[124] Die Empfängerverstärkung (*receiver gain*, *rxgain*), die erforderlich ist, um die Spannung des FIDs an den Spannungsbereich des ADC anzupassen, hängt vom Rotationswinkel des Pulses, der Konzentration von ^1H Kernen und der Verwendung von Lösungsmittelunterdrückungsmethoden ab. Daher ist es notwendig für jede verwendete Pulssequenz den jeweiligen *rxgain* zu kalibrieren. Dies geschah entsprechend der Beschreibung von Botha et al.[22, 103] Der *rxgain* wurde schrittweise erhöht bis Sinc-Artefakte durch das *FID clipping* auftraten. Der für spätere NMR Messungen verwendete *rxgain* war 6 dB unter dem *rxgain*, bei dem gerade noch keine Sinc-Artefakte zu sehen waren. In Abbildung 5.6 ist beispielhaft eine *rxgain* Kalibrierung am Shim-Standard (5 % H_2O in D_2O) für einen 90° Puls gezeigt.

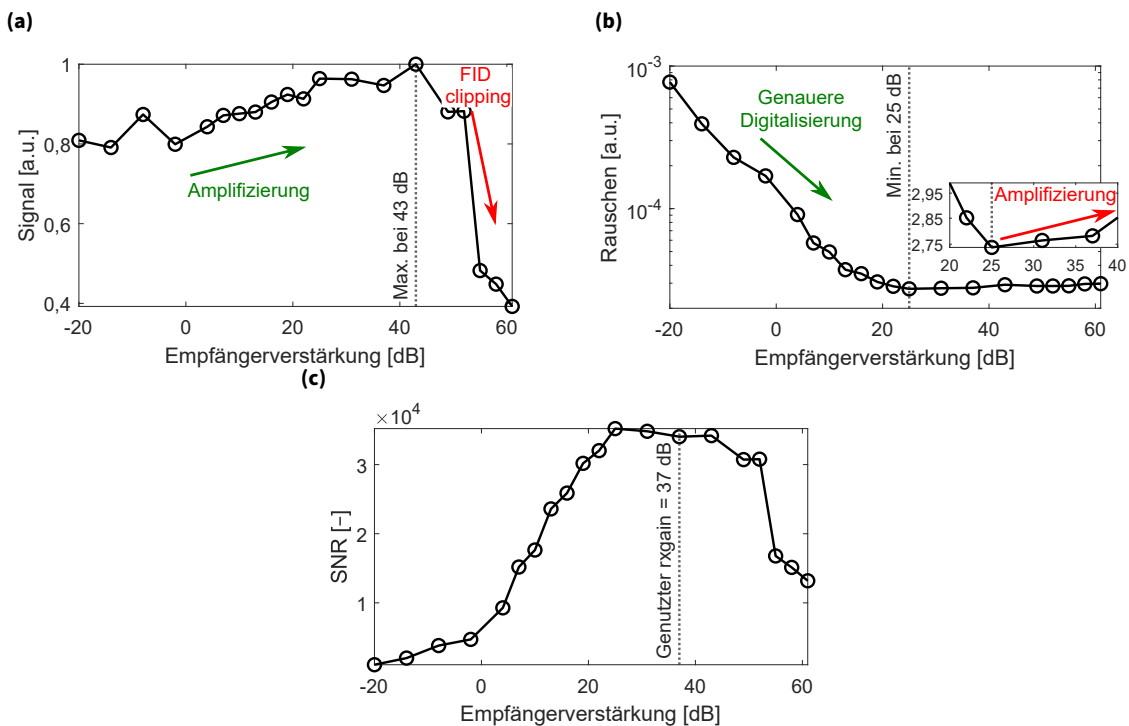


Abbildung 5.6: Manuelle Kalibrierung der Empfängerverstärkung (*receiver gain*, *rxgain*), beispielsweise gezeigt am Shim-Standard (5 % H_2O in D_2O) für einen 90° Puls. Die NMR Spektren wurden bei unterschiedlichen *rxgains* gemessen und lediglich phasiert und basislinienkorrigiert. (a) Die Signalintensität des Wassersignals, (b) das Rauschen und (c) das SNR wurden bestimmt. (a) Das Signal steigt bis zu *rxgain* = 43 dB an. Für *rxgains* über 43 dB ist die Spannung des FIDs größer als der Digitalisierungsbereich des ADC, wodurch es zum *FID clipping* kommt. (b) Bis zu *rxgain* = 25 dB nimmt das Rauschen ab, da die Basislinie durch immer kleiner werdende Digitalisierungsfenster genauer digitalisiert werden kann. Für die *rxgains* über 25 dB wird auch das Rauschen amplifiziert. (c) Die zuvor beschriebenen Effekte überlagern beim SNR. Der verwendete *rxgain* liegt 6 dB unter dem *rxgain*, bei welchem der FID gerade noch vollständig digitalisiert werden kann.

Die Signalintensität des Wassersignals nimmt aufgrund der Amplifizierung der Spannung des FIDs bis zu einem *rxgain* von 43 dB zu. Im Gegensatz dazu nimmt das Rauschen in Abbildung 5.6b zuerst bis zu einem *rxgain* von 25 dB ab und dann für *rxgains* über 25 dB zu. Die Abnahme des Rauschens entsteht durch die zunehmend genauere Digitalisierung des Analogsignals. Ein höherer *rxgain* verstärkt nicht nur das Signal, sondern auch das Rauschen. Dieser Effekt zeigt sich in der Zunahme des Rauschens für *rxgains* über 25 dB. Beim SNR in Abbildung 5.6c überlagern beide Effekte, sodass das SNR für *rxgain*

über 25 dB nicht mehr ansteigt. In diesem Beispiel wäre der für spätere NMR Messungen genutzte rxgain $43 \text{ dB} - 6 \text{ dB} = 37 \text{ dB}$.

In Abschnitt 6.2.2, S. 70, werden unterschiedliche NMR Aufnahmemethoden verglichen, die sich im Pulswinkel, in der Wiederholzeit, dem Zusatz von Gadolinium(III) als Relaxationsreagenz und der Verwendung von Lösungsmittelunterdrückung unterscheiden. In Tabelle B.1, Anhang B.3, S. 177, sind die dafür verwendeten rxgains zusammengefasst. Für eine Probe mit protoniertem Lösungsmittel betrug der verwendete rxgain für einen 90° Puls ohne Lösungsmittelunterdrückung 19 dB und 43 dB mit Lösungsmittelunterdrückung.

5.5. Methoden zur Bestimmung der Relaxationszeiten

Für die Bestimmung der longitudinalen Relaxationszeit (T_1) wurde die *inversion recovery* (IR) Pulssequenz und für die transversale Relaxationszeit (T_2) die Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) Pulssequenz verwendet. Die IR Pulssequenz ist in Abbildung 5.7a und die CPMG Pulssequenz in Abbildung 5.7b dargestellt. Im Folgenden wird auf beide Pulssequenzen und die Auswertung der erhaltenen Spektren näher eingegangen.

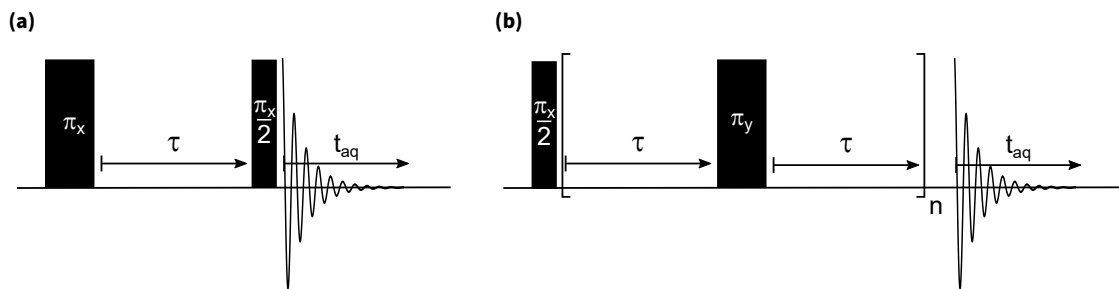


Abbildung 5.7: (a) Die *inversion recovery* (IR) Pulssequenz wurde für die T_1 Bestimmung genutzt und (b) die Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) Pulssequenz für die T_2 Bestimmung.[50]

5.5.1. Bestimmung der longitudinalen Relaxationszeit

Die *inversion recovery* (IR) Pulssequenz (Abbildung 5.7a) besteht aus einem $\beta = 180_x^\circ$ Puls, der zuerst die makroskopische Magnetisierung \vec{M}_0 auf die $-z$ -Achse ausrichtet. Nach einer Wartezeit τ , in der \vec{M}_0 wieder entlang der $+z$ -Achse relaxiert, folgt ein $\beta = 90_x^\circ$ Puls, der \vec{M}_z in die x,y -Ebene ausrichtet. Anschließend erfolgt die Datenaufnahme mit der Dauer t_{aq} . Die Intensität des detektierten Signals ist proportional zum Betrag der in die x,y -Ebene ausgelenkten Magnetisierung \vec{M}_t , deren Abhängigkeit von τ von Gleichung 5.5.1 beschrieben wird,[50]

$$|\vec{M}_t| = |\vec{M}_0| \left(1 - 2 \exp\left(-\frac{\tau}{T_1}\right) \right). \quad (5.5.1)$$

Die Pulssequenz wird mit variierenden τ wiederholt. Die Signalintensität der NMR Spektren werden gegen τ aufgetragen. Durch die Anpassung der Daten mit Gleichung 5.5.1 wird T_1 für jede spektrale Komponente erhalten.

5.5.2. Bestimmung der transversalen Relaxationszeit

Um die T_2 Relaxationszeit zu messen, wurde die CPMG Pulssequenz angewandt (siehe Abbildung 5.7b, S. 50). Zuerst wird \vec{M}_0 mit einem $\beta = 90^\circ_x$ Puls in die x,y-Ebene ausgelenkt. Nach einer Wartezeit τ in dem die magnetischen Momente auffächern folgt ein $\beta = 180^\circ_y$ Refokussierungspuls. Dadurch wird der Einfluss von Magnetfeldinhomogenitäten und Pulsungenauigkeiten auf die T_2 Bestimmung ausgeglichen, sodass der Rückgang der transversalen Magnetisierung nur durch die T_2 Relaxation stattfindet. Mit steigender Anzahl an Echos n nimmt die Amplitude des FIDs ab. Die Aufnahme von Spektren erfolgt mit unterschiedlichen n . Durch Auftragen der Spektren gegen $2\tau \cdot n$ wird ein Datensatz erhalten, in dem die abnehmenden Signalintensitäten mit der Gleichung 5.5.2 angepasst werden können, um die T_2 Relaxationszeit zu bestimmen.

$$|\vec{M}_i| = |\vec{M}_0| \exp\left(-\frac{2\tau \cdot n}{T_2}\right). \quad (5.5.2)$$

5.6. Verbesserung der Empfindlichkeit durch Steigerung der Signalakkumulation

Die Sensitivität in einem NMR Spektrum wird durch Signalmittelung verbessert. Gleichung 3.2.10, S. 20, beschreibt, dass das SNR proportional zur Quadratwurzel der Anzahl der gemittelten Scans ($ns^{1/2}$) steigt und somit von der Messzeit t_m abhängt. Zur Bewertung der Sensitivität einer NMR Methode wird daher das $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ herangezogen. Daher ist ein Ansatz zur Sensitivitätssteigerung bei NMR Messungen die Wiederholzeit der Pulssequenz t_r zu reduzieren, sodass mehr Spektren in derselben Messzeit t_m akkumuliert werden können und somit das $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ verbessert wird. Für $t_r < 5,0 \cdot T_1$ wird aufgrund der unvollständigen T_1 Relaxation eine Gleichgewichtsmagnetisierung \vec{M}_z gemessen, wobei die Intensität des Messsignals proportional zum Betrag von \vec{M}_z ist. Die $|\vec{M}_z| \cdot t_r^{-1/2}$ für einen 90° Puls kann mit der Gleichung 5.6.1 für unterschiedliche $t_r \cdot T_1^{-1}$ Verhältnisse berechnet werden.[125] Der berechnete Verlauf von $|\vec{M}_z| \cdot t_r^{-1/2}$ für verschiedene $t_r \cdot T_1^{-1}$ Verhältnisse ist in Abbildung 5.8a relativ zu $t_r = 5,0 \cdot T_1$ gezeigt.[125]

$$\frac{|\vec{M}_z|}{t_r^{1/2}} = \frac{|\vec{M}_0|}{t_r^{1/2}} \left(1 - \exp\left(-\frac{t_r}{T_1}\right)\right). \quad (5.6.1)$$

Da $|\vec{M}_z|$ proportional zur Signalintensität und damit auch zum SNR des NMR Spektrums, entspricht die Darstellung dem theoretischen $SNR \cdot t_r^{-1/2}$. Die Funktion ist in Abbildung 5.8a dargestellt und besitzt für $t_r \approx 1,3 \cdot T_1$ ein Maximum mit einer Sensitivitätssteigerung um einen Faktor von etwa 1,4.

Um die Sensitivität weiter zu erhöhen, wurden Rotationswinkel von $\beta < 90$ verwendet. Somit konnte die Signalakkumulation pro Zeiteinheit weiter gesteigert werden. Der optimale Rotationswinkel β_{opt} für ein bestimmtes $t_r \cdot T_1^{-1}$ Verhältnis wird Ernst Winkel genannt und wird anhand Gleichung 5.6.2 berechnet.[51] Mit Gleichung 5.6.3 wird $|\vec{M}_z|$ und mit Gleichung 5.6.4 die $|\vec{M}_z| \cdot t_r^{-1/2}$ für unterschiedliche β_{opt} bestimmt.

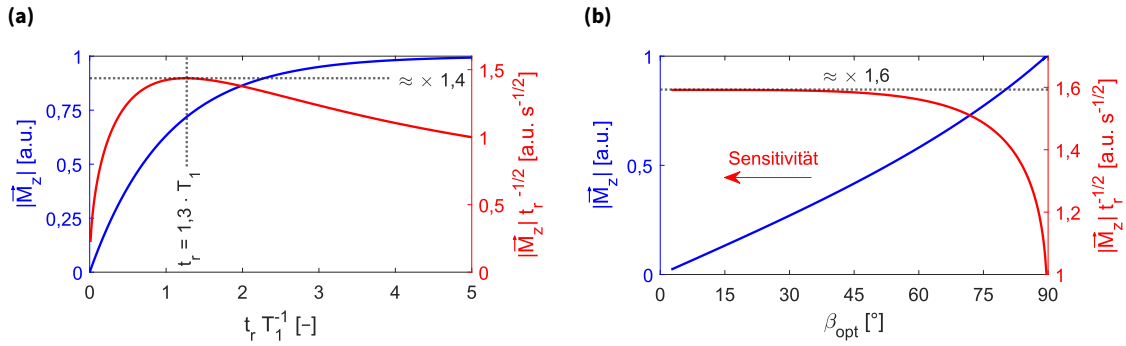


Abbildung 5.8: Betrag der Gleichgewichtsmagnetisierung $|\vec{M}_z|$ und $|\vec{M}_z| \cdot t_r^{-1/2}$ (a) für einen 90° Puls und (b) für den Ernst Winkel β_{opt} , relativ zu einem 90° Puls mit $t_r = 5,0 \cdot T_1$. Der Verlauf von $|\vec{M}_z|$ und $|\vec{M}_z| \cdot t_r^{-1/2}$ ist für (a) in Gleichung 3.2.12, S. 22, und Gleichung 5.6.1, sowie für (b) in den Gleichungen 5.6.3 und 5.6.4 beschrieben.[51, 125]. Da $|\vec{M}_z|$ proportional zur Intensität des NMR Signals ist, entspricht der Verlauf von $|\vec{M}_z| \cdot t_r^{-1/2}$ dem des theoretischen $\text{SNR} \cdot t_r^{-1/2}$ und wird zur Abschätzung der Sensitivität herangezogen.

Die Werte für $|\vec{M}_z|$ und $|\vec{M}_z| \cdot t_r^{-1/2}$ für verschiedene β_{opt} sind in Abbildung 5.8b relativ zu einem 90° Puls mit $t_r = 5,0 \cdot T_1$ dargestellt.[51, 125–127]

$$\cos(\beta_{\text{opt}}) = \exp\left(-\frac{t_r}{T_1}\right) \quad (5.6.2)$$

$$|\vec{M}_z| = |\vec{M}_0| \frac{(1 - \cos(\beta_{\text{opt}})) \cdot \sin(\beta_{\text{opt}})}{1 - \cos(\beta_{\text{opt}})^2} \quad (5.6.3)$$

$$\frac{|\vec{M}_z|}{t_r^{1/2}} = \frac{|\vec{M}_0|}{(-\ln(\cos(\beta_{\text{opt}}) T_1))^{1/2}} \frac{(1 - \cos(\beta_{\text{opt}})) \cdot \sin(\beta_{\text{opt}})}{1 - \cos(\beta_{\text{opt}})^2} \quad (5.6.4)$$

Abbildung 5.8b verdeutlicht, dass mit abnehmenden β_{opt} das $|\vec{M}_z|$ abnimmt (linke y-Achse). Da nach Gleichung 5.6.2 mit kleinerem β_{opt} auch t_r abnimmt, werden aber mehr FIDs pro Zeiteinheit gemittelt, sodass das $|\vec{M}_z| \cdot t_r^{-1/2}$ effektiv ansteigt (rechte y-Achse). Daher nimmt mit abnehmenden β_{opt} die Sensitivität stetig zu und ist maximal um einen Faktor von ca. 1,6 höher als die Referenz von $\beta = 90^\circ$ mit $t_r = 5,0 \cdot T_1$. Der Ernst Winkel hängt von der Wiederholzeit der Pulssequenz ab, welche die FID Aufnahmezeit t_{aq} einschließt. Da, wie in Gleichung 3.3.20, S. 27, gezeigt, die Aufnahmezeit invers zur spektralen Auflösung ist, hängt der minimale Ernst Winkel von der gewünschten spektralen Auflösung ab. Für weitere Informationen zu den verwendeten Ernst Winkel wird auf Abschnitt 6.2.4, S. 73, verwiesen.

5.7. Lösungsmittelunterdrückung durch Präsaturation, PRESAT

In dieser Arbeit wurde mit einem ^1H optimierten 80 MHz NMR Spektrometer ohne designierte z-Gradientenspulen gearbeitet. Daher ist die Auswahl an Pulssequenzen zur Lösungsmittelunterdrückung auf solche ohne Gradienten beschränkt. In dieser Arbeit wurde eine Lösungsmittelunterdrückung durch die Präsaturation (PRESAT) Pulssequenz erreicht. Diese Pulssequenz ist in Abbildung 5.9 gezeigt und in Abschnitt 4.4, S. 35, näher erläutert. Durch einen amplitudenmodulierten Sättigungspuls konnten bis zu maximal drei Lösungsmittelsignale simultan gesättigt werden. Zwischen dem Sättigungspuls und dem Anregungspuls befand sich ein Spoil-Puls. Der Gradient G des

Spoil-Pulses wird durch die linearen x-Shim Spulen erzeugt und beträgt nach Informationen des Herstellers etwa $0,02 \text{ T m}^{-1}$. Der Spoil-Puls zerstört die restliche transversale Magnetisierung, die für den Fall, dass $t_r \leq T_2$, die Phase des FIDs beeinflussen würde.[128–131]

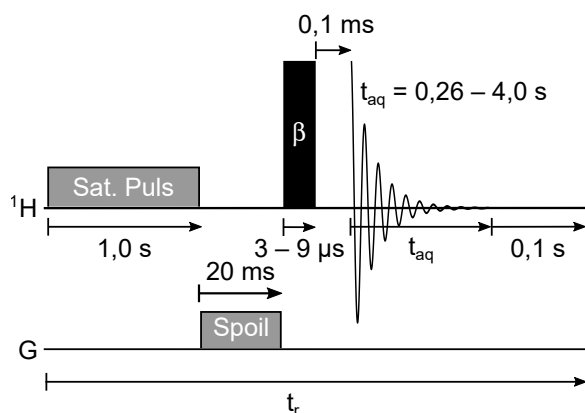


Abbildung 5.9: Für die Lösungsmittelunterdrückung wurde die Präsaturation (PRESAT) Pulssequenz verwendet. Ein amplitudenmodulierter Saturierungspuls konnte bis zu drei Lösungsmittelsignale simultan unterdrücken. Zwischen dem Saturierungspuls und dem Anregungsimpuls befand sich ein Spoil-Puls. Der Gradient G für den Spoil-Puls entsprach nach Herstellerangaben etwa $0,02 \text{ T m}^{-1}$ und wurde durch die linearen x-Shim Spulen erzeugt. Die angegebenen Zeiten der Pulssequenzkomponenten entsprechen den Zeiten nach der in Abschnitt 6.2.1, S. 67, beschriebenen Optimierung.

5.8. Datenprozessierungsmethoden

Der Umfang der angewandten Datenprozessierungsmethoden hing davon ab, ob die NMR Spektren mit oder ohne chromatographischer Separation aufgenommen wurden. Sämtliche Prozessierungsschritte sind in Abbildung 5.10 zusammengefasst. Bei NMR Spektren, die ohne chromatographischer Separation aufgenommen wurden, wurden folgende Prozessierungsschritte durchgeführt: (1) *zero filling* und Apodisierung, (2) Phasierung sowie (3) eine Basislinienkorrektur. Bei einem Datensatz mit chromatographischer Separation folgten daraufhin noch (4) eine Filterung der Chromatogramme bei jeder chemischen Verschiebung, (5) eine Referenzsubtraktion, (6) eine Identifizierung der Analytpeaks sowie (7) eine Basislinienkorrektur der Chromatogramme.[22] Im Weiteren werden die einzelnen Schritte näher erklärt.

5.8.1. Prozessierung der NMR Spektren ohne chromatographischer Separation

Die Datenprozessierungsschritte für NMR Spektren ohne chromatographischer Separation in Abbildung 5.10 wurden bereits in Abschnitt 3.4, S. 28, näher erläutert. In dieser Arbeit wurden als Apodisierungsfunktionen eine halbseitige Gaußfunktion oder eine abfallende Exponentialfunktion verwendet, die mathematisch in Abschnitt 3.3, S. 25, definiert sind. *Zero filling* (zf) wurde mit unterschiedlichen Faktoren durchgeführt, mindestens jedoch mit einem Faktor von zwei. Der jeweilige zf Faktor hing von der Datenpunktzahl des NMR Spektrums ab und wird in Abschnitt 6.1.3.1, S. 61, weiter diskutiert. Im selbigen Abschnitt sind auch die Wahl der Apodisierungsparameter weiter beschrieben. Eine Phasenkorrektur nullter und erster Ordnung wurden separat für jedes Spektrum durchgeführt. Die Basislinienkorrektur der NMR Spektren wurde mit einem Polynom dritter Ordnung durchgeführt.

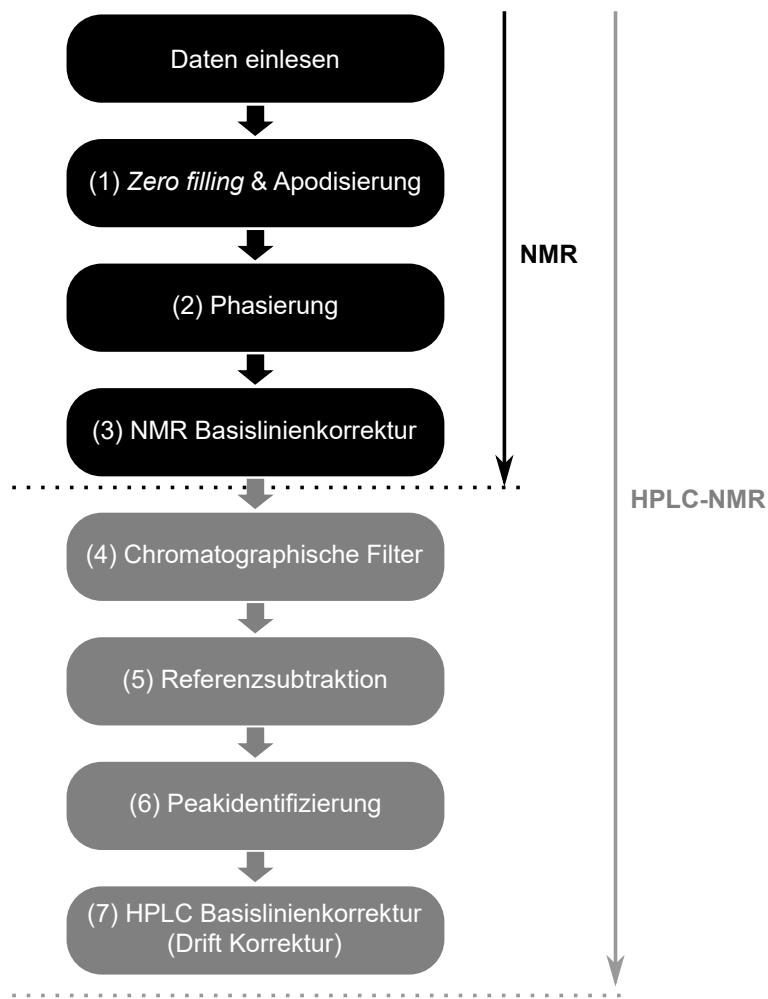


Abbildung 5.10: Datenprozessierungsschritte zur Bearbeitung von NMR Datensätzen mit und ohne chromatographischer Separation.

5.8.2. Datenprozessierung der NMR Spektren mit chromatographischer Separation

Globale Phasenkorrektur Abbildung 5.10 veranschaulicht, dass bei Datensätzen einer LAC-NMR Messung zuerst dieselben Prozessierungsschritte angewandt wurden wie bei Datensätzen, die ohne chromatographischer Separation aufgenommen wurden. Aufgrund der Größe der Datensätze (typischerweise zwischen 1000 und 2000 NMR Spektren pro Datensatz) war es aber nicht möglich jedes Spektrum individuell zu phasieren. Daher wurde für LAC-NMR Datensätze eine globale Phasenkorrektur verwendet. Hierfür wurden zunächst die Phasenkorrekturen nullter und erster Ordnung an einem NMR Spektrum durchgeführt. Diese Phasenkorrekturwerte wurden im Anschluss dann für alle Spektren verwendet.

Chromatographische Filter Nach der Bearbeitung der NMR Spektren, folgte die Datenprozessierung entlang der chromatographischen Dimension. Wie in Abbildung 4.4, S. 37, beschrieben, besteht ein LAC-NMR Datensatz aus einer Matrix aus Spektren, die bei einem bestimmten Elutionsvolumen aufgenommen wurden. Aufgrund der spektralen Auflösung der NMR Spektren wird somit für jede chemische Verschiebung ein Chromatogramm erhalten. Zur Verbesserung des SNR wurden die Chromatogramme

mit Fensterfunktionen gefaltet. Im Unterschied zur Apodisierung, bei der die Faltung im Frequenzraum geschieht, wird hier die Faltung im Zeitraum durchgeführt. Die Ergebnisse der Anwendung verschiedener Fensterfunktionen sind in Abschnitt 6.3.4, S. 85, zusammengefasst.

5.8.2.1. Numerische Lösungsmittelunterdrückung: Referenzsubtraktion und chromatographische Basislinienkorrektur

Eine Reduzierung der Lösungsmittelsignale und Basislinieninstabilitäten wurde durch die Referenzsubtraktion und der chromatographischen Basislinienkorrektur erreicht.[22, 103, 104] Diese Schritte werden unter dem Begriff numerische Lösungsmittelunterdrückung zusammengefasst. Mit der Kombination beider Methoden war es möglich, die Lösungsmittelsignale um etwa einen Faktor 100 zu reduzieren, wobei die Peaks der Analyten nicht oder nur geringfügig beeinflusst wurden. Der jeweilige tatsächliche Unterdrückungsfaktor hängt von der Datenqualität (Lock Stabilität, Veränderungen der Form der Lösungsmittelsignale) und der gewählten Referenzregion ab. In Abbildung 5.11 ist der Effekt der numerischen Lösungsmittelunterdrückung dargestellt.

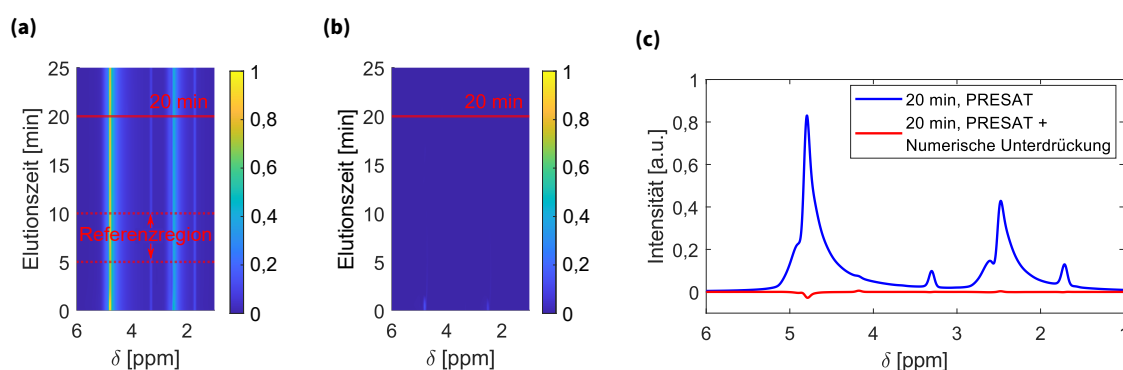


Abbildung 5.11: Effekt der numerischen Lösungsmittelunterdrückung. In (a) ist eine isokratische LAC-NMR Messung gezeigt, bei der als mobile Phase eine binäre Mischung aus Aceton und Wasser (60/40 v/v%) verwendet wurde. Während der Datenaufnahme erfolgte eine Lösungsmittelunterdrückung durch PRESAT. In (b) ist derselbe Datensatz nach der numerischen Lösungsmittelunterdrückung gezeigt, wobei die Farbskala beibehalten wurde (PRESAT + numerische Unterdrückung). Die jeweiligen Spektren bei einer Elutionszeit von 20 min sind in (c) zu sehen. Mit der numerischen Lösungsmittelunterdrückung können Lösungsmittelsignale zusätzlich um etwa einen Faktor 100 reduziert werden.

Ein weiterer Vorteil der numerischen Lösungsmittelunterdrückung ist, dass Verunreinigungen im Lösungsmittel oder konstant auftretende Signale in den NMR Spektren (Artefakte, ^{13}C Satelliten der Lösungsmittel) ebenso reduziert werden. Im Anschluss werden beide Schritte näher erläutert, jedoch wird für eine tiefergehende Diskussion dieser Methoden auf vorherige Arbeiten der Arbeitsgruppe verwiesen.[6, 22, 103, 104, 132]

Referenzsubtraktion Bei der Referenzsubtraktion wird ein gemittelt NMR Spektrum eines variablen Bereichs ohne Analytelution (Referenzregion) von allen anderen Spektren abgezogen. Im Beispiel in Abbildung 5.11 wurde zur Berechnung des Referenzspektrums die Spektren im Elutionsbereich zwischen 5 und 10 min gemittelt. Die Subtraktion des Referenzspektrums erfolgte mit einer konstanten Intensität. In der SEC-NMR Kopplung sind Fälle beschrieben, bei denen das Referenzspektrum zusätzlich durch Multiplikation mit einem Faktor an den Maximalwert des Messspektrums angepasst wurde.[22] Darauf wurde verzichtet, da hauptsächlich mit einem binären Lösungsmittelsystem aus Aceton und Wasser (60/40 v/v%) gearbeitet wurde und die Lösungsmittelsignale während der Analytelution durch das in der

Probe gelöste O₂ unterschiedlich beeinflusst wurden, wodurch eine Skalierung des Referenzspektrums zu keiner verbesserten Lösungsmittelunterdrückung führte.

Um eine hohe zeitliche Auflösung der chromatographischen Dimension zu erhalten, wird empfohlen, die NMR Spektren mit einer kurzen FID Aufnahmezeit zu messen, um die Wiederholzeit der Pulssequenz möglichst gering zu halten. Dies führt zu einer geringen spektralen Auflösung und damit zu einer ungenauen Darstellung der NMR Linienformen. Um Subtraktionsartefakte zu reduzieren, ist es ratsam, *zero filling* durchzuführen.[103]

Peakidentifizierung und chromatographische Basislinienkorrektur Nach der Referenzsubtraktion erfolgt zunächst die Identifizierung der Analytelutionsbereiche, um diese bei der anschließenden chromatographischen Basislinienkorrektur auszuschließen. Zur Identifizierung der Analytpeaks wurde der 2D Datensatz nach Signalen, deren Intensität einem Vielfachen (typischerweise einen Faktor 6) des Rauschwertes entsprachen, durchsucht. Alle gefundenen Peaks wurden mit einer interaktiven Auswahl manuell spezifiziert.[22, 103, 104] Bei der anschließenden Basislinienkorrekturroutine, in vorherigen Arbeiten auch Driftkorrektur genannt, wurden die Chromatogramme bei jeder chemischen Verschiebung basislinienkorrigiert. Hierzu wurde die Basislinie jedes Chromatogramms mit einem Polynom erster Ordnung angepasst, wobei die Elutionsbereiche der Analyten ausgeschlossen wurden. Die erhaltene Anpassungsfunktion wird dann vom kompletten Chromatogramm abgezogen.

Teil IV.

Ergebnisse und Diskussion

6. Ergebnisse und Diskussion zur LAC-NMR Kopplung

Für die Methodenentwicklung der LAC-NMR Kopplung wurde zunächst ein Modellsystem bestehend aus Alkyl-estern der 4-Hydroxybenzoesäure spektroskopisch und chromatographisch charakterisiert. Für die Verbesserung der Sensitivität in der NMR Detektion, wurden die NMR Aufnahmeparameter optimiert, Lösungsmittelunterdrückung angewandt und der Einsatz von Gadolinium(III) als Relaxationsreagens untersucht. Hierfür wurden zunächst NMR Messungen unter statischen und onflow Bedingungen ohne chromatographische Separation durchgeführt.

Anschließend wurde in der gekoppelten Analytik die Auswirkung chromatographischer Parameter auf die Trennleistung und Sensitivität untersucht. Nach der Datenerfassung wurden die Effekte der Signalmittelung und Filterung entlang der chromatographischen Dimension analysiert.

Mit den optimierten Parametern wurden in Applikationsbeispielen die Sensitivität und Vorteile der chemisch selektiven Detektion demonstriert. Dazu wurden Parabene bei Konzentrationen weit unterhalb der zulässigen Höchstmengen in Kosmetika sowie Polystyrol-Oligomere analysiert. Zusätzlich wurde bei einer LAC-NMR Messung mit chromatographisch überlappenden Peaks die spektrale Auflösung genutzt, um die Substanzen chromatographisch aufzulösen.

Die in diesem Kapitel diskutierten Ergebnisse wurden teilweise in einem von mir verfassten Artikel (abrufbar unter <https://pubs.acs.org/articlesonrequest/AOR-SHGENWPQS2GNR7YXYYPB>) veröffentlicht.[133]

6.1. Definition und Charakterisierung des Modellsystems

6.1.1. Beschreibung des verwendeten Modellsystems: Parabene

Für die Methodenentwicklung und -optimierung der LAC-NMR (80 MHz) Kopplung wurden die Alkyl-ester (Methyl- bis Pentylester) der 4-Hydroxybenzoesäure verwendet. Diese Moleküle werden unter dem Namen Parabene zusammengefasst und finden, bis auf Ausnahme des Pentylesters, als Konservierungsstoffe in kosmetischen Produkten Verwendung.[134] Im Weiteren werden diese Moleküle entsprechend der Estergruppe als Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl- und Pentylparaben bezeichnet. Die Molekülstrukturen sind in Abbildung 6.1 dargestellt.

6.1.2. Chromatographische Methodenentwicklung und Charakterisierung des Modellsystems

Die Methodenentwicklung wurde unter isokratischen Bedingungen durchgeführt. Dafür wurde zunächst zur Auftrennung des Modellsystems eine LAC Methode entwickelt. Die mobile Phase bestand aus einer binären Mischung aus Aceton und Wasser (60/40 v/v%). Eine semipräparative C₁₈ Säule (250 × 10 mm) wurde auf 26,5°C temperiert und bei einer Flussrate von 1 mL min⁻¹ genutzt. Unter diesen Bedingungen erfolgte die Auftrennung aller Parabene innerhalb 60 min. Für weitere Informationen zur Säule wird auf den Anhang A.1, S. 169, verwiesen. Beide Lösungsmittel wurden gewählt, da diese im NMR Spektrum jeweils als Singulets erscheinen und nicht giftig sind. In Abbildung 6.1 ist eine Überlagerung von

Chromatogrammen des UV Detektors von Parabenmischungen mit den injizierten Konzentrationen von 0,1, 0,01 und 0,001 g L⁻¹ je Paraben gezeigt. Die Detektionswellenlänge des UV Detektors betrug $\lambda = 210$ nm. Die Parabenlösungen wurden mit der mobile Phase hergestellt.

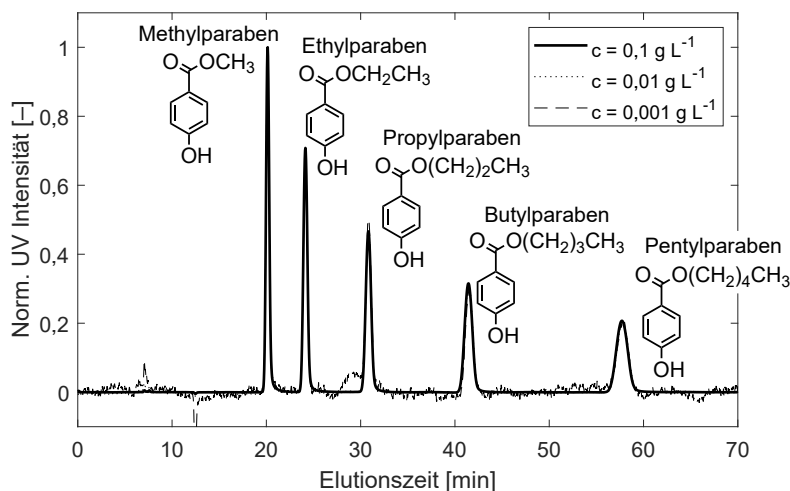


Abbildung 6.1: Chromatographische Trennung von Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl- und Pentylparaben im linearen Konzentrationsbereich der LAC Säule. Die Chromatogramme dreier Messungen sind gezeigt. Die Probenkonzentration betrug jeweils 0,1, 0,01 oder 0,001 g L⁻¹ pro Paraben. Pro Messung wurden 20 μ L injiziert und die Auftrennung erfolgte unter isokratischen Bedingungen (Aceton/Wasser 60/40 v/v%), bei 26,5°C und einer Flussrate von 1 mL min⁻¹. Die UV Detektionswellenlänge wurde auf $\lambda = 210$ nm gesetzt. Die Chromatogramme wurden jeweils auf den Peak von Methylparaben normiert. Die Überlagerung der Chromatogramme bestätigt, dass die analysierten Konzentrationen im linearen Konzentrationsbereich der Säule liegen, in dem die Elutionszeiten und Peakbreiten unabhängig von der Konzentration sind.

Von jeder Parabenmischung wurde ein Volumen von 20 μ L injiziert. Zur besseren Vergleichbarkeit der Chromatogramme wurden diese auf den Methylparabenpeak normiert. Wie in Abbildung 6.1 zu erkennen ist, bleibt die Peakform und die Elutionszeit der Parabene für die unterschiedlichen Konzentrationen konstant. Dies zeigt, dass die in Abschnitt 2.2, S. 8, beschriebenen Verteilungskoeffizienten der Analyten konstant sind und die analysierten Konzentrationen somit im linearen Konzentrationsbereich der Säule liegen.[31] Bei isokratischen Messungen wurde die mobile Phase nicht in der Mischkammer der quaternären HPLC Pumpe, sondern händisch mit Messzylindern vorgemischt. Somit sollte eine Volumenkontraktion, die durch den Mischvorgang während der HPLC Trennung entstehen würde, vermieden werden, da diese potentiell zu einer Zunahme von Flussinstabilitäten und zur Luftblasenbildung führen könnte und somit die NMR Detektion beeinträchtigen könnte. Das Chromatogramm der LAC Analyse der Parabenmischung mit einer Konzentration von jeweils 0,1 g L⁻¹ wurde zur Bestimmung der in Tabelle 6.1 aufgelisteten Retentionszeiten und *FWHM* verwendet.

Zunächst wurde die Löslichkeitsgrenze der Parabene in einer Aceton/Wasser Mischung (60/40 v/v%) bestimmt. Dafür wurden Mischungen aller Parabene in jeweils gleicher Konzentration hergestellt. Bei einer Paraben-Konzentration von ca. 60 g L⁻¹ (entspricht einer Gesamtparabekonzentration von 300 g L⁻¹) konnte eine Phasenseparation beobachtet werden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Maximalkonzentration pro Paraben auf 50 g L⁻¹ begrenzt. Sofern es nicht anders angegeben ist, wurden die Parabenlösungen stets mit einer Aceton/Wasser Mischung (60/40 v/v%) angesetzt.

Tabelle 6.1: Retentionszeit und Halbwertsbreite (*FWHM*) der Parabenpeaks des Chromatogramms der Messung mit $0,1 \text{ g L}^{-1}$ injizierter Parabenkonzentration, gezeigt in Abbildung 6.1. Genutzt wurde eine semipräparative C_{18} Säule ($250 \times 10 \text{ mm}$), eine Flussrate von 1 mL min^{-1} und ein Injektionsvolumen von $20 \mu\text{L}$.

Analyt	Retentionszeit [min]	<i>FWHM</i> [min]
Methylparaben	20,1	0,4
Ethylparaben	24,1	0,5
Propylparaben	30,8	0,7
Butylparaben	41,4	1,0
Pentylparaben	57,7	1,4

6.1.3. Spektroskopische Charakterisierung des Modellsystems

In Abbildung 6.2 sind die jeweiligen 80 MHz NMR Spektren der Parabene mit einer Konzentration von 30 g L^{-1} in einer Aceton/Wasser Mischung (60/40 v/v%) gezeigt. Die Lösungen wurden mit deuterierten (in schwarz) und protonierten (in grau) Lösungsmitteln hergestellt. Die NMR Messungen wurden mit einem 90° Puls ohne Lösungsmittelunterdrückung, mit einer FID Aufnahmezeit von $t_{\text{aq}} = 4,1 \text{ s}$, einer Verweilzeit von $t_{\text{dw}} = 500 \mu\text{s}$, einer Wiederholzeit von $t_r = 15,0 \text{ s}$ und mit 4 Scans unter statischen Bedingungen aufgenommen. Nach der Datenaufnahme wurden keine Apodisierung und kein *zero filling* durchgeführt um die ursprüngliche spektrale Auflösung und Selektivität zu erhalten. Die aliphatischen Signale von Methyl- bis Pentylparaben erscheinen im Bereich zwischen 1,00 und 4,40 ppm und überlagern mit den intensiven Lösungsmittelsignalen von Wasser bei 4,79 ppm und von Aceton bei 2,43 ppm. Die aromatischen Signale der Parabene erscheinen im Bereich zwischen 6,50 und 8,50 ppm und überlagern nicht mit den Lösungsmittelsignalen. Da die *ortho* (zwischen 8,00 und 8,50 ppm) und *meta* (zwischen 7,00 und 7,50 ppm) Signale jeweils in Dubletts aufgespalten sind, sind insgesamt vier Signale zu sehen, die in ihrer Intensität jeweils einem Proton (^1H) entsprechen. In Abbildung 6.2f ist die aromatische Region zwischen 6,50 und 9,00 ppm vom Methylparabenspektrum vergrößert gezeigt. Aufgrund der geringen Intensität und der Separation vom Lösungsmittel wurden die aromatischen Signale zur Methodenentwicklung herangezogen. Zur Beurteilung der Empfindlichkeit der untersuchten Methoden wurde das arithmetische Mittel des *SNR* der vier aromatischen Signalen bestimmt. Als Rauschen (*noise*) wurde die einfache Standardabweichung σ des signalfreien Bereichs zwischen 10,00 und 12,00 ppm verwendet, der zuvor mit einem Polynom erster Ordnung basislinienkorrigiert wurde. Jedes Dublett der aromatischen Signale hat eine Kopplungskonstante von $J = 8,8 \text{ Hz}$. Um die Dubletts aufzulösen, war daher eine spektrale Auflösung von mindestens 4,4 Hz erforderlich, was einer FID Aufnahmezeit von mindestens $1 / 4,4 \text{ Hz} = 0,23 \text{ s}$ entsprach. In dieser Arbeit wurden deshalb FID Aufnahmezeiten von mehr als 0,23 s gewählt.

6.1.3.1. Wahl der NMR Datenaufnahme- und Prozessierungsparameter

Für eine effiziente Datenprozessierung eines LAC-NMR Datensatzes ist es vorteilhaft die FIDs während der Messung mit möglichst wenig Datenpunkten aufzunehmen, um die Rechenzeit bei der Datenauswertung zu verkürzen. Deshalb wurden alle FIDs mit einer Verweilzeit von $t_{\text{dw}} = 500 \mu\text{s}$ aufgenommen, was in einer ausreichend großen spektralen Breite von 25,0 ppm resultierte. Die spektrale Breite entspricht dem doppelten der Nyquist Frequenz von $\nu_{\text{Nyq}} = 1 / (2 \cdot 0,0005 \text{ s} \cdot 80 \text{ MHz}) = 12,5 \text{ ppm}$, da Real- und Imaginärteil des FIDs eine Unterscheidung positiver und negativer Frequenzen ermöglicht. Die Sender- und Empfängerfrequenz wurden auf 6,0 ppm gesetzt. Die Gesamtzahl der Datenpunkte betrug stets 2^n Punkte und variierte abhängig von der FID Aufnahmezeit zwischen 512 und 8 192 (entspricht FID

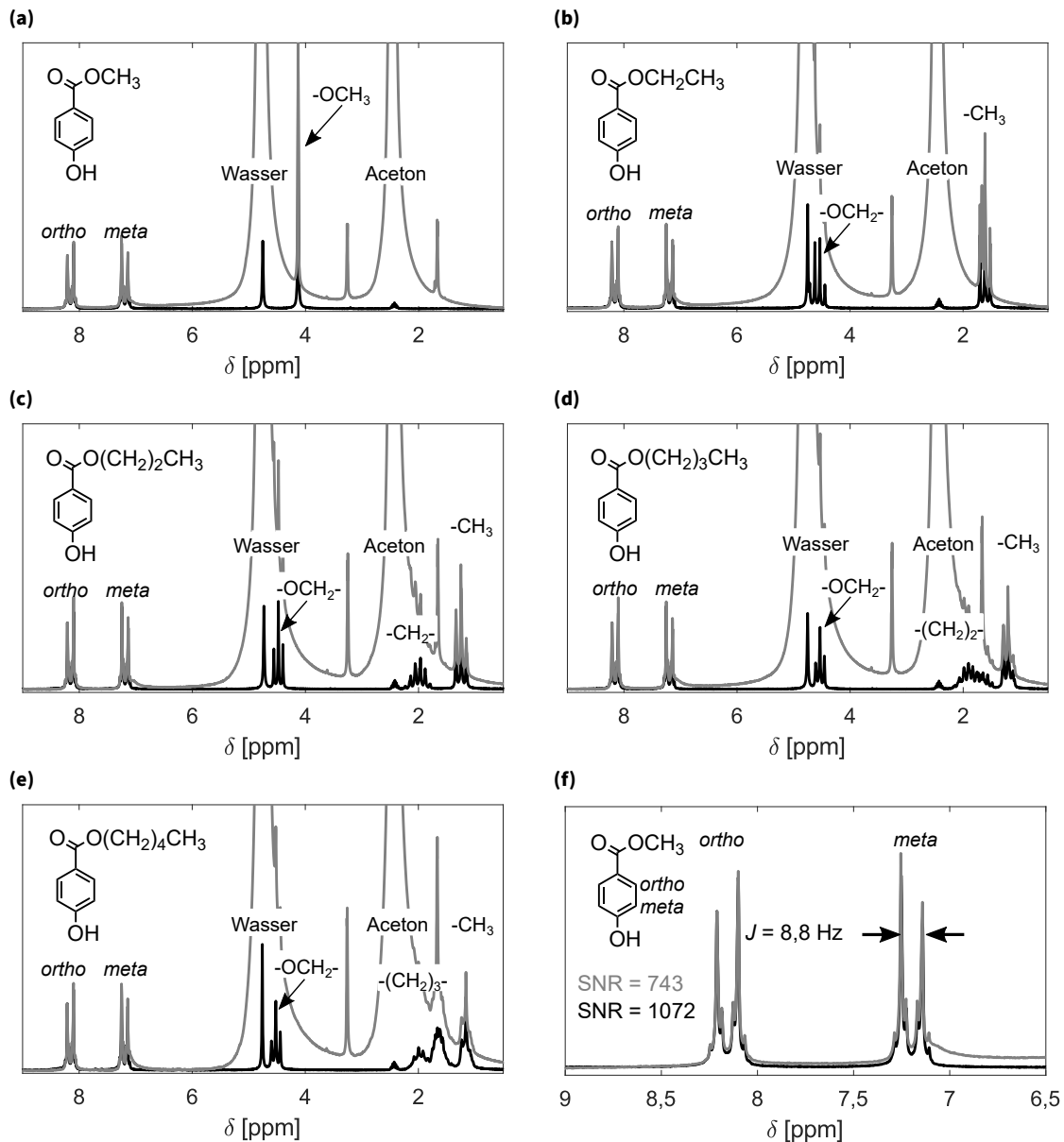


Abbildung 6.2: NMR Spektren (80 MHz, ^1H optimiert) von (a) Methyl-, (b) Ethyl-, (c) Propyl-, (d) Butyl- und (e) Pentylparaben mit je 30 g L^{-1} in einem deuterierten (in schwarz) und protonierten (in grau) Lösungsmittelgemisch aus Aceton/Wasser (60/40 v/v%). Die Messungen wurden unter statischen Bedingungen mit einer FID Aufnahmezeit von $t_{\text{aq}} = 4,1$ s, einer Verweilzeit von $t_{\text{dw}} = 500 \mu\text{s}$, einer Wiederholzeit von $t_r = 15,0$ s und 4 Scans aufgenommen. Um einen Eindruck der nativen spektralen Auflösung, Selektivität und Sensitivität zu geben wurde auf Apodisierung und *zero filling* verzichtet. Die aliphatischen Signale der Parabene erscheinen zwischen 1,00 und 4,40 ppm und überlagern mit den Lösungsmittelsignalen (Wasser bei 4,79 ppm, Aceton bei 2,43 ppm), was eine präzise Auswertung dieser erschwerte.[135] Die aromatischen *ortho* und *meta* Signale, zwischen 6,50 und 8,50 ppm, von Methylparaben vergrößert gezeigt in (f), überlagern kaum mit den Lösungsmittelsignalen. Da die Signalintensität einem Proton entspricht, besitzen diese eine geringe Sensitivität und wurden daher für die Methodenoptimierung ausgewertet. Das SNR wurde als arithmetisches Mittel der vier Signale bestimmt. Um ein Dublett der aromatischen Signale mit einer Kopplungskonstante von $J = 8,8$ Hz aufzulösen, ist eine spektrale Auflösung von $\Delta\nu = 4,4$ Hz nötig. Dies entspricht nach Gleichung 3.3.20, S. 27, einer minimalen FID Aufnahmezeit von $t_{\text{aq}} = 0,23$ s.

Aufnahmezeiten zwischen 0,26 und 4,10 s). Nach der Datenaufnahme wurde die spektrale Auflösung aller Spektren einander angeglichen, indem die Gesamtzahl der Datenpunkte mit *zero filling* auf 16 k aufgefüllt wurde. Um das Auftreten von Sinc-Artefakten durch das *zero filling* zu vermeiden, war

aufgrund der teilweise sehr kurzen FID Aufnahmezeit von 0,26 s eine relativ starke Apodisierung notwendig. In dieser Arbeit wurde, wenn es nicht anders angegeben wird, als Apodisierungsfunktion eine halbseitige Gaußfunktion (siehe Gleichung 3.3.17, S. 27) mit einer Standardabweichung von $\sigma = 0,07$ s gewählt, was zu einer Signalverbreiterung von $1/(2\pi \cdot 0,07) = 2,3$ Hz führte.[22] Trotz der relativ starken Apodisierung war somit sichergestellt, dass die Dubletts der aromatischen Signale auflösbar blieben. Die Totzeit (Wartezeit zwischen dem Anregungspuls und der Datenerfassung) wurde von den vorherigen Arbeiten in der SEC-NMR Kopplung übernommen und betrug $t_{\text{dead}} = 100 \mu\text{s}$. [103] Nach der NMR Datenerfassung wurde eine zusätzliche Wartezeit von $t_{\text{rd}} = 0,1$ s für die Datenübertragung und -speicherung angefügt.

6.1.3.2. Kalibrierung der B_1 -Pulslänge

Bei einer NMR Messung wird die maximale Signalintensität bei einem 90° Puls erhalten. Die exakte Pulslänge ist abhängig vom Analyt und Lösungsmittel sowie der Pulsamplitude.[50] Für die aromatischen Signale einer 30 g L^{-1} Propylparabendlösung in protoniertem Aceton/Wasser (60/40 v/v%) wurde die Pulslänge für einen 90° Puls unter statischen und *onflow* Bedingungen bestimmt. Dazu wurden Spektren mit einem Scan in Abständen von 30 s aufgenommen und dabei die Pulslänge in $1 \mu\text{s}$ Schritten erhöht. Die Pulsamplitude von 0 dB wurde konstant gehalten, was nach Herstellerangaben der maximalen Leistung in der B_1 -Spule von 1 mW entsprach.[136] Für jedes Spektrum wurde das Integral der aromatischen Signale bestimmt und in Abbildung 6.3 abhängig von der Pulslänge aufgetragen.

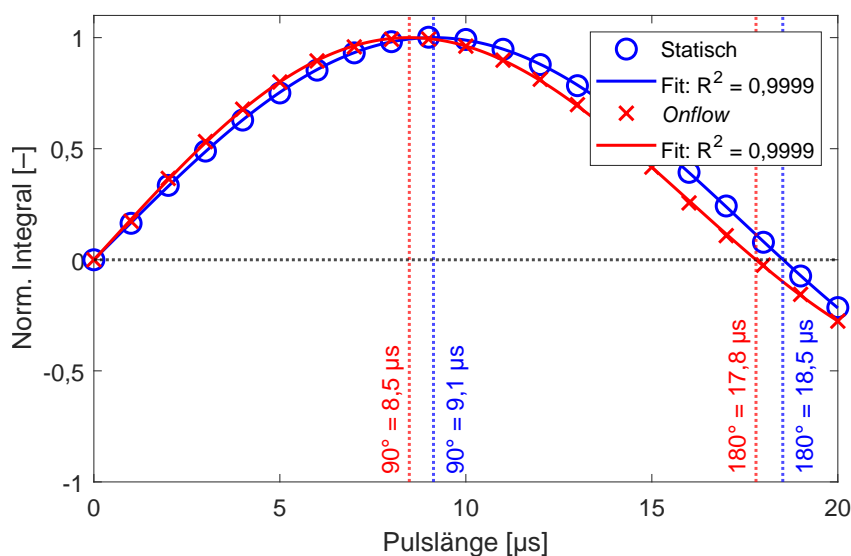


Abbildung 6.3: Bestimmung der Pulslänge für einen 90° und 180° Puls an einer 30 g L^{-1} Propylparabendlösung bei einer Amplitude von 0 dB unter statischen (in Blau) und *onflow* (in Rot) Bedingungen. Das Integral der aromatischen Signale wurde für verschiedene Pulsängen bestimmt und jeweils auf das Maximum normiert.

Die Integrale in Abbildung 6.3 wurden jeweils auf das Maximum normiert und anschließend mit Gleichung 6.1.1 angepasst wobei die Anpassungsparameter in Tabelle 6.2 zusammengefasst sind.

$$I = I_0 + A \cdot \exp(-t_p/\tau_e) \cdot \sin\left(\pi \frac{t_p - t_s}{T}\right), \quad (6.1.1)$$

mit der Amplitude A , der Pulslänge t_p , der Zeitkonstante τ_e bis die Exponentialfunktion auf $1/e$ abgefallen ist, einem Zeitversatz des Sinus t_s sowie der Periode T .

Tabelle 6.2: Parameter der Anpassungsfunktionen in Abbildung 6.3. Die Parameter sind in Gleichung 6.1.1 definiert.

	Statisch	Onflow
I_0	0,131	0,179
A	0,897	0,919
τ_e	271,254	81,550
t_s	0,789	0,978
T	16,893	15,607

Da beim Anschalten des B_1 -Feldes zuerst das elektromagnetische Feld aufgebaut werden muss (*gate delay*), kann es vorkommen, dass die Pulslänge eines 180° Pulses nicht exakt dem Doppelten der Pulslänge eines 90° Pulses entspricht sondern etwas länger ist.[112] Daher wurde neben der Pulslänge für einen 90° Puls zusätzlich die eines 180° Pulses bestimmt. Hierfür wurde von den Anpassungsfunktionen das Maximum (Pulslänge für einen 90° Puls) und der Nulldurchgang (Pulslänge für einen 180° Puls) bestimmt. Für die aromatischen Signale von Propylparaben betrug die Pulslänge für einen 90° Puls unter statischen Bedingungen $9,1 \mu\text{s}$ und unter *onflow* Bedingungen $8,5 \mu\text{s}$. Die Pulslänge für einen 180° Puls war für statische Bedingungen $18,5 \mu\text{s}$ und für *onflow* Bedingungen $17,8 \mu\text{s}$ und liegt somit bei etwa dem Doppelten der 90° Pulslänge. Im Fortgang wurde für NMR Messungen unter statischen und *onflow* Bedingungen für einen 90° Puls eine Pulslänge von $9,0 \mu\text{s}$ bei einer Amplitude von 0 dB verwendet.

6.1.3.3. Bestimmung der Relaxationszeiten des Modellsystems für statische und *onflow* Bedingungen

Die longitudinale und transversale Relaxationszeiten wurden für die aromatischen Signale der Parabene mit 30 g L^{-1} unter statischen (T_1, T_2) und *onflow* (bei 1 mL min^{-1} , T_1^*, T_2^*) Bedingungen bestimmt. Die T_1 und T_1^* wurden mit der IR Pulssequenz und die T_2 und T_2^* mit der CPMG Pulssequenz bestimmt. Beide Pulssequenzen sind detailliert im Abschnitt 5.5, S. 50, beschrieben. Für die Bestimmung von T_1 und T_1^* der Parabene und des Wassers wurde die Wartezeit zwischen dem 90° und 180° Puls von $0,50 - 5,00 \text{ s}$ in linearen Schritten von $0,15 \text{ s}$ variiert. Insgesamt wurden 30 Schritte mit jeweils 4 Scans gemessen, wobei die Wiederholzeit zwischen zwei Scans $15,00 \text{ s}$ betrug. Für Aceton wurde die Wartezeit von $1,00 - 15,50 \text{ s}$ in linearen Schritten von $0,50 \text{ s}$ variiert. Insgesamt wurden 29 Schritte gemessen, mit je 4 Scans und einer Wiederholzeit von $30,00 \text{ s}$ pro Scan. Für die T_2 und T_2^* Bestimmung mit der CPMG Pulssequenz wurden 30 Schritte gemessen. Für die Parabene und das Wasser bestand jeder Schritt aus 250 Echos mit einer Dauer von 1 ms zwischen den Pulsen. Jeder Schritt wurde mit 4 Scans und einer Wiederholzeit pro Scan von $15,00 \text{ s}$ gemessen. Für Aceton wurden aufgrund der längeren T_2 und T_2^* Zeiten die Anzahl der Echos pro Schritt auf 500 und die Wiederholzeit auf $30,00 \text{ s}$ erhöht, während die anderen Einstellungen konstant gehalten wurden. Jede Messung wurde dreimal wiederholt, was zu Standardabweichungen der bestimmten Relaxationszeiten von unter $0,10 \text{ s}$ führte. Die Mittelwerte sind in Tabelle 6.3 aufgelistet.

Für eine Probe mit i Komponenten mit $T_{1,i}$ Zeiten muss entschieden werden, für welche Komponente die NMR Aufnahmeparameter optimiert werden. Die Gleichgewichtsmagnetisierung \vec{M}_z normiert auf die Quadratwurzel der Wiederholzeit $t_r^{1/2}$ hängt von der jeweiligen T_1 Zeit ab, wie ausführlich in Abschnitt 5.6, S. 51, diskutiert ist. Um für alle Parabene eine gute Empfindlichkeit zu erhalten wurde jeweils von den T_1 und den T_1^* Zeiten des Modellsystems das arithmetische Mittel gebildet, was $T_1 = 2,0 \text{ s}$ und $T_1^* = 1,7 \text{ s}$ ergab. Da dies der T_1 bzw. T_1^* Zeit von Propylparaben entsprach wurde dieses für die nachfolgenden Versuche verwendet.

Tabelle 6.3: Longitudinale (T_1) und transversale (T_2) Relaxationszeiten der verwendeten Parabene (aromatischen Protonen) und Lösungsmittel unter statischen (Nicht entgast, T_1 , T_2) und *onflow* Bedingungen (entgast, T_1^* , T_2^*). Die Parabene wurden jeweils in einer Konzentration von 30 g L^{-1} in einer Aceton/Wasser Mischung (60/40 v/v%) gemessen. Zur Messung unter *onflow* Bedingungen wurde der zirkuläre Aufbau in Abbildung 5.3b, S. 45, mit einer Flussrate von 1 ml min^{-1} verwendet. Modifiziert nach Matz et al. 2024.[133]

	Statisch		<i>Onflow</i> , 1 mL min^{-1}	
	T_1 [s]	T_2 [s]	T_1^* [s]	T_2^* [s]
Methylparaben	2,3	2,0	1,9	1,5
Ethylparaben	2,2	1,9	1,8	1,5
Propylparaben	2,0	1,8	1,7	1,4
Butylparaben	2,0	1,7	1,7	1,3
Pentylparaben	1,7	1,5	1,5	1,3
Aceton	4,5	4,1	3,0	2,3
Wasser	2,0	1,8	1,6	1,4

6.1.3.4. Charakterisierung des NMR Detektionsbereichs

Wie in den Gleichungen 4.3.2 und 4.3.3, S. 35, beschrieben, berechnet sich T_1^* und T_2^* bei einer gegebenen Flussrate F aus der Verweilzeit τ im NMR Detektionsvolumen V_{coil} und der T_1 Zeit beziehungsweise der T_2 Zeit. Voraussetzung für die Berechnung ist, dass neben der veränderten Flussrate alle anderen Bedingungen (wie z. B. der Gehalt an paramagnetischem O_2) konstant sind. Diese Bedingung ist bei den Relaxationszeiten in Tabelle 6.3 nicht erfüllt, da die Probenlösung beim zirkulären Aufbau (Abbildung 5.3b, S. 45) vor den NMR Messungen entgast wurde, während bei den statischen NMR Messungen (Abbildung 5.3a, S. 45) die Probenlösung ohne vorheriges Entgasen gemessen wurde. Um das V_{coil} genauer zu bestimmen, wurde mit dem zirkulären Aufbau die T_1^* der aromatischen Signale einer 30 g L^{-1} Propylparabenlösung bei den Flussraten $F = 0, 1,00, 2,00$ und $3,00 \text{ mL min}^{-1}$ gemessen. Da die T_1^* Zeiten in der Einheit Sekunde angegeben werden und das NMR Detektionsvolumen im μL Bereich liegt, ist F in Abbildung 6.4 in $\mu\text{L s}^{-1}$ angegeben ($F = 0, 16,67, 33,33$ und $50,00 \mu\text{L s}^{-1}$). Durch Ersetzen von τ in Gleichung 4.3.2, S. 35, mit Gleichung 4.3.1, S. 34, und dem Umstellen nach T_1^* wird die Gleichung 6.1.2 hergeleitet,

$$T_1^* = \frac{1}{\frac{1}{T_1} + \frac{F}{V_{\text{coil}}}}, \quad (6.1.2)$$

die in Abbildung 6.4 genutzt wurde, um die T_1^* anzupassen. Aus der Anpassungsfunktion wurde ein effektives Detektionsvolumen von $V_{\text{coil}} = 88,50 \mu\text{L}$ erhalten. Bei einer Flussrate von $F = 16,67 \mu\text{L s}^{-1}$ ($=1 \text{ mL min}^{-1}$) entspricht dieses V_{coil} einer effektiven Verweilzeit von $\tau = 88,50/16,67 = 5,31 \text{ s}$. Wie in Tabelle 6.6, S. 77, beschrieben, beträgt der Innendurchmesser der verwendeten Flusszelle (FC-9) $4,23 \text{ mm}$. Demnach entspricht das effektive Detektionsvolumen V_{coil} einem effektiven Detektionsbereich L_{coil} von $L_{\text{coil}} = 88,50 \text{ mm}^3 / (\pi \cdot (4,23 \text{ mm}/2)^2) = 6,30 \text{ mm}$.

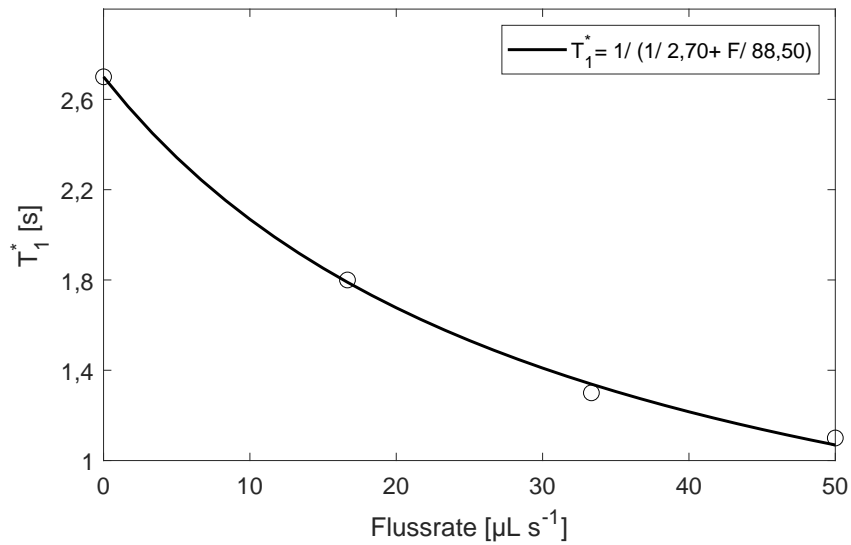


Abbildung 6.4: Longitudinale Relaxationszeiten (T_1^*) der aromatischen Protonen von Propylparaben (30 g L^{-1} in Aceton/Wasser 60/40 v/v%) bei unterschiedlichen Flussraten F . Zur Anpassung der T_1^* Zeiten wurde Gleichung 6.1.2 genutzt. Entsprechend der Anpassungsfunktion besitzt das 80 MHz NMR ein Detektionsvolumen V_{coil} von $V_{\text{coil}} = 88,50 \mu\text{L}$. Bei einer Flussrate von $16,67 \mu\text{L s}^{-1}$ ($= 1 \text{ ml min}^{-1}$) entspricht das einer Verweilzeit τ von $\tau = 88,50/16,67 \text{ s} = 5,31 \text{ s}$. Die NMR Messungen wurden mit dem in Abbildung 5.3b, S. 45, beschriebenen zirkulären Aufbau durchgeführt. Da die Propylparabenlösung dabei entgast wurde, war die T_1^* Zeit bei $F = 0 \mu\text{L s}^{-1}$ mit $T_{1,0 \mu\text{L s}^{-1}}^* = 2,7 \text{ s}$ länger als die T_1 unter statischen Bedingungen in Tabelle 6.3 mit $T_1 = 2,0 \text{ s}$.

6.2. Steigerung der Sensitivität der NMR Detektion

6.2.1. Optimierung der Lösungsmittelunterdrückungseffizienz der PRESAT Pulssequenz

Die LAC-NMR Messungen wurden mit protonierten Lösungsmitteln durchgeführt. Wie in Abschnitt 4.4, S. 35, und in Abschnitt 5.4.3, S. 48, weiter ausgeführt ist, wird durch die Anwendung von Lösungsmittelunterdrückungsmethoden die spektrale Qualität und die Sensitivität verbessert. In bisherigen Arbeiten in der SEC-NMR Kopplung konnte aufgrund den kurzen T_1 Zeiten der Polymere ($T_{1, \text{Polymer}} \approx 200 - 500$ ms) das Lösungsmittel durch einen T_1 Filter unterdrückt werden.[113] In der LAC-NMR Kopplung ist dies nicht möglich, da aufgrund der geringen Molekülgröße des Analyten $T_{1, \text{Analyt}} \approx T_{1, \text{Lösungsmittel}}$ entspricht. Aufgrund dessen musste eine andere Methode zur Lösungsmittelunterdrückung herangezogen werden.

Da das verwendete 80 MHz NMR Spektrometer keine designierte Gradientenspulen besaß, waren die anwendbaren Pulssequenzen zur Lösungsmittelunterdrückung auf solche beschränkt, die nicht auf Feldgradienten basieren. Eine der populärsten Lösungsmittelunterdrückungsmethoden, die ohne Feldgradienten auskommt ist die Präsaturation (PRESAT). Die Vor- und Nachteile der PRESAT Pulssequenz sind in Abschnitt 4.4, S. 35, und die experimentelle Beschreibung in Abschnitt 5.7, S. 52, beschrieben. Um von der chromatographischen Elutionsspur schnellstmöglich Spektren aufzunehmen, wurde zunächst die Dauer der PRESAT Pulssequenz optimiert. Ziel war es, die Wiederholzeit zu reduzieren und gleichzeitig eine gute Lösungsmittelunterdrückung zu erzielen. Dafür wurde die Dauer und Amplitude des Saturierungspulses variiert. Folgende Amplituden wurden untersucht: -85, -75, -65, -45 und -25 dB, was nach Herstellerangaben etwa 3 pW, 30 pW, 0,3 nW, 30 nW und 3 μ W entsprach.[136] Bei jeder Amplitude wurden folgende Pulsdauern des Saturierungspulses t_{sat} untersucht: 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 und 5,0 s. Als Probe wurde eine 30 g L⁻¹ Propylparabenslösung in einer Aceton/Wasser Mischung (60/40 v/v%) genutzt und unter statischen und *onflow* (1 mL min⁻¹) Bedingungen bei konstanter Empfängerverstärkung von 22 dB gemessen. Es wurden zwei Sättigungsfrequenzen festgelegt, eine für Aceton bei 2,43 ppm und eine für Wasser bei 4,79 ppm. Die Integrale der aromatischen Signale von Propylparaben (I_{PP}) sowie die der Lösungsmittel (I_{Aceton} , I_{Wasser}) wurden bestimmt und sind in Abbildung 6.5a für statische und in Abbildung 6.5c für *onflow* Messungen dargestellt. In Abbildung 6.5b und 6.5d wurde die jeweilige Lösungsmittelunterdrückungseffizienz ausgewertet, indem das Verhältnis von I_{PP} zu I_{Aceton} und zu I_{Wasser} bestimmt und anschließend auf die Quadratwurzel der Dauer des Saturierungspulses $t_{\text{sat}}^{1/2}$ normiert wurde. Die Integrale der Lösungsmittelsignale waren bei einer Amplitude von -85 dB deutlich intensiver als bei den höheren Amplituden. Die intensiven Lösungsmittelsignale beeinflussten die Bestimmung der I_{PP} , weshalb diese für -85 dB leicht überbestimmt wurden. In Abbildung 6.5a und 6.5c ist zu sehen, dass die I_{PP} für die Messungen mit den Amplituden -45 und -25 dB abnehmen, was auf eine partielle Saturierung des Propylparabens hindeutet. Dies liegt vermutlich an der hohen Leistung des Saturierungspulses. Deshalb wurden für die Bewertung der Effizienz der Lösungsmittelunterdrückung in Abbildung 6.5b und 6.5d die Messungen, die mit einer Amplitude über -65 dB aufgenommen wurden, ausgeschlossen. Wie aus Abbildung 6.5b und 6.5d hervorgeht, wurde für eine Pulsdauer von $t_{\text{sat}} = 1,0$ s bei -65 dB eine gute Lösungsmittelunterdrückungseffizienz sowohl für statische als auch für *onflow* Messungen erzielt. Für kürzere Pulsdauern nimmt die Robustheit der Lösungsmittelunterdrückung ab, was zu den starken Variationen der Lösungsmittelintegrale für die Pulsdauern von $t_{\text{sat}} = 0,1$ s und $t_{\text{sat}} = 0,5$ s führte. In den weiteren Experimenten wurde daher für den Saturierungspuls eine Pulsdauer von $t_{\text{sat}} = 1,0$ s verwendet. Wie im Abschnitt 6.1.3, S. 61, diskutiert, betrug die kürzeste verwendete FID Aufnahmezeit $t_{\text{aq}} = 0,26$ s. Mit der zusätzlichen Wartezeit von $t_{\text{rd}} = 0,1$ s für die Datenverarbeitung und -speicherung, betrug die kürzestmögliche Wiederholzeit für die PRESAT Pulssequenz $t_{\text{r}} = 1,4$ s.

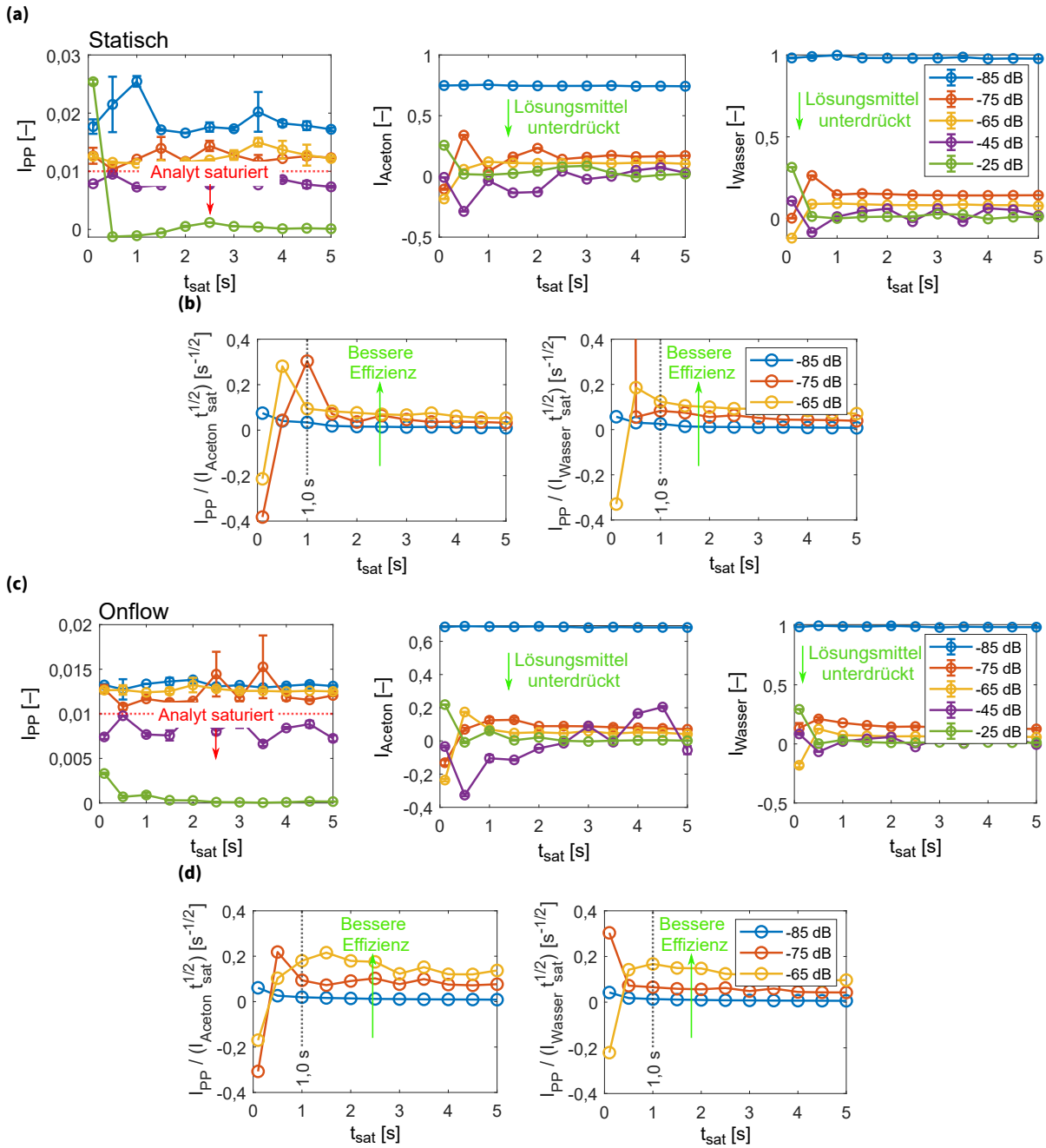


Abbildung 6.5: Optimierung der Dauer t_{sat} und der Amplitude des Saturierungspulses unter statischen ((a), (b)) und *onflow* ((c), (d)) Bedingungen. Eine 30 g L^{-1} Propylparabenlösung in Aceton/Wasser (60/40 v/v%) wurde analysiert. Die Integrale der aromatischen Signale von Propylparaben (I_{PP}) und der Lösungsmittelsignale (I_{Aceton} , I_{Wasser}) wurden bestimmt und jeweils auf das höchste I_{Wasser} normiert, gezeigt in (a) und (c). Bei einer Amplitude von -85 dB wird keine Lösungsmittelunterdrückung erreicht. Aufgrund der Überlagerung mit den intensiven Lösungsmittelsignalen wurden I_{PP} für -85 dB überbestimmt. Unter statischen und *onflow* Bedingungen ist zu erkennen, dass für die Amplituden -45 und -25 dB die I_{PP} als Folge der Sättigung abnehmen, weshalb diese Amplituden bei der Bewertung der Effizienz der Lösungsmittelunterdrückung in (b) und (d) ausgeschlossen wurden. Um die Effizienz der Lösungsmittelunterdrückung zu bewerten, wurde das Verhältnis der Integrale von Analyt-zu-Lösungsmittel gebildet und auf die Quadratwurzel der Saturierungspulsdauer ($t_{\text{sat}}^{1/2}$) normiert, gezeigt in (b) für statisch und (d) für *onflow*. Für eine Pulsdauer von 1,0 s bei -65 dB wird durchweg eine gute Lösungsmittelunterdrückungseffizienz erreicht.

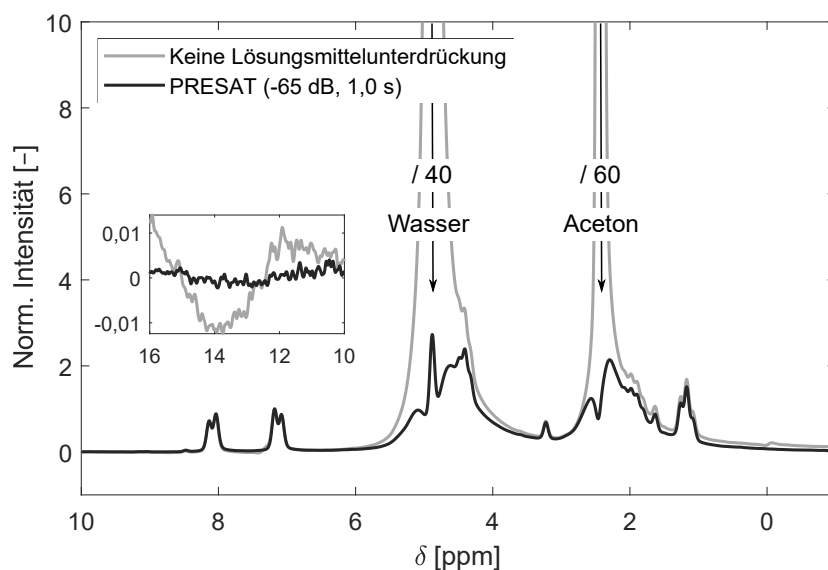


Abbildung 6.6: NMR Spektren einer 30 g L^{-1} Propylparabenlösung in einer Aceton/Wasser Mischung (60/40 v/v%), aufgenommen ohne und mit PRESAT unter statischen Bedingungen. Beide Spektren wurden auf die mittlere Intensität der aromatischen Signale von Propylparaben normiert. Durch PRESAT nimmt die Amplitude der Sinc-artigen Basislinienfluktuationen ab, was in der Vergrößerung im Bereich zwischen 10 bis 16 ppm sichtbar ist.

In Abbildung 6.6 ist ein Spektrenvergleich einer 30 g L^{-1} Propylparabenlösung mit und ohne PRESAT unter statischen Bedingungen gezeigt. Die Spektren in Abbildung 6.6 wurden auf die mittlere Intensität der aromatischen Signale von Propylparaben normiert. Durch die Anwendung von PRESAT ist die Intensität des Acetonsignals um den Faktor 60 und die des Wassersignals um den Faktor 40 reduziert. Eine ähnliche Lösungsmittelunterdrückung wird auch unter *onflow* Bedingungen erhalten, wobei die Qualität der Lösungsmittelunterdrückung stark von der Magnetfeldhomogenität und -stabilität abhängt. In der Vergrößerung in Abbildung 6.6 ist die Basislinienregion zwischen 10,0 und 16,0 ppm zu sehen. Für beide Spektren sind Fluktuationen in der Basislinie zu erkennen, wobei die Instabilität zunimmt, wenn PRESAT nicht angewendet wird. Die Basislinienfluktuationen entstehen hauptsächlich durch das Totzeitproblem.[64] Das Totzeitproblem beschreibt ein Phänomen, das aufgrund der Totzeit (t_{dead}) zwischen dem Anregungspuls und dem Start der FID Aufnahmezeit zustande kommt. Durch diesen Zeitversatz kommt es zu frequenzabhängigen Phasenunterschieden, die durch die Phasenkorrektur erster Ordnung (siehe Gleichung 3.4.1, S. 28) berichtigt werden. Durch die Anwendung dieser Phasenkorrektur bekommt jede Frequenzkomponente einen $\sin(\omega t_{\text{dead}})/\omega$ -Term, die in Sinc-Artefakten für jede Frequenzkomponente resultierten. Die Breite der Sinc-Artefakte ist invers proportional zu t_{dead} und die Amplitude linear zu der Signalintensität an der jeweiligen Frequenz ω . Daher zeigen die Sinc-Artefakte eine besonders starke Ausprägung für intensive und breite Signale, wie es für die Lösungsmittelsignale der Fall ist. Werden die intensitven Lösungsmittelsignale unterdrückt nimmt daher auch die Amplitude der Sinc-Artefakte ab. Weitere Ursachen die zu Basislinieninstabilitäten führen sind das nichtlineare Verhalten des Analogfilters, das zu einem frequenzabhängigen Phasenfehler führt, die Rückfaltung der dispersiven Anteile außerhalb des Spektrums in das Absorptionsspektrum, die verzögerte Datenaufnahme aufgrund der Ansprechzeit der Elektronik und das *magneto acoustic ringing*. [137–140]

6.2.2. Anwendung des Ernst Winkels zur Steigerung der Sensitivität

Durch die Signalmittelung skaliert das SNR eines NMR Spektrums proportional zur Quadratwurzel der Anzahl der gemittelten FIDs (Scans), wobei die Anzahl der Scans durch die Gesamtmesszeit t_m begrenzt wird.[141] Zur Beurteilung der Sensitivität einer NMR Methode wird deshalb das $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ betrachtet. Werden NMR Spektren mit einem einzigen Scan aufgenommen, entspricht die Wiederholzeit der Pulssequenz t_r der Gesamtmesszeit t_m .

Um quantitative Bedingungen bei der Aufnahme von NMR Spektren zu erhalten, muss die Probe zwischen zwei aufeinanderfolgenden Scans vollständig relaxiert sein. Um bei einem $\beta = 90^\circ$ Puls eine Relaxation von $> 99\%$ zu erhalten, muss eine Wiederholzeit von $t_r \geq 5 \cdot T_1$ gewählt werden.[141, 142] Wie in Abschnitt 5.6, S. 51, beschrieben ist, wird zur Steigerung der Sensitivität jedoch eine Wiederholzeit von $t_r < 5 \cdot T_1$ gewählt, um mehr Signal pro Zeiteinheit zu akkumulieren. Dadurch bildet sich eine Gleichgewichtsmagnetisierung \vec{M}_z aus, die für verschiedene $t_r \cdot T_1^{-1}$ Verhältnisse in Abbildung 5.8a, S. 52, skizziert ist. In einer Probe haben chemisch verschiedene Protonen oft unterschiedliche T_1 Zeiten. Wird bei der NMR Messung einer solchen Probe eine Wiederholzeit gewählt die kürzer ist als das Fünffache der längsten T_1 Zeit, werden für die NMR Signale unterschiedliche Signalintensitäten pro Proton erhalten. Für diesen Fall wäre es für eine quantitative Bestimmung erforderlich eine Konzentrations-Kalibrierung zu erstellen. Eine solche Kalibrierung ist auch für quantitative Bestimmungen unter *onflow* Bedingungen erforderlich, da die in das Detektionsvolumen fließenden Protonen eine unterschiedliche Präpolarisierung aufweisen können. Für eine vollständige Präpolarisierung müsste die Verweilzeit im Präpolarisierungsvolumen $5 \cdot T_1$ betragen.[11]

Für einen $\beta = 90^\circ$ Puls mit einer Wiederholzeit von $t_r = 1,3 \cdot T_1$ wird das $SNR \cdot t_r^{-1/2}$ relativ zu einer Wiederholzeit von $t_r = 5,0 \cdot T_1$ theoretisch um den Faktor 1,4 verbessert (siehe Abbildung 5.8a, S. 52). Wird der Ernst Winkel β_{opt} verwendet ($\beta_{opt} < 90^\circ$) kann das $SNR \cdot t_r^{-1/2}$ relativ zu einem Rotationswinkel von $\beta = 90^\circ$ mit einer Wiederholzeit von $t_r = 5,0 \cdot T_1$ um maximal einen Faktor 1,6 verbessert werden (siehe Abbildung 5.8b, S. 52), wobei das $SNR \cdot t_r^{-1/2}$ mit kleiner werdendem β_{opt} zunimmt.

Um die Sensitivitätssteigerung durch die Anwendung des Ernst Winkels zu quantifizieren, wurden unterschiedliche β_{opt} unter *onflow* Bedingungen (1 mL min^{-1}) bei konstanter Empfängerverstärkung von 22 dB gemessen. Als Probe wurde eine Propylparablenlösung (30 g L^{-1} in Aceton/Wasser 60/40 v/v%) verwendet. Die Messungen wurden ohne Lösungsmittelunterdrückung durch PRESAT aufgenommen, da die minimale Wiederholzeit aufgrund des 1,0 s langen Saturierungspulses auf $t_r = 1,4 \text{ s}$ limitiert war, was nach Gleichung 5.6.2, S. 52, mit der T_1^* von Propylparaben in Tabelle 6.3, S. 65, von $T_1^* = 1,7 \text{ s}$ einem Ernst Winkel von $\beta_{opt} = 62^\circ$ entsprach. Bei Messungen ohne PRESAT betrug die minimale Wiederholzeit lediglich $t_r = 0,4 \text{ s}$ (0,26 s Datenaufnahme und etwa 0,1 s Wartezeit am Ende), wodurch Ernst Winkel bis zu $\beta_{opt} = 35^\circ$ messbar waren und somit eine höhere Sensitivität erhalten wird. Sowohl die mittlere Intensität I der aromatischen Signale von Propylparaben, als auch das daraus bestimmte SNR wurden jeweils auf $t_r^{-1/2}$ normiert und sind in Abbildung 6.7 gezeigt.

Sowohl $I \cdot t_r^{-1/2}$ als auch $SNR \cdot t_r^{-1/2}$ wurden jeweils auf den höchsten Wert normiert. Die Sensitivitätssteigerung wurde relativ zu der Referenzmessung mit $\beta = 90^\circ$ und $t_r = 5,0 \cdot T_1$ (Kreissymbol in Abbildung 6.7) bewertet. Die $I \cdot t_r^{-1/2}$ nahm um den Faktor 1,6 zu, was mit den Angaben aus der Literatur für statische NMR Messungen übereinstimmt.[125] Dagegen nahm das $SNR \cdot t_r^{-1/2}$ um den Faktor 2,1 zu und war damit etwas höher als erwartet. Diese Überbestimmung ist darauf zurückzuführen, dass mit größerem Ernst Winkel die absolute Intensität der Lösungsmittelsignale ansteigt und damit, aufgrund des Totzeitproblems (siehe Abbildung 6.6, S. 69), auch die Amplituden der Sinc-artigen Basislinienfluktuationen ansteigen. Obwohl die Basisliniensektion, die zur Berechnung des Rauschens genutzt wurde, separat mit einem Polynom erster Ordnung basislinienkorrigiert wurden, führten diese Basislinienfluktuationen zu einem höheren Rauschwert. Deshalb nimmt in Abbildung 6.7 das $SNR \cdot t_r^{-1/2}$ (rechte y-Achse) mit zunehmenden Ernst Winkel stärker ab als das $I \cdot t_r^{-1/2}$ (linke y-Achse).

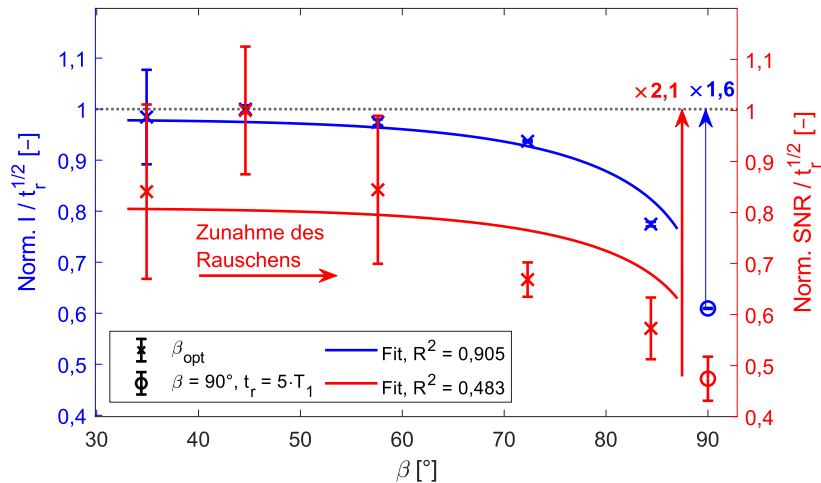


Abbildung 6.7: Quantifizierung der Sensitivitätssteigerung durch die Anwendung des Ernst Winkels β_{opt} , relativ zu $\beta = 90^\circ$ mit $t_r = 5,0 \cdot T_1$. Die Messungen wurden ohne PRESAT bei konstanter Empfängerverstärkung aufgenommen. Der kleinste β_{opt} betrug 35° und wurde nach Gleichung 5.6.2, S. 52, durch die kürzeste Wiederholzeit von $t_r = 0,4$ s begrenzt. Die zur Quadratwurzel der Wiederholzeit normierten Intensität $I \cdot t_r^{-1/2}$ sowie das daraus bestimmte $\text{SNR} \cdot t_r^{-1/2}$ wurden mit Gleichung 5.6.4, S. 52, angepasst. Mit zunehmendem β_{opt} nahm das Rauschen zu, weshalb das $\text{SNR} \cdot t_r^{-1/2}$ stärker abnimmt als $I \cdot t_r^{-1/2}$ und damit eine größere Abweichung von der Anpassungsfunktion zeigt. Modifiziert nach Matz et al. 2024.[133]

Aufgrund der Abhängigkeit des ermittelten Rauschwertes vom Rotationswinkel wurde das $I \cdot t_r^{-1/2}$ mit $R^2 = 0,905$ gut durch die Gleichung 5.6.4, S. 52, beschrieben, im Gegensatz zum $\text{SNR} \cdot t_r^{-1/2}$ mit $R^2 = 0,483$.

Wenn eine Lösungsmittelunterdrückung angewendet wird, nimmt die Amplitude der Basislinienfluktuationen ab (siehe Abbildung 6.6, S. 69). Daher wird erwartet, dass für eine solche Messreihe das Profil des $\text{SNR} \cdot t_r^{-1/2}$ dem des $I \cdot t_r^{-1/2}$ ähnlicher ist und somit eine maximale Verbesserung um etwa den Faktor 1,6 erzielt wird. Wie bereits zu Beginn dieses Abschnitts beschrieben ist, war mit PRESAT für Propylparaben der kleinst mögliche Ernst Winkel $\beta_{\text{opt}} = 62^\circ$. Entsprechend der Anpassungsfunktion für $I \cdot t_r^{-1/2}$ in Abbildung 6.7 wäre für diesen β_{opt} die Sensitivität um den Faktor 1,5 – 1,6 gesteigert.

6.2.3. Reduzierung der Wiederholzeit durch *paramagnetic relaxation enhancement*, PRE

Um die Sensitivität der NMR Messung zu steigern, wird die T_1 Zeit des Analyten durch die Zugabe von paramagnetischen Metallionen reduziert. Diese Methode wird *paramagnetic relaxation enhancement* (PRE) genannt.[143, 144] Paramagnetische Metallionen besitzen ungepaarte Elektronen, die ein etwa 660-mal höheres gyromagnetisches Verhältnis haben als ^1H Kerne. Die ungepaarten Elektronen erzeugen, wie in Gleichung 3.2.1, S. 18, beschrieben, starke, oszillierende magnetische Momente, welche die T_1 und T_2 Relaxation der ^1H Kerne über einen magnetischen dipolaren Relaxationsmechanismus fördern.[145] Der Einfluss auf die T_1 und T_2 Relaxation hängt von der Reorientierungszeit τ_c zwischen dem magnetischen Moment des ^1H Kerns und von dem paramagnetischen Metall ab, wie in Gleichung 6.2.1, S. 71, beschrieben ist,[146]

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_e} + \frac{1}{\tau_r}, \quad (6.2.1)$$

mit der Relaxationszeit des Elektronenspins τ_e und der Rotationskorrelationszeit des gelösten Moleküls τ_r . Die Reduzierung von T_1 und T_2 hat zwei gegenläufige Effekte. (1) Durch die Verkürzung von T_1 wird

eine schnellere Datenerfassung ermöglicht, was zu einer Steigerung des SNR führt. (2) Durch die Reduzierung der T_2 kommt es nach Gleichung 3.2.14, S. 23, zu einer Verbreiterung der NMR Signale, wodurch das SNR verringert wird. Daher gilt, je stärker die Reduktion von T_1 im Vergleich zu T_2 , desto höher ist die Steigerung der Sensitivität durch PRE. Die T_1 Reduktion ist maximal, wenn τ_c dem Inversen der Larmorfrequenz entspricht, also $1/\nu_L = \tau_c \approx 10^{-8}$ s. Je länger τ_c , desto stärker wird T_2 verringert. Um T_1 stärker zu reduzieren als T_2 , wird daher empfohlen $\tau_c < 10^{-11}$ s zu wählen.[145] Für kleine Moleküle ist diese Bedingung relativ einfach zu erfüllen, da $\tau_r \approx 10^{-10}$ s ist.[50, 145, 147]. Für Makromoleküle nimmt hingegen mit zunehmender Molekülgröße auch τ_r zu. Daher ist es für die Anwendung von PRE bei Makromolekülen wichtig, paramagnetische Metallionen mit kurzer τ_e zu wählen, wie beispielsweise Nickel(II) (Ni^{2+}) oder Cobalt(II) (Co^{2+}), die beide ein τ_e von $\tau_e \approx 10^{-13} - 10^{-10}$ s besitzen.[146] Eines der effizientesten Metallionen für PRE ist Gadolinium(III) (Gd^{3+}) mit einem paramagnetischen Moment von 10,8 Bohr-Magneton ($= 1,00 \cdot 10^{-22}$ J T $^{-1}$).[146] Verglichen mit Ni^{2+} oder Co^{2+} hat Gd^{3+} ein langes τ_e von etwa $\tau_e \approx 10^{-9} - 10^{-6}$ s, weshalb Gd^{3+} nur für die Anwendung bei kleinen Molekülen mit kurzer τ_r geeignet ist.

Die Abhängigkeit von T_1 und T_2 von der Gd^{3+} Konzentration ($c(Gd^{3+})$ in $[g L^{-1}]$) ist in den Gleichungen 6.2.2 und 6.2.3 beschrieben,[148]

$$T_{1, \text{obs}} = \frac{1}{\frac{1}{T_1} + r_{T_1} \cdot c(Gd^{3+})}, \quad (6.2.2)$$

$$T_{2, \text{obs}} = \frac{1}{\frac{1}{T_2} + r_{T_2} \cdot c(Gd^{3+})}, \quad (6.2.3)$$

mit der T_1 Relaxivität r_{T_1} und der T_2 Relaxivität r_{T_2} in $[L g^{-1} s^{-1}]$. Die Relaxivität ist ein Maß für die Effektivität des Relaxationsreagens auf den Relaxationsprozess. Gleichung 6.2.4 beschreibt den Zusammenhang zwischen der Halbwertsbreite ($FWHM_{\text{obs}}$) und der $c(Gd^{3+})$ und ergibt sich aus Gleichung 3.2.14, S. 23, durch Einsetzen von $T_{2, \text{obs}}$ aus Gleichung 6.2.3 in T_2^* ,

$$FWHM_{\text{obs}} = FWHM_0 + \frac{r_{T_2}}{\pi} \cdot c(Gd^{3+}), \quad (6.2.4)$$

wobei $FWHM_0$ die $FWHM$ bei $c(Gd^{3+}) = 0$ g L $^{-1}$ ist.

Zur Untersuchung des Potentials von PRE für die Sensitivitätssteigerung in der LAC-NMR Kopplung wurde in diesem Abschnitt eine 30 g L $^{-1}$ Propylparabendlösung mit verschiedenen $c(Gd^{3+})$ hergestellt und unter statischen Bedingungen gemessen. Die $c(Gd^{3+})$ betrug zwischen 0,0006 und 6,0 g L $^{-1}$. Die $T_{1, \text{obs}}$ und $FWHM_{\text{obs}}$ der aromatischen Signale von Propylparaben wurden für jedes $c(Gd^{3+})$ bestimmt und sind in Abbildung 6.8 dargestellt.

Die $T_{1, \text{obs}}$ und $FWHM_{\text{obs}}$ wurden mit den Gleichungen 6.2.2 und 6.2.4 angepasst. Um die potentielle Sensitivitätssteigerung durch die Zugabe von Gd^{3+} abzuschätzen, wurde die Quadratwurzel des Faktors der T_1 -Reduktion durch den Faktor der $FWHM$ -Zunahme dividiert. Die daraus resultierende schwarze Kurve in Abbildung 6.8 entspricht dem theoretischen $SNR \cdot t_r^{-1/2}$. Bei $c(Gd^{3+}) \approx 0,3$ g L $^{-1}$ wird eine maximale potentielle Sensitivitätssteigerung um den Faktor 1,4 erwartet. Das $T_{1, \text{obs}}$ bei dieser $c(Gd^{3+})$ ist $T_{1, \text{obs}} \approx 0,35$ s. Für einen 90° Puls mit einer Wiederholzeit von $t_r = 1,3 \cdot T_1$ würde somit $t_r \approx 0,5$ s betragen. Da dies bereits nahe am kürzesten t_r von 0,4 s liegt (siehe Abschnitt 6.1.3.1, S. 61), ist keine weitere signifikante Sensitivitätssteigerung durch die Anwendung des Ernst Winkels möglich.

Wird die PRESAT Pulssequenz zur Lösungsmittelunterdrückung angewandt, ist die potentielle Sensitivitätssteigerung durch die Zugabe von Gd^{3+} geringer, da die minimale Wiederholzeit $t_r = 1,4$ s ist. Für die Kombination von PRE mit PRESAT sollte daher $c(Gd^{3+})$ so gewählt werden, dass die Wiederholzeit $t_r = 1,3 \cdot T_{1, \text{obs}} = 1,4$ s entspricht. Dies wäre der Fall für $T_{1, \text{obs}} = 1,1$ s, was für die aromatischen Protonen von Propylparaben bei $c(Gd^{3+}) = 0,05$ g L $^{-1}$ erhalten wird. Bei dieser $c(Gd^{3+})$ wird eine potentielle

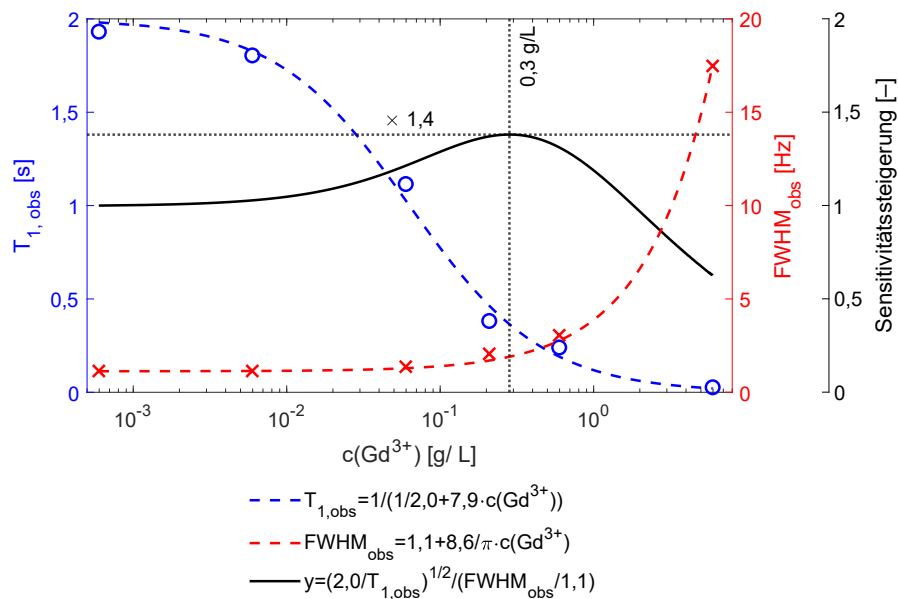


Abbildung 6.8: Bestimmung der T_1 ($T_{1,obs}$) und der $FWHM$ ($FWHM_{obs}$) der aromatischen Protonen von Propylparaben bei unterschiedlichen Gd^{3+} Konzentrationen ($c(Gd^{3+})$), gemessen unter statischen Bedingungen. Die $T_{1,obs}$ und $FWHM_{obs}$ wurden mit Gleichung 6.2.2 und Gleichung 6.2.4 angepasst. Indem die Quadratwurzel des Reduktionsfaktors von $T_{1,obs}$ durch den Steigerungsfaktor von $FWHM_{obs}$ dividiert wird, kann eine Vorhersage über die potentielle Sensitivitätssteigerung (theoretisches $SNR \cdot t_r^{-1/2}$, schwarze Linie) getroffen werden. Modifiziert nach Matz et al. 2024.[133]

Sensitivitätssteigerung um einen Faktor von 1,2 erwartet. Die tatsächliche Sensitivitätssteigerung wird im Abschnitt 6.2.4, S. 73, diskutiert. Es wird sich aber zeigen, dass die Zugabe von Gd^{3+} in eine geringere Effizienz der Lösungsmittelunterdrückung resultiert, da es auch die Relaxation der Lösungsmittel fördert. Im Vergleich zur PRESAT Messung ohne Gd^{3+} erhöht die Zugabe von Gd^{3+} somit die Intensität der Lösungsmittelsignale und damit auch die Amplitude der Basislinienfluktuationen, wodurch der ermittelte Rauschwert zunimmt. Ein weiterer Nachteil der Anwendung von PRE in der LAC-NMR Kopplung ist der zusätzliche Arbeitsaufwand und Chemikalienverbrauch, da die T_1 - und T_2 -Relaxivitäten für jedes Molekül charakterisiert werden müssen und die mobile Phase vor der NMR Detektion mit dem jeweiligen Metallion versetzt werden muss. Die potentielle Sensitivitätssteigerung um den Faktor 1,4 rechtfertigt den damit verbundenen zusätzlichen Arbeitsaufwand somit in der Regel nicht. Deshalb wird PRE als eine ungeeignete Methode zur Anwendung in der LAC-NMR für Analyten mit $T_1 \approx T_2$ beurteilt. Für Analyten mit $T_1 \gg T_2$ wird jedoch davon ausgegangen, dass eine größere Sensitivitätssteigerung erzielt werden kann und somit die Anwendung von PRE potentiell sinnvoll ist.

6.2.4. Vergleich der relativen Sensitivität unterschiedlicher NMR Aufnahmemethoden

In den vorhergehenden Abschnitten wurden Methoden zur Sensitivitätssteigerung während der NMR Detektion untersucht, die auf der Reduktion der Wiederholzeit basieren. Ziel war es nun diese Methoden ohne und mit Lösungsmittelunterdrückung durch PRESAT unter statischen und *onflow* Bedingungen bezüglich der Sensitivität zu vergleichen. Als Referenzmessung wurde ein $\beta = 90^\circ$ Puls mit einer Wiederholzeit von $t_r = 5,0 \cdot T_1$ (NMR Aufnahmemethode 1) herangezogen. Eine Zusammenfassung der Parameter der untersuchten NMR Aufnahmemethoden ist in Tabelle 6.4 gegeben.

Tabelle 6.4: Untersuchte NMR Aufnahmemethoden zur Steigerung der Sensitivität. Die Auswertung der Methoden ist in Abbildung 6.9 enthalten. Die Parameter wurden für die T_1 und T_1^* Werte von Propylparaben aus Tabelle 6.3, S. 65, berechnet. Modifiziert nach Matz et al. 2024.[133]

Methode	PRESAT	Statisch		Onflow		t_{aq} [s]	$c(\text{Gd}^{3+})$ [g L ⁻¹]
		β [°]	t_r [s]	β [°]	t_r [s]		
1	-	90	$5 \cdot T_1 = 10,0$	90	$5 \cdot T_1^* = 9,0$	4,1	0
2	-	90	$1,3 \cdot T_1 = 2,6$	90	$1,3 \cdot T_1^* = 2,4$	2,0	0
3	-	33 ^a	0,4	35 ^a	0,4	0,3	0
4	+	90	$1,3 \cdot T_1 = 2,6$	90	$1,3 \cdot T_1^* = 2,4$	1,0	0
5	+	60 ^a	1,4	62 ^a	1,4	0,3	0
6	-	90	$1,3 \cdot T_{1, \text{obs}} = 0,5$			0,3	$\approx 0,3$
7	+	90	$1,3 \cdot T_{1, \text{obs}} = 1,4$			0,3	$\approx 0,05$

^a Zur Berechnung der Ernst Winkel wurde Gleichung 5.6.2, S. 52, genutzt.

Zur Berechnung der Parameter t_r und β_{opt} für die Aufnahmemethoden 1 – 5 wurde für Messungen unter *onflow* Bedingungen die T_1^* Zeit und für Messungen unter statischen Bedingungen die T_1 Zeit von Propylparaben aus Tabelle 6.3, S. 65, verwendet. Für die Aufnahmemethoden 6 und 7 mit Gd^{3+} Zusatz basierte die Berechnung auf den $T_{1, \text{obs}}$ Zeiten, die aus der Anpassungsfunktion in Abbildung 6.8, S. 73, für die jeweiligen $c(\text{Gd}^{3+})$ erhalten wurden. Für jede Aufnahmemethode und jede Messbedingung (statisch, *onflow*) wurde die Empfängerverstärkung manuell kalibriert, entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 5.4.3, S. 48. Die verwendeten Empfängerverstärkungen sind in Anhang B.3, S. 177, aufgeführt. Die Aufnahmemethoden 1 – 5 wurden unter statischen und *onflow* Bedingungen verglichen, während die Aufnahmemethoden 6 und 7 (mit Gd^{3+} Zusatz) nur unter statischen Bedingungen gemessen wurden. Das SNR wurde für die aromatischen Signale einer 30 g L⁻¹ Propylparabenlösung (Aceton/Wasser 60/40 v/v%) bestimmt und auf $t_r^{1/2}$ normiert. Die $\text{SNR} \cdot t_r^{-1/2}$ sind in Abbildung 6.9a verglichen.

Das höchste $\text{SNR} \cdot t_r^{-1/2}$ wurde für Aufnahmemethode 5 erzielt, die eine Kombination aus PRESAT und Ernst Winkel war. Verglichen zur Referenzmessung (Aufnahmemethode 1) war das $\text{SNR} \cdot t_r^{-1/2}$ um etwa einen Faktor 30 höher. Dies übersteigt der im Abschnitt 6.2.2, S. 70, erwarteten Verbesserung um einen Faktor von 1,5 – 1,6. Diese Diskrepanz ist vor allem auf den unterschiedlichen Rauschwert zurückzuführen, der aufgrund der fehlenden Lösungsmittelunterdrückung bei Aufnahmemethode 1 und der daraus resultierenden intensiveren Basislinienfluktuationen höher bestimmt wird. Ein weiterer Grund ist, dass die Empfängerverstärkung für Aufnahmemethode 5 aufgrund der Lösungsmittelunterdrückung deutlich höher gewählt werden konnte als für Aufnahmemethode 1 (43 dB für Aufnahmemethode 5 und 19 dB für Aufnahmemethode 1). Bei Aufnahmemethode 7 mit PRESAT führte die Zugabe von Gd^{3+} zu einer schnelleren Relaxation der Lösungsmittelkerne und damit zu höheren Signalintensitäten der Lösungsmittel, sichtbar in Abbildung 6.9b und 6.9c. Infolgedessen war das $\text{SNR} \cdot t_r^{-1/2}$ niedriger als bei der gleichen Methode ohne Gd^{3+} Zusatz (Aufnahmemethode 4). Die relativen Lösungsmittelsignalintensitäten entsprechen aufgrund der unterschiedlichen T_1 (Tabelle 6.3, S. 65) nicht der Lösungsmittelzusammensetzung von 60/40 v/v% Aceton/Wasser. Da die Wiederholzeit anhand der T_1 bzw. T_1^* Zeit von Propylparaben berechnet wurde, war die Gleichgewichtsmagnetisierung für Wasser aufgrund der ähnlichen T_1 Zeit zu Propylparaben größer als die Gleichgewichtsmagnetisierung für Aceton, was eine deutlich längere T_1 Zeit besaß.

Tabelle 6.5 zeigt eine Bewertung der untersuchten Aufnahmemethoden aus Tabelle 6.4 basierend auf den Ergebnissen aus Abbildung 6.9 und deren praktischen Durchführbarkeit.

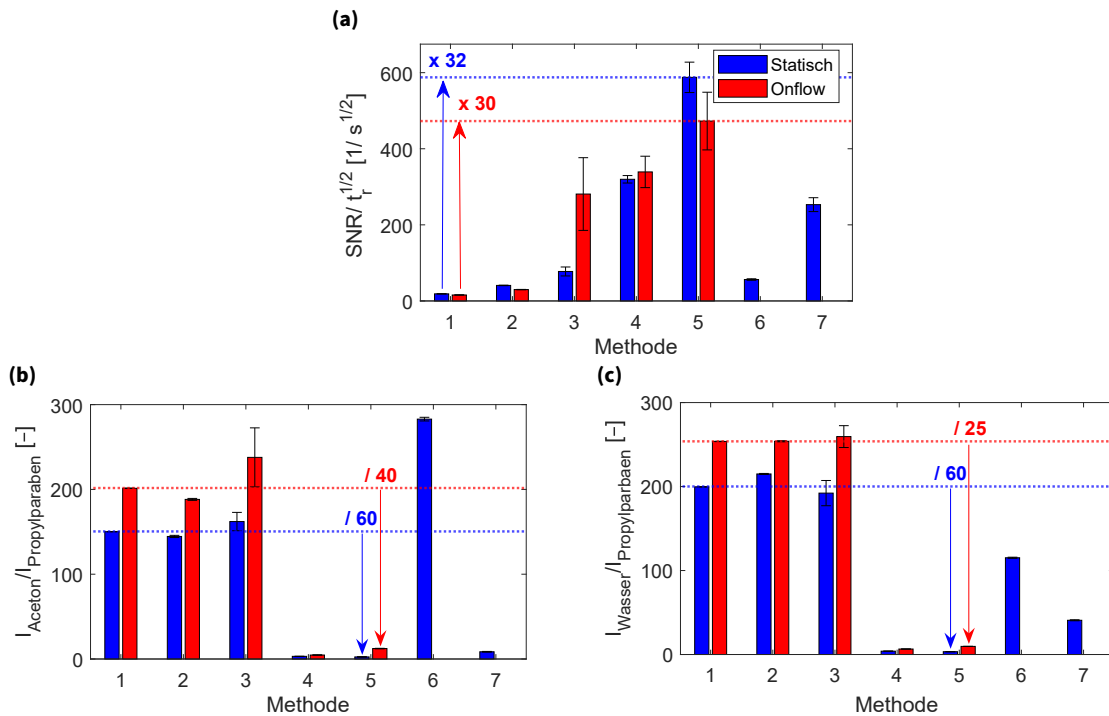


Abbildung 6.9: Sensitivitätsvergleich der in Tabelle 6.4 aufgeführten NMR Aufnahmemethoden an einer 30 g L⁻¹ Propylparabenlösung. Die Empfängerverstärkung wurde für jede Pulssequenz manuell kalibriert und ist in Anhang B.3, S. 177, aufgelistet. Die Spektren wurden entsprechend dem in Abbildung 5.4b, S. 46, beschriebenen experimentellen Ablauf mit einem Scan aufgenommen, wobei die ersten fünf Spektren verworfen wurden, um die Gleichgewichtsmagnetisierung zu erhalten. Die Sensitivität wurde in (a) anhand des SNR der aromatischen Signale von Propylparaben, normiert auf $t_r^{1/2}$, bewertet. Zur Bewertung der Lösungsmittelunterdrückung in (b) und (c) wurde das Verhältnis der Lösungsmittelsignalintensitäten (I_{Aceton} , I_{Wasser}) zu der mittleren Signalintensität von Propylparaben ($I_{Propylparaben}$) bestimmt. Modifiziert nach Matz et al. 2024.[133]

Tabelle 6.5: Bewertung der NMR Aufnahmemethoden aus Tabelle 6.4. Die Farbkodierung ist wie folgt: Weiß = sehr gut, Hellgrau = gut, Dunkelgrau = schlecht, Schwarz = sehr schlecht. Modifiziert nach Matz et al. 2024.[133]

Methode	1	2	3	4	5	6	7
Geschwindigkeit	Black	Dark Gray	Light Gray	Dark Gray	Light Gray	White	Light Gray
Einfachheit	White	Light Gray	Light Gray	Dark Gray	Light Gray	Black	Black
Sensitivität	Black	Dark Gray	Dark Gray	Light Gray	White	Dark Gray	Light Gray

Für die LAC-NMR Kopplung wurden drei wichtige Kriterien ermittelt: (1) die Geschwindigkeit, mit der die chromatographische Elutionsspur abgetastet werden kann (entspricht der Wiederholzeit t_r), (2) der erforderliche Aufwand für den Anwender bezogen auf die Probenvorbereitung und Berechnungen (Einfachheit) und (3) die Sensitivität, gemessen als $SNR \cdot t_r^{-1/2}$. Aufnahmemethode 5 hat eine Wiederholzeit von $t_r = 1,4$ s, was eine gute Zeitauflösung des chromatographischen Elutionsprofil ermöglicht. Die Sensitivität ist aufgrund der Kombination von PRESAT und Ernst Winkel am höchsten. Der zusätzliche Aufwand für die Berechnung des Ernst Winkels nach Gleichung 5.6.2, S. 52, wird als gering eingeschätzt. Aufgrund der hohen Sensitivität, der Einfachheit und der schnellen Wiederholzeit wurde die Aufnahmemethode 5 für die nachfolgenden LAC-NMR Experimente ausgewählt.

6.3. Etablierung der LAC-NMR Kopplung

6.3.1. Flusszellen Optimierung

In vorangegangenen Arbeiten zur *onflow* SEC-62 MHz NMR Kopplung wurden etwa 20 verschiedene NMR Flusszellen (*flow cells*, FCs) hergestellt und bezüglich der chromatographischen Auflösung und spektroskopischen Sensitivität verglichen.[22, 103] Wie in Abbildung 5.1, S. 42, dargestellt, sind die Flusszellen linear und gehen vertikal durch das *benchtop* NMR Spektrometer. Der aktive Bereich der Flusszelle ist in Abbildung 4.3c, S. 33, hervorgehoben und ist definiert als die mittlere Region der Flusszelle mit vergrößertem Innendurchmesser. In diesem Abschnitt wird der Einfluss der Länge des aktiven Bereichs L_{aktiv} auf die Präpolarisierung beschrieben, um die Sensitivität zu steigern. Durch eine Vergrößerung des aktiven Bereichs wird potentiell die Präpolarisierungszeit verlängert, wodurch sich eine größere Magnetisierung \vec{M}_z ausbildet und somit zu intensiveren NMR Signalen führt.[114] Der Aufbau von \vec{M}_z hängt von der T_1 Zeit ab.[11] Da die T_1 Zeit von Polymeren typischerweise im Bereich 200 – 500 ms liegt, ist eine kürzere Zeit für eine vollständige Präpolarisierung erforderlich als bei kleinen Molekülen deren T_1 Zeit im einstelligen Sekundenbereich liegt, wie bei den hier verwendeten Paraben (siehe Tabelle 6.3, S. 65).[103, 113] Deshalb wird die optimale Flusszelle für die SEC (die Flusszelle Nummer 9, FC-9, siehe Tabelle 6.6) mit einer Länge des aktiven Bereichs von $L_{\text{aktiv}} = 15$ mm mit der FC-10 mit $L_{\text{aktiv}} = 18$ mm verglichen. Die FC Bezeichnungen und Spezifikationen wurden aus der Publikation von Botha et al. übernommen und sind in Tabelle 6.6 zusammengefasst.[103] Der Innendurchmesser des aktiven Bereichs war bei FC-9 4,23 mm und bei FC-10 4,24 mm. Durch das 3 mm längere L_{aktiv} von FC-10, besaß FC-10 ein um 42 μL vergrößertes aktives Volumen V_{aktiv} und somit eine um 42 μL / (1000 μL /60 s) $\approx 2,5$ s verlängerte Präpolarisierungszeit.

Vor den LAC-NMR Messungen wurden die Positionen der Flusszellen im 80 MHz *benchtop* NMR Spektrometer entsprechend der Beschreibung von Botha et al. manuell kalibriert, um die maximale Signalintensität zu erhalten.[22] Die Position-Kalibrierungen sind in Anhang B.2, S. 176, aufgeführt. Die LAC-NMR Messungen wurden mit zwei Injektionsvolumina V_i durchgeführt. Pro Flusszelle wurden 100 μL und 1000 μL einer 30 g L^{-1} Propylparabenlösung injiziert. Die Daten wurden entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 5.8.2, S. 54, prozessiert, wobei zum Erhalten der originalen Elutionsprofilen keine Fensterfunktionen zur chromatographischen Filterung verwendet wurden.

Abbildung 6.10a zeigt den Ausschnitt des spektralen Chromatogramms der Elution von Propylparaben aus der LAC-NMR Messung mit FC-9 und $V_i = 1000$ μL . Die Elutionsprofile der lokalen Maxima der aromatischen Signale von Propylparaben sind in Schwarz eingezeichnet. Diese wurden gemittelt, um ein gemittelttes Elutionsprofil zu erhalten, siehe Abbildung 6.10b. Die gemittelten Elutionsprofile zeigen eine dreieckige Peakform, was darauf hinweist, dass eine Konzentrationsüberladung vorlag.[2] Die Konzentrationsüberladung tritt auf, wenn die Analytkonzentrationen so hoch sind, dass der Verteilungskoeffizient, also das Verhältnis der Analytkonzentrationen zwischen stationärer und mobiler Phase (siehe Abschnitt 2.2, S. 8), unter isothermen Bedingungen nicht mehr konstant ist.[149, 150] Infolgedessen baut sich eine Analytfront auf, die schneller durch die Säule fließt, was zu dreieckigen Peaks mit verringerter Retentionszeit führt.[2, 151] Im Vergleich zu den $V_i = 100$ μL Messungen sind bei den $V_i = 1000$ μL Messungen die Konzentrationen am Peakmaximum weniger verdünnt, wodurch die Retentionszeiten als Folge ausgeprägter Konzentrationsüberladungsphänomene stärker verkürzt sind.

Tabelle 6.6: Spezifikationen des aktiven Bereichs der NMR Flusszellen Nummer 9 (FC-9) und 10 (FC-10). Die Werte und die Bezeichnung wurden aus der Publikation von Botha et al. übernommen.[103] Der aktive Bereich der Flusszelle ist die mittlere Region der Flusszelle mit vergrößerten Innendurchmesser und der Konuswinkel ist der Öffnungswinkel des Konus relativ gemessen zur Symmetrieachse. Die aktive Region und der Konuswinkel einer Flusszelle sind in Abbildung 4.3c, S. 34, graphisch definiert. Modifiziert nach Matz et al. 2024.[133]

FC	Konuswinkel [°]	L_{aktiv} [mm]	Innendurchmesser [mm]	V_{aktiv} [μL]
FC-9	30	15	4,23	211
FC-10	30	18	4,24	226

Tabelle 6.7: Evaluierung der Leistung der NMR Flusszellen bezüglich der chromatographischen Auflösung und der spektroskopischen Sensitivität. Die in Abbildung 6.10 gezeigten gemittelten Elutionsprofile der aromatischen Signale von Propylparaben (30 g L^{-1}), gemessen mit 100 und 1000 μL injiziertem Volumen, wurden ausgewertet. Die Peakhöhe (Intensität) und die Halbwertsbreite ($FWHM$) wurden direkt an den gezeigten NMR Elutionsprofilen bestimmt. Zusätzlich wurde zur Bewertung der Präpolarisierung das Elutionsprofil der Integrale der aromatischen Signale bestimmt und integriert (Integral). Modifiziert nach Matz et al. 2024.[133]

FC	Intensität _{100 μL}	Intensität _{1000 μL}	$FWHM_{100 \mu\text{L}}$ [min]	$FWHM_{1000 \mu\text{L}}$ [min]	Integral _{100 μL} [a.u.]	Integral _{1000 μL} [a.u.]
FC-9	0,24	1,00	1,28	3,03	2,77	29,60
FC-10	0,24	0,98	1,33	3,17	2,60	30,27

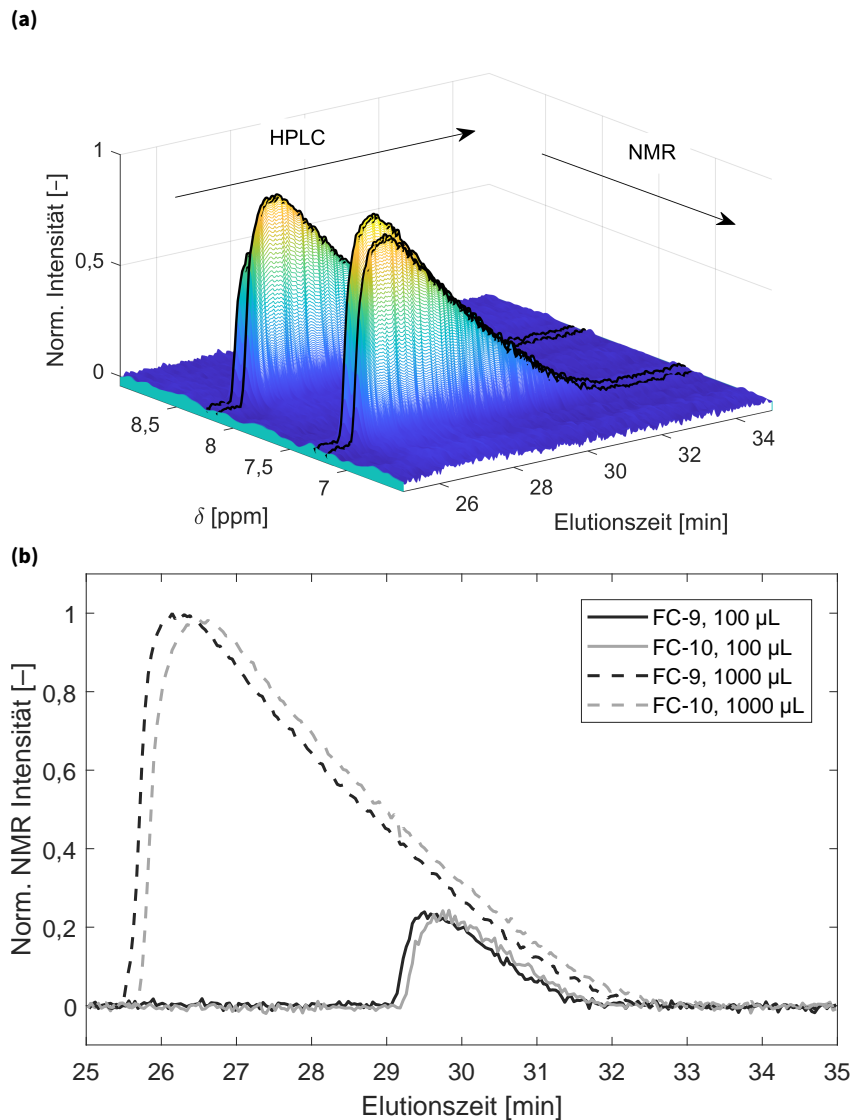


Abbildung 6.10: Vergleich von FC-9 und FC-10 anhand der NMR Elutionsprofile der aromatischen Signale von Propylparaben (30 g L^{-1} injizierte Konzentration, 100 und $1000 \mu\text{L}$ Injektionsvolumen). Die Spezifikationen der Durchflusszelle sind in Tabelle 6.6 zusammengefasst. (a) Exemplarische Darstellung der Elutionsprofile der aromatischen Signale von Propylparaben im spektral aufgelösten Chromatogramm (Spektralen nicht gemittelt) von FC-9 mit $1000 \mu\text{L}$ injiziertem Volumen. Aus den Elutionsprofilen der vier Signale (schwarz gefärbt) wurde das mittlere Elutionsprofil gebildet, die in (b) dargestellt sind. Die gemittelten Elutionsprofile sind auf das Maximum des Elutionsprofil von FC-9 mit $1000 \mu\text{L}$ injiziertem Volumen normiert. Die Auswertung der Flussprofile ist in Tabelle 6.7 enthalten. Mit der FC-9 mit einer Länge des aktiven Bereichs von $L_{\text{aktiv}} = 15 \text{ mm}$ wird bereits eine vollständige Präpolarisierung erhalten. Modifiziert nach Matz et al. 2024.[133]

Von jedem gemittelten Elutionsprofil in Abbildung 6.10b wurde die Peakhöhe (Intensität) und die Halberwerbsbreite ($FWHM$) bestimmt und sind in Tabelle 6.7 aufgeführt. Die Intensitäten und die $FWHM$ der jeweiligen Injektionsvolumina sind für beide FCs ähnlich, was zeigt, dass keine messbare zusätzliche Verdünnung (Bandenverbreiterung) für FC-10 stattfand, trotz des zusätzlichen V_{aktiv} von $42 \mu\text{L}$. Dies liegt vermutlich an den deutlich größeren Peakbreiten. Für $V_i = 100 \mu\text{L}$ beträgt das $FWHM \approx 80 \text{ s}$, was bei einer Flussrate von 1 mL min^{-1} $1300 \mu\text{L}$ entspricht. Das zusätzliche V_{aktiv} von $42 \mu\text{L}$ beträgt damit nur etwa 4 % des $FWHM$ Volumens.

Um den Einfluss des zusätzlichen V_{aktiv} auf die Präpolarisierung zu untersuchen, wurden zunächst die Elutionsprofile der Integrale der aromatischen Signale bestimmt. Diese Elutionsprofile wurden

dann erneut integriert, wodurch die Integralwerte (Integral) in Tabelle 6.7 erhalten wurden. Für jedes untersuchte Injektionsvolumen sind die Integrale der FCs ähnlich. Dies bestätigt, dass das zusätzliche V_{aktiv} zu keiner messbaren Verbesserung der Präpolarisierung führt. Für das in dieser Arbeit verwendete 80 MHz NMR Spektrometer wird bei einer Flussrate von $F = 1 \text{ mL min}^{-1}$ die maximale Präpolarisierung bereits mit der FC-9 erhalten mit $L_{\text{aktiv}} = 15 \text{ mm}$. Daher wurde FC-9 weiterhin verwendet, da durch das geringere aktive Volumen geringfügig schmalere Elutionsprofile erhalten werden und um eine bessere Vergleichbarkeit zu früheren Arbeiten zu gewährleisten.

6.3.2. Effekt der Flussrate auf LAC-NMR Messungen

Nach Van-Deemter existiert für jeden Analyten in der HPLC eine optimale Flussrate, bei der die chromatographische Bandenverbreiterung minimal und die Konzentration am Peakmaximum somit maximal ist.[43] Dies gilt jedoch nur, wenn die analysierten Analytkonzentrationen im linearen Konzentrationsbereich der Säule liegen. Bei der Messung höherer Analytkonzentrationen wird die Peakverbreiterung bei unterschiedlichen Flussraten aufgrund Säulenüberladungsphänomenen nicht mehr von der Van-Deemter Beziehung beschrieben.[149]

Für *onflow* NMR Messungen existiert eine optimale Flussrate bei der die maximale Signalfläche erhalten wird.[114, 152] Diese ist abhängig von dem Verhältnis der Wiederholzeit der Pulssequenz zur T_1 Zeit des Analyten, sowie der Präpolarisierung der ^1H Kerne, die in das Detektionsvolumen V_{coil} strömen und die angeregten ^1H Kerne verdrängen. Zur Analytdetektion in der gekoppelten Analytik ist jedoch das *SNR* entscheidend. Unter *onflow* Bedingungen nehmen die effektiven Relaxationszeiten (T_1^* , T_2^*) mit steigender Flussrate ab (vgl. Gleichungen 4.3.1 – 4.3.3, S. 34). Dadurch ergeben sich für das *SNR* zwei gegensätzliche Effekte. Durch die Verringerung von T_1^* , gezeigt in Abbildung 6.4, S. 66, kann die Wiederholzeit der Pulssequenz reduziert werden und somit schneller NMR Spektren aufgenommen werden, wodurch das *SNR* proportional zur Quadratwurzel des Faktors der T_1^* Verringerung steigt. In den Gleichungen 6.3.1 – 6.3.3 ist dieser Zusammenhang in Abhängigkeit von der Flussrate F beschrieben,

$$SNR \propto \sqrt{\frac{T_{1,0 \text{ mL/min}}^*}{T_{1,X \text{ mL/min}}^*}}, \quad (6.3.1)$$

$$\propto \sqrt{\frac{T_{1,0 \text{ mL/min}}^*}{\frac{1}{\frac{1}{T_{1,0 \text{ mL/min}}^*} + \frac{F}{V_{\text{coil}}}}}}, \quad (6.3.2)$$

$$\propto \sqrt{1 + \frac{T_{1,0 \text{ mL/min}}^* \cdot F}{V_{\text{coil}}}}. \quad (6.3.3)$$

Ein negativer Effekt auf das *SNR* hat die Verringerung der T_2^* Zeit, da nach Gleichung 3.2.14, S. 23, die *FWHM* der NMR Signale dadurch zunehmen. Die Auswirkung auf das *SNR* ist invers proportional zum

Faktor der *FWHM* Zunahme. Die *FWHM* nimmt mit der Flussrate zu. Der Einfluss der *FWHM* Zunahme auf das *SNR* ist in Abhängigkeit von der Flussrate *F* in den Gleichungen 6.3.4 – 6.3.9 formuliert,

$$SNR \propto \frac{1}{\frac{FWHM_{X \text{ mL/min}}}{FWHM_{0 \text{ mL/min}}}}, \quad (6.3.4)$$

$$\propto \frac{FWHM_{0 \text{ mL/min}}}{FWHM_{X \text{ mL/min}}}, \quad (6.3.5)$$

$$\propto \frac{\frac{1}{\pi T_{2,0 \text{ mL/min}}^*}}{\frac{1}{\pi T_{2,X \text{ mL/min}}^*}}, \quad (6.3.6)$$

$$\propto \frac{T_{2,X \text{ mL/min}}^*}{T_{2,0 \text{ mL/min}}^*}, \quad (6.3.7)$$

$$\propto \frac{\frac{1}{T_{2,0 \text{ mL/min}}^*} + \frac{F}{V_{\text{coil}}}}{T_{2,0 \text{ mL/min}}^*}, \quad (6.3.8)$$

$$\propto \frac{1}{1 + \frac{T_{2,0 \text{ mL/min}}^* \cdot F}{V_{\text{coil}}}}. \quad (6.3.9)$$

In einer HPLC-NMR Messung überlagern diese Effekte, weshalb die optimale Flussrate abhängig von den Analyteigenschaften (Relaxationszeiten, Retentionszeit), der Konzentration und der NMR Aufnahmemethode ist.

Zur Überprüfung ob die bisher verwendete Flussrate von $F = 1 \text{ mL min}^{-1}$ für das verwendete Modellsystem geeignet ist, wurden $100 \mu\text{L}$ einer 30 g L^{-1} Propylparabenslösung mittels LAC-NMR bei unterschiedlichen Flussraten gemessen. Für die NMR-Detektion wurde die NMR Aufnahmemethode 4 in Tabelle 6.4, S. 74, verwendet, wobei ein Spektrum mit einem Scan aufgenommen wurde. Die Wiederholzeiten der Pulssequenz basierten auf den T_1^* Zeiten, die für die unterschiedlichen Flussraten mit der Anpassungsfunktion in Abbildung 6.4, S. 66, ermittelt wurden. Die Datenprozessierung erfolgte entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 6.1.3.1, S. 61, ohne die Anwendung chromatographischer Filter. Von den aromatischen Signalen wurde, wie in Abbildung 6.10a, S. 76, veranschaulicht, das gemittelte Elutionsprofil bestimmt. Die gemittelten Elutionsprofile von Propylparaben sind in Abbildung 6.11 dargestellt. Die höchste Flussrate betrug $F = 3 \text{ mL min}^{-1}$ da der maximal zulässige Druck der Säule von 150 Bar erreicht wurde. Die Chromatogramme zeigen eine Zunahme des Elutionsvolumens mit zunehmender Flussrate. Die Veränderung der Retardierung wird auf die Temperaturänderung innerhalb der Säule zurückgeführt. Die Temperatur des Säulenofens von $26,5^\circ\text{C}$ lag deutlich über der Temperatur der mobilen Phase, die der Raumtemperatur von 20°C entsprach. Durch eine Veränderung des Volumenflusses wird das thermische Gleichgewicht innerhalb der Säule verändert, was die Stärke der adsorptiven Wechselwirkung zwischen dem Analyten und der Säule beeinflusst. Das Chromatogramm, das mit einer Flussrate von $F = 3 \text{ mL min}^{-1}$ aufgenommen wurde, zeigt die geringste NMR Intensität. Die maximale NMR Intensität ist einen Faktor 1,5 höher und wird für das Chromatogramm erreicht, dass mit einer Flussrate von $F = 1 \text{ mL min}^{-1}$ aufgenommen wurde. Dies bestätigt, dass für das verwendete Modellsystem und Säule bei einer Flussrate von $F = 1 \text{ mL min}^{-1}$ eine gute Empfindlichkeit erhalten wird.

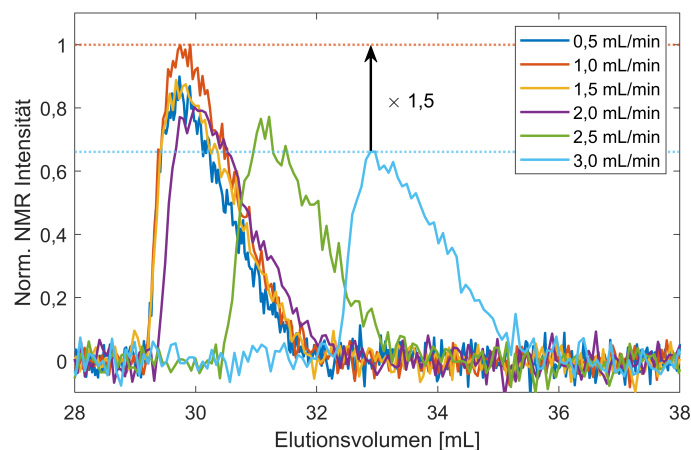


Abbildung 6.11: Auswirkung der Flussrate auf das NMR Elutionsprofil von Propylparaben. Bei unterschiedlichen Flussraten wurden $100 \mu\text{L}$ einer 30 g L^{-1} Propylparabenlösung injiziert und das gemittelte Elutionsprofil der aromatischen Signale bestimmt. Bei einer Flussrate von 1 mL min^{-1} wird die maximale NMR Signalintensität erhalten.

6.3.3. Auswirkung des Injektionsvolumens und der Signalmittelung auf die Sensitivität

Eine Methode zur Erhöhung der Sensitivität der HPLC-NMR Kopplung besteht darin, eine größere Menge des Analyten in das System einzubringen. Dies kann durch Injektion einer Lösung mit höherer Konzentration und/oder eines größeren Probenvolumens erreicht werden.[42, 153, 154] Beide Varianten können zu Säulenüberladungsphänomenen führen, die in Konzentrations- und Volumenüberladung unterschieden werden.[2, 149] Wie bereits im Abschnitt 6.3.1, S. 76, erläutert, resultiert die Konzentrationsüberladung zu veränderten Verteilungskoeffizienten der Analyten und somit zu dreieckigen Peaks mit verringerter Retentionszeit.[2] Die Volumenüberladung tritt auf, wenn das Injektionsvolumen größer ist als die inhärente chromatographische Peakverbreiterung, wodurch Peaks mit einem Plateau anstatt eines Maximums erhalten werden.[33] Die Analytkonzentration auf dem Plateau entspricht der injizierten Konzentration. Anders als bei der Konzentrationsüberladung ist bei reiner Volumenüberladung der Verteilungskoeffizient konstant.[2, 153] Beide Säulenüberladungsphänomene führen zu verbreiterten Peaks, wodurch die chromatographische Auflösung verringert wird. Zudem können die Säulenüberladungsphänomene überlagern und so zu komplexen Peakformen führen.[155] Durch die Injektion größerer Volumina wird die Sensitivität bezüglich der Nachweisgrenze für eine gegebene injizierte Konzentration verbessert, da die Verdünnung am Peakmaximum reduziert und die Messzeit des Analytpeaks verlängert wird. Die verringerte chromatographische Auflösung kann dabei teilweise mit der spektralen Auflösung der NMR Detektion ausgeglichen werden, wie in Abschnitt 6.4, S. 91, gezeigt wird.

Eine Mischung aus Methyl-, Propyl- und Pentylparaben (jeweils 30 g L^{-1}) wurde mit den Injektionsvolumina von $V_i = 20, 100, 500$ und $1000 \mu\text{L}$ analysiert. Die Datenprozessierung wurde ohne chromatographische Filter durchgeführt, um die originalen Elutionsprofile zu erhalten. Die Auswirkungen der Anwendung chromatographischer Filter wird in Abschnitt 6.3.4, S. 85, beschrieben. Für jedes spektral aufgelöste Chromatogramm wurde das gemittelte Elutionsprofil der aromatischen Parabensignale, analog zur Beschreibung in Abbildung 6.10a, S. 78, bestimmt. Das gemittelte Elutionsprofil der Messung mit $V_i = 20 \mu\text{L}$ besaß für den niedrigsten Peak (Pentylparaben) ein *SNR* von etwa 5. Zur genaueren Charakterisierung der Peakform wurde das Rauschen aller gemittelten Elutionsprofile durch einen Tiefpassfilter reduziert. Die Grenzfrequenz, d. h. die höchste Frequenz, oberhalb der alle Frequenzen gleich Null gesetzt werden, entsprach dem Kehrwert des Drittels der *FWHM* des schmalsten Peaks der Messreihe. Der schmalste Peak war der Methylparabenpeak aus der $V_i = 20 \mu\text{L}$ Messung mit einem *FWHM* von etwa 30 s, was einer Grenzfrequenz von $1/(30/3) = 0,1 \text{ Hz}$ entsprach. Die Höhe *I* und das

FWHM jedes Parabenpeaks wurden bestimmt. Für jedes Paraben p und Injektionsvolumen V_i wurde der Verdünnungsfaktor $DF_{i,p}$ am Peakmaximum nach Gleichung 6.3.10 bestimmt,

$$DF_{i,p} = \frac{I_{i,p} \cdot V_i}{A_{i,p}}, \quad (6.3.10)$$

mit der Intensität am Maximum des jeweiligen Parabenpeaks $I_{i,p}$ und der Peakfläche $A_{i,p}$. Das Verhältnis von $A_{i,p}$ und V_i entspricht der Intensität des als Rechteck angenommenen Injektionsprofils vor der chromatographischen Separation. Bei der Berechnung der $DF_{i,p}$ wurde von einer vollständigen Wiederfindung der Parabene ausgegangen, d. h. die Fläche des Injektionsprofil entspricht der Fläche des detektierten Signals, die proportional zur injizierten Masse ist.

In Abbildung 6.12a sind die gemittelten Elutionsprofile der aromatischen Signale zu sehen und in Abbildung 6.12b die nach Gleichung 6.3.10 berechneten Verdünnungsfaktoren.

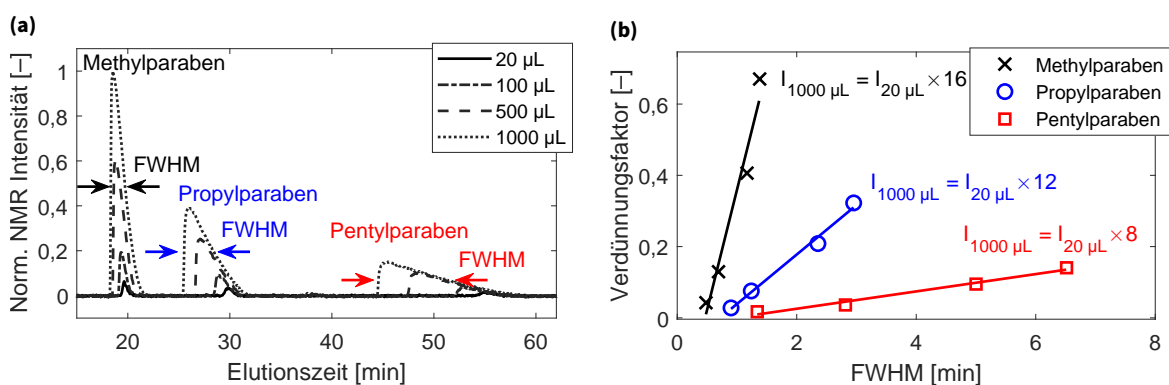


Abbildung 6.12: Charakterisierung der Chromatogramme für unterschiedliche Injektionsvolumina. (a) Gemittelte Elutionsprofile der aromatischen Signale nach Anwendung eines Tiefpassfilters mit einer Grenzfrequenz von 0,1 Hz, normiert auf den Methylparabenpeak der $V_i = 1000 \mu\text{L}$ Messung. (b) Die nach Gleichung 6.3.10 bestimmten Verdünnungsfaktoren und die *FWHM* für jeden Parabenpeak und jedes Injektionsvolumen. Modifiziert nach Matz et al. 2024.[133]

Die chromatographische Auflösung nimmt mit steigendem Injektionsvolumen ab (siehe Abbildung 6.12a). Durch Erhöhung des Injektionsvolumens von 20 auf $1000 \mu\text{L}$ nimmt die Peakhöhe für Methylparaben um den Faktor 16, für Propylparaben um den Faktor 12 und für Pentylparaben um den Faktor 8 zu, eingezeichnet in Abbildung 6.12b. Das *FWHM* nimmt umgekehrt zur Elutionsreihenfolge zu und ist am höchsten für Pentylparaben, gefolgt von Propyl- und dann Methylparaben. Das zeigt, dass Konzentrationsüberladungsphänomene mit zunehmender Retentionszeit des Analyten zunehmen. Beim Chromatogramm der $V_i = 1000 \mu\text{L}$ Messung ist die Peakhöhe von Methyl-, Propyl- und Pentylparaben um den Faktor 0,67, 0,32 bzw. 0,14 verdünnt. Daher kann die Peakhöhe in anderen Fällen durch Injektion größerer Volumina weiter erhöht werden. Um eine Basislinienseparation zwischen Methyl- und Propylparaben beizubehalten, wurden keine größeren Injektionsvolumina als $V_i = 1000 \mu\text{L}$ untersucht. Um die Sensitivität weiter zu erhöhen, wurden die NMR Spektren entlang des chromatographischen Peaks gemittelt. Das in Abbildung 6.12a gezeigte Elutionsprofil für $V_i = 1000 \mu\text{L}$ wurde verwendet, um den Elutionsbereich (in Minuten) zu bestimmen, innerhalb dessen die NMR Spektren gemittelt wurden. Der zu mitteln Elutionsbereich wurde anhand der Intensität des Elutionsprofils definiert. Die gewählten Intensitäten begannen bei 5 % der Peakhöhe und wurden immer in 5 %-Schritten erhöht, bis das nicht-gemittelte NMR Spektrum beim Peakmaximum (100 % der Peakhöhe) erreicht war. Für jedes gemittelte Spektrum wurde das *SNR* bestimmt und auf das *SNR_{raw}* des nicht-gemittelten NMR Spektrums bei 100 % der Peakhöhe normiert. In Abbildung 6.13a sind die normierten *SNR* für die drei Parabene der $V_i = 1000 \mu\text{L}$ Messung gezeigt.

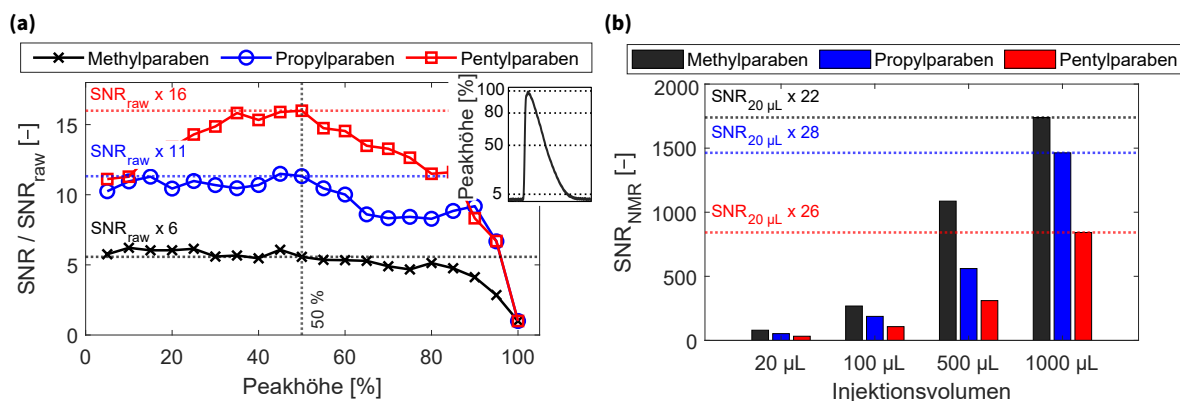


Abbildung 6.13: Sensitivitätssteigerung durch Signalmittelung entlang des chromatographischen Peaks. (a) Auswirkung der Mittelung der NMR Spektren entlang des chromatographischen Peaks auf das spektrale SNR, exemplarisch gezeigt an der $V_i = 1000 \mu\text{L}$ Messung. Die Konzentration pro Paraben entsprach 30 g L^{-1} . Die Spektren wurden oberhalb unterschiedlicher Peakhöhen gemittelt und das SNR auf das SNR des nicht-gemittelten NMR Spektrums bei 100 % der Peakhöhe (SNR_{raw}) normiert. Oben rechts ist ein typischer chromatographischer Peak gezeigt, bei dem wichtige Peakhöhen markiert sind, über denen die NMR Spektren gemittelt wurden. In (b) ist das spektrale SNR der Parabene für die gemittelten NMR Spektren (über 50 % der Peakhöhe) für die verschiedenen V_i gezeigt. Für $V_i = 1000 \mu\text{L}$ wird die höchste SNR erhalten, da aufgrund der Peakbreite am meisten Spektren gemittelt werden. Modifiziert nach Matz et al. 2024.[133]

Bei einer Mittelung der Spektren über 50 % der Peakhöhe erhöhte sich jeweils das SNR für Methyl-, Propyl- und Pentylparaben um die Faktoren 6, 11 und 16. Das zeigt, dass der Effekt der Signalmittelung mit der Peakbreite zunimmt, da der Konzentrationsgradient um das Peakmaximum geringer ist. Werden die Spektren unter 50 % der Peakhöhe gemittelt bleibt das SNR der gemittelten NMR Spektren von Methyl- und Propylparaben ungefähr konstant, während es bei Pentylparaben deutlich abnimmt.

Die Beobachtung, dass das SNR des gemittelten Spektrums bis zu einer Peakhöhe von etwa 50 % zunimmt, wird durch die folgende Überlegung gestützt. Vereinfacht kann die Mittelung der NMR Spektren entlang des chromatographischen Peaks als die Mittelung zweier Spektren angesehen werden. Das Spektrum am Peakmaximum hat das $\text{SNR}_{\text{raw}} = S/N$. Das zweite Spektrum hat eine um den Faktor a reduzierte Signalintensität S bei gleichem Rauschen N . Werden zwei Spektren mit gleicher Signalintensität ($a = 1$) gemittelt, so erhöht sich das SNR im gemittelten Spektrum theoretisch um $2^{1/2} \approx 1,414$. Wird jedoch das Spektrum vom Peakmaximum mit einem Spektrum gemittelt, das nur Rauschen N enthält ($a = 0$), beträgt das Rauschen $N/2^{1/2}$ und das Signal $(S+0 \cdot S)/2 = S/2$. Das SNR des gemittelten Spektrums wäre dann $(S/2)/(N/2^{1/2}) \approx 0,707 \cdot \text{SNR}_{\text{raw}}$. Gesucht ist nun das Spektrum mit der Signalintensität $a \cdot S$, bei dem eine Mittelung gerade keine Verbesserung des SNR_{raw} mehr bringt, d. h. $\text{SNR}_{\text{raw}} = \text{SNR}_{\text{gemittelt}}$. Mit diesen Überlegungen kann die Gleichung 6.3.11 formuliert werden,

$$\frac{S}{N} = \frac{S + aS}{2^{1/2} \cdot N} \quad (6.3.11)$$

Durch Kürzen von S und N in Gleichung 6.3.11 und anschließendes Umformen nach a ergibt sich Gleichung 6.3.12,

$$a = 2^{1/2} - 1 \approx 0,414. \quad (6.3.12)$$

Diese Überlegung zeigt also, dass eine Mittelung der Spektren zu einer Verbesserung des SNR führt, solange die Signalintensität des zweiten Spektrums 41 % der Intensität des Spektrums des Peakmaximums besitzt. Dieser Wert liegt in der Nähe des Wertes von 50 %, der in Abbildung 6.13a ermittelt wurde.

In Abbildung 6.13b ist das SNR der gemittelten Spektren (Mittelung der NMR Spektren über 50 % der jeweiligen Peakhöhen) für die unterschiedlichen V_i gezeigt. Die Steigerung des SNR nimmt mit der Peakbreite zu, da damit auch der Zeitbereich, in dem die NMR Spektren gemittelt werden, größer wird. Bei der Messung mit $V_i = 1000 \mu\text{L}$ sind die Peaks am breitesten, wodurch die SNR Steigerung

am größten ist. Durch die angewandte Signalmittelung wurde das SNR der $V_i = 1000 \mu\text{L}$ Messung im Vergleich zur $V_i = 20 \mu\text{L}$ Messung um den Faktor 22 – 28 gesteigert. Gegenüber des Sensitivitätszuwachs ohne Signalmittelung (Abbildung 6.12b, Verbesserung um den Faktor 8 – 16) ist ersichtlich, dass die Sensitivität pro injizierter Konzentrationseinheit durch die Signalmittelung zusätzlich um etwa einen Faktor von 2 zunimmt.

Während das Injizieren größerer Probenvolumina eine effektive Methode darstellt die Sensitivität pro injizierter Konzentrationseinheit zu steigern, nimmt die Sensitivität pro injizierter Masseneinheit ab. Bei der Messung mit $V_i = 1000 \mu\text{L}$ wird relativ zu $V_i = 20 \mu\text{L}$ ein Faktor 50 mehr Analyt injiziert, während das SNR nur um den Faktor 22 – 28 zunimmt. Es wird angenommen, dass das optimale Injektionsvolumen für die höchste Sensitivität pro injizierter Masseneinheit dann erhalten wird, wenn die $FWHM$ des chromatographischen Peaks dem effektiven NMR Detektionsvolumen (siehe Abschnitt 6.1.3.4, S. 65, etwa $89 \mu\text{L}$) entspricht. Somit würde jede Elutionsvolumenfraktion mit einer Konzentration von über 50 % der Konzentration des Peakmaximums zum NMR Signal beitragen. Dies wäre äquivalent zu der Signalmittelung über 50 % der Peakhöhe.

Zur Abschätzung der absoluten Sensitivitätssteigerung durch Erhöhung des Injektionsvolumens und Anwendung der Signalmittelung, sind in Abbildung 6.14 die NMR Spektren der $V_i = 20 \mu\text{L}$ Messung bei 100 % Peakhöhe (nicht gemittelt) mit den gemittelten Spektren der $V_i = 1000 \mu\text{L}$ Messung (Mittelung über 50 % der Peakhöhe) verglichen. Das SNR der aromatischen Signale ist für Methyl-, Propyl- und Pentylparaben jeweils um die Faktoren 76, 144 und 168 erhöht. Da für das verwendete Modellsystem eine ausreichende chromatographische Auflösung vorlag, wurden die folgenden Messungen mit einem Injektionsvolumen von $V_i = 1000 \mu\text{L}$ durchgeführt.

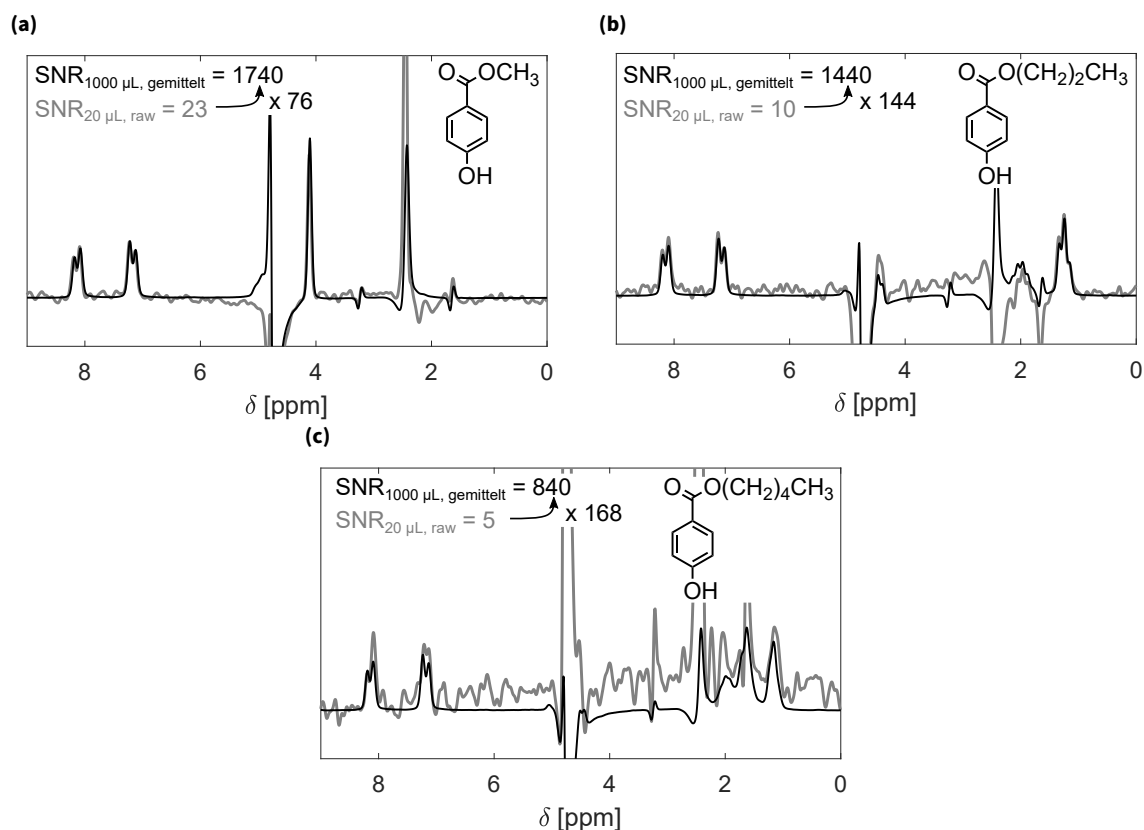


Abbildung 6.14: Vergleich der NMR Spektren der LAC-NMR Messungen mit verschiedenen Injektionsvolumina V_i . Gezeigt ist das Spektrum vom Peakmaximum der Messung mit $V_i = 20 \mu\text{L}$ (SNR_{raw}) und das gemittelte Spektrum (Mittelung der Spektren über 50 % der Peakhöhe) der $V_i = 1000 \mu\text{L}$ Messung. Modifiziert nach Matz et al. 2024.[133]

Im obigen Abschnitt wurde gezeigt, dass die Sensitivität in der LAC-NMR Kopplung durch eine Vergrößerung des Injektionsvolumens und der Anwendung der Signalmittelung erheblich verbessert werden kann. Allerdings führt die Signalmittelung zu einem Verlust der chromatographischen Auflösung im gemittelten Bereich. Eine geringere chromatographische Auflösung ist problematisch bei (1) chromatographisch überlappenden Peaks und (2) wenn Informationen über die Peakform benötigt werden. (1) Bei überlappenden Peaks muss die Signalintensität für die Signalmittelung angepasst werden, sodass nur Spektren von den reinen Komponenten gemittelt werden. Wie Abbildung 6.13a zeigt, wurde bereits bei einer Mittelung der NMR Spektren über 80 % der Peakhöhe eine große Verbesserung der *SNR* erzielt. Daher können signifikante *SNR* Verbesserungen auch für chromatographisch überlappende Peaks erzielt werden, wenn die NMR Spektren um das Peakmaximum gemittelt werden. (2) Wenn Informationen über die chromatographische Peakfläche oder die spektrale Entwicklung von Signalen während der Peakelution von Interesse sind, kann eine Signalmittelung angewendet werden, bei der aufeinanderfolgende Spektren innerhalb einer festen Fensterbreite gemittelt werden. Bei dieser fortlaufenden Signalmittelung wird die Datenpunktdichte entlang des chromatographischen Peaks reduziert, ähnlich zur Datenreduktion beim *oversampling*. [156] Dies kann entweder während der Datenaufnahme durch Erhöhen der Anzahl der Scans pro Spektrum oder während der Datenprozessierung erfolgen. Der Nachteil dieses Ansatzes ist, dass das Peakprofil geringfügig modifiziert wird. Diese Methode kann auch bei der SEC-NMR Kopplung verwendet werden, wenn z. B. die prozentuale Monomerkonzentration in einer Copolymerkette als Funktion des Elutionsvolumens bestimmt werden soll. [103, 104]

Im Abschnitt 6.3.5, S. 88, wird gezeigt, dass die Sensitivitätssteigerungen durch die Signalmittelung und der chromatographischen Filterung nicht multiplikativ sind, da während der chromatographischen Filterung ebenso eine Signalmittelung stattfindet. Die hier vorgenommene manuelle Signalmittelung zeigt erst eine signifikante *SNR* Steigerung für Mittelungsbereiche die mindestens einen Faktor 1,5 größer sind als die Fenstergröße der Faltfunktion.

6.3.4. Chromatographische Filterung durch Fensterfunktionen

Digitale Filter wurden angewandt, um das *SNR* der Daten zu verbessern. Datensätze von der HPLC-NMR Kopplung können in zwei Richtungen gefiltert werden: entlang der spektralen Achse (Apodisierung, Faltung in der Frequenzdomäne) und entlang der chromatographischen Achse (chromatographische Filterung, Faltung in der Zeitdomäne). [103, 104] Bei der chromatographischen Filterung werden die Chromatogramme bei jeder chemischen Verschiebung mit einer Fensterfunktion gefaltet. Dabei werden die Datenpunkte innerhalb des Fensters gemittelt, wobei die Anzahl an gemittelten Datenpunkten mit der Fenstergröße variiert werden kann. Bei der Mittelung werden die Datenpunkte entsprechend der Intensität der Fensterfunktion gewichtet. Nach der Mittelwertbildung wird das Fenster um einen Datenpunkt verschoben und die Mittelwertbildung erneut durchgeführt. Dies wird für den gesamten Datensatz wiederholt. [29] Das gefaltete Signal hat somit die gleiche Anzahl an Datenpunkten wie das ursprüngliche Signal. Um einen Zeitversatz der Signale zu vermeiden, werden Fenstergrößen mit einer ungeraden Anzahl an Datenpunkten gewählt. [156] Durch die Anwendung chromatographischer Filter wird das Rauschen reduziert und die Signale verbreitert, was zu einer Reduktion der Signalintensität führt. Die Reduktion des Rauschens hängt von der jeweiligen Frequenz ab: hochfrequentes Rauschen nimmt schneller mit steigender Fenstergröße ab, wohingegen niederfrequentes Rauschen langsamer abnimmt. Das Ausmaß der Peakverbreiterung wird vom Verhältnis zwischen Peakbreite und Fensterfunktion bestimmt. Daher gibt es für jeden Peak eine optimale Fensterbreite, bei der das *SNR* maximal ist. Typischerweise ist diese kleiner als die Basisbreite des zu glättenden Peaks. [156]

An Datensätzen von der SEC-NMR (62 MHz) Kopplung wurde in vorangegangenen Publikationen folgende Glättungsfunktionen entlang der chromatographischen Dimension untersucht: (1) Rechteck, (2) Gauß sowie (3) Tukey.[103] Diese Funktionen wurden nun zur Anwendung in der LAC-NMR (80 MHz) untersucht. Die verwendeten Fensterfunktionen sind in Abbildung 6.15 visualisiert.

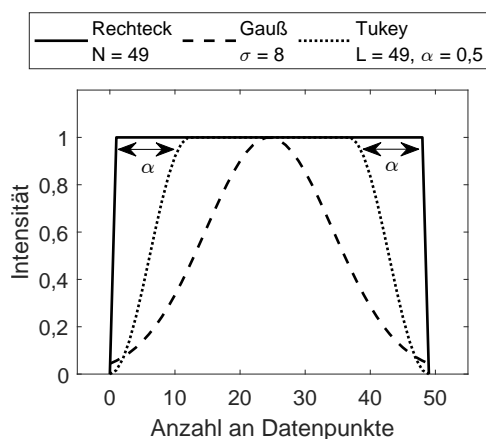


Abbildung 6.15: Darstellung der verwendeten chromatographischen Fensterfunktionen. Die Fensterbreite der Rechteckfunktion N und die der Tukey-Funktion L entspricht der Basisbreite. Die Tukey-Funktion ist in Gleichung 6.3.13 definiert und besitzt zusätzlich einen α -Wert, der die Form der Übergangsbereiche zwischen dem flachen Mittelteil und die durch zwei Kosinusfunktionen abfallenden Seiten beschreibt. Die Fensterbreite der Gaußfunktion wird über die Standardabweichung σ definiert. Die Bezeichnung der Parameter wurde von früheren Arbeiten übernommen.[22, 103, 104] Modifiziert nach Matz et al. 2024.[133]

Die mathematische Definition der Rechteckfunktion ist in Gleichung 3.3.19, S. 27, und die der Gaußfunktion in Gleichung 3.3.16, S. 27, angegeben. Die Tukey-Funktion ist in Gleichung 6.3.13 definiert.

$$f(x) = \begin{cases} \cos\left(\frac{2\pi}{\alpha L} \left[x - \frac{\alpha L}{2}\right]\right), & 0 \leq x < \frac{\alpha L}{2} \\ 1, & \frac{\alpha L}{2} \leq x < L - \frac{\alpha L}{2} \\ \cos\left(\frac{2\pi}{\alpha L} \left[x - L + \frac{\alpha L}{2}\right]\right), & L - \frac{\alpha L}{2} \leq x \leq L \end{cases} \quad (6.3.13)$$

mit der Datenpunktliste x , mit der Gesamtlänge L (Anzahl an Datenpunkten, Fenstergröße) sowie dem Parameter α , der dem Verhältnis aus der Länge des kosinusverjüngten Abschnitts zur Fenstergröße L entspricht, mit $0 \leq \alpha \leq 1$. [22, 75, 157] Für $\alpha = 0$ wird die Rechteckfunktion und für $\alpha = 1$ wird eine Hann-Funktion erhalten. Die Tukey-Funktion wurde für $\alpha = 0,25, 0,50$ und $0,75$ untersucht. Gegenüber der Rechteckfunktion ist die Gaußfunktion und die Tukey-Funktion mit $\alpha > 0$ stetig und stetig differenzierbar.

Da der Effekt der Peakverbreiterung vom Verhältnis der Peakbreite zur Fensterfunktion abhängt, wurde Methylparaben als schmalster chromatographischer Peak des Modellsystems für die folgenden Versuche ausgewählt. Zwei Methylparabenlösungen mit 30 g L^{-1} und $0,78 \text{ g L}^{-1}$ wurden mit der LAC-NMR Kopplung gemessen. Der Datensatz der 30 g L^{-1} wurde entlang der chromatographischen Achse mit der Rechteckfunktion, der Gaußfunktion und der Tukey-Funktion (mit $\alpha = 0,25, 0,50$ und $0,75$) gefaltet. Da mit der Tukey-Funktion ($\alpha = 0,75$) maximales SNR der aromatischen Signale erhalten wurde, wurde nur die Tukey-Funktion mit $\alpha = 0,75$ auf den Datensatz der $0,78 \text{ g L}^{-1}$ Messung angewandt. Um eine Verschiebung der Elutionszeiten des Methylparabenpeaks zu vermeiden, wurden ausschließlich Fenstergrößen mit einer ungeraden Anzahl an Datenpunkten (Spektren) verwendet. Die kleinste Fenstergröße bestand aus drei Datenpunkten. Die Wiederholzeit der verwendeten NMR Aufnahmemethode 5 betrug $t_r = 1,4 \text{ s}$ (siehe Tabelle 6.4, S. 74). Somit entsprach die minimalen Fenstergröße $3 \cdot 1,4 = 4,2 \text{ s}$. Diese

wurde immer um 4 Datenpunkte (entspricht 5,6 s Elutionszeitschritte) vergrößert. Nach jeder Filterung wurde vom gemittelten Elutionsprofil der aromatischen Signale das $FWHM$ ($FWHM_{HPLC}$) sowie vom NMR Spektrum am Peakmaximum das spektrale SNR bestimmt. Zur Bestimmung der SNR Steigerung wurde dieses auf das SNR ohne chromatographische Filterung (SNR_{raw}) normiert. Das normierte SNR gegen das $FWHM_{HPLC}$ ist in Abbildung 6.16 aufgetragen.

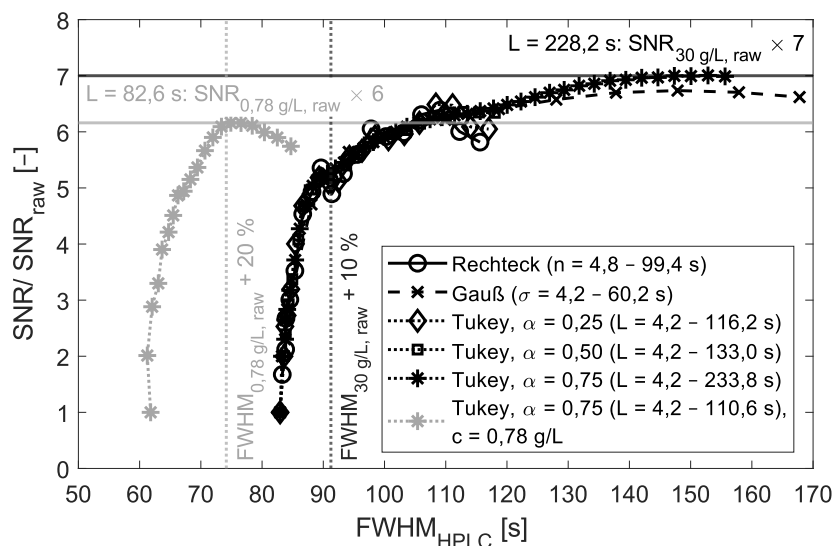


Abbildung 6.16: Auswertung der Effektivität der chromatographischen Fensterfunktionen, die in Abbildung 6.15 abgebildet sind. Diese wurden mit unterschiedlichen Fensterbreiten auf die Datensätze der LAC-NMR Messungen einer 30 g L^{-1} (schwarz) und einer $0,78 \text{ g L}^{-1}$ (grau) Methylparablenlösung angewandt. Vom gemittelten Elutionsprofil der aromatischen Signale wurde das $FWHM$ ($FWHM_{HPLC}$) und vom NMR Spektrum am chromatographischen Peakmaximum das spektrale SNR bestimmt. Das SNR wurde auf das SNR ohne Filterung (SNR_{raw}) normiert. Bei der 30 g L^{-1} Messung zeigen die Fensterfunktionen bei kleinen Fenstergrößen einen ähnlichen SNR Anstieg und $FWHM$ Verbreiterung (siehe schwarze gestrichelte Linie bei $FWHM_{30 \text{ g/L, raw}} + 10\%$), wobei das maximale SNR für die Tukey-Funktion mit $\alpha = 0,75$ und $L = 228,2 \text{ s}$ erhalten wurde. Um die optimale Fensterbreite dieser Funktion für den schmalsten Peak des Modellsystems zu bestimmen, wurde zusätzlich die $0,78 \text{ g L}^{-1}$ Messung ausgewertet. Das maximale SNR wurde für $L = 82,6 \text{ s}$ erhalten mit einer $FWHM$ Zunahme des chromatographischen Elutionsprofils um 20% (siehe graue gestrichelte Linie). Modifiziert nach Matz et al. 2024.[133]

Die Konzentration von $0,78 \text{ g L}^{-1}$ wurde gewählt, da das SNR_{raw} mit 11 noch über der Bestimmungsgrenze (LOQ , $SNR = 10$) lag und somit eine zuverlässige Auswertung des Datensatzes möglich war. Bei LAC Messungen mit DRI Detektion wurde beobachtet, dass die Retentionszeit und die $FWHM$ von Methylparaben bei Konzentrationen unter $3,1 \text{ g L}^{-1}$ verglichen mit der Konzentration bei $0,012 \text{ g L}^{-1}$ um weniger als 10% variierten. Diese Auswertung ist in Anhang B.4, S. 177, dargestellt. Dies zeigt, dass bei einer Konzentration von $0,78 \text{ g L}^{-1}$ nur wenig bis keine Konzentrationsüberladung auftrat und somit die schmalst-mögliche chromatographische Peakform erhalten wurde.

Alle Fensterfunktionen zeigen ein ähnliches Verhalten, mit einem starken SNR Anstieg bis zu einem Faktor von etwa 5 bei gleichzeitig nur geringer Zunahme des $FWHM$ um den Faktor 1,1 (siehe schwarze gestrichelte vertikale Linie). Für den 30 g L^{-1} Datensatz wurde das höchste SNR mit dem Tukey-Filter ($\alpha = 0,75$ und $L = 228,2 \text{ s}$) erreicht, wobei das SNR um den Faktor 7 und das $FWHM$ um den Faktor 1,8 zunahm. Beim Datensatz der $0,78 \text{ g L}^{-1}$ Messung und dem Tukey-Filter ($\alpha = 0,75$) wurde für $L = 82,6 \text{ s}$ das maximale SNR erhalten. Mit diesen Parametern war SNR um einen Faktor 6 und das $FWHM$ um einen Faktor 1,2 erhöht (siehe graue gestrichelte Linie). Die SNR Zunahme war bei der 30 g L^{-1} Messung höher, da das Elutionsprofil breiter war ($FWHM_{30 \text{ g/L, raw}} \approx 80 \text{ s}$ gegenüber $FWHM_{0,78 \text{ g/L, raw}} \approx 60 \text{ s}$). Je breiter das Elutionsprofil, desto höher ist die maximal mögliche SNR Verbesserung, da die Peakverbreiterung vom Verhältnis zwischen Fenstergröße und $FWHM$ abhängt, die Rauschreduzierung jedoch nur

von der Fenstergröße.

Mit dem Tukey-Filter ($\alpha = 0,75$ und $L = 82,6$ s) wurde für den schmalsten chromatographischen Peak des Modellsystems eine *FWHM* Zunahme um den Faktor 1,2 erhalten (siehe graue gestrichelte Linie). Dementsprechend sollte die Peakverbreiterung für die anderen Parabene (da diese breitere Elutionsprofile aufweisen) für alle Konzentrationen geringer sein. Daher wurde nachfolgend die Tukey-Fensterfunktion mit $\alpha = 0,75$ und $L = 82,6$ s verwendet.

6.3.5. Bestimmung der Sensitivitätsgrenzen der LAC-NMR Kopplung für Parabene

Zur Beurteilung der Sensitivität einer Methode wird die Nachweisgrenze (*LOD*, $SNR = 3$) und die Bestimmungsgrenze (*LOQ*, $SNR = 10$) herangezogen. Diese Kenngrößen können sich dabei auf die Menge an injiziertem Analyt oder auf die injizierte Konzentration beziehen.[29] Die Optimierung der LAC-NMR Kopplung hatte als Ziel, die Sensitivität pro injizierter Konzentrationseinheit zu verbessern, weshalb diese im Folgenden bestimmt wurde. Eine Konzentrationsreihe einer Mischung bestehend aus Methyl- und Pentylparaben wurden analysiert, jeweils mit den Konzentrationen von $c = 0,012, 0,049, 0,20, 0,78, 3,10, 12,5$ und $50,0$ g L⁻¹. Die höchste Konzentration wurde auf $50,0$ g L⁻¹ begrenzt, um die Löslichkeit sicherzustellen (siehe Abschnitt 6.1.2, S. 59). Die Prozessierung der LAC-NMR Daten wurde entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 5.8.2, S. 54, durchgeführt, wobei zur chromatographischen Filterung die Tukey-Fensterfunktion mit $\alpha = 0,75$ und $L = 82,6$ s genutzt wurde. In Abschnitt 6.3.4, S. 85, wurde gezeigt, dass mit diesen Parametern für Methylparaben im linearen Konzentrationsbereich das maximale *SNR* erhalten wird. Neben der chromatographischen Filterung wurde Signalmittelung angewandt. Dabei wurden die Spektren über 50 % der Peakhöhe gemittelt. Für weitere Informationen zur Auswirkung der Signalmittelung auf das *SNR* wird auf Abschnitt 6.3.3, S. 81, verwiesen. Die Elutionsbereiche für die Signalmittelung wurden abhängig von der injizierten Konzentration auf zwei Arten bestimmt. Für Konzentrationen $c > 3,1$ g L⁻¹ bei denen das Pentylparabenspektrum am Peakmaximum ein $SNR > 100$ besaß, wurden die Elutionszeiten direkt am Elutionsprofil der aromatischen Signale abgelesen. Für Konzentrationen $c \leq 3,1$ g L⁻¹ wurde das DRI Chromatogramm verwendet, wobei die Elutionszeitverzögerung und die Peakbreitendifferenz zwischen NMR und DRI zuvor bestimmt wurden. Die Bestimmung des *SNR* erfolgte vor der Signalmittelung vom Spektrum am Peakmaximum sowie nach der Signalmittelung vom gemittelten Spektrum. In Abbildung 6.17 ist das *SNR* für das gemittelte aromatische Signal (entspricht einem einzelnen Proton) und des Methoxysignals (entspricht drei Protonen) der Spektren am Peakmaximum (nicht gemittelt, grau) und der gemittelten Spektren (schwarz) dargestellt.

Für eine Abschätzung der *LOD* und *LOQ* Werte wurden in Abbildung 6.17 die *SNR* mit angewandter Signalmittelung im linearen Konzentrationsbereich mit Gleichung 6.3.14 angepasst,

$$SNR = a \cdot c^b, \quad (6.3.14)$$

mit dem Skalierungsfaktor a , der injizierten Analytkonzentration c in g L⁻¹ und dem Exponent b , der für einen idealen linearen Zusammenhang $b = 1$ annimmt. Der lineare Konzentrationsbereich wurde basierend auf den *FWHM* der Elutionsprofilen nach der chromatographischen Filterung definiert. Als Grenzwert wurde ein Anstieg des *FWHM* um 10 % gegenüber der niedrigsten analysierten Konzentration von $0,012$ g L⁻¹ gewählt. Die Auswertung ist in Anhang B.4, S. 177, aufgeführt. Für Methylparaben lagen die Konzentrationen bis zu $3,1$ g L⁻¹ und für Pentylparaben bis zu $0,78$ g L⁻¹ im linearen Konzentrationsbereich. Bei höheren Konzentrationen war der *SNR* Anstieg pro injizierter Konzentrationseinheit nicht mehr linear, da die Peakverbreiterung aufgrund der Konzentrationsüberladungsphänomene und der chromatographischen Filterung variierte. Die Anpassungsparameter und die daraus bestimmten *LOD* und *LOQ* Werte sind in Tabelle 6.8 zusammengefasst. Für Methylparaben waren $a = 341,5$ und $b = 1,028$ und für Pentylparaben $a = 66,1$ und $b = 0,951$. Beide Anpassungsfunktionen beschreiben die

Daten mit $R^2 = 0,996$ sehr gut. Mit den Anpassungsgleichungen wurden die Nachweisgrenze (LOD , $SNR = 3$) und die Quantifizierungsgrenze (LOQ , $SNR = 10$) pro injizierter Konzentrationseinheit bestimmt. Für das Methoxysignal von Methylparaben betrug $LOD = 0,010 \text{ g L}^{-1}$ und $LOQ = 0,031 \text{ g L}^{-1}$ und für die aromatischen Signale von Pentylparaben $LOD = 0,038 \text{ g L}^{-1}$ und $LOQ = 0,134 \text{ g L}^{-1}$.

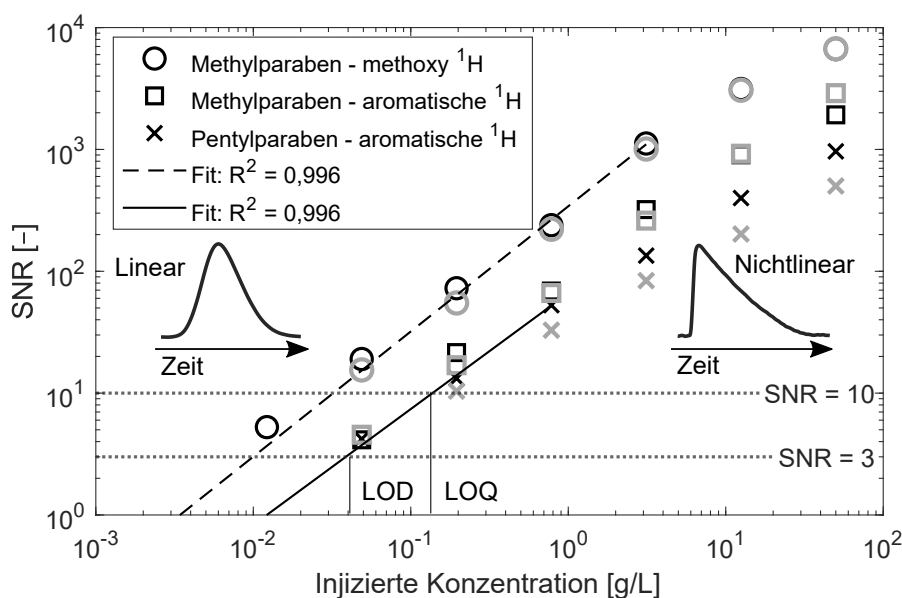


Abbildung 6.17: Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) bezogen auf die Injektionskonzentration für Methyl- und Pentylparaben bei einem Injektionsvolumen von $1000 \mu\text{L}$. Das SNR des NMR Spektrums am Peakmaximum ist in Grau (nicht gemittelt) und das SNR der gemittelten Spektren ist in Schwarz (Signalmitteilung über 50 % der chromatographischen Peakhöhe) eingezeichnet. Die Messungen im linearen Konzentrationsbereich wurden für die Anpassung mit Gleichung 6.3.14 verwendet. Die Anpassungsparameter sowie die LOD und LOQ Werte sind in Tabelle 6.8 zusammengefasst. Modifiziert nach Matz et al. 2024.[133]

Tabelle 6.8: Parameter der Anpassungsgleichung 6.3.14 aus Abbildung 6.17 und der daraus bestimmten LOD und LOQ Werte, bezogen auf die injizierte Konzentration unter Verwendung eines Injektionsvolumens von $1000 \mu\text{L}$. Modifiziert nach Matz et al. 2024.[133]

	a	b	$LOD [\text{g L}^{-1}]$	$LOQ[\text{g L}^{-1}]$
Methylparaben ($-\text{OCH}_3$)	341,5	1,028	0,010	0,031
Pentylparaben (aromatische ^1H)	66,1	0,951	0,038	0,134

Der Vergleich des SNR zwischen den gemittelten (schwarz) mit den nicht-gemittelten Spektren (grau) zeigt, dass die Signalmittlung auf Methylparaben keinen Einfluss hat. Dagegen unterscheiden sich bei Pentylparaben die SNR zwischen gemittelten und nicht-gemittelten Spektren ab einer Konzentration von $c = 0,78 \text{ g L}^{-1}$, wobei der Unterschied mit steigender injizierter Konzentration zunimmt. Für die Messung von $50,0 \text{ g L}^{-1}$ ist das SNR des gemittelten Spektrums um einen Faktor 2 höher als das SNR des nicht-gemittelten Spektrums vom Peakmaximum. Dies zeigt, dass die im Abschnitt 6.3.3, S. 81, und Abschnitt 6.3.4, S. 85, beschriebenen SNR Verbesserungen aufgrund der Signalmittlung und chromatographischer Filterung sich teilweise gegenseitig kompensieren.

Bei der Anwendung chromatographischer Filter werden Fensterfunktionen mit einer definierten Fenstergröße mit dem Chromatogramm gefaltet. Während der Faltung wird die Fensterfunktion in einzelnen

Schritten über die Datenpunkte des Chromatogramms geschoben. Bei jedem Schritt wird ein entsprechend der Fensterfunktion gewichteter Mittelwert der Datenpunkte innerhalb des Fensters berechnet. Aufgrund dieser bereits erfolgten Mittelung führt eine weitere Mittelung im Bereich der Fenstergröße, wie es bei der Signalmittelung entlang des chromatographischen Peaks der Fall ist, zu keiner zusätzlichen *SNR* Erhöhung. Für die $50,0 \text{ g L}^{-1}$ Messung ist die *FWHM* von Methylparaben mit *FWHM* = 106 s nur geringfügig größer als die Tukey-Fenstergröße von $L = 82,6 \text{ s}$, während für Pentylparaben die *FWHM* = 460 s um den Faktor 5 größer ist. Aufgrund des deutlich größeren Bereichs für die Signalmittelung wird eine zusätzliche *SNR* Verbesserung um den Faktor 2 erzielt. Für Pentylparaben beginnt eine Verbesserung des *SNR* durch die Signalmittelung ab einer Konzentration von etwa $0,78 \text{ g L}^{-1}$. Bei dieser Konzentration ist das *SNR* des gemittelten Spektrums um den Faktor 1,6 höher als das *SNR* des nicht-gemittelten Spektrums vom Peakmaximum. Die *FWHM* von Pentylparaben bei $0,78 \text{ g L}^{-1}$ beträgt 124,6 s und ist somit ein Faktor von $124,6 \text{ s}/82,6 \text{ s} = 1,5$ größer als die Tukey-Fenstergröße. Dies zeigt, dass die Signalmittelung entlang des chromatographischen Peaks trotz zuvor erfolgter chromatographischer Filterung eine effiziente Methode zur Erhöhung des *SNR* ist, wenn der Peak eine *FWHM* aufweist, die mindestens um den Faktor 1,5 breiter ist als die gewählte Fenstergröße der chromatographischen Filterfunktion. Zudem verdeutlichen diese Ergebnisse, dass es während der Datenaufnahme einer HPLC-NMR Messung ratsam ist, die Spektren mit einem Scan pro Spektrum aufzunehmen, da die Signalmittelung während der chromatographischen Filterung erfolgt und somit Rohdaten mit maximaler chromatographischer Auflösung vorliegen.

Brkljača et al. führten in der LAC-NMR (500 MHz) Kopplung auch *LOD* Studien mit Methylparaben durch.[1] Die *LOD* Werte hängen von der *SNR* Definition ab. Von den Autoren wird nicht eindeutig beschrieben wie das *SNR* definiert wurde. Es wird davon ausgegangen, dass das *SNR* mit der einfachen Standardabweichung berechnet wurde und somit ein Vergleich zulässig ist. Beschrieben werden LAC-NMR (500 MHz) Messungen unter *onflow* und isokratischen Bedingungen. Als mobile Phase wurde eine binäre Mischung aus protoniertem Acetonitril und deuteriertem Wasser (50/50 v/v%) verwendet. Weiter wurde eine Flussrate von $0,8 \text{ ml min}^{-1}$, ein Injektionsvolumen von $50 \mu\text{L}$, eine analytische C_{18} Säule ($150 \times 4,6 \text{ mm}$ Innendurchmesser) und eine NMR Flusszelle mit einem aktiven Volumen von $60 \mu\text{L}$ gewählt. Die NMR Spektren wurden mit 4 Scans und einer Wiederholungszeit pro Scan von 3,0 s aufgenommen, wobei der Rotationswinkel nicht angegeben ist. Eine Lösungsmittelunterdrückung wurde durch die WET Pulssequenz (siehe Abschnitt 4.4, S. 35) erreicht. Die Spektren wurden mit einer Linienverbreiterung von 0,5 Hz prozessiert, wobei die Apodisierungsfunktion nicht spezifiziert ist. Unter diesen Bedingungen wird eine Nachweisgrenze von $LOD = 2,3 \mu\text{g}$ für das aromatische ^1H von Methylparaben beschrieben, was einer injizierten Konzentration von $LOD_{500 \text{ MHz}} = 0,046 \text{ g L}^{-1}$ entspricht. In diesem Artikel wurden die LAC-NMR (80 MHz) Messungen mit einer binären Mischung aus protoniertem Aceton/Wasser (60/40 v/v%), einer Flussrate von 1 ml min^{-1} , einem Injektionsvolumen von $1000 \mu\text{L}$, einer semipräparativen C_{18} Säule ($250 \times 10 \text{ mm}$ Innendurchmesser) und mit einer NMR Flusszelle mit einem aktiven Volumen von $211 \mu\text{L}$ durchgeführt. Die NMR Detektion erfolgte mit einem Scan pro Spektrum, wobei ein Ernst Winkel von 62° mit einer Wiederholungszeit von 1,40 s verwendet wurde. Zur Lösungsmittelunterdrückung wurde die PRESAT Pulssequenz genutzt. Die Datenprozessierung erfolgte mit einer Linienverbreiterung von 2,3 Hz (Gauß), einer numerischen Lösungsmittelunterdrückung, einer HPLC Basislinienkorrektur sowie einer chromatographischen Filterung und manueller Signalmittelung. Unter diesen Bedingungen wurde ein *LOD* für das aromatische ^1H von Pentylparaben von $LOD_{80 \text{ MHz}} = 0,038 \text{ g L}^{-1}$ bestimmt. Dieser Wert liegt sogar etwas unter dem *LOD* der LAC-NMR (500 MHz) Kopplung, der für ein aromatisches ^1H von Methylparaben $LOD_{500 \text{ MHz}} = 0,046 \text{ g L}^{-1}$ betrug. Dieses Ergebnis unterstreicht das Potenzial der Methodenoptimierung, da unter den gleichen Bedingungen ein 500 MHz NMR Spektrometer als Detektor eine deutlich höhere Empfindlichkeit aufweisen sollte.

6.4. Applikationsbeispiele der LAC-NMR (80 MHz) Kopplung

6.4.1. Parabenanalyse unter relevanten Konzentrationen und Auflösung chromatographisch überlappender Peaks

Parabene werden als Konservierungsmittel in kosmetischen Produkten verwendet. In der Europäischen Union beträgt die maximale Konzentration aller Parabene im kosmetischen Endprodukt 0,8 w/w%, wobei die maximale Konzentration eines einzelnen Parabens 0,4 w/w% nicht übersteigen darf.[134] Zur Demonstration möglicher Anwendungsmöglichkeiten wurde eine Mischung aus Methyl- und Ethylparaben hergestellt und mit der LAC-NMR (80 MHz) Kopplung analysiert. In der Mischung war die Konzentration pro Paraben 1 g L^{-1} (0,1 w/w%), was einer Gesamtparabenenkonzentration von 2 g L^{-1} (0,2 w/w%) entsprach und damit um einen Faktor 4 unter der zulässigen Höchstkonzentration lag.[134] Die LAC-NMR Analyse wurde mit den in Abschnitt 6.2, S. 67, und Abschnitt 6.3, S. 76, optimierten Parametern durchgeführt und ist in Abbildung 6.18a ausgewertet. Zusätzlich ist in Abbildung 6.18b die Analyse einer Methyl- und Ethylparabenenmischung mit jeweils 50 g L^{-1} (entspricht einer Gesamtparabenenkonzentration von 100 g L^{-1}) dargestellt. Die spektral aufgelösten Chromatogramme sind als Konturdiagramm dargestellt. Die NMR Spektren der jeweiligen Peakmaxima sind über dem Konturdiagramm gezeigt. Rechts ist das gemittelte Elutionsprofil der aromatischen Signale sowie das analytspezifische Elutionsprofil des Methoxysignals ($-\text{OCH}_3$ bei 4,07 ppm) von Methylparaben und die des Methylsignals ($-\text{CH}_3$ bei 1,48 ppm) von Ethylparaben gezeigt. Für die Messung der Probe mit einer Gesamtparabenenkonzentration von 2 g L^{-1} (in Abbildung 6.18a) ist die Retentionszeit von Methylparaben 20,4 min und für Ethylparaben 24,2 min. Anhand charakteristischer NMR Signale können die Peaks Methylparaben (Singulett der $-\text{OCH}_3$ Gruppe bei 4,07 ppm) und Ethylparaben (Triplet der R-CH_3 Gruppe bei 1,48 ppm) zugeordnet werden. Das Wassersignal ist bei 4,79 ppm und das Acetonsignal ist bei 2,44 ppm sichtbar. Da die Form und Position der Lösungsmittelsignale während der Analytelution aufgrund der veränderten chemischen Umgebung variieren, erscheinen im Spektrum aufgrund der numerischen Lösungsmittelunterdrückung negative Subtraktionsartefakte.[103] Obwohl der rechte ^{13}C Satellit von Aceton teilweise mit dem Methylsignal von Ethylparaben überlagert, ist dieses dennoch deutlich als Triplet zu erkennen. Das $-\text{OCH}_2-$ Signal von Ethylparaben ist nicht sichtbar, da dieses aufgrund der Nähe zur Wasserresonanz durch PREAST unterdrückt wird. Für die aromatischen Signale beider Parabene ist $\text{SNR} \approx 90$ und erlaubt somit potentiell eine Quantifizierung. Für eine Quantifizierung der Parabene wäre für die jeweiligen Signale die Erstellung einer Konzentrations-Kalibrierung erforderlich, wie in Abschnitt 6.2.2, S. 70, erläutert.

Bei der LAC-NMR Messung mit einer Gesamtparabenenkonzentration von 100 g L^{-1} (in Abbildung 6.18b) sind die chromatographischen Peaks aufgrund der Konzentrationsüberladung zu kürzeren Elutionszeiten (18,4 bzw. 21,1 min) verschoben und verbreitert, wodurch sie überlappen. Das gemittelte SNR der aromatischen Signale von Methylparaben beträgt $\text{SNR} = 3100$ und das von Ethylparaben $\text{SNR} = 1500$. Unter Nutzung der spektralen Auflösung der NMR Detektion können die Parabene trotz der chromatographischen Überlappung aufgelöst werden. Hierfür werden die analytspezifischen Elutionsprofile der $-\text{OCH}_3$ Gruppe von Methylparaben bei 4,07 ppm und der $-\text{CH}_3$ Gruppe von Ethylparaben bei 1,48 ppm betrachtet, wie auf der rechten Seite der Abbildung 6.18b zu sehen ist.

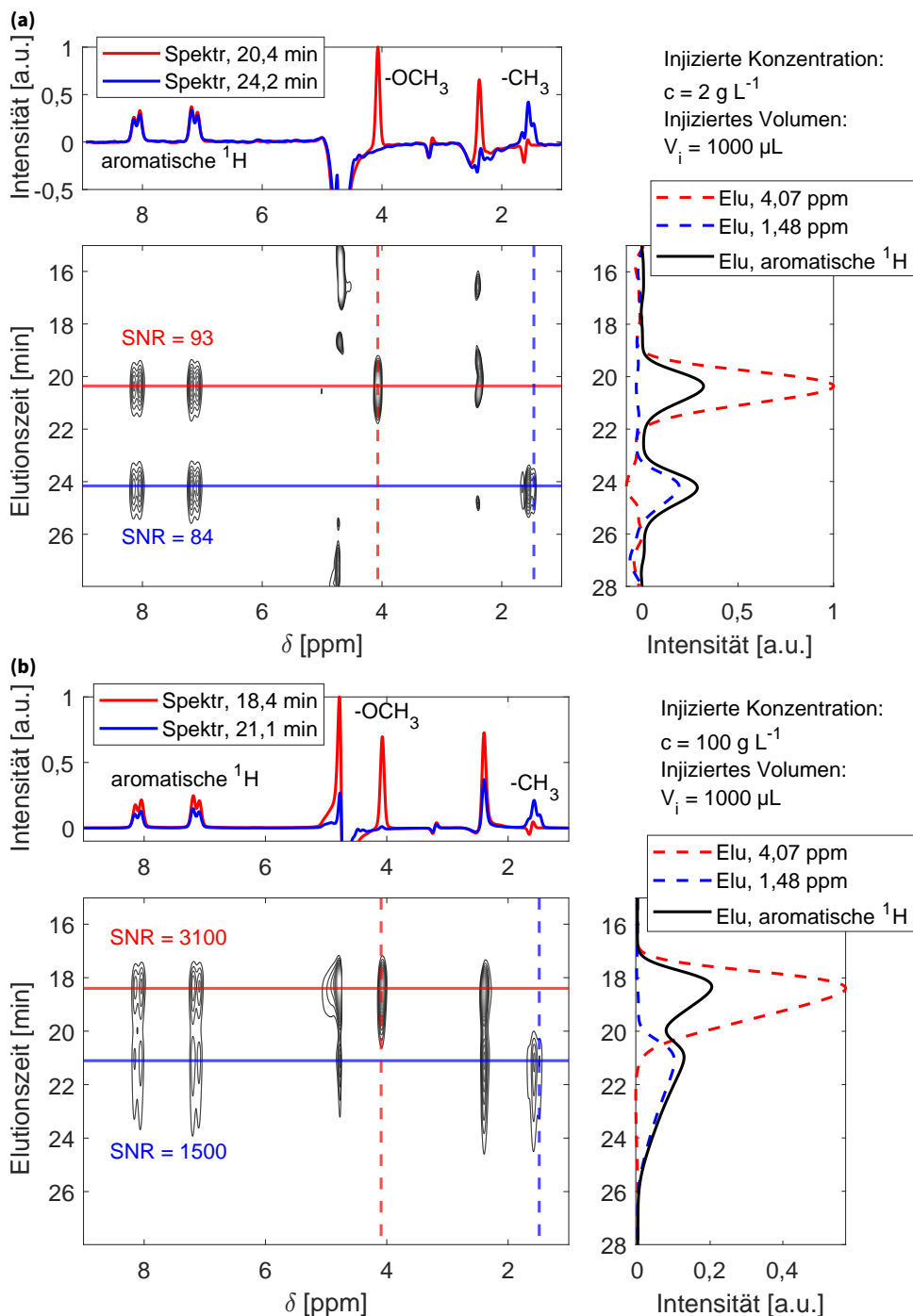


Abbildung 6.18: Spektral aufgelöstes Chromatogramm der LAC-NMR (80 MHz) Analyse einer Mischung aus Methyl- und Ethylparaben mit einer Parabenkonzentration von (a) $1 + 1 \text{ g L}^{-1}$ und (b) $50 + 50 \text{ g L}^{-1}$. Die Konturdiagramme sind auf das Maximum in der 2D-Ebene normiert und mit 20 Linien in Intensitätsabständen von 0,05, beginnend ab einer Intensität von 0,05, dargestellt. Über dem Konturdiagramm sind die ^1H NMR Spektren vom jeweiligen chromatographischen Peakmaximum gezeigt. Die aromatischen Signale wurden zur Berechnung der in den Konturdiagrammen gezeigten SNR genutzt. Rechts ist jeweils das gemittelte Elutionsprofil der aromatischen Signale (in Schwarz) sowie das Elutionsprofil von $-\text{OCH}_3$ bei 4,07 ppm (in Blau) und das von $-\text{CH}_3$ bei 1,48 ppm (in Rot) dargestellt. Die Mittelung der NMR Spektren wurde in (a) nicht angewandt, da die chromatographische $FWHM$ mit $FWHM \approx 90 \text{ s}$ etwa der Fenstergröße des Tukey-Filters von $L = 82,6 \text{ s}$ entsprach, sodass keine Sensitivitätssteigerung erhalten worden wäre. In (b) wurde aufgrund der chromatographischen Überlappung auf eine Mittelung der NMR Spektren verzichtet. Modifiziert nach Matz et al. 2024.[133]

6.4.2. Oligomeranalyse von Styrol bezüglich der Taktizität mittels LAC-NMR (80 MHz)

Im Jahr 1998 beschrieben Pasch et al. die Analyse der Taktizität von Styrololigomeren mit der *onflow* LAC-NMR (500 MHz) Kopplung.[122] Im Gegensatz zu den bisher verwendeten reinen Parabenstandards handelt es sich bei einer Polymerprobe immer um eine Mischung von Ketten mit unterschiedlicher Anzahl an Monomeren, deren Länge durch den Polymerisationsgrad n charakterisiert wird. Befinden sich im Polymerrückgrat chirale Zentren, unterscheiden sich Polymerketten zusätzlich in der Taktizität. Bei einem Polymer mit einer Kettenlänge aus n Monomeren können potentiell 2^{n-1} Stereoisomere vorkommen.[158, 159] Zur Polymeranalyse wird grundsätzlich die SEC genutzt (siehe Abschnitt 2.2.2, S. 10), da bei der LAC die Retentionszeit etwa linear mit n zunimmt.[31] Da Oligomere aber sehr kleine n aufweisen ist eine Auftrennung mit der LAC möglich.

Pasch et al. verwendeten die LAC zur Separation eines Polystyrol (PS)-Standards mit einem Molekulargewicht am SEC Peakmaximum M_p von $M_p = 530 \text{ g mol}^{-1}$ in die einzelnen PS-Oligomere. Dabei wurde protoniertes Acetonitril als mobile Phase und eine analytische C_{18} Säule ($250 \times 4 \text{ mm}$ Innendurchmesser) verwendet. Pasch et al. beschrieben die Auftrennung der PS-Probe in die einzelnen PS-Oligomeren bis zu einem Polymerisationsgrad von $n = 7$. Durch die *onflow* NMR (500 MHz) Detektion konnten anschließend Informationen über die Taktizität der Oligomere mit $n = 2$ bis 4 gewonnen werden. Eine ähnliche Analyse wurde in der vorliegenden Arbeit mit der *onflow* LAC-NMR (80 MHz) Kopplung vorgenommen. Ein PS-Standard mit $M_p = 682 \text{ g mol}^{-1}$ wurde auf einer semipräparativen C_{18} Säule ($250 \times 10 \text{ mm}$ Innendurchmesser) mit Acetonitril als mobile Phase aufgetrennt.

Zunächst wurde die Löslichkeitsgrenze des PS-682 g mol^{-1} Standards in Acetonitril bestimmt, die bei etwa $c = 60 \text{ g L}^{-1}$ lag. Zum Lösen wurde die Probe eine Stunde lang auf 35°C erhitzt. In Abbildung 6.19 ist ein NMR Spektrum des PS-682 g mol^{-1} Standards mit $c = 60 \text{ g L}^{-1}$ in Acetonitril zu sehen, wobei das Acetonitrilsignal bei 2,05 ppm durch die PRESAT Pulssequenz unterdrückt wurde.

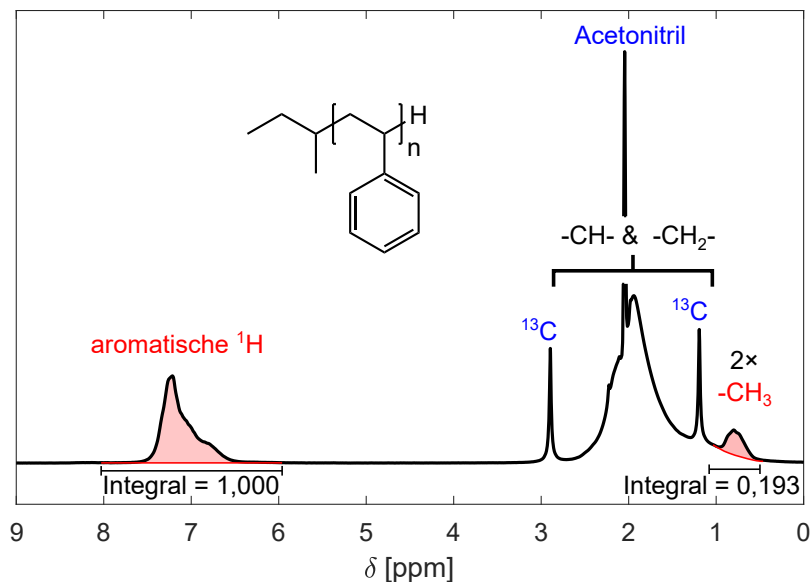


Abbildung 6.19: NMR Spektrum eines Polystyrol (PS)-Standards mit $M_p = 682 \text{ g mol}^{-1}$, mit $c = 60 \text{ g L}^{-1}$ in protoniertem Acetonitril, aufgenommen unter statischen Bedingungen mit 4 Scans mit einer Wiederholzeit von $t_r = 20,0 \text{ s}$ und einer FID-Aufnahmezeit von $t_{aq} = 6,6 \text{ s}$ und einer Verweilzeit $t_{dw} = 200 \mu\text{s}$. Bei der Datenprozessierung wurde eine 1 Hz exponentielle Apodisierung angewandt. Das Signal von Acetonitril bei 2,05 ppm wurde durch die PRESAT Pulssequenz unterdrückt. Die Struktur eines anionisch polymerisierten PS mit sekundärem Butyllithium als Initiator ist gezeigt. Die Zuordnung der Signale basierte auf Pasch et al.[122] Der mittlere Polymerisationsgrad \bar{n} kann aus den rot markierten Integralen der zwei $-\text{CH}_3$ Gruppen der Isobutylgruppe und den aromatischen ^1H berechnet werden und ist $\bar{n} = (1,000/5)/(0,193/6) \approx 6$.

Tabelle 6.9: T_1 Relaxationszeiten der aromatischen und Methylsignale einer 60 g L^{-1} Polystyrollösung (682 g mol^{-1}) Lösung in Acetonitril, bestimmt mit der *inversion recovery* Pulssequenz.

Chemische Gruppe	T_1 [s]
aromatische ^1H	1,4
$-\text{CH}_3$	1,0

Pasch et al. wählten einen anionisch polymerisierten PS-Standard, der mit sekundärem Butyllithium initiiert wurde.[122] Der mittels LAC-NMR (80 MHz) analysierte PS-Standard wurde vom selben Hersteller (Polymer Standards Service, Mainz, Deutschland) bezogen und im NMR Spektrum erscheinen ebenfalls Signale bei chemischen Verschiebungen, die von Pasch et al. den Methylsignalen ($-\text{CH}_3$) der Isobutylgruppe zugeordnet wurden. Der mittlere Polymerisationsgrad \bar{n} wurde zudem aus den in Abbildung 6.19 rot markierten Integralen berechnet und entsprach dem erwarteten mittleren Polymerisationsgrad von $\bar{n} = (1,000/5)/(0,193/6) \approx 6$. Daher wird angenommen, dass der verwendete PS-Standard ebenfalls durch anionische Polymerisation mit sekundärem Butyllithium hergestellt wurde. Die Zuordnung der NMR Signale zu den chemischen Gruppen in Abbildung 6.19 basierte auf der Beschreibung von Pasch et al.[122] Da das Acetonitrilsignal mit den Signalen der $-\text{CH}$ - und $-\text{CH}_2$ - Gruppen des PS und der Isobutylgruppe überlagerte, war nur eine Auswertung der aromatischen Signale des PS zwischen 6,5 und 8,0 ppm und der Methylsignale der Isobutylgruppe zwischen 0,5 und 1,0 ppm möglich.

Die aromatischen ^1H besitzen die größte spektrale Separation zum Lösungsmittelsignal, weshalb diese am wenigsten von diesem beeinträchtigt sind. Daher wurden die aromatischen ^1H zur Kalibrierung des 90° Pulses genutzt. Die Kalibrierung der Pulslänge unter statischen Bedingungen ist in Anhang B.5, S. 178, gezeigt. Die Pulsdauer für einen 90° Puls betrug $8 \mu\text{s}$. Mit der kalibrierten Pulslänge wurde die T_1 Zeit von den beiden Signalen mit der *inversion recovery* Pulssequenz unter statischen Bedingungen bestimmt. Dabei wurde die Wartezeit zwischen dem 90° und dem 180° Puls von 1 bis 5000 ms in linearen Schritten von 263 ms mit insgesamt 20 Schritten aufgenommen, wobei von jedem Schritt 4 Scans gemessen wurden. Die T_1 Zeiten sind in Tabelle 6.9 aufgelistet.

Der Fokus der LAC-NMR Methodenoptimierung lag auf der Steigerung der Sensitivität. In Abschnitt 6.2.2, S. 70, wurde gezeigt, dass durch ein Verkürzen der Wiederholzeit der Pulssequenz die Sensitivität verbessert werden kann. Als Folge wurde die Aufnahmezeit möglichst kurz gewählt, wodurch die spektrale Auflösung abnahm. Zum Verbessern der spektralen Auflösung wurde *zero filling* angewandt. Um das Auftreten von Sinc-Artefakten zu vermeiden, war eine relativ starke Apodisierung von 2,3 Hz (Gauß) notwendig, die die Selektivität des NMR Spektrums aufgrund der Linienverbreiterung reduzierte. Bei der hier durchgeführten Analyse der Taktizität ist dies hinderlich, da für die Auswertung der Feinstruktur der NMR Signale sowohl eine hohe spektrale Auflösung, als auch eine hohe Selektivität im NMR Spektrum erforderlich ist. Folglich wurde die Aufnahmezeit von 0,26 s auf 2,0 s erhöht, womit die spektrale Auflösung ohne *zero filling* 0,5 Hz entsprach. Damit war die spektrale Auflösung hoch genug, um J-Kopplungskonstanten von über 1 Hz aufzulösen. Durch das *zero filling* wurde eine Stufe im FID erzeugt, die durch die Apodisierung entfernt werden musste. Da eine Reduzierung der spektralen Selektivität durch die Apodisierung nicht erwünscht war wurde auf die Anwendung von *zero filling* und Apodisierung verzichtet. Für die LAC-NMR (80 MHz) Analyse wurden $1000 \mu\text{L}$ der 60 g L^{-1} Polystyrollösung injiziert. Die NMR Datenaufnahme erfolgte mit einem $\beta = 90^\circ$ Anregungspuls und einem Scan pro Spektrum. Eine Lösungsmittelunterdrückung wurde mit der PRESAT Methode erreicht, wobei die Saturierungsfrequenz auf das Maximum des Acetonitrilsignals bei 2,05 ppm gesetzt wurde. Mit dem $t_{\text{sat}} = 1,0 \text{ s}$ langen Saturierungspuls, der $t_{\text{aq}} = 2,0 \text{ s}$ langen Aufnahmezeit sowie der erforderlichen Wartezeit von etwa $t_{\text{rd}} = 0,1 \text{ s}$ für die Datenverarbeitung und -speicherung ergab sich somit eine Wiederholzeit der Pulssequenz von 3,2 s. Die Wiederholzeit entsprach etwa dem dreifachen der gemessenen T_1 Zeiten aus Tabelle 6.9. Der Datensatz der LAC-NMR Messung wurde wie in Abschnitt 5.8.2, S. 54,

beschrieben verarbeitet.

In Vorversuchen wurde festgestellt, dass bei einer Säulentemperatur von $26,5^{\circ}\text{C}$ und einer Flussrate von 1 mL min^{-1} für die Separation der PS-Oligomere bis $n = 7$ etwa 240 min erforderlich war. Um die Messzeit zu verringern und die PS-Peaks zu fokussieren, wurde die Säulentemperatur um 10°C auf $36,5^{\circ}\text{C}$ erhöht. Bei dieser Säulentemperatur und bei einer Flussrate von 1 mL min^{-1} wurde eine Auftrennung der PS-Oligomere bis $n = 7$ innerhalb 140 min erreicht. Pasch et al. nutzten einen Gradienten der Flussrate, um die Messzeit zu reduzieren. Darauf wurde verzichtet, da dies bei dem 80 MHz Spektrometer das thermische Gleichgewicht des NMR Magneten gestört hätte und somit die Stabilität des Locks negativ beeinflusst hätte. Siehe hierzu die Diskussion im Abschnitt 5.4.1, S. 47. In Abbildung 6.20 ist das DRI Chromatogramm sowie die spektral aufgelösten Chromatogramme der aromatischen und Methylsignale der PS-682 g mol^{-1} Messung zu sehen.

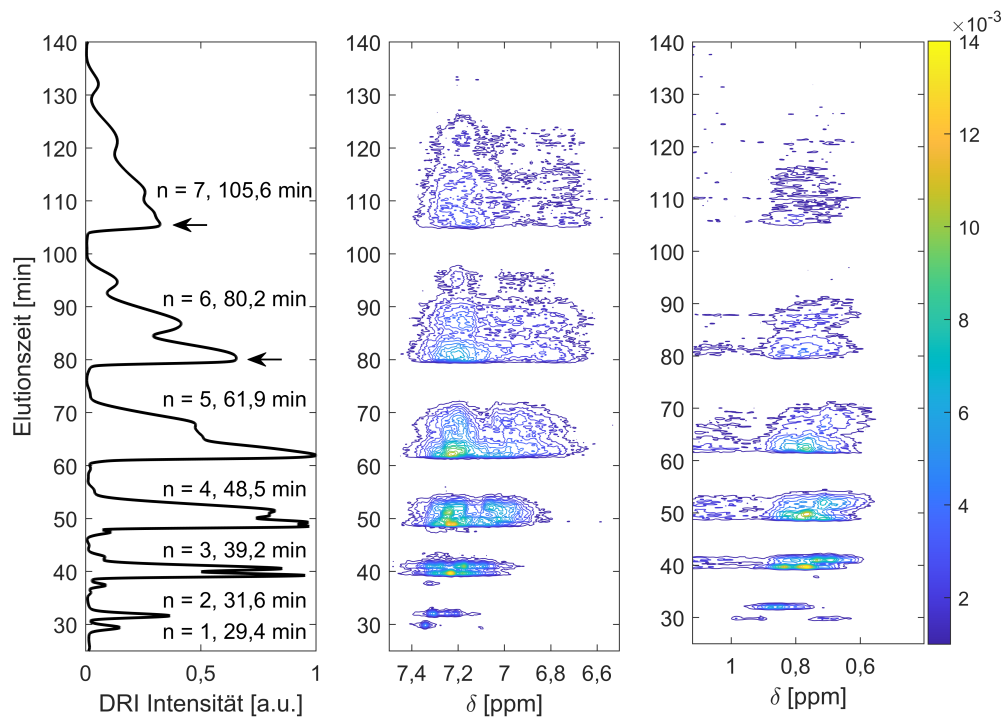


Abbildung 6.20: Auswertung der LAC-NMR (80 MHz) eines PS-Standards mit $M_p = 682\text{ g mol}^{-1}$. Hierfür wurden $1000\text{ }\mu\text{L}$ einer 60 g L^{-1} PS-Lösung injiziert. Die NMR Datenaufnahme erfolgte mit einem $\beta = 90^{\circ}$ Puls, einer Datenaufnahmezeit von 2,0 s, einer Wiederholzeit pro Scan von 3,2 s und einem Scan pro Spektrum. Lösungsmittelunterdrückung wurde durch die PRESAT Methode und numerisch während der Datenprozessierung erreicht. Gezeigt ist das DRI Chromatogramm und die spektral aufgelösten Chromatogramme im Bereich der aromatischen Signale zwischen 6,5 und 7,5 ppm und der Methylsignale zwischen 0,5 und 1,1 ppm. Die Konturdiagramme wurden auf die maximale Intensität des kompletten 2D Datensatzes normiert und wurden mit 50 Konturlinien in Intensitätsschritten von 0,001 a.u., beginnend ab einer Intensität von 0,001 a.u., erstellt. Die Oligomerauftrennung bis $n = 7$ ist gezeigt. Für die Oligomere mit $n > 2$ wurde aufgrund der steigenden Anzahl an Stereoisomeren mehrere chromatographische Peaks pro Oligomer erhalten. Die Elution von Oligomeren mit $n > 7$ wurde ebenfalls beobachtet. Diese sind nicht dargestellt, da sie weder chromatographisch aufgetrennt noch mit dem NMR Spektrometer detektiert werden konnten. Die Retentionszeit des jeweilig ersten Peakmaximums ist angegeben. Eine genauere Betrachtung NMR Spektren der Oligomere mit $n = 1$ bis 4 ist in Abbildung 6.21 gezeigt.

Der Vergleich der Chromatogramme mit der Arbeit von Pasch et al. erlaubt eine Zuordnung der Peaks zu PS-Oligomeren $n = 2 - 7$. Zusätzlich wurde in der hier durchgeführten Messung ein weiterer Peak bei 29,4 min detektiert, der dem Polymerisationsgrad $n = 1$ zugeordnet wurde. Im DRI Chromatogramm wurde die Elution von PS-Oligomere mit $n > 7$ beobachtet. Diese konnten aber weder chromogra-

phisch aufgelöst noch spektroskopisch detektiert werden. In Abbildung 6.21 sind für die PS-Oligomere mit $n = 1 - 4$ die NMR Spektren an den chromatographischen Peakmaxima dargestellt.

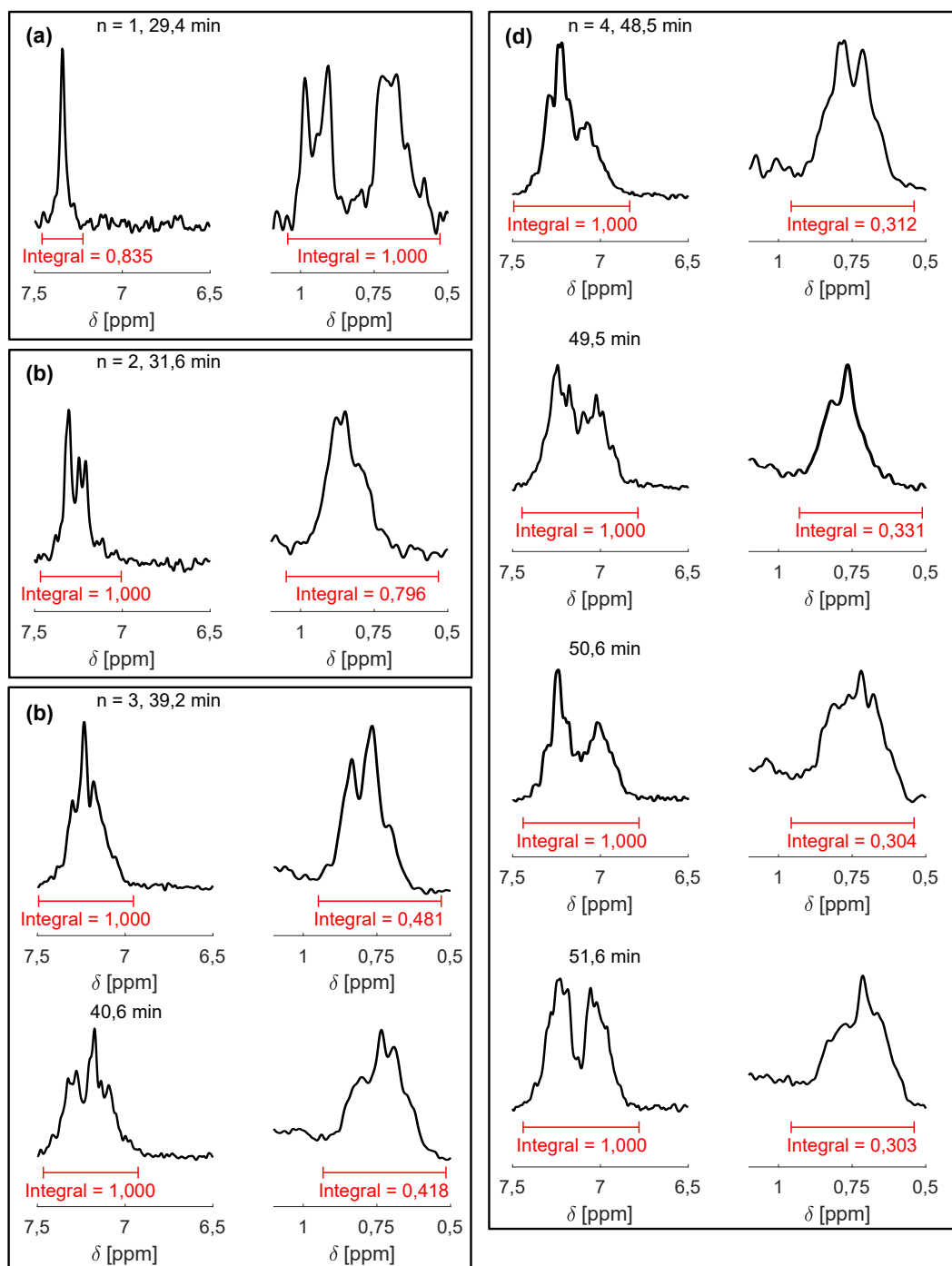


Abbildung 6.21: NMR Spektren der PS-Oligomere mit einem Polymerisationsgrad von $n = 1 - 4$, entnommen bei den in Abbildung 6.20 dargestellten chromatographischen Peakmaxima. Für jedes gezeigte Elutionsvolumen wurden jeweils von den aromatischen Signalen (6,5 – 7,5 ppm, entspricht fünf Protonen) und den Methylsignalen (0,5 – 1,0 ppm, entspricht sechs Protonen) die relativen Integrale bestimmt, die in Tabelle 6.10 ausgewertet sind. Mit Zunahme von n nimmt die Breite des aromatischen Signals zu.

Für die jeweiligen Oligomere sind die relativen Integrale angegeben, die zur Berechnung der Integralverhältnisse I_{VH} in Tabelle 6.10 mit Gleichung 6.4.1 verwendet wurden,

$$I_{VH} = \frac{Integral_{methyl}}{Integral_{aromatisch}} \cdot n, \quad (6.4.1)$$

mit dem relativen Integral des aromatischen Signals (6,5 – 7,5 ppm) $Integral_{aromatisch}$ und dem relativen Integral des Methylsignals ($2 \times -CH_3$, 0,5 – 1,0 ppm) $Integral_{methyl}$ sowie dem Polymerisationsgrad n . Das relative Integral des aromatischen Signals entspricht fünf Protonen und das des Methylsignals sechs Protonen.[122] Das Integralverhältnis sollte daher idealerweise dem Protonenverhältnis von $I_{VH, ideal} = 6/5 = 1,2$ entsprechen. Die berechneten Integralverhältnisse I_{VH} in Tabelle 6.10 liegen im Bereich zwischen 1,2 und 1,59 und sind damit tendenziell größer als $I_{VH, ideal}$. Dies war erwartet, da die T_1 Zeit der Methylprotonen kürzer ist als die der aromatischen Protonen, wie in Tabelle 6.9 ersichtlich ist. Da eine Wiederholzeit $t_r < 5 \cdot T_{1, aromatische \ ^1H}$ für eine höhere Sensitivität gewählt wurde, wurde für die Methylprotonen aufgrund der schnelleren Relaxation eine höhere Gleichgewichtsmagnetisierung M_z erhalten. Die experimentellen Werte stimmten also gut mit den Erwartungen überein.

Tabelle 6.10: Integralverhältnisse I_{VH} der relativen Integrale der aromatischen Signale und der Methylsignale der in Abbildung 6.21 dargestellten Oligomerspektren mit dem Polymerisationsgrad n . Die Integralverhältnisse wurden mit der Gleichung 6.4.1 berechnet und sollten unter quantitativen Bedingungen dem Protonenverhältnis von $I_{VH, ideal} = 6/5 = 1,2$ entsprechen. Tendenzial sind die I_{VH} größer, was darauf zurückzuführen ist, dass das Integral der Methylprotonen aufgrund der kürzeren T_1 Zeit (vgl. Tabelle 6.9) überbestimmt wurde.

Elutionszeit [min]	n	I_{VH}
29,4	1	1,20
31,6	2	1,59
39,2	3	1,44
40,6	3	1,25
48,5	4	1,25
49,5	4	1,32
50,6	4	1,22
51,6	4	1,21

Die Methylsignale des Spektrums mit $n = 1$ bei einer Elutionszeit von 29,4 min in Abbildung 6.21a entsprechen einem Dublett und einem Triplet, allerdings ist die Feinstruktur aufgrund der geringen Feldstärke nicht auflösbar. Die Feinstruktur wird mit steigenden n zunehmend komplexer, wie bei den PS-Oligomeren mit $n = 2 - 4$ in Abbildung 6.21b – d zu sehen ist.

Für das PS-Oligomer mit $n = 2$ bei einer Elutionszeit von 31,6 min wurde ein einzelner Peak erhalten wobei theoretisch zwei Stereoisomere vorliegen sollten. Das NMR Spektrum in Abbildung 6.21b zeigt bei den aromatischen Signalen zwei zusätzliche Signale bei etwa 7,2 ppm. Dies zeigt, dass zwei Stereoisomere vorhanden sind, die chromatographische Selektivität aber nicht ausreicht um diese aufzutrennen. Dies stimmt mit der Beobachtung von Pasch et al. überein.

Für $n > 2$ wird eine Aufspaltung der chromatographischen Peaks beobachtet, wobei die chromatographische Peakaufspaltung mit steigendem n zunimmt. Für das PS-Oligomer mit $n = 3$ liegen theoretisch vier Stereoisomere vor. Da allerdings nur eine Auftrennung in zwei chromatographische Peaks mit nahezu gleicher Intensität bei etwa 39,2 und 40,6 min (Abbildung 6.20) erhalten wurden, ist davon auszugehen, dass je Peak zwei Stereoisomere enthalten waren. In Abbildung 6.21c sind jeweils die NMR Spektren vom Peakmaximum gezeigt. Die Spektren unterscheiden sich in der Peakform der aromatischen Signale und der Methylsignale. Eine weitergehende Analyse der Stereoisomerenzusammensetzung ist hier

jedoch nicht mehr möglich. Für das PS-Oligomer mit $n = 4$ in Abbildung 6.21d ist eine Analyse der Stereoisomerenzusammensetzung noch komplexer, da neben der Zunahme an möglichen Stereoisomeren auch die chromatographische Auftrennung abnahm. Wie in Abbildung 6.20 zu sehen ist, genügt die chromatographische Trennleistung gerade noch um die Peakmaxima aufzutrennen, wobei große Teile der Peaks überlagern. Aufgrund der unvollständigen chromatographischen Auftrennung entsprechen die in Abbildung 6.21d gezeigten NMR Spektren Mischungen mehrerer Stereoisomere. Qualitativ kann jedoch festgestellt werden, dass die Breite der aromatischen Signale aufgrund der zunehmenden Anzahl an Stereoisomeren zunimmt (heterogene Linienverbreiterung). Während für $n = 1$ ein einziges schmales Signal bei 7,4 ppm erhalten wird, sind die aromatischen Signale der Stereoisomere für das PS-Oligomer mit $n = 7$ in einem Bereich zwischen 7,5 und 6,6 ppm verteilt.

In diesem Abschnitt wurde gezeigt, dass mittels LAC-NMR qualitative Einblicke in die Stereochemie von PS-Oligomeren gewonnen werden können, wobei eine detaillierte Analyse aufgrund der geringen spektralen Auflösung nur eingeschränkt möglich war. Die Sensitivität der LAC-80 MHz Kopplung reichte aus, um die PS-Oligomere bis zu $n = 7$ zu detektieren. Wären die zu untersuchenden NMR Signale spektral besser aufgelöst worden, wäre eine quantitative Analyse möglich gewesen. Daher könnte ein mögliches Anwendungsgebiet der LAC-NMR Kopplung die Bestimmung der Monomerverteilung in oligomeren Copolymeren sein. In der SEC-NMR (62 MHz) Kopplung wurde bereits von Botha et al. gezeigt, dass die spektrale Auflösung und Sensitivität der gekoppelten Methodik ausreicht, um die Monomerzusammensetzung eines PS/PMMA Copolymers abhängig vom Molekulargewicht der Polymerketten zu bestimmen.[103]

6.5. Zusammenfassung zur LAC-NMR (80 MHz) Kopplung

In diesem Kapitel wurde die erfolgreiche Kopplung der HPLC im LAC-Modus mit einem 80 MHz Spektrometer (¹ optimiert, ohne Feldgradienten) beschrieben. Zur Steigerung der Sensitivität wurden folgende Methoden diskutiert: (1) Lösungsmittelunterdrückung durch Präsaturation, (2) Ernst Winkel, (3) Gd³⁺ für *paramagnetic relaxation enhancement* (PRE), (4) Steigerung des Injektionsvolumens, (5) Veränderung der NMR Flusszellegeometrie und (6) Datenprozessierungsmethoden, die aufgrund der 2D Datenstruktur möglich sind, wie (6.1) die Anwendung chromatographischer Filter und (6.2) Signalmittelung entlang der chromatographischen Elutionsachse. Dabei wurde gezeigt, (1) dass der Einsatz einer Lösungsmittelunterdrückung erforderlich ist, um im NMR Spektrum eine stabilere Basislinie und eine genauere Digitalisierung der Analytsignale zu erhalten. Die Ursache für un stabile Basislinien ist das Totzeitproblem, wodurch Sinc-artige Basislinienfluktuationen entstehen, deren Amplitude proportional zu der Intensität der Lösungsmittelsignale ist und zu einem höheren Rauschwert führen. In dieser Arbeit wurde eine Lösungsmittelunterdrückung um etwa einen Faktor 50 mithilfe der Präsaturation-Pulssequenz innerhalb von 1,0 s erreicht. Mit einer 0,26 s langen FID Datenaufnahmezeit konnte innerhalb 1,4 s ein Spektrum aufgenommen werden. Eine schnelle Datenerfassung ist vorteilhaft, da dadurch sowohl die Sensitivität der NMR Detektion als auch die chromatographische Auflösung gesteigert wird. (2) Mit einem Ernst Winkel von $\beta_{\text{opt}} = 62^\circ$ bei einer Wiederholzeit von 1,4 s wird für das verwendete Modellsystem eine gute Sensitivität erhalten. Der Ernst Winkel hängt von der T_1 Zeit des Analyten ab und muss für jedes Modellsystem individuell angepasst werden. Mit optimierter Empfängerverstärkung konnte das SNR , normiert auf die Quadratwurzel der Messzeit $t_m^{1/2}$, für die Kombination aus Präsaturation und Ernst Winkel, verglichen zu einem 90° Puls mit einer Wiederholzeit von $5,0 \cdot T_1$ (ohne Lösungsmittelunterdrückung), um einen Faktor 30 gesteigert werden. Diese Steigerung des $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ lag deutlich über der erwarteten Sensitivitätsverbesserung durch Anwendung des Ernst Winkels von einem Faktor 1,6. Die Ursache für diese Inkonsistenz liegt an den stark unterschiedlichen Rauschwerten aufgrund der unterschiedlich stark ausgeprägten Basislinienfluktuationen sowie einer anderen Empfängerverstärkung. (3) Es wurde gezeigt, dass die Zugabe von Gd³⁺ beim verwendeten Modellsystem die Sensitivität potentiell um den Faktor 1,4 steigert. Der Nachteil war, dass die Effizienz der Lösungsmittelunterdrückung aufgrund der gesteigerten Relaxation der Lösungsmittelsignale reduziert war und somit die Amplitude der Basislinienfluktuationen und das errechnete Rauschen zunahm. Aufgrund des deutlich höheren Arbeits- und Chemikalienaufwands bei nur einer Sensitivitätssteigerung um den Faktor 1,4 wird die Anwendung von PRE für die LAC-NMR Trennung nicht empfohlen. (4) Durch die Erhöhung des Injektionsvolumens von 20 auf 1000 μL wurde das SNR weiter um den Faktor 8 – 16 erhöht. Die SNR Steigerung hing dabei von der chromatographischen Peakverbreiterung aufgrund Konzentrationsüberladungsphänomenen ab. (5) In einem Vergleich zweier NMR Flusszellen mit unterschiedlich langen aktiven Regionen wurde gezeigt, dass für den verwendeten LAC-NMR Aufbau bei einer Flussrate von 1 mL min^{-1} ein aktives Volumen von 211 μL ausreicht, um eine maximale Präpolarisierung des Modellsystems zu erreichen. (6.1) Durch die Verwendung chromatographischer Filter konnte das spektrale SNR um einen Faktor von 6 verbessert werden. (6.2) Die Signalmittelung entlang der chromatographischen Elutionsachse ergab, dass das maximale SNR dann erhalten wird, wenn die NMR Spektren über 50 % der chromatographischen Peakhöhe gemittelt wurden. Ohne vorherige chromatographische Filterung konnte das SNR um den Faktor 6 – 16 gesteigert werden. Wenn jedoch der 2D Datensatz zuvor mit einem chromatographischen Filter bearbeitet wurde, verbesserte sich das SNR nur um den Faktor 1,6 bis 2, sofern die $FWHM$ des gemittelten Peaks dem 1,5- bis 5-fachen der Fenstergröße der Filterfunktion entsprach. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass LAC-NMR Messungen mit einem einzigen Scan pro Spektrum aufgenommen werden sollten, um eine möglichst hohe zeitliche Auflösung des Chromatogramms zu erhalten. Die Signalmittelung geschieht während der Datenprozessierung durch chromatographische Filterung oder durch manuelles Mitteln

der Spektren.

Die Gesamtverbesserung berechnet sich aus dem Produkt der einzelnen Verbesserungsfaktoren. Mit der Anwendung der optimierten Methoden konnte ein Gesamtverbesserungsfaktor, gemessen in $SNR \cdot t_r^{-1/2}$ von etwa 123 (= 1,6 (Ernst Winkel) \times 8 (Injektionsvolumen) \times 6 (chromatographische Filterung) \times 1,6 (manuelle Signalmittelung) erzielt werden.

Unter optimierten Bedingungen wurden die Nachweisgrenzen (LOD , $SNR = 3$) und die Bestimmungsgrenzen (LOQ , $SNR = 10$), bezogen auf die injizierte Konzentration, für Methyl- und Pentylparaben bestimmt. Für die Methoxyprotonen von Methylparaben betrug das $LOD = 0,010 \text{ g L}^{-1}$ und $LOQ = 0,031 \text{ g L}^{-1}$ und für die aromatischen Protonen von Pentylparaben $LOD = 0,038 \text{ g L}^{-1}$ und $LOQ = 0,134 \text{ g L}^{-1}$. Die Bestimmung der LOD und LOQ Werte erfolgte mit der LAC-NMR (80 MHz) Kopplung unter Verwendung protonierter Lösungsmittel. Die Sensitivität ist vergleichbar mit den publizierten Werten einer *onflow* LAC-NMR (500 MHz) Kopplung.[1] Brkljača et al. verwendeten eine binäre Mischung aus D_2O und protoniertem Acetonitril für die Sensitivitätsbestimmung von Methylparaben. Für die aromatischen Protonen berichteten die Autoren eine Nachweisgrenze von $LOD_{500 \text{ MHz}} = 0,046 \text{ g L}^{-1}$, das sogar leicht über dem in dieser Arbeit bestimmten LOD für die aromatischen Protonen von Pentylparaben mit $LOD_{80 \text{ MHz}} = 0,038 \text{ g L}^{-1}$ liegt.

Anhand von Anwendungsbeispielen wurde das Potenzial der gekoppelten Methodik demonstriert. Aufgrund der guten Sensitivität der LAC-NMR (80 MHz) Kopplung konnte eine binäre Parabenmischung mit Konzentrationen analysiert werden, die um den Faktor 4 unterhalb der erlaubten Höchstmenge in Kosmetika lagen. Eine Identifizierung der Analyten erfolgte mit den NMR Spektren vom Peakmaximum. Daneben wurde bei einer Messung mit chromatographisch überlappenden Peaks veranschaulicht, dass die spektrale Auflösung genutzt werden kann, um die Peaks aufzulösen. Zusätzlich wurde mit der LAC-NMR (80 MHz) Analyse eines Polystyrol-Standards ($M_p = 682 \text{ g mol}^{-1}$) aufgezeigt, dass die spektrale Selektivität und Sensitivität ausreicht, um qualitative Aussagen über die Taktizität von Oligomeren bis zu einem Polymerisationsgrad von $n = 7$ zu treffen.

In diesem Kapitel werden Faktoren diskutiert, die bei der Wahl der optimalen Parameter für eine LAC-NMR Messung und der nachfolgenden Datenprozessierung berücksichtigt werden sollten, um die Übertragbarkeit der vorgestellten Methoden auf verschiedene chromatographische und analytische Systeme zu erleichtern. Obwohl die optimalen Parameter von den jeweiligen chromatographischen Bedingungen und Analyteigenschaften abhängen, gibt Tabelle 6.11 eine Zusammenfassung von Parametern, die als Ausgangspunkt für die Messung einer unbekannte Probe dienen können.

Tabelle 6.11: Optimierte Aufnahme- und Prozessierungsparameter einer LAC-NMR Messung. Die aufgelisteten Parameter können als Ausgangspunkt für die Messung einer unbekannt Probe dienen.

Parameter	HPLC
NMR Flusszelle	FC-9 (211 μL aktives Volumen)
Säule	semipreparative Säule (250 \times 10 mm)
Mobile Phase	isokratisch
Flussrate	1 mL min ⁻¹
Injektionsvolumen	1000 μL
Probenkonzentration	Knapp unter Löslichkeitsgrenze
NMR Detektion	
Pulssequenz	20231220_Presat_collect
Pulslänge	6,2 μs
Amplitude	0 dB
Pulslänge Saturierungspuls	1,00 s
Amplitude Saturierungspuls	-65 dB
Pulslänge Spoilpuls	20 ms
Amplitude Spoilpuls	10 000 a.u.
Wiederholzeit	1,40 s
FID Datenpunkte	512
Verweilzeit	500 μs
FID Aufnahmezeit	0,26 s
Empfängerverstärkung	43 dB
Totzeit	100 μs
Anzahl Scans (<i>ns</i>)	1
Anzahl Spektren (<i>nrSpecs</i>)	$nSpecs = \frac{\text{HPLC Messdauer [s]}}{\text{Wiederholzeit [s]} \cdot ns}$
Datenprozessierung	
MATLAB Skript	Process_2D_dataV8
<i>Zero filling</i> Faktor	32
Apodisierungsfunktion	Gauß
Linienverbreiterung	2,3 Hz (0,07 s)
NMR Basislinienkorrektur	1. Ordnung
Chromatographische Filterfunktion	Tukey ($\alpha = 0,75$)
Fensterbreite	82,6 s (entspricht 59 <i>nrSpecs</i>)
Referenzregion	5 – 10 min
HPLC Basislinienkorrektur	1. Ordnung

7. Ergebnisse und Diskussion zur Entwicklung der Fourier-Transformation *liquid chromatography*

Die Entwicklung einer kontinuierlichen Injektionsmethode wird beschrieben mit dem Ziel, die Sensitivität zu steigern. Anstatt ein kleines Probenvolumen in die HPLC zu injizieren, wird ein oszillierendes Analytkonzentrationsprofil kontinuierlich in die HPLC geleitet. Das sinusförmige Chromatogramm wird anschließend mittels Fourier-Transformation ausgewertet, weshalb diese Methode Fourier-Transformation liquid chromatography (FT-LC) genannt wird. Die Retardierung der Moleküle innerhalb der chromatographischen Säule führt zu einer analytspezifischen Phase, die zur Charakterisierung der Analyten verwendet werden. Zuerst wird auf die Theorie der FT-LC Methode eingegangen. Nach der Beschreibung der experimentellen Durchführung wird die Datenprozessierung der sinusförmigen Chromatogramme im Detail erläutert. Diese Methode wurde in der SEC etabliert. Durch einen Vergleich von Molekulargewichtskalibrierungen sowie der Analyse von Analytmischungen wird gezeigt, dass die Retardierung der Analyten in der FT-SEC ähnlich zur konventionellen SEC ist, womit die Integrität der mit der FT-SEC bestimmten Molekulargewichte bestätigt wird.

Aufgrund der kontinuierlichen Analyteinleitung in die HPLC wird mit der FT-LC deutlich mehr Analyt pro Zeiteinheit gemessen, als mit der konventionell genutzten Einzelinjektionsmethode. Durch die effizientere Nutzung der Säule wird mit der FT-SEC eine Sensitivitätssteigerung um den Faktor 50 erzielt.

Der Anwendungsbereich der FT-LC wird anschließend auf die LAC-NMR Kopplung ausgedehnt, um die erhöhte Sensitivität der FT-LC und die spektrale Auflösung der NMR-Detektion bei der Analyse eines binären Parabengemischs zu nutzen. Verglichen mit der in Kapitel 6 vollständig optimierten LAC-NMR Methodik konnte durch die Anwendung der FT-LC mit NMR Detektion die Sensitivität um einen weiteren Faktor 1,6 gesteigert werden.

Die Thematik dieses Kapitels knüpft an meine Masterarbeit an (betreut von Dr. Carlo Botha), in der erste grundlegende Untersuchungen durchgeführt wurden.[160] Die in dieser Dissertation erzeugten Ergebnisse erweitern die Erkenntnisse aus der Masterarbeit maßgeblich und wurden teilweise in einem von mir verfassten Artikel publiziert.[153]

7.1. Hintergrund und Umsetzung der kontinuierlichen Injektionsmethode

7.1.1. Erhöhung der Sensitivität durch alternative Injektionsprofile

Zur Steigerung der Sensitivität in der HPLC gibt es mehrere Möglichkeiten. Zu den am häufigsten beschriebenen Methoden gehören: (1) die Erhöhung der messbaren Analytmenge durch Injektion größerer Volumina oder einer Aufkonzentrierung,[161, 162] (2) die Derivatisierung der Analyten,[162, 163] (3) die Optimierung der chromatographischen Bedingungen,[22, 103, 104] (4) die Anwendung geeigneter Datenverarbeitungsmethoden [22, 103, 104] oder (5) die Verwendung eines empfindlicheren Detektors.[29]

Eine etwas unbekanntere Methode zur Steigerung der Sensitivität besteht darin, die Probeninjektion zu modifizieren. Wie in Abschnitt 2.3, S. 12, bereits erläutert wurde, wird in der konventionellen HPLC typischerweise ein kleines Volumen injiziert. Diese konventionelle Injektionsmethode wird fortan als Einzelinjektion bezeichnet. Im Jahr 1962 diskutierten Reilley et al. theoretische Injektionsprofile in der Gaschromatographie als mögliche Alternative zur herkömmlich genutzten Einzelinjektionsmethode.[164] Zwei von Reilley et al. vorgeschlagenen Injektionsprofile bestehen aus einer mehrfachen Wiederholung der Einzelinjektion (mehrfache Injektion) sowie einer kontinuierlichen Injektion, mit einem sinusförmigen Analytkonzentrationsprofil (sinusförmige Injektion). In nachfolgenden Veröffentlichungen wurden beide Methoden weiter untersucht.[165–175] Die mehrfache Injektionsmethode wurde in der HPLC und in der Gaschromatographie (GC) untersucht mit dem Ziel das SNR zu steigern. Die Chromatogramme wurden dabei entweder mittels Kreuzkorrelation oder Hadamard Transformation ausgewertet.[165, 166, 172–175] Im Gegensatz dazu wurde das Konzept der sinusförmigen Injektion nur in sehr wenigen Fällen zur Prozesskontrolle in der GC verwendet.[168–170] Eine Anwendung der sinusförmigen Injektion in der HPLC wurde bisher noch nicht beschrieben. Weder die mehrfache Injektion noch die sinusförmige Injektion wurden bisher in größerem Umfang eingesetzt oder vollständig entwickelt. Dies liegt vermutlich an der komplexeren Datenauswertung im Vergleich zur konventionellen Einzelinjektionsmethode sowie daran, dass aktuelle chromatographische Fragestellungen bereits mit der konventionellen Einzelinjektionsmethode beantwortet werden können.[166]

Dieses Kapitel befasst sich mit der Entwicklung einer sinusförmigen Injektionsmethode für die HPLC, die Fourier-Transformation *liquid chromatography* (FT-LC) genannt wurde. Die konzeptionelle Idee zwischen der konventionellen HPLC (Einzelinjektion) und der FT-LC (sinusförmige Injektion) ist in Abbildung 7.1 veranschaulicht.[22, 153]

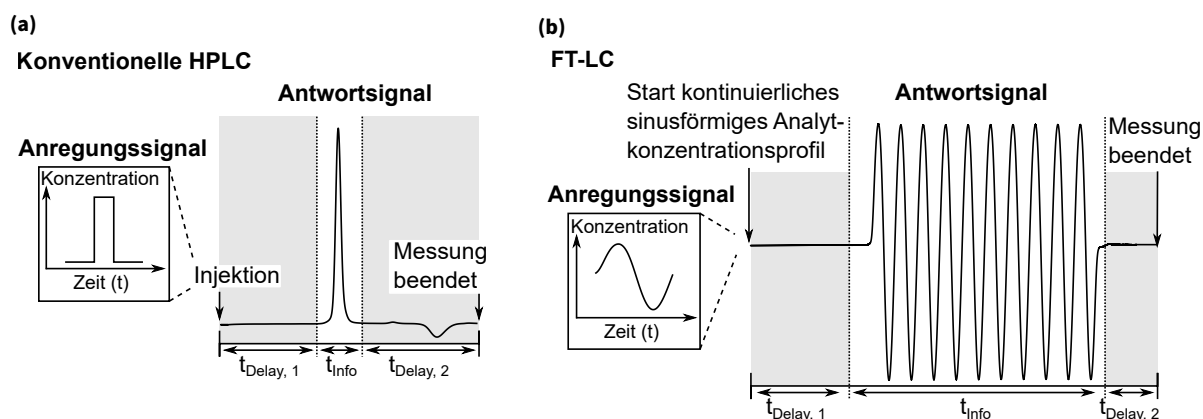


Abbildung 7.1: Veranschaulichung des Prinzips der Fourier-Transformation *liquid chromatography* (FT-LC). Bei der konventionellen HPLC Methode, gezeigt in (a), wird ein kleines Probenvolumen mittels Einzelinjektion in die HPLC eingebracht. (b) Die Probeninjektion wird bei der FT-LC modifiziert, sodass ein kontinuierliches sinusförmiges Analytkonzentrationsprofil in die HPLC geleitet wird. Im hier gezeigten Beispiel beginnt dieses Anregungssignal bei 50 % der maximalen Konzentration. Die Retardierung der Moleküle führt zu einem analytspezifischen Phasenwinkel, der mithilfe der Fourier-Transformation ausgewertet wird. Die Chromatogramme sind unterteilt in Regionen ohne Probeninformation ($t_{\text{Delay},1}$) und mit Probeninformation (t_{Info}). Um die Trenneffizienz beider Methoden abzuschätzen wird das $t_{\text{Info}}/(t_{\text{Delay},1} + t_{\text{Info}} + t_{\text{Delay},2})$ Verhältnis bestimmt. Durch die kontinuierliche Einleitung von Analyt bei der FT-LC beträgt dieses Verhältnis für (b) 63 % während es für die konventionelle HPLC Methode (a) lediglich 17 % beträgt. Die deutlich gesteigerte analysierbare Analytmenge resultiert in eine Sensitivitätssteigerung, die in Abschnitt 7.2.4, S. 120, und Abschnitt 7.2.5, S. 123, genauer untersucht wird. Modifiziert nach Matz et al. 2022.[153]

Bei der konventionellen HPLC Methode, gezeigt in Abbildung 7.1a, wird ein kleines Volumen (20 – 1000 μL) in die HPLC injiziert. Dieses Injektionssignal, kann als rechteckiges Konzentrations-Zeit-Profil visualisiert werden, was einer Delta-Funktion in der Zeitdimension entspricht und eine Oszillation im

Fourier-Raum darstellt. Bei der FT-LC in Abbildung 7.1b wird durch das oszillierende sinusförmige Analytkonzentrationsprofil ein sinusförmiges Anregungssignal erhalten, das nach Gleichung 3.3.14, S. 27, einem Delta-Puls im Fourier-Raum entspricht.[64] Daher wird bei der FT-LC das sinusförmige Chromatogramm einer komplexen Fourier-Transformation unterzogen und anschließend von der Delta-Funktion an der Anregungsfrequenz die Phase bestimmt, die analog zur Retentionszeit, analytenspezifische Informationen enthält.

Für die Entwicklung und Etablierung der Methode wurde die SEC gewählt, weshalb im Folgenden statt FT-LC die präzisere Bezeichnung Fourier-Transformation *size exclusion chromatography* (FT-SEC) verwendet wird. Die SEC eignet sich für solche Versuche besonders gut, weil die Messungen prinzipiell unter isokratischen Bedingungen durchgeführt werden, der Trennbereich genau definiert ist und, im Vergleich zu anderen HPLC Methoden, die Analytauftrennung aufgrund eines relativ einfachen Trennmechanismus (sterischem Ausschluss) geschieht. Die FT-LC kann aber auch bei anderen HPLC Methoden angewandt werden. Dies wird im Abschnitt 7.2.5, S. 123, demonstriert, indem die FT-LC in der LAC-NMR Kopplung angewandt wird.

Für die Methodenentwicklung wurden Polystyrol (PS)-Kalibrierstandards mit unterschiedlichen Molekulargewichten und engen Molekulargewichtsverteilungen genutzt. Eine Zusammenstellung der verwendeten PS-Standards und Chemikalien ist in Anhang A, S. 169, enthalten. Zur Herstellung der Analytlösungen wurden die PS-Standards in THF gelöst. Um ein sinusförmiges Analytkonzentrationsprofil zu erhalten, wurde ein Lösungsmittelgradient zwischen zwei Lösungsreservoirs angewandt, wobei eines die PS in THF Lösung und das andere reines THF enthielt. Der Lösungsmittelgradient bestand aus einer sinusförmigen Variation der relativen Volumenanteile und konnte beliebig oft wiederholt werden. Dadurch wurde ein sinusförmiges Anregungssignal erhalten, dessen Länge der Anzahl der gewählten Oszillationen entsprach. Eine detailliertere Beschreibung des Lösungsmittelgradienten befindet sich im nächsten Abschnitt und in Abbildung 7.3, S. 108.

Das sinusförmige Anregungssignal wurde vor und das Antwortsignal nach der Säule detektiert. Durch das Totvolumen zwischen den Detektoren und der Retardierung innerhalb der Säule wurden somit zwei zueinander zeitversetzte sinusförmige Chromatogramme erhalten (Referenz- und Antwortchromatogramm). Die in Gleichung 3.3.4, S. 25, definierte diskrete Fourier-Transformation (DFT) wurde verwendet, um die Frequenzkomponenten der Chromatogramme aufzulösen. Zur Bestimmung der Phasenverschiebung zwischen dem Referenz- und Antwortchromatogramm wurde ausschließlich die Frequenzkomponente an der Anregungsfrequenz ν_0 ausgewertet, da die Anregungsfrequenz durch den Lösungsmittelgradient vorgegeben wurde und konstant blieb. Die Phasenverschiebung ist proportional zur Retentionszeit konventioneller HPLC Experimenten und korreliert daher in der SEC mit dem Molekulargewicht.

Eine Sensitivitätssteigerung durch die Anwendung der FT-LC wird aufgrund zwei Gründen erwartet. (1) Durch die kontinuierliche Probeninjektion wird deutlich mehr Analyt pro Zeiteinheit in das System eingeführt und folglich auch gemessen. (2) Das stochastische Rauschen sollte im Zeit- und Frequenzbereich gleich sein und über alle Datenpunkte verteilt. Da die Anzahl an Datenpunkten im Zeit- und Frequenzbereich gleich ist, aber nur einen Datenpunkt im Frequenzbereich an bekannter Stelle ausgewertet wird (der Datenpunkt an der Anregungsfrequenz), sollte der Einfluss des Rauschens reduziert werden (in Analogie zu einem Lock-in Verstärker).

Aufgrund des Zusammenhangs der Phasenverschiebung mit dem Molekulargewicht wird nachfolgend mit der Phasenverschiebung der PS-Standards eine Molekulargewichtskalibrierung erstellt. Anschließend wird auf die FT-SEC Analyse von PS-Mischungen mit UV Detektion eingegangen. Weiterhin wird die Auswirkung der Periode des sinusförmigen Analytkonzentrationsprofils auf das SNR beschrieben und die Sensitivitätssteigerung durch die Anwendung der FT-LC in der SEC quantifiziert. Abgeschlossen wird dieses Kapitel mit der FT-LC Analyse einer Analytmischung in der LAC-NMR Kopplung (FT-LAC-NMR).

7.1.2. Umsetzung der FT-SEC Methodik

Der Systemaufbau ist schematisch in Abbildung 7.2a und als Bild in Abbildung 7.2b gezeigt und basiert auf dem bereits gezeigten LAC-NMR Aufbau in Abbildung 5.1, S. 42. Für die Methodenentwicklung wurden neben der quaternären Pumpe zwei UV Detektoren verwendet. Der erste UV Detektor 1 (UVD1) befand sich vor und der zweite UV Detektor 2 (UVD2) nach der Säule. Die Detektion erfolgte bei $\lambda = 260$ nm, mit Ausnahme bei dem Sensitivitätsvergleich in Abschnitt 7.2.4, S. 120, bei welchem $\lambda = 236$ nm genutzt wurde. Der Grund für die veränderte Detektionswellenlänge ist im Abschnitt 7.2.4, S. 120, erörtert. Als Säule wurde eine analytische Linear M SDV Säule (300×8 mm Innendurchmesser) genutzt mit einem Trennbereich von 0,1 bis 1000 kg mol^{-1} . Zur Möglichkeit der Durchführung konventioneller Einzelspritzungen befand sich zwischen UVD1 und der Säule ein manuelles Injektionsventil. Bei der Methodenentwicklung wurde eine Injektionsschleife mit einem Volumen von $V_i = 100 \mu\text{L}$ verwendet. Zum Starten einer FT-SEC Messung und zur Digitalisierung der Analogsignale der UVDs wurde ein *universal data center* (UDC) genutzt. Das UDC wurde mit einem manuellen Injektionsauslöser modifiziert und digitalisierte die Daten mit einem 24 Bit ADC und einer Abtastrate von 1 Hz. Weitere Gerätespezifikationen sowie Informationen über die verwendeten Softwares sind im Anhang A, S. 169, zu finden. Zusätzlich befindet sich in Anhang C, S.181, eine detaillierte Anleitung für die Durchführung einer FT-SEC Messung.

Beim Betätigen des Injektionsauslösers startete die quaternäre Pumpe einen Lösungsmittelgradient zwischen zwei Lösungsmittelreservoirs. Die Tabelle zur Festlegung der zeitabhängigen Lösungsmittelzusammensetzung in der Benutzeroberfläche der quaternären Pumpe wurde so erstellt, dass die Zusammensetzung zwischen zwei Lösungsmittelreservoirs sinusförmig in zeitlich äquidistanten Schritten variiert wurden. Eines der Lösungsmittelreservoirs enthielt eine Analytlösung (PS + THF) und das andere reines Lösungsmittel (THF), wie in Abbildung 7.3 dargestellt. Die maximale Anzahl an Tabelleneinträgen betrug 100 Zeilen, womit das minimale Phaseninkrement zwischen zwei Tabelleneinträgen $3,6^\circ$ entsprach. Für jeden Zeitschritt wurden die relativen Volumenanteile der Lösungsmittelreservoirs so programmiert, dass zwei um 180° zueinander versetzte Sinuswellen erhalten wurden. Zwischen zwei aufeinanderfolgenden Zeitschritten änderte die quaternäre Pumpe die Volumenanteile der Lösungsmittelreservoirs mit einer konstanten Rate, sodass die tatsächlichen relativen Volumenanteile einen Sinus annähern. Zur Illustration der daraus entstehenden Abweichung vom idealen Sinus ist das Profil der relativen Volumenanteile in Abbildung 7.3 vergrößert abgebildet. Um den Sinus so gut wie möglich abzubilden, wurde die höchste Anzahl an Zeitschritten (= 100) verwendet. Der Lösungsmittelgradient begann für die Methodenentwicklung immer bei einem relativen Volumenanteil von 50 %. Es sind aber auch andere Volumenzusammensetzungsprofile möglich, wie in Abschnitt 7.2.5, S. 123, gezeigt wird. Die Magnitude eines Sinus ist im Zeit und Fourier-Raum gleich.[76] Um die höchste Sensitivität zu erzielen, wurde daher der relative Volumenanteil der Analytlösung von 0 % bis 100 % variiert.

Entsprechend dem sinusförmigen Volumenzusammensetzungsprofil der Analytlösung wird ein Analytkonzentrationsprofil mit gleicher Form erhalten. Daher ist die Periode des Volumenzusammensetzungsprofils in Abbildung 7.3 gleich der Periode des resultierenden Analytkonzentrationsprofils (Anregungssignals). Die Periode wurde entsprechend dem Trennbereich der Säule gewählt. Eine weiterführende Diskussion der Dauer der Periode befindet sich in Abschnitt 7.2.1, S. 113.

Für eine FT-SEC Messung wurde das Volumenzusammensetzungsprofil für eine vordefinierte Anzahl von Zyklen wiederholt (Oszillationen). Die Mindestzahl der Oszillationen wird in den folgenden Abschnitten diskutiert. Typischerweise wurden zwischen 5 und 12 Oszillationen gemessen. Der UVD1 zeichnet das Anregungssignal vor der Säule und der UVD2 das Antwortsignal hinter der Säule auf, wobei die Länge der sinusförmigen Chromatogramme von der Anzahl an Oszillationen und deren Periode abhing. Anschließend wurde die Phasenverschiebung der Anregungsfrequenz zwischen beiden Chromatogrammen nach der DFT bestimmt. In Abschnitt 7.1.3, S. 108, wird zunächst die theoretische

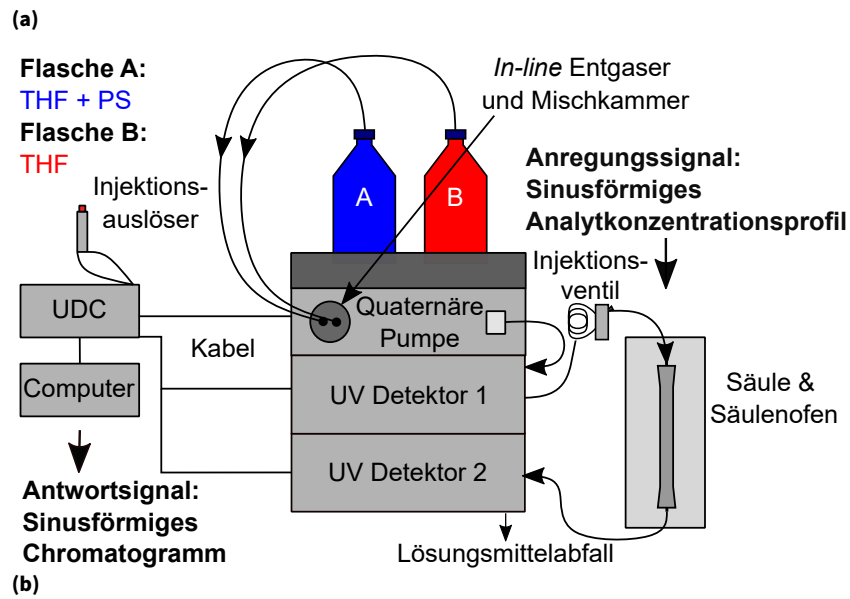


Abbildung 7.2: Experimenteller Aufbau für die FT-SEC. Der Aufbau basierte auf dem der LAC-NMR Kopplung, gezeigt in Abbildung 5.1, S. 42. Zum Starten einer FT-SEC Messung wurde ein *universal data center* (UDC) mit einem manuellen Injektionsauslöser verwendet. Ein sinusförmiges Chromatogramm wurde vor und eines nach der Säule detektiert, um die Phasenverschiebung zwischen den Chromatogrammen mittels Fourier-Transformation zu bestimmen. Zur Möglichkeit der Durchführung konventioneller SEC Messungen war ein manuelles Injektionsventil vor der Säule installiert. Modifiziert nach Matz et al. 2022.[153]

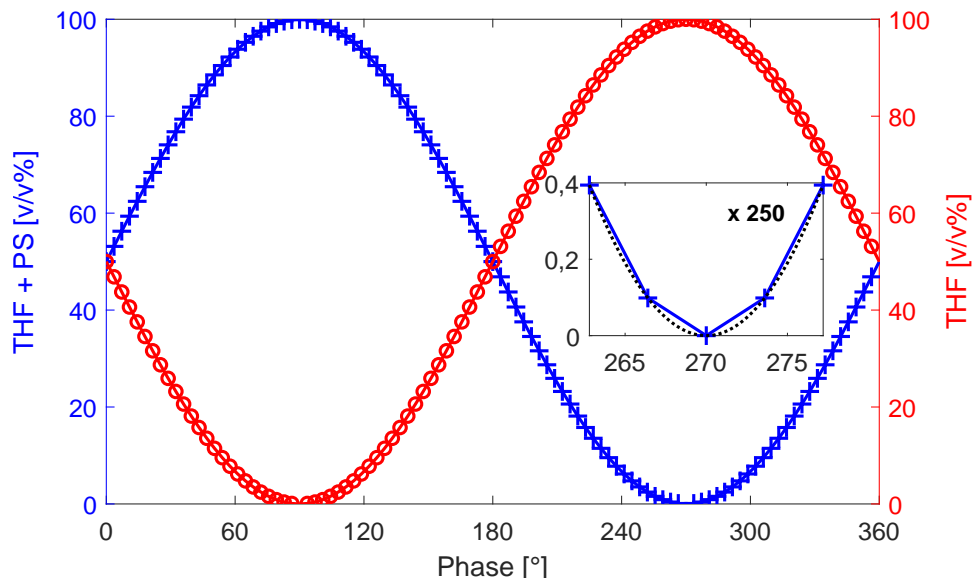


Abbildung 7.3: Profile der relativen Volumenzusammensetzung zweier Lösungsmittelreservoirs für die sinusförmige Injektion. Die Profile wurden in 100 äquidistante Zeitschritte aufgeteilt, sodass jeder Zeitschritt einem Phaseninkrement von $3,6^\circ$ entsprach. Ein Lösungsmittelreservoir enthielt die Analytlösung (THF + PS, in Blau) und das andere das Lösungsmittel (THF, in Rot). Zwischen zwei Zeitschritten änderte die quaternäre Pumpe die Volumenzusammensetzung mit einer konstanten Rate entsprechend der programmierten relativen Volumenzusammensetzung, wodurch zwei um 180° zueinander versetzte Sinuskurven angenähert wurden. In der Vergrößerung ist die Abweichung vom erhaltenen Volumenzusammensetzungsprofil (durchgezogene Linie) zum idealen Sinus (gestrichelte Linie) gezeigt. Die Dauer, die für einen vollständigen Phasenzyklus von 360° benötigt wird, ist die Periode T . Ähnlich zum Profil der relativen Volumenzusammensetzung von THF + PS wird ein PS-Konzentrationsprofil erhalten, das als Anregungssignal dient. Der Gesamtvolumenstrom entspricht der Summe beider Lösungsmittelreservoirs und wurde konstant bei 1 mL min^{-1} gehalten. Modifiziert nach Matz et al. 2022.[153]

Grundlage der FT-SEC erläutert und anschließend wird in Abschnitt 7.1.4, S. 110, auf die Auswertung der sinusförmigen Chromatogramme näher eingegangen.

7.1.3. Theoretische Grundlagen der FT-SEC

In Abschnitt 2.2, S. 8, wurden die Grundlagen der HPLC sowie im Speziellen der LAC und SEC erläutert. Dabei wurde der Zusammenhang zwischen der Retardierung innerhalb der Säule und der Retentionszeit sowie die unterschiedlichen Auftrennmechanismen vorgestellt. Die Retentionszeit wird üblicherweise in Minuten und die Frequenz in Hertz (Hz, $1/s$) angegeben. Um die Umrechnung der Retentionszeit in die Frequenzdomäne zu erleichtern, wird im Anschluss die Retentionszeit in Sekunden angegeben. In der FT-SEC führt die um Δt zeitversetzte Elution zwischen dem Referenz- und Antwortchromatogramm zu einer Phasenverschiebung $\Delta\varphi$ (in Grad) von

$$\Delta\varphi = \frac{360^\circ}{T} \Delta t, \quad (7.1.1)$$

wobei T die Periode des sinusförmigen Analytkonzentrationsprofils ist.

Zur Bestimmung von $\Delta\varphi$ ist daher neben dem Antwortchromatogramm immer ein Referenzchromatogramm erforderlich, zu dem die Zeitverschiebung bestimmt wird. Referenzchromatogramme können auf unterschiedliche Weise erhalten werden. (1) Eine Möglichkeit ist die Aufzeichnung des Anregungssignals vor der Säule bei derselben Messung oder (2) in einer separaten Messung ohne Säule. (3) Daneben kann auch ein Chromatogramm eines Referenzanalyten nach der Säule verwendet werden. Bei Option (1) wird das Referenz- und das Antwortchromatogramm gleichzeitig aufgezeichnet,

während bei Option (2) und (3) das Referenzchromatogramm in einer separaten Messung aufgezeichnet werden muss. Dementsprechend erfordert Option (1) die Verwendung von zwei Detektoren, während für Option (2) und (3) ein einzelner Detektor ausreicht. Bei Option (1) entstammen das Referenz- und das Antwortchromatogramm vom selben Anregungssignal (Konzentrationsprofil des Analyten). Daher wirken sich Abweichungen des sinusförmigen Analytkonzentrationsprofils vom idealen Sinus sowohl auf das Referenz- als auch auf das Antwortchromatogramm aus. Abweichungen des sinusförmigen Analytkonzentrationsprofils vom idealen Sinus entstehen aufgrund Strömungsinstabilitäten, Ungenauigkeiten beim Mischvorgang und Druckschwankungen durch die Pulsation der Pumpe. Daher sollte die Bestimmung von $\Delta\varphi$ mit Option (1) resistenter gegen systematische Fehler sein als mit Option (2) oder (3), weshalb Option (1) für die weitere Methodenentwicklung verwendet wurde.

Die DFT der Chromatogramme wurde mit dem FFTW Algorithmus in MATLAB durchgeführt, der eine beliebige Anzahl von Zeitpunkten verarbeiten kann (siehe Abschnitt 3.3, S. 25, für mehr Informationen zur FFTW). Aus den komplexen spektralen Komponenten der Anregungsfrequenz wurde im Anschluss mit Gleichung 3.3.8, S. 26, die Phase φ und mit Gleichung 3.3.7, S. 26, die Magnitude berechnet. Aus den Phasen der Anregungsfrequenz des UVD1 $\varphi_{\text{UVD1}}(\nu_0)$ und des UVD2 $\varphi_{\text{UVD2}}(\nu_0)$ wurde $\Delta\varphi$ mit Gleichung 7.1.2 bestimmt,

$$\Delta\varphi = \varphi_{\text{UVD1}}(\nu_0) - \varphi_{\text{UVD2}}(\nu_0). \quad (7.1.2)$$

Für eine erfolgreiche Analyse mit der FT-SEC sind folgende Punkte zu beachten: (1) Ähnlich zur konventionellen SEC werden Analyten nur aufgetrennt, wenn das hydrodynamische Volumen im Trennbereich der Säule liegt. (2) Die Periode T sollte den kompletten Trennbereich abdecken, sodass eine Elution außerhalb 360° vermieden wird. Ist dies nicht sichergestellt, wäre es möglich, dass zwei Analyten mit unterschiedlichen Retentionszeiten ein gleiches $\Delta\varphi$ aufweisen, womit diese nicht mehr differenzierbar wären. (3) Für eine quantitative Bestimmung der FT-SEC Messungen wird empfohlen, Konzentrationen unterhalb der Linearitätsgrenze des Detektors zu analysieren. Hinsichtlich weiterer Informationen zur Bestimmung der Linearitätsgrenzen der UVDs wird auf Abschnitt 2.4, S. 14, und Anhang C.2, S. 184, verwiesen. Beim Überschreiten der Linearitätsgrenze sinkt die Intensitätszunahme des Detektorsignals pro gemessener Masseneinheit, was eine präzise quantitative Messung erschwert. Wird eine Konzentration über der Linearitätsgrenze analysiert, würde ein unsymmetrischer Sinus erhalten werden, bei dem die Maxima abgeschwächt sind, während die Minima die volle Auslenkung aufweisen. Die Dämpfung der Sinuskurve führt zu höheren harmonischen Frequenzen im Spektrum bei $2 \cdot \nu_0, 3 \cdot \nu_0, \dots$. Die Phase eines solchen Chromatogramms sollte aber nicht beeinflusst sein da die Dämpfung keinen Einfluss auf die Elutionszeit hat.

Nach der DFT wurde das SNR im Fourier-Raum bestimmt. Um das Rauschen möglichst gering zu halten, wird empfohlen, dass im Chromatogramm die Bereiche mit einer flachen Basislinie verworfen werden. Zur Rekonstruktion der flachen Basislinie werden unendlich viele Frequenzen benötigt. Zusätzlich sollte der zur Auswertung genutzte Datensatz perfekt periodisch sein, wie in Abbildung 7.4 angedeutet. Dies liegt daran, dass der FFTW Algorithmus davon ausgeht, dass die Daten ein periodischer Teil eines unendlich langen Signals sind, weshalb der Datensatz bei der Verarbeitung periodisch wiederholt wird. Nicht-periodische Zeitdaten führen bei der Aneinanderreihung zur Ausbildung einer Stufenfunktion. Stufenfunktionen resultieren nach Gleichung 3.3.18, S. 27, in $\sin(\omega t)/\omega$ -Termen (Sinc-Artefakte) im Frequenzbereich.[76] Im Hinblick auf die chromatographische Umsetzung bedeutet das, dass nur sinusförmige Chromatogrammabschnitte verwendet werden sollten, bei denen bereits ein dynamisches Gleichgewicht vorliegt. Deshalb wurde mindestens die erste Oszillation bei der Datenauswertung verworfen.

Wie in Gleichung 3.3.20, S. 27, bereits eingeführt wurde, entspricht die spektrale Auflösung $\Delta\nu$ dem

Kehrwert der Aufnahmezeit des Zeitdatensatzes. Zum Auflösen der Anregungsfrequenz ν_0 muss $\Delta\nu$ die Bedingung in Gleichung 7.1.3 erfüllen,

$$\Delta\nu \leq \frac{\nu_0}{2} = \frac{1}{2T}. \quad (7.1.3)$$

In Abschnitt 3.3.1, S. 26, ist beschrieben, dass die Abtastrate des Zeitsignals s_r die höchste detektierbare Frequenz, die Nyquist Frequenz ν_{Nyq} , limitiert. Zum Detektieren der ν_0 muss daher Gleichung 7.1.4 gelten,

$$\nu_0 \leq \nu_{\text{Nyq}} = \frac{s_r}{2}. \quad (7.1.4)$$

7.1.4. Datenprozessierung einer FT-SEC Messung und SNR Definition im Fourier-Raum

Im vorhergehenden Abschnitt wurde erläutert, dass für ein maximales *SNR* nur der periodische mittlere Teil der sinusförmigen Chromatogramme für die Auswertung verwendet werden sollte. Die für die DFT verwendeten Abschnitte sind in Abbildung 7.4 exemplarisch an einem Referenzchromatogramm (UV Detektor 1, in Abbildung 7.4a und an einem Antwortchromatogramm (UV Detektor 2, in Abbildung 7.4b gezeigt.

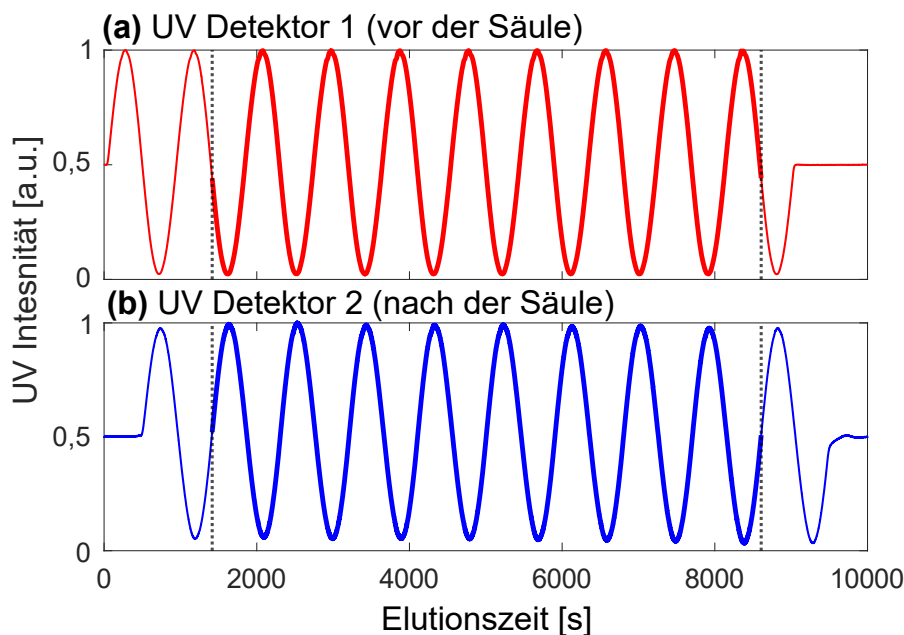


Abbildung 7.4: Verarbeitung der Zeitdaten einer FT-SEC Messung. Gezeigt ist die Analyse eines $0,25 \text{ g L}^{-1}$ PS-100 kg mol^{-1} Standards, gemessen mit 10 Oszillationen und einer Periode von $T = 900 \text{ s}$. Von dem Referenzchromatogramm in (a) und dem Antwortchromatogramm in (b) wurde jeweils ein Abschnitt mit 8 Oszillationen aus der Mitte des Chromatogramms (dick hervorgehoben und durch gestrichelte Linien begrenzt) für die DFT verwendet. Die Fourier-Spektren beider Abschnitte sind in Abbildung 7.5 zu sehen. Modifiziert nach Matz et al. 2022.[153]

Die FT-SEC Messung wurde mit einem PS-100 kg mol^{-1} Standard und 10 Oszillationen mit einer Periode von $T = 900 \text{ s}$ (entspricht 15 min) durchgeführt. Die verwendeten Abschnitte der Chromatogramme wurden auf der Grundlage folgender Überlegungen ausgewählt: (1) Um Informationen über die Phasenverschiebung zu erhalten, wurden die Abschnitte bei den gleichen Elutionszeiten entnommen, (2) die Abschnitte waren perfekt periodisch und (3) aufgrund des Übergangs zur flachen Basislinie und der Zeit, die benötigt war, bis sich ein dynamisches Gleichgewicht eingestellt hatte, wurde mindestens die

erste Oszillation des Antwortchromatogramms verworfen, siehe Abbildung 7.4b.

Zur Beurteilung der Sensitivität wurde das SNR für die FT-SEC Methode im Fourier-Raum definiert als die Magnitude der Anregungsfrequenz $M(\nu_0)$, dividiert durch die einfache Standardabweichung eines Bereichs ohne Informationen. Als Rauschregion für die FT-SEC wurden die letzten 20 % des Spektrums genutzt, was dem Bereich zwischen 0,4 und 0,5 Hz entsprach. Dieser Bereich wurde gewählt, da dieser für unterschiedliche Messungen weitestgehend stabil und ohne offensichtliche Signale war. Die SNR Definition wird in Abbildung 7.5 anhand der Spektren der in Abbildung 7.4 hervorgehobenen Chromatogrammabschnitte veranschaulicht.

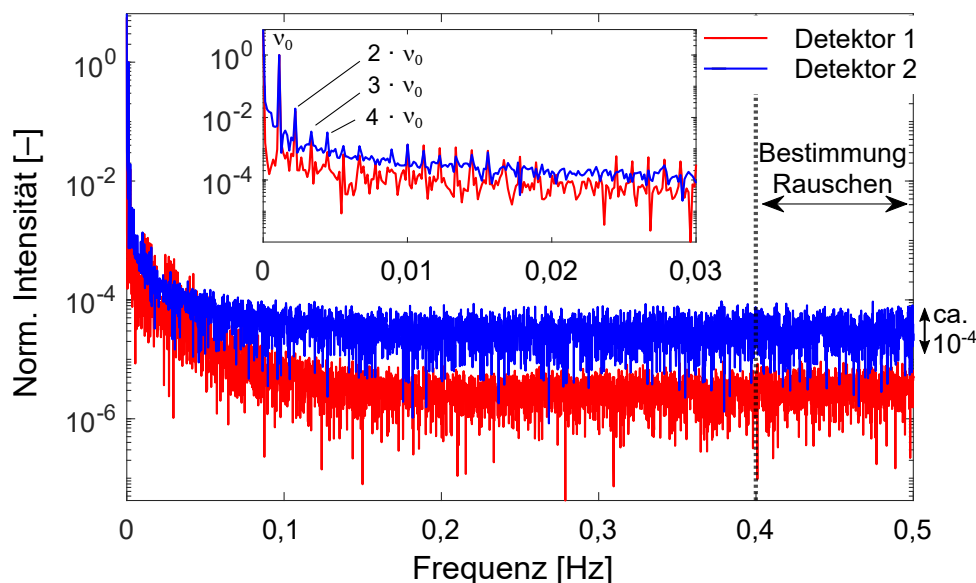


Abbildung 7.5: Magnitudenspektren der hervorgehobenen Chromatogrammabschnitte in Abbildung 7.4, normiert auf die Magnitude der Anregungsfrequenz $M(\nu_0)$. Das SNR wurde berechnet aus $M(\nu_0)$, dividiert durch die Standardabweichung der letzten 20 % des Spektrums (in diesem Beispiel zwischen 0,4 und 0,5 Hz). Das SNR wurde anschließend zur besseren Vergleichbarkeit zur Quadratwurzel der Messzeit des Chromatogrammabschnitts normiert. Im vergrößerten Fenster sind in beiden Spektren die Anregungsfrequenz ($\nu_0 = 1/900 \text{ s} = 0,001 \text{ Hz}$) sowie deren höheren harmonischen Frequenzen markiert. Mögliche Ursachen für die höheren harmonischen Frequenzen sind im Fließtext diskutiert. Modifiziert nach Matz et al. 2022.[153]

In Abbildung 7.5 sind im vergrößerten Bereich die Anregungsfrequenz ($\nu_0 = 1/900 \text{ s} = 0,001 \text{ Hz}$) und deren höheren harmonischen Frequenzen ($2 \cdot \nu_0, 3 \cdot \nu_0, \dots$) zu sehen. Die höheren harmonischen Frequenzen der $c = 0,25 \text{ g L}^{-1}$ Messung besaßen eine Magnitude von etwas über 1 % relativ zu $M(\nu_0)$ und nahmen zu höheren Frequenzen hin ab. Die Magnituden der höheren harmonischen Frequenzen entstanden durch Abweichungen des sinusförmigen UV Chromatogramms zum perfekten Sinus mit ν_0 durch Mischungenauigkeiten der quaternären Pumpe sowie UV Licht absorbierende gelöste Gasresiduen, die aufgrund einer unvollständigen Entgasung in der mobilen Phase verblieben.[176, 177] Im Anhang C.3, S. 186, wird gezeigt, dass durch eine dreifache Entgasung der Lösungsmittel die Magnitude der höheren harmonischen Frequenzen um einen Faktor von 45 für UVD1 und einen Faktor 30 für UVD2 reduziert werden konnte. Der verwendete *in-line* Entgaser hatte für jedes Lösungsmittelreservoir eine separate Entgaserleitung. Da der Volumenstrom der zwei Lösungsmittelreservoirs sinusförmig variiert wurde (siehe Abbildung 7.3, S. 108), veränderten sich die linearen Geschwindigkeiten der Volumeneinheiten innerhalb der Entgaserleitungen und folglich auch deren Verweilzeiten. Der Entgaser entfernt eine bestimmte Menge an Gas pro Zeiteinheit. Unter der Voraussetzung, dass der Gasgehalt der Volumeneinheit so hoch ist, dass dieser bei der kürzesten Verweilzeit nicht vollständig entfernt

wird, führt eine Variation der Verweilzeiten zu unterschiedlichen Gasgehalten. Für den Idealfall, dass (1) die entfernte Gasmenge pro Zeiteinheit, im Folgenden als Entgasereffizienz bezeichnet, unabhängig von der linearen Geschwindigkeit innerhalb der Entgaserleitung ist, (2) die Entgasereffizienz für beide Entgaserlinien gleich ist, (3) die Gaskonzentration in den Lösungsmittelreservoirs gleich ist und (4) die gelöste Gaskonzentration nach der Entgasung noch hoch genug ist, damit diese über der Nachweisgrenze der UVDs liegt, würde für jede Entgaserlinie nach der Entgasung ein Detektorsignal erhalten werden, das den in Abbildung 7.3 gezeigten relativen Volumenzusammensetzungsprofilen der Lösungsmittel ähnelt. Tatsächlich ist es jedoch wahrscheinlicher, dass (1) die Entgasereffizienz eine Funktion der Gaskonzentration ist und damit von der Verweilzeit einer Volumeneinheit im Entgaser abhängt, (2) die Entgasereffizienz zwischen den Entgaserlinien unterschiedlich ist, da der Abstand zur Vakuumpumpe und die Porosität der Membran unterschiedlich sein können, (3) die Lösungsmittelreservoirs unterschiedliche Gasgehalte besitzen und (4) die Restgaskonzentration teilweise unter die Nachweisgrenzen der UVDs fallen. Folglich weist jede Entgaserlinie ein modifiziertes sinusförmiges Konzentrationsprofil des Restgases auf. Aufgrund der nachfolgenden Vermischung der Volumenströme beider Entgaserleitungen wird ein komplexes Konzentrationsprofil des gelösten Gases erhalten, was nur schwer vorhersagbar ist. Da der Signalanteil des gelösten Gas relativ gering zur Signalintensität des PS bei der Analyse von PS mit $c = 0,25 \text{ g L}^{-1}$ war, sind in den Chromatogrammen in Abbildung 7.4 keine auffälligen Veränderungen des Sinus zu erkennen. Bei einer Reduzierung der PS Konzentration auf weniger als $c = 0,05 \text{ g L}^{-1}$ wurden jedoch deutliche Veränderungen der UV Chromatogramme sichtbar.

Weitere Ursprünge der höheren harmonischen Frequenzen können (1) Druckschwankungen aufgrund der Pulsation der Pumpe sein und (2) Abweichungen des PS-Konzentrationsprofils von dem eines idealen Sinus. Abweichungen vom idealen Sinus entstehen, da das in Abbildung 7.3, S. 108, erzeugte Anregungssignal nur eine Annäherung an eine Sinuskurve ist sowie aus instrumentellen Ungenauigkeiten wie einem ungenauem Schaltventilsystem oder einer inhomogenen Durchmischung der zwei Lösungsmittelreservoirs innerhalb der Mischkammer.

7.2. Entwicklung der Fourier-Transformation *liquid chromatography*

7.2.1. Erstellen einer Molekulargewichtskalibrierung

Bei der konventionellen SEC korreliert das Elutionsvolumen mit dem Molekulargewicht. Dafür wird eine Molekulargewichtskalibrierung erstellt, indem das Molekulargewicht am Peakmaximum gegen die entsprechende Retentionszeit oder dem Retentionsvolumen aufgetragen und mit einer Polynomfunktion angepasst wird.[38] In der FT-SEC kann eine analoge Beziehung hergestellt werden, indem das Molekulargewicht gegen die Phasenverschiebung aufgetragen wird da diese der Retentionszeit proportional ist. Die für die Kalibrierung verwendeten PS-Standards bestehen aus einer Mischung von Molekülen unterschiedlicher Größe und besitzen daher eine Molekulargewichtsverteilung. Reilley et al. beschrieben, dass ein Gemisch verschiedener Analyten, das mittels sinusförmiger Injektion analysiert wird, eine Superposition bildet, die dieselbe Anregungsfrequenz besitzt wie die der einzelnen Komponenten.[164] Dies trifft allerdings nur zu, wenn der genutzte Detektor ein einziges Signal als Funktion der Elutionszeit aufzeichnet und keine zeitabhängige spektrale Information zur weiteren Auflösung der sinusförmigen Elutionsprofile bereitstellt. Nach dem Superpositionsprinzip ist die Magnitude M und die Phase φ des Antwortsignals der Mischung (Mix) die Summe aus den einzelnen Magnituden M_j und Phasen φ_j der j Komponenten, gewichtet mit M_j und φ_j der Polymerfraktionen, wie in Gleichung 7.2.1 beschrieben wird,[78]

$$M_{\text{Mix}} \cdot \exp(i\varphi_{\text{Mix}}) = \sum_j M_j \cdot \exp(i\varphi_j). \quad (7.2.1)$$

Die Intensität des UVD Signals ist proportional zur Anzahl der Styrol-Monomere in der Flusszelle. Bezogen auf ein Mol an Substanz gilt daher, dass mit steigendem Molekulargewicht ein linear steigendes Detektorsignal erhalten wird. Folglich werden die Polymerfraktionen mit hohem Molekulargewicht in einer Superposition stärker gewichtet, weshalb davon ausgegangen wird, dass das mit φ_{Mix} ermittelte Molekulargewicht am ehesten dem Gewichtsmittel \overline{M}_w entspricht. Da die Superposition neben M_j auch mit φ_j gewichtet wird, werden jedoch Abweichungen von \overline{M}_w erwartet, die mit der Dispersität D der Polymerprobe zunehmen.

Da das mittels der FT-SEC analysierte Molekulargewicht am ehesten dem \overline{M}_w entspricht, wurde die Molekulargewichtskalibrierung für die FT-SEC und die konventionelle SEC mit den \overline{M}_w der PS-Standards (siehe Tabelle A.3 im Anhang A.1, S. 169) erstellt. Dafür wurden zunächst Lösungen von jedem PS-Standard mit THF mit einer Konzentration von $c = 0,25 \text{ g L}^{-1}$ hergestellt. Die Konzentration wurde gewählt, da diese (1) unterhalb der Linearitätsgrenze der UVDs lag (siehe Anhang C.2, S. 184) sowie (2) ein intensives UV-Signal von PS erhalten wurde, um den Einfluss lichtabsorbierender Restgaskomponenten, Rauschen, Detektordrifts und Basislinieninstabilitäten zu minimieren. (3) Zusätzlich lag die Konzentration weit unter dem Konzentrationsüberladungslimit der Säule. Eine Analyse des Konzentrationsüberladungslimits in der FT-SEC und konventionellen SEC ist in Abschnitt 7.2.4, S. 120, behandelt. Eine FT-SEC Messung wurde mit einer Periode von $T = 900 \text{ s}$ und zehn Oszillationen durchgeführt. Die Dauer der Periode war größer als die Retentionszeit des zuletzt eluierenden PS-0,682 kg mol^{-1} , um eine Elution außerhalb des ersten 360° Zyklus zu vermeiden. Die für die Kalibrierung genutzten Chromatogramme der FT-SEC Messung des PS-100 kg mol^{-1} sind in Abbildung 7.4, S. 110, und die entsprechenden Fourier-Spektren in Abbildung 7.5, S. 111, dargestellt. Die Molekulargewichtskalibrierungen der konventionellen SEC (mittels Retentionszeit) und der FT-SEC (mittels Phasenverschiebung) sind in Abbildung 7.6 verglichen. Die Kalibrierungen wurden mit einem Polynom dritter Ordnung angepasst. Beide Kalibrierungen ähneln sich, wobei die FT-SEC Kalibrierung aufgrund eines größeren chromatographischen Totvolumens zu längeren Elutionszeiten verschoben ist. Das Totvolumen war bei der FT-SEC größer, da die Zeitverschiebung relativ zu UVD1 und nicht relativ zum manuellen Injektionsventil, wie es bei der konventionellen SEC der Fall ist, bestimmt wurde. Die Phasenverschiebung betrug im arithmetischen Mittel $4,2^\circ$, was

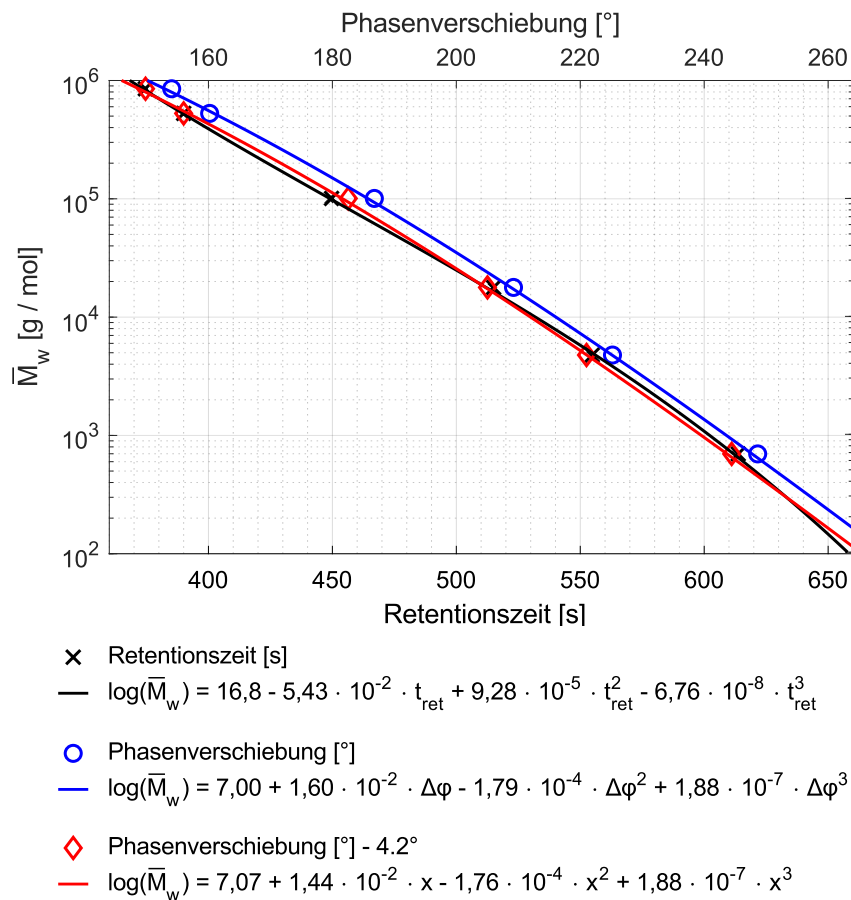


Abbildung 7.6: Vergleich der Molekulargewichtskalibrierungen, die mit der konventionellen SEC (Retentionszeit, t_{ret}) und der FT-SEC (Phasenverschiebung, $\Delta\varphi$) erstellt wurden. Bei der FT-SEC war das chromatographische Totvolumen größer, weshalb die Kalibrierung um $4,2^\circ$ (entspricht 10,5 s oder 0,18 mL) zu längeren Elutionszeiten hin verschoben wurde. Für einen direkten Vergleich der Kalibrierungen wurde diese Zeitverschiebung von der FT-SEC Kalibrierung abgezogen ($x = \Delta\varphi - 4,2^\circ$). Die Form der FT-SEC Kalibrierung weicht geringfügig von der Kalibrierung der konventionellen SEC ab. Mögliche Gründe hierfür werden im Abschnitt diskutiert. Modifiziert nach Matz et al. 2022.[153]

nach Gleichung 7.1.1, S. 108, 10,5 s oder 0,18 ml entspricht (bei einer Flussrate von 1 mL min^{-1}). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden $4,2^\circ$ von den $\Delta\varphi$ der FT-SEC Kalibrierung abgezogen. Diese phasenverschobenen Kalibrierpunkte sind in Abbildung 7.6 als graue Rauten eingezeichnet. Die FT-SEC Kalibrierung zeigt geringe Abweichungen zur konventionellen Kalibrierung. Es wird angenommen, dass mehrere Faktoren zu diesen geringfügigen Veränderungen in der Form beitragen. Neben dem oben bereits diskutierten Effekt bei der Superposition unterschiedlicher Gewichtsfraktionen wird die Phasenverschiebung der PS-Standards durch die lichtabsorptiven Restgaskomponenten modifiziert. Durch eine nicht-vollständige Entgasung verbleibt gelöstes Gas in der mobilen Phase (siehe Abschnitt 7.1.4, S. 110, und Anhang C.3, S. 186) und wird innerhalb der Säule aufgetrennt. Bei der konventionellen SEC eluieren diese gelösten Gaskomponenten typischerweise an der Permeationsgrenze und bilden die Systempeaks, die am Ende des Chromatogramms erscheinen.[37] Bei der FT-SEC Analyse überlagern die gelösten Gaskomponenten mit den Analyten, wodurch eine Superposition mit einer veränderten Phasenverschiebung erhalten wird.

Eine weitere mögliche Ursache für die Abweichungen in der Form der Kalibrierkurven könnte eine asymmetrische Bandenverbreiterung sein. Während in der konventionellen SEC eine asymmetrische Peakform die Position des Peakmaximums nicht beeinflusst,[178] führt diese bei der FT-SEC aufgrund

der Superposition der asymmetrischen Elutionsbande zu einer veränderten Phase des Antwortsignals. Die Effekte der asymmetrischen Bandenverbreiterung sollten abhängig von der Flussrate, den Analyteigenschaften (Molekulargewicht, chemische Zusammensetzung, Dispersität und Konzentration), der Periode und des verwendeten Lösungsmittels sein.

Die Ähnlichkeit der Kalibrierungen bestätigt, dass die Retardierung der Analyten innerhalb der Säule bei der FT-SEC und der konventionellen SEC Methode gleich sind und somit eine zuverlässige Molekulargewichtsbestimmung von Polymerproben mit einer engen Molekulargewichtsverteilung mittels FT-SEC vorgenommen werden kann.

7.2.2. Analyse von Polymermischungen mittels FT-SEC

Die verwendeten UVDs zeichnen nur eine einzige Intensität als Funktion der Elutionszeit oder des Elutionsvolumen auf, weshalb eine Superposition mehrerer sinusförmiger Konzentrationsprofile nicht direkt aufgelöst werden kann. Die Superposition zweier Sinuswellen mit gleicher Frequenz resultiert in ein Antwortsignal mit der gleichen Anregungsfrequenz aber unterschiedlicher Amplitude. Die Grundlagen zur Superposition von Sinuswellen wurden in Abschnitt 3.3.1, S. 26, beschrieben, wobei nachfolgend die Gleichungen 3.3.9, 3.3.10 und 7.1.2 (S. 26 und 109) verwendet wurden, um die Magnitude M und Phasenverschiebung $\Delta\varphi$ einer Superposition zweier PS-Standards zu berechnen. Die so vorhergesagten Magnituden M_{theo} und Phasenverschiebungen $\Delta\varphi_{\text{theo}}$ der Mischungen wurden im Anschluss experimentell verifiziert. Eine Übereinstimmung der M_{theo} und $\Delta\varphi_{\text{theo}}$ mit den experimentellen Werten M_{exp} und $\Delta\varphi_{\text{exp}}$ ist nur dann gegeben, wenn die im Antwortsignal bestimmten Magnituden und Phasenverschiebungen der reinen PS-Standards in der Mischung unverändert bleiben. Würden sich die beiden PS-Standards während der FT-SEC Messung gegenseitig beeinflussen oder würden sich die im vorherigen Abschnitt diskutierten asymmetrischen Bandenverbreiterungseffekte ändern, hätte dies eine Abweichung von M_{exp} und $\Delta\varphi_{\text{exp}}$ zu M_{theo} und $\Delta\varphi_{\text{theo}}$ zur Folge. Um den Effekt der Superposition zu veranschaulichen und zu untersuchen, ob sich die Analyten während der Trennung gegenseitig beeinflussen oder ob sich die asymmetrischen Bandenverbreiterungseffekte ändern, wurden Mischungen bestehend aus je zwei PS-Standards mit gleichen Konzentrationen hergestellt.

Zwei PS-Mischungen wurden hergestellt, indem die zur Kalibrierung verwendeten PS-Lösungen mit $c = 0,25 \text{ g L}^{-1}$ je im Verhältnis 50/50 (v/v%) gemischt wurden. In der Mischung lag folglich jeder PS-Standard mit $c = 0,125 \text{ g L}^{-1}$ vor. Bei der Mischung-1 (Mix-1) wurden die PS-Standards PS-0,682 kg mol^{-1} und PS-851 kg mol^{-1} verwendet, welche die größtmögliche Differenz der Phasenverschiebungen aufwiesen. Mischung-2 (Mix-2) bestand aus PS-526 kg mol^{-1} und PS-851 kg mol^{-1} , die die geringstmögliche Differenz der Phasenverschiebung aufwiesen. Die Magnitude M und Phasenverschiebung $\Delta\varphi$ der verwendeten PS-Standards mit $c = 0,25 \text{ g L}^{-1}$ sind in Tabelle 7.1 aufgelistet. Für die Berechnung von M_{theo} und $\Delta\varphi_{\text{theo}}$ der Mischungen 1 und 2 (Mix-1_{theo} und Mix-2_{theo}) wurden aufgrund der halben Konzentration die jeweiligen $M/2$ der PS-Standards verwendet. Die berechneten und experimentell ermittelten Werte beider Mischungen sind ebenfalls in Tabelle 7.1 aufgeführt. In Abbildung 7.7 sind die Chromatogramme von PS-0,682 kg mol^{-1} und PS-851 kg mol^{-1} mit $c = 0,25 \text{ g L}^{-1}$ gezeigt sowie die Superposition dieser (Mix-1). Abbildung 7.7 verdeutlicht, dass Mix-1 eine gewichtete Überlagerung der Einzelchromatogrammen von PS-851 kg mol^{-1} und PS-0,682 kg mol^{-1} ist. Diese Beobachtung wird durch die berechneten und experimentell bestimmten Werte von M und $\Delta\varphi$ von Mix-1 und Mix-2 in Tabelle 7.1 gestützt. Die maximale Abweichung zwischen den theoretischen und experimentellen $\Delta\varphi$ war für Mix-1 $199,3^\circ - 199,9^\circ = 0,6^\circ$. Nach Gleichung 7.1.1, S. 108, entspricht das einer Zeitverschiebung Δt von $\Delta t = 1,5 \text{ s}$. Die maximale Abweichung der Magnitude M wurde dagegen für Mix-2 erhalten, wobei die Magnitude von Mix-2_{exp} um $0,9804 - 0,9669 = 0,0135$ kleiner war als die berechnete Magnitude von Mix-2_{theo}, was einer Abweichung von 1,4 % entspricht. Somit stimmen die Werte sehr gut überein.

Tabelle 7.1: Phasenverschiebungen $\Delta\varphi$ und Magnituden M des UVD2 für die PS-Standards mit 0,682, 526 und 851 kg mol⁻¹ mit einer Konzentration von ungefähr $c = 0,25 \text{ g L}^{-1}$. Mix-1 bestand aus einer 50/50 (v/v%) Mischung von PS-0,682 kg mol⁻¹ und PS-851 kg mol⁻¹ und Mix-2 aus PS-526 kg mol⁻¹ und PS-851 kg mol⁻¹. Für die Mischungen wurden die theoretischen $\Delta\varphi$ und M berechnet und mit den experimentell bestimmten Werten verglichen. Die Werte wurden von Matz et al. 2022 übernommen.[153]

Probe	$\Delta\varphi$ [°]	M [-]
PS-0,682 kg mol ⁻¹	248,6	0,9374 ^a
PS-526 kg mol ⁻¹	160,2	0,9636
PS-851 kg mol ⁻¹	154,1	1,0000
Mix-1 _{theo}	199,3	0,6576
Mix-1 _{exp}	199,9	0,6599
Mix-2 _{theo}	157,1	0,9804
Mix-2 _{exp}	157,1	0,9669

^a Die Magnitude M ist etwas geringer, da die UV-inaktive alkyl-Endgruppe etwa 8 w/w% des Standards ausmachte.

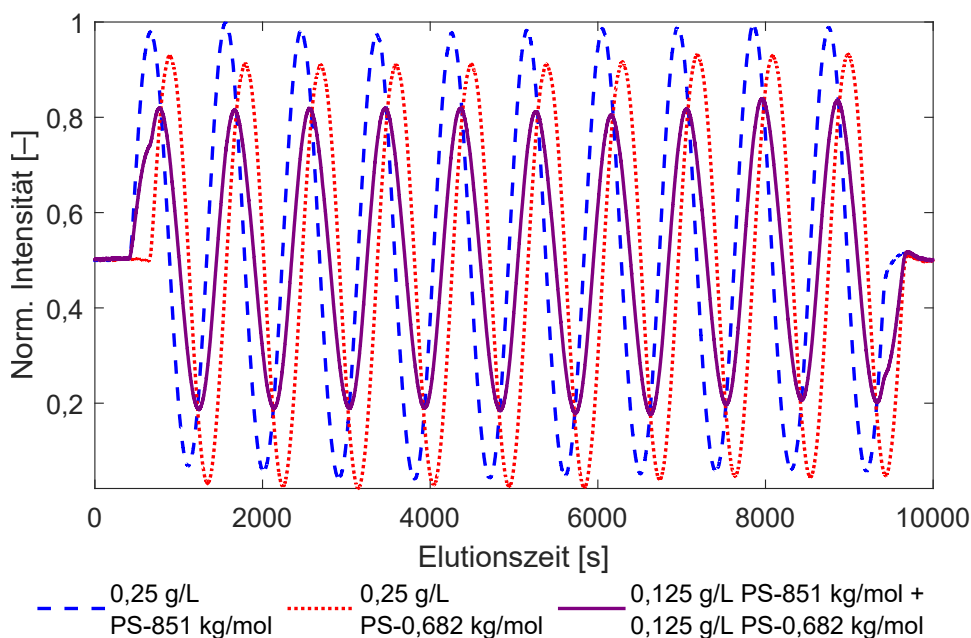


Abbildung 7.7: Chromatogramme des UVD2 reiner PS-Standards und der daraus hergestellten 50/50 (v/v%) Mischung (Mix-1, siehe Tabelle 7.1). Die Chromatogramme sind auf die maximale Intensität der PS-851 kg mol⁻¹ Messung normiert. Das Chromatogramm der Mischung ist eine Superposition der beiden reinen PS-Standards. Modifiziert nach Matz et al. 2022.[153]

Die UVDs, aber auch DRI Detektoren, können nur ein einziges Signal als Funktion der Zeit anzeigen, sodass eine Auflösung der Superposition im Antwortchromatogramm nur schwer möglich ist. Aufgrund der nicht-aufgelösten Superposition nimmt die Magnitude der Mischung ab und folglich auch das SNR. Bei einer Mischung aus zwei Komponenten mit derselben Magnitude und einer Phasenverschiebung von 180° zueinander, entspräche die erhaltene Superposition einer flachen Basislinie mit einem konstanten Wert, ähnlich zu einer destruktiven Interferenz zweier Wellen. Falls dieses Phänomen bei der FT-SEC auftreten würde, könnte die Periode verlängert werden. Die Fourier-Transformation einer konstanten Basislinie ergibt lediglich ein Signal bei der Nullfrequenz mit einer Magnitude, die der mittleren Intensität der Basislinie entspricht. Demnach können aus flachen Chromatogrammabschnit-

ten keine analytspezifischen Informationen gewonnen werden. In einem solchen Fall könnten die Anfangs- und Endregionen des sinusförmigen Antwortsignals Hinweise auf die Zusammensetzung der Probenmischung geben, da das erste Maximum des zuerst eluierenden Analyten und das letzte Minimum des zuletzt eluierenden Analyten nicht von der Superposition beeinträchtigt sein sollten.

Bei der Analyse einer Probe, bestehend aus einer Mischung chemisch unterschiedlicher Analyten, können Detektoren mit erhöhter chemischer Selektivität, wie z. B. ein NMR Spektrometer, die einzelnen Elutionsprofile auflösen, wie in Abschnitt 7.2.5, S. 123, gezeigt ist. Durch die zusätzliche spektrale Auflösung ist es möglich die Magnitude und Phasenverschiebung separat für jeden Analyten zu bestimmen. Die FT-SEC Analyse einer Probe bestehend aus chemisch identischen Komponenten ist aber selbst mit spektroskopischer Detektion nicht direkt auflösbar. Potentiell kann eine Superposition aus N Komponenten mit verschiedenen Elutionszeiten aufgelöst werden, indem $2 \cdot N$ Chromatogramme mit unterschiedlichen Superpositionen dieser aufgenommen werden.[164] Solche Chromatogramme können erhalten werden, indem (1) ein multifrequentes Anregungssignal verwendet wird, (2) zusätzliche Detektoren während der Trennung Chromatogramme aufnehmen, z. B. realisierbar durch eine alternierende Anordnung von Säulen und Detektoren und (3) eine wiederholte Messung derselben Probe unter unterschiedlichen Bedingungen, die die Elutionszeit beeinflussen, wie z. B. eine andere Säulentemperatur, -länge oder -packung. Durch eine Linearkombination der Chromatogramme sollte eine Superposition prinzipiell auflösbar sein.[164] Praktisch ist dies für eine Polymerprobe nur schwer umsetzbar, da für jede Molekulargewichtsfraction ein Chromatogramm aufgenommen werden müsste. Um eine Mischung verschiedener Polymerproben aufzulösen, müssten daher zuvor die jeweiligen Phasenverschiebungen bestimmt werden.

Eine mögliche Charakterisierungsmethode zur Quantifizierung der Molekulargewichtsverteilung einer Polymerprobe, könnte eine Auswertung der Magnitude relativ zu einer Referenzmagnitude sein. Eine mögliche Referenzmagnitude könnte vom Chromatogramm des UVD1 oder von einer wiederholten Messung ohne chromatographische Auftrennung vom UVD2 erhalten werden. Die Magnitude einer Superposition hängt von der Konzentration der einzelnen Komponenten und deren Phasendifferenz zueinander ab, wie in Gleichung 7.2.1, S. 113, erläutert. Da jede Molekulargewichtsfraction einer Polymerprobe eine spezifische Phasenverschiebung aufweist, ist die Differenz der Phasenverschiebungen zwischen den Komponenten größer, je breiter die Molekulargewichtsverteilung ist. Deshalb sollte mit zunehmender Dispersität die Magnitude der Superposition abnehmen.

Die konventionelle HPLC Analyse einer Probe beruht auf der örtlichen Auftrennung der Analyten, wodurch die einzelnen Peaks ausgewertet werden können. Für eine präzise Auswertung der Peaks sollten diese basisliniengetrennt vorliegen. Bei der FT-LC gibt es keine örtliche Auftrennung wie bei der konventionellen HPLC, da die Analyten sowohl vor, als auch nach der Säule als Gemisch vorliegen. Daher gibt es in der FT-LC keine Anforderung bezüglich der Basislinienseparation der Analyten. Die Analyse einer Probe mittels FT-LC ist möglich, sofern die Retentionszeitunterschiede der Komponenten größer sind als die instrumentelle und methodische Unsicherheit. Die methodische Unsicherheit der FT-SEC wurde noch nicht bestimmt, es wird jedoch angenommen, dass die erforderliche minimale Retentionszeitdifferenz für die FT-LC geringer ist als für die konventionelle HPLC. Diese vorläufige Abschätzung basiert auf dem Vergleich der Genauigkeit der Vorhersage der theoretischen Phasenverschiebungen der Mischungen (siehe Tabelle 7.1) mit der Peakbreite (Basisbreite) eines konventionellen HPLC Chromatogramms. Während die Phasenverschiebung mit einer Genauigkeit von $0,6^\circ$ (entspricht 1,5 s) vorhergesagt werden konnte, liegt die Gesamtbreite eines Peaks in der Größenordnung von einer Minute, was gemäß Gleichung 7.1.1, S. 108, etwa 24° entspricht. Dementsprechend könnten Analytmische, die mit der konventionellen HPLC aufgrund einer unzureichenden Separation nicht analysiert werden können, möglicherweise trotzdem mit der FT-LC aufgelöst werden. Darüber hinaus könnte bei der FT-LC die Messzeit potentiell durch eine Erhöhung der Flussrate oder durch eine Verkürzung der Säulenlänge reduziert werden, was auch eine Abnahme der Retentionszeitdifferenzen zur Folge hätte.

7.2.3. Auswirkung der Periode auf das SNR

Um die Auswirkung der Periode T auf das SNR zu untersuchen, wurden FT-SEC Messungen mit $T = 60, 300, 600, 900, 1\,300$ und $3\,600$ s in zweifacher Ausführung durchgeführt. Lösungen von PS-100 kg mol^{-1} mit $c = 0,1 \text{ g L}^{-1}$ wurden mit 12 Oszillationen gemessen. Für jede Messreihe wurde eine separate PS-Lösung hergestellt. Für die Auswertung durch die DFT wurden aus dem Antwortchromatogramm (UVD2) die mittleren zehn Oszillationen verwendet. Dementsprechend variierte die Messzeit des ausgewerteten Datensatzes zwischen 600 und 36 000 s. Das SNR wurde zweimal normalisiert: einmal zur Quadratwurzel von der Messzeit des ausgewerteten Datensatzes $t_m^{1/2}$ und anschließend auf das höchste $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ innerhalb einer Messreihe. Von beiden Datensätze wurden mit Gleichung 7.2.2 wurde für jede untersuchte Periode die Differenz der $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ bestimmt (*Range*),

$$\text{Range} = y_{T, \max} - y_{T, \min}, \quad (7.2.2)$$

wobei $y_{T, \max}$ und $y_{T, \min}$ das maximale und minimale $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ bei der gemessenen Periode T war. Für die gemessenen Perioden wurden die $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ gemittelt und sind in Abbildung 7.8 dargestellt.

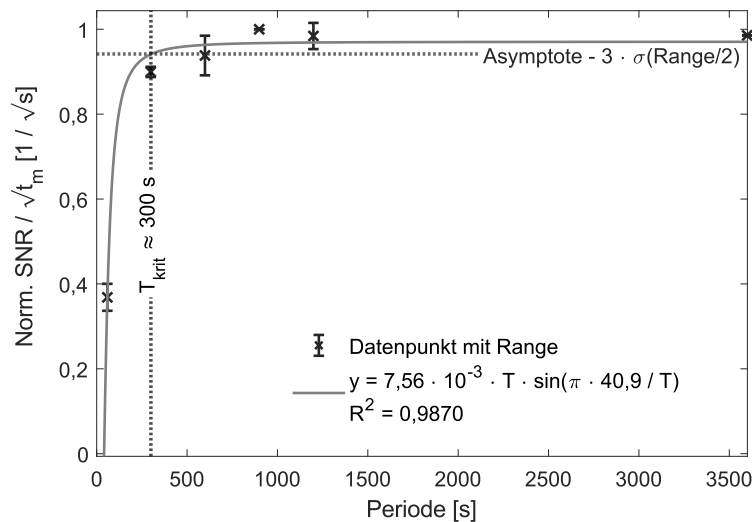


Abbildung 7.8: Auswirkung der Periode T auf das SNR , normiert auf die Quadratwurzel der Messzeit $t_m^{1/2}$. Zwei Messreihen mit jeweils einer frisch hergestellten PS-Lösung ($c = 0,1 \text{ g L}^{-1}$, $M_p = 100,0 \text{ kg mol}^{-1}$, $\bar{M}_w = 96,0 \text{ kg mol}^{-1}$) wurden gemessen. Bei jeder Periode ist die Differenz der $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ (*Range*, Fehlerbalken) und das gemittelte $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ dargestellt. Das $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ steigt zu längeren Perioden hin an und nähert sich einem Plateau an. Zur Anpassung dieses Trends wurde die Anpassungsfunktion in Gleichung 7.2.6 verwendet, wobei y dem $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ entspricht. Anschließend wurde die kritische Periode T_{krit} bestimmt, bei der das $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ signifikant vom Plateauwert abweicht. Dafür wurde ein Grenzwert ermittelt, indem vom Plateauwert die dreifache Standardabweichung der $\text{Range}/2$ ($\sigma(\text{Range}/2)$) subtrahiert wurde. Die Verringerung von $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ zu kürzeren Perioden hin ist auf die Bandenverbreiterung zurückzuführen. Modifiziert nach Matz et al. 2022.[153]

In Abbildung 7.8 nimmt das $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ zu längeren Perioden hin zu und nähert sich einem Plateauwert an. Theoretisch sollte das $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ unabhängig von der Periode sein, da das SNR nur proportional zu $t_m^{1/2}$ skaliert.[64] Die Abnahme von $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ zu kürzeren Perioden hin entstand durch eine abnehmende Magnitude der Antwortchromatogramme, die in Abbildung C.11, Anhang C.4, S. 188, dargestellt sind. Die Abnahme der Magnitude folgt aus der Superposition unterschiedlicher Molekulargewichtsfractionen der Polymerprobe und aus der Bandenverbreiterung. Die Bandenverbreiterung

findet im Totvolumen außerhalb (z. B. Volumen der Mischkammer, Pumpe, Kapillaren und Flusszellen) und innerhalb der Säule statt.[178] Aufgrund der Bandenverbreiterung vermischen sich benachbarte Volumeneinheiten, wodurch das Anregungssignal verbreitert wurde. Durch die Verbreiterung des sinusförmigen Analytkonzentrationsprofils nahm die Analytkonzentration am Maximum ab und am Minimum zu, wodurch die Magnitude der Oszillation insgesamt abnahm. Je kürzer die Periode, desto höher ist der Analytkonzentrationsgradient pro Volumeneinheit. Unter der Annahme, dass die Bandenverbreiterung immer denselben Volumenbereich beeinflusst, nimmt der Effekt der Bandenverbreiterung mit abnehmender Periode zu. Wenn die Periode lang genug ist, dass sich die Konzentrationen an den Extrema nicht durch die Bandenverbreiterung verändern, ist die Magnitude maximal und konstant für alle längeren Perioden.

Basierend auf dieser Annahme wurde die semiempirische Anpassungsfunktion in Gleichung 7.2.6 hergeleitet. Das von der Bandenverbreiterung betroffene Volumen wird vereinfacht als rechteckiges Zeit- oder Volumensignal betrachtet, innerhalb dessen eine homogene Durchmischung der mobilen Phase stattfindet. Die Verbreiterung des sinusförmigen Analytkonzentrationsprofils wird dann als Faltung des sinusförmigen Analytkonzentrationsprofils mit dieser Rechteckfunktion verstanden. Nach dem Faltungstheorem in Gleichung 3.3.13, S. 26, ist eine Faltung zweier Funktionen in der Zeitdimension gleich der Multiplikation der Fourier-Transformierten in der Frequenzdomäne. Die Fourier-Transformierte eines Sinus wurde in Gleichung 3.3.14, S. 27, ((I) δ -Funktion) und die einer Rechteckfunktion in Gleichung 3.3.18, S. 27, ((II) Sinc-Funktion) eingeführt. Die Herleitung der Anpassungsfunktion ist in Gleichungen 7.2.3 bis 7.2.6 gezeigt.

$$M = \underbrace{M_0(v_0)}_{\text{(I) Magnitude der } \delta\text{-Funktion an } v_0} \cdot \underbrace{2 \frac{\sin(\omega \frac{t_0}{2})}{\omega}}_{\text{(II) Sinc-Funktion eines Rechtecks mit der Breite } t_0}, \quad (7.2.3)$$

$$= M_0(v_0) \cdot 2 \frac{\sin\left(\frac{2\pi}{T} \frac{t_0}{2}\right)}{\frac{2\pi}{T}}, \quad (7.2.4)$$

$$= \frac{M_0(v_0)}{\pi} T \sin\left(\frac{\pi t_0}{T}\right), \quad (7.2.5)$$

$$= AT \sin\left(\frac{\pi t_0}{T}\right), \quad (7.2.6)$$

mit der Periode T des sinusförmigen Konzentrationsprofils, mit der ursprünglichen Magnitude $M_0(v_0)$ vor der Bandenverbreiterung und der Breite der Rechteckfunktion t_0 . Die Magnitude nach der Faltung ist M und entspricht $SNR \cdot t_m^{-1/2}$.

Die Gleichung 7.2.6 wurde genutzt um die gemittelten $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ in Abbildung 7.8 anzupassen. Der R^2 Wert von $R^2 = 0,9870$ bestätigt, dass die Anpassungsfunktion die Daten gut beschreibt. Unter Verwendung der Regel von L'Hospital wurde ein $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ -Plateauwert von $0,97 \text{ s}^{-1/2}$ bestimmt.[179] Zur Feststellung, bei welcher Periode das $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ signifikant von diesem Wert verringert war, wurde die dreifache Standardabweichung der *Range*/2 abgezogen, was den Wert $0,94 \text{ s}^{-1/2}$ ergab. Zuvor wurde mit einem David-Test bestätigt, dass die *Range*/2 normalverteilt und die Streuung der Daten somit unabhängig von der Periode war.[180] In Abbildung 7.8 ist bei $0,94 \text{ s}^{-1/2}$ eine horizontale gestrichelte Linie eingezeichnet, die die Anpassungsfunktion bei der kritischen Periode T_{kirt} von $T_{\text{krit}} \approx 300 \text{ s}$ schneidet. Für Perioden $T < 300 \text{ s}$ ist die Magnitude signifikant reduziert. Deshalb wird bei dem verwendeten System und einer Flussrate von 1 mL min^{-1} empfohlen eine Periode von $T \geq 300 \text{ s}$ zu wählen, sodass die Bandenverbreiterung die Magnitude nur geringfügig beeinträchtigt.

7.2.4. Sensitivitätsvergleich am Konzentrationsüberladungslimit der Säule

In diesem Abschnitt wird die Sensitivitätssteigerung durch Anwendung der FT-SEC im Vergleich zur konventionellen SEC bestimmt. Zunächst wurde hierfür das Konzentrationsüberladungslimit der analytischen SDV Säule (30×8 mm Innendurchmesser) bestimmt. Für den Sensitivitätsvergleich wurden die Messungen direkt unter den Konzentrationsüberladungslimits herangezogen.

Bei der konventionellen SEC zeigen sich Konzentrationsüberladungseffekte zunächst durch eine Peakverbreiterung und eine Zunahme des Retentionsvolumens.[38, 181] In der aktuellen Umsetzung der FT-SEC wird das Molekulargewicht über die Phasenverschiebung mithilfe der Molekulargewichtskalibrierung aus Abbildung 7.6, S. 114, bestimmt. Das Konzentrationsüberladungslimit wurde als die Konzentration definiert, bei der das Molekulargewicht relativ zum Molekulargewicht einer Analyse bei niedriger Konzentration um mehr als 10 % verringert war. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass das Säulenüberladungslimit über der Linearitätsgrenze des UVD2 bei der Detektionswellenlänge $\lambda = 260$ nm von $c \approx 1,00$ g L⁻¹ lag. Deshalb wurde die Detektionswellenlänge auf $\lambda = 236$ nm reduziert, da PS gelöst in THF dort einen niedrigeren Extinktionskoeffizient aufweist. Die Bestimmung der Linearitätsgrenze bei $\lambda = 236$ nm ist im Anhang C.2, S. 184, beschrieben und betrug $c \approx 3,80$ g L⁻¹ (Konzentration in der Detektorflusszelle). Die Experimente wurden mit einem, von Dr. Matthias Heck synthetisierten, PS-Standard mit einem $\bar{M}_w = 75,5$ kg mol⁻¹ und $\bar{D} = 1,02$ durchgeführt. Mit beiden Methoden wurden Lösungen mit den Konzentrationen von 0,25, 1,00, 1,75, 2,50, 3,00, 3,40 und 3,60 g L⁻¹ analysiert. Zusätzlich wurde mit der konventionellen SEC noch eine Lösung mit 4,00 g L⁻¹ gemessen. Für die konventionelle SEC wurde ein Injektionsvolumen von $V_i = 100$ μ L verwendet. Für die FT-SEC hatte das Anregungssignal eine Periode von $T = 900$ s mit fünf Oszillationen, von denen, entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 7.1.4, S. 110, die mittleren drei für die Auswertung genutzt wurden. Das \bar{M}_w wurde mit den Kalibrierungen aus Abbildung 7.6, S. 114, bestimmt. Die Bestimmung der Säulenüberladungslimits sind in Abbildung 7.9 gezeigt.

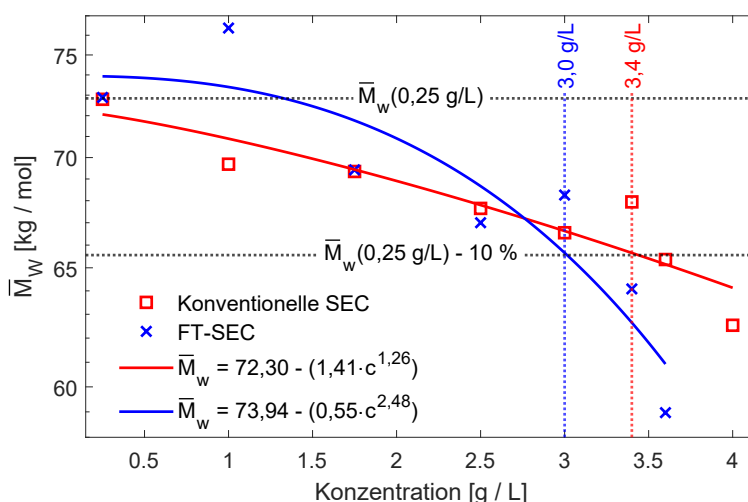


Abbildung 7.9: Konzentrationsüberladungslimits der analytischen SDV Säule für die FT-SEC und die konventionelle SEC Methode. Bestimmt wurde das Gewichtsmittel des Molekulargewichts \bar{M}_w bei verschiedenen Konzentrationen. Das Konzentrationsüberladungslimit war die Konzentration, bei der das \bar{M}_w eine Abweichung von 10 % relativ zu dem \bar{M}_w bei $c = 0,25$ g L⁻¹ aufwies. Für die konventionelle Methode wurde ein Injektionsvolumen von $V_i = 100$ μ L und für die FT-SEC eine Periode von $T = 900$ s mit 5 Oszillationen verwendet. Das Konzentrationsüberladungslimit bei der FT-SEC lag bei $c = 3,00$ g L⁻¹ und bei der konventionellen SEC bei $c = 3,40$ g L⁻¹. Es wird angenommen, dass die Abweichung der Säulenüberladungsgrenzen auf eine unterschiedliche Verdünnung der Anregungssignale zurückzuführen ist. Modifiziert nach Matz et al. 2022.[153]

Für beide Methoden nimmt wie erwartet das apparente \overline{M}_w mit steigender injizierter Konzentration ab. Zur Beschreibung dieses Trends wurde die Anpassungsfunktion in Gleichung 7.2.7 verwendet,

$$\overline{M}_w = A - (B \cdot c^D), \quad (7.2.7)$$

mit dem y-Achsenabschnitt A , dem Skalierungsfaktor B , der PS Konzentration c und dem Exponent D . Der Parameter A entspricht dem \overline{M}_w ohne Konzentrationsüberladung und B sowie D beschreiben den Zusammenhang der Konzentrationsüberladungsphänomene mit der Konzentration.

Das ermittelte \overline{M}_w der PS-75,5 kg mol⁻¹ Lösung mit $c = 0,25$ g L⁻¹ wurde als Referenzwert verwendet. Niedrigere Konzentrationen wurden nicht analysiert, da der Einfluss der gelösten Gaskomponenten auf das Antwortchromatogramm mit abnehmender PS-Konzentration zunahm und somit eine präzise Bestimmung der Phasenverschiebung vom PS erschwerte. Das Konzentrationsüberladungslimit wurde als die Konzentration definiert, bei der das apparente \overline{M}_w der $c = 0,25$ g L⁻¹ Messung um mehr als 10 % reduziert war. Für die FT-SEC war dies bei $c = 3,00$ g L⁻¹ und für die konventionelle SEC bei $c = 3,40$ g L⁻¹ der Fall. Demnach können mit der konventionellen SEC Methode höhere Analytkonzentrationen (Injektionskonzentration) gemessen werden, ohne dass die Säule überladen ist.

Zur Beurteilung der tatsächlichen Analytkonzentration am Maximum des Injektionssignals wurde für jede Messung der Verdünnungsfaktor DF am Signalmaximum der Antwortchromatogramme (UVD2) mit Gleichung 7.2.8 bestimmt,

$$DF = \frac{c_{\text{Probe}}}{c_{\text{UVD2}}}, \quad (7.2.8)$$

wobei c_{Probe} die Konzentration der analysierten PS-Lösung ist und c_{UVD2} die PS-Konzentration in der Detektorflusszelle vom UVD2. Die c_{UVD2} wurden mit der linearen Anpassungsfunktion von der Bestimmung der Linearitätsgrenze berechnet, die in Anhang C.2, S. 184, enthalten ist.

Der Verdünnungsfaktor für die FT-SEC betrug im arithmetischen Mittel etwa 1,0. Dies bestätigt die Beobachtung aus Abbildung 7.8, S. 118, dass die Verdünnung des Anregungssignals vernachlässigbar ist, wenn $T \geq 300$ s beträgt. Bei der konventionellen SEC betrug der Verdünnungsfaktor am Peakmaximum im arithmetischen Mittel etwa 3,0, was zeigt, dass eine signifikante Verdünnung des Anregungssignals während der SEC Messung stattfand. Allerdings unterschieden sich die Konzentrationsüberladungslimits beider Methoden kaum ($c = 3,4$ g L⁻¹ für konventionelle SEC und $c = 3,0$ g L⁻¹ für FT-SEC), obwohl entsprechend des Verdünnungsfaktors ein Unterschied um den Faktor 3 erwartet wurde. Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich auf die maximalen Probenkonzentrationen der Anregungssignale zurückzuführen, die direkt nach der Injektion am Anfang der Säule ähnlicher sind als nach der Trennung und deshalb die Konzentrationsüberladungsphänomene zu Beginn der Analyse stärker ausgeprägt sind. Im Anschluss wurde für beide Methoden die SNR der Messungen unter dem Konzentrationsüberladungslimit verglichen. Ausgewertet wurden für die FT-SEC die Messungen mit 0,25, 1,00, 1,75, 2,50 und 3,00 g L⁻¹ und für die konventionelle SEC zusätzlich das SNR der 3,4 g L⁻¹ Messung. Für die konventionelle SEC wurde das SNR berechnet als die Intensität am Peakmaximum geteilt durch die einfache Standardabweichung des signalfreien Bereichs zwischen 120 und 180 s. Für beide Methoden wurde die Masse des analysierten PS $m(\text{PS})$ berechnet. Dafür wurde für die konventionelle SEC Gleichung 7.2.9 und für die FT-SEC Gleichung 7.2.10 verwendet.

$$m(\text{PS})_{\text{SEC}} = V_i \cdot c(\text{PS}), \quad (7.2.9)$$

$$m(\text{PS})_{\text{FT-SEC}} = \frac{t_m \cdot F \cdot c(\text{PS})}{2}, \quad (7.2.10)$$

mit der Konzentration an PS, $c(\text{PS})$, dem Volumen der Injektionsschleife V_i , der Datenaufnahmezeit des ausgewerteten Chromatogrammabschnitts t_m und der Flussrate F in mL s⁻¹. Der Faktor 2 im Divisor von Gleichung 7.2.10 beschreibt, dass die mobile Phase im Durchschnitt nur zur Hälfte aus PS-Lösung

bestand, während die andere Hälfte aus purem THF bestand.

Die Messzeit t_m für ein Chromatogramm einer konventionellen Messung wurde durch den Systempeak begrenzt und betrug $t_m = 780$ s. Für die FT-SEC Messung entsprach t_m der Messzeit der ausgewerteten Oszillationen und war $t_m = 3 \cdot 900$ s = 2700 s. Die $m(\text{PS})$ und SNR wurden auf die entsprechenden $t_m^{1/2}$ normiert. Die Werte werden in Abbildung 7.10 verglichen.

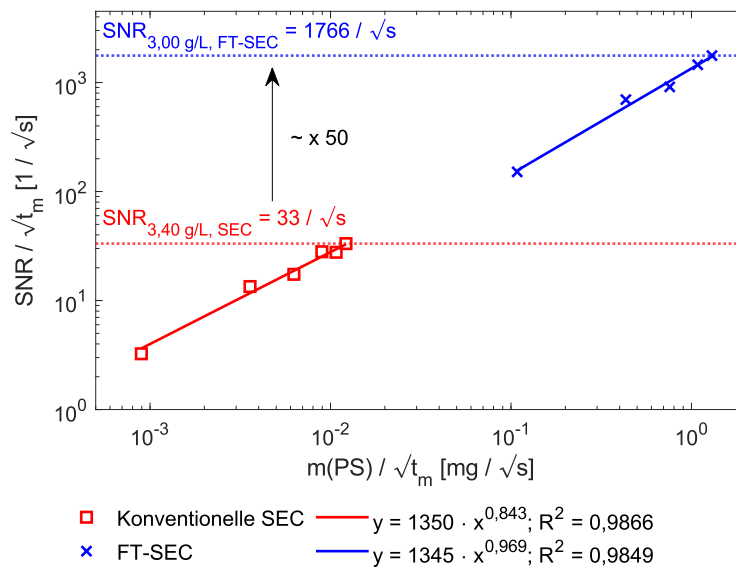


Abbildung 7.10: Sensitivitätsvergleich der FT-SEC mit der konventionellen SEC Methode. Das SNR ist gegen die Masse an analysiertem PS $m(\text{PS})$ aufgetragen, wobei beide Werte auf die Quadratwurzel der jeweiligen Datenaufnahmezeit $t_m^{1/2}$ normiert wurden. Die Datenpunkte wurden von den Messungen unterhalb der in Abbildung 7.9 eingezeichneten Konzentrationsüberladungslimits bestimmt. Das y in der Anpassungsfunktion entspricht dem $\text{SNR} \cdot t_m^{-1/2}$ und x dem $m(\text{PS}) \cdot t_m^{-1/2}$. Die $\text{SNR} \cdot t_m^{-1/2}$ der Messungen am Konzentrationsüberladungslimit wurden zur Beurteilung der Sensitivitätssteigerung herangezogen. Für diese Messungen ist das $\text{SNR} \cdot t_m^{-1/2}$ der FT-SEC um ein Faktor 50 höher als das $\text{SNR} \cdot t_m^{-1/2}$ der konventionellen SEC. Modifiziert nach Matz et al. 2022.[153]

Die Datenpunkte beider Messreihen wurden an ein Potenzgesetz nach Gleichung 7.2.11 angepasst,

$$y = a \cdot x^b, \quad (7.2.11)$$

wobei y dem $\text{SNR} \cdot t_m^{-1/2}$ und x dem $m(\text{PS}) \cdot t_m^{-1/2}$ entspricht. Das a ist ein Skalierungsfaktor und b ein Exponent, der für einen idealen linearen Zusammenhang $b = 1,0$ annimmt.

Für die FT-SEC ist $b = 0,969$ und für die konventionelle SEC $b = 0,843$. Beide Exponenten sind nahe 1,0 und bestätigen den linearen Zusammenhang der Datenpunkte. Die Abweichungen vom idealen linearen Zusammenhang sind wahrscheinlich auf Fluktuationen und Drifts der Basislinie zurückzuführen, die den Rauschwert beeinflussten. Die R^2 von $R^2 = 0,9849$ für die FT-SEC und $R^2 = 0,9866$ für die konventionelle SEC zeigen, dass die Daten trotz der leichten Streuung der Datenpunkte gut dargestellt werden.

Zur Quantifizierung der Sensitivitätssteigerung wurde das $\text{SNR} \cdot t_m^{-1/2}$ beim Säulenüberladungslimit verglichen. Für die $c = 3,00$ g L⁻¹ FT-SEC Messung war $\text{SNR} \cdot t_m^{-1/2} = 1766$ s^{-1/2} und für die konventionelle SEC $\text{SNR} \cdot t_m^{-1/2} = 33$ s^{-1/2}, was einer Verbesserung um den Faktor 50 entspricht. Das deutlich gesteigerte $\text{SNR} \cdot t_m^{-1/2}$ für die FT-SEC ist auf die kontinuierliche Analytinjektion zurückzuführen, wodurch in derselben Zeit deutlich mehr Analyt gemessen werden kann, wie in der Methodenvorstellung in

Abbildung 7.1, S. 104, bereits hervorgehoben wurde. Da bei der konventionellen SEC nur ein schmales Analytinjektionsprofil gemessen wird, ist das $m(\text{PS}) \cdot t_m^{-1/2}$ deutlich geringer als bei der FT-SEC. Da das $\text{SNR} \cdot t_m^{-1/2}$ linear mit $m(\text{PS}) \cdot t_m^{-1/2}$ zunimmt, wie in Abbildung 7.10 zu sehen ist, wird deshalb für die FT-SEC eine deutlich höhere $\text{SNR} \cdot t_m^{-1/2}$ erreicht.

Aufgrund des linearen Anstiegs von $\text{SNR} \cdot t_m^{-1/2}$ mit $m(\text{PS}) \cdot t_m^{-1/2}$ ist es denkbar, dass das $\text{SNR} \cdot t_m^{-1/2}$ für konventionelle SEC verbessert werden kann, wenn ein Injektionsvolumen von 1000 μL verwendet wird. Bei der LAC-NMR Optimierung wurde in Abbildung 6.12b, S. 82, gezeigt, dass neben der Peakintensität auch die Peakbreite mit dem Injektionsvolumen zunahm. Dadurch war der Faktor, um den die Peakintensität zunahm, deutlich geringer als der Faktor, um den die injizierte Analytmenge erhöht wurde. Es ist anzunehmen, dass ein ähnlicher Effekt in der SEC auftreten wird. Daher würde bei der konventionellen SEC das $\text{SNR} \cdot t_m^{-1/2}$ durch eine Vergrößerung des injizierten Volumens nicht linear mit $m(\text{PS}) \cdot t_m^{-1/2}$ steigen.

Trotz der Normalisierung von SNR und $m(\text{PS})$ auf $t_m^{1/2}$ ist ein Vergleich beider Methoden schwierig, da die Probeninjektion grundlegend unterschiedlich ist. Während die konventionelle SEC Methode eine geringere Empfindlichkeit aufweist, erfordert die FT-SEC Methode eine deutlich längere Messzeit, da die Periode der FT-SEC dem Trennbereich der Säule entsprechen und mindestens drei Oszillationen gemessen werden sollte (siehe Abschnitt 7.1.3, S. 108 und Abschnitt 7.1.4, S. 110). Obwohl die längere Messzeit zunächst nachteilig erscheint, ist dies auch ein Vorteil der FT-SEC Methode. Aufgrund des stationären Charakters der FT-SEC Methode kann die Datenerfassung beliebig verlängert werden, wodurch das SNR proportional zu $t_m^{1/2}$ steigt. Folglich kann das SNR allein durch eine Verlängerung der Messzeit gesteigert werden. Dies erscheint besonders bei Proben mit geringer Konzentration in Kombination mit Detektoren geringer Empfindlichkeit, z.B. NMR oder IR, von Vorteil.

7.2.5. Anwendung der FT-LC in der LAC-NMR Kopplung

In diesem Abschnitt wurde die FT-LC in der LAC-NMR Kopplung angewandt, um zu bestätigen, dass die Retardierung der Analyten in der LAC für die FT-LC und die konventionelle Injektionsmethode gleich sind. Darüber hinaus sollte demonstriert werden, dass die spektrale Auflösung der NMR Detektion eine Auflösung der jeweiligen oszillierenden Antwortchromatogramme ermöglicht. Schließlich wurde die Sensitivitätssteigerung durch die Anwendung der FT-LAC-NMR im Vergleich zur konventionellen, vollständig optimierten LAC-NMR Methodik abgeschätzt.

Für die Auflösung zweier Analyten in der FT-LAC-NMR ist es wichtig, dass die Analyten spezifische NMR Signale besitzen, die sich nicht überlagern. In Kapitel 6 wurde die LAC-NMR Optimierung mit einem Modellsystem bestehend aus fünf Parabenen durchgeführt. In Abbildung 6.2, S. 62, sind deren NMR Spektren dargestellt. Anhand dieser Spektren wurden Methyl- und Propylparaben als geeignete Analyten ausgewählt. Abbildung 7.11 zeigt die Überlagerung der NMR Spektren dieser Analyten aus Abbildungen 6.2a und 6.2c. Die Proben wurden mit 30 g L^{-1} in deuteriertem Aceton/Wasser (60/40 v/v%) unter statischen Bedingungen mit 4 Scans gemessen. Zusätzlich ist ein NMR Spektrum einer Mischung von Methyl- und Propylparaben mit jeweils $0,78 \text{ g L}^{-1}$ in protoniertem Aceton/Wasser (60/40 v/v%) gezeigt. Dieses Spektrum wurde ebenfalls mit 4 Scans unter statischen Bedingungen aufgenommen, wobei zusätzlich PRESAT zur Lösungsmittelunterdrückung angewandt wurde.

In Abbildung 7.11 sind geeignete analytspezifische Signale markiert: das Methoxysignal ($-\text{OCH}_3$) von Methylparaben bei 4,18 ppm und das Methylsignal ($-\text{CH}_3$) von Propylparaben bei 1,30 ppm. Diese Signale wurden ausgewählt, da sie am weitesten von den Lösungsmittelmaxima entfernt waren (Wasser bei 4,79 ppm und Aceton bei 2,44 ppm) und daher am wenigsten durch PRESAT oder Änderungen der Lösungsmittelsignalform beeinflusst wurden. Die aromatischen Signale, die während der LAC-NMR

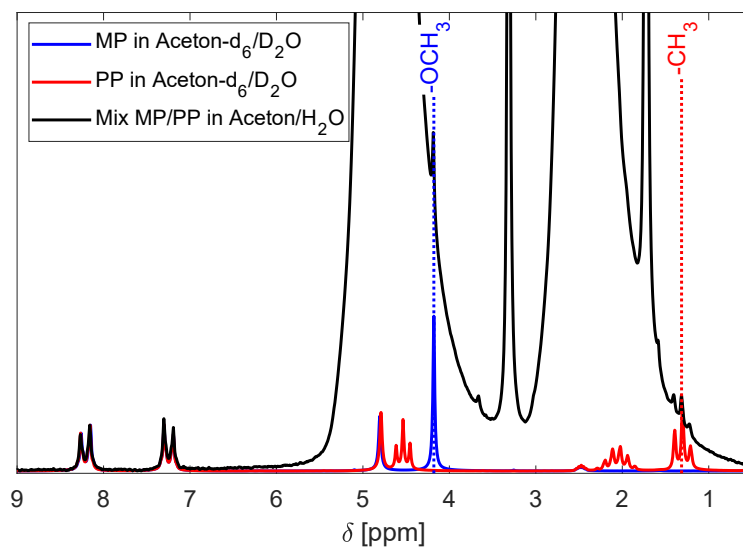


Abbildung 7.11: Geeignete NMR Signale für die Auflösung einer FT-LAC-NMR Analyse der Mischung von Methyl- und Propylparaben. Gezeigt ist das NMR Spektrum von Methylparaben (MP, in Blau) und Propylparaben (PP, in Rot), sowie deren Mischung (in Schwarz). Die Lösungen der reinen Analyten wurden mit 30 g L^{-1} mit deuteriertem Aceton/Wasser (60/40 v/v%) hergestellt und die der Mischung mit jeweils $0,78 \text{ g L}^{-1}$ und protoniertem Aceton/Wasser (60/40 v/v%). Die Spektren wurden jeweils auf die gemittelte Intensität der aromatischen Signale normiert. Das Methoxysignal ($-\text{OCH}_3$) von Methylparaben und das Methylsignal ($-\text{CH}_3$) von Propylparaben überlagern nicht und eignen sich daher zur chromatographischen Auflösung der FT-LAC-NMR Analyse.

Methodenoptimierung ausgewertet wurden sind ungeeignet, da diese sich überlagern und deshalb in der FT-LAC-NMR Messung eine Superposition bilden, ähnlich zu den PS-Mischungen in Abbildung 7.7, S. 116.

Für die FT-LAC-NMR Messung wurde der experimentelle FT-LC Aufbau in Abbildung 7.2, S. 107, mit dem 80 MHz NMR Spektrometer erweitert, das nach der Säule (semipräparative C_{18}) vor dem UVD2 platziert wurde. Für die FT-LAC-NMR Messung wurde die NMR Aufnahmemethode 5 verwendet, mit einer Wiederholzeit pro Scan von 1,4 s (siehe Tabelle 6.4, S. 74). Die Dauer einer Periode betrug $T = 2436 \text{ s}$ (entspricht 40,6 min) und war lang genug damit beide Parabene innerhalb des ersten Zyklus eluierten (Retentionszeit von Propylparaben 30,8 min, siehe Tabelle 6.1, S. 61). Zudem entsprach die Anzahl an Scans pro Periode einer ganzen Zahl. Ein kosinusförmiges Anregungssignal wurde gewählt (Start bei 0% Volumenanteil der Analytlösung, 100% Lösungsmittel) und 6-mal wiederholt. Da die Zeit einer zusätzlichen Periode aufgrund der Retardierung hinzugezählt werden muss, betrug somit die gesamte Messdauer 17 052 s, was etwa $(6+1) \cdot 40,6 \text{ min} \approx 282 \text{ min}$ entspricht. Mit einer Wiederholzeit pro Scan von 1,4 s hätten bei einem Scan pro Spektrum 12 180 Spektren aufgenommen werden müssen. Dieser Datensatz konnte aufgrund der Größe allerdings nicht abgespeichert werden. Deshalb wurden die Spektren mit 4 Scans pro Spektrum aufgenommen.

Zum Vergleich der Retardierung in der konventionellen LAC und der FT-LAC ist es erforderlich unter dem Konzentrationsüberladungslimit der Säule zu bleiben. Damit wird sichergestellt, dass die Retentionszeiten unabhängig von der jeweiligen Analytkonzentration im chromatographischen System sind. Wie in Abschnitt 6.3.5, S. 88, und im Anhang B.5, S. 178, beschrieben wird, lag das Konzentrationsüberladungslimit (Injektionskonzentration bei einem Injektionsvolumen von $1000 \mu\text{L}$) für Methylparaben über $3,1 \text{ g L}^{-1}$. In Abbildung 6.12a, S. 82, wurde gezeigt, dass bei einem Injektionsvolumen von $1000 \mu\text{L}$ die Konzentration am Peakmaximum von Methylparaben etwa 70 % der Injektionskonzentration entsprach. Weiter wurde in Abbildung 7.8, S. 118, dargelegt, dass in der FT-SEC mit einer Periode von $T \geq 300 \text{ s}$ die Verdünnung am Maximum der Oszillation vernachlässigbar ist. Da in den hier diskutierten

Experimenten eine Periode von $T = 2\,436$ s gewählt wurde, wird angenommen, dass die Konzentration am Maximum der Oszillation des Anregungssignals kaum verdünnt wird. Durch die Wahl einer Probenkonzentration von $0,78\text{ g L}^{-1}$, die ein Faktor 4 unter dem Konzentrationsüberladungslimit der LAC lag, wurde somit sichergestellt, dass das Konzentrationsüberladungslimit für Methylparaben bei beiden Methoden nicht überschritten wurde.

Bisher wurde das Referenzchromatogramm mit UVD1 vor der Säule aufgenommen. Dies war in der FT-LAC-NMR nicht möglich, da die Flusszelle des UVD1 auf maximal 40 Bar ausgelegt war und die Säule inklusive der Kapillaren einen Rückdruck von 70 bis 80 Bar erzeugten. Daher wurde ein Referenzchromatogramm mit einer separaten Messung mit UVD2 ohne Säule aufgenommen. Die Referenzmessung wurde gleich zur Probenmessung mit einer Periode von $T = 2\,436$ s und 6 Oszillationen aufgenommen, wobei das NMR Spektrometer umgangen wurde.

Die NMR Spektren wurden, wie in Abschnitt 5.8, S. 53, beschrieben, prozessiert, wobei auf eine Basislinienkorrektur der NMR Spektren verzichtet wurde, um den Einfluss ungleicher Anpassungsfunktionen auf die NMR Signalintensitäten zu vermeiden. Entlang der chromatographischen Dimension wurde für eine bessere Darstellung zunächst eine Referenzsubtraktion und anschließend eine Basislinienkorrektur erster Ordnung durchgeführt. Bei der Referenzsubtraktion wurde das gemittelte Lösungsmittelspektrum der flachen Basislinienregion zwischen 600 und 900 s (entspricht 10 und 15 min) vor der Analytelution mit einer konstanten Intensität von allen Spektren abgezogen. Bei der Basislinienkorrektur wurden bei jeder chemischen Verschiebung die flachen Basislinienabschnitte vor und nach den Oszillationen mit einem Polynom erster Ordnung angepasst und die Anpassungsfunktion von dem Chromatogramm abgezogen. Das prozessierte, spektral aufgelöste FT-LAC-NMR Chromatogramm ist in Abbildung 7.12a dargestellt. Auf der rechten Seite sind die Chromatogramme des aromatischen Signals bei 7,29 ppm (in Schwarz, Superposition beider Parabene), des Methoxysignals von Methylparaben bei 4,18 ppm ($-\text{OCH}_3$, in Blau) und des Methylsignals von Propylparaben bei 1,30 ppm ($-\text{CH}_3$, in Rot) abgebildet. In der konventionellen LAC eluiert Methylparaben bei 1 206 s und Propylparaben bei 1 848 s (entspricht 20,1 und 30,8 min, entnommen aus Tabelle 6.1, S. 61). Daher zeigt das Chromatogramm bei 4,18 ppm (Methylparaben) als erstes eine oszillierende Form. Erst nach einer deutlichen Zeitverzögerung beginnt bei dem Chromatogramm bei 1,30 ppm (Propylparaben) die Oszillation. Das Chromatogramm bei 7,29 ppm entspricht einer Superposition beider Parabene.

Zur Auswertung der Phasenverschiebungen $\Delta\varphi$ der Chromatogramme wurde, entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 7.1.4, S. 110, die erste Periode des zuletzt eluierenden Propylparaben verworfen. Die mittleren vier Oszillationen wurden für die weitere Auswertung mittels DFT verwendet, was einem Elutionsbereich von 9 744 s entsprach. Dieser Bereich ist in Abbildung 7.12a mit zwei durchgezogenen horizontalen schwarzen Linien begrenzt. Die DFT wurde entlang der chromatographischen Dimension bei jeder chemischen Verschiebung angewandt. Die Magnitudenspektren der Chromatogramme sind für jede chemische Verschiebung in Abbildung 7.12b im Bereich von 0 bis 0,0021 Hz gezeigt. Die spektralen Komponenten bei der Anregungsfrequenz von $1/2\,436\text{ s}^{-1} = 0,00041\text{ Hz}$ sind in Abbildung 7.12c mit einer gestrichelten schwarzen Linie gekennzeichnet. Diese sind als Magnitudenspektrum gegen die chemische Verschiebung in Abbildung 7.12c abgebildet, wobei die Intensitäten auf das Restsignal des Wassers bei 4,79 ppm normiert wurden.

Im Magnitudenspektrum der FT-LAC-NMR Messungen in Abbildung 7.12c sind die Intensitäten der Lösungsmittelsignale im Vergleich zu dem 1D NMR Spektrum in Abbildung 7.11, das nur mit PRESAT aufgenommen wurde, kleiner und schmaler. Dies ist auf die DFT zurückzuführen, mit der die Signale, die sich mit der Anregungsfrequenz ändern, herausgefiltert werden. Da die Lösungsmittelsignale größtenteils konstant bleiben, befinden sich die Signale nach der DFT größtenteils bei der Nullfrequenz. Dadurch ist die Intensität des Acetonsignals etwa um den Faktor 2 und die Intensität des Wassersignals etwa um den Faktor 20 größer als die Intensität der aromatischen Analytsignale. Eine ähnlich gute Lösungsmittelunterdrückung wird auch in konventionellen LAC-NMR Experimenten mit PRESAT und numerischer Lösungsmittelunterdrückung erhalten, wie qualitativ in Abbildung 6.18, S. 92, zu

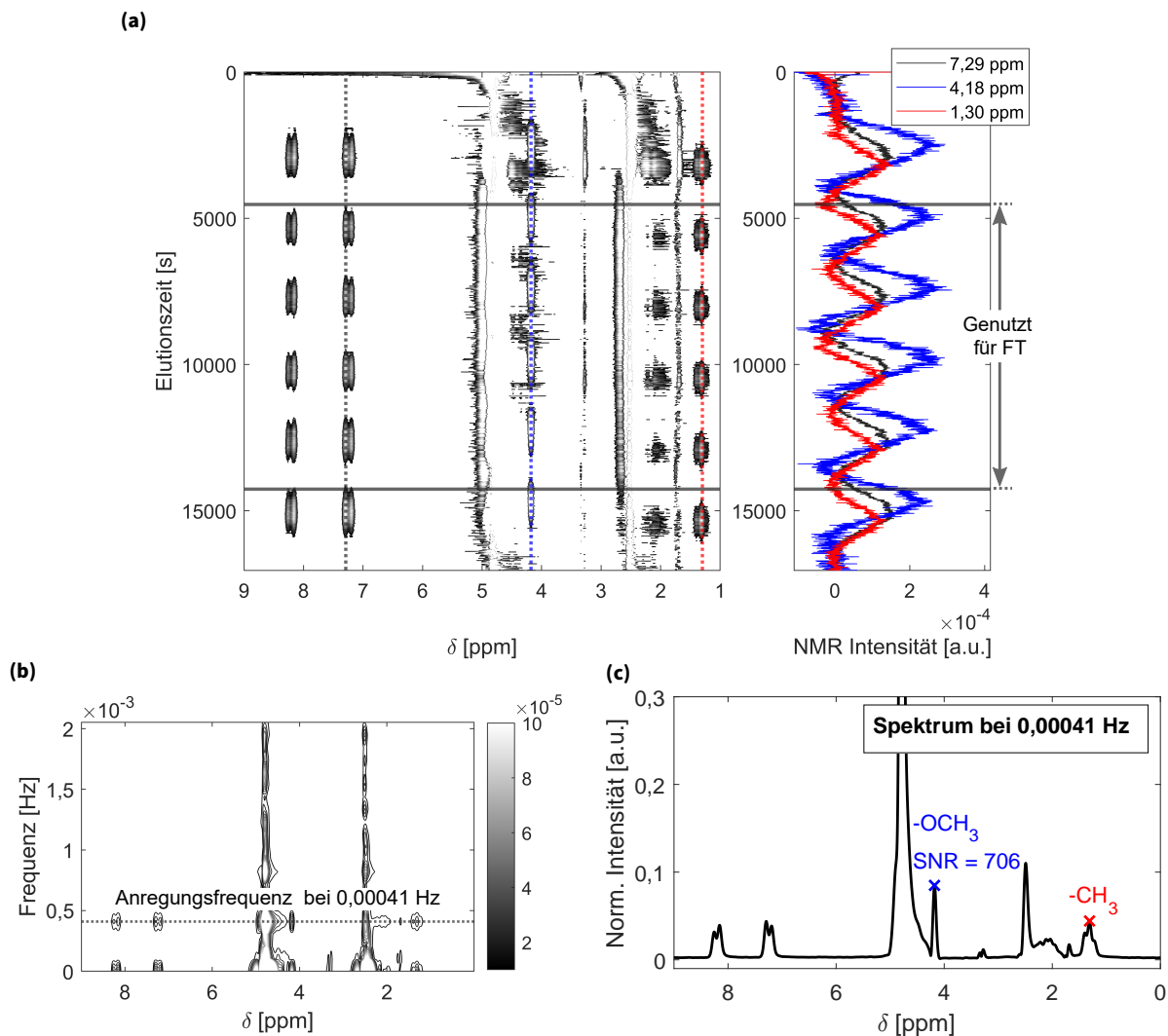


Abbildung 7.12: FT-LAC-NMR Analyse einer Mischung aus Methyl- und Propylparaben mit je $0,78 \text{ g L}^{-1}$. Zum Ansetzen der Mischung und als Lösungsmittel für die FT-LAC-NMR Analyse wurde eine Aceton/Wasser Mischung (60/40 v/v%) verwendet. Ein kosinusförmiges Anregungssignal mit einer Periode von $T = 2436 \text{ s}$ und 6 Oszillationen wurde verwendet. (a) Im spektral aufgelösten Chromatogramm sind folgende Elutionsprofile hervorgehoben: des aromatischen Signals bei $7,29 \text{ ppm}$ (Überlagerung beider Analyten) in Schwarz, des Methoxysignals ($-\text{OCH}_3$) bei $4,18 \text{ ppm}$ von Methylparaben in Blau und des Methylsignals ($-\text{CH}_3$) bei $1,30 \text{ ppm}$ von Propylparaben in Rot. Die jeweiligen Elutionsprofile sind auf der rechten Seite gezeigt. Die für die DFT genutzte Elutionsregion ist durch zwei durchgezogene horizontale schwarze Linien begrenzt. In (b) sind die Magnitudenspektren von 0 bis $0,002 \text{ Hz}$ bei jeder chemischen Verschiebung als Konturdiagramm zu sehen. Die spektralen Komponenten der Anregungsfrequenz von $0,00041 \text{ Hz}$ ($= 1/2436 \text{ s}$) sind markiert (schwarze gestrichelte Linie) und in (c) als Magnitudenspektrum gegen die chemische Verschiebung aufgetragen. Das Magnitudenspektrum in (c) wurde auf das Wassersignal normiert. In dem Spektrum wurde das SNR für das Methoxysignal berechnet, wobei das Rauschen der einfachen Standardabweichung der basislinienkorrigierten Region zwischen 10 und 12 ppm entsprach. In Tabelle 7.2 sind die $\Delta\varphi$ der analytspezifischen Signale und in Tabelle 7.3 das SNR des Methoxysignals ausgewertet.

sehen ist. Eine Quantifizierung der Lösungsmittelunterdrückungseffizienz wird nicht vorgenommen, da nur eine FT-LAC-NMR Messung vorliegt und angenommen wird, dass – ähnlich wie bei konventionellen LAC-NMR Messungen – die Intensität der verbleibenden Lösungsmittelsignale je nach Datenqualität stark variieren kann. Daher müssten zur verlässlichen Quantifizierung der Lösungsmittelunterdrückungseffizienz der FT-LAC-NMR noch weitere Experimente durchgeführt werden.

Im Magnitudenspektrum in Abbildung 7.12c sind die analytspezifischen Signale markiert: das $-\text{OCH}_3$ Singulettssignal von Methylparaben (in Blau) und das $-\text{CH}_3$ Triplettsignal von Propylparaben (in Rot).

In Tabelle 7.2 sind die $\Delta\varphi$ der beiden Gruppen zusammengefasst. Für Propylparaben wurden die $\Delta\varphi$ für jedes lokale Maximum des Triplettsignals bestimmt und daraus das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung berechnet.

Tabelle 7.2: Vergleich der Retardierung von Methyl- und Propylparaben, gemessen mit der FT-LAC Methode und mit der konventionellen LAC. Die $\Delta\varphi$ der Frequenzkomponenten der Anregungsfrequenz wurden für das lokale Maximum des -OCH₃ Signals von Methylparaben und für die lokalen Maxima des -CH₃ Triplettsignals von Propylparaben bestimmt, wobei für Propylparaben das arithmetische Mittel und die Standardabweichung aufgeführt ist.

	FT-LAC		LAC
	$\Delta\varphi$ [°]	Δt [s] ^a	t_{ret} [s] ^b
Methylparaben	172,0	1 164	1 206
Propylparaben	267,0 ± 0,4	1 807 ± 3	1 848
Differenz	95,0	643	642

^a Berechnet aus $\Delta\varphi$ mit Gleichung 7.1.1, S. 108. ^b Retentionszeit t_{ret} entnommen aus Tabelle 6.1, S. 61.

Mit Gleichung 7.1.1, S. 108, wurde aus dem $\Delta\varphi$ die zeitliche Verschiebung Δt zwischen Referenz- und Antwortchromatogramm berechnet. Weiter sind die Retentionszeiten t_{ret} beider Analyten aus Tabelle 6.1, S. 61, aufgelistet. Für Methylparaben betrug $\Delta\varphi = 172,0^\circ$, was $\Delta t = 1\,164$ s entspricht und für Propylparaben $\Delta\varphi = 267,0^\circ$, was $\Delta t = 1\,807$ s entspricht. Die drei $\Delta\varphi$ des Triplettsignals von Propylparaben zeigten eine Streuung von $0,4^\circ$, was nach Gleichung 7.1.1 etwa 3 s entspricht und ein Maß für die methodische Unsicherheit der FT-LAC-NMR Analyse darstellt. Verglichen mit den t_{ret} von $t_{\text{ret}} = 1\,206$ s für Methyl- und $t_{\text{ret}} = 1\,848$ s Propylparaben zeigt sich, dass die Δt für die FT-LAC etwa 40 s geringer sind. Die Verschiebung zu kürzeren Zeiten zeigt, dass das Totvolumen für die FT-LAC geringer war als für die konventionelle LAC, da das Referenzchromatogramm mit UVD2 aufgenommen wurde.

Zum Vergleich der Retardierung wurde die Differenz der Δt und t_{ret} zwischen Methyl- und Propylparaben berechnet. Für die FT-LAC beträgt die Differenz 643 s und für die konventionelle LAC 642 s, was sehr gut übereinstimmt. Dies zeigt, dass die Retardierung innerhalb der Säule in der LAC für die konventionelle und FT-LAC Methode bei der Analyse von zwei Analyten im linearen Konzentrationsbereich gleich ist.

In Abbildung 7.12c wurde das SNR des -OCH₃ Signals bestimmt. Ähnlich zur konventionellen LAC-NMR Kopplung wurde das Rauschen als die einfache Standardabweichung des basislinienkorrigierten Bereichs (Polynom erster Ordnung) zwischen 10 und 12 ppm berechnet. Das SNR wurde anschließend auf die Quadratwurzel der Messzeit des ausgewerteten Chromatogrammabschnitts $t_{\text{m}}^{1/2}$ normiert. Für die konventionelle LAC-NMR Kopplung wurde das SNR der $0,78 \text{ g L}^{-1}$ Methylparabenmessung aus der Bestimmung der Sensitivitätsgrenzen in Abschnitt 6.3.5, S. 88, nach der Methodenoptimierung herangezogen. Bei dieser Messung wurde ein Injektionsvolumen von $V_i = 1000 \mu\text{L}$ verwendet. Das SNR der konventionellen LAC-NMR Kopplung wurde ebenso auf $t_{\text{m}}^{1/2}$ normiert. Für die FT-LAC-NMR betrug $t_{\text{m}} = 9\,744$ s und für die konventionelle LAC-NMR $t_{\text{m}} = 2\,436$ s. Zusätzlich wurde für beide Methoden die Menge an analysiertem Methylparaben $m(\text{MP})$ mit den Gleichungen 7.2.9 und 7.2.10, S. 121, bestimmt und ebenso auf $t_{\text{m}}^{1/2}$ normiert. In Tabelle 7.3 sind für beide Methoden die SNR, $\text{SNR} \cdot t_{\text{m}}^{-1/2}$ und $m(\text{MP}) \cdot t_{\text{m}}^{-1/2}$ zusammengefasst. Wie in Tabelle 7.3 zu sehen, ist das $\text{SNR} \cdot t_{\text{m}}^{-1/2}$ der FT-LAC-NMR Messung mit $\text{SNR} \cdot t_{\text{m}}^{-1/2} = 7,2 \text{ s}^{-1/2}$ einen Faktor 1,60 höher als das $\text{SNR} \cdot t_{\text{m}}^{-1/2}$ der konventionellen LAC-NMR Kopplung mit $\text{SNR} \cdot t_{\text{m}}^{-1/2} = 4,5 \text{ s}^{-1/2}$. Dieser Verbesserungsfaktor ist deutlich geringer als der in Abschnitt 7.2.4, S. 120, bestimmte Faktor von 50, der für die PS Analyse mittels SEC und UV Detektion ermittelt wurde. Dort wurde die FT-SEC Methode mit der konventionellen SEC unter Verwendung eines $100 \mu\text{L}$ Injektionsvolumens verglichen.

Tabelle 7.3: Abschätzung der Sensitivitätssteigerung durch Anwendung der FT-LC in der LAC-NMR Kopplung. Analysiert wurde jeweils eine $0,78 \text{ g L}^{-1}$ Methylparabenslösung und das *SNR* wurde für das Methoxysignal bestimmt. Der ausgewertete Datensatz der FT-LAC-NMR Messung umfasste vier Oszillationen eines Anregungssignals mit einer Periode von $T = 2436 \text{ s}$. Für die FT-LC betrug die Messzeit $t_m = 9744 \text{ s}$, während für die konventionelle LAC-NMR Messung $t_m = 2426 \text{ s}$. Für die Messung mit der konventionellen LAC-NMR Kopplung wurde ein Injektionsvolumen von $1000 \mu\text{L}$ verwendet. Mit Gleichungen 7.2.9 und 7.2.10, S. 121, wurde jeweils die Menge an analysiertem Methylparaben $m(\text{MP})$ berechnet. Das *SNR* und $m(\text{MP})$ wurden für den Sensitivitätsvergleich jeweils auf $t_m^{1/2}$ normiert.

	FT-LAC-NMR	LAC-NMR
<i>SNR</i>	706	221 ^a
$\text{SNR} \cdot t_m^{-1/2}$	$7,2 \text{ s}^{-1/2}$	$4,5 \text{ s}^{-1/2}$
$m(\text{MP}) \cdot t_m^{-1/2}$	$0,641 \text{ mg s}^{-1/2}$	$0,016 \text{ mg s}^{-1/2}$

^a Das *SNR* entspricht dem *SNR* des Methoxysignals der $0,78 \text{ g L}^{-1}$ Messung aus der Bestimmung der Sensitivitätsgrenzen in Abbildung 6.17, S. 89.

Die Sensitivitätssteigerung durch die Anwendung der FT-LC in der LAC-NMR Kopplung fällt aufgrund von zwei Faktoren geringer aus. (1) Bei der konventionellen LAC-NMR Messung wurde ein Injektionsvolumen von $1000 \mu\text{L}$ anstatt $100 \mu\text{L}$ verwendet. In Abbildung 6.12b, S. 82, wurde der Sensitivitätszuwachs durch Injektion größerer Probenvolumina für verschiedene Parabene bestimmt. Für Methylparaben konnte durch die Vergrößerung des Injektionsvolumen von $100 \mu\text{L}$ auf $1000 \mu\text{L}$ die Sensitivität um einen Faktor 5 gesteigert werden. (2) Zusätzlich wird in der konventionellen LAC-NMR durch die Datenverarbeitung die Sensitivität deutlich verbessert. In Abbildung 6.16, S. 87, wurde gezeigt, dass durch die Anwendung chromatographischer Filter die Sensitivität zusätzlich um einen Faktor 6 gesteigert wurde. Somit wurde die Sensitivität der konventionellen LAC-NMR Messung bereits um einen Faktor von $5 \cdot 6 = 30$ gesteigert. Folglich erhöht die FT-LC die Sensitivität potentiell nur noch um den Faktor $50/30 = 1,67$, was sehr nahe an dem experimentell ermittelten Faktor 1,60 liegt.

Wie bereits in den vorherigen Abschnitten beschrieben wurde, wird in der FT-LC die Säule effizienter genutzt, wodurch deutlich mehr Analyt pro Zeiteinheit analysiert werden kann. Wie aus Tabelle 7.3 hervorgeht, ist $m(\text{MP}) \cdot t_m^{-1/2}$ für die FT-LAC-NMR mit $m(\text{MP}) \cdot t_m^{-1/2} = 0,641 \text{ mg s}^{-1/2}$ etwa einen Faktor 40 höher als für die LAC-NMR mit $m(\text{MP}) \cdot t_m^{-1/2} = 0,016 \text{ mg s}^{-1/2}$. Allerdings wird nur eine Sensitivitätssteigerung von einem Faktor 1,60 erhalten. Dies verdeutlicht, dass die Sensitivität pro injizierter Masseneinheit für die LAC-NMR Kopplung deutlich höher ist als für die FT-LAC-NMR.

Während die Sensitivität pro injizierter Masseneinheit für die LAC-NMR Kopplung höher ist, ist das absolute *SNR* pro analysierter Analytkonzentration für die FT-LAC-NMR etwa ein Faktor 3 höher, wie aus Tabelle 7.3 hervor geht. Da das Signal proportional zur Analytkonzentration ist, lässt sich für Methylparaben aus dem *SNR* von $\text{SNR} = 706$ eine Nachweisgrenze (LOD , $\text{SNR} = 3$) für die FT-LAC-NMR mit 6 gemessenen Oszillationen abschätzen. Diese beträgt $LOD_{FT-LAC-NMR} = 0,78/706 \cdot 3 \approx 0,003 \text{ g L}^{-1}$ und ist somit etwa einen Faktor 3 geringer als die Nachweisgrenze der konventionellen LAC-NMR von $LOD_{LAC-NMR} \approx 0,010 \text{ g L}^{-1}$ (vgl. Tabelle 6.8, S. 89).

Das *SNR* steigt proportional zu $t_m^{1/2}$, weshalb mit einer Verlängerung der Messzeit das absolute *SNR* und somit die Nachweisgrenze in der FT-LAC-NMR weiter verbessert werden kann. Theoretisch würde das *SNR* so weit steigen, bis das stochastische Rauschen unter das systematische Rauschen fällt.[29] Aktuell wurden diese Grenzen noch nicht untersucht.

7.3. Zusammenfassung zur FT-LC Methodenentwicklung

In diesem Kapitel wurde eine HPLC Methode mit einer kontinuierlichen Probeninjektion mit einem sinusförmigen Konzentrationsprofil entwickelt. Es ist im Detail beschrieben, wie die Datensätze mittels Fourier-Transformation ausgewertet wurden. Die Methode wurde zur Polymeranalyse in der SEC angewandt, weshalb diese Analysemethode Fourier-Transformation *size exclusion chromatography* (FT-SEC) genannt wurde. Die sinusförmige Injektion wurde durch periodische Wiederholung eines Gradienten zwischen zwei Lösungsmittelreservoirs erhalten. Das Profil der Zusammensetzung der Lösungsmittelreservoirs ist in Abbildung 7.3, S. 108, gezeigt. Ein Lösungsmittelreservoir enthielt ein reines Lösungsmittel und das andere eine Analytlösung, die mit demselben Lösungsmittel hergestellt wurde. Bei konstantem Volumenfluss variiert der relative Volumengehalt der Analytlösung sinusförmig, wodurch ein sinusförmiges Analytkonzentrationsprofil als Funktion der Zeit oder des Volumens erhalten wird. Dieses Profil dient als Anregungssignal. Für die Methodenentwicklung wurden zwei UV Detektoren verwendet. Einer befand sich vor der Säule zur Aufnahme des Anregungssignals und einer nach der Säule zur Aufnahme des Antwortsignals. Die durch die Retardierung entstehende analytspezifische Phasenverschiebung der Anregungsfrequenz zwischen beiden Chromatogrammen wurde im Fourier-Raum bestimmt. Mit den Phasenverschiebungen von PS-Kalibrierstandards wurde eine Molekulargewichtskalibrierung erstellt, die in der Form einer konventionellen Kalibrierung gleicht. Dies bestätigt, dass die Retardierung bzw. der sterische Auftrennmechanismus in der Säule unabhängig von der angewandten Injektionsmethode ist.

Aufgrund des Superpositionsprinzips überlagern die einzelnen Gewichtsfractionen einer Polymerprobe abhängig von der Phasenverschiebung und Magnitude zueinander, weshalb das mit der FT-SEC mit UV Detektion bestimmte Molekulargewicht einer Polymerprobe vermutlich am ehesten dem Gewichtsmittel \bar{M}_w entspricht. Durch die Analyse zweier Mischungen von jeweils zwei PS-Standards konnte gezeigt werden, dass als Folge der Superposition eine Sinuswelle entsteht, deren Magnitude und Phasenverschiebung aus den Magnituden und Phasenverschiebungen der einzelnen Komponenten präzise vorhersagbar ist. Dies beweist, dass die Retardierung der PS-Standards im reinen und gemischten Zustand eine lineare Superposition zeigt.

In einer Messreihe mit unterschiedlichen Perioden konnte gezeigt werden, dass das *SNR* pro Quadratwurzel der Messzeit für den hier verwendeten experimentellen Aufbau eine Periode von Minimum 300 s verwendet werden sollte, um eine Verringerung der Magnitude aufgrund der Bandenverbreiterung zu vermeiden. Werden Perioden unter 300 s verwendet, nimmt die Magnitude und somit das *SNR* stark ab, wodurch die erreichbare Sensitivität verringert wird.

In einem Sensitivitätsvergleich zwischen der FT-SEC und der konventionellen SEC Methode wurde gezeigt, dass mit der FT-SEC Methode am Konzentrationsüberladungslimit für die hier vorgestellte experimentelle und methodische Durchführung etwa ein um den Faktor 50 höheres *SNR* pro Quadratwurzel der Messzeit erhalten wird. Der Sensitivitätszuwachs begründet sich auf der effizienteren Nutzung der Säule. Faktoren, die das *SNR* in der FT-SEC beeinflussen sind: (1) die gewählte Magnitude des Anregungssignals, (2) die Periode in Kombination mit der instrumentenspezifischen Bandenverbreiterung, (3) die Datenaufnahmezeit sowie (4) die Superposition der Detektorsignale unterschiedlicher Analyten und, speziell für die SEC, auch die Superposition unterschiedlicher Molekulargewichtsfractionen.

Bei der Anwendung der FT-LC in der LAC-NMR (80 MHz) Kopplung wurde gezeigt, dass durch die spektrale Auflösung der NMR Detektion eine binäre Mischung aus Methyl- und Propylparaben mithilfe analytspezifischer NMR Signale chromatographisch aufgelöst werden kann. Indem der Phasenversatz mit der Retentionszeit verglichen wurde, konnte gezeigt werden, dass die Retardierung in der FT-LAC und der konventionellen LAC gleich ist und somit eine zuverlässige Identifizierung der Analyten ermöglicht. Beim Sensitivitätsvergleich der FT-LAC NMR mit der konventionellen LAC-NMR Kopplung, nach vollständiger Methodenoptimierung, wurde gezeigt, dass das *SNR* pro Quadratwurzel der Messzeit

um einen Faktor von 1,60 weiter gesteigert werden konnte. Im Vergleich zum Steigerungsfaktor von 50, der in der SEC mit UV Detektion bestimmt wurde, ist dieser Faktor jedoch deutlich geringer. Dies liegt daran, dass in der LAC-NMR Kopplung ein Faktor 10 größeres Injektionsvolumen verwendet und Signalmittelung angewandt wurde. Durch beide Verfahren konnte die Sensitivität deutlich gesteigert werden. Aus dem absoluten SNR der FT-LAC-NMR Messung einer $0,78 \text{ g L}^{-1}$ Methylparabenslösung, gemessen mit 6 Oszillationen und einer Periode von $T = 40,6 \text{ min}$, wurde eine Nachweisgrenze (LOD , $SNR = 3$) von $LOD_{FT-LAC-NMR} \approx 0,003 \text{ g L}^{-1}$ abgeschätzt, die um einen Faktor 3 unter der Nachweisgrenze der konventionellen LAC-NMR Kopplung für Methylparaben mit $LOD_{LAC-NMR} \approx 0,010 \text{ g L}^{-1}$ liegt. Durch eine Erhöhung der Anzahl an gemessenen Oszillationen (Messzeit) kann das absolute SNR weiter gesteigert und die Nachweisgrenze weiter reduziert werden. Dies zeigt, dass die FT-LC Methode besonders für die Analyse von Proben mit geringer Konzentration geeignet ist. Wird ein Detektor mit spektraler Auflösung, wie z. B. ein IR oder *benchtop* NMR Spektrometer, genutzt, kann mit der FT-LC nicht nur das absolute SNR deutlich gesteigert werden, sondern auch analytische Mischungen chromatographisch aufgelöst werden.

8. Numerische Signalunterdrückung in NMR Spektren durch Fourier-Filterung, FF

In diesem Kapitel wird die Entwicklung einer Methode zur numerischen Signalunterdrückung in NMR Spektren beschrieben. Zwei Proben werden gemessen, wobei eine Probe die Analytlösung enthält und die andere Probe das Lösungsmittel, mit dem die Analytlösung hergestellt wurde. Die Spektren werden abwechselnd in einem 2D Datenfeld angeordnet, wodurch eine Periodizität für die Analytsignale erzeugt wird. Indem eine Fourier-Transformation entlang den angeordneten Spektren bei jeder chemischen Verschiebung durchgeführt wird, werden die periodischen Analytsignale herausgefiltert und die Signale der konstanten Probenbestandteile unterdrückt. Nachfolgend wird diese Methode Fourier-Filterung (FF) genannt. Die methodische Entwicklung der FF wurde mit Polystyrol (PS) in THF durchgeführt. Die Anwendung von FF in Kombination mit einer Pulssequenz zur Lösungsmittelunterdrückung führt zu einer weiteren Verringerung der THF-Signale um einen Faktor 18 im Vergleich zur Lösungsmittelunterdrückung allein.

8.1. Konzept der Signalunterdrückung durch Fourier-Filterung

NMR Messungen von Proben in protonierten Lösungsmitteln erfordern eine Unterdrückung der intensiven Lösungsmittelsignale aufgrund der in Abschnitt 4.4, S. 35, aufgeführten Gründe. Die Anwendung von Pulssequenzen zur Lösungsmittelunterdrückung ist nur dann möglich, wenn das gesuchte Signal weit genug von der Lösungsmittelresonanz entfernt ist, um nicht unterdrückt zu werden. Außerdem verbleibt stets ein Restsignal des Lösungsmittels im Spektrum. Für den Fall, dass keine Pulssequenz zur Lösungsmittelunterdrückung angewandt werden kann, oder das Restsignal des Lösungsmittels weiter reduziert werden soll, wurde eine numerische Methode zur Lösungsmittelunterdrückung entwickelt. Die Methode basiert auf der Anwendung der Fourier-Transformation (FT), weshalb diese nachfolgend als Fourier-Filterung (FF) bezeichnet wird.

Für die Anwendung der FF ist es notwendig zwei Proben zu messen, eine Probe enthält die Analytlösung und die andere das Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch, mit dem die Analytlösung hergestellt wurde. Die Spektren werden abwechselnd in einer Datenmatrix mit der Größe $nSpecs \times npts$ angeordnet, wobei $nSpecs$ die Anzahl an aufgenommenen 1D NMR Spektren und $npts$ die Anzahl an Datenpunkte (chemische Verschiebung) pro Spektrum ist. Die Messzeit eines Spektrums t_m entspricht dem Produkt aus der Anzahl an Scans (*number of scans*, ns) und der Wiederholzeit pro Scan t_r und wird genutzt, um eine Messzeitachse zu erstellen, mit der Gesamtmesszeit $nSpecs \cdot t_m$. In der Matrix folgt dem Analytspektrum immer ein Lösungsmittelspektrum, womit eine Periodizität der Analytsignale erzeugt wird. Die Periode entspricht 2 Spektren oder der Dauer T von $T = 2 \cdot t_m$. Die Anordnungsfrequenz ν_0 entspricht dem Kehrwert der Periode und beträgt $\nu_0 = 1/(2 \cdot t_m)$.

Durch eine FT entlang der Spektrenanordnung (Messzeitachse) werden die periodischen Signalanteile spektral aufgelöst. Die periodischen Analytsignale erscheinen bei ν_0 , während die Signalanteile, die über alle Spektren hinweg konstant sind, bei der Nullfrequenz verbleiben. Unregelmäßig auftretende Signale

verteilen sich über alle spektralen Komponenten hinweg.[76, 79] Das Spektrum bei ν_0 wird ausgewertet, wodurch die Signale der konstanten Probenkomponenten, wie dem Lösungsmittel, reduziert werden. Für eine gute Signalunterdrückung und um möglichst alle Analytsignale herauszufiltern ist es wichtig, dass die Spektren beider Proben unter möglichst gleichen Bedingungen aufgenommen werden. Veränderungen der Messbedingungen, beispielsweise durch Temperaturschwankungen oder unterschiedliche Lösungsmittelzusammensetzungen, können zu Veränderungen der Form und chemischen Verschiebung der Signalen im Spektrum führen.[70] Dies führt im Spektrum bei ν_0 dazu, dass die Signale der konstanten Probenkomponenten zunehmen und die des Analyten abnehmen.

Da für die FF zwei Proben gemessen werden müssen, ist diese Methode zeitintensiver als herkömmliche 1D NMR Messungen einer Probe. Dieser Nachteil wird teilweise durch die Verwendung eines Autosamplers für das NMR Spektrometer kompensiert, da durch die Automatisierung der NMR Messungen die Messzeit effizienter genutzt wird.

Ein mögliches Anwendungsgebiet dieser Methode sind *offline* HPLC-NMR Messungen, die unter isokratischen Bedingungen mit protoniertem Lösungsmittel aufgenommen werden. Die Grundlagen zur *offline* HPLC-NMR Kopplung sind in Abbildung 4.2c, S. 33, beschrieben. Neben den Analytfractionen müsste dafür eine zusätzliche Fraktion von der mobilen Phase ohne Analyten entnommen werden. Die Fraktionen könnten anschließend in NMR Röhren gefüllt und mittels Autosampler automatisiert gemessen werden.

8.2. Umsetzung und Auswertung der Fourier-Filterung

Zur Entwicklung der Methode wurde ein 90 MHz NMR Spektrometer (mit ultra-hoher Auflösung) verwendet, das mit z-Gradienten und einem Autosampler ausgestattet war. Als Modellsystem wurde ein PS-Standard $M_p = 17,6 \text{ kg mol}^{-1}$ gewählt, der mit $c = 2,50 \text{ g L}^{-1}$ in protonierten THF gelöst wurde. Diese PS-Lösung und das pure THF wurden in NMR Röhren gefüllt und in den Autosampler eingebracht. Weitere Informationen zum NMR Spektrometer und den Chemikalien sind im Anhang A, S. 169, enthalten. Die Proben wurden abwechselnd gemessen, bis von jeder Probe insgesamt 8 Spektren vorlagen. Vor jeder Messung wurde 5 min zur Temperierung der Probe gewartet. Die Spektren wurden mit einem 90° Puls, einer FID Aufnahmezeit von 0,8 s, 8 Scans pro Spektrum und einer Wiederholzeit pro Scan von 5,0 s aufgenommen. Zur Lösungsmittelunterdrückung wurde die WET Pulssequenz angewandt, die in Abschnitt 4.4, S. 35, näher beschrieben ist. Die Unterdrückungsfrequenzen entsprachen den Maxima der THF Signale von 1,62 und 3,46 ppm. Die vier selektiven Pulse der WET Pulssequenz hatten eine Amplitude von -67, -65, -68 und -61 dB (entspricht nach Herstellerangaben 0,20, 0,31, 0,16 und 0,79 nW) mit jeweils einer Dauer von 45 ms.[136] Die Empfängerverstärkung betrug 40 dB. Die Messzeit eines Spektrums betrug $t_m = 8 \cdot 5,0 \text{ s} = 40,0 \text{ s}$ womit die Gesamtmesszeit der 16 Spektren (je Probe 8) 640,0 s entsprach. Die Äuqilibrierungszeit zwischen jedem Probenwechsel von 5 min wurde bei der Berechnung der Gesamtmesszeit nicht mitgezählt.

Das NMR Spektrometer wurde nur einmal vor Beginn der Messreihe auf den Shimstandard geschimmt, entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 5.4.2, S. 48. Ein individuelles Shimmen der Proben wurde nicht durchgeführt, da nach dem Shimmen der ^{19}F -Lock automatisch auf das höchste Signal im Spektrum kalibriert wurde. Der dafür genutzte ppm-Wert musste zuvor vom Benutzer festgelegt werden. Da das THF zwei Signale mit gleicher Intensität aufweist, konnte nicht vorhergesagt werden, welches der Signale nach dem Shimmen größer sein würde. Da die Messungen automatisiert durchgeführt wurden, war es daher nicht möglich, den ppm-Wert für die Lock-Kalibrierung im Voraus festzulegen. Eine Kalibrierung des Locks auf einem falschen ppm-Wert hätte zur Folge gehabt, dass die vordefinierten Unterdrückungsfrequenzen nicht auf den THF-Signalen gelegen hätten.

Zur Beurteilung der Sensitivität und der Effektivität der Signalunterdrückung der FF wurden zusätzlich zwei weitere Spektren von der PS-Lösung aufgenommen. Dafür wurden die Parameter der vorherigen NMR Messungen übernommen. Ein Spektrum wurde mit WET und 128 Scans (= $2 \cdot 8$ Spektren $\cdot 8$ Scans/Spektrum) aufgenommen, was ebenfalls einer Messzeit von 640,0 s entsprach. Das andere Spektrum wurde ohne WET, mit 8 Scans und einer Empfängerverstärkung von 16 dB gemessen. Die Prozessierung der Spektren erfolgte entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 5.8, S. 53, mit den in Abschnitt 6.1.3.1, S. 61, aufgelisteten Parametern. Im nachfolgenden Abschnitt wird der Effekt der Signalverbreiterung durch exponentielle Apodisierungsfunktionen für die FF optimiert.

8.2.1. Optimierung der exponentiellen Apodisierung

Die exponentielle Apodisierung führt zu einer Verbreiterung der Signale im NMR Spektrum. Im Abschnitt 8.1, S. 131, wurde dargelegt, dass unterschiedliche Messbedingungen die Form und die chemische Verschiebung von Signalen in NMR Spektren beeinflussen. Dies führt dazu, dass die Effektivität der Signalunterdrückung und der Analytfilterung der FF abnimmt. Durch die Apodisierung werden die Signale verbreitert, wodurch Unterschiede zwischen den Spektren reduziert werden und somit die Effektivität der Signalunterdrückung und Analytfilterung prinzipiell gesteigert wird.

Für das verwendete Modellsystem ergibt sich ein weiterer positiver Effekt durch die Apodisierung. In Abbildung 8.1a ist die NMR Messung der PS-Lösung mit WET und 128 Scans gezeigt. Bei der Prozessierung wurden unterschiedliche exponentielle Apodisierungsfunktionen mit Signalverbreiterungen von 0 (keine Signalverbreiterung) bis 5 Hz verwendet. Vergrößert dargestellt sind die Signale der aromatischen PS-Protonen zwischen 5,5 und 8,0 ppm sowie das THF-Signal zwischen 3,2 und 3,7 ppm. Das THF-Signal zeigt aufgrund der WET Pulssequenz teilweise negative Signale. Aufgrund der Dispersion der isotropen chemischen Verschiebung und der kurzen T_2 Zeit sind die aromatischen PS-Signale breiter als das Restsignal des THFs. Bei der Apodisierung bleibt die Signalfläche im Spektrum konstant. Daher nimmt bei der exponentiellen Apodisierung die Signalintensität umso stärker ab, je schmaler das ursprüngliche Signal ist. Bei der exponentiellen Apodisierungsfunktion mit einer Signalverbreiterung von 5 Hz nimmt die Intensität des Signals der aromatischen *meta* und *para* Protonen nur um den Faktor 1,3 ab, während das negative THF-Signal um einen Faktor von 5,5 verringert wird. Nachfolgend wird die *FWHM* der Signale ausgewertet, da das *SNR* der aromatischen Signale abhängig von der Apodisierung überlagern und dadurch das *SNR* dieser beeinflusst wird. Das *FWHM* Zunahme der *ortho* PS-Protonen wurde für die unterschiedlichen exponentielle Apodisierungsfunktionen bestimmt. Die *meta* und *para* Protonen konnten nicht verwendet werden, da diese mit dem Signal von Butylhydroxytoluol (BHT) überlagern. BHT wird als Stabilisator dem THF zugesetzt, um eine Peroxidbildung zu vermeiden.[182] In Abbildung 8.1b sind die *FWHM* des Signals der *ortho* Protonen ($FWHM_{ortho}$) für verschiedene Signalverbreiterungen der exponentiellen Apodisierungsfunktion aufgetragen. Eine Zunahme der $FWHM_{ortho}$ von maximal 10 % wurde als Grenzwert festgelegt um eine übermäßige Verbreiterung der Signale zu vermeiden. Dieser Grenzwert wurde mit einer exponentiellen Apodisierung mit einer Signalverbreiterung von 1,3 Hz erreicht.

8.2.2. Quantifizierung der Effektivität der Signalunterdrückung und Sensitivität der FF

Nach der Datenaufnahme und Prozessierung wurden die Spektren entsprechend der Messreihenfolge in einer Matrix angeordnet. Eine Darstellung der alternierend angeordneten Spektren ist in Abbildung 8.2a gezeigt. Die Spektren wurden auf das Maximum der Matrix normiert und die Messzeitachse wurde durch Aufaddieren der Messzeiten der Spektren (40 s Messzeit pro Spektrum) erstellt. Bei der Anordnung wurde mit einem Spektrum der PS-Lösung begonnen, sodass die Periodizität der PS-Signale durch eine

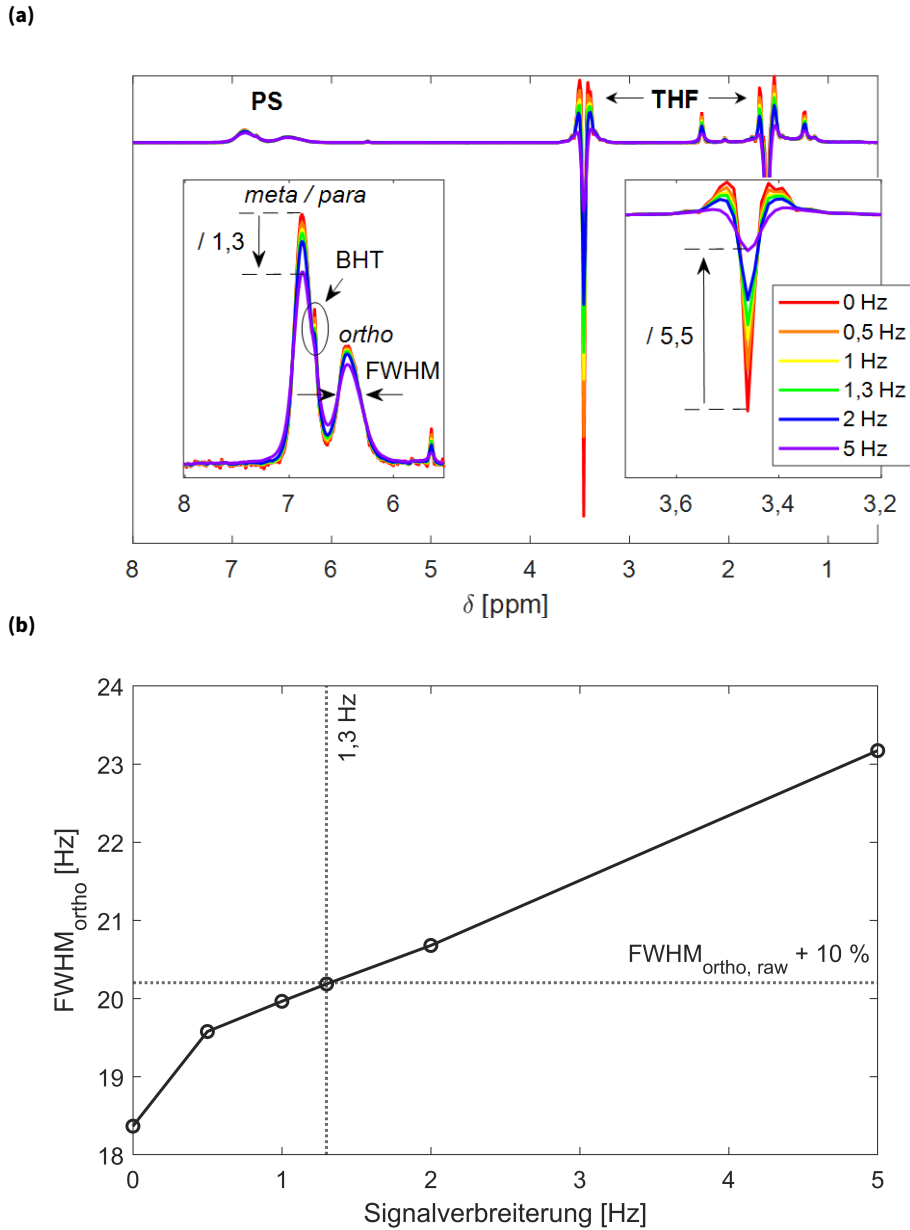


Abbildung 8.1: Auswirkung der exponentiellen Apodisierung auf die Signale von PS und THF. Gezeigt ist die ^1H NMR Messung (90 MHz, ultra) einer $2,50 \text{ g L}^{-1}$ PS- $17,6 \text{ kg mol}^{-1}$ Lösung in THF, die mit WET zur Lösungsmittelunterdrückung und 128 Scans aufgenommen wurde. (a) Die Messung wurde mit exponentiellen Apodisierungsfunktionen mit Signalverbreiterungen von 0 bis 5 Hz prozessiert. Die aromatischen Signale von PS sowie das Restsignal von THF sind vergrößert dargestellt. Das Signal der aromatischen *meta* und *para* Protonen von PS überlagert mit dem Signal von Butylhydroxytoluol (BHT, 6,9 ppm). [110] Bei einer Signalverbreiterung von 5 Hz war das Signal der *meta* und *para* Protonen von PS um einen Faktor 1,3 reduziert, während das deutlich schmalere negative Artefakt des THF Signals um einen Faktor 5,5 abnahm. Die aromatischen PS-Signale sind aufgrund der Dispersion der isotropen chemischen Verschiebung in ppm und der kurzen T_2 Zeit breiter als das Restsignal des THF. Zur Bestimmung der maximalen Signalverbreiterung wurde die $FWHM$ des Signals der *ortho* Protonen bestimmt und gegen die Signalverbreiterung durch die exponentielle Apodisierungsfunktionen in (b) aufgetragen. Um eine übermäßige Verbreiterung der Signale zu vermeiden wurde als Grenzwert eine maximale Erhöhung der ursprünglichen $FWHM_{\text{ortho}}$ um 10 % (horizontale gestrichelte Linie) festgelegt. Dieser Grenzwert wurde mit bei einer Signalverbreiterung von 1,3 Hz erreicht.

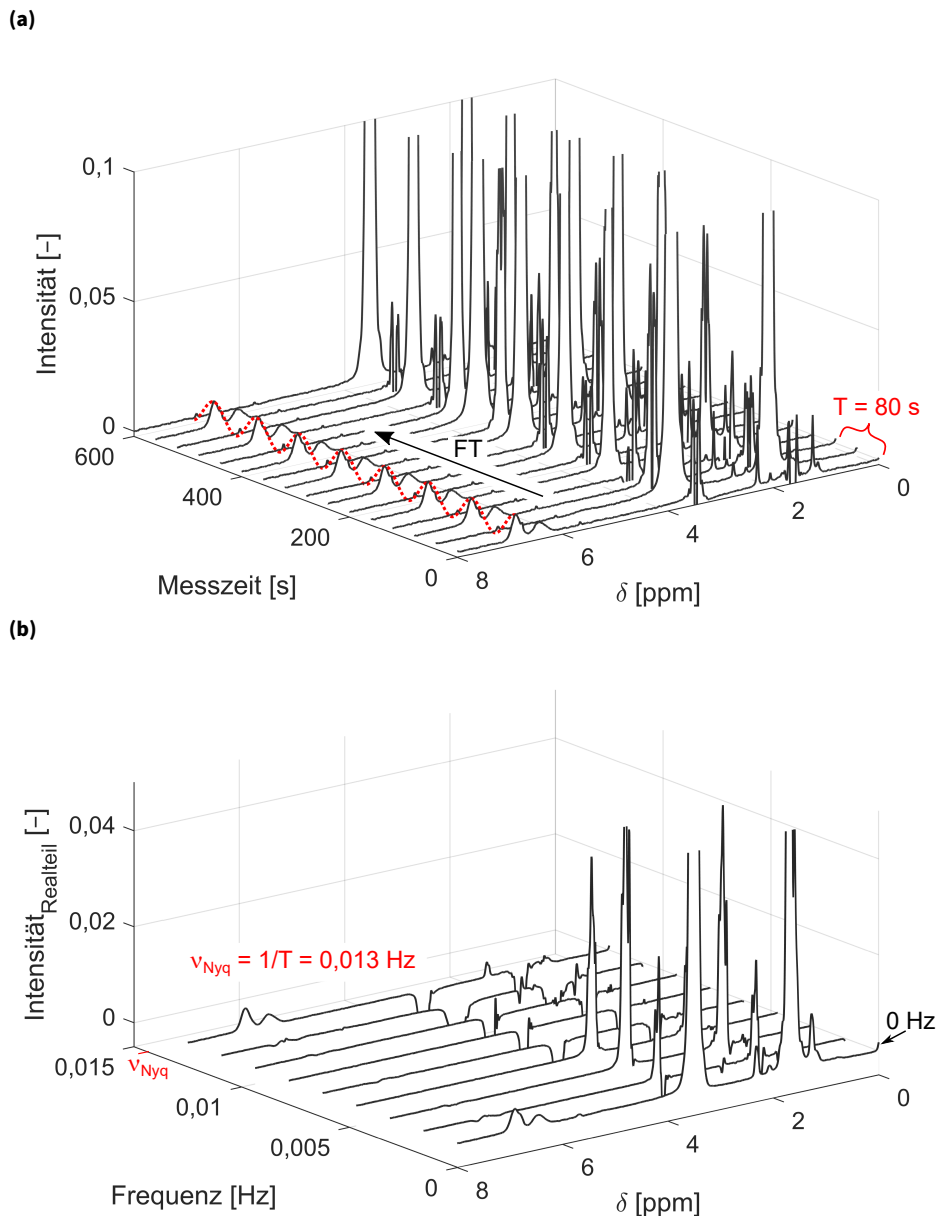


Abbildung 8.2: Durchführung der Fourier-Filterung (FF) zur Signalunterdrückung. In (a) sind die statisch gemessenen NMR Spektren der $2,50 \text{ g L}^{-1}$ PS-Lösung in THF und des reinen THFs zu sehen. Die Spektren wurden entsprechend der Messreihenfolge angeordnet. Jedes Spektrum wurde mit 8 Scans mit einer Wiederholzeit pro Scan von $5,0 \text{ s}$ aufgenommen. Die Spektren sind auf das Maximum im 2D Datensatz normiert. Indem bei der Anordnung mit einem PS-Spektrum begonnen wurde, wurde eine kosinusförmige Periodizität erzeugt, wie in dem Datensatz für das *meta/para* Signal von PS angedeutet ist (roter gestrichelter Kosinus). Die Anordnungsfrequenz hat eine Periode von zwei Datenpunkten (Spektren), was einer Periodendauer von $T = 80 \text{ s}$ ($= 2 \cdot 8 \cdot 5,0 \text{ s}$) entspricht. Entlang der Zeitachse wurde für jede chemische Verschiebung δ eine FT durchgeführt, wodurch das chemisch aufgelöste Spektrum in (b) erhalten wurde. Nach Gleichung 3.3.6, S. 26, entspricht der Realteil der komplexen spektralen Komponente dem Kosinusanteil einer Welle, weshalb im Spektrum nur die Realteile gezeigt sind. Die Nyquist Frequenz ν_{Nyq} entspricht der Anordnungsfrequenz von $0,013 \text{ Hz}$ ($= 1/80 \text{ s}$). In Abbildung 8.3 wird das Spektrum an der Anordnungsfrequenz weiter ausgewertet. Die NMR Messungen wurden von Johanna Tratz durchgeführt.

Kosinusfunktion beschrieben wurde. Zur Visualisierung ist in Abbildung 8.2a eine Kosinusfunktion für die aromatischen *meta* und *para* PS-Protonen in Rot eingezeichnet. Die Periode T der Funktion ist $T = 80 \text{ s}$ und entspricht der Messzeit zweier Spektren. Da die Datenabtastrate $0,025 \text{ Hz}$ ($= 1/40 \text{ s}$) war, beträgt die Nyquist Frequenz nach Gleichung 3.3.21, S. 27, $\nu_{Nyq} = 0,013 \text{ Hz}$, was der Anordnungsfrequenz

ν_0 entspricht.

Die FT wurde entlang den Spektren bei jeder chemischen Verschiebung durchgeführt, wodurch die spektralen Komponenten der Spektrenanordnung aufgelöst werden. Nach Gleichung 3.3.6, S. 26, entspricht der Realteil einer komplexen Zahl dem Kosinusanteil einer Wellenfunktion. Aufgrund der gewählten Anordnung (Kosinusfunktion) befanden sich somit die PS-Signale im Realteil der komplexen spektralen Komponenten. In Abbildung 8.2b sind für jede chemische Verschiebung die Realteile der spektralen Komponenten abgebildet. Die PS- und Lösungsmittelsignale erscheinen zu großen Teilen bei der Nullfrequenz (Mittelwert der Oszillation), wobei die PS-Signale noch zusätzlich bei der Anordnungsfrequenz (entspricht ν_{Nyq}) erscheinen. Sowohl für die PS-Signale, als auch für die Lösungsmittelsignale sind Signalanteile bei anderen spektralen Komponenten zu sehen. Diese erscheinen aufgrund von Variationen der Form oder Position der Signale zwischen den einzelnen Spektren in Abbildung 8.2a. Das Spektrum bei ν_{Nyq} ist in Abbildung 8.3 mit den Spektren der Messungen ohne ($ns = 8$) und mit WET ($ns = 128$) verglichen.

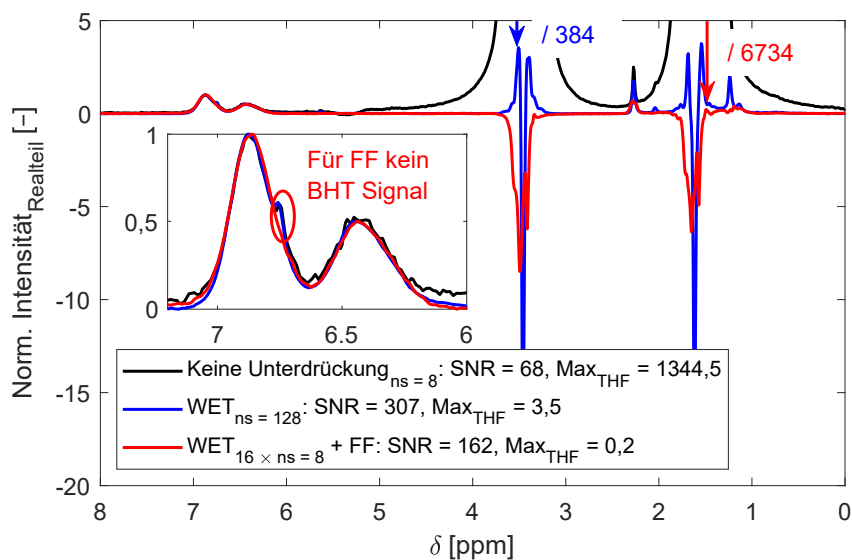


Abbildung 8.3: Auswertung der Sensitivität und Signalunterdrückung durch die Anwendung der Fourier-Filterung (FF). Gezeigt sind NMR Spektren einer $2,50 \text{ g L}^{-1}$ PS- $17,6 \text{ kg mol}^{-1}$ Lösung in THF, aufgenommen ohne Lösungsmittelunterdrückung durch WET mit $ns = 8$ (number of scans, in Schwarz), mit WET mit $ns = 128$ (in Blau) sowie das Spektrum nach der in Abbildung 8.2 dargestellten FF (16 Spektren aufgenommen mit WET und $ns = 8$, in Rot). Die Spektren wurden jeweils auf das Maximum der aromatischen PS-Signale normiert. Das THF-Signal ist mit WET um den Faktor 384 und mit der Kombination aus WET und FF um den Faktor 6 734 reduziert. Zusätzlich sind nach der FF die negativen Artefakte durch die WET Pulssequenz um etwa einen Faktor 2 reduziert und das BHT-Signal, das mit den *meta/para* Signalen von PS überlagert, wurde herausgefiltert. Das Spektrum mit WET und $ns = 128$ wurde in derselben Messzeit aufgenommen wie die Spektren für die FF, sodass die Sensitivität direkt über einen Vergleich der SNR beurteilt werden kann. Für das Spektrum mit WET und $ns = 128$ ist $SNR = 307$, während das Spektrum nach der FF $SNR = 162$ aufweist, etwa einen Faktor 2 geringer. Dies ist darauf zurückzuführen, dass für die FF zur Hälfte der Messzeit nur THF gemessen wurde.

Die Spektren sind auf das Maximum der aromatischen PS-Signale normiert. Verglichen zum Spektrum ohne WET sind die THF-Signale für das $WET_{ns=128}$ Spektrum um ein Faktor 384 und für das Spektrum nach der FF um ein Faktor 6 734 reduziert. Somit verbesserte die FF die Lösungsmittelunterdrückung zusätzlich um etwa einen Faktor 18. Sowohl das $WET_{ns=128}$ als auch das Spektrum nach der FF zeigen negative THF-Signale, wobei für die FF diese etwa um die Hälfte reduziert sind. Neben der deutlich gesteigerten Lösungsmittelunterdrückung zeigt das Spektrum nach der FF auch eine Reduktion von Lösungsmittelverunreinigungen oder -additiven, wie in der Vergrößerung beispielhaft am BHT-Signal zu sehen ist (markiert mit einem roten Kreis).[183]

Zum Vergleich der Sensitivität wurde das SNR für das Maximum der aromatischen PS-Signale berechnet. Das Rauschen ist definiert als die einfache Standardabweichung der basislinienkorrigierten Region zwischen 10 und 12 ppm. Für das $WET_{ns=128}$ Spektrum ist das $SNR = 307$ und für das Spektrum nach der FF ist das $SNR = 162$, trotz gleicher Messzeit etwa ein Faktor 2 geringer. Dieser Unterschied ist darauf zurückzuführen, dass die Spektren für die FF nur zur Hälfte von der Messung der PS-Lösung mit $c(PS) = 2,50 \text{ g L}^{-1}$ entstammen und sonst nur THF gemessen wurde. Dadurch ist die Signalintensität und folglich auch das SNR der PS Signale nach der Signalmittlung durch die FF halbiert.

Bei dem Spektrum ohne WET mit $ns = 8$ ist das $SNR = 68$ und mit WET und $ns = 128$ ist das $SNR = 307$. Durch die Normierung des SNR auf $ns^{1/2}$ wird das SNR für einen Scan ermittelt. Für das Spektrum ohne WET mit $ns = 8$ ist $SNR \cdot ns^{-1/2} = 24,0$ und für das Spektrum mit WET und $ns = 128$ ist $SNR \cdot ns^{-1/2} = 27,1$. Das $SNR \cdot ns^{-1/2}$ des Spektrums ohne WET ist etwas geringer, da aufgrund der intensiven Lösungsmittelsignale eine geringere Empfängerverstärkung verwendet wurde (40 dB bei WET und 16 dB ohne WET). Dadurch wurde, wie in Abbildung 5.6, S. 49, gezeigt, das Rauschen ungenauer digitalisiert. Zusätzlich war die Basislinie durch die intensiven Lösungsmittelsignale instabiler. Dieser Effekt ist auf das Torzeitproblem zurückzuführen und ausführlich in Abschnitt 6.2.2, S. 70, diskutiert. Infolgedessen war der Rauschwert für die Messungen ohne WET höher als mit WET.

Höpfner et al. verglichen 2021 verschiedene Lösungsmittelunterdrückungsmethoden in der SEC-NMR (43 MHz) Kopplung.[113] Mit der WET Methode in Kombination mit der numerischen Lösungsmittelunterdrückung, beschrieben in Abschnitt 5.8, S. 53, wurde eine Reduktion der THF-Signale um einen Faktor 410 beschrieben. Mitarbeiter der Firma Magritek haben gezeigt, dass mit einem 80 MHz *benchtop* NMR Spektrometer (ultra) unter statischen NMR Messbedingungen mit WET das Wassersignal um einen Faktor 1 000 reduziert werden kann.[184] Weiter untersuchten Smallcombe et al. die Lösungsmittelunterdrückung von WET auf Acetonitril mit einem 500 MHz NMR Spektrometer. Es wurde eine Reduktion des Lösungsmittelsignals von etwa 50 000 berichtet.[116] Der in dieser Arbeit erreichte Lösungsmittelunterdrückungsfaktor von 6 734 liegt etwa einen Faktor 10 über dem berichteten Lösungsmittelunterdrückungsfaktor von Höpfner et al. und einen Faktor 6 über dem von Magritek. Verglichen mit der Lösungsmittelunterdrückung des 500 MHz NMR Spektrometers, ist die erreichte Lösungsmittelunterdrückung dennoch einen Faktor von etwa 7 geringer, was vermutlich auf die deutlich schmäleren Linienbreite im 500 MHz NMR Spektrum zurückzuführen ist.

8.3. Zusammenfassung zur Fourier-Filterung

In diesem Kapitel wurde eine Methode zur Signalreduktion von Lösungsmitteln, Kontaminationen und Artefakten vorgestellt. Da diese Methode auf der Fourier-Transformation (FT) beruht, wurde die Methode in diesem Kapitel als Fourier-Filterung (FF) bezeichnet. Gemessen wurden zwei Proben, bestehend aus einer PS-17,6 kg mol⁻¹-Lösung mit $c = 2,5 \text{ g L}^{-1}$ in THF und dem reinen THF. Die Proben wurden abwechselnd gemessen, bis insgesamt 16 Spektren aufgenommen wurden. Entsprechend der Messreihenfolge wurden die Spektren in einer Matrix angeordnet und anschließend entlang der Anordnung eine FT angewandt. Die PS-Signale erscheinen größtenteils bei den Frequenzkomponenten die der Anordnungsfrequenz entsprechen, während die konstanten Signale vom THF größtenteils bei der Nullfrequenz verbleiben.

Ein Vergleich des Spektrums bei der Anordnungsfrequenz mit einem Spektrum, das nur mit WET aufgenommen wurde, zeigte, dass die FF die Lösungsmittelunterdrückung um einen zusätzlichen Faktor 18 verbesserte. Das SNR pro Messzeit war bei der FF um den Faktor 2 geringer als bei der kontinuierlichen Messung der PS-Lösung. Dies ist darauf zurückzuführen, dass für die FF zur Hälfte der Messzeit THF gemessen wurde und somit nach der Fourier-Transformation die Analytensignalintensität halbiert ist.

Aufgrund leichter Unterschiede der Form und Position von Signalen in NMR Spektren wird vermutet, dass die Messreihenfolge und die Anzahl der Spektren wichtige Parameter für die Effektivität der Signalfilterung der FF darstellen und deshalb in der Zukunft genauer untersucht werden sollten.

Ein Nachteil der FF ist, dass Teile der Analytsignale nicht herausgefiltert werden, wodurch eine quantitative Auswertung der Signalfäche erschwert wird. Die Genauigkeit einer quantitativen Bestimmung sollte daher auch Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Teil V.

Fazit und Ausblick

9. Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die LAC-*benchtop* NMR (80 MHz, ^1H optimiert) Kopplung unter Verwendung protonierter Lösungsmittel etabliert und hinsichtlich maximaler Sensitivität optimiert. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 5.1, S. 42, dargestellt. Als Modellsystem wurden fünf Alkylester der *para*-Hydroxybenzoesäure (Methyl- bis Pentylester) verwendet, die unter dem Trivialnamen Parabene zusammengefasst werden. Eine chromatographische Trennung des Modellsystems wurde unter isokratischen Bedingungen mit einer binären Mischung aus Aceton/Wasser (60/40 v/v%) bei einer Flussrate von 1 mL min^{-1} innerhalb 60 min auf einer semipräparativen C_{18} Säule ($250 \times 10\text{ mm}$ Innendurchmesser) erreicht. Eine semipräparative Säule wurde gewählt, da im Vergleich zu einer analytischen Säule bei gleicher Trennleistung eine größere Analytmenge injiziert werden kann, was zu breiteren Analytbanden und damit zu einer längeren NMR Messzeit und geringeren Verdünnung in der NMR Flusszelle führt. Die intensiven Lösungsmittelsignale führen zu Basislinieninstabilitäten. Zusätzlich muss aufgrund der hohen ^1H Konzentration eine geringere Empfängerverstärkung gewählt werden, wodurch die Digitalisierung der NMR Signale verschlechtert und das Rauschen gesteigert wird. Indem Pulssequenzen zur Lösungsmittelunterdrückung angewandt werden, werden diese Effekte reduziert. Da das für die Kopplung verwendete 80 MHz *benchtop* NMR Spektrometer keine z-Gradienten besaß, wurde zur Lösungsmittelunterdrückung die Präsaturation (PRESAT) Pulssequenz verwendet, deren experimenteller Ablauf in Abbildung 5.9, S. 53, beschrieben ist. Zur Steigerung der Sensitivität und der zeitlichen Auflösung des chromatographischen Elutionsprofils sollte die Wiederholzeit der Pulssequenz so kurz wie möglich gewählt und die FIDs ohne Signalmittelung aufgenommen werden. Nach erfolgter Optimierung des Saturierungspulses wurde eine Unterdrückung der Lösungsmittelsignale um etwa einen Faktor 50 innerhalb von 1,0 s erreicht. Durch die Optimierung betrug die minimale Wiederholzeit der PRESAT Pulssequenz, inklusive FID Datenaufnahme von 0,25 s, insgesamt 1,4 s.

Um während der NMR Detektion mehr Signal pro Quadratwurzel Messzeit t_m zu erfassen, wurde der Ernst Winkel (siehe Gleichung 5.6.2, S. 52) genutzt. Verglichen zur Referenzmessung (Rotationswinkel von 90° mit einer Wiederholzeit von $5 \cdot T_1$) kann so die Sensitivität bis zu einem Faktor 1,6 gesteigert werden. Der Ernst Winkel wird in Abhängigkeit von der T_1 Zeit der Analyten gewählt. Ist ein spezifisches Signal von Interesse, sollte dessen T_1 Zeit für die Berechnung des Ernst Winkels verwendet werden. In der hier durchgeführten Methodenoptimierung wurde zur Berechnung des Ernst Winkels eine T_1 Zeit im mittleren Bereich genutzt, um für alle Analyten eine gute Sensitivität zu erhalten.

Das *paramagnetic relaxation enhancement* (PRE) wurde angewandt mit dem Ziel, die T_1 Zeit der Analyten zu reduzieren und somit eine schnellere Signalakkumulation zu erhalten. Mit dieser Methode kann das SNR potentiell um einen Faktor 1,4 gesteigert werden. Jedoch führt die Anwesenheit der gelösten paramagnetischen Relaxationsreagenzien zu einer verschlechterten Lösungsmittelunterdrückung. Da die Anwendung von PRE zusätzlich mit einem hohen Arbeitsaufwand und Chemikalienverbrauch verbunden ist, wurde von einer Anwendung dieser Methode in der LAC-NMR abgesehen.

Durch die Vergrößerung des chromatographischen Injektionsvolumens von $20\ \mu\text{L}$ auf $1000\ \mu\text{L}$ konnte die Konzentration am Peakmaximum um den Faktor 8 bis 16 erhöht werden. Die Konzentration stieg dabei stärker an, je kürzer die Retentionszeit war. Da die Konzentration in der Flusszelle direkt proportional zur Signalintensität im NMR Spektrum ist, wird dadurch das SNR um denselben Faktor verbessert. Mit steigendem Injektionsvolumen nimmt die Peakbreite zu, was zu einer verminderten chromatographischen Auflösung führt. Daher wird empfohlen, ein Injektionsvolumen zu wählen, bei

dem noch eine Basislinienseparation der Analyten sichergestellt werden kann. Kommt es dennoch zu einer unvollständigen chromatographischen Auftrennung, können die Elutionsprofile mithilfe der spektralen Auflösung des NMR Spektrometers aufgelöst werden, sofern die Analyten spezifische NMR Signale besitzen, wie in Abbildung 6.18b, S. 92, gezeigt wird.

Während den LAC-NMR Messungen werden kontinuierlich NMR Spektren aufgenommen, um ein spektral aufgelöstes Chromatogramm in Form einer 2D Datenmatrix zu erhalten. Da für jede Elutionsvolumeneinheit ein NMR Spektrum aufgenommen wurde, ist für jede chemische Verschiebung ein Chromatogramm zugänglich. Indem die NMR Spektren, die während der Analytelution aufgenommen wurden, gemittelt werden, wird das spektrale *SNR* signifikant gesteigert. Diese Signalmittelung kann auf zwei Arten erfolgen: (1) durch eine chromatographische Filterung und (2) durch ein manuelles Mitteln der Spektren.

Bei der chromatographischen Filterung wird eine Fensterfunktion mit den Chromatogrammen bei der jeweiligen chemischen Verschiebung gefaltet. Dabei werden die Spektren innerhalb der Fenstergröße entsprechend der Fensterfunktion gewichtet und gemittelt. Dadurch werden die Peaks, abhängig vom Verhältnis der Peakbreite zur Fensterbreite, verbreitert. Um eine übermäßige Verbreiterung schmaler Peaks zu vermeiden, wurde die Fensterfunktion auf den schmalsten Peak im Modellsystem optimiert. Dieser hatte ein chromatographisches *FWHM* von etwa 60 s. Das maximale *SNR* wurde mit der Tukey-Fensterfunktion in Gleichung 6.3.13, S. 86, mit $\alpha = 0,75$ erhalten. Diese Funktion ähnelt einer Rechteckfunktion, deren Seiten durch Kosinusfunktionen abgeschrägt sind, wobei der Anteil der Kosinuskomponenten durch den α Wert bestimmt wird. Für den ausgewählten Peak betrug die optimale Fensterbreite 82,6 s und resultierte in eine *SNR* Steigerung um etwa einen Faktor 6, während die *FWHM* um 20 % zunahm. Sowohl für die Tukey-Funktion als auch für die Rechteck- und Gauß-Funktion wurde die stärkste *SNR* Steigerung bis zu einer *FWHM* Zunahme von etwa 10 % beobachtet. Bei einer *FWHM* Verbreiterung von 10 % war das *SNR* für alle Fensterfunktionen bereits um den Faktor 5 gesteigert. Ergänzend zur chromatographischen Filterung wurde eine manuelle Signalmittelung durchgeführt. Dabei wurden die Spektren gemittelt, die während der Analytelution aufgenommen wurden. Für unterschiedliche Peakbreiten wird die beste *SNR* Steigerung erhalten, wenn das Mittelungsfenster dem chromatographischen *FWHM* entspricht. Ohne vorherige chromatographische Filterung verbessert die manuelle Mittelung das *SNR* in Abhängigkeit von der Peakbreite um den Faktor 6 – 16. Die *SNR* Steigerung nahm dabei zu, je breiter der Peak war. In Kombination mit der chromatographischen Filterung zeigte die manuelle Mittelung eine signifikante *SNR* Steigerung, wenn die chromatographische *FWHM* mindestens einen Faktor 1,5 größer war als die Fensterbreite der Filterfunktion. Nach der chromatographischen Filterung konnte das *SNR* von Peaks, deren *FWHM* um den Faktor 1,5 – 5 größer war als die Fensterbreite, durch die manuelle Signalmittelung um einen zusätzlichen Faktor von 1,6 – 2 gesteigert werden.

Somit entsprach der Gesamtverbesserungsfaktor für die LAC-NMR etwa $123 (= 1,6 \text{ (Ernst Winkel)} \times 8 \text{ (Injektionsvolumen)} \times 6 \text{ (chromatographische Filterung)} \times 1,6 \text{ (manuelle Signalmittelung)})$, was einer Reduktion der Messzeit um einen Faktor $123^2 \approx 15\,000$ entspricht.

Nach erfolgter Methodenoptimierung wurden die Detektions- (*LOD*) und Bestimmungsgrenzen (*LOQ*), gemessen als Injektionskonzentration, für das Modellsystem bestimmt. Für das Methoxysignal von Methylparaben (entspricht drei ^1H) wurden die folgenden Werte bestimmt: $LOD = 0,010 \text{ g L}^{-1}$ und $LOQ = 0,031 \text{ g L}^{-1}$. Für ein aromatisches Signal von Pentylparaben (entspricht einem ^1H) ergaben sich $LOD = 0,038 \text{ g L}^{-1}$ und $LOQ = 0,134 \text{ g L}^{-1}$. Die erreichte Sensitivität liegt somit im Bereich veröffentlichter Werte der *online* und *onflow* LAC-500 MHz NMR Kopplung.[1]

Durch die erreichte Sensitivität konnte eine binäre Parabenmischung, deren Konzentration um einen Faktor 4 unter dem in der EU zulässigen Höchstwert für kosmetische Produkte lag, mittels LAC-80 MHz NMR Kopplung mit guter Sensitivität ($SNR \approx 90$) analysiert werden.

Zusätzlich wurden Stereoisomere von Polystyrol (PS) Oligomeren mittels LAC-NMR analysiert. Dazu wurde ein PS-Standard mit ($M_p = 682 \text{ g mol}^{-1}$) innerhalb 140 min in die einzelnen Oligomere aufge-

trennt und mittels NMR Detektion gemessen. Um die spektrale Selektivität zu erhöhen und damit möglichst viel Information aus der Feinstruktur der aromatischen Signale zu gewinnen, wurden die NMR Aufnahme- und Prozessierungsparameter angepasst. Aufgrund der geringen Feldstärke konnten allerdings nur qualitative Aussagen über die jeweiligen Stereoisomere getroffen werden.

Diese Beispiele ermöglichen die Abschätzung weiterer Anwendungsgebiete der LAC-NMR Kopplung. Die Methode ist für Proben geeignet, in denen die Analyten in einer Konzentration $c > 0,2 \text{ g L}^{-1}$ vorliegen und deren Signale spektral unterschiedlich sind. Solche Bedingungen können in analytischen Laboren mit einem Fokus auf Grenzwertprüfung oder präparativer HPLC vorkommen.

Zur weiteren Steigerung der Sensitivität in der gekoppelten Analytik wurde eine chromatographische Methode mit sinusförmiger Injektion entwickelt, die als Fourier-Transformation *liquid chromatography* (FT-LC) bezeichnet wird. Dabei wird ein kontinuierliches, oszillierendes Analytkonzentrationsprofil in das chromatographische System eingeleitet, wodurch die analysierte Analytmenge pro $t_m^{1/2}$ und damit die Sensitivität signifikant erhöht wird. Die Phase der sinusförmigen Chromatogramme wird mittels Fourier-Transformation bestimmt und kann mit der Retentionszeit korreliert werden.

Die FT-LC wurde in der SEC zur Analyse von PS-Standards und in der LAC zur Parabenanalyse eingesetzt. Es wurde gezeigt, dass die Retardierung innerhalb der Säule unabhängig von der gewählten Injektionsmethode und der Anwesenheit eines weiteren Analyten ist. Die Verwendung eines 80 MHz *benchtop* NMR Spektrometers als Detektor bei der FT-LAC Analyse einer binären Parabenmischung ermöglichte es, die oszillierenden chromatographischen Elutionsprofile spektral aufzulösen und parallel auszuwerten.

Zur Bestimmung der Sensitivitätssteigerung wurde das $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ bestimmt. In der SEC mit UV Detektion wurde bei der Analyse eines PS-Standards eine Sensitivitätssteigerung um den Faktor 50 im Vergleich zur konventionellen Injektionsmethode mit einem Injektionsvolumen von $100 \mu\text{L}$ erreicht. In der LAC mit NMR Detektion wurde durch die Anwendung der FT-LC das $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ im Vergleich zur oben beschriebenen optimierten konventionellen LAC-NMR Methodik, um einen weiteren Faktor von 1,6 gesteigert. Dieser Faktor ist geringer, da die konventionelle LAC-NMR Messung mit einem Injektionsvolumen von $1000 \mu\text{L}$ aufgenommen und Signalmittelung angewandt wurde, was im Vergleich zur LAC-NMR Messung mit einem Injektionsvolumen von $100 \mu\text{L}$ und ohne Signalmittelung die Sensitivität um etwa einen Faktor 30 steigerte. Daher stimmt der erhaltene Steigerungsfaktor gut mit dem erwarteten Wert von $50/30 \approx 1,7$ überein.

Obwohl die $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ Steigerung durch die FT-LC in der LAC-NMR Kopplung nur einen Faktor 1,6 beträgt, können innerhalb einer Messung deutlich höhere absolute SNR erzielt werden, da das SNR proportional zu $t_m^{1/2}$ ansteigt und t_m methodisch nicht beschränkt ist. Für eine FT-LAC-NMR Messung konnte innerhalb der vierfachen Messzeit einer konventionellen LAC-NMR Messung das absolute SNR um einen Faktor 3 gesteigert werden. Für die durchgeführte Messung wurde für Methylparaben eine Nachweisgrenze von $LOD_{\text{FT-LAC-NMR}} = 0,003 \text{ g L}^{-1}$ abgeschätzt, einen Faktor 3 unter der Nachweisgrenze der konventionellen LAC-NMR Kopplung mit $LOD_{\text{LAC-NMR}} = 0,010 \text{ g L}^{-1}$. Ein zukünftiges Anwendungsgebiet dieser Methodik könnten daher niedrig konzentrierte Proben sein, die in großer Menge vorliegen. Ein mögliches Beispiel wäre die Endgruppenanalyse in Polymeren.

Des Weiteren wurde eine Methode zur numerischen Lösungsmittelunterdrückung in NMR Spektren entwickelt. Diese Methode basiert auf einer alternierenden statischen NMR Messung zweier Proben: der Analytlösung und des reinen Lösungsmittels. Durch eine alternierende Anordnung der Spektren in einem 2D Datenfeld und anschließender Fourier-Transformation entlang den angeordneten Spektren können die Analytsignale herausgefiltert und die Lösungsmittelsignale unterdrückt werden. Diese Methode wurde in dieser Dissertation als Fourier-Filterung (FF) bezeichnet. Mit der WET-Pulssequenz wurde eine Unterdrückung des THF-Signals um etwa einen Faktor 400 erhalten. Indem die WET-Pulssequenz

in Kombination mit der FF angewandt wurde, konnte das Restsignal des THFs um einen weiteren Faktor 18 reduziert werden. Bei der FF wird die Hälfte der Messzeit für die Messung des Lösungsmittels benötigt. Aus diesem Grund ist die Analytsignalintensität nach der Fourier-Transformation halbiert. Folglich ist das $SNR \cdot t_m^{-1/2}$ im Vergleich zur kontinuierlichen Messung der Probenlösung um einen Faktor 2 reduziert.

Diese Methode ist notwendig für Proben, bei denen eine verbesserte Lösungsmittelunterdrückung erforderlich ist. Ein konkretes Anwendungsgebiet könnte in der *offline* HPLC-NMR Kopplung sein, bei der protoniertes Lösungsmittel verwendet wird.

10. Ausblick auf zukünftige Entwicklungen und Forschungsbedarf

Die vorliegende Arbeit behandelt die Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Steigerung der Sensitivität und Lösungsmittelunterdrückung in der LAC-NMR Kopplung. Insgesamt konnte die Sensitivität um einen Faktor 123 gesteigert werden, wodurch neue Anwendungsgebiete erschlossen werden. Die gewonnenen Erkenntnisse und Ergebnisse bilden die Grundlage für zukünftige Forschungsarbeiten. Aktuell wird versucht, die Spektrenaufnahme während der NMR Detektion so schnell wie möglich durchzuführen, um die größtmögliche Sensitivitätssteigerung durch Anwendung des Ernst Winkels und eine hohe Auflösung der chromatographischen Elutionsspur zu erreichen. Aufgrund der kurzen FID Aufnahmezeit (0,26 s) war es zur Vermeidung von Sinc-Artefakten notwendig, eine Apodisierungsfunktion mit starker Linienverbreiterung anzuwenden. Durch Verlängerung der FID Aufnahmezeit ist es möglich, weitere Apodisierungsfunktionen mit unterschiedlichen Linienverbreiterungen (z. B. *Sine bell* oder *Trafficante*) anzuwenden, um die spektrale Selektivität oder die Sensitivität zu erhöhen.[185, 186] Es ist bisher nicht bekannt, ob der Sensitivitätsgewinn durch eine optimale Linienverbreiterung größer ist als der Sensitivitätsgewinn durch die Anwendung des Ernst Winkels.

Zur schnelleren Datenaufnahme in der NMR Detektion wurde in Abschnitt 6.2.3, S. 71, *paramagnetic relaxation enhancement* (PRE) durch den Zusatz von paramagnetischen Relaxationsreagenzien untersucht. Da diese Methode jedoch die Effektivität der Lösungsmittelunterdrückung verringert und mit einem deutlich erhöhten Arbeits- und Chemikalienaufwand verbunden ist, wurde diese Methode in der LAC-NMR Kopplung nicht angewandt. Um die Präpolarisation und somit die NMR Signalintensität zu steigern, könnten im Präpolarisierungsvolumen der Flusszelle paramagnetische Relaxationsreagenzien immobilisiert werden.[187, 188] Somit sind paramagnetische Relaxationsreagenzien nicht im Detektionsvolumen der NMR Flusszelle, wodurch die Effektivität der Lösungsmittelunterdrückung nicht beeinflusst sein sollte.

In Abschnitt 6.3.3, S. 81, wurde erläutert, dass die Signalmittelung entlang des chromatographischen Peaks die maximale Sensitivität ergibt, wenn die Spektren innerhalb der chromatographischen Halbwertsbreite gemittelt werden. Obwohl diese Methode verwendet wurde, um das *SNR* eines Spektrums zu erhöhen, kann sie auch verwendet werden, um das *SNR* der NMR Elutionsspur zu verbessern. Dazu müssten die Elutionsspuren innerhalb der Halbwertsbreite des NMR Signals gemittelt werden. Diese Methode kann angewandt werden, wenn eine genauere Darstellung des Elutionsprofils eines NMR Signals gewünscht wird.

Bisher wurden LAC-NMR Messungen bei konstanten Flussraten durchgeführt. Vorläufige Ergebnisse von Dr. Michael Pollard deuten darauf hin, dass in einer LAC-NMR Messung durch eine Reduktion oder Stoppen der Flussrate während der Analytelution das *SNR* pro Quadratwurzel der Messzeit gesteigert werden kann. Darüber hinaus eröffnet eine Flussratenreduzierung die Möglichkeit einer 2D NMR Detektion, wie aus bisher nicht veröffentlichten Ergebnissen von Dr. Marianne Gaborieau hervorgeht. Eine Flussratenänderung wurde in dieser Arbeit nicht beschrieben, da dadurch das thermische Gleichgewicht des NMR Magneten und damit die Stabilität des externen ^{19}F -Lock beeinträchtigt wird. Um die Anwendung einer Flussratenänderung zu ermöglichen, ist es erforderlich, die thermische Isolierung der HPLC Kapillaren zu verbessern, sodass die Temperatur der mobilen Phase, die durch das NMR Spektrometer geleitet wird, der Magnettemperatur entspricht und unabhängig von der Flussrate

ist. Die Präpolarisierung und die effektive Relaxationszeit sind Flussratenabhängig, sodass sich bei einer Änderung der Flussrate die Intensitäten der Lösungsmittelsignale verändern. Dadurch kann die numerische Lösungsmittelunterdrückung (Referenzsubtraktion und HPLC Basislinienkorrektur) nicht, wie in dieser Arbeit beschrieben, auf den gesamten Datensatz angewandt werden, sondern nur auf Sektionen mit konstanter Flussrate.

Die Gradientenelution wird zur Reduzierung der Messzeit und Fokussierung der Analytbanden in der LAC eingesetzt. In der LAC-NMR Kopplung führt eine Veränderung der Lösungsmittelzusammensetzung zu Änderungen in der Signalintensität, -position, -form und den Relaxationszeiten.[50, 108, 109, 189–191] Dadurch müssen die Lösungsmittelunterdrückungs- und Datenauswertungsmethoden angepasst werden, was Gegenstand weiterführender Forschung sein könnte. In Anhang B.6, S. 179, sind mögliche Methoden beschrieben, wie eine Lösungsmittelunterdrückung während einer Gradientenelution erhalten werden kann.

Die Anwendung der FT-LC in der LAC-NMR Kopplung bietet ein großes Potenzial zur Analyse gering konzentrierter Proben und sollte daher weiter erforscht werden. Bisher ist noch unklar, welche Auswirkungen diese Methode auf die Lösungsmittelunterdrückung und quantitative Bestimmung hat. Weiter wurden die Detektionsgrenzen und die Präzision der Bestimmung des Phasenversatzes noch nicht bestimmt. Es wird angenommen, dass – ähnlich wie bei konventionellen LAC-NMR Messungen – die Intensitäten der Restsignale der Lösungsmittel, je nach Datenqualität, stark variieren. Zudem werden aufgrund geringer Unterschiede in den NMR Spektren bei der FT nicht alle Analytsignalanteile herausgefiltert, was bei quantitativen Bestimmungen zu Fehlern führt.

Abkürzungsverzeichnis

ADC	<i>analog to digital converter/</i> Analog-Digital-Wandler
BHT	Butylhydroxytoluol
c	Konzentration [g L^{-1}]
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CW	<i>continuous wave</i>
D	Dispersität der Molekulargewichtsverteilung
DF	<i>dilution factor/</i> Verdünnungsfaktor
DFT	diskrete Fourier-Transformation
F	Flussrate
FC	<i>flow cell/</i> Flusszelle
FF	Fourier-Filterung
FFTW	<i>fastest Fourier transform in the west</i>
FID	<i>free induction decay/</i> freier Induktionszerfall
FT	Fourier-Transformation
FT-LC	Fourier-Transformation <i>liquid chromatography</i>
FTIR	Fourier-Transformation Infrarot Spektroskopie
FT-SEC	Fourier-Transformation <i>size exclusion chromatography</i>
FWHM	<i>full width at half maximum/</i> Halbwertsbreite
GC	Gaschromatographie
\hbar	reduzierte Planck-Konstante
H	Bodenhöhe
HPLC	<i>high performance liquid chromatography/</i> Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IR	<i>inversion recovery</i>
K_d	Verteilungskoeffizient
k_B	Boltzmannkonstante
LAC	<i>liquid adsorption chromatography/</i> Flüssigkeitsadsorptionschromatographie
LC	<i>liquid chromatography/</i> Flüssigkeitschromatographie

LCCC	<i>liquid chromatography at critical conditions/ Flüssigkeitschromatographie am kritischen Punkt</i>
LOD	<i>limit of detection/ Nachweisgrenze</i>
LOL	<i>limit of linearity/ Linearitätsgrenze</i>
LOQ	<i>limit of quantification/ Bestimmungsgrenze</i>
m	Magnetquantenzahl
M	Magnitude
\vec{M}_0	makroskopische Magnetisierung
\bar{M}_n	zahlengemitteltes Molekulargewicht
M_p	Molekulargewicht am Peakmaximum
MS	Massenspektrometrie
\bar{M}_w	gewichtsgemitteltes Molekulargewicht
$\vec{M}_{x,y}$	transversale Magnetisierung
\vec{M}_z	Gleichgewichtsmagnetisierung
N	Bodenzahl
NMR	<i>nuclear magnetic resonance/ magnetische Kernspinresonanz</i>
NP	<i>normal phase/ Normalphase</i>
ns	<i>number of scans</i>
PMMA	Polymethylmethacrylat
PRE	<i>paramagnetic relaxation enhancement</i>
PRESAT	<i>pre-saturation/ Präsaturation</i>
PS	Polystyrol
PTFE	Polytetrafluorethylen
RI	<i>refractive index/ Brechungsindexdetektor</i>
RP	<i>reversed phase/ Umkehrphase</i>
rxgain	<i>receiver gain/ Empfängerverstärkung</i>
SDV	<i>styrene divinylbenzene copolymer/ Polystyrol-Divinylbenzol Copolymer</i>
SEC	<i>size exclusion chromatography/ Größenausschlusschromatographie</i>
SNR	<i>signal to noise ratio/ Signal-zu-Rausch Verhältnis</i>
SPE	<i>solid phase extraction/ Festphasenextraktion</i>
r_r	<i>sampling rate/ Abtastrate</i>
T	Periode
t_{aq}	<i>acquisition time/ Aufnahmezeit</i>

t_{dead}	<i>dead time/ Totzeit</i>
t_{dw}	<i>dwell time/ Verweilzeit</i>
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
t_{m}	Messzeit
t_{p}	B_1 -Pulslänge
t_{r}	<i>repetition time/ Wiederholzeit</i>
t_{rd}	<i>recycle delay</i>
t_{ret}	Retentionszeit
t_{sat}	Saturierungspulsdauer
T_1	longitudinale Relaxationszeit
T_1^*	effektive longitudinale Relaxationszeit
T_2	transversale Relaxationszeit
T_2^*	effektive transversale Relaxationszeit
UDC	<i>universal data center</i>
UV	ultraviolett
UVD	ultraviolett Detektor
V_{aktiv}	aktives Volumen
V_{coil}	Detektionsvolumen
V_{h}	hydrodynamisches Volumen
V_{i}	Injektionsvolumen
VIS	<i>visible/ sichtbar</i>
V_{p}	Porenvolumen
V_{ret}	Retentionsvolumen
V_0	interpartikuläres Volumen
WET	<i>water suppression enhanced through T_1 effects</i>
zf	<i>zero filling</i>
β	Rotationswinkel
β_{opt}	Ernst Winkel
δ	chemische Verschiebung
γ	gyromagnetisches Verhältnis
$\Delta\varphi$	Phasenverschiebung

$\vec{\mu}$	Magnetisches Moment
ν	Frequenz
ν_L	Larmor Frequenz
ν_{Nyq}	Nyquist Frequenz
φ	Phase
τ	Wartezeit

Abbildungsverzeichnis

2.1.	Einfluss des Molekulargewichts auf das Retentionsvolumen für verschiedene HPLC Methoden.	9
2.2.	Darstellung einer Molekulargewichtsbestimmung mittels Größenausschlusschromatographie.	11
2.3.	Darstellung der Bandenverbreiterung in der HPLC.	12
2.4.	Beschreibung des Zusammenhangs zwischen der Bandenverbreiterung und der Flussrate anhand der Van-Deemter Kurve.	13
2.5.	Definition des linearen Bereichs eines konzentrationsabhängigen HPLC Detektors.	14
3.1.	Beschreibung des Phänomens der Energieaufspaltung, der Larmorpräzession sowie der makroskopischen Magnetisierung in der NMR Spektroskopie.	19
3.2.	Graphische Visualisierung einer NMR Pulssequenz.	21
3.3.	Beschreibung des zeitabhängigen Wiederaufbaus von \vec{M}_0 entlang der z-Achse durch die T_1 Relaxation.	22
3.4.	Zusammenhang der T_2 Relaxation und der Linienform im NMR Spektrum.	23
3.5.	Aufbau der in <i>benchtop</i> NMR Spektrometern verwendeten Halbarch Anordnung von Permanentmagneten und ^{19}F -Locksonde.	30
4.1.	Übersicht über die Anzahl und thematische Zuordnung der Publikationen zur HPLC-NMR Kopplung.	32
4.2.	Mögliche Durchführungen der HPLC-NMR Messungen.	33
4.3.	Typische Flusszellengeometrien für Hochfeld und <i>benchtop</i> NMR Spektrometer.	34
4.4.	Datenstruktur eines spektral aufgelösten Chromatogramms.	37
5.1.	Verwendeter Aufbau für die <i>onflow</i> LAC-NMR Kopplung.	42
5.2.	Sensitivitätsvergleich des 80 MHz NMR Spektrometers (^1H optimiert, Magritek) mit einem 62 MHz (^1H optimiert, Magitek) und einem 400 MHz (Bruker) NMR Spektrometer.	43
5.3.	Durchführung der NMR Messungen ohne chromatographische Separation.	45
5.4.	Experimenteller Ablauf zur Aufnahme von 1D NMR Spektren und 2D Spektrenmatrizen.	46
5.5.	Darstellung der Äquilibrationszeit des 80 MHz NMR Spektrometers für statische und <i>onflow</i> NMR Messungen.	47
5.6.	Kalibrierung der Empfängerverstärkung.	49
5.7.	Darstellung der <i>inversion recovery</i> und Carr-Purcell-Meiboom-Gill Pulssequenz.	50
5.8.	Relative Sensitivität für unterschiedliche Pulswinkel und Wiederholzeit-zu- T_1 Zeit Verhältnisse.	52
5.9.	Illustration der Präsaturation-Pulssequenz.	53
5.10.	Datenprozessierungsschritte zur Bearbeitung von NMR Datensätzen mit und ohne chromatographischer Separation.	54
5.11.	Effekt der numerischen Lösungsmittelunterdrückung.	55
6.1.	Chromatographische Trennung von Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl- und Pentylparaben im linearen Konzentrationsbereich der LAC Säule unter isokratischen Bedingungen.	60
6.2.	NMR Spektren (80 MHz, ^1H optimiert) der Parabene in einem protonierten und deuterierten Aceton/Wasser Gemisch mit 60/40 v/v%.	62

6.3.	Kalibrierung der Pulslänge anhand den aromatischen Singalen von Propylparaben.	63
6.4.	Bestimmung des Detektionsvolumens des 80 MHz NMR Spektrometers.	66
6.5.	Optimierung der PRESAT Pulssequenz.	68
6.6.	Illustration der Auswirkung von PRESAT auf ein Spektrum einer 30 g L ⁻¹ Propylparaben- lösung.	69
6.7.	Quantifizierung der Sensitivitätssteigerung durch die Anwendung des Ernst Winkels. . . .	71
6.8.	Bestimmung der Sensitivitätssteigerung durch Anwendung von <i>paramagnetic relaxation enhancement</i>	73
6.9.	Sensitivitätsvergleich der in Tabelle 6.4 aufgeführten NMR Aufnahmemethoden.	75
6.10.	NMR Elutionsprofile zum Vergleich der Leistung der Flusszelligeometrien.	78
6.11.	Auswirkung der Flussrate auf das NMR Elutionsprofil von Propylparaben.	81
6.12.	Charakterisierung der Chromatogramme für unterschiedliche Injektionsvolumina.	82
6.13.	Sensitivitätssteigerung durch Signalmittelung entlang des chromatographischen Peaks. . .	83
6.14.	Vergleich der NMR Spektren der LAC-NMR Messungen mit verschiedenen Injektionsvolumina.	84
6.15.	Visualisierung der chromatographischen Fensterfunktionen.	86
6.16.	Auswertung der Effektivität der chromatographischen Fensterfunktionen.	87
6.17.	Bestimmung der Sensitivitätsgrenzen der optimierten LAC-NMR Kopplung zur Paraben- analyse.	89
6.18.	Parabenanalyse als Applikationsbeispiel der LAC-NMR (80 MHz) Kopplung.	92
6.19.	NMR Spektrum eines Polystyrol-Standards mit $M_p = 682 \text{ g mol}^{-1}$	93
6.20.	Spektral aufgelöstes Chromatogramm der LAC-NMR (80 MHz) Messung eines PS-Standards mit $M_p = 682 \text{ g mol}^{-1}$	95
6.21.	NMR Spektren der PS-Oligomere mit einem Polymerisationsgrad von $n = 1 - 4$	96
7.1.	Veranschaulichung des Prinzips der Fourier-Transformation <i>liquid chromatography</i> , FT-LC.	104
7.2.	Experimenteller Aufbau für die FT-SEC.	107
7.3.	Profile der relativen Volumenzusammensetzung zweier Lösungsmittelreservoirs für die sinusförmige Injektion	108
7.4.	Verarbeitung der Zeitdaten einer FT-SEC Messung.	110
7.5.	<i>SNR</i> Definition im Fourier-Raum für die FT-SEC Methodik.	111
7.6.	Vergleich der Molekulargewichtskalibrierungen, die mit der konventionellen SEC und der FT-SEC erstellt wurden.	114
7.7.	Chromatogramm der FT-SEC Analyse einer Mischung aus zwei PS-Standards.	116
7.8.	Auswirkung der Periode T auf das <i>SNR</i> einer FT-SEC Analyse.	118
7.9.	Konzentrationsüberladungslimits der analytischen SDV Säule für die FT-SEC und die konventionelle SEC Methode.	120
7.10.	Sensitivitätsvergleich der FT-SEC mit der konventionellen SEC Methode.	122
7.11.	Geeignete NMR Signale für die Auflösung einer FT-LAC-NMR Analyse der Parabenmischung	124
7.12.	FT-LAC-NMR Analyse einer Methyl- und Propylparabenmischung.	126
8.1.	Auswirkung der exponentiellen Apodisierung auf das Spektrum der PS-Lösung.	134
8.2.	Durchführung der Fourier-Filterung zur Signalunterdrückung.	135
8.3.	Auswertung der Sensitivität und Signalunterdrückung durch die Fourier-Filterung.	136
B.1.	Flusszellenkalibrierung der FC-9 und FC-10 für das 80 MHz NMR Spektrometer.	176
B.2.	DRI Chromatogramme einer Konzentrationsreihe von Methyl- und Pentylparaben.	177
B.3.	Abschätzung des Konzentrationsüberladungslimit für Methyl- und Pentylparaben.	178
B.4.	Pulslängenkalibrierung der aromatischen PS Protonen in Acetonitril.	179
B.5.	Funktionsweise der dynamischen PRESAT Pulssequenz.	180

C.1. Interface zum Feststellen der Datenquelle.	181
C.2. Das WinGPC Login Fenster.	182
C.3. Auswahl der Schnittstelle des Computers zur HPLC.	182
C.4. Erstellung des Lösungsmittelgradienten für das sinusförmige Analytkonzentrationsprofil. .	183
C.5. Einstellungen in der Benutzeroberfläche der quaternären Pumpe.	184
C.6. Nutzung der Relais Funktion zur periodischen Wiederholung des Gradienten.	184
C.7. Absorptionsspektrum von PS in THF.	185
C.8. Bestimmung der LOL für UVD2 bei 236 und 260 nm.	185
C.9. Auswirkung gelöster UV absorbierende Gaskomponenten auf die FT-SEC Messung.	186
C.10. Auswirkung der unvollständigen Entgasung auf die höheren harmonischen Frequenzen. .	187
C.11. FT-SEC Chromatogrammabschnitte von Messungen mit unterschiedlicher Periode.	188

Tabellenverzeichnis

2.1. Häufig verwendete HPLC Detektoren mit typischen Nachweisgrenzen und Größen der linearen Bereiche.	15
3.1. Zusammenhang zwischen der Atomkernzusammensetzung und der Kernspinnquantenzahl.	18
3.2. Eigenschaften der wichtigsten Isotope für die NMR Spektroskopie.	19
4.1. Für die HPLC-NMR Kopplung geeignete Lösungsmittel.	35
5.1. Spektroskopische Charakterisierung verwendeter Lösungsmittel und Lösungsmittelgemische.	48
6.1. Chromatographische Charakterisierung des Paraben-Modellsystems.	61
6.2. Anpassungsparameter der Pulslängenkalibrierung.	64
6.3. Relaxationszeiten des Modellsystems.	65
6.4. Zusammenfassung der Parameter der untersuchten NMR Aufnahmemethoden.	74
6.5. Bewertung der NMR Aufnahmemethoden.	75
6.6. Spezifikationen der NMR Flusszellen.	77
6.7. Messung der Leistung der NMR Flusszellen.	77
6.8. Zusammenfassung der Parameter der Anpassungsgleichung sowie der daraus bestimmten <i>LOD</i> und <i>LOQ</i> Werte.	89
6.9. T_1 Relaxationszeiten der aromatischen und Methylsignale einer 60 g L^{-1} Polystyrollösung in Acetonitril.	94
6.10. Integralverhältnisse der Oligomeranalyse von Styrol.	97
6.11. Optimierte Aufnahme- und Prozessierungsparameter einer LAC-NMR Messung.	101
7.1. Charakterisierung von PS-Mischungen mittels FT-SEC.	116
7.2. Vergleich der Retardierung von Methyl- und Propylparaben, gemessen mit der FT-LAC und mit der LAC.	127
7.3. Abschätzung der Sensitivitätssteigerung durch Anwendung der FT-LC in der LAC-NMR Kopplung.	128
A.1. Spezifikationen der verwendeten Lösungsmittel.	169
A.2. Spezifikationen der verwendeten Chemikalien für die HPLC-NMR Methodenoptimierung.	169
A.3. Spezifikationen der verwendeten Polystyrol Standards.	169
B.1. Zusammenfassung der Empfängerverstärkungen der NMR Aufnahmemethoden.	177

Literatur

- [1] R. Brkljača und S. Urban. "Limit of detection studies for application to natural product identification using high performance liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance spectroscopy". In: *Journal of Chromatography A* 1375 (2015), S. 69. ISSN: 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.11.074.
- [2] J. H. Knox und H. M. Pyper. "Framework for maximizing throughput in preparative liquid chromatography". In: *Journal of Chromatography A* 363.1 (1986), S. i. ISSN: 0021-9673. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)88988-8.
- [3] S. Fanali, P. R. Haddad, C. F. Poole, P. J. Schoenmakers und D. Lloyd. *Liquid chromatography: applications*. Elsevier, 2013. ISBN: 978-0-12-415806-1. DOI: 10.1016/C2010-0-68910-3.
- [4] C. Seger und S. Sturm. "NMR-based chromatography readouts: indispensable tools to "translate" analytical features into molecular structures". In: *Cells* 11.21 (2022), S. 3526. ISSN: 2073-4409. DOI: 10.3390/cells11213526.
- [5] H. Pasch. "Hyphenated separation techniques for complex polymers". In: *Polymer Chemistry* 4.9 (2013), S. 2628. DOI: 10.1039/C3PY21095B.
- [6] T. F. Beskers, T. Hofe und M. Wilhelm. "Development of a chemically sensitive online SEC detector based on FTIR spectroscopy". In: *Polymer Chemistry* 6.1 (2015), S. 128. ISSN: 1759-9954. DOI: 10.1039/C4PY01043D.
- [7] C. Seger, S. Sturm und H. Stuppner. "Mass spectrometry and NMR spectroscopy: modern high-end detectors for high resolution separation techniques—state of the art in natural product HPLC-MS, HPLC-NMR, and CE-MS hyphenations". In: *Natural Product Reports* 30.7 (2013), S. 970. ISSN: 0265-0568. DOI: 10.1039/c3np70015a.
- [8] S. Sturm und C. Seger. "Liquid chromatography–nuclear magnetic resonance coupling as alternative to liquid chromatography–mass spectrometry hyphenations: Curious option or powerful and complementary routine tool?" In: *Journal of Chromatography A* 1259 (2012), S. 50. ISSN: 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.05.032.
- [9] E. Uliyanchenko. "Applications of hyphenated liquid chromatography techniques for polymer analysis". In: *Chromatographia* 80.5 (2017), S. 731. ISSN: 0009-5893. DOI: 10.1007/s10337-016-3193-y.
- [10] A. M. Striegel, W. W. Yau, J. J. Kirkland und D. D. Bly. *Modern size-exclusion liquid chromatography: practice of gel permeation and gel filtration chromatography*. Wiley-VCH, 2009. ISBN: 0470442832.
- [11] W. Hiller, P. Sinha, M. Hehn und H. Pasch. "On-line LC-NMR - from an expensive toy to a powerful tool in polymer analysis". In: *Progress in Polymer Science* 39.5 (2014), S. 979. ISSN: 0079-6700. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2013.10.001.
- [12] T. Gebretsadik, W. Linert, M. Thomas, T. Berhanu und R. Frew. "LC–NMR for natural product analysis: A journey from an academic curiosity to a robust analytical tool". In: *Sci* 3.1 (2021), S. 6. ISSN: 2413-4155. DOI: 10.3390/sci3010006.

- [13] T. Castaing-Cordier, D. Bouillaud, J. Farjon und P. Giraudeau. "Recent advances in benchtop NMR spectroscopy and its applications". In: *Annual Reports on NMR Spectroscopy* 103 (2021), S. 191. ISSN: 0066-4103. DOI: 10.1016/bs.arnmr.2021.02.003.
- [14] Q Magnetics. *QM-125: 125 MHz Permanent-Magnet Benchtop Proton NMR Spectrometer*. Manuscript. 2021. URL: <https://www.qmagnetics.com/>.
- [15] B. Blümich. "Low-field and benchtop NMR". In: *Journal of Magnetic Resonance* 306 (2019), S. 27. ISSN: 1090-7807. DOI: 10.1016/j.jmr.2019.07.030.
- [16] J. Mitchell, L. F. Gladden, T. C. Chandrasekera und E. J. Fordham. "Low-field permanent magnets for industrial process and quality control". In: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 76 (2014), S. 1. ISSN: 0079-6565. DOI: 10.1016/j.pnmrs.2013.09.001.
- [17] K. Singh und B. Blümich. "NMR spectroscopy with compact instruments". In: *Trends in Analytical Chemistry* 83 (2016), S. 12. ISSN: 0165-9936. DOI: 10.1016/j.trac.2016.02.014.
- [18] E. Danieli, J. Perlo, B. Blümich und F. Casanova. "Small magnets for portable NMR spectrometers". In: *Angewandte Chemie International Edition* 49.24 (2010), S. 4133. ISSN: 1433-7851. DOI: 10.1002/anie.201000221.
- [19] S. Fanali, P. R. Haddad, C. F. Poole, P. J. Schoenmakers und David Lloyd. *Liquid chromatography: fundamentals and instrumentation*. Amsterdam; Heidelberg: Elsevier, 2013. ISBN: 978-0-12-415807-8.
- [20] M. Cudaj, G. Guthausen, T. Hofe und M. Wilhelm. "On-line coupling of size exclusion chromatography and low field ^1H NMR spectroscopy". In: *Macromolecular Chemistry and Physics* 213.18 (2012), S. 1933. ISSN: 1022-1352. DOI: 10.1002/macp.201200290.
- [21] K. Albert. *On-line LC-NMR and related techniques*. Wiley-VCH, 2003. ISBN: 0470854812.
- [22] C. Botha. "Method development of new chemically sensitive detectors for size exclusion chromatography". Thesis. 2021. DOI: 10.5445/IR/1000130418.
- [23] J. W. Jaroszewski. "Hyphenated NMR methods in natural products research, part 1: direct hyphenation". In: *Planta Medica* 71.08 (2005), S. 691. ISSN: 0032-0943. DOI: 10.1055/s-2005-871298.
- [24] L. S. Ettre. "M. S. Tswett and the invention of chromatography". In: *LCGC North America* 21.5 (2003), S. 458. ISSN: 1527-5949.
- [25] R. L. Wixom und C. W. Gehrke. *Chromatography: a science of discovery*. Wiley-VCH, 2011. ISBN: 1118060296.
- [26] L. S. Ettre. "Chromatography: the separation technique of the 20th century". In: *Chromatographia* 51 (2000), S. 7. ISSN: 0009-5893. DOI: 10.1007/BF02490689.
- [27] L. S. Ettre. "Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993)". In: *Pure and Applied Chemistry* 65.4 (1993), S. 819. ISSN: 1365-3075. DOI: 10.1351/pac199365040819.
- [28] L. K. Kostanski, D. M. Keller und A. E. Hamielec. "Size-exclusion chromatography - a review of calibration methodologies". In: *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 58.2 (2004), S. 159. ISSN: 0165-022X. DOI: 10.1016/j.jbbm.2003.10.001.
- [29] D. A. Skoog, F. J. Holler und S. R. Crouch. *Principles of instrumental analysis*. Boston, MA: Cengage Learning, 2016. ISBN: 978-1-305-57721-3.
- [30] V. R. Meyer. *Praxis der Hochleistungsflüssigchromatographie*. Weinheim: Wiley-VCH, 2009. ISBN: 978-3-527-32046-2.
- [31] H. Pasch und B. Trathnigg. *Multidimensional HPLC of polymers*. Springer, 2013. ISBN: 3642360807.

- [32] J. N. Israelachvili. *Intermolecular and surface forces*. third. Academic press, 2011. ISBN: 0123919339.
- [33] H. Schmidt-Traub, M. Schulte, A. Seidel-Morgenstern und H. Schmidt-Traub. *Preparative chromatography*. Wiley Online Library, 2012. ISBN: 9783527328987.
- [34] S. Kromidas. *HPLC richtig optimiert: Ein Handbuch für Praktiker*. Wiley-VCH, 2012. ISBN: 3527660356.
- [35] S. Mori und H. G. Barth. *Size exclusion chromatography*. Springer Science & Business Media, 1999. ISBN: 3540656359.
- [36] H. G. Barth, B. E. Boyes und C. Jackson. "Size exclusion chromatography and related separation techniques". In: *Analytical chemistry* 70.12 (1998), 251R. ISSN: 0003-2700.
- [37] D. Alliet. "Analysis of the negative peaks in gel permeation chromatography". In: *Journal of Polymer Science* 5.7 (1967), S. 1783. ISSN: 0449-296X. DOI: 10.1002/pol.1967.150050725.
- [38] C. S. Wu. *Handbook of size exclusion chromatography and related techniques: revised and expanded*. Bd. 91. CRC press, 2003. ISBN: 0203913329.
- [39] J. Samuelsson, L. Edström, P. Forssén und T. Fornstedt. "Injection profiles in liquid chromatography. I. A fundamental investigation". In: *Journal of Chromatography A* 1217.26 (2010), S. 4306. ISSN: 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.04.045.
- [40] S. T. Sie und G. W. A. Rijnders. "Band-broadening in packed chromatographic columns". In: *Analytica Chimica Acta* 38 (1967), S. 3. ISSN: 0003-2670. DOI: 10.1016/S0003-2670(01)80557-2.
- [41] K. Vanderlinden, K. Broeckhoven, Y. Vanderheyden und G. Desmet. "Effect of pre-and post-column band broadening on the performance of high-speed chromatography columns under isocratic and gradient conditions". In: *Journal of Chromatography A* 1442 (2016), S. 73. ISSN: 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.03.016.
- [42] S. R. Bakalyar, C. Phipps, B. Spruce und K. Olsen. "Choosing sample volume to achieve maximum detection sensitivity and resolution with high-performance liquid chromatography columns of 1.0, 2.1 and 4.6 mm ID". In: *Journal of Chromatography A* 762.1 (1997), S. 167. ISSN: 0021-9673. DOI: 10.1016/S0021-9673(96)00851-5.
- [43] J. J. Van Deemter, F. J. Zuiderweg und A. Klinkenberg. "Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography". In: *Chemical Engineering Science* 5.6 (1956), S. 271. ISSN: 0009-2509. DOI: 10.1016/0009-2509(96)81813-6.
- [44] M. Swartz. "HPLC detectors: a brief review". In: *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 33.9 (2010), S. 1130. ISSN: 1082-6076. DOI: 10.1080/10826076.2010.484356.
- [45] K. Zhang, K. L. Kurita, C. Venkatramani und D. Russell. "Seeking universal detectors for analytical characterizations". In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 162 (2019), S. 192. ISSN: 0731-7085. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.09.029.
- [46] D. L. Pavia, G. M. Lampman und G. S. Kriz. *Introduction to Spectroscopy*. 3. Aufl. Thomson Learning, 2001. ISBN: 9780030319617.
- [47] M. Hesse, H. Meier und B. Zeeh. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Georg Thieme Verlag, 2005. ISBN: 313576107X.
- [48] F. Bloch. "Nuclear induction". In: *Physical Review* 70.7-8 (1946), S. 460. ISSN: 0031-8914. DOI: 10.1016/0031-8914(51)90068-7.
- [49] E. M. Purcell. "Spontaneous emission probabilities at radio frequencies". In: *Confined Electrons and Photons: New Physics and Applications*. Springer, 1995, S. 839. DOI: 10.1103/PhysRev.69.674.2.

- [50] T. D. W. Claridge. *High-resolution NMR techniques in organic chemistry*. Bd. 27. Elsevier, 2009. ISBN: 008099993X.
- [51] R. R. Ernst, G. Bodenhausen und A. Wokaun. *Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions*. Clarendon Press, 2004.
- [52] A. E. Derome. *Modern NMR techniques for chemistry research*. Elsevier, 2013. ISBN: 1483286428.
- [53] K. Seidel, J. Matysik und B. Luy. "Trendbericht: Kernmagnetische Resonanz". In: *Nachrichten aus der Chemie* 69.4 (2021), S. 63. ISSN: 1439-9598. DOI: 10.1002/nadc.20214106854.
- [54] Bruker. *NMR Instruments GHz Class NMR*. Web Page. 2024. URL: <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mr/nmr/ascend-ghz-class.html>.
- [55] T. A. van Beek. "Low-field benchtop NMR spectroscopy: status and prospects in natural product analysis". In: *Phytochemical Analysis* 32.1 (2021), S. 24. ISSN: 0958-0344. DOI: 10.1002/pca.2921.
- [56] N. Watanabe und E. Niki. "Direct-coupling of FT-NMR to high performance liquid chromatography". In: *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 54.4 (1978), S. 194. ISSN: 0386-2208. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)95270-1.
- [57] H. W. Spiess. "50th anniversary perspective: The importance of NMR spectroscopy to macromolecular science". In: *Macromolecules* 50.5 (2017), S. 1761. ISSN: 0024-9297. DOI: 10.1021/acs.macromol.6b02736.
- [58] D. K. Singh, M. Pradhan und A. Materny. *Modern techniques of spectroscopy*. Springer, 2021. ISBN: 9813360836.
- [59] Z. Y. Tian. *Advanced Diagnostics in Combustion Science*. Springer Nature, 2023. ISBN: 981990546X.
- [60] P. W. Atkins und J. De Paula. *Physikalische Chemie*. 2. Aufl. Wiley-VCH, 2022. ISBN: 3527332472.
- [61] K. Hatada und T. Kitayama. *NMR spectroscopy of polymers*. Berlin: Springer, 2004. ISBN: 978-3540402206.
- [62] F. A. Bovey, L. Jelinski und P. A. Mirau. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Academic Press, 1988. ISBN: 0080916996.
- [63] B. Blümich. "Introduction to compact NMR: A review of methods". In: *Trends in Analytical Chemistry* 83 (2016), S. 2. ISSN: 0165-9936. DOI: 10.1016/j.trac.2015.12.012.
- [64] K. Schmidt-Rohr und H. W. Spiess. *Multidimensional solid-state NMR and polymers*. London: Academic Press, 1994. ISBN: 978-0126266306.
- [65] H. Günther. *NMR spectroscopy: basic principles, concepts and applications in chemistry*. Wiley-VCH, 2013. ISBN: 3527330003.
- [66] R. Kellner, J. M. Mermet, M. Otto und H. M. Widmer. *Analytical chemistry. The approved text to the FECS curriculum analytical chemistry*. Wiley-VCH, 1998. ISBN: 9783527288816.
- [67] M. J. Minkler, J. M. Kim, V. V. Shinde und B. S. Beckingham. "Low-field ^1H NMR spectroscopy: Factors impacting signal-to-noise ratio and experimental time in the context of mixed microstructure polyisoprenes". In: *Magnetic Resonance in Chemistry* 58.12 (2020), S. 1168. ISSN: 0749-1581. DOI: 10.1002/mrc.5022.
- [68] J. H. Lee, Y. Okuno und S. Cavagnero. "Sensitivity enhancement in solution NMR: Emerging ideas and new frontiers". In: *Journal of Magnetic Resonance* 241 (2014), S. 18. ISSN: 1090-7807. DOI: 10.1016/j.jmr.2014.01.005.
- [69] I. Fleming und D. H. Williams. *Spectroscopic methods in organic chemistry*. Springer, 2019. ISBN: 978-3-030-18251-9. DOI: 10.1007/978-3-030-18252-6.

- [70] R. E Hoffman. "Standardization of chemical shifts of TMS and solvent signals in NMR solvents". In: *Magnetic Resonance in Chemistry* 44.6 (2006), S. 606. ISSN: 0749-1581. DOI: 10.1002/mrc.1801.
- [71] T. Rundlöf, M. Mathiasson, S. Bekiroglu, B. Hakkarainen, T. Bowden und T. Arvidsson. "Survey and qualification of internal standards for quantification by ^1H NMR spectroscopy". In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 52.5 (2010), S. 645. ISSN: 0731-7085. DOI: 10.1016/j.jpba.2010.02.007.
- [72] J. W. Cooley und J. W. Tukey. "An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series". In: *Mathematics of Computation* 19.90 (1965), S. 297. ISSN: 0025-5718. DOI: 10.2307/2003354.
- [73] M. Werner. *Digitale Signalverarbeitung mit MATLAB*. 6. Aufl. Springer, 2019. ISBN: 3834814733.
- [74] M. Frigo und S. G. Johnson. "FFTW: an adaptive software architecture for the FFT". In: *IEEE Xplore* (1998), S. 1381. ISSN: 1520. DOI: 10.1109/ICASSP.1998.681704.
- [75] The MathWorks Inc. *MATLAB version: 9.11.0 (R2021b)*. Online Database. 2021.
- [76] A. Jüngel und H. G. Zachmann. *Mathematik für Chemiker*. Wiley-VCH, 2014. ISBN: 3527675523.
- [77] M. Wilhelm, P. Reinheimer und M. Ortseifer. "High sensitivity Fourier transform rheology". In: *Rheologica Acta* 38.4 (1999), S. 349. ISSN: 1435-1528. DOI: 10.1007/s003970050185.
- [78] F. L. Pedrotti, L. M. Pedrotti und L. S. Pedrotti. *Introduction to Optics*. Cambridge University Press, 2019. ISBN: 978-1108552493. DOI: 10.1017/9781108552493.
- [79] T. Butz. *Fouriertransformation für Fußgänger*. Wiesbaden: Vieweg Teubner Verlag, 1998. ISBN: 978-3-322-94868-7. DOI: 10.1007/978-3-322-94867-0.
- [80] S. W. Homans. *A dictionary of concepts in NMR*. Oxford: Clarendon Press, 1995. ISBN: 9780198552741.
- [81] V. Zorin, M. A. Bernstein und C. Cobas. "A robust, general automatic phase correction algorithm for high-resolution NMR data". In: *Magnetic Resonance in Chemistry* 55.8 (2017), S. 738. ISSN: 0749-1581. DOI: 10.1002/mrc.4586.
- [82] K. F. Sheberstov, E. Sistaré Guardiola und D. Jeannerat. "Everything you wanted to know about phase and reference frequency in one-and two-dimensional NMR spectroscopy". In: *Magnetic Resonance in Chemistry* 58.5 (2020), S. 376. ISSN: 0749-1581. DOI: 10.1002/mrc.4938.
- [83] A. Ebel, W. Dreher und D. Leibfritz. "Effects of zero-filling and apodization on spectral integrals in discrete Fourier-transform spectroscopy of noisy data". In: *Journal of Magnetic Resonance* 182.2 (2006), S. 330. ISSN: 1090-7807. DOI: 10.1016/j.jmr.2006.06.026.
- [84] E. Bartholdi und R. R. Ernst. "Fourier spectroscopy and the causality principle". In: *Journal of Magnetic Resonance* 11.1 (1973), S. 9. ISSN: 0022-2364. DOI: 10.1016/0022-2364(73)90076-0.
- [85] F. Jiru. "Introduction to post-processing techniques". In: *European Journal of Radiology* 67.2 (2008), S. 202. ISSN: 0720-048X. DOI: 10.1016/j.ejrad.2008.03.005.
- [86] D. Bouillaud, J. Farjon, O. Gonçalves und P. Giraudeau. "Benchtop NMR for the monitoring of bioprocesses". In: *Magnetic Resonance in Chemistry* 57.10 (2019), S. 794. ISSN: 0749-1581. DOI: 10.1002/mrc.4821.
- [87] P. Giraudeau und F. X. Felpin. "Flow reactors integrated with in-line monitoring using benchtop NMR spectroscopy". In: *Reaction Chemistry & Engineering* 3.4 (2018), S. 399. ISSN: 399-413. DOI: 10.1039/C8RE00083B.
- [88] M. V. S. Elipe. "Application of hyphenated NMR in industry". In: *Nuclear Magnetic Resonance*. Bd. 45. 2016, S. 190. ISBN: 1782620532. DOI: 10.1039/9781782624103-00190.
- [89] Magritek. *SpinsolveExpert - User Manual Version 1.41.00*. Manuscript. 2021.

- [90] E. Danieli, J. Perlo, A. L. L. Duchateau, G. K. M. Verzijl, V. M. Litvinov, B. Blümich und F. Casanova. "On-line monitoring of chemical reactions by using bench-top nuclear magnetic resonance spectroscopy". In: *ChemPhysChem* 15.14 (2014), S. 3060. ISSN: 1439-4235. DOI: 10.1002/cphc.201402049.
- [91] B. P. Hills, K. M. Wright und D. G. Gillies. "A low-field, low-cost Halbach magnet array for open-access NMR". In: *Journal of Magnetic Resonance* 175.2 (2005), S. 336. ISSN: 1090-7807. DOI: 10.1016/j.jmr.2005.04.015.
- [92] K. Halbach. "Design of permanent multipole magnets with oriented rare earth cobalt material". In: *Nuclear Instruments and Methods* 169.1 (1980), S. 1. ISSN: 0029-554X. DOI: 10.1016/0029-554X(80)90094-4.
- [93] P. Blümler und H. Soltner. "Construction and Application of Halbach Magnets in Magnetic Resonance". In: *Applied Magnetic Resonance* 54 (2023), S. 1701. ISSN: 701-1739. DOI: 10.1007/s00723-023-01602-2.
- [94] D. I. Hoult und R. E. Richards. "The signal-to-noise ratio of the nuclear magnetic resonance experiment". In: *Journal of Magnetic Resonance* 24.1 (1976), S. 71. ISSN: 0022-2364. DOI: 10.1016/0022-2364(76)90233-X.
- [95] N. Zientek, K. Meyer, S. Kern und M. Maiwald. "Quantitative online NMR spectroscopy in a nutshell". In: *Chemie Ingenieur Technik* 88.6 (2016), S. 698. ISSN: 0009-286X. DOI: 10.1002/cite.201500120.
- [96] Clarivate. *Web of Science*. Web Page. URL: <https://www.webofscience.com/wos/woscc/basic-search>.
- [97] E. Bayer, K. Albert, M. Nieder, E. Grom und T. Keller. "Online coupling of high performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance". In: *Journal of Chromatography A* 186 (1979), S. 497. ISSN: 0021-9673. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)95270-1.
- [98] J. F. Haw, T. E. Glass, D. W. Hausler, E. Motell und H. C. Dorn. "Direct coupling of a liquid chromatograph to a continuous flow hydrogen nuclear magnetic resonance detector for analysis of petroleum and synthetic fuels". In: *Analytical Chemistry* 52.7 (1980), S. 1135. ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/ac50057a032.
- [99] S. D. Riegel und G. M. Leskowitz. "Benchtop NMR spectrometers in academic teaching". In: *Trends in Analytical Chemistry* 83 (2016), S. 27. ISSN: 0165-9936. DOI: 10.1016/j.trac.2016.01.001.
- [100] R. W. Morrison und M. Zhang. "Applications of benchtop NMR in the organic chemistry instructional laboratory". In: *Magnetic Resonance in Chemistry* 58.12 (2020), S. 1187. ISSN: 0749-1581. DOI: 10.1002/mrc.5031.
- [101] I. J. Lawson, C. Ewart, A. Kraft und D. Ellis. "Demystifying NMR spectroscopy: applications of benchtop spectrometers in the undergraduate teaching laboratory". In: *Magnetic Resonance in Chemistry* 58.12 (2020), S. 1256. ISSN: 0749-1581. DOI: 10.1002/mrc.5055.
- [102] M. Cudaj, G. Guthausen, T. Hofe und M. Wilhelm. "SEC-MR-NMR: online coupling of size exclusion chromatography and medium resolution NMR spectroscopy". In: *Macromolecular Rapid Communications* 32.8 (2011), S. 665. ISSN: 1022-1336. DOI: 10.1002/marc.201000760.
- [103] C. Botha, J. Höpfner, B. Mayerhöfer und M. Wilhelm. "On-line SEC-MR-NMR hyphenation: optimization of sensitivity and selectivity on a 62 MHz benchtop NMR spectrometer". In: *Polymer Chemistry* 10.18 (2019), S. 2230. ISSN: 1759-9962. DOI: 10.1039/C9PY00140A.

- [104] J. Höpfner, K. F. Ratzsch, C. B. Botha und M. Wilhelm. "Medium resolution ^1H NMR at 62 MHz as a new chemically sensitive online detector for size exclusion chromatography (SEC-NMR)". In: *Macromolecular Rapid Communications* 39.7 (2018), e1700766. DOI: 10.1002/marc.201700766.
- [105] M. Cudaj. "Medium Resolution-NMR zur chemisch sensitiven Detektion in der polymeren GPC-Analytik". Thesis. 2012.
- [106] M. V. S. Elipe. *LC-NMR and other hyphenated NMR techniques: overview and applications*. Wiley-VCH, 2011. ISBN: 978-1-118-13539-6.
- [107] S. A. Korhammer und A. Bernreuther. "Hyphenation of high-performance liquid chromatography (HPLC) and other chromatographic techniques (SFC, GPC, GC, CE) with nuclear magnetic resonance (NMR): A review". In: *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 354.2 (1996), S. 131. ISSN: 0937-0633. DOI: 10.1007/PL00012706.
- [108] P. A. Keifer. "Chemical shift referencing and resolution stability in gradient LC-NMR (acetonitrile: water)". In: *Journal of Magnetic Resonance* 199.1 (2009), S. 75. ISSN: 1090-7807. DOI: 10.1016/j.jmr.2009.04.010.
- [109] P. A. Keifer. "Chemical shift referencing and resolution stability in methanol:water gradient LC-NMR". In: *Journal of Magnetic Resonance* 205.1 (2010), S. 130. ISSN: 1090-7807. DOI: 10.1016/j.jmr.2010.04.009.
- [110] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw und K. I. Goldberg. "NMR chemical shifts of trace impurities: common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist". In: *Organometallics* 29.9 (2010), S. 2176. ISSN: 0276-7333. DOI: 10.1021/om100106e.
- [111] S. Davies, C. Bauer, P. Barker und R. Freeman. "The dynamic range problem in NMR". In: *Journal of Magnetic Resonance* 64.1 (1985), S. 155. ISSN: 0022-2364. DOI: 10.1016/0022-2364(85)90045-9.
- [112] E. Fukushima. *Experimental pulse NMR: a nuts and bolts approach*. Chapman und Hall, 2018, S. 556. ISBN: 0201627264.
- [113] J. Höpfner, B. Mayerhöfer, C. Botha, D. Bouillaud, J. Farjon, P. Giraudeau und M. Wilhelm. "Solvent suppression techniques for coupling of size exclusion chromatography and ^1H NMR using benchtop spectrometers at 43 and 62 MHz". In: *Journal of Magnetic Resonance* 323 (2021), S. 106889. DOI: 10.1016/j.jmr.2020.106889.
- [114] B. Gouilleux, B. Charrier, S. Akoka und P. Giraudeau. "Gradient-based solvent suppression methods on a benchtop spectrometer". In: *Magnetic Resonance in Chemistry* 55.2 (2017), S. 91. ISSN: 0749-1581. DOI: 10.1002/mrc.4493.
- [115] M. V. S. Elipe. "Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique". In: *Analytica Chimica Acta* 497.1 (2003), S. 1. ISSN: 0003-2670. DOI: 10.1016/j.aca.2003.08.048.
- [116] S. H. Smallcombe, S. L. Patt und P. A. Keifer. "WET solvent suppression and its applications to LC NMR and high-resolution NMR spectroscopy". In: *Journal of Magnetic Resonance* 117.2 (1995), S. 295. ISSN: 1064-1858. DOI: 10.1006/jmra.1995.0759.
- [117] A. Olivieri und G. M. Escandar. *Practical three-way calibration*. Elsevier, 2014. ISBN: 0124104541.
- [118] M. Wasim und R. G. Brereton. "Application of multivariate curve resolution methods to on-flow LC-NMR". In: *Journal of Chromatography A* 1096.1 (2005), S. 2. ISSN: 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.05.101.
- [119] T. M. Alam und M. K. Alam. "Chemometric analysis of NMR spectroscopy data: a review". In: *Annual Reports on NMR Spectroscopy* 54 (2005), S. 41. ISSN: 0066-4103. DOI: 10.1016/S0066-4103(04)54002-4.

- [120] M. Matz, C. Botha und M. Wilhelm. "Chemically-sensitive detection in HPLC". In: *Wiley Analytical Science Magazine* 5.Sep/22 (2022), S. 19.
- [121] United States Pharmacopeia. *General Chapter, <761> Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. Government Document. 2023.
- [122] H. Pasch, W. Hiller und R. Haner. "Investigation of the tacticity of oligostyrenes by on-line HPLC/¹H NMR". In: *Polymer* 39.8-9 (1998), S. 1515. ISSN: 0032-3861. DOI: 10.1016/S0032-3861(97)00446-1.
- [123] D. I. Hoult und R. E. Richards. "Critical factors in the design of sensitive high resolution nuclear magnetic resonance spectrometers". In: *Proceedings of the Royal Society of London* 344.1638 (1975), S. 311–340. ISSN: 0080-4630.
- [124] H. Mo, J. S. Harwood und D. Raftery. "Receiver gain function: the actual NMR receiver gain". In: *Magnetic Resonance in Chemistry* 48.3 (2010), S. 235. ISSN: 0749-1581. DOI: 10.1002/mrc.2563.
- [125] E. D. Becker, J. A. Ferretti und P. N. Gambhir. "Selection of optimum parameters for pulse Fourier transform nuclear magnetic resonance". In: *Analytical Chemistry* 51.9 (1979), S. 1413. ISSN: 0003-2700. DOI: DOI10.1021/ac50045a016.
- [126] D. D. Traficante und L. R. Steward. "The relationship between sensitivity and integral accuracy further comments on optimum tip angle and relaxation delay for quantitative analysis". In: *Concepts in Magnetic Resonance* 6.2 (1994), S. 131. ISSN: 1043-7347. DOI: 10.1002/cmr.1820060204.
- [127] R. R. Ernst und W. A. Anderson. "Application of Fourier transform spectroscopy to magnetic resonance". In: *Review of Scientific Instruments* 37.1 (1966), S. 93. ISSN: 0034-6748. DOI: DOI10.1063/1.1719961.
- [128] H. Z. Wang und S. J. Riederer. "A spoiling sequence for suppression of residual transverse magnetization". In: *Magnetic Resonance in Medicine* 15.2 (1990), S. 175. ISSN: 0740-3194. DOI: 10.1002/mrm.1910150202.
- [129] Y. Zur, M. L. Wood und L. J. Neuringer. "Spoiling of transverse magnetization in steady-state sequences". In: *Magnetic Resonance in Medicine* 21.2 (1991), S. 251. ISSN: 0740-3194. DOI: 10.1002/mrm.1910210210.
- [130] F. H. Epstein, J. P. Mugler und J. R. Brookeman. "Spoiling of transverse magnetization in gradient-echo (GRE) imaging during the approach to steady state". In: *Magnetic Resonance in Medicine* 35.2 (1996), S. 237. ISSN: 0740-3194. DOI: 10.1002/mrm.1910350216.
- [131] J. Leupold, J. Hennig und K. Scheffler. "Moment and direction of the spoiler gradient for effective artifact suppression in RF-spoiled gradient echo imaging". In: *Magnetic Resonance in Medicine* 60.1 (2008), S. 119. ISSN: 0740-3194. DOI: 10.1002/mrm.21614.
- [132] T. F. Beskers, T. Hofe und M. Wilhelm. "Online coupling of size-exclusion chromatography and IR spectroscopy to correlate molecular weight with chemical composition". In: *Macromolecular Rapid Communications* 33.20 (2012), S. 1747. ISSN: 1022-1336. DOI: 10.1002/marc.201200403.
- [133] M. Matz, M. Pollard, M. Gaborieau, J. Tratz, C. Botha und M. Wilhelm. "Enhancing sensitivity in the hyphenation of high-performance liquid chromatography to benchtop nuclear magnetic resonance spectroscopy at isocratic and onflow conditions". In: *The Journal of Physical Chemistry B* 128.39 (2024), S. 9512. ISSN: 1520-6106. DOI: 10.1021/acs.jpcc.4c03509.
- [134] European parliament und the council. *Regulation (EC) No 1223-2009 on cosmetic products*. Legal Rule or Regulation. 2009.
- [135] R. Meusinger. *NMR-Spektren richtig ausgewertet: 100 Übungen für Studium und Beruf*. 1. Aufl. Springer, 2010. ISBN: 3642016839.

- [136] Magritek. *SpinsolveExpert – Pulse Programming Guide*. Manuscript. 2020.
- [137] D. I. Hoult, C. N. Chen, H. Eden und M. Eden. "Elimination of baseline artifacts in spectra and their integrals". In: *Journal of Magnetic Resonance* 51.1 (1983), S. 110. ISSN: 0022-2364. DOI: 10.1016/0022-2364(83)90106-3.
- [138] C. G. Tang. "An analysis of baseline distortion and offset in NMR spectra". In: *Journal of Magnetic Resonance* 109.2 (1994), S. 232. ISSN: 1064-1858. DOI: 10.1006/jmra.1994.1160.
- [139] M. E. Smith und J. H. Strange. "NMR techniques in materials physics: a review". In: *Measurement Science and Technology* 7.4 (1996), S. 449. ISSN: 0957-0233. DOI: 10.1088/0957-0233/7/4/002.
- [140] I. P. Gerothanassis. "Methods of avoiding the effects of acoustic ringing in pulsed Fourier transform nuclear magnetic resonance spectroscopy". In: *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 19.3 (1987), S. 267. ISSN: 0079-6565. DOI: 10.1016/0079-6565(87)80005-5.
- [141] S. K. Bharti und R. Roy. "Quantitative ^1H NMR spectroscopy". In: *Trends in Analytical Chemistry* 35 (2012), S. 5. ISSN: 0165-9936. DOI: 10.1016/j.trac.2012.02.007.
- [142] T. Schönberger, Y. B. Monakhova, D. W. Lachenmeier und T. Kuballa. "Guide to NMR method development and validation-Part I: Identification and quantification". In: *EUROLAB Technical Reports* 2014 (2014), S. 1. DOI: 10.13140/RG.2.2.30200.83208.
- [143] M. Mobli und J. C. Hoch. *Fast NMR data acquisition: beyond the Fourier transform*. Royal Society of Chemistry, 2017. ISBN: 978-1-78262-836-1. DOI: 10.1039/9781782628361.
- [144] H. G. Hocking, K. Zangger und T. Madl. "Studying the structure and dynamics of biomolecules by using soluble paramagnetic probes". In: *ChemPhysChem* 14.13 (2013), S. 3082. ISSN: 1439-4235. DOI: 10.1002/cphc.201300219.
- [145] G. N. La Mar, W. Dew Horrocks und R. H. Holm. *NMR of paramagnetic molecules: principles and applications*. Elsevier, 1973.
- [146] S. Cai, C. Seu, Z. Kovacs, A. D. Sherry und Y. Chen. "Sensitivity enhancement of multidimensional NMR experiments by paramagnetic relaxation effects". In: *Journal of the American Chemical Society* 128.41 (2006), S. 13474. ISSN: 0002-7863. DOI: 10.1021/ja0634526.
- [147] N. Bloembergen, E. M. Purcell und R. V. Pound. "Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption". In: *Physical Review* 73.7 (1948), S. 679. DOI: 10.1103/PhysRev.73.679.
- [148] R. B. Lauffer. "Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging: theory and design". In: *Chemical Reviews* 87.5 (1987), S. 901. ISSN: 0009-2665.
- [149] G. Guiochon, D. G. Shirazi und A. Felinger. *Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography*. Academic Press, 2006. ISBN: 0123705371.
- [150] A. Jaulmes, C. Vidal-Madjar, H. Colin und G. Guiochon. "Study of peak profiles in nonlinear liquid chromatography". In: *The Journal of Physical Chemistry* 90.1 (1986), S. 207. ISSN: 0022-3654. DOI: 10.1021/j100273a047.
- [151] Z. s. Pápai und T. L. Pap. "Analysis of peak asymmetry in chromatography". In: *Journal of Chromatography A* 953.1 (2002), S. 31. ISSN: 0021-9673. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)00121-8.
- [152] J. L. Sudmeier, U. L. Günther, K. Albert und W. W. Bachovchin. "Sensitivity optimization in continuous-flow FTNMR". In: *Journal of Magnetic Resonance* 118.2 (1996), S. 145. ISSN: 1064-1858. DOI: 10.1006/jmra.1996.0023.
- [153] M. Matz, C. Botha, T. F. Beskers und M. Wilhelm. "Fourier transformation liquid chromatography: increasing sensitivity by a factor of 50". In: *The Analyst* 147.6 (2022), S. 1199. DOI: 10.1039/d1an02298a.

- [154] M. Broquaire und P. R. Guinebault. "Large volume injection of biological samples dissolved in a non-eluting solvent: a way to increase sensitivity and a means of automating drug determination using HPLC". In: *Journal of Liquid Chromatography* 4.11 (1981), S. 2039. ISSN: 0148-3919. DOI: 10.1080/01483918108067559.
- [155] J. Dai, P. W. Carr und D. V. McCalley. "A new approach to the determination of column overload characteristics in reversed-phase liquid chromatography". In: *Journal of Chromatography A* 1216.12 (2009), S. 2474. ISSN: 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.01.036.
- [156] T. O'Haver. *Pragmatic introduction to signal processing 2023: with applications in scientific measurement*. Independently published, 2023. ISBN: 979-8378715381.
- [157] P. Bloomfield. *Fourier analysis of time series: an introduction*. Wiley-VCH, 2004. ISBN: 0471653993.
- [158] B. Grabe und W. Hiller. "Online coupling of liquid chromatography and two-dimensional diffusion ordered spectroscopy for the analysis of oligostyrenes". In: *Journal of Chromatography A* (2024), S. 464750. ISSN: 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2024.464750.
- [159] W. Hiller, M. Hehn, T. Hofe und K. Oleschko. "Online size exclusion chromatography - NMR for the determination of molar mass distributions of copolymers". In: *Analytical Chemistry* 82.19 (2010), S. 8244. ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/ac1013095.
- [160] M. Matz. "Development and optimisation of a novel liquid chromatographic method with periodic excitation". Thesis. 2020.
- [161] B. L. Karger, M. Martin und G. Guiochon. "Role of column parameters and injection volume on detection limits in liquid chromatography". In: *Analytical Chemistry* 46.12 (1974), S. 1640. ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/ac60348a053.
- [162] R. W. Frei und J. F. Lawrence. *Chemical derivatization in analytical chemistry*. Bd. 1. Chromatography. Springer, 1978. ISBN: 978-0306406089.
- [163] N. Kishikawa. "Derivatization techniques for chromatographic analysis". In: *Analytical Sciences* 34.10 (2018), S. 1109. ISSN: 0910-6340. DOI: 10.2116/analsci.highlights1810.
- [164] C. N. Reilley, G. P. Hildebrand und J. W. Ashley. "Gas chromatographic response as a function of sample input profile". In: *Analytical Chemistry* 34.10 (1962), S. 1198. ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/ac60190a008.
- [165] C. Mars und H. C. Smit. "Sample introduction in correlation liquid chromatography Application, properties and working conditions for a novel injection system". In: *Analytica Chimica Acta* 228 (1990), S. 193. ISSN: 0003-2670. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)80496-1.
- [166] J. B. Phillips und M. F. Burke. "Cross-correlation chromatography applied to gas-solid adsorption studies". In: *Journal of Chromatographic Science* 14.10 (1976), S. 495. ISSN: 1945-239X. DOI: 10.1093/chromsci/14.10.495.
- [167] A. F. Siegle, S. Pallmann und O. Trapp. "Significant sensitivity enhancement in Hadamard transform high-performance liquid chromatography by application of long modulation sequences constructed from lower order sequences". In: *Journal of Chromatography A* 1575 (2018), S. 34. ISSN: 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.08.069.
- [168] D. Obst. "Verfahren zur kontinuierlichen gaschromatographischen Analyse unter Anwendung der Phasenmodulation". In: *Journal of Chromatography A* 32 (1968), S. 8. ISSN: 0021-9673. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)80467-2.
- [169] S. Hiratsuka und A. Ichikawa. "A new method of continuous gas chromatography". In: *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 40.10 (1967), S. 2303. ISSN: 1348-0634. DOI: 10.1246/bcsj.40.2303.

- [170] D. E. Carter und G. L. Esterson. "Continuous gas chromatography of multicomponent hydrocarbon mixtures". In: *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals* 9.4 (1970), S. 661. ISSN: 0196-4313. DOI: 10.1021/i160036a024.
- [171] A. F. Siegle und O. Trapp. "Improving the signal-to-noise ratio in gel permeation chromatography by Hadamard encoding". In: *Journal of Chromatography A* 1448 (2016), S. 93. ISSN: 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.04.057.
- [172] M. R. Wunsch, R. Lehnig und O. Trapp. "On-line continuous trace process analytics using multiplexing gas chromatography". In: *Analytical Chemistry* 89.7 (2017), S. 4038. ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b04674.
- [173] A. F. Siegle und O. Trapp. "Implementation of Hadamard encoding for rapid multisample analysis in liquid chromatography". In: *Journal of Separation Science* 38.22 (2015), S. 3839. ISSN: 1615-9306. DOI: 10.1002/jssc.201500849.
- [174] A. F. Siegle und O. Trapp. "Hyphenation of Hadamard encoded multiplexing liquid chromatography and circular dichroism detection to improve the signal-to-noise ratio in chiral analysis". In: *Analytical Chemistry* 87.23 (2015), S. 11932. ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b03705.
- [175] A. F. Siegle und O. Trapp. "Development of a straightforward and robust technique to implement Hadamard encoded multiplexing to high performance liquid chromatography". In: *Analytical Chemistry* 86.21 (2014), S. 10828. ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/ac502933f.
- [176] J. Doehl. "Chromatographic and UV-spectroscopic properties of solvated oxygen in mixtures of acetonitrile and water". In: *Journal of Chromatographic Science* 26.1 (1988), S. 7. ISSN: 1945-239X. DOI: 10.1093/chromsci/26.1.7.
- [177] S. R. Bakalyar, M. P. T. Bradley und R. Honganen. "The role of dissolved gases in high-performance liquid chromatography". In: *Journal of Chromatography A* 158 (1978), S. 277. ISSN: 0021-9673. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)89973-2.
- [178] S. T. Popovici, W. T. Kok und P. J. Schoenmakers. "Band broadening in size-exclusion chromatography of polydisperse samples". In: *Journal of Chromatography A* 1060.1 (2004), S. 237. ISSN: 0021-9673. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.05.099.
- [179] A. E. Taylor. "L'Hospital's rule". In: *The American Mathematical Monthly* 59.1 (1952), S. 20. ISSN: 0002-9890. DOI: 10.1080/00029890.1952.11988058.
- [180] H. A. David, H. O. Hartley und E. S. Pearson. "The distribution of the ratio, in a single normal sample, of range to standard deviation". In: *Biometrika* 41.3 (1954), S. 482. ISSN: 0006-3444. DOI: 10.2307/2332728.
- [181] J. C. Moore. "The overload effect in gel permeation chromatography". In: *Separation Science* 5.6 (1970), S. 723. ISSN: 0037-2366. DOI: 10.1080/00372367008055535.
- [182] H. Müller. "Tetrahydrofuran". In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (2000). ISSN: 1435-6007. DOI: 10.1002/14356007.
- [183] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar und A. Nudelman. "NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities". In: *Journal of organic chemistry* 62.21 (1997), S. 7512. ISSN: 0022-3263. DOI: 10.1021/om100106e.
- [184] Magritek. *Solvent suppression: the key to measure your samples every time you need while they are synthesized*. Manuscript. 2022. URL: <https://magritek.com/2022/03/24/solvent-suppression-the-key-to-measure-your-samples-immediately-while-they-are-synthesized/>.

- [185] D. D. Traficante und M. Rajabzadeh. "Optimum window function for sensitivity enhancement of NMR signals". In: *Concepts in Magnetic Resonance* 12.2 (2000), S. 83. ISSN: 1043-7347.
- [186] R. G. Brereton, M. J. Garson und J. Staunton. "The application of adjustable-parameter sine bell apodization to carbon-13 NMR spectra". In: *Journal of Magnetic Resonance* 43.2 (1981), S. 224. ISSN: 0022-2364. DOI: 10.1016/0022-2364(81)90033-0.
- [187] D. Bruck, R. Dudley, C. A. Fyfe und J. Van Delden. "Sample magnetization using immobilized free radicals for use in flow NMR systems". In: *Journal of Magnetic Resonance* 42.1 (1981), S. 51. ISSN: 0022-2364. DOI: 10.1016/0022-2364(81)90009-3.
- [188] H. H. Fischer, M. Seiler, T. S. Ertl, U. Eberhardinger, H. Bertagnolli, H. Schmitt-Willich und K. Albert. "Quantification studies in continuous-flow ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy by use of immobilized paramagnetic relaxation agents". In: *The Journal of Physical Chemistry B* 107.20 (2003), S. 4879. ISSN: 1520-6106. DOI: 10.1021/jp021631d.
- [189] I. Krämer, W. Hiller und H. Pasch. "On-line coupling of gradient-HPLC and ^1H NMR for the analysis of random poly [(styrene)-co-(ethyl acrylate)] s". In: *Macromolecular Chemistry and Physics* 201.14 (2000), S. 1662. ISSN: 1022-1352. DOI: 10.1002/1521-3935(20000901)201:14<1662::AID-MACP1662>3.0.CO;2-J.
- [190] D. A. Laude und C. L. Wilkins. "Reverse-phase high-performance liquid chromatography/nuclear magnetic resonance spectrometry in protonated solvents". In: *Analytical Chemistry* 59.4 (1987), S. 546. ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/ac00131a003.
- [191] M. Hehn, K. Maiko, H. Pasch und W. Hiller. "Online HPLC-NMR: an efficient method for the analysis of PMMA with respect to tacticity". In: *Macromolecules* 46.19 (2013), S. 7678. ISSN: 0024-9297. DOI: 10.1021/ma401429n.
- [192] Magritek. *Brochure Spinsolve 60 MHz Proton*. Manuscript. 2020. URL: <https://magritek.com/wp-content/uploads/2020/06/Spinsolve-Proton-60-MHz.pdf>.
- [193] Magritek. *Brochure Spinsolve 80 MHz*. Manuscript. 2022. URL: <https://magritek.com/wp-content/uploads/1450/06/Spinsolve-80-MHz.pdf>.
- [194] Magritek. *Brochure Spinsolve 90 MHz*. Manuscript. 2021. URL: <https://magritek.com/wp-content/uploads/1409/07/Spinsolve-90-MHz.pdf>.
- [195] D. A. Jayawickrama, A. M. Wolters und J. V. Sweedler. "Mobile phase compensation to improve NMR spectral properties during solvent gradients". In: *Analyst* 128.5 (2003), S. 421. ISSN: 0003-2654. DOI: 10.1039/b301359f.

A. Anhang: Verwendete Chemikalien, Instrumente und Software

A.1. Verbrauchsmaterialien

Im Folgenden sind die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tabelle A.1: Spezifikationen der verwendeten Lösungsmittel. Alle Lösungsmittel wurden in HPLC-Qualität erworben.

Bezeichnung	Reinheit [w/w%]	Hersteller
Aceton	≥ 99,8	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Acetonitrile	≥ 99,9	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Tetrahydrofuran	≥ 99,9	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Wasser	keine Verunreinigungen detektiert	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

Tabelle A.2: Spezifikationen der verwendeten Chemikalien für die HPLC-NMR Methodenoptimierung.

Bezeichnung	Reinheit [w/w%]	Hersteller
Methylparaben (4-Hydroxybenzoesäuremethylester)	≥ 99,0	ACROS, Geel, Belgien
Ethylparaben (4-Hydroxybenzoesäureethylester)	≥ 99,0	ACROS, Geel, Belgien
Propylparaben (4-Hydroxybenzoesäurepropylester)	≥ 99,0	ACROS, Geel, Belgien
Butylparaben (4-Hydroxybenzoesäurebutylester)	≥ 99,0	Alfa Aesar, Haverhill, USA
Pentylparaben (4-Hydroxybenzoesäurepentylester)	≥ 98,0	Alfa Aesar, Haverhill, USA
Gadolinium(III)-chlorid hexahydrat	≥ 99,9	Alfa Aesar, Haverhill, USA

Tabelle A.3: Spezifikationen der verwendeten Polystyrol (PS)-Standards.

Bez. ^a	M_p [kg mol ⁻¹]	\overline{M}_w [kg mol ⁻¹]	\overline{M}_n [kg mol ⁻¹]	\overline{D}	Hersteller
PS-0,682	0,682	0,707	0,641	1,10	PSS, Mainz, Deutschland
PS-4,70	4,70	4,73	4,60	1,03	PSS, Mainz, Deutschland
PS-17,6	17,6	17,3	16,9	1,03	PSS, Mainz, Deutschland
PS-75,5	75,5	75,5	73,3	1,03	Intern synthetisiert ^b
PS-100	100	96,0	92,0	1,04	PSS, Mainz, Deutschland
PS-526	526	524	502	1,04	PSS, Mainz, Deutschland
PS-851	851	827	764	1,08	PSS, Mainz, Deutschland

^a Bez. = Bezeichnung, ^b Synthetisiert von Dr. Matthias Heck.

Für statische NMR Messungen wurden NMR Röhren Boroeco-5-7 von Deutero (Kastellaun, Deutschland) bezogen mit einem Außendurchmesser von 4,95 mm und einem Innendurchmesser von 4,09 mm.

Für HPLC Messungen wurden folgende Säulen verwendet:

- Für LAC: semipräparative (250 × 10 mm Innendurchmesser), Modifizierung: C₁₈, Partikelgröße: 5 μm, Porengröße: 125 Å, Hersteller: Phenomenex, Torrance, USA
- Für SEC: analytische (300 × 8 mm Innendurchmesser), Material: SDV, Partikelgröße: 5 μm, Trennbereich: 0,100 – 1000 kg mol⁻¹, Hersteller: PSS, Mainz, Deutschland

A.2. Instrumente

A.2.1. HPLC

Die HPLC bestand aus einer quaternären Pumpe (1260 Infinity II, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) mit einem Inline-Entgaser, einem manuellen Injektionsventil (Rheodyne, 7725i) mit Injektionsschleifen aus Edelstahl mit den Volumen $V_i = 20, 100, 500$ und $1000 \mu\text{L}$, einem Säulenofen (TCC 6500, PSS, Mainz, Deutschland), einem DRI Detektor (1260 Infinity, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) und zwei UV Detektoren (UVD1: 1260 Infinity, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland; UVD2: 1260 Infinity II, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Die für die FT-LC verwendete UDC-Box (Modell 810, PSS, Mainz, Deutschland) nutzte einen 24 Bit ADC mit einer Datenabtastrate von 1 Hz.

A.2.2. NMR Spektrometer

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten NMR Geräte aufgelistet:

- Spinsolve 60 MHz, ¹H optimiert^a, Feldstärke: 1,45 T (¹H Larmorfrequenz = 62 MHz), ¹H Linienbreite (20% CHCl₃ in CDCl₃): 50 % Peakhöhe < 0,5 Hz, 0,55 % Peakhöhe < 20 Hz, [192] ¹H Sensitivität: nicht spezifiziert, aber in der Dimension 260:1 (Spezifikationen nach Magitek, Aachen, Deutschland [22])
- Spinsolve 80 MHz, ¹H optimiert^a, Feldstärke: 1,9 T (¹H Larmorfrequenz = 80 MHz), ¹H Linienbreite (20% CHCl₃ in CDCl₃): 50 % Peakhöhe < 0,5 Hz, 0,55 % Peakhöhe < 20 Hz, ¹H Sensitivität: (1 % Ethylbenzol in CDCl₃) 280:1 (Spezifikationen nach Magitek, Aachen, Deutschland [193])
- Spinsolve 90 MHz Ultra, ¹H und ¹³C mit z-Gradienten mit 0,5 T m⁻¹ und Autosampler, Feldstärke: 2,1 T (¹H Larmorfrequenz = 90 MHz), ¹H Linienbreite (20% CHCl₃ in CDCl₃): 50 % Peakhöhe < 0,25 Hz, 0,55 % Peakhöhe < 12 Hz, ¹H Sensitivität (1 % Ethylbenzol in CDCl₃): 240:1 (Spezifikationen nach Magitek, Aachen, Deutschland [194])
- 400 MHz Ascend mit Avance III Konsole, Probenkopf: PA BBI 400S1 H-BB-D-05 (Bruker, Rheintetten, Deutschland)

^a ¹H optimiert bedeutet, dass der Schwingkreis nur ¹H Kerne detektieren kann.

A.3. Software

Die Datenaufnahme und Instrumentsteuerung der HPLC Messungen erfolgte mit WinGPC (Version 8.32, Build 8844) und die der NMR Messungen mit SpinsolveExpert (Version 1.41.18). Für die Auswertung der FT-LC Messungen wurde MATLAB (Version 2021a) und für die Auswertung der HPLC-NMR Datensätze wurde MATLAB (Version 2021b) sowie MestReNova (v14.1.2) verwendet.

B. Anhang: Experimentelle Parameter und Zusatzinformationen für die Ergebnisse der LAC-NMR Kopplung

B.1. Experimenteller Ablauf der Pulssequenzen

Die in SpinsolveExpert vorprogrammierten Pulssequenzen von Magritek wurden verwendet und modifiziert. Die genutzte Programmiersprache war Prospa.

Experimentelle Beschreibung der Pulssequenz ohne PRESAT

```
procedure(pulse_program,dir,mode,pars)

# Expose parameters for Microzed implementation
if(nrArgs == 3)
assignlist(pars)
endif

# Interface description (name, label, x, y, ctrl, vartype)
interface = ["nucleus",      "Nucleus",      "0","0", "tb",  "readonly_string";
"b1Freq1H",      "B1 Frequency (MHz)",    "0","1", "tbw", "freq";
"repTime",      "Repetition time (ms)",  "0","2", "tbw", "reptime";
"90Amplitude1H", "Pulse amplitude (dB)",  "1","0", "tb",  "pulseamp";
"pulseLength1H", "Pulse length (us)",    "1","1", "tb",  "pulselength";
"acqDelay",      "Pulse acqu. delay (us)", "2","0", "tb",  "sdelay",
"nrSpectra",     "Number of spectra",    "3","1", "tb",  "float,[1,1e5]";
"doplot",        "Make plot/Print info", "3","2", "cb",  "no,yes"]

# Relationships to determine remaining variable values
relationships = ["nDataPnts = nrPnts",
"a90Amp      = 90Amplitude1H",
"d90Dur      = pulseLength1H",
"dAcqDelay   = acqDelay",
"totPnts     = nrPnts",
"totTime     = acqTime"]

# Define the tabs and their order
tabs = ["Pulse_sequence","Progress","Acquisition",
"Processing_Std","Display_Std","File_Settings"]
```

```
# These parameters may be changed between experiments
variables = [""]

# x and y spacing between controls
dim = [170,26]

# Pulse sequence
initpp(dir) # Reset internal parameter list

pulse(mode,a90Amp,p1,d90Dur) # RF pulse
delay(dAcqDelay) # Pulse - acquire delay
acquire("overwrite",nDataPnts) # Acquire echo and wait

lst = endpp() # Return parameter list

# Phase cycle list
phaseList = [0,1,2,3; # Pulse phase
0,1,2,3] # Acquire phase

endproc(lst,tabs,interface,relationships,variables,dim,phaseList)
```

Experimentelle Beschreibung der Pulssequenz mit PRESAT

```
procedure(pulse_program,dir,mode)

# Interface description (name, label, controls, vartype)
interface = ["nucleus", "Nucleus", "tb", "readonly_string";
"b1Freq1H", "B1 Frequency (MHz)", "tb", "freq";
"centerFreqPPM", "Centre frequency (ppm)", "tb", "float";
"pulseLengthHard", "Hard pulse length (us)", "tb", "pulselength";
"pulseAmplitude90", "90 Pulse amplitude (dB)", "tb", "pulseamp";
"pulseLengthPs", "Presat length (ms)", "tb", "float,[0,1e4]";
"0sup1", "Presat frequency 1 (ppm)", "tb", "float,[-1e6,1e6]";
"aSup1", "Presat amplitude 1 (dB)", "tb", "float,[-85,-16]";
"0sup2", "Presat frequency 2 (ppm)", "tb", "float,[-1e6,1e6]";
"aSup2", "Presat amplitude 2 (dB)", "tb", "float,[-85,-16]";
"0sup3", "Presat frequency 3 (ppm)", "tb", "float,[-1e6,1e6]";
"aSup3", "Presat amplitude 3 (dB)", "tb", "float,[-85,-16]";
"useSup1", "Use 1", "cb", "no,yes";
"useSup2", "Use 2", "cb", "no,yes";
"useSup3", "Use 3", "cb", "no,yes";
"spoilAmp", "Homospoil amplitude", "tb", "float,[0,1e4]";
"spoilDur", "Homospoil duration (ms)", "tb", "sdelay";
"shiftPoints", "Number of points to shift", "tb", "float,[-100,100]";
"acqDelay", "Acquisition delay (us)", "tb", "sdelay";
"repTime", "Repetition time (ms)", "tb", "reptime";
"nrSpectra", "Number of spectra", "tb", "float,[1,1e5]"]
```

```

# Relationships to determine remaining variable values
relationships = ["b1Freq    = b1Freq1H",
"nPnts    = nrPnts",
"nxSpoil  = xshim-sign(xshim)*spoilAmp", # x shim spoiler amplitude
"nxShim   = xshim",                      # x shim
"dHard    = pulseLengthHard",            # Hard 1H-pulse duration
"dSpoil   = spoilDur*1000",              # Gradient spoiler duration
"dRecov   = 1500",                       # Gradient recovery delay
"aHard    = pulseAmplitude90",          # Hardpulse amplitude
"dAcqDelay = acqDelay",                  # Acquisition delay
"offFreq1H = (centerFreqPPM-wvPPMOffset1H)*b1Freq1H",
"O1       = offFreq1H",
"fTx1H    = double(b1Freq1H)",          # 1H Tx freq (no offset)
"(tPhase,tAmp,nTabSz,dStep) = 20231220_Presat_Collect:getRFPulse
(1000*pulseLengthPs,0sup1,aSup1,useSup1,0sup2,aSup2,useSup2,0sup3,aSup3,useSup3,b1Freq1H)",
"totPnts  = nrPnts",
"totTime  = acqTime"]

# Define the pulse sequence parameter groups and their order
groups = ["Pulse_sequence","Progress","Acquisition",
"Processing_Std","Display_Std","File_Settings"]

# These parameters will be changed between experiments
variables = ["aHard"]

# Pulse sequence
initpp(dir) # Reset internal parameter list

# Set the transmit frequencies for 1H
settxfreq(fTx1H)

# Allow time to finish lock scan
delay(10000)

# Saturate the 1H peaks using a soft pulse
shapedrf(1,tAmp,tPhase,p1,nTabSz,dStep)

# Apply homospoil via an x shim offset
Spoiler:X(nxSpoil,nxShim,dSpoil,dRecov)

# Hard RF pulse
pulse(mode,aHard,p1,dHard)

# Pulse - acquire delay
delay(dAcqDelay)

# Acquire FID with decoupling
acquire("overwrite",nPnts) # Acquire FID

```

```

lst = endpp() # Return parameter list

# Phase cycle list
phaseList = [0,1,2,3; # 90 phase
0,1,2,3] # Acquire phase

endproc(lst,groups,interface,relationships,variables,dim=null,phaseList)
    
```

B.2. Flusszellenkalibrierung für *onflow* 80 MHz NMR Messungen

Die Positionen der Flusszellen FC-9 und FC-10 im 80 MHz NMR wurden kalibriert. Die Spezifikationen der Flusszellen sind in Tabelle 6.6, S. 77, aufgeführt. Dafür wurde in Millimeter-Schritten die Position variiert, wobei der Mittelpunkt der aktiven Region auf 0 mm gesetzt wurde. Unter *onflow* (1 mL min^{-1}) Bedingungen wurde bei jeder Position ein NMR Spektrum einer 30 g L^{-1} Propylparabendlösung (Aceton/Wasser 60/40 v/v%) gemessen. Die NMR Spektren wurden mit der NMR Aufnahmemethode 2 in Tabelle 6.4, S. 74, aufgenommen, mit 4 Scans pro Spektrum. Nach der in Abschnitt 5.8, S. 53, beschriebenen Prozessierung mit einer 1 Hz exponentiellen Apodisierung wurde die mittlere Intensität der aromatischen Protonen bestimmt. In Abbildung B.1a ist schematisch die aktive Region der Flusszelle dargestellt und in Abbildung B.1b die mittlere Intensität der aromatischen Protonen für die jeweilige Position. Die verwendete Position der FC-9 betrug +2 mm und die der FC-10 +1 mm.

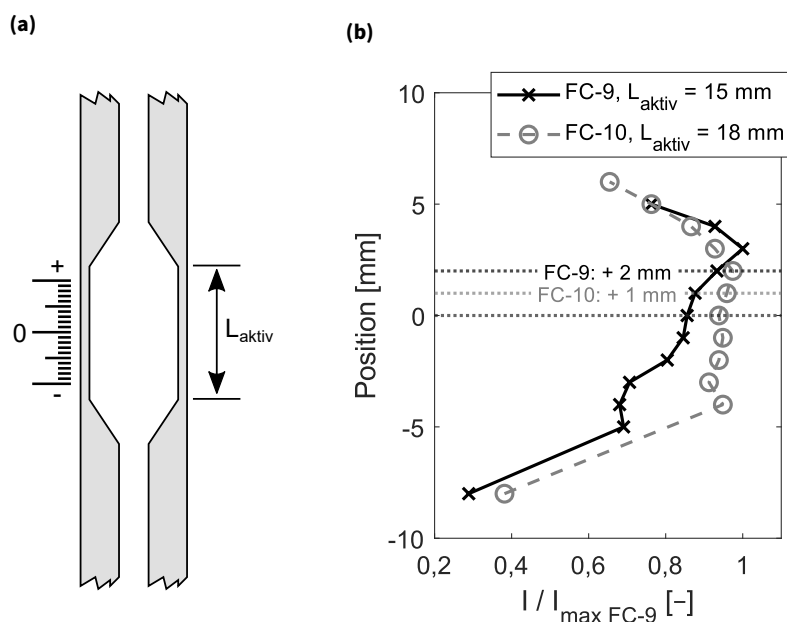


Abbildung B.1: Flusszellenkalibrierung der FC-9 und FC-10 für das 80 MHz NMR Spektrometer. (a) Der Mittelpunkt der aktiven Region wurde auf 0 mm gesetzt. Für verschiedene Position wurden unter *onflow* Bedingungen NMR Spektren einer 30 g L^{-1} Propylparabendlösung (Aceton/Wasser 60/40 v/v%) mit der NMR Aufnahmemethode 2 aufgenommen. Die mittlere Intensität der aromatischen Protonen für unterschiedliche Position ist in (b) dargestellt. Für FC-9 betrug die verwendete Position +2 mm und für FC-10 +1 mm.

B.3. Kalibrierung der Empfängerverstärkung

In Tabelle B.1 sind die genutzten Empfängerverstärkungen (rxgains) des 80 MHz NMR Spektrometers der in Abbildung 6.9, S. 75, verglichenen NMR Aufnahmemethoden zusammengefasst. Die Kalibrierungen der Empfängerverstärkungen erfolgten entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 5.4.3, S. 48.

Tabelle B.1: Zusammenfassung der Empfängerverstärkungen (rxgains) der NMR Aufnahmemethoden.

NMR Aufnahmemethode ^a	rxgain [dB]	
	Statisch	Onflow (1 mL min ⁻¹)
1	19	22
2	19	22
3	25	28
4	40	43
5	40	43
6	19	
7	34	

^a Entspricht der Bezeichnung in Tabelle 6.4, S.74.

B.4. Abschätzung des linearen Konzentrationsbereich in der LAC

Zur Abschätzung des linearen Konzentrationsbereichs (Konzentrationsbereich in dem der Verteilungskoeffizient des Analyten zwischen der mobilen und stationären Phase konstant ist) der in Anhang A.1, S. 169, spezifizierten semipräparativen C₁₈ Säule (250 × 10 mm) für das Modellsystem wurden HPLC Messungen mit DRI Detektion einer Konzentrationsreihe von Methyl- und Pentylparaben durchgeführt. Die Chromatogramme von Methylparaben sind in Abbildung B.2 dargestellt.

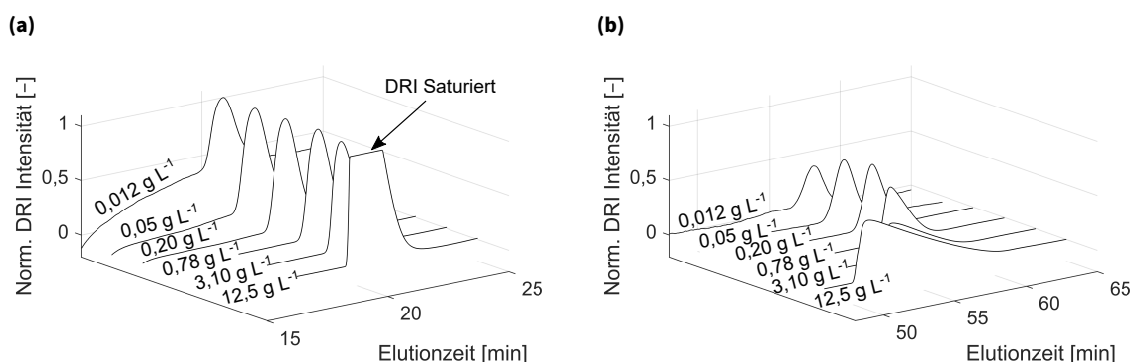


Abbildung B.2: DRI Chromatogramme einer Konzentrationsreihe von (a) Methyl- und (b) Pentylparaben. Die Chromatogramme jeder analysierten Konzentration wurden jeweils auf den Methylparabenpeak normiert. Mit zunehmender Konzentration nimmt aufgrund der Konzentrationsüberladung die Peakbreite zu und die Retentionszeit ab, wie in Abbildung B.3 zu sehen ist.

Aufgrund der DRI Sättigung konnten für Methylparaben die Messungen bis zu 3,1 g L⁻¹ ausgewertet werden, während für Pentylparaben aufgrund der breiteren Peaks die Analyse bis zu 12,5 g L⁻¹ möglich war. Die Retentionszeit und *FWHM* des chromatographischen Peaks wurden für jede Messung

bestimmt. Das Konzentrationsüberladungslimit (höchste Konzentration die noch im linearen Konzentrationsbereich liegt) war die analysierte Konzentration, bei der die Abnahme der Retentionszeit oder die Zunahme des *FWHM*, relativ zur $0,012 \text{ g L}^{-1}$ Messung, noch unter 10 % lag. Die Auswertung ist in Abbildung B.3 dargestellt.

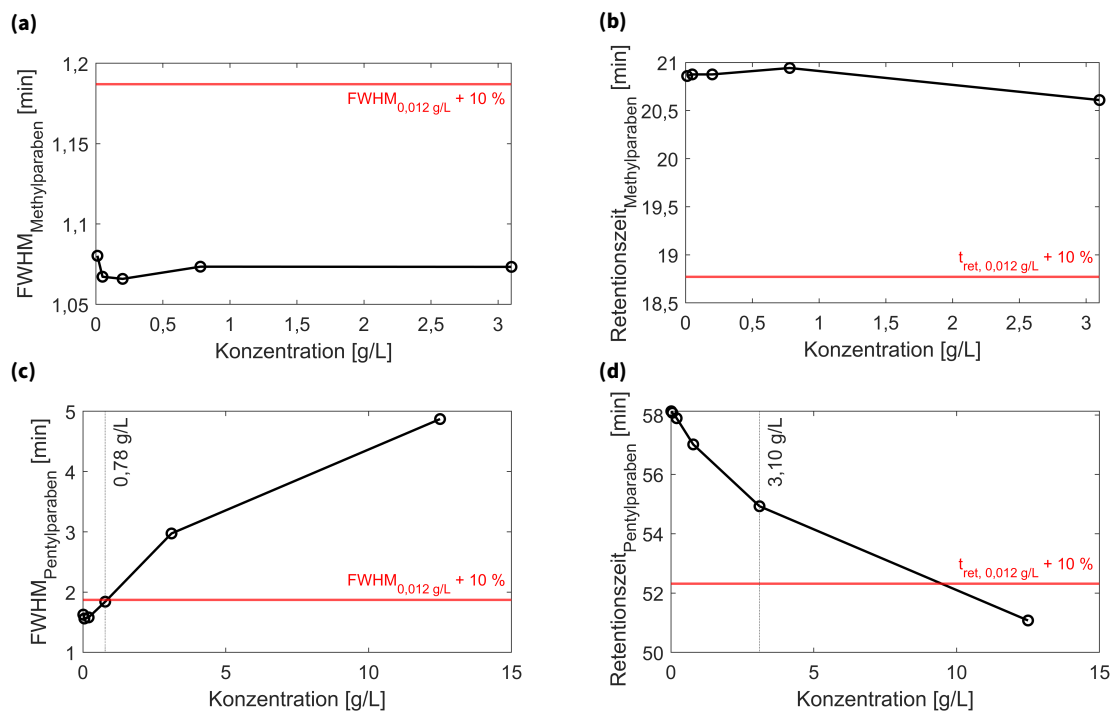


Abbildung B.3: Abschätzung des Konzentrationsüberladungslimits für Methyl- und Pentylparaben. Die *FWHM* und die Retentionszeiten wurden von HPLC Messungen mit DRI Detektion einer Konzentrationsreihe von Methyl- und Pentylparaben bestimmt. Die niedrigste analysierte Konzentration war $0,012 \text{ g L}^{-1}$ und wurde als Referenzwert herangezogen. Das Konzentrationsüberladungslimit entsprach der Konzentration, bei der die Retentionszeit oder die *FWHM* noch keine 10 % Abweichung zur Referenzmessung aufwies. Aufgrund der DRI Detektorsaturierung war die höchste analysierte Konzentration von Methylparaben $3,1 \text{ g L}^{-1}$ und von Pentylparaben $12,5 \text{ g L}^{-1}$. Für Methylparaben wurde die 10 % Abweichung weder für die *FWHM* in (a) noch die Retentionszeit in (b) erreicht. Das Konzentrationsüberladungslimit für Pentylparaben wurde anhand der *FWHM* Zunahme in (c) bestimmt und betrug $0,78 \text{ g L}^{-1}$.

Die Abweichungen der *FWHM* in Abbildung B.3a und der Retentionszeit in Abbildung B.3b sind für Methylparaben bis zur $3,10 \text{ g L}^{-1}$ Messung unter der 10 % Grenze. Dies zeigt, dass für Methylparaben das Konzentrationsüberladungslimit über $3,10 \text{ g L}^{-1}$ lag. Für Pentylparaben war die letzte analysierte Konzentration, bei der die 10 % Abweichung noch nicht erreicht wurde, für die *FWHM* bei $0,78 \text{ g L}^{-1}$ (Abbildung B.3c) und für die Retentionszeit bei $3,10 \text{ g L}^{-1}$ (Abbildung B.3d). Somit entsprach das Konzentrationsüberladungslimit für Pentylparaben $0,78 \text{ g L}^{-1}$.

B.5. Kalibrierung der 90° Pulslänge für Polystyrol in Acetonitril

Für die Analyse der PS-Oligomere in Abschnitt 6.4.2, S. 93, wurde eine 90° Pulslängenkalibrierung durchgeführt, entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 6.1.3.2, S. 63. Gemessen wurde unter statischen Bedingungen eine 40 g L^{-1} Lösung eines PS- $0,162 \text{ kg mol}^{-1}$ Standard in Acetonitril. Die Pulslänge wurde bei einem konstanten rxgain von 16 dB in $1 \mu\text{s}$ Schritten erhöht. Jedes Spektrum wurde mit 4 Scans und mit einer Wiederholzeit pro Scan von 15,0 s aufgenommen. Von den Spektren wurden die

aromatischen Protonen zwischen 6,0 und 8,0 ppm integriert und mit einer exponentiell abfallenden Sinusfunktion angepasst. Die zum Maximum normierten Flächen sowie die Anpassungsfunktion sind in Abbildung B.4 gezeigt.

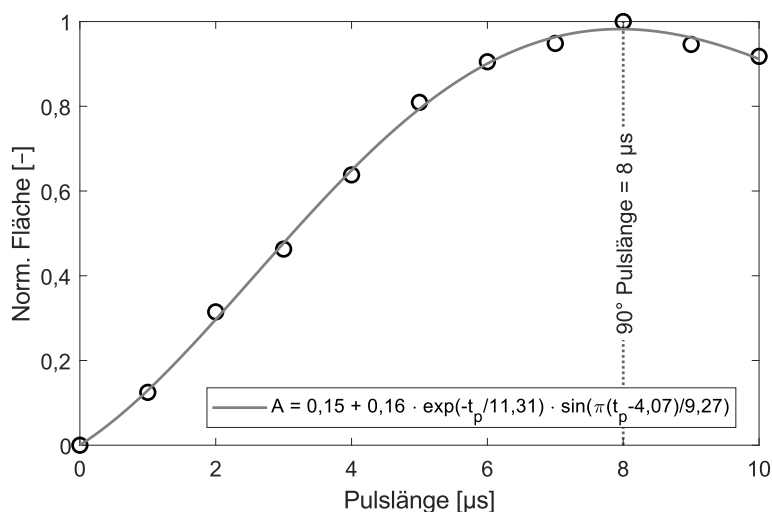


Abbildung B.4: Pulslängenkalibrierung der aromatischen PS Protonen in Acetonitril unter statischen Bedingungen. Bei unterschiedlichen Pulslängen t_p wurden Spektren einer 60 kg mol^{-1} PS in Acetonitril aufgenommen. Die Fläche A der aromatischen Protonen wurde für jedes Spektrum bestimmt und auf das Maximum normiert.

In Gleichung 6.1.1, S.63, ist die verwendete Anpassungsfunktion dargestellt und die einzelnen Parameter benannt. In Abbildung 6.3, S. 63, wurde gezeigt, dass die Pulslänge für statische und *onflow* Messungen nur geringfügig unterschiedlich sind, weshalb dieselbe Pulslänge von $t_p = 8 \mu\text{s}$ für die LAC-NMR Messung verwendet wurde.

B.6. Lösungsmittelunterdrückung während einer Gradientenelution

In der LAC-NMR-Kopplung bewirkt eine Veränderung der Lösungsmittelzusammensetzung Änderungen in der Signalintensität, -position, -form und den Relaxationszeiten.[50, 108, 109, 189–191]

Um bei der Gradientenelution eine Lösungsmittelunterdrückung zu ermöglichen, entwickelte Jayawickrama et al. eine Methode, bei der ein zusätzlicher Lösungsmittelgradient nach der HPLC Separation aber vor der NMR Detektion der mobilen Phase zugeleitet wird, der invers zum eigentlichen Lösungsmittelgradienten ist. Somit wird versucht die Lösungsmittelzusammensetzung während der NMR Detektion konstant zu halten.[195] Die Nachteile dieser Methode sind, dass die aktuelle Lösungsmittelzusammensetzung nur schwer exakt getroffen werden kann und eine homogene Mischung der zwei mobilen Phasen vor der NMR Detektion sichergestellt werden muss. Zudem wird durch die Zuleitung des inversen Gradienten die Analytkonzentration um den Faktor 2 reduziert.

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung einer zweiteiligen Pulssequenz. Zuerst wird mit einem normalen NMR Experiment die aktuelle chemische Verschiebung der Lösungsmittelsignale festgestellt und deren Frequenzen automatisch in der darauf folgenden Pulssequenz mit Lösungsmittelunterdrückung verwendet.[116, 189] Der Nachteil dieser Methode ist, dass nur jeder zweite Scan zur Erstellung des spektral aufgelösten Chromatogramms zur Verfügung steht.

In dieser Arbeit wurde ein weiterer Ansatz untersucht. Die PRESAT Pulssequenz wurde modifiziert,

sodass die Sättigungsfrequenzen während der Messung angepasst werden und somit der Veränderung der chemischen Verschiebung der Lösungsmittelsignale folgen. Das Prinzip der dynamischen PRESAT Pulssequenz ist in Abbildung B.5 dargestellt.

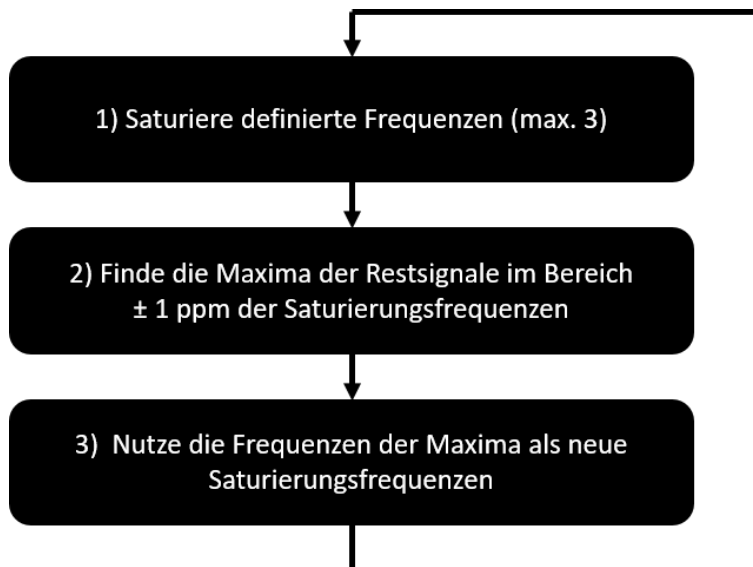


Abbildung B.5: Funktionsweise der dynamischen PRESAT Pulssequenz zur Lösungsmittelunterdrückung bei der Gradientenelution. Bei der Aufnahme des ersten Spektrums werden die Sättigungsfrequenzen, die zu Beginn der Messung vom Benutzer festgelegt werden, verwendet. Im Spektrum wird im Bereich ± 1 ppm der Sättigungsfrequenzen das Maximum des Restlösungsmittelsignals gesucht und dessen Frequenz als neue Sättigungsfrequenz im folgenden Scan verwendet.

Bei der dynamischen PRESAT werden in der ersten NMR Messung die Sättigungsfrequenzen verwendet, die vom Benutzer zuvor festgelegt werden. Im aufgenommenen Spektrum wird im Bereich ± 1 ppm der Sättigungsfrequenzen nach den Maxima gesucht und die dazugehörigen Frequenzen in der nachfolgenden Messung als neue Sättigungsfrequenzen verwendet.

Mit dieser Methode ist es möglich eine Lösungsmittelunterdrückung trotz der Veränderung der chemischen Verschiebung der Lösungsmittelsignale bei der Gradientenelution zu erhalten. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass der Lösungsmittelgradient nicht unter ein Volumenanteil von unter $\approx 10\%$ v/v% fallen sollte damit das Restsignal des Lösungsmittels zuverlässig höher ist als die Analytsignale.

In der Benutzeroberfläche der SpinsolveExpert Applikation befindet sich die Pulssequenz unter dem Pfad: `macros_mm > 20230627_Presat_Collect_dynamic_sat_frequ.`

C. Anhang: Experimentelle Durchführung und Zusatzinformationen zur FT-LC

C.1. Durchführung einer FT-LC Messung

C.1.1. Herstellung der Verbindung zur UDC-Box

Zum Durchführen einer FT-LC Messung muss aufgrund des manuellen Injektionsauslösers die UDC-Box mit der WinGPC Software verbunden werden. Die Detektoren sind über Ethernetkabel und die UDC-Box mit einem USB-Kabel mit dem Computer verbunden. Im Interface Menü in Abbildung C.1 kann nachgeschaut werden, welches Kabel gerade für die Datenübertragung genutzt wird.

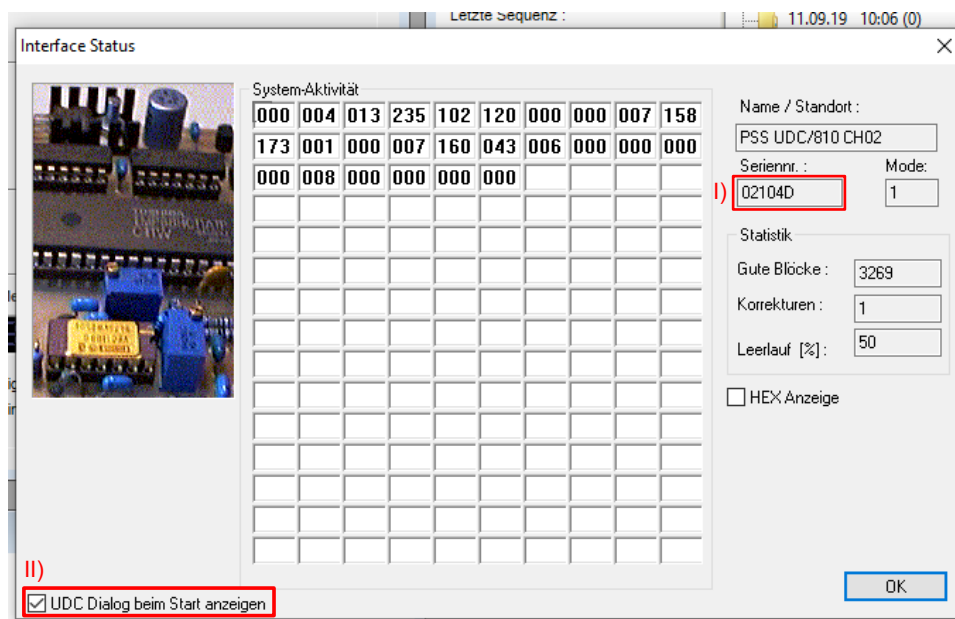


Abbildung C.1: Interface zum Feststellen der Datenquelle. Das Fenster wird aufgerufen, indem auf das Methodenfenster geklickt und dann über der Symbolleiste **Interface>Information** ausgewählt wird. Im Kasten I) unter **Seriennr.** wird der Verbindungstyp angegeben. Wird der Text **0214D** angegeben, wird die UDC-Box bereits über das USB-Kabel angesteuert. Sind die Detektoren direkt mit dem Computer verbunden steht dort **00FFF**. In dem Fall muss die Verbindung gewechselt werden. Setze hierzu zunächst den Haken im Kasten II) **UDC Dialog beim Start anzeigen** und starte die WinGPC Applikation neu. Das weitere Vorgehen ist in Abbildung C.2 beschrieben.

Im Interface Menü in Abbildung C.1 wird im markierten Kasten I) unter **Seriennr.** der Verbindungstyp angegeben. Im in Abbildung C.1 gezeigten Beispiel wird bereits die UDC-Box über das USB-Kabel angesteuert, weshalb **0214D** im Kasten I) erscheint. Sind die Detektoren direkt über das Ethernetkabel verbunden, würde in dem Anzeigefeld **00FFF** erscheinen. In einem solchen Fall muss die Verbindung gewechselt werden. Hierfür muss zunächst der Haken im Kasten II) **UDC Dialog beim Start anzeigen**

gesetzt werden. Anschließend wird die WinGPC Applikation neu gestartet.

Nach dem Neustart der WinGPC Applikation erscheint das in Abbildung C.2 dargestellte Login-Fenster. Wichtig ist drauf zu achten, dass bei dem roten Kästchen bei **Show Login Screen** ein Haken gesetzt ist.

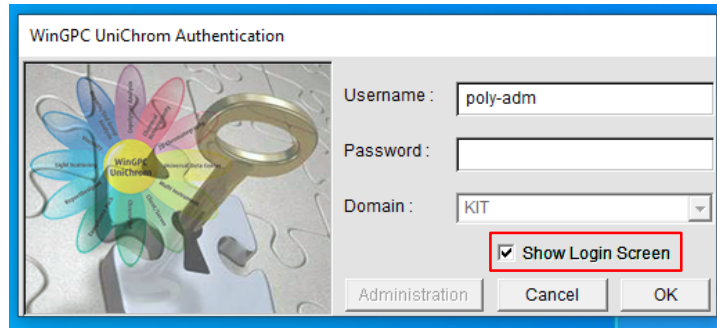


Abbildung C.2: Das WinGPC Login Fenster. Wähle **Show Login Screen** aus und klicke auf **OK** und beim nächsten Fenster das sich öffnet auf Login. Daraufhin öffnet sich das Fenster in Abbildung C.3, in dem die Schnittstelle des Computers ausgewählt werden kann.

Nach dem Login öffnet sich das Fenster in Abbildung C.3 in dem die Schnittstelle ausgewählt werden kann. Für eine FT-LC Messung muss die markierte USB Verbindung ausgewählt werden.

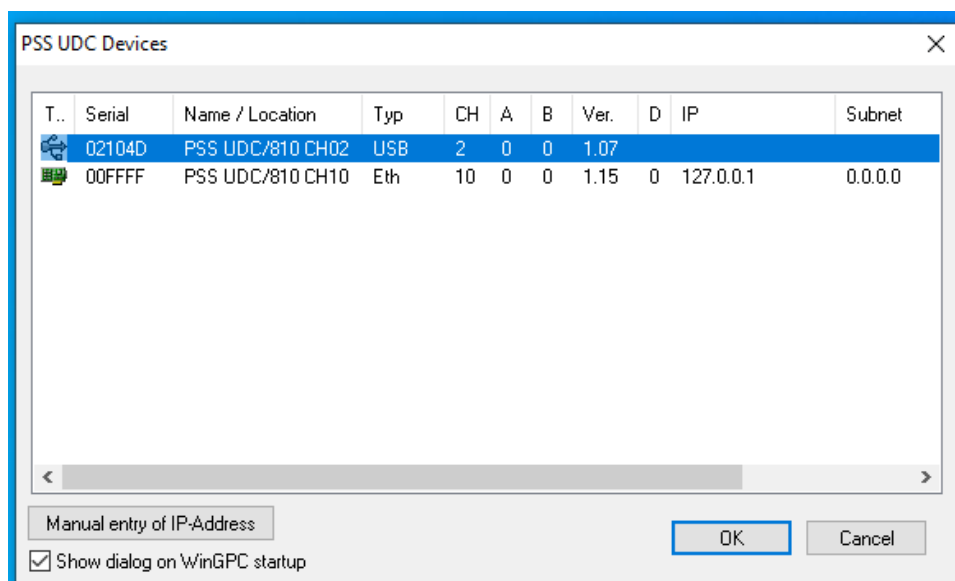


Abbildung C.3: Auswahl der Schnittstelle des Computers zur HPLC. Wird die USB Verbindung ausgewählt werden die HPLC Daten von der UDC-Box empfangen. Wird dagegen die Ethernetverbindung ausgewählt, werden die Daten direkt vom HPLC Detektor abgegriffen.

Falls der zweite Detektor noch nicht als Gerät zur Software hinzugefügt wurde, kann dies nachfolgend geschehen, indem **Show dialog on WinGPC startup** ausgewählt wird.

C.1.2. Vorbereiten der FT-LC Messung

Der Lösungsmittelgradient wird erstellt indem das in Abbildung C.4 genutzte Excel Arbeitsblatt mit dem Namen **Sinusoidal Gradient_100events** verwendet wird.

Row No	Time in min	sin	THF	Sample	C	D
1	0	0,000	0,000	0	50,00	0
2	15	1	0,150	0,063	0	53,14
3	2	0,300	0,125	0	56,27	0
4	3	0,450	0,187	0	59,37	0
5	4	0,600	0,249	0	62,43	0
6	5	0,750	0,309	0	65,45	0
7	100	4	0,600	0,249	0	62,43
8	50	6	0,900	0,368	0	68,41
9	7	1,050	0,426	0	71,29	0
10	8	1,200	0,482	0	74,09	0
11	9	1,350	0,536	0	76,79	0
12	10	1,500	0,588	0	79,39	0
13	11	1,650	0,637	0	81,87	0
14	12	1,800	0,685	0	84,23	0
15	13	1,950	0,729	0	86,45	0
16	14	2,100	0,771	0	88,53	0
17	15	2,250	0,809	0	90,45	0
18	16	2,400	0,844	0	92,22	0
19	17	2,550	0,876	0	93,82	0
20	18	2,700	0,905	0	95,24	0
21	19	2,850	0,930	0	96,49	0
22	20	3,000	0,951	0	97,55	0
23	21	3,150	0,969	0	98,43	0
24	22	3,300	0,982	0	99,11	0
25	23	3,450	0,992	0	99,61	0
26	24	3,600	0,998	0	99,90	0
27	25	3,750	1,000	0	100,00	0
28	26	3,900	0,998	0	99,90	0
29	27	4,050	0,992	0	99,61	0

Abbildung C.4: Erstellung des Lösungsmittelgradienten für das sinusförmige Analytkonzentrationsprofil. In dem Excel Arbeitsblatt kann die Form, die Periode und die Amplitude des Anregungssignals definiert werden. Das Anregungssignal wird mit 100 Zeitschritten erstellt und in einen für die WinGPC lesbaren XML Code übersetzt (gezeigt in der K-Spalte). Dieser wird in eine leere Text-Datei kopiert und in die WinGPC Benutzeroberfläche der quaternären Pumpe, gezeigt in Abbildung C.5, importiert. Damit der Import funktioniert muss sichergestellt sein, dass das Dezimaltrennzeichen ein Punkt (.) und kein Komma (,) ist.

In dieser Datei wird die Form, die Periode sowie Amplitude definiert. Für die maximale Sensitivität der FT-LC Analyse wird empfohlen eine Amplitude von 50 zu wählen, damit der Sinus die volle Auslenkung besitzt. Der erstellte Gradient wird anschließend in einen *extensible markup language* (XML) Code übersetzt, der in der K-Spalte angezeigt wird. Dieser wird in ein leeres Textdokument kopiert und zum späteren Import in die WinGPC Software abgespeichert. Als Dezimaltrennzeichen wird in der englischen Excel-Version ein Punkt (.) und in der deutschen Excel-Version ein Komma (,) verwendet. Damit der Import in der WinGPC Software funktioniert muss das Dezimaltrennzeichen ein Punkt (.) sein.

Das Textdokument wird anschließend in der graphischen Benutzeroberfläche der WinGPC Software hochgeladen. Hierfür wird **Import Timetable** (Kasten I)) im Instrumentenfenster der quaternären Pumpe in Abbildung C.5 ausgewählt. Die Stoppszeit eines Gradientenzyklus wird ebenfalls dort eingestellt (Kasten II)), wobei diese der Periode - 0,03 min entsprechen sollte. Diese Zeit wird benötigt damit die Pumpe innerhalb der Periode mit der nächsten Oszillation starten kann.

Zur periodischen Wiederholung des Lösungsmittelgradienten (Oszillation) wird die Relais Funktion der quaternären Pumpe verwendet. Diese wird aktiviert, indem über der Symbolleiste der Reiter **Definition>Steuerung> Aktiviert** ausgewählt wird. Anschließend wird im unter **Definition>Steuerung> Relais 1** aufgerufenen Fenster die Anzahl der Oszillationen definiert. Das entsprechende Fenster ist in Abbildung C.6 dargestellt. Für eine periodische Schaltung der Oszillation sollte das in Abbildung C.6 (Kasten I)) gezeigte **Schaltintervall** der Periode - 1 s und die **Schaltzeit** 0,500 s (Kasten II)) entsprechen. Die Zahl unter dem Reiter **Schaltvorgänge** entspricht der Anzahl an gewünschten Oszillationen und sollte mindestens 3 sein. Nachdem nun noch im Methodenfenster die Methode **FT-SEC_MM.MET** geladen wurde, kann die FT-LC Messung gestartet werden. Hierzu wird zuerst die Aufnahme der Basislinie gestartet und anschließend der manuelle Injektionsauslöser betätigt.

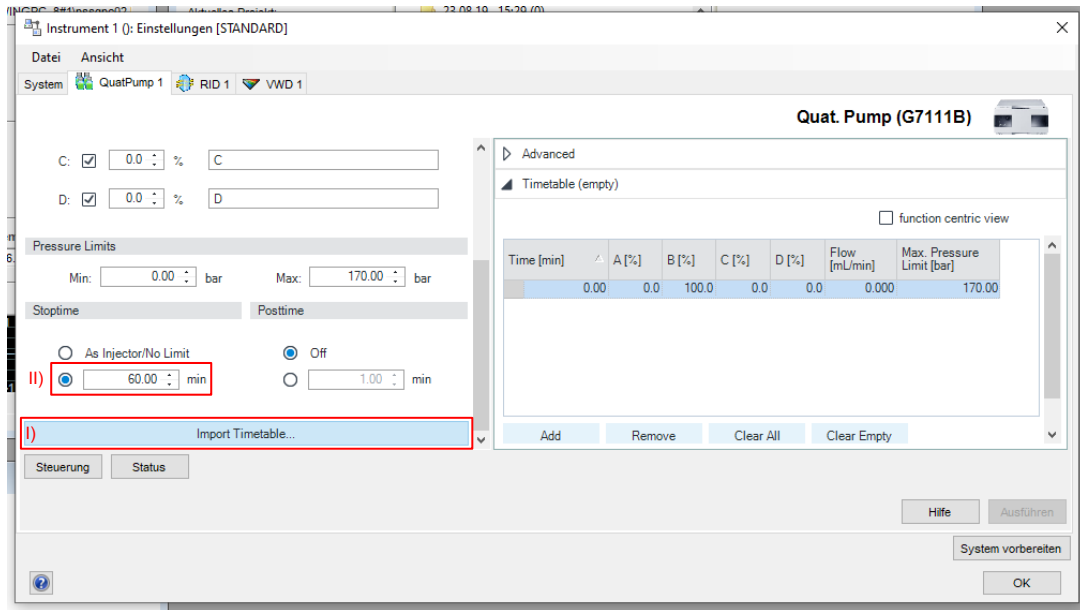


Abbildung C.5: Der Lösungsmittelgradient, der in Abbildung C.4 erstellt wurde, wird unter **Import Timetable**, markiert mit dem Kasten I), in die Benutzeroberfläche der quaternären Pumpe geladen. Im Kasten II) wird die Stoppzeit eines Gradientenzyklus festgelegt und sollte der Dauer der Periode - 0,03 min entsprechen.

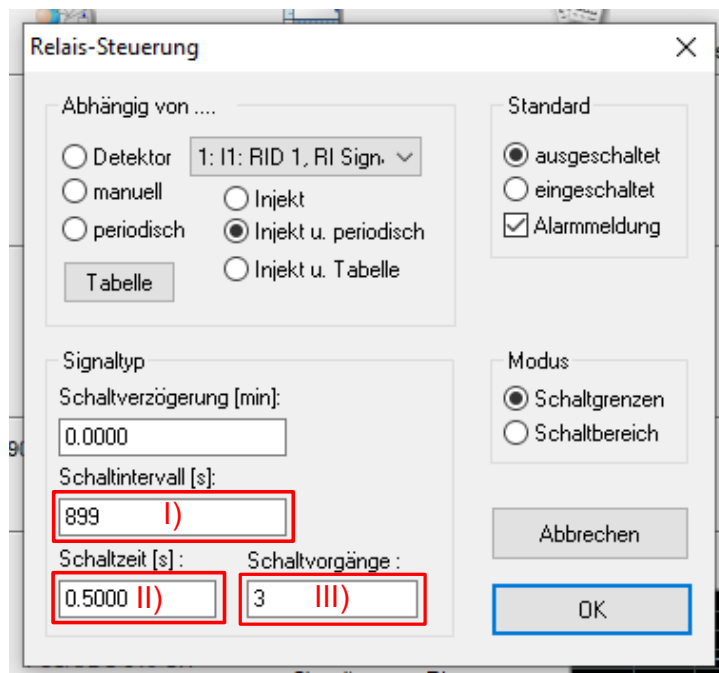


Abbildung C.6: Nutzung der Relais Funktion zur periodischen Wiederholung des Gradienten. Hierzu wird im Kasten I) das **Schaltintervall** gleich der Periode - 1 s gesetzt und die **Schaltzeit** (Kasten II) auf 0,500 s. Die Anzahl an Oszillationen wird unter **Schaltvorgänge** (Kasten III) definiert.

C.2. Linearitätsgrenze der UV Detektoren für PS-Standards

In Abbildung C.7 ist das UV Absorptionsspektrum einer 1 g L^{-1} PS- $75,5 \text{ kg mol}^{-1}$ Lösung in THF gezeigt.

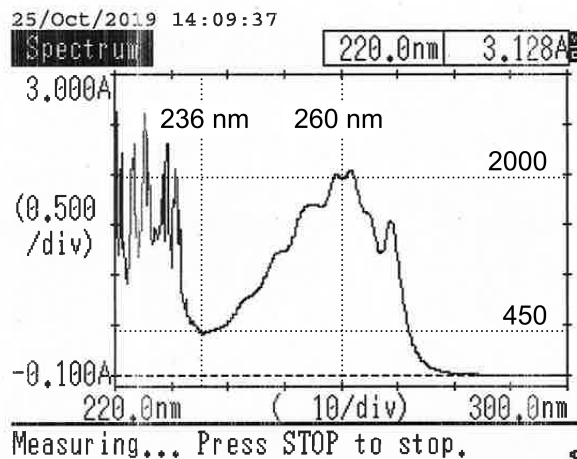


Abbildung C.7: Absorptionsspektrum von 1 g L^{-1} PS- $75,5 \text{ kg mol}^{-1}$ in THF. Entnommen aus der Masterarbeit von Markus Matz.[160]

Bei den Wellenlängen 236 und 260 nm wurden die Linearitätsgrenzen (LOL) der UVDs bestimmt. Die Definition des LOL ist in Abschnitt 2.4, S. 14, beschrieben. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen von PS- $75,5 \text{ kg mol}^{-1}$ mittels des zirkulären Aufbaus durch den UVD1 und UVD2 geleitet und die Signalintensität bei 236 und 260 nm gemessen. In Abbildung C.8 sind die LOL für UVD2 dargestellt, wobei die Konzentration der Konzentration in der Detektorflusszelle entspricht.

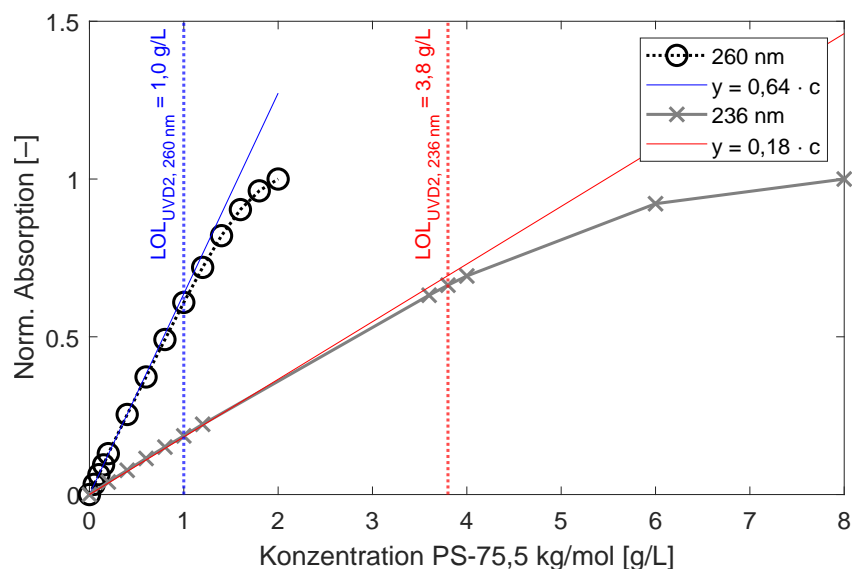


Abbildung C.8: Bestimmung der LOL für UVD2 bei 236 und 260 nm. Gezeigt ist die zum jeweiligen Maximum normierte Absorption, aufgetragen gegen die Konzentrationen in der Flusszelle an PS- $75,5 \text{ kg mol}^{-1}$ in THF. Zur Bestimmung der LOL wurden die Absorptionswerte im linearen Bereich der Detektorantwort linear angepasst. Für die Anpassung der linearen Anpassungsfunktion wurden bei 236 nm die Messwerte der Konzentrationen bis zu $1,2 \text{ g L}^{-1}$ und für 260 nm, aufgrund des höheren Absorptionskoeffizienten, bis zu $0,6 \text{ g L}^{-1}$ genutzt.

C.3. Effekt gelöster Gaskomponenten auf eine FT-SEC Messung

Eine FT-SEC Messung wurde nur mit THF in beiden Lösungsmittelreservoirs durchgeführt mit einer Periode von $T = 15$ min. Die Messungen wurden mit keiner, einfacher, zweifacher und dreifacher Entgasung durchgeführt. Die Chromatogramme sind in Abbildung C.9 dargestellt.

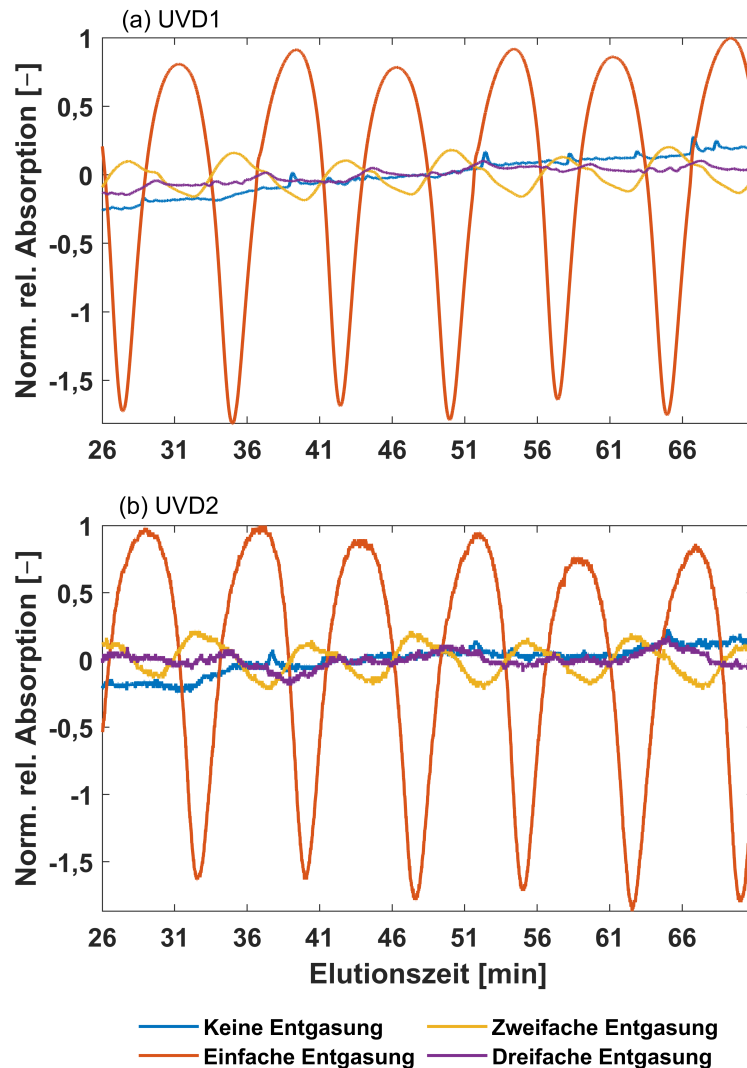


Abbildung C.9: Auswirkung gelöster UV absorbierende Gaskomponenten auf die FT-SEC Messung. FT-SEC Messungen wurden durchgeführt, wobei sich in beiden Lösungsmittelflaschen THF befand. Die mobile Phase wurde unterschiedlich oft entgast. Die Chromatogramme wurden zuerst auf den jeweiligen Mittelwert der Absorption referenziert und anschließend auf das jeweilige Maximum des Chromatogramms der einfachen Entgasung normiert. Während bei keiner Entgasung und dreifacher Entgasung die Amplitude der Oszillation nahezu null ist, sind bei einfacher und zweifacher Entgasung noch deutliche Oszillationen erkennbar. Bei zweifacher Entgasung ist die Amplitude jedoch deutlich reduziert, verglichen zur einfachen Entgasung. Der Grund für die Absorption ist gelöstes O_2 , wie in Abschnitt 7.1.4, S.110, detailliert erklärt ist. In Abbildung C.10 sind die Fourier-Spektren dieser Abschnitte zu sehen.

Die dargestellten Chromatogrammsegmente zeigen bei keiner und dreifacher Entgasung eine nahezu stabile Basislinie, während bei den Chromatogrammen mit einfacher und zweifacher Entgasung deutli-

che Oszillationen erkennbar sind. Die Amplitude der Oszillation im Chromatogramm mit einfacher Entgasung ist deutlich intensiver als die beim Chromatogramm mit zweifacher Entgasung. Die unterschiedlich intensiven Oszillationen entstehen durch eine unvollständige Entgasung und bilden in die höheren harmonischen Frequenzen in den Fourier-Spektren in Abbildung C.10. Indem das THF dreimal entgast wurde, konnte die Magnitude der zweiten höheren harmonischen Frequenz $2 \cdot \nu_0$ für UVD1 um einen Faktor 45 und für UVD2 um einen Faktor 30 reduziert werden.

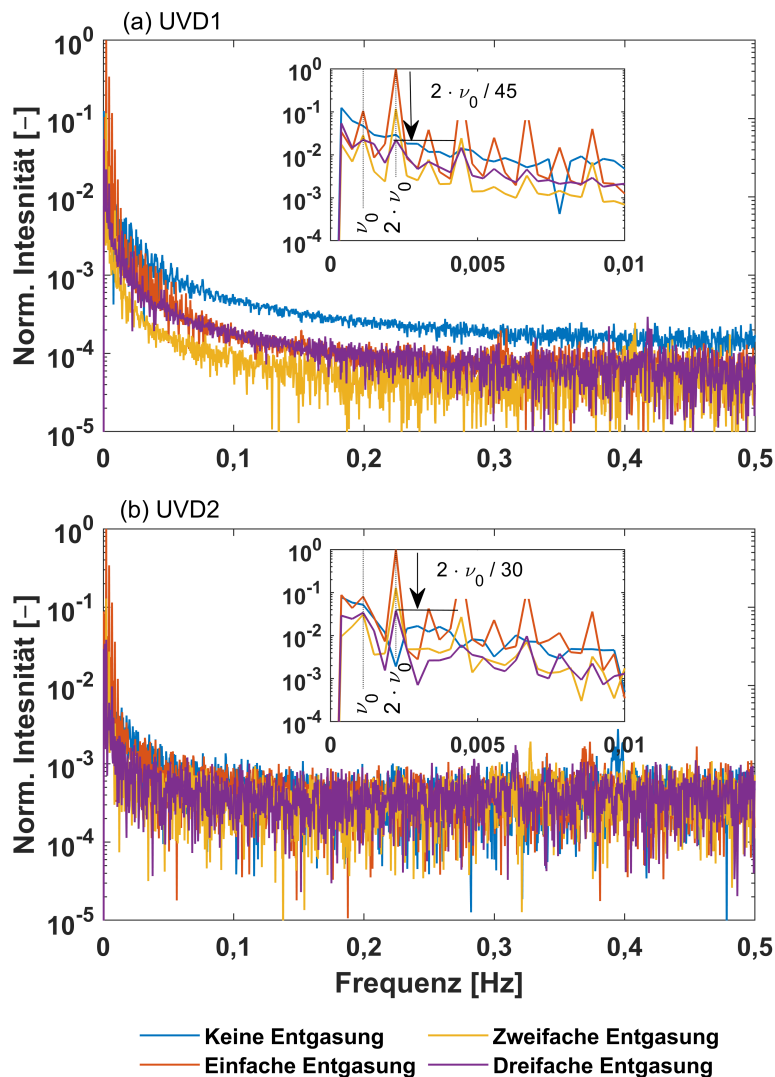


Abbildung C.10: Auswirkung der unvollständigen Entgasung auf die höheren harmonischen Frequenzen. Indem eine dreifache Entgasung anstatt einer einfachen Entgasung angewandt wird, reduziert sich die Magnitude der zweiten höheren harmonischen Frequenz ($2 \cdot \nu_0$) im Spektrum des UVD1 um einen Faktor 45 und im Spektrum des UVD2 um einen Faktor 30.

C.4. Einfluss der Periode auf die Amplitude des Antwortchromatogramms

In Abschnitt 7.2.3, S. 118, werden FT-SEC Messungen einer $0,1 \text{ g L}^{-1}$ PS- 100 kg mol^{-1} Lösung in THF mit den Perioden $T = 60, 300, 600, 900, 1\,300$ und $3\,600 \text{ s}$ beschrieben. Chromatogrammabschnitte des UVD2 der Analysen sind in Abbildung C.11 dargestellt.

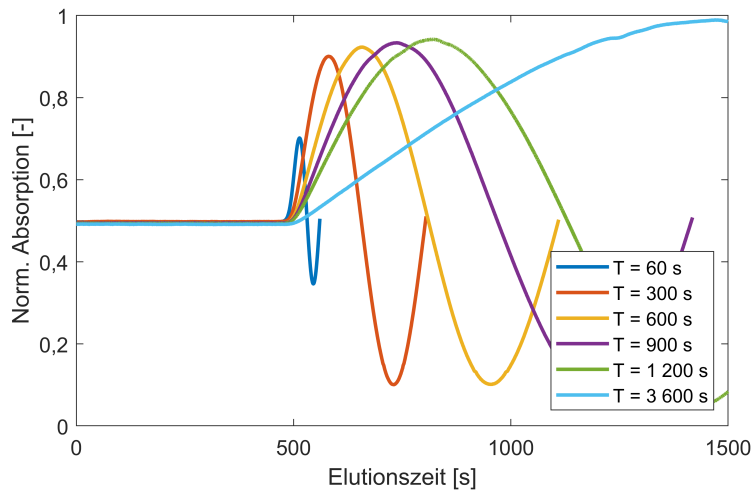


Abbildung C.11: FT-SEC Chromatogrammabschnitte von Messungen mit unterschiedlicher Periode. Aufgrund der Bandenverbreiterung nimmt die Amplitude zu kürzeren Perioden hin ab. Aufgrund der Diskussion in Abschnitt 7.2.3, S. 118, wird empfohlen eine Periode von $T > 300 \text{ s}$ zu wählen um eine übermäßige Reduzierung der Amplitude zu vermeiden.

Von den Messungen mit $T = 60 - 900 \text{ s}$ sind jeweils nur die erste Periode gezeigt. Für die Messungen mit $T = 1\,300$ und $3\,600 \text{ s}$ sind die Chromatogrammabschnitte bis zu Elutionszeit des ersten Maximums der $T = 3\,600 \text{ s}$ Messung dargestellt. Die Amplitude der Oszillation nimmt mit der Periode aufgrund der Bandenverbreiterung ab.

Publikationen und Konferenzbeiträge

Publikationen

Peer-Review

- 2022** Markus Matz, Carlo Botha, Timo Beskers, Manfred Wilhelm, *Fourier transformation liquid chromatography: increasing sensitivity by a factor of 50*, *Analyst* (2022) 147, 1199.
- 2024** Johanna Tratz, Marianne Gaborieau, Markus Matz, Michael Pollard, Manfred Wilhelm, *Potential of benchtop NMR for determination of polymer molar mass, molar mass distribution, and chemical composition distribution by means of diffusion-ordered spectroscopy, DOSY*, *Macromolecular Rapid Communications* (2024), 2400512.
- 2024** Markus Matz, Michael Pollard, Marianne Gaborieau, Johanna Tratz, Carlo Botha, Manfred Wilhelm, *Enhancing sensitivity in the hyphenation of HPLC to benchtop NMR at isocratic and onflow conditions*, *Journal of Physical Chemistry B* (2024) 128, 9512.

Ohne Peer-Review

- 2022** Markus Matz, Carlo Botha, Manfred Wilhelm, *Chemically-sensitive detection in HPLC*, *Wiley Analytical Science Magazine*, (2022) 5, 19.
- 2022** Markus Matz, Carlo Botha, Manfred Wilhelm, *Online hyphenation of a benchtop 80 MHz ¹H NMR with HPLC for chemically sensitive detection*, *Lebensmittelchemie* (2022) S2-037 (Zusammenfassung für den Vortrag beim 50. Deutscher Lebensmittelchemikertag).
- 2022** Markus Matz, Carlo Botha, Michael Pollard, Manfred Wilhelm, *Benchtop NMR Spektrometer als HPLC-Detektor*, *Lebensmittelchemie* (2022) 76, 205.
- 2023** Markus Matz, Carlo Botha, Manfred Wilhelm, *Chemisch empfindlicher Nachweis in der HPLC*, *Wiley Online Library* (2023).
- 2023** Markus Matz, Carlo Botha, Michael Pollard, Marianne Gaborieau, Manfred Wilhelm, *HPLC-80 MHz ¹H NMR method development on parabens*, *Lebensmittelchemie* (2023) 77(S1) (Zusammenfassung für die Posterpräsentation bei der Lebensmittelchemischen Regionalverbandstagung 2023).

Konferenzbeiträge

Vorträge

2022 Markus Matz, Carlo Botha, Manfred Wilhelm, *Benchtop 80 MHz ^1H NMR spectrometer as online HPLC detector*, 43rd FGMR Annual Discussion Meeting, Karlsruhe, 12.09. – 15.09.2022.

2022 Markus Matz, Carlo Botha, Manfred Wilhelm, *Online hyphenation of 80 MHz benchtop NMR with HPLC for chemically sensitive detection*, 50. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Hamburg, 19.09. – 21.09.2022.

2023 Markus Matz, Carlo Botha, Michael Pollard, Marianne Gaborieau, Manfred Wilhelm, *Methods for increasing sensitivity and solvent suppression in HPLC-80 MHz NMR hyphenation*, NMRPM 2023, Kaiserslautern, 24.05. – 26.05.2023.

2023 Markus Matz, Carlo Botha, Timo Beskers, Manfred Wilhelm, *Fourier transformation liquid chromatography: increasing sensitivity by a factor of 50*, HPLC 2023, Düsseldorf, 18.06. – 22.06.2023.

Posterpräsentationen

2023 Markus Matz, Carlo Botha, Michael Pollard, Marianne Gaborieau, Manfred Wilhelm, *HPLC-80 MHz ^1H NMR method development on parabens*, Lebensmittelchemische Regionalverbandstagung, Karlsruhe 28.03. – 29.03.2023.