

Autoren, die eine „Zuschrift“ veröffentlichen wollen, sollten vor der Abfassung ihres Manuskripts unbedingt die „Hinweise für Autoren“ lesen, die jeweils im Januarheft eines Jahrgangs nach dem Inhaltsverzeichnis gedruckt sind; auf Anforderung können sie auch von der Redaktion erhalten werden.

Abbildung der chromatographischen Trennung mit NMR-Bildgebung (NMR-Imaging)

Von Ernst Bayer*, Winfried Müller, Martin Ilg und Klaus Albert

Die Bildgebung auf Basis der magnetischen Resonanzspektroskopie (Kernspintomographie)^[1, 2] hat in der medizinischen Diagnostik Fortschritte gebracht, da sie die zerstörungsfreie Beobachtung von flüssigen und gelartigen Zuständen sowie von dynamischen Prozessen ermöglicht. Somit ist diese Methode auch zur Untersuchung von Stoffaustausch-, Strömungs- und Diffusionsprozessen im Bereich der Chemie geeignet^[3, 4]. Die Flüssigkeitschromatographie ist einer der am häufigsten durchgeführten Prozesse dieser Art. Eine Beobachtung der chromatographischen Wechselwirkungen zwischen Eluent und stationärer Phase in der Säule und damit die exakte Verfolgung des Elutionsprofils sowie der Faktoren, die zu Bandenverbreiterung und Unregelmäßigkeiten führen, ist *in situ* nicht möglich. Auch bei farbigen Substanzen, deren Trennung *T_{wett}* zu dem Namen Chromatographie („Farbschreiben“) führte, erhält man nur Aufschluß über die Randzone und nicht über das Profil im Inneren der Säule.

Bei der ¹H-NMR-Bildgebung werden Protonenbilder von einem beliebigen Volumensektor einer gepackten Säule erzeugt. Durch drei zueinander orthogonale Gradientenfelder, welche die Abhängigkeit zwischen Magnetfeld und Ort genau definieren, wird eine eindeutige Zuordnung zwischen Ort und Resonanzfrequenz erreicht. Das NMR-Bild setzt sich aus den Signalintensitäten der so erzeugten Volumenelemente zusammen. Die Signalintensitäten sind von vielen Parametern abhängig, wie Relaxationszeiten *T₁* und *T₂*, Spindichte, Fluß- und Diffusionsphänomenen sowie chemischer Verschiebung. Unterschiede in diesen Parametern führen zur kontrastreichen Abbildung des Objekts. Da bei der Wechselwirkung zwischen stationärer und mobiler Phase sowie Eluent diese Parameter unterschiedlich beeinflußt werden, kann ein Chromatogramm oder eine Säule im stationären Zustand abgebildet werden. So lassen sich Unterschiede in der Packungsdichte über den Säulendurchmesser oder die Säulenlänge, Kanalbildung oder unterschiedliche Benetzung deutlich erkennen und diagnostisch zur Optimierung der Packungsmethoden von Säulen heranziehen. Insbesondere bei präparativen Säulen ist dies wichtig.

Ein wesentlicher Faktor bei der Bildgebung sind die Relaxationszeiten *T₁* und *T₂*, die Aufschluß über die Beweglich-

keit des Lösungsmittels in der stationären Phase geben. Stationäre Phasen mit geringer Porosität und großem Absorptionsvermögen zeigen eine stärkere Absorption des Wassers als Materialien mit großen Poren. Dies drückt sich in kleinen Relaxationszeiten *T₁* und *T₂* in feinporeigen Materialien aus, wie die Werte in Tabelle 1 zeigen. In den feinporeigen

Tabelle 1. Protonenrelaxationszeiten *T₁* und *T₂* von in Wasser gequollenen Sephadex-Gelen.

Sephadex	<i>T₂</i> [ms]	<i>T₁</i> [ms]
G 10	103	490
G 15	164	585
G 25	305	843
G100	494	2460

Gelen Sephadex G10 und G15 ist die Mobilität des Wassers stark eingeschränkt, während *T₁* und *T₂* im grobporigen Material G100 den normalen Relaxationszeiten von Wasser nahekommen. In Kieselgel 60 ist wegen der größeren Polarität die Beweglichkeit des Wassers noch stärker als in Sephadex G10 eingeschränkt. Ähnliche Zusammenhänge werden auch mit anderen Lösungsmitteln beobachtet.

Interessant ist, daß längs einer Säule von oben nach unten eine Abnahme der Relaxationszeit *T₁* beobachtet wird, wie Abbildung 1 für Kieselgelsäulen mit Acetonitril und mit

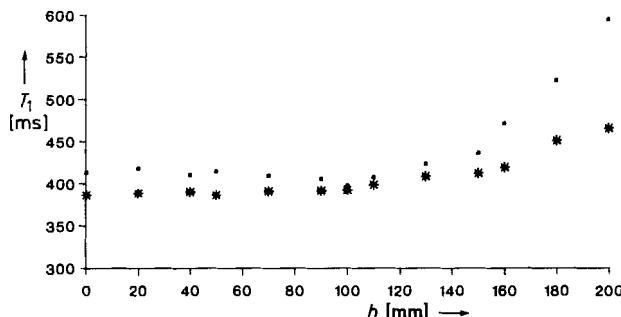


Abb. 1. Relaxationszeit *T₁* in unterschiedlichen Bereichen einer Kieselgelsäule. 0 mm ist unteres Säulenende. Inversion-Recovery-Sequenz, Ganzkörpergerät Siemens Magnetom 1.5 T, ■: Acetonitril/SiO₂, *: H₂O/SiO₂.

Wasser als mobiler Phase im stationären Zustand zeigt. Dies wird auf eine dichtere Packung des Kieselgels im unteren Säulenbereich zurückgeführt.

Schnellbildverfahren wie FLASH (Fast Low Angle Shot Imaging)^[5] erlauben die kontinuierliche Verfolgung eines chromatographischen Prozesses. Diese Sequenzen basieren auf der Einstellung einer dynamischen Gleichgewichtsmagnetisierung durch die Anwendung kleiner Flip-Winkel von $\alpha < 90^\circ$. Damit wird eine hohe Quermagnetisierung und eine nur geringfügig reduzierte Längsmagnetisierung erreicht, so daß auch bei sehr kurzen Repetitionszeiten hohe Kontraste und gute Signal/Rausch-Verhältnisse bei Meßzeiten von wenigen Sekunden erzielt werden können. Daher kann ein laufendes Chromatogramm in der Weise verfolgt werden, daß man im Abstand von 30 s Bilder aufnimmt und sie zu einem Film zusammensetzt.

Die Entwicklung des Profils der chromatographischen Bande kann in jedem Volumensegment der Säule abgebildet werden und nicht nur am Rande der Säule. Das Elutions-

[*] Prof. Dr. E. Bayer, Dr. W. Müller, M. Ilg, Dr. K. Albert
Institut für Organische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 18, D-7400 Tübingen

profil wird in einzelnen Schichtbildern über den Längs- oder Querschnitt der Säule sichtbar gemacht oder als vollständiger, dreidimensionaler Block (3D-FLASH) erfaßt. Sowohl von Einzel- als auch von Mehrkomponentensystemen wurde die Trennung abgebildet, wie Abbildung 2 (links) für die

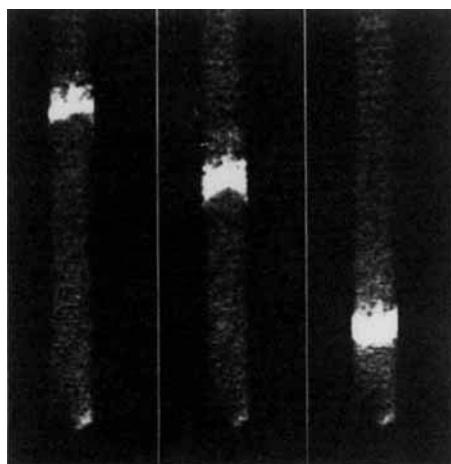


Abb. 2. Links: Momentaufnahmen (Protonenbilder) der Chromatographie von Amavadin/ H_2O an Sephadex (FLASH-Sequenz, $TE = 20$ ms, $TR = 60$ ms) nach einer Elutionsdauer von 37 min, 63 min und 110 min. Rechts: Schematische Darstellung der Schichtauswahl in den chromatographischen Abbildungen.

Trennung von Amavadin, einem natürlich vorkommenden Vanadium(IV)-Komplex^[6, 7], an Sephadex zeigt. Hier wurde die chromatographische Bande in einem zentralen Längsschnitt von 4 mm Schichtdicke im Innern der Säule beim Durchwandern der Säule verfolgt (siehe Abb. 2, rechts). Man sieht deutlich die Bandenverbreiterung und die Änderung des Elutionsprofils mit fortschreitender Entwicklung des Chromatogramms. Noch deutlicher lassen sich die Effekte untersuchen, wenn zur Analyse solcher Strömungsprofile der Diethylentriaminpentaessigsäure-Gadolinium-Komplex (Gd-DTPA) chromatographiert wird. Diese Verbindung wird als Kontrastmittel in der Kernspintomographie in 10^{-3} bis 10^{-4} m Konzentration verwendet^[8] und gibt in diesem Konzentrationsbereich deutliche Kontraste. Die Entwicklung des Chromatogramms wurde kontinuierlich verfolgt und zu einem Film rekonstituiert^[9], aus dem in Abbildung 3 neun Einzelbilder wiedergegeben sind.

Am Anfang der Säule ist ein paraboloides Flußprofil ausgebildet, das auf den Wandeffekt zurückzuführen ist, da am Rand der Säule die Packung weniger dicht und die Wechselwirkung zwischen Eluent und Phase somit geringer ist und dadurch eine schnellere Wanderung auftritt. Der Wandeffekt vor allem bei präparativen Säulen ist zwar theoretisch vorausgesagt, aber nicht *in situ* untersucht worden^[10, 11]. Hier wird er zum ersten Mal sichtbar. Deutlich ist am Anfang des Chromatogramms auch der Effekt der Unregelmäßigkeiten durch die Probenaufgabe. Im folgenden wird der Wandeffekt weniger bedeutsam, und die Abtrennung einer Nebenkomponente wird sichtbar. In der Mitte der Säule ist nun eine schnellere Wanderung des Eluenten zu erkennen. Dieser Effekt wird auf die höhere Temperatur im Zentrum der Säule durch die Absorptionswärme zurückgeführt. Das Säulenmaterial hat eine relativ schlechte Wärmeleitfähigkeit und kann die Wärme nicht schnell genug an die Wand abführen. Im weiteren Verlauf tritt Bandenverbreiterung durch Diffusionseffekte auf. Interessant sind auch Kontraste in der Säule außerhalb des jeweiligen Elutionsbereichs, die während der gesamten Chromatographie ortskonstant

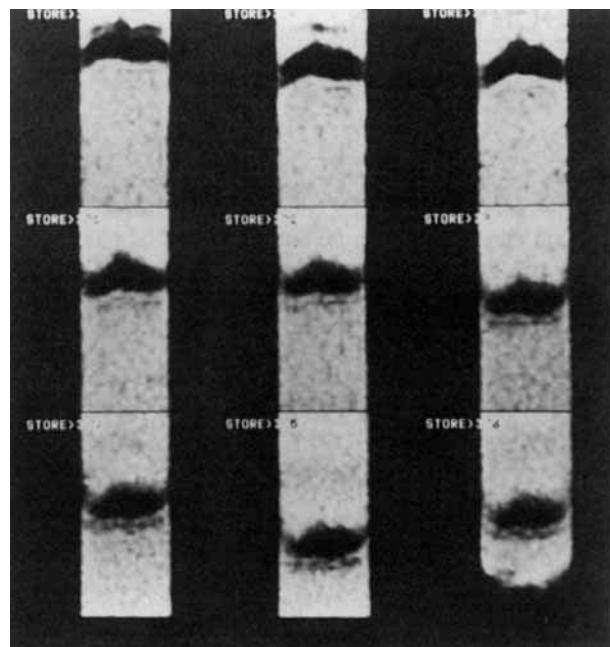


Abb. 3. Entwicklung der Elutionsfront (Protonenbilder) während der Chromatographie von Gd-(DTPA)/ H_2O an Sephadex (FLASH, $TE = 20$ ms, $TR = 60$ ms). Bilder aus einem Film [9] im zeitlichen Abstand von 15 min. Die Bilder sind zeilenweise (nicht spaltenweise) zu betrachten.

bleiben. Wir führen dies auf unterschiedliche Benetzung des Säulenmaterials zurück.

Außer Protonen können auch andere Kerne wie ^{19}F , ^{23}Na oder ^{13}C zur Bildgebung herangezogen werden. Durch die geringere NMR-Empfindlichkeit dieser Kerne wird allerdings die Bildgebung auf größere Volumenelemente mit geringerer räumlicher Auflösung beschränkt. Gleichwohl kann man bei Ionenaustauschern bewegliche von gebundenen Natrium-Ionen aufgrund der Unterschiede in der T_2 -Relaxationszeit im Kontrast unterscheiden. Eine mit Na^+ beladene Dowex-Säule zeigt nur schwache Kontraste. In Abbildung 4 sind verschiedene Stadien der Elution wiedergegeben. Aufgrund der Verlängerung von T_2 wird das nun-

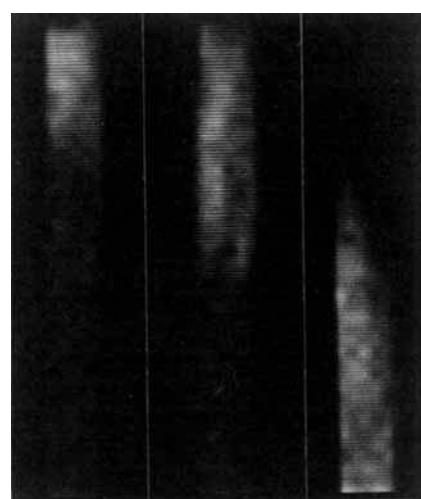


Abb. 4. Momentaufnahmen (^{23}Na -Bilder) des Ionenaustausches an einer Ionenaustauscher-Säule während der Elution mit 2 N HCl im zeitlichen Abstand von 40 min (Säule 30 cm \times 3 cm, 3D-FLASH, $TE = 5$ ms, $TR = 20$ ms).

mehr mobile Na^+ -Ion im Kontrast deutlich. Hier sind Fehler in der Säulenpackung, die zu Kanalbildung führen, zu erkennen.

Diese ersten Versuche zur Darstellung des chromatographischen Prozesses durch NMR-Bildgebung zeigen, daß hier neue Möglichkeiten für grundlegende Untersuchungen bestehen. Strömungseffekte, die bisher nur theoretisch oder experimentell durch Eingriffe in den Prozeß untersucht werden konnten, lassen sich ohne Störung laufend verfolgen. Die Optimierung von Säulenpackungen wird besonders bei der präparativen Chromatographie neue Anwendungen erschließen.

Die bildliche Darstellung von Strömungssystemen in gepackten und offenen Säulen ist über die Chromatographie hinaus bei vielen Prozessen interessant. Mit der Bildgebung ist die Beobachtung des chromatographischen Prozesses unabhängig von einer Farbe des Eluenten möglich, und dem Wort „Farbschreiben“ von *Tswett* wird wieder ein allgemeiner Sinngehalt gegeben.

Bisher ist eine Volumenauflösung noch nicht in dem Bereich der für die Chromatographie benutzten Partikelgrößen möglich, so daß sich die Diffusionsvorgänge in einzelnen Partikeln nicht abbilden lassen. Modellstudien mit größeren Partikeln können mit den Mikro-Imaging-Geräten^[12, 13] jedoch bereits durchgeführt werden. Abbildung 5

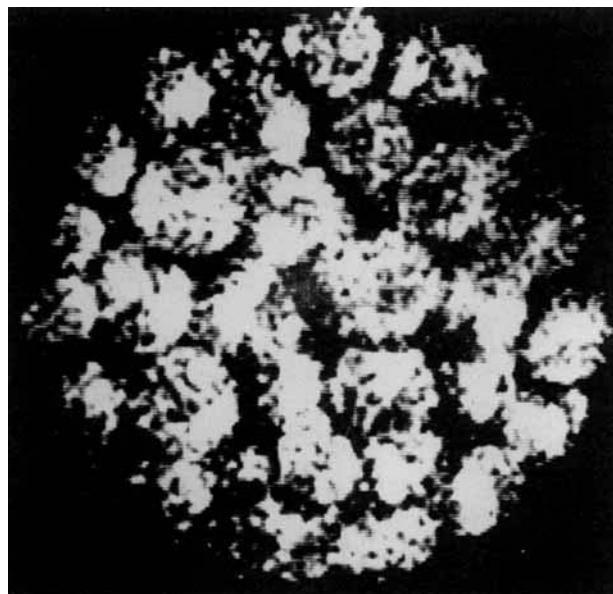


Abb. 5. Mikro-Image von Polystyrol-Beads in Benzol. Pixel-Auflösung 20 µm, Objektdicke 200 µm (Spin-Echo-Sequenz, Gerät Bruker AM 300 WB). Wir danken Herrn W. Kuhn, Bruker Analytische Meßtechnik, Karlsruhe-Forschheim, für diese Aufnahme.

zeigt Polystyrolkugelchen von ca. 500 µm Durchmesser mit einer planaren Auflösung von 20 µm × 20 µm nach der Quellung in Benzol. Die Verteilung des Lösungsmittels in den Polymerkugelchen geht aus den Helligkeitskontrasten hervor. Die Weiterentwicklung der NMR-Bildgebung in nahezu mikroskopische Auflösungsbereiche erschließt in der Polymerchemie und zellulären Biologie eine Fülle von Anwendungsmöglichkeiten.

Eingegangen am 17. März 1989 [Z 3235]

- [1] P. C. Lauterbur, *Nature (London)* 242 (1973) 190.
- [2] F. W. Wehrli, D. Shaw, J. B. Kneel (Hrsg.): *Biochemical Resonance Imaging*, VCH Publishers, New York 1988.
- [3] B. Blümich, *Angew. Chem. Adv. Mater.* 100 (1988) 1460; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) 1406.
- [4] L. A. Weisenberger, J. L. König, *Polym. Prepr. Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.* 29 (1988) 98.

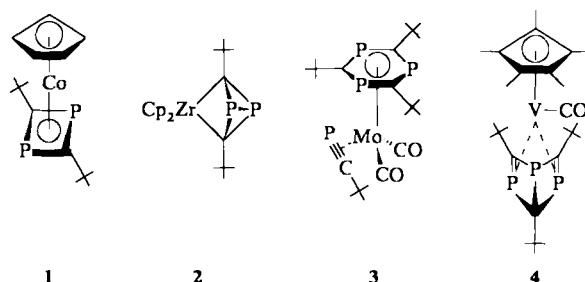
- [5] A. Haase, J. Frahm, D. Matthaei, K. D. Merboldt, W. Hänicke, *J. Magn. Reson.* 67 (1986) 217.
- [6] E. Bayer, E. Koch, G. Anderegg, *Angew. Chem.* 99 (1987) 570; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26 (1987) 545.
- [7] H. Kneifel, E. Bayer, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 3075.
- [8] W. Grodd, R. C. Brasch, *Roe Fo Fortschr. Geb. Roentgenstr. Nuklearmed.* 145 (1986) 130.
- [9] E. Bayer, Vortrag und Filmvorführung beim 12th Symposium on Column Liquid Chromatography, Washington, 19. – 24. Juni 1988.
- [10] E. Bayer, *Chimia* 17 (1963) 414.
- [11] G. Guichon, S. Ghodbane, S. Golshan-Shirazi, L. Bingcheng, Vortrag beim 17th International Symposium on Chromatography, Wien, 25. – 30. Sept. 1988.
- [12] J. Aguayo, S. Blackband, J. Schoeniger, M. Mattingly, M. Hintermann, *Nature (London)* 322 (1986) 190.
- [13] W. Kuhn, *Bruker Rep.* 1987 (1) 40. Übersicht über NMR-Mikroskopie; W. Kuhn, *Angew. Chem.* 101 (1989), im Druck; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28 (1989), im Druck.

Tetra-*tert*-butyl-tetraphosphacuban – die erste thermische Cyclooligomerisierung eines Phosphaalkins **

Von Thomas Wetling, Jürgen Schneider, Oliver Wagner, Cornelius G. Kreiter und Manfred Regitz*

Professor Gottfried Märkl zum 60. Geburtstag gewidmet

Die sich ungemein schnell entwickelnde Chemie der Phosphaalkine stand bisher vor allem im Zeichen der Cycloadditionsreaktivität sowie der Ligandeigenschaften^[1]. Gerade in diesem Zusammenhang ist dem Cyclodimerisierungs- und Cyclotrimerisierungsverhalten in der Koordinationssphäre von Metallen viel Aufmerksamkeit entgegengebracht worden. So kann *tert*-Butylphosphaacetylen 5 z. B. an Cobaltkomplexen zu Diphosphacyclobutadien- (1^[2, 3]) und Di-phosphabicyclo[1.1.0]butan-Einheiten (2^[4]) dimerisiert werden. Auch Cyclotrimerkomplexe, die sich vom 1,3,5-Triphosphabenzol (3^[5]) und dessen Dewar-Derivat ableiten (4^[6]), sind bekannt geworden.



Daß man auch auf die Mithilfe von Metallkomplexen bei Cyclooligomerisierungsreaktionen verzichten kann, zeigt die thermische Cyclotetramerisierung von 5. Zwar weiß man, daß die meisten Phosphaalkine thermisch nicht sonderlich belastbar sind^[1], doch gibt es keine Untersuchungen über Vorgänge, die sich beim Erwärmen abspielen.

[*] Prof. Dr. M. Regitz, Dipl.-Chem. T. Wetling, Dipl.-Chem. J. Schneider, Dipl.-Chem. O. Wagner, Prof. Dr. C. G. Kreiter Fachbereich Chemie der Universität Erwin-Schrödinger-Straße, D-6750 Kaiserslautern

[**] Ungewöhnlich koordinierte Phosphorverbindungen, 37. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. – 36. Mitteilung: W. Schnurr, M. Regitz, *Synthesis* 1989, im Druck.