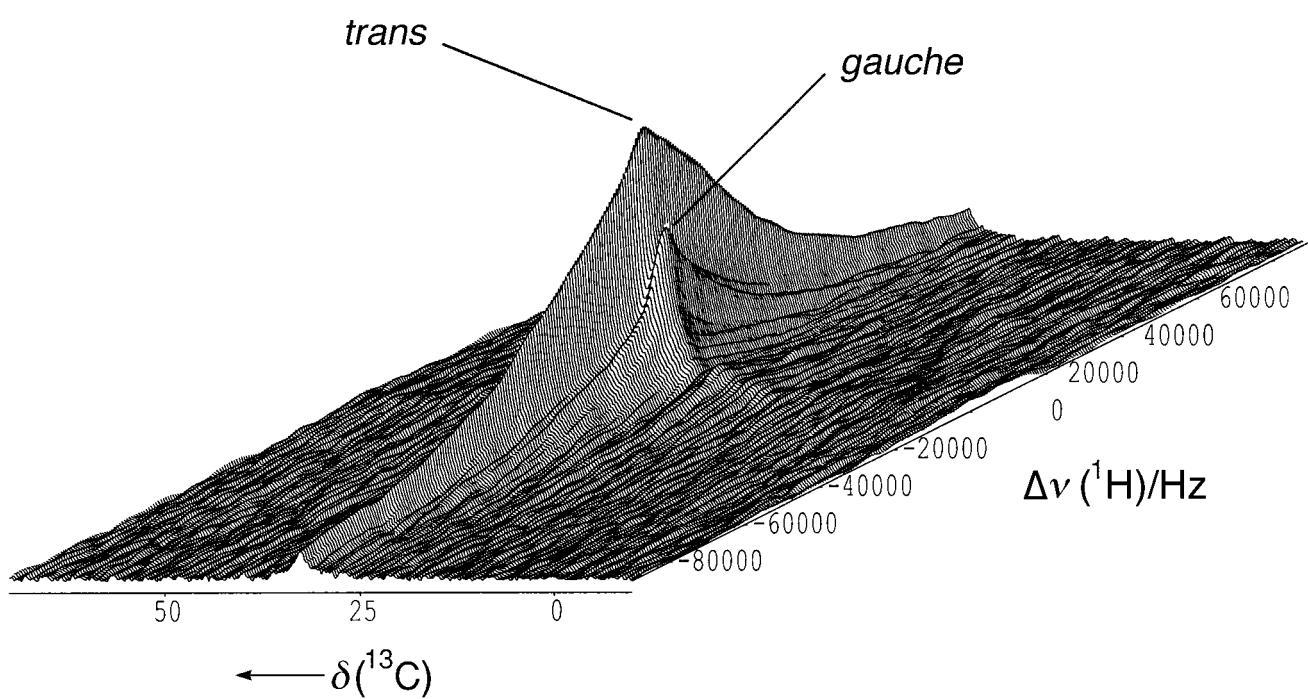
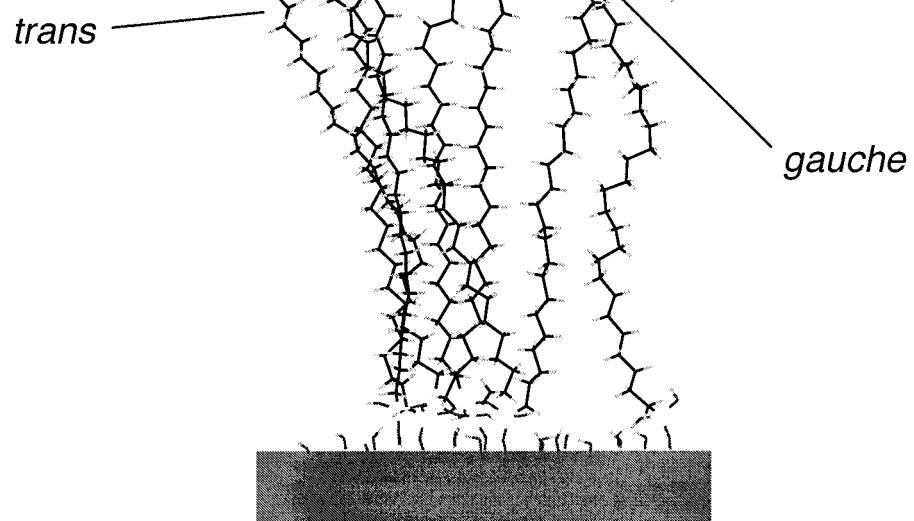


Das dynamische Verhalten der Alkylketten einer stationären C_{30} -Interphase für die HPLC kann über ein 2D-Festkörper-NMR-Spektrum ermittelt werden. Mehr über die Anwendung dieser Methode erfahren Sie auf den folgenden Seiten.



Untersuchungen zur Selektivität von Triacontylinterphasen**

Klaus Albert,* Tanja Lacker, Martin Raitza, Matthias Pursch, Hans-Joachim Egelhaaf und Dieter Oelkrug

Zur Trennung von Isomerengemischen durch Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) sind neben octyl- und octadecylmodifizierten Kieselgelen (C_8 - bzw. C_{18} -Trennphasen) zunehmend Trennmaterialien mit Triacontylgruppen (C_{30} -Trennphasen) im Gebrauch. Besonders in der Analytik von Carotinoiden sowie von Tocopherol-Homologen werden diese Materialien wegen ihrer spezifischen Selektivität inzwischen weitgehend verwendet.^[1-7] Die Untersuchung der für dieses spezifische Trennverhalten ursächlichen Strukturparameter und Wechselwirkungen war Gegenstand der hier vorgestellten Studien. Die Selektivität (Trennfaktor α) einer chromatographischen Trennung wird vom interaktiven Wechselspiel der stationären und der mobilen Phase mit den unterschiedlichen Analyten bestimmt. In diesem komplexen Interphasensystem durchdringt die mobile Phase die stationäre Komponente des alkylmodifizierten Kieselgels in molekularer Dimension, ohne mit ihr eine homogene Lösung zu bilden. Die unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten zwischen mobiler und stationärer Phase ermöglichen die chromatographische Trennung der einzelnen Komponenten eines Gemisches.

Wesentliche Parameter des chromatographischen Interphasensystems sind Struktur und Dynamik der stationären Phase, die Zusammensetzung der mobilen Phase sowie die räumliche und elektronische Struktur des Analyten. Zur Untersuchung des dynamischen Verhaltens derartiger komplexer Systeme wurden temperaturabhängige Festkörper-NMR-, Suspensions-MAS-NMR- und Fluoreszenzmessungen mit temperaturabhängigen HPLC-Trennungen kombiniert.

Die untersuchte C_{30} -Interphase wurde durch Lösungspolymerisation hergestellt, wobei das teilhydrolysierte Silan partiell polykondensierte und anschließend an die Kieselgeloberfläche band.^[1, 4] Die durch dieses Syntheseverfahren resultierende Anordnung der n -Alkylgruppen spiegelt sich in den temperaturabhängigen ^{13}C -Festkörper-NMR-Spektren wider (Abb. 1). Für die Kohlenstoffatome der Methylenhauptkette werden bei Temperaturen von 305 K und 315 K zwei klar getrennte Signale bei $\delta = 30.0$ und 32.8 beobachtet. Bei tieferen Temperaturen dominiert das tieffeldverschobene Signal, während mit steigender Temperatur die Intensität der

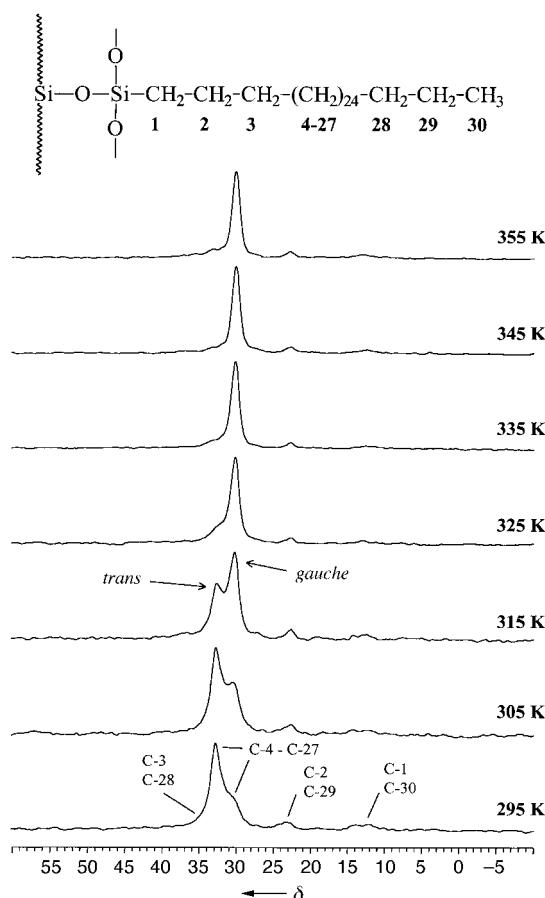


Abb. 1. Temperaturabhängigkeit der 75.4 MHz- ^{13}C -CP-MAS-NMR-Spektren (75.4 MHz) der C_{30} -Trennphase.

Hochfeldresonanz zunimmt. In Analogie zu den Befunden bei ^{13}C -Festkörper-NMR-Untersuchungen an Polyethylen^[8] können geordnete Alkylkettenbereiche mit *trans*-Konformationen dem Signal bei $\delta = 32.8$ und ungeordnetere Domänen mit *gauche*-Konformationen dem Signal bei $\delta = 30.0$ zugeordnet werden. Die getroffene Signalzuordnung ist über ein zweidimensionales Wideline-Separation-Experiment (WISE) überprüfbar.^[9] In Abbildung 2a sind die ^{13}C -chemischen Verschiebungen gegen die Signalhalbwertsbreiten $\Delta\nu$ der Protonen aufgetragen. Aus Abbildung 2b ist klar ersichtlich, daß die Signalhalbwertsbreite der Protonen der *trans*-Konformationen (^{13}C -NMR-Signal bei $\delta = 32.8$) wesentlich größer ist (48 kHz) als die Signalhalbwertsbreite der Protonen der *gauche*-Konformationen (^{13}C -NMR-Signal bei $\delta = 30.0$, 15 kHz). Da sich die Signalhalbwertsbreite eines Methylenprotonen-Ensembles reziprok zur Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 der beteiligten Protonen und damit zur gemittelten Gesamtbeweglichkeit verhält, können unbeweglichere *trans*-Konformationen eindeutig von beweglicheren *gauche*-Konformationen unterschieden werden.

Beide n -Alkylkettenkonformationen sind, wie in Abbildung 1 gezeigt, durch Änderung der Temperatur ineinander überführbar. So liegen bei 295 K hauptsächlich *trans*-neben *gauche*-Konformationen vor, während bei Temperaturen höher als 335 K ausschließlich *gauche*-Konformationen auftreten. Auch in Gegenwart der mobilen Phase, also in dem Medium, in dem der chromatographische Trennprozeß statt-

[*] Prof. Dr. K. Albert, Dipl.-Chem. T. Lacker, Dipl.-Phys. M. Raitza, Dr. M. Pursch
Institut für Organische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 18, D-72076 Tübingen
Fax: (+49) 7071-295875
E-mail: klaus.albert@uni-tuebingen.de

Dr. H.-J. Egelhaaf, Prof. Dr. D. Oelkrug
Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 8, D-72076 Tübingen

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (LI 154/41-3 und LI 154/41-4) und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken der Fa. Bischoff Analysentechnik und -geräte GmbH, Leonberg, für die Überlassung von Prontosil-Kieselgel.

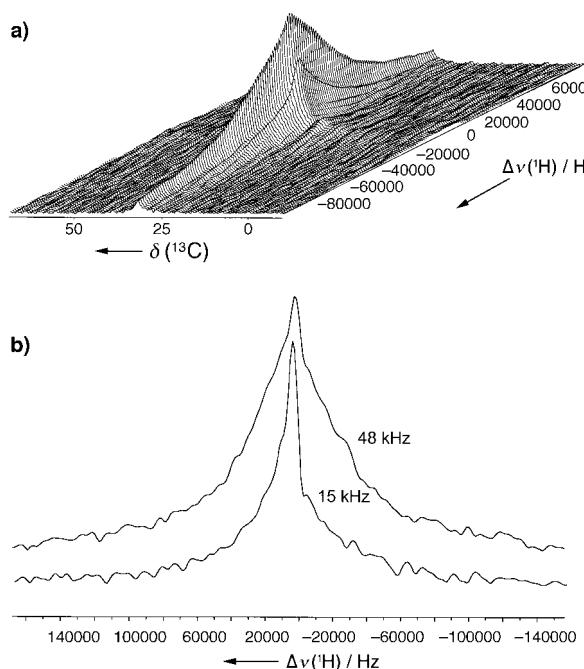


Abb. 2. a) 2D-WISE-NMR-Spektrum der C_{30} -Trennphase. b) 1H -Breitlinienspektren ($\Delta\nu$ in Hz) aus dem 2D-WISE-NMR-Spektrum für die Resonanzen der *trans*- und der *gauche*-Konformationen.

findet, können über Suspensions-MAS-NMR-Spektren *gauche*- und *trans*-Konformationen der C_{30} -Alkylketten nachgewiesen werden.^[7] Die relativen Anteile der jeweiligen Konformationen sind von der Zusammensetzung der mobilen Phase abhängig. So führt das häufig als „Modifier“ verwendete Lösungsmittel *tert*-Butylmethylether (TBME) bevorzugt zu *gauche*-Konformationen und damit zu einer erhöhten Gesamtbeweglichkeit der Alkylkette.^[7]

In den Suspensions-NMR-Spektren der C_{30} -Phase in einem für die Trennung von β -Carotin-Isomeren vorteilhaften Lösungsmittelgemisch aus Methanol/TBME 75/25 (v/v) sind bei einer Temperatur von 295 K die relativen Anteile der *trans*- und der *gauche*-Alkylkettenkonformationen gegenüber denen im Festkörper-NMR-Spektrum nicht wesentlich verändert (Abb. 3). Analog wie in den Festkörper-NMR-Spektren nimmt mit steigender Temperatur der Anteil der *trans*-zugunsten der *gauche*-Konformationen ab (Abb. 3).

Eine Veränderung der Alkylkettenorientierung, hervorgerufen durch Variation der Zusammensetzung der mobilen Phase oder der Temperatur, sollte sich auf das dynamische und das chromatographische Retentionsverhalten des Analyten auswirken. Das dynamische Verhalten des Analyten im Interphasensystem kann bei Fluorophoren aus den Rotationskorrelationszeiten τ_R bestimmt werden. Diese werden über Fluoreszenzanisotropiemessungen ermittelt.^[10] Der reziproke Wert von τ_R ist proportional zum Rotationsdiffusionskoeffizienten der betreffenden Fluoreszenzsonde und ist somit ein direktes Maß für ihre Beweglichkeit im Interphasensystem.^[10] Damit kann man aus Abbildung 4 eindeutig erkennen, daß der verwendete Analyt, 1,6-Diphenylhexatrien (DPH), im Interphasensystem aus C_{30} -Trennphase und Acetonitril/Wasser als mobiler Phase mit zunehmender Temperatur zunehmend mobiler wird. Die in Abbildung 4 aufgetra-

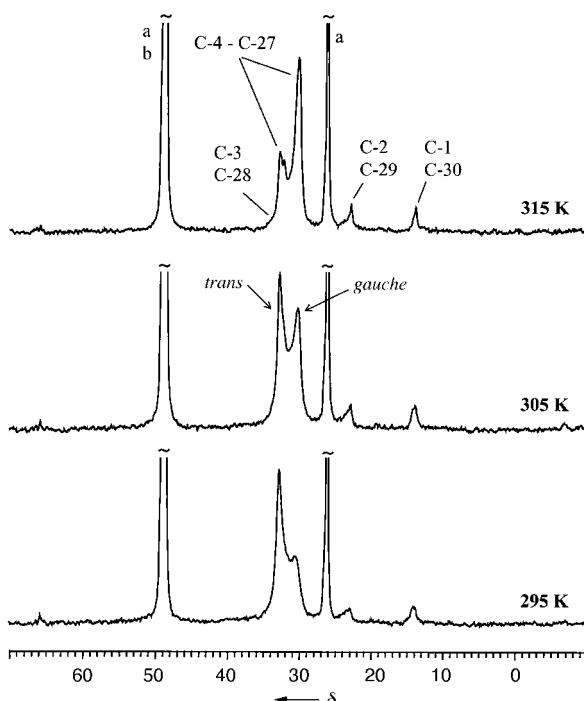


Abb. 3. Temperaturabhängigkeit der Suspensions- ^{13}C -MAS-NMR-Spektren (75.4 MHz) der C_{30} -Trennphase in Methanol/TBME 75/25 (v/v). Die Lösungsmittelsignale sind mit a (TBME) und b (Methanol) gekennzeichnet.

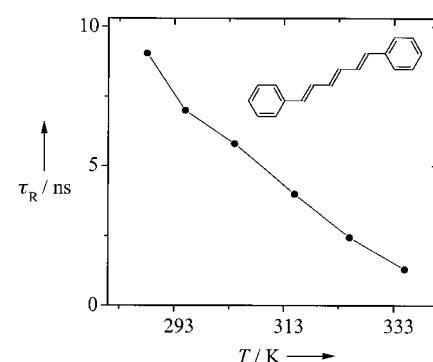


Abb. 4. Temperaturabhängigkeit der gemittelten Rotationskorrelationszeiten $\bar{\tau}_R$ von DPH im Interphasensystem C_{30} -Trennphase – DPH – Acetonitril/Wasser 50/50 (v/v).

genen mittleren Rotationskorrelationszeiten $\bar{\tau}_R$ wurden aus stationären Fluoreszenzanisotropien und den entsprechenden Fluoreszenzabklingkurven τ_F berechnet.

Das Gesamtbild des temperaturabhängigen Interphasensystems wird durch das temperaturabhängige Trennverhalten der C_{30} -Phase bei der Trennung von β -Carotin-Isomeren ersichtlich. Bei einer Temperatur von 285 K sind das all-*trans*- und das 9-*cis*-Isomer sehr gut aufgetrennt (Abb. 5). Mit steigender Temperatur nehmen sowohl die Retentionszeit als auch die Selektivität ab. Dennoch kann auch noch bei 295 K eine gute Trennung, und das mit kürzeren Retentionszeiten, erhalten werden. Bis zu einer Temperatur von 305 K treten keine wesentlichen Änderungen auf, im Temperaturbereich von 305 bis 315 K verschlechtert sich das Trennverhalten jedoch zunehmend, so daß bei 315 K beide Strukturisomere gemeinsam eluiert werden.

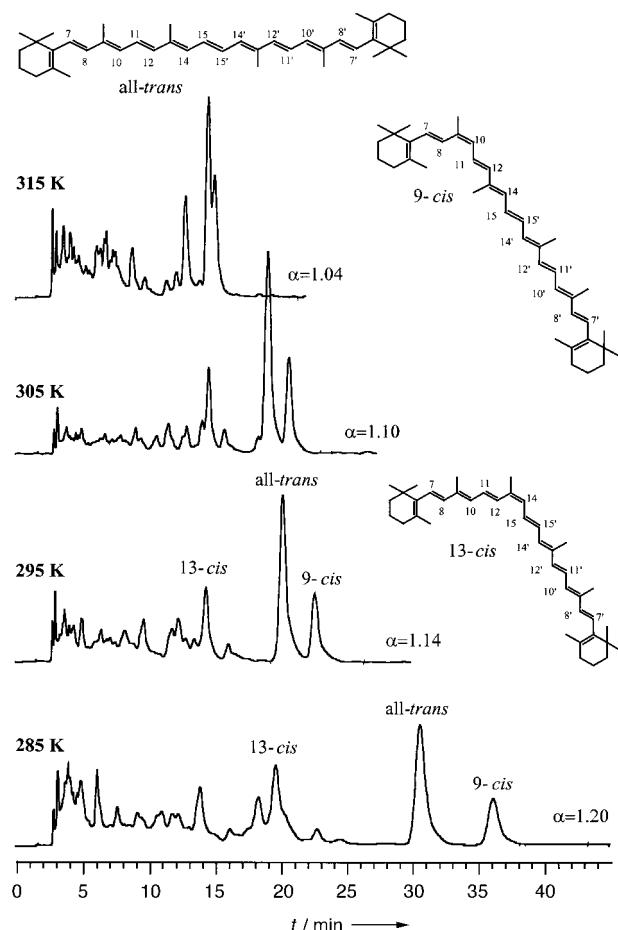


Abb. 5. Temperaturabhängigkeit der Trennung von *cis/trans*- β -Carotinen auf der C₃₀-Trennphase. Die angegebenen Selektivitäten α beschreiben das relative Retentionsverhalten von 9-*cis*- und all-*trans*- β -Carotin.

Parallel zur Verschlechterung der Trennleistung der C₃₀-Phase bewirkt der Temperaturanstieg zwischen 295 K und 315 K eine Änderung des Verhältnisses von *trans*- zu *gauche*-Konformationen der *n*-Alkylkette. Der Anteil der *trans*-Konformationen nimmt unter den gewählten Trennbedingungen mit steigender Temperatur kontinuierlich ab: Bei 295 K beträgt er 70 %, bei 305 K 57 % und bei 315 K nur noch 35 %. Somit wird spezifische Selektivität für die räumliche Erkennung von Strukturisomeren durch das Verhältnis von *trans*- zu *gauche*-Konformationen der C₃₀-Alkylketten gesteuert, wobei ein höherer Anteil an *trans*-Konformationen vorteilhaft ist. Für die praktische Anwendung der C₃₀-Trennphasen ergibt sich als wichtige Schlußfolgerung, daß anders als bei C₈- und C₁₈-Trennphasen unbedingt eine Temperaturäquilirierung der Trennsäule durchgeführt werden sollte.

Experimentelles

Zur Synthese der C₃₀-Interphase wurden 4 g Kieselgel (Prontosil, 3 μ m Partikelgröße, 200 Å Porengröße, Fa. Bischoff, Leonberg) mit 5 g Trichlor-n-triacontylsilan (ABCR, Karlsruhe) umgesetzt. Das Silan wurde bei 343 K in Xylol (50 mL) gelöst und über ein Papiertuch zu mit 50 mL Xylol aufgeschämmtem Kieselgel gegeben. Durch Zugabe von 1.0 mL Wasser wurde die Reaktion gestartet. Nach dem Erhitzen unter Rückfluß (10 h) wurde das Reaktionsprodukt über eine P4-Fritte abgesaugt und der Rückstand nacheinander mit Xylol, Aceton, Ethanol, Wasser, Ethanol, Aceton und *n*-Hexan gewaschen.^[1, 4]

NMR-Parameter: Die NMR-Spektren wurden an einem Bruker-ASX-300-Spektrometer aufgenommen. Die ¹³C-CP-MAS-NMR-Messungen wurden mit einem 7-mm-Probenkopf bei einer Rotationsfrequenz (MAS) von 4000 Hz durchgeführt (90°-Pulswinkel 6.5 μ s, 2048 Transienten, Kontaktzeit 6 ms, Wartezeit 1 s, Zeitdomäne 2K Datenpunkte (TD) mit einer Spektralbreite (SW) von 23 kHz, Akquisitionszeit 45 ms). Suspensions-MAS-NMR-Messungen wurden mit einem 4-mm-Probenkopf bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 3000 Hz aufgenommen (90°-Pulswinkel 3.6 μ s, 8000 Transienten, Wartezeit 5 s, Zeitdomäne 6K Datenpunkte (TD) mit einer Spektralbreite (SW) von 23 kHz, Akquisitionszeit 135 ms). Die temperaturabhängigen NMR-Messungen wurden nach einer Äquilibrierungszeit von 15 min aufgenommen.

2D-WISE-Experiment: 650 Transienten pro FID, Zeitdomäne 2K Datenpunkte (TD2) mit einer Spektralbreite (SW2) von 23 kHz, Akquisitionszeit 45 ms, 64 Inkremente (TD1) zu 3 μ s, Spektralbreite (SW1) 333 kHz, Kontaktzeit 500 μ s, Wartezeit 1 s, Exponentielle Multiplikation mit 20 Hz entlang F₂ und 5000 Hz entlang F₁.

Fluoreszenzparameter: Stationäre Fluoreszenzanisotropien wurden an einem Spex-222-Fluorolog-Spektrometer mit Calcit-Polarisationsprismen in verdünnter Suspension (10⁻⁷ M Lösungen von DPH) bestimmt, letzteres zur Vermeidung von Depolarisation durch Vielfachstreuung.

Chromatographieparameter: Das in Propan-2-ol suspendierte Trennmaterial wurde in eine Stahlsäule (250 \times 4.6 mm, Fa. Bischoff, Leonberg) gefüllt. Die Trennung wurde mit einem HP-1100-Chromatographensystem (Hewlett-Packard, Waldbronn) durchgeführt. Als Eluent wurde Methanol/TBME 75/25 (v/v) gewählt, die Fließgeschwindigkeit betrug 1.0 mL min⁻¹, UV-Detektion bei 450 nm. 10 μ L einer 0.05proz. Lösung von β -Carotin-Isomeren wurden injiziert. Zur Temperaturäquilirierung wurde die Trennsäule in einem Haake-K-Thermostaten bei der gewünschten Temperatur temperiert.

Eingegangen am 29. September, ergänzte Fassung am 17. November 1997 [Z 10985]

Stichwörter: Carotinoide • Chromatographie • Fluoreszenzspektroskopie • NMR-Spektroskopie

- [1] L. C. Sander, K. Epler Sharpless, N. E. Craft, S. A. Wise, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1667–1674.
- [2] C. Emenhiser, L. C. Sander, S. J. Schwartz, *J. Chromatogr. A* **1995**, 707, 205–212.
- [3] S. Strohschein, M. Pursch, H. Händel, K. Albert, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1997**, 357, 498–502.
- [4] M. Pursch, S. Strohschein, H. Händel, K. Albert, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 386–393.
- [5] K.-J. Yeum, S. L. Booth, J. A. Sadowski, C. Liu, G. Tang, N. I. Krinsky, R. M. Russel, *Am. J. Clin. Nutr.* **1996**, 64, 594–602.
- [6] F. Delgado-Vargas, O. Paredes-Lopez, *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 1097–1102.
- [7] S. Strohschein, M. Pursch, D. Lubda, K. Albert, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 13–18.
- [8] W. L. Earl, D. L. Van der Hart, *Macromolecules* **1979**, 12, 762–767.
- [9] K. Schmidt-Rohr, J. Clauss, H.-W. Spiess, *Macromolecules* **1992**, 25, 3273–3277.
- [10] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum, New York, 1982.