

Lehrstuhl für Ökologische Chemie und Umweltanalytik  
Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
Technische Universität München

NMR-spektroskopische Verfahren für eine  
verbesserte quantitative Beschreibung der  
Sauerstoff-Funktionalität in Huminstoffen

Annette Günzl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur  
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Huber  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. A. Kettrup  
2. Univ.-Prof. Dr. I. Kögel-Knabner

Die Dissertation wurde am 14.12.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung  
und Umwelt am 10.04.2001 angenommen.

---

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdrucks, der Entnahme von Abbildungen, der Wiedergabe auf photo-mechanischem, elektronischem oder ähnlichem Wege bleiben — auch bei nur auszugsweiser Verwendung — vorbehalten. Die elektronische Fassung (PDF-Datei) dieser Publikation darf ausschließlich in unveränderter Form weitergegeben werden. Jede Veränderung oder auszugsweise Weitergabe oder Veröffentlichung bedarf der schriftlichen Genehmigung des Autors. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtsgesetzes.

Die in dieser Publikation erwähnten Soft- und Hardwarebezeichnungen sind in den meisten Fällen auch eingetragene Warenzeichen und unterliegen als solche gesetzlichen Bestimmungen.

Copyright © Annette Günzl 2000

Annette@Guenzl.de

---

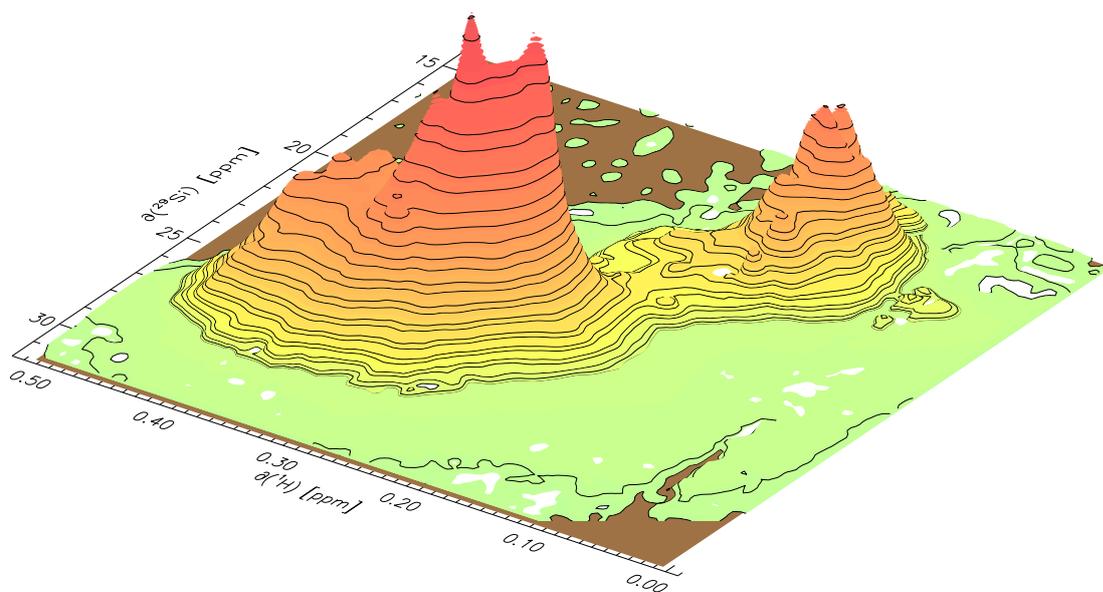
Lehrstuhl für Ökologische Chemie und Umweltanalytik

Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt

Technische Universität München

# NMR-spektroskopische Verfahren für eine verbesserte quantitative Beschreibung der Sauerstoff-Funktionalität in Huminstoffen

Annette Günzl



## Zusammenfassung

Huminstoffe bestehen aus einer komplexen Mischung einzelner Komponenten und besitzen daher keine definierte molekulare Struktur. Polare funktionelle Gruppen sind als relevante Konstituenten von Huminstoffen verantwortlich für das physikochemische Verhalten sowie das ökologische Wirkungsspektrum von Huminstoffen. Die NMR-Spektroskopie spielt eine herausragende Rolle für die Charakterisierung von Huminstoffen. Die Kombination aus chemischer Derivatisierung mit NMR aktiven Markern und zweidimensionaler NMR Spektroskopie ist eine neue Methode für die Identifizierung und Quantifizierung von aziden, sauerstoffhaltigen Funktionen in Huminstoffen. Mit dieser Methode können sowohl aliphatische und aromatische Carboxylgruppen als auch primäre, sekundäre und tertiäre Hydroxylgruppen unterschieden werden.

## Summary

Humic substances are a complex mixture with a nearly infinite number of components and for this reason, they do not possess a well defined molecular structure. Functional groups are relevant constituents of humic substances and affect their physico-chemical properties and ecological efficacy. NMR spectroscopy is a valuable tool for the characterization of humic substances. The combination of chemical derivatization with NMR active labels and two dimensional NMR spectroscopy is a new method for the identification and quantification of exchangeable protons in humic materials. It allows a detailed distinction of aliphatic and aromatic carboxylic acids as well as a differentiation of primary, secondary and tertiary alcohols in humic substances.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einführung und Aufgabenstellung</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>Die Suche nach der Struktur von Huminstoffen</b>	<b>16</b>
2.1	Strukturelemente und ihre Bestimmungen . . . . .	17
2.1.1	Strukturelle Untersuchungen von Huminstoffen: ein Problem von Mischungen . . . . .	18
2.1.2	Informationen aus Abbaureaktionen . . . . .	18
2.1.3	Informationen aus spektroskopischen Methoden . . . . .	21
2.1.4	Informationen über die Molekülgröße . . . . .	23
2.2	Methoden zur Analyse funktioneller Gruppen . . . . .	23
2.3	Zusammenfassung: Die strukturelle "Form" von Huminstoffen . . . . .	24
<b>3</b>	<b>Die Silylierung zur Markierung funktioneller Gruppen</b>	<b>25</b>
3.1	Silylierungsreagenzien und Methoden . . . . .	26
3.2	Nebenreaktionen der Silylierungsmethoden . . . . .	28
<b>4</b>	<b>Grundlagen der Impuls-NMR-Spektroskopie</b>	<b>33</b>
4.1	Der quantenmechanische Formalismus . . . . .	33
4.1.1	Der klassische Ansatz . . . . .	33
4.1.2	Die Dynamik von Kernspinsystemen . . . . .	35
4.2	Der Produktoperator-Formalismus . . . . .	40
4.2.1	Produkte kartesischer Spin-Operatoren . . . . .	40
4.2.2	Das INEPT-Experiment . . . . .	44
4.2.3	Zweidimensionale heteronuklear korrelierte Experimente . . . . .	45
4.3	Feldgradienten-Spektroskopie . . . . .	49
4.3.1	Gepulste Feldgradienten (PFG) in der NMR-Spektroskopie . . . . .	49
4.3.2	Kohärenz-Transferwege . . . . .	50
4.3.3	Das HMQC-Experiment . . . . .	52
4.3.4	Das HSQC-Experiment . . . . .	54
4.4	Experimentelle Aspekte der FT-NMR-Spektroskopie . . . . .	56

4.4.1	Die Fourier-Transformations-Technik . . . . .	56
4.4.2	Signalverarbeitung: Digitale Filterung, Nullpunktfüllung . . . . .	57
4.4.3	Phasenkorrektur . . . . .	59
4.5	Die zweidimensionale NMR-Spektroskopie . . . . .	60
4.6	Die $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektroskopie . . . . .	62
4.6.1	Eigenschaften des $^{29}\text{Si}$ -Kerns . . . . .	63
4.6.2	Polarisationstransfer-Experimente . . . . .	63
4.7	Die $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektroskopie . . . . .	65
4.7.1	$^{17}\text{O}$ -Kerneigenschaften . . . . .	65
4.7.2	Quadrupoleigenschaften, Relaxation, Linienbreite . . . . .	65
4.7.3	Chemische Verschiebung . . . . .	67
4.7.4	Prozessierungsverfahren . . . . .	67
4.8	Die on-line LC-NMR-Kopplung . . . . .	69
<b>5</b>	<b>Literaturüberblick</b>	<b>70</b>
5.1	Bestimmung von Strukturelementen des Grundgerüsts . . . . .	72
5.2	Bestimmung von Funktionalitäten . . . . .	74
5.2.1	$^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie . . . . .	74
5.2.2	$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie . . . . .	74
5.2.3	$^{15}\text{N}$ -NMR-Spektroskopie . . . . .	74
5.2.4	$^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektroskopie . . . . .	75
5.2.5	$^{19}\text{F}$ - und $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie . . . . .	75
5.2.6	$^{17}\text{O}$ -NMR-Spektroskopie . . . . .	75
5.2.7	Zweidimensionale NMR-Spektroskopie . . . . .	75
5.3	Physikalisch-chemische Wechselwirkungen . . . . .	76
5.4	Silylierung von Huminstoffen . . . . .	81
5.5	Die $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektroskopie . . . . .	83
<b>6</b>	<b>Ergebnisse der methodischen Entwicklung</b>	<b>84</b>
6.1	Optimierung der Synthesebedingungen . . . . .	84
6.1.1	Optimierung der Silylierung an einer Modellverbindung . . . . .	85
6.1.2	Silylierung von Huminstoffen . . . . .	93
6.1.3	Das Silylierungsverfahren nach Haider et al. . . . .	96
6.2	Optimierung der 1D-NMR-Experimente . . . . .	99
6.2.1	Die $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie . . . . .	99
6.2.2	Die $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektroskopie . . . . .	101
6.2.3	Die $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie . . . . .	103
6.3	Auswahl der 2D-NMR-Experimente . . . . .	104

6.3.1	Berechnung der Gradientenverhältnisse . . . . .	104
6.3.2	Experimentelle Ermittlung einer geeigneten NMR-Technik . . . . .	104
6.3.3	Ermittlung von geeigneten Prozessierungsparametern . . . . .	104
6.3.4	Weitbereichskopplungsexperimente . . . . .	112
6.3.5	Differenzspektren . . . . .	115
6.3.6	Kombination von 2D-NMR-Spektren . . . . .	116
6.4	Die $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektroskopie . . . . .	121
6.4.1	Optimierung der Akquisitionsparameter . . . . .	121
6.4.2	Optimierung der Prozessierungsparameter . . . . .	122
6.4.3	Optimierung von Lösungsmittel und Temperatur . . . . .	123
6.4.4	Einfluß der Molekülgröße auf die Linienbreite . . . . .	123
6.4.5	Einfluß des Bindungszustandes auf die Linienbreite . . . . .	126
6.5	LC-NMR . . . . .	128
<b>7</b>	<b>Interpretation der NMR-Spektren</b>	<b>130</b>
7.1	Auswertung und Bewertung der Protonenspektren . . . . .	130
7.2	Ergebnisse der $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie . . . . .	138
7.3	Ergebnisse der $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektroskopie . . . . .	139
7.3.1	Korrelation von $\text{pK}_a$ -Werten mit der chemischen Verschiebung $\delta(^{29}\text{Si})$	142
7.4	Ergebnisse der zweidimensionalen NMR-Spektroskopie . . . . .	143
7.4.1	Strukturbereichskarten . . . . .	143
7.4.2	Differenzspektren . . . . .	146
7.4.3	Vergleich der Ergebnisse . . . . .	173
7.4.4	Integration von $^2\text{J}(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ - und $^1\text{J}(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -NMR-Spektren . . . . .	179
7.5	Weitbereichskopplungsexperimente . . . . .	181
7.6	Aufnahme eines Huminstoff- $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektrums . . . . .	196
7.7	LC-NMR-Spektren . . . . .	198
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>204</b>
<b>A</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>208</b>
<b>B</b>	<b>Chemische Verschiebung der Modellsubstanzen</b>	<b>225</b>
<b>C</b>	<b>Integrale der NMR-Spektren</b>	<b>232</b>
<b>D</b>	<b>Begriffe, Abkürzungen und Symbole</b>	<b>238</b>
<b>E</b>	<b>Liste der verwendeten Substanzen</b>	<b>242</b>

# Abbildungsverzeichnis

4.1	Impulsfolge des refokussierten INEPT-Experiment . . . . .	44
4.2	Pulssequenz des HMQC-Experiments . . . . .	46
4.3	Pulssequenz des HSQC-Experiments . . . . .	47
4.4	Schematische Erklärung der Wirkung von gepulsten Feldgradienten . . . . .	49
4.5	Kohärenzweg-Diagramm für die Anregung mit einem 90°-Puls . . . . .	51
4.6	Die HMQC-Pulssequenz mit Gradientenpulsen . . . . .	53
4.7	Die HSQC-Pulssequenz mit Gradientenpulsen . . . . .	55
4.8	Schema für 2D-Experimente mit vier Intervallen . . . . .	60
4.9	Chemische Verschiebungsbereiche $\delta(^{17}\text{O})$ organischer Verbindungen . . . . .	67
6.1	( $^1\text{H}$ , $^{29}\text{Si}$ )-HMQC-NMR-Spektrum von Carminsäure . . . . .	85
6.2	Vergleich einiger literaturbekannter Silylierungsmethoden . . . . .	87
6.3	Weitere Untersuchung der Methode BSTFA/DMSO. . . . .	92
6.4	Vergleich einiger literaturbekannter Silylierungsmethoden . . . . .	94
6.5	NMR-Spektren nach Haider et al. . . . .	97
6.6	Vergleich verschiedener Pulssequenzen . . . . .	100
6.7	Vergleich des invers-gated $^{29}\text{Si}$ -Experiments mit der $^{29}\text{Si}$ -INEPT-Technik . . .	101
6.8	Vergleich verschiedener NMR-Pulssequenzen . . . . .	105
6.9	Vergleich verschiedener Prozessierungsparameter . . . . .	108
6.10	Vergleich verschiedener Anzahlen der Inkremente . . . . .	109
6.11	$^3\text{J}(^1\text{H}^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektren von silylierter Saccharose und 1,2-Propandiol . . .	113
6.12	Austausch von Spalten . . . . .	118
6.13	Einfluß der Pulssequenz auf die Homogenität der Anregung . . . . .	122
6.14	Einfluß der Anzahl ersetzter Aufnahmepunkte auf die Basislinie . . . . .	124
6.15	Abhängigkeit der Linienbreite von Lösungsmittel und Temperatur . . . . .	125
6.16	Einfluß der Molekülgröße auf das Signal-Rausch-Verhältnis . . . . .	127
6.17	Einfluß des Bindungszustandes auf die Linienbreite . . . . .	127
6.18	LC-NMR-Spektrum von Carminsäure . . . . .	128
7.1	Verteilung der Protonen . . . . .	131



7.2	Graphische Darstellung der Protonenverhältnisse . . . . .	135
7.3	$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von BS1FA. . . . .	138
7.4	$^{29}\text{Si}$ -INEPT-Spektren der HS . . . . .	140
7.5	Auftragung von $\delta(^{29}\text{Si})$ -Werten gegen $\text{pK}_a$ -Werte . . . . .	142
7.6	Die verschiedenen Strukturbereiche von $^2\text{J}(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektren . . . . .	145
7.7	Die verschiedenen Strukturbereiche von $^2\text{J}(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -NMR-Spektren . . . . .	145
7.8	$(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektren der Fulvinsäuren . . . . .	148
7.9	$(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -NMR-Spektren der Fulvinsäuren . . . . .	150
7.10	$(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektren der Huminsäuren . . . . .	152
7.11	$(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -NMR-Spektren der Huminsäuren . . . . .	153
7.12	$(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektren der Substanz BS1 . . . . .	154
7.13	$(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -NMR-Spektren der Substanz BS1 . . . . .	155
7.14	$(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektren der Substanz HO13 . . . . .	156
7.15	$(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -NMR-Spektren der Substanz HO13 . . . . .	157
7.16	$(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektren der Substanzen aus dem Suwannee-Fluß . . . . .	158
7.17	$(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -NMR-Spektren der Substanzen aus dem Suwannee-Fluß . . . . .	159
7.18	Die "strukturelle Grund-Form" der HS-Funktionen . . . . .	163
7.19	Die "strukturelle Grund-Form" der HS-Funktionen . . . . .	165
7.20	Übersicht über die verschiedenen Strukturbereiche von $^1\text{J}(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -NMR-Spektren. . . . .	168
7.21	$(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -NMR-Spektren des Huminstoffgerüsts . . . . .	170
7.22	Die "strukturelle Grund-Form" des Huminstoffgerüsts . . . . .	172
7.23	Kopplungen des $^{29}\text{Si}$ -Kerns mit Gerüstprotonen . . . . .	181
7.24	Verschiebungsbereiche und Korrelation der NMR-Spektren von Saccharose . . . . .	184
7.25	Die Verschiebungsbereiche und Korrelation von 2D NMR-Spektren . . . . .	185
7.26	Verschiebungsbereiche und Korrelation der NMR-Spektren von BS1FA . . . . .	186
7.27	Verschiebungsbereiche und Korrelation der NMR-Spektren von BS1FA . . . . .	187
7.28	Verschiebungsbereiche und Korrelation der NMR-Spektren von HO10FA . . . . .	188
7.29	Verschiebungsbereiche und Korrelation der NMR-Spektren von HO10FA . . . . .	189
7.30	Verschiebungsbereiche und Korrelation der NMR-Spektren von FG1FA . . . . .	190
7.31	Verschiebungsbereiche und Korrelation der NMR-Spektren von FG1FA . . . . .	191
7.32	Verschiebungsbereiche und Korrelation der NMR-Spektren von MPDOM . . . . .	192
7.33	Verschiebungsbereiche und Korrelation der NMR-Spektren von MPDOM . . . . .	193
7.34	Verschiebungsbereiche und Korrelation der NMR-Spektren von SUWFA . . . . .	194
7.35	Verschiebungsbereiche und Korrelation der NMR-Spektren von SUWFA . . . . .	195
7.36	$^{17}\text{O}$ -NMR-Spektrum der Substanz MPDOM in Pyridin . . . . .	196
7.37	LC-NMR-Spektrum von BS1FA. . . . .	199

7.38 LC-NMR-Spektrum von HO10FA. . . . .	200
7.39 LC-NMR-Spektrum von FG1FA. . . . .	201
7.40 LC-NMR-Spektrum von BS1HA. . . . .	202

# Tabellenverzeichnis

3.1	Silylierungsreagenzien für sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen. . . . .	28
3.2	Eigenschaften und Anwendung der Silylierung komplexer Moleküle . . . . .	31
4.1	$^{17}\text{O}$ -Kerneigenschaften und Meßparameter . . . . .	65
5.1	NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung des HS-Grundgerüsts . . . . .	77
5.2	NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung der Funktionalitäten von HS . . .	79
5.3	Silylierungsmethoden von Lignin, Kohleextrakten und Erdölfraktionen . . . .	81
5.4	Silylierungsmethoden für HS. . . . .	82
6.1	Umsätze der Silylierungsreaktion . . . . .	91
6.2	Parameter für $^1\text{H}$ -Einpuls-Experimente . . . . .	99
6.3	Parameter für Experimente mit Vorsättigung . . . . .	100
6.4	Parameter für refokussierte INEPT-Experimente . . . . .	102
6.5	Parameter für invers-gatad-entkoppelte $^{13}\text{C}$ -Experimente . . . . .	103
6.6	Parameter für gs-( $^1\text{H},^{29}\text{Si}$ )-HSQC-Experimente . . . . .	110
6.7	Parameter für gs-( $^1\text{H},^{13}\text{C}$ )-HSQC-Experimente . . . . .	111
6.8	Parameter für Weitbereichs-gs( $^1\text{H},^{29}\text{Si}$ )-HSQC-Experimente . . . . .	114
6.9	Parameter für LC-NMR-Experimente . . . . .	129
7.1	Verhältnisse der funktionellen Gruppen von HO10FA. . . . .	136
7.2	Verschiebungsbereiche silylierter Huminstoffkonstituenten . . . . .	144
7.3	Sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen in Fulvinsäuren . . . . .	160
7.4	Sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen in Huminsäuren . . . . .	160
7.5	Sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen in den BS1-Substanzen . . . . .	160
7.6	Sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen in den HO13-Substanzen . . . . .	161
7.7	Sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen in den Substanzen des Suwannee- Flusses . . . . .	161
7.8	Sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen in den Substanzgruppen . . . . .	162
7.9	Gerüststruktur aquatischer HS . . . . .	169
7.10	Protonenkapazität mittels potentiometrischer Titration . . . . .	173

7.11	Vergleich der potentiometrischen Titration mit der 2D-NMR-Spektroskopie .	173
7.12	Protonenkapazität mittels BaOH/Ca-Acetat-Methode . . . . .	174
7.13	Vergleich der BaOH/Ca-Acetat-Methode mit der 2D-NMR-Spektroskopie . .	174
7.14	Gehalt an Kohlenhydraten . . . . .	175
7.15	Integrale der $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren . . . . .	176
7.16	Vergleich der $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie mit der 2D-NMR-Spektroskopie . . .	176
7.17	Vergleich der $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektroskopie mit der $^2\text{J}(\text{}^1\text{H}, \text{}^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektroskopie	177
7.18	Vergleich der Ergebnisse von Protonen- und $^2\text{J}(\text{}^1\text{H}, \text{}^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektroskopie	178
7.19	Vergleich der Ergebnisse von Protonen- und $^1\text{J}(\text{}^1\text{H}, \text{}^{13}\text{C})$ -NMR-Spektroskopie	178
7.20	Vergleich der Integrale . . . . .	180
7.21	Beschreibung der LC-NMR-Spektren . . . . .	203
B.1	Chemische Verschiebung silylierter Modellverbindungen - Carbonsäuren . . .	226
B.2	Chemische Verschiebung silylierter Modellverbindungen - Aliphatische Alko- hole. . . . .	227
B.3	Chemische Verschiebung silylierter Modellverbindungen - Phenole . . . . .	229
B.4	Chemische Verschiebung silylierter Modellverbindungen - Amine, Amide . .	229
B.5	Chemische Verschiebung silylierter Modellverbindungen - Aliphatische Alko- hole . . . . .	230
C.1	Integrale der Einpuls- $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von HS in DMSO- $\text{d}_6$ . . . . .	232
C.2	Integrale der Einpuls- $^1\text{H}$ -NMR-Spektren und Spektren mit Vorsättigung . . .	233
C.3	Protonenverteilung durch Differenzbildung . . . . .	234
C.4	Anteil der austauschenden Protonen an den Gesamtprotonen . . . . .	235
C.5	Verhältnisse der funktionellen Gruppen . . . . .	235
C.6	Integrale der $^{29}\text{Si}$ -INEPT-Spektren . . . . .	236
C.7	Integrale der invers-gated-entkoppelten $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren . . . . .	236
C.8	Integrale der 2D-NMR-Spektren . . . . .	237
D.1	Abkürzungen . . . . .	238
E.1	Verwendete Substanzen . . . . .	242
E.2	Verwendete Huminstoffe . . . . .	244



# Kapitel 1

## Einführung und Aufgabenstellung

Die Entstehung von Huminstoffen in der Ökosphäre ist neben der Photosynthese einer der quantitativ bedeutendsten biogeochemischen Prozesse auf der Erde. Huminstoffe werden durch chemische und biochemische Zersetzungsreaktionen von pflanzlichem und tierischem Material und durch mikrobielle Aktivitäten in Gewässern und Böden gebildet. Der größte Anteil dieser Materialien liegt in Form höhermolekularer organischer Verbindungen vor, die bisher strukturell nicht umfassend charakterisiert werden konnten. Huminstoffe zeigen die Eigenschaften von polydispersen Polymeren und sind somit keine eindeutig definierten Moleküle. Sie reflektieren durch ihre Zusammensetzung die wesentlichen Bestandteile des jeweiligen Ökosystems und sind die ökologische Matrix, die Bindung, Transport, Abbau und Toxizität vieler organischer und anorganischer umweltrelevanter Chemikalien kontrolliert. Huminstoffe sind ein wesentliches Intermediat im globalen Kohlenstoff-, Stickstoff-, Schwefel- und Phosphorkreislauf. Strukturelle Modelle der Funktionalitäten von Huminstoffen werden entwickelt, um damit wissenschaftliche Fragestellungen aus der Ökologie und dem Zusammenwirken von natürlichen und anthropogenen Systemen zu bearbeiten. Dabei strebt man eine detaillierte strukturelle Beschreibung der chemischen Umgebung von aziden, sauerstoffhaltigen Funktionen in aquatischen und terrestrischen Huminstoffen an. Ziel ist es, das Verständnis jener Prozesse, Strukturen und Mechanismen in der Huminstoffforschung zu erweitern, für die die Charakterisierung der Funktionalität wesentlich ist. Eine umfassende analytische Charakterisierung der natürlichen organischen Materie ist die Voraussetzung für ein tieferes Verständnis jener Prozesse, die aquatische und terrestrische Umgebungen gestalten. Dies erfordert den Einsatz moderner NMR-spektroskopischer Methoden.

Polare funktionelle Gruppen sind als relevante Konstituenten von Huminsäuren verantwortlich für das physikochemische Verhalten sowie das ökologische Wirkungsspektrum von Huminstoffen (z.B. Komplexbildung, Redoxchemie, Mobilisierung und Bioverfügbarkeit von Metallionen und Xenobiotika und deren Wirkungen auf Mikroorganismen). Typische pola-

re funktionelle Gruppen in Huminstoffen beinhalten neben den vorherrschenden Carboxylgruppen, phenolischen und aliphatischen Hydroxylgruppen auch Methoxy-, Chinon-, Amid- und Etherfunktionen sowie Amine und Thiole. Die meisten Methoden zur Bestimmung reaktiver Gruppen in Huminstoffen basieren auf deren aziden Eigenschaften. Die Strukturparameter unterschiedlicher Strukturelemente überlappen wegen der komplexen Natur dieser Substanzen häufig. Potentiometrische Titrationskurven von Huminstoffen zeigen keine definierten Endpunkte, so daß diese willkürlich definiert werden. Zusätzliche Unsicherheiten ergeben sich aus dem großen Einfluß der Vorbehandlung, Extraktion und Reinigung der Substanzen auf die Kurvenform. Zwar werden Carboxylgruppen und phenolische Hydroxylgruppen erfaßt, jedoch können keine aliphatischen Hydroxylfunktionen bestimmt werden. Da der zu untersuchende Huminstoff auch in saurer Umgebung löslich sein muß, kann diese Methode nur zur Untersuchung von Fulvinsäuren, nicht aber für Huminsäuren herangezogen werden.

In den Biowissenschaften sind komplexe Prozesse und Strukturen, meist mit einer räumlich-zeitlichen Komponente, zu untersuchen. Dadurch entsteht ein großer Bedarf an komplementären Methoden, die Abhängigkeiten in den Beobachtungen berücksichtigen. Nahezu jede physikalische, chemische und biologische Methode findet in der modernen Huminstoffforschung Anwendung, die jedoch häufig widersprüchliche Aussagen liefern. Auch eine Kombination dieser Techniken hat bis heute nur ein eingeschränktes Bild über die Struktur dieser natürlichen Materialien erbracht. Für strukturelle Fragestellungen spielt die NMR-Spektroskopie eine herausragende Rolle, die sowohl für die Untersuchung des Huminstoffgerüsts als auch die mit dem Gerüst verknüpften funktionellen Gruppen eingesetzt wird. Die eindimensionale NMR-Spektroskopie hat wesentliche Beiträge zur strukturellen Charakterisierung der Huminstoffe geleistet. Ein neueres Forschungsgebiet ist die zweidimensionale NMR-Spektroskopie an natürlichen und derivatisierten Huminstoffen. Es werden damit detailliertere Aussagen über die Gerüststruktur und die austauschenden Protonen verfügbar.

Einen Schwerpunkt der NMR-spektroskopischen Untersuchungen bildet die Quantifizierung von Protonen- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren durch Zuordnung von definierten Integrationsbereichen zu Partialstrukturen. Diese Abgrenzungen der Verschiebungsbereiche spiegeln jedoch nicht die tatsächlichen Grenzen der chemischen Verschiebung unterschiedlicher Strukturelemente wider, da die Resonanzen der verschiedenen Partialstrukturen erheblich überlappen. Intensive Untersuchungen der Huminstoff-Funktionalitäten mit Hilfe der eindimensionalen NMR-Spektroskopie haben zu einer Abschätzung der Strukturelemente  $\text{COOH}$ ,  $\text{C}_{ar}\text{-OH}$  und  $\text{C}_{alk}\text{-OH}$  geführt (Kapitel 5). Protonenspektren von Huminstoffen in verschiedenen Lösungsmitteln enthalten Informationen über austauschbare und nicht-austauschbare Protonen. Eine Kombination von Methylierung und Trimethylsilylierung wird eingesetzt, um

aus eindimensionalen  $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektren carboxylische, phenolische und alkoholische Funktionen zu bestimmen. Eine darüberhinausgehende Differenzierung ist aufgrund der starken Überlappung der Verschiebungsbereiche unterschiedlicher Strukturelemente (beispielsweise die Unterscheidung von aromatischen und aliphatischen Carbonsäuren) in eindimensionalen NMR-Spektren nicht möglich. Zweidimensionale NMR-Spektren, die Informationen über funktionelle Gruppen enthalten, wurden bisher noch nicht eingesetzt.

Erst der Einsatz zweidimensionaler Aufnahmeverfahren ermöglicht durch die Einführung einer zweiten Frequenzvariablen detaillierte Unterscheidung sich ansonsten überlagernder Strukturinformationen. Das Arbeitsziel ist eine präzisere strukturchemische Beschreibung der chemischen Umgebung von Sauerstoff durch Anwendung moderner NMR-spektroskopischer Techniken auf natürliche und chemisch derivatisierte Huminstoffe als Grundlage für ein vertieftes Verständnis ihres physikochemischen Verhalten und ihrer Reaktivität sowie ihres ökologischen Wirkungsspektrums.

Die Einführung NMR-aktiver Marker stellt zusätzliche analytische Möglichkeiten zur Verfügung. Einzelresonanzen in Heteroatomkern-NMR-Spektren indizieren vollständige funktionelle Gruppen und sind daher, bei häufig erweitertem verfügbarem Verschiebungsbereich, deutlich vereinfacht. Günstige Relaxationseigenschaften ermöglichen die Durchführung von ein- und zweidimensionalen NMR-Experimenten.

Die chemische Derivatisierung von Huminstoffen substituiert austauschende azide Protonen (z.B. aliphatische, aromatische und carboxylische OH-Gruppen) mit polaren Substituenten und synthetisiert Materialien, die in organischen Lösungsmitteln löslich sind. Charakteristikum einer geeigneten Derivatisierungsreaktion für Huminstoffe ist ein quantitativer Reaktionsverlauf ohne Spaltungsreaktionen als Voraussetzung für eine eindeutige Korrelation zwischen natürlichem Ausgangsmaterial und Produkt.

Geeignete NMR-Techniken stammen u.a. aus der Protein- und Ligninchemie, die an die besonderen Eigenschaften der Huminstoffe angepaßt werden. Grundlage für eine detaillierte strukturchemische Beschreibung der Sauerstofffunktionalität in Huminstoffen bildet die Identifizierung und Quantifizierung, sowie die strukturelle Zuordnung von austauschenden Protonen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die aziden Protonen mittels verschiedener Techniken qualitativ und quantitativ beschrieben und die Daten unterschiedlicher Huminstoffe miteinander verglichen. Zu den Verfahren auf diesem Gebiet gehören sowohl eindimensionale als auch zweidimensionale NMR-Experimente. Insbesondere wurden zweidimensionale NMR-Experimente in Kombination mit einer Derivatisierungsreaktion eingesetzt, um durch eine weitere NMR-Variable (heteronuklear korrelierte Spektroskopie) eine bessere Differenzierung der aziden Protonen zu erreichen. Einen weiteren Schwerpunkt für eine direkte Bestimmung der chemischen Umgebung des Sauerstoffs in Huminstoffen stellte die  $^{17}\text{O}$ -



NMR-Spektroskopie dar.

Es wurden Verfahren zur Abschätzung der Substanzeigenschaften entwickelt und konventionellen, literaturbekannten Verfahren gegenübergestellt. Fragen wie die Übereinstimmung der ermittelten Werte unterschiedlicher Analyseverfahren wurden dabei speziell untersucht. Die entsprechenden Techniken wurden hinsichtlich ihrer Eignung als Analysemethoden für huminstoffspezifische Fragestellungen analysiert.

Aufgrund der geringen Unterschiede der NMR-Spektren durch die Vielzahl sich überlagernder Signale und den damit verbundenen Schwierigkeiten bei der Interpretation ergab sich die Notwendigkeit, eine weiterführende Prozessierung der Spektren zur genaueren Untersuchung zu entwickeln und somit die Aussagekraft der Spektren zu verbessern.

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse sind eine wesentliche Voraussetzung für ein verbessertes Verständnis der ökologischen Wirkungsmechanismen und der Reaktivität der Huminstoffe mit Metallionen, Mineralien und organischen Verbindungen. Eine sorgfältige Bewertung ist in allen Teilbereichen von der Probenvorbereitung, Wahl der NMR-Experimente, Wahl der Aufnahme- und Prozessierungsparameter und Entwicklung weiterverarbeitender Verfahren bis hin zur Ergebnisinterpretation im Hinblick auf die Heterogenität und Komplexität des Systems "Huminstoff" erforderlich.

## Kapitel 2

# Die Suche nach der Struktur von Huminstoffen

Huminstoffe (HS) umfassen eine allgemeine Klasse biogener, refraktärer, gelb-schwarzer organischer Substanzen, die in allen terrestrischen und aquatischen Umgebungen auftreten [4]. Die Bedeutung dieser Stoffklasse leitet sich davon ab, daß sie den überwiegenden Teil des gesamten organischen Kohlenstoffreservoirs in terrestrischen wie aquatischen Bereichen beinhaltet und damit in zahlreiche ökologische Prozesse eingebunden ist. Aus der für das Leben essentiellen Depotfunktion leitet sich ein grundsätzliches Interesse an der Struktur und Funktionalität dieser Substanzklasse sowie an ihrer Bedeutung für die Ökosysteme ab. Darüber hinaus sind die HS im Bereich der Trinkwasserversorgung und Abwasserbehandlung wegen der Vehikelfunktion für Schadstoffe und als Präkursoren für toxisch relevante Substanzen technologisch bedeutsam. Die Wechselwirkung mit Schwermetallen und Xenobiotika, wie z.B. Pestiziden, sind für Transportvorgänge in Gewässern und aus umweltschutztechnischen Aspekten besonders wichtig [78]. Dieser großen Relevanz steht ein noch lückenhaftes Verständnis der Struktur und davon abgeleitet der Reaktionsmechanismen gegenüber [79]. Mehrere Arbeiten weisen darauf hin, daß die aufwendigen Versuche zur exakten Aufklärung der totalen Molekularstruktur nicht wesentlich weiterführen. Vielmehr scheint der Schlüssel zum Verständnis des ökosystemaren Verhaltens dieser Substanzen in den physikalischen, chemischen und biologischen Funktionalitäten zu liegen, die den einzelnen Strukturbereichen zukommen.

Die Heterogenität und Komplexität von HS erfordert eine Betrachtungsweise, die weniger auf klassische Molekülstrukturen als vielmehr auf Funktionalitäten ausgerichtet ist. HS gehören nicht einer einzigen chemischen Klasse an und können daher nicht als eindeutiger struktureller Ausdruck beschrieben werden. Bei der Genese spielen Lignine, Peptide, Polysaccharide und Lipide eine bedeutende Rolle. Da die Zusammensetzung von HS, die von den biologischen und chemischen Bedingungen während ihres Entstehens abhängt, sehr he-

terogen ist, müssen HS operationell definiert werden. Die Wasserlöslichkeit ist wegen ihrer Abhängigkeit von wichtigen chemischen Eigenschaften wie dem Anteil azider funktioneller Gruppen, Molekülgröße, Aromatizität ein effektives Kriterium für eine Einteilung von HS-Fraktionen. Traditionell werden drei Fraktionen von Humus nach der Methode ihrer Isolation definiert: Huminsäuren (HA, löslich in verdünnter wäßriger Lauge, unlöslich in verdünnten Säuren), Fulvinsäuren (FA, löslich in Wasser bei jedem pH-Wert) und Humin (unlöslich in Wasser bei jedem pH-Wert).

Ebenfalls ist die Unterscheidung zwischen aquatischen Huminstoffen und "Nichthuminstoffen" meist sehr subjektiv. Im allgemeinen wird die Sorption an Kunstharzen herangezogen, doch sagen solche Abgrenzungen in der Regel wenig über die ökologischen und chemischen Eigenschaften aus. Es ist daher auch fraglich, ob solche Unterscheidungen im Rahmen einer ökologischen Bewertung noch eine Rolle spielen [73].

HS können Probleme im Trinkwasserbereich verursachen. Obwohl die Substanzen selbst nicht gesundheitsschädlich sind, können sie anthropogene Chemikalien komplexieren und Schwermetalle durch Komplexbildung und Ionenaustausch lösen. Einige mutagene organische Chemikalien wurden in den konzentrierten Extrakten von chloriertem natürlichem Wasser identifiziert, die durch die Anwesenheit von HS gebildet worden sind. Daher ist es angemessen, HS vor der Chlorierung von Trinkwasser zu entfernen [104].

Obwohl exakte Strukturformeln nicht ermittelt werden können, können Abschätzungen über die Zusammensetzung und Menge der verschiedenen funktionellen Gruppen in HS-Mischungen durchgeführt werden. Solche Informationen sind wichtig für die Vorhersage von Reaktionen der HS. Die Methoden zur Untersuchung funktioneller Gruppen werden in Kapitel 2.1 vorgestellt.

Wegen der Komplexität der HS-Materialien ergeben sich Schwierigkeiten bei der Charakterisierung von HS, wie beispielsweise die Bestimmung carboxylischer und phenolischer Gruppen der häufig angewendeten titrimetrischen Prozeduren, bei denen die Kriterien für die verschiedenen Endpunkte subjektiv bestimmt werden. Aus diesen Gründen kann die Zusammensetzung der funktionellen Gruppen von HS nicht mit derselben Genauigkeit wie die Elementarzusammensetzung bestimmt werden.

## 2.1 Strukturelemente und ihre Bestimmungen

Die Suche nach der Struktur von HS ist eng verknüpft mit dem Fortschritt des Verständnisses über Zusammensetzung und Struktur von häufig vorkommenden Biopolymeren, wie Proteinen und Polysacchariden. Diese Suche wird durch die Komplexität der Strukturen behindert und dadurch, daß selbst nach Auftrennung in Fraktionen eine große Vielzahl von Molekülen in jeder kleineren Einheit von HS vorhanden ist. In der Zeit vor der Einführung

der Intensivlandwirtschaft gab es keine Notwendigkeit, das Ausmaß oder die Mechanismen, mit denen HS mit anderen Bodenkonstituenten wechselwirken, zu verstehen. Heutzutage erfordern die verheerenden Wirkungen der Erosion, der kontinuierlichen Kultivierung und der Zugabe von Chemikalien zu Böden und Gewässern, Kenntnis über die Bedeutung und den Einfluß von HS in Böden und Gewässern.

Für die Charakterisierung der HS bieten sich chemische, physikalische sowie biologische Methoden an.

### **2.1.1 Strukturelle Untersuchungen von Huminstoffen: ein Problem von Mischungen**

HS-Makromoleküle, die durch eine Vielfalt an Vorläufern und einem breiten Spektrum von Umgebungen entstanden sind, stellen hochkomplexe Mischungen von Molekülen dar. Diese Substanzen widersetzen sich allen Bemühungen, sie in reine Fraktionen zu separieren. Darin begründet sich die größte Schwierigkeit der Untersuchungen über HS. Alle physikalischen und chemischen Werkzeuge, die zur Untersuchung herangezogen werden, liefern unabhängig von der Komplexität der experimentellen Daten immer nur einen statistischen Mittelwert. Die Interpretation dieser Daten ist wegen der extremen Heterogenität und Komplexität der HS sehr beschränkt. Es muß bei der Messung und Interpretation von Daten berücksichtigt werden, daß verschiedene HS-Moleküle unterschiedliche Charakteristika in variierendem Umfang zu den Eigenschaften und Verhalten der Gesamtheit beisteuern.

Die Anwendungen verschiedener chemischer und physikalischer Prozeduren für die Untersuchung von HS liefern Informationen über einige strukturelle Komponenten, funktionelle Gruppen, Bindungen, spektroskopisch aktive Komponenten, Molekülgröße, etc., aber es ist nicht möglich, diese Komponenten zu einem spezifischen Molekül zusammensetzen oder seine Position in diesem Molekül zu bestimmen [102].

### **2.1.2 Informationen aus Abbaureaktionen**

Das Gerüst von Proteinen, Polysacchariden, Nucleinsäuren und anderen polymeren Naturstoffen ist eindeutig definiert, weil Aminosäuren, Zucker, Nucleotide und andere Komponenten der unterschiedlichen Makromoleküle an spezifischen Bindungen während der Hydrolyse gespalten werden. Bei HS sind die Positionen der Spaltung der nicht-hydrolysierbaren Anteile der Moleküle abhängig von der Energie, die von verschiedenen Abbaureagenzien und Prozeduren aufgewendet wird. Das strukturelle Grundgerüst, das durch eine Abbaureaktion ermittelt wird, kann von den Strukturen, die durch andere Abbaureaktionen ermittelt werden völlig verschieden sein. Komplikationen ergeben sich durch die Formation von sekundären Makromolekülen, die während der Hydrolyse in Säure oder Base durch aktive

Komponenten gebildet werden. Die durch Kondensationsreaktionen gebildeten braunen, makromolekularen HS-ähnlichen Substanzen werden gemeinsam mit dem HS-Rückstand untersucht und verfälschen dadurch die Ergebnisse.

Hydrolytische Spaltreaktionen werden vor allem zur Bestimmung von Monosacchariden, die aus Oligosacchariden entstehen, eingesetzt. Die Hydrolyse, die durch Säure katalysiert wird, bietet die Möglichkeit, labil assoziierte Einheiten aus dem Makromolekül abzutrennen und zu bestimmen. Die basisch katalysierte Hydrolyse spielt eine untergeordnete Rolle, da es zu undefinierten Abbaureaktionen kommen kann. Neben den Monosacchariden können durch die saure Hydrolyse weitere einfache Moleküle wie beispielsweise Aminosäuren aus Peptiden und Carbonsäuren aus Estern und Amiden gebildet werden [1].

Durch oxidative, reduktive oder thermische Abbaureaktionen erhält man ebenfalls Fragmente, die Rückschlüsse auf die Ausgangssubstanzen erlauben. So lassen sich ligninbürtige Bestandteile durch CuO-Oxidation mit anschließender Identifizierung der Phenolcarbonsäuren und phenolische Aldehyde nachweisen.

Der thermische Abbau durch Pyrolyse erlaubt es, Einzelbausteine zu erfassen.

- **Informationen aus Hydrolysereaktionen**

Die Säurehydrolyse wird zur Entfernung von labilen Kohlenhydraten und Peptidstrukturen, die mit HS assoziiert sind, eingesetzt. Eine Hydrolyse in siedender 6 M HCl ergibt 0.5–50 % Massenverlust der HS als CO<sub>2</sub>, Zucker, Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen, phenolische Komponenten und aliphatische Carbonsäuren. Die Identifikation der säure-labilen Komponenten von HS, speziell Aminosäuren und Zucker, lassen keine Rückschlüsse auf die Gerüststruktur der HS zu, aber sie ermöglichen einige Schlußfolgerungen über das Ausmaß, in dem Substanzen, die unter biologischer Kontrolle synthetisiert worden sind, wie Saccharide, Peptide, Proteine und Nucleinsäuren, an der Zusammensetzung der HS-Makromoleküle beteiligt waren. Die aliphatischen Carbonsäuren, die nach der sauren Hydrolyse identifiziert werden, können aus Spaltungen von Esterbindungen hervorgehen [109] [150].

- **Informationen aus oxidativen Zersetzungsreaktionen**

Klassische oxidative Abbaureaktionen sind Reaktionen mit Permanganat und Kupfer(II)oxid in alkalischer Lösung. Wie beim Abbau von HS-Materialien durch Hydrolyse ist es auch bei oxidativen Prozessen schwierig abzuschätzen, welcher Anteil der Abbauprodukte dem HS-Grundgerüst zugeordnet werden können, und welche Abbauprodukte in der HS-Lösung zu sekundären Produkten weiterreagieren. Alle oxidativen Abbaureaktionen liefern Hinweise auf HS-Konstituenten, die zu aromatischen Polycarbonsäuren und Hydroxypolycarbonsäuren und aliphatischen Di- und Polycar-

bonsäuren oxidieren. Die Abbauprodukte lassen weiterhin Schlüsse auf ungesättigte aliphatische Kohlenwasserstoffanteile zu [53] [97].

- **Informationen aus reduktiven Zersetzungsreaktionen**

Obwohl einige Abbauprodukte bestimmt worden sind, liefert die Methode kaum Hinweise auf HS-Konstituenten und ist auch als "fingerprint" Methode nicht geeignet [183].

- **Informationen aus thermischen Zersetzungsreaktionen**

Die Pyrolyseprodukte von Kohlenhydraten, Polypeptiden und Proteinen, Lipiden, Ligninen und Polycarbonsäuren sind gut bekannt und wurden in den Pyrolysaten von Böden und HS identifiziert. Alle Pyrolysate lassen auf Ursprünge in Polypeptiden, Polysacchariden, Ligninen und mikrobiell synthetisierten Polyphenolen und kleineren Mengen an Lipiden und Polycarbonsäuren schließen. Die durch Pyrolyse ermittelten Strukturelemente von HS sind gesättigte und ungesättigte aliphatische Ketten mit OH-, CO- und COOH-Substituenten, die an Lignin, Polysaccharide und Polypeptide gebunden sind [35] [102].

Die chemischen Abbau- und Zersetzungsprozeduren, die für Untersuchungen der Gerüststruktur von HS angewandt werden, involvieren üblicherweise Hydrolyse-, Oxidations-, Reduktions- oder Pyrolyseprozesse. Pyrolytische Untersuchungen haben beachtliche Unterschiede zwischen HS unterschiedlicher Umgebungen gezeigt.

Die Hydrolyse in 6 molarer Salzsäure findet häufig Anwendung als eine Vorbehandlung zur Entfernung von Zucker und Aminosäuren vor der eigentlichen Abbaureaktion des HS-Gerüsts. Obwohl 0.5–50 % der HS-Masse durch Hydrolysebehandlung gelöst wird oder als CO<sub>2</sub> verloren geht, ist nur ein kleiner Teil als HS-Komponente identifiziert. Die Massenverluste basieren nicht nur auf dem Abbau von Kohlenhydraten und Aminosäuren, die nur maximal 20 % der HS-Masse betragen. Ein beträchtlicher Anteil der hydrolysierbaren Substanzen ist weitgehend unbekannt.

Es ist offensichtlich, daß oxidative Prozesse während der Hydrolysereaktion durch Base, insbesondere durch NaOH stattfinden. Eine Vielzahl der identifizierten Abbauprodukte werden auch in den Reaktionsprodukten von alkalischer Permanganat- oder Cu(II)oxidlösungen gefunden.

Die Formation von huminähnlichen Substanzen der degradativen Prozesse sind Artefakte der Reaktionen, die durch Decarboxylierung der HS-Makromoleküle oder durch sekundäre Kondensationsreaktionen zwischen bereits abgespaltenen, kleineren Molekülen entstehen.

Die identifizierten Komponenten der weitverbreiteten oxidativen Abbaureaktionen liefern Hinweise auf die Anwesenheit von substituierten aromatischen Strukturen in HS. Die aro-

matischen Strukturen festigen die Ergebnisse von NMR-Untersuchungen, daß die Mehrheit der aromatischen Komponenten in den Makromolekülen 3–5 Substituenten besitzen.

### 2.1.3 Informationen aus spektroskopischen Methoden

Der Einsatz spektroskopischer Methoden der instrumentellen Analytik ist wie alle anderen Untersuchungsmethoden in der HS-Forschung stark begrenzt. Der Grund dafür ist, daß HS eine komplizierte Mischung aus nicht-definierten Molekülen sind und ihre Spektren die Summe der Antworten vieler verschiedener Spezies sind. In manchen Fällen trägt nur ein kleiner Teil der Gesamtheit an Molekülen zum gemessenen Spektrum bei. Die Anwendungsmöglichkeiten und Grenzen von Infrarot-, UV/VIS-, Fluoreszenz- und Elektronenspinresonanzspektroskopie für die Untersuchung von HS werden im folgenden erläutert. Die NMR-Technik wird meist als die Methode angesehen, die detailliertere Informationen über HS liefert als alle anderen Methoden [31] [49] [66] [80] [102].

- **NMR-Spektroskopie**

Die NMR-Spektroskopie ist die bedeutendste und weitverbreitetste Methode zum Nachweis von Unterschieden und Gemeinsamkeiten in der Zusammensetzung von HS verschiedener Böden, Flüsse, Seen und marinen Umgebungen (s. Kapitel 5). Eine detaillierte Erfassung des Bindungszustandes von Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphor wird durch  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -,  $^{15}\text{N}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie sowie in zunehmendem Maß auch durch verschiedene 2D NMR-Experimente ermöglicht.

- **IR-Spektroskopie**

Obwohl die IR-Spektroskopie eine geeignete Methode zur Untersuchung von HS-Funktionalitäten ist, ist ihre Anwendbarkeit trotzdem stark limitiert. Sie liefert eine fingerprint-artige Strukturinformation. Die meisten Schlüsselfrequenzen werden von breiten Banden, wie sie für Wasserstoffbrückenbindungen typisch sind, geprägt [2]. Die Interkombinationsbanden erlauben aufgrund der komplexen Moleküle keine weitergehende Interpretation. Es gibt jedoch typische Frequenzbereiche, die eine Unterscheidung hinsichtlich Ursprung und verschiedener HS-Fractionen ermöglichen. Eine Quantifizierung der einzelnen funktionellen Gruppen ist nicht möglich.

IR-Spektren zeigen viele für molekulare Strukturen typische Absorptionsbanden. Leider ist die Information, die die IR-Spektroskopie liefert im Vergleich zur NMR-Spektroskopie mehr von qualitativer als quantitativer Natur, da die Intensität des Übergangs proportional dem Quadrat des Übergangsdipolmoments der involvierten Schwingung ist. Die verschiedenen Valenz- und Deformationsschwingungen, die IR-Energie absorbieren, besitzen einen weiten Bereich von molaren Absorptionskoeffizi-

enten, die die Technik der Peakintegration als eine Messung der relativen Anteile der verschiedenen Gruppen stark limitieren. Eine weitere Schwierigkeit für die Quantifizierung von IR-Spektren ist die große Überlappung breiter Banden von der großen Anzahl der IR-aktiven Gruppen, wie sie in HS vorhanden sind. Trotz der Komplexität der HS beinhalten ihre IR-Spektren einige charakteristische Banden mit eindeutiger Zuordnung [113].

Die wichtigsten Absorptionsbanden sind in den Bereichen bei  $3300\text{ cm}^{-1}$  (O–H-Valenzschwingung),  $2900\text{ cm}^{-1}$  (aliphatische C–O-Valenzschwingung),  $1720\text{ cm}^{-1}$  (C=O-Valenzschwingungen von Säuren, Estern, Ketonen, Aldehyden und Chino-*nen*),  $1610\text{ cm}^{-1}$  (olefinische und aromatische C=C-Valenzschwingung),  $1400\text{ cm}^{-1}$  (OH-Deformationsschwingung, C–O-Valenzschwingung von Phenolen und C–H Deformationsschwingung von  $\text{CH}_2$  und  $\text{CH}_3$ ),  $1250\text{ cm}^{-1}$  (C–O Valenzschwingung und OH-Deformation von COOH). Uneinigkeit besteht in der Zuordnung der Banden bei  $1660\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$  [182].

- **UV-VIS-Spektroskopie**

Aus dem mit zunehmenden Wellenlängen monoton abnehmendem Extinktionsverlauf der UV/VIS-Spektroskopie wird der klassische  $E_4/E_6$ -Quotient aus der Absorption bei  $465\text{ nm}$  und  $665\text{ nm}$  berechnet, der eine negative Korrelation zur Molekülgröße zeigt und mit dem Grad der Kondensation aromatischer Konstituenten korreliert ist. Die Beiträge zur Aufklärung der Struktur von HS sind jedoch relativ gering [5] [31].

- **Fluoreszenz-Spektroskopie**

Die Fluoreszenz-Spektroskopie wird zur quantitativen Charakterisierung von Metallionenkomplexierung herangezogen [80], liefert jedoch wenig strukturelle Informationen.

- **ESR-Spektroskopie**

Die ESR-Spektroskopie ermöglicht Aussagen über freie Radikale in HS. Sie ist ein nützliches Werkzeug zur Untersuchung von Reaktionen, die mit freien Radikalen verbunden sind.

Die Information, die von allen spektroskopischen Methoden zur Strukturaufklärung beige-*tragen* wird, ist eher kompositionell als strukturell. Alle Daten bestätigen, daß FA aller Ursprünge nur wenige Methoxygruppen besitzen, wenig Phenole und weniger aromatisch sind als die HA desselben Ursprungs.

NMR-Daten zeigen, daß Boden-HS einen höheren aromatischen Anteil aufweisen als Substanzen von aquatischen Ursprüngen. Die aromatischen Ringe besitzen 3–5 Substituenten.



### 2.1.4 Informationen über die Molekülgröße

Die Kenntnis über molekulare Massen, Größen und die Gestalt von HS ist wichtig für das Verständnis der Rolle, die diese Substanzen in Böden und Gewässern spielen. Die Bestimmung dieser Eigenschaften ist wegen der irregulären, polydispersen Natur der HS sehr schwierig [103].

Generell sind die molaren Massen von aquatischen HS sehr viel kleiner als die von Böden. Die molekulare Größe von aquatischen HA ist etwa dreimal größer als die der korrespondierenden FA. Die Massen von aquatischen HS betragen mehrere Hundert bis mehrere Tausend u, die Massen der Boden-HS hingegen  $10^3 - 10^6$  u.

## 2.2 Methoden zur Analyse funktioneller Gruppen

Die meisten Methoden zur Bestimmung reaktiver Gruppen in HS basieren auf deren aziden Eigenschaften. Die Strukturparameter unterschiedlicher Strukturelemente überlappen wegen der komplexen Natur dieser Substanzen häufig und müssen daher vorsichtig interpretiert werden.

Die potentiometrischen Titrationskurven von HS in wäßriger Lösung werden in drei Bereiche eingeteilt: Im ersten Bereich dissoziieren Carboxylgruppen und im dritten Bereich phenolische Hydroxylgruppen. Zwischen diesen Bereichen finden Dissoziationen von Säuren und Phenolen statt, so daß dieser Bereich nicht eindeutig einer Funktionalität zugeordnet werden kann [182]. Da die Titrationskurven von HS streng monoton ansteigen, tritt bei der Interpretation das Problem auf, die Endpunkte zu ermitteln. Oft wird das Maximum der ersten Ableitung bei pH-Werten von 7.0–7.6 als Grenze zwischen carboxylischen und phenolischen Dissoziationen definiert.

HS werden als kolloidale Komplexe mit hoher Adsorptionskapazität oder schwach saure Polyelektrolyte verstanden, weil die Titrationskurven keine definierten Endpunkte aufzeigen. Einen großen Einfluß auf die potentiometrische Titration von HS hat die Art der Vorbehandlung, Extraktion und Reinigung der Substanzen.

Die Gesamtazidität, die Carboxylgruppen und phenolische Hydroxylgruppen umfaßt, kann durch die  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Methode erfaßt werden. Der Probe wird ein Überschuß an  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  zugesetzt und anschließend die überschüssige Base rücktitiert. Der wesentliche Vorteil dieser Methode besteht in der einfachen Durchführbarkeit [182].

Die  $\text{Ca}(\text{acetat})_2$ -Methode ermöglicht in ähnlicher Weise die Bestimmung von Carboxylgruppen. Die Rücktitration erfolgt mit  $\text{NaOH}$ -Lösung [182]. Bei dieser Methode ist zu berücksichtigen, daß neben den carboxylischen auch stark azide phenolische Gruppen erfaßt oder Carboxyle acetyliert werden.

## 2.3 Zusammenfassung: Was wir über die strukturelle ”Form“ von Huminstoffen wissen

Der Anteil an aromatischen Komponenten beträgt bis zu 25 %, die in Form von Einfachringen vorliegen. Einige Protonen der aromatischen Ringe sind durch Substituenten wie Methoxygruppen, Ether, Hydroxylgruppen, Carboxylgruppen oder aliphatische Kohlenwasserstoffketten ersetzt. Diese aromatischen Einheiten sind durch aromatische Etherstrukturelemente wie aliphatisch-aromatische Etherbindungen und durch aliphatische Kohlenwasserstoffketten miteinander verknüpft [103].

Der Hauptunterschied zwischen HA und FA besteht in der Molekülgröße. HA sind größer als FA, weniger hoch geladen, unpolarer, aromatischer und enthalten mehr phenolische Hydroxylgruppen. Die Moleküle aquatischer Substanzen sind kleiner als die der entsprechenden Bodensubstanzen und weniger aromatisch. Sie enthalten weniger assoziierte Zuckerbestandteile und weniger Aminosäuren. HA besitzen mit bis zu 20 % mehr Zucker- und Aminosäureanteile als FA.

Die hydrophoben Eigenschaften der HA können auf längerkettigen Kohlenwasserstoffstrukturen und auf Fettsäuren, die mit Phenolen oder anderen Hydroxylgruppen verestert sein können, basieren.

HA und FA enthalten dissoziierbare Gruppen, wobei die FA üblicherweise die höheren Ladungsdichten besitzen. Titrationsdaten belegen, daß die aziden Gruppen ein Kontinuum dissoziierbarer Protonen ergeben, die den Bereich von starken bis sehr schwachen Säuren abdecken. Carboxylgruppen leisten einen wesentlichen Beitrag zur Azidität von HS [103].

HS sind Mischungen, die nicht in diskrete Fraktionen geteilt werden können. Daher kann das klassische Konzept einer molekularen Formel nicht angewandt werden, sondern man kann sie als eine Art Lego-Spiel auffassen, das aus einer variablen Mischung bestimmter chemischer Blöcke besteht, deren Anteil von Ausgangsmaterial, Humifikationsbedingungen und -dauer und anorganische Bodenkonstituenten abhängen [174].

# Kapitel 3

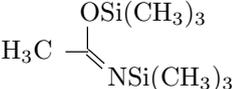
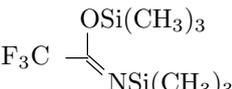
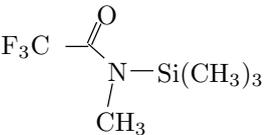
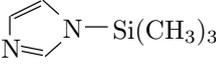
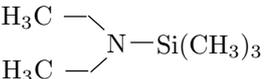
## Die Silylierung zur Markierung funktioneller Gruppen

Die Silylierung von aziden funktionellen Gruppen wie aromatischen und aliphatischen Hydroxyl- und Carboxylgruppen, Aminosäuren, Amide und Amine ist sowohl in der analytischen als auch präparativen organischen Chemie ein wichtiges Werkzeug. In der analytischen Chemie wird die Silylierung seit Ende der 50er Jahre in der Gaschromatographie und Massenspektroskopie als Derivatisierungsmethode für eine Vielzahl von Substanzen verwendet. Silylierte polare Substanzen besitzen eine geringere Polarität und somit eine größere Flüchtigkeit und größere thermische Stabilität. Viele Substanzen, die underivatisiert zu instabil und zu wenig flüchtig sind, können so mit GC-MS-Techniken analysiert werden. Die Bedeutung der Silylierung in der Gaschromatographie beruht auf der hohen Reaktionsgeschwindigkeit und Einfachheit der Derivatisierungsreaktion. In der präparativen organischen Chemie werden Trialkylsilylderivate als Schutzgruppen insbesondere für Hydroxylgruppen, aber auch Carboxylsäuren genutzt[74].

In der technischen Chemie findet die Silylierung für die Herstellung von Fasern und Folien Verwendung. Durch Silylierung von Hydroxylgruppen der Glasoberflächen werden unpolare Glasoberflächen erhalten. Die erste Silylierungsreaktion wurde 1944 mit TMCS in Pyridin zur Silylierung von Methanol und Ethanol durchgeführt. Einige Jahre später wurden mit demselben Reagenz Silylether von Zellulose und Silylester von Essigsäure synthetisiert [151]. Die Silylierungsreaktion wird durch folgendes Reaktionsschema beschrieben:



Häufig verwendete Substanzen sind:

TMCS Trimethylchlorosilan	$\text{Cl}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$
HMDS Hexamethyldisilazan	$(\text{H}_3\text{C})_3\text{Si}-\text{NH}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$
BSA N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid	
BSTFA N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid	
MSTFA N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid	
TMSIM 1-(Trimethylsilyl)imidazol	
TMSDEA N-Trimethylsilyldiethylamin	

### 3.1 Silylierungsreagenzien und Methoden

Die Vielfältigkeit an Substraten und GC-Säulen erfordert eine Vielzahl von Silylierungsreagenzien und -prozeduren. In [151] und [74] werden die wichtigsten Reagenzien und Reaktionsbedingungen ausführlich aufgelistet und anhand von Beispielen erläutert. Die Reaktionsdauer und -temperatur liegt abhängig von Substrat, Lösungsmittel und Silylierungsreagenz zwischen einigen Minuten bei Raumtemperatur und mehreren Stunden unter Rückfluß. In den meisten Fällen reicht eine Erwärmung auf 50-60 °C für 15-30 Minuten aus. Die am häufigsten verwendeten Lösungsmittel sind Pyridin und DMF, aber auch DMSO, Acetonitril und  $\text{CHCl}_3$ . Weniger Anwendung finden Aceton, Benzol, Ether, Formamide, Dioxan, Hexan, Cyclohexan, Ethylacetat, Methylenechlorid, Schwefelkohlenstoff, Tetrahydrofuran und Toluol. Die Reaktivität, Selektivität und Reaktionsgeschwindigkeit einiger Silylreagenzien kann durch Kombination verschiedener Silylierungsreagenzien oder Katalysatoren erhöht werden. Manche Mischungen ermöglichen die gezielte Silylierung von primären Hydroxylfunktionen, während andere Kombinationen aus Reagenzien, Katalysatoren und Lösungsmitteln auch mit sterisch anspruchsvolleren Hydroxylgruppen Silylether bilden. Substanzen, die die Reaktivität erhöhen sind bei Reaktionen mit TMCS Basen wie Pyridin und Triethylamin. Reagenzien auf Amin- und Amid-Basis wie HMDS und BSA können durch TMCS oder Säuren katalysiert werden.

Die Reaktivität von Silylrezeptoren nimmt in folgender Reihenfolge ab:

$\text{ROH} > \text{ArOH} > \text{RCOOH} > \text{RNH}_2 > \text{RSH}$

Die am häufigsten verwendeten Methoden, ihre Anwendungen und Eigenschaften können in folgende Gruppen mit steigender Reaktivität eingeordnet werden:

- **auf TMCS basierende Methoden**

- Wird TMCS ohne zusätzliche Base verwendet, muß das Nebenprodukt HCl durch Kochen der Reaktionslösung entfernt werden.
- Zum Abfangen des bei der Reaktion entstehenden HCl können Basen wie z.B.  $\text{NH}_3$ , Pyridin oder Triethylamin zugegeben werden.
- Es wird meist das Natrium-Salz der zu silylierenden Substanz verwendet.
- TMBrS und TMIS besitzen eine größere Reaktivität, aber eine geringere Selektivität. Häufig treten Nebenreaktionen wie z.B. die Bildung von Silylenolether aus Ketonen auf. TMIS spaltet Ester, Ether und Ketale.

- **Methoden, die auf HMDS basieren**

- Wird HMDS allein verwendet, muß das Nebenprodukt  $\text{NH}_3$  durch Kochen entfernt werden, damit die Reaktion vollständig verläuft.
- Die Reaktivität kann durch Zugabe von TMCS, sauren Katalysatoren oder einer Kombination von TMCS oder einem Katalysator und einem geeignetem Lösungsmittel (beispielsweise Pyridin) gesteigert werden.

- **Methoden mit Silylaminen als Silyldonor**

- Die Reaktivität von TMSDEA kann mit sauren Katalysatoren erhöht werden.

- **Methoden mit Silylamiden als Silyldonor**

- BSA, BSTFA oder MSTFA werden allein oder in Kombination mit geeigneten Lösungsmitteln verwendet.
- Die Reaktivität von BSTFA entspricht der von BSA.
- eine Kombination mit TMCS kann die Reaktivität und Selektivität der Silylamide erhöhen.
- Eine Silylierungsmischung aus TMSIM, BSA (oder BSTFA) und TMCS im Verhältnis 3 : 3 : 2 reagiert selbst mit sterisch anspruchsvollen und tertiären Hydroxylgruppen.
- Katalysatoren, wie beispielsweise Säuren, begünstigen die Reaktivität.

Tabelle 3.1: Silylierungsreagenzien für sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen.

aliphatische Hydroxylgruppen:	BSTFA, BSTFA/TMCS, TMSIM, TMSDEA
aromatische Hydroxylgruppen:	BSA, BSTFA, BSTFA/TMCS, TMSIM, MST-FA/TMCS, HMDS/Katalysator
Carboxylgruppen:	BSA, BSTFA, TMSIM, TMSDEA, HMDS

In Tabelle 3.1 sind einige der für die Silylierung von sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen geeigneten Reagenzien zusammengestellt.

Um aus der großen Anzahl der Silylierungsmethoden eine für die Silylierung von Huminstoffen geeignete Auswahl zu treffen, ist es wichtig, die Eigenschaften der Silylierungsreagenzien zu kennen. Für Huminstoffe, die aus einer Vielzahl von funktionellen Gruppen bestehen, und deren strukturelle Einheiten noch größtenteils unbekannt sind, müssen Reagenzien und Reaktionsbedingungen gefunden werden, die quantitativ alle aziden Protonen durch eine Trimethylsilylgruppe substituieren und dabei das Huminstoffgrundgerüst nicht wesentlich verändern. Für die Charakterisierung von sauerstoffhaltigen Gruppen wird eine Methode benötigt, die quantitativ die unterschiedlichen aliphatischen und aromatischen Hydroxylgruppen und Carboxylgruppen silyliert, aber keine Nebenreaktionen des Huminstoffgerüsts wie Etherspaltung und Enolbildung verursacht.

In der Tabelle 3.2 werden die Eigenschaften der für komplexe Moleküle im medizinischen und biologischen Bereich verwendeten Reaktionsmischungen näher erläutert [65] [151] [152] [160] [74].

## 3.2 Nebenreaktionen der Silylierungsmethoden

Um das Huminstoff-Molekülgerüst bei der Silylierungsreaktion weitgehend zu erhalten, sollen Reaktionsbedingungen gefunden werden, die keine Nebenreaktionen verursachen. Die meisten literaturbekannten Nebenreaktionen bei der Silylierung azider funktioneller Gruppen werden im Zusammenhang mit Halogentrimethylsilanen erwähnt. Häufig finden Reaktionen mit dem Lösungsmittel statt, die reaktive Intermediate bilden und Nebenreaktionen verursachen. Einige Beispiele:

- TMCS bildet Addukte mit Pyridin, DMF und DMSO [19] [32].
- TMCS und DMSO bilden Chlorodimethylsulfonium-Intermediate, die Ketone in  $\alpha$ -Position halogenieren oder Methansulfenylchlorid an Olefine knüpfen können [20] [21] [23] [24] [22] [92] [91]. In der Literatur werden des weiteren Reaktionen mit Oximen [92], Semicarbazonen [92], Pyrrolen[22], Styrolen [24] und Alkenen [23] beschrieben.

Wird anstatt TMCS TMBrS oder TMIS verwendet, werden meist größere Mengen des Nebenproduktes erhalten. TMBrS und TMIS besitzen zwar ein größeres Silylierungspotential, der Anteil an Nebenreaktionen nimmt jedoch ebenfalls zu.

- Sekundäre Amine werden in Gegenwart von Imidazol mit TMCS in DMF N-formyliert.
- TMBrS spaltet Lignin-Modellsubstanzen [157], verursacht eine Ringöffnung von Lactonen, bildet mit Ketonen  $\beta$ -Halogenketone und reduziert Sulfoxide zu Sulfiden [164].
- TMCS mit Triethylamin als Base und DMF als Lösungsmittel bildet aus enolisierbaren Aldehyden und Ketonen Enoxysilan [46] [56].

Die Bildung von Silylethern aus enolisierbaren Ketonen spielt auch bei Silylierungsmischungen, die TMCS enthalten, eine Rolle. Beispiele zu Nebenreaktionen von Reaktionsmischungen:

- In [48] wird die Abhängigkeit der Ausbeute von Enol-TMS-Ethern von zu silylierender Substanz, Silylierungsreagenz, Lösungsmittel, Katalysator, Reaktionszeit und Temperatur beschrieben.
- In [64] werden Reaktionen von Hydroxysteroiden mit MSTFA und verschiedenen Trimethylhalogensilanen ausführlich erläutert. Die Enolisierungsgeschwindigkeit ist abhängig von Lösungsmittel, Katalysator, Silylierungsreagenz und der Struktur des Steroids. TMCS in geringer Konzentration und mit nur geringer Wärmezufuhr überführt nur die Hydroxylfunktionen in Trimethylsilylether. Es werden nur geringe Mengen des enolisierten Produktes gefunden. Mit TMBrS und TMIS findet eine deutlich schnellere Reaktion statt.
- Die Reaktionsmischung BSA/TMCS öffnet einen ungesättigten Lactonring [164].
- BSTFA/TMCS mit DMF als Lösungsmittel überführt sekundäre Amine in  $=N-CH=N-CO-CF_3$ .

Um eine vollständige Substitution von aziden Protonen in Huminstoffen durch die Trimethylsilylgruppe ohne Veränderung des HS-Grundgerüsts zu gewährleisten, muß ein Silylierungsreagenz mit hohem Silylierungspotential bei kurzer Reaktionsdauer und niedriger Temperatur gewählt werden. Nebenreaktionen des Silylierungsreagenz, Reaktionen des Huminstoffs mit dem Lösungsmittel oder Veränderung des Huminstoffgerüsts durch wenig schonende Reaktionsbedingungen sollen vermieden werden. Um Nebenreaktionen zu

vermeiden, muß auf Reaktionsmischungen mit TMCS verzichtet werden. Unter diesen Gesichtspunkten sind BSA, BSTFA und MSTFA geeignete Silylierungsreagenzien für ein schonendes Verfahren. Als Lösungsmittel sind Pyridin, DMF und DMSO gut geeignet, da die zu untersuchenden Huminstoffe darin weitgehend löslich sind.

Um gut interpretierbare Spektren zu erhalten, muß bei der Auswahl der Silylierungsreagenzien weiterhin berücksichtigt werden, daß die bei der Reaktion entstehenden Nebenprodukte der Reagenzien möglichst keine Signale erzeugen, die sich mit den Signalen des silylierten Huminstoffs überlagern. Unter diesen Gesichtspunkten ist BSTFA am geeignetsten. Das Nebenprodukt Trifluoroacetamid enthält außer Protonen, die am Stickstoff gebunden sind keine weiteren Protonen. Das Lösungsmittel sollte Huminstoffe vollständig lösen. Für Huminsäuren eignet sich DMSO und DMF, für Fulvinsäuren kann auch Pyridin verwendet werden.

Die in diesem Kapitel erläuterten Silylierungsmethoden und deren Einsatzmöglichkeit für die Silylierung von Huminstoffen werden in Kapitel 6.1 anhand von Modellverbindungen und Huminstoffen überprüft und die Synthesebedingungen optimiert.



Tabelle 3.2: Eigenschaften und Anwendung der Silylierung komplexer Moleküle

Reagenz	Eigenschaften	Anwendungsbeispiele
TMCS	TMCS allein ist ein schwaches Silylierungsreagenz und wird daher meist in Anwesenheit einer Base, die als HCl-Akzeptor dient (Pyridin, NH <sub>3</sub> , tertiäres Amin), oder in Kombination mit anderen Silyldonoren für viele funktionelle Gruppen verwendet. Während der Reaktion können unerwünschte Nebenreaktionen wie z.B. die Enolbildung von ungeschützten Ketonen auftreten. Ersetzt man TMCS durch TMBrS oder TMIS, treten außer der verstärkten Enolbildung von Aldehyden und Ketonen andere Nebenreaktionen auf. Beispielsweise kann eine Öffnung eines Lactonringes [164] oder die Reduktion von Sulfoxiden zu Sulfiden auftreten.	Zellulose [180]
HMDS	Obwohl HMDS im Vergleich zu anderen Silylierungsreagenzien kein starker Trimethylsilyldonor ist, wird es häufig aufgrund vieler Vorteile bevorzugt. Der Siedepunkt ist mit 124-127°C sehr niedrig, das einzige Nebenprodukt NH <sub>3</sub> kann während der Reaktion leicht durch Erhitzen entfernt werden. HMDS reagiert selektiver als stärkere Silyldonoren. Die Reaktivität kann durch Katalysatoren (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Essigsäure, TMCS) oder geeignete Lösungsmittel (Pyridin, DMF, DMSO) erhöht werden. Carboxylsäuren lassen sich ohne Katalysator silylieren. Generell ist die Ausbeute geringer als bei Reaktionen mit BSA oder BSTFA.	Alkaloide, Aminosäuren, Kohlenhydrate [84] [25] [194] [142]; Zellulose [95] [143]; Steroide, Polyalkohole [8]; Naturprodukte [163]
TMSDEA	Die Reaktivität von TMSDEA liegt zwischen der von HMDS und BSA, BSTFA und MSTFA. Obwohl es empfindlich für die sterische Umgebung von Hydroxylgruppen ist, silyliert es die meisten funktionellen Gruppen. Einziges Nebenprodukt ist das leicht flüchtige Diethylamin.	Aminosäuren [74]

Reagenz	Eigenschaften	Anwendungsbeispiele
MSTFA	MSTFA besitzt ähnliche Reaktionseigenschaften wie BSA und BSTFA und kann für die Silylierung aller protischer funktioneller Gruppen eingesetzt werden. Von Vorteil ist, daß das Reagenz selbst und das Nebenprodukt N-Methyltrifluoroacetamid leichter flüchtig als BSTFA und dessen Nebenprodukte sind.	Fettsäuren, Steroide [64]
BSA BSTFA	BSA und BSTFA sind die am häufigsten verwendeten Silylierungsreagenzien, die mit allen aziden funktionellen Gruppen unter milden Reaktionsbedingungen reagieren. Abhängig von Reaktionsbedingungen und Substrat ist die Reaktivität ähnlich der von MSTFA und größer als HMDS oder TMSDEA. Die Reaktivität kann durch ein geeignetes Lösungsmittel (Pyridin, DMF, Acetonitril) oder durch Zugabe eines Katalysators (TMCS, Trifluoressigsäure) erhöht werden. Geringe Mengen an H <sub>2</sub> O können die Reaktionsgeschwindigkeit erhöhen, da die Hydrolyseprodukte von BSA und BSTFA katalytische Wirkung besitzen.	Alkaloide, Amide [125]; Aminosäuren [125] [85]; Amine [193]; Kohlenhydrate [112]; Nucleinsäuren, Nucleoside [101]; Steroide [107]; pflanzliche Polyole [70]; Phenole [125] [96]; Carboxylsäuren [125]; Enole [125]; Monoterpenalkohole und Phenole [28]; in wäßriger Lösung: Seifen, Alkohole, Amine [189] [190]
TMSIM	TMSIM ist das reaktivste Silylierungsreagenz für Hydroxylgruppen und wird insbesondere für die Silylierung schwer zugänglicher Hydroxylgruppen eingesetzt. Selbst in Anwesenheit von H <sub>2</sub> O können TMS-Derivate von Kohlenhydraten gebildet werden. Es reagiert nicht mit aliphatischen Aminen. Die Reaktivität kann durch Zugabe von TMCS oder BSA bzw. BSTFA im Verhältnis 3:3:2 erhöht werden.	Kohlenhydrate [7]; Hormone, Nucleotide, Narcotica, Steroide [47]

# Kapitel 4

## Physikalische Grundlagen der Impuls-NMR-Spektroskopie

Eine genaue Kenntnis der Struktur, Dynamik und Reaktionsweise von Molekülen ist der Schlüssel zum Verständnis ihrer Funktionen und Eigenschaften. Die NMR-Spektroskopie hat sich durch die Einführung zweidimensionaler Verfahren zur bedeutendsten Methode entwickelt, um derartige Informationen über Moleküle zu erhalten. Es steht nunmehr eine Vielzahl an Aufnahmetechniken zur Verfügung, deren erfolgreiche Anwendung jedoch nicht nur die entsprechende apparative Ausstattung, sondern auch die richtige Auswahl der Experimente einschließlich der optimalen Meßparameter und natürlich auch die sorgfältige Auswertung der Spektren voraussetzt [117].

In diesem Kapitel werden die Grundlagen der modernen NMR-Spektroskopie vorgestellt und es wird gezeigt, daß es mit dem Produktoperatorformalismus gelingt, komplexe Pulsfolgen der NMR-Spektroskopie zu verstehen. Mit dem Produktoperatorformalismus und dem Konzept der Kohärenz-Transferwege ist eine Methode verfügbar, die der umständlichen und nicht ausreichenden Vektorbeschreibung an Klarheit, Einfachheit und Exaktheit weit überlegen ist. Zum Verständnis der NMR-Experimente, die für die Aufnahme der Spektren in Kapitel 7 angewandt wurden, werden die relevanten Pulssequenzen näher erläutert.

### 4.1 Der quantenmechanische Formalismus

#### 4.1.1 Der klassische Ansatz

Die Grundlage der Kernresonanz-Spektroskopie bilden die magnetischen Eigenschaften der Atomkerne. Die meisten Kerne besitzen einen Kern- oder Eigendrehimpuls  $P$  [76]. In der klassischen Vorstellungsweise rotiert der Atomkern um eine Kernachse. Dieser Drehimpuls

ist gequantelt:

$$P = \sqrt{I(I+1)}\hbar \quad (4.1)$$

Hierbei ist  $\hbar$  das Plancksche Wirkungsquantum<sup>1</sup> und  $I$  die Drehimpuls- oder Kernspinzahlanzahl, vereinfacht als Kernspin bezeichnet. Der Kernspin kann die Werte  $I = 0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, 2 \dots 6$  annehmen [76].

Mit dem Drehimpuls  $P$  ist ein magnetisches Moment  $\mu$  verknüpft:

$$\mu = \gamma P \quad (4.2)$$

Das gyromagnetische Verhältnis  $\gamma$  ist für jedes Isotop der verschiedenen Elemente eine charakteristische Konstante. Von  $\gamma$  hängt die Nachweisempfindlichkeit eines Kerns im NMR-Experiment ab. Mit den Gleichungen 4.1 und 4.2 erhält man für das magnetische Moment  $\mu$ :

$$\mu = \gamma \sqrt{I(I+1)}\hbar \quad (4.3)$$

Wird ein Kern mit dem Drehimpuls  $P$  und dem magnetischen Moment  $\mu$  in ein statisches Magnetfeld  $B_0$  gebracht, orientiert sich der Drehimpulsvektor bezüglich der  $z$ -Achse so, daß seine  $z$ -Komponente  $P_z$

$$P_z = M \cdot \hbar \quad (4.4)$$

ist. Die magnetische Quantenzahl  $M$  kann die Werte  $M=I, I-1, \dots -I$  annehmen.

In der klassischen Betrachtungsweise verursacht das externe statische Magnetfeld  $B_0$  durch Wechselwirkung mit dem magnetischen Moment des isolierten Kernspins  $I = \frac{1}{2}$  eine Aufspaltung der Energie zwischen den beiden Spinzuständen  $\alpha$  und  $\beta$ :

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \quad (4.5)$$

In einem Molekül ist nicht für jede Kernsorte nur ein Signal zu erwarten, sondern die Energieniveaus jedes Kerns werden von der Umgebung des beobachteten Kerns beeinflusst. Das tatsächlich am Kernort wirkende Magnetfeld unterscheidet sich also von dem angelegten Feld  $B_0$ . Deshalb liefert die Zuordnung jeder Frequenz in einem NMR-Spektrum zu einem korrespondierenden Kern Informationen über dessen chemische Umgebung. Mit der NMR-Spektroskopie können damit Eigenschaften von Molekülen auf einem atomaren Level gemessen werden.

Für die Durchführung von NMR-Experimenten wird die zu untersuchende Probe in ein magnetisches Feld  $B_0$  mit möglichst großer Feldstärke gebracht. Nach der Boltzmann-Verteilung beträgt das Verhältnis der Zahl der Kerne im energiereicheren Niveau  $N_\beta$  zu

---

<sup>1</sup> $\hbar = h/2\pi$

der Zahl der Kerne im energieärmeren Niveau  $N_\alpha$ :

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}} \approx 1 - \frac{\Delta E}{k_B T} = 1 - \frac{\gamma \hbar B_0}{k_B T} \quad (4.6)$$

$k_B$  = Boltzmannkonstante  $\approx 1.3805 \cdot 10^{-23} \text{JK}^{-1}$

$T$  = absolute Temperatur in K

Da der Energieunterschied  $\Delta E$  der beiden Niveaus sehr klein ist im Vergleich zur mittleren Energie der Wärmebewegung ( $k_B T$ ), sind die Niveaus nahezu gleichbesetzt. Der Überschuss im energieärmeren Niveau liegt im Bereich von tausendstel Promille. Die NMR-Messungen sind entsprechend unempfindlich.

Jedes Experiment besteht aus einer Serie von Radiofrequenz-Pulsen senkrecht zu  $B_0$ . Während dieser Pulssequenz folgt die Magnetisierung einem Weg und kann von einem Spin zu einem anderen übertragen werden. Die Anzahl der Pulse (Frequenz, Phase, Amplitude), ihre Parameter und die Wartezeiten (Delays) zwischen den einzelnen Pulsen sind abhängig von dem durchzuführenden Experiment. Nach der Pulssequenz wird während der Aufnahmezeit (Akquisitionszeit) die resultierende Quermagnetisierung in Form einer radiofrequenten Antwort gemessen.

### 4.1.2 Die Dynamik von Kernspinsystemen

Die Dynamik isolierter Kernspins kann noch mit den Bewegungsgleichungen der klassischen Magnetisierungsvektoren erklärt werden. Um gekoppelte Spinsysteme zu beschreiben, ist ein quantenmechanischer Ansatz notwendig [71]. Im Gegensatz zu den klassischen Ansätzen befaßt sich der quantenmechanische Ansatz nicht direkt mit observabler Magnetisierung, sondern mit dem Zustand des Spinsystems. Der Zustand des Systems wird entweder durch die Wellenfunktion  $\psi(t)$  oder den Dichteoperator  $\rho(t)$  ausgedrückt. Die zeitliche Entwicklung des Dichteoperators wird durch die Liouville-von Neumann-Gleichung beschrieben.

#### Der Dichte-Operator

Das Konzept des Dichte-Operators  $\rho$  für ein vollständiges quantenmechanisches System wird aus der zeitabhängigen Schrödinger-Gleichung<sup>2</sup> mit dem Hamilton-Operator  $\mathcal{H}$  hergeleitet:

$$\frac{d}{dt} |\psi(t)\rangle = -i\mathcal{H}(t) |\psi(t)\rangle \quad (4.7)$$

Sie beschreibt die zeitliche Entwicklung der Wellenfunktion  $\psi$  des Systems.

Der Dichte-Operator  $\rho$  befolgt eine Gleichung, die von der Schrödinger-Gleichung abgeleitet ist. Sie enthält die Informationen, die zur Berechnung aller Observablen eines Systems

<sup>2</sup>  $\mathcal{H}\psi = i\hbar\left(\frac{d\psi}{dt}\right)$

benötigt wird. Die den Zustand des Systems beschreibende Wellenfunktion  $|\psi\rangle$  kann nach einer orthonormalen Basis  $\{|i\rangle, i = 1, 2, \dots, n\}$  zerlegt werden:

$$|\psi(t)\rangle = \sum_{i=1}^n c_i(t)|i\rangle \quad (4.8)$$

Die Zeitabhängigkeit von  $\psi(t)$  wird durch die zeitabhängigen Koeffizienten  $c_i(t)$  ausgedrückt. Dabei ist  $n$  die Dimension des Vektorraumes aller Wellenfunktionen (einem Hilbert-Raum).

Für die Definition eines Dichte-Operators können zwei Fälle unterschieden werden:

1. In einem reinen Zustand befinden sich alle Spin-Systeme eines Ensembles in demselben Zustand und können durch dieselbe normalisierte Wellenfunktion  $|\psi(t)\rangle$  mit  $\langle\psi(t)|\psi(t)\rangle = 1$  beschrieben werden. Der korrespondierende Dichte-Operator  $\varrho$  wird definiert als:

$$\varrho(t) = |\psi(t)\rangle\langle\psi(t)| = \sum_i \sum_j c_i(t)c_j^*(t)|i\rangle\langle j| \quad (4.9)$$

2. Für ein Ensemble in einem gemischten Zustand, z.B. ein Ensemble im thermischen Gleichgewicht, können nur Wahrscheinlichkeiten  $p^k$  angegeben werden, daß sich ein Spin-System des Ensembles in einem der möglichen Zustände  $|\psi^k(t)\rangle$  befindet. Der Dichte-Operator ist dann ein Mittel des Ensembles

$$\varrho(t) = \sum_k p^k |\psi^k(t)\rangle\langle\psi^k(t)| \quad (4.10)$$

$$= \sum_k p^k \sum_i \sum_j c_i^k(t)c_j^{k*}(t)|i\rangle\langle j| \quad (4.11)$$

$$= \sum_i \sum_j \overline{c_i(t)c_j^*(t)}|i\rangle\langle j| \quad (4.12)$$

wobei  $\sum_k p^k = 1$  gilt. Der Querbalken kennzeichnet das Ensemblemittel.

Die physikalische Bedeutung des Dichteoperators wird deutlich, wenn man seine Matrixelemente in der Orthonormalbasis  $\{|j\rangle\}$  betrachtet. Für einen reinen Zustand erhält man:

$$\langle r|\varrho(t)|s\rangle = \sum_i \sum_j c_i(t)c_j^*(t)\langle r|i\rangle\langle j|s\rangle = c_r(t)c_s^*(t) \quad (4.13)$$

Für einen gemischten Zustand gilt:

$$\langle r|\varrho(t)|s\rangle = \sum_k p^k c_r^k(t)c_s^{k*}(t) = \overline{c_r(t)c_s^*(t)} \quad (4.14)$$

Die Matrix-Elemente sind also Produkte der Koeffizienten  $c_i(t)$  der Wellenfunktion  $\psi(t)$ . Eine einfache Interpretation der Dichte-Matrix ist in der Eigenbasis des Hamilton-Operators  $\mathcal{H}$  möglich. Das Diagonal-Element der Dichte-Matrix

$$\varrho_{rr} = \langle r|\varrho(t)|r\rangle = \overline{|c_r(t)|^2} = P_r \quad (4.15)$$

ist gleich der Wahrscheinlichkeit, daß das Spin-System im Eigenzustand  $|r\rangle$  gefunden wird.  $P_r$  ist also die Besetzung des Zustandes  $|r\rangle$ . Das nichtdiagonale Element

$$\varrho_{rs} = \langle r|\varrho(t)|s\rangle = \overline{c_r(t)c_s^*(t)} \quad (4.16)$$

indiziert eine kohärente Superposition von Eigenzuständen  $c_r(t)|r\rangle + c_s(t)|s\rangle$  in  $\psi(t)$  der Gleichung 4.8 in der Weise, daß die Zeitabhängigkeit und die Phase der verschiedenen Glieder des Ensembles bezüglich  $|r\rangle$  und  $|s\rangle$  korreliert sind. Solch eine kohärente Superposition wird "Kohärenz" genannt. Das Matrix-Element  $\varrho_{rs}(t)$  ist die komplexe Amplitude der Kohärenz ausgedrückt durch den Operator  $|r\rangle\langle s|$ . Eine Kohärenz kann mit einem Übergang zweier Eigenzustände  $|r\rangle$  und  $|s\rangle$  verbunden werden. Wenn die beiden Zustände einen zulässigen Übergang mit einer Differenz der Magnetquantenzahlen  $\Delta M_{rs} = M_r - M_s = \pm 1$  darstellen, entspricht die Kohärenz  $\varrho_{rs}$  den transversalen Magnetisierungskomponenten  $M^{\pm(rs)} = M_x^{(rs)} \pm iM_y^{(rs)}$ . Im allgemeinen repräsentiert ein Matrixelement  $\varrho_{rs}$  eine  $p$ -Quantenkohärenz ( $p = M_r - M_s$ ), welche für  $p \neq \pm 1$  zu keiner beobachtbaren Magnetisierung führt und die damit nur indirekt detektiert werden kann.

### Erwartungswerte observabler Operatoren

Für normierte Wellenfunktionen ergibt sich der Erwartungswert  $\langle A \rangle$  eines observablen Operators  $A$  aus:

$$\langle A \rangle = \sum_k p^k(t) \langle \psi^k(t) | A | \psi^k(t) \rangle \quad (4.17)$$

$$= \sum_k p^k(t) \sum_r \sum_s c_r^{k*}(t) c_s^k(t) \langle r | A | s \rangle = \sum_r \sum_s \varrho_{sr}(t) A_{rs} \quad (4.18)$$

$$= \text{tr}\{A\varrho(t)\} \quad (4.19)$$

Der Erwartungswert ergibt sich also aus der Spur<sup>3</sup> der Matrix, die aus dem Produkt des Operators  $A$  und des Dichte-Operator  $\varrho(t)$  hervorgeht.

### Liouville-von Neumann Gleichung — reduzierte Dichte-Operatoren

Aus der zeitabhängigen Schrödinger-Gleichung kann die Zeitabhängigkeit des Dichte-Operators in Form der *Liouville-von Neumann Gleichung* abgeleitet werden:

$$\frac{d}{dt}\varrho(t) = -i[\mathcal{H}(t), \varrho(t)] = -i\hat{\mathcal{K}}(t)\varrho(t) \quad (4.20)$$

<sup>3</sup>Die Spur  $\text{tr}\{\}$  einer Matrix ist gleich der Summe ihrer Diagonalelemente

Dabei ist  $\hat{\mathcal{H}}$  der aus dem Hamilton-Operator  $\mathcal{H}$  abgeleitete sogenannte *Liouville Superoperator*<sup>4</sup>. Der Dichte-Operator  $\varrho(t)$  bezieht sich auf das gesamte quantenmechanische System. Die Basisfunktionen des gesamten Hilbert-Raumes hängen von Raum- und Spinkoordinaten aller Elektronen und Kerne, die das System bilden, ab. Für NMR-Anwendungen genügt es, Erwartungswerte für eine Menge von Operatoren zu erhalten, die sich nur auf Kernspinvariablen bezieht. Die übrigen Freiheitsgrade werden dem sogenannten *Gitter* zugeordnet. Dazu können die Basisfunktionen des gesamten Systems als Produkte von Funktionen  $|f\rangle$  und  $|s\rangle$  geschrieben werden, so daß  $|f\rangle$  nur vom Gitter und  $|s\rangle$  nur von den Spin-Koordinaten des nun eingeschränkten Systems abhängt. Der reduzierte Dichte-Operator  $\sigma(t)$  definiert sich damit durch:

$$\langle s' | \sigma(t) | s \rangle = \sum_f \langle s' f | \varrho(t) | f s \rangle \quad (4.21)$$

Analog zu Gleichung 4.20 ergibt sich das dynamische Verhalten des reduzierten Dichte-Operator zu [108]

$$\frac{d}{dt} \sigma(t) = -i[\mathcal{H}^s, \sigma(t)] - \hat{\Gamma}[\sigma(t) - \sigma_0] = -i\hat{\mathcal{H}}^s \sigma(t) - \hat{\Gamma}[\sigma(t) - \sigma_0] \quad (4.22)$$

wobei  $\mathcal{H}^s$  der nur auf Spin-Variablen operierende Hamilton-Operator<sup>5</sup> und  $\hat{\Gamma}$  der Relaxations-Superoperator ist. Letzterer stellt die Wechselwirkungen zwischen dem Spinsystem und dem Gitter dar und ist dafür verantwortlich, daß das System zum thermischen Gleichgewicht  $\sigma_0$  zurückkehrt.

Diese Gleichung ermöglicht es, die Frequenz und die Intensität jedes Peaks in einem NMR-Spektrum zu verstehen und vorherzusagen. Hierzu wird die Evolution eines reduzierten Dichte-Operators mit Hilfe der Gleichung 4.22 während der Pulssequenz berechnet. Es ist dabei nötig, die für das betrachtete Spin-System relevanten Hamilton-Operatoren  $\mathcal{H}^s$  für die einzelnen Schritte während der Pulssequenz zu kennen. Man erhält dadurch den Erwartungswert des Ensembles für die NMR-Observable (transversale Magnetisierung). Diese zeitabhängige Funktion, stellt eine Superposition von Frequenzen, korrespondierend zu den beobachteten Peaks im Spektrum dar.

## Kohärenz

Das Konzept der Kohärenz ist eine Erweiterung des Begriffs "transversale Magnetisierung". Während der Begriff "transversale Magnetisierung" mit Übergängen zwischen den Eigenzuständen  $|r\rangle$  und  $|s\rangle$  und einer Änderung der Quantenzahl  $M_r - M_s = \pm 1$  verknüpft ist, ist der Begriff der "Kohärenz" weiter gefaßt und kann auf jeden Übergang angewandt werden.

<sup>4</sup>  $\hat{\mathcal{H}}(t)\varrho(t) = \mathcal{H}(t)\varrho(t) - \varrho(t)\mathcal{H}(t)$

<sup>5</sup>  $\mathcal{H}^s = \sum_f \langle f | \mathcal{H} | f \rangle = \text{tr}_f \{ \mathcal{H} \}$



Gleichung 4.23 veranschaulicht eine Dichte-Matrix für zwei gekoppelte Kerne mit  $I = \frac{1}{2}$ .

$$\sigma(t) = \begin{bmatrix} P_1 & \text{SQC} & \text{SQC} & \text{DQC} \\ \text{SQC} & P_2 & \text{ZQC} & \text{SQC} \\ \text{SQC} & \text{ZQC} & P_3 & \text{SQC} \\ \text{DQC} & \text{SQC} & \text{SQC} & P_4 \end{bmatrix}; \quad \begin{array}{l} P_r = \text{population of state } |r\rangle \\ \text{SQC} = \text{single quantum coherence} \\ \text{ZQC} = \text{zero quantum coherence} \\ \text{DQC} = \text{double quantum coherence} \end{array} \quad (4.23)$$

Die Elemente der Dichte-Matrix besitzen eine einfache physikalische Bedeutung: ein Diagonalelement  $\sigma_{rr}(t)$  repräsentiert die Besetzung  $P_r(t)$  des Energiezustands  $|r\rangle$  (s. Gleichung 4.15) wobei  $\text{tr}\{\sigma(t)\} = \sum_r P_r(t) = 1$  gilt. Ein nichtdiagonales Element  $\sigma_{rs}$  repräsentiert Kohärenz zwischen den Zuständen  $|r\rangle$  und  $|s\rangle$ . Ein Element  $\sigma_{rs} \neq 0$  indiziert, daß die Wellenfunktion  $|\psi\rangle$  gemäß Gleichung 4.8 aus einer Superposition von Eigenzuständen  $|r\rangle$  und  $|s\rangle$  besteht:

$$|\psi(t)\rangle = c_r(t)|r\rangle + c_s(t)|s\rangle + \dots \quad (4.24)$$

Diese kohärente Superposition von Eigenzuständen wird oft vereinfacht "Kohärenz" genannt.

Jeder Eigenzustand  $|r\rangle$  ist charakterisiert durch eine Magnetquantenzahl  $M_r$  und jede Kohärenz  $\sigma_{rs}$  durch eine Differenz der Magnetquantenzahlen  $p_{rs} = M_r - M_s$ , die "Kohärenzordnung" genannt wird.

Man unterscheidet zwischen Nullquantenkohärenz ( $p_{rs} = 0$ ), Einquantenkohärenz ( $p_{rs} = \pm 1$ ), welche zu observabler transversaler Magnetisierung führt, und allgemein p-Quantenkohärenz. Kohärenztransfer beschreibt die Transformation von Kohärenz von einem Übergang zu einem anderen und damit den Austausch von nichtdiagonalen Matrixelementen in der Dichte-Matrix.

Bei der Impuls-NMR-Spektroskopie werden mit Hilfe von Radiofrequenzpulsen (rf-Impuls) Transfers zwischen Kohärenzen induziert, wobei sich die Kohärenzordnung ändern kann. Dieser induzierte Kohärenztransfer ist von zentraler Bedeutung in vielen Pulsexperimenten. Zusätzlich können gepulste Feldgradienten verwendet werden, um verschiedene Kohärenzordnungen zu separieren.

## 4.2 Der Produktoperator-Formalismus

Die vollständige Beschreibung eines Systems mehrerer gekoppelter Spins erfordert auch die Einbeziehung nicht observabler Magnetisierungen. Es muß eine quantenmechanische Darstellung gewählt werden, die den Verlauf eines Experiments beschreibt. Dazu wird der Zustand eines Spin-Systems durch einen auf das zu betrachtende Teilsystem reduzierten Spin-Dichteoperator  $\sigma$  beschrieben (s. Gleichung 4.21). Das zeitliche Verhalten  $\sigma(t)$  eines solchen Systems kann dann durch die Differentialgleichung 4.22 beschrieben werden. Dies ermöglicht es, die Erwartungswerte observabler Größen im zeitlichen Verlauf eines Experiments durch Multiplikation des zu der jeweiligen Größe zugeordneten Operators  $A$  mit  $\sigma(t)$  zu bestimmen (s. Gleichung 4.17).

### Der Liouville-Operator-Raum

Da in der Praxis häufig einige Elemente der Dichte-Matrix für die zu betrachtende Observable nicht relevant sind, ist eine vollständige Betrachtung Matrix oftmals nicht notwendig. In solchen Fällen ist es zweckmäßig, den Dichte-Operator durch eine vollständige Menge von Basis-Operatoren  $\{B_s\}$  darzustellen

$$\sigma(t) = \sum_{s=1}^{n^2} b_s(t) B_s. \quad (4.25)$$

Der durch die Basisoperatoren  $\{B_s\}$  aufgespannte Raum wird *Liouville-Raum* genannt. Die Komplexität praktischer Rechnungen hängt dabei wesentlich von der für die jeweilige Fragestellung geeigneten Wahl der Menge der Basis-Operatoren  $\{B_s\}$  ab.

### 4.2.1 Produkte kartesischer Spin-Operatoren

Eine für das Verständnis vieler NMR-Experimente bedeutende Besetzung der Basis  $\{B_s\}$  basiert auf den Drehmoment-Operatoren  $I_{kx}, I_{ky}, I_{kz}$  einzelner Spins  $k$  in den drei Raumrichtungen. Dabei ist  $z$  die Richtung des Gradienten des angelegten Magnetfeldes  $B_0$ . Es ist nun möglich, den gesamten Liouville-Raum von  $N$  Spins durch Produkte der  $3N$  erzeugenden Operatoren aufzuspannen. Im folgenden werden nur Systeme mit Spins der Quantenzahl  $I = \frac{1}{2}$  betrachtet. Für ein System aus  $N$  Kernen kann damit eine Basis durch folgende Produkte definiert werden:

$$B_s = 2^{(q-1)} \prod_{k=1}^N (I_{k\alpha})^{a_{ks}} \quad \text{mit } \alpha = x, y \text{ oder } z \quad (4.26)$$

Dabei wird durch  $a_{ks}$  eine Auswahl von  $q$  Operatoren getroffen, indem für die betreffenden Operatoren  $a_{ks} = 1$  und für die übrigen  $N - q$  Operatoren  $a_{ks} = 0$  gesetzt wird. Da für

jeden der  $N$  Spins genau einer ( $\alpha = x, y$  oder  $z$ ) oder keiner ( $a_{ks} = 0$ ) der drei Drehmoment-Operatoren für die Bildung der Basis Verwendung findet, entstehen pro Spin 4 Möglichkeiten ( $I_x, I_y, I_z, E$ ). Die vollständige Basismenge  $\{B_s\}$  für ein  $N$ -Spin-System besteht also aus  $4^N$  Produktoperatoren  $B_s$ . Die entstehenden Operatoren sind orthogonal bezüglich der gebildeten Spur  $\text{tr}\{B_r B_s\} = \delta_{r,s} 2^{N-1}$ , wobei allerdings die Normierung von der Zahl der Kerne abhängt. Man spricht daher von *kartesischen Produktoperatoren*.

## 2-Spin-Systeme

Für den Fall  $N = 2$  ergeben sich für zwei Kerne I und S aus Gleichung 4.26 demnach 16 Basis-Operatoren

$B_s$	$E$	$I_x$	$I_y$	$I_z$
$E$	$\frac{1}{2}E$	$I_x$	$I_y$	$I_z$
$S_x$	$S_x$	$2I_x S_x$	$2I_y S_x$	$2I_z S_x$
$S_y$	$S_y$	$2I_x S_y$	$2I_y S_y$	$2I_z S_y$
$S_z$	$S_z$	$2I_x S_z$	$2I_y S_z$	$2I_z S_z$

der folgenden Art:

$q$	$2^{q-1}$	Operator	Operator-Typ
0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}E$	Einheitsoperator
1	1	$I_x, I_y, I_z, S_x, S_y, S_z$	Ein-Spin-Operatoren
2	2	$2I_x S_y, 2I_x S_x, 2I_x S_z$ $2I_y S_x, 2I_y S_y, 2I_y S_z$ $2I_z S_x, 2I_z S_y, 2I_z S_z$	Zwei-Spin-Operatoren

Der jeweilige Zustand  $\sigma$  des betrachteten Systems läßt sich damit gemäß Gleichung 4.25 zu jedem Zeitpunkt  $t$  durch eine Linearkombination  $b_s(t)$  dieser Operatoren beschreiben. Nimmt man den Hamilton-Operator für den Zeitraum  $\tau$  als zeitunabhängig an, und vernachlässigt die Relaxation  $\hat{\Gamma}$ , so besitzt Gleichung 4.22 die Lösung:

$$\sigma(t + \tau) = \exp\{-i \hat{\mathcal{H}} \tau\} \sigma(t) \quad (4.27)$$

Man verwendet dafür vereinfachend die Schreibweise

$$\sigma(t) \xrightarrow{\mathcal{H} \tau} \sigma(t + \tau) \quad (4.28)$$

für den Übergang des Systems vom Zustand  $\sigma(t)$  unter dem Einfluß  $\mathcal{H} \tau$  in den Zustand  $\sigma(t + \tau)$ . Der Einfluß eines *rf-Pulses* oder der *chemischen Verschiebung* induziert eine Rotation um den Winkel  $\Phi$  in dem durch die Drehmoment-Operatoren  $I_x, I_y, I_z$  aufgespannten Unterraum des einzelnen Spins. Für den einzelnen Operator  $I_\beta$  gilt damit

$$I_\beta \xrightarrow{\Phi I_\alpha} I_\beta \cos \Phi + I_\gamma \sin \Phi \quad \text{mit} \quad \Phi = -\gamma B_\alpha \tau \quad (4.29)$$

für alle  $(\alpha, \beta, \gamma) \in \{(x, y, z), (y, z, x), (z, x, y)\}$ . Für das Produkt zweier Operatoren unterschiedlicher Spins ergibt sich der Zustandsübergang als Vektorprodukt der einzelnen Übergänge

$$2I_\beta S_{\beta'} \xrightarrow{\Phi I_\alpha + \Phi' S_{\alpha'}} 2(I_\beta \cos \Phi + I_\gamma \sin \Phi) \times (S_{\beta'} \cos \Phi' + S_{\gamma'} \sin \Phi') \quad (4.30)$$

Daraus resultiert eine Operator-Algebra mit folgenden Regeln [179]:

**Pulse mit der Phase  $x$  und dem Pulswinkel  $\beta$ :**

$$I_x \xrightarrow{\beta I_x} I_x \quad (4.31)$$

$$I_y \xrightarrow{\beta I_x} I_y \cos \beta + I_z \sin \beta \quad (4.32)$$

$$I_z \xrightarrow{\beta I_x} I_z \cos \beta - I_y \sin \beta \quad (4.33)$$

**Pulse mit der Phase  $y$  und dem Pulswinkel  $\beta$ :**

$$I_x \xrightarrow{\beta I_y} I_x \cos \beta - I_z \sin \beta \quad (4.34)$$

$$I_y \xrightarrow{\beta I_y} I_y \quad (4.35)$$

$$I_z \xrightarrow{\beta I_y} I_z \cos \beta + I_x \sin \beta \quad (4.36)$$

**Chemische Verschiebung  $\Omega_I = -\gamma_I B_0$  im Zeitraum  $\tau$ :**

$$I_x \xrightarrow{\Omega_I \tau I_z} I_x \cos \Omega_I \tau + I_y \sin \Omega_I \tau \quad (4.37)$$

$$I_y \xrightarrow{\Omega_I \tau I_z} I_y \cos \Omega_I \tau - I_x \sin \Omega_I \tau \quad (4.38)$$

$$I_z \xrightarrow{\Omega_I \tau I_z} I_z \quad (4.39)$$

**Spin-Spin Kopplung mit Kopplungskonstante  $J$ :**

$$I_x \xrightarrow{\pi J \tau 2I_z S_z} I_x \cos \pi J \tau + 2I_y S_z \sin \pi J \tau \quad (4.40)$$

$$I_y \xrightarrow{\pi J \tau 2I_z S_z} I_y \cos \pi J \tau - 2I_x S_z \sin \pi J \tau \quad (4.41)$$

$$2I_x S_z \xrightarrow{\pi J \tau 2I_z S_z} 2I_x S_z \cos \pi J \tau + I_y \sin \pi J \tau \quad (4.42)$$

$$2I_y S_z \xrightarrow{\pi J \tau 2I_z S_z} 2I_y S_z \cos \pi J \tau - I_x \sin \pi J \tau \quad (4.43)$$

Mit diesem Produkt-Operator-Formalismus, der auf einfache Weise Mehrquantenkohärenz veranschaulicht, lassen sich alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten 2D-, Mehrpuls- und Gradienten-Experimente effizient beschreiben.

Folgende Operatoren beschreiben observable Kohärenz:	
$I_x, I_y, S_x, S_y$	$x$ - bzw. $y$ -Magnetisierung
$2I_x S_z, 2I_y S_z$	$x$ - bzw. $y$ -Magnetisierung des Spin $I$ in Antiphase bezüglich des Spin $S$
$2I_z S_x, 2I_z S_y$	$x$ - bzw. $y$ -Magnetisierung des Spin $S$ in Antiphase bezüglich des Spin $I$
Folgende Operatoren beschreiben nicht-observable Kohärenz:	
$I_z, S_z$	longitudinale $z$ -Spinordnung von $I$ oder $S$
$2I_z S_z$	longitudinale Zwei-Spinordnung der Spins $I$ und $S$
$2I_x S_x, 2I_x S_y,$	Zweispinkohärenz der Spins $I$ und $S$
$2I_y S_x, 2I_y S_y$	

Antiphasen-Magnetisierung repräsentiert Dupletts, in denen die einzelnen Linien im Spektrum entgegengesetzte Phasen haben. Beispielsweise korrespondiert  $2I_x S_z$  zu einem 2-Spin-Duplett mit Magnetisierung entlang der  $x$ -Achse im rotierenden Koordinatensystem. Das Integral eines Antiphasendupletts ist Null. Zweispinkohärenz repräsentiert eine Superposition von Null- und Doppelquantenkohärenz [71] [179].

### 4.2.2 Das INEPT-Experiment

Das INEPT-Experiment (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer) verstärkt die Empfindlichkeit von NMR-Experimenten mit Kernsorten geringer natürlicher Häufigkeit und kleinem gyromagnetischem Verhältnis durch Polarisationstransfer. Abb. 4.1 zeigt die Impulsfolge für das INEPT-Experiment.

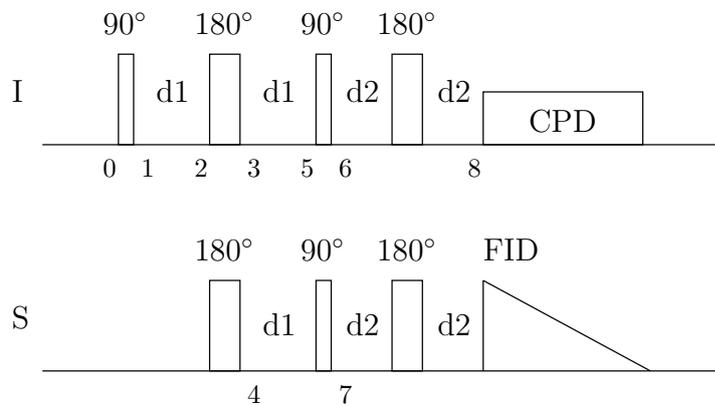
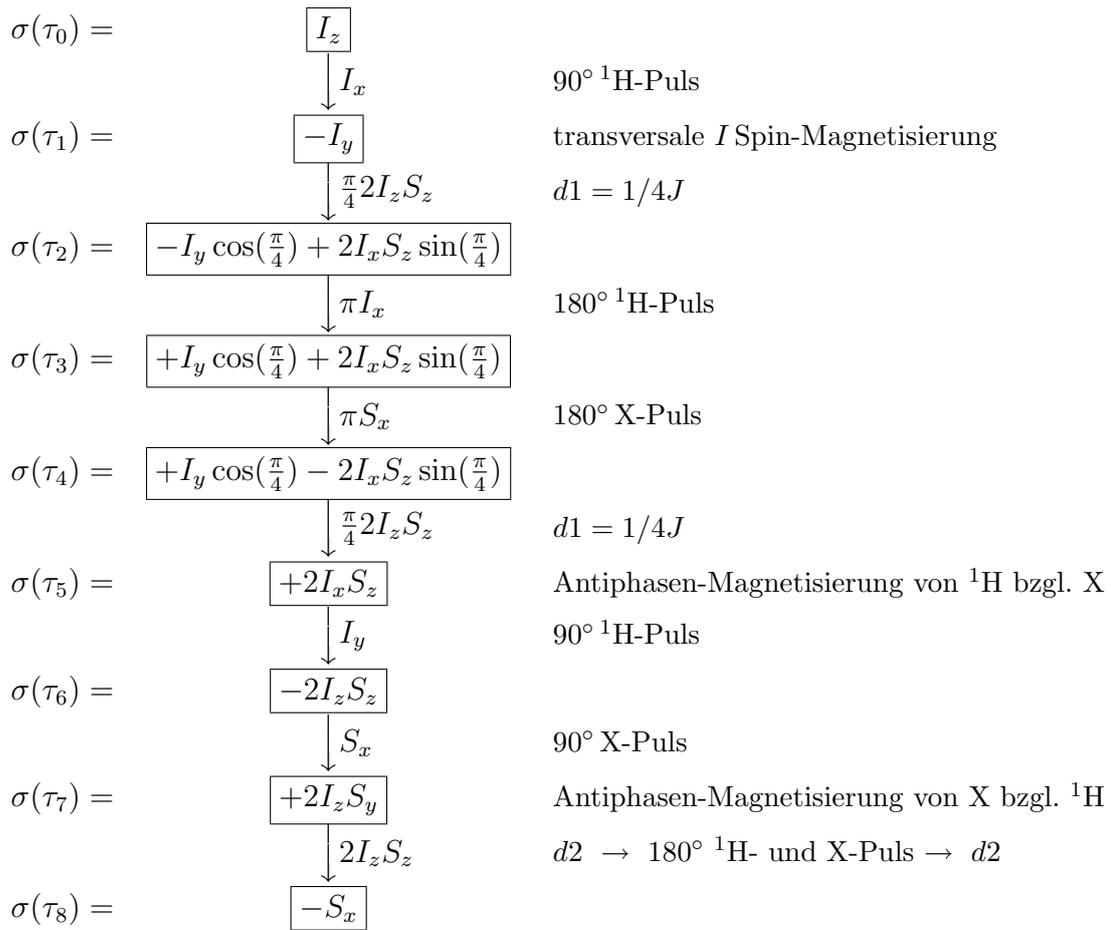


Abbildung 4.1: Impulsfolge des refokussierten INEPT-Experiment. Der Polarisationstransfer wird durch simultane  $90^\circ$ -Pulse auf die Spins  $I$  und  $S$  erzeugt. Die nachfolgende Evolution während  $2 \cdot d2$  ermöglicht den Antiphasen- $S$ -Spinvektoren entlang der  $-x$ -Achse zu refokussieren, so daß  $I$ -Spin-Entkopplung verwendet werden kann.  $d1=1/4J$ .

Die INEPT-Sequenz besteht aus einem  $90^\circ$ -Anregungspuls und je einem  $90^\circ$ -Puls auf beide Kernsorten für den Kohärenz-Transfer. Die  $180^\circ$ -Pulse dienen lediglich zur Refokussierung der chemischen Verschiebung.

Der erste  $90^\circ$  Protonenpuls erzeugt transversale Magnetisierung der Protonen, während der beiden  $d1$ -Perioden entwickelt sich die heteronukleare  $J_{IS}$ -Kopplung. Die chemische Verschiebung wird durch den  $180^\circ$   $^1\text{H}$ -Puls refokussiert. Beträgt der Delay  $2 \cdot d1=1/2J_{I,S}$ , so wird der Cosinus-Term Null und der Sinus-Term Eins. Das Proton besitzt reine Antiphasen-Magnetisierung bezüglich  $S$  [37] [75]. Diese Antiphasen-Magnetisierung wird durch die beiden simultanen  $90^\circ$ -Pulse in Antiphasen-Magnetisierung von  $S$  bezüglich  $^1\text{H}$  konvertiert (Polarisationstransfer). Während  $2 \cdot d2$  wird die heteronukleare Kopplung zu meßbarer In-Phasen-Magnetisierung der  $S$ -Kerne refokussiert.



### 4.2.3 Zweidimensionale heteronuklear korrelierte Experimente

Die große Anzahl verschiedener Pulssequenzen für die heteronukleare Korrelationsspektroskopie kann in zwei Grundtypen eingeteilt werden: eine Gruppe, die heteronukleare Mehrquantenkohärenz (HMQC) während der Evolutionszeit  $t_1$  verwendet und eine zweite Gruppe, die auf transversaler Magnetisierung des Kerns mit kleinem gyromagnetischen Verhältnis  $\gamma$  während  $t_1$  beruht (HSQC). HSQC-Experimente basieren auf zwei INEPT-Transfers, um Magnetisierung vom Proton zu dem Kern mit kleinem  $\gamma$  und zurück zum Proton zu transferieren.

#### Das HMQC-Experiment

HMQC- und HSQC-Experimente repräsentieren eine Klasse von Pulssequenzen für die "inverse Korrelation", z.B. heteronukleare Korrelation mit Protonendetektion. Zum Verständnis der Pulssequenz kann der Produkt-Operator-Formalismus herangezogen werden [37] [71] [75].

Der erste 90°-Puls erzeugt transversale Magnetisierung  $-I_y$ . Während  $d=1/2J_{S,I}$  entwickelt sich Antiphasen-Magnetisierung  $2I_x S_z$ . Der zweite 90°-Puls transformiert die Antiphasen-Magnetisierung in heteronukleare Zwei-Spin-Kohärenz  $-2I_x S_y$  (Superposition von ZQC

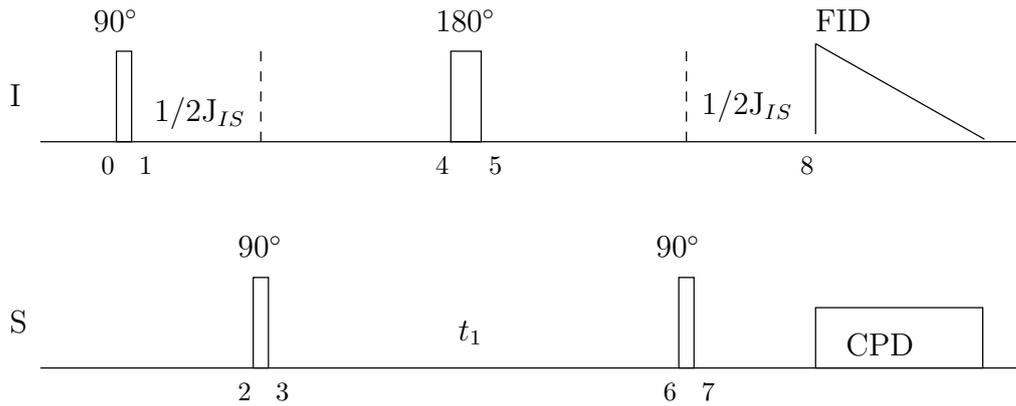


Abbildung 4.2: Pulssequenz des HMQC-Experiments

und DQC). Während  $t_1$  entwickelt sich die chemische Verschiebung von  $S$ . Der  $180^\circ$ -Puls vertauscht ZQC und DQC. Die chemische Verschiebung von  $I$  wird durch den  $180^\circ$ -Puls während  $t_1$  refokussiert. Der letzte Puls transformiert die Zwei-Spin-Kohärenz in Antiphasen- $I$ -Spin-Magnetisierung, die sich während der zweiten  $1/2J_{IS}$ -Zeit in In-Phasen-Magnetisierung  $-I_y$  entwickelt.

$$\begin{aligned}
 \sigma(\tau_0) &= \boxed{I_z} \\
 &\downarrow \quad 90^\circ \text{ } ^1\text{H-Puls} \\
 \sigma(\tau_1) &= \boxed{-I_y} \quad \text{transversale } I \text{ Spin-Magnetisierung} \\
 &\downarrow \quad d=1/2J \\
 \sigma(\tau_2) &= \boxed{+2I_x S_z} \quad \text{Antiphasen-Magnetisierung von } I \text{ bzgl. } S \\
 &\downarrow \quad 90^\circ \text{ X-Puls} \\
 \sigma(\tau_3) &= \boxed{-2I_x S_y} \quad \text{heteronukleare Zwei-Spin-Kohärenz; Superposition von ZQC und DQC} \\
 &\downarrow \quad \text{Entwicklung der chemischen Verschiebung von } S \\
 \sigma(\tau_4) &= \boxed{-2I_x S_y \cos \omega t - 2I_x S_x X n \omega t} \\
 &\downarrow \quad 180^\circ \text{ } ^1\text{H-Puls: Austausch ZQC und DQC} \\
 \sigma(\tau_5) &= \boxed{-2I_x S_y \cos \omega t + 2I_x S_x X n \omega t} \\
 &\downarrow \\
 \sigma(\tau_6) &= \boxed{-2I_x S_y} \quad \text{Zwei-Spin-Kohärenz} \\
 &\downarrow \quad 90^\circ \text{ X-Puls} \\
 \sigma(\tau_7) &= \boxed{-2I_x S_z} \quad \text{Antiphasen-Magnetisierung von } I \text{ bzgl. } S \\
 &\downarrow \quad d=1/2J \\
 \sigma(\tau_8) &= \boxed{-I_y} \quad \text{Inphasen-Magnetisierung}
 \end{aligned}$$



HMQC-Experimente haben folgende Vor- und Nachteile gegenüber HSQC-Experimenten:

- $\ominus$  Mehrquanten-Kohärenz: DQC relaxiert schneller als SQC, die Empfindlichkeit gegenüber Feldhomogenität, Gradienten, etc. ist größer
- $\ominus$   $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -Multipllettstruktur in  $F_1$ : geringere Empfindlichkeit, breitere Linien
- $\oplus$  weniger Pulse: 4 statt 10.

### Das HSQC-Experiment

Folgende Eigenschaften kennzeichnen das HSQC-Experiment:

- $\oplus$  SQC
- $\oplus$  Singuletts in  $F_1$ : höhere Empfindlichkeit
- $\ominus$  10 Pulse: empfindlicher gegenüber Pulsfehlern

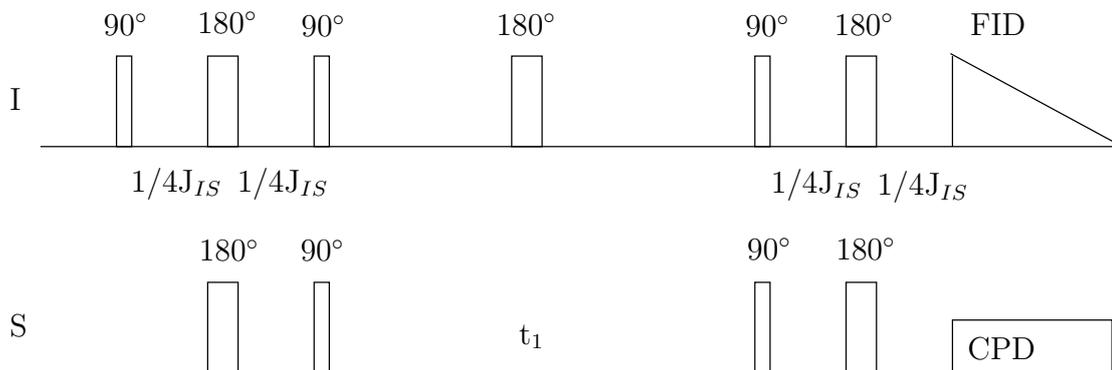


Abbildung 4.3: Pulssequenz des HSQC-Experiments

Die HSQC-Sequenz besteht aus einem INEPT-Transfer von dem  $I$ -Kern zu dem  $S$ -Kern, einer  $t_1$ -Zeit mit einem 180°-Puls und einem reversen INEPT-Transfer von  $S$  zu  $I$ . Der erste INEPT-Transfer resultiert in Antiphasen-Magnetisierung von  $S$  bzgl.  $I$  ( $-2I_zS_y$ ; SQC). Während  $t_1$  entwickelt sich die chemische Verschiebung von  $S$ .

Die drei 180°-Pulse refokussieren die chemische Verschiebung der Protonen. Der 180°-Puls während  $t_1$  refokussiert die heteronuklearen Kopplungen in dieser Periode. Nach der Präparationszeit ist nur SQC vorhanden. Im Gegensatz zur HMQC-Sequenz findet keine Änderung der Kohärenzordnung während  $t_1$  statt. Ein weiterer INEPT-Transfer konvertiert die Antiphasen- $S$ -Magnetisierung in observable Inphasen- $I$ -Magnetisierung zurück. Der komplette Prozeß kann durch den Produktoperator-Formalismus beschrieben werden, wobei nur

die Terme berücksichtigt werden, die zu dem Spektrum führen [108]. Es werden reine absorptive Linienformen erhalten. Die  $F_1$ -Linienbreite ist signifikant schmaler verglichen mit HMQC-Experimenten, da sie nicht von  $I,I$  oder  $I,S$ -Kopplungen beeinflusst wird, sondern nur durch die Relaxation von  $I_z S_y$ .

$$I_z \xrightarrow{\text{INEPT}} -2I_z S_y \xrightarrow{t_1} -2I_z S_y \cos \omega_S t_1 \xrightarrow{\text{reverses INEPT}} -I_y \cos \omega_S t_1$$

## 4.3 Feldgradienten-Spektroskopie

### 4.3.1 Gepulste Feldgradienten (PFG) in der NMR-Spektroskopie

Die Einführung von gepulsten Feldgradienten (PFG) in der NMR-Spektroskopie hatte eine deutliche Spektrenverbesserung durch Kohärenzselektion zur Folge. Durch die Verwendung dieser PFG statt sog. "phase cycling" können Artefakte minimiert, die Datenaufnahmezeit reduziert und Lösungsmittelresonanzen besser unterdrückt werden. Die Selektion von Kohärenz-Transferwegen durch PFG basiert auf der charakteristischen Sensitivität von Kohärenz gegenüber Feldgradienten und auf der Bildung von Transfer-Echos.

Die Feldgradienten-Spektroskopie bietet folgende Vorteile:

1. Für konzentrierte Proben können 2D und 3D Experimente mit nur einem Scan pro Inkrement durchgeführt werden. Keine Notwendigkeit für die Messung vollständiger Phasenzyklen.
2. Signifikante Reduktion von  $t_1$ -Rauschen.
3. Die durch die Begrenzung des Dynamikbereichs des AD-Wandlers verursachten Probleme werden durch die Unterdrückung von unerwünschten Signalen vor der Akquisition eliminiert. Beispielsweise können  $^1\text{H}$ - $^{12}\text{C}$  Signale in einem HMQC Experiment ohne Einsatz der BIRD-Sequenz unterdrückt werden.
4. Die Wasserunterdrückung ist unabhängig von Linienform oder Shim. Resonanzen an derselben Position wie die Frequenz des Wassers können detektiert werden.

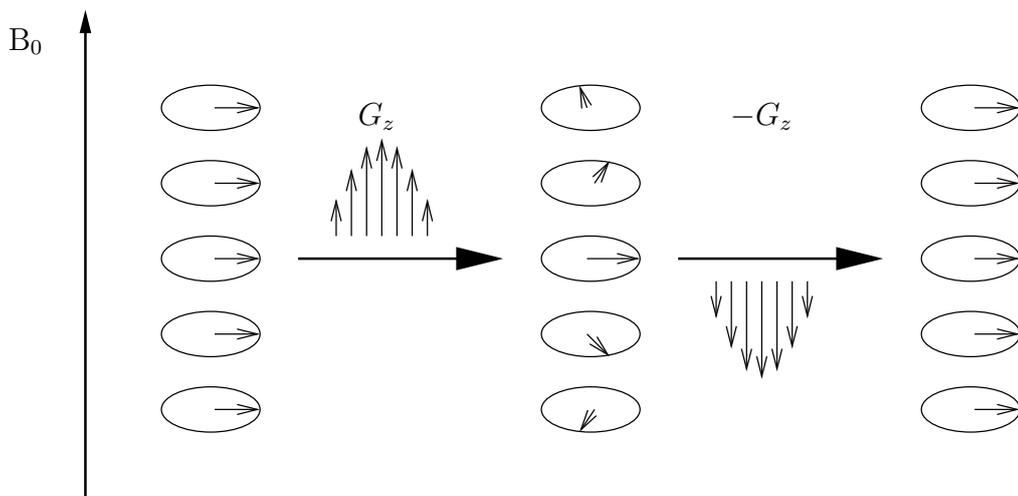


Abbildung 4.4: Schematische Erklärung der Wirkung von gepulsten Feldgradienten.  $G_z$  führt zu einer Dephasierung, die durch  $-G_z$  rephasiert wird.

Wie in Abb. 4.4 dargestellt, induziert ein Feldgradient entlang der  $z$ -Achse eine  $z$ -Abhängigkeit der Resonanzfrequenzen und somit eine Phasenabhängigkeit der Magnetisierung [26]. Nachdem ein Gradient gepulst wurde, oszillieren die Spins mit der Phase, die sie durch den Gradienten erhalten haben. Nach Anwendung eines zweiten Pulses mit entgegengesetztem Vorzeichen kann ein normales Spektrum registriert werden. Eine durch PFG verursachte Dephasierung kann somit durch einen zweiten PFG wieder rephasiert werden.

Dieses Prinzip ermöglicht einen weiten Bereich an Anwendungstechniken. Da Dephasierung und Rephasierung von den  $\gamma$ -Faktoren und der Kohärenzordnung im Augenblick der Anwendung der Gradientenpulse abhängig sind, können Kohärenzen durch eine Änderung der Kohärenzordnung zwischen den Gradientenpulsen mit geeigneten rf-Pulsen selektiert werden.

Die selektive Beobachtung von Signalen der gewünschten Kohärenz-Transferwege wird in Techniken, die keine PFG verwenden, durch die Addition und Subtraktion von Scans erreicht, in denen die Phasen der rf-Pulse oder des Empfängers geändert werden ("phase cycling"). Der wesentliche Nachteil besteht in der längeren Meßzeit, um einen Datensatz aufzunehmen und der höheren Anfälligkeit gegenüber Spektrometerinstabilitäten.

### 4.3.2 Kohärenz-Transferwege

Jede Kohärenz (s. Kap. 5) eines Spinsystems ist mit einer Quantenzahl verknüpft. Diese Quantenzahl wird als Kohärenzordnung bezeichnet. Transversale Magnetisierung entspricht einer Einquanten-Kohärenz: Sie hat die Kohärenzordnung von 1 und ist in NMR-Experimenten direkt beobachtbar. Doppelquantenkohärenz entspricht Übergängen mit einer Kohärenzordnung von 2. Nullquantenkohärenz entspricht Übergängen der Kohärenzordnung 0. rf-Pulse können Kohärenz von einer Ordnung zu einer anderen Ordnung transferieren, während bei der freien Präzession die bestehende Kohärenzordnung bestehen bleibt.

In Kap. 4.2.1 wurde ein Liouville-Operator-Raum für ein 2-Spin-System mit den kartesischen Drehmoment-Operatoren  $I_x, I_y, I_z$  und dem Einheits-Operator aufgespannt. In einigen Fällen, insbesondere bei der Mehrquantenspektroskopie ist es sinnvoll, eine andere Basis zu verwenden, die aus den Operatoren  $I^+, I^-, I_z$  und dem Einheits-Operator besteht.

$$I^+ = I_x + iI_y \quad (4.44)$$

$$I^- = I_x - iI_y \quad (4.45)$$

Die Operatoren  $I^+$  und  $I^-$  werden als Eielementoperatoren bezeichnet. Der Vorteil dieser neuen Basis besteht darin, daß nun jeder Produkt-Operator in Beziehung zu einer Einquanten-Kohärenz steht. Die kartesischen Produktoperatoren enthalten immer einen Satz von Kohärenzordnungen [117]. Beispielsweise enthalten  $I_x$  und  $I_y$  jeweils die Summe

aus positiver und negativer Einquanten-Kohärenz:  $I_x = \frac{1}{2}(I^+ + I^-)$ ;  $I_y = -\frac{1}{2}(I^+ - I^-)$  (s. Abb. 4.5).

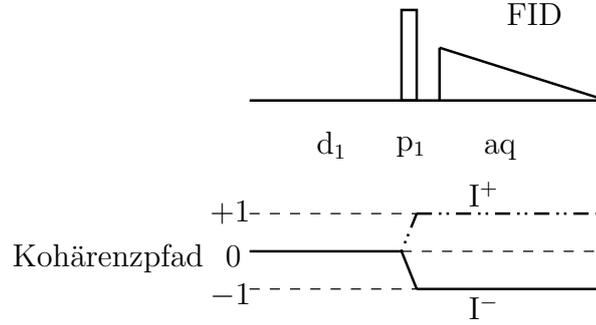


Abbildung 4.5: Kohärenzweg-Diagramm für die Anregung mit einem  $90^\circ$ -Puls. Die detektierte Kohärenz entspricht der durchgezogenen Linie,  $d_1 =$  Relaxationszeit,  $p_1 = 90^\circ$ -Anregungspuls,  $t_a =$  Akquisitionszeit

Das phasensensitive Quadratur-NMR-Signal detektiert die Einquanten-Kohärenz  $I^-$ , wobei die rf-Pulse innerhalb einer Pulssequenz so gewählt werden müssen, daß der gewünschte Kohärenzweg bei  $I^-$  endet. Die einzelnen PFG innerhalb einer Pulssequenz werden daher so gewählt, daß Kohärenzen, die nicht der gewünschten Ordnung entsprechen, nicht rephasiert werden [202].

Betrachtet man ein System im Zustand  $\sigma$  in einem homogenen Magnetfeld  $B_0$  zum Zeitpunkt  $t$  für die Dauer  $\tau$ , so ergibt sich für die Elemente des Dichte-Operators mit der Kohärenzordnung  $p$  aus Gleichung 4.27:

$$\sigma_p(t + \tau) = \exp(-ip\gamma B_0\tau)\sigma_p(t) \quad (4.46)$$

Ein PFG stellt eine vom Ort  $r$  abhängige Änderung  $\Delta B_z(r)$  des angelegten Magnetfeldes  $B_0$  dar [188]. In diesem Fall ergibt sich:

$$\sigma_p(t + \tau) = \exp(-ip\gamma(B_0 + \Delta B_z(r))\tau)\sigma_p(t) \quad (4.47)$$

$$= \exp(-ip\gamma B_0\tau)\exp(-ip\gamma\Delta B_z(r)\tau)\sigma_p(t) \quad (4.48)$$

Der Einfluß gepulster Feldgradienten kann also als eine Addition eines ortsabhängigen Phasenterms zur Entwicklung von  $\sigma$  betrachtet werden. Wesentlich für die Kohärenzselektion ist dabei, daß dieser Phasenoffset linear von der Kohärenzordnung  $p$  abhängig ist. Betrachtet man einen Kohärenzweg mit  $n$  Zuständen der Ordnung  $p_n$  und  $n - 1$  Übergängen, so ergibt sich die Phasenbeeinflussung:

$$\Delta P = \prod_{j=1}^n \exp(-ip_j\gamma B_{zj}(r)\tau_j) = \exp(-i\gamma \sum_{j=1}^n p_j B_{zj}(r)\tau_j) \quad (4.49)$$

Als Bedingung für eine Rephasierung ( $\Delta P = 1$ ) gilt somit:

$$\sum_{j=1}^n p_j B_{zj}(r) \tau_j = 0 \quad (4.50)$$

Diese Selektion von Kohärenz-Transferwegen durch PFG kann zur Eliminierung von "phase cycling", Reduzierung von Artefakten und verbesserter Lösungsmittelunterdrückung herangezogen werden.

### 4.3.3 Das HMQC-Experiment

Das HMQC-Experiment findet Anwendung in der Zuordnung heteronuklearer Konnektivitäten durch die Detektion des empfindlicheren Kerns. Das System kann nach der Kohärenz-Echo-Bedingung zur Berechnung geeigneter PFG behandelt werden, wobei separate Kohärenzlevel für die individuellen Kerne berücksichtigt werden müssen. Für Kerne mit geringerer natürlicher Häufigkeit sind die möglichen Kohärenzlevel üblicherweise auf 0 und  $\pm 1$  beschränkt.

Die Selektion eines Kohärenz-Transferweges kann durch einen einzigen Scan erreicht werden. Die Artefakte und  $t_1$ -Rauschen, das durch "phase cycling" entsteht, werden reduziert, da Subtraktions- und Additionsfehler eliminiert werden. Der Nachteil der Feldgradientenspektroskopie besteht darin, daß in einigen Anwendungen ein Verlust der Signalintensität auftritt. Während bei "phase cycling" verschiedene Ordnungen durch geeignete Phaseninkrementierung simultan aufgenommen werden können, wird bei der PFG-Technik nur ein einziger Wert der Kohärenzordnung aufgenommen. Soll beispielsweise ein zweidimensionales reines Absorptionsspektrum erhalten werden, so müssen zwei separate Spektren aufgenommen werden: ein Spektrum, das den Kohärenzlevel  $+n$  während  $t_1$  selektiert und ein Spektrum, das den Kohärenzlevel  $-n$  selektiert. Jedes dieser Spektren besitzt die unerwünschte phase-twisted Linienform. Die beiden Spektren können während der Datenprozessierung zu einem reinen Absorptionsspektrum kombiniert werden [202].

Um die geeigneten Gradientenverhältnisse für heteronukleare Systeme mit der Bedingung für die Bildung von Kohärenz-Transferechos zu berechnen, ist es nützlich, einen modifizierten Kohärenzlevel  $p'$  nach der Gleichung

$$p' = p_{(H)} + p_{(X)} \frac{\gamma_{(X)}}{\gamma_{(H)}} \quad (4.51)$$

zu berechnen, wobei  $p_{(H)}$ ,  $p_{(X)}$  die Kohärenzlevel für das Proton und den X-Kern bei einem spezifischen Kohärenz-Transferschritt sind. Um ein Kriterium für die Selektion von Kohärenz-Transferwegen zu erhalten, setzt man  $p'$  in Gleichung 4.50.

$$\sum_{j=1}^n p'_j B_{zj}(r) \tau_j = 0 \quad (4.52)$$

Die rf-Pulssequenz, Gradientenpulse und Kohärenz-Transferwege für das HMQC-Experiment sind in Abb. 4.6 dargestellt [37] [202]. Es existieren zwei mögliche Kohärenz-Transferwege, die zu dem FID-Signal führen. Zur Berechnung der modifizierten Kohärenz-

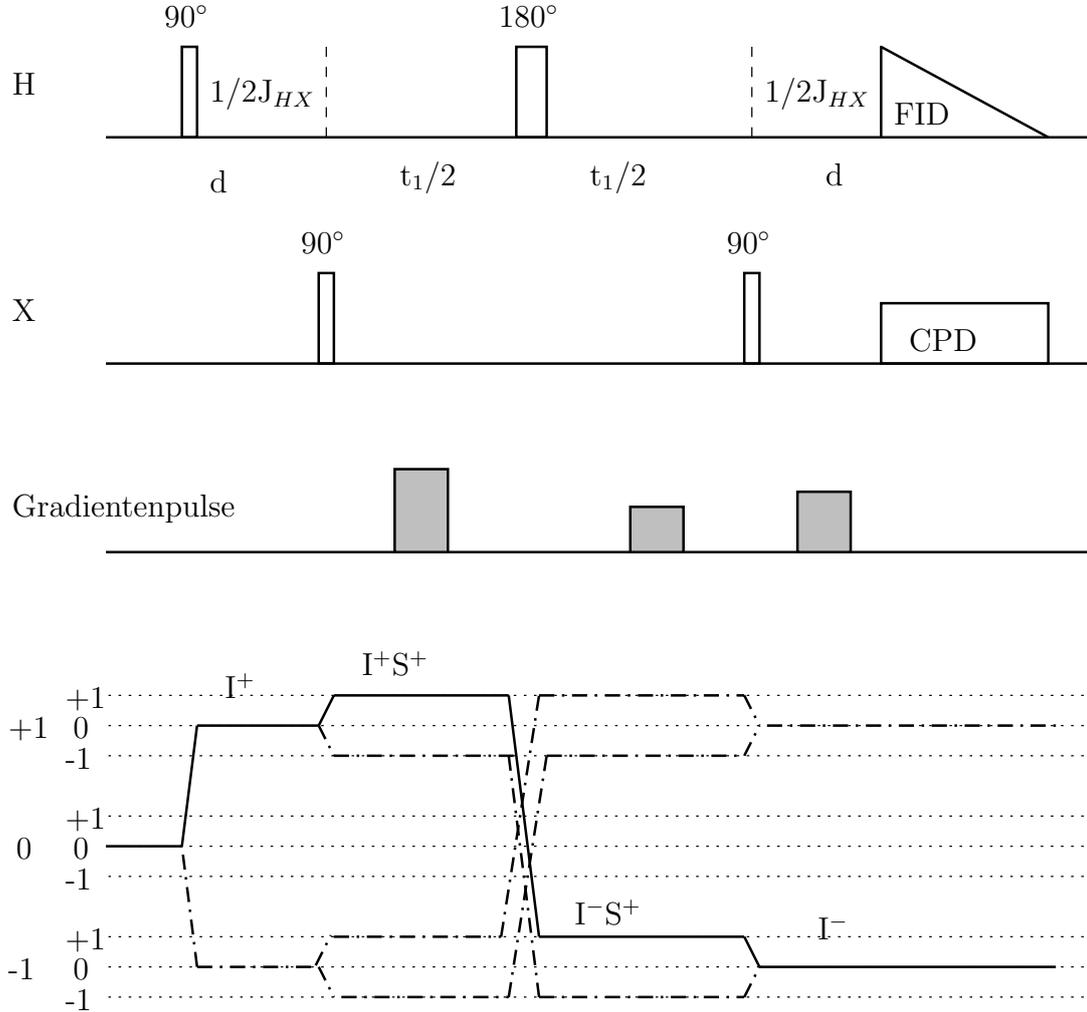


Abbildung 4.6: Die HMQC-Pulssequenz mit Gradientenpulsen und den selektierten Kohärenz-Transferwegen.

level gilt für eine ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )-Korrelation näherungsweise  $\gamma_C = \frac{1}{4}\gamma_H$ . Die modifizierten Kohärenzlevel entlang des Kohärenzweges sind also  $p'_1 = \{0, 1, 1.25, -0.75, -1\}$  und  $p'_2 = \{0, 1, 0.75, -1.25, -1\}$ . Werden die drei PFGs  $G_1$ ,  $G_2$  und  $G_3$  mit  $G_j = B_{zj}(r)\tau_j$  eingeführt, so lauten die Gradientenbedingung für die Selektion der Kohärenzwege:

$$1.25G_1 - 0.75G_2 - G_3 = 0 \quad (4.53)$$

$$0.75G_1 - 1.25G_2 - G_3 = 0 \quad (4.54)$$

Verschiedene Sätze von PFG können benutzt werden, um diese Kohärenzwege auszuwählen. Für den Kohärenzweg  $p_1$  (Gleichung 4.53) könnten die Gradientenverhältnisse  $G_1:G_2:G_3 =$

2:2:1, 0:4:-3, 4:0:5, 3:5:0 oder 5:3:4 gewählt werden. Jede dieser Kombinationen führt zur Selektion eines bestimmten Kohärenzweges, der zu einem Magnituden-HMQC-Spektrum führt. Ein reines Absorptionsspektrum kann erhalten werden, wenn die Beiträge von zwei symmetrischen Kohärenzwegen mit entgegengesetztem Vorzeichen in der Evolutionsdimension  $t_1$  kombiniert werden, um ein Signal zu erhalten. Eine übliche Methode dafür ist, beide Gradientensätze abwechselnd aufzunehmen und die beiden Scans zu addieren, um beide Wege zu detektieren. Beispielsweise kann durch die Aufnahme von Scans mit den Gradientensätzen  $G_1:G_2:G_3 = 2:2:1$  und  $G_1:G_2:G_3 = 2:2:-1$  ein reines Absorptionsspektrum erhalten werden. Hierbei wird das Signal-Rausch-Verhältnis um  $\sqrt{2}$  gegenüber konventionellen "phase-cycling" Experimenten erniedrigt.

#### 4.3.4 Das HSQC-Experiment

Ein linearer Feldgradient beeinflusst Einquanten- und Mehrquanten-Magnetisierung. Der damit verbundene Effekt ist proportional zu der Kohärenzordnung, d.h. ein PFG dephasiert Doppelquanten-Magnetisierung doppelt so schnell wie Einquanten-Magnetisierung.

Um ein phasensensitives HSQC-Spektrum zu erhalten, werden die Echo- (bei einem Verhältnis der Gradienten in ( $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ )-korrelierten Spektren von +4: +1) und die Antiecho-Signale (Gradientenverhältnis -4: +1) getrennt in verschiedenen Blöcken registriert (s. Abb. 4.7). Vor dem zweiten  $90^\circ$ -Puls auf die Protonen kann ein Spinlock-Puls eingebaut werden, der die Magnetisierung dephasiert, die nicht entlang der  $x$ -Achse orientiert ist.

Eine erweiterte gs-HSQC-Pulsfolge mit erhöhter Empfindlichkeit [116] [149] [148] ist insbesondere für die Aufnahme heteronuklear korrelierter Spektren von Proteinen von Bedeutung (PEP-Methode: preservation of equivalent pathways). Die für die Untersuchung der Gerüststruktur von Proteinen wichtigen  $\text{CH}_\alpha$ -Signale sind gegenüber der "phase-cycling" HSQC-Methode um  $\sqrt{2}$  empfindlicher und doppelt so empfindlich wie die Standard-Echo-Antiecho-HSQC-Methode.



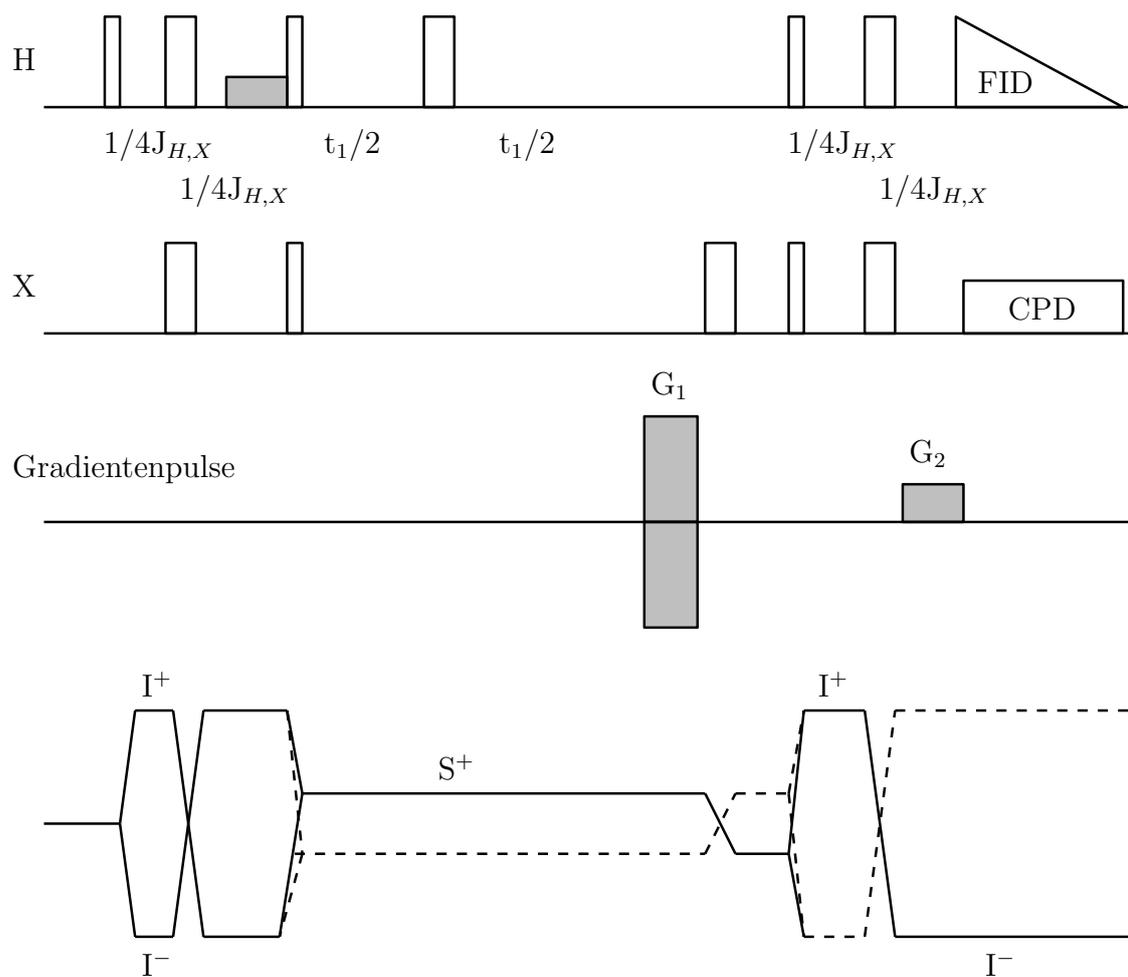


Abbildung 4.7: Die HSQC-Pulssequenz mit Gradientenpulsen

## 4.4 Experimentelle Aspekte der FT-NMR-Spektroskopie

Ein entscheidender Fortschritt in der NMR-Spektroskopie wurde durch die Impulsspektroskopie erreicht. Die Aufnahmezeit konnte dramatisch verkürzt und damit die Empfindlichkeit erhöht werden. Es wurden eine Vielzahl an Mehrpulseexperimente und die zweidimensionale NMR-Spektroskopie entwickelt, wobei man, je nach gewünschtem Ergebnis die verschiedensten Impuls-Sequenzen verwendet.

Beim Impulsverfahren werden in der Probe durch einen Hochfrequenzimpuls gleichzeitig alle Kerne einer Sorte angeregt (z.B. sämtliche Protonen oder  $^{13}\text{C}$ -Kerne). Um Informationen über die Phase eines angeregten Spinzustandes eines phasensensitiven Experiments zu erhalten, wird das elektronische Signal einem phasensensitiven Detektor zugeführt. Anschließend werden die Signale digitalisiert und weiterverarbeitet. Diese nach der Akquisition im Computer gespeicherten Signale werden einer digitalen Filterung (Kapitel 4.4.2) unterworfen, Nullpunkt gefüllt (Kapitel 4.4.2) und Fourier-transformiert (Kapitel 4.4.1). Um reine Absorptionslinien zu erhalten, wird im Anschluß eine Phasenkorrektur durchgeführt (Kapitel 4.4.3).

### 4.4.1 Die Fourier-Transformations-Technik

In der modernen Impuls-NMR-Spektroskopie werden die NMR-Signale aller Kerne einer Sorte simultan aufgenommen und als eine Funktion der Zeit im Computer gespeichert. Die zeitabhängige Spannung  $f(t)$ , die im Detektor registriert und im Computer in digitaler Form gespeichert wird, wird FID (free induction decay) genannt. Der FID enthält sowohl die Resonanzfrequenzen als auch die Intensitäten des Spektrums in der Zeitdomäne. Zur Interpretation des Informationsgehalts werden die registrierten Meßpunkte mittels Fourier-Transformation FT in die Frequenzdomäne überführt. Die Fouriertransformierte  $F(\omega)$  der Funktion  $f(t)$  ist gegeben durch [201]

$$F(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) e^{-i\omega t} dt \quad (4.55)$$

$$= \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) [\cos(\omega t) - i \sin(\omega t)] dt \quad (4.56)$$

$$= \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \left[ \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \cos(\omega t) dt - i \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \sin(\omega t) dt \right] \quad (4.57)$$

Im folgenden werden mit GROSSBUCHSTABEN die komplexwertigen Fouriertransformierten  $F(\omega)$  der betreffenden Funktionen  $f(t)$  bezeichnet. Realteil und Imaginärteil entsprechen dabei den Signalanteilen mit einem Phasenunterschied von  $90^\circ$ .

Gleichung 4.55 beschreibt die kontinuierliche Transformation, deren Integrationsgrenzen zwischen  $-\infty$  und  $+\infty$  liegen. In der FT-NMR-Spektroskopie wird die diskrete Fourier-

Transformation verwendet.

$$F(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \sum_0^t f(t) e^{-i\omega t} \quad (4.58)$$

Um den Butterfly- oder Cooley-Tukey-Algorithmus für die Fast Fourier Transformation (FFT) anwenden zu können, muß die Zahl der Datenpunkte einer Zweierpotenz entsprechen.

## 4.4.2 Signalverarbeitung: Digitale Filterung, Nullpunktfüllung

### Digitale Filterung

In vielen Fällen kann die Qualität der Spektren durch eine geeignete Filterung verbessert werden. Der FID besteht aus mehreren sich überlagernden exponentiell gedämpften Schwingungen. Betrachtet man also ein einzelnes Signal, so kann dies in der Form

$$f(t) = e^{i\omega t} \cdot e^{-\frac{t}{T_2^*}} + n(t) \quad (4.59)$$

dargestellt werden. Dabei ist  $e^{i\omega t}$  die eigentliche Schwingung,  $T_2^*$  die Relaxationszeit und  $n(t)$  das Rauschen.

Der Zusammenhang zwischen Linienform im Spektrum und der Gestalt des FID ergibt sich dabei aus dem Faltungssatz: Die Fouriertransformierte des Faltungsprodukts zweier Funktionen ( $(f \star g)(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(y)g(t-y)dy$ ) ist bis auf den Faktor  $\sqrt{2\pi}$  gleich dem Produkt der Fouriertransformierten der einzelnen Faktoren [40]:

$$\frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} (f \star g)(t) e^{i\omega t} dt = \sqrt{2\pi} F(\omega) \cdot G(\omega) \quad (4.60)$$

$$g(t) \cdot f(t) \xrightarrow{FT} G(\omega) * F(\omega) \quad (4.61)$$

Kennt man die Fouriertransformierten der einzelnen Faktoren aus denen sich der FID zusammensetzt, so kennt man die zu erwartende Linienform im Spektrum. Der exponentielle Abfall  $e^{-\frac{t}{T_2^*}}$  führt zu einer Lorentz-Linienform. Ziel einer Filterung ist es, die verrauschten Lorentz-Linien des NMR-Spektrums zu glätten, um das S/N-Verhältnis zu verbessern. Der FID besteht aus zwei Anteilen: einer exponentiell abfallenden Wellenfunktion und einer "Rauschfunktion"  $n(t)$ , deren maximale Amplituden zeitlich konstant bleiben. Zu Beginn des FID ist somit das Signal-Rausch-Verhältnis besser, die spektrale Auflösung hingegen wegen der geringen Akquisitionszeit schlecht. Mathematisch läßt sich eine dieser Eigenschaften auf Kosten der anderen betonen. Diese digitale Filterung erreicht man durch Multiplikation des verrauschten FID mit einer Gewichtungsfunktion. Das Spektrum ergibt sich dementsprechend aus der Faltung des ursprünglichen Spektrums mit dem Spektrum der Gewichtungsfunktion. Da die Fourier-Transformierte der Exponential-Funktion eine Lorentz-Kurve ergibt, folgt aus Gleichung 4.59 eine dementsprechende Linienform im Spektrum.

Die Multiplikation eines FID mit einer Exponential-Funktion verändert die Breite der resultierenden Lorentz-Kurve im Spektrum und damit die Linienbreite. Das maximale Signal-Rausch-Verhältnis erzielt man mit:

$$g(t) = e^{-\frac{t}{T_2^*}} \quad (4.62)$$

Die Exponential-Funktion sollte also an den FID angepaßt werden (matched filter). Als digitale Filter werden folgende Verfahren (sog. window functions) verwendet [71]:

#### 1. exponentielle Multiplikation

- Ein matched filter maximiert die Empfindlichkeit (Signal-Rausch-Verhältnis) in ein- und zweidimensionaler Spektroskopie.
- Eine Erhöhung der Auflösung ist durch Verschmälerung der Resonanzlinien möglich.
- Oszillierende Signalfüße, die von dem Abschneiden des FIDs nach der vorgegebenen Akquisitionszeit herrühren, können durch Multiplikation mit einer Gewichtungsfunktion unterdrückt werden. Hierbei werden die Datenpunkte zu Beginn des FID stärker gewichtet. Die Datenpunkte am Ende des FID streben gegen Null.

2. Lorentz-Gauß-Transformation: Der FID wird mit der Dichtefunktion der Normalverteilung, der sogenannten Gaußfunktion<sup>6</sup> multipliziert. Man erhält NMR-Resonanzlinien mit gemischter Lorentz-Gauß-Linienform, die den Vorteil einer schmalen Signalbasis haben. Das führt zu einer besseren Trennung der Signale im Spektrum.

3. Multiplikation mit einer Sinus-Funktion: Der FID wird mit einer Sinus-Funktion multipliziert. Die Auflösung ist stark erhöht, das Signal-Rausch-Verhältnis sehr niedrig. Alternativ kann eine phasenverschobene Sinusfunktion gewählt werden. Dieses Verfahren wird häufig in der 2D-NMR-Spektroskopie verwendet.

### Nullpunktfüllen

Im allgemeinen wird ein aus N komplexwertigen Datenpunkten bestehender FID durch Fourier-Transformation in ein NMR-Frequenzspektrum mit N Datenpunkten überführt [108]. Die digitale Auflösung resultiert aus der Zahl der aufgenommenen Punkte im FID. Die Akquisitionszeit AQ ist gleich DW·N (DW = Dwelltime, N = Anzahl der aufgenommenen Punkte). Die digitale Auflösung in Hz ergibt sich zu  $\frac{1}{AQ}$ , d.h. wenn eine Auflösung

---

<sup>6</sup>Gauß'sche Glockenkurve

von 0.5 Hz erwünscht ist, muß die Akquisitionszeit 2 s betragen. Um die Linienform des NMR-Spektrums durch eine höhere Punktdichte besser zu beschreiben, muß die Akquisitionszeit und damit die gesamte Dauer der Messung erhöht werden. Um dies zu vermeiden, kann der FID aber auch künstlich verlängert werden, indem man ihn an den Enden mit Nullen auffüllt. Dies wird häufig bei 2D-NMR-Experimenten angewendet, in denen die Anzahl der  $t_1$ -Inkrementen keine Potenz von 2 ist. Dabei werden die FID-Datenpunkte auf die nächste Zweierpotenz aufgefüllt, um damit die FFT nach dem Cooley-Tukey-Algorithmus zu ermöglichen.

### 4.4.3 Phasenkorrektur

Ein NMR-Spektrum, das durch Fourier-Transformation eines FID erhalten wurde, ist komplexwertig. Im Idealfall zeigt der Realteil rein absorptive Signale und der Imaginärteil dispersive Signale. Unterschiedliche Phasenlagen der NMR-Signale führen in der Regel dazu, daß sowohl der Real- als auch der Imaginärteil des NMR-Spektrums aus einem Gemisch von Absorptions- und Dispersionsanteilen besteht. Dabei unterscheidet man zwei Arten von Phasenfehlern: konstante Abweichungen (Phasenfehler 0. Ordnung) und linear frequenzabhängige Abweichungen (Phasenfehler 1. Ordnung). Bei der Durchführung einer rechnerischer Phasenkorrektur werden durch Linearkombination von Real- und Imaginärteil Phasenfehler 0. und 1. Ordnung korrigiert. Man erhält damit ein NMR-Spektrum mit reinen Absorptionslinien.

## 4.5 Die zweidimensionale NMR-Spektroskopie

Die 2D-NMR-Spektroskopie hat vor allem im Bereich der Naturstoffe eine große Anwendungsbreite und Vielzahl von Einzelmethoden hervorgebracht.

Zweidimensionale Verfahren enthalten die spektrale Information als Funktion zweier unabhängiger Frequenzvariablen. Die resultierende Aufzeichnung ist dann dreidimensional: nämlich die spektrale Intensität als Funktion der chemischen Verschiebung auf der  $x$ -Achse und der zweiten Frequenz auf der  $y$ -Achse. Als Darstellung verwendet man Diagramme mit Linien gleicher Signalintensität, bei denen die NMR-Signale wie die Erhebungen auf einer geographischen Landkarte erscheinen.

Ein Signal  $s(t_1, t_2)$  wird als eine Funktion von zwei unabhängigen Zeit-Variablen gemessen und wird durch eine zweidimensionale Fouriertransformation in ein 2D Spektrum  $S(\omega_1, \omega_2)$  in der Frequenzdomäne transformiert. Das Signal  $s(t_1, t_2)$  wird durch Inkrementierung des Intervalls  $t_1$  erhalten und das FID-Signal als eine Funktion von  $t_2$  aufgenommen.

Pulssequenzen für die 2D-NMR-Spektroskopie kann man nach Abb. 4.8 in drei Phasen einteilen.

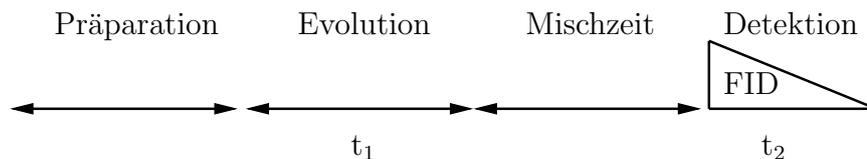


Abbildung 4.8: Schema für 2D-Experimente mit vier Intervallen, die zu einem Signal in der Zeitdomäne führen

1. In der Präparationszeit relaxiert das Spinsystem und wird durch einen einfachen Puls oder Polarisationstransfer aus der Gleichgewichtslage gebracht.
2. Es folgt die Evolutionszeit, während der das Spinsystem sich entwickelt und durch beliebige Pulssequenzen beeinflusst werden kann. Diese Evolutionsphase besitzt die Dauer  $t_1$ , welche in einem 2D-NMR-Experiment in festen Schritten inkrementiert wird.  
Refokussierung während der Evolutionszeit kann durch einen  $\pi$ -Puls erzielt werden.
3. Während der Mischzeit werden SQC, MQC, oder ZQC in observable Kohärenz transformiert.
4. Im Anschluß an die Evolutionsphase folgt die Detektionsphase  $t_2$ , in der das NMR-Signal aufgenommen wird. Die NMR-Signale sind also Funktionen  $s(t_1, t_2)$  von zwei

Zeitvariablen und werden in einer Matrix abgespeichert. Es erfolgt dann eine Fourier-Transformation der Zeilen und anschließend der Spalten dieser Matrix. Die resultierende Datenmatrix besteht nun aus den entsprechenden NMR-Signalen  $S(\omega_1, \omega_2)$  als Funktion der beiden Frequenzen  $\omega_1$  und  $\omega_2$ .

## 4.6 Die $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektroskopie

Die NMR-spektroskopische Identifizierung funktioneller Gruppen in polyfunktionalen organischen Verbindungen oder Mischungen ist oft eine schwierige Aufgabe, da die Kerne, die die Funktionen bilden, häufig keine charakteristische chemische Verschiebung aufweisen, an Austauschprozessen beteiligt oder schwierig zu messen sind. Um diese Probleme zu umgehen, werden chemische Reaktionen vor der NMR-spektroskopischen Untersuchung durchgeführt, die die NMR-Analyse unterstützen. Beispielsweise werden Methylierungen und Acetylierungen seit langem in der Analyse von Zuckern verwendet. Diese Reaktionen ersetzen die aziden Protonen funktioneller Gruppen, die schwierig zu bestimmen sind durch eine andere Gruppe, die leicht durch NMR-Spektroskopie detektierbar ist entweder direkt oder indirekt durch ihre Effekte auf das Spektrum des restlichen Moleküls [168].

Folgende charakteristische Eigenschaften der  $(\text{H}_3\text{C})_3\text{Si}$ -Substituenten sind für die Aufnahme und Zuordnung der  $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektren derivatisierter Substanzen von Bedeutung [168]:

- $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{29}\text{Si}$ -Kerne sind magnetisch aktiv und besitzen den Kernspin  $I = \frac{1}{2}$ .
- Die neun Protonen des  $(\text{H}_3\text{C})_3\text{Si}$ -Substituenten sind magnetisch äquivalent. Dies bewirkt in invers detektierten Korrelationsspektren eine sehr hohe Empfindlichkeit.
- TMS-Signale sind im  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum basisliniengetrennt, hochfeldseitig bezogen auf sämtliche anderen Resonanzen organischer Verbindungen.
- Der Gesamtbereich der Zweibindungskopplung  $^2\text{J}(\text{SiH})$  ist weitgehend substituentenunabhängig; für  $(\text{H}_3\text{C})_3\text{Si-O}$ -Gruppen beträgt er 6.3–7.7 Hz.
- Der Gesamtbereich der Dreibindungskopplung  $^3\text{J}(\text{Si,H})$  liegt für  $(\text{H}_3\text{C})_3\text{Si-O-CH}$ -Gruppen im Bereich von 2–4 Hz.
- Die  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{29}\text{Si}$  chemischen Verschiebungen der TMS-Fragmente sind empfindlich gegenüber der Molekülstruktur. Anhand charakteristischer chemischer Verschiebungen gelingt eine Differenzierung in Bezug auf silylierte aromatische und aliphatische Hydroxyl-Gruppen, primäre und sekundäre Alkohole und Carboxylgruppen.
- Die durch den Silyl-Substituenten in organischen Verbindungen induzierte chemische Verschiebung ist für  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Kerne sehr klein.
- Die  $T_1$ -Relaxationszeiten der  $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$ -Protonen sind kurz verglichen mit den entsprechenden  $T_1(^{29}\text{Si})$ -Werten, was eine schnelle Wiederholungsrate von Polarisationstransfer-Experimenten erlaubt.



- Die  $\delta$  ( $^{29}\text{Si}$ )-Werte korrelieren mit den  $\text{pK}_a$ -Werten von Carbonsäuren (bzw. mit der Elektronenanziehung der Substituenten), höhere Säurestärke bewirkt Entschirmung.
- Im Gegensatz zu den stark überlagerten  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren derivatisierter HS liegen die Signale von Silylethern und Silylestern im  $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektrum voneinander getrennt.

### 4.6.1 Eigenschaften des $^{29}\text{Si}$ -Kerns

Der  $^{29}\text{Si}$ -Kern als einziger NMR-aktiver Si-Kern mit  $I = \frac{1}{2}$  besitzt eine natürliche Häufigkeit von 4.70 % . Die relative Empfindlichkeit beträgt  $3.7 \cdot 10^{-4}$  und ist damit 2.1-fach größer als die von  $^{13}\text{C}$ -Kernen. Das gyromagnetische Verhältnis  $\gamma$  von  $^{29}\text{Si}$  ist negativ (-0.55477), was für Experimente mit Protonenentkopplung bedeutet, daß der NOE negativ ist, und somit eine Verringerung der Intensität bewirkt. Aufgrund des relativ kleinen Werts von  $\gamma$  ist die Energiedifferenz zwischen den Spinzuständen und daher auch die Boltzmann Populationsdifferenz klein. Große Spin-Gitter-Relaxationszeiten  $T_1$  verlangen lange Relaxationswartezeiten zwischen den rf-Pulsen.

### 4.6.2 Polarisationstransfer-Experimente

Polarisationstransfer-Experimente, wie INEPT- und DEPT-Techniken können die Signalintensität erheblich erhöhen. Die Empfindlichkeitsverstärkung wird durch Polarisationstransfer von Protonen via X,H-Spinnkopplung erreicht. Die Impulsfolge für das INEPT-Experiment zeigt Abb. 4.1. Für die Verstärkung ist der Quotient der gyromagnetischen Verhältnisse  $\gamma(^1\text{H}) : \gamma(^{29}\text{Si})$  verantwortlich und ist unabhängig vom Vorzeichen von  $\gamma$ . Das refokussierte INEPT-Experiment unterscheidet sich vom normalen INEPT dadurch, daß die Detektion erst nach einer Wartezeit von  $2 \cdot d_2$  erfolgt, wobei nach der halben Zeit  $d_2$  noch jeweils ein  $180^\circ$ -Puls im  $^1\text{H}$ - und  $^{29}\text{Si}$ -Kanal eingeschoben wird. Die Signale können aber auch durch eine ergänzende Spinechosequenz refokussiert und mit positiver Phase als "normale" Multipletts oder in Verbindung mit  $^1\text{H}$ -Entkopplung als Singulets dargestellt werden. Dabei gelten für  $A_n\text{X}$ -Spinsysteme verschiedene Echozeiten  $d_2$ . Da durch die Refokussierung die Linien der Multipletts die gleiche Phase haben, kann der Entkoppler während der Detektion eingeschaltet werden, so daß die Linien zu Singulets zusammenfallen.

Der Vorteil von INEPT ist wie bei anderen Polarisationstransfer-Techniken auch, daß die Wiederholungsrate der einzelnen Pulsfolgen von den  $T_1$ -Relaxationszeiten der Protonen abhängt, die wesentlich kleiner ist als die der  $^{29}\text{Si}$ -Kerne. Als Nachteil der INEPT-Experimente gegenüber der DEPT-Sequenzen erweist sich die größere Empfindlichkeit gegenüber J-Variationen innerhalb einer Verbindung, da zwei INEPT-Parameter von J

abhängen, in der DEPT-Sequenz dagegen nur ein Parameter. Trotzdem können für  $^{29}\text{Si}$ -INEPT-Experimente trimethylsilylierter Substanzen nahezu quantitative Spektren erwartet werden, denn die Kopplungskonstante ist bei allen TMS-Gruppen nahezu gleich. Bei optimaler Parameterwahl beträgt der Verstärkungsfaktor 9.4 für die TMS-Gruppen.

Obwohl die DEPT-Sequenz weniger Pulse beinhaltet, ist die Dauer der Sequenz doppelt so lange wie die INEPT-Pulssequenz. Der Erfolg eines Polarisationstransfer-Experiments hängt entscheidend von der Relaxationszeit des empfindlicheren Kerns ab. Sie muß lang genug sein, um eine Rückentwicklung der Spinpopulation zum Gleichgewichtszustand während der Pulsfolge zu verhindern. Für HS, die aufgrund ihrer Molekülgröße schnell relaxieren, ist daher die INEPT-Sequenz gegenüber der DEPT-Sequenz von Vorteil [30].

Der Verstärkungsfaktor von 9.4 bewirkt, daß nur etwa  $\frac{1}{(9.4)^2}$  der Akquisitionen für gleiches Signal-Rausch-Verhältnis eines Einpuls experimentes nötig ist. Da die Wiederholungsrate von Polarisationstransfer-Experimenten nur von der  $T_1$ -Relaxationszeit der Protonen abhängt, die 4–10 mal kleiner ist als die des  $^{29}\text{Si}$ -Kerns, ist die Gesamteffizienz der Messungen bis 800 fach größer verglichen mit Einpuls experimenten.

Für die quantitative Analyse müssen zwei mögliche Fehlerquellen berücksichtigt werden: mit festgelegter Polarisationszeit und Refokussierungswartezeit ist die INEPT-Verstärkung jeder  $^{29}\text{Si}$ -Linie abhängig von der aktuellen Kopplungskonstante von  $^{29}\text{Si}$  und  $^1\text{H}$  im gegebenen  $\text{CH}_n\text{-X-Si}(\text{CH}_3)_3$ -Fragment. Die zweite Fehlerquelle ist die Relaxation während der Dauer der INEPT-Pulssequenz, welche die Intensitäten verschiedener  $^{29}\text{Si}$ -Linien in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusst. In [169] wurden die Verstärkungsfaktoren für verschiedene Kombinationen von Kopplungskonstanten ermittelt. Die Abweichung von quantitativen Einpulspektren beträgt maximal 20 %.

In polyfunktionellen Verbindungen können die  $^{29}\text{Si}$ -NMR-Signale überlagert oder die Zuordnung nicht möglich sein. Zweidimensionale heteronuklear korrelierte NMR-spektroskopische Techniken können zur Interpretation von  $^{29}\text{Si}$ - und  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren hinzugezogen werden. In [136] werden sowohl  $^2\text{J}(^{29}\text{Si-C-}^1\text{H})$ -Korrelationspektren ( $^2\text{J} = 6.9$ ) als auch Weitbereichsexperimente mit  $^3\text{J}(^{29}\text{Si-O-C-}^1\text{H}) = 3.5$  Hz zur Zuordnung der  $^{29}\text{Si}$ - und  $^1\text{H}$  Linien aller TMS-Gruppen von TMS-substituierten Zuckern verwendet. Für die 2D heteronuklear korrelierten Spektren eines Zuckers wurden in [145] die Kopplungskonstanten  $^2\text{J} = 6.6$  Hz und  $^3\text{J} = 3.0$  Hz gewählt.

## 4.7 Die $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektroskopie

Trotz der für die NMR-Spektroskopie ungünstigen Eigenschaften wie der geringen natürlichen Häufigkeit und des Quadrupolmomentes gewinnt die  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektroskopie zunehmend an Bedeutung [27] [140]. Als zentrales Element in der organischen und anorganischen Chemie besteht großes Interesse an der Charakterisierung von Sauerstoff in Verbindungen.

### 4.7.1 $^{17}\text{O}$ -Kerneigenschaften und daraus resultierende meßtechnische Besonderheiten

Die Kerneigenschaften des  $^{17}\text{O}$ -Kerns und NMR-Parameter sind in Tabelle 4.1 zusammengestellt [27] [140].

Tabelle 4.1:  $^{17}\text{O}$ -Kerneigenschaften und Meßparameter

Kernspin $I$	5/2
gyromagnetisches Verhältnis $\gamma$ [ $10^{-7}$ rad T $^{-1}$ s $^{-1}$ ]	-3.628
elektrisches Quadrupolmoment [eQ] [ $10^{-28}$ m $^2$ ]	$-2.6 \cdot 10^{-2}$
natürliche Häufigkeit [%]	0.037
NMR-Frequenz ( $B_0 = 2.3$ T) [MHz]	13.557
Bereich chemischer Verschiebung [ppm]	1500
relative Empfindlichkeit gegenüber $^1\text{H}$ bei natürlicher Häufigkeit	$1.08 \cdot 10^{-5}$
relative Empfindlichkeit gegenüber $^{13}\text{C}$ bei natürlicher Häufigkeit	$6.11 \cdot 10^{-2}$
Referenzsubstanz	H $_2$ O

In Flüssigkeiten und Lösungen mitteln sich die quadrupolaren Wechselwirkungen heraus und die Resonanzfrequenz des  $^{17}\text{O}$ -Kerns wird nur durch die chemische Abschirmung und J-Kopplung bestimmt. Von zentraler Bedeutung für die  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektroskopie ist der Quadrupol-Relaxationsmechanismus, der die Akquisition und Prozessierung der  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektren wesentlich beeinflusst.

### 4.7.2 Quadrupoleigenschaften, Relaxation, Linienbreite

Kerne mit einem Kernspin  $I > \frac{1}{2}$  relaxieren in Lösungen durch Wechselwirkung mit ihrem elektrischen Quadrupolmoment, damit verbunden sind kurze  $T_1$ - bzw.  $T_2$ -Relaxationszeiten. Im Bereich des "motional narrowing limit"  $\omega_0^2 \tau_c^2 \ll 1$ , welcher für kleine Moleküle in wenig viskosen Lösungen gültig ist, wird der Quadrupol-Relaxationsmechanismus durch Gleichung

4.63 beschrieben [87]:

$$\frac{1}{T_{1Q}} = \frac{1}{T_{2Q}} = \frac{3}{125} \left(1 + \frac{\eta^2}{3}\right) \left(\frac{e^2qQ}{\hbar}\right)^2 \tau_c \quad (4.63)$$

wobei  $\omega_0$  die Larmor-Frequenz des  $^{17}\text{O}$ -Kerns,  $\tau_c$  die Korrelationszeit für die isotrope molekulare Reorientierung,  $\frac{e^2qQ}{\hbar}$  die nukleare Quadrupol-Kopplungskonstante und  $\eta$  der Asymmetrie-Parameter  $\eta = (q_{xx} - q_{yy})/q_{zz}$  des elektrischen Feldgradienten ist. In der Quadrupol-Kopplungskonstanten bedeuten  $e$  die Ladung des Elektrons,  $Q$  das Quadrupolmoment und  $q$  der elektronischen Feldgradiententensor am Kernort. Bei großen Quadrupol-Kopplungskonstanten sind breite Linien zu erwarten. Die Quadrupol-Kopplungskonstanten hängen ab von der Symmetrie der Elektronenhülle um den Kern, d.h. vom Bindungszustand des Sauerstoffs. Der einzige Parameter, auf den der Spektroskopiker einen Einfluß hat, ist die molekulare Korrelationszeit  $\tau_c$  [27].

Der Einfluß der Molekülgröße und -gestalt findet sich in der molekularen Reorientierungszeit, auch Korrelationszeit  $\tau_c$  genannt. Aufgrund der Molekülbewegung sind die Kernspins statistisch schwankenden Zusatzfeldern ausgesetzt. Fallen die Reorientierungszeiten der Moleküle in die Größenordnung der reziproken Larmor-Frequenz der Kernspins, so können diese in Resonanz mit den durch die Molekülbewegung hervorgerufenen lokalen Magnetfeldern treten und ihre Energie an das Gitter abgeben. Große, ausgedehnte Moleküle benötigen beispielsweise für die Reorientierung einer Rotationsbewegung mehr Zeit als kleine, kompakte Moleküle,  $\tau_c$  nimmt große Werte an. Entsprechend hat die Viskosität der Lösung von großen Molekülen einen Einfluß auf Reorientierungszeit  $\tau_c$  und damit auf Relaxationszeiten und Linienbreiten [75]. Die Rotations-Korrelationszeit ist linear abhängig von der Viskosität der Lösung [33]. Die Linienbreiten von  $^{17}\text{O}$ -NMR-Signalen liegen im Bereich von 20 bis 300 Hz. Bei Lösungen mit hoher Viskosität können die Linienbreiten mehr als 1 kHz betragen. Durch Temperaturerhöhung bzw. Viskositätserniedrigung läßt sich die molekulare Reorientierungszeit  $\tau_c$  verkürzen und somit eine Verkleinerung der Linienbreite erreichen.

Kurze  $T_1$ - bzw.  $T_2$ -Relaxationszeiten ermöglichen kleine Pulswiederholungsraten, so daß die Aufnahme von  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektren trotz der geringen natürlichen Häufigkeit möglich ist.

Trotz dieser meßtechnischen Schwierigkeiten konnten sogar bereits zweidimensionale ( $^{17}\text{O}, ^1\text{H}$ ) heteronuklear korrelierte NMR-Spektren kleiner Moleküle mit  $^{17}\text{O}$ -Relaxationszeiten über 5 ms aufgenommen werden [171]. Die 2D-( $^{17}\text{O}, ^1\text{H}$ )-NMR-Experimente erlauben eine Unterscheidung zwischen Hydroxyl- und Ethersauerstoffresonanzen.



Hochfrequenzpulses her und verhält sich im Empfänger des NMR-Gerätes wie ein breites NMR-Signal, welches häufig stärker als das zu messende Signal ist.

Ist die Relaxationszeit des zu messenden Kernresonanzsignals länger als das Probenkopfklingeln, kann zur Verbesserung der Basislinie eine Wartezeit zwischen Ende des HF-Pulses und Beginn der Datenaufnahme (Preakquisitions-Delay) geschaltet oder die ersten Datenpunkte des FID ignoriert werden. Das Signal-Rausch-Verhältnis nimmt dabei ab. Datenpunkte, die während der Wartezeit nicht berücksichtigt wurden, können nach dem Linear-Prediction-Verfahren aus den verbleibenden Datenpunkten des FID errechnet und korrigiert werden [133].

Ist die Relaxationszeit des NMR-Signals jedoch von gleicher Größenordnung wie die Dauer der Kopfresonanzen, so wählt man spezielle Pulssequenzen, die zur Vermeidung der Artefakte eingesetzt werden. Eine Pulssequenz, die häufig zur Unterdrückung des "acoustic ringing" verwendet wird, ist die RIDE-Pulssequenz (ring down elimination). Die Pulssequenz beruht auf der Tatsache, daß das Probenkopfklingeln unabhängig von jedem vorherigen Puls ist, während das Kernresonanz-Signal in eindeutiger Weise durch die vorhergegangenen Pulse bestimmt wird [27].

## 4.8 Die on-line LC-NMR-Kopplung

Die NMR-Spektroskopie ist die bedeutendste spektroskopische Technik, um detaillierte strukturelle Information über organische Komponenten in Lösung zu erhalten. Die Identifikation der einzelnen Komponenten von Mischungen durch 1D und 2D NMR-Experimente benötigt Methoden, die die Signalüberlappung erheblich reduziert.

Zwei wesentliche Nachteile sind bei der Aufnahme von konventionellen NMR-Spektren gegenüber anderen Analyseverfahren zu berücksichtigen: Der eine Nachteil besteht in der relativen Unempfindlichkeit der Methode im Vergleich zu anderen spektroskopischen Techniken, der andere ist die starke Überlagerung von  $^1\text{H}$ -NMR-Signalen von Mischungen, die eine Zuordnung der Signale zu den einzelnen Komponenten weitgehend verhindert. Eine Separation sollte daher einer NMR-spektroskopischen Untersuchung vorgeschaltet werden. Die Kopplung von Chromatographie und NMR-Spektroskopie ermöglicht die direkte Untersuchung einzelner Komponenten einer Mischung ohne zwischengeschaltete Schritte oder Lagerung. Feuchtigkeitsempfindliche oder instabile Substanzen können somit in kürzester Zeit und ohne Luftkontakt nach einem chromatographischen Schritt in eine NMR-Zelle überführt und gemessen werden.

# Kapitel 5

## Literaturüberblick: NMR-spektroskopische Untersuchungen von Huminstoffen und Huminstoff-relevanten Verbindungen

Wegen seines einzigartigen biosynthetischen Ursprungs ist es nicht möglich, eine eindeutige, definierte strukturelle Beschreibung von Huminstoffen zu ermitteln. Die Simulation von HS-Strukturmodellen ist mehr als umstritten. HS sind ein heterogenes Gemisch unterschiedlicher Substanzen mit extrem unterschiedlichen physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften.

Obwohl es nicht möglich ist, in demselben Maß strukturelle Informationen zu erhalten, wie es für "NMR-freundlichere" Biopolymere wie Peptide, Nucleotide und Oligosaccharide möglich ist, erhält man dennoch durch geeignete Kombinationen von verschiedenen NMR-Techniken Hinweise auf die Präsenz von Struktureinheiten.

Einen wesentlichen Beitrag, Funktionalitäten qualitativ und quantitativ zu erfassen, liefert die NMR-Spektroskopie. Im folgenden sind die wesentlichen NMR-spektroskopischen Methoden zur Charakterisierung von Struktureinheiten und funktionellen Gruppen zusammengestellt, um einen Überblick über die Möglichkeiten struktureller Untersuchungsmethoden, die die NMR-Spektroskopie bietet, zu vermitteln.

Die erzielten Ergebnisse der einzelnen Techniken, die z.T. in Kombination mit Derivatisierungsreaktionen eingesetzt werden, lassen sich in die Beschreibung des Huminstoffgerüsts (s. Kapitel 5.1) und den damit verknüpften funktionellen Gruppen (s. Kapitel 5.2) unterteilen. Weiterhin wird die NMR-Spektroskopie für Untersuchungen physikalisch-chemischer



Wechselwirkungen, wie z.B. Wechselwirkungen mit Xenobiotika und Metallverbindungen (s. Kapitel 5.3) verwendet. Da die für Huminstoffe bestimmten Daten oft in Zusammenhang mit Daten von Lignin, Tannin, Lipiden, fossilen organischen Substanzen und Kohlenhydraten bewertet werden, die Bestandteile von HS sind oder ähnlichen Ursprung haben, sind neben den Publikationen über NMR-Spektroskopie von HS auch einige Veröffentlichungen dieser Substanzen aufgeführt.

Bezüglich eindimensionaler NMR-Verfahren sind in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte erzielt worden [154], die zweidimensionale NMR-Spektroskopie hingegen wurde bisher zur Untersuchung von HS im Gegensatz zu Arbeiten über Lignin kaum eingesetzt. Gründe für die mangelnde Anwendung zweidimensionaler NMR-Techniken sind zum einen in dem großen experimentellen Aufwand zu suchen<sup>1</sup>, als auch in den Eigenschaften der HS als extrem komplexes Gemisch mit ungünstigen Relaxationszeiten. Die für HS typischen kurzen Relaxationszeiten sind auf ihre große Molekülgröße, Austauschprozesse und teilweise auf die Anwesenheit von paramagnetischen Substanzen (v.a. komplex gebundene Eisenionen) zurückzuführen. Eine Übertragung von Ergebnissen aus Experimenten von Modellverbindungen ist nur bedingt möglich. In jedem Fall müssen die Eigenschaften der HS bei der Parametrierung der NMR-Experimente und bei der Prozessierung und Auswertung von NMR-Spektren berücksichtigt werden.

Die eindimensionalen NMR-Spektren werden in Bereiche chemischer Verschiebungsklassen unterteilt, die jeweils bestimmten Strukturelementen entsprechen. Protonenspektren werden eingeteilt in die Strukturelemente Aromaten (9 - 6 ppm), O-Alkyl-Wasserstoff (6 - 3.2 ppm), Aliphaten (3.2 - 0 ppm). <sup>13</sup>C-NMR-Spektren werden eingeteilt in Carbonylfunktionen (230 - 190 ppm), Carboxylfunktionen (190 - 160 ppm), Aromaten (160 - 100 ppm), O-Alkyl-Kohlenstoff (100 - 60 ppm), Methoxygruppen (60 - 50 ppm), Aliphaten (50 - 0 ppm).

Die 2D NMR-Spektroskopie bietet durch die Einführung einer zusätzlichen unabhängigen Frequenzvariablen eine erhöhte Informationsvielfalt. Die zweite verfügbare Frequenz liefert Informationen über räumliche oder Bindungs-Wechselwirkungen zwischen Atompaaaren durch Konnektivitätsmuster mit einer Signaldispersion in zwei Dimensionen.

---

<sup>1</sup>Für eine gute Auflösung der Signale, die für Gemische nötig ist, sind große Inkrementzahlen und den damit verbundenen langen Meßzeiten, sowie Lösungsmittelunterdrückung durch den Einsatz von PFG und Probenköpfe, die inverse Aufnahmen ermöglichen, erforderlich.

## 5.1 Bestimmung von Strukturelementen des Grundgerüsts

HS-relevante NMR-Techniken können in eindimensionale Einpuls- und Mehrpulseexperimente ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT), homonukleare und heteronukleare zweidimensionale Experimente (COSY, TOCSY, HMQC), Experimente mit weiteren Kernen ( $^{31}\text{P}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{19}\text{F}$ ) und Festkörperspektroskopie unterteilt werden. Aus der heterogenen Natur dieser Makromoleküle resultiert in 1D Experimenten eine starke Überlagerung individueller Peaks, die eine eindeutige Zuordnung von chemischer Verschiebung zu spezifischen Strukturelementen, wie sie von NMR-Spektren NMR-freundlicher Substanzen üblich ist, verhindern. Man behilft sich damit, die NMR-Spektren in Bereiche chemischer Verschiebung nach verschiedenen Strukturelementen zu unterteilen<sup>2</sup>. Aus  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren werden Informationen über aliphatische Methylprotonen,  $\alpha$ -substituierte-Methylprotonen und aromatische Methylprotonen, Protonen in Alkylketten, H-C-O-Einheiten und  $C_{alk}\text{-OH}$ , aromatische und olefinische Protonen, phenolische und carboxylische Protonen erhalten.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren werden in Bereiche eingeteilt, die folgende Struktureinheiten repräsentieren: Carbonylfunktion, Carboxylfunktion, Aryl-O und Aryl-N, Aryl-C und Aryl-H, O-Alkyl-, aliphatische  $\text{CH}_n$ -Gruppen.

Eine detailliertere quantitative Bestimmung von  $^{13}\text{C}$  in strukturellen Einheiten ist durch den Einsatz von Pulsfolgen wie DEPT, QUAT und Spin-Echo möglich. Durch Editierung gemäß Multiplizität vereinfachen sich die NMR-Spektren. Es werden unterschieden: C, CH,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  und isolierte Methylgruppen.

Das erste J-aufgelöste 2D NMR-Experiment von HS wurde von Buddrus und Lambert [42][130] durchgeführt. Hauptanwendungsgebiet der J-aufgelösten NMR-Spektroskopie ist die Analyse von Spektren, bei denen sich die Spin-Multipletts einzelner Protonen stark überlagern. Der wesentliche Vorteil von J-aufgelösten 2D NMR-Spektren besteht darin, daß zur Quantifizierung der verschiedenen Strukturelemente nur ein einziges Spektrum herangezogen wird. Probleme, die in Zusammenhang mit der Bestimmung von Gewichtungsfaktoren auftreten, werden auf diese Weise vermieden. Im Gegensatz zu DEPT und SEMUT-90-NMR-Spektren, bei denen die Signalintensität von einem festen Delay  $\frac{1}{2}J(\text{C,H})$  abhängen, haben C-H-Kopplungen keinen Einfluß auf die Signalintensität.

Die zweidimensional homonuklear und heteronuklear korrelierte NMR-Spektroskopie ist in der Lignin-Forschung eine etablierte Methode zur Beschreibung von Konnektivitäten und Kopplungen, dagegen findet man in der Literatur kaum Arbeiten, die an HS durchgeführt worden sind.

---

<sup>2</sup>Leider hat man sich noch nicht auf Grenzen geeinigt, so daß die meisten Publikationen unterschiedliche Einteilungen verwenden, und die erhaltenen Ergebnisse nicht direkt miteinander verglichen werden können.

Bei zweidimensionalen  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -verschiebungskorrelierten Spektren treten auf beiden Frequenzachsen chemische Verschiebungen auf. Sogenannte Kreuzsignale zeigen an, welche Kerne miteinander koppeln. Grundlage der COSY-Pulssequenz (COrrrelation SpectroscopY) ist die skalare Spin,Spin-Kopplung. Das Experiment dient dazu, mit Hilfe der Kreuzsignale Nachbarschaftsbeziehungen zwischen Kernen aufzuzeigen und auf diese Weise Strukturinformationen zu erhalten. In [176] werden Kreuzsignale, die charakteristisch sind für die Struktureinheiten  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-CO-R}$  und  $\text{R-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CO-R}$  postuliert.

TOCSY- (TOtal COrrrelation SpectroscopY) und ROESY-Spektren (Rotating frame Overhauser Enhancement SpectroscopY) finden im Rahmen von Arbeiten über Lignin häufig Anwendung, hingegen wurde bisher erst ein TOCSY-Spektrum eines HS veröffentlicht. Im Gegensatz zur COSY-Technik, bei der Protonen nur über geminale oder vicinale Spin-Kopplung miteinander korreliert werden, können in TOCSY-Spektren alle Protonen eines Spin-Systems korreliert werden. Diese Technik wird häufig für Peptide und Oligosaccharide verwendet, um die einzelnen Bestandteile zu identifizieren. Das TOCSY-Spektrum in [176] zeigt die Kopplung zwischen Amid-Protonen und Protonen der Seitenketten der Aminosäuren. ROESY-Spektren von HS wurden bisher nicht veröffentlicht. Die ROESY-Technik liefert Informationen über  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  dipolare Kopplungen zwischen räumlich benachbarten Kernen.

Heteronukleare 2D NMR-Korrelationspektroskopie ermöglicht die Identifikation direkt oder über mehrere Bindungen gebundener Atompaaare. Jedes Kreuzsignal eines Einbindungs-Korrelationspektrums repräsentiert eine chemische Bindung zwischen einem Proton und einem  $^{13}\text{C}$ . Die einzelnen Kreuzsignale können anhand ihrer  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  chemischen Verschiebung zugeordnet werden. Für Untersuchungen von Ligninen und Lignin-Modellsubstanzen findet das HMQC-Experiment (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) häufig Anwendung. In [176] ist ein HMQC-Spektrum eines HS abgebildet, dessen Kreuzsignale in Bereiche eingeteilt werden. Eine Kreuzsignalgruppe großer Intensität bei  $\delta = 3.9$  ppm ( $^1\text{H}$ ) und bei 55 ppm ( $^{13}\text{C}$ ) deutet auf aromatisch gebundene Methoxygruppen hin, die charakteristisch für Lignin-Fragmente sind. Die "Kohlenhydratregion" bei 60–105 ppm wird im ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-HMQC-Spektrum in Bereiche von Kohlenhydrat- und Etherstrukturelemente, Estergruppen und  $\text{CH}_2$ -Gruppen in  $\text{RCH}_2\text{OAr}$ -Strukturelementen zugeordnet.

HMBC-Experimente, die Weitbereichs-Korrelationen über  $^2\text{J}(\text{H,C})$ - und  $^3\text{J}(\text{H,C})$ -Kopplungen ermöglichen, lieferten bisher keine Kreuzsignale. Verantwortlich für die mit Weitbereichs-Kopplungstechniken verbundenen experimentellen Schwierigkeiten sind die geringere Empfindlichkeit des NMR-Experiments und die ungünstigen Relaxationseigenschaften der HS, verursacht durch ihre hohe Molekülgröße.

Die Festkörper-Spektroskopie von Böden und Komposten ermöglicht die Untersuchung unbehandelte organischer Materie. Die hochauflösende NMR-Spektroskopie kann nur den Anteil von organischem Bodenmaterial erfassen, der extrahierbar und löslich ist. Da während

der Extraktion von HS physikalische und chemische Veränderungen des HS stattfinden, erhält man nur eingeschränkte Informationen über den Zustand der HS-Matrix, wie er in der Natur vorliegt. Wesentlicher Nachteil der Festkörper-Spektroskopie ist die geringe Auflösung der Spektren.

## 5.2 Bestimmung von Funktionalitäten

### 5.2.1 $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie

$^1\text{H}$ -NMR-Spektren von HS liefern abhängig vom Lösungsmittel unterschiedliche Ergebnisse. In DMSO aufgenommene Spektren enthalten Informationen über austauschbare und nicht-austauschbare Protonen, deren chemische Verschiebungsbereiche überlappen. Bei der Verwendung von  $\text{D}_2\text{O}$  als Lösungsmittel liefert der chemische Austausch der aziden Protonen des HS ein Mittelwertsignal. Zur Unterdrückung dieses Lösungsmittelsignals werden verschiedene NMR-Sequenzen eingesetzt. Durch Subtraktion der Spektren lassen sich Rückschlüsse über den Gehalt an Carboxylgruppen sowie aliphatische und aromatische Hydroxylgruppen ziehen [162] [176]. Alternativ kann Trifluoressigsäure zugegeben werden, was eine Verschiebung der austauschbaren Protonen in den Bereich 13–15 ppm zur Folge hat und die somit außerhalb der Gerüstprotonen liegen [115].

### 5.2.2 $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie

In Kombination mit  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren können mittels der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie Aussagen über Ester, Ether, Carboxyl-, aromatische und aliphatische Hydroxylgruppen gemacht werden. Strukturelemente, deren chemische Verschiebung in einem der beiden Spektrentypen zusammenfallen, liegen im korrespondierenden NMR-Spektrum getrennt voneinander vor. Spektren derivatisierter HS (z.B. methylierte HS) können zur Charakterisierung von Strukturelementen nur bedingt herangezogen werden. Da die Signale der unterschiedlich substituierten Methylprotonen sehr nah beieinander liegen, überlappen sie stark, so daß die Verhältnisse der verschiedenen aziden Protonen nur abgeschätzt werden können.

### 5.2.3 $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektroskopie

$^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren werden von natürlichen und von derivatisierten HS aufgenommen. Natürliche HS beinhalten Peptid- und Aminofunktionen. Von derivatisierten HS erhält man Informationen über Carbonylgruppen, den Phenolgehalt und die Aromatizität. In der Festkörper-NMR-Spektroskopie werden Spektren sowohl von extrahierten HS als auch von Böden aufgenommen.

### 5.2.4 $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektroskopie

$^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektren von silylierten HS, Ligninen und fossilen organischen Substanzen werden zur Untersuchung der Substitution azider Protonen durch die Trimethylsilylgruppe herangezogen. Da auch in der  $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektroskopie die Signale der unterschiedlichen Funktionen überlappen, kann eine Kombination von Methylierung und Silylierung eingesetzt werden, die die Bestimmung von carboxylischen, phenolischen und alkoholischen Funktionen ermöglicht. Durch gezielte Methylierung von Carboxyl- und aliphatischen Hydroxylgruppen oder nur Carboxylfunktionen werden die jeweiligen methylierten Funktionen nicht silyliert. Es können  $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektren von silylierten Phenolen und Alkoholen oder nur Phenolen aufgenommen und durch Differenzbildung der NMR-Spektren die Anteile der Strukturelemente bestimmt werden.

In der Lignin-Forschung wurden Modellverbindungen silyliert, deren chemische Verschiebung bestimmt und damit Lignin- $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektren interpretiert.

### 5.2.5 $^{19}\text{F}$ - und $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie

$^{19}\text{F}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Experimente derivatisierter Substanzen wurden bisher noch nicht in der HS-Analytik eingesetzt. Phosphorsäure oder Phosphorsäureester wurden als Bestandteil von HS nachgewiesen.

### 5.2.6 $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektroskopie

Die  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektroskopie, die Informationen über den Gesamtsauerstoff liefert, fand bisher nur für Erdölfraktionen Anwendung. Es wurden Resonanzen von Säuren und einfach gebundenen Sauerstoff gefunden.

### 5.2.7 Zweidimensionale NMR-Spektroskopie

2D NMR-Spektren von HS, die Informationen über funktionelle Gruppen liefern, wurden bisher noch nicht aufgenommen. In Kapitel 6.3 wird ein Verfahren vorgestellt, das nicht nur die aziden Protonen in Carboxyl-, aromatische und aliphatische Hydroxyl-Funktionen einteilt, sondern diese Gruppen weiter nach ihrer chemischen Umgebung differenziert. Es wird dabei eine Verknüpfung von aziden, sauerstoffhaltigen Funktionen mit dem HS-Gerüst möglich.

### 5.3 Physikalisch-chemische Wechselwirkungen

Die NMR-Spektroskopie wird von einigen Arbeitsgruppen als Sonde für die Wechselwirkungen zwischen HS und Böden mit Xenobiotika und Metallverbindungen herangezogen.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von mit Anilazin oder Cyprodinil inkubierten und anschließend extrahierten HS zeigen kovalente Bindungen von Xenobiotika mit der HS-Matrix [100] [60] [59]. Die OH-Funktionen der HS reagieren mit der Cl-Funktion des Triazin-Strukturelementes von Anilazin durch Eliminierung von HCl. Dabei entsteht eine kovalente Etherbindung zwischen dem Triazin-Strukturelement und dem HS.

Mittels  $^{13}\text{C}$   $T_1$ -Relaxationsmessungen lassen sich Rückschlüsse über nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen Acenaphthenon und einer FA ziehen [110] [144] [195].

Die Tabellen 5.1 und 5.2 bieten eine Übersicht über die wichtigsten NMR-spektroskopischen Verfahren, die Beiträge zur strukturellen Untersuchung von HS liefern.

Tabelle 5.1: NMR-spektroskopische Verfahren zur Charakterisierung des HS-Grundgerüstes (Referenzen in Spalte A) und HS-verwandter Verbindungen (Referenzen in Spalte B).

NMR-Experiment	Strukturinformation	A	B
1D Experimente			
<sup>1</sup> H Einpuls-experiment	isolierte Methylprotonen, aliphatische Ketten (CH <sub>2</sub> - und CH-Gruppen aliphatischer Ketten), aromatisch gebundene CH <sub>3</sub> - und CH <sub>2</sub> -Gruppen, CH <sub>3</sub> -CO und CH <sub>2</sub> CO, CH-O-, CH <sub>2</sub> -O-, aromatische Protonen, olefinische Protonen	[176][197] [52][176] [114][139] [181][135] [132]	
<sup>1</sup> H WATER-GATE, WATR, Spin-Echo	zur H <sub>2</sub> O-Unterdrückung (WATERGATE, WATR), Bestimmung von isolierten paraffinischen Methylgruppen (Spin-Echo)	[129][106] [176][134]	
<sup>13</sup> C Einpuls-experiment	Carbonyl-, Carboxyl-, Aryl-O- und Aryl-N-, Aryl-C- und Aryl-H-, O-CH <sub>2</sub> -Fragmente, CH <sub>n</sub> (aliph.); <sup>13</sup> C aus Gerüst und von funktionellen Gruppen überlagern sich teilweise (z.B. Carbonsäuren und Ester)	[36][137] [61][159] [82][198] [29][52] [114]	[173][115]
<sup>13</sup> C DEPT, QUAT, Spin-Echo	quantitative Bestimmung der Strukturelemente: C, CH, CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> , isolierte CH <sub>3</sub> , Substitutionsgrad der Aromaten	[42][128] [130][43] [175][129]	[16][200] [68]
<sup>13</sup> C CPMAS	Polysaccharid-Strukturen, aromatische und aliphatische Komponenten, Carbonyle und Carboxyle	[118][196] [119][6] [127][55] [81][120] [126]	

NMR-Experiment	Strukturinformation	A	B
2D Experimente			
J-aufgelöste Experimente	Bestimmung der Strukturelemente C, CH, CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub>	[42][130]	[200][68]
homonukleare 2D Experimente: COSY, TOCSY, ROESY, NOESY	( <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H) Zwei- und Dreibindungs-Kopplung: Substitutionsmuster aromatischer Ringe (COSY); ( <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H)-Kopplung über ein Spinsystem (TOCSY); ( <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H) dipolare Kopplung: Information über Protonendistanzen (ROESY) (NOESY)	[176][167] [51]	[200][138] [83][123] [45][68] [69][67] [83][57] [58][69] [69]
heteronukleare 2D Experimente: HMQC, HETCOR, XHCORR, DEPT-HMQC, HMBC	heteronukleare Einbindungskopplung; <sup>1</sup> H <sup>13</sup> C Konnektivitäten; Information über Proton-Kohlenstoff-Bindung: Kohlenhydrate, Ether, Ester, CH <sub>2</sub> -Protonen in RCH <sub>2</sub> -Funktionalitäten, aromatisch gebundene Methoxygruppen (HMQC, HETCOR, XHCORR); editierte HMQC-Experimente (DEPT-HMQC); heteronukleare Zwei- und Dreibindungskopplung; Zuordnung von nicht-protonierten Kohlenstoffatomen (HMBC)	[167] [176]	[123][69] [69][83] [57][58] [158][155] [156][200]
3D Experimente			
HMQC-TOCSY	TOCSY-Spektren, die durch ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C)-Korrelation editiert werden		[41][122] [158]



Tabelle 5.2: NMR-spektroskopische Verfahren zur Charakterisierung der Funktionalitäten von HS (Referenzen in Spalte A) und HS-verwandter Verbindungen (Referenzen in Spalte B)

NMR-Experiment	Strukturinformation	A	B
1D Experimente			
<sup>1</sup> H Einpuls-experimente	austauschbare aromatische Protonen, Carboxylgruppen, aromatische und aliphatische Hydroxylgruppen	[162][114] [176]	[115]
<sup>13</sup> C Einpuls-experimente	in Kombination mit <sup>1</sup> H-Experimenten oder Derivatisierung (z.B. Methylierung) Bestimmung der Strukturelemente: Säuren, Ester, Ether, Phenole, Alkohole		[72][141] [187][178] [115]
<sup>15</sup> N	derivatisierte HS: Carbonyle, Aromatizität, phenolischer Anteil, versch. funkt. Gruppen; Festkörper-NMR-Spektroskopie von HS, Böden, Komposten	[185][184] [93][111] [6][126]	
<sup>29</sup> Si Einpuls-experimente, INEPT, DEPT	Substitution azider Protonen durch die Trimethylsilylgruppe und Kombination mit Methylierungsreaktionen: Bestimmung von Carboxyl-, sowie aromatischen und aliphatischen Hydroxylanteilen	[186][105]	[146][38] [62][39] [54][63] [170][178]
<sup>19</sup> F	Substitution azider Protonen mit fluorhaltigen Reagenzien		[62][17] [18][178]
<sup>31</sup> P	underivatisierte HS: Phosphorsäure oder Phosphorsäureester; derivatisierte HS: azide Protonen von Carboxyl-, sowie aromatischen und aliphatischen Hydroxylfunktionen	[147]	[72][10] [14][11] [9][12] [13][199] [55][58]
<sup>17</sup> O	Information über Gesamtsauerstoff: Ether, Ester, Säuren, Alkohole		[94]

NMR-Experiment	Strukturinformation	A	B
2D Experimente			
( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ )- und ( $^1\text{H}$ , $^{29}\text{Si}$ )- HSQC	detaillierte chemische Umgebung funktio- neller Gruppen; Verbindung der Informatio- nen von Gerüstfragmenten und Funktio- nalitäten; Einteilung verschiedener Hydroxyl- gruppen, Unterscheidung aromatischer und aliphatischer Carbonsäuren, Nachweis von tertiären Hydroxylgruppen	[vorliegende Arbeit]	

## 5.4 Die Silylierung von Huminstoffen, Ligninen, Kohleextrakten und Erdölfractionen und anschließende $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie von silylierten Ligninen, Kohleextrakten und ihren relevanten Modellverbindungen ist eine etablierte Methode zur Bestimmung und Charakterisierung sauerstoffhaltiger, funktioneller Gruppen. In Arbeiten zur strukturellen Untersuchung von HS fand sie bisher kaum Anwendung.

Um die stark überlappenden  $^{29}\text{Si}$ -NMR-Signale interpretieren zu können, ist es nötig, zunächst Modellsubstanzen zu silylieren und deren chemische Verschiebung zu bestimmen. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse werden zur Interpretation der  $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektren silylierter Materialien herangezogen [38] [39] [63] [62] [54] [146] [178]. Da die chemischen Verschiebungen der Lignin-Modellverbindungen für eine Analyse der HS-NMR-Spektren nicht ausreichen, wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Modellverbindungen silyliert und die chemische Verschiebung bestimmt (Kapitel 6).

Folgende Silylierungsmethoden werden für die Derivatisierung von Lignin, Kohleextrakten und Erdölfractionen beschrieben:

Tabelle 5.3: Silylierungsmethoden von Lignin, Kohleextrakten und Erdölfractionen

Reagenz	Lösungsmittel	Reaktionsbedingungen	Substanz
HMDS	Pyridin	50 °C, 30 min	Lignin [146]
HMDS/TMCS	$\text{CDCl}_3$	RT, 1 h	Erdölextrakte [62][63]
BSA/TMCS	—	60–70° , 1 h	Lignin [38][39]
HMDS/TMCS	Pyridin	50 °C, 5 min	synthetischer Treibstoff [54]
HMDS/TMCS	Pyridin	Rückfluß, 1 h	Kohleextrakte [178]
BSA	—	50–70° , 1 h	Lignin-bezogene Modellsubstanzen [170]

In der HS-Forschung wurde die Silylierung von Thorn et al. [186] eingeführt. Es folgte nur eine weitere Veröffentlichung von  $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektren silylierter HS [105]. Beide Arbeitsgruppen verwendeten eine Kombination von Methylierung und Silylierung zur Quantifizierung von phenolischen und aliphatischen Hydroxylfunktionen (Tabelle 5.4).

Eine Reihe von Veröffentlichungen aus der Arbeitsgruppe Haider et al. [99] [100] [98] [60] [195] beschreibt die Extraktion von HS-Fractionen durch Silylierung von mit NaOH-behandelten Böden mit TMCS in  $\text{CHCl}_3$  und anschließender Extraktion mit Aceton. Durch die Silylierungsreaktion wird eine größere Menge an Xenobiotika extrahiert als

mit herkömmlichen Extraktionsverfahren.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren weisen unabhängig vom Boden dasselbe Muster scharfer Linien auf, die in keinem NMR-Spektrum von mit NaOH-extrahierten HS zu finden sind. Das für HS typische Signalmuster ist praktisch nicht vorhanden. Auffällig ist, daß die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren im Silylbereich keine Intensität aufweisen. Da durch die Silylierung jeder  $^{13}\text{C}$ -Kern, der ein azides Proton trägt, durch drei TMS- $^{13}\text{C}$ -Kerne ersetzt wird, sollte das Integral über den Silylbereich bei 0 ppm in derselben Größenordnung liegen wie das gesamte restliche HS-NMR-Spektrum. Eigene Versuche an der Modellverbindung Carminsäure, einer Huminsäure, und eines Bodens, sowie einige Blindversuche werden in Kapitel 6.1.3 erläutert und interpretiert.

Tabelle 5.4: Silylierungsmethoden für HS.

Reagenz	Lösungsmittel	Reaktionsbedingungen	Substanz
HMDS/Trifluoressigsäure	Pyridin	25 °C, 12 h	HS [186]
HMDS	DMSO	50 °C, 30 min	HS [105]
TMCS/NaOH <sub>s</sub>	CDCl <sub>3</sub>	20 °C, 24 h	Boden [99] [100]

Azide Protonen von Ligninen, Kohleextrakten, Erdölfraktionen und HS konnten bisher durch die  $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektroskopie quantitativ erfaßt werden. Eine qualitative Beurteilung der Signale durch Vergleich mit Modellverbindungen wurde nur an Ligninen und Kohleextrakten, nicht aber an HS durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit werden 2D NMR-Spektren silylierter HS vorgestellt, die eine detailliertere Strukturanalyse ermöglichen.

## 5.5 Die $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektroskopie

Die  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektroskopie wurde für die Bestimmung der chemischen Umgebung von Sauerstoff in natürlich vorkommenden Substanzen wie Aminosäuren [88] [191], Monosacchariden [89], L-Ascorbinsäure [161], Säuren [87] [86], Steroiden [121] [177] und Fraktionen von Kohledestillaten [94] herangezogen, für Huminstoffe bisher aber nicht eingesetzt. Die  $^{17}\text{O}$ -NMR-Signale von Fraktionen von Kohledestillaten sind auf Phenole, Furane und Carbonsäuren zurückzuführen. Ein  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektrum des gesamten Destillats konnte jedoch nicht aufgenommen werden.

Ein wesentliches Kriterium für die Parametrierung der Experimente und der Qualität der  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektren sind die geringe natürliche Häufigkeit und die Relaxationseigenschaften der  $^{17}\text{O}$ -Kerne. Der  $^{17}\text{O}$ -Kern besitzt ein Quadrupolmoment, welches wegen der damit verbundenen sehr kurzen Relaxationszeiten zu breiten Signalen führt. Zusätzlich nimmt mit steigender Molekülgröße die transversale Relaxationszeit  $T_2$  ab. Die Resonanzlinien werden extrem breit (bis 2500 Hz) und das Signal-Rausch-Verhältnis kann soweit abnehmen, bis keine Signale mehr registriert werden können. Ein  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektrum von Cholesterol ( $M = 375 \text{ g Mol}^{-1}$ ) bei natürlicher Häufigkeit konnte in [177] nicht aufgenommen werden. Die  $T_1$ -Relaxationszeit beträgt für das angereicherte  $[3\beta - ^{17}\text{O}]$ Cholesterol  $417 \mu\text{s}$ , für  $\text{H}_2\text{O}$  hingegen 37.4 ms, d.h. Cholesterol relaxiert etwa 100 mal schneller als  $\text{H}_2\text{O}$ . In [121] werden die  $^{17}\text{O}$  chemischen Verschiebungen nicht-angereicherter Steroide ermittelt. Die Experimente wurden bei  $90^\circ\text{C}$  aufgenommen, um die Löslichkeit der Verbindungen zu erhöhen und die Linienbreite zu verkleinern.

Die extreme Verkürzung der  $T_1$ -Relaxationszeit mit steigender Molmasse wird in [131] und in [177] näher erläutert. In einer wäßrigen Lösung von D-Glukose ( $M = 180 \text{ g Mol}^{-1}$ ) bei  $75^\circ\text{C}$  beträgt der  $T_1$ -Wert 9 ms für den Wassersauerstoff, während die  $T_1$ -Werte weniger als 0.5 ms für den Sauerstoff der Glukose betragen. Die Relaxationszeit  $T_1$  von  $[3\beta - ^{17}\text{O}]$ Cholesterol in  $\text{CD}_3\text{CN}$  beträgt  $417 \mu\text{s}$ , für internes  $\text{H}_2^{17}\text{O}$  bei natürlicher Häufigkeit 37.40 ms. Dieser Effekt muß für die Aufnahme von  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektren von Biopolymeren wie HS berücksichtigt werden.

Weiterhin sind in der Literatur Datensätze für eine Vielzahl an kleinen organischen Molekülen verfügbar; beispielsweise aromatische Carbonyle [34] [50], Aldehyde und Ketone [44], Amide [90], Ester, Ether und Alkohole.

# Kapitel 6

## Ergebnisse der methodischen Entwicklung

### 6.1 Optimierung der Synthesebedingungen für die Silylierungsreaktion

Kriterien für eine optimale Silylierungsreaktion von Huminstoffen sind quantitative Derivatisierung der aziden funktionellen Gruppen, keine Nebenreaktionen des Huminstoffes, sowie günstige Eigenschaften des silylierten Produktes für die NMR-Spektroskopie.

Wie in Kapitel 3 ausführlich erläutert, kommen für eine weitgehend quantitative Silylierung sauerstoffhaltiger funktioneller Gruppen folgende Silylierungsreagenzien in Betracht: BSTFA, BSA, MSTFA, TMSDEA, BSTFA/TMCS, BSA/TMCS, HMDS/TMCS, TMSIM/BSTFA(BSA)/TMCS, TMCS/Base. Diese Reagenzien können kombiniert werden mit den Lösungsmitteln Pyridin, DMF, DMSO,  $\text{CHCl}_3$  und Acetonitril. Einige dieser Kombinationen wurden an Carminsäure, die die wesentlichen für HS relevanten Strukturelemente besitzt, getestet.

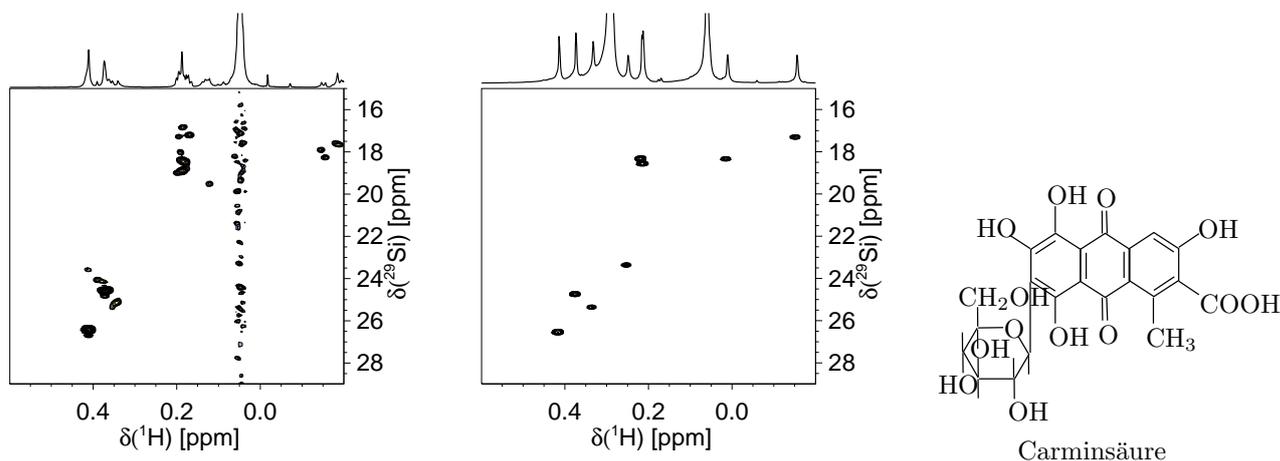
Sollen Nebenreaktionen vermieden werden, müssen schonende Synthesebedingungen gewählt werden, wie tiefe Temperaturen und die Vermeidung von starken Säuren und Basen. Eine Reihe an Veröffentlichungen beschreiben Nebenreaktionen, die durch TMCS und Reagenzmischungen, die TMCS enthalten, verursacht werden.

Für qualitativ gute NMR-Spektren sind Reagenzien und Lösungsmittel zu bevorzugen, die keine durch Überlagerung mit Huminstoffsignalen störenden Signale erzeugen. Der Vorteil von BSTFA gegenüber BSA und MSTFA ist, daß im Protonenspektrum keine zusätzlichen Protonensignale vorhanden sind. Als Lösungsmittel sind Pyridin, DMF und DMSO geeignet, in denen die Huminstoffe weitgehend löslich sind.

### 6.1.1 Optimierung der Silylierung an einer Modellverbindung

Anhand einer einfachen Modellverbindung konnte die Silylierungsreaktion mit unterschiedlichen Reagenzien und Lösungsmitteln untersucht und bezüglich ihrer Eignung als Derivatisierungsmethode von HS bewertet werden. Carminsäure, die wesentliche sauerstoffhaltige funktionelle Baueinheiten von HS enthält, wurde mit literaturbekannten und abgewandelten Methoden auf die Silylierbarkeit der unterschiedlichen Gruppen hin getestet. Die Derivatisierungsprodukte wurden zur Beschreibung der Synthese NMR-spektroskopisch überprüft und zur Quantifizierung soweit möglich integriert. Abb. 6.1 zeigt das  $^1\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$ -HMQC-Spektrum einer unvollständig und einer quantitativ silylierten Carminsäure.

Abbildung 6.1: ( $^1\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$ )-HMQC-NMR-Spektrum einer nicht quantitativ silylierten Carminsäure (links) und einer quantitativ silylierten Carminsäure (rechts).



Die Vollständigkeit einer Silylierungsreaktion kann anhand des Verteilungsmusters der Signale leicht bewertet werden. Uneinheitlich silylierte Funktionen verursachen durch Substituenteneffekte geringe Änderungen der chemischen Verschiebung benachbarter Signale und damit eine Verteilung der Kreuzsignale auf jeweils mehrere Resonanzen. Das dann vorliegende Gemisch mehrerer ähnlicher Verbindungen (teilweise silylierte Carminsäuren) liefert statt eines einzigen Kreuzsignals überlagerte Signalgruppen mit Resonanzfrequenzen, die angenähert den jeweiligen Positionen des vollständig silylierten Moleküls entsprechen. Jedes Signal einer solchen Gruppierung repräsentiert eine Silylgruppe in einem definierten, nicht an allen Positionen silylierten Molekül. Jede Gruppierung spiegelt somit auch die Heterogenität eines Gemisches von nur teilweise silylierten Carminsäuren wieder. Nur ein einziges Silylierungsprodukt liegt vor, wenn, wie im rechten Spektrum der Abb. 6.1 gezeigt, jede derivatisierte funktionelle Gruppe nur durch ein einziges Kreuzsignal repräsentiert wird. Außer der Vollständigkeit der Derivatisierung wurden die NMR-Spektren silylierter Carminsäure nach weiteren Kriterien bewertet:

- Jede sauerstoffhaltige funktionelle Gruppe, deren azides Proton durch eine Trimethylsilylgruppe substituiert wurde, muß ein Signal im ( $^1\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$ )-NMR-Spektrum zeigen. Die Vollständigkeit kann anhand des Zuckerbereichs im Protonenspektrum beurteilt werden.
- Die Signale sollen eine möglichst geringe Linienbreite besitzen.
- Die Integrale der Signale sollen bei quantitativer Silylierung für jede funktionelle Gruppe gleich groß sein.
- Signale von Nebenprodukten des Silylierungsreagenz sollen in den NMR-Spektren silylierter Huminstoffe mit den Signalen der Huminstoffe überlappen.
- Es dürfen keine zusätzlichen Signale vorhanden sein, die durch Nebenreaktionen, wie beispielsweise Etherspaltung und Enolisierung von Ketonen erzeugt worden sind.

In Abb. 6.2 sind die ( $^1\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$ )-HMQC-NMR-Spektren und die Protonen-Spektren des Kohlenhydratbereichs, die für die Bewertung herangezogen wurden, aufgelistet. Die Silylierung, die Carminsäure am quantitativsten silyliert und aussagekräftige NMR-Spektren liefert, wird mit BSTFA oder BSA als Trimethylsilyldonor im Überschuß in DMSO bei Raumtemperatur durchgeführt. Signale, die auf Nebenprodukte der Carminsäure hindeuten, sind nicht vorhanden. Die Relaxationszeiten der Trimethylsilylprotonen sind für die Aufnahme von inversen, heteronuklear korrelierten Spektren ausreichend groß.

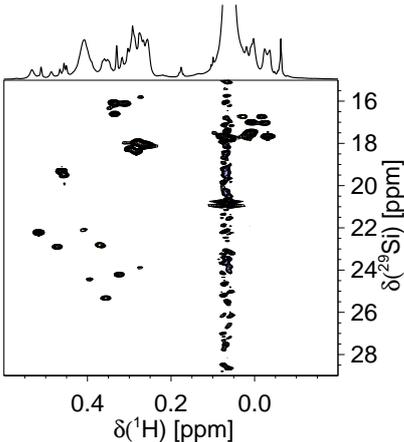
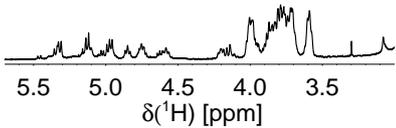
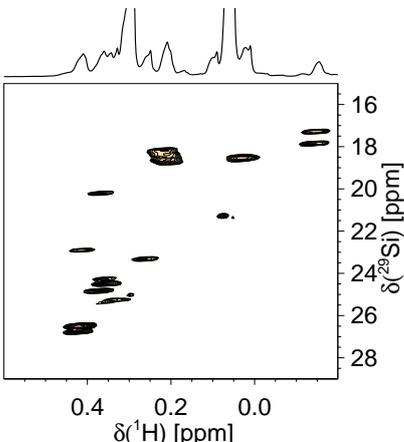
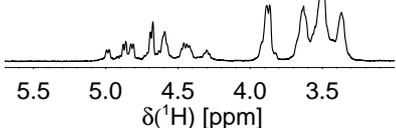
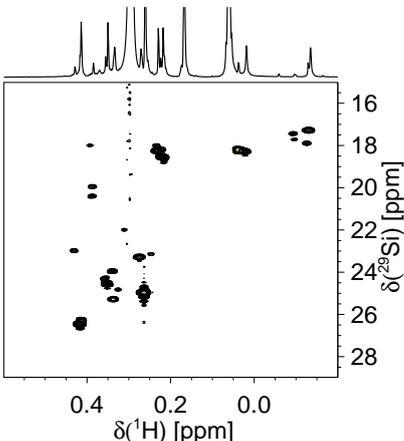
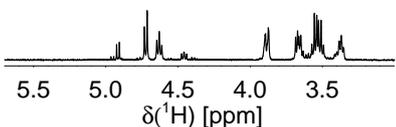
Die Reaktion von BSTFA in Pyridin oder DMF führt nicht zu vollständig silylierten Produkten.

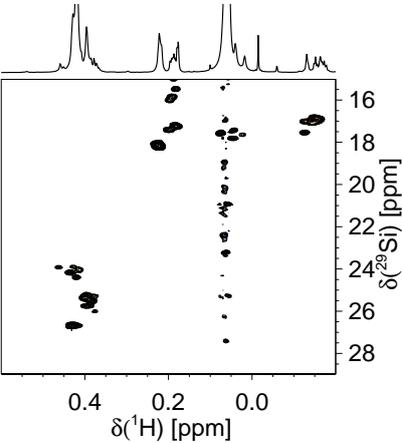
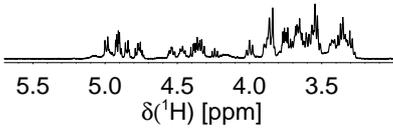
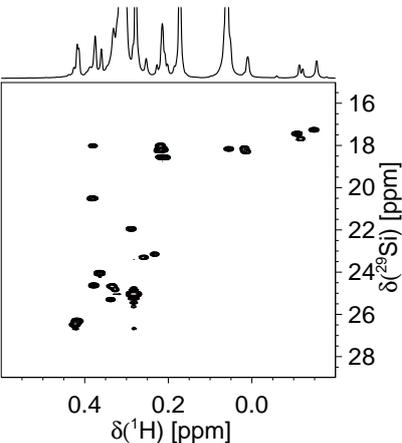
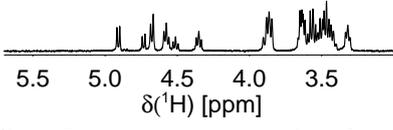
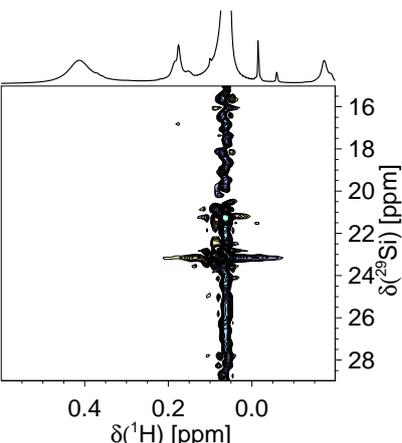
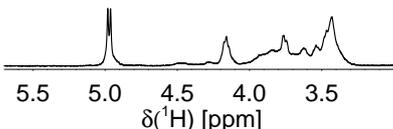
Unter einigen Reaktionsbedingungen werden nicht alle Kreuzsignale silylierter Modellverbindungen des HMQC-NMR-Spektrums beobachtet, obwohl im entsprechenden Verschiebungsbereich im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum Resonanzen mit großer Linienbreite auftreten. Kurze Relaxationszeiten verursachen durch einen schnell abklingenden FID ein NMR-Signal mit geringer Intensität, das zudem in der F2-Achse stark verbreitert ist.

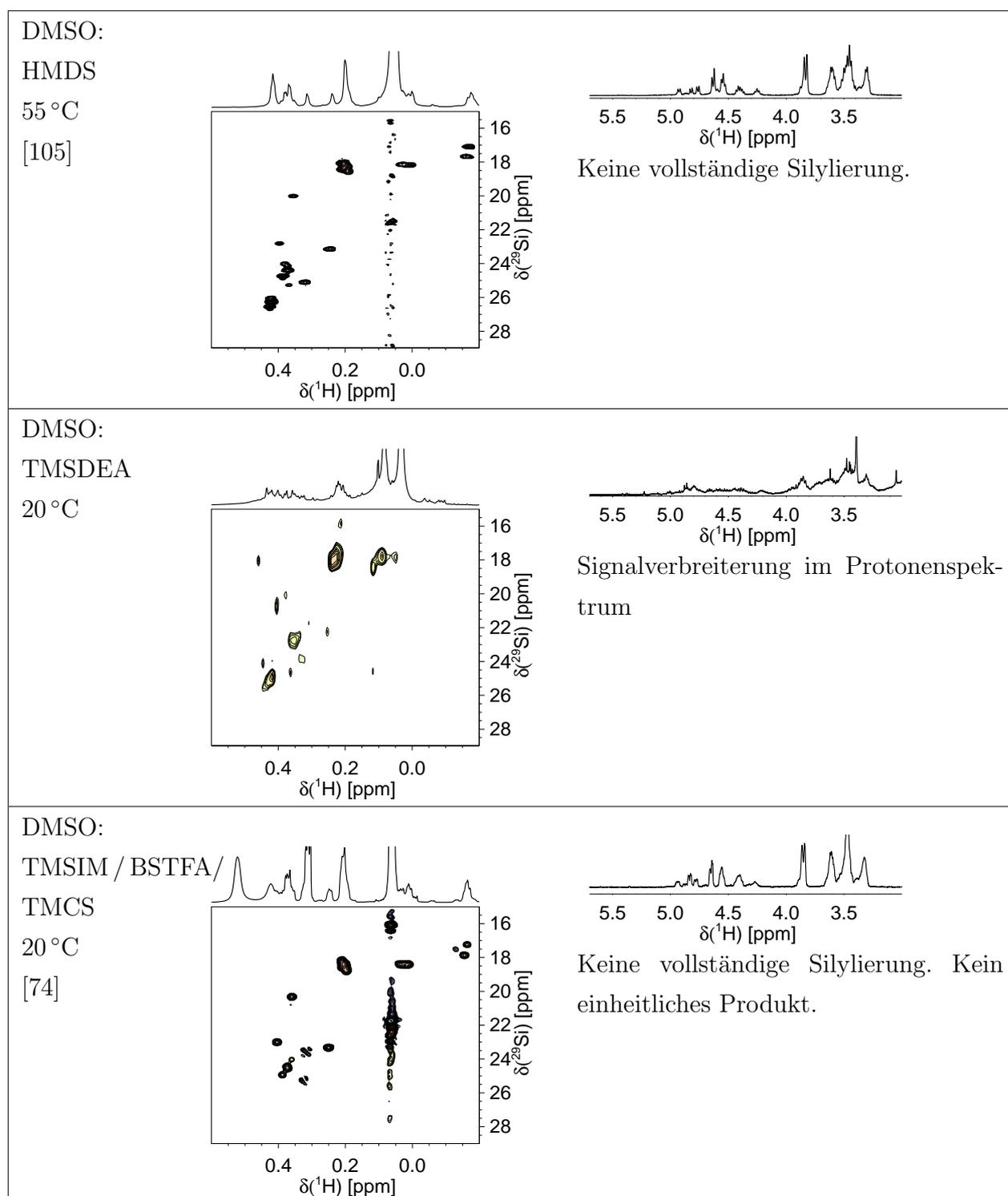
Für eine Abschätzung der Menge an Silylierungsreagenz, die für eine weitgehend quantitative Silylierung nötig ist, wurden unterschiedliche Mengen einer in DMSO gelösten Carminsäure zugegeben. Abb. 6.3 zeigt das Verhalten der Signalgruppen bei verschiedenen Mengen des Silylierungsmittels. Bei einer Zugabe von 260% BSTFA entstehen aus den Signalgruppen definierte, scharfe Peaks. Bei Anlegen von Vakuum zur Entfernung der Nebenprodukte wird eine Aufteilung der Signale auf Peakgruppen beobachtet. Die silylierte Carminsäure hat unter dem angelegten Vakuum TMS-Gruppen abgespaltet. TMS-Signale des Silylierungsreagenzes BSTFA sind nur bei großem Überschuß und zügigem Messen zu beobachten. Das eingesetzte N,O-BSTFA reagiert zu N-(Trimethylsilyl)trifluoroacetamid

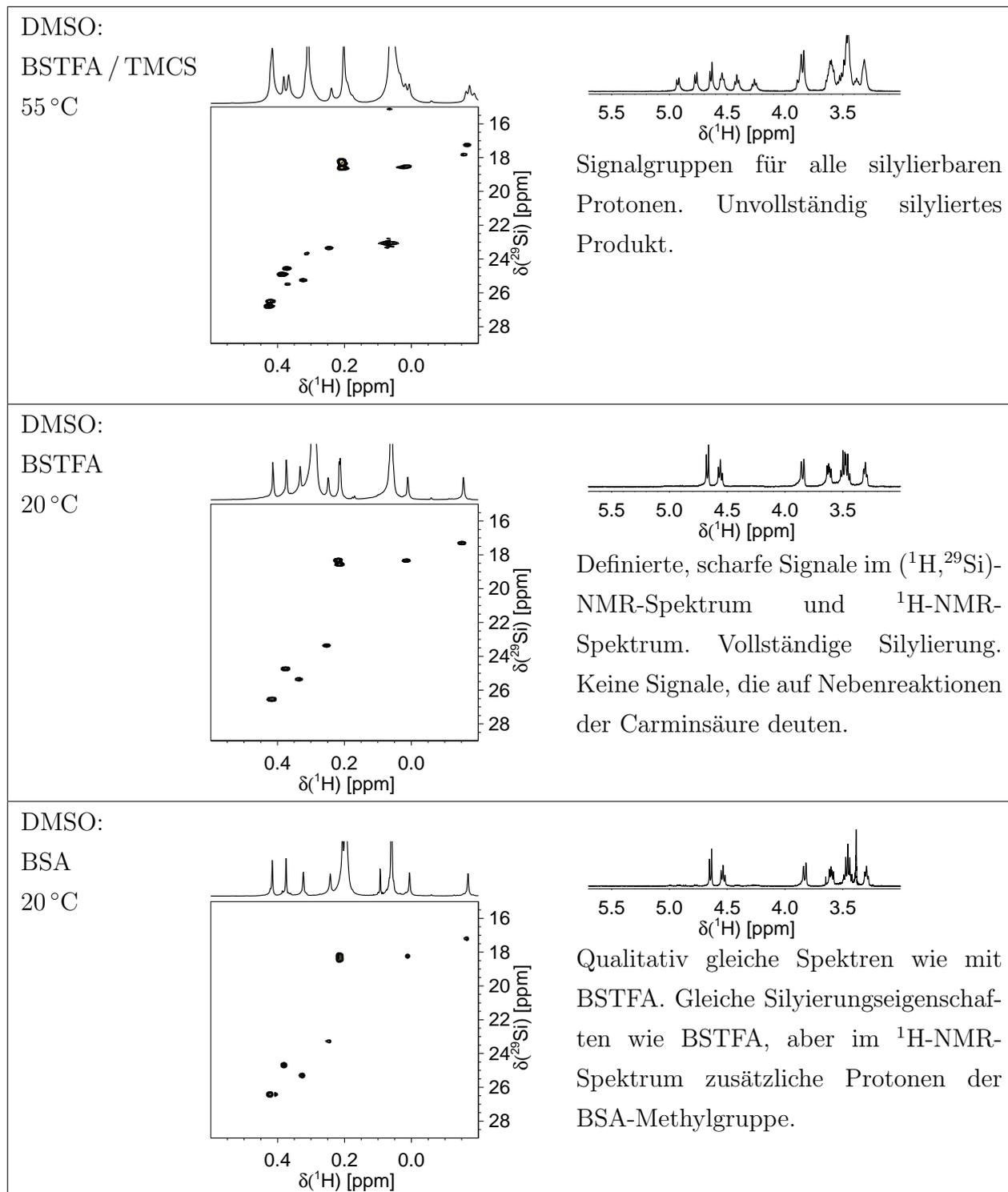


Abbildung 6.2: Vergleich einiger literaturbekannter Silylierungsmethoden anhand von ( $^1\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$ )-NMR-Spektren und  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren silylierter Carminsäuren.

Methode	$^1\text{H}$ , $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektrum	$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Zucker-Bereichs und Bewertung
Pyridin: HMDS 50 °C [146]	 <p>2D NMR spectrum showing <math>\delta(^1\text{H})</math> [ppm] on the x-axis (0.4 to 0.0) and <math>\delta(^{29}\text{Si})</math> [ppm] on the y-axis (16 to 28). The spectrum displays a complex pattern of cross-peaks and proton signals, indicating incomplete silylation.</p>	 <p><math>^1\text{H}</math>-NMR spectrum of the sugar region (5.5 to 3.5 ppm). The spectrum shows a distribution of cross-signals and proton signals across several resonances, indicating unevenly silylated carminic acid. No complete silylation.</p>
Pyridin: BSTFA 60 °C [125][168]	 <p>2D NMR spectrum showing <math>\delta(^1\text{H})</math> [ppm] on the x-axis (0.4 to 0.0) and <math>\delta(^{29}\text{Si})</math> [ppm] on the y-axis (16 to 28). The spectrum shows signal broadening, indicating incomplete silylation.</p>	 <p><math>^1\text{H}</math>-NMR spectrum of the sugar region (5.5 to 3.5 ppm). The spectrum shows signal broadening, indicating incomplete silylation.</p>
Pyridin: BSTFA 20 °C	 <p>2D NMR spectrum showing <math>\delta(^1\text{H})</math> [ppm] on the x-axis (0.4 to 0.0) and <math>\delta(^{29}\text{Si})</math> [ppm] on the y-axis (16 to 28). The spectrum shows signal groups instead of individual signals, indicating incomplete silylation.</p>	 <p><math>^1\text{H}</math>-NMR spectrum of the sugar region (5.5 to 3.5 ppm). The spectrum shows signal groups instead of individual signals, indicating incomplete silylation.</p>

DMF: BSTFA / TMCS 60 °C [39]			Signalgruppen mit sehr vielen Peaks aufgrund großer Anzahl unterschiedlich silylierter Moleküle. Keine vollständige Silylierung.
DMF: BSTFA 20 °C			Signalgruppen statt einzelner Signale. Keine vollständige Silylierung.
DMF: TMCS 20 °C [124]			Breite Signale im $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum, die durch schnelle Relaxation verursacht werden. Im $^1\text{H}^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektrum werden keine Kreuzsignale erhalten. Keine Signale der phenolischen Gruppen im $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Silylbereichs.
$\text{CDCl}_3$ : TMCS 20 °C, [99][100]	Carminsäure löst sich nicht, Lösung bleibt klar.		
Acetonitril: 20 °C, [189][190][125]	Carminsäure löst sich nicht.		





weiter, welches mit  $\delta(^{29}\text{Si})=10.6$  ppm und  $\delta(^1\text{H})=0.31$  ppm außerhalb des Bereiches von silylierter Carminsäure und silylierten Huminstoffen liegt .

Die Ausbeute der an Carminsäure optimierten Silylierungsreaktion wurde an vielen Modellverbindungen, wie Carbonsäuren unterschiedlicher Azidität oder Verbindungen mit eingeschränkter räumlicher Zugänglichkeit überprüft. In Tabelle 6.1 sind die durch Integration von  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren erhaltenen Umsätze der silylierbaren Protonen aufgelistet. Aufgrund des geringen Verschiebungsbereichs der Trimethylsilylprotonen und den daraus resultierenden Überlagerungen einzelner Peaks im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum können die ermittelten Werte je nach Anzahl funktioneller Gruppen der Ausgangssubstanz nur auf 1-5 % genau angegeben werden. Während unter den gewählten Reaktionsbedingungen aromatische und aliphatische Säuren praktisch quantitativ derivatisiert werden, liegen die Werte von aliphatischen primären und sekundären Hydroxylgruppen sowie phenolischen Unterstrukturen bei 75 bis 100% . Die Silylierung von Lysin zeigt, daß außer den sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen auch Amine unter den optimierten Derivatisierungsbedingungen silyliert werden (88 %). Die  $\delta(^{29}\text{Si})$ -Werte liegen mit 3.6 und 2.3 ppm, bezogen auf die  $\delta(^{29}\text{Si})$ -Werte der Silylether und Silylester, deutlich hochfeldverschoben.

Tabelle 6.1: Umsätze der Silylierungsreaktion bezogen auf funktionelle Gruppen der Ausgangssubstanzen in %.

Modellverbindung	-COOH	C <sub>ar</sub> -OH	C <sub>alk</sub> -OH
Quercetin	–	98	–
Saccharose	–	–	88
D-Glucarsäure-1,4-lacton	99	–	99
meso-Butan-1,2,3,4-tetracarbonsäure	99	–	–
R(-)Mandelsäure	100	–	91
Tetrahydrofuran-2,3,4,5-tetracarbonsäure	99	–	–
trans-DL-1,2-Cyclopentandicarbonsäure	100	–	–
Benzoessäure	99	–	–
Vanillinsäure	100	überlagert	–
L(+)-Weinsäure	100	–	94
Salicylsäure	100	83	–
Syringylsäure	98	76	–
Phthalsäure	99	–	–

Abbildung 6.3: Weitere Untersuchung der Methode BSTFA/DMSO.

Verhältnis von eingesetzten TMS-Gruppen zu aziden Protonen	$^1\text{H}, ^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektrum	$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Zucker- Bereichs und Bewertung
130 % :		<p data-bbox="858 763 1394 898">Silylether sind auf Signalgruppen aufgeteilt. Die silylierte Carboxylfunktion erzeugt ein einzelnes Signal.</p>
260 % :		<p data-bbox="858 1256 1394 1339">Einzelne, scharfe Signale. Vollständig silyliertes Produkt.</p>
nach Behand- lung mit Va- kuum		<p data-bbox="858 1753 1394 1939">Zerfall der Signale in Signalgruppen. Abspaltung von TMS-Gruppen der quantitativ silylierten Carminsäure durch Anlegen von Vakuum.</p>

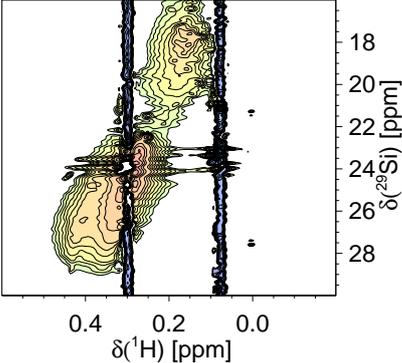
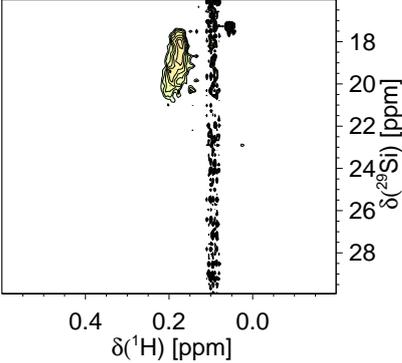
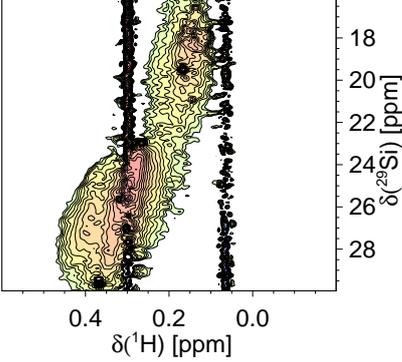
### 6.1.2 Silylierung von Huminstoffen

Neben Carminsäure wurde auch ein aquatischer Huminstoff (MPDOM) nach literaturbekannten Methoden silyliert, die für die Silylierung von Ligninen und Huminstoffen verwendet wurden. Die aufgenommenen ( $^1\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$ )-NMR-Spektren sind wie die Spektren der silylierten Carminsäure von unterschiedlicher Qualität. Die Spektren der drei mit BSTFA silylierten HS zeigen das erwartete Muster von Silylether und Silylester. Es lassen sich die Bereiche von Silylethern und Silylestern unterscheiden. Die vertikalen verrauschten Linien ( $t_1$ -Rauschen) sind auf die Anwesenheit großer Mengen an Nebenprodukten zurückzuführen, deren Resonanzsignale sich außerhalb des abgebildeten Ausschnitts befinden. Das letzte Spektrum der Abb. 6.4 wurden nach der in Kapitel 6.1.1 optimierten Methode aufgenommen.

Abbildung 6.4: Vergleich einiger literaturbekannter Silylierungsmethoden anhand von  $^1\text{H}$ , $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektren und  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren eines silylierten aquatischen Huminstoffes.

Methode	$^1\text{H}$ , $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektrum	Bewertung
Pyridin: HMDS 50 °C [146]		Schlechte Qualität des Spektrums, trotzdem Silylether und Silylester erkennbar.
Pyridin: BSTFA 60 °C [125] [168]		Silylether und Silylester vorhanden. Intensitätsverhältnis wie erwartet.
DMF: TMCS 20 °C [124]		Nur wenige aliphatische Silylether vorhanden. Keine Silylester und aromatische Silylether.



DMF: BSTFA / TMCS 60 °C [39]		Silylether und Silylester vorhanden. Intensitätsverhältnis wie erwartet.
DMSO: HMDS 55 °C [105]		Im Silylbereich der $^1\text{H}$ - und $(^1\text{H},^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektren sind keine Signale von Silylestern vorhanden.
DMSO: BSTFA 20 °C vorliegende Arbeit		Silylether und Silylester vorhanden. Intensitätsverhältnis wie erwartet. Qualitativ und quantitativ auswertbares 2D NMR-Spektrum.

### 6.1.3 Das Silylierungsverfahren nach Haider et al.

Ein trockener Boden wurde mit TMCS gemäß der von Haider et al. etablierten Prozedur [99] [100] silyliert. Unter Stickstoffatmosphäre wurde der Boden in Natronlauge suspendiert und anschließend gefriergetrocknet. Für die Silylierungsreaktion wurde der vorbehandelte Boden in  $\text{CHCl}_3$  suspendiert,  $\text{NaOH}_{[s]}$  und TMCS zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Abzentrifugieren wurde der Rückstand mit Aceton in einer Soxhlet-Apparatur extrahiert und das so erhaltene gelblich gefärbte Extrakt mit dem ebenfalls gelblichen  $\text{CHCl}_3$ -Extrakt vereinigt. Nach der Entfernung flüchtiger Produkte im Vakuum wurde die dunkelbraune, ölige Flüssigkeit in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  aufgenommen und mit Eiswasser zur Spaltung silylierter Metallverbindungen eine Minute geschüttelt. Die organische Phase wurde sofort mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel erneut abgezogen.

Zur NMR-spektroskopischen Untersuchung wurde das Produkt in  $\text{CDCl}_3$  gelöst. Die erhaltenen NMR-Spektren dieser Substanz sind in der ersten Spalte der Abb. 6.5 abgebildet.

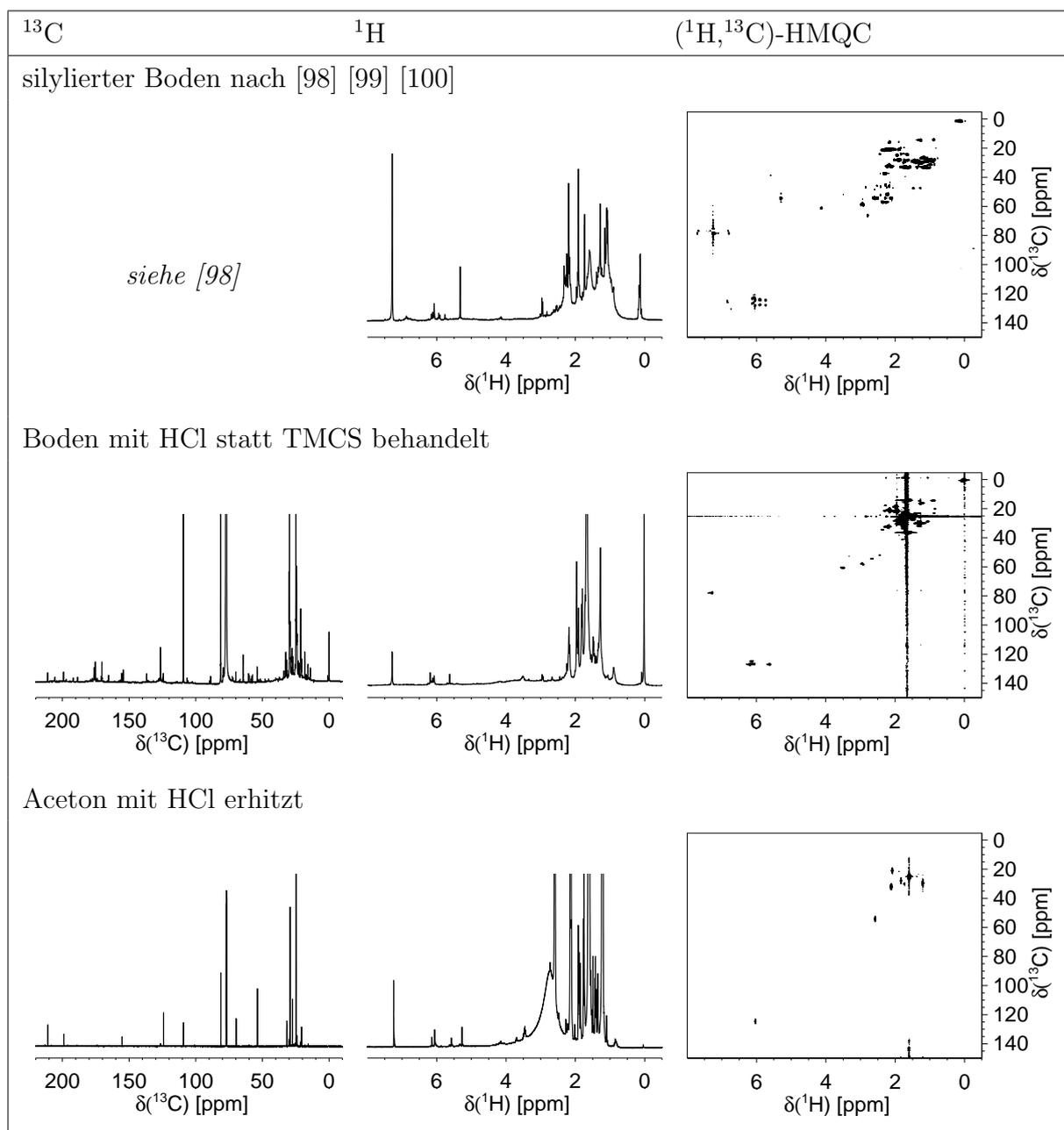
Es fällt auf, daß das Protonenspektrum der silylierten Bodensubstanz kaum Resonanzen im Silylbereich bei 0.5–0.0 ppm aufweist. Werden azide Protonen einer Substanz durch die TMS-Gruppe substituiert, so muß das Integral der Silylgruppe, die neun Protonen enthält, um den Faktor neun größer sein. Da das Verhältnis der Integrale 30:1 beträgt, liegt der Anteil der substituierten Protonen bei  $\frac{1}{9 \cdot 30}$ , d.h. 0.37%. Literaturgemäß liegt der Anteil silylierbarer Carboxyl- und Hydroxylfunktionen jedoch bei 20–30%. Es wurde demnach höchstens  $\frac{1}{50}$  der silylierbaren Funktionen silyliert.

Für diese Beobachtung sind zwei Erklärungen denkbar: Das Reaktionsprodukt enthält höchstens 1% silylierte Bodensubstanz, 99% sind Nebenprodukte, die keine TMS-Gruppen enthalten oder es handelt sich um ein größtenteils unsilyliertes Lösungsmittel-extrakt des Bodens. Um diese beiden Möglichkeiten zu überprüfen, wurden zwei weitere Reaktionen durchgeführt und deren Reaktionsprodukte NMR-spektroskopisch untersucht.

Es wurde eine Blindreaktion durchgeführt, bei der das Silylierungsreagenz TMCS durch einige Tropfen Salzsäure ersetzt wurde. Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum der erhaltenen Substanz weist dasselbe Huminstoff-unspezifische Muster (Spalte 2) auf wie die von Haider et al. veröffentlichten Spektren. Sowohl die Protonenspektren als auch die ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-HMQC-Spektren sind einander sehr ähnlich. Das Silylierungsreagenz besitzt demnach keinen Einfluß auf das Reaktions- bzw. Extraktionsprodukt.

Zur Überprüfung, ob es sich bei den gelblichen Substanzen um ein Extrakt der organischen Bodensubstanz handelt oder um Polymerisationsprodukte des Lösungsmittels, wurde eine weitere Blindreaktion durchgeführt, dessen NMR-Spektren in der dritten Spalte abgebildet sind. Für diese Reaktion wurde weder das Silylierungsreagenz noch der Boden eingesetzt. Aceton wurde mit einigen Tropfen Salzsäure in Anwesenheit von  $\text{NaOH}_{[s]}$  erhitzt bis sich

Abbildung 6.5: NMR-Spektren einer nach Haider et al. silylierten Bodensubstanz und zweier Blindproben.



die Lösung gelblich färbte. Die in den NMR-Spektren der ersten beiden Substanzen dominierenden Signale stimmen mit den Signalen des Aceton-Polymerisates überein.

Aus diesen Ergebnissen resultiert, daß das nach der Methode von Haider et al. erhaltene Produkt zum einen aus einem Lösungsmittlextrakt des Bodens und zum anderen aus dem Polymerisationsprodukt von Aceton besteht. Nur ein verschwindend kleiner Anteil des Produktes liegt in silylierter Form vor.

Diese Methode ist für die NMR-spektroskopische Charakterisierung der Funktionalität von HS aus folgenden Gründen nicht geeignet:

- Nur ein Bruchteil der organischen Bodensubstanz wird erfaßt. Lösungen, die terrestrische HS enthalten, besitzen die für HS typische tiefe schwarzbraune Färbung. Die Lösung dieses Produktes ist hingegen hell-gelblich.
- Das Produkt liegt weitgehend underivatisiert vor und ist daher für die  $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektroskopie ungeeignet.
- Die Signale des Bodenextraktes werden von Signalen der Acetonpolymerisate überlagert.
- Bereits isolierte HS konnten mit diesem Verfahren nicht gelöst und somit nicht silyliert werden.

In Kapitel 6.1.1 wurde diese Silylierungsmethode an der Modellverbindung Carminsäure überprüft. Die Reaktionslösung blieb klar, die Carminsäure wurde nicht silyliert.

## 6.2 Auswahl der 1D-NMR-Experimente und Optimierung der Parameter

### 6.2.1 Die $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie

#### Einpulsexperiment

Für die Aufnahme von  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden die in der Literatur üblichen Parametersätze verwendet (s. Tabelle 6.2). Die Bedeutung der Parameter ist in Kap. 4 ausführlich erläutert.

Tabelle 6.2: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für  $^1\text{H}$ -Einpuls-Experimente von HS.

Aufnahmeparameter			
Probenkopf	5 mm BBI oder 5 mm BBO		
Frequenz des $^1\text{H}$ -Kerns	500.13	MHz	
spektrale Breite	ca. 15000	Hz	
Akquisitionszeit	0.546 bis 1.091	s	
Anzahl der Meßpunkte in der Zeitdomäne	16384 oder 32768		
Relaxationsdelay	2.0	s	
Pulslänge $30^\circ$ : $^1\text{H}$ -Kern	4.2 oder 3.3	$\mu\text{s}$	
Prozessierungsparameter			
Nullpunktfüllung (Anzahl komplexwertiger Punkte nach FT)	32768 oder 65536		
Filter	Exponentialfunktion		
Linienverbreiterungsfaktor	3	Hz	

#### Eindimensionale Version der NOESY-Sequenz mit Vorsättigung

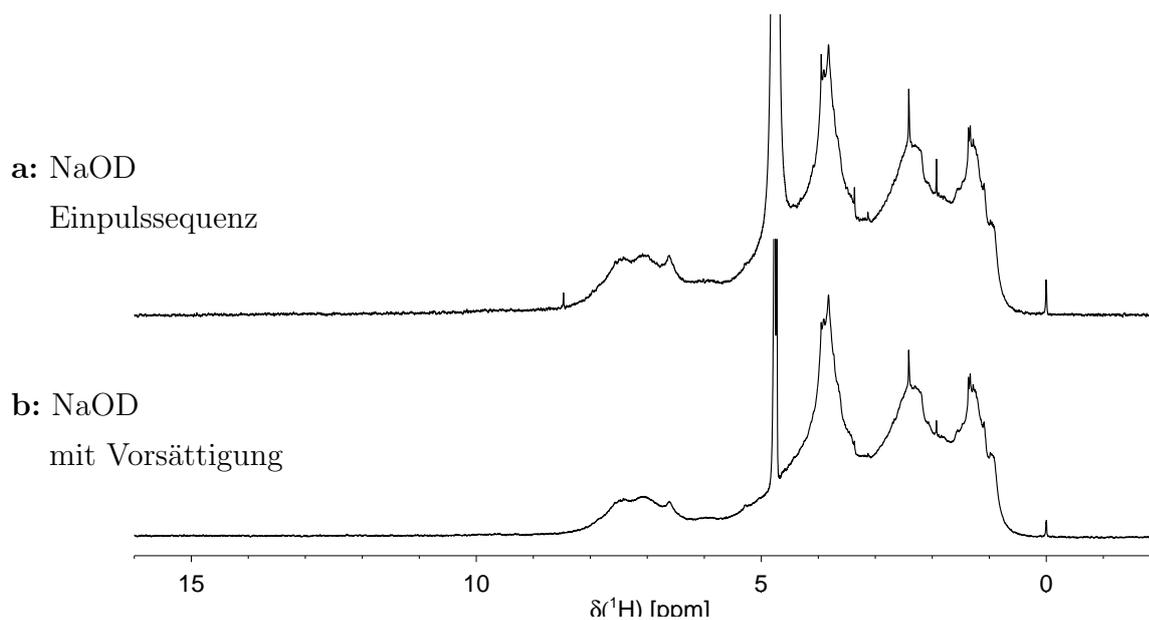
Für die eindimensionale Version der NOESY-Sequenz mit Vorsättigung während des Relaxationsdelays und der Mischzeit wurde der in Tabelle 6.3 aufgeführte Parametersatz verwendet.

In Abb. 6.6 ist das Protonenspektrum von BS1FA in NaOD-Lösung, das mit der NOESY-Sequenz aufgenommen worden ist, dem Einpulsspektrum gegenübergestellt. In beiden Spektren sind die austauschenden Protonen in dem  $\text{H}_2\text{O}$ -Peak bei 4.8 ppm enthalten, der im NOESY-Experiment unterdrückt wird. Die Spektren repräsentieren die als "Gerüstprotonen" der HS-Moleküle bezeichneten Protonen.

Tabelle 6.3: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für eindimensionale NOESY-Experimente mit Vorsättigung.

Aufnahmeparameter		
Probenkopf	5 mm BBI	
Frequenz des $^1\text{H}$ -Kerns	500.13	MHz
spektrale Breite	15015	Hz
Akquisitionszeit	0.273	s
Anzahl der Meßpunkte in der Zeitdomäne	8192	
Relaxationsdelay	2.0	s
Mischzeit	0.200	s
Pulslänge $90^\circ$ : $^1\text{H}$ -Kern	12.6	$\mu\text{s}$
Prozessierungsparameter		
Nullpunktfüllung (Anzahl komplexwertiger Punkte nach FT)	32768	
Filter	Exponentialfunktion	
Linienverbreiterungsfaktor	3	Hz

Abbildung 6.6: Vergleich verschiedener Pulssequenzen.

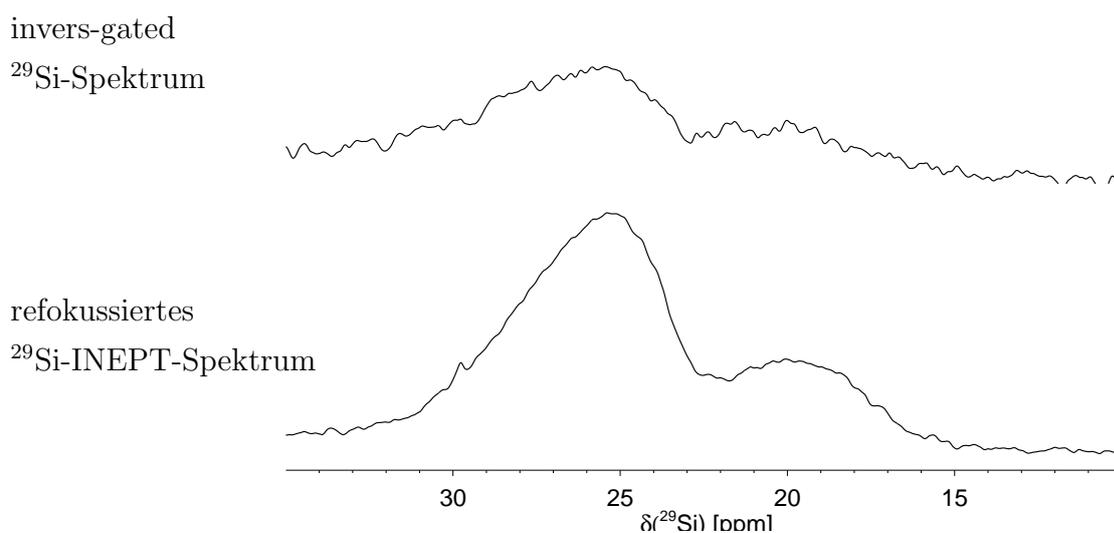


### 6.2.2 Die $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektroskopie

$^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektren werden durch invers-gated entkoppelte Experimente oder durch die INEPT-Pulssequenz aufgenommen. Die INEPT-Sequenz bietet den Vorteil, daß durch Polarisationstransfer und kürzere Relaxationsdelays eine wesentliche Verbesserung der Spektrenqualität bei geringem Verlust der Quantifizierbarkeit verbunden ist (s. Kapitel 4.6). Inwieweit die refokussierte INEPT-Technik die Anteile der Silylether und -ester im Vergleich zu dem invers-gated-entkoppelten Experiment widerspiegelt, wurde an der aquatischen Fulvinsäure HO10FA überprüft. In Abb. 6.7 sind die mit äquivalenten Parametersätzen gemessenen Spektren abgebildet. Die Meßzeit betrug für beide Spektren 7 h bei einer Substanzmenge von 30 mg. Da für Spektren mit Polarisationstransfer nur die Relaxationszeit der Protonen berücksichtigt wird, die sehr viel kürzer ist als die der  $^{29}\text{Si}$ -Kerne, wurde für die Aufnahme des INEPT-Spektrums ein Relaxationsdelay von nur 5 s gewählt. Der Relaxationsdelay des invers-gated Experiments betrug 30 s. Die Anzahl der im Meßzeitraum addierten Scans konnte so von 897 auf 4200 erhöht werden. Durch Polarisationstransfer wurden die Signale zusätzlich verstärkt (s. Kapitel 4.6).

Abb. 6.7 veranschaulicht die große S/N-Verbesserung durch die INEPT-Technik.

Abbildung 6.7: Vergleich des invers-gated  $^{29}\text{Si}$ -Experiments mit der refokussierten  $^{29}\text{Si}$ -INEPT-Technik anhand der Spektren von silylierter HO10FA.



Die Integrale betragen:

Experiment	Silylester	Silylether
	33 – 22.5 ppm	22.5 – 14 ppm
invers-gated Experiment	75 %	25 %
refokussiertes INEPT-Experiment	75 %	25 %

Die aus der Integration der  $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektren erhaltenen Werte für Carboxylgruppen und aromatische, sowie aliphatische Hydroxylfunktionen sind im Rahmen der Integrationsgenauigkeit von ca. 1 % gleich. Die refokussierte INEPT-Technik ist somit für die Untersuchung der chemischen Umgebung der  $^{29}\text{Si}$ -Kerne silylierter Huminstoffe geeignet. Sie liefert quantitative Ergebnisse bei erheblicher Meßzeitersparnis durch größeres Signal-Rausch-Verhältnis [168].

Tabelle 6.4: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für refokussierte INEPT-Experimente von HS.

Aufnahmeparameter	
Probenkopf	multinuklear 5 mm BBO
Frequenz des $^{29}\text{Si}$ -Kerns	99.36 MHz
spektrale Breite	4960 Hz
Akquisitionszeit	0.826 s
Anzahl der Meßpunkte in der Zeitdomäne	8192
Relaxationsdelay	5.0 s
Pulslänge $90^\circ$ : $^{29}\text{Si}$ -Kern	11 $\mu\text{s}$
Pulslänge $90^\circ$ : $^1\text{H}$ -Kern	10 $\mu\text{s}$
Kopplungskonstante $^2\text{J}(\text{Si},\text{H})$	6.8 Hz
$d1 = 1/4\text{J}$	0.0368 s
$d2 = 0.108 \cdot \text{J}^{-1}$	0.0159 s
Entkopplung	WALTZ-16
Prozessierungsparameter	
Nullpunktfüllung (Anzahl komplexwertiger Punkte nach FT)	8192
Filter	Exponentialfunktion
Linienverbreiterungsfaktor	25 Hz



### 6.2.3 Die $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie

Die Aufnahmen von  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren zur Untersuchung des Silylbereichs silylierter HS wurden mit der invers-gated Entkopplungstechnik durchgeführt. Diese Technik ist die am häufigsten verwendete Pulssequenz für die Untersuchung von HS und wird routinemäßig zur Bestimmung der Verteilung von Kohlenstoff in HS herangezogen. Dieses Experiment liefert  $^1\text{H}$ -entkoppelte  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren ohne Signalverstärkung durch den NOE, der zu einer Verzerrung der Signalintensitäten aufgrund der unterschiedlichen chemischen Umgebungen der  $^{13}\text{C}$ -Kerne im HS-Molekül führen würde. Die erhaltenen Spektren sind näherungsweise quantitativ verglichen mit der konventionellen Einpulstechnik. Da die  $^{13}\text{C}$ -Kerne der TMS-Gruppen ähnliche chemische Umgebungen aufweisen und somit gleiche Relaxationseigenschaften besitzen, können die Silylbereiche der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren quantitativ ausgewertet werden.

Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Experimente wurden mit folgenden Aufnahme- und Prozessierungsparametern durchgeführt:

Tabelle 6.5: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für invers-gated-entkoppelte  $^{13}\text{C}$ -Experimente von HS.

Aufnahmeparameter		
Probenkopf	5 mm BBO, 5 mm BBI	
Frequenz des $^{13}\text{C}$ -Kerns	125.76	MHz
Spektrale Breite	35211 oder 37594	Hz
Akquisitionszeit	0.440 bis 0.930	s
Anzahl der Meßpunkte in der Zeitdomäne	32768 oder 65536	
Relaxationsdelay	7.5	s
Pulslänge $90^\circ$ : $^{13}\text{C}$ -Kern	10.5 oder 10.8	$\mu\text{s}$
Entkopplung	WALTZ-16	
Prozessierungsparameter		
Nullpunktfüllung (Anzahl komplexwertiger Punkte nach FT)	32768	
Filter	Exponentialfunktion	
Linienverbreiterungsfaktor	3	Hz

## 6.3 Auswahl der 2D-NMR-Experimente und Optimierung der Parameter

### 6.3.1 Berechnung der Gradientenverhältnisse

Die gepulsten Feldgradienten  $G_1$ ,  $G_2$  müssen so gewählt werden, daß Gleichung 4.52 erfüllt ist. Nach dem Kohärenzleveldiagramm (Abb. 4.7) ergibt sich mit  $\gamma_{Si} = -\frac{1}{5}\gamma_H$  für das ( $^1\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$ )-HSQC-Echo:

$$+\frac{1}{5} \cdot G_1 - 1 \cdot G_2 = 0 \quad (6.1)$$

Für das Antiecho gilt:

$$-\frac{1}{5} \cdot G_1 - 1 \cdot G_2 = 0 \quad (6.2)$$

Für die Echos wurde das Gradientenverhältnis  $G_1 : G_2 = 5 : +1$  gewählt und für die Antiechos  $G_1 : G_2 = -5 : +1$ . Entsprechend wurden für die ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-Experimente die Gradientenverhältnisse  $4 : +1$  und  $-4 : +1$  gewählt.

### 6.3.2 Experimentelle Ermittlung einer geeigneten NMR-Technik

Unter Berücksichtigung der Eigenschaften der NMR-Experimente, die in Kapitel 4.2 vorgestellt worden sind, wurden verschiedene Pulssequenzen auf ihre Leistungsfähigkeit bezüglich ihrer Empfindlichkeit und Artefaktbildung überprüft. Es wurden 2D NMR-Spektren aufgenommen, miteinander verglichen und bewertet. In Abb. 6.8 sind die aufgenommenen Spektren abgebildet und die Eigenschaften der Experimente tabellarisch zusammengefaßt.

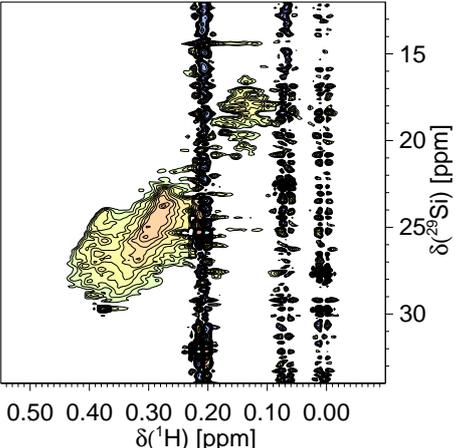
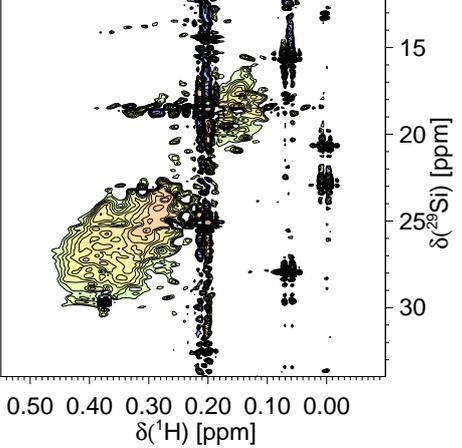
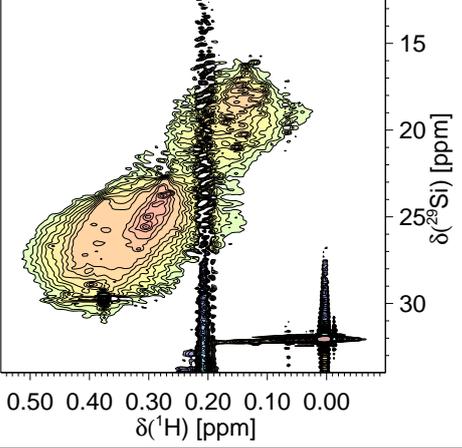
Nach qualitativer Bewertung der 2D-NMR-Spektren eignet sich das gs-HSQC-Experimente ohne PEP für die Untersuchungen von HS am besten. Dieses Experiment bietet das größte Signal-Rausch-Verhältnis ohne zusätzliche Artefakte, wie sie bei dem Experiment mit PEP (Überlagerung einer Sinusfunktion) auftreten. Das  $t_1$ -Rauschen der Nebenprodukte wird durch den Einsatz der Gradientenspektroskopie weitgehend unterdrückt.

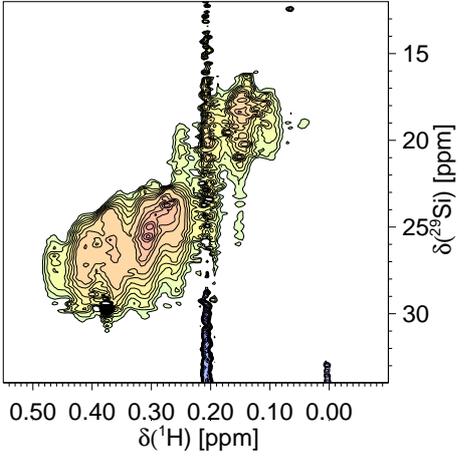
### 6.3.3 Ermittlung von geeigneten Prozessierungsparametern

Für die heteronuklear korrelierten  $^1\text{J}$  ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )- und  $^2\text{J}$  ( $^1\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$ )-HSQC-Spektren der Silyl-bereiche wurden exponentielle und sinusförmige Funktionen in  $F_1$  und  $F_2$  getestet. Die Form der Sinusfunktionen, mit denen die Daten multipliziert werden, entspricht

$$\sin\left(\left(\pi - \frac{\pi}{SSB}\right) \cdot \frac{t}{AQ} + \frac{\pi}{SSB}\right), \quad 0 < t < AQ \quad (6.3)$$

Abbildung 6.8: Vergleich verschiedener NMR-Pulssequenzen anhand von ( $^1\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$ )-NMR-Spektren silylierter BS1FA.

NMR-Experiment	$^1\text{H}$ , $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektrum	Charakteristika des 2D-NMR-Spektrums
Phasensensitives (TPPI) HMQC-Experiment mit BIRD-Selektion zur Unterdrückung von $^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen; Entkopplung während der Detektionszeit		geringe Signalintensität; $t_1$ -Rauschen
Phasensensitives (TPPI) gs-HMQC-Experiment mit Gradientenpulse zur Kohärenzselektion Entkopplung während der Detektionszeit		geringe Signalintensität
gs-HSQC: ( $^1\text{H}$ , X)-Korrelation mit doppeltem INEPT-Transfer und Trim-Puls in der ersten INEPT-Sequenz; phasensensitiv durch Echo/Antiecho-TPPI Gradientenselektion; Entkopplung während der Detektionszeit		gutes Signal-Rausch-Verhältnis

NMR-Experiment	$^1\text{H}, ^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektrum	Beschreibung des 2D-NMR-Spektrums
gs-HSQC mit PEP: ( $^1\text{H}, \text{X}$ )-Korrelation mit doppeltem INEPT-Transfer und Trim-Puls in der ersten INEPT-Sequenz; mit PEP-Sequenz zur Empfindlichkeitssteigerung; phasensensitiv durch Echo/Antiecho-TPPI Gradientenselektion; Entkopplung während der Detektionszeit		gutes Signal-Rausch-Verhältnis; überlagert von einer Sinus-Funktion

Eine Sinuswelle wird mit großen  $SSB$ -Werten erhalten; eine reine Cosinuswelle mit  $SSB = 2$ . Die Werte  $SSB = 3, 4, 5, 6 \dots$  entsprechen Mischfunktionen. Die FID der  $^1\text{J} (^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ - und  $^2\text{J} (^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -HSQC-Experimente wurden in  $F_2$  mit  $SSB = 3$  prozessiert. In  $F_1$  wurde das Quadrat der Funktion 6.3 mit  $SSB = 3$  als Filterfunktion gewählt.

Diese Filter-Funktionen bieten ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis bei ausreichend strukturierten Spektren. Abb. 6.9 veranschaulicht die Effekte der Filterung: Werden Funktionen gewählt, die die Signale stark verbreitern, so sind Detailstrukturen nicht mehr erkennbar, werden hingegen Funktionen gewählt, die eine Peakverschmälerung bewirken, so nimmt das Signal-Rausch-Verhältnis stark ab. Eine umfangreichere Erläuterung der Filtermöglichkeiten findet sich in Kapitel 4.4.

Den Einfluß von unterschiedlichen Inkrementanzahlen auf die Auflösung der Spektren veranschaulicht Abb. 6.10. Bei zunehmender Inkrementanzahl nimmt die Auflösung zu. Da die Intensität der einzelnen Bereiche gleichermaßen abnimmt, kann angenommen werden, daß die Kerne der TMS-Gruppen mit gleicher Geschwindigkeit relaxieren. Eine erhöhte Relaxationsgeschwindigkeit hätte eine größere Abnahme der Signalintensität zur Folge.

Den Einfluß der Anzahl der Inkremente veranschaulicht Abb. 6.10. Mit steigender Inkrementanzahl nimmt die Auflösung in  $F_2$  zu. Das S/N-Verhältnis nimmt jedoch mit steigender Inkrementanzahl wegen der damit verbundenen längeren Pulssequenzdauer ab. Aufgrund des gleichmäßigen S/N-Verlustes mit zunehmender Anzahl der Inkremente (Erscheinungsbild der Spektren bleiben gleich) läßt sich schließen, daß die Protonen der unterschiedlich substituierten TMS-gruppen gleich schnell relaxieren (kein selektiver Relaxationseffekt).

Für die Differenzspektren in Kapitel 7.4.2, bei denen ein großes S/N-Verhältnis für eine optimale Bestimmung der Spektrenvolumina notwendig ist, wurden nur die ersten 128 Inkremente der Messungen prozessiert.

Abbildung 6.9: Vergleich verschiedener Prozessierungsparameter anhand von ( $^1\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$ )-NMR-Spektren silylierter BS1FA.

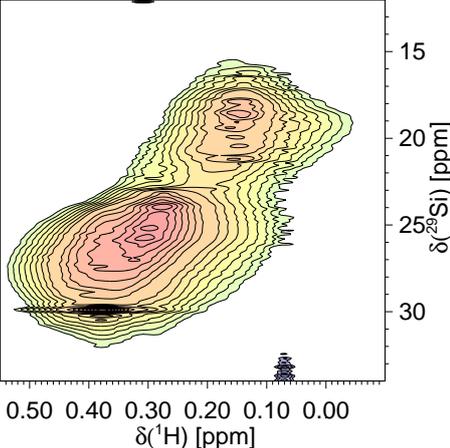
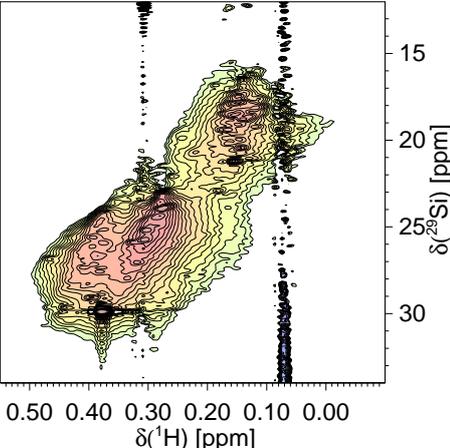
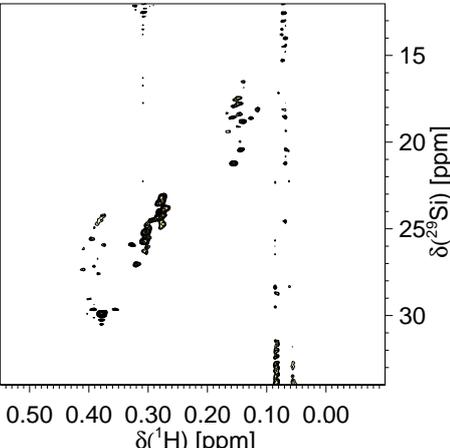
Prozessierung	$^1\text{H}$ , $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektrum	Beschreibung des 2D-NMR-Spektrums
F2: Exponentialfunktion, 10 Hz F1: sinus, $SSB=3$		hohes S/N-Verhältnis; Details nicht erkennbar
F2: sinus <sup>2</sup> , $SSB=3$ F1: sinus, $SSB=3$		hohes S/N-Verhältnis bei guter Auflösung
F2: sinus <sup>2</sup> F1: sinus, $SSB=3$		geringes S/N-Verhältnis; einzelne Peaks erkennbar

Abbildung 6.10: Vergleich verschiedener Anzahlen der Inkremente anhand von ( $^1\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$ )-NMR-Spektren silylierter BS1FA.

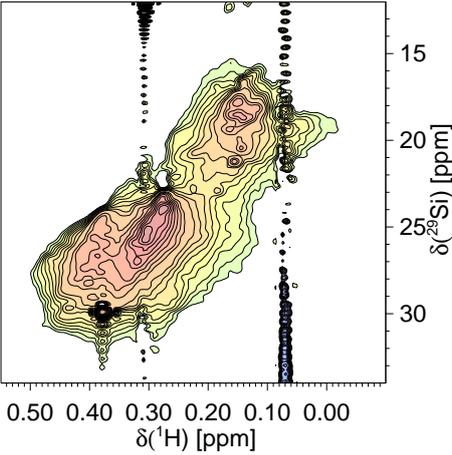
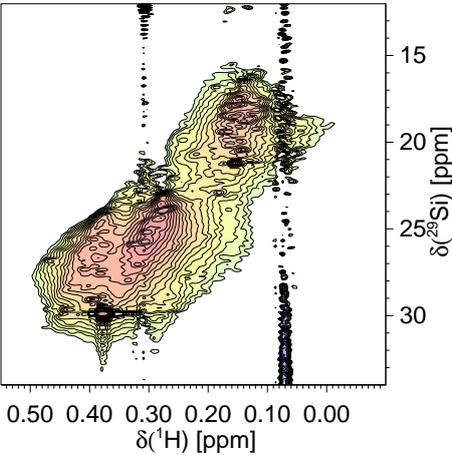
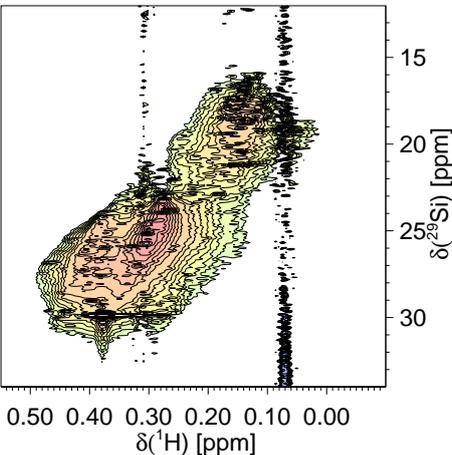
Inkrement- anzahl	$^1\text{H}$ , $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektrum	Beschreibung des 2D-NMR- Spektrums
128		Details nicht erkennbar
256		gute Auflösung
512		einzelne Peaks erkennbar

Tabelle 6.6: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für gs-( $^1\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$ )-HSQC-Experimente von HS.

F2 - Aufnahmeparameter		
Probenkopf	invers 5 mm BBI	
Frequenz des $^1\text{H}$ -Kerns	500.13	MHz
Frequenz des $^{29}\text{Si}$ -Kerns	99.36	MHz
spektrale Breite	6010	Hz
Akquisitionszeit	0.170	s
Anzahl Meßpunkte in der Zeitdomäne	2048	
Relaxationsdelay	2.0	s
Pulslänge $90^\circ$ : $^{29}\text{Si}$ -Kern	21.0	$\mu\text{s}$
Pulslänge $90^\circ$ : $^1\text{H}$ -Kern	10.8	$\mu\text{s}$
Trimpuls	2000	$\mu\text{s}$
Gradientenpulse	1000	$\mu\text{s}$
$d=1/4J_{H,Si}$	36.8	ms
Gradientenverhältnis (Echo-Antiecho)	5 : 1 : -5 : 1	
Kopplungskonstante $^2J(\text{Si},\text{H})$	6.8	Hz
Entkopplung	GARP	
F1 - Aufnahmeparameter		
Inkrement für die $t_1$ -Evolution	0.157	ms
spektrale Breite	32	ppm

F2 - Prozessierungsparameter		
Nullpunktfüllung (Anzahl komplexwertiger Punkte nach FT)	2048	
Filter	Quadrat der Sinus-Funktion	
SSB	3	
F1 - Prozessierungsparameter		
Datenprozessierung	echo-antiecho	
Nullpunktfüllung (Anzahl komplexwertiger Punkte nach FT)	128, 256 oder 512	
Filter	Sinus-Funktion	
SSB	3	

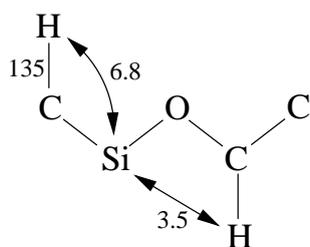


Tabelle 6.7: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für gs-( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-HSQC-Experimente von HS.

F2 - Aufnahmeparameter		
Probenkopf	invers 5 mm BBI	
Frequenz des $^1\text{H}$ -Kerns	500.13	MHz
Frequenz des $^{13}\text{C}$ -Kerns	125.75	MHz
spektrale Breite	6010	Hz
Akquisitionszeit	0.170	s
Anzahl Meßpunkte in der Zeitdomäne	2048	
Relaxationsdelay	2.0	s
Pulslänge $90^\circ$ : $^{13}\text{C}$ -Kern	10.0	$\mu\text{s}$
Pulslänge $90^\circ$ : $^1\text{H}$ -Kern	10.8	$\mu\text{s}$
Trimpuls	2000	$\mu\text{s}$
Gradientenpulse	1000	$\mu\text{s}$
d20	0.001427	s
$d=1/4J_{H,C}$	1.9	ms
Gradientenverhältnis (Echo-Antiecho)	4 : 1 : -4 : 1	
Kopplungskonstante $^2J(\text{Si},\text{H})$	135	Hz
Entkopplung	GARP	
F1 - Aufnahmeparameter		
Inkrement für die $t_1$ -Evolution	0.904	ms
spektrale Breite	4.4	ppm
F2 - Prozessierungsparameter		
Nullpunktfüllung (Anzahl komplexwertiger Punkte nach FT)	2048	
Filter	Quadrat der Sinus-Funktion	
SSB	3	
F1 - Prozessierungsparameter		
Datenprozessierung	echo-antiecho	
Nullpunktfüllung (Anzahl komplexwertiger Punkte nach FT)	128, 256 oder 512	
Filter	Sinus-Funktion	
SSB	3	

### 6.3.4 Weitbereichskopplungsexperimente: Verbindung von aliphatischen Hydroxylgruppen und der Gerüststruktur

Durch heteronuklear shift-korrelierte Weitbereichskopplungsexperimente gelingt eine Zuordnung von silylierten aliphatischen Hydroxylfunktionen zur Gerüststruktur durch die Ermittlung ihrer Position innerhalb des Gerüsts.



Entsprechende Kreuzsignale im  ${}^3J({}^1\text{H}{}^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektrum repräsentieren eine Dreibindungskorrelation von  ${}^{29}\text{Si}$ -Kernen des TMS-Substituenten zu Gerüstprotonen des HS. Die für die NMR-Spektroskopie von silylierten HS relevanten Kopplungen sind in der nebenstehenden Abbildung eingezeichnet.

Bei der Aufnahme von  ${}^3J({}^1\text{H}{}^{29}\text{Si})$ -NMR-Experimenten sind folgende Schwierigkeiten zu berücksichtigen:

- Bei indirekter Detektion in  ${}^2J({}^1\text{H},{}^{29}\text{Si})$ -Experimenten wird statt der neun TMS-Protonen nur ein Proton registriert. Für ein gleiches Signal-Rausch-Verhältnis ist die  $9^2 = 81$  fache Meßzeit erforderlich.
- Je kleiner eine Kopplungskonstante ist, d.h. je größer die Anzahl der beteiligten chemischen Bindungen ist, desto größer ist der Intensitätsverlust durch Relaxation ( ${}^2J \sim 6.8 \text{ Hz}$ ,  ${}^3J \sim 3.5 \text{ Hz}$ ,  ${}^4J \sim 2.0 \text{ Hz}$ ).
- Bei Weitbereichskopplungsexperimenten spielen außer der gewünschten Kopplung weitere Kopplungen eine Rolle, die einen Verlust an Intensität oder die Auslöschung eines Kreuzsignals verursachen können.

Zur Optimierung der Meßparameter wurde das Weitbereichskopplungsexperiment zunächst an Modellverbindungen getestet und überprüft. Der Delay  $d=1/4J_{\text{H,Si}}$  des HSQC-Experimentes betrug 71.4 ms entsprechend einer Kopplungskonstante von 3.5 Hz.

In den  ${}^3J({}^1\text{H}{}^{29}\text{Si})$ -HSQC-Spektren von silylierter Saccharose und 1,2-Propandiol (Abb. 6.11) sind die Kreuzsignale unterschiedlich stark ausgeprägt und weisen z.T. negative Phasen auf. Die Auslöschung einiger Signale wird durch Beiträge zusätzlicher Kopplungen verursacht. Die bei diesen einfachen Modellmolekülen schwer interpretierbaren NMR-Spektren lassen Schwierigkeiten bei der Messung und Interpretation von HS-NMR-Weitbereichskopplungsspektren erwarten (bei HS zudem zu erwartende Verluste durch Relaxation).

Abbildung 6.11:  $^3J(^1\text{H}^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektren von silylierter Saccharose (links) und 1,2-Propandiol (rechts).

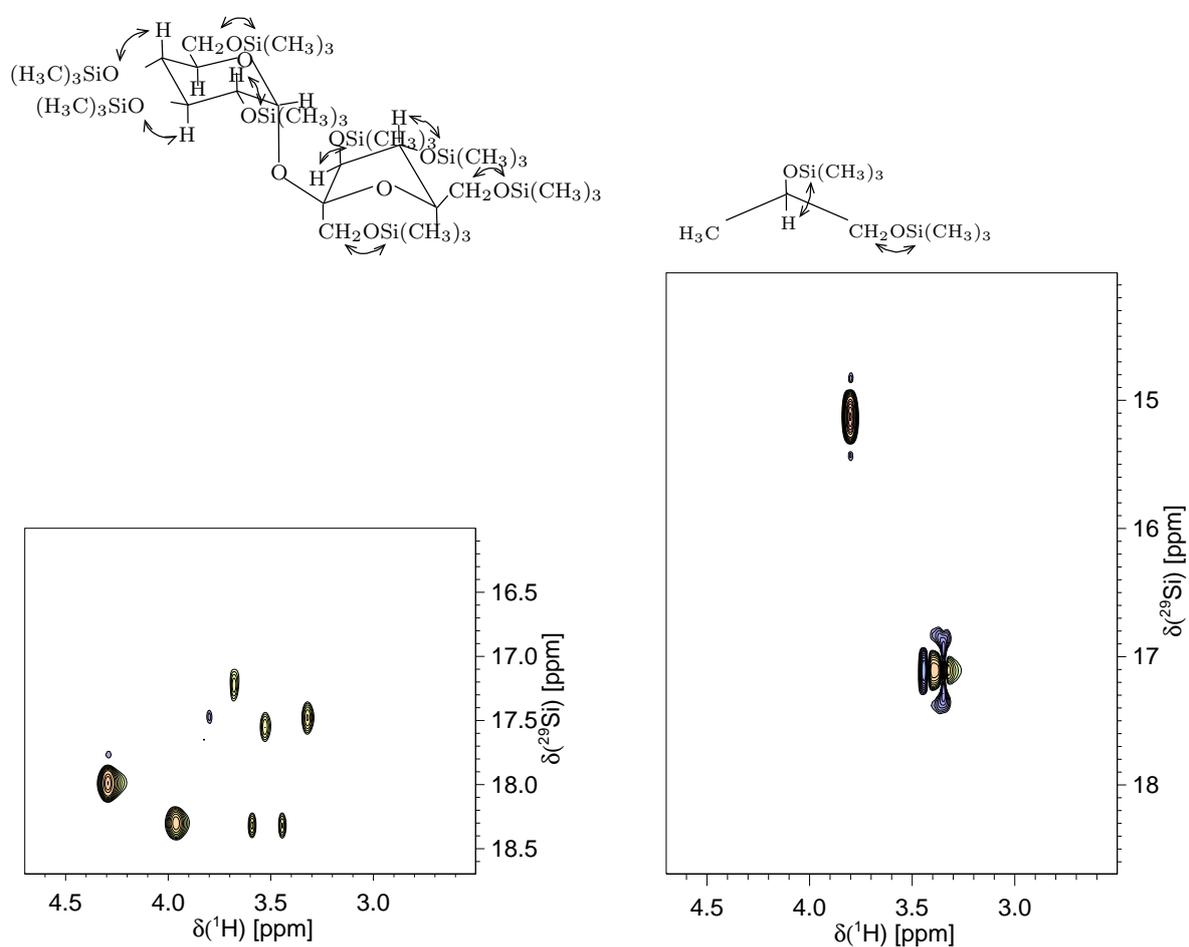


Tabelle 6.8: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für Weitbereichs-gs( $^1\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$ )-HSQC-Experimente von HS.

F2 - Aufnahmeparameter		
Probenkopf	invers 5 mm BBI	
Frequenz des $^1\text{H}$ -Kerns	500.13	MHz
Frequenz des $^{29}\text{Si}$ -Kerns	99.36	MHz
spektrale Breite	5000 bis 7002	Hz
Akquisitionszeit	0.102 bis 0.146	s
Anzahl Meßpunkte in der Zeitdomäne	1024 oder 2048	
Relaxationsdelay	1.0	s
Pulslänge $90^\circ$ : $^{29}\text{Si}$ -Kern	21.0	$\mu\text{s}$
Pulslänge $90^\circ$ : $^1\text{H}$ -Kern	10.8	$\mu\text{s}$
Trimpuls	2000	$\mu\text{s}$
Gradientenpulse	1000	$\mu\text{s}$
$d=1/4J_{H,Si}$	71.4	ms
Gradientenverhältnis (Echo-Antiecho)	5 : 1 : 5 : -1	
Kopplungskonstante $^2J(\text{Si},\text{H})$	3.5	Hz
Entkopplung	GARP	
F1 - Aufnahmeparameter		
Anzahl der Experimente	51 bis 80	
Inkrement für die $t_1$ -Evolution	0.180	ms
spektrale Breite	28	ppm

F2 - Prozessierungsparameter		
Nullpunktfüllung (Anzahl komplexwertiger Punkte nach FT)	2048	
Filter	Exponentialfunktion	
Linienverbreiterungsfaktor	40	Hz
F1 - Prozessierungsparameter		
Datenprozessierung	echo-antiecho	
Nullpunktfüllung (Anzahl komplexwertiger Punkte nach FT)	128	
Filter	Sinus-Funktion	
SSB	3	

### 6.3.5 Differenzspektren

In der konventionellen Isolinien-Darstellung einzelner 2D-NMR-Spektren sind die Unterschiede verschiedener Huminstoffe kaum erkennbar. Insbesondere bei der Vielzahl sich überlagernder Signale sind die im gesamten Signalebereich oftmals gering ausfallenden Unterschiede nicht lokalisierbar. Es ist daher notwendig, die Gemeinsamkeiten und Unterschiede rechnerisch zu bestimmen, wobei es weiterhin möglich ist, diese anschließend in der gewohnten Form graphisch darzustellen.

#### Problematik der Differenzspektren: die Normierung

Um mehrere zweidimensionale NMR-Spektren vergleichen zu können, müssen die Spektren zunächst aneinander angepaßt bzw. normiert werden. Dazu benötigt man deren tatsächliches Volumen-Verhältnis. Es gibt drei Möglichkeiten für die Definition eines solchen Verhältnisses:

1. Es werden die durch Elementaranalyse bestimmte Gesamtprotonenzahl und die Anzahl der austauschbaren Protonen berücksichtigt. Man erhält den tatsächlich vorhandenen Differenzbetrag bezüglich der Gesamtheit der Protonen.
2. Es wird das Verhältnis der austauschbaren zu nicht-austauschbaren Protonen berücksichtigt, die Gesamtprotonenzahl wird als konstant angenommen. Das Verhältnis der Gesamtintegrale entspricht dem Verhältnis der austauschenden Protonen.
3. Sowohl die Azidität als auch die Gesamtprotonenzahl werden als konstant angenommen. Die Gesamtintegrale der zu vergleichenen Spektren können gleichgesetzt werden.

Folglich müssen je nach Aufgabenstellung unterschiedliche Faktoren gewählt werden. Wünscht man einen Überblick über die Art und Menge der Protonen pro Masseneinheit der HS, muß der erste Ansatz gewählt werden. Eine Reihe von Fehlerquellen beeinflussen das Ergebnis: Fehler bei der Elementaranalyse, Fehler bei der Wasserbestimmung (Feuchtigkeit des HS), einen weitgehend unbekanntem Fehler bei der Bestimmung der austauschbaren Protonen (s. Kapitel 6.2.1) und einen Fehler durch die Unvollständigkeit der Silylierungsreaktion. Die zweite Möglichkeit bietet den Vergleich der Gesamtprotonen. Die größte Fehlerquelle ist bei dieser Methode die Bestimmung der silylierbaren Funktionen. Für einen direkten Vergleich der silylierbaren Protonen ist die unter Punkt 3 aufgeführte Variante zu verwenden.

### 6.3.6 Kombination von 2D-NMR-Spektren: mit BSTFA und BSA silylierte Huminstoffe

Die NMR-Spektren, die zur Untersuchung des Silylbereichs von N,O-BSTFA-silylierten Substanzen aufgenommen worden sind, weisen die Resonanzen zweier Nebenprodukte auf: Hexamethylsiloxan  $\delta(^{29}\text{Si}) = 7.3 \text{ ppm}$   $\delta(^1\text{H}) = 0.06 \text{ ppm}$  und N-(Trimethylsilyl)trifluoroacetamid  $\delta(^{29}\text{Si}) = 10.6 \text{ ppm}$   $\delta(^1\text{H}) = 0.31 \text{ ppm}$ . Diese beiden Nebenprodukte erzeugen ein Rauschen parallel zur  $F_1$ -Achse. Während das durch Hexamethylsiloxan verursachte  $t_1$ -Rauschen am Tieffeld-Rand des HS-Silylether- und Silylesterresonanzbereichs ( $\delta(^1\text{H}) \approx 0.5 - 0.0 \text{ ppm}$ ) liegt, beeinträchtigt das  $t_1$ -Rauschen von N-(Trimethylsilyl)trifluoroacetamid die 2D-NMR-Spektren des Silylbereichs erheblich.

Alternativ kann die gleiche Probe mit N,O-BSA silyliert werden. Dabei entsteht neben dem oben bereits erwähnten Hexamethylsiloxan als zweites Nebenprodukt N-Trimethylsilylacetamid  $\delta(^{29}\text{Si}) = 4.6 \text{ ppm}$   $\delta(^1\text{H}) = 0.2 \text{ ppm}$ . Wird nun die gleiche Probe mit je einem der beiden Silylierungsmittel zweimal mit identischer Parametrierung gemessen, so erhält man das gleiche Spektrum, wobei das störende  $t_1$ -Rauschen an zwei verschiedenen Positionen  $\delta(^1\text{H}) = 0.31 \text{ ppm}$  und  $\delta(^1\text{H}) = 0.2 \text{ ppm}$  zu finden ist. Ersetzt man den gestörten Bereich des einen Spektrums durch den gleichen, dort nicht gestörten Bereich des anderen, so erhält man ein Spektrum, in dem das durch N-(Trimethylsilyl)trifluoroacetamid und N-Trimethylsilylacetamid verursachte  $t_1$ -Rauschen vollständig unterdrückt ist.

Der Ansatz einer einfachen Substitution der betreffenden Spaltenvektoren führt jedoch zu keinem brauchbaren Ergebnis. Der Grund ist zum einen darin zu suchen, daß trotz gleicher Parametrierung der beiden Messungen erhebliche Unterschiede in der absoluten Amplitude auftreten. Zum anderen verursachen bereits kleine Phasenunterschiede deutliche Abweichungen der Höhe und Schräglage der Basisebenen beider Messungen. Die Spektren sind also zuvor in geeigneter Weise einander anzugleichen. Diese Angleichung kann jedoch nicht wie in Kapitel 6.3.5 beschrieben durch einfaches Gleichsetzen zweier Integrationsbereiche durchgeführt werden, da das vorliegende  $t_1$ -Rauschen die Integrale erheblich beeinflusst. Außerdem würden dabei die Unterschiede in der Schräglage der Basisebenen nicht berücksichtigt.

Um einen passenden Übergang von einer Messung zur anderen zu realisieren, wurden die vom  $t_1$ -Rauschen unbeeinflussten Grenzbereiche bei  $\delta(^1\text{H}) = 0.26 \text{ ppm}$  und  $\delta(^1\text{H}) = 0.35 \text{ ppm}$  durch ein robustes Verfahren der kleinsten absoluten Abweichung [153] einander angepaßt. Aus den daraus resultierenden Parametern beider Grenzbereiche läßt sich durch einfache lineare Interpolation eine für den gesamten zu substituierenden Bereich anwendbare Matrix aus Korrekturfaktoren bestimmen. Diese Methode erlaubt es, alle oben erwähnten Abweichungen zu korrigieren. Man erhält ein ungestörtes Spektrum, das den Informationsgehalt

beider Spektren kombiniert und ansonsten in gleicherweise auswertbar ist.

Abb. 6.12 zeigt die ( $^1\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$ )-NMR-Spektren der jeweils mit N,O-BSTFA und N,O-BSA silylierten HS sowie den nach diesem Verfahren erhaltenen Spektren. Es resultieren weitgehend unverrauschte ( $^1\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$ )-Spektren der silylierten HS.

### Bildung von Differenz- und Minimum-Spektren

Von den einzelnen Substanzen wurden  $^2\text{J}(\text{}^1\text{H}, \text{}^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektren aufgenommen und nach dem oben beschriebenen Verfahren die entsprechenden Spalten substituiert. Da das durch N-Trimethylsilylacetamid erzeugte Störsignal nicht nur bei  $\delta(\text{}^1\text{H}) = 0.2$  ppm ein Rauschen verursacht, sondern in den  $^1\text{J}(\text{}^1\text{H}, \text{}^{13}\text{C})$ -NMR-Spektren auch bei  $\delta(\text{}^{13}\text{C}) = -0.7$  ppm parallel zur  $F_2$ -Achse eine Störung innerhalb des HS-Silylether- und Silylesterresonanzbereichs verursacht, sind bei  $^1\text{J}(\text{}^1\text{H}, \text{}^{13}\text{C})$ -NMR-Spektren derartige Substitutionen von Spaltenbereichen nicht sinnvoll anwendbar.

Von den Substanzgruppen: FA, HA, BS1, HO13 und Suwannee-Fluß wurden nach entsprechender Angleichung (s. Kapitel 6.3.5) die jeweiligen Minimum-Spektren ermittelt. Man erhält dadurch zu jeder Substanzgruppe ein charakteristisches Spektrum, das diejenigen Signale enthält, die gleichermaßen in allen Spektren der einzelnen Substanzen einer Gruppe auftreten. In gleicher Weise kann man aus den vier Gruppen-Spektren ein Gesamt-Spektrum ableiten, in dem nur diejenigen Signale enthalten sind, die in der Gesamtheit aller Messungen auftraten. Dieses Gesamt-Spektrum stellt die Grundstruktur aller Substanzen dar, da es nur funktionelle Gruppen repräsentiert, die in allen Substanzen enthalten sind und somit die Strukturbasis darstellt.

Die Besonderheiten einzelner Substanzen innerhalb einer Gruppe lassen sich anschließend aus den Differenzen der Einzelspektren zu dem charakteristischen Gruppen-Spektrum erkennen. Die Differenzen repräsentieren den Anteil an silylierten funktionellen Gruppen, die die Substanzen zusätzlich zum Gruppenanteil enthalten. Die zusammengesetzten Einzelspektren, deren Differenz zum Gruppen-Spektrum und das Gruppen-Spektrum sind in den Abb. 7.8 bis 7.17 abgebildet.

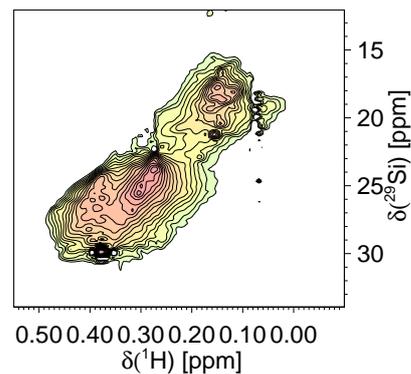
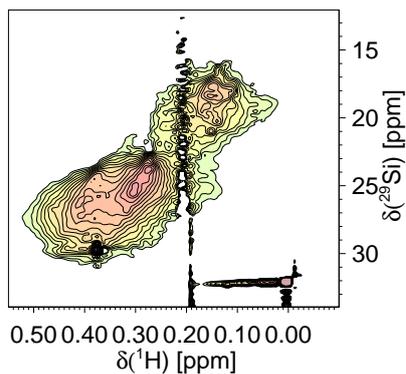
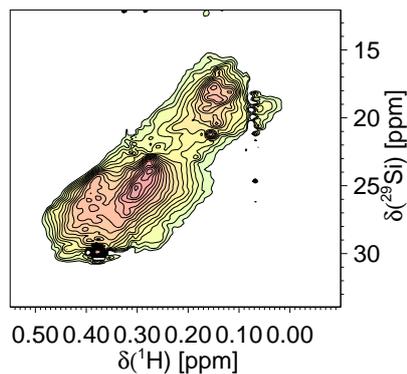
Abbildung 6.12: Austausch von Spalten.

BSTFA

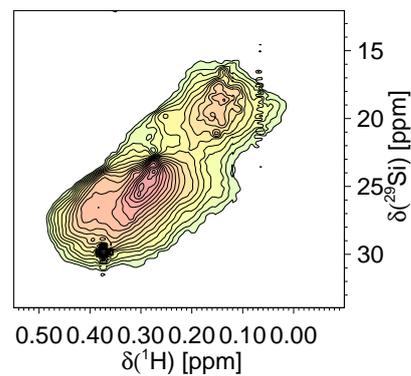
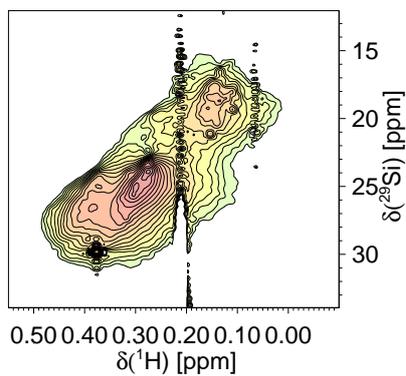
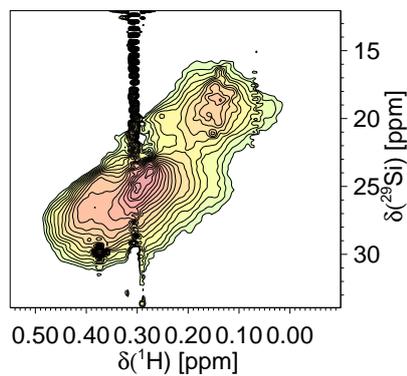
BSA

substituiert

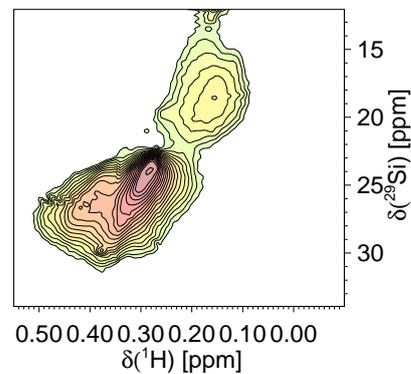
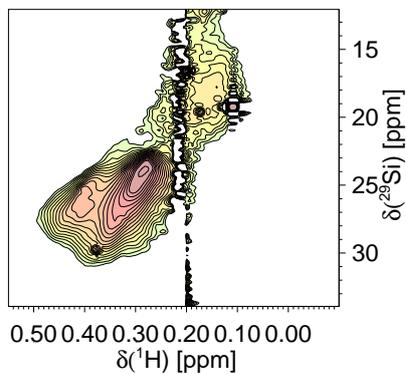
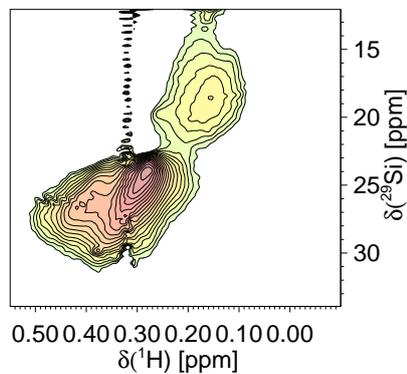
BS1FA



HO10FA



FG1FA



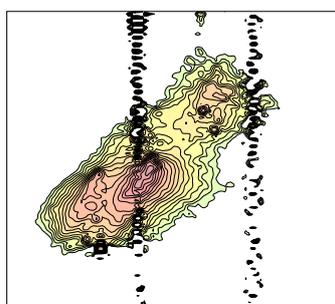


BSTFA

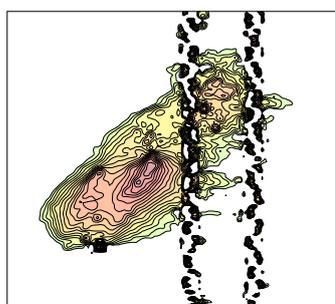
BSA

substituiert

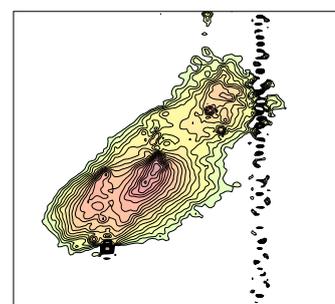
HO13FA



0.50 0.40 0.30 0.20 0.10 0.00  
 $\delta(^1\text{H})$  [ppm]

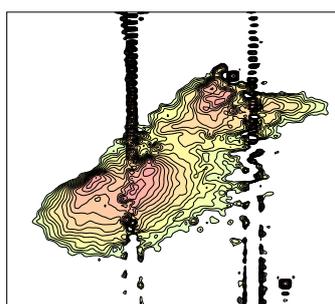


0.50 0.40 0.30 0.20 0.10 0.00  
 $\delta(^1\text{H})$  [ppm]

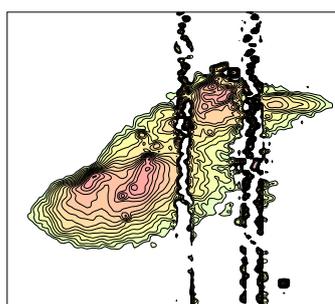


0.50 0.40 0.30 0.20 0.10 0.00  
 $\delta(^1\text{H})$  [ppm]

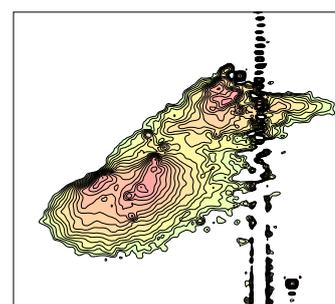
BS1HA



0.50 0.40 0.30 0.20 0.10 0.00  
 $\delta(^1\text{H})$  [ppm]

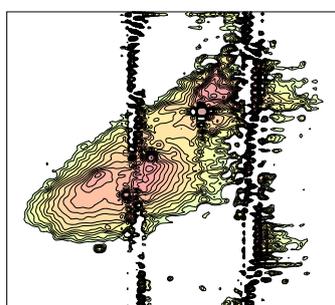


0.50 0.40 0.30 0.20 0.10 0.00  
 $\delta(^1\text{H})$  [ppm]

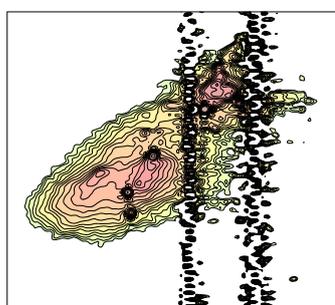


0.50 0.40 0.30 0.20 0.10 0.00  
 $\delta(^1\text{H})$  [ppm]

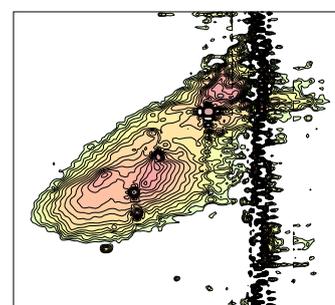
HO13HA



0.50 0.40 0.30 0.20 0.10 0.00  
 $\delta(^1\text{H})$  [ppm]



0.50 0.40 0.30 0.20 0.10 0.00  
 $\delta(^1\text{H})$  [ppm]



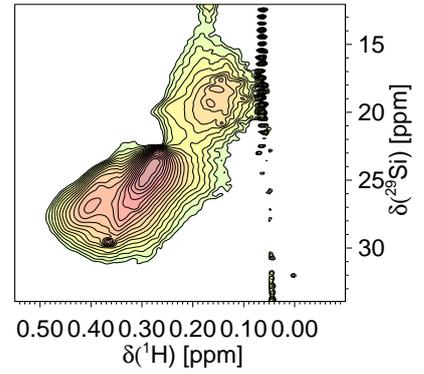
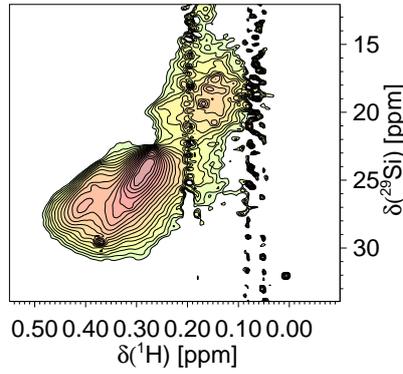
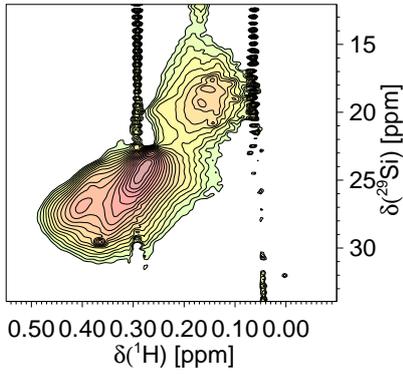
0.50 0.40 0.30 0.20 0.10 0.00  
 $\delta(^1\text{H})$  [ppm]

BSTFA

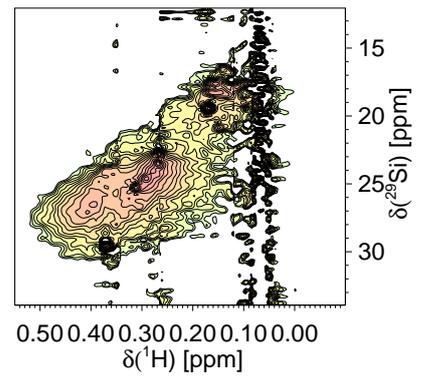
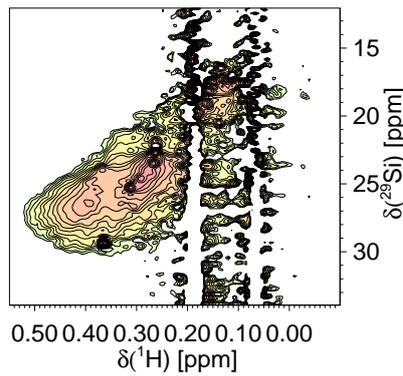
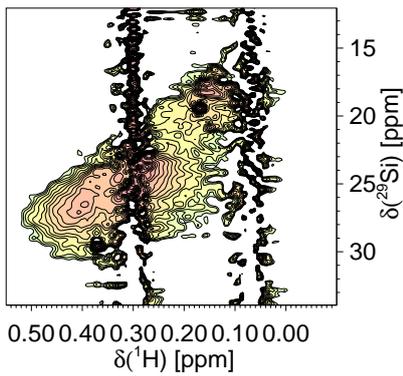
BSA

substituiert

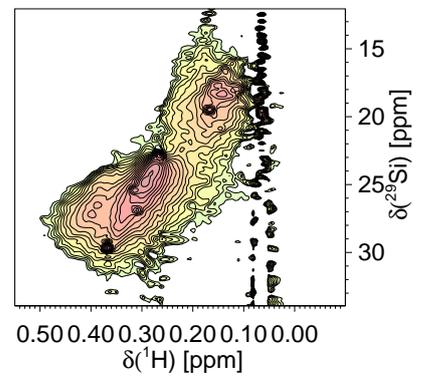
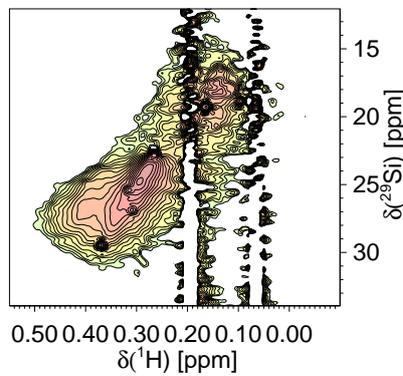
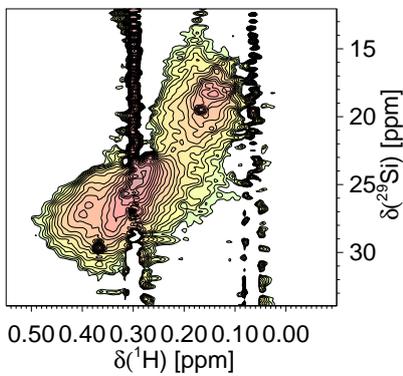
SUWFA



SUWHA



MPDOM



## 6.4 Die $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektroskopie

Die  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektroskopie sollte als eine direkte Bestimmungsmethode für die chemische Umgebung des Sauerstoffs in Huminstoffen eingesetzt werden. Mittels der  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektroskopie können Informationen auch über die  $^{17}\text{O}$ -Kerne in Huminstoffen erhalten werden, an den keine aziden, silylierbaren Protonen gebunden sind (beispielsweise Ether- und Estergruppen) und sollte daher komplementäre Informationen zur  $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektroskopie und zu den zweidimensionalen Verfahren silylierter Substanzen liefern.

Es sollten erste grundlegende Versuche unternommen werden, das Potential der hochauflösenden  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektroskopie für die Strukturanalyse von Huminstoffen auszuloten und nutzbar zu machen. Unter Berücksichtigung neuer experimenteller Techniken der Datenaufnahme und -verarbeitung sollten Aufnahme- und Prozessierungsparameter für die  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektroskopie an Huminstoffen etabliert werden.

Die Schwierigkeiten in der  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektroskopie resultieren aus den elektrischen Eigenschaften des  $^{17}\text{O}$ -Kerns. Aus dem elektrischen Quadrupolmoment resultieren große Linienbreiten, insbesondere für Moleküle mit langen Korrelationszeiten. Die extrem geringe natürliche Häufigkeit (0.037 %) und die häufig auftretende rollende Basislinie in  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektren verursachen zusätzliche Probleme bei der Aufnahme und Interpretation der  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektren.

Zunächst wurden anhand von Modellverbindungen Akquisitions- sowie Prozessierungsparameter variiert, um die Qualität der  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektren zu optimieren. Dazu wurden Experimente mit verschiedenen Lösungsmitteln, Temperaturen und Pulssequenzen durchgeführt, die mit verschiedenen Verfahren prozessiert wurden. Es wurden Modellsubstanzen gemessen, in denen Sauerstoff in unterschiedlicher chemischer Umgebung vorliegt, wie in Ether-, Carboxyl-, Carbonyl-, und Hydroxylfunktionen. Mit den ermittelten Parametern wurden  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektren von Verbindungen unterschiedlicher Molekülgröße aufgenommen und die Abhängigkeit der Linienbreite von der Molekülgröße ermittelt. Die erhaltenen Ergebnisse waren Grundlage für die Aufnahme eines Huminstoff- $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektrums.

### 6.4.1 Optimierung der Akquisitionsparameter: Pulssequenz, Pulswinkel, Preakquisitions-Delay, Relaxationsdelay, spektrale Breite

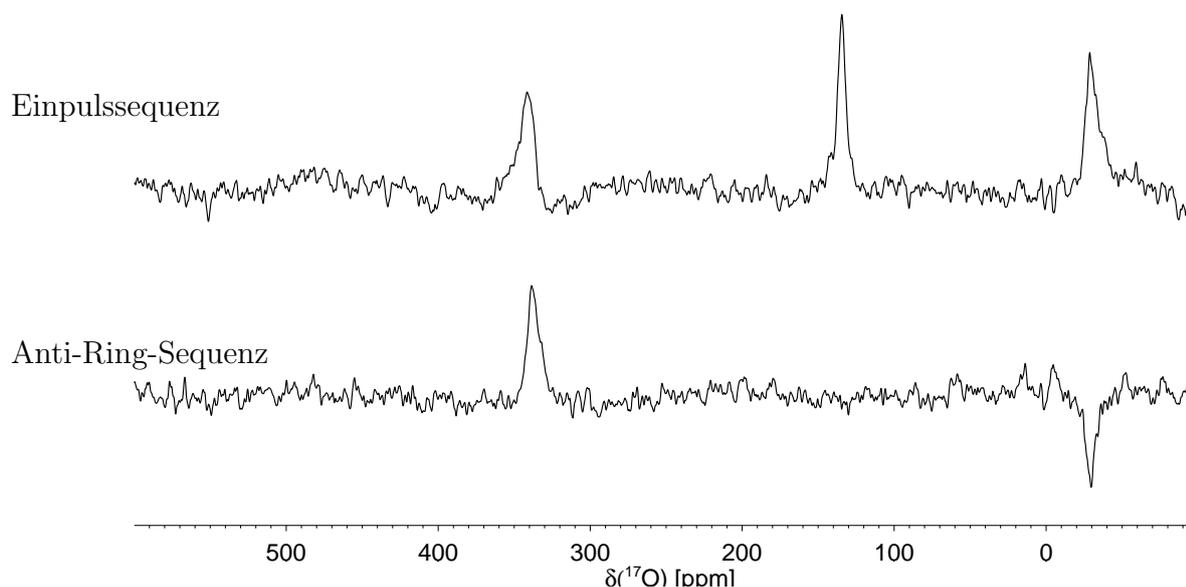
Die Mehrzahl der in der Literatur beschriebenen  $^{17}\text{O}$ -NMR-Daten sind im Einpuls-Verfahren erhalten worden. Außer dem Einpuls-Experiment wurde zur Verbesserung der Basislinie ein in der Spektrometer-Software verfügbares Anti-Ring-Pulsprogramm getestet.

Die Parameter Pulswinkel, Preakquisitions-Delay, Relaxationsdelay und spektrale Brei-

te für Einzugs-Experimente wurden bereits von S.Schramm im Rahmen seiner Arbeiten am IÖC optimiert. Optimale Ergebnisse für eine gleichmäßige Anregung der  $^{17}\text{O}$ -Kerne und eine lineare Basislinie wurden mit folgenden Werten erzielt: Pulswinkel  $45^\circ$  ( $7.7\ \mu\text{s}$ ), Preakquisitions-Delay  $13.1\ \mu\text{s}$ , Relaxationsdelay  $40\ \text{ms}$  bei einer spektralen Breite von  $800\ \text{ppm}$ .

Die  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektren der Standardverbindung  $\text{Me}_3\text{SiOCH}_2\text{OCOSiMe}_3$  sind in Abb. 6.13 abgebildet. Das obere Spektrum wurde mit einem Einzugs-Experiment aufgenommen, das untere mit einer Antiring-Sequenz. Während im oberen Spektrum alle drei Signale der Standardverbindung gleichermaßen vorhanden sind, verursacht die Antiring-Sequenz durch ein ungleichmäßiges Anregungsprofil im unteren Spektrum eine partielle Signalauslöschung. Im Einzugs-Experiment wird durch einen rf-Puls von sehr kurzer Dauer ( $7.7\ \mu\text{s}$ ) eine homogene Anregung des Meßbereichs und eine optimale Basislinie gewährleistet.

Abbildung 6.13: Einfluß der Pulssequenz auf die Homogenität der Anregung: Vergleich des Einzugs-Experimentes mit einer Standard-Antiring-Sequenz.



#### 6.4.2 Optimierung der Prozessierungsparameter: Linear Prediction-Methode, digitale Filterung

Für ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis kann es bei schnell relaxierenden Kernen sinnvoll sein, nicht alle aufgenommenen Datenpunkte für die Erzeugung eines Spektrums durch Fourier-Transformation zu verwenden. Da bei schnell relaxierenden Kernen der FID sehr schnell abfällt, ist die Information über die zu messenden  $^{17}\text{O}$ -Frequenzen nur zu Beginn

des FID vorhanden. Die ersten Datenpunkte des FID sind in der  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektroskopie jedoch oft durch instrumentelles "acoustic ringing" gestört. Die Folge ist eine rollende Basislinie des Fourier-transformierten Spektrums. Diese Datenpunkte können durch den sog. Linear-Prediction-Algorithmus extrapoliert und ersetzt werden. Den Einfluß der Anzahl der eliminierten und nach dem Linear-Prediction-Verfahren ersetzten Aufnahmepunkte auf die Basislinie veranschaulicht Abb. 6.14. Bereits kleine Änderungen der Anzahl ausgetauschter Datenpunkte bewirken große Änderungen in der Ausprägung der Basislinie. Da die Wellenform der Basislinie mit zunehmender Anzahl ersetzter Datenpunkte sich nicht gleichmäßig ändert, muß durch Ausprobieren die optimale Datenpunktzahl für das Linear-Prediction-Verfahren ermittelt werden. In Abb. 6.14 ist die Basislinie des unteren  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektrums gegenüber dem ersten Spektrum, welches ohne vorausgegangenem Linear-Prediction-Verfahren Fourier-transformiert worden ist, deutlich verbessert.

Um die verrauschten Lorenz-Linien der  $^{17}\text{O}$ -NMR-Signale zu glätten, wurden die FID mit einer Exponential-Funktion entsprechend einer Linienbreite von 150 Hz gefiltert.

### 6.4.3 Optimierung von Lösungsmittel und Temperatur

Die Viskosität einer Lösung beeinflußt die molekulare Reorientierungszeit der zu messenden Moleküle, durch die die Relaxionszeiten erniedrigt und die Linienbreiten vergrößert werden (s. Gleichung 4.63). Für kleine Linienbreiten und damit einem guten Signal/Rausch-Verhältnis ist eine Lösung mit möglichst geringer Viskosität erforderlich, d.h. das Lösungsmittel sollte niederviskos sein, die Konzentration der Lösung gering und die Temperatur sollte entsprechend der Siedetemperatur des Lösungsmittels und der Stabilität der zu messenden Substanz möglichst hoch gewählt werden. Die für die Lösung von Huminstoffen in Betracht kommenden Lösungsmittel sind  $\text{H}_2\text{O}$ , Pyridin, DMSO und DMF.

Tabelle 6.15 veranschaulicht die Abhängigkeit der Linienbreite von Lösungsmittel und Temperatur anhand der  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektren von Weinsäure. Die Linienbreiten der carboxylischen (250 ppm) als auch hydroxylichen  $^{17}\text{O}$ -Signalen ( $\approx 0$  ppm, teilweise überlagert von  $\text{H}_2^{17}\text{O}$ -Signalen) nimmt in der Reihenfolge  $\text{DMSO} > \text{Pyridin}^1 > \text{DMF} > \text{H}_2\text{O}$  ab. Schmälere Linien erhält man wie erwartet durch Temperaturerhöhung, die die Viskosität der Lösungen erniedrigt.

### 6.4.4 Einfluß der Molekülgröße auf die Linienbreite

Einen wesentlichen Einfluß auf die Relaxation der  $^{17}\text{O}$ -Kerne und somit auf die Linienbreite der Signale im  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektrum besitzt die Molekülgröße und -gestalt (s. Kapitel 4.7). In Abb. 6.16 sind  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektren von Substanzen unterschiedlicher molekularer Masse

<sup>1</sup>Die Einordnung von Pyridin in diese Reihenfolge erfolgte nach Messungen mit anderen Substanzen

Abbildung 6.14: Einfluß der Anzahl ersetzter Aufnahmepunkte auf die Basislinie der Probe MPDOM.

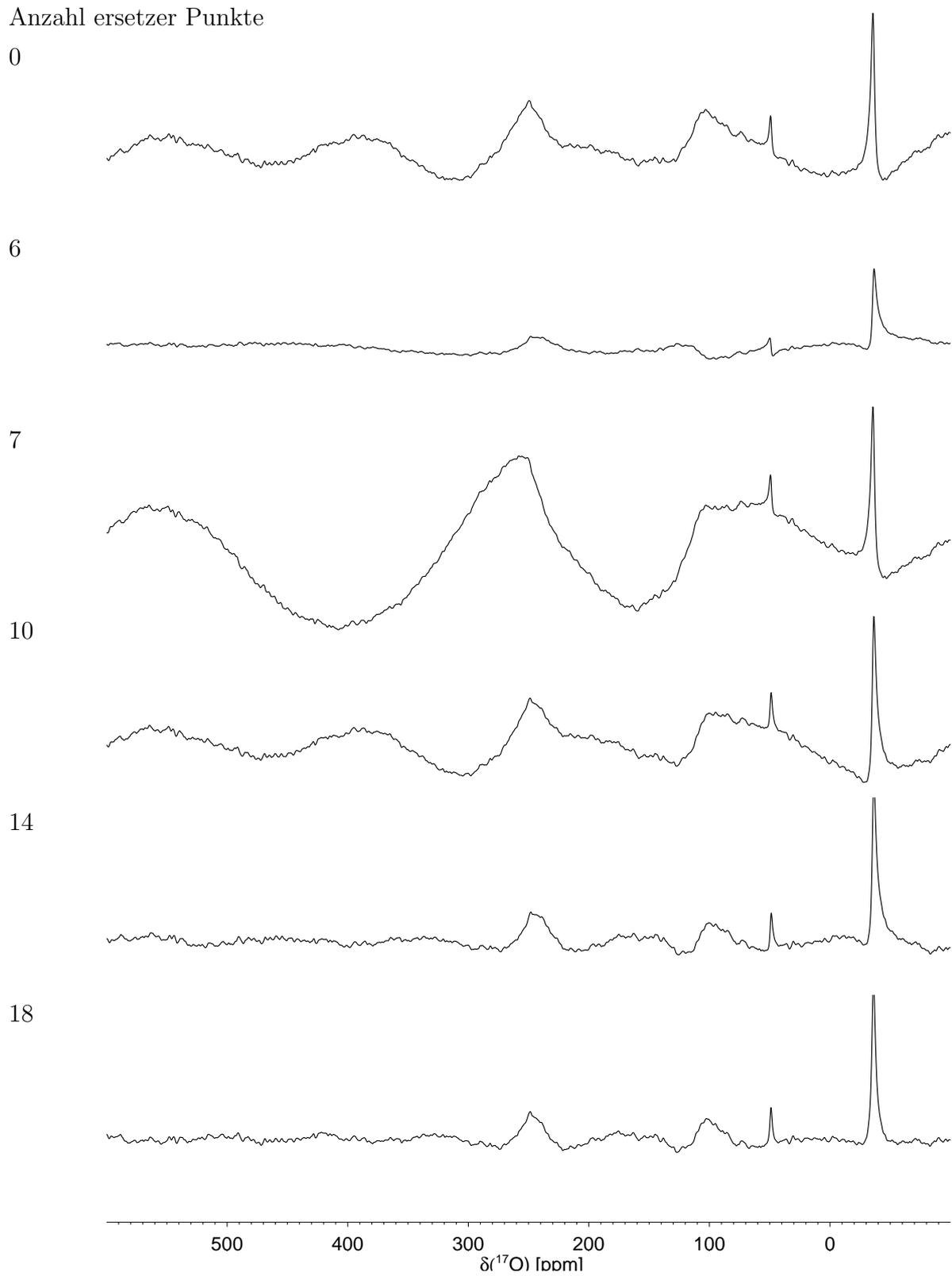
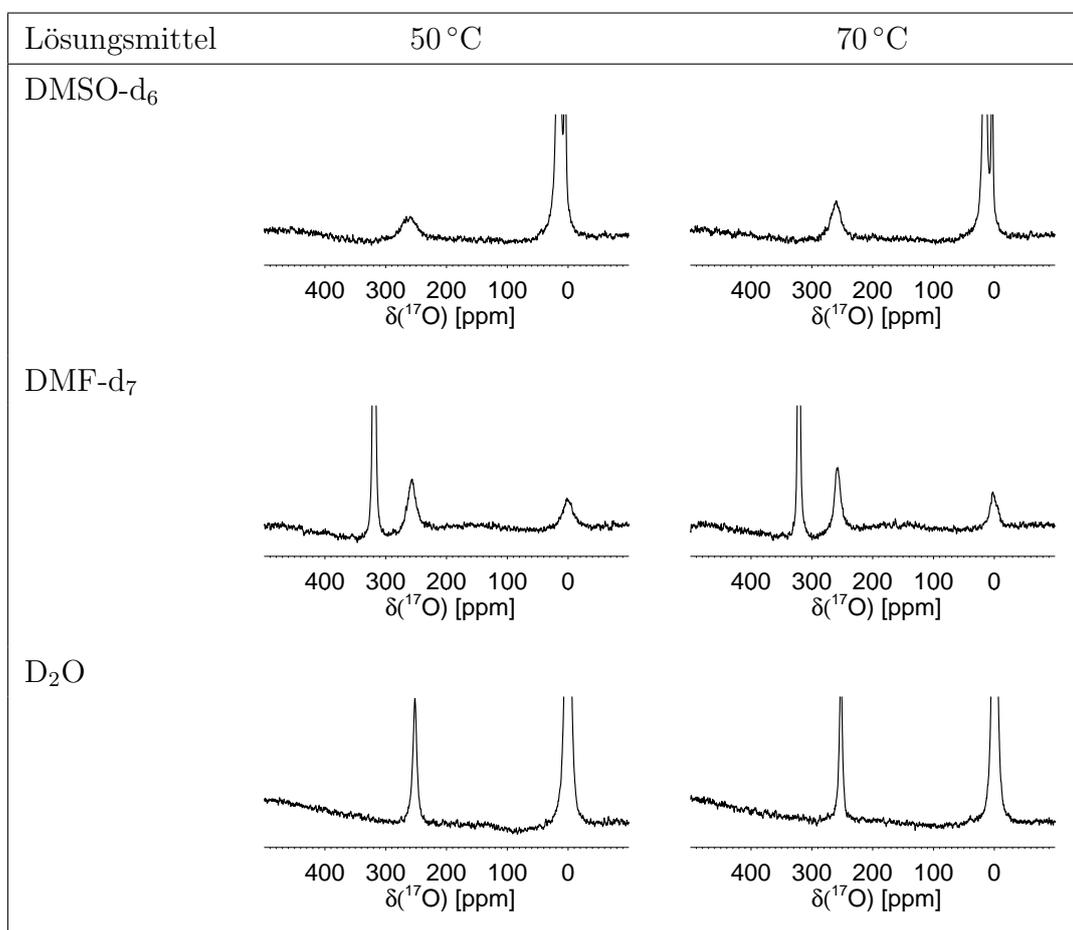


Abbildung 6.15: Abhängigkeit der Linienbreite der Weinsäure-Signale von Lösungsmittel und Temperatur. Die Signale bei 20, 320 und 0 ppm entsprechen den Resonanzen der Lösungsmittel DMSO- $d_6$ , DMF- $d_7$  und  $\text{D}_2\text{O}$ .



in DMF (320 ppm) abgebildet. Um den Einfluß der Viskosität von konzentrierten Lösungen klein zu halten, wurden die höhermolekularen Verbindungen in geringerer Konzentration gemessen als die Lösung der kleineren Verbindungen und entsprechend mehr Scans akkumuliert. Während der Methanol-Peak sehr scharf ausgeprägt ist, werden mit zunehmendem Molekulargewicht (von Methanol mit  $32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  bis zum Schardinger- $\beta$ -Dextrin mit  $1135 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) die Peaks breiter und das Signal/Rausch-Verhältnis nimmt stark ab. Im  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektrum des Schardinger- $\beta$ -Dextrin sind außer dem Wasser-Signal (0 ppm) und dem DMF-Signal keine weiteren Peaks zu erkennen. Es kann angenommen werden, daß  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektren von Huminstoffen durch die extreme Linienverbreiterung großer Moleküle entweder überhaupt nicht aufgenommen werden können oder nur die kleinsten Fraktionen dieser polydispersen Substanzen oder Segmente mit hoher lokaler Beweglichkeit in der  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektroskopie interpretierbare Signale liefern.

#### 6.4.5 Einfluß des Bindungszustandes auf die Linienbreite

Die Linienbreite im  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektrum wird weiterhin durch die Kernquadrupolkonstante bestimmt, die von der Bindungsstärke abhängt. C=O (Keto-, Carboxy-, Amid-, Esterfunktionen) hat eine größere Quadrupolkopplungskonstante als -O- (Ether, Alkohole) und verursacht daher größere Linienbreiten. Die lokale Symmetrie hat ebenfalls einen Einfluß auf die Linienbreite. C=O ist gegenüber -O- "weniger symmetrisch" - dies bewirkt ebenfalls eine relativ höhere Linienbreite im  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektrum.

Um die Größe des Einflusses diese Eigenschaften der  $^{17}\text{O}$ -Kerne auf die Linienbreite abschätzen zu können, wurde ein  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektrum (Abb. 6.17) von Substanzen mit Sauerstoff in verschiedenen Umgebungen aufgenommen. Es wurden zwei Substanzen mit ähnlicher Molekülgröße gewählt, um den Einfluß der Molekülgröße auf die Linienbreite zu eliminieren. Glucarsäurelacton- $\text{H}_2\text{O}$  (2 Carbonsäure- $^{17}\text{O}$ -Kerne, 1 C=O in Ester, 1 C-O in Ester, 3  $\text{C}_{alk}$ -OH, 1  $\text{H}_2\text{O}$ ) und Dihydroxybenzoesäuremethylester (1 C=O in Ester, 1 C-O in Ester, 2  $\text{C}_{ar}$ -OH). Die Linienbreiten der  $^{17}\text{O}$ -Kerne dieser Substanzen sind näherungsweise gleich. Einen wesentlich größeren Effekt als der Bindungszustand des  $^{17}\text{O}$ -Kerns besitzt die Molekülgröße. Die Breite des Wassersignals ist verglichen mit den Signalen der beiden Modellsubstanzen sehr schmal. Der Einfluß des Bindungszustandes auf die Linienbreite und somit auf das S/N-Verhältnis und die Quantifizierung von HS- $^{17}\text{O}$ -Spektren kann somit vernachlässigt werden.



Abbildung 6.16: Einfluß der Molekülgröße auf das Signal-Rausch-Verhältnis (50 °C, DMF- $\text{d}_7$ ).

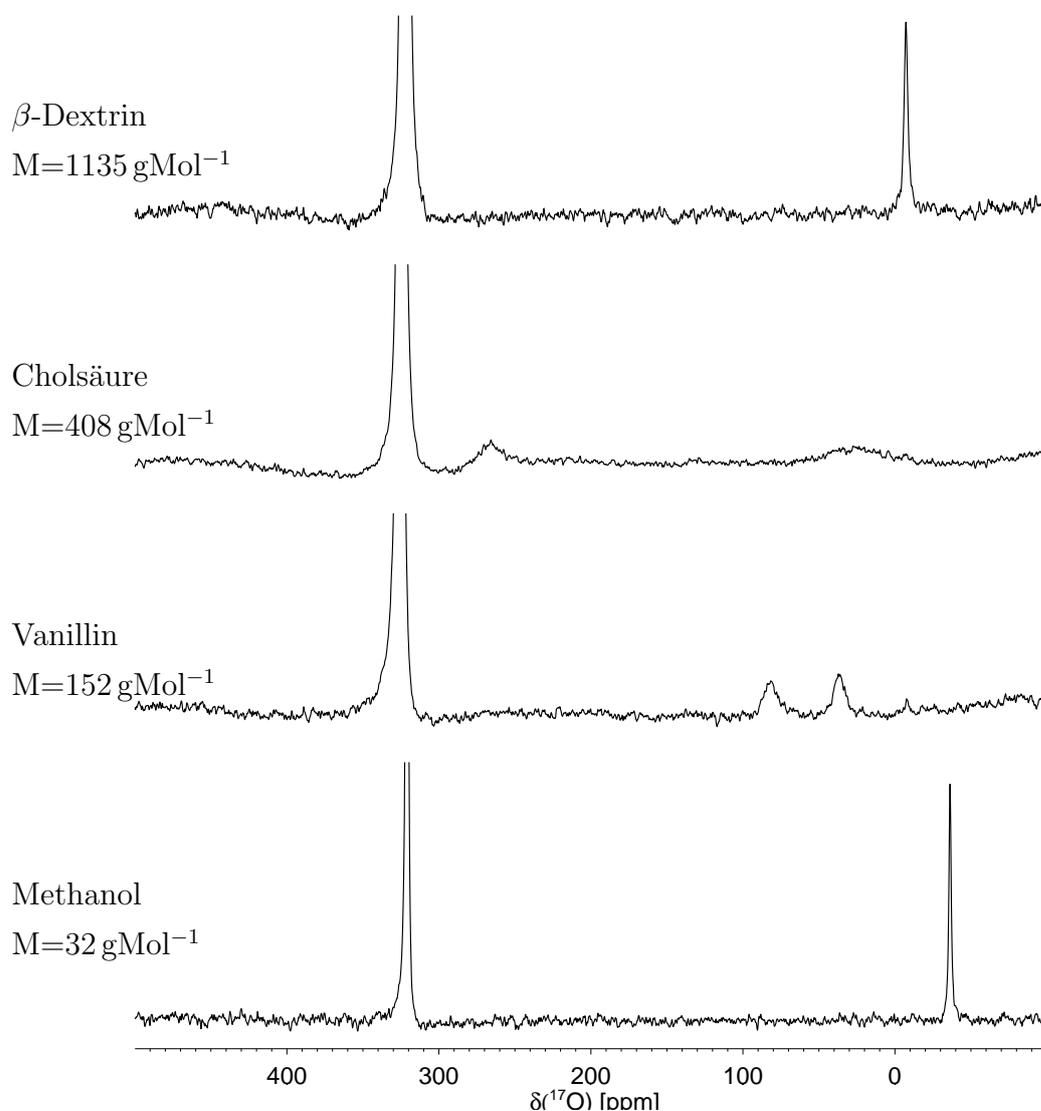
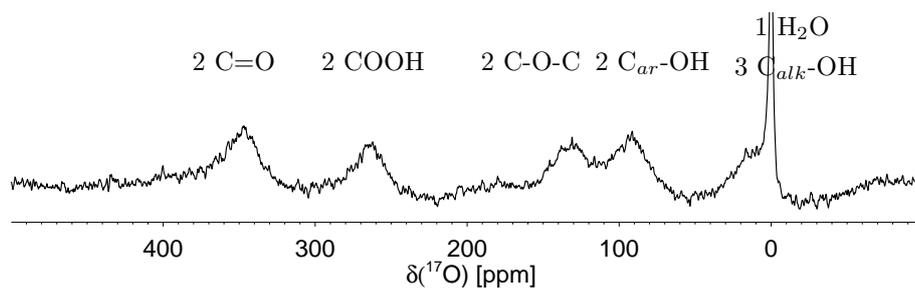


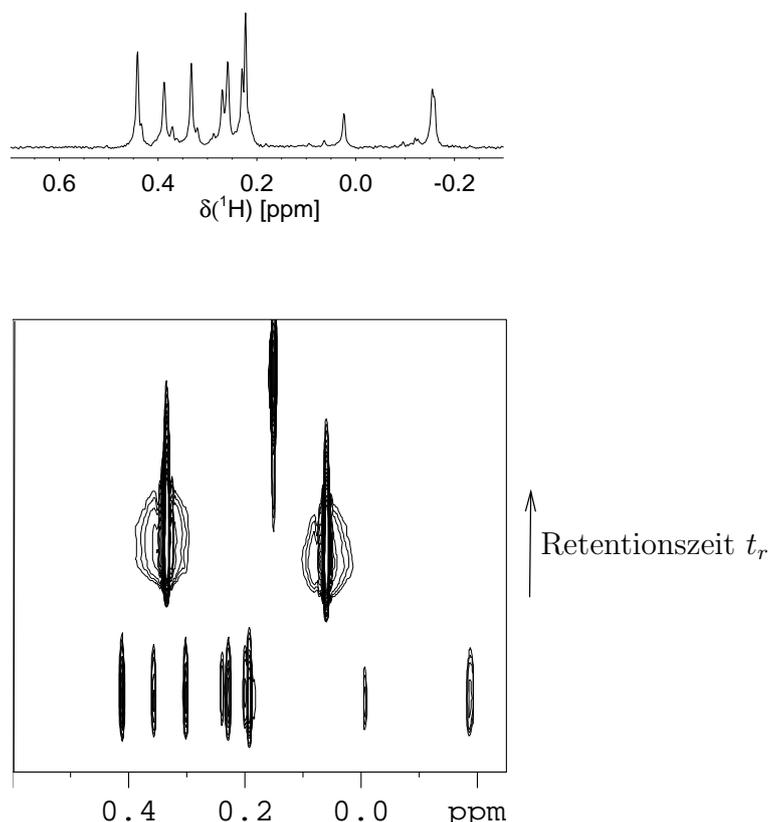
Abbildung 6.17: Einfluß des Bindungszustandes auf die Linienbreite (50 °C, Pyridin). Die Angaben beziehen sich auf die relative Anzahl der  $^{17}\text{O}$ -Kerne in der Lösung.



## 6.5 LC-NMR

Die direkte Kopplung von Chromatographie und Spektroskopie bietet den Vorteil, daß empfindliche Substanzen ohne Zwischenschritte untersucht werden können. Feuchtigkeitsempfindliche Substanzen, wie silylierte HS können auf diese Weise zügig und ohne zusätzliche Fehlerquellen NMR-spektroskopisch untersucht werden. Diese moderne Technik wurde zunächst an einer Modellverbindung getestet. Als Lösemittel wurde  $\text{CDCl}_3$  gewählt. Die Messungen wurde im on-flow-Verfahren bei einer Flußrate von 0.15 ml/min durchgeführt. Direkt im Anschluß an die Chromatographie fand die Aufnahme der Protonenspektren statt. Es wurden jeweils 64 Scans aufaddiert und als pseudo-2D-Spektrum dargestellt. Die  $F_1$ -Achse bezeichnet den zeitlichen Verlauf der Chromatographie (s. Abb. 6.5).

Abbildung 6.18: LC-NMR-Spektrum von Carminsäure: einzelnes Protonenspektrum und pseudo-2D-Spektrum.



In Abb. 6.5 ist das pseudo-2D-Spektrum und ein einzelnes Protonenspektrum abgebildet. Die Nebenprodukte sind deutlich von der silylierten Carminsäure abgetrennt. Das 1D-Spektrum zeigt nicht die im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum silylierter Carminsäure üblichen Resonanzen der Nebenprodukte, die mit den Signalen der Carminsäure stark überlappen.

Zur Kalibrierung der GPC-Säule wurden von Polystyrol-Standards mit bekanntem Molekulargewicht Chromatogramme aufgenommen. Da sich die GPC-Säule im Laufe der Experimente veränderte (Druckanstieg) konnte keine Zuordnung von Molekulargewichten zu

Retentionszeiten vorgenommen werden.

Für ein ausreichendes Signal-Rausch-Verhältnis wurden 25  $\mu\text{l}$  der Lösung injiziert und 64 Scans für jede Reihe des pseudo-2D-NMR-Spektrums aufaddiert.

Tabelle 6.9: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für LC-NMR-Experimente von HS (Sequenz mit Vorsättigung während des Relaxationsdelays und der Mischzeit).

Aufnahmeparameter		
Probenkopf	4 mm LCI	
Frequenz des $^1\text{H}$ -Kerns	500.13	MHz
spektrale Breite	10000	Hz
Akquisitionszeit	0.410	s
Anzahl der Meßpunkte in der Zeitdomäne	8192	
Relaxationsdelay	0.448	s
Mischzeit	100	ms
Pulslänge $30^\circ$ : $^1\text{H}$ -Kern	7.10	$\mu\text{s}$
Prozessierungsparameter		
Nullpunktfüllung (Anzahl komplexwertiger Punkte nach FT)	16384	
Filter	Exponentialfunktion	
Linienverbreiterungsfaktor	5	Hz

# Kapitel 7

## Interpretation der NMR-Spektren

### 7.1 Auswertung und Bewertung der Protonenspektren

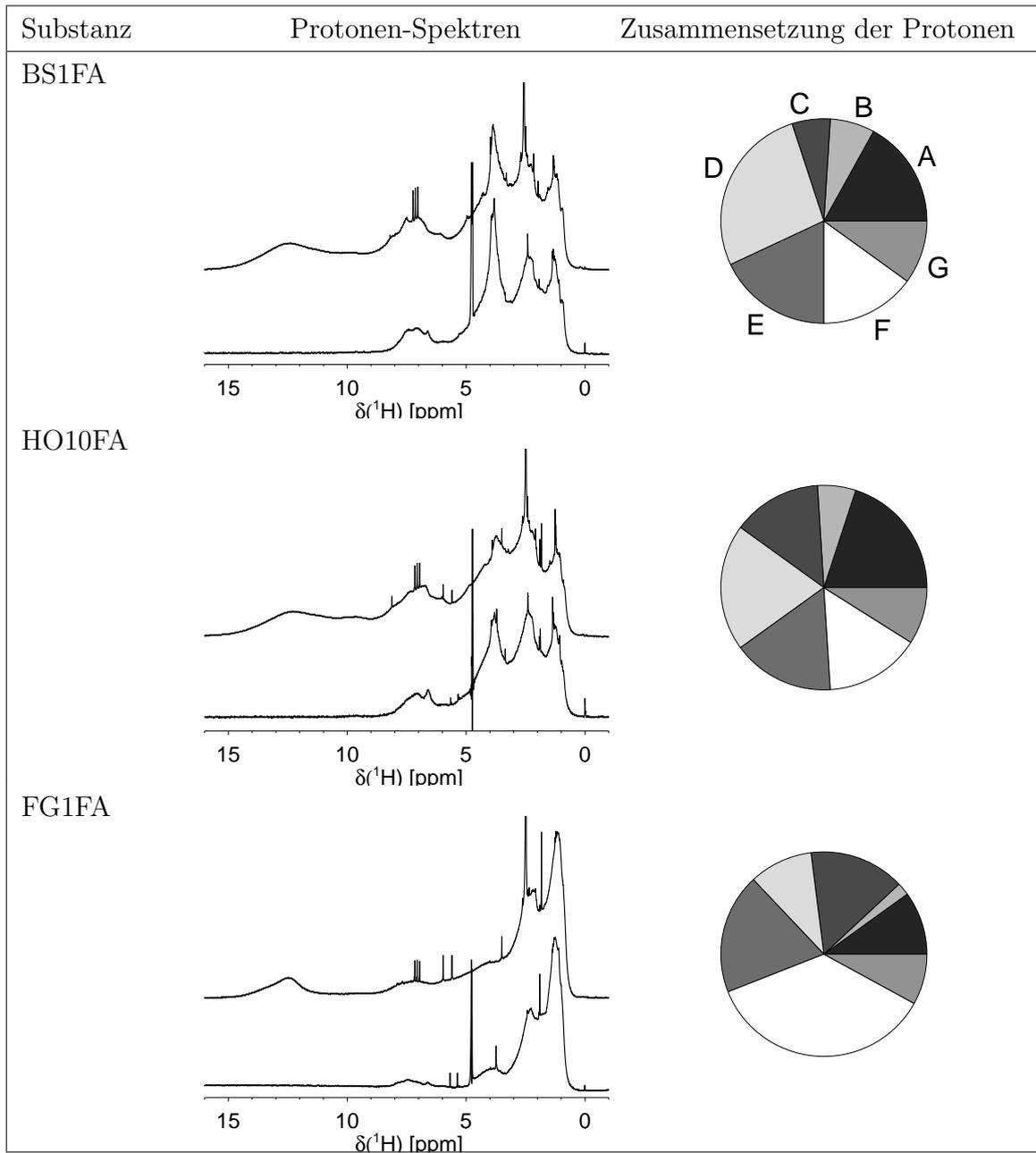
Die Integrale der verschiedenen HS-Protonenspektren sind im Anhang aufgelistet. Abb. 7.1 veranschaulicht die Zusammensetzung sämtlicher Protonen. Die unteren Spektren (Vorsättigung, NaOD) enthalten die nicht-austauschenden Protonen. Die jeweils oberen Protonenspektren (Einpulsexperimente, DMSO-d<sub>6</sub>) zeigen neben den nicht-austauschenden zusätzlich die Signale der austauschenden Protonen. Die Zusammensetzung der Protonen wurde über folgende Integrale bestimmt (Methode von I.Perminova, MSU Moskau):

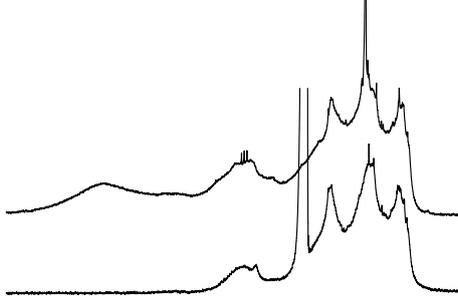
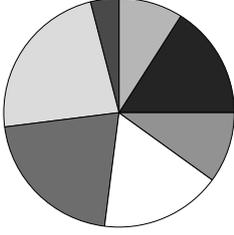
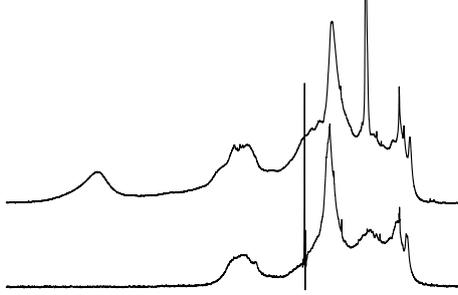
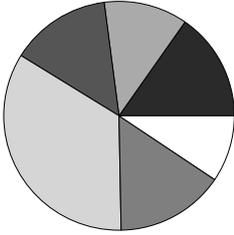
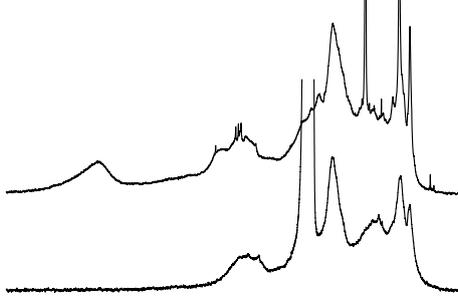
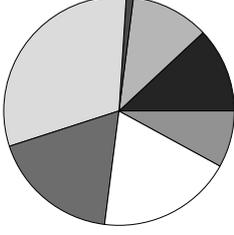
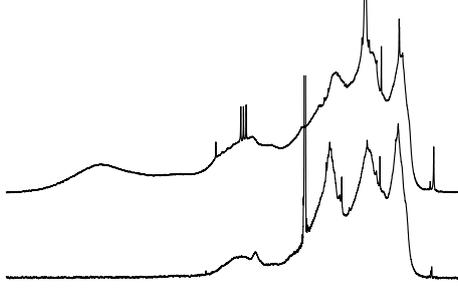
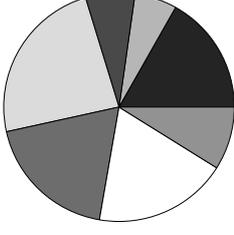
Strukturelement	Bereich	<sup>1</sup> H-NMR-Integral
C <sub>ar</sub> -H	9.0 – 6.0 ppm	NaOD
O-C-H	6.0 – 3.2 ppm	NaOD
α-CH <sub>n</sub>	3.2 – 2.0 ppm	NaOD
CH <sub>n</sub>	2.0 – 0.5 ppm	NaOD
COOH	16.0 – 11.5 ppm	DMSO-d <sub>6</sub>
C <sub>ar</sub> -OH	11.5 – 6.0 ppm	DMSO-d <sub>6</sub> – NaOD
C <sub>alk</sub> -OH	6.0 – 2.0 ppm	DMSO-d <sub>6</sub> – NaOD

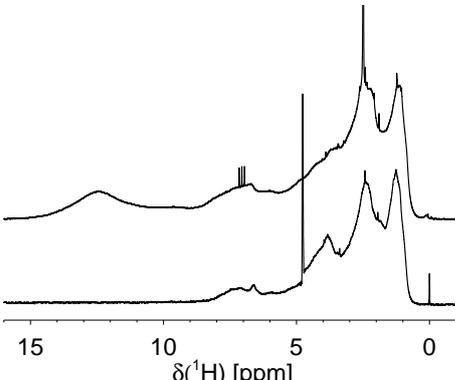
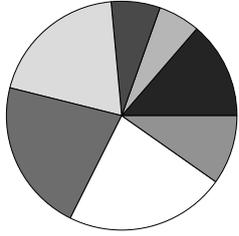
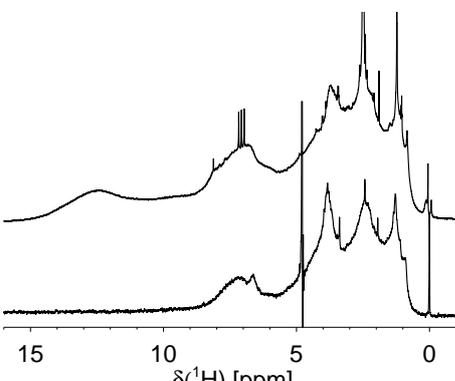
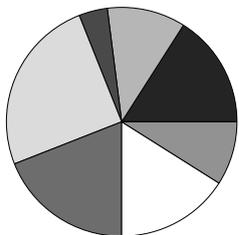
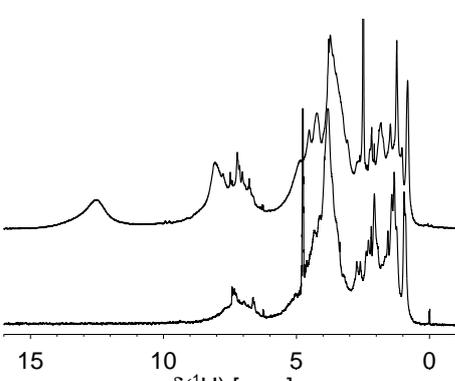
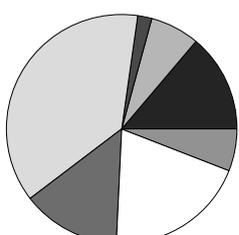
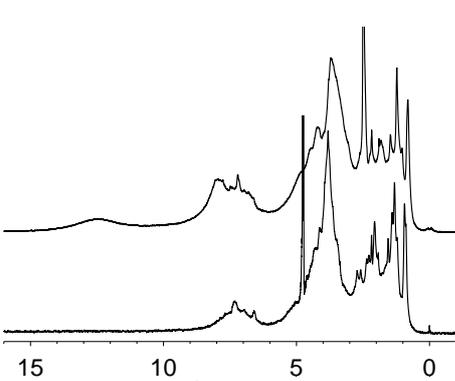
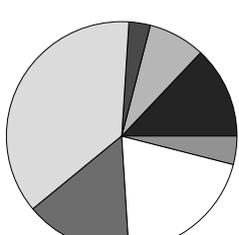
Durch Differenzbildung der Integrale der beiden Spektrenarten wurden die jeweiligen Anteile der Gruppen an den Gesamtprotonen ermittelt. Als Referenz für die Subtraktion wurde der Bereich 2.0 – 0.5 ppm gewählt, da dieser Bereich in beiden Spektrenarten ausschließlich nicht-austauschende Protonen enthält.

Die Graphiken der rechten Spalte veranschaulichen die Zusammensetzung der HS-Protonen. Die durch Subtraktion der Integrale von Eimpuls-<sup>1</sup>H-Spektren in DMSO-d<sub>6</sub> und Eimpuls-<sup>1</sup>H-Spektren in NaOD-Lösung oder <sup>1</sup>H-Spektren der Experimente mit Vorsättigung in NaOD sind in Anhang C aufgelistet.

Abbildung 7.1: Quantitative Auswertung der Protonenspektren: **A** =  $C_{ar}$ -OH, **B** =  $C_{ar}$ -H, **C** =  $C_{alk}$ -OH, **D** = H-C-O, **E** =  $\alpha$ - $CH_n$ , **F** =  $CH_n$ , **G** = COOH



Substanz	Protonen-Spektren	Zusammensetzung der Protonen
HO13FA	 <p data-bbox="368 728 826 779"><math>\delta(^1\text{H})</math> [ppm]</p>	
BS1HA	 <p data-bbox="368 1137 826 1193"><math>\delta(^1\text{H})</math> [ppm]</p>	
HO13HA	 <p data-bbox="368 1552 826 1608"><math>\delta(^1\text{H})</math> [ppm]</p>	
MPDOM	 <p data-bbox="368 1966 826 2022"><math>\delta(^1\text{H})</math> [ppm]</p>	

Substanz	Protonen-Spektren	Zusammensetzung der Protonen
SUWFA		
SUWHA		
SCHEYFA3		
BOUZFA3		

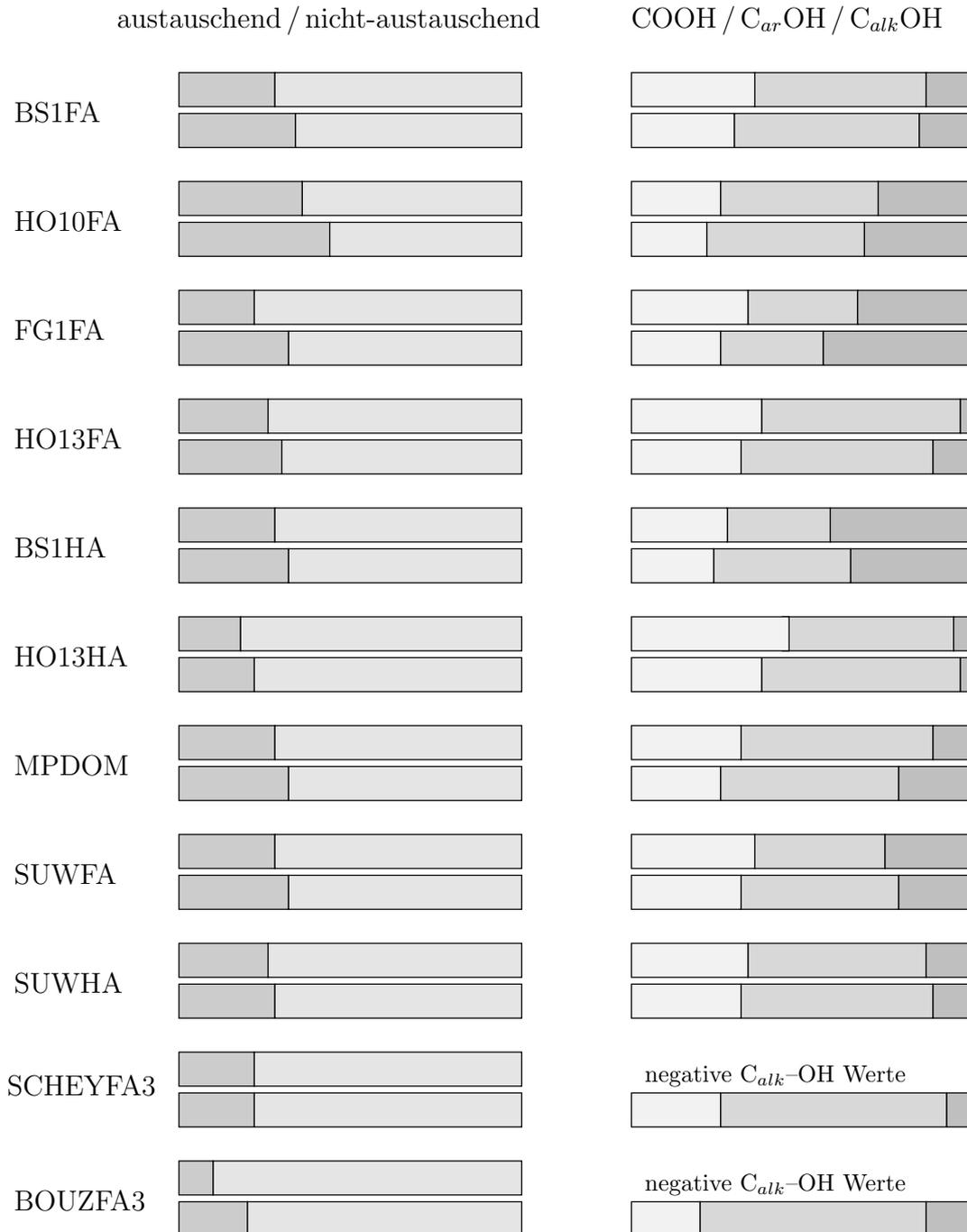
Die nach dieser Methode erhaltenen Protonenverteilungen geben offensichtlich die tatsächlichen Anteile der Strukturelemente der HS nicht korrekt wieder. Der Substitutionsgrad von Aromaten beträgt etwa 3-4, d. h. der Anteil der aromatischen Hydroxylfunktionen kann den Anteil der aromatischen Protonen nicht überschreiten. Nach Tabelle C.3 ist der Anteil an Phenolen jedoch 1.5 bis 5 mal (FG1FA) so groß wie der Anteil an aromatischen Protonen. In Tabelle C.3 sind die negativen Werte der beiden Boden-FA im Bereich C, die durch Subtraktion aus den Einpulsexperimenten ermittelt worden sind, zu beachten. Obwohl die der Differenzbildung zugrunde liegenden Spektren nach der quantitativen Einpuls-Technik aufgenommen worden sind, gibt dieses Verfahren offensichtlich nicht die tatsächliche Zusammensetzung der Protonen wieder. Das Verfahren der Subtraktion von Integralen verschiedener Spektrenbereiche ist nur als vergleichende Methode zu betrachten, die durch die unvollständige Erfassung der austauschenden Protonen die Zusammensetzung der nicht-austauschenden Protonen beeinflusst. Ein Vergleich der Daten, die über Einpulsexperimente und Experimente mit Vorsättigung in NaOD-Lösung errechnet worden sind zeigt, daß das Experiment mit Vorsättigung größere Werte für die  $C_{ar}$ -OH Protonen und kleinere Werte für  $C_{ar}$ -H liefert. Es werden keine negativen Werte im Bereich C erhalten.

Das Verhältnis von austauschenden Protonen zu nicht-austauschenden Protonen ist in Abb. 7.2 dargestellt. Während der Anteil der austauschenden Protonen der aquatischen HS 17-35 % (Einpulsexperiment) bzw. 21-43 % (Experiment mit Vorsättigung) beträgt, besitzen Boden-Fulvinsäuren mit ca. 11 % (Einpulsexperiment) bzw. 21 % (Experiment mit Vorsättigung) wesentlich weniger austauschende und damit azide und silylierbare Protonen. Ein systematischer Unterschied bezüglich dem Verhältnis von austauschenden und nicht-austauschenden Protonen zwischen HA und FA ist nicht erkennbar.

Legt man die aus den Einpulsexperimenten erhaltenen Integrationswerte zugrunde, so ist der Anteil an austauschenden Protonen bei den aquatischen FA mit 23–35 % um den Faktor 2.5 größer als jener der terrestrischen FA (11 %), für Experimente mit Vorsättigung hingegen, die generell einen größeren Anteil an austauschenden Protonen aufzeigen (aquatische FA: 31–43 %, terrestrische FA: 21 %), ist das Verhältnis bei aquatischen FA etwa 1.8 fach größer. Um die Ergebnisse der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren mit den Ergebnissen der  $^{29}\text{Si}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und den zweidimensionalen NMR-Spektren vergleichen zu können, müssen vergleichbare Darstellungsweisen gewählt werden. Die  $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektren liefern die Verhältnisse  $\text{COOH} / (C_{ar}\text{-OH} + C_{alk}\text{-OH})$  (entsprechend der zweiten Spalte in Abb. 7.2). Während die Verhältnisse von austauschenden zu nicht-austauschenden Protonen in aquatischen HS ähnlich sind, sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Substanzen bezogen auf das Verhältnis der funktionellen Gruppen COOH,  $C_{ar}$ -OH und  $C_{alk}$ -OH deutlicher. Dennoch bestehen offensichtlich keine Zusammenhänge zwischen FA und HA. Der  $C_{alk}$ -OH-Anteil der Bodensickerwasser-FA ist um den Faktor 2.8 kleiner als der Anteil der zugehörigen



Abbildung 7.2: Graphische Darstellung der Verhältnisse austauschende / nicht-austauschende Protonen (linke Spalte) und der Verhältnisse der Funktionalitäten COOH /  $C_{ar}OH$  /  $C_{alk}OH$  (rechte Spalte), die durch Auswertung der Einpulsexperimente (obere Zeilen) und Experimente mit Vorsättigung (untere Zeilen).



HA, der  $C_{alk}$ -OH-Anteil der Suwannee-FA ist um den Faktor 1.7 größer als der Anteil der zugehörigen HA. Die Boden-FA besitzen einen eher kleinen Anteil an aliphatischen Hydroxylfunktionen. Berücksichtigt man den insgesamt sehr niedrigen Gehalt austauschender Protonen, so wird deutlich, daß aliphatische Hydroxylfunktionen, wie sie beispielsweise in Kohlenhydraten und in Zellulose vorkommen nur in geringen Mengen vorhanden sind.

Ein Vergleich der Protonenverhältnisse von HO10FA, die nach der Methode von I. Perminova erhalten worden sind mit den Daten aus dem "ROSIG"-Datenpool (U. Lankes, Regensburg) zeigt erhebliche Unterschiede (Tabelle 7.1). Der Anteil an Carboxylfunktionen ist zu gering (80 % zuwenig) oder der Anteil der Hydroxlfunktionen zu hoch (400 %).

Tabelle 7.1: Verhältnisse der funktionellen Gruppen von HO10FA.

Funktion	ROSIG	$^1\text{H-NMR-Spektren}$
	% C	% H
COOH	13.3	9
$C_{ar}$ -OH	5.9	16 bzw. 20
$C_{alk}$ -OH	3.7	10 bzw.14

Ein Vergleich der Carboxyl-Anteile, die aus den Protonenspektren ermittelt worden sind (Tabelle C.5) mit den Integralen der  $^{29}\text{Si-NMR-Spektren}$  (Tabelle C.6) zeigt ebenfalls deutliche Unterschiede. Die Werte für die Carboxylfunktionen aus den Protonenspektren betragen nur etwa 50 % derjenigen Werte, die durch die Integration der  $^{29}\text{Si-NMR-Spektren}$  erhalten worden sind.

### Vergleich der Berechnung azider Protonen aus Protonenspektren mit literaturbekannten Titrationsmethoden zur Bestimmung von aziden Protonen

Zur Bewertung der Ergebnisse, die die Quantifizierung azider Protonen aus Protonenspektren liefern, wurden die berechneten Werte mit den Daten, die aus dem ROSIG-Pool zur Verfügung stehen, gegenübergestellt.

Nach der Elementaranalyse aus dem Arbeitskreis Prof. Dr. Zech, Universität Bayreuth enthalten die ROSIG-Substanzen folgende Anteile an Protonen:

BS1FA 4.1 %

HO10FA 4.5 %

FG1FA 5.2 %

Die carboxylischen und phenolischen Protonen bezogen auf den Gesamtprotonenzahl

betragen nach der erläuterten NMR-spektroskopischen Methode für diese Substanzen:

BS1FA	24 %
HO10FA	25 %
FG1FA	15 %

Hierbei beziehen sich die Werte auf den Anteil an der Gesamtprotonenzahl. Die Anzahl der carboxylischen und phenolischen Protonen pro Masseneinheit beträgt somit:

BS1FA	10 $\mu\text{mol}/\text{mg}$
HO10FA	11 $\mu\text{mol}/\text{mg}$
FG1FA	8 $\mu\text{mol}/\text{mg}$

Der Arbeitskreis Dr. Abbt-Braun, Universität Karlsruhe erhielt durch potentiometrische Titration folgende Werte für den Gehalt an carboxylischen und phenolischen Protonen:

BS1FA	16.7 $\mu\text{mol}/\text{mg}$
HO10FA	16.0 $\mu\text{mol}/\text{mg}$
FG1FA	11.4 $\mu\text{mol}/\text{mg}$

Der Arbeitskreis Prof. Dr. Zech erhielt durch die  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  / Ca-acetat-Methode die Werte

BS1FA	13 $\mu\text{mol}/\text{mg}$
HO10FA	16 $\mu\text{mol}/\text{mg}$

Die carboxylischen und phenolischen Protonen werden offensichtlich mit der Methode der Differenzierung von Protonenspektren nicht vollständig erfaßt. Die Anzahl der nicht-registrierbaren Protonen wurde in Kapitel 6.2.1 anhand von Modellsubstanz-Messungen auf 20 % geschätzt. Verglichen mit der potentiometrischen Titrationsmethode scheint die NMR-spektroskopische Methode etwa 30-40% zuwenig azide Protonen zu registrieren, bzw. verglichen mit der  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  / Ca-acetat-Methode 23–31% zuwenig azide Protonen.

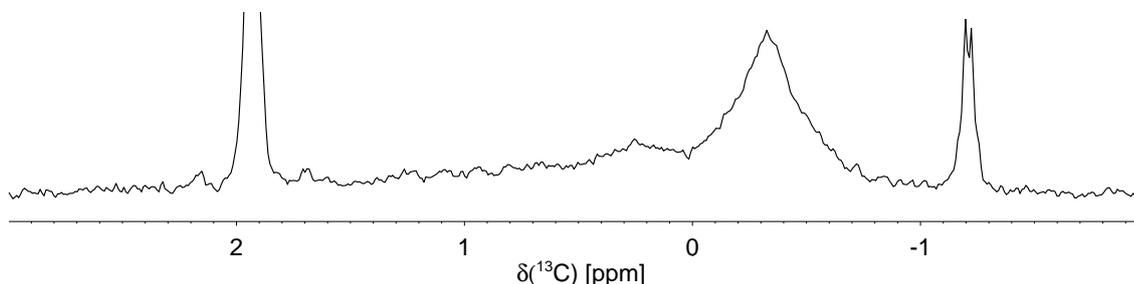
Der wesentliche Vorteil der Methode der Differenzbildung von Protonenspektren liegt in der breiteren Anwendbarkeit. Huminsäuren können durch ihr Lösungsverhalten durch Titration nicht untersucht werden. Zweidimensionale NMR-Spektren derivatisierter HS liefern zusätzlich eine Differenzierung von Partialstrukturen über  $\text{pK}_a$ -Daten hinaus.

## 7.2 Ergebnisse der $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie

Die Resonanzen der  $^{13}\text{C}$ -Kerne der TMS-Substituenten verschiedener funktioneller Gruppen liegen nicht in voneinander getrennten Bereiche chemischer Verschiebung, sondern überlappen erheblich. Die genauen  $\delta(^{13}\text{C})$ -Bereiche dieser  $^{13}\text{C}$ -Kerne sind in Kapitel 7.4 aufgelistet. Der Gesamtbereich kann nur grob eingeteilt werden in TMS- $^{13}\text{C}$ -Kerne von silylierten Carboxylgruppen und primären aliphatischen Hydroxylgruppen (Bereich A: 0 – -0.65 ppm), sowie phenolischen und sekundären aliphatischen Hydroxylgruppen (Bereich B: 1.7 – 0 ppm). Die Resonanzen bei 1.9 ppm und -1.2 ppm sind auf die Nebenprodukte Hexamethylsiloxan und N-Trimethylsilyltrifluoroacetamid zurückzuführen. Die Integrale dieser Bereiche der einzelnen Substanzen finden sich in Tabelle C.7.

Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum des Silylbereichs von BS1FA ist in Abb. 7.3 abgebildet. Der Anteil des Bereichs A beträgt bei den aquatischen HS 39 % (SUWHA) bis 56 % (BS1FA). Der Anteil an COOH + primären OH ist bei BS1FA, HO13FA und SUWFA um 20 % höher als ihre korrespondierenden HA. Da beide silylierten Boden-FA nur teilweise gelöst waren, wurden die Spektren dieser Substanzen nicht quantitativ ausgewertet.

Abbildung 7.3:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von BS1FA.



## 7.3 Ergebnisse der $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektroskopie

In Abbildung 7.4 sind die  $^{29}\text{Si}$ -INEPT-Spektren der mit BSA silylierten HS einander gegenübergestellt. Mit Ausnahme der Grundwasserfulvinsäure ist die Form der Spektren sehr ähnlich. Verglichen mit ihrer korrespondierenden FA ist die Fläche unter der BS1HA-Kurve des Bereichs, dem Silylether zugeordnet werden (22.5–12 ppm), größer: Das Verhältnis von Carboxyl- zu Hydroxylfunktionen ist bei BS1HA kleiner als das von BS1FA. Die Form der  $^{29}\text{Si}$ -INEPT-Spektren von BS1FA und HO10FA ist annähernd gleich. Die  $^{29}\text{Si}$ -INEPT-Spektren von FG1FA, HO13FA, SUWFA und MPDOM unterscheiden sich von den anderen Substanzen durch einen flachen Kuvenverlauf im Bereich der Silylether, der nicht bei bereits 16 ppm auf die Höhe der Basislinie zurückgeht<sup>1</sup>. Zwischen 16 und 12 ppm liegen die Resonanzen der Silylether von Cyclohexanol-Verbindungen und sekundären Hydroxylfunktionen in Alkylketten. Offensichtlich sind diese Strukturelemente nur in FG1FA sowie in HO13FA, MPDOM und SUWFA enthalten.

Die Substanz MPDOM weist bezüglich ihres  $^{29}\text{Si}$ -INEPT-Spektrums mehr Ähnlichkeiten mit der FA des Suwannee-Flusses auf als mit der HA. Entsprechend sind MPDOM und SUWFA ähnlich zu der ROSIG-Substanz FG1FA.

Das Maximum des Silylesterbereichs (31–22.5 ppm) liegt mit Ausnahme von FG1FA bei allen Substanzen bei etwa 25 ppm. Das Maximum der FG1FA-Kurve ist zu deutlich kleineren  $\delta(^{29}\text{Si})$ -Werten verschoben.

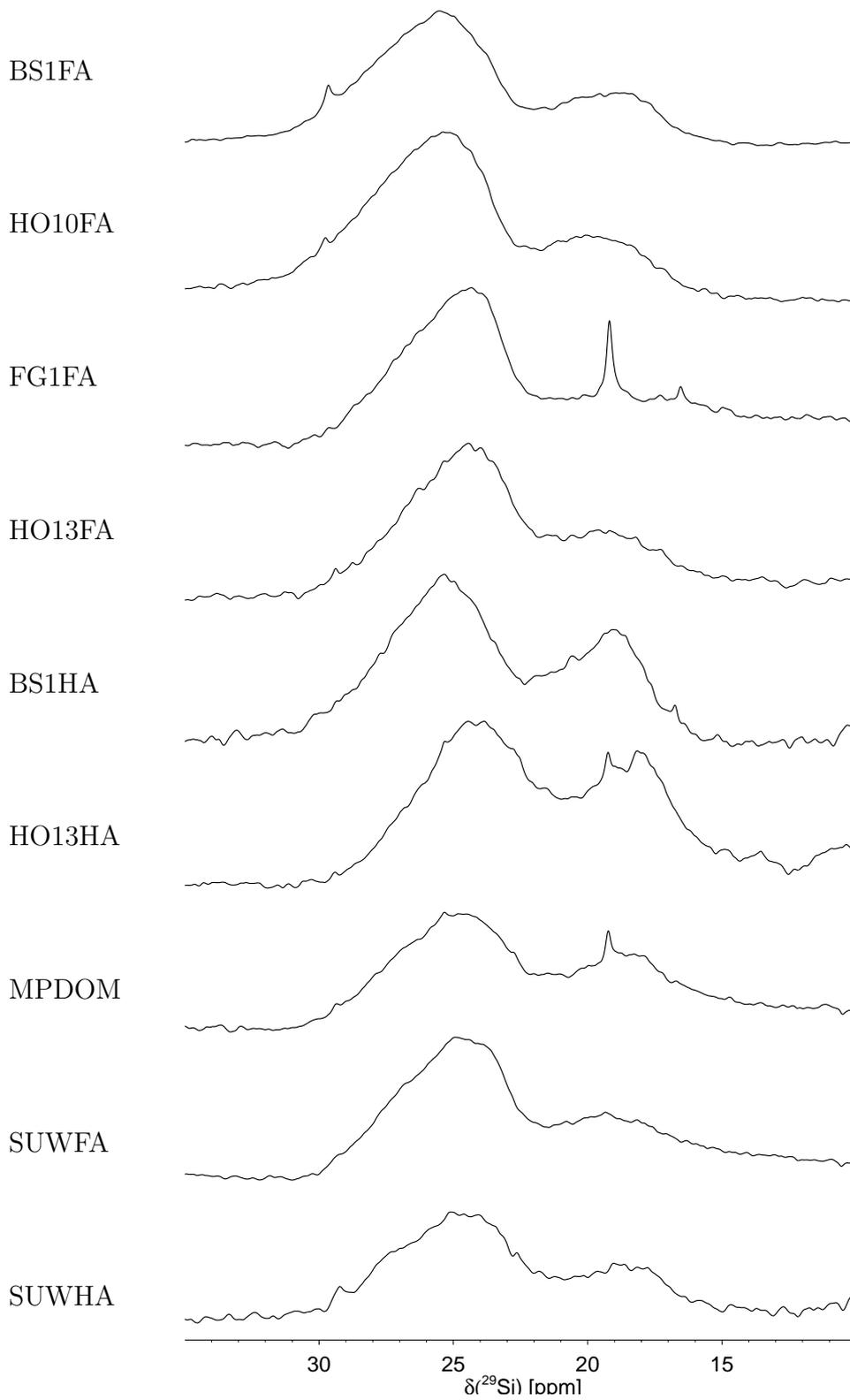
Die  $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektren wurden nach Bestimmung der chemischen Verschiebung von Modellsubstanzen (s. Anhang) eingeteilt in die Bereiche der silylierten Funktionen

- A: 31–22.5 ppm (COOH)
- B: 22.5–18.5 ppm ( $\text{C}_{ar}$ -OH,  $\text{C}_{alk}$ -OH in  $\alpha$ -Position zu Carbonyl-, Carboxyl- oder Hydroxylgruppen)
- C: 18.5–16 ppm (primäre und sekundäre Zucker-OH, primäre Alkylketten-OH)
- D: 16–12 ppm (sekundäre Alkylketten-OH, Cyclohexan-OH)

In Tabelle C.6 sind die Integrationswerte der  $^{29}\text{Si}$ -INEPT-Spektren aufgelistet. Eine quantitative Auswertung der  $^{29}\text{Si}$ -INEPT-Spektren ist von beiden Bodenfulvinsäuren nicht sinnvoll, da sich die silylierten Substanzen nicht vollständig gelöst haben.

Die prozentualen Anteile der Integrale an den Bereichen betragen A: 48–75 %, B: 18–28 %, C: 5–17 %, D: 0–11 %.

<sup>1</sup>Das scharfe Signal im  $^{29}\text{Si}$ -INEPT-Spektrum von FG1FA bei 19 ppm stammt von einer unbekanntem Verunreinigung bei der Präparation der Probe.

Abbildung 7.4:  $^{29}\text{Si}$ -INEPT-Spektren der HS.

Die FA der Substanz BS1 ist mit einem Anteil von 73% des Bereichs A, der die Azidität der Substanzen beschreibt azider als die korrespondierende HA mit 61%. Entsprechend ist HO13FA mit einem Anteil von 61% azider als ihre korrespondierende HA mit 48%. Voraussetzung solcher Bilanzierungen ist, daß die Gesamtzahl der Protonen in verschiedenen Substanzen gleich ist. Der Bereich B von BS1HA ist mit 28% (HO13HA: 28%) deutlich größer als der von BS1FA mit nur 18% (HO13FA: 22%). Die Integrale der Bereiche A und B von SUWFA und SUWHA sind etwa gleich. Obwohl die ROSIG-Substanzen BS1FA, HO10FA und BS1HA im Bereich D kaum Signalintensitäten aufweisen, besitzt die Grundwasserfulvinsäure FG1FA einen erheblichen Anteil (11%) an den Funktionen sekundäre Alkylketten-OH oder Cyclohexan-OH. Desweiteren enthalten die Proben aus dem Suwannee-Fluß und HO13 einen erheblichen Anteil an diesen Funktionen.

### 7.3.1 Korrelation von $pK_a$ -Werten mit der chemischen Verschiebung $\delta(^{29}\text{Si})$

Der in Kapitel 4.6 erläuterte Einfluß des  $pK_a$ -Wertes einer Carbonsäure auf die chemische Verschiebung  $\delta(^{29}\text{Si})$  der silylierten Substanz und die Nutzbarkeit dieser Korrelation für die Auswertung von HS-NMR-Spektren wurden untersucht. In Abb.7.5 sind die chemischen Verschiebungen  $\delta(^{29}\text{Si})$  der Silylester gegen die  $pK_a$ -Werte der entsprechenden Carbonsäuren aufgetragen. Für Substanzen mit mehreren Carboxylgruppen wurde nur der erste  $pK_a$ -Wert berücksichtigt, der gegen den größten  $\delta(^{29}\text{Si})$ -Wert aufgetragen wurde. Ein Zusammenhang zwischen  $\delta(^{29}\text{Si})$  und  $pK_a$ -Werten ist nicht anzunehmen, da die Wertepaare unkorreliert erscheinen ( $R^2 = 0.15$ ). Diese Methode ist somit zur Auswertung der  $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektren nicht geeignet.

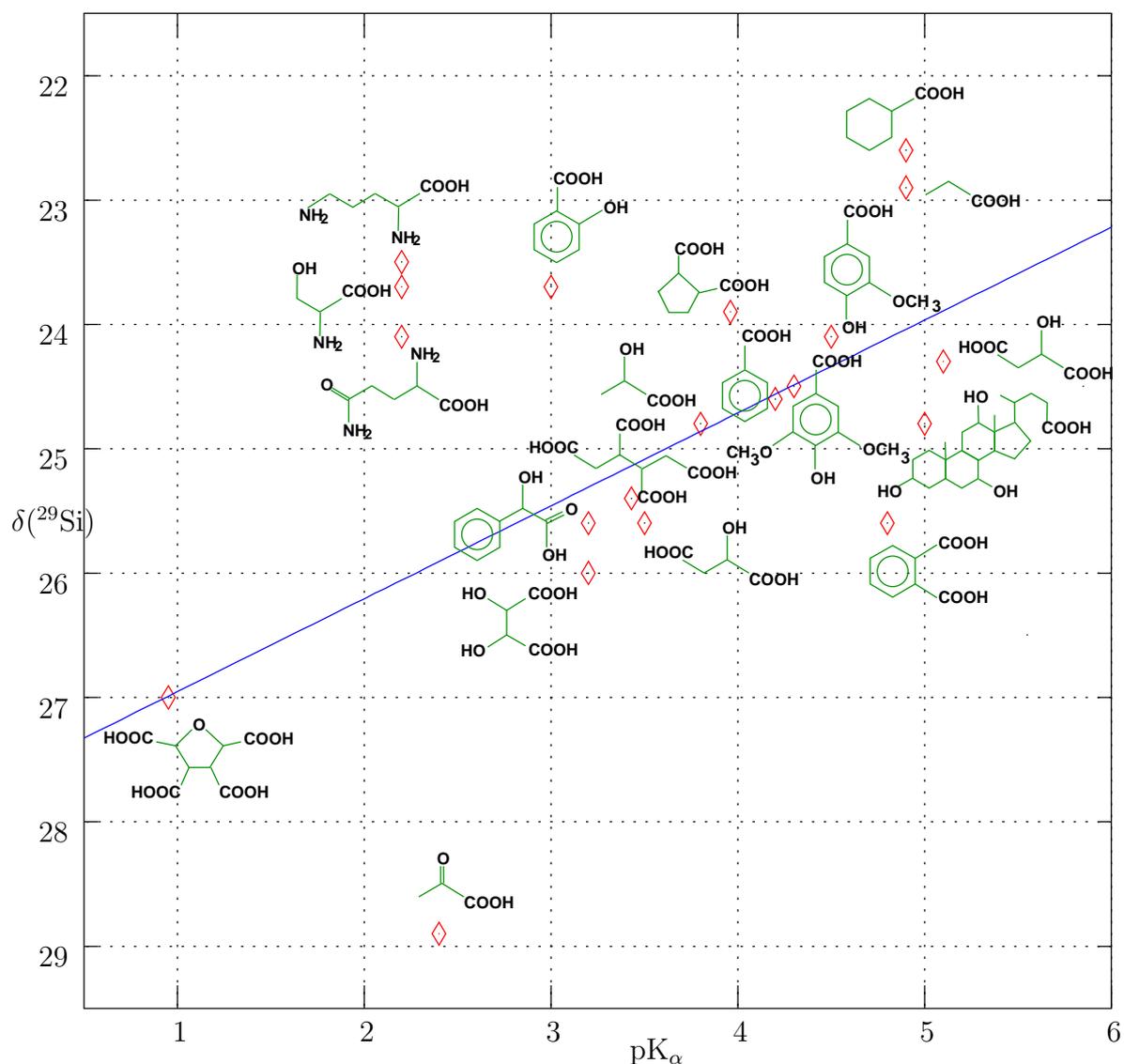


Abbildung 7.5: Auftragung von  $\delta(^{29}\text{Si})$ -Werten silylierter Carbonsäuren gegen die  $pK_a$ -Werte der Carbonsäure



## 7.4 Ergebnisse der zweidimensionalen NMR-Spektroskopie

### 7.4.1 Strukturbereichskarten: Übersicht von Bereichen ähnlicher struktureller Einheiten

Anhand silylierter Modellverbindungen wurden die literaturbekannten Strukturbereiche überprüft und ergänzt. Die gemessenen Werte der chemischen Verschiebungen  $\delta(^1\text{H})$ ,  $\delta(^{29}\text{Si})$  und  $\delta(^{13}\text{C})$  der Substanzen in DMSO- $d_6$  finden sich im Anhang B. Die Bestimmung der Werte ermöglicht eine detailliertere Zuordnung von Resonanzbereichen zu chemischen Partialstrukturen in  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -,  $^{29}\text{Si}$ -,  $(^1\text{H},^{13}\text{C})$ - und  $(^1\text{H},^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektren. Insbesondere die Kombination von  $(^1\text{H},^{13}\text{C})$ - und  $(^1\text{H},^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektren erlaubt eine präzise Zuordnung von Signalen zu Partialstrukturen und eine eindeutige Bestimmung von Strukturbereichsgrenzen. Gegenüber 1D NMR-Spektren, in denen die Signale verschiedener Strukturelemente durch den kleinen Verschiebungsbereich stark überlagert sind und nur schwer interpretiert werden können, wurden in den zugehörigen 2D NMR-Spektren einzelne Bereiche nach funktionellen Gruppen differenziert. Eine deutliche, aussagekräftige Unterscheidung einzelner Strukturelemente ist nur in 2D-NMR-Spektren möglich.

Die Abb. 7.6 und 7.7 zeigen schematisch die  $^2\text{J}(^1\text{H},^{29}\text{Si})$ - und  $^1\text{J}(^1\text{H},^{13}\text{C})$ -HSQC-Spektren des Silylbereichs silylierter Modellverbindungen und die zugehörigen Strukturbereiche struktureller Einheiten. Diese Strukturbereichskarten wurden zur qualitativen und quantitativen Auswertung der HS-NMR-Spektren genutzt. In Tabelle 7.2 sind die Verschiebungsbereiche silylierter Huminstoffkonstituenten aufgelistet.

In den  $(^1\text{H},^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektren sind die Signalbereiche von aromatischen und aliphatischen Silylestern, aromatischen und aliphatischen Silylethern und Stickstoffverbindungen deutlich getrennt. Primäre, sekundäre und tertiäre aliphatische Silylether sind ebenfalls voneinander unterscheidbar. Weiterhin lassen sich die Silylverbindungen aromatischer und aliphatischer Carbonsäuren sowie primäre und sekundäre Hydroxylgruppen von Alkylketten und Kohlenhydraten, Hydroxylgruppen in  $\alpha$ -Position zu Carboxyl-, Carbonyl- oder Hydroxylgruppen und Cyclohexanol- und tertiäre Hydroxylgruppen differenzieren. Eine Korrelation von  $\delta(^{29}\text{Si})$  mit  $\text{pK}_a$ -Werten der Carbonsäuren konnte nicht gefunden werden. Die Signale silylierter mehrkernig benzoider Carbonsäuren (Carminsäure:  $\delta(^{29}\text{Si})$  26.1 ppm und Anthrachinon-2-carbonsäure:  $\delta(^{29}\text{Si})$  26.8 ppm) befinden sich relativ zu den einkernigen Carbonsäuren tieffeldverschoben. Die chemische Verschiebung  $\delta(^{29}\text{Si})$  von silylierten aliphatischen Carbonsäuren steigt von Säuren, die in  $\alpha$ -Position nicht O-substituiert sind (24.8-22.6 ppm), über  $\alpha$ -Hydroxyl- und  $\alpha$ -Carboxyl-substituierten Carbonsäuren (27.0-23.9 ppm) bis zur  $\alpha$ -Carbonyl-substituierten Carbonsäure (Brenztraubensäure: 28.9 ppm). Die Reso-

nanzen der aromatischen Silylether der Carminsäure sind tieffeldverschoben und befinden sich in den Bereichen der Carbonsäuren.

In ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-NMR-Spektren überlappen die den verschiedenen Strukturelementen zugeordneten Bereiche. Die Signale der silylierten Kohlenhydrate sind über einen großen Verschiebungsbereich verteilt.

Tabelle 7.2: Verschiebungsbereiche silylierter Huminstoffkonstituenten in [ppm].

funktionelle Gruppe	$\delta(^1\text{H})$	$\delta(^{29}\text{Si})$	$\delta(^{13}\text{C})$
$\text{C}_{ar}\text{-COOH}$	0.50–0.34	31.0–22.5	0.00–-0.50
$\text{C}_{alk}\text{-COOH}$	0.34–0.15	31.0–22.5	0.00–-0.65
$\text{C}_{ar}\text{-OH}$	0.34–0.22	22.5–18.5	0.90–0.00
$\alpha\text{-C-OH}$	0.22–0.08	22.5–18.5	-0.20–0.25
$\text{C}_{Kohlenhydrate}\text{-OH (sek.)}$	0.22–0.13	18.5–16.0	1.80–0.10
$\text{C}_{Kohlenhydrate}\text{-OH (prim.)}$	0.13–0.10	18.5–16.0	0.00–-0.30
$\text{C}_{Alkylkette}\text{-OH (prim.)}$	0.10–0.00	18.5–16.0	-0.20–-0.65
$\text{C}_{Alkylkette}\text{-OH (sec.)}$	0.15–0.08	16.0–13.5	0.30–0.10
$\text{C}_{Cyclohexan}\text{-OH}$	0.15–0.08	13.5–12.0	1.20–0.50
$\text{C}_{alk}\text{-OH (tert.)}$	0.15–0.08	13.5–5.5	2.70–2.50
$\text{C-NH}$	0.22–0.00	5.5–2.0	0.25–0.00

Abbildung 7.6: Übersicht über die verschiedenen Strukturbereiche von  ${}^2J({}^1\text{H}, {}^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektren.

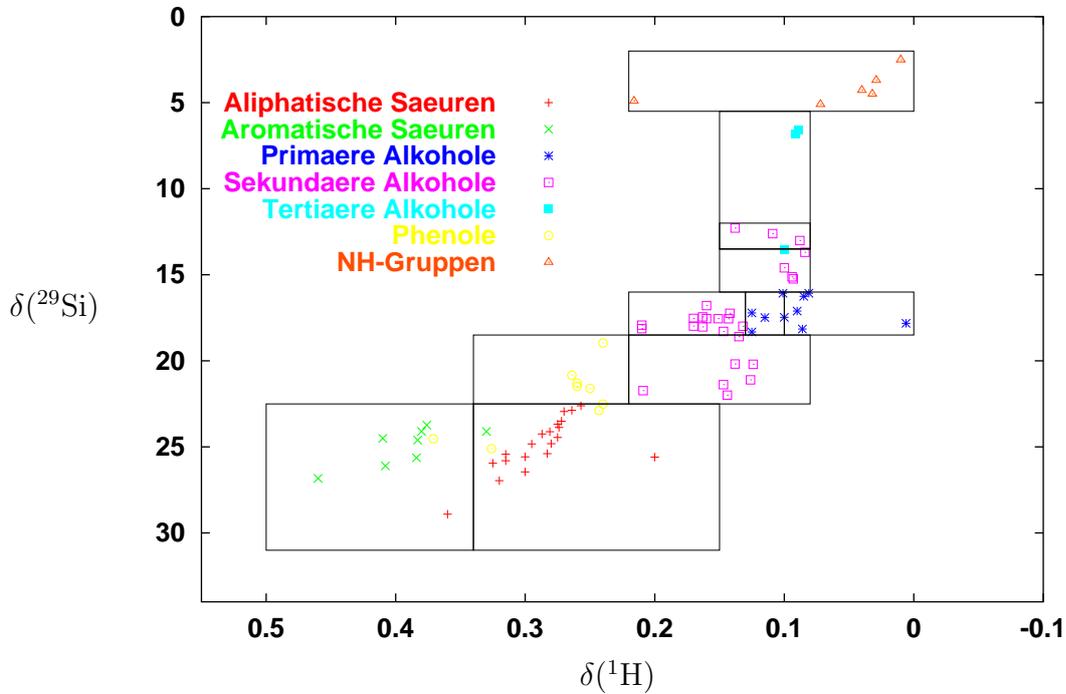
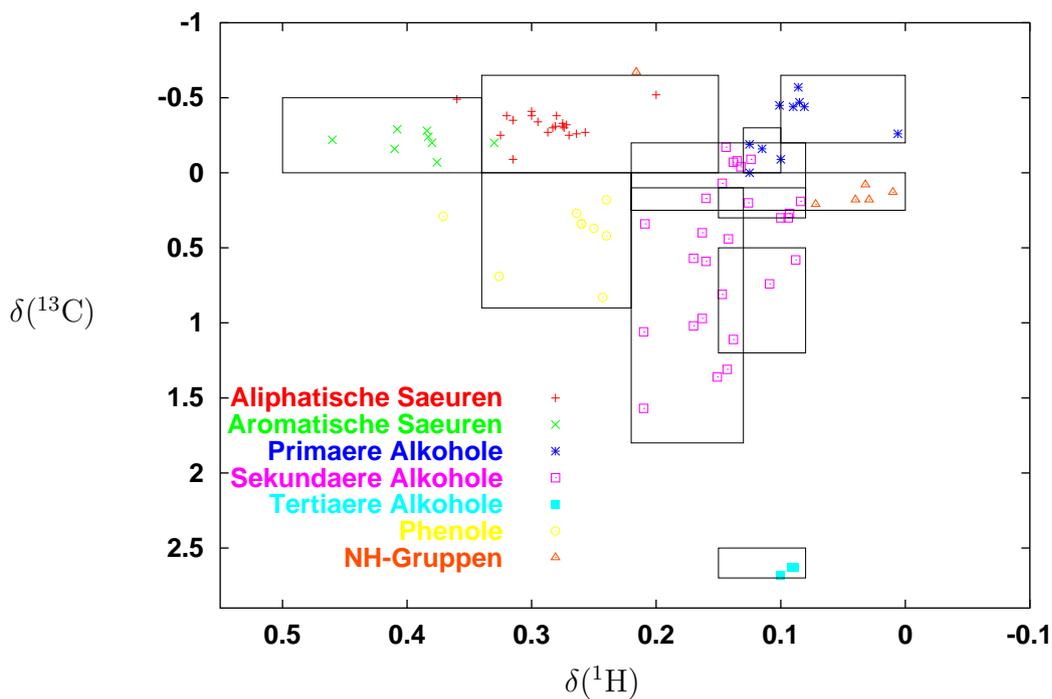


Abbildung 7.7: Übersicht über die verschiedenen Strukturbereiche von  ${}^2J({}^1\text{H}, {}^{13}\text{C})$ -NMR-Spektren.



### 7.4.2 Differenzspektren

Die  $^2J(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ - und  $^1J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -NMR-Spektren, die Differenzspektren und das Minimum-Spektrum der Substanzgruppen FA, HA, BS1 und Suwannee-Fluß sind in den Abb. 7.8 bis 7.17 abgebildet. Wie die meisten Methoden, die zur Untersuchung von HS herangezogen werden, liefert auch die NMR-Spektroskopie Ergebnisse, die sich auf ein "mehr" oder "weniger als" beschränken. In den Tabellen 7.3 bis 7.7 sind die Ergebnisse aus den Differenzspektren der HS zusammenfassend dargestellt.

Generell sind FA deutlich weniger aromatisch als die korrespondierenden HA. Insbesondere enthält die Grundwasser-FA praktisch keine aromatischen und phenolischen Strukturelemente. Der Carboxylanteil der FA ist größer als bei HA, der Kohlenhydratanteil hingegen kleiner. Auffallend ist der hohe Anteil an primären Alkylketten-Hydroxylfunktionen von BS1HA. Hydroxylgruppen von Cyclohexanolen oder sekundären Alkylketten sind in den Substanzen FG1FA, MPDOM und SUWFA vorhanden. Die Signale von tertiären Silylethern (zwischen 2.5 und 2.0 ppm) sind im  $(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -NMR-Spektrum der Grundwasserfulvinsäure erkennbar.

Die FA unterscheiden sich in ihrem Gehalt an phenolischen Strukturelementen (FG1FA und SUWFA enthalten wenig Phenole), in ihrem Kohlenhydratanteil (einen besonders hohen Anteil an Kohlenhydraten enthält BS1FA) und ihrem Verhältnis von carboxylischen zu hydroxylierten Funktionen (das Verhältnis von COOH zu OH ist bei der Grundwasser-FA besonders hoch).

Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden HA besteht in dem hohen Anteil an primären Alkylketten-Hydroxylfunktionen der Substanz BS1HA.

Die Substanz MPDOM enthält außer einem hohen Kohlenhydratanteil einen hohen Anteil an  $\alpha$ - $C_{alk}$ -OH. SUWFA besitzt den für aquatische FA typischen hohen Anteil an aliphatischen Carbonsäuren. Der Anteil an phenolischen Strukturen ist bei der SUWHA größer als bei den anderen beiden Substanzen. In folgenden Strukturelementen bestehen Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen der Substanz MPDOM und SUWFA bzw. SUWHA:

	Gemeinsame Strukturelemente	wesentliche Unterschiede
MPDOM und SUWFA	$C_{ar}$ -COOH, $C_{alk}$ -COOH tertiäre-OH	Kohlenhydrate $\alpha$ - $C_{alk}$ -OH
MPDOM und SUWHA	Kohlenhydrate	Phenole $C_{ar}$ -COOH, $C_{alk}$ -COOH tertiäre-OH

Ein Vergleich der NMR-Spektren von SUWFA und SUWHA (Abb. 7.16 und 7.17) bestätigt

die in [15] erhaltenen Ergebnisse für die Anteile an Carbonsäuren (FA:  $6.1 \text{ mmol g}^{-1}$  HA:  $4.9 \text{ mmol g}^{-1}$ ), methylierbaren Phenolen (FA:  $1.5 \text{ mmol g}^{-1}$  HA:  $2.9 \text{ mmol g}^{-1}$ ) und den gesamten Hydroxylgruppen (FA:  $7.0 \text{ mmol g}^{-1}$  HA:  $9.0 \text{ mmol g}^{-1}$ ). Entsprechend den Differenzspektren enthält SUWFA deutlich mehr Carboxylgruppen als die korrespondierende HA, weniger Phenole und weniger Hydroxylgruppen.

Allgemein ist der Vergleich mit literaturbekannten Werten mit Schwierigkeiten in der Auswahl und Bewertung der zur Verfügung stehenden Daten verbunden. Das Ausmaß der Unterschiede wird deutlich, wenn man die Daten verschiedener analytischer Methoden miteinander vergleicht. Die Werte können stark (bis zu mehreren Hundert Prozent) voneinander abweichen. Beispielsweise liefert die Acetylierung mit anschließender Protonen-NMR-Spektroskopie für die Gesamtzahl der Hydroxylprotonen von SUWFA  $4.4 \text{ mmol g}^{-1}$ . Die Bestimmung dieser Protonen durch Permethylierung mit NaH und  $^{13}\text{CH}_3\text{I}$  und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie ergibt hingegen  $7.0 \text{ mmol g}^{-1}$  [15].

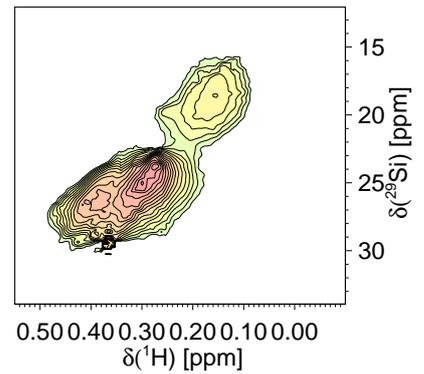
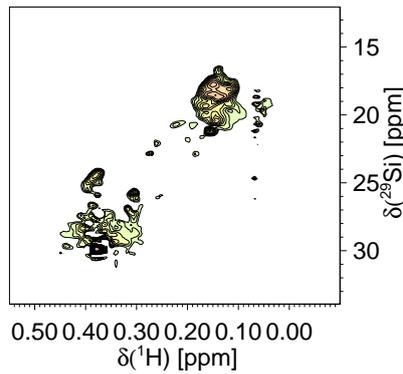
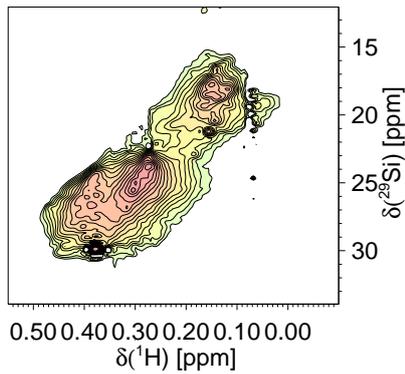
Die meisten, der für HS angewandten analytischen Methoden bieten eine gute Möglichkeit für den direkten Vergleich von HS, sind jedoch für die exakte Ermittlung von strukturellen Parametern nicht geeignet.

Abbildung 7.8: ( $^1\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$ )-NMR-Spektren, Differenzspektren und das Minimumspektrum der Fulvinsäuren.

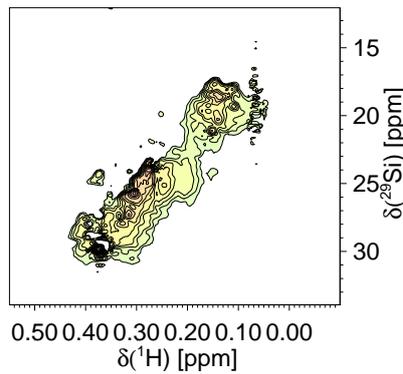
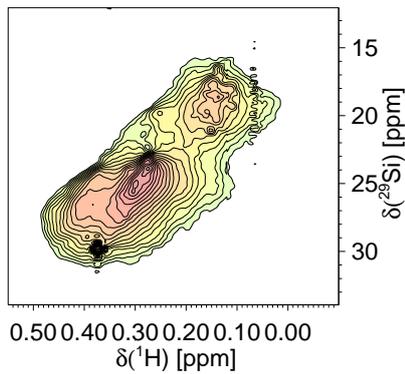
**BS1FA**

Differenzspektren

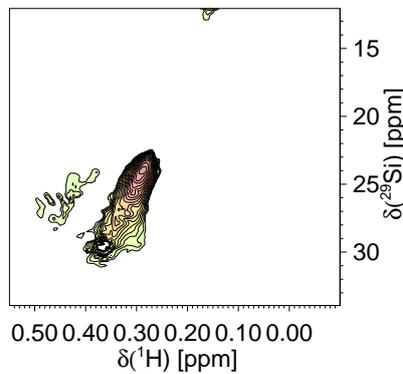
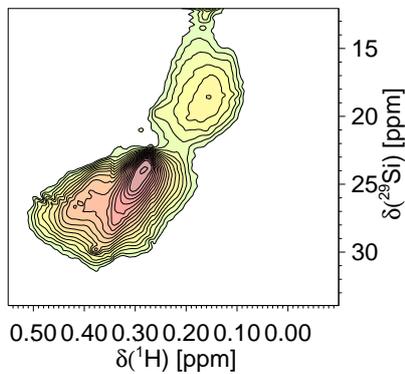
Minimumspektrum



**HO10FA**

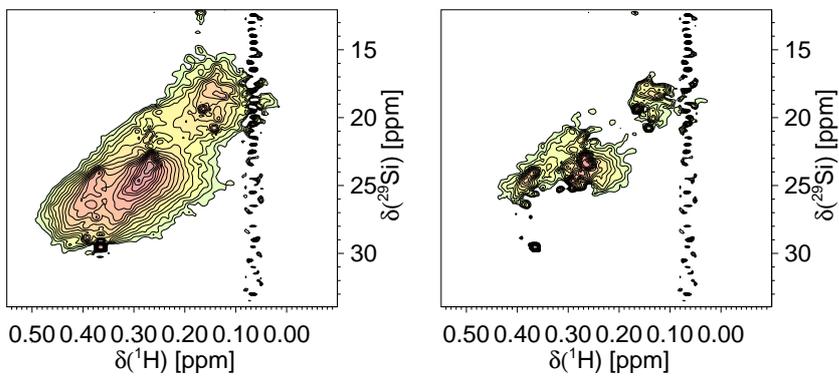


**FG1FA**



HO13FA

Differenzspektren



SUWFA

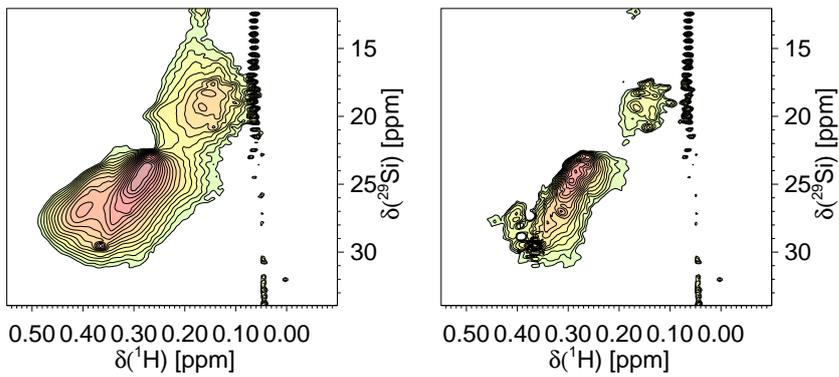
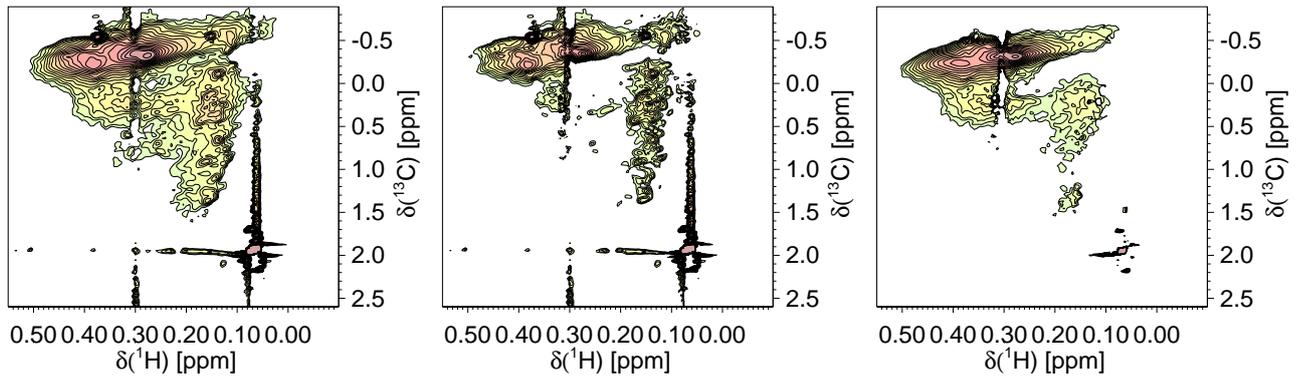


Abbildung 7.9: ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-NMR-Spektren, Differenzspektren und das Minimumspektrum der Fulvinsäuren.

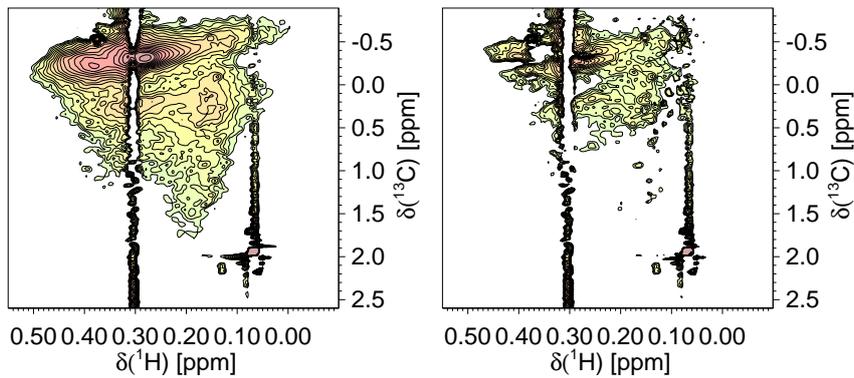
BS1FA

Differenzspektren

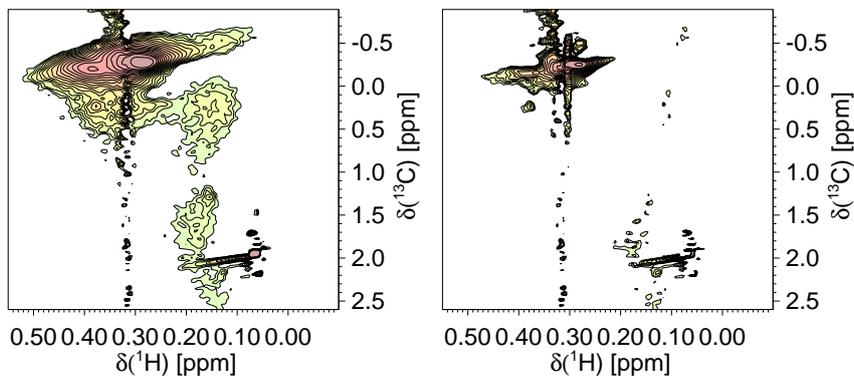
Minimumspektrum



HO10FA



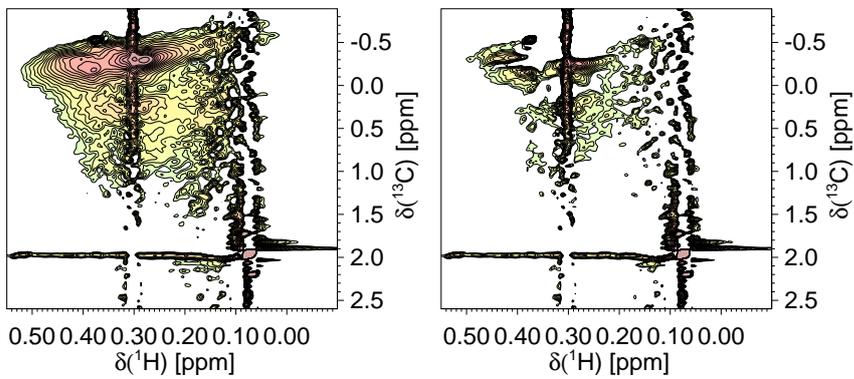
FG1FA





HO13FA

Differenzspektren



SUWFA

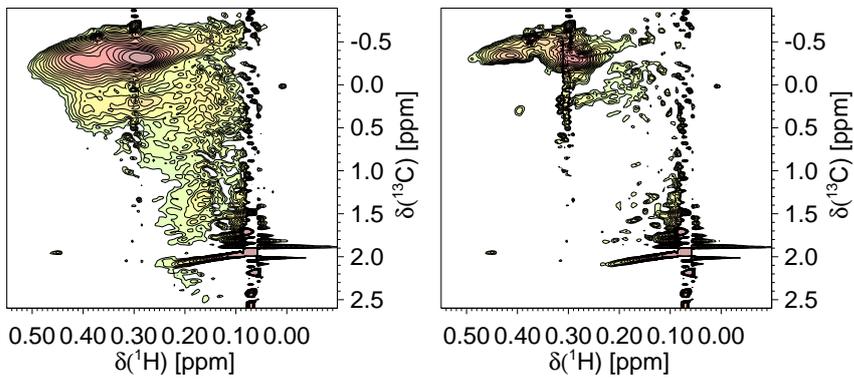
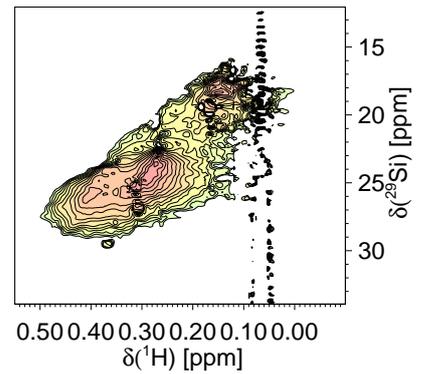
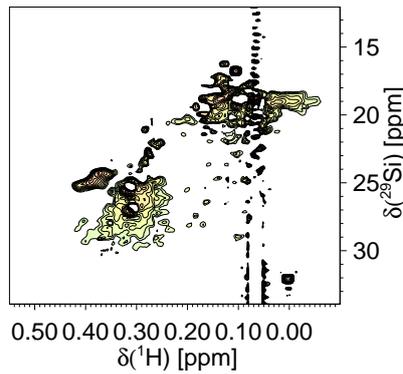
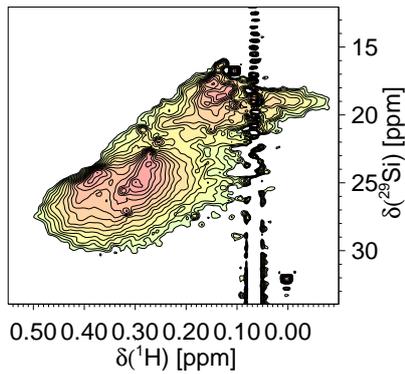


Abbildung 7.10: ( $^1\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$ )-NMR-Spektren, Differenzspektren und das Minimumspektrum der Huminsäuren.

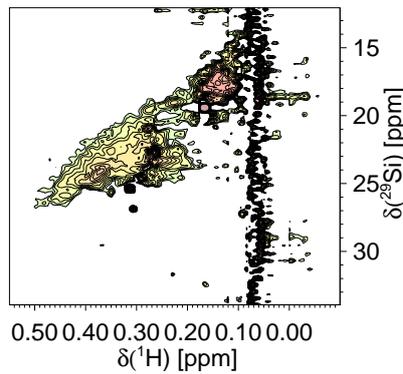
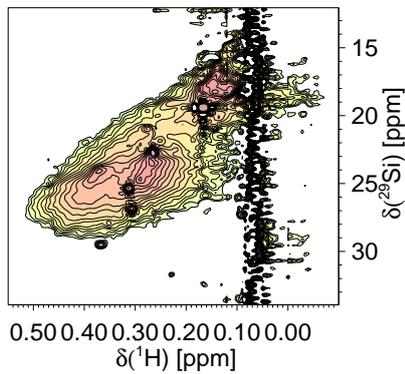
**BS1HA**

Differenzspektren

Minimumspektrum



**HO13HA**



**SUWHA**

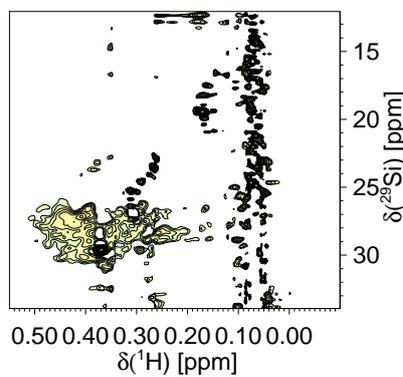
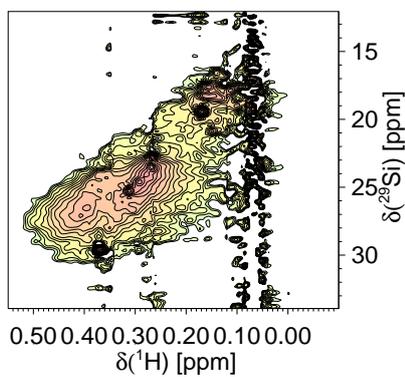
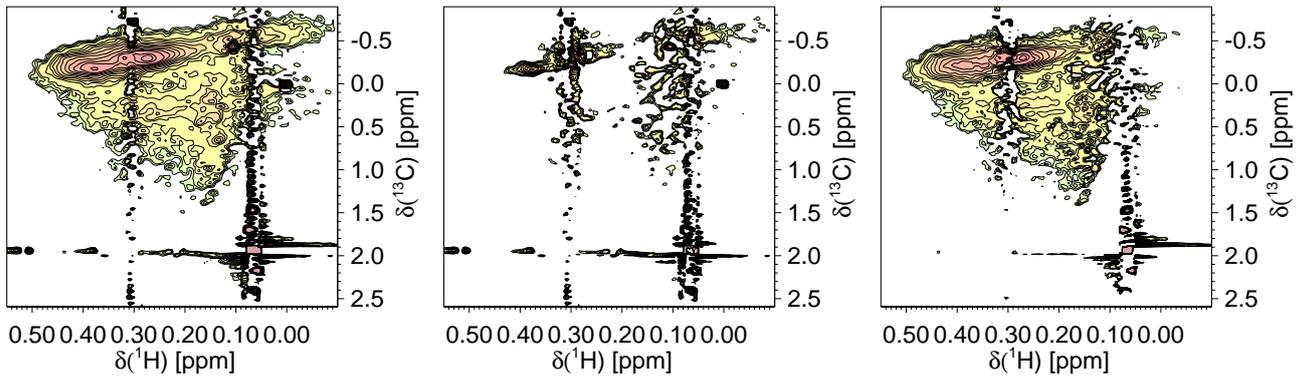


Abbildung 7.11: ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-NMR-Spektren, Differenzspektren und das Minimumspektrum der Huminsäuren.

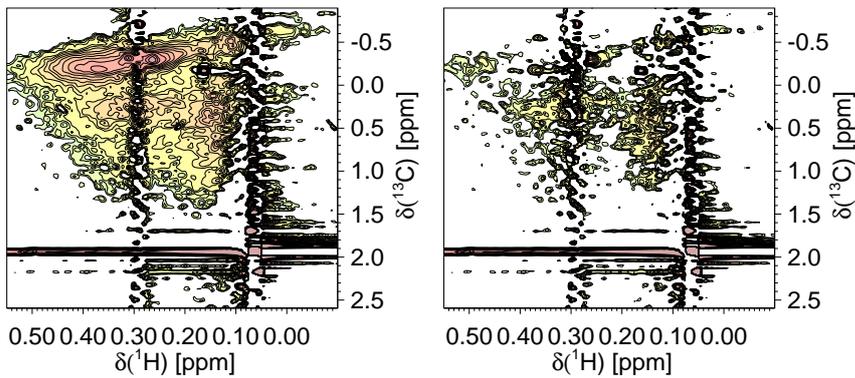
BS1HA

Differenzspektren

Minimumspektrum



HO13HA



SUWHA

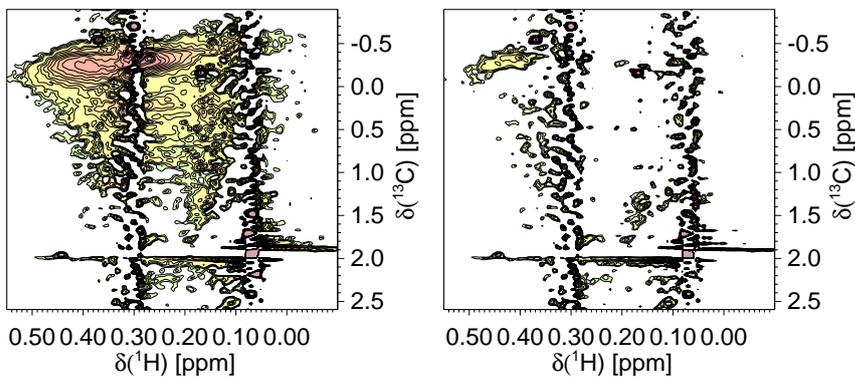
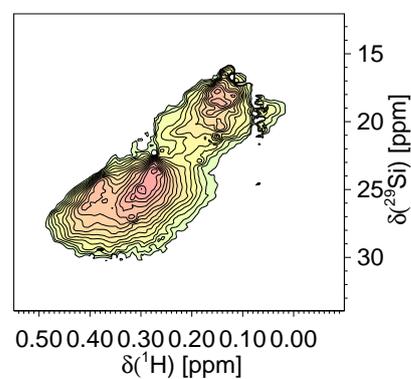
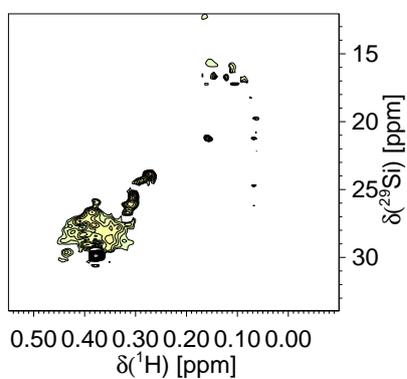
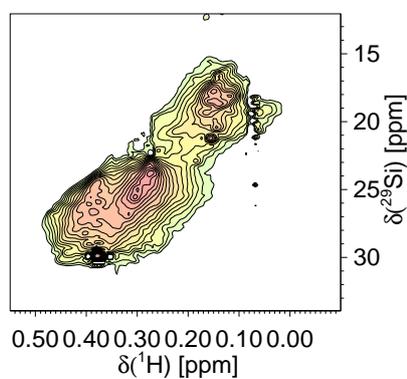


Abbildung 7.12: ( $^1\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$ )-NMR-Spektren, Differenzspektren und das Minimumspektrum der Substanz BS1.

**BS1FA**

Differenzspektren

Minimumspektrum



**BS1HA**

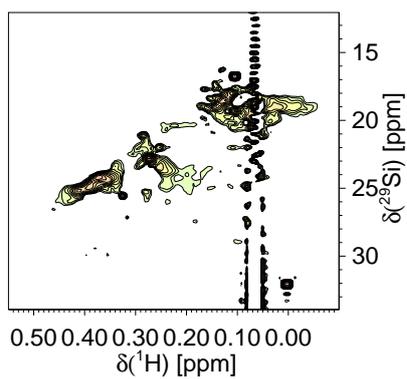
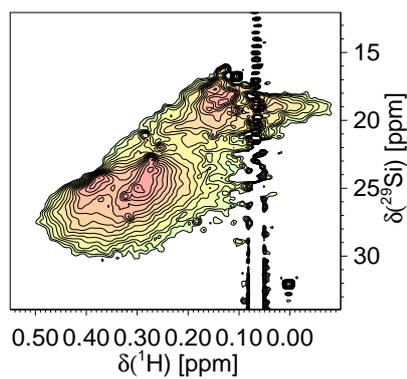
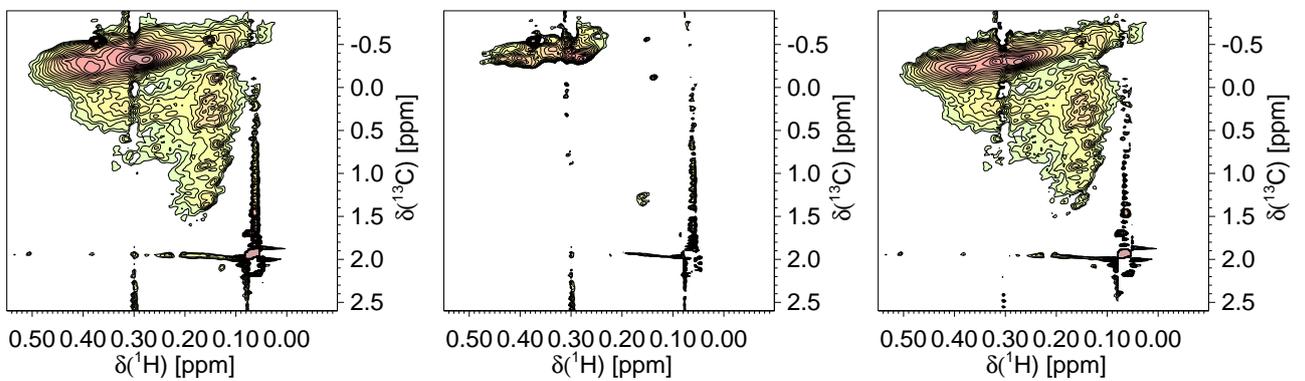


Abbildung 7.13: ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-NMR-Spektren, Differenzspektren und das Minimumspektrum der Substanz BS1.

BS1FA

Differenzspektren

Minimumspektrum



BS1HA

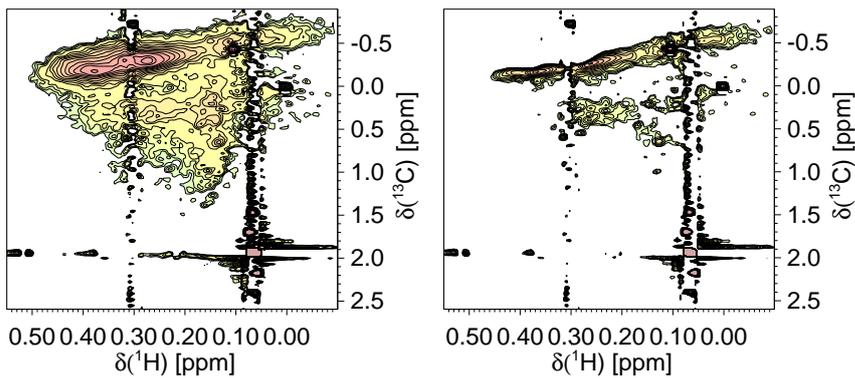
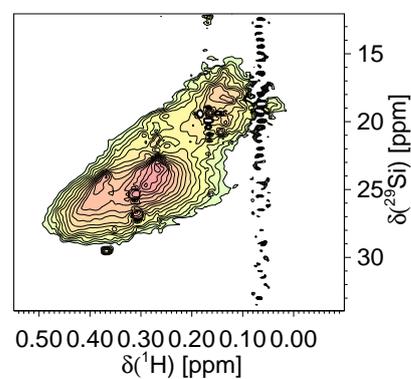
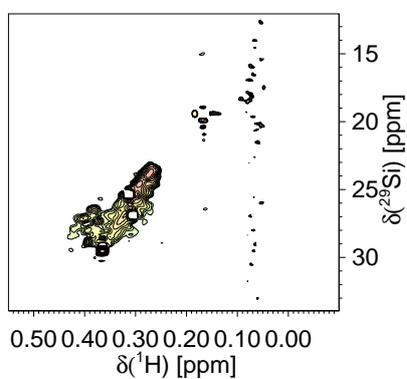
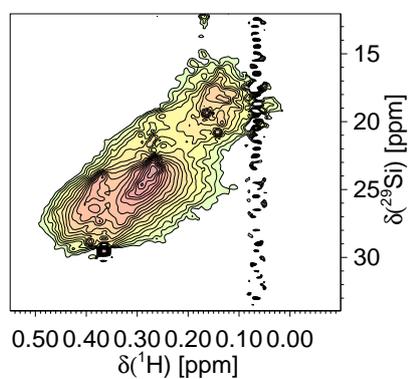


Abbildung 7.14: ( $^1\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$ )-NMR-Spektren, Differenzspektren und das Minimumspektrum der Substanz HO13.

**HO13FA**

Differenzspektren

Minimumspektrum



**HO13HA**

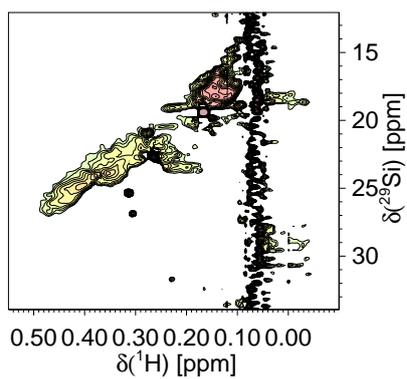
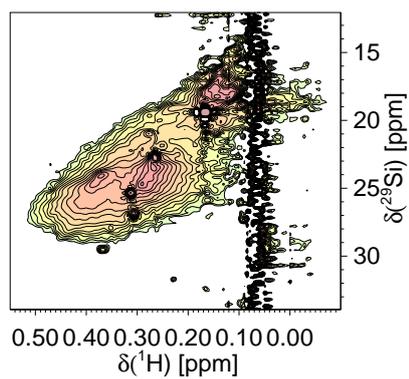
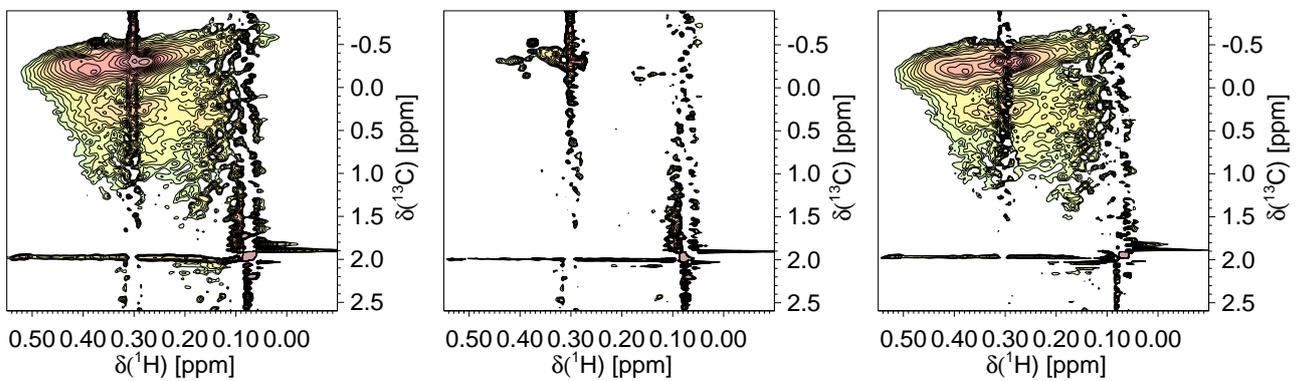


Abbildung 7.15: ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-NMR-Spektren, Differenzspektren und das Minimumspektrum der Substanz HO13.

HO13FA

Differenzspektren

Minimumspektrum



HO13HA

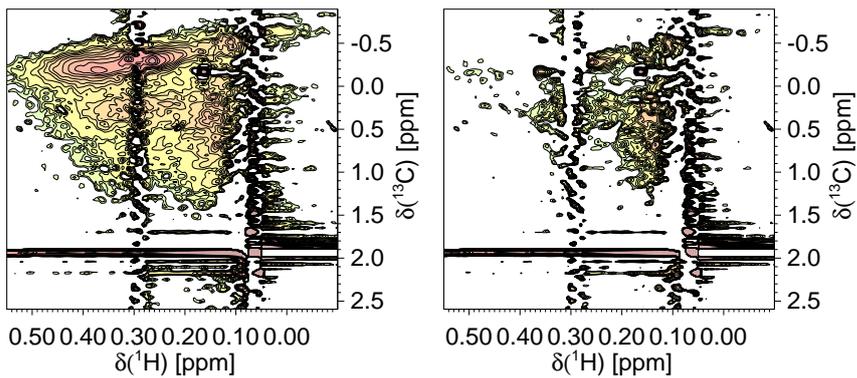
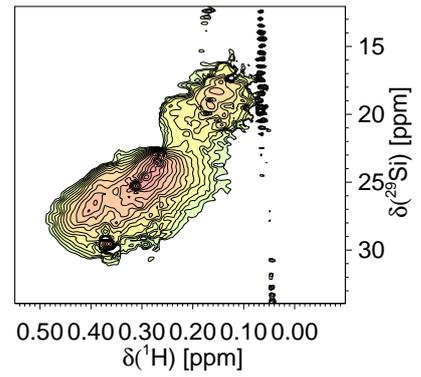
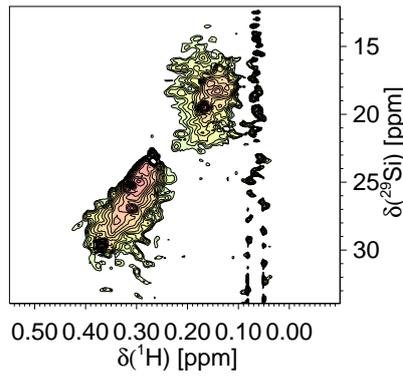
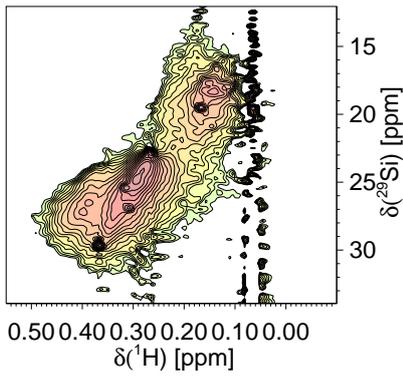


Abbildung 7.16: ( $^1\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$ )-NMR-Spektren, Differenzspektren und das Minimumspektrum der Substanzen aus dem Suwannee-Fluß.

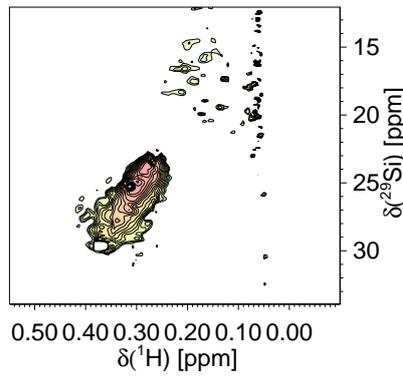
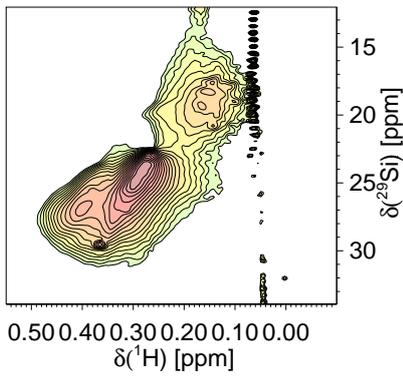
## MPDOM

## Differenzspektren

## Minimumspektrum



## SUWFA



## SUWHA

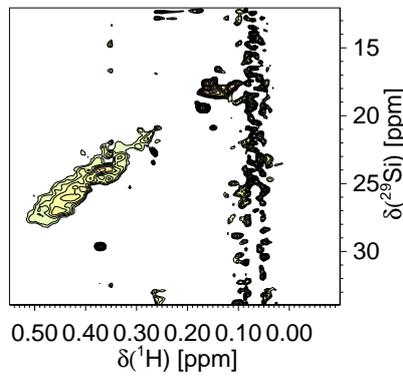
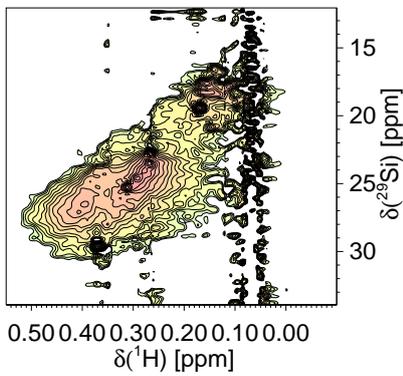


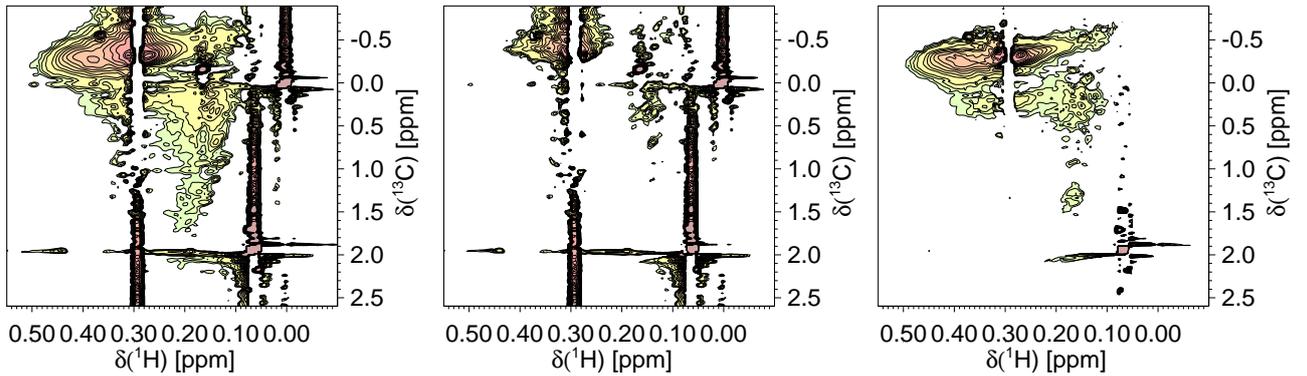


Abbildung 7.17: ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-NMR-Spektren, Differenzspektren und das Minimumspektrum der Substanzen aus dem Suwannee-Fluß.

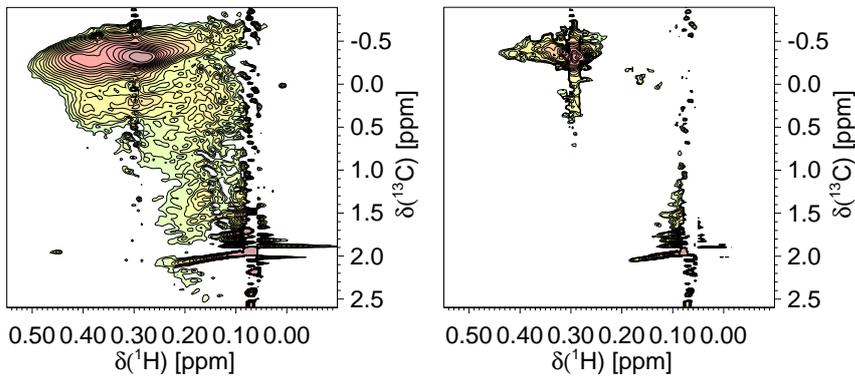
## MPDOM

## Differenzspektren

## Minimumspektrum



## SUWFA



## SUWHA

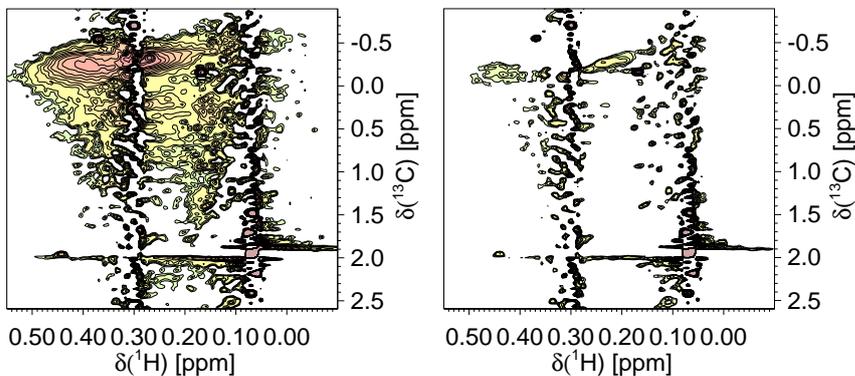


Tabelle 7.3: Sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen in Fulvinsäuren.

$C_{ar}$ -COOH	HO13FA > BS1FA $\approx$ HO10FA $\approx$ SUWFA > FG1FA
$C_{alk}$ -COOH	FG1FA > HO10FA $\approx$ HO13FA $\approx$ SUWFA > BS1FA
$C_{ar}$ -OH	HO13FA > HO10FA > BS1FA $\gg$ SUWFA $\approx$ FG1FA
Kohlenhydrate	BS1FA > HO10FA $\approx$ HO13FA $\approx$ SUWFA $\gg$ FG1FA
$\alpha$ - $C_{alk}$ -OH	BS1FA $\approx$ HO10FA $\approx$ HO13FA > SUWFA $\gg$ FG1FA
Cyclohexan-OH, sekundäre Alkylketten-OH	FG1FA $\approx$ SUWFA > BS1FA $\approx$ HO10FA $\approx$ HO13FA
tertiäre-OH	FG1FA > BS1FA $\approx$ HO10FA $\approx$ HO13FA $\approx$ SUWFA

Tabelle 7.4: Sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen in Huminsäuren.

$C_{ar}$ -COOH	HO13FA > SUWHA > BS1HA
$C_{alk}$ -COOH	BS1HA > HO13HA $\approx$ SUWHA
$C_{ar}$ -OH	HO13HA > BS1HA $\approx$ SUWHA
Kohlenhydrate	HO13HA > BS1HA > SUWHA
primäre Alkylketten-OH	BS1HA > HO13HA $\approx$ SUWHA
$\alpha$ - $C_{alk}$ -OH	BS1HA $\approx$ HO13HA $\approx$ SUWHA

Tabelle 7.5: Sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen in den BS1-Substanzen.

$C_{ar}$ -COOH	HA > FA
$C_{alk}$ -COOH	FA > HA
$C_{ar}$ -OH	HA $\gg$ FA
Kohlenhydrate	HA > FA
primäre Alkylketten-OH	HA > FA
$\alpha$ - $C_{alk}$ -OH	FA $\approx$ HA

Tabelle 7.6: Sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen in den HO13-Substanzen.

$C_{ar}$ -COOH	HA > FA
$C_{alk}$ -COOH	FA > HA
$C_{ar}$ -OH	HA > FA
Kohlenhydrate	HA > FA
$\alpha$ - $C_{alk}$ -OH	HA $\approx$ FA

Tabelle 7.7: Sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen in den Substanzen des Suwannee-Flusses.

$C_{ar}$ -COOH	HA > FA $\approx$ MPDOM
$C_{alk}$ -COOH	FA $\approx$ MPDOM $\gg$ HA
$C_{ar}$ -OH	HA > FA $\approx$ MPDOM
Kohlenhydrate	MPDOM > HA > FA
$\alpha$ - $C_{alk}$ -OH	MPDOM > FA $\approx$ HA
Cyclohexan-OH, sekundäre Alkylketten-OH	FA > MPDOM $\approx$ HA

### Qualitative Auswertung der 2D NMR-Spektren der Substanzgruppen

Ein Vergleich der Minimumspektren der verschiedenen Substanzgruppen verdeutlicht die strukturellen Merkmale. Die FA enthalten den größten Anteil aliphatischer Carbonsäuren und wenig Kohlenhydrat-Strukturelemente. Zwischen den Substanzen BS1 und SUW bestehen nur geringe Unterschiede. Die Gesamt-Minimumspektren repräsentieren die "strukturelle Grund-Form" der Huminstoff-Funktionen.

Tabelle 7.8: Sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen in den Substanzgruppen.

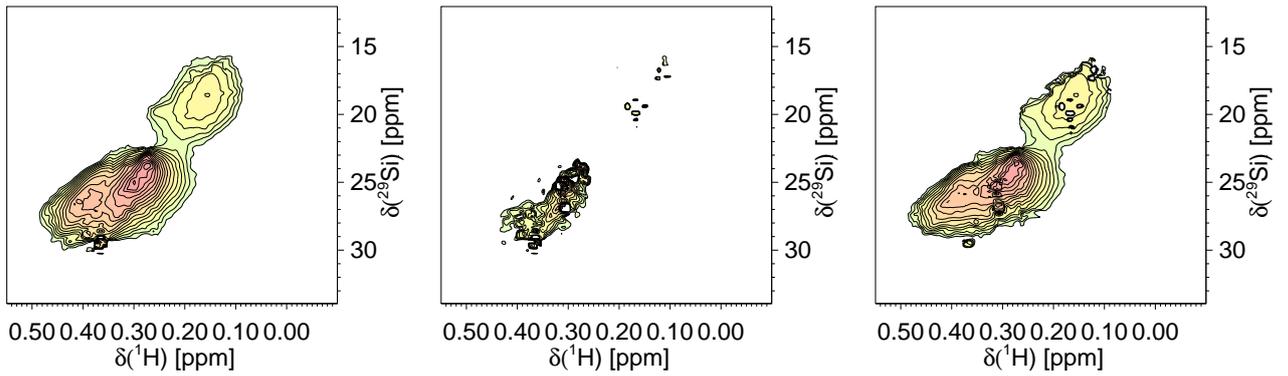
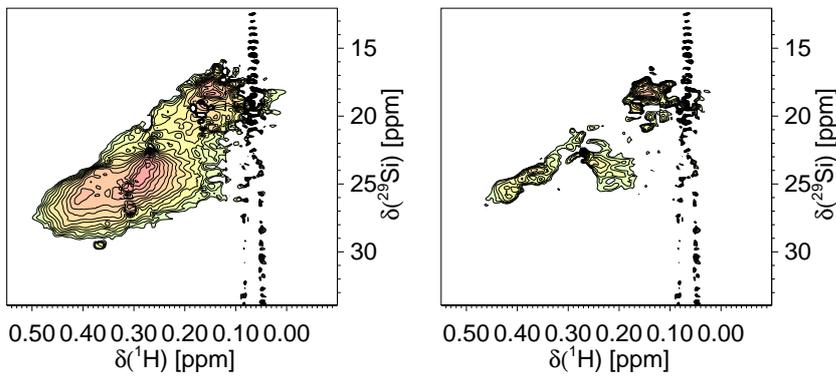
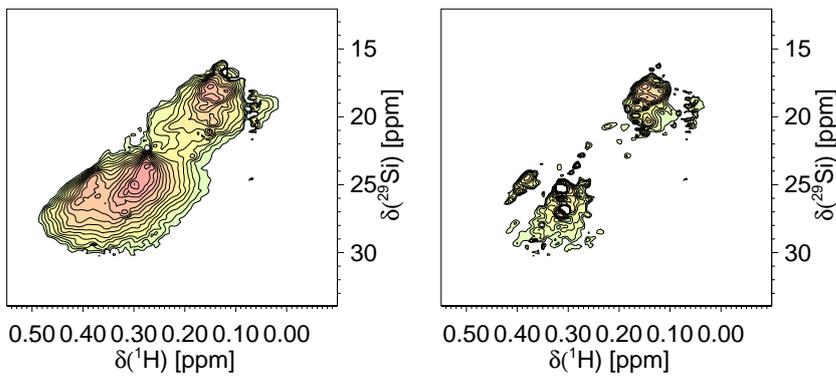
$C_{ar}$ -COOH	HA > FA ; HO13 > BS1
$C_{alk}$ -COOH	FA > HA ; BS1 > HO13
$C_{ar}$ -OH	HO13 > HA > BS1 > SUW $\approx$ FA
Kohlenhydrate	HA $\approx$ BS1 $\approx$ HO13 > SUW > FA
$\alpha$ - $C_{alk}$ -OH	HA > BS1 $\approx$ HO13 $\approx$ SUW > FA

Abbildung 7.18: ( $^1\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$ )-NMR-Minimumspektrum der Substanzgruppen, deren Differenzspektren und das Minimum-Spektrum: Die "strukturelle Grund-Form" der HS-Funktionen.

**FA**

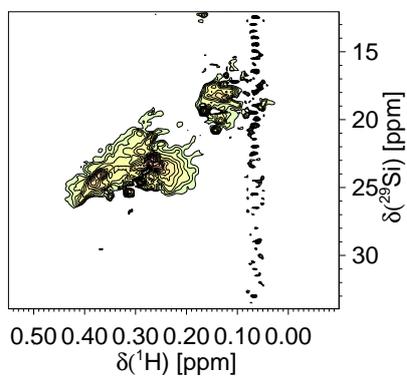
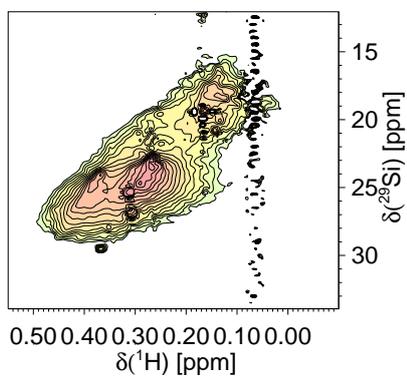
Differenzspektren

Minimumspektrum

**HA****BS1**

HO13

Differenzspektren



SUW

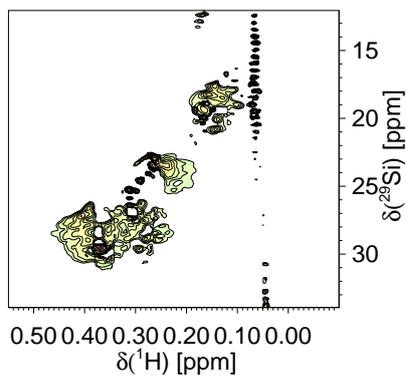
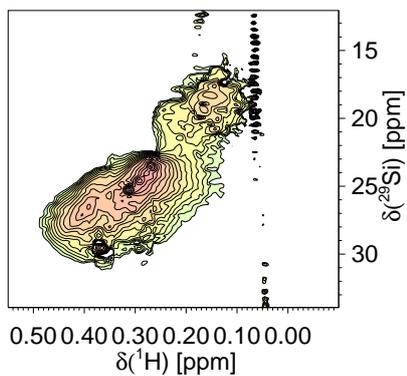
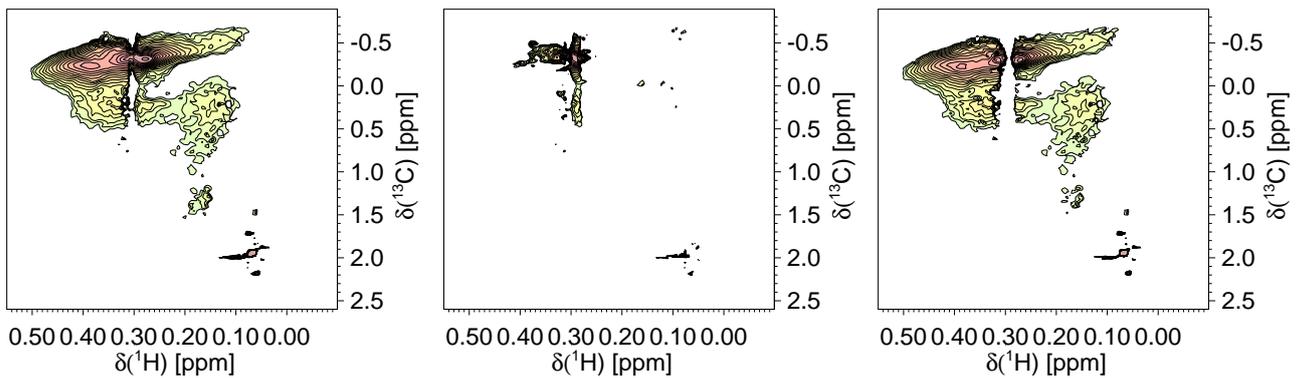
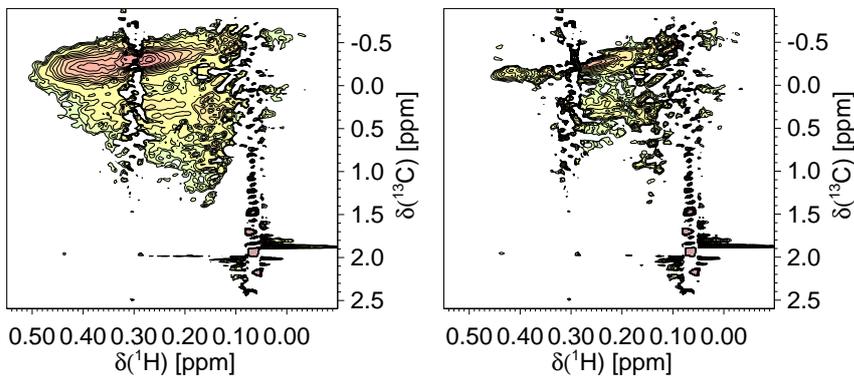
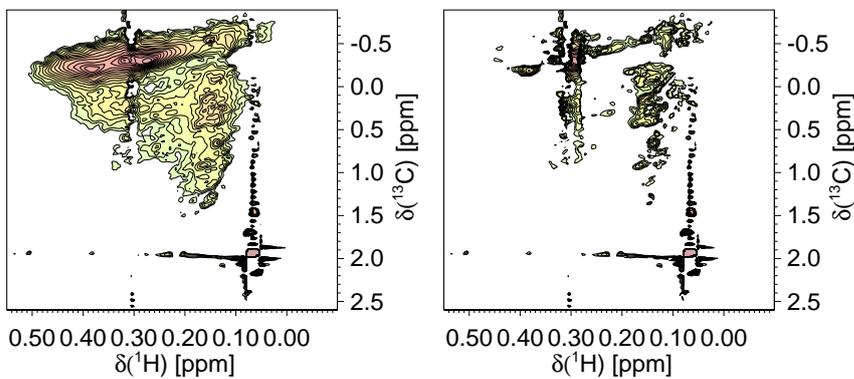


Abbildung 7.19: ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-NMR-Minimumspektrum der Substanzgruppen, deren Differenzspektren und das Minimum-Spektrum: Die "strukturelle Grund-Form" der HS-Funktionen.

**FA**

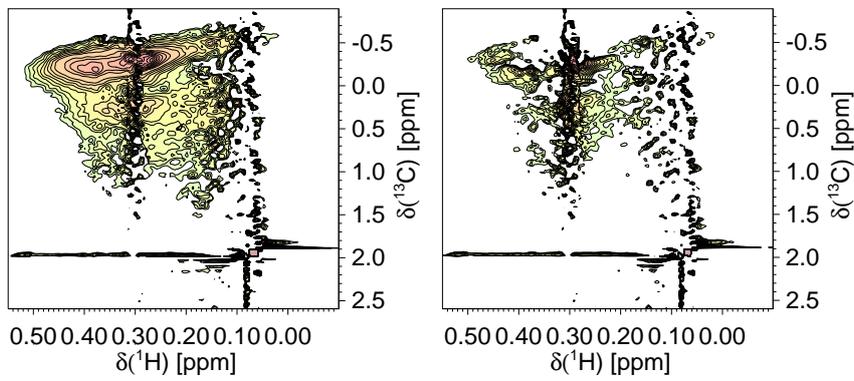
Differenzspektren

Minimumspektrum

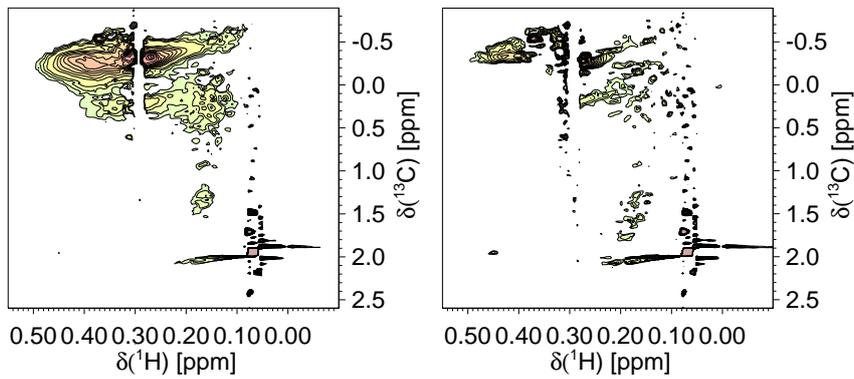
**HA****BS1**

SUW

Differenzspektren



SUW





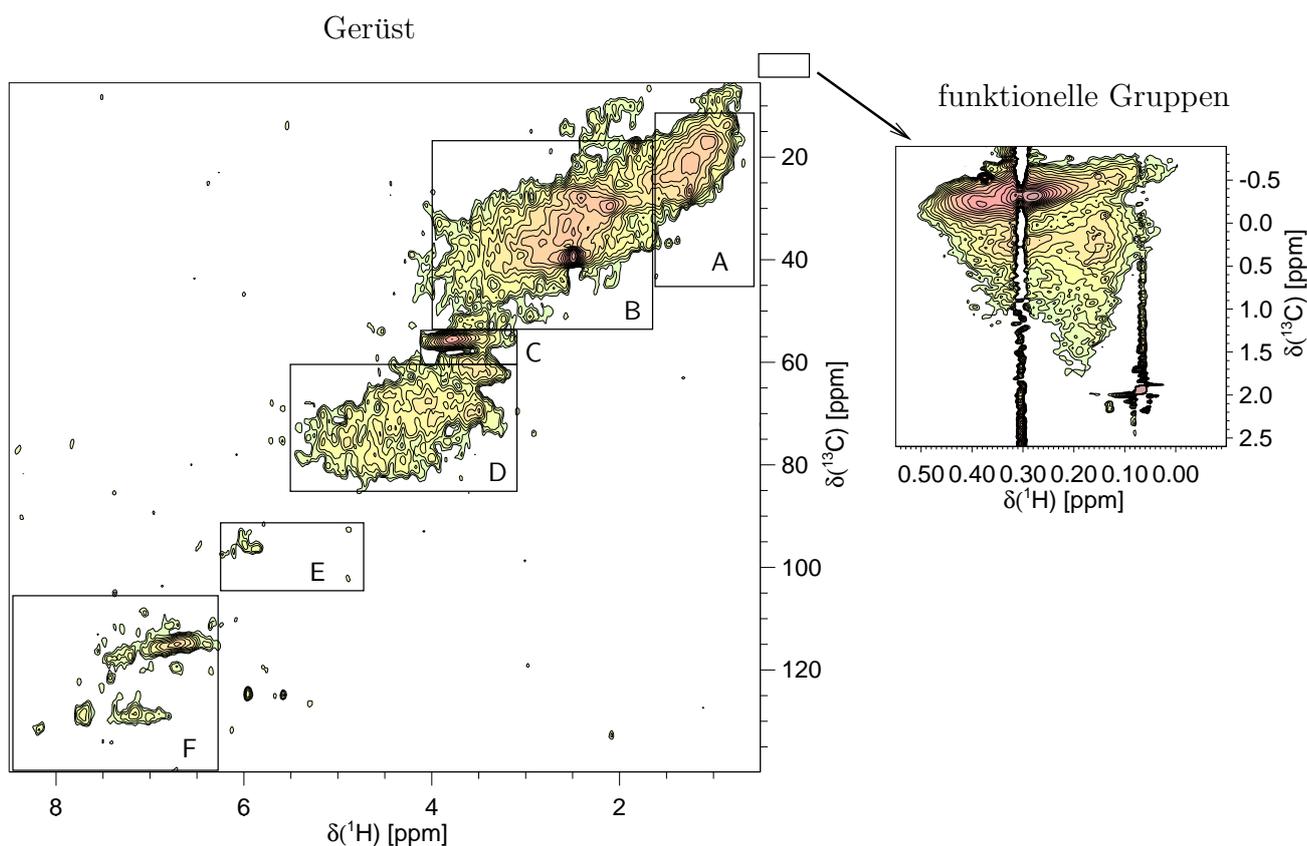
### Zusammenfassung der qualitativen Auswertung der 2D NMR-Spektren des Silylbereichs

1. Heteronuklear korrelierte  $^1J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ - und  $^2J(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektren ermöglichen eine Differenzierung vieler unterschiedlicher silylierter funktioneller Gruppen. Es können folgende Strukturelemente, die Hydroxylgruppen beinhalten, unterschieden werden: aromatische und aliphatische Carbonsäuren, Phenole, Kohlenhydrate, primäre Hydroxylgruppen von Alkylketten, Hydroxylgruppen in  $\alpha$ -Position zu Carboxyl-, Carbonyl- oder weiteren Hydroxylgruppen, Hydroxylgruppen von Cyclohexanol oder sekundären Alkylketten und tertiäre Hydroxylgruppen.
2. In den  $(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -NMR-Spektren sind erstmalig primäre, sekundäre und tertiäre aliphatische Hydroxylgruppen weitgehend voneinander unterscheidbar und liefern den Nachweis für die Existenz von tertiären Hydroxylgruppen.
3. Sowohl in  $(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ - als auch in  $(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektren sind erstmalig aliphatische von aromatischen silylierten Carboxylgruppen unterscheidbar. Dies gelingt nicht mit anderen analytischen Methoden. (Obwohl in [141] der Methylesterpeak einer methylierten FA im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum in zwei Einzelpeaks bei 51 und 52 ppm aufgetrennt ist und eine Differenzierung von aromatischen und aliphatischen Methylestern möglich erscheint, ist diese Auftrennung des Methylesterpeaks in keinem weiteren literaturbekannten  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum methylierter Substanzen vorhanden. In [187] wird für Methylester jeweils nur ein breites Signal bei 52 ppm gefunden. Somit bietet die 2D NMR-Spektroskopie silylierter Substanzen die einzige Möglichkeit, aromatische und aliphatische Carboxylfunktionen zu unterscheiden.)
4. Die Protonen der silylierten Funktionen  $\text{COOH}$ ,  $\text{C}_{ar}\text{OH}$  und  $\text{C}_{alk}\text{OH}$  sind unterscheidbar. Dies gelingt nicht mit den Titrationsverfahren, bei denen  $\text{C}_{alk}\text{OH}$  unberücksichtigt bleiben.
5. Tertiäre Hydroxylgruppen und Cyclohexanol-Strukturelemente in der Grundwasser-Fulvinsäure weisen auf cyclische Isoprenoid-Strukturen hin, wie sie in Huminstoff-ähnlichen Substanzen wie Erdöl und marinen Sedimenten vorkommen und in [129] für Grundwasser-Huminstoffe postuliert werden.

### Qualitative Auswertung der 2D NMR-Spektren des Bereichs der Gerüstprotonen

In Abb. 7.20 sind die Integrationsbereiche der Gerüstprotonen gekennzeichnet. A:  $\text{CH}_n$ , B:  $\alpha\text{-CH}_n$ , C:  $\text{CH}_3\text{-O}$ , D:  $\text{H-C-O}$ , E: Anomere, F:  $\text{C}_{ar}\text{-H}$ .

Abbildung 7.20: Übersicht über die verschiedenen Strukturbereiche von  $^1\text{J}(\text{}^1\text{H}, \text{}^{13}\text{C})$ -NMR-Spektren.



In den Abb. 7.21 und 7.22 sind die  $^1\text{J}(\text{}^1\text{H}, \text{}^{13}\text{C})$ -HSQC-Spektren, deren Differenzspektren und das Minimumspektrum des Gesamtbereichs der Substanzen abgebildet. Die Spektren können wie die Protonenspektren in Kap. 7.1 in die Bereiche  $\text{C}_{ar}\text{-H}$ ,  $\text{O-C-H}$ ,  $\alpha\text{-CH}_n$  und  $\text{CH}_n$  eingeteilt werden. Die Grundwasserfulvinsäure FG1FA und die Substanz SUWFA enthalten kaum aromatische Protonen und Methoxygruppen und nur wenig  $\text{O-C-H}$ , jedoch einen großen Anteil an  $\alpha\text{-CH}_n$  und  $\text{CH}_n$ . MPDOM ist die Substanz mit dem höchsten Gehalt an  $\text{O-C-H}$  Protonen, die Kohlenhydrat-Strukturelementen zuzuordnen sind. BS1FA und HO10FA enthalten einen geringen Anteil an Methoxygruppen. Die vergleichende Darstellungsweise in Tabelle 7.9 entspricht im wesentlichen den aus Protonenspektren erhaltenen Protonenverteilungen in Kapitel 7.1.

Das Minimumspektrum der  $(\text{}^1\text{H}, \text{}^{13}\text{C})$ -NMR-Spektren – die "strukturelle Grundform" des

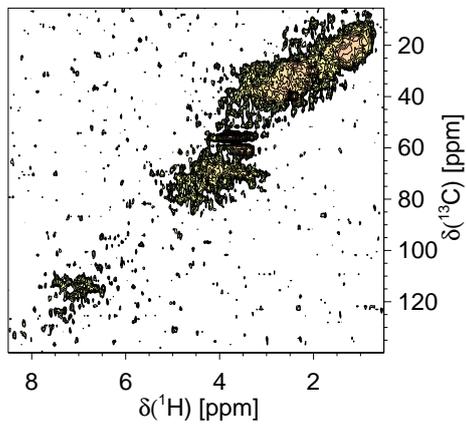
Huminstoffgerüstes – besteht aus  $\alpha$ -CH<sub>n</sub> und CH<sub>n</sub>-Protonen, sowie einem geringen Anteil an O-C-H Protonen.

Tabelle 7.9: Gerüststruktur aquatischer HS.

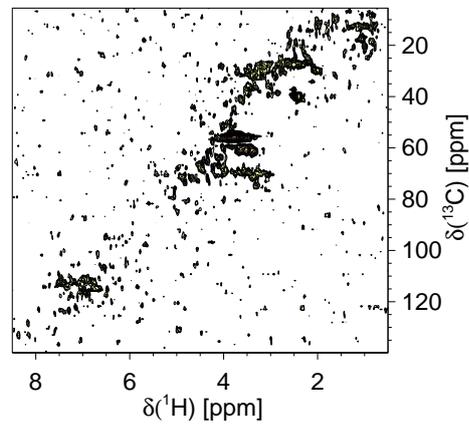
C <sub>ar</sub> -H	BS1FA ≈ HO10FA ≈ HO13FA > MPDOM > SUWFA > FG1FA
O-C-H	MPDOM > HO10FA ≈ HO13FA > BS1FA ≈ SUWFA ≫ FG1FA
C-O-CH <sub>3</sub>	BS1FA ≈ HO10FA ≈ HO13FA > MPDOM > SUWFA ≫ FG1FA
$\alpha$ -CH <sub>n</sub>	SUWFA > FG1FA > HO10FA ≈ HO13FA ≈ MPDOM > BS1FA
CH <sub>n</sub>	FG1FA ≫ SUWFA > BS1FA ≈ HO10FA ≈ HO13FA ≈ MPDOM

Abbildung 7.21: ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-NMR-Spektren, und deren Differenzspektren: Die "strukturelle Grund-Form" des Huminstoffgerüsts.

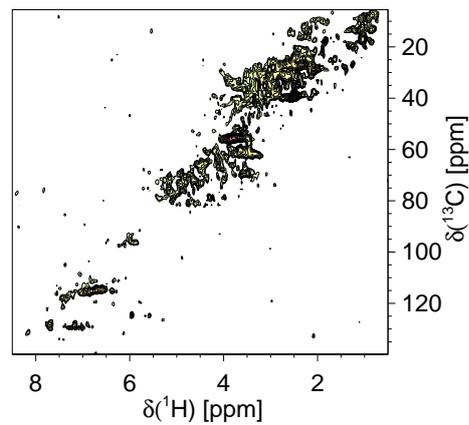
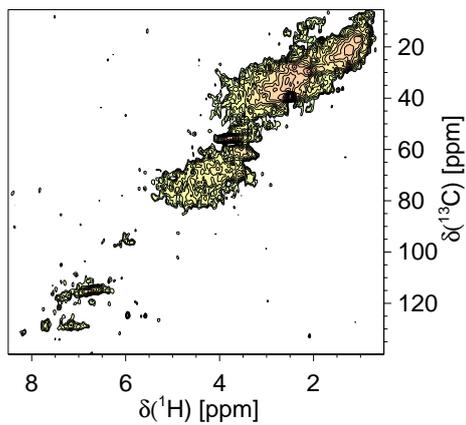
BS1FA



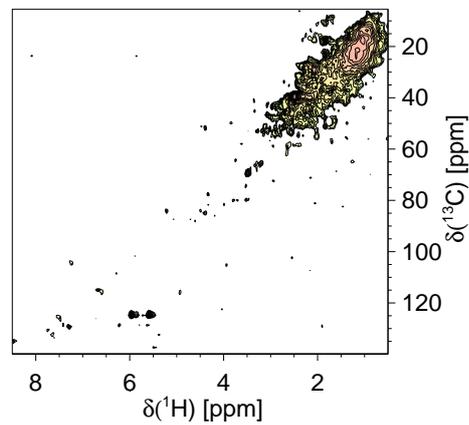
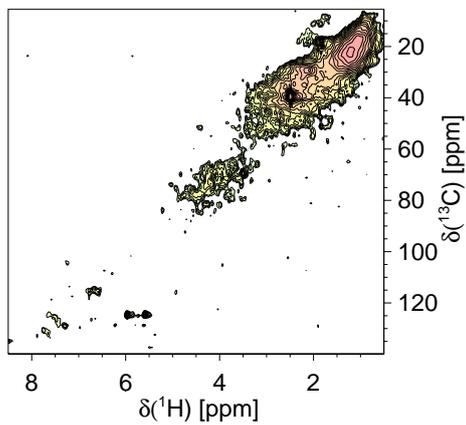
Differenzspektren



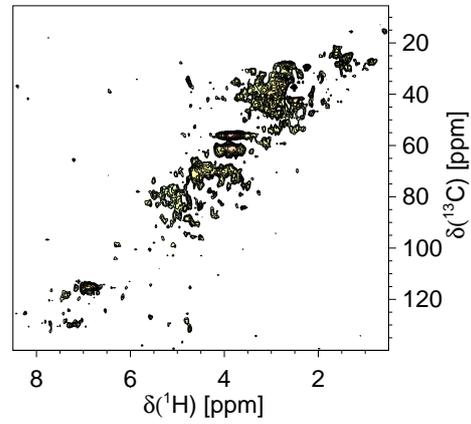
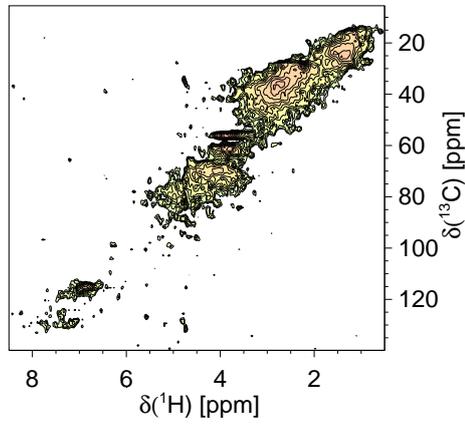
HO10FA



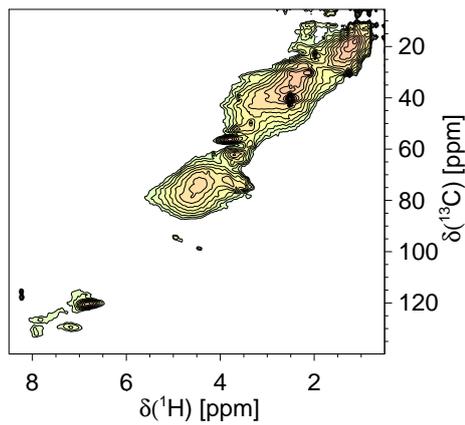
FG1FA



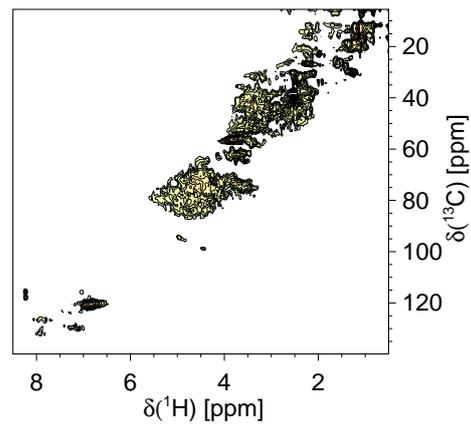
## HO13FA



## MPDOM



## Differenzspektren



## SUWFA

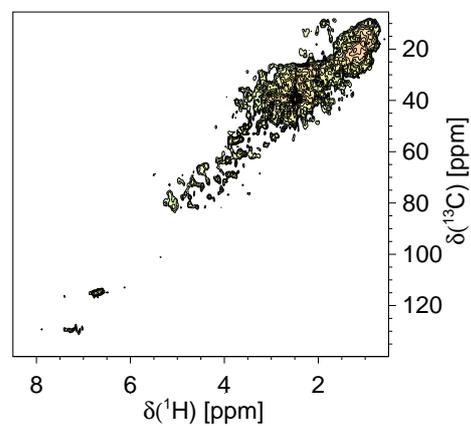
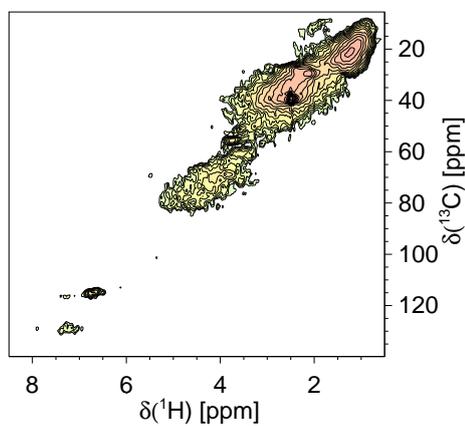
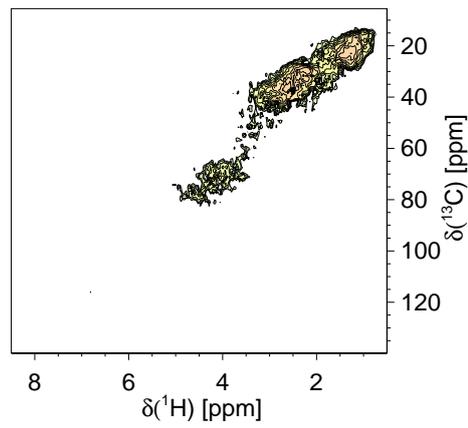


Abbildung 7.22: ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-NMR-Minimum-Spektrum: Die "strukturelle Grund-Form" des Huminstoffgerüstes.



### 7.4.3 Vergleich der Ergebnisse zweidimensionaler NMR-Verfahren mit eindimensionaler NMR-Spektroskopie und Daten anderer Methoden

#### Protonenkapazität mittels potentiometrischer Titration

Die Protonenkapazität mittels potentiometrischer Titration wurde von der Arbeitsgruppe Abbt-Braun, TH Karlsruhe bestimmt.

Tabelle 7.10: Protonenkapazität mittels potentiometrischer Titration. Funktionelle Gruppen in [ $\mu\text{mol} / \text{mg DOC}$ ].

Substanz	COOH	$C_{ar}\text{OH}$
BS1FA	11.1	5.5
HO10FA	11.1	4.9
FG1FA	10.0	1.4
HO13FA	9.3	3.9

In Tabelle 7.11 sind die Daten der potentiometrischen Titration den Ergebnissen der 2D-NMR-Spektroskopie gegenüber gestellt. Die Ergebnisse stimmen nur bezüglich der Einordnung von FG1FA in die  $C_{ar}\text{OH}$ -Reihe überein. Insbesondere die Menge carboxylicher und phenolischer Protonen von BS1FA wird in der 2D-NMR-Spektroskopie geringer als durch die potentiometrischen Titration eingeschätzt.

Tabelle 7.11: Vergleich der potentiometrischen Titration mit der 2D-NMR-Spektroskopie.

potentiometrische Titration	
COOH	BS1FA $\approx$ HO10FA > FG1FA > HO13FA
$C_{ar}\text{OH}$	BS1FA > HO10FA > HO13FA $\gg$ FG1FA
2D-NMR-Differenzspektren	
COOH (gesamt)	FG1FA > HO10FA $\approx$ HO13FA > BS1FA
$C_{ar}\text{COOH}$	HO13FA > BS1FA $\approx$ HO10FA > FG1FA
$C_{alk}\text{COOH}$	FG1FA > HO10FA $\approx$ HO13FA > BS1FA
$C_{ar}\text{OH}$	HO13FA > HO10FA > BS1FA $\gg$ FG1FA

### Protonenkapazität mittels BaOH/Ca-Acetat-Methode

Die Protonenkapazität mittels BaOH/Ca-Acetat-Methode wurde von der Arbeitsgruppe Zech, Universität Bayreuth bestimmt. Die Gesamtazidität wurde dabei mit der BaOH-Methode und die Carboxylgruppen mit der Ca-Acetat-Methode ermittelt. Die Anzahl der phenolischen Gruppen ergab sich aus der Differenzbildung.

Tabelle 7.12: Protonenkapazität mittels BaOH/Ca-Acetat-Methode. Funktionelle Gruppen in  $[\text{mmol mol}^{-1}]$ .

Substanz	COOH	$C_{ar}OH$
HO10FA	178	24
BS1FA	148	18

In Tabelle 7.13 sind die Daten der BaOH/Ca-Acetat-Methode den Ergebnissen der 2D-NMR-Spektroskopie gegenüber gestellt. Die Ergebnisse der beiden Methoden stimmen überein.

Tabelle 7.13: Vergleich der BaOH/Ca-Acetat-Methode mit der 2D-NMR-Spektroskopie.

BaOH/Ca-Acetat-Methode	
COOH	HO10FA > BS1FA
$C_{ar}OH$	HO10FA > BS1FA
2D-NMR-Differenzspektren	
COOH	HO10FA > BS1FA
$C_{ar}OH$	HO10FA > BS1FA



### Vergleich der Kohlenhydratanalyse mit der 2D-NMR-Spektroskopie

Ein direkter Vergleich der Anteile von hydrolysierbaren Kohlenhydraten [109] und den Kohlenhydratstrukturen, die NMR-spektroskopisch detektiert werden, ist nicht möglich, da hydrolysierbare Kohlenhydrate nur in einem geringen Ausmaß zu den registrierbaren Kohlenhydratstrukturen beitragen. Die Werte in Tabelle 7.14 lassen jedoch auf einen Zusammenhang zwischen gebundenen Kohlenhydraten und sämtlichen Kohlenhydratstrukturen schließen. FG1FA, das nur 0.2% gebundene Kohlenhydrate enthält, besitzt nur wenig Intensität im Bereich der Kohlenhydratstrukturen. HA enthalten nach beiden Messungen mehr Kohlenhydrate als FA.

Tabelle 7.14: Gehalte an hydrolysierbaren Kohlenhydraten. Kohlenhydrat-C am DOC in %.

Substanz	Anteil
BS1FA	1.5
FG1FA	0.2
HO10FA	0.4
BS1HA	2.0

### Vergleich der Ergebnisse von $^{13}\text{C}$ - und 2D-NMR-Spektroskopie

Die Integrale der 1D- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren (Arbeitsgruppe Lambert, ISAS Dortmund) sind in Tabelle 7.16 aufgelistet. Die in den  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren registrierten funktionellen Gruppen liegen in den  $\delta(^{13}\text{C})$  Bereichen anderer Strukturelemente. So sind beispielsweise Säuren nicht von Estern unterscheidbar, der Bereich der Phenole überlappt mit Arylthern, und Alkohole befinden sich in demselben Bereich wie Ether.

Vergleichbar sind die Integrale aliphatischer Ketten mit den Ergebnissen der  $^1\text{J}(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -NMR-Spektren der Gerüstprotonen (Tabelle 7.16).

Tabelle 7.15: Integrale [%] der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren.

Substanz	Car-bonyl	Car-boxyl	Aryl-O Aryl-N	Aryl-C Aryl-H	O- $C_{alk}$	Methoxy	$\text{CH}_n$
BS1FA	4	15	10	25	21	6	19
HO10FA	6	17	11	25	20	5	16
FG1FA	4	15	8	18	17	7	31
HO13FA	3	10	8	26	20	5	28
BS1HA	4	13	11	29	20	6	17
HO13HA	4	10	9	29	21	5	22

Tabelle 7.16: Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie mit der 2D-NMR-Spektroskopie.

$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie	
$\text{CH}_n$	FG1FA > HO13FA > BS1FA > HO10HA
$^1\text{J}(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -NMR-Differenzspektren	
$\text{CH}_n$	FG1FA $\gg$ BS1FA $\approx$ HO10FA $\approx$ HO13FA

### Vergleich der Ergebnisse von $^{29}\text{Si}$ - und $^2\text{J}(\text{}^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektroskopie

In Tabelle 7.17 sind die Ergebnisse der  $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektroskopie und der  $^2\text{J}(\text{}^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektroskopie gegenübergestellt.

Tabelle 7.17: Vergleich der  $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektroskopie mit der  $^2\text{J}(\text{}^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektroskopie.

$^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektroskopie	
COOH	HO10FA > BS1FA > HO13FA $\approx$ BS1HA > FG1FA > HO13HA
$C_{ar}$ OH + $\alpha$ - $C_{alk}$ -OH	BS1HA $\approx$ HO13HA > HO13FA > HO10FA $\approx$ FG1FA > BS1FA
Kohlenhydrate	HO13HA > FG1FA $\approx$ BS1HA $\approx$ HO13FA > BS1FA > HO10FA
Cyclohexan-OH + sekundäre Alkylketten-OH + tertiäre-OH	FG1FA > HO13FA $\approx$ HO13HA > BS1FA $\approx$ BS1HA > HO10FA
$^2\text{J}(\text{}^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -NMR-Differenzspektren	
COOH	FG1FA > HO10FA $\approx$ HO13FA > BS1FA BS1HA $\approx$ HO13HA
$C_{ar}$ OH + $\alpha$ - $C_{alk}$ -OH	BS1FA $\approx$ HO10FA $\approx$ HO13FA > FG1FA HO13HA > BS1HA
Kohlenhydrate	BS1FA > HO10FA $\approx$ HO13FA $\gg$ FG1FA HO13HA > BS1HA
Cyclohexan-OH + sekundäre Alkylketten-OH + tertiäre-OH	FG1FA > BS1FA $\approx$ HO10FA $\approx$ HO13FA

Die durch ein- und zweidimensionalen Techniken erhaltenen Ergebnisse lassen sich nur bedingt miteinander vergleichen. Der Grund für die schlechte Übereinstimmung liegt i. w. in der unterschiedlichen Normierung. So wird das Gesamtintegral jedes  $^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektrums unabhängig vom Anteil azider Protonen der Substanz gleich 100 % gesetzt. Das Referenzintegral der 2D-NMR-Spektren ( $\delta(\text{}^1\text{H})$ : 0.45 - 0.35 ppm;  $\delta(^{29}\text{Si})$ : 29.0 - 24 ppm) berücksichtigt nicht die durch  $t_1$ -Rauschen gestörten Bereiche. Die Integrale der Protonenspektren beziehen sich auf die Gesamtzahl der HS-Protonen. Eine sorgfältige Beschreibung und Beurteilung aller Meß- und Prozessierungsparameter ist daher zur Charakterisierung von HS von besonderer Bedeutung. Die Ergebnisse können grundsätzlich nur im Zusammenhang mit sämtlichen Randbedingungen beurteilt werden.

### Vergleich der Ergebnisse von Protonen- und $^2J(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektroskopie der aziden Protonen

Tabelle 7.18: Vergleich der Ergebnisse von Protonen- und  $^2J(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektroskopie.

$^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie	
COOH	BS1FA $\approx$ HO13FA > HO10FA > FG1FA $\approx$ BS1HA $\approx$ HO13HA
$C_{ar}$ -OH	HO10FA > BS1FA > HO13FA > BS1HA > HO13HA > FG1FA
$C_{alk}$ -OH	FG1FA > HO10FA > BS1HA > BS1FA > HO13FA > HO13HA
$^1J(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -NMR-Differenzspektren	
COOH	FG1FA > HO10FA $\approx$ HO13FA > BS1FA BS1HA $\approx$ HO13HA
$C_{ar}$ -OH	HO13FA > HO10FA > BS1FA $\gg$ FG1FA HO13HA > BS1HA
$C_{alk}$ -OH	BS1FA > HO10FA $\approx$ HO13FA $\gg$ FG1FA BS1HA $\approx$ HO13HA

### Vergleich der Ergebnisse von Protonen- und $^1J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -NMR-Spektroskopie der Gerüstprotonen

Tabelle 7.19: Vergleich der Ergebnisse von Protonen- und  $^1J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -NMR-Spektroskopie.

$^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie	
$C_{ar}$ -H	HO13FA > BS1FA > HO10FA > FG1FA
H-C-O	BS1FA > HO13FA > HO10FA > FG1FA
$\alpha$ -CH <sub>n</sub>	FG1FA > HO13FA > BS1FA > HO10FA
CH <sub>n</sub>	FG1FA > HO13FA > BS1FA $\approx$ HO10FA
$^1J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -NMR-Differenzspektren	
$C_{ar}$ -H	BS1FA $\approx$ HO10FA $\approx$ HO13FA > FG1FA
H-C-O	HO10FA $\approx$ HO13FA > BS1FA > $\gg$ FG1FA
$\alpha$ -CH <sub>n</sub>	FG1FA > HO10FA $\approx$ HO13FA > BS1FA
CH <sub>n</sub>	FG1FA $\gg$ BS1FA $\approx$ HO10FA $\approx$ HO13FA

#### 7.4.4 Integration von ${}^2J({}^1\text{H}, {}^{29}\text{Si})$ - und ${}^1J({}^1\text{H}, {}^{13}\text{C})$ -NMR-Spektren

Die Integrale der 2D-NMR-Spektren wurden mit dem Programm "xwinnmr" (Firma Bruker) berechnet. Es wurden die in Tabelle C.8 aufgelisteten Bereiche verwendet. Aus den Verhältnissen  $C_{ar}\text{-COOH} : C_{alk}\text{-OH}$  (BSTFA) und  $C_{ar}\text{-COOH} : C_{alk}\text{-COOH} : C_{ar}\text{-OH}$  (BSA) der ( ${}^1\text{H}, {}^{29}\text{Si}$ )-NMR-Spektren wurden die Anteile der funktionellen Gruppen an der Gesamtzahl silylierter Funktionen ermittelt.

Schwierigkeiten bei der Integration von 2D-NMR-Spektren ( $t_1$ -Rauschen, Sternartefakte, Schräglage der Basisebene, geringes S/N-Verhältnis in Bereichen geringer Intensität) lassen keine absolute Einteilung der silylierten funktionellen Gruppen zu. Die Angaben in Tabelle 7.20 sind äußerst kritisch zu betrachten. Das Verhältnis von  $C_{alk}\text{-OH}$  zu  $C_{ar}\text{-COOH}$  ist beispielsweise in den ( ${}^1\text{H}, {}^{13}\text{C}$ )-NMR-Spektren etwa doppelt so groß als das der ( ${}^1\text{H}, {}^{29}\text{Si}$ )-NMR-Spektren. Die Ergebnisse sind daher nur im Rahmen von Vergleichen zu verwenden und interpretieren. Die Werte dürfen daher nicht direkt mit den Ergebnissen anderer Methoden verglichen werden. Die Angabe von nach funktionellen Gruppen sortierten Reihenfolgen scheint sinnvoll. In Tabelle 7.20 sind diese abfallenden Reihen mit den Reihenfolgen, die mit anderen Verfahren erhalten worden sind, gegenübergestellt.

Die Ergebnisse stimmen nur teilweise überein. Fehlerhaft ist beispielsweise die Einordnung von FG1FA in die durch Integration bestimmte  $C_{ar}\text{-OH}$  Reihe: Sowohl die potentiometrische Titration die BaOH/Ca-Acetat-Methode als auch die Protonen- und 2D-NMR-Differenzspektren belegen einen besonders geringen Anteil an phenolischen Funktionen.

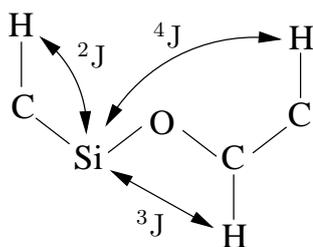
Tabelle 7.20: Vergleich der Integrale von ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie.

$^2J(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektroskopie (Integration)	
$C_{ar, alk}$ -COOH	FG1FA > HO13FA > HO10FA > BS1FA > BS1HA > HO13HA
$C_{ar}$ -COOH	BS1HA > BS1FA $\approx$ HO13FA > HO13HA > HO10FA > FG1FA
$C_{alk}$ -COOH	FG1FA > HO10FA > HO13FA > BS1FA > HO13HA > BS1HA
$C_{ar}$ -OH	HO13HA > HO10FA $\approx$ HO13FA > FG1FA $\approx$ BS1HA > BS1FA
$C_{alk}$ -OH	BS1HA > HO13HA > BS1FA > HO10FA > HO13FA $\gg$ FG1FA
$^2J(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektroskopie (Differenzbildung)	
$C_{ar}$ -COOH	HO13FA > BS1FA $\approx$ HO10FA > FG1FA HO13HA > BS1HA
$C_{alk}$ -COOH	FG1FA > HO10FA $\approx$ HO13FA > BS1FA BS1HA > HO13HA
$C_{ar}$ -OH	HO13FA > HO10FA > BS1FA $\gg$ FG1FA HO13HA > BS1HA
$C_{alk}$ -OH	BS1FA > HO10FA $\approx$ HO13FA $\gg$ FG1FA BS1HA $\approx$ HO13HA
$^{29}\text{Si}$ -NMR-Spektroskopie	
$C_{ar}$ -COOH	HO10FA > BS1FA > BS1HA $\approx$ HO13FA > FG1FA > HO13HA
$C_{ar, alk}$ -OH	HO13HA > FG1FA > HO13FA $\approx$ BS1HA > BS1FA > HO10FA
$^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie	
COOH	BS1FA $\approx$ HO13FA > HO10FA > FG1FA $\approx$ BS1HA $\approx$ HO13HA
$C_{ar}$ -OH	HO10FA > BS1FA > HO13FA > BS1HA > HO13HA > FG1FA
$C_{alk}$ -OH	FG1FA > HO10FA > BS1HA > BS1FA > HO13FA > HO13HA

## 7.5 Weitbereichskopplungsexperimente: Zuordnung von silylierten aliphatischen Hydroxyfunktionen zu dem Huminstoffgerüst

Korrelationen von  $^{29}\text{Si}$ -Kernen zu Protonen sind in Trimethylsilyl-substituierten Substanzen über 2, 3, 4 und 5 Bindungen möglich. Je nach funktioneller Gruppe sind für Kopplungen zu Gerüstprotonen mindestens 3 (aliphatische Silylether), 4 (aromatische Silylether und aliphatische Silylester) oder 5 (aromatische Silylester) Bindungen beteiligt. Je größer die Anzahl der Bindungen zwischen den koppelnden Kernen ist, desto länger ist die Pulsfolge und somit der Einfluß der Relaxation auf das S/N-Verhältnis. Daher werden eher Signale von silylierten Alkoholen als Signale von Phenolen oder Carbonsäuren beobachtet.

Abbildung 7.23: Kopplungen des  $^{29}\text{Si}$ -Kerns mit Gerüstprotonen.



	aliphatisch	aromatisch
C-OH	$^3\text{J}$	$^4\text{J}$
COOH	$^4\text{J}$	$^5\text{J}$

Wie eine Zuordnung der 2D NMR-Spektren des Silylbereichs<sup>2</sup> über das  $^3\text{J}(\text{H},^{29}\text{Si})$ -Weitbereichsexperiment möglich ist, veranschaulicht die Zuordnungslinie anhand der NMR-Spektren der silylierten Saccharose in Abb. 7.24, die die Signale in unterschiedlichen Spektren miteinander verbindet.

Im Gegensatz zu den Verschiebungsbereichskarten der  $^1\text{J}(\text{H},^{13}\text{C})$ - und  $^2\text{J}(\text{H},^{29}\text{Si})$ -NMR-Modellsubstanzspektren des Silylbereichs (Ausschnitte aus den Abb. 7.6 und 7.7) wurden die  $\delta(\text{H})$ - und  $\delta(^{13}\text{C})$ -Werte der Gerüstprotonen und  $^{13}\text{C}$ -Kerne, die über Sauerstoff mit TMS-Gruppen verknüpft sind, mit einem kommerziellen Programm (Firma: ACD-Lab) berechnet und daraus die entsprechenden Verschiebungsbereichskarten ( $^1\text{J}(\text{H},^{13}\text{C})$ -Karte der Gerüstprotonen und  $^3\text{J}(\text{H},^{29}\text{Si})$ -Karte) erstellt. Die berechneten chemischen Verschiebungen enthält Anhang B. Die Kreuzsignale des  $^3\text{J}(\text{H},^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektrums wurden durch die errechneten  $\delta(\text{H})$ -Werte und die gemessenen  $\delta(^{29}\text{Si})$ -Werte bestimmt. Für Moleküle mit mehreren Hydroxyfunktionen konnten die Werte nicht einander zugeordnet werden und wurden daher im  $^3\text{J}(\text{H},^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektrum nicht berücksichtigt. Die Kartierung der Modellsubstanzwerte ermöglicht wie auch bei den 2D NMR-Spektren, die den Silylbereich

<sup>2</sup>  $^1\text{J}(\text{H},^{13}\text{C})$  und  $^2\text{J}(\text{H},^{29}\text{Si})$ -Spektren mit dem  $^1\text{J}(\text{H},^{13}\text{C})$ -Spektrum der Gerüstprotonen.

beschreiben, die Zuordnung der Huminstoff- $^1\text{J}(\text{}^1\text{H}, \text{}^{13}\text{C})$ -NMR-Spektren zu Partialstrukturen, denn auch bei diesen beiden Spektrentypen fallen die Kreuzsignale unterschiedlicher funktioneller Einheiten in getrennte Verschiebungsbereiche. Abb. 7.25 zeigt die 2D-NMR-Spektren, in denen die Bereiche ähnlicher Strukturelemente umrandet sind.

Auf den folgenden Seiten sind die korrespondierenden 2D-NMR-Spektren einiger aquatischer organischer Substanzen gegenübergestellt. Von den Huminsäuren konnten keine  $^3\text{J}(\text{}^1\text{H}, \text{}^{29}\text{Si})$ -Weitbereichskopplungsspektren erhalten werden. Für den starken Intensitätsverlust sind die Relaxationseigenschaften der HA verantwortlich. Aufgrund der schnellen Relaxation der HS-Protonen können nur wenig Inkremente für die  $^3\text{J}(\text{}^1\text{H}, \text{}^{29}\text{Si})$ -NMR-Experimente aufgenommen werden, da bereits nach wenigen Inkrementen keine HS-Signale mehr registriert werden können. Die Auflösung ist entsprechend schlecht. Für den  $F_1$ -Bereich von 28 ppm wurden nur maximal 80 Inkremente aufgenommen.

Die  $^3\text{J}(\text{}^1\text{H}, \text{}^{29}\text{Si})$ -Weitbereichskopplungsexperimente der silylierten HS weisen keine Signale im Bereich der primären Hydroxylgruppen ( $\delta(\text{}^1\text{H}) = 3.7 - 3.3$  ppm,  $\delta(\text{}^{29}\text{Si}) = 18.5 - 16.0$  ppm) auf. Wie bereits anhand der  $^3\text{J}(\text{}^1\text{H}, \text{}^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektren der Saccharose und des 1,2-Propandiol (s. Abb. 6.11) erläutert, resultiert aus den  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Kopplungen eine Signalauslöschung. Der Grund dafür, daß keine Resonanzen von Silylethern der sekundären Kohlenhydrat-Strukturen vorhanden sind ( $\delta(\text{}^1\text{H}) = 4.3 - 3.7$  ppm,  $\delta(\text{}^{29}\text{Si}) = 18.5 - 16.0$  ppm), liegt, wie durch die LC-NMR-Technik in Kapitel 7.7 gezeigt wird, in der größeren Molekülgröße der Fraktion, die die Kohlenhydratebestandteile enthalten. Größere Moleküle relaxieren schneller und werden daher im Weitbereichskopplungsexperiment nicht registriert. In den  $^3\text{J}(\text{}^1\text{H}, \text{}^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektren dominieren die Resonanzen von Silylethern in  $\alpha$ -Position zu Carboxyl-, Carbonyl- oder Hydroxylgruppen. Die Intensität dieser Strukturelemente ist bei der Grundwasserfulvinsäure offensichtlich besonders groß. Die LC-NMR-Spektren zeigen, daß die Molekülgröße von FG1FA kleiner ist als die der anderen Substanzen. Damit verbunden sind günstige Relaxationseigenschaften. Zum andern belegen die Ergebnisse der Protonenspektren in Kapitel 7.1, daß der Gehalt an  $\alpha\text{-CH}_n$  Protonen der Substanz FG1FA und SUWFA besonders hoch ist. Beide Aspekte tragen zu den hohen Signal-Rausch-Verhältnissen des  $^3\text{J}(\text{}^1\text{H}, \text{}^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektrums von FG1FA bei.

Zur Identifizierung von Partialstrukturen, die bevorzugt in HS vorkommen und durch scharfe, definierte Signale gekennzeichnet sein sollten, wurden die 2D-NMR-Spektren der Silylprotonen zusätzlich mit 512 Inkrementen prozessiert (Abb. 7.27, 7.29, 7.31, 7.33, 7.35). Die Spektren zeigen definierte Signale im Bereich des "Signalgrates". Scharfe Signale, die sich neben dem "Signalgrat" befinden<sup>3</sup>, können bei diesem Verfahren nicht beobachtet werden. Die abgebildeten Peaks befinden sich in den Bereichen der Maxima der Spektren, die mit 128 Inkrementen prozessiert worden sind. Die Peaks der  $^2\text{J}(\text{}^1\text{H}, \text{}^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektren befin-

---

<sup>3</sup>bzw. weiter unten



den sich im Bereich der sekundären Silylether und  $\alpha$ -substituierten Silylether. Die Peaks primärer Silylether sind nicht vorhanden.

In den  $^1J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -NMR-Spektren sind bei  $\delta(^1\text{H}) = 0.15$  ppm und  $\delta(^{13}\text{C}) = -0.3 - -0.6$  ppm "imaginäre" Peaks in einem nicht-identifizierten Bereich vorhanden, die aus der Überlagerung der Signalfüße von aliphatischen Silylestern und primären Silylethern resultieren. Da die Intensitäten der  $^1J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -NMR-Spektren zu größeren  $\delta(^{13}\text{C})$  hin abfallen, werden Peaks von Kohlenhydratstrukturen nicht abgebildet.

Auffallend sind die Spektren der Grundwasserfulvinsäure, die relativ homogen erscheinen. Selbst in den Spektren mit erhöhter Auflösung werden keine scharfe Peaks beobachtet.

Abbildung 7.24: Übersicht über die Verschiebungsbereiche und Korrelation der einzelnen NMR-Spektren von Saccharose.

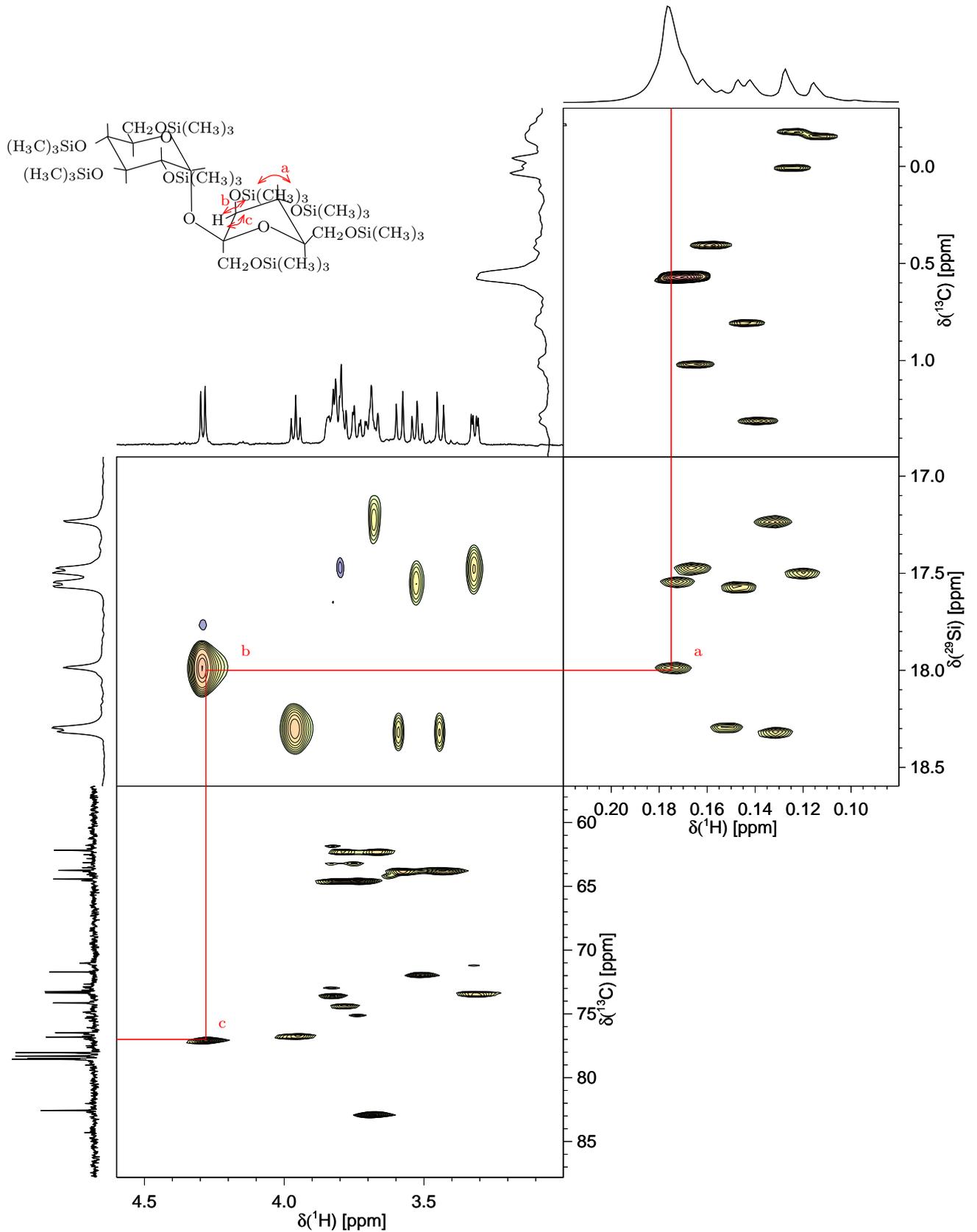


Abbildung 7.25: Übersicht über die Verschiebungsbereiche und Korrelation von 2D NMR-Spektren.

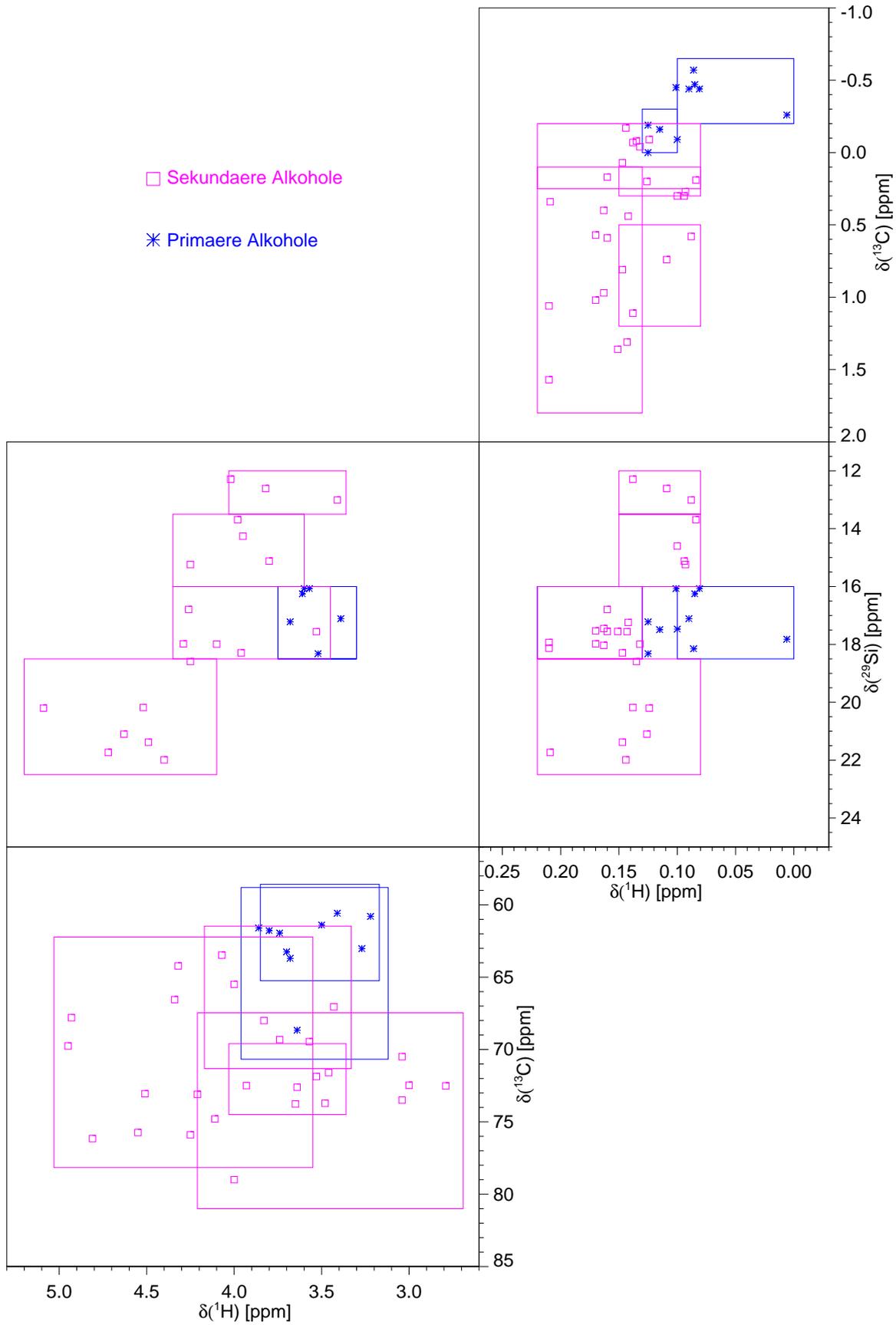


Abbildung 7.26: Übersicht über die Verschiebungsbereiche und Korrelation der einzelnen NMR-Spektren von BS1FA. Anzahl der Inkremente des  $^1J(^1\text{H},^{13}\text{C})$ - und  $^2J(^1\text{H},^{29}\text{Si})$ -Spektrums der funktionellen Gruppen: 128.

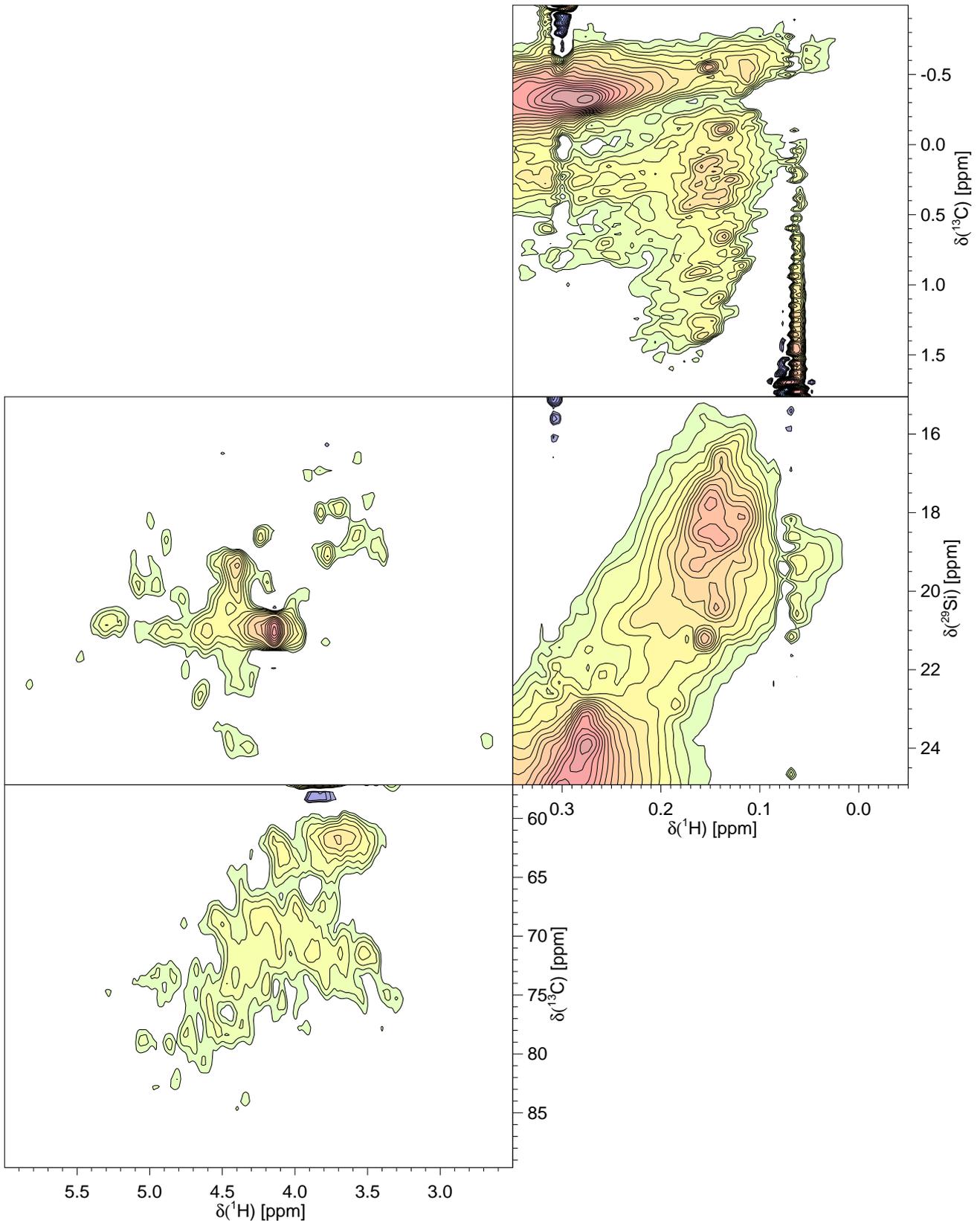


Abbildung 7.27: Übersicht über die Verschiebungsbereiche und Korrelation der einzelnen NMR-Spektren von BS1FA. Anzahl der Inkremente des  $^1J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ - und  $^2J(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -Spektrums der funktionellen Gruppen: 512.

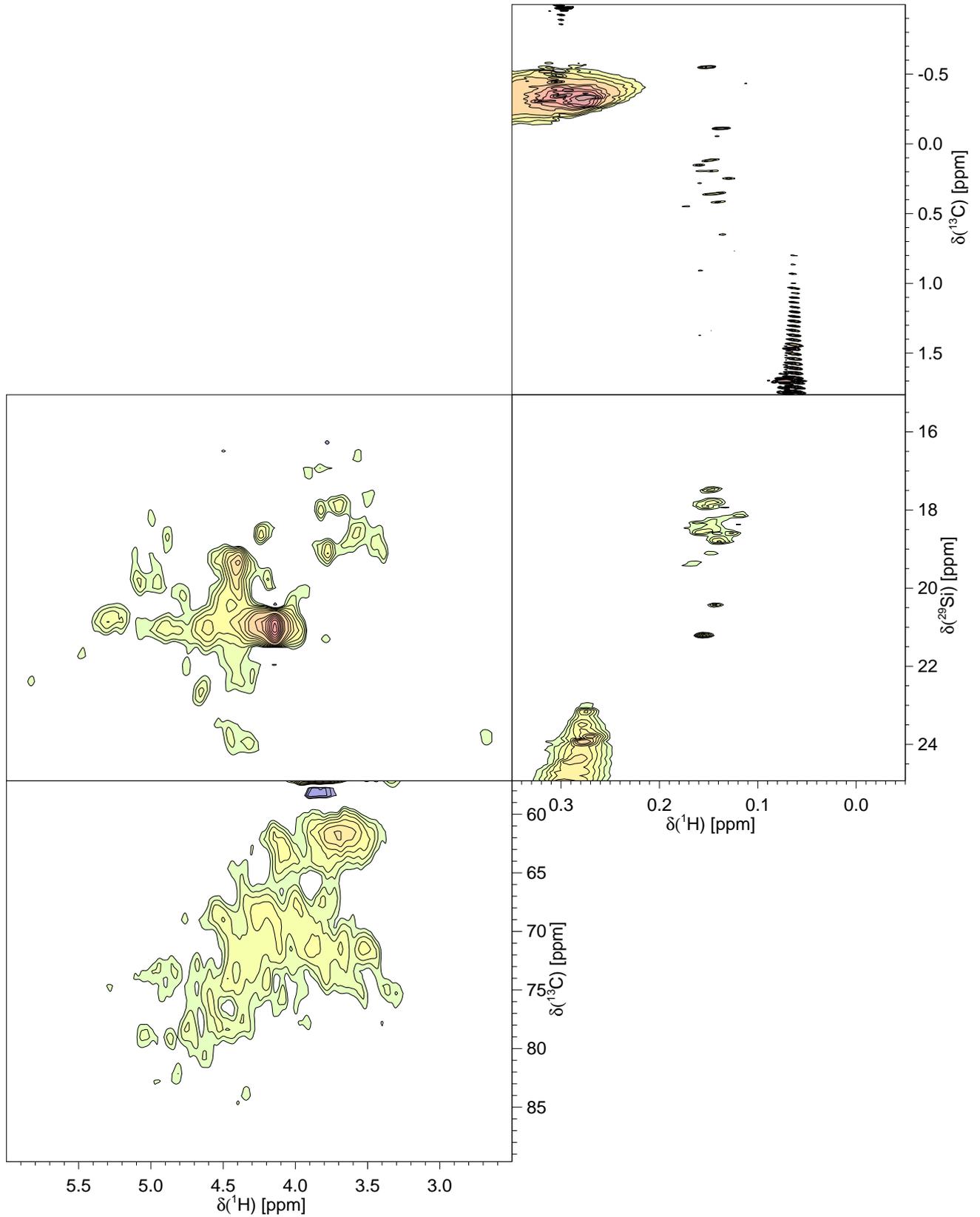


Abbildung 7.28: Übersicht über die Verschiebungsbereiche und Korrelation der einzelnen NMR-Spektren von HO10FA. Anzahl der Inkremente des  $^1J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ - und  $^2J(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -Spektrums der funktionellen Gruppen: 128

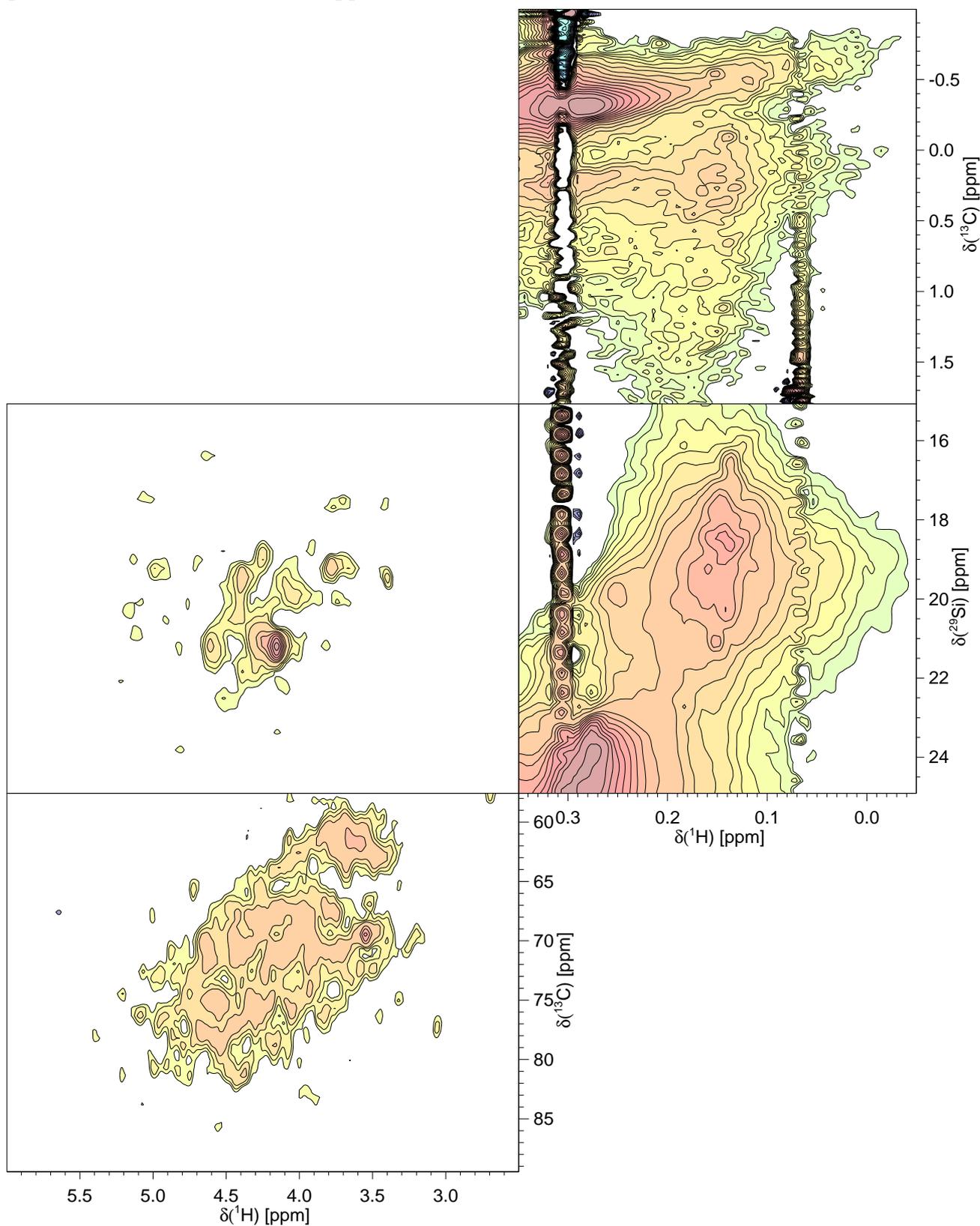


Abbildung 7.29: Übersicht über die Verschiebungsbereiche und Korrelation der einzelnen NMR-Spektren von HO10FA. Anzahl der Inkremente des  $^1J(^1\text{H},^{13}\text{C})$ - und  $^2J(^1\text{H},^{29}\text{Si})$ -Spektrums der funktionellen Gruppen: 512.

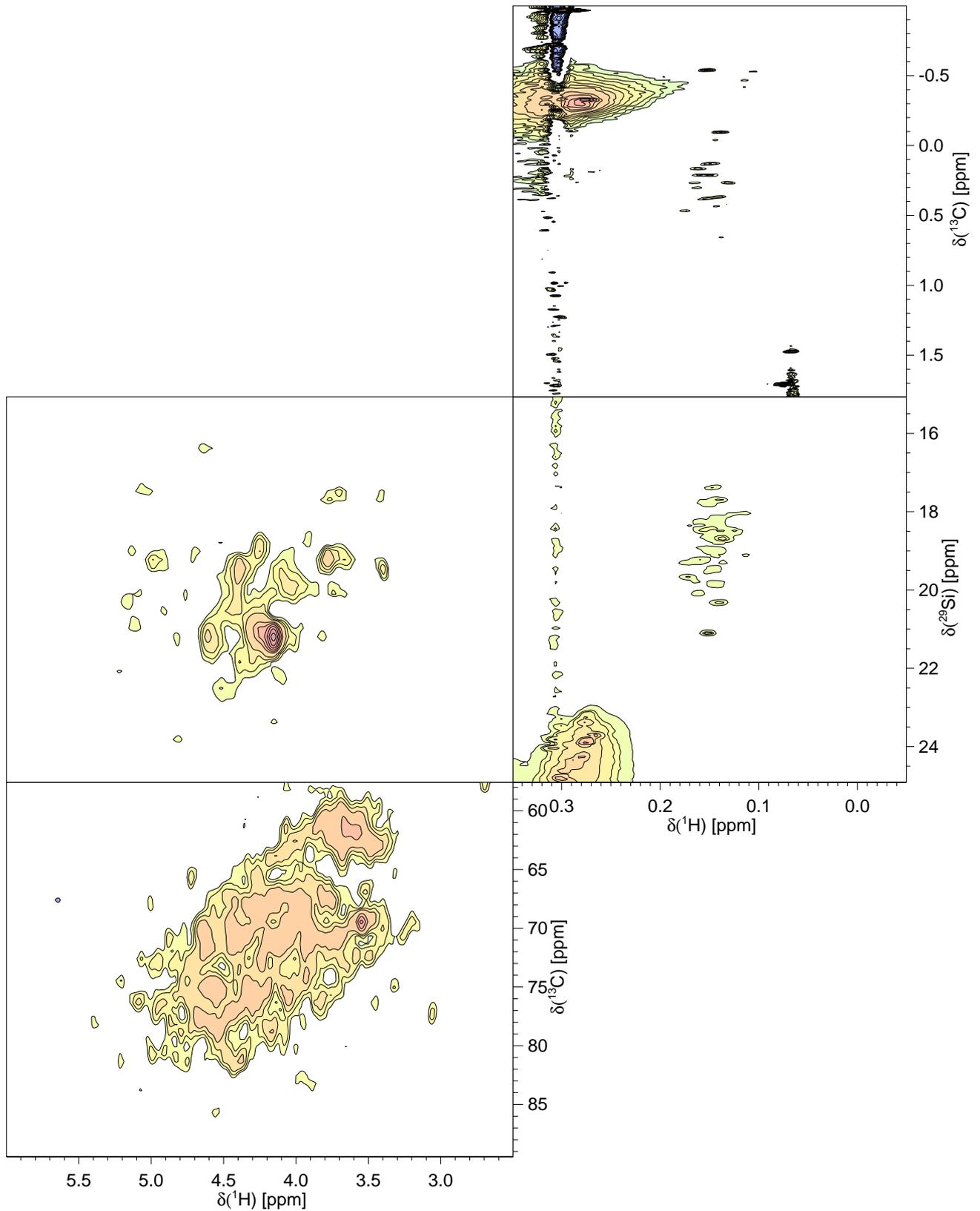


Abbildung 7.30: Übersicht über die Verschiebungsbereiche und Korrelation der einzelnen NMR-Spektren von FG1FA. Anzahl der Inkremente des  $^1J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ - und  $^2J(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -Spektrums der funktionellen Gruppen: 128

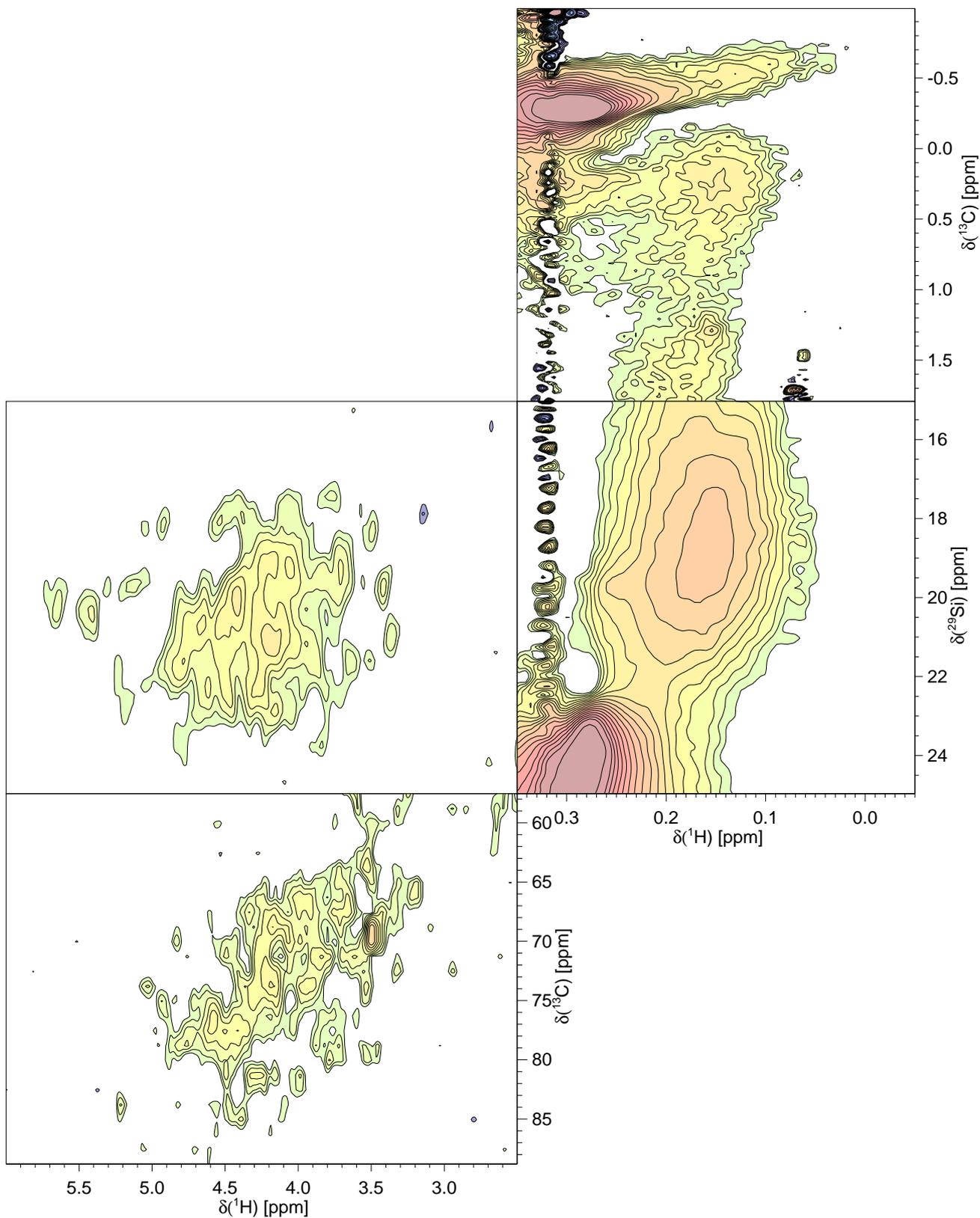




Abbildung 7.31: Übersicht über die Verschiebungsbereiche und Korrelation der einzelnen NMR-Spektren von FG1FA. Anzahl der Inkremente des  $^1J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ - und  $^2J(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -Spektrums der funktionellen Gruppen: 512.

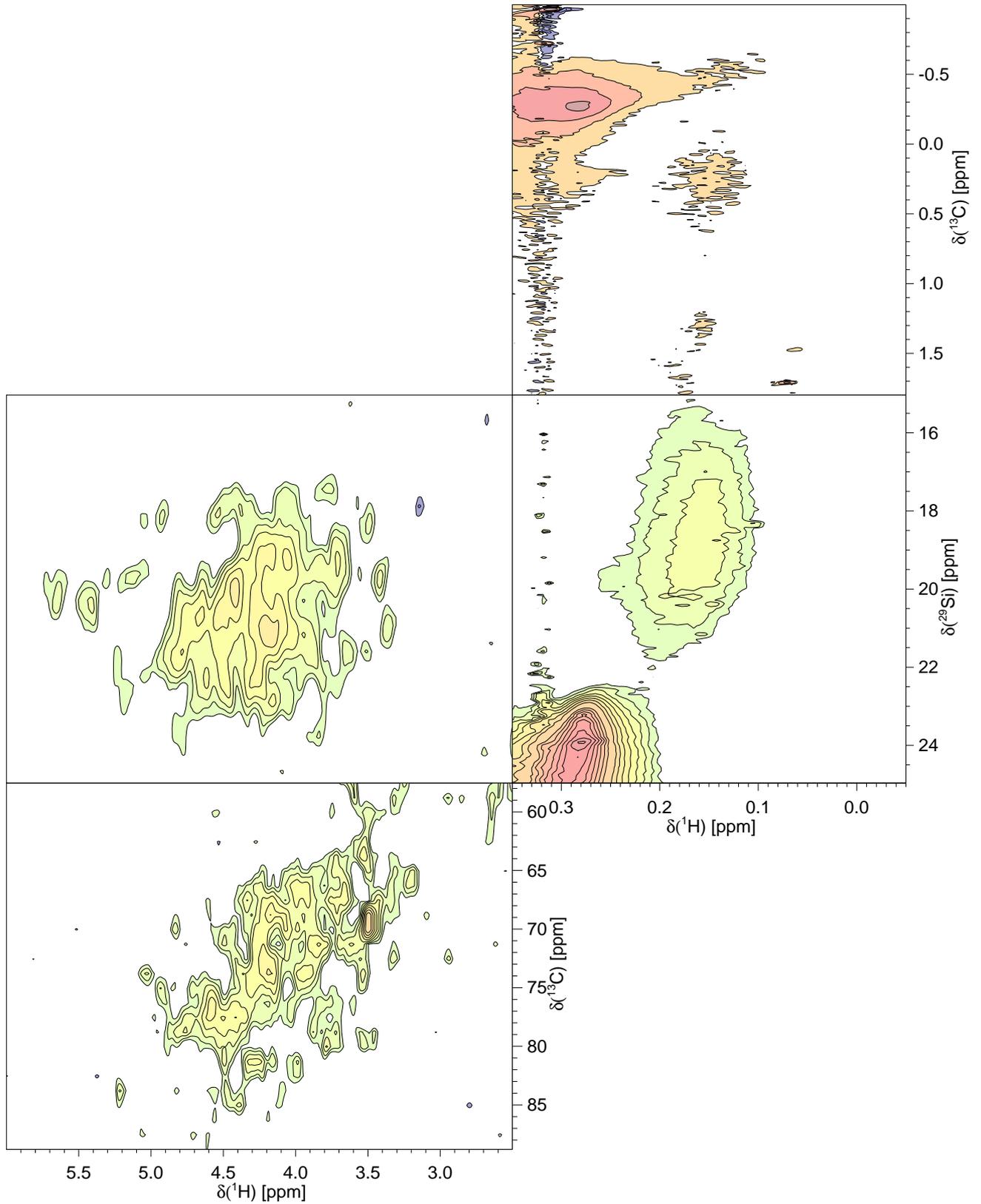


Abbildung 7.32: Übersicht über die Verschiebungsbereiche und Korrelation der einzelnen NMR-Spektren von MPDOM. Anzahl der Inkremente des  $^1J(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ - und  $^2J(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -Spektrums der funktionellen Gruppen: 128

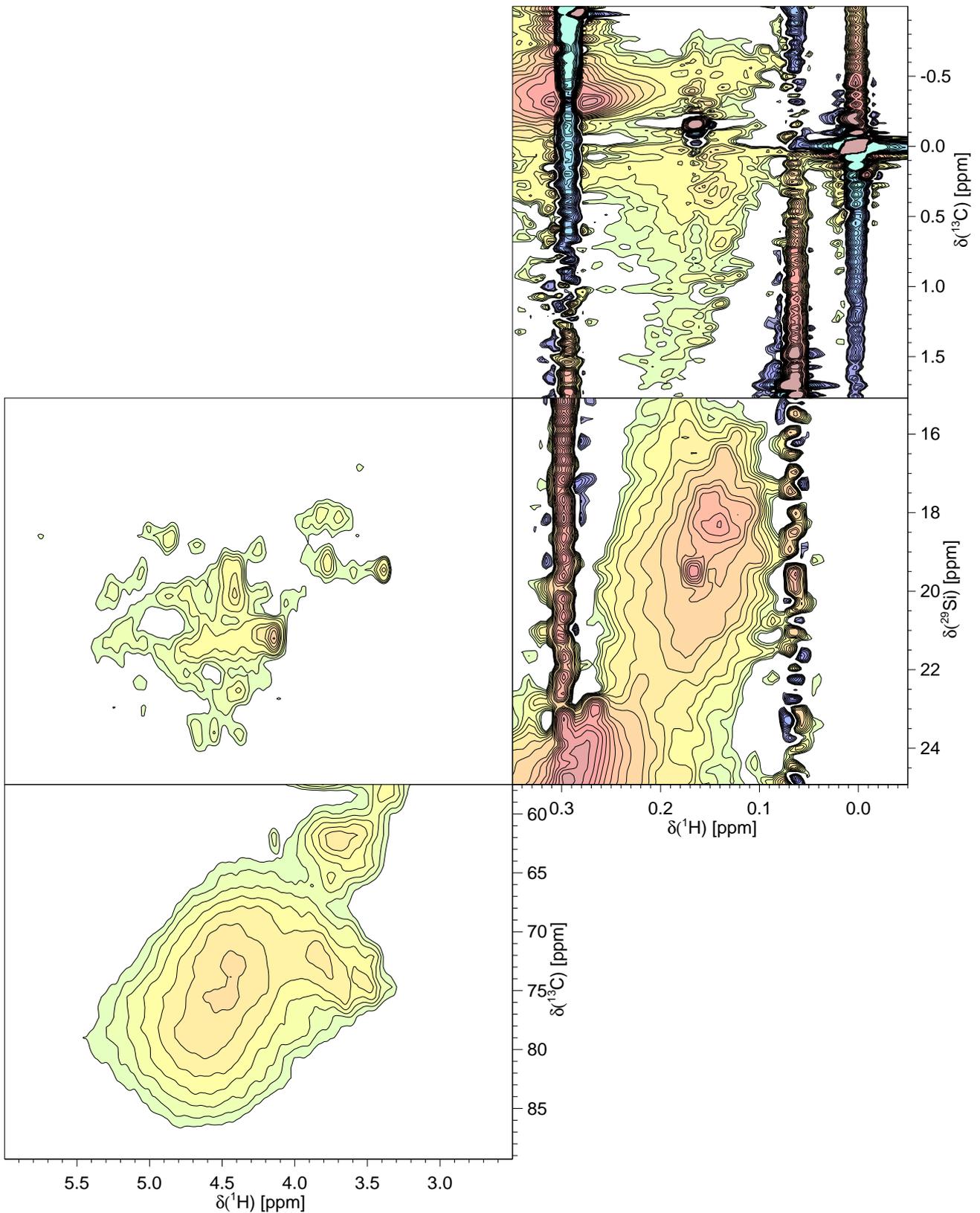


Abbildung 7.33: Übersicht über die Verschiebungsbereiche und Korrelation der einzelnen NMR-Spektren von MPDOM. Anzahl der Inkremente des  $^1\text{J}(\text{H},^{13}\text{C})$ - und  $^2\text{J}(\text{H},^{29}\text{Si})$ -Spektrums der funktionellen Gruppen: 512.

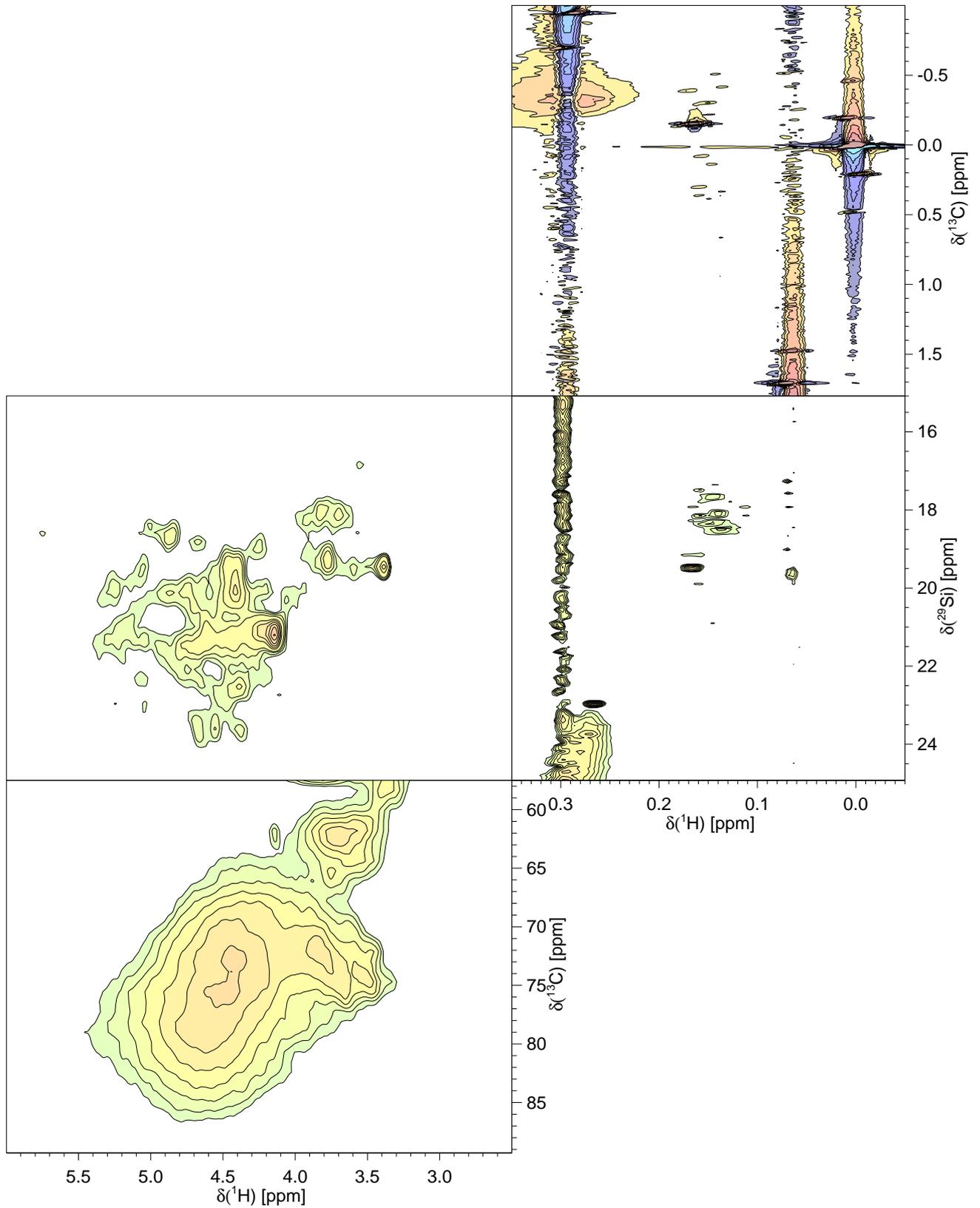


Abbildung 7.34: Übersicht über die Verschiebungsbereiche und Korrelation der einzelnen NMR-Spektren von SUWFA. Anzahl der Inkremente des  $^1J(^1\text{H},^{13}\text{C})$ - und  $^2J(^1\text{H},^{29}\text{Si})$ -Spektrums der funktionellen Gruppen: 128

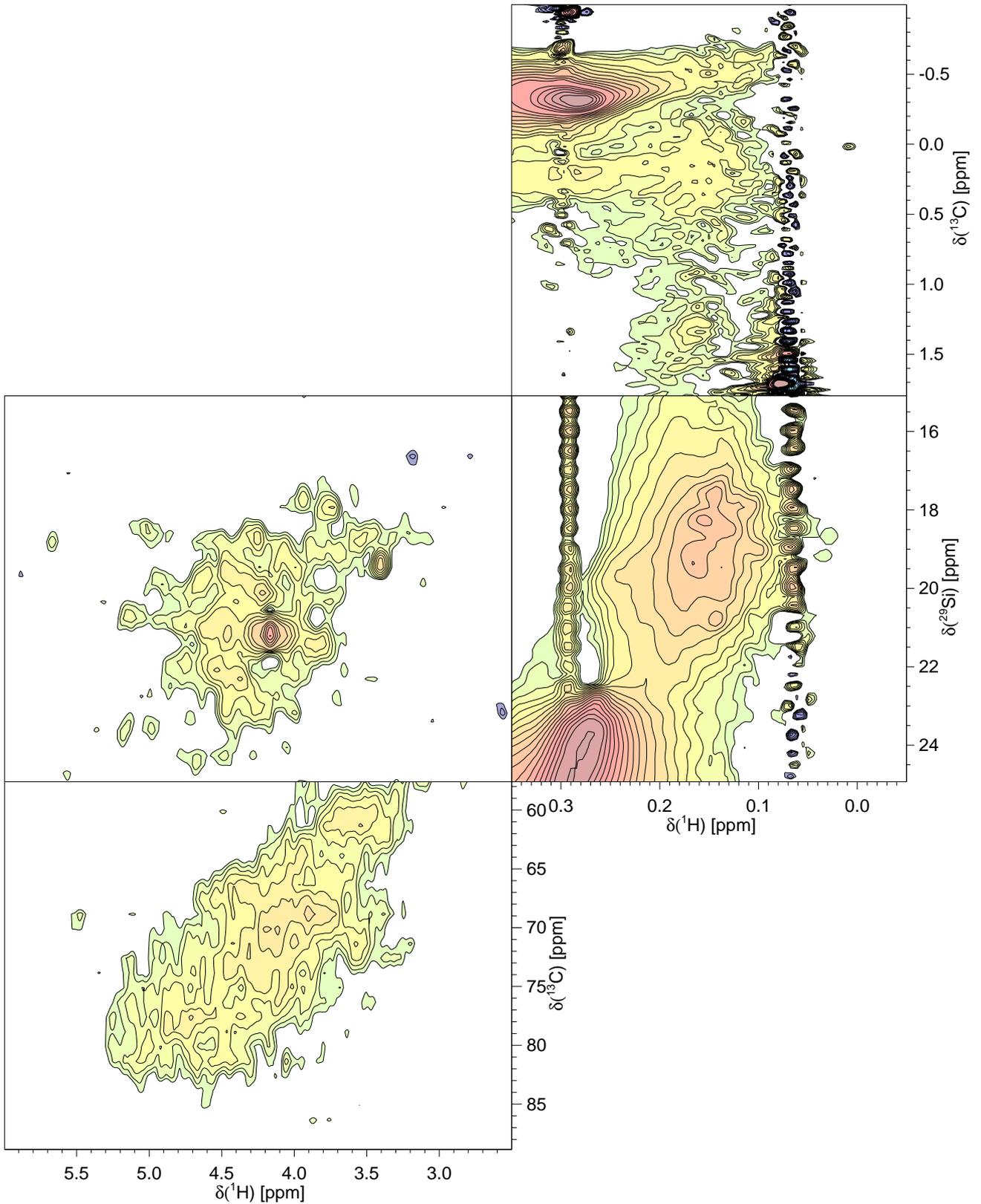
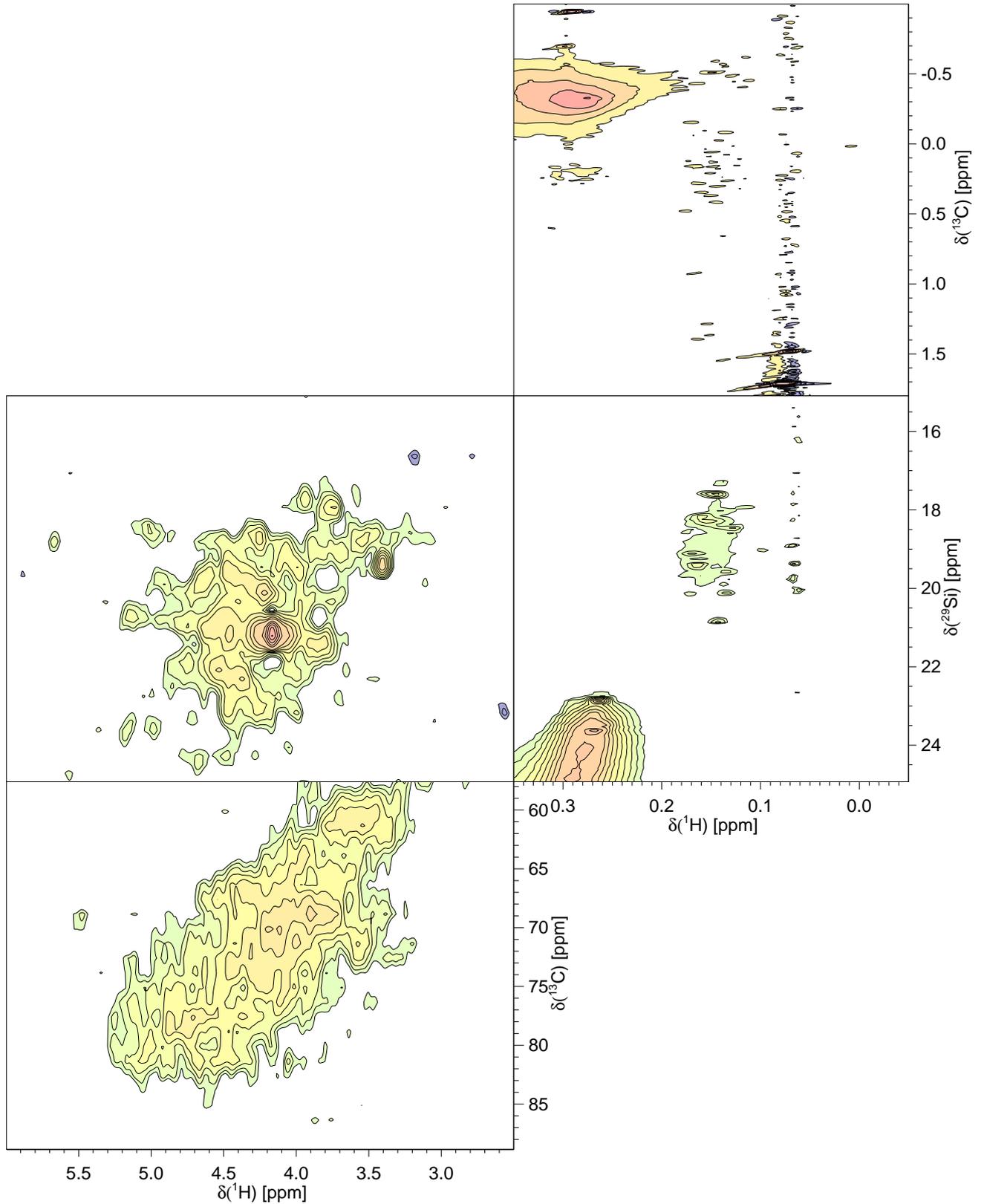


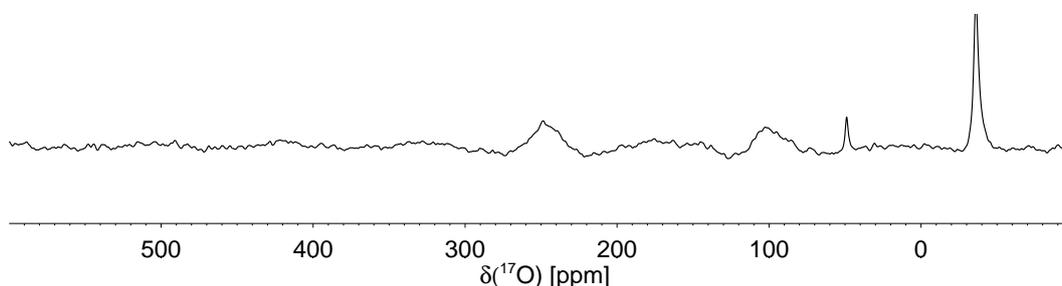
Abbildung 7.35: Übersicht über die Verschiebungsbereiche und Korrelation der einzelnen NMR-Spektren von SUWFA. Anzahl der Inkremente des  $^1J(^1\text{H},^{13}\text{C})$ - und  $^2J(^1\text{H},^{29}\text{Si})$ -Spektrums der funktionellen Gruppen: 512.



## 7.6 Aufnahme eines Huminstoff- $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektrums

Zur Vermeidung eines störenden  $\text{H}_2^{17}\text{O}$ -Signals wurden 125 mg der Substanz MPDOM im Vakuum getrocknet, in 3 ml trockenem Pyridin- $\text{d}_5$  weitgehend gelöst und zur NMR-Messung in ein 10 mm NMR-Röhrchen unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre überführt. Das  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektrum des Huminstoffes wurde nach dem Einpuls-Verfahren mit einem Pulswinkel von  $45^\circ$  ( $7.7\ \mu\text{s}$ ) aufgenommen. Die spektrale Breite betrug 54.3 kHz entsprechend 800 ppm, der Preacquisition-Delay  $13.1\ \mu\text{s}$ , die Akquisitionszeit 37.7 ms, der Relaxationsdelay 40 ms und die Zahl der aufgenommenen FIDs 2 735 000. Der FID wurde mit 4096 Meßpunkten aufgenommen, wobei die ersten 18 gemessenen Datenpunkte durch das Linear-Prediction-Verfahren errechnet und ersetzt worden sind. Vor der Fourier-Transformation wurde der FID mit einer Exponentialfunktion mit einem Linienverbreiterungsfaktor von 150 Hz multipliziert. Zur Erhöhung der Löslichkeit und Verschmälerung der Linienbreite wurde die  $^{17}\text{O}$ -NMR-Messung des Huminstoffes bei  $70^\circ\text{C}$  durchgeführt. Nach einer Meßzeit von 2 Tagen bei  $70^\circ\text{C}$  konnte ein schwarz-brauer Niederschlag auf der NMR-Röhrchenwand beobachtet werden, der auf Zersetzung des organischen Materials hindeutet.

Abbildung 7.36:  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektrum der Substanz MPDOM in Pyridin



In dem  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektrum Abb. 7.36 sind die Resonanzen von Carbonsäurestrukturen bei 250 ppm deutlich vorhanden. Die für Esterbindungen repräsentativen Carbonyl-Resonanzen bei 360 ppm fehlen vollständig. Es ist anzunehmen, daß Ester-Strukturelemente, während der Meßzeit hydrolysiert worden sind. Signale bei 100 ppm weisen auf aromatische Ether (beispielsweise mit einem höher substituierten Alkylrest) und Phenole hin. Das bei 50 ppm gefundene Signal läßt sich Methyl-Arylethern, wie sie in Huminstoffen mit Lignin-Partialstrukturen vorhanden sind, zuordnen. Bei -40 ppm liegen die  $^{17}\text{O}$ -NMR-Signale von primären Hydroxylgruppen.

Die in dem  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektrum vorhandenen Signale stammen vermutlich von den Zersetzungsprodukten des Huminstoffes. Es sind weder die für HS typischen Ester-Strukturelemente, noch (die in den aufgenommenen 2D-NMR-Spektren des Silylbereichs silylierter Huminstoffe gefundenen) sekundäre Hydroxylgruppen in diesen Zersetzungspro-

dukten vorhanden. In  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektren, die von der Substanz MPDOM bei tieferen Temperaturen in anderen Lösungsmitteln aufgenommen worden sind, fehlen völlig die Resonanzen, die auf den Huminstoff zurückzuführen sind. Die große Molekülgröße der Huminstoffmoleküle ist für eine große Korrelationszeit  $\tau_c$  verantwortlich und bewirkt sehr große Linienbreiten, die keine erkennbaren und interpretierbaren Signale liefern. In Kapitel 6.4 ist der Zusammenhang zwischen Linienbreite und Molekülgröße bereits ausführlich erläutert.  $^{17}\text{O}$ -NMR-Spektren von Huminstoffen mit natürlichem  $^{17}\text{O}$ -Gehalt können wegen der durch die großen Korrelationszeiten  $\tau_c$  verursachten großen Linienbreiten nicht aufgenommen werden.

## 7.7 LC-NMR-Spektren

Die Abb. 7.37 bis 7.40 zeigen die erhaltenen pseudo-2D-NMR-Spektren des Aliphatenbereichs (**A**) und des Silylbereichs (**B**) und die Protonen-Einzelspektren. Im Silylbereich können Silylester ( $\delta(^1\text{H}) = 0.45\text{-}0.22$  ppm) von Silylethern ( $\delta(^1\text{H}) = 0.22\text{-}0.10$  ppm) unterschieden werden. Die niedermolekularen Nebenprodukte sind weitgehend von den HS abgetrennt worden<sup>4</sup>. In den pseudo-2D-NMR-Spektren befinden sich ihre Signale im oberen Bereich (lange Retentionszeiten). Im Bereich der Aliphaten können O-C-H (4.0-3.0 ppm),  $\alpha\text{-CH}_n$  (3.0-2.0 ppm) und  $\text{CH}_n$  (2.0-0.5 ppm) unterschieden werden, deren Muster bei den verschiedenen Substanzen unterschiedlich ausgeprägt ist.

Die LC-NMR-Spektroskopie bestätigt die Ergebnisse der 1D und 2D-NMR-Spektroskopie der HS: Die HA enthält mehr O-C-H, die Kohlenhydrat-Strukturelementen zugeordnet werden können und weniger  $\alpha\text{-CH}_n$  als die korrespondierende FA. Im Spektrum **A** der Grundwasserfulvinsäure sind in Übereinstimmung mit der Literatur keine O- $\text{CH}_n$ -Strukturelemente und in den Spektren **B** kaum Silylether, die beispielsweise Kohlenhydrate indizieren, vorhanden. Der Aliphatenbereich des FG1FA-Spektrums enthält außer  $\text{CH}_n$ -Protonen einen großen Anteil an  $\alpha\text{-CH}_n$ .

Die chromatographische Auftrennung in der  $F_1$ -Dimension belegt die allgemein kleine Molekülgröße der Grundwasserfulvinsäure. In den Spektren der Substanzen BS1FA, BS1HA und besonders deutlich in Spektrum HO10FA sind die drei Protonenbereiche zeitlich versetzt. **Die Fraktionen der größeren Moleküle enthalten ausschließlich Kohlenhydratstrukturen.**<sup>5</sup>

---

<sup>4</sup>Geringe Mengen an Verunreinigungen aus Lösungsmittel und Säule verursachen die zeitlich konstanten Signale.

<sup>5</sup>Nach Kapitel 6.3.3 kann ein selektiver Relaxationseffekt ausgeschlossen werden.



Abbildung 7.37: LC-NMR-Spektrum von BS1FA.

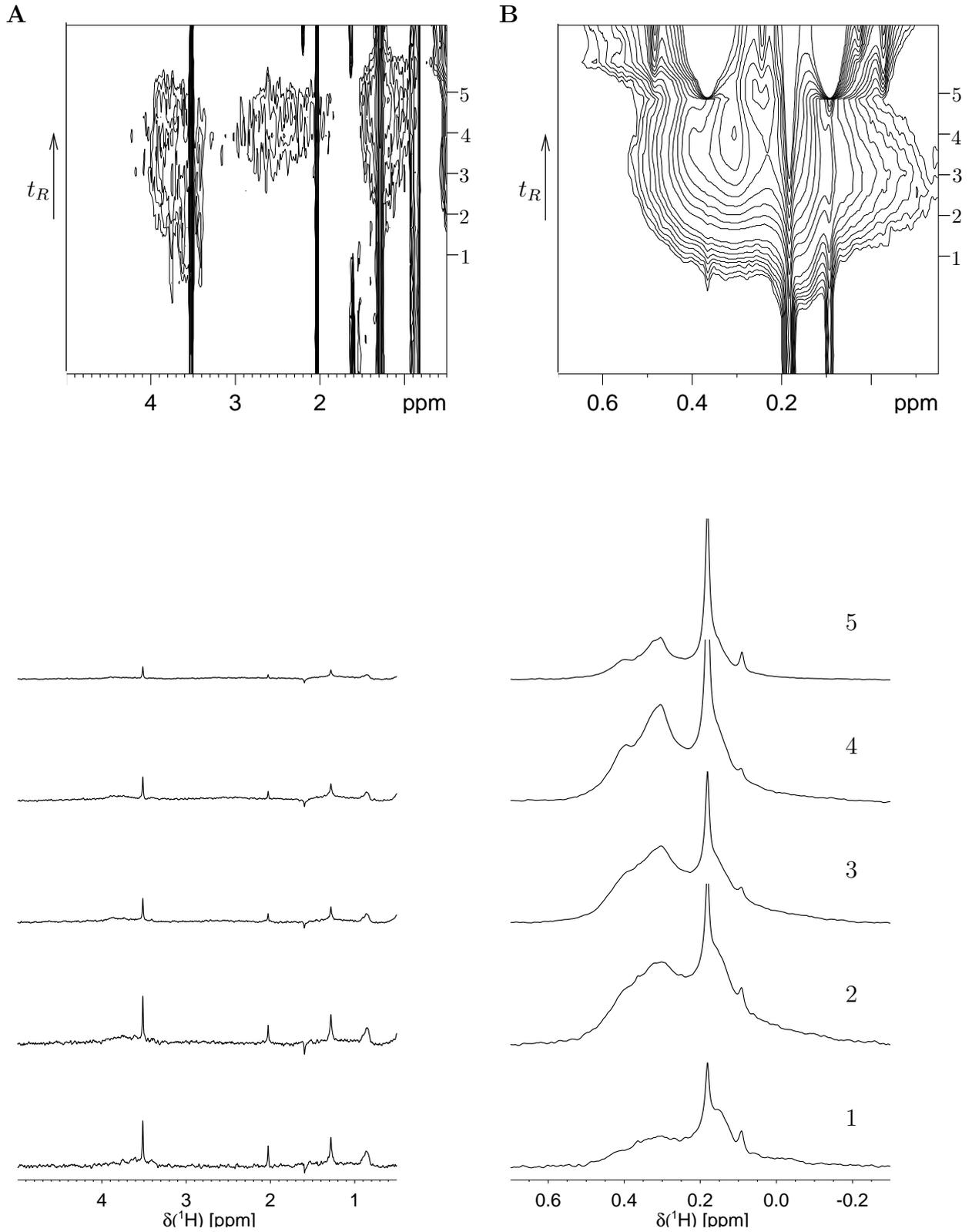


Abbildung 7.38: LC-NMR-Spektrum von HO10FA.

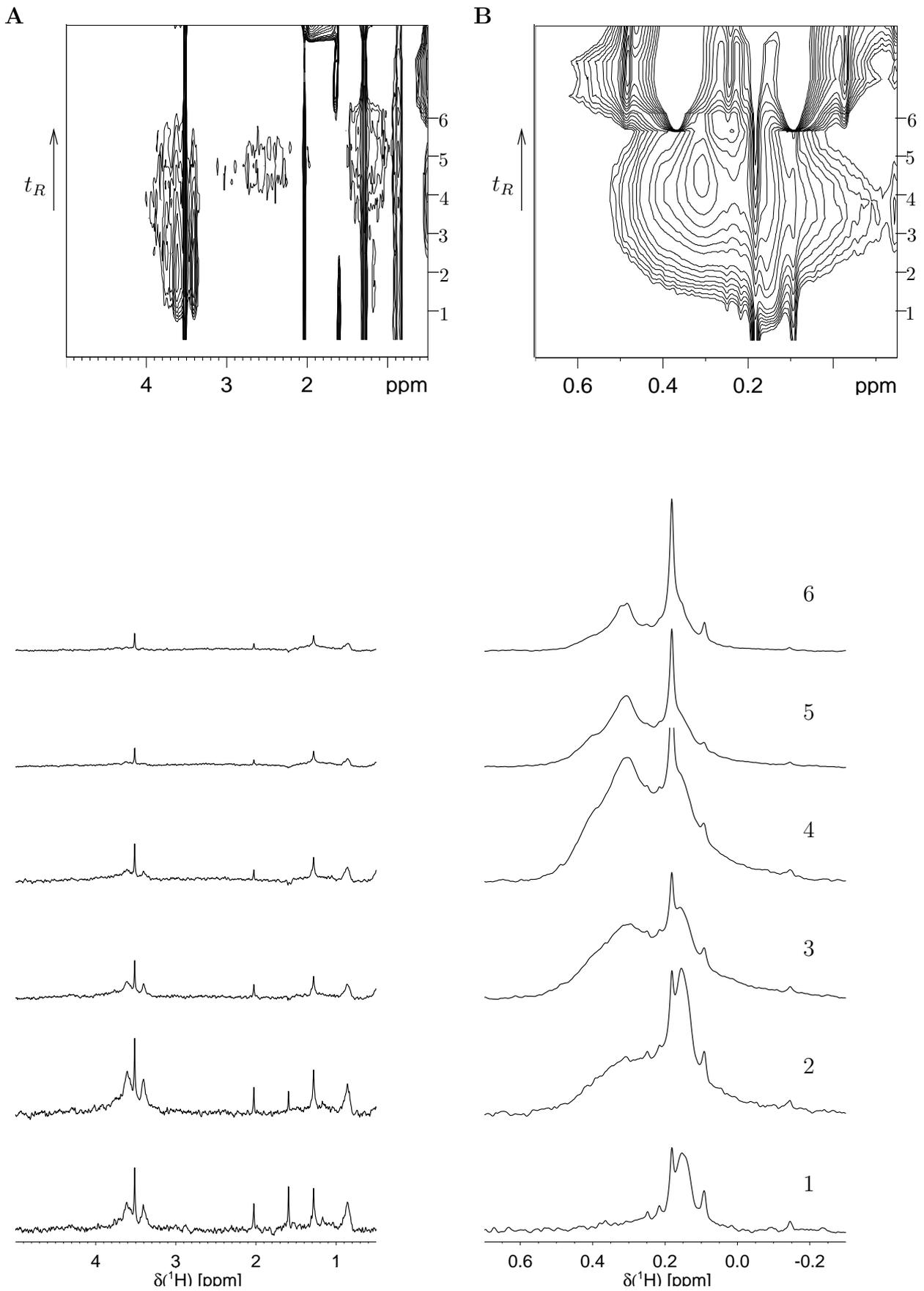


Abbildung 7.39: LC-NMR-Spektrum von FG1FA.

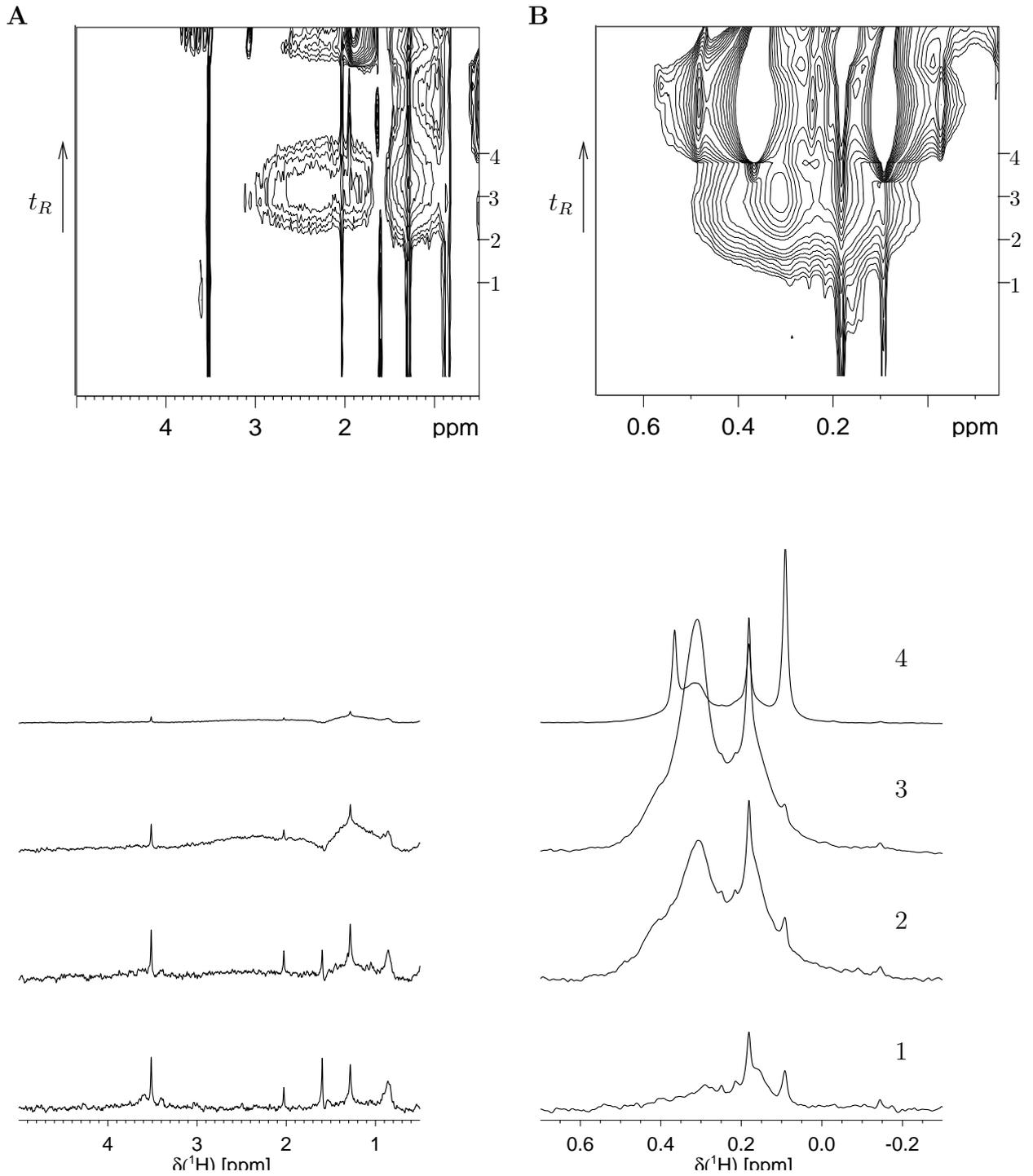


Abbildung 7.40: LC-NMR-Spektrum von BS1HA.

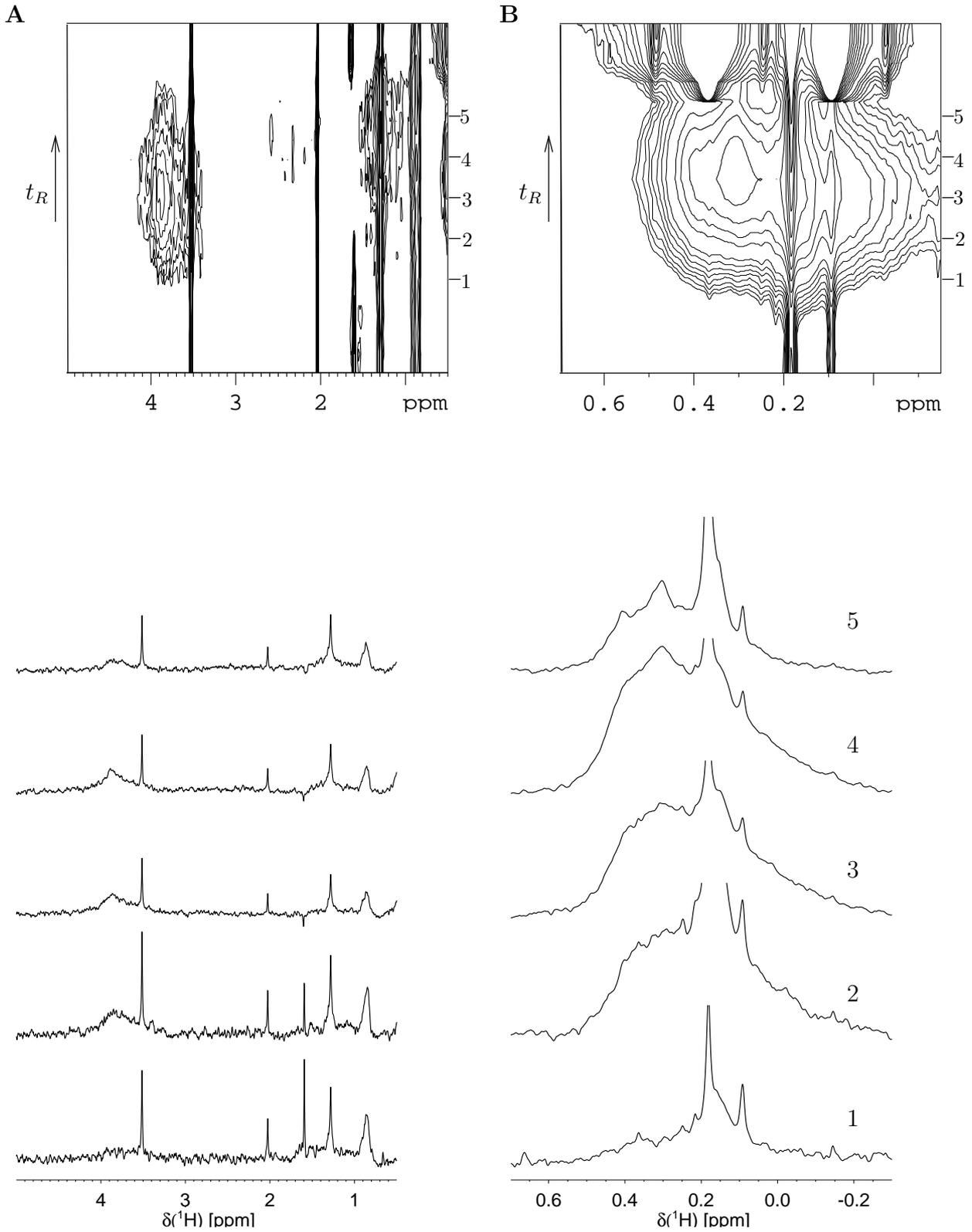


Tabelle 7.21: Beschreibung der LC-NMR-Spektren

Substanz	Bereich <b>A</b>	Bereich <b>B</b>
BS1FA	Hoher $\alpha$ -CH <sub>n</sub> -Anteil. Die Fraktionen mit den höheren Molekülmassen bestehen nur aus Kohlenhydraten.	Moleküle der großen Fraktionen enthalten in Übereinstimmung mit <b>A</b> Silylether der Kohlenhydratstrukturen (0.15 ppm).
HO10FA	Der Anteil an O-C-H ist größer als bei BS1FA. Wenig $\alpha$ -CH <sub>n</sub> . Die Fraktionen mit den höheren Molekülmassen bestehen nur aus Kohlenhydraten.	Moleküle der großen Fraktionen enthalten in Übereinstimmung mit <b>A</b> Silylether der Kohlenhydrate (0.15 ppm).
FG1FA	Keine O-C-H Protonen erkennbar. Die Fraktion der Kohlenhydrate (s. BS1FA und HO10FA) fehlt (Übereinstimmung mit Kohlenhydratanalyse Tabelle 7.14). Hoher $\alpha$ -CH <sub>n</sub> -Anteil. Molekülgrößen kleiner als die der anderen Substanzen.	In den <sup>1</sup> H-Spektren des Silylbereichs dominieren Silylester. Molekülgrößen kleiner als die der anderen Substanzen.
BS1HA	O-C-H Protonen und CH <sub>n</sub> etwa gleichmäßig auf die Fraktionen verteilt. Fast keine $\alpha$ -CH <sub>n</sub> Protonen. Mehr O-C-H und weniger $\alpha$ -CH <sub>n</sub> als BS1FA.	Spektrenverlauf bei 0.4 ppm steiler als bei BS1FA, d.h. höherer Anteil an C <sub>ar</sub> -COOH. Signalintensität bei ca. 0.05 ppm deutet auf primäre Hydroxylgruppen.

# Kapitel 8

## Zusammenfassung und Ausblick

Der Einsatz leistungsfähiger NMR-spektroskopischer Methoden ermöglichte die strukturelle Charakterisierung von Huminstoffen unterschiedlicher Herkunft. Die chemische Umgebung azider, sauerstoffhaltiger Funktionen in aquatischen und terrestrischen Huminstoffen wurde mit den entwickelten Verfahren durch eine präzisere Differenzierung der funktionalen Gruppen strukturell beschrieben.

Zur Charakterisierung der Huminstoffe wurden sowohl die Protonen funktioneller Gruppen als auch die Gerüstprotonen untersucht. Silylierte Huminstoffe konnten erfolgreich mittels  $^1\text{H}$ -,  $^{29}\text{Si}$ -,  $^{13}\text{C}$ -,  $^1\text{J}(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ - und  $^2\text{J}(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektroskopie untersucht werden.  $^3\text{J}(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -Weitbereichskopplungsexperimente lieferten zusätzliche Informationen über die Zuordnung von Funktionen zum Huminstoffgerüst. Die hochaufgelösten 2D-NMR-Spektren konnten in Bereiche ähnlicher Huminstoff-Konstituenten (aliphatische und aromatische Säuren, Phenole, primäre, sekundäre und tertiäre Alkohole) eingeteilt werden. Die Kombination von Chromatographie und NMR-Spektroskopie ermöglichte die Abtrennung von Nebenprodukten.

Als Grundlage für die Untersuchung der aziden Protonen wurde eine Silylierungsmethode entwickelt, die zum einen die austauschbaren, silylierbaren Carboxyl- und Hydroxylprotonen durch Trimethylsilylsubstituenten markiert und zum anderen einen neuen NMR-aktiven Kern ( $^{29}\text{Si}$ ) einführt. Durch die Optimierung NMR-spektroskopischer Aufnahme- und Prozessierungsparameter von ein- und zweidimensionalen NMR-Experimenten wurden aussagekräftige Spektren mit verbessertem Informationsgehalt erhalten. Anhand der Bestimmung der chemischen Verschiebung silylierter Modellsubstanzen wurden Strukturbereichskarten erstellt, mit deren Hilfe die NMR-Spektren silylierter Huminstoffe in Bereiche ähnlicher Strukturelemente gegliedert wurden. Während die Resonanzen ähnlicher Strukturelemente in eindimensionalen NMR-Spektren stark überlagert sind, bieten zweidimensionale NMR-Spektren durch die Einführung einer zweiten Frequenzvariablen einen Einblick in die chemische Umgebung verschiedener Funktionalitäten. So konnte die  $^{29}\text{Si}$ -

NMR-Technik nur zwischen Silylether und Silylester differenzieren, in den zweidimensionalen ( $^1\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$ )- und ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-NMR-Spektren hingegen wurden aromatische und aliphatische Carboxylgruppen, Phenole,  $\alpha$ -substituierte Hydroxylgruppen, primäre und sekundäre Kohlenhydrat- und Alkylketten-Hydroxylfunktionen, Cyclohexanole und tertiäre Hydroxylgruppen identifiziert. Die Einführung eines Weitbereichskopplungsexperiments erlaubt die Verknüpfung der Funktionen zum Huminstoffgerüst für aliphatische Alkohole (Silylether). Durch Differenzbildung von zweidimensionalen NMR-Spektren gelang eine Abschätzung der Anteile der Partialstrukturen in Huminstoffen unterschiedlicher Herkunft. Die Bedeutung solcher Verfahren liegt in deren Anwendbarkeit zur Abschätzung individueller Verteilungsmuster der Huminstoffkonstituenten. Die Aufnahme von  $^3\text{J}(^1\text{H}, ^{29}\text{Si})$ -Weitbereichskopplungsexperimenten ermöglichte die Zuordnung von  $\alpha$ -substituierten Hydroxylfunktionen. Neben den heteronuklear korrelierten Spektren des Silylbereichs der Huminstoffe konnten weiterhin  $^1\text{J}(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -Spektren der Gerüstprotonen aufgenommen werden, die es erlauben, komplementäre Informationen zu den Spektren des Silylbereichs zu erhalten.

Erstmalig wurden Gruppenspektren (Gemeinsamkeiten einer gewählten Huminstoffgruppe) ermittelt, die die Grundstruktur von Huminstoffgruppen repräsentieren. Das Minimumspektrum aller gemessenen Substanzen ist mit denjenigen strukturellen Elementen der Huminstofffunktionen und des Huminstoffgerüsts verknüpft, die in jedem der beteiligten Huminstoffen enthalten sind. Die Differenzspektren von gemessenen Spektren und Minimumspektrum zeigen die Besonderheiten der jeweiligen Substanz, bzw. die Differenzspektren von Gruppenspektren und dem Gesamt-Minimumspektrum spiegeln die Besonderheiten der jeweiligen Substanzgruppe wieder.

Zusammengefaßt bietet die zweidimensionale NMR-Spektroskopie silylierter Huminstoffe folgende Werkzeuge zur Untersuchung der Sauerstoff-Funktionalität:

- Detaillierte Erfassung einer Vielzahl unterschiedlicher Strukturelemente (im Gegensatz zur bisherigen nur Unterscheidung zwischen  $\text{COOH}$ ,  $\text{C}_{ar}\text{-OH}$  und  $\text{C}_{alk}\text{-OH}$ ).
- Durch die Optimierung der Silylierungsreaktion sowie der Meß- und Prozessierungsparameter ist ein quantitativer Vergleich der funktionellen Gruppen möglich (bisher wegen der Überlappung von Signalen in eindimensionalen NMR-Spektren problematisch).
- Direkter Vergleich von Huminstoffen durch Differenzbildung ihrer Spektren; Ermittlung eines NMR-Spektrums, das die Grundstruktur von Huminstoffen widerspiegelt.
- Verknüpfung von  $\alpha$ -substituierten Hydroxylfunktionen mit dem Huminstoffgerüst durch Weitbereichskopplungsexperimente.

Zur Abtrennung der bei der Silylierungsreaktion entstandenen Nebenprodukte wurde die LC-NMR-Spektroskopie eingesetzt. Die erhaltenen Protonenspektren zeigen einen Zusammenhang zwischen molekularer Zusammensetzung der Substanzen und der Molekülgröße. Obwohl die strukturelle Charakterisierung von Huminstoffen aufgrund ihrer polydispersen Eigenschaften eingeschränkt ist, haben die in dieser Arbeit entwickelten Strukturaufklärungsmethoden zum Verständnis der Stoffklasse der Huminstoffe beigetragen. Mit Blick auf die internationale interdisziplinäre Huminstoffforschung ergeben sich aus der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen für zukünftige Forschungsarbeiten:

1. Welche chemischen und physikalischen Veränderungen des Huminstoffgerüsts bewirkt die Silylierungsreaktion?
  - Durchführung von Desilylierungsreaktionen und vergleichende Charakterisierung (NMR-Spektroskopie, Azidität, Molekülgrößenverteilung, chemische, physikalische und biologische Umsetzungen) mit der Ausgangssubstanz.
2. Wie groß ist der Einfluß der Molekülgröße auf die Intensität der NMR-Peaks?
  - Silylierung und Aufnahme von NMR-Spektren von Gemischen multifunktionaler polymerer Modellsubstanzen (beispielsweise von ROSIG-Projektpartnern synthetisierte Substanzen) und Vergleich der Peakintensitäten. Wie in Kapitel 6.4 dargelegt, werden die Peaks mit zunehmender Molekülmasse breiter und können gegebenenfalls ganz verschwinden.
3. Gibt es strukturelle Unterschiede zwischen verschiedenen Größenfraktionen? Wie sind die Funktionalitäten auf die verschiedenen Huminstoffgrößen verteilt?
  - Fraktionierung der Huminstoffe nach Größe und anschließende Silylierung und Messung der Einzelfraktionen, um strukturelle Änderungen bei verschiedenen Aggregatgrößen genau zu beschreiben.
4. Inwieweit können aus den NMR-Spektren Rückschlüsse auf die Umweltbedingungen gezogen werden? Welche Auswirkungen haben Veränderungen in der Umgebung (Waldbrand, Versauerung von Böden und Gewässern, Pestizide, Schwermetalle, etc.) auf die HS-Funktionalität?



- Aufnahme und Auswertung der NMR-Spektren von Huminstoffen mit entsprechender Herkunft.
5. Inwieweit sind die Ergebnisse im Rahmen des ROSIG-Projektes mit mathematischen Verfahren auswertbar?
- Einsatz von mathematischen Modellen zur Korrelation der Daten des ROSIG-Datenpools und Vergleich der analytischen Methoden und Ergebnisse (wird bereits von der Arbeitsgruppe Abbt-Braun bearbeitet).

Die Klärung dieser Fragestellungen würde die Huminstoffforschung bei der Frage nach der ökologischen Bedeutung von Huminstoffen voranbringen und damit ein verbessertes globales Ressourcenmanagement ermöglichen.

Für strukturchemische Fragestellungen in der Biochemie von Huminstoffen spielt die NMR-Spektroskopie eine herausragende Rolle. Da es sich um polydisperse, makromolekulare Stoffe handelt, ist eine Strukturbestimmung im Sinne der klassischen organischen Chemie jedoch nur sehr begrenzt möglich. In der Regel können lediglich einzelne Strukturelemente oder -bereiche bestimmt werden, die jedoch einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Stoffklasse der Huminstoffe leisten. Der Schlüssel zum Verständnis des ökosystemaren Verhaltens dieser Substanzen scheint in den physikalischen, chemischen und biologischen Funktionalitäten zu liegen, die den einzelnen Strukturbereichen zukommen.

Die Bestimmung einzelner Strukturelemente erlaubt eine Abschätzung und ein besseres Verständnis der Reaktionsfähigkeit. Die Grenzen bei der Untersuchung dieser Substanzen müssen zu einem neuen Strukturbegriff führen, der mehr von der Funktionalität des Stoffgemisches als von der exakten Anordnung der Atome geprägt ist. Angesichts der komplexen Zusammenhänge zwischen der Gerüst-Funktionalitäts-Beziehung und ihrem Einfluß auf das Verhalten der Substanzen im Ökosystem erfordert die Beurteilung analytischer Verfahren Behutsamkeit bei der Interpretation der Daten. Trotzdem sehe ich in diesen neuentwickelten Verfahren ein großes Potential, das in Zukunft über eine umfassende strukturchemische Beschreibung der chemischen Umgebung von Sauerstoff-Funktionen einen wesentlichen Beitrag zur Huminstoffforschung leisten kann.

# Anhang A

## Experimenteller Teil

### Beschreibung der Durchführung der optimierten Silylierungsreaktion

Die Optimierung der Silylierungsreaktion ist in Kapitel 6.1 ausführlich erläutert. Die in Kapitel 7 ausgewerteten Spektren wurden von silylierten HS aufgenommen, die nach folgendem Verfahren erhalten worden sind: 30 mg des zu untersuchenden Huminstoffes wurden in 90  $\mu\text{l}$  DMSO- $d_6$  gelöst und anschließend 90  $\mu\text{l}$  des Silylierungsreagenzes BSTFA bzw. BSA zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurde die Lösung mit 200  $\mu\text{l}$   $\text{CDCl}_3$  verdünnt.

### Apparative Ausstattung

Sämtliche NMR-Spektren wurden an einem DMX 500 Spektrometer der Firma Bruker, Rheinstetten aufgenommen. Die Messungen wurden mit einem 5 mm Breitbandprobenkopf und einem 5 mm Invers-Probenkopf mit z-Gradient durchgeführt.

Für die Aufnahme der LC-NMR-Spektren wurde eine GPC-Säule (MZ-SDV-Gel 500 Å, 5  $\mu\text{m}$ , 300 x 4.6 mm, MZ-Analysentechnik, Mainz) eingesetzt. Das Lösemittelfördersystem LC 22 (Firma Bruker) und der UV-Detektor (Firma Knauer) wurde über die Chromatographie-Software "Chromstar" gesteuert. Als Lösemittel wurde  $\text{CDCl}_3$  gewählt. Die Messungen wurde im on-flow-Verfahren bei einer Flußrate von 0.15 ml/min durchgeführt. Die Auswahl der Experimente und Parameter ist in Kapitel 6 erläutert.

### Spektrenfusion und Differenzbildung

Um die in Kapitel 6.3.6 durchgeführte Fusion zweier Spektren und die in Kapitel 6.3.5 gebildeten Differenz- und Minimum-Spektren korrekt bestimmen zu können, müssen zuvor instrumentell bedingte Abweichungen beseitigt werden. Dabei müssen zunächst die in der Regel voneinander abweichenden Signalamplituden einander angeglichen werden. Dies kann durchgeführt werden, indem beide Spektren anhand des Integrals eines Referenzbereichs normiert werden. Dieser Re-

ferenzbereich muß so gewählt werden, daß die darin enthaltenen Signale in beiden Messungen als identisch angenommen werden können und nicht von  $t_1$ -Rauschen und anderen Artefakten betroffen sind.

Eine weitere instrumentell bedingte Abweichung besteht in der Lage der Basisfläche einzelner 2D-NMR-Spektren. Die Form und Lage diese Basisfläche ist abhängig von den bei der Messung auftretenden Phasenfehlern und deren späterer Korrektur. Da diese Fehler in der Praxis nie ganz beseitigt werden können, muß diese Lageabweichung zweier zu verschneidender Spektren mit berücksichtigt werden. Insbesondere bei der in Kapitel 6.3.6 durchgeführten Kombination zweier durch  $t_1$ -Rauschen beeinträchtigten Spektren zu einem störungsfreien Spektrum, treten Lageabweichungen der Basisflächen nach der Spaltensubstitution als Signalsprünge auf. Um diese Art von Signalartefakten zu vermeiden, wurde eine Methode entwickelt, zwei Spektren unter Berücksichtigung ihrer Basisflächenabweichungen einander anzugleichen. Dabei wird die relative Lage zweier korrespondierender Spaltenvektoren beider Spektren durch eine robuste lineare Korrelation ermittelt. Führt man dies an beiden Seiten des zu substituierenden Bereichs durch und interpoliert anschließend die ermittelten Koeffizienten, so kann damit der einzufügende Bereich in seiner Lage korrigiert werden.

Zur technischen Realisierung der oben beschriebenen Verfahren wurde die von der Firma Research Systems, Inc. vertriebene wissenschaftliche Datenverarbeitungssprache IDL<sup>1</sup> um spezielle Funktionen zum Zugriff auf 1D- und 2D-NMR-Spektren in dem von Bruker verwendeten Format [192] und deren Parametrierung erweitert. Die 2D-NMR-Spektren liegen dabei als Matrix vor und lassen sich mit den IDL-üblichen Operatoren verarbeiten. Die oben erwähnte Normierung anhand eines Referenzbereichs läßt sich dann als elementweise Division durch den Mittelwert der betreffenden Untermatrix erreichen. Zur robusten linearen Korrelation wurde das in [153] in Kapitel 5.7 auf Seite 703 beschriebene Verfahren<sup>2</sup> verwendet. Es ist in besonderem Maß unempfindlich gegen überlagerte Signalstörungen und in Form der IDL-Funktion LADFIT bereits implementiert. Durch die Vielzahl der in IDL verfügbaren Funktionen zur Behandlung von derartigen 2D-Datenfeldern lassen sich auch NMR-Daten unterschiedlicher spektraler Auflösung so normieren und anpassen, daß damit ein modulares System zur Verfügung steht, mit dem sich NMR-Daten praktisch beliebig normieren, numerisch integrieren und kombinieren lassen.

Durch die in IDL verfügbaren Plotfunktionen konnten die in dieser Arbeit abgebildeten Spektren zusammen mit den daraus gewonnenen Kombinationen und Differenzen in einer einheitlichen Weise dargestellt werden. Das linke obere Spektrum in Abbildung 6.12 auf Seite 118 wurde beispielsweise mit dem folgenden IDL-Programm erstellt:

```
.com plot_nmr nmr_merge
nmr_set_eps_name, "diff.FA.1H29Si.A.eps"

f2plot=[0.55,-0.1] % Plotbereich in F2
```

<sup>1</sup>Interactive Data Language, Version 5

<sup>2</sup>Fitting a Line by Minimizing Absolute Deviation

```

f1plot=[34.0,12.0] % Plotbereich in F1
f2norm=[0.45,0.35] % Referenzbereich in F2
f1norm=[29.0,24.0] % Referenzbereich in F1
f2subs=[0.26,0.35] % Zu substituierender Bereich
f2mean=[0.12,0.0] % Zu mittelnder Bereich

% einlesen eines Spektrums
s2da = read_nmr_spect( nmr_path( 'r_bs1fa_1h29si', '3', '8' ) )
% negative Signalanteile auf 0 setzen
s2da.spect[where(s2da.spect lt 0)] = 0.0
% den gewuenschten Ausschnitt auswaehlen
nmr_2d_crop, s2da, F2RANGE=f2plot, F1RANGE=f1plot
% zweites Spektrum einlesen
s2db = read_nmr_spect( nmr_path( 'r_bs1fab_1h29s', '1', '8' ) )
s2db.spect[where(s2db.spect lt 0)] = 0.0;
% Spektren vereinigen
nmr_2d_merge, s2da, s2db, $
  F2SUBST=f2subs,F2MEAN=f2mean,F2NORM=f2norm,F1NORM=f1norm
% Ergebniss als PostScript-Grafik ausgeben
plot_nmr, s2da, CMPPPM=[6.7,0.18] % Massstab in cm pro ppm
exit

```

In geeignet normierten Spektren lassen sich dann Gemeinsamkeiten durch die elementweise Bestimmung des Minimums mehrerer Spektren durchführen. Dies erfolgt mit dem IDL-Operator  $<$ . Die charakteristischen Besonderheiten eines Spektrums lassen sich danach durch Subtraktion der als Minimum bestimmten Gemeinsamkeiten ermitteln. Liegen die Spektren A und B vor, so ergeben sich:

- die gemeinsamen Signalanteile aus  $A < B$
- die für A spezifischen Signalanteile aus  $A - (A < B)$
- und die für B spezifischen Signalanteile aus  $B - (A < B)$ .

Auf diese Weise läßt sich eine Art Boolesche Algebra spezifischer Signalanteile durchführen. Signale die in A und B, aber nicht in C oder D vorkommen, ergeben sich beispielsweise aus durch  $(A < B) - (A < B < (C > D))$ .

Die Besonderheiten der Fulvinsäure **BS1FA** gegenüber den Fulvinsäuren **HO10FA**, **FG1FA**, **SUWFA** und **HO13FA** in Abbildung 7.8 auf Seite 148 kann dann mit folgendem IDL-Programm dargestellt werden:

```

.com plot_nmr nmr_merge
nmr_set_eps_name, "diff.FA.1H29Si.Ae.eps"

```

```

f2plot=[0.55,-0.1] % Plotbereich in F2
f1plot=[34.0,12.0] % Plotbereich in F1
f2norm=[0.45,0.35] % Referenzbereich in F2
f1norm=[29.0,24.0] % Referenzbereich in F1
f2subs=[0.26,0.35] % Zu substituierender Bereich
f2mean=[0.12,0.0] % Zu mittelnder Bereich

s2da = read_nmr_spect( nmr_path( 'r_bs1fa_1h29si', '3', '8' ))
s2da.spect[where(s2da.spect lt 0)] = 0.0
nmr_2d_crop, s2da, F2RANGE=f2plot, F1RANGE=f1plot
s2db = read_nmr_spect( nmr_path( 'r_bs1fab_1h29s', '1', '8' ))
s2db.spect[where(s2db.spect lt 0)] = 0.0
nmr_2d_merge, s2da, s2db, $
    F2SUBST=f2subs,F2MEAN=f2mean,F2NORM=f2norm,F1NORM=f1norm
% Referenzintegral bestimmen
tA=nmr_2d_mean( s2da, F2RANGE=f2norm, F1RANGE=f1norm )
sA=s2da

s2da = nmr_2d_fit( sA, read_nmr_spect( nmr_path( 'r_ho10faa_1h29', '1', '8' )))
s2da.spect[where(s2da.spect lt 0)] = 0.0
s2db = read_nmr_spect( nmr_path( 'r_ho10fab_1h29', '1', '8' ))
s2db.spect[where(s2db.spect lt 0)] = 0.0
nmr_2d_merge, s2da, s2db, $
    F2SUBST=f2subs,F2MEAN=f2mean,F2NORM=f2norm,F1NORM=f1norm
t=nmr_2d_mean( s2da, F2RANGE=f2norm, F1RANGE=f1norm )
% an Referenzspektrum angleichen
s2da.spect = s2da.spect*tA/t
sB=s2da

s2da = nmr_2d_fit( sA, read_nmr_spect( nmr_path( 'r_fg1faa_1h29s', '1', '8' )))
s2da.spect[where(s2da.spect lt 0)] = 0.0
s2db = read_nmr_spect( nmr_path( 'r_fg1fab_1h29s', '1', '8' ))
s2db.spect[where(s2db.spect lt 0)] = 0.0
nmr_2d_merge, s2da, s2db, $
    F2SUBST=f2subs,F2MEAN=f2mean,F2NORM=f2norm,F1NORM=f1norm
t=nmr_2d_mean( s2da, F2RANGE=f2norm, F1RANGE=f1norm )
s2da.spect = s2da.spect*tA/t
sC=s2da

```

```
s2da = nmr_2d_fit( sA, read_nmr_spect( nmr_path( 'suwfaa_1h29si', '2', '8' )))
s2da.spect[where(s2da.spect lt 0)] = 0.0
s2db = read_nmr_spect( nmr_path( 'suwhab_1h29si', '1', '8' ))
s2db.spect[where(s2db.spect lt 0)] = 0.0
nmr_2d_merge, s2da, s2db, $
  F2SUBST=f2subs,F2MEAN=f2mean,F2NORM=f2norm,F1NORM=f1norm
t=nmr_2d_mean( s2da, F2RANGE=f2norm, F1RANGE=f1norm )
s2da.spect = s2da.spect*tA/t
sD=s2da

s2da = nmr_2d_fit( sA, read_nmr_spect( nmr_path( 'x_ho13faa_1h29', '3', '1' )))
s2da.spect[where(s2da.spect lt 0)] = 0.0
s2db = read_nmr_spect( nmr_path( 'x_ho13fab_1h29', '1', '1' ))
s2db.spect[where(s2db.spect lt 0)] = 0.0
nmr_2d_merge, s2da, s2db, $
  F2SUBST=f2subs,F2MEAN=f2mean,F2NORM=f2norm,F1NORM=f1norm
t=nmr_2d_mean( s2da, F2RANGE=f2norm, F1RANGE=f1norm )
s2da.spect = s2da.spect*tA/t
sE=s2da

% spezifische Signalanteile des ersten Spektrums sA bestimmen
sA.spect = sA.spect-(sA.spect<sB.spect<sC.spect<sD.spect<sE.spect)+0.0001

plot_nmr, sA, CMPPPM=[6.7,0.18]
exit
```

# Spektrenfusion und Differenzbildung mit Bruker-Standardsoftware

## Software Version und Patchlevel

Bruker Software XWIN-NMR Patchlevel 4 oder höher.

## Grundsätzliche Problematik der differentiellen Auswertung

Alle Methoden des Verschneidens mehrerer 2D-Spektren erfordern, daß diese kompatibel (also mit weitgehend identischer Parametrierung) aufgenommen und prozessiert wurden. Eine vergleichende Auswertung verschiedener Spektren ist nur bei vergleichbaren Messungen sinnvoll durchführbar. Inkompatible Größen der Matrix der Spektralwerte führt beispielsweise bei der unten beschriebenen Spaltensubstitution zu Fehlermeldungen (siehe Handbuch Kap. 7.19).

Die differentielle Auswertung einzelner Messungen dient dem Auffinden feinsten Unterschiede. Neben den durch die Probe bedingten Signalunterschieden werden dabei aber auch systemimmanente Störungen und deren Unterschiede verstärkt. Beim direkten Vergleich zweier Messungen treten unterschiedliche Ausprägungen dieser Störungen daher wesentlich stärker hervor als bei der Betrachtung einzelner Messungen. Als Folge daraus muß bei der Verknüpfung mehrerer Messungen daher grundsätzlich in besonderem Maß auf eine sorgfältige Korrektur aller Störeinflüsse (Phasen-, Basislinien-, Verstärkungsfehler u.ä.) und die bereits erwähnte Vergleichbarkeit der Messungen geachtet werden.

## Prinzip der differentiellen Auswertung

Die Spektren dieser Arbeit beruhen alle auf einer Kombination vier verschiedener Techniken:

1. Angleichen einzelner zu vergleichender Spektren.
2. Ggf. Austausch durch T1-Rauschen gestörter Spalten.
3. Bestimmung gemeinsamer Signalanteile einer Gruppe von Spektren.
4. Differenzbildung zwischen einem Spektrum und den gemeinsamen Signalanteilen einer Gruppe von Spektren.

Diese vier Methoden werden zunächst prinzipiell und anschließend an einigen ausgewählten Beispielen im Detail erläutert.

## 1. Angleichen einzelner Spektren

Der Vergleich zweier oder mehrerer Spektren setzt zunächst deren Vergleichbarkeit voraus. In der Praxis bedeutet das, daß die Spektren bereits mit identischer Parametrierung aufgenommen und prozessiert werden. Insbesondere müssen die Dimensionen der Spektralmatritzen (SI(F1) und

SI(F2)) identisch sein, da dies sonst (z.B. beim Befehl `wsc` siehe Spaltensubstitution) zu Fehlermeldungen oder fehlerhaften Ergebnissen führt. Ist dies nicht der Fall, müssen die Prozessierungsparameter geeignet angeglichen werden und die Prozessierung erneut durchgeführt werden. Danach müssen die Korrekturen der NMR-typischen Störeinflüsse mit den üblichen Methoden durchgeführt werden. Die einzige Besonderheit besteht darin, daß die Basislinien- und Phasenkorrektur besonders sorgfältig durchgeführt werden muß, um später daraus resultierende Artefakte zu vermeiden.

### Angleich der Signalamplitude

Zusätzlich zu den routinemäßigen Korrekturen muß nun die Amplitude der einzelnen Spektren einander angepaßt werden. Dies erfolgt über Integrale eines in den einzelnen Messungen als identisch und ungestört annehmbaren Bereichs. In diese Arbeit wurde einheitlich für  $^{29}\text{Si}$ -Spektren der Bereich F1 29 bis 24ppm und F2 0.45 bis 0.35ppm und für  $^{13}\text{C}$ -Spektren der Bereich F1 0.0 bis -0.4 und F2 0.45 bis 0.35ppm verwendet. Ziel ist es, die Spektren so mit Korrekturfaktoren zu multiplizieren, daß danach das Referenzintegral in allen zu vergleichenden Spektren denselben Wert ergibt. Vorsicht: Als Besonderheit der Bruker-Software ist dabei zu beachten, das Spektren in ihrer Amplitude nur reduziert, aber nicht erhöht werden dürfen (siehe XWINNMR-Handbuch Kap. 7.27). Alle zu vergleichenden Spektren müssen also demjenigen Spektrum mit dem geringsten Integralwert angeglichen werden, nicht umgekehrt.

---

#### Beispiel: Abb.7.11 S.153

Nachdem die Messungen BS1HA, HO13HA und SUWHA mit SI(F1)=256 SI(F2)=2048 prozessiert, phasenkorrigiert und basislinienkorrigiert wurden, werden zunächst Arbeitskopien angelegt:

1. Laden der Messung BS1HA  
Befehl: `wrpa a 1 1`  
Damit wird eine Kopie der Messung angelegt.
2. Laden der Messung HO13HA  
Befehl: `wrpa a 2 1`
3. Laden der Messung SUWHA  
Befehl `wrpa a 3 1`

---

### Definition des Integrationsbereichs

Die Integration von 2D-Spektren wird, wie im XWINNMR-Handbuch Kap. 3.11 beschrieben, durchgeführt:

1. Laden einer Messung (z.B. a/1 )



2. Befehl: `integ`
3. Please enter name of region file: `ref13c`
4.
  - Mit linker Maustaste Fadenkreuz einschalten.
  - Das Fadenkreuz auf die linke obere Ecke des Integrationsbereichs (F1=-0.4 F2=0.45) einstellen und mit mittlerer Taste bestätigen.
  - Das Fadenkreuz auf die rechte untere Ecke des Integrationsbereichs (F1=0.0 F2=0.35) einstellen und mit mittlerer Taste bestätigen.
  - Linke Maustaste drücken und an dem erscheinenden Menu + anklicken. Damit wird der Integrationsbereich so gewählt, daß nur positive Signalanteile integriert werden.

Danach steht in `/u/exp/stan/nmr/lists/roi/` eine Datei `ref13c` mit etwa folgendem Inhalt, wobei durch die Rasterung der Spektren leichte Abweichungen von den eingestellten Werten auftreten:

```
0 0
+ 256 162 186 0.000252 -0.400109
2048 1342 1359 0.450149 0.350557
```

Dieses *region file* kann nun für alle weiteren  $^{13}\text{C}$ -Messungen verwendet werden. Um die Vergleichbarkeit der Integrationswerte nicht zu gefährden, sollte diese Datei nicht mehr verändert werden.

## Integration

1. Laden einer Messung z.B. `a/1`
2. Befehl: `int2d ref13c`

Danach steht in dem Verzeichnis der prozessierten Daten (dort wo auch die zu dem Spektrum gehörende Datei `2rr` steht) die Datei `int2d` mit folgenden Aufbau:

```
Current data set:
Name =          a   ExpNo =      1 ProcNo =      1
User =          mg   Disk  = /u
Baseline = 0      Noise = 0

# SI_F1 row1 row2 row1(ppm) row2(ppm)  Integral  Mode}
  SI_F2 col1 col2 col1(ppm) col2(ppm)}

1   256  162  186   0.00025  -0.40011    1551.4   +
    2048 1342 1359   0.45015   0.35056
```

Das Integral ergab demnach den Wert 1551.4. Man kann dieses Ergebnis auch mit dem Befehl `li` ausgeben. Damit erhält man für die drei Messungen des Beispiels die Werte:

`a/1` : 1551.4

`a/2` : 454.84

`a/3` : 473.54

Da wie bereits angesprochen in XWIN-NMR die Signalamplituden nicht erhöht werden dürfen, müssen nun alle Messungen derjenigen mit dem geringsten Wert angeglichen werden. Das bedeutet in diesem Beispiel daß die Messung `a/1` mit dem Faktor  $454.84/1551.4=0.2932$  und die Messung `a/3` mit dem Faktor  $454.84/473.54=0.9605$  korrigiert werden muß.

### Anbringen von Korrekturfaktoren

Die Funktion `add2d` (XWINNMR-Handbuch Kap. 7.27) erlaubt es, die gewichtete Summe zweier Spektren zu bestimmen. Setzt man den Faktor des zweiten Spektrums auf 0, so kann man damit auch ein einzelnes Spektrum mit einem Faktor versehen. In unserem Beispiel:

1. Lade Messung `a/1`

2. Befehl: `edc2`

In der Eingabemaske als Zweit- und Drittspektrum die bereits geladene Messung selbst nochmal eingeben und durch anklicken von `SAVE` abschließen. Diese Eingabe wird nur als Dummy-Eintrag benötigt.

3. Befehl: `alpha 0.2932`

4. Befehl: `gamma 0.0`

Damit sind die Gewichtungsfaktoren für das erste und zweite Spektrum definiert. Indem `GAMMA` auf 0 gesetzt wird, spielt die Summation des zweiten Spektrums keine Rolle.

5. Befehl: `add2d`

Das aktuell angezeigt Spektrum wird nun mit `ALPHA` multipliziert.

Den gleichen Vorgang wiederholt man nun für die Messung `a/3` und dem Wert `ALPHA=0.9605`.

Vorsicht: Der Befehl `add2d` verändert das gespeicherte Spektrum unwiederruflich.

### Kontrolle der Amplitudenangleichung

Es empfiehlt sich, auf den korrigierten Spektren die Integration erneut wie oben beschrieben mit der gleichen Datei `ref13c` nochmals durchzuführen. Man sollte nun ungefähr den gleichen Wert (im Beispiel 454.84) für alle drei Spektren erhalten. Ist dies nicht der Fall, liegt ein Fehler vor. Leichte Abweichungen der Werte sind jedoch normal, da sowohl die Integralwerte als auch die damit bestimmten Korrekturfaktor gerundet wurden. Ferner arbeitet XWIN-NMR nur mit ganzzahligen Signalwerten, wodurch weitere Rundungsfehler entstehen. Die Abweichungen sollten jedoch unter 1% liegen.

Diese Amplitudenanpassung anhand eines Referenzintegrals muß für die vergleichende Auswertung immer für alle Spektren, die später direkt oder indirekt miteinander verglichen werden sollen, gemeinsam durchgeführt werden. Die Phasen und Basislinienkorrekturen müssen vorher stattfinden, da sie das Ergebnis der Integration beeinflussen. Wird ein Spektrum später nochmals korrigiert, ist diese Anpassung zu wiederholen.

**Tip:** Die Multiplikation kann alternativ auch in AMIX mit Hilfe der Funktion `data = c + (f * data)` aus dem Menu "Spektral algebra" durchgeführt werden (siehe Q26 des AMIX-Tutorial und AMIX-Handbuch Kap. 10.2.12).

## 2. Austausch des T1-Rauschens gestörter Spalten

Die gleiche Probe wird einmal mit BSTFA und einmal mit BSA silyliert und mit identischer Parametrierung gemessen. Dabei verursacht BSTFA bei etwa 0.3 ppm und BSA bei etwa 0.2 ppm ein starkes T1-Rauschen. Da in jeder der beiden Messungen der jeweils andere Bereich ungestört vorliegt, kann man beide Messungen so kombinieren, daß das T1-Rauschen an diesen Positionen vollständig entfällt.

Dazu werden beide Messungen wie oben beschrieben und einander angeglichen. Danach kann man den gestörten Bereich einer der beiden Messungen durch den entsprechenden Bereich der zweiten Messung ersetzen, indem man Spalten der Spektralwertmatrix austauscht. In XWIN-NMR wird dies mit den Befehlen `rsc` (Kap.7.17) und `wsc` (Kap. 7.19) ermöglicht.

Die Idee ist, in der weniger gestörten Messung den Teil zu ersetzen, der in der anderen Messung ungestört sind. Man wählt also zunächst diejenige Messung aus, die in dem Bereich des gemeinsamen T1-Rauschens bei etwa 0.07 ppm den geringsten Störeinfluß hat, da dieser unverändert erhalten bleibt. Danach bestimmt man die Spaltennummern der auszutauschenden Spalten in beiden Spektren. Nun entnimmt man eine Spalte aus dem ersten Spektrum mit `rsc` und fügt sie mit `wsc` in das zweite Spektrum ein. Diesen Vorgang wiederholt man bis der betroffene Bereich vollständig ersetzt ist.

1. Visuelles Entscheiden, welche der Messungen als Grundlage genommen wird und aus welcher nur Teile übernommen werden.
2. Auswahl des zu substituierenden Bereichs. Dazu klickt man bei angezeigtem Spektrum mit der linken Maustaste in das Spektrum. Es erscheint ein Fadenkreuz und ein Fenster in dem die Koordinaten in ppm und Rasterzellen angegeben werden. Damit kann man die vom T1-Rauschen betroffenen Spaltennummern bestimmen.
3. Kopieren der zu verändernden Messung mit `wrpa` (Kap. 5.6.1).
4. Ein Spektrum auswählen, dem eine Spalte entnommen werden soll, und dort den Befehl `rsc` gefolgt von der Spaltennummer ausführen.
5. Das Spektrum, in das die Spalte eingefügt werden soll, auswählen und dort den Befehl `wsc` gefolgt von der Spaltennummer, an der diese Spalte eingefügt werden soll, ausführen.

Diese Position ist nicht notwendigerweise die gleiche, da gleiche ppm-Werte unterschiedliche Spaltennummern aufweisen können.

Die Schritte 4 und 5 wiederholen bis alle zu substituierenden Spalten getauscht sind.

**Beispiel:** S.118 Abb.6.12 HO10FA

Die beiden Ausgangsdatensätze sind B1 (BSTFA) und B2 (BSA). Diese entsprechen den beiden linken Abbildungen auf S.118 zweite Reihe von oben.

**Ausführung:**

1. Das gemeinsame T1-Rauschen bei etwa 0.07ppm ist bei Messung B1 weniger stark ausgeprägt. Also wird diese als Grundlage verwendet.
2. Nur der durch BSTFA gestörte Bereich bei 0.3ppm wird ersetzt. In der Messung B2 liegt die durch BSA verursachte Störung bei 0.21ppm. Man wählt nun einen Bereich, der groß genug ist, um das Rauschen zu enthalten und klein genug ist, um keine anderen Störungen mit zu übernehmen. Im vorliegenden Beispiel sind das die Spalten 1322-1328. In diesem Fall stimmt die Kalibrierung der Messung soweit überein, daß dieser Bereich in beiden Messungen die gleichen Spaltennummern betrifft.
3. Laden der Messung B1 und Kommando `wrpa NEU 1 1`  
Damit liegt eine Kopie der Messung B1 unter dem Namen NEU vor.
4. Laden der Messung B2 und Kommando `rsc 1322`  
Die Spalte 1322 wird nun als 1D Spektrum temporär unter `TEMP 1 1` abgelegt.
5. Laden der Kopie NEU und Kommando `wsc 1322`  
Das temporäre 1D Spektrum `TEMP 1 1` wird in die Spalte 1322 eingefügt.

Wiederholung der Schritte 4 und 5 mit den Spalten 1323-1328.

Damit ist die zweite Reihe (HO10FA) von Abbildung 6.12 fertig. Die Messungen B1 und B2 entsprechen den linken beiden Spektren und das neue substituierte Spektrum NEU 1 1 dem rechten Spektrum. Das Spektrum NEU 1 1 kann nun wie jedes andere Spektrum auch weiter verarbeitet werden.

Vorsicht: Damit ist zwar das Spektrum verändert, nicht aber die FIDs. Eine erneute Prozessierung überschreibt diese Änderungen.

**Anmerkungen für die Praxis**

Diese Methode funktioniert nur bei Messungen mit kompatiblen Achsen. Ist dies nicht der Fall führt der Befehl `wsc` in Schritt 4 zu einer entsprechenden Fehlermeldung.

Die Methode bringt kleinste Nachlässigkeiten bei der Kompensierung von Störeinflüssen deutlich zum Vorschein. Die Kompensierungen der Phasenfehler können mit allen aus dem Routinebetrieb bekannten Mitteln beseitigt werden. Dies sollte jedoch mit besonderer Sorgfalt geschehen. Das gleiche gilt für die Basisebenenkorrektur, da bei der Kombination durch Spaltensubstitution Abweichungen nicht nur zu sichtbaren Stufen im Spektrum führen, sondern auch die Auswertung des Ergebnisses in Frage stellen.

**Tip:** In der Praxis sind drei verschiedene Ursachen für derartige Stufen relevant: Mangelhafte Phasenkorrektur, Basislinienfehler oder allgemeine Signalintensitätsunterschiede. Diese Ursachen lassen sich mit den dafür üblichen Methoden korrigieren. Die Korrektur der Signalintensitätsunterschiede wird dabei durch das Angleichen von Referenzintegralen wie im Kapitel "Angleichen einzelner Spektren" durchgeführt. Treten solche Stufen in Erscheinung, kann man aus ihrer Ausprägung Rückschlüsse darauf ziehen, welche Ursache jeweils vorliegt:

1. Stufen mit sich verändernder Sprunghöhe entlang der F1-Achse lassen auf einen Basislinien- oder Phasenfehler in F1 schließen.
2. Stufen mit gleichmäßiger Sprunghöhe entlang F1 aber ungleicher Höhe an beiden Seiten des Substitutionsbereichs lassen auf einen Basislinien- oder Phasenfehler in F2 schließen. Basislinienfehler entstehen u.a. auch durch nicht vollständig aufgenommene FIDs. In diesem Fall kann eine Extrapolation der FIDs durch linear prediction (siehe Befehle LPfr und LPbr Handbuch Kap. 3.6) zu einem verbesserten Ergebnis führen. Diese muß in allen zu verknüpfenden Messungen gleichermaßen durchgeführt werden, um diese kompatibel zu halten.
3. Beidseits gleichmäßige Stufen lassen auf ein insgesamt schwächeres Signal einer der beiden Messungen schließen. Dies testet man am einfachsten mit Integralen in einem als gleich anzunehmenden, kaum gestörten Bereich wie in Kapitel "Angleichen einzelner Spektren" beschrieben.

Nach dem Korrigieren der Ausgangsspektren ist der Angleich und die Spaltensubstitution wie oben beschrieben erneut durchzuführen. Es macht im allgemeinen keinen Sinn, Phasen- oder Basislinienkorrekturen am bereits substituierten Spektrum vorzunehmen.

**Tip:** Die Substitution einer einzigen Spalte kann als Indikator für die Qualität der durchgeführten Korrekturen verwendet werden, ohne den gesamten Bereich erneut zu substituieren.

**Beispiel:** S.118 Abb.6.12 HO13FA

Die Ausführung ist analog zum vorherigen Beispiel. Die beiden Ausgangssätze sind C1 (BST-FA) und C2 (BSA). Die beiden Messungen entsprechen den linken Abbildungen S.116 unten. Das gemeinsame T1-Rauschen ist in Messung C2 stärker ausgeprägt. Also werden wieder Spalten aus Messung C2 in Messung C1 übertragen.

1. Messung C1 wählen. Eingabe: `wrpa NEU 1 1`
2. Messung C2 wählen. Eingabe: `rsc 1322`
3. Messung NEU 1 1 wählen. Eingabe: `wsc 1322`
4. Wiederholen für 1323-1328.

Die Messung NEU 1 1 entspricht nun der Abbildung S.118 rechts unten.

**Beispiel:** S.118 Abb.6.12 HO13HA

Die Ausführung ist analog zum vorherigen Beispiel. Die beiden Ausgangsdatensätze sind D1 (BST-FA) und D2(BSA). Das gemeinsame T1-Rauschen ist in Messung D1 stärker ausgeprägt. Also werden diesmal Spalten aus Messung D1 in Messung D2 übertragen.

1. Messung D2 wählen. Eingabe: `wrpa NEU 1 1`  
Mit dem Fadenkreuz ermittelt man nun, daß das zu substituierende Rauschen bei 0.19 ppm in den Spalten 1338 bis 1344 liegt.
2. Messung D1 wählen.
3. Eingabe: `rsc 1338` Messung NEU 1 1 wählen.
4. Eingabe: `wsc 1338`
5. Wiederholen für die Spalten 1339-1344.

### 3. Bestimmung gemeinsamer Signalanteile einer Gruppe von Spektren

Im folgenden werden Spektren als reellwertige, zweidimensionale Signalamplituden in Abhängigkeit zweier Frequenzen betrachtet. Die Idee ist nun, zu jeder Frequenzpaarung diejenige Signalamplitude zu bestimmen, die in jeder der Messungen mindestens erreicht wird. Das entspricht dem punktweisen Minimum aller Spektren der betreffenden Gruppe, bzw. dem maximalen gemeinsamen Signalanteil.

Zunächst müssen die betreffenden Spektren, wie in Teil 1 beschrieben, angeglichen werden. Wir betrachten zunächst den Fall für zwei Spektren deren punktweises Minimum zu bestimmen ist. Da das punktweise Minimum in dieser Form in den Programmen XWIN-NMR und AMIX nicht implementiert ist, muß diese Funktion durch die geeignete Kombination anderer Funktionen erreicht werden. Das Minimum zweier positiven Zahlen  $a$  und  $b$  läßt sich auch als

$$\min(a, b) = a - \text{pos}(a - b) \tag{A.1}$$

darstellen, wobei  $pos(x) = 0$  für  $x < 0$  und  $pos(x) = x$  für  $x > 0$  gilt. Die Funktion  $pos()$  ist in AMIX in Form der Funktion `delete negative` implementiert (AMIX-Handbuch Kap. 10.3 S.134). Die einfache Differenz zweier Spektren ist im AMIX-Tutorial als Übungsaufgabe Q.26 S.272 beschrieben. Durch geeignete Kombination dieser Funktionen läßt sich Gleichung (1) realisieren.

**Vorsicht:** Da die Funktion `add2d` in XWIN-NMR die Achsenkalibrierung nicht berücksichtigt, sondern immer auf Matrixpositionen gleicher Zeilen und Spaltennummern operiert, darf diese Funktion hier nicht angewandt werden.

### Löschen negativer Signalanteile

Dazu wird in 2D/AMIX der Menüpunkt `Präparation` gewählt. Über das Menü `File-Select a NMR data set` wird die jeweilige Messung ausgewählt. Danach wird rechts die Funktion `delete negative` aktiviert (AMIX-Handbuch Kap. 10.3 S.134) und links unten im Spektrum die linke Maustaste und anschließend rechts oben im Spektrum die rechte Maustaste gedrückt. Dadurch wurde die gesamte Fläche des Spektrums als zu manipulierendes Gebiet gewählt. Alle negativen Signalanteile sind nun auf 0 gesetzt. Das zunächst nur im Arbeitsspeicher manipulierte Spektrum kann nun über die Funktion `memory-->2rr` (AMIX-Handbuch Kap. 10.3 S.136) als Realteil des Spektrums zurückgeschrieben werden. Die Sicherheitsanfrage `save dataset before overwriting it ?` sollte mit `Yes` quittiert werden. Der anschließend vorgeschlagene Name für die Sicherungskopie kann mit `OK` übernommen werden. Man kann nun das Spektrum erneut in XWIN-NMR laden. Bei korrekter Ausführung erkennt man nun besonders an den großen Artefakten das Fehlen der negativen Bereiche.

---

**Beispiel:** S.153 Abb.7.11

Die Angleichung der drei Spektren a/1, a/2 und a/3 wurde bereits in Teil 1 beschrieben. Ausgehend von diesen angeglichenen Spektren soll hier nun exemplarisch die Bestimmung der gemeinsamen Signalanteile durchgeführt werden. Die in Teil 1 angeglichenen Spektren (a/1, a/2 und a/3) werden der Einfachheit halber mit Spektrum A, B und C bezeichnet.

### Minimum von A und B

1. Die negativen Signalanteile aller drei Spektren wie eben beschrieben löschen.
2. Die Differenz von Spektrum A und B wie in der Übungsaufgabe Q.26 des AMIX-Tutorial beschrieben bestimmen.
3. In der in Schritt 2 bestimmten Differenz A-B werden nun wie bereits in Schritt 1 die negativen Signalanteile auf 0 gesetzt bzw. gelöscht ( $pos(A-B)$ ).
4. Die eben ermittelten positiven Signalanteile der Differenz von A und B werden nun von A abgezogen (siehe Tutorial Q.26).

Das Resultat entspricht  $A - \text{pos}(A-B)$  und damit nach Gleichung A.1 dem Minimum  $\min(A,B)$  beider Spektren. Dieses Zwischenergebnis ist nicht in der Arbeit abgebildet.

### Minimum von A, B und C

Das Minimum mehrerer Spektren läßt sich einfach durch mehrfache Minimumbildung bestimmen. Für  $n$  Spektren müssen  $n-1$  duale Minimumoperationen nach obigem Schema durchgeführt werden. In diesem Fall ergibt sich  $\min(A,B,C)$  aus  $\min(C, \min(A,B))$  das Minimum aller drei Spektren ergibt sich also aus dem Minimum des dritten Spektrums und dem Minimums der ersten beiden Spektren.

1. Differenz aus C und  $\min(A,B)$  bestimmen.
2. Negative Anteile dieser Differenz löschen. Man erhält  $\text{pos}(C - \min(A,B))$ .
3. Differenz aus C und  $\text{pos}(C - \min(A,B))$  bestimmen. Diese Differenz entspricht nun dem Minimum aller drei Spektren  $\min(A,B,C)$  und damit bei den im Beispiel angegebenen Messungen dem Minimumspektrum rechts in Abb. 7.11 auf Seite 153.

Auf diese Art lassen sich schrittweise die Minima beliebig vieler vergleichbarer Spektren ermitteln. Durch Rundungsfehler bei der Zuordnung korrespondierender Zellen der Spektralmatrizen kann es vorkommen, daß AMIX im Bereich stark un stetiger Signalverläufe im Minimumspektrum negative Werte ermittelt, die theoretisch nicht vorkommen dürften. Dies tritt jedoch nur in den Bereichen auf, die ohnehin von Artefakten stark gestört sind.

## 4. Differenzbildung zwischen einem Spektrum und den gemeinsamen Signalanteilen

Nachdem in Teil 3 die gemeinsamen Signalanteile bestimmt wurden, besteht die Bestimmung der spezifischen Signalanteile nur noch aus der Differenzbildung zwischen den ursprünglichen Spektren und dem in Teil 3 ermittelten Minimum. Diese einfache Differenzbildung wurde bereits in Teil 3 angewandt und ist im Tutorial des AMIX-Manuals eingehend beschrieben.

**Beispiel:** S.153 Abb.7.11

Die Abbildungen der mittleren Spalte ergeben sich aus der Differenz des jeweiligen Spektrums mit dem in Teil 3 beschriebenen Minimum aller drei Spektren also  $A - \min(A,B,C)$ ,  $B - \min(A,B,C)$  und  $C - \min(A,B,C)$ .



## 5. Kombinierte Anwendungen

Nachdem in Teil 1 eine Gruppe von Spektren einander angeglichen wurden, konnte in Teil 3 das Minimum dieser Messungen bestimmt werden, um damit in Teil 4 Spezifika der einzelnen Messungen zu ermitteln. Liegt nun eine oder mehrere der Messungen mit identischer Parametrierung und unterschiedlichem Silylierungsmittel vor, so kann zusätzlich auch die in Teil 2 beschriebene Methode der Spaltensubstitution durchgeführt werden. Als Beispiel einer kombinierten Anwendung aller vier Methoden kann Abbildung 7.10 auf Seite 152 betrachtet werden. Dabei wurden die in den Teilen 1 bis 4 beschriebenen Methoden in dieser Reihenfolge angewandt.

---

**Beispiel:** S.152 Abb.7.10

Die Abbildungen der linken Spalte entsprechen den Abbildungen der rechten Spalte in Abb. 6.12 Seite 118. Die Ausgangsmessungen sind dabei:

D1 (BS1HA mit BSTFA) sowie D2 (BS1HA mit BSA)

D3 (HO13HA mit BSTFA) sowie D4 (HO13HA mit BSA)

D5 (SUWHA mit BSTFA) sowie D6 (SUWHA mit BSA)

1. **Angleich:** Zunächst werden alle sechs Spektren kompatibel prozessiert und Phasen- sowie Basislinienkorrekturen durchgeführt. Danach werden die Spektren wie in Teil 1 beschrieben anhand eines Referenzintegrals angeglichen. Für  $^{29}\text{Si}$ -Messungen wurde einheitlich der Bereich F1 29 bis 21ppm und F2 0.45 bis 0.35ppm verwendet.
2. **Spaltensubstitution:** Die Spektren werden paarweise, also jeweils die Messung der gleichen Probe einmal mit BSTFA und einmal mit BSA, zu einer weniger gestörten Messung vereinigt. Dies geschieht analog zu den Beispielen in Teil 2.
  - **BS1HA:** D1 und D2 Substitution der Spalten 1322-1328 in der ersten Messung. Besonderheit: In der zweiten Messung entspricht 0.3ppm nicht wie bisher der Spalte 1325 sondern 1368. Dies kann mit dem Fadenkreuz (linke Maustaste) im Spektrum nachgemessen werden. Man fügt also die Spalten 1365-1371 der zweiten Messung an den Positionen 1322-1328 der ersten Messung ein. Ansonsten analog zu den drei Beispielen aus Teil 2.
  - **SUWHA:** D5 und D6 Substitution der Spalten 1322-1328 in der ersten Messung. Besonderheit: Da das T1-Rauschen hier etwas breiter ist, kann man ggf. den zu substituierenden Spaltenbereich auf 1320-1330 vergrößern. Ansonsten gilt wieder das gleiche Vorgehen wie in den Beispielen aus Teil 2.
  - **HO13HA:** Bei diesen Messungen treten keinerlei Besonderheiten auf. Vorgehen genau analog zu Teil 2.

Die Substitutionen ergeben die drei Abbildungen der linken Spalte in Abb. 7.10

3. **Schritt 3 (Minimum):** Das Minimum dieser drei substituierten Spektren kann nun analog zu dem Beispiel in Teil 3 ermittelt werden. Man erhält das Minimumspektrum rechts in Abb. 7.10.
4. **Schritt 4 (Spezifika):** Die mittlere Spalte in Abbildung 7.10 ermittelt man durch einfache Differenzbildung der in Schritt 2 erstellten substituierten Spektren mit dem in Schritt 3 erstellten Minimum.

## **Anhang B**

# **Chemische Verschiebung der Modellsubstanzen**

Tabelle B.1: Chemische Verschiebung silylierter Modellverbindungen - Carbonsäuren

Ausgangssubstanz	$\delta(^1\text{H})$	$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^{29}\text{Si})$
aliphatische Carboxylgruppen			
Cholsäure	0.280	-0.38	24.81
(S)-(+)-Glutamin	0.281	-0.31	24.12
Brenztraubensäure	0.360	-0.49	28.91
Cyclohexancarbonsäure	0.257	-0.27	22.61
Äpfelsäure	0.287	-0.27	24.25
	0.300	-0.38	25.58
L-Milchsäure	0.295	-0.34	24.83
DL-Cystein	0.315	-0.35	25.8
DL-Serin	0.275	-0.31	23.68
Lysin	0.272	-0.32	23.51
meso-Butan-1,2,3,4-tetracarbonsäure	0.275	-0.33	24.45
	0.283	-0.30	25.39
R(-)Mandelsäure	0.200	-0.52	25.59
Tetrahydrofuran-2,3,4,5-tetracarbonsäure	0.300	-0.41	26.45
	0.320	-0.38	26.96
trans-DL-1,2-Cyclopentandicarbonsäure	0.274	-0.3	23.87
n-Propionsäure	0.270	-0.25	22.94
L(+)-Weinsäure	0.325	-0.25	25.95
Glucarsäurelacton	0.315	-0.09	25.42
3-Hydroxybuttersäure	0.264	-0.26	22.87
aromatische Carboxylgruppen			
Anthrachinon-2-carbonsäure	0.460	-0.22	26.83
Benzoessäure	0.383	-0.24	24.60
Vanillinsäure	0.38	-0.2	24.1
Salicylsäure	0.376	-0.07	23.73
Syringylsäure	0.41	-0.16	24.5
Phthalsäure	0.384	-0.28	25.63
Carminsäure	0.408	-0.29	26.10
ungesättigte Säuren			
Kaffeesäure	0.33	-0.2	24.1

Tabelle B.2: Chemische Verschiebung silylierter Modellverbindungen - Aliphatische Alkohole. a Die  $\delta(^{13}\text{C})$  und  $\delta(^{29}\text{Si})$  Signale können wegen ihrer gleichen  $\delta(^1\text{H})$ -Werten nicht zugeordnet werden.

Ausgangssubstanz	$\delta(^1\text{H})$	$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^{29}\text{Si})$
primäre Hydroxylgruppen			
1-Butanol	0.081	-0.44	16.07
1,4 Butandiol	0.101	-0.45	16.07
1,3 Butandiol	0.085	-0.47	16.25
1,2 Propandiol	0.090	-0.44	17.11
DL-Serin	0.086	-0.57	18.15
Carminsäure	0.006	-0.26	17.82
Sucrose C6'	0.115	-0.16	17.49
Sucrose	0.125	-0.19	a
Sucrose	0.125	-0.00	a
Sucrose	0.125	a	17.22
Sucrose	0.125	a	18.32
Glucose	0.100	-0.09	17.47
sekundäre Hydroxylgruppen			
Cholsäure	0.138	1.11	12.29
	0.109	0.74	12.61
	0.088	0.58	13.01
Äpfelsäure	0.138	-0.07	20.18
3-Hydroxy-2-butanon	0.132	-0.04	17.99
2-Methyl-2,4-pentandiol	0.160	0.59	16.79
L-Milchsäure	0.135	-0.08	18.59
Isopropanol	0.084	0.19	13.69
1,3 Butandiol	0.10	0.3	14.6
1,2 Propandiol	0.094	0.30	15.12
Mandelsäure	0.124	-0.09	20.20
L(+)-Weinsäure	0.126	0.2	21.10
3-Hydroxybuttersäure	0.093	0.27	15.24
Carminsäure	-0.161	0.8	16.91
	0.21	1.06	18.13
	0.21	1.57	17.93
Glucarsäurelacton	0.209	0.34	21.73
	0.147	0.07	21.38
	0.144	-0.17	21.99

Ausgangssubstanz	$\delta(^1\text{H})$	$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^{29}\text{Si})$
Sucrose C3	0.143	1.31	17.56
C4'	0.147	0.81	18.29
C4	0.163	0.40	17.45
C2	0.170	1.02	17.53
C3'	0.170	0.57	17.98
Glucose C2	0.142	0.44	17.24
C3	0.151	1.36	17.55
C1	0.160	0.17	17.55
C4	0.163	0.97	18.03
tertiäre Hydroxylgruppen			
tert-Butanol	0.091	2.63	6.84
2-Methyl-2,4-pentandiol	0.100	2.68	13.55
iso-Amylalkohol	0.089	2.63	6.60

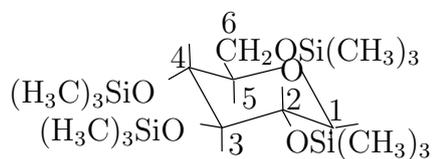
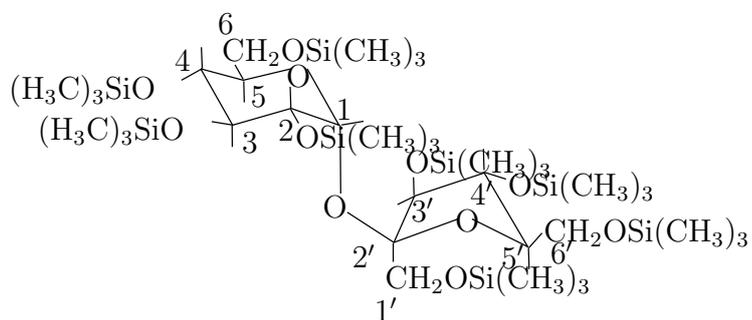


Tabelle B.3: Chemische Verschiebung silylierter Modellverbindungen - Phenole

Ausgangssubstanz	$\delta(^1\text{H})$	$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^{29}\text{Si})$
Phenol	0.240	0.18	18.96
Vanillinsäure	0.25	0.37	21.6
Salicylsäure	0.264	0.27	20.83
Syringylsäure	0.24	0.42	22.52
Carminsäure	0.243	0.83	22.88
	0.326	0.69	25.10
	0.371	0.29	24.53
Kaffeesäure	0.26	0.34	21.30
	0.26	0.34	21.48

Tabelle B.4: Chemische Verschiebung silylierter Modellverbindungen - Amine, Amide

Ausgangssubstanz	$\delta(^1\text{H})$	$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^{29}\text{Si})$
(S)-(+)-Glutamin	0.216	-0.67	4.91
	0.032	0.08	4.50
DL-Cystein	0.072	0.21	5.10
DL-Serin	0.040	0.18	4.28
Lysin	0.010	0.13	2.51
	0.029	0.18	3.70

Tabelle B.5: Chemische Verschiebung silylierter Modellverbindungen - Aliphatische Alkohole

Ausgangssubstanz	$\delta(^1\text{H})$	$\delta(^{13}\text{C})$
primäre Hydroxylgruppen		
1-Butanol	3.80	61.78
1,4 Butandiol	3.68	63.70
1,3 Butandiol	3.22	60.80
1,2 Propandiol	3.64	68.67
Carminsäure	3.41	60.58
Sucrose	3.50	61.40
	3.27	63.03
	3.70	63.25
Glucose	3.74	61.95
sekundäre Hydroxylgruppen		
Cholsäure	3.93	72.50
	3.83	68.00
	3.46	71.60
Äpfelsäure	4.93	67.80
3-Hydroxy-2-butanon	4.21	73.10
2-Methyl-2,4-pentandiol	4.00	65.50
L-Milchsäure	4.34	66.55
Isopropanol	4.07	63.47
1,3 Butandiol	3.43	67.05
1,2 Propandiol	3.74	69.32
Mandelsäure	3.65	73.77
L(+)-Weinsäure	4.51	73.06
3-Hydroxybuttersäure	4.32	64.22
Carminsäure	4.11	74.80
	3.04	73.50
	2.79	72.52
Glucarsäurelacton	4.95	69.76
	4.81	76.16
	4.55	75.74



Ausgangssubstanz	$\delta(^1\text{H})$	$\delta(^{13}\text{C})$
Sucrose	3.04	70.50
	3.48	73.72
	3.00	72.47
	4.00	79.00
	4.25	75.90
D-Glucose	3.57	69.46
	3.64	72.61
	3.53	71.87
	4.84	94.56

# Anhang C

## Integrale der NMR-Spektren

Tabelle C.1: Integrale der Einpuls-<sup>1</sup>H-NMR-Spektren von HS in DMSO-d<sub>6</sub>

Substanz	16.0-11.5 ppm	11.5-6.0 ppm	6.0-2.0 ppm	2.0-0.5 ppm
	COOH	C <sub>ar</sub> -OH, C <sub>ar</sub> -H	H-C-O, C <sub>alk</sub> -OH, α-CH <sub>n</sub>	CH <sub>n</sub>
BS1FA	10	25	50	15
HO10FA	9	26	50	15
FG1FA	8	12	44	36
HO13FA	10	25	48	17
BS1HA	8	23	55	14
HO13HA	8	23	50	19
MPDOM	9	23	49	19
SUWFA	10	19	48	23
SUWHA	9	27	48	16
SCHEYFA3	6	21	53	20
BOUZFA3	4	21	55	20

Tabelle C.2: Integrale der Einpuls- $^1\text{H}$ -NMR-Spektren (erster Wert) und Spektren mit Vorsättigung (zweiter Wert) von HS in 0.1 M NaOD-Lösung in %

Substanz	9.0-6.0 ppm	6.0-3.2 ppm	3.2-2.0 ppm	2.0-0.5 ppm
	$C_{ar}\text{-H}$	H-C-O	$\alpha\text{-CH}_n$	$\text{CH}_n$
BS1FA	14	40	24	22
	11	40	26	23
HO10FA	16	35	26	23
	11	35	27	26
FG1FA	7	18	28	47
	3	15	28	54
HO13FA	14	36	27	23
	13	33	30	24
BS1HA	20	42	18	20
	16	45	19	21
HO13HA	18	41	18	23
	14	39	23	24
MPDOM	11	38	25	26
	9	36	28	28
SUWFA	11	28	29	32
	8	28	31	32
SUWHA	18	36	24	22
	16	36	27	22
SCHEYFA3	11	48	18	22
	9	48	18	25
BOUZFA3	14	45	18	23
	10	46	19	25

Tabelle C.3: Protonenverteilung durch Differenzbildung der Integrale von Einpuls- $^1\text{H}$ -NMR-Spektren in  $\text{DMSO-d}_6$  und Einpuls- $^1\text{H}$ -NMR-Spektren in  $\text{NaOD}$  (obere Werte) und  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren mit Vorsättigung in  $\text{NaOD}$  (untere Werte) erhaltene Anteile der HS-Protonen

Substanz	COOH	$C_{ar}\text{-OH}$	$C_{ar}\text{-H}$	$C_{alk}\text{-OH}$	H-C-O	$\alpha\text{-CH}_n$	$\text{CH}_n$
BS1FA	10	14	10	4	29	17	15
	10	17	7	6	27	18	15
HO10FA	9	16	10	10	23	17	15
	9	20	6	14	20	16	15
FG1FA	8	7	5	8	14	22	36
	8	10	2	15	10	19	36
HO13FA	10	15	10	1	27	20	17
	10	16	9	4	23	21	17
BS1HA	8	9	14	12	30	13	14
	8	13	10	12	29	13	14
HO13HA	8	8	15	1	34	15	19
	8	12	11	1	31	18	19
MPDOM	9	15	8	4	27	18	19
	9	17	6	7	24	19	19
SUWFA	10	11	8	7	20	21	23
	10	14	6	7	20	22	23
SUWHA	9	14	13	4	26	7	16
	9	16	11	4	25	19	16
SCHEYFA3	6	11	10	-5	42	16	20
	6	14	7	2	38	14	20
BOUZFA3	4	8	12	-2	40	16	20
	4	13	8	3	37	15	20

Tabelle C.4: Anteil der austauschenden Protonen an den Gesamtprotonen in [%] errechnet aus den verschiedenen Experimenten.

Substanz	Einpulsverfahren	Vorsättigungsexperiment
BS1FA	28	33
HO10FA	35	43
FG1FA	23	33
HO13FA	26	30
BS1HA	29	33
HO13HA	17	21
MPDOM	28	33
SUWFA	28	31
SUWHA	27	29
SCHEYFA3	12	22
BOUZFA3	10	20

Tabelle C.5: Verhältnisse der funktionellen Gruppen in [%] berechnet aus den verschiedenen NMR-Techniken

Substanz	Verhältnis COOH / C <sub>ar</sub> -OH / C <sub>alk</sub> -OH					
	Einpulsverfahren			Vorsättigungsexperiment		
BS1FA	36	50	14	30	52	18
HO10FA	26	45	29	21	46	33
FG1FA	35	30	35	25	30	45
HO13FA	38	58	4	33	54	13
BS1HA	28	31	41	24	40	36
HO13HA	47	47	6	38	57	5
MPDOM	32	54	14	27	52	21
SUWFA	36	39	25	32	45	23
SUWHA	33	52	15	31	55	14
SCHEYFA3	–	–	–	27	64	9
BOUZFA3	–	–	–	20	65	15

Tabelle C.6: Integrale der  $^{29}\text{Si}$ -INEPT-Spektren

Substanz	31.0-22.5 ppm	22.5-18.5 ppm	18.5-16.0 ppm	16.0-12.0 ppm
BS1FA	73	18	8	1
HO10FA	75	20	5	0
FG1FA	59	20	10	11
HO13FA	61	22	10	7
BS1HA	61	28	10	1
HO13HA	48	28	17	7
MPDOM	52	23	14	11
SUWFA	61	21	10	8
SUWHA	64	22	10	4

Tabelle C.7: Integrale der invers-gated-entkoppelten  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren

Substanz	1.7-0.0 ppm	0.0- -0.65 ppm
BS1FA	44	56
HO10FA	52	48
FG1FA	56	44
HO13FA	54	46
BS1HA	54	46
HO13HA	66	34
MPDOM	56	44
SUWFA	52	48
SUWHA	61	39

Tabelle C.8: Integrale der 2D-NMR-Spektren. Die jeweils obere Zeile enthält die Integrale der  ${}^2J({}^1\text{H}, {}^{29}\text{Si})$ -NMR-Spektren, die jeweils untere Zeile enthält die Integrale der  ${}^1J({}^1\text{H}, {}^{13}\text{C})$ -NMR-Spektren

Substanz	$C_{ar}\text{-COOH}$	$C_{alk}\text{-COOH}$	$C_{ar}\text{-OH}$	$C_{alk}\text{-OH}$
BS1FA	28	44	3	25
	1			1.71
FG1FA	14	78	7	1
	1			0.08
HO10FA	21	54	8	17
	1			2.02
HO13FA	28	48	8	16
	1			1.39
BS1HA	29	34	7	30
	1			1.86
HO13HA	24	36	11	29
	1			2.14
MPDOM	22	44	10	24
	1			1.49
SUWFA	21	53	9	17
	1			1.58
SUWHA	31	36	14	19
	1			1.66

# Anhang D

## Begriffe, Abkürzungen und Symbole

Tabelle D.1: Abkürzungen

$\gamma$		gyromagnetisches Verhältnis
$\rho$		Dichte-Operator
$\sigma$		reduzierter Dichte-Operator
$\omega_0$		Larmor-Frequenz der um die $z$ -Achse präzedierenden Kerne
$\omega_1$		Erste Frequenzdomäne im 2D-NMR-Spektrum, durch Fourier-Transformation über $t_1$ erhalten
$\omega_2$		Zweite Frequenzdomäne
1 D		eindimensional
2 D		zweidimensional
Akquisition		Aufnahme des NMR-Signals, in 2D-Experimenten findet sie in der $t_2$ -Zeit statt
Antiphase		Multipllettstruktur mit entgegengesetzter Phase, Multipllettlinien mit Vorzeichenwechsel
$B_0$		statisches Magnetfeld, konventionsgemäß entlang der $z$ -Achse orientiert
chemische Verschiebung $\delta$		Differenz zwischen der Präzessionsfrequenz des Kerns und der Frequenz eines Standards, bezogen auf die Trägerfrequenz
COSY		Correlated Spectroscopy
CPD		Composite Pulse Decoupling
CPMAS		Cross Polarization Magic Angle Spinning
DEPT		Distortionless Enhancement by Polarization Transfer



Dichtematrix	Sie beschreibt den Zustand eines quantenmechanischen Objekts
Delay	Zeitspanne
DOC	Dissolved Organic Matter
DQC	Double Quantum Coherence, Doppelquantenkohärenz
$F_1, F_2$	Frequenzachsen
Faltung (Convolution)	Mathematische Operation: $F * G = \int_{-\infty}^{+\infty} F(x - y)G(y)dy$ Sie ist für die NMR-Spektroskopie aufgrund der Beziehung $F * G = F(f \cdot g)$ von Bedeutung, wobei $F(f)$ die Fourier-Transformierte von $f$ ist. D.h. die Fourier-Transformierte des Produkts zweier Funktionen ist die Faltung der Fourier-Transformierten dieser Funktionen
FA	Fulvic Acid (Fulvinsäure)
FID	Free Induction Decay, das aufgenommene NMR-Signal
Fourier-Transformation	”Rechenvorschrift“, um die in einer zeitlich veränderlichen Funktion enthaltenen Frequenzen zu bestimmen
gs	gradient spectroscopy
$\mathcal{H}$	Hamiltonoperator
HA	Humic Acid (Huminsäure)
HETCOR	HETeronuclear CORrelation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HS	Humic Substance (Huminstoff)
I	Drehimpuls- oder Kernspin-Quantenzahl
INEPT	Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer
Inphase	Multipllettstruktur mit gleicher Phase, Multipllettlinien ohne Vorzeichenwechsel
inverse Techniken	Bezeichnung für heteronukleare Experimente, die den Heterokern indirekt über Protonenmagnetisierung detektieren.
${}^nJ$	Kopplungskonstante über n Bindungen
Kohärenz	Sie entspricht einem Übergang zwischen zwei Eigenzuständen und ist eine Erweiterung des Ausdrucks ”transversale Magnetisierung“, der sich nur auf erlaubte Übergänge bezieht. Quantenmechanisch gesehen entspricht eine Kohärenz einem Nicht-Diagonal-Element in der Spin-Dichtematrix.

Kohärenzordnung $p$	Differenz $\Delta M$ der magnetischen Quantenzahlen zweier an einer Kohärenz beteiligten Energieniveaus
Kohärenz-Transfer	Übertragung der Kohärenz von einem Kern auf einen anderen
Kohärenz-Transferweg	Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der Kohärenzordnung in einer Pulssequenz
Korrelationszeit	Die Korrelationszeit $\tau_c$ gibt die mittlere Zeitdauer der molekularen Umorientierung wieder, die Ursache für die Relaxation ist
LC	Liquid Chromatography (Flüssigkeitschromatographie)
longitudinale Magnetisierung	Magnetisierung in Richtung des $B_0$ -Feldes
M	Magnetquantenzahl
MQC	Multi Quantum Coherence, Mehrquantenkohärenz
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
Nullpunktfüllen	Anhängen von Nullen an den FID zur Verbesserung der digitalen Auflösung
PEP	Preservation of Equivalent Pathways
PFG	Pulsed Field Gradient
$pK_a$	Aziditätskonstante
Produktoperatoren	Satz zueinander orthogonaler Operatoren, die durch die Produktbildung miteinander verknüpft werden können
Produktoperatorformalismus	Formalismus zur Beschreibung von NMR-Experimenten, der hohe Anschaulichkeit mit großer Anwendungsbreite verbindet
Puls	Anlegen eines nur für kurze Zeit erzeugten, hochfrequenten (im Radiofrequenzbereich liegenden) zusätzlichen Magnetfeldes, um einen Übergang anzuregen.
Pulssequenz	Abfolge von Radiofrequenzpulsen und Zeiten freier Evolution mit anschließender Detektion der entstandenen Magnetisierung
PSD	Phase Sensitive Detection
Quadraturdetektion	Verfahren zur Detektion von NMR-Signalen, das es gestattet, Vorzeichen von Frequenzen zu unterscheiden
RIDE	ring down elimination
rf	radio frequency
ROESY	Rotating frame Overhauser Enhancement Spectroscopy

Scan	Einmaliger Ablauf eines NMR-Experimentes
schwache Kopplung	Die Kopplungskonstante $J$ für die Kopplung zwischen zwei Spins ist klein gegenüber der Differenz ihrer chemischen Verschiebungen
skalare Kopplung	Wechselwirkung zwischen zwei Spins, die durch die Bindung vermittelt wird, auch $J$ -Kopplung genannt. Sie ist skalar, d. h. orientierungsunabhängig, und bewirkt die Multiplettaufspaltung der Signale.
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis
SQC	Single Quantum Coherence, Einquantenkohärenz
$t_1$	Inkrementierte Zeit, die in 2D-NMR-Experimenten nach der Fourier-Transformation die erste Frequenzdomäne ergibt
$t_2$	Detektionszeit, ergibt nach der Fourier-Transformation die zweite Frequenzdomäne
$t_1$ -Rauschen	In 2D-NMR-Experimenten parallel zur $\omega_1$ -Achse auftretendes Rauschen, das besonders dort beobachtet, wo intensive Signale auftreten
$T_1$	longitudinale oder Spin-Gitter-Relaxationszeit
$T_2$	transversale oder Spin-Spin-Relaxationszeit
$t_R$	Retentionszeit
TOCSY	TOtal COrrelation Spectroscopy
TPPI	Time Proportional Phase Incrementation
transversale Magnetisierung	Magnetisierung in der $x, y$ -Ebene
WATERGATE	WATER suppression by GrAdient Tailored Excitation
Weitbereichskopplung	Skalare Kopplung über mehrere Bindungen
ZQC	Zero Quantum Coherence, Nullquantenkohärenz

# Anhang E

## Liste der verwendeten Substanzen

Tabelle E.1: Verwendete Substanzen

### Modellsubstanzen

Cholsäure	Fluka, Neu-Ulm
(S)-(+)-Glutamin	Merck, Darmstadt
Brenztraubensäure	Merck, Darmstadt
Cyclohexancarbonsäure	Merck, Darmstadt
Äpfelsäure	Merck, Darmstadt
L-Milchsäure	Aldrich, Steinheim
DL-Cystein	Aldrich, Steinheim
DL-Serin	Merck, Darmstadt
Lysin	Merck, Darmstadt
meso-Butan-1,2,3,4-tetracarbonsäure	Aldrich, Steinheim
R(-)Mandelsäure	Merck, Darmstadt
Tetrahydrofuran-2,3,4,5-tetracarbonsäure	Aldrich, Steinheim
trans-DL-1,2-Cyclopentandicarbonsäure	Aldrich, Steinheim
n-Propionsäure	Merck, Darmstadt
L(+)-Weinsäure	Merck, Darmstadt
D-Glucarsäure-1,4-lacton	Aldrich, Steinheim
3-Hydroxybuttersäure	Merck, Darmstadt
Anthrachinon-2-carbonsäure	Aldrich, Steinheim
Benzoessäure	Merck, Darmstadt
Vanillinsäure	Sigma, St. Louis (US)
Salicylsäure	Merck, Darmstadt

Syringylsäure	Sigma, St. Louis (US)
Phthalsäure	Merck, Darmstadt
Carminsäure	Aldrich, Steinheim
Kaffeesäure	Merck, Darmstadt
1-Butanol	Merck, Darmstadt
1,4 Butandiol	Merck, Darmstadt
1,3 Butandiol	Merck, Darmstadt
1,2 Propandiol	Merck, Darmstadt
Saccharose	Haushaltszucker
3-Hydroxy-2-butanon	Merck, Darmstadt
2-Methyl-2,4-pentandiol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
tert-Butanol	Merck, Darmstadt
tert-Amylalkohol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
$\alpha$ -D-(+)-Glucose	Aldrich, Steinheim
Styrol und Polystyrol-Standards	Fluka, Neu-Ulm
TMS-Phenol	Fluka, Neu-Ulm

### Silylierungsreagenzien

Hexamethyldisilazan HMDS	Fluka, Neu-Ulm
Trimethylchlorosilan TMCS	Fluka, Neu-Ulm
N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid BSA	Fluka, Neu-Ulm
N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid BSTFA	Fluka, Neu-Ulm
N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid MSTFA	Fluka, Neu-Ulm
N-Trimethylsilyldiethylamin TMSDEA	Fluka, Neu-Ulm
1-(Trimethylsilyl)imidazol TMSIM	Fluka, Neu-Ulm
Trimethylsilyliodsilan TMIS	Fluka, Neu-Ulm

### Lösungsmittel

CDCl <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt, Aldrich, Steinheim
CDCl <sub>3</sub> für LC-NMR	euriso-top, Saint Aubin Cedex (F)
Dimethylsulfoxid DMSO-d <sub>6</sub>	Merck, Darmstadt, Aldrich, Steinheim
Pyridin-d <sub>5</sub>	Merck, Darmstadt, Aldrich, Steinheim
N,N-Dimethylformamid DMF-d <sub>7</sub>	Merck, Darmstadt, Aldrich, Steinheim

Tabelle E.2: Verwendete Huminstoffe

Bezeichnung	Herkunft	Quelle	Isolations- verfahren
BS1FA, BS1HA	Bodensickerwasser Bayreuth	ROSIG-Projekt, DFG	1
HO10FA	Hohlohsee Schwarzwald Probennahme: Okt. 94	ROSIG-Projekt, DFG	1
HO13FA, HO13HA	Hohlohsee Schwarzwald Probennahme: Aug. 96	ROSIG-Projekt, DFG	1
FG1FA	Grundwasser Fuhrberg/Hannover	ROSIG-Projekt, DFG	1
SUWFA, SUWHA	Suwannee-Fluß South Georgia, USA	IHSS	2
MPDOM	Suwannee-Fluß South Georgia, USA	M. Perdue, Georgia, USA	3
SCHEYFA3	tiefgründige Braunerde (loamy brown soil) Ap Horizont, 0-20 cm Klostergut Scheyern, Bayern [166]	Ph. Schmitt-Kopplin, IÖC-Attaching	4
BOUZFA3	Pseudogley (wet prairie pseudogley) Versuchsgut Bouzule, Nancy, Frankreich [166]	Ph. Schmitt-Kopplin, IÖC-Attaching	4

### Isolations-/Extraktionsverfahren:

1. Standardreferenz-Proben des ROSIG-Projektes wurden in Anlehnung an das IHSS-XAD8-Standardverfahren isoliert [77]. Die angewandte, leicht variierte Methode verwendet XAD8-Material und ein Kationenaustauscherharz ([3]). Die filtrierten Proben wurden vor der Adsorption auf dem Harz auf pH 2 angesäuert. Die auf der XAD8-Säule adsorbierten HS wurden mit 0.2 M NaOH desorbiert. Ansäuern des Extraktes auf pH 2 führt zur Ausfällung der HA-Fraktion. Die HA-Fraktion wird abfiltriert. Zusätzlich zu dem Basis-Isolationsverfahren wurde die angesäuerte desorbierte Lösung ein zweites Mal auf der gespülten XAD8-Säule adsorbiert. Die Säule wurde mit 0.01 M HCl und anschließend mit destilliertem Wasser gespült, um den größten Teil der Chlorid-Ionen zu entfernen. Die adsorbierte FA wurde mit 0.2 M NaOH eluiert und der Eluent wurde mittels eines Kationenaustauscherharzes in die protonierte Form überführt. Abschließend wurde die resultierende Lösung gefriergetrocknet.
2. Das IHSS-Verfahren zur Isolation von aquatischen HS ist in [www.ihss.gatech.edu](http://www.ihss.gatech.edu) beschrieben.
  - (a) Wasser mit einer 0.45  $\mu\text{m}$  Silber- oder Polymermembran filtrieren.
  - (b) Mit HCl pH 2 einstellen.
  - (c) Lösung auf XAD8-Säule bringen.
  - (d) HA und FA mit 0.1 M NaOH eluieren. Eluat sofort mit HCl ansäuern.
  - (e) Auf einer kleineren XAD8-Säule konzentrieren; Mit NaOH eluieren und ansäuern. Der DOC-Gehalt sollte mehr als 500 mg C/l betragen.
  - (f) Den pH mit HCl auf 1.0 einstellen. Zentrifugieren, um HA von FA abzutrennen. HA mit Wasser waschen bis mit dem  $\text{AgNO}_3$ -Test kein  $\text{Cl}^-$  mehr nachgewiesen wird. HA mit ausreichend 0.1 M NaOH lösen und anschließend mit einem stark sauren Harz in die protonierte Form überführen.
  - (g) Die FA-Fraktion auf pH 2.0 mit NaOH einstellen und die FA-Fraktion auf XAD8 adsorbieren. Mit destilliertem Wasser waschen.
  - (h) Im Umkehrfluß mit 0.1 M NaOH eluieren.
  - (i) Das FA-Eluat durch einen Kationenaustauscherharz geben und sofort ansäuern. Die HA in 0.1 M NaOH durch einen Kationenaustauscherharz geben und sofort ansäuern. Solange wiederholen bis die  $\text{Na}^+$ -Konzentration kleiner als 1 mg/l ist.
  - (j) HA und FA Probe gefriergetrocknen.
3. Die Substanz MPDOM wurde über Revers-Osmose erhalten ([www.ihss.gatech.edu](http://www.ihss.gatech.edu)). Dazu wurde das Wasser zunächst mit einem 1  $\mu\text{m}$  und 0,4  $\mu\text{m}$  Polypropylen-Filter filtriert. Während die Probe durch Reversosmose konzentriert wurde, zirkulierte sie kontinuierlich durch ein Kationenaustauscher-Harz ( $\text{H}^+$ -Form), um die meisten Kationen zu entfernen. Im

Labor wurden die Reversosmose-Membranen mit 0.01 M NaOH gespült, um das adsorbierte organische Material zu erhalten. Die Spüllösung wurde mit einem Kationenaustauscher-Harz ( $H^+$ -Form) entsalzt. Die entsalzte Probe wurde abschließend gefriergetrocknet.

4. Bei den verwendeten Substanzen handelt es sich um die sogenannte FA3-Fraktion. Die vollständige Extraktionsmethode für FA und HA ist in [165] ausführlich erläutert. Durch folgende Extraktionsstufen wird die FA3-Fraktion erhalten:
  - (a) Boden im Verhältnis von 1/10 (trockener Boden/Lösung) mit 1 N HCl auf pH 1 eine Stunde schütteln (100 g Boden für 1 l Lösung).
  - (b) Zentrifugieren des Gemisches; Überstand mit XAD8 aufkonzentrieren.
  - (c) Rückstand mit 1 N NaOH auf pH 7 und unter  $N_2$  mit 0.1 N NaOH auf ein Boden/Lösung-Verhältnis von 1/10 bringen (100 g Boden für 1 l Lösung).
  - (d) Extraktion unter  $N_2$  mindestens 4 Stunden schütteln, danach zentrifugieren.
  - (e) Überstand mit 6 N HCl auf pH 1 bringen und einige Stunden stehen lassen, Rückstand wird entsorgt.
  - (f) Zentrifugieren, um flockige Huminsäuren von den Fulvinsäuren zu trennen.
  - (g) Huminfraction unter  $N_2$  in minimalem Volumen KOH 0.1 N lösen, mit KCl auf 0.3 N  $K^+$  bringen. Zentrifugieren, um Suspension zu trennen. Festpartikel fallen aus (Ton...).
  - (h) Fällung der HA aus dem Überstand wie in Stufe 5 und zentrifugieren; der Überstand ist die FA3-Fraktion.
  - (i) Überstand auf XAD8-Säule. Die FA bleiben auf der Säule; mit 0.65 Säulenvolumen destilliertem Wasser waschen.
  - (j) XAD8-Säule mit 1 Vol. 0.1 N NaOH und 3 Vol. destilliertem Wasser eluieren.
  - (k) Eluierte FA gleich mit HCl auf pH 1 ansäuern und mit HF auf 0.3 Normalität bringen; alle FA müssen in Lösung bleiben.
  - (l) Eluat auf XAD8 in Plastiksäule bringen, mit 0.65 Säulenvolumen destilliertem Wasser waschen.
  - (m) Mit 1 Vol. 0.1 N NaOH und 2 Vol. Wasser eluieren; über Ionenaustauscher in  $H^+$ -Form bringen.
  - (n) Gefriertrocknen der Endprobe.



# Literaturverzeichnis

- [1] ABBT-BRAUN, G. Strukturelemente und ihre Bestimmungen — Zusammenfassung und Ausblick —. In Frimmel und Abbt-Braun [79], S. 71–78.
- [2] ABBT-BRAUN, G., UND FRIMMEL, F. Spektroskopische Strukturaufklärung aquatischer Huminstoffe. *Vom Wasser 77* (1991), 291–302.
- [3] ABBT-BRAUN, G., FRIMMEL, F., UND LIPP, P. Isolation of organic substances from aquatic and terrestrial systems — Comparison of some methods. *Z. Wasser-Abwasser. Forsch. 24* (1991), 285–292.
- [4] AIKEN, G. R., MCKNIGHT, D. M., WERSHAW, R. L., UND MACCARTHY, P. An Introduction to Humic Substances in Soil, Sediment, and Water. In *Humic substances in soil, sediment, and water* (1985), G. R. Aiken, D. M. McKnight, R. L. Wershaw, und P. McCarthy, Hrsg., John Wiley & Sons, Inc., S. 1–9.
- [5] ALBERTS, J. J., FILIP, Z., UND HERTKORN, N. Fulvic and humic acids isolated from groundwater: Compositional characteristics and cation binding. *J. Contam. Hydrol. 11* (1992), 317–330.
- [6] ALMENDROS, G., FRÜND, R., GONZALEZ-VILA, F., HAIDER, K., KNICKER, H., UND LÜDEMANN, H.-D. Analysis of  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  CPMAS NMR-spectra of soil organic matter and composts. *FEBS Letters 282*(1) (1991), 119–121.
- [7] ANDREWS, M. Capillary Gas-Chromatographic Analysis of Mono-Saccharides: Improvements and Comparisons Using Trifluoroacetylation and Trimethylsilylation of Sugar *O*-Benzyl- and *O*-Methyl-Oximes. *Carbohydr. Res. 194* (1989), 1–19.
- [8] ANTONELLI, A., CARNACINI, A., UND VERSARI, A. Liquid-Liquid Extraction of Silylated Polyalcohols from Vinegar, and their Determination by Capillary GC. *Journal of High Resolution Chromatography 17* (1994), 553–555.
- [9] ARCHIPOV, Y., ARGYROPOULOS, D. S., BOLKER, H., UND HEITNER, C.  $^{31}\text{P}$ -N.m.r. spectroscopy in wood chemistry. Phosphite derivates of carbohydrates. *Carbohydr. Res. 220* (1991), 49–61.

- [10] ARCHIPOV, Y., ARGYROPOULOS, D. S., BOLKER, H. I., UND HEITNER, C.  $^{31}\text{P}$  NMR Spectroscopy in Wood Chemistry: Part 1 — Model Compounds. *J. Wood Chem. Technol.* 11(2) (1991), 137–157.
- [11] ARGYROPOULOS, D. S., BOLKER, H. I., HEITNER, C., UND ARCHIPOV, Y.  $^{31}\text{P}$  NMR Spectroscopy in Wood Chemistry: Part IV. Lignin Models: Spin Lattice Relaxation Times and Solvent Effects in  $^{31}\text{P}$  NMR. *Holzforschung* 47(1) (1993), 50–56.
- [12] ARGYROPOULOS, D. S., BOLKER, H. I., HEITNER, C., UND ARCHIPOV, Y.  $^{31}\text{P}$  NMR Spectroscopy in Wood Chemistry: Part V. Qualitative Analysis of Lignin Functional Groups. *J. Wood Chem. Technol.* 13(2) (1993), 187–212.
- [13] ARGYROPOULOS, D. S., UND HEITNER, C.  $^{31}\text{P}$  NMR Spectroscopy in Wood Chemistry: Part VI. Solid State  $^{31}\text{P}$  NMR of Trimethyl Phosphite Derivatives of Chromophores and Carboxylic Acids Present in Mechanical Pulps; a Method for Quantitative Determination of *ortho*-Quinones. *Holzforschung* 48 (1994), 112–116.
- [14] ARGYROPOULOS, D. S., HEITNER, C., UND MORIN, F. G.  $^{31}\text{P}$  NMR Spectroscopy in Wood Chemistry: Part III. Solid State  $^{31}\text{P}$  NMR of Trimethyl Phosphite Derivatives of Chromophores in Mechanical Pulp. *Holzforschung* 46(3) (1992), 211–218.
- [15] AVERETT, R. C., LEENHEER, J. A., MCKNIGHT, D. M., UND THORN, K. A., Hrsg. *Humic Substances in the Suwannee River, Georgia: Interactions, Properties, and Proposed Structures*. U.S. Geol. Surv., 1989.
- [16] BARDET, M., FORAY, M.-F., UND ROBERT, D. Use of the DEPT pulse sequence to facilitate the  $^{13}\text{C}$  NMR structural analysis of lignins. *Macromol. Chem.* 86 (1985), 1495–1504.
- [17] BARRELLE, M. A New Method for the Quantitative  $^{19}\text{F}$  NMR Spectroscopic Analysis of Hydroxyl Groups in Lignins. *Holzforschung* 47(3) (1993), 261–267.
- [18] BARRELLE, M., FERNANDES, J. C., FROMENT, P., UND LACHENAL, D. An Approach to the Determination of Functional Groups in Oxidized Lignins by  $^{19}\text{F}$  NMR. *J. Wood Chem. Technol.* 12 (1992), 413–424.
- [19] BASSINDALE, A., UND STOUT, T. A  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR Study of the Interaction of Various Halotrimethylsilanes and Trimethylsilyl Triflate with Dimethyl Formamide and Acetonitril. A Comment on the Nucleophile Induced Racemisation of Halosilanes. *J. Organometal. Chem.* 238 (1982), C41–C45.
- [20] BELLESIA. Reactions of the Trimethylchlorosilane – Dimethyl Sulfoxide Reagent with Carbonyl Compounds. *J. Chem. Research (S)* (1986), 426–427.

- [21] BELLESIA, F., GHELFI, F., GRANDI, R., UND PAGNONI, U. Regioselective  $\alpha$ -Bromination of Carbonyl Compounds with Trimethylbromosilane-Dimethyl Sulfoxide. *J. Chem. Research (S)* (1986), 428–429.
- [22] BELLESIA, F., GHELFI, F., GRANDI, R., PAGNONI, U., UND PINETTI, A. The Reaction of Pyrroles with Trimethylhalosilanes-Dialkyl Sulfoxides. *J. Heterocyclic Chem.* 30 (1993), 617–621.
- [23] BELLESIA, F., GHELFI, F., PAGNONI, U., UND PINETTI, A. The Reaction of Trimethylchloro- and Trimethylbromo-silane – Dimethyl Sulfoxide Reagent Systems on Alkenes. Synthesis of 2-Chloroalkyl and 2-Chlorocycloalkyl Methyl Sulphides. *J. Chem. Research (S)* (1987), 238–239.
- [24] BELLESIA, F., GHELFI, F., PAGNONI, U., UND PINETTI, A. The Reaction of Styrenes with Chlorotrimethylsilane/Dimethyl Sulfoxide. *Gazzetta Chimica Italiana* 121 (1991), 559–561.
- [25] BENTLEY, R. Preparation of crystalline octa-O-(trimethylsilyl)sucrose. *Carbohydr. Res.* 59 (1977), 274–275.
- [26] BERGER, S. NMR techniques employing selective radiofrequency pulses in combination with pulsed field gradients. *Progress in NMR Spectroscopy* 30 (1997), 137–156.
- [27] BERGER, S., BRAUN, S., UND KALINOWSKI, H.-O., Hrsg. *NMR-Spektroskopie von Nichtmetallen; Bd. 1 Grundlagen, Sauerstoff, Schwefel, Edelgase*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1992.
- [28] BETTS, T. J., ALLAN, C. A., UND DONOVAN, C. A. Gas chromatographic behaviour of trimethylsilyl derivatives of some monoterpene alcohols and phenols found in volatile oils. *J. Chromatogr.* 291 (1984), 361–364.
- [29] BEYER, L. The chemical composition of soil organic matter in classical humic compound fractions and in bulk samples – a review. *Zeitschr. Pflanzenernähr. Bodenk.* 159 (1996), 527–539.
- [30] BLINKA, T. A., UND HELMER, B. J. Polarization Transfer NMR Spectroscopy for Silicon-29: The INEPT and DEPT Techniques. *Advances in Organometallic Chemistry* 23 (1984), 193–218.
- [31] BLOOM, P. R., UND LEENHEER, J. A. Vibrational, Electronic, and High-energy Spectroscopic Methods for Characterizing Humic Substances. In Hayes et al. [103], S. 409–446.
- [32] BORBELY-KUSZMANN, A., ZIMONYI-HEGGEDÜS, E., UND NAGY, J. Untersuchung der Methylchlorosilan-Pyridin, -DMF bzw. -DMSO-Addukte. *Periodica Polytechnica/Chemical Engineering* 20(3) (1976), 255–262.
- [33] BOYKIN, D. W., Hrsg. <sup>17</sup>O NMR spectroscopy in organic chemistry. CRC Press, Inc., 1991.

- [34] BOYKIN, D. W., UND BAUMSTARBK, A. L.  $^{17}\text{O}$  NMR Spectroscopy: Assessment of Steric Perturbation of Structure in Organic Compounds. *Tetrahedron* 45(12) (1989), 3613–3651.
- [35] BRACEWELL, J. M., HAIDER, K., LARTER, S. R., UND H.-R., S. Thermal Degradation Relevant to Structural Studies of Humic Substances. In Hayes et al. [103], S. 181–222.
- [36] BRANTHAVER, J. F., UND BARDEN, R. E.  $^{13}\text{C}$ -NMR, i.r. and fluorescence spectroscopic studies of the polymeric acids found in Black Trona Water from the Green River Basin. *Org. Geochem.* 4(3/4) (1983), 117–120.
- [37] BRAUN, S., KALINOWSKI, H.-O., UND BERGER, S. *100 and More Basic NMR Experiments*. VCH, Weinheim, 1996.
- [38] BREŽNÝ, R., UND SCHRAML, J. Silicon-29 NMR Spectral Studies of Kraft Lignin and Related Model Compounds. *Holzforschung* 41 (1987), 293–298.
- [39] BREŽNÝ, R., SCHRAML, J., KVÍČALOVÁ, M., ZELENÝ, J., UND CHVALOVSKÝ, V. Silicon-29 NMR Spectrometry in Lignin Chemistry — Application to Trimethylsilylated Spruce Dioxane Lignin and Related Model Compounds. *Holzforschung* 39(5) (1985), 297–303.
- [40] BRONSTEIN, I., UND SEMENDJAJEW, K. *Taschenbuch der Mathematik*. Verlag Harri Deutsch, Thun, Frankfurt/Main, 1987.
- [41] BRUNOW, G., ÄMMÄLAHTI, E., NIEMI, T., SIPILÄ, J., SIMOLA, L., UND KIPELAINEN, I. Labelling of a Lignin from Suspension Cultures of *Picea Abies*. *Phytochemistry* 47(8) (1998), 1495–1500.
- [42] BUDDRUS, J., BURBA, P., HERZOG, H., UND LAMBERT, J. Quantitation of Partial Structures of Aquatic Humic Substances by One- and Two-Dimensional Solution  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Anal. Chem.* 61 (1989), 628–631.
- [43] BUDDRUS, J., UND LAMBERT, J. Isolated paraffinic methyl groups in humic substances. *Org. Geochem.* 23(3) (1995), 269–271.
- [44] BYRN, M., UND CALVIN, M. Oxygen-18 Exchange Reactions of Aldehydes and Ketones. *J. Am. Chem. Soc.* 88(9) (1966), 1916–1922.
- [45] CASU, M., ANDERSON, G. J., CHOI, G., UND GIBBONS, W. A. NMR Lipid Profiles of Cells, Tissues and Body Fluids I. 1D and 2D Proton NMR of Lipids from Rat Liver. *Magn. Reson. Chem.* 29 (1991), 594–602.
- [46] CAZEAU, P., DUBOUDIN, F., MOULINES, F., BABOT, O., UND DUNOGUES, J. A New Practical Synthesis of Silyl Enol Ethers. Part I. From Simple Aldehydes and Ketones. *Tetrahedron* 43(9) (1987), 2075–2088.
- [47] CHAMBAZ, E. M., UND HORNING, E. C. Steroid Trimethylsilyl Ethers. *Analytical Letters* 1 (1967), 201–211.

- [48] CHAMBAZ, E. M., MAUME, G., UND HORNING, E. C. Silylation of Steroids. Formation of Enol Trimethylsilyl Ethers and Oxsilylation Products. *Analytical Letters* 1(12) (1968), 749–761.
- [49] CHEN, Y., UND SCHNITZER, M. Sizes and Shapes of Humic Substances by Electron Microscopy. In Hayes et al. [103], S. 621–640.
- [50] CHENG, C. P., UND LIN, S. C. Correlation of  $^{17}\text{O}$  NMR and  $^{17}\text{O}$  NQR Data for Some Aromatic Carbonyl Compounds. *J. Magn. Res.* 69 (1986), 58–67.
- [51] CHIEN, Y.-Y., UND BLEAM, W. F. Two-Dimensional NOESY Nuclear Magnetic Resonance Study of pH-Dependent Changes in Humic Acid Conformation in Aqueous Solution. *Environ. Sci. Technol.* 32(23) (1998), 3653–3658.
- [52] CHOUDHRY, G., UND WEBSTER, G. Soil Organic Matter Chemistry. Part 1. Characterization of Several Humic Preparations by Proton and Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Toxicol. Environ. Chem.* 23 (1989), 227–242.
- [53] CHRISTMAN, R. F., NORWOOD, D. L., SEO, Y., UND FRIMMEL, F. H. Oxidative Degradation of Humic Substances From Freshwater Environments. In Hayes et al. [103], S. 33–68.
- [54] COLEMAN, W. M., UND BOYD, A. R. Determination of Hydroxyl-Containing Compounds in Synthetic Fuels by Silicon-29 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. *Anal. Chem.* 54(1) (1982), 133–134.
- [55] COOK, R., UND LANGFORD, C. Structural Characterization of a Fulvic Acid and a Humic Acid Using Solid-State Ramp-CP-MAS  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance. *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998), 719–725.
- [56] COOPER, B. Silylation as a protective method in organic synthesis. *Chem. Ind.* 21 (1978), 794–797.
- [57] CRESTINI, C., UND ARGYROPOULOS, D. Structural Analysis of Wheat Straw Lignin by Quantitative  $^{31}\text{P}$  and 2D NMR Spectroscopy. The Occurrence of Ester Bonds and  $\alpha$ -O-4 Substructures. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997), 1212–1219.
- [58] CRESTINI, C., SERMANI, G., UND ARGYROPOULOS, D. Structural Modifications Induced During Biodegradation of Wheat Lignin by *Lentinula edodes*. *Bioorg. Med. Chem.* 6 (1998), 967–973.
- [59] DEC, J., HAIDER, K., BENESI, A., RANGASWAMY, V., SCHÄFFER, A., PLÜCKEN, U., UND BOLLAG, J.-M. Analysis of Soil-Bound Residues of  $^{13}\text{C}$ -Labeled Fungicide Cyprodinil by NMR Spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997), 1128–1135.

- [60] DEC, J., HAIDER, K., SCHÄFFER, A., FERNANDES, E., UND BOLLAG, J.-M. Use of a Silylation Procedure and  $^{13}\text{C}$ -NMR Spectroscopy to Characterize Bound and Sequestered Residues of Cyprodinil in Soil. *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997), 2991–2997.
- [61] DEIANA, S., GESSA, C., MANUNZA, B., RAUSA, R., UND SEEBER, R. Analytical and Spectroscopic Characterization of Humic Acids Extracted from Sewage Sludge, Manure, and Worm Compost. *Soil Sci.* 150 (1990), 419–424.
- [62] DEREPPE, J.-M., UND PARBHOO, B. Hydroxyl Determination in Petroleum Oil Extracts by Fluorine-19 and Silicon-29 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. *Anal. Chem.* 56(14) (1984), 2740–2743.
- [63] DEREPPE, J.-M., UND PARBHOO, B. Quantitative Protonated Heteroatom Determination by Silicon-29 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry and Polarization Transfer Pulse Sequences. Application to Asphaltene. *Anal. Chem.* 58(13) (1986), 2641–2642.
- [64] DONIKE, M. Zur Darstellung von Trimethylsilyl-, Triethylsilyl- und *tert.* - Butyldimethylsilyl-enoläthern von Ketosteroiden für gas-chromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen. *J. Chromatogr.* 202 (1980), 438–486.
- [65] DROZD, J. Chemical Derivatization in Gas Chromatography. *J. Chromatogr.* 113 (1975), 303–356.
- [66] DUXBURY, J. M. Studies of the Molecular Size and Charge of Humic Substances by Electrophoresis. In Hayes et al. [103], S. 593–620.
- [67] EDE, R., UND RALPH, J. Assignment of 2D TOCSY Spectra of Lignins: the Role of Lignin Model Compounds. *Magn. Reson. Chem.* 34 (1996), 261–268.
- [68] EDE, R. M., UND BRUNOW, G. Two-Dimensional  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  Chemical Shift Correlation and *J*-Resolved NMR Studies on Isolated and Synthetic Lignins. *Holzforschung* 44(2) (1990), 95–101.
- [69] EDE, R. M., UND BRUNOW, G. Application of Two-Dimensional Homo- and Heteronucleare Correlation NMR Spectroscopy to Wood Lignin Structure Determination. *J. Organometal. Chem.* 57 (1992), 1477–1480.
- [70] ENGLMAIER, P. Identification and quantitative estimation of plant cyclitols and polyols by gas chromatography. *Anal. Chem.* 324 (1986), 338+.
- [71] ERNST, R. R., BODENHAUSEN, G., UND WOKAUN, A. *Principles of nuclear magnetic resonance in one an two dimensions*. New York: Oxford University Press Inc., 1994.
- [72] FAIX, O., ARGYROPOULOS, D. S., ROBERT, D., UND NEIRINCK, V. Determination of Hydroxyl Groups in Lignins Evaluation of  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -,  $^{31}\text{P}$ -NMR, FTIR and Wet Chemical Methods. *Holzforschung* 48(5) (1994), 387–394.

- [73] FISCHER, W. Definitionen, Abgrenzungen und experimentelle Engpässe. In Frimmel und Abbt-Braun [79], S. 5–12.
- [74] FLUKA CHEMICA AG. *Silylating Agents*, 1988,1995. ISBN 3-905617-08-0 (Firmenschrift).
- [75] FREEMAN, R. *A Handbook of Nuclear Magnetic Resonance*. Longman, 1997.
- [76] FRIEBOLIN, H. *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*. VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1992.
- [77] FRIMMEL, F., UND ABBT-BRAUN, G. Basic Characterization of Reference NOM from Central Europe — Similarities and Differences. *Environment International* 25(2/3) (1999), 191–207.
- [78] FRIMMEL, F. H. Einführung. In Frimmel und Abbt-Braun [79], S. 1–4.
- [79] FRIMMEL, F. H., UND ABBT-BRAUN, G., Hrsg. *Refraktäre organische Säuren in Gewässern* (1990), DFG Deutsche Forschungsgemeinschaft, VCH, Weinheim.
- [80] FRÜND, R., GUGGENBERGER, G., HAIDER, K., KNICKER, H., KÖGEL-KNABNER, I., LÜDEMANN, H.-D., LUSTER, J., ZECH, W., UND SPITELLER, M. Recent advances in the spectroscopic characterization of soil humic substances and their ecological relevance. *Zeitschr. Pflanzenernähr. Bodenk.* 157 (1994), 175–186.
- [81] FRÜND, R., HAIDER, K., UND LÜDEMANN, H.-D. Impacts of Soil Management Practices on the Organic Matter Structure — Investigations by CPDAS <sup>13</sup>C NMR-Spectroscopy. *Zeitschr. Pflanzenernähr. Bodenk.* 157 (1994), 29–35.
- [82] FRÜND, R., LÜDEMANN, H.-D., UND ZECH, W. The separation of Low Molecular Weight Humic Acid Fractions and their Characterisation by HR-C-13-NMR in Solution. *ZPB* 151 (1988), 303–305.
- [83] FUKAGAWA, N., MESHITSUKA, G., UND ISHIZU, A. A Two-Dimensional NMR Study of Birch Milled Wood Lignin. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 11(3) (1991), 373–396.
- [84] GALE, D., UND EVANS, N. Silicon-29 NMR Spectroscopy in Carbohydrate Chemistry: Galactose Derivatives. *Org. Magn. Reson.* 21 (1983), 567–569.
- [85] GEHRKE, C. W., UND LEIMER, K. Trimethylsilylation of Amino Acids – Effect of Solvents on Derivatization Using Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. *J. Chromatogr.* 53 (1970), 201–208.
- [86] GEROTHANASSIS, I. P., HUNSTON, R., UND LAUTERWEIN, J. <sup>17</sup>O-NMR. of Enriched Acetic Acid, Glycine, Glutamic Acid and Aspartic Acid in Aqueous Solution. I. Chemical Shift Studies. *Helv. Chim. Acta* 65 (1982), 1764–1773.

- [87] GEROTHANASSIS, I. P., HUNSTON, R., UND LAUTERWEIN, J.  $^{17}\text{O}$ -NMR. of Enriched Acetic Acid, Glycine, Glutamic Acid and Aspartic Acid in Aqueous Solution. II. Relaxation Studies. *Helv. Chim. Acta* 65 (1982), 1774–1784.
- [88] GEROTHANASSIS, I. P., HUNSTON, R. N., UND LAUTERWEIN, J.  $^{17}\text{O}$  NMR Chemical Shifts of the Twenty Protein Amino Acids in Aqueous Solution. *Magn. Reson. Chem.* 23(8) (1985), 659–665.
- [89] GEROTHANASSIS, I. P., UND LAUTERWEIN, J. Natural-Abundance  $^{17}\text{O}$  NMR of Monosaccharides. *J. Magn. Res.* 48 (1982), 431–446.
- [90] GEROTHANASSIS, I. P., TROGANIS, A., UND VAKKA, C.  $^{17}\text{O}$  and  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Heteronuclear Multiple Quantum Coherence ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{pN}$  HMQC) NMR of Linear Amides: Evidence of an Out-of-Plane (Torsion Angle) Deformation of the Amide Bond and Pyramidity at the Amide Nitrogen. *Tetrahedron* 51(34) (1995), 9493–9500.
- [91] GHELFI, F., GRANDI, R., UND PAGNONI, U. Carbonyl Regeneration from p-Toluensulfonylhydrazones by Trimethylchlorosilane-Dimethylsulfoxide. *Synthetic Communications* 22(13) (1992), 1845–1850.
- [92] GHELFI, F., GRANDI, R., UND PAGNONI, U. Carbonyl Regeneration from Oximes and Semicarbazones by Trimethylchlorosilane-Dimethylsulfoxide. *Synthetic Communications* 23(16) (1993), 2279–2284.
- [93] GINWALLA, A., UND MIKITA, M. A. Reaction of Suwannee River Fulvic Acid with Chloramine: Characterization of Products via  $^{15}\text{N}$  NMR. *Environ. Sci. Technol.* 26(6) (1992), 1148–1150.
- [94] GRANDY, D. W., PETRAKIS, L., YOUNG, D. C., UND GATES, B. C. Determination of oxygen functionalities in synthetic fuels by NMR of naturally abundant  $^{17}\text{O}$ . *Nature* 308(8) (1984), 175–177.
- [95] GREEN, J. G. Trimethylsilylation of Cellulose. *United States Patent* (1983). US 4390692 A 830628.
- [96] GREENAWAY, W., UND WHATLEY, F. R. Resolution of complex mixtures of phenolics in poplar bud exudate by analysis of gas chromatography-mass spectrometry data. *J. Chromatogr.* 519 (1990), 145–158.
- [97] GRIFFITH, S. M., UND SCHNITZER, M. Oxidative Degradation of Soil Humic Substances. In Hayes et al. [103], S. 69–98.
- [98] HAIDER, K. Advances in the Basic Research of the Biochemistry of Humic Substances. In Senesi und Miano [172], S. 91–107. Proceedings of the 6th International Meeting of the International Humic Substances Society, Monopoli (Bari), Italy, September 20-25, 1992.



- [99] HAIDER, K., SPITELLER, M., REICHERT, K., UND FILD, M. Derivatization of Humic Compounds: An Analytical Approach for Bound Organic Residues. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 46 (1992), 201–211.
- [100] HAIDER, K., SPITELLER, M., WAIS, A., UND FILD, M. Evaluation of the Binding Mechanism of Anilazine and its Metabolites in Soil Organic Matter. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 53 (1993), 125–137.
- [101] HAMMARGREN, W. M., SCHRAM, K. H., NAKANO, K., UND YASAKA, T. Identification of a novel nucleoside, 1,N<sup>6</sup>-dimethyladenosine, in human cancer urine. *Analytica Chimica Acta* 247 (1991), 201–209.
- [102] HAYES, M. H. B., MACCARTHY, P., MALCOLM, R. L., UND SWIFT, R. Structures of Humic Substances: The Emergence of 'Forms'. In Hayes et al. [103], S. 689–734.
- [103] HAYES, M. H. B., MACCARTHY, P., MALCOLM, R. L., UND SWIFT, R. S., Hrsg. *Humic Substances II* (1989), New York: John Wiley & Sons Ltd.
- [104] HAYES, M. H. B., MACCARTHY, P., MALCOM, R. L., UND SWIFT, R. S. The Search for Structure: Setting the Scene. In Hayes et al. [103], S. 3–32.
- [105] HERZOG, H., BURBA, P., UND BUDDRUS, J. Quantification of hydroxylic groups in a river humic substance by <sup>29</sup>Si-NMR. *Fresenius J. Anal. Chem.* 354 (1996), 375–377.
- [106] HERZOG, H., HAIBER, S., BURBA, P., UND BUDDRUS, J. Quantification of partial structures of aquatic humic substances by <sup>1</sup>H-NMR under WATR conditions. *Fresenius J. Anal. Chem.* 359 (1997), 167–170.
- [107] HIROTA, N., FURUTA, T., UND KASUYA, Y. Determination of Cortisol in Human Plasma by Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry using [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]Cortisol as an internal Standard. *J. Chromatogr.* 425 (1988), 237–243.
- [108] HOMANS, S. *A Dictionary of Concepts in NMR*. Oxford University Press, 1995.
- [109] JAHNEL, J., ILIEVA, P., ABBT-BRAUN, G., UND FRIMMEL, F. Aminosäuren und Kohlenhydrate als Strukturbestandteile von refraktären organischen Säuren. *Vom Wasser* 90 (1998), 205–216.
- [110] JAYASUNDERA, S., TORRENTS, A., UND SCHMIDT, W. Comment on "Noncovalent Interactions between Acenaphthenone and Dissolved Fulvic Acid As Determined by <sup>13</sup>C NMR T<sub>1</sub> Relaxation Measurements". *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997), 3742–3743.
- [111] JENSEN, J. N. Comment On "Reaction of Suwannee River Fulvic Acid with Chloramine: Characterization of Products via <sup>15</sup>N NMR". *Environ. Sci. Technol.* 27 (1993), 2612–2613.
- [112] JOHNSON, D. Simple procedure for the preparation of trimethylsilyl ethers of carbohydrates and alcohols. *Carbohydr. Res.* 237 (1992), 313–318.

- [113] JOHNSTON, C. T., DAVIS, W. M., ERICKSON, C., DELFINO, J. J., UND COOPER, W. T. Characterization of Humic Substances Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In Senesi und Miano [172], S. 145–152. Proceedings of the 6th International Meeting of the International Humic Substances Society, Monopoli (Bari), Italy, September 20-25, 1992.
- [114] KANITSKAYA, L., IVANOVA, N., GOROKHOVA, V., UND BABKIN, V. Studies on the Structure of "Lignin Humic Substances" Using Quantitative  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy. *Chemistry for Sustainable Development* 4 (1996), 275–280.
- [115] KANITSKAYA, L., ROKHIN, A., GOGOTOV, A., KUSHAREV, D., UND KALABIN, G. Quantitative  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy of Lignin Preparations in Alkaline Delignification of Aspen Wood. *Chemistry for Sustainable Development* 4 (1996), 281–288.
- [116] KAY, L. E., KEIFER, P., UND SAARINEN, T. Pure Absorption Gradient Enhanced Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy with Improved Sensitivity. *JACS* 114 (1992), 10663–10665.
- [117] KESSLER, H., GEHRKE, M., UND GRIESINGER, C. Zweidimensionale NMR-Spektroskopie, Grundlagen und Übersicht über Experimente. *Angew. Chem.*(100) (1988), 507–554.
- [118] KÖGEL-KNABNER, I., HATCHER, P. G., TEGELAAR, E. W., UND LEEUW, J. W. Aliphatic components of forest soil organic matter as determined by solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR and analytical pyrolysis. *Sci. Total Environ.* 113 (1992), 89–106.
- [119] KÖGEL-KNABNER, I., HATCHER, P. G., UND ZECH, W. Chemical Structural Studies of Forest Soil Humic Acids: Aromatic Carbon Fraction. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 55 (1991), 241–247.
- [120] KÖGEL-KNABNER, I., ZECH, W., UND HATCHER, P. G. Chemical composition of the organic matter in forest soils: The humus layer. *Zeitschr. Pflanzenernähr. Bodenk.* 151 (1988), 331–340.
- [121] KÄHLING, H., UND ROBIEN, W.  $^{17}\text{O}$  NMR Spectroscopic Investigation of Steroids at Natural Abundance. *Magn. Reson. Chem.* 32 (1994), 608–613.
- [122] KILPELÄINEN, I., UND ÄMMÄLAHTI, E. Application of Three-Dimensional HMQC-HOHAHA NMR Spectroscopy to Wood Lignin, a Natural Polymer. *Tetrahedron Lett.* 35(49) (1994), 9267–9270.
- [123] KILPELÄINEN, I., SIPILÄ, J., BRUNOW, G., LUNDQUIST, K., UND EDE, R. M. Application of Two-Dimensional NMR Spectroscopy to Wood Lignin Structure Determination and Identification of Some Minor Structural Units of Hard- and Softwood Lignins. *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994), 2790–2794.

- [124] KLAUS, U., MOHAMED, S., VOLK, M., UND SPITELLER, M. Interaction of Aquatic Humic Substances With Anilazine and its Derivatives: The Nature of the Bond Residues. *CS* 37(2) (1998), 341–361.
- [125] KLEBE, J. F., FINKBEINER, H., UND WHITE, D. M. Silylations with Bis(trimethylsilyl)acetamide, a Highly Reactive Silyl Donor. *J. Am. Chem. Soc.* 88(14) (1966), 3390–3395.
- [126] KNICKER, H., FRÜND, R., UND LÜDEMANN, H.-D. The Chemical Nature of Nitrogen in Native Soil Organic Matter. *Naturwissenschaften* 80 (1993), 219–221.
- [127] KNULST, J., BOERSCHKE, R., UND LOEMO, S. Differences in Organic Surface Microlayers from an Artificially Acidified and Control Lake, Elucidated by XAD-8/XAD-4 Tandem Separation and Solid State  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 32(1) (1997), 8–12.
- [128] KROSSHAVN, M., KÖGEL-KNABNER, I., SOUTHON, T. E., UND STEINNES, E. The influence of humus fractionation on the chemical composition of soil organic matter studied by solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR. *J. Soil Sci.* 43 (1992), 473–483.
- [129] LAMBERT, J., UND BUDDRUS, J. Quantification of Isolated Methyl Groups in Aquatic Humic Substances by Means of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* 34 (1996), 276–282.
- [130] LAMBERT, J., BURBA, P., UND BUDDRUS, J. Quantification of Partial Structures in Aquatic Humic Substances by Volume Integration of Two-Dimensional  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectra. Comparison of One- and Two-Dimensional Techniques. *Magn. Reson. Chem.* 30 (1992), 221–227.
- [131] LAUTERWEIN, J., UND GEROTHANASSIS, I. P. Applications of a Steady-State Pulse Sequence for Solvent Elimination in  $^{17}\text{O}$  NMR. *J. Magn. Res.* 51 (1983), 153–156.
- [132] LÜDEMANN, H.-D., LENTZ, H., UND ZIECHMANN, W. Protonenresonanzspektroskopie von Ligninen und Huminsäuren bei 100 Megahertz. *Erdöl und Kohle - Erdgas - Petrochemie vereinigt mit Brennstoffchemie* 26(9) (1973), 506–509.
- [133] LED, J. J., UND GESMAR, H. Application of the Linear Prediction Method to NMR Spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 91 (1991), 1413–1426.
- [134] LEE, G., WILSON, M., UND BRENT, R. The application of the "Watergate" suppression technique for analyzing humic substances by nuclear magnetic resonance. *Org. Geochem.* 28(9-10) (1998), 549–559.
- [135] LEENHEER, J., WILSON, M., UND MALCOLM, R. Presence and potential significance of aromatic-ketone groups in aquatic humic substances. *Org. Geochem.* 11(4) (1987), 273–280.

- [136] LIEPINSH, E., SEKACIS, I., UND LUKEVICS, E. Analysis of the NMR Spectra of Trimethylsilyl-Substituted Sugars by Two-Dimensional Heteronuclear  $^{29}\text{Si}$ - $^1\text{H}$  Shift Correlation Spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* 23(1) (1985), 10–11.
- [137] LOBARTINI, J. C., UND TAN, K. H. Differences in Humic Acid Characteristics as Determined by Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance, Scanning Electron Microscopy, and Infrared Analysis. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52 (1988), 125–130.
- [138] LUNDQUIST, K., UND STERN, K. Analysis of lignins by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *Nordic Pulp and Paper Research Journal* 3 (1989), 210–213.
- [139] MALCOLM, R., UND HAYES, T. Organic Solute Changes with Acidification in Lake Skjervatjern as Shown by  $^1\text{H}$ -NMR Spectroscopy. *Environment International* 20(3) (1994), 299–305.
- [140] MASON, J., Hrsg. *Multinuclear NMR*. New York: Plenum Press, 1989.
- [141] MIKITA, M. A., STEELINK, C., UND WERSHAW, R. L. Carbon-13 Enriched Nuclear Magnetic Resonance Method for the Determination of Hydroxyl Functionality in Humic Substances. *Anal. Chem.* 53(11) (1981), 1715–1717.
- [142] MOLNAR-PERL, I., UND HORVATH, K. Simultaneous Quantitation of Mono-, Di- and Trisaccharides as Their TMS Ether Oxime Derivatives by GC-MS: I. In Model Solutions. *Chromatographia* 45 (1997), 321–327.
- [143] NAGY, J., BORBELY-KUSZMANN, A., BECKER-PALOSSY, K., UND ZIMONYI-HEGEDÜS, E. Herstellung von Trimethyl-silyl-zellulose mittels Hexamethyl-disilazan in Pyridin. *Periodica Polytechnica/Chemical Engineering* (1974), 91–98.
- [144] NANNY, M., BORTIATYNSKI, J., UND HATCHER, P. Response to Comment on "Noncovalent Interactions between Acenaphthenone and Dissolved Fulvic Acid As Determined by  $^{13}\text{C}$  NMR  $T_1$  Relaxation Measurements". *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997), 3744–3745.
- [145] NARDIN, R., UND VINCENDON, M. Proton-Silicon-29 Two-Dimensional Chemical-Shift Correlation NMR Spectroscopy. *J. Magn. Res.* 61 (1985), 338–342.
- [146] NIEMINEN, M. O. J., PULKKINEN, E., UND RAHKAMAA, E. Determination of Hydroxyl Groups in Kraft Pine Lignin by Silicon-29 NMR Spectroscopy. *Holzforschung* 43(5) (1989), 303–307.
- [147] OGNER, G.  $^{31}\text{P}$ -NMR Spectra of Humic Acids: A Comparison of Four Different Raw Humus Types in Norway. *Geoderma* 29 (1983), 215–219.
- [148] PARELLA, T. Pulsed field gradients: a new tool for routine NMR. *MRC* 36 (1998), 467–495.
- [149] PARELLA, T., SANCHEZ-FERRANDO, F., UND VIRGILI, A. Improved Sensitivity in Gradient-Based 1D and 2D Multiplicity-Edited HSQC Experiments. *JMR* 126 (1997), 274–277.

- [150] PARSONS, J. W. Hydrolytic Degradations of Humic Substances. In Hayes et al. [103], S. 99–120.
- [151] PIERCE, A. E., Hrsg. *Silylation of Organic Compounds*. Pierce Chemical Co., 1968.
- [152] POOLE, C. F., UND ZLADTKIS, A. Trialkylsilyl Ether Derivatives (Other Than TMS) for Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.* 17 (1979), 115–123.
- [153] PRESS, W. H., TEUKOLSKY, S. A., VETTERLING, W. T., UND FLANNERY, B. P. *Numerical Recipes in C — The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, 1995. ISBN 0-521-43108-5.
- [154] PRESTON, C. M. Applications of NMR to Soil Organic Matter Analysis: History and Prospects. *SS* 161(3) (1996), 144–166.
- [155] RALPH, J. NMR of Lignin Model Compounds; Application of Long-range C–H Correlations Through Oxygen. *Holzforschung* 42(4) (1988), 273–275.
- [156] RALPH, J. NMR of Lignin Model Quinone Methides. Corrected  $^{13}\text{C}$  NMR Assignments via C–H Correlation Experiments. *Holzforschung* 42(5) (1988), 337–338.
- [157] RALPH, J., HELM, R., FORT, R., UND ELDER, T. Stereoselectivity in Benzyl 1,2-Diaryl Ether Cleavage by Bromotrimethylsilane. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (1994), 2117–2121.
- [158] RALPH, J., ZHANG, Y., UND EDE, R. Preparation of synthetic lignins with superior NMR characteristics via isotopically labeled monolignols. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (1998), 2609–2613.
- [159] RICCA, G., UND SEVERINI, F. Structural investigations of humic substances by IR-FT,  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy and comparison with a maleic oligomer of known structure. *Geoderma* 58 (1993), 233–244.
- [160] ROTH, C. A. Silylation of Organic Chemicals. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Develop.* 11 (1972), 134–137.
- [161] RUCHMANN, A., LAUTERWEIN, J., BÄCKER, T., UND KLESSINGER, M.  $^{17}\text{O}$  NMR of L-Ascorbic Acid. New Spectroscopy of an Old Molecule. *Magn. Reson. Chem.* 34 (1996), 116–122.
- [162] RUGGIERO, P., INTERESSE, F., UND SCIACOVELLI, O.  $^1\text{H}$  nmr evidence of exchangeable aromatic protons in fulvic and humic acids. *Soil Biol. Biochem.* 12 (1980), 297–299.
- [163] RUMPF, G. The silylation of substances occurring in natural products and detectable by gas chromatography. *J. Chromatogr.* 43 (1969), 247–250.

- [164] SCHMIDT, A. H., UND RUSS, M. Chlortrimethylsilan/Natriumbromid – Ein einfaches System zur in-situ-Erzeugung von Bromtrimethylsilan. Umsetzung mit Ketonen, Sulfoxiden und anderen sauerstoffhaltigen Substraten. *Chem. Ber.* 114 (1981), 1099–1110.
- [165] SCHMITT, P. *Untersuchungen zur Wechselwirkung von Pestiziden mit Huminstoffen mit Hilfe der Kapillarelektrophorese*. PhD thesis, Institut für Chemie Weihnstephan, Lehrstuhl für Ökologische Chemie, der Technischen Universität München, 1995.
- [166] SCHMITT, P., GARRISON, A. W., FREITAG, D., UND KETTRUP, A. Capillary Isoelectric Focusing (CIEF) for the Characterization of Humic Substances. *Wat. Res.* 31(8) (1997), 2037–2049.
- [167] SCHMITT-KOPPLIN, P., HERTKORN, N., SCHULTEN, H.-R., UND KETTRUP, A. Structural Changes in a Dissolved Soil Humic Acid during Photochemical Degradation Processes under O<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> Atmosphere. *EST* 32 (1998), 2531–2541.
- [168] SCHRAML, J. <sup>29</sup>Si NMR Spectroscopy of Trimethylsilyl Tags. *Progress in NMR Spectroscopy* 22 (1990), 289–348.
- [169] SCHRAML, J., BLECHTA, V., KVÍČALOVÁ, M., NONDEK, L., UND CHVALOVSKÝ, V. Polar Functional Group Analysis of Mixtures by Silicon-29 Nuclear Magnetic Resonance. *Anal. Chem.* 58(8) (1986), 1892–1894.
- [170] SCHRAML, J., PAST, J., PUSKAR, J., PEHK, T., LIPPMAA, E., UND BREŽNÝ, R. Assignment of <sup>29</sup>Si NMR Lines and Determination of <sup>29</sup>Si–<sup>13</sup>C Coupling Constants in Pertrimethylsilylated Lignin-Related Phenol-Carboxylic Acids by Selective Heteronuclear INADEQUATE Method. *Collection Czechoslovak Chem. Commun.* 52 (1987), 1985–1991.
- [171] SCHULTE, J., UND LAUTERWEIN, J. 2D <sup>17</sup>O,<sup>1</sup>H Chemical Shift Correlation Spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* 34 (1996), 703–707.
- [172] SENESI, N., UND MIANO, T. M., Hrsg. *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health* (1994), Amsterdam: Elsevier Science Publisher B.V. Proceedings of the 6th International Meeting of the International Humic Substances Society, Monopoli (Bari), Italy, September 20-25, 1992.
- [173] SESHADRI, K. S., YOUNG, D. C., UND CRONAUER, D. C. Characterization of coal liquids by <sup>13</sup>C n.m.r. and FT-i.r. spectroscopy — fractions of oils of SRC-I and asphaltenes and preasphaltenes of SRC-I and SRC-II. *Fuel* 64 (1985), 22–28.
- [174] SHEVCHENCO, S., UND BAILEY, G. Life After Death: Lignin-Humic Relationships Reexamined. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 26(2) (1996), 95–153.
- [175] SHIN, H., UND MOON, H. An "Average" Structure Proposed for Soil Fulvic Acid by DEPT/QUAT <sup>13</sup>C NMR Pulse Techniques. *Soil Sci.* 161(4) (1996), 250–256.

- [176] SIMPSON, A., BOERSMA, R., KINGERY, W., HICKS, R., UND HAYES, M. Application of NMR Spectroscopy for Studies of the Molecular Compositions of Humic Substances. In *Humic Substances, Peats and Sludges*, M. Hayes und W. Wilsoo, Hrsg. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1997, S. 46–62.
- [177] SMITH, L., HERZ, J., UND EZELL, E.  $^{17}\text{O}$  nuclear magnetic resonance spectra of steroids. *Steroids* 58 (1993), 260–267.
- [178] SNAPE, C. E., SMITH, C. A., BARTLE, K. D., UND MATTHEWS, R. S. Estimation of Oxygen Group Concentrations in Coal Extracts by Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. *Anal. Chem.* 54 (1982), 20–25.
- [179] SØRENSEN, O. W., EICH, G. W., LEWITT, M. H., BODENHAUSEN, G., UND ERNST, R. R. Product Operator Formalism for the Description of NMR Pulse Experiments. *Progress in NMR Spectroscopy* 16 (1983), 163–192.
- [180] STEIN, A., WAGENKNECHT, W., KLEMM, D., UND PHILIPP, B. Verfahren zur Herstellung von O-Trialkylsilylcellulosen. *Patentschrift DD 299 314 A5 920409* (1989).
- [181] STEPANOV, A., ZHARKOVA, L., UND STEPANOVA, E. Application of  $^1\text{H}$ -NMR Spectroscopy for the Characterization of Humic Substances. *Eurasian Soil Science* 30(2) (1997), 142–145.
- [182] STEVENSON, F. J. *Humus Chemistry; Genesis, Composition, Reactions*. New York: John Wiley & Sons, 1982.
- [183] STEVENSON, F. J. Reductive Cleavage of Humic Substances. In Hayes et al. [103], S. 121–142.
- [184] THORN, K., UND MIKITA, M. Ammonia fixation by humic substances: a nitrogen-15 and carbon-13 NMR study. *Sci. Total Environ.* 113 (1992), 67–87.
- [185] THORN, K. A., ARTERBURN, J. B., UND MIKITA, M. A.  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Investigation of Hydroxylamine-Derivatized Humic Substances. *Environ. Sci. Technol.* 26 (1992), 107–116.
- [186] THORN, K. A., FOLAN, D. W., ARTERBURN, J. B., MIKITA, M. A., UND MACCARTHY, P. Application of Inept Nitrogen-15 and Silicon-29 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry to Derivatized Fulvic Acids. *Sci. Total Environ.* 81/82 (1989), 209–218.
- [187] THORN, K. A., STEELINK, C., UND WERSHAW, R. L. Methylation patterns of aquatic humic substances determined by  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Org. Geochem.* 11(3) (1987), 123–137.
- [188] TOLMAN, J. R., UND PRESTEGARD, J. H. Homonuclear and Heteronuclear Correlation Experiments Using Pulsed-Field Gradients. *CMR* 7(4) (1995), 247–262.
- [189] VALDEZ, D., UND ILER, H. D. Application of Silylation to Soaps, Alcohols and Amines in Aqueous Solutions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63(1) (1986), 119–122.

- [190] VALDEZ, D., UND MACK, S. H. Silylation of Dilute Hydroxy Compounds in Aqueous Solutions. *J. Chromatogr. Sci.* 23 (1985), 128–131.
- [191] VALENTINE, B., AMOUR, T. S., WALTER, R., UND FIAT, D. pH Dependence of Oxygen-17 Chemical Shifts and Linewidths of L-Alanine and Glycine. *J. Magn. Res.* 38 (1980), 413–418.
- [192] VAN BOXTEL, J., UND ENGELHARDT, M. *The interaction between XWIN-NMR and UNIX*. Bruker, 1996. Part Number: H5951.
- [193] VANDENHEUVEL, W. J. A. Gas-liquid chromatography of the trimethylsilyl derivatives of several amines of biological interest. *J. Chromatogr.* 36 (1968), 354–358.
- [194] VELASCO, V., HEISLER, M., UND DOWLING, J. Quantitative Measurement of Sugars by Gas-Liquid Chromatography. *U.S. Dep. Agr. Res. Serv. [Rep.] ARS 72-90* (1971), 61–81.
- [195] WAIS, A., BURAUDEL, P., DE GRAAF, A., HAIDER, K., UND FÜHR, F. Using  $^{13}\text{C}$ -NMR Spectroscopy to Evaluate the Binding Mechanism of Bound Pesticide Residues in Soils. 2. Investigations of Model Humic Acids. *J. Environ. Sci. Health B31*(1) (1996), 1–24.
- [196] WERSHAW, R. L., UND J., P. D. NMR characterization of humic acid fractions from different Philippine soils and sediments. *Anal. Chim. Acta* 232 (1990), 31–42.
- [197] WILSON, M., COLLIN, P., UND TATA, K.  $^1\text{H}$ -nuclear magnetic resonance study of a soil humic acid. *J. Soil Sci.* 34 (1983), 297–304.
- [198] WILSON, M., UND GOH, K. Proton-Decoupled Pulse Fourier-Transform  $^{13}\text{C}$  Magnetic Resonance of Soil Organic Matter. *J. Soil Sci.* 28 (1977), 645–652.
- [199] WROBLEWSKI, A. E., LENSINK, C., MARKUSZEWSKI, R., UND VERKADE, J. G.  $^{31}\text{P}$  NMR Spectroscopic Analysis of Coal Pyrolysis Condensates and Extracts for Heteroatom Functionalities Possessing Labile Hydrogen. *Energy & Fuels* 2 (1988), 765–774.
- [200] YOSHIDA, T., HATANO, T., UND OKUDA, T. Two-Dimensional NMR Spectra of Hydrolyzable Tannins which Form Equilibrium Mixtures. *Magn. Reson. Chem.* (1992), S46–S55.
- [201] ZACHMANN, H. G. *Mathematik für Chemiker*. VCH, Weinheim, 1994.
- [202] ZHU, J., UND SMITH, I. Selection of Coherence Transfer Pathways by Pulsed-Field Gradients in NMR Spectroscopy. *Concepts in Magnetic Resonance* 7(4) (1995), 281–291.



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1996 bis Juni 1999 am Institut für Ökologische Chemie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Kettrup angefertigt.

Für die Themenstellung und Unterstützung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. A. Kettrup und Herrn Dr. N. Hertkorn bedanken. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. S. Schramm für seine zuverlässige Hilfe bei technischen Problemen und die zahlreichen Diskussionen.

Weiter möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Arbeitskreises für die kollegiale Unterstützung bedanken.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinen Kollegen im DFG-Schwerpunktprogramm "ROSIG".

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Herrn Dipl.-Inform. Manfred Günzl, der die nötigen Programmierarbeiten vorgenommen hat.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziert. Für die Bereitstellung von Personal- und Sachmitteln möchte ich mich recht herzlich bedanken.

# Lebenslauf

Name                    Annette Günzl  
Geburtstag            13. 12. 1968 in Schramberg (Schwarzwald)

## Ausbildung

1979 – 1988    Gymnasium Schramberg  
1988 – 1995    Chemiestudium an der TH-Karlsruhe  
                  Vertiefungsfach: Chemische Technik  
                  Diplomarbeit am Mineralogischen Institut  
2000 –         Weiterbildung: Marketing, Vertriebs- und Projektmanagement

## Berufstätigkeit

1992 – 1993    Werkstudent im Forschungszentrum Karlsruhe, Institut für Materialforschung.  
1996 – 1998    Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Ökologische Chemie der GSF-Neuherberg unter Leitung von Prof. Dr. A. Kettrup. Arbeiten zur quantitativen Beschreibung der Sauerstoff-Funktionalität in Huminstoffen.