

Lehrstuhl für Ökologische Chemie und Umweltanalytik
der Technischen Universität München

Struktur- und Größencharakterisierung von Huminstoffen und ihren methylierten Derivaten

Friederike Jäkle

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 (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. W. Huber
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat., Dr. h.c. (RO) A. Kettrup
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat., Dr. rer. nat. habil.
I. Kögel-Knabner
3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat., Dr. agr. habil. K.-W. Schramm

Die Dissertation wurde am 09.10.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 11.12.2002 angenommen.

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdrucks, der Entnahme von Abbildungen, der Wiedergabe auf photomechanischem, 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 © Friederike Jäkle 2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1999 bis September 2002 im Institut für Ökologische Chemie der GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg angefertigt.

BEDANKEN MÖCHTE ICH MICH...

...bei Herrn Professor Dr. Dr. h.c. A. Kettrup für die interessante Themenstellung und die nachfolgende Unterstützung und Förderung. Die hervorragende instrumentelle und experimentelle Ausstattung des Instituts hat einen entscheidenden Teil dieser Arbeit erst ermöglicht.

...bei Frau Professor Dr. I. Kögel-Knabner für die freundliche Übernahme des Koreferats.

...bei meinem Betreuer Herrn PD Dr. K.-W. Schramm, der mich in allen Belangen dieser Arbeit tatkräftig unterstützt hat. Er war jederzeit zu Diskussionen bereit und trug mit zahlreichen fruchtbare Anregungen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

...bei Herrn Dr. N. Hertkorn, Frau Dr. J. Lintelmann, Herrn Dr. D. Martens und Frau V. Meyer für die technische und praktische Hilfe bei den NMR- und den AFFFF-Messungen.

...bei Frau B. Danzer für ihre intensive Unterstützung und Zivilcourage und für das Durchsehen des Manuskripts.

...bei meinen Kollegen im IÖC, d.h. bei Karin Doods, Naima Chahbane, Dr. Gabriele Severin, Wolfgang Jaser, Hannes Hofbauer, Marchela Lebiqyan, Manuel Ciumasu, Michaela Weber, Dr. Petra Krämer, Annette Franke, Rainer Hermann, Bernhard Henkelmann, Werner Bergheim, Thorsten Hauler, Fabian Mühlberger, Thomas Ferge, Klaus Hafner, Dr. Jürgen Maghun, Martin Blumenstock für das freundliche Arbeitsklima und den kooperativen Stil.

...vor allem bei meinen Eltern und bei Jörn für ihre liebevolle mentale Unterstützung und das Vertrauen in mich, das sie mir während jeder Phase des Entstehens dieser Arbeit entgegenbrachten.

Inhalt

1	Einleitung und Aufgabenstellung	1
2	Allgemeiner Teil.....	4
2.1	Huminstoffe	4
2.1.1	Entstehung und Vorkommen	4
2.1.2	Industrielle Bedeutung von Huminstoffen.....	5
2.1.3	Definition und Struktur.....	5
2.1.4	Molekülgrößen von Huminstoffen.....	9
2.2	Methylierung von Huminstoffen	11
2.2.1	Methylierungsmethoden	11
2.2.2	Mechanistische Betrachtung von Nebenreaktionen	12
2.2.2.1	Methylierungsnebenreaktionen von Diazomethan.....	13
2.2.2.2	Methylierungsnebenreaktionen von Methyljodid	16
2.3	NMR-Spektroskopie	16
2.3.1	Physikalische Grundlagen.....	16
2.3.2	Prinzip der Zweidimensionalen NMR-Spektroskopie	19
2.3.3	Gepulste Feldgradienten (PFG) in der NMR-Spektroskopie.....	20
2.3.4	NMR-Spektroskopie an Huminstoffen - ein Überblick.....	23
2.3.4.1	Eindimensionale NMR-Spektroskopie	23
2.3.4.2	Zweidimensionale NMR-Spektroskopie.....	24
2.3.4.3	Festkörper-NMR-Spektroskopie	25
2.3.4.4	Heterokern-NMR-Spektroskopie	25
2.3.5	Pulssequenzen der verwendeten Experimente	25
2.3.5.1	Eindimensionale NMR-Experimente	25
2.3.5.2	Zweidimensionale NMR-Experimente.....	28
2.4	FELDFLUSSFRAKTIONIERUNG (FFF)	32
2.4.1	Die FFF als analytische Trenntechnik	32
2.4.1.1	Historische Entwicklung und Anwendungsbereiche.....	32
2.4.1.2	Allgemeines Trennprinzip: Normal-Modus.....	33
2.4.1.3	Spezielle Trennmodi.....	34
2.4.1.4	Verschiedene FFF-Varianten	35
2.4.1.5	Trennbereiche der FFF-Varianten	36
2.4.1.6	Andere analytische Methoden im Trennbereich der FFF	37
2.4.2	Asymmetrische Fluss-FFF (AFFFF).....	39

2.4.2.1	Trennprinzip und instrumenteller Aufbau der AFFFF	39
2.4.2.2	Ablauf einer Trennung	41
2.4.2.3	Theoretische Grundlagen	42
2.4.3	Detektion der FFF-Trennungen	46
2.4.3.1	UV / VIS-Absorptionsdetektion	46
2.4.3.2	Differentialrefraktometrie (RI)	47
2.4.3.3	Laserlichtstreuung	47
3	Materialien und Methoden	49
3.1	Huminstoffe und Referenzsubstanzen	49
3.2	Methylierung von Huminstoffen	50
3.3	NMR-Spektroskopie	51
3.3.1	Apparative Ausstattung	51
3.3.2	Probenvorbereitung	52
3.3.3	Parameter der NMR-Experimente	52
3.3.3.1	Eindimensionale NMR-Experimente	52
3.3.3.2	Zweidimensionale NMR-Experimente	55
3.3.4	Hilfen zur Auswertung der NMR-Ergebnisse	59
3.3.4.1	Erstellung von Minimum- und Differenzspektren	59
3.3.4.2	Modellrechnungen als Zuordnungshilfe für NMR-Spektren	59
3.4	Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung	60
3.4.1	Geräteparameter	60
3.4.2	Standards und Fließmittel	60
3.4.3	Probenvorbereitung und Trennbedingungen	61
4	Ergebnisse und Diskussion	63
4.1	Ergebnisse und Diskussion der NMR-Spektroskopie	63
4.1.1	NMR-Verschiebungsbereiche der HS-Partialstrukturen	63
4.1.2	Integrationsdaten der funktionellen Gruppen und der Gerüststruktur von methylierten Huminstoffen in den verschiedenen NMR-Experimenten	69
4.1.2.1	Eindimensionale ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren	70
4.1.2.2	Zweidimensionale NMR-Spektren	74
4.1.3	Erstellung von Minimum- und Differenzspektren	76
4.1.4	Anteile an nativen und durch die Methylierung hinzugekommenen Methylgruppen	76
4.1.4.1	Vergleich von Spektren derivatisierter und underivatisierter Huminstoffe	76

4.1.4.2	Vergleich der ^{12}C - und der ^{13}C -methylierten Huminstoffspektren	78
4.1.5	Einfluss der Methylierungsreihenfolge auf die Ergebnisse	79
4.1.6	Ergebnisse der Weitbereichskopplungs-NMR-Spektren (HSQC-TOCSY)	81
4.1.7	Vergleich der 2D-NMR-Spektren von methylierten Fulvin- und Huminsäuren	85
4.1.8	Struktur von methylierten Huminstoffen am Beispiel HO10	85
4.1.9	Zusammenfassung der NMR-Ergebnisse	98
4.2	Ergebnisse der Asymmetrischen Fluss Feld-Fluss Fraktionierung (AFFFF)	99
4.2.1	Kalibrierung der AFFFF	99
4.2.1.1	Polystyrolstandards in THF	100
4.2.1.2	Polyethylenglykolstandards in Methanol	101
4.2.1.3	Polystyrolsulfonatstandards im wässrigen Bereich	102
4.2.2	Molekulargewichts- und Größenverteilungen der Huminstoffe und ihrer methylierten Derivate	104
4.2.2.1	Methylierte Huminstoffe in THF	105
4.2.2.2	Huminstoffe in Methanol	107
4.2.2.3	Huminstoffe in 0,1 M und 0,01 M NaCl	109
4.2.3	Diskussion der Berechnung der Diffusionskoeffizienten	112
4.2.4	Abhängigkeit der Ergebnisse von den gewählten Standards	115
4.2.4.1	Wässrige Lösungen	115
4.2.4.2	Methanol	117
4.2.4.3	THF	118
4.2.5	Vergleich der Ergebnisse der methylierten Huminstoffe in Methanol und THF	118
4.2.6	Vergleich der Ergebnisse der Huminstoffe in Methanol wässrigem Medium	119
4.2.7	Ergebnisse von Carminsäure und ihren methylierten Derivaten in den verschiedenen Fließmitteln	121
4.2.8	Gewichts- und Größenveränderung der Huminstoffe durch die Methylierung	121
4.2.9	Zusammenfassung der Ergebnisse der Asymmetrischen Fluss-Feldflussfraktionierung	122
5	Zusammenfassung und Ausblick	123
6	Literatur	127

- Anhang A: Integrationsdaten der 1D- und der 2D-COSY- und HSQC-Spektren
- Anhang B: ^{12}C -methylierte HSQC-Spektren und Differenzspektren des Gerüsts und der nativen CH_3 -Gruppen der methylierten HS
- Anhang C: HSQC- und COSY-Differenzspektren aller FAs und HAs in beiden Methylierungsreihenfolgen und daraus resultierende Minimumspektren
- Anhang D: Weitbereichskopplungsinformationen: HSQC-, HSQC-TOCSY- und deren Differenzspektren
- Anhang E: Vergleich der verschiedenen FAs und HAs: HSQC- und COSY-Spektren aller FAs und HAs, aus den Substanzgruppen resultierende Minimumspektren, Differenzspektren für alle Substanzen
- Anhang F: Liste der verwendeten Substanzen für das ACD-Labs-Modell
- Anhang G: M_w -, M_n -, M_p -Werte, Diffusionskoeffizienten, Polydispersitäten, $H(S)D_w$ -, $H(S)D_n$ -, $H(S)D_p$ -Werte methylierter und unmethylierter Substanzen in THF, Methanol und 0,1 bzw. 0,01 M NaCl

Verzeichnis der verwendeten Größen und deren Einheiten

Größe	Zeichen	Einheit
Kern- oder Eigendrehimpuls	P	Js
Plancksche Wirkungsquantum	h	$6,6262 \cdot 10^{-34}$ Js
magnetische Moment	μ	$V \text{ s A}^{-1} \text{ m}^{-1}$
gyromagnetisches Verhältnis	γ	$10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Magnetfeld	B	T
Energie	E	J
Boltzmannkonstante	k	$1,3805 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$
Temperatur	T	K
Frequenz	ν	Hz
Pulsdauer	τ	s
Gradientenstärke	G	cm^{-1}
Kanalhöhe	w	cm
Strömungsgeschwindigkeit	v	m s^{-1}
Kraft auf ein Teilchen in x-Richtung	J_x	kg m s^{-2}
Konzentration	c	g mol^{-1}
Diffusionskoeffizient	D	$\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$
Voidvolumen	V_0	ml
Totzeit	t_0	s
Retentionszeit	t_R	s
Flussrate am Kanalausgang	V_{out}	ml s^{-1}
Querflussrate	V_c	ml s^{-1}
Kapillar- und Detektorzellenvolumen vom Kanalausgang bis zum Detektor	$V_{K \rightarrow D}$	ml
Wellenlänge	λ	nm
Viskositätskoeffizient	η	$10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Durchmesser	d	nm
Extinktionskoeffizient	ε	$\text{cm}^2 \text{ mol}^{-1}$

1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

Huminstoffe (HS) bilden den Hauptbestandteil organischen Materials in der aquatischen und terrestrischen Umwelt. Ihr Vorkommen in natürlichen Gewässern, Abwässern, Böden, Sedimenten, Braunkohle etc, macht sie zu einer der am weitesten verbreiteten Form von unbelebtem, organischem Material auf der Erde.

Chemisch gesehen handelt es sich bei HS um heterogene Gemische organischer Makromoleküle, die sich hauptsächlich aus den Elementen Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff zusammensetzen (1). Sie stellen ein komplexes Stoffgemisch einander ähnlicher organischer Verbindungen dar mit einem breiten Spektrum an funktionellen Gruppen, Strukturen und Molekülgrößen. Ihre Zusammensetzung variiert stark aufgrund ihrer Herkunft bzw. Genese (2). HS entstehen durch mikrobiellen Abbau von pflanzlichem Material, sind gegenüber weiteren Zersetzungsprozessen äußerst resistent und werden wasserchemisch als „refraktäre organische Säuren in Gewässern“ (ROSIG) eingeordnet. Die wichtigsten Ausgangsmaterialien für den Humifizierungsprozess sind Cellulose und Lignin (3), was den hohen Gehalt an sauerstoffffunktionalisierten Strukturbausteinen erklärt.

Über HS in Böden, also in der festen organischen Phase, gibt es zahlreiche Arbeiten, welche aufgrund des landwirtschaftlichen Interesses bis zum Ende des 18. Jahrhunderts (Archard 1786) zurückgehen. Die Untersuchung von HS in aquatischen Systemen ist noch relativ jung.

Die Wirkungsmechanismen von HS in der Umwelt sind sehr vielschichtig. HS beeinflussen aufgrund ihres starken Bindungsvermögens in hohem Maße Transport, Ablagerung und Reaktivität von organischen (z.B. Pestiziden) und anorganischen (z.B. Metallen) Spurenstoffen in aquatischen Systemen.

Die vorliegende Arbeit besteht aus zwei Teilen, der Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie und der Bestimmung der Molekulargewichts- und Größenverteilungen von HS und ihren methylierten Derivaten in verschiedenen Lösemitteln mittels asymmetrischer Flussfeldflussfraktionierung (AFFFF):

NMR-Spektroskopie zur Untersuchung der Struktur von methylierten HS

Durch die Entwicklung von Hochfeldmagneten und multidimensionalen NMR-Techniken eröffnet sich die Möglichkeit, Signale sichtbar zu machen, welche in 1D-NMR-Spektren wegen starker Überlagerung nicht unterscheidbar sind. 2D-NMR-Experimente haben sich schon seit längerem in der Lignin-Forschung etabliert (4), (5) und lassen sich mit geringen Abwandlungen auch auf HS anwenden.

Ein Ziel dieser Arbeit war, durch die Kombination von 1D- ^1H -, ^{13}C - und ^{13}C -DEPT-Experimenten und 2D-Experimenten (COSY, HSQC, HSQC-TOCSY und TOCSY) eine präzisere strukturelle Beschreibung des HS-Gerüsts und vor allem der chemischen Umgebung von Sauerstoffatomen in diesem Gerüst zu ermöglichen.

Die HS wurden hierfür mit markierten (^{13}C) und unmarkierten Reagenzien methyliert. Die Methylierung bringt eine deutlich verbesserte Empfindlichkeit der Spektren und eine erhöhte Anzahl an Resonanzen und Kreuzsignalen bei gleichzeitiger Veränderung der mittleren Signalpositionen mit sich. Die ^{13}C -Markierung erlaubt hierbei die Differenzierung von nativen und neu eingeführten Methylgruppen. Zudem werden bei der Methylierung außer der Substitution von aktivierten, aciden Protonen Nebenreaktionen erwartet wie C-Methylierung, Spaltungsreaktionen etc. Diese geben Aufschluss über die Substitution von aliphatischen α - und β -Positionen (zu funktionellen Gruppen) in HS.

Durch Integration von definierten Strukturbereichen in den 1D-Experimenten erhält man einen groben Überblick über die quantitative Partialstrukturzusammensetzung und die Multiplizitäten (^{13}C -DEPT) der untersuchten HS.

Durch die Einführung der zweiten Frequenzvariablen und die Kombination verschiedener 2D-NMR-Experimente soll eine detaillierte Aufklärung nicht nur von einzelnen Partialstrukturen, sondern auch von Weitbereichskopplungen innerhalb eines Spinsystems (HSQC-TOCSY, TOCSY) erreicht werden. Die Kreuzsignale aliphatischer und aromatischer Methylester und -ether fallen bei guter Auflösung im HSQC-Spektrum in unterschiedliche chemische Verschiebungsbereiche. Dadurch können sie getrennt quantifiziert werden.

Molekulargewichtsbestimmung und Größenverteilung von HS und ihren methylierten Derivaten mittels AFFFF

Bei der asymmetrischen Fluss-Feldflussfraktionierung handelt es sich um eine relativ neue Methode zur Auftrennung von Substanzen gemäß unterschiedlicher Diffusionskoeffizienten. Einschränkungen und Probleme wie bei der Size-Exclusion-Chromatography (SEC) und Gelpermeationschromatographie (GPC) (hydrophobische Interaktionen, Ionenaustausch und intramolekulare elektrostatische Wechselwirkungen) treten bei dieser Technik nicht auf. Somit lässt diese Analysemethode auf nahezu unverfälschte Ergebnisse hoffen.

Die AFFFF wird in dieser Arbeit erstmals auf Referenz-HS aus dem DFG-ROSIG(**refraktäre organische Säuren in Gewässern**)-Programm angewandt. Das Molekulargewicht dieser HS soll im wässrigen Medium bestimmt und die Ergebnisse mit anderen größenbestimmenden Analysemethoden wie beispielsweise SEC, GPC oder Ultrazentrifugation verglichen werden.

Dabei soll besonderer Wert auf die Wahl von pH, Ionenstärke, Probenkonzentration und Referenzstandards gelegt werden. Aufgrund von Literaturangaben wurden Polystyrolsulfonat-Standards eingesetzt.

Die Vermessung methylierter HS in organischen Lösemitteln (THF und Methanol) erfolgt erstmals mittels AFFFF. Die Methylierung erfordert den Einsatz organischer Lösemittel (LM). Dabei werden aus den ursprünglich sehr polaren HS unpolare, in Wasser nicht mehr gut lösliche Derivate. Da bisher der Einsatz organischer LM weder in der HS-Forschung noch in der Entwicklung der AFFFF-Geräte in Kombination mit Naturstoffen etabliert ist, wurde vor den Messungen zuerst eine, den HS angepasste Messmethode entwickelt. Außerdem werden lösemittelspezifische Referenzstandards identifiziert und mit ihnen die Funktionsfähigkeit des Gerätes im organischen Betrieb optimiert.

Methanol, als nicht mehr sehr polares, aber auch noch nicht sehr unpolares Lösemittel konnte eingesetzt werden, um sowohl die underivatisierten HS als auch die methylierten zu untersuchen. Das ermöglicht einen direkten Größenvergleich der HS vor und nach der Methylierung. Die Molekulargewichtsverteilungen wurden relativ zu Polyethylenglykolstandards bestimmt.

Die methylierten HS wurden zum Vergleich der Molekulargewichte zusätzlich noch in THF vermessen. Als Referenzstandards dienten hier Polystyrole.

2 ALLGEMEINER TEIL

2.1 HUMINSTOFFE

2.1.1 ENTSTEHUNG UND VORKOMMEN

Huminstoffe (HS) sind refraktäre organische Substanzen biogenen Ursprungs. Sie entstehen durch mikrobiellen Abbau von pflanzlichem Material und kommen in Böden, aquatischen Systemen und Sedimenten vor. Pflanzliches Material besteht aus Ligninen, Cellulose, Sacchariden, Eiweißen, Fettsäuren, Kohlehydraten und einer Reihe von anderen organischen und anorganischen Substanzen. Die Vielfalt der eingehenden Materialien führt zu einer sehr komplexen und heterogenen Mischung von Verbindungen, welche einen wesentlichen Einfluss auf physikalische und chemische Eigenschaften des umgebenden Mediums haben können (2), (6).

Bisher wurde davon ausgegangen, dass die kleinen Abbauprodukte durch Polymerisation und Kondensierung in refraktäre Huminstoff-Makromoleküle mit Molekulargewichten von bis zu über einer Million Dalton übergehen (2), (7), (8).

Neueren Erkenntnissen zufolge formen die kleinen Abbauprodukte in wässriger Lösung Aggregate mit makromolekular-ähnlichen Eigenschaften (9), (10), (11). Simpson et al. konnten diese Vermutungen 2001 erstmals durch DOSY („Diffusion ordered Spectroscopy“)-NMR-Experimente beweisen. Demnach sind HS: „...a mixture of plant components at various stages of humification with a range of molecular sizes that are held together by weak associations....“ (12).

Etwa 60 – 70 % des gesamten organischen Kohlenstoffgehaltes (TOC: total organic carbon) in Böden und 40 – 60 % des gelösten organischen Kohlenstoffes (DOC: dissolved organic carbon) in Grund-, Oberflächen- und Meerwasser bestehen aus Huminstoffen. Böden enthalten zwischen 0 und 10 % HS (moorige Böden bis zu 20 %) und stellen mit einem geschätzten TOC-Gehalt von $3 - 5 \times 10^{15}$ kg das größte Reservoir für organischen Kohlenstoff an der Erdoberfläche dar (2). Der HS-Gehalt in Gewässern kann stark variieren und beträgt in Meerwasser ca. 0,1 in Flüssen 3 – 5 und in Moorgebieten oft 10 mg / l und mehr (13).

2.1.2 INDUSTRIELLE BEDEUTUNG VON HUMINSTOFFEN

Schon Justus von Liebig arbeitete am Stoffwechsel von Pflanzen und Tieren und gewann HS durch Extraktion von Torf- und Bodenproben. Er gilt als der Gründer der Agrikulturchemie (14). Die indirekte Verwendung von HS in Form von Torf, der nach Entwässerung von Mooren in sogenannten Torfstichen gewonnen werden kann, geht noch weiter zurück als auf Liebig. Torf wurde aufgrund seines hohen Kohlenstoffgehalts in Gebieten mit großen Moorflächen als Heizmaterial verwendet. Heute findet er vor allem in der Landwirtschaft Anwendung, wo er als Bodenverbesserer oder Düngemittel genutzt wird. Ein weiteres traditionelles Anwendungsgebiet von HS ist die Medizin. Therapeutische Wirkung erzielen Moorbäder bei chronisch-entzündlichen oder rheumatischen Gelenkserkrankungen.

MacCarthy et al. (15) zählen in einem Übersichtsartikel zahlreiche industrielle Anwendungen von Humus und Huminstoffen auf. Wegen ihrer exzellenten Ionenaustauscher- und Adsorptionskapazitäten, welche die Entfernung von Schwermetallionen, Radionukliden, Gasen, Ölen, Pestiziden usw. ermöglichen, werden HS und vor allem das Rohprodukt Torf in der Umwelttechnik zur Wasseraufbereitung verwendet (15). HS finden ihren Einsatz aber auch in zahlreichen, eher weniger offensichtlichen industriellen Anwendungsgebieten. Einige davon sollen im Folgenden aufgeführt werden:

- Tintenpigment
- Additiv bei der Herstellung und Einfärbung von PVC
- Färbe- und Gerbmittel in der Lederbearbeitung
- Zement- und Keramikadditiv
- Zusatz in Chlor-Alkali-Zellen
- Zusatz für die Herstellung von harten Polyurethan-Schäumen
- Quelle synthetischer Kohlenwasserstoffe
- Extraktionsmittelzugabe bei der Urangewinnung
- Aufbewahrungsmedium für Bakterien
- Hilfsstoff beim Papierrecycling etc.

2.1.3 DEFINITION UND STRUKTUR

Trotz der vielfältigen Verwendungszwecke von HS sind viele Fragen bezüglich ihrer Entstehung, Struktur und Wirkungsweise bis heute nicht eindeutig und befriedigend zu beantworten. Aus diesem Grund ist es trotz der Kenntnis einer Vielzahl von charakteristischen HS-Eigenschaften nach wie vor schwierig, ihnen eine generell gültige Definition zuzuweisen.

Auf der Basis ihrer pH-abhängigen Löslichkeit werden die HS in drei Kategorien unterteilt (3):

- Fulvinsäuren (FA): löslich im alkalischen und im sauren Medium
- Huminsäuren (HA): löslich im alkalischen, unlöslich im sauren Medium
- Humine: unlöslich im alkalischen und im sauren Medium

Alle drei Fraktionen sind gelbe bis braune oder schwarze heterogene Biomoleküle (16) von derzeit sehr umstrittener Größe, welche nahezu resistent gegen biologischen Abbau sind.

Die chemische Zusammensetzung der HS ist maßgeblich vom Ort ihrer Entstehung und den dort herrschenden Bedingungen abhängig. Sie setzen sich hauptsächlich aus den Elementen Kohlenstoff (40 – 60 %), Wasserstoff (4 – 6 %) und Sauerstoff (30 – 40 %) zusammen. Dazu kommen Stickstoff (1 – 6 %) und Schwefel (< 2 %). Phosphor (5×10^{-3} %), Silicium ($< 1,7$ %) und Metalle ($10^{-6} - 2$ %) liegen meistens nur in Spurenkonzentrationen vor.

Am Aufbau von HS sind sowohl aliphatische als auch aromatische (bis zu 25 %) Struktureinheiten beteiligt. Aus traditioneller Sicht sind HS komplexe Mischungen sich ähnelnder Makromoleküle mit variierenden Molekülgrößen, (Sub)strukturen und Funktionalitäten, welche stark von ihrer Genese und dem Grad ihrer Humifizierung abhängen. Meist bestehen sie aus einer Vielzahl von aromatischen, aliphatischen, Kohlehydrat- und Peptid-Substrukturen, die irregulär miteinander verknüpft sind und zudem eine große Anzahl unterschiedlicher funktioneller Gruppen enthalten können (17).

Nach neuesten Erkenntnissen haben die HS Molekulargewichte von weniger als 2000 Da und neigen in Anwesenheit von Metallen zu Aggregatbildung. Sie setzen sich aus Metallkationen, Polysacchariden, Polypeptiden, aliphatischen Ketten und aromatischen Ligninfragmenten zusammen (12), (18).

Der Hauptunterschied zwischen HA und FA besteht in der Molekülgröße. FA sind kleiner als HA, sie zeichnen sich durch höhere Ladung, höhere Polarität, höhere C/N- bzw. höhere O/C-Verhältnisse und eine geringere Aromatizität aus. Außerdem besitzen sie weniger phenolische Hydroxylgruppen. Die aquatischen HS sind kleiner als die terrestrischen und weniger aromatisch. Sie enthalten weniger assoziierte Zuckerbestandteile und weniger Aminosäuren. Generell besitzen HA mehr Zucker- und Aminosäureanteile als FA (3).

Trotz des hier beschriebenen Wissens über Bestandteile und Zusammensetzung von HS ist es nach wie vor nicht möglich, eindeutige Aussagen über die Art der Verknüpfung der verschiedenen Strukturelemente und damit über die räumliche Molekülstruktur von HS zu treffen. Dabei tritt bei analytischen Untersuchungen an HS generell das Problem auf, dass summarische Ergebnisse anfallen, die sich auf eine komplexe Stoffmischung beziehen und

zudem meist auf breiten Analysesignalen mit eingeschränkter Auflösung bzw. Selektivität basieren (17). In den letzten 30 Jahren wurden zahlreiche Versuche gemacht, den HS eine generell gültige Struktur zuzuordnen.

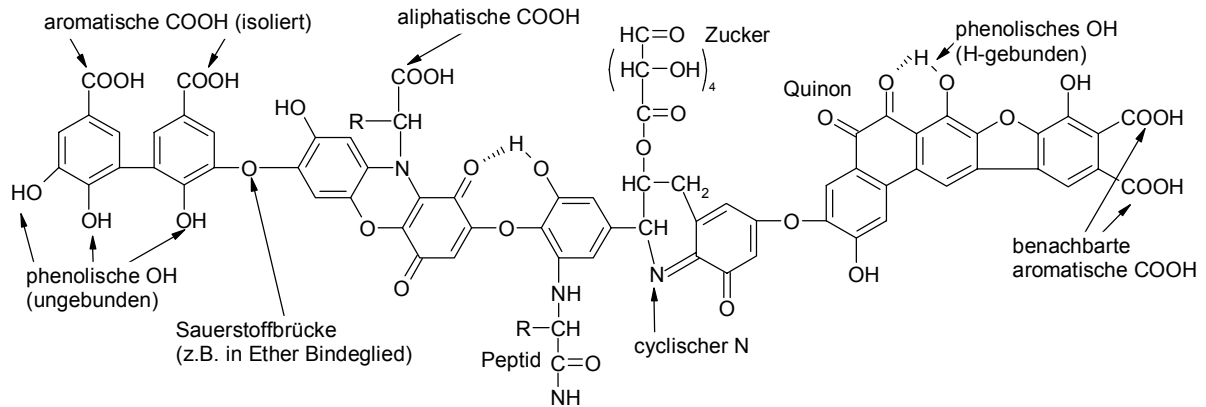


Abbildung 2-1: Hypothetische Struktur einer Huminsäure (HA) mit freien und gebundenen phenolischen OH-Gruppen, Quinon-Strukturen, Stickstoff- und Sauerstoffbrücken, Carboxylgruppen, Zucker- und Peptideinheiten (2)

Neuere Modelle, die anhand von experimentellen Daten zur Zusammensetzung von HS mit Hilfe von „Molecular Modelling“ erhalten wurden (7), bestätigen die Strukturvorschläge aus den frühen siebziger Jahren.

Zwei Strukturbeispiele sind in Abbildung 2-1 und 2-2 vorgestellt. Alle bisher postulierten mehr oder weniger komplexen Modelle gehen von einer heterogenen Komposition und einer Vielzahl von funktionellen Gruppen aus.

Simpson et al. (12) beschreiben die HS erstmals nicht mehr als Makromoleküle, sondern als eine komplexe Mischung von vielen Komponenten, die in Verhältnis und Struktur von Probenursprung und Extraktionstechnik abhängen. Eine allgemein gültige Struktur, falls es sie denn geben sollte, konnte bisher noch nicht festgelegt werden.

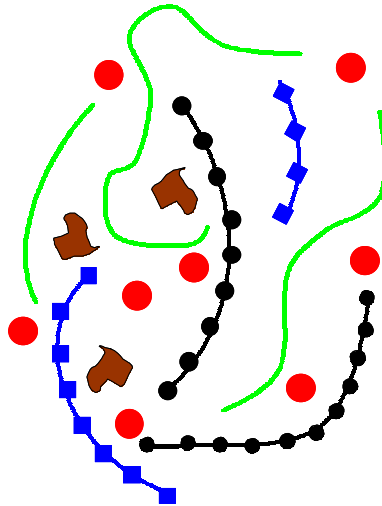


Abbildung 2-2: Rote Kreise: Metallkationen, schwarz: Polysaccharide, blau: Polypeptide, grün: aliphatische Ketten, braun: aromatische Lignin-Fragmente

Ein Überblick über Methoden zur allgemeinen Strukturbeschreibung und über die geläufigen molekülspektroskopischen Analysemethoden zur strukturellen Charakterisierung von HS wird in Tabelle 2-1 gegeben.

Tabelle 2-1: Methoden zur Huminstoff-Charakterisierung

Methode	Literatur
<i>Elementaranalyse</i>	
C, H, N, O, S in isolierten HS	(2)
<i>Molekülspektroskopie</i>	
UV / VIS	(19)
Fluoreszenz	(20)
FTIR	(19)
NMR (^1H , ^{13}C und Heterokerne)	(21)
Pyrolyse-GC-MS	(7)
<i>Chemische Methoden</i>	
Derivatisierung	(22)
Hydrolyse	(23)
Enzymatische Methoden	(24)

2.1.4 MOLEKÜLGRÖßEN VON HUMINSTOFFEN

Viele Prozesse und Wechselwirkungen von HS in der aquatischen Umwelt sind mehr oder weniger von der Molekülgröße beeinflusst. Daher ist eine zuverlässige Bestimmung der Molekülgrößenverteilung von hoher Relevanz.

In der aquatischen Umwelt erstrecken sich die Molekülgrößenverteilungen von gelösten HS über einen sehr breiten Bereich von <1 bis >100 kDa (ca. 1 – 100 nm). Dies entspricht einer Mischung von Polyelektrolyten kleiner, mittlerer und hoher molarer Masse. Die Bestimmung mittlerer molarer Massen, wozu eine Reihe von Methoden herangezogen werden können (25), erweist sich aufgrund der breiten Verteilung als wenig sinnvoll. Erste Hinweise auf den Verlauf einer solchen Verteilung erhält man durch Fraktionierung. (Wie bereits unter 2.1.3 beschrieben, werden die HS in Abhängigkeit vom pH-Wert in Fulvin- (FA) und Huminsäuren (HA) unterteilt.)

Die molare Masse ist eine fundamentale physikalische Größe, die bei reinen Verbindungen einfacher Struktur exakt bestimmt werden kann. Bei HS ist diese Eindeutigkeit jedoch nicht gegeben. Schon bei relativ gut charakterisierbaren Proteinen und Polysacchariden, denen eine regelmäßige, bekannte Struktur zugrunde liegt, treten verschiedene Kettenlängen auf, die zu einer Molekulargewichtsverteilung anstelle einer einheitlichen molaren Masse führen. Somit stellt die molare Masse nur für eine relativ kleine Anzahl gut definierter, monodisperser Proteine und Polysaccharide einen exakten Parameter dar. Makromoleküle oder Huminstoffe, welche eine ausgedehnte Verteilung ihrer Massen aufweisen, werden als polydispers bezeichnet.

Bei der Bestimmung molarer Massen polydisperser Verbindungen kann man sich auf die Kombination von molarer Masse am Peakmaximum (M_p), Anzahl der betrachteten Moleküle (M_n : number average weight) und Gesamtgewicht (M_w : weight average weight) beziehen. Die Begriffe M_w , M_n und M_p werden in Kapitel 2.4.2.3 mathematisch definiert. Experimentell lässt sich M_p durch Size-Exclusion-Chromatographie (SEC) (18), Gelpermeationschromatographie (GPC) oder Feldflussfraktionierung (FFF) (26), M_n durch Dampfdruckerniedrigung, Gefrierpunkterniedrigung oder Messung des osmotischen Druckes (27) und M_w durch Lichtstreuung bestimmen (28).

Wegen ihrer breiten Verteilung werden die HS, wie bereits erwähnt, als polydispers bezeichnet. Die Polydispersität eines Kolloids ergibt sich aus dem Verhältnis M_w / M_n . Für ein homogenes, monodisperses System von Makromolekülen erhält man $M_w / M_n = 1$. Bei Werten zwischen eins und zwei spricht man von einer beträchtlichen und bei Werten über zwei von einer extrem hohen Polydispersität (25). Für solche kolloidalen Systeme liefert eine

einzelne Größe wie M_n oder M_w nur sehr eingeschränkte Informationen. Massenverteilungen, die mittels FFF, SEC, GPC oder UF (Ultrafiltration) erhalten werden, liefern sowohl M_p - als auch M_n - und M_w -Werte und somit weitaus mehr Informationen. Bei der Bestimmung von molaren Massen mittels dieser Techniken sind die Molekülgröße und die Form der Teilchen entscheidend für die Fraktionierung.

Regelmäßige Moleküle, wie Proteine oder Polysaccharide, lassen sich relativ gut mit einer globulären oder ellipsoiden Form beschreiben. Somit besteht hier ein direkter Zusammenhang von Molekülgröße und molarer Masse.

In natürlichen Gewässern gelöste HS-Moleküle werden traditionell als lose, flexible und ständigen Veränderungen unterworfenen Molekülstränge betrachtet, die mit einem „random coil“ Modell beschrieben werden können (25). „Random coil“ bedeutet, dass ein Makromolekül erst über einen längeren Zeitraum gesehen eine Durchschnittsform annimmt, welche noch dazu in starkem Maße vom pH-Wert und der Salzkonzentration abhängt (29). Nach dieser Theorie kann die Gestalt eines gelösten HS-Moleküls bei gleicher molarer Masse von einer total gestreckten Form bei geringer Salzkonzentration bis zum stark geschrumpften oder geknäulten Körper in salzhaltigeren Lösungen reichen. Das bedeutet, dass man mit der FFF, SEC, GPC und UF Molekülgrößen erhält, die in starkem Maße von den jeweils gewählten experimentellen Bedingungen abhängig sind. Auch können die Ergebnisse nur dann miteinander verglichen werden, wenn sie unter identischen experimentellen Bedingungen (pH-Wert, Salzkonzentration, Kalibrierung) ermittelt wurden.

Neuester Literatur zufolge handelt es sich bei HS nicht um Molekülstränge, sondern um ungebundene kleine Moleküle (< 2000 Da), die in Anwesenheit von Metallkationen Aggregate bilden. Das Verhältnis der einzelnen Bestandteile und die Struktur der HS hängt demnach hauptsächlich von der natürlichen Probenumgebung und der Extraktionstechnik ab. Demzufolge würden pH-Wert und Salzkonzentration in Hinblick auf die Molekülgröße eine untergeordnete Rolle spielen. Die Aggregate werden zwar auch nach dieser Theorie durch eine komplexe Kombination aus hydrophoben Verbindungen, Ladungswchselwirkungen, Wasserstoffbindungen und Metallbrücken „zusammengehalten“, die Hauptrolle bei der Bildung und Stabilität der Aggregate wird aber laut Simpson et al. den Metallionen zugeschrieben (12). Die folgende Tabelle zeigt gängige Fraktionierungsmethoden für Huminstoffe.

Tabelle 2-2: Fraktionierungsmethoden von aquatischen Huminstoffen

Methoden	Fraktionen	Literatur
Unterschiedliche Löslichkeit in Säuren und Laugen	Fulvinsäure, Huminsäure, Humin	(30)
Gelpermeationschromatographie	breite Verteilung nach Molekülgrößen	(31), (32)
Ultrafiltration	getrennte Fraktionen nach Molekülgrößen	(33), (34)
Ultrazentrifugation	getrennte Fraktionen nach Molekülgrößen	(35)
Feldflussfraktionierung	Verteilung nach Molekülgrößen	(26), (36), (37-42),
Size-Exclusion-Chromatography	Verteilung nach Molekülgrößen	(26), (18)
Kapillarelektrophorese	Fingerprint im Fall von niedermolekularen HS	(43)
Elektrophorese	Fingerprint von Fraktionen	(44)
Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry	Verteilung nach Molekülmassen	(45), (26)

2.2 METHYLIERUNG VON HUMINSTOFFEN

Die Methylierung ist eine Standardmethode zur Funktionalisierung acider Protonen mit einem breiten Spektrum an Reagentien und Reaktionsbedingungen. Sie wurde bereits auf Huminstoffe angewendet (46), (47), (48), (49), (50), (51), (52), (53), (54).

2.2.1 METHYLIERUNGSMETHODEN

Beruhend auf der Veröffentlichung von Abbt-Braun et al. (46) wurde die sequentielle Methylierung mit Diazomethan und Methyljodid als aussichtsreiche Reaktion eingestuft und dies durch eigene Experimente auch bestätigt. Für isolierte aquatische Fulvinsäuren liefern laut Literatur die Kombinationsmethoden Diazomethan/ BF_3 / MeOH und Diazomethan / Hakamori die höchsten Ausbeuten. In der folgenden Tabelle werden verschiedene Methylierungsmöglichkeiten und die dabei derivatisierten Gruppen vorgestellt.

Tabelle 2-3: Reagentien und Charakteristika wichtiger Methylierungsreaktionen von Huminstoffen (46)

Kurzbezeichnung	Reagens	Derivatisierte Gruppe	Verbindungsklassen	Relative Ausbeute ^(a)	Reaktionsbedingungen
Diazomethan	CH ₂ N ₂ in Ether	-COOH -OH (phenolisch) -NH ₂	Aliph. Fettsäuren, arom. Säuren, Aminosäuren, Amine, Phenole	10,13 57,80 31,80	1 x 24 h 3 x je 24 h 3 x je 24 h
Hakamori	NaH/DMSO CH ₃ I	-COOH -NH -SH -OH	Polysaccharide, Lipopolysaccharide Peptide	0,08 0,87 1,80 14,70	0 °C 20 °C DMSO+CH ₃ I gleichzeitig DMSO-4 h dann CH ₃ I
Diazomethan/ Hakamori	s.o.	s.o.	s.o.	17,4	DMSO-4 h, dann CH ₃ I
MeOH/BF ₃	Methanol-Bortrifluorid	-COOH	Mono-(di,tri)-basische Carbonsäuren, (un)gesättigte Fettsäuren, arom. Säuren, Lipide, Herbizide	0,14 0,22 0,57 0,65	24 h, 20 °C 12 h, 40 °C und 15 h, 20 °C 120 h, 20 °C 16 h, 40 °C und 30 h, 20 °C
Diazomethan/ BF ₃ /MeOH	s.o.	s.o.	s.o.	15,30	20 h, 20 °C

^(a) bestimmt aus der relativen Extinktion bei 436 nm in unpolarem und polarem Lösungsmittel

Bei Anwendung der Methode Diazomethan / BF₃ / MeOH tritt eine Spaltung von Ester-, Ether- und Peroxy-Bindungen auf, und phenolische und alkoholische Hydroxylgruppen werden nicht methyliert. Mit der Diazomethan/Hakamori-Methode erreicht man eine vollständige Methylierung. In der Literatur wird auf unterschiedliche Selektivität bei Umkehr der Reihenfolge auf Hakamori / Diazomethan ohne genauere Erklärung hingewiesen (46), (47), (48).

2.2.2 MECHANISTISCHE BETRACHTUNG VON NEBENREAKTIONEN

Die Reagenzien Methyljodid und Diazomethan zeichnen sich durch ihre sehr hohe Reaktivität aus. Von daher muss man davon ausgehen, dass neben der gewünschten Funktionalisierung acider Protonen der oben genannten funktionellen Gruppen auch Nebenreaktionen auftreten. Diese können, sofern man sie in strukturelle Überlegungen mit einbezieht, nicht nur störend sein, sondern durchaus dem Verständnis der Substitutionsmuster in Alkylketten der Huminstoffe dienen. In der Literatur über Methylierung von HS werden Nebenreaktionen nur sehr selten beschrieben und auch untersucht (51), (52), (53). Sachs et al. (54) setzten

Diazomethan als Methylierungsreagenz ein. Sie konnten nur einen geringen Anteil an C-Methylierung feststellen. Andere Nebenreaktionen traten nicht auf.

Im folgenden sollen in der Literatur beschriebene Nebenreaktionen vorgestellt werden.

2.2.2.1 Methylierungsnebenreaktionen von Diazomethan

Die meisten in der Literatur beschriebenen Nebenreaktionen treten beim Einsatz von Diazomethan auf. Im Folgenden sollen die Nebenreaktionen kurz zusammengefasst aufgezählt werden und daran anschließend die Mechanismen der wichtigsten Reaktionen vorgestellt werden. Diazomethan kann mittels einer 1,3-dipolaren Cycloaddition an Olefine addieren. C-Methylierung und Insertionen sind häufige Nebenreaktionen an aktivierten Positionen. Mit Aldehyden (R-CHO) reagiert Diazomethan unter Bildung von homologen Aldehyden: R-CH₂-CHO oder Methylketonen R-CO-CH₃ sowie unter Bildung von Ethylenoxiden. Mit Ketonen (R-CO-R') reagiert Diazomethan unter Bildung von homologen Ketonen: R-CH₂-CO-R' oder R-CO-CH₂-R' oder von Ethylenoxiden, wobei die Reaktionsprodukte auch nebeneinander auftreten können und die entstehenden Ketone mit Diazomethan weiterreagieren können. Bei der Einwirkung von Diazomethan auf carbocyclische Ketone erfolgt CH₂-Insertion unter Ringerweiterung und in vielen Fällen auch Bildung von Epoxiden (47), (50), (54), (55).

C-Methylierung

Die wichtigste Nebenreaktion ist die C-Methylierung. Diese tritt sowohl bei der Methylierung mit Diazomethan als auch mit Methyljodid auf. Sie gibt Auskunft über Verzweigungen und Substitution von aliphatischen Ketten. Für die C-Methylierung müssen in der zu methylierenden Verbindung aktivierende Gruppen wie Alkoxy-carbonyl, Phenyl oder Acetyl bevorzugt neben einer Doppelbindung vorliegen (55).

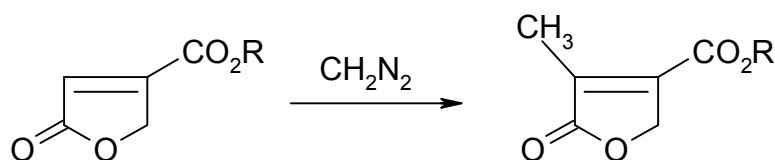


Abbildung 2-3: C-Methylierung von 5-oxo-2,5-dihydro-Furan-3-Carboxylsäureester

Bei der Reaktion von bestimmten β-Keto-Aldehyden und ähnlichen Verbindungen mit Diazomethan entsteht zuerst ein Methylether, welcher sodann weitermethyliert wird zum C-Methylierungsprodukt. Die C-Methylierung ist die häufigste Nebenreaktion bei Diazomethan.

Additionen

Neben der Methylierung können auch mehrere Additionsreaktionen eine Rolle spielen. Hier wäre einmal die Bildung von Pyrazolin zu nennen. Laut Huisgen (55) entsteht Pyrazolin durch die Addition von Diazoalkanen an C-C-Doppelbindungen über einen Mehrzentren-Prozess.

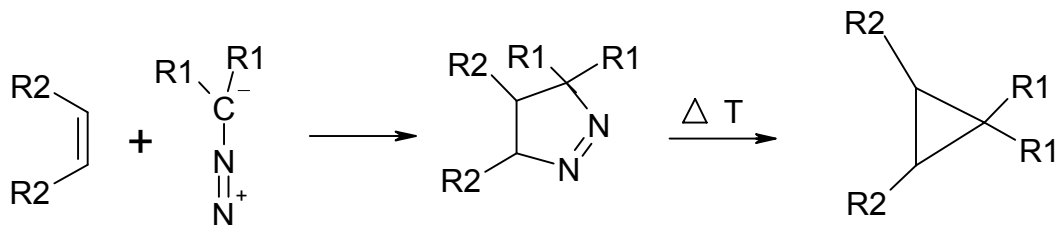


Abbildung 2-4: Entstehung von Pyrazolin durch Additionsreaktion und anschließende Stickstoffabspaltung

Ledwith und Parry (55) zeigten, dass die Reaktionsraten unabhängig von der Polarität des Lösemittels sind und schlugen für obige Reaktion einen konzertierten 1,3-dipolaren Cycloadditions-Mechanismus vor, was einer 3+2 Cycloaddition entspricht. In der Hitze geht das Pyrazolinderivat unter Stickstoffabspaltung in Cyclopropan über. Genauso lassen sich Pyrazole aus Acetylenen und Diazomethan herstellen.

Epoxidbildung und Insertion an Ketonen und Aldehyden

Diazomethan kann auch an Aldehyde und Ketone addieren, was die Bildung von Epoxiden und / oder homologen Komponenten zur Folge hat. Das Zwitterion (1) stabilisiert sich selbst entweder durch Ringschluß in Form eines Epoxids (2) oder durch Migration von einem der beiden Substituenten unter Bildung der homologen Derivate.

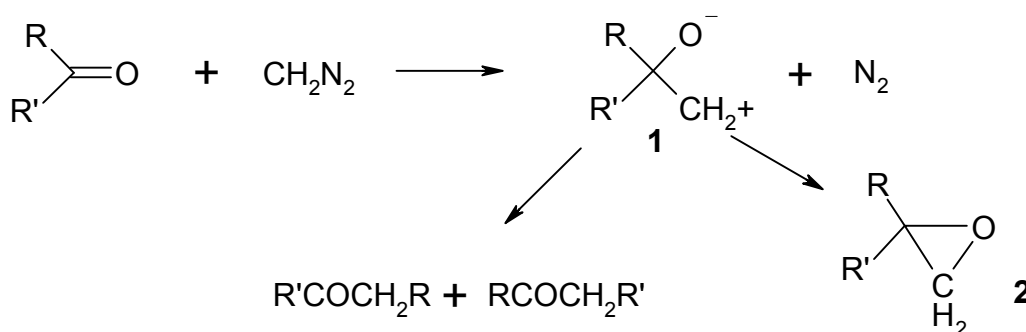


Abbildung 2-5: Epoxidbildung und Insertion an einem Keton

Im Falle von Aldehyden ist eines der beiden entstehenden Carbonylderivate der homologe Aldehyd, welcher mit nochmaliger Zugabe von Diazomethan zu den entsprechenden Produkten weiterreagieren kann. Methanol als Lösemittel begünstigt die Reaktionsrate von

Diazomethan mit Ketonen und Aldehyden. Zudem nimmt die Menge an gebildetem Epoxid generell prozentual zu. Allerdings wurde auch festgestellt, dass Methanol den Anteil an Ketonen vergrößert (55).

Homologisierungen

Bildung cyclischer Ketone via Ring-Vergrößerungsreaktion

Diazomethan reagiert mit cyclischen Ketonen in Anwesenheit von Methanol oder Bortrifluorid zum homologen, ringvergrößerten Molekül und zu anderen Produkten. Darauf soll hier allerdings nicht näher eingegangen werden, da cyclische Ketone höchstwahrscheinlich nicht Bestandteil von Huminstoffen sind.

Acyclische Ketone

Wie zuvor schon beschrieben, können bei der Reaktion von Aldehyden und Ketonen mit Diazomethan entweder Epoxide oder acyclische Ketone entstehen. Unter „normalen“ Bedingungen hängt das Verhältnis der Produkte sowohl vom Lösemittel als auch von der Struktur der jeweiligen Verbindung ab. Hauptsächlich das Epoxid entsteht, wenn am α -Kohlenstoff-Atom eine elektronenziehende Gruppe sitzt. Im Falle von unsymmetrischen Ketonen und Aldehyden entstehen zwei verschiedene homologe Verbindungen.



Abbildung 2-6: Bildung von zwei homologen Ketonen durch Addition an ein unsymmetrisches Keton

Die relative Migrationsfähigkeit der Gruppen R und R' hängt von deren Elektronenaffinität und vom Lösemittel ab. Die Reaktionsrate von aliphatischen Aldehyden mit CH_2N_2 vergrößert sich mit zunehmender Kettenlänge, und die Ausbeute an homologen Ketonen, welche von 25 % bis 75 % variiert, nimmt in ähnlicher Weise zu (55).

Spaltung durch Insertionsreaktionen

In der Literatur werden zwar viele Insertionsreaktionen beschrieben, durch welche Amine, Ester, Ether, Alkene und organometallische Verbindungen entstehen; unter den in dieser Arbeit angewandten Reaktionsbedingungen sind allerdings keine Spaltungsreaktionen zu erwarten.

2.2.2.2 Methylierungsnebenreaktionen von Methylidid

Wie auch bei Diazomethan tritt C-Methylierung an aktivierten Methylen- und Methinpositionen häufig auf, z. B. für α,β -ungesättigte Verbindungen, β -Diketone und auch Phenole. Außerdem kann Methylidid auch Partner in einer S_N2 -Substitution mit pentagonalem Übergangszustand sein. Daraus resultieren, bezogen auf Reaktionen mit Diazomethan, wesentliche Unterschiede im sterischen Anspruch (47), (50).

2.3 NMR-SPEKTROSKOPIE

2.3.1 PHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN

In der NMR-Spektroskopie werden durch Radiowellen Übergänge zwischen magnetischen Energiezuständen von Atomkernen angeregt, die sich in einem äußeren Magnetfeld B_0 befinden. Die meisten Kerne haben einen Kern- oder Eigendrehimpuls P . Dieser wird für die NMR-Aktivität eines Kerns vorausgesetzt. Die Quantentheorie liefert für den Betrag von P die folgende Beziehung:

$$P = \sqrt{I(I+1)} \cdot \hbar \quad \text{Gleichung 2-1}$$

I ist die Kernspinquantenzahl, welche halb- oder ganzzahlige Werte annehmen kann, \hbar das durch 2π geteilte Plancksche Wirkungsquantum.

Mit dem Spin des geladenen Atomkerns ist ein magnetisches Moment μ verknüpft.

$$\mu = \gamma \cdot P \quad \text{Gleichung 2-2}$$

Die Proportionalitätskonstante γ ist eine kernspezifische Konstante und heißt gyromagnetisches Verhältnis. Nicht nur der Betrag von P ist gequantelt, sondern auch die Richtung. Befindet sich ein Atom im Magnetfeld B_0 , so kann P nur bestimmte Winkel mit der Richtung von B_0 einschließen. Aus der Richtungsquantelung folgt, dass die Komponente des Kernspinvektors in Feldrichtung P_z nur bestimmte Werte annehmen darf.

$$P_z = m \cdot \hbar \quad \text{Gleichung 2-3}$$

m ist die magnetische Quantenzahl, die folgende Werte annehmen kann: $m = I, I-1, \dots, -I$. Bei der Strukturaufklärung organischer Moleküle sind die Kerne ^1H und ^{13}C von besonderem Interesse. Ihr Kernspin ist durch die Kernspinquantenzahl $\frac{1}{2}$ festgelegt, so dass die magnetische Quantenzahl die Werte $-\frac{1}{2}$ und $+\frac{1}{2}$ annehmen kann.

Das natürlich sehr viel häufiger vorkommende Kohlenstoff-Isotop ^{12}C (98,89 %) wie auch das Sauerstoff-Isotop ^{16}O , die Hauptbausteine organischer Verbindungen, sind NMR-spektroskopisch nicht nachweisbar, da ihr Kernspin $I = 0$ ist.

Die z-Komponente des magnetischen Moments μ_z ergibt sich aus der z-Komponente des Kernspinvektors.

$$\mu_z = \gamma \cdot P_z$$

Gleichung 2-4

Die den Atomkern umgebenden Elektronen wirken dem äußeren Magnetfeld entgegen, so dass am Kernort ein von B_0 verschiedenes effektives Magnetfeld B_{eff} herrscht. Für die

Energiezustände E des Kerns im Magnetfeld gilt:

$$E = \mu_z \cdot B_{\text{eff}} = P_z \cdot \gamma \cdot B_{\text{eff}} = m \cdot \hbar \cdot \gamma \cdot B_{\text{eff}}$$

Gleichung 2-5

Demnach ist μ_z für Kerne mit einer Spinquantenzahl von $\frac{1}{2}$ parallel oder antiparallel zum äußeren Magnetfeld B_0 orientiert. Daraus folgt für die Differenz zwischen den beiden Energiezuständen:

$$\Delta E = \hbar \cdot \gamma \cdot B_{\text{eff}}$$

Gleichung 2-6

Im thermischen Gleichgewicht gehen die Kerne einer makroskopischen Probe eine Boltzmann-Verteilung ein.

Für das Verhältnis der Besetzungszahlen gilt:

$$\frac{N_{(m=-1/2)}}{N_{(m=+1/2)}} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \approx 1 - \frac{\Delta E}{kT} = 1 - \frac{\gamma \hbar B_0}{kT}$$

Gleichung 2-7

k steht für die Boltzmannkonstante und T für die Temperatur. Da die Energiedifferenz ΔE im Vergleich zur mittleren thermischen Energie sehr klein ist, liegt der Überschuss im energieärmeren Zustand nur im Bereich von tausendstel Promille (ppm).

Im Kernresonanzexperiment werden Übergänge zwischen verschiedenen Energieniveaus induziert. Im Resonanzfall wechseln Kerndipole durch Absorption von Radiowellen von der energieärmeren parallelen Einstellung zum äußeren Magnetfeld in die energiereichere antiparallele Einstellung. Für die Frequenz ν muss die folgende Resonanzbedingung erfüllt sein:

$$\nu = \frac{\Delta E}{h} = \frac{\gamma \cdot B_{\text{eff}}}{2 \cdot \pi}$$

Gleichung 2-8

Die Resonanzfrequenz hängt vom Magnetfeld B_{eff} ab. Somit ergeben sich für verschiedene Kerne in verschiedenen Positionen eines Moleküls unterschiedliche Resonanzfrequenzen, sofern die elektronischen Abschirmungen nicht zufällig gleich sind. Zusätzlich wird das Magnetfeld am Kernort durch die magnetischen Momente benachbarter Kerne beeinflusst, die im Falle von $I = \frac{1}{2}$ entweder parallel oder antiparallel zu B_0 orientiert sind. Dadurch kommt im NMR-Spektrum eine Aufspaltung der Resonanzsignale zustande, welche als Kopplung

bezeichnet wird. Die Kopplungsinformation kann über den Raum oder die Bindungselektronen weitergegeben werden. Die Empfindlichkeit des NMR-Experiments ist umso höher, je stärker das Besetzungsverhältnis zwischen den am Resonanzvorgang beteiligten Energieniveaus von eins abweicht. Da ΔE und das Magnetfeld einander proportional sind, steigt die Energiedifferenz mit steigendem Magnetfeld. Daher geht der Trend bei der Geräteherstellung zu immer höheren Feldstärken. Im Vergleich zu anderen spektroskopischen Methoden ist die NMR-Spektroskopie unempfindlich. Bei einem eindimensionalen NMR-Spektrum handelt es sich um die Auftragung der Intensität gegen die eingestrahlte Resonanzfrequenz.

Die Radiofrequenz wird üblicherweise nicht in Hertz, sondern relativ zur Anregungsfrequenz in ppm angegeben, weil die Frequenzunterschiede $\Delta \nu$ der Signale innerhalb eines Spektrums bezogen auf die Anregungsfrequenz sehr klein sind. Die ppm-Skala hat den Vorteil, dass sie von der Spektrometerfeldstärke unabhängig ist, so dass Messergebnisse, die von verschiedenen Spektrometern stammen, direkt verglichen werden können.

Die relativen Intensitäten in einem NMR-Spektrum hängen bei geeigneter Wahl der Messparameter ausschließlich davon ab, wie häufig eine Kernsorte in den verschiedenen Positionen eines Moleküls vorkommt.

Die heutzutage normalerweise genutzten NMR-Spektrometer sind Impuls-Fouriertransform-NMR-Spektrometer (PFT). Dieses Verfahren wurde erstmals in den 60er Jahren von Ernst und Anderson auf die NMR-Spektroskopie angewandt und führte zu einer neuen Generation von Spektrometern und Experimenten. Ein kurzer Puls von einigen Mikrosekunden regt alle Kerne in einer Probe simultan an. Die makroskopische Magnetisierung M wird dabei aus der z -Richtung um einen Pulswinkel θ ausgelenkt und beginnt um die z -Achse zu präzedieren. Dadurch wird eine Quermagnetisierung (transversale Magnetisierung) erzeugt. Durch die y -Komponente von M wird in der Empfängerspule ein zeitabhängiges Spannungssignal induziert und gemessen, das als freier Induktionsabfall (free induction decay: FID) bezeichnet wird. Durch Fouriertransformation wird das zeitabhängige Signal in die Frequenzdomäne überführt, so dass ein NMR-Spektrum in der üblichen Darstellungsform resultiert.

Der Winkel θ , um den die makroskopische Magnetisierung ausgelenkt wird, ist bei gegebener Senderleistung B_1 von der Pulsdauer τ abhängig:

$$\theta = \gamma \cdot B_1 \cdot \tau$$

Gleichung 2-9

Die einfachste Pulssequenz setzt sich also aus einem Anregungspuls und der Datenaufnahme zusammen. Die folgende Abbildung zeigt, wie Pulssequenzen üblicherweise dargestellt werden.

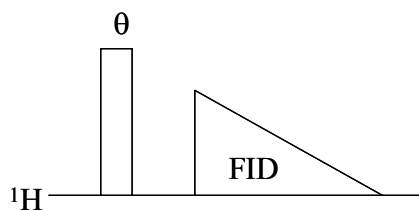


Abbildung 2-7: Darstellungsweise von Pulssequenzen

Komplexe Pulssequenzen können aus bis zu 30 Pulsen bestehen, die in mehreren Frequenzkanälen gleichzeitig wirken. Die Pulse sind durch definierte Wartezeiten voneinander getrennt, in denen sich die angeregten Spinsysteme entwickeln können. Aufgrund der Unempfindlichkeit der NMR-Spektroskopie werden mehrere Spektren nacheinander aufgezeichnet und aufsummiert. Zwischen Datenaufnahme und dem nächsten Anregungspuls müssen alle Kernspins in der Probe relaxieren, da ansonsten durch die Absorption der Besetzungsunterschied der beiden Energieniveaus bald aufgehoben wäre. Man spricht in diesem Fall von Sättigung. Diese würde zu Intensitätsverfälschungen im Spektrum führen (56), (57), (58), (59), (60).

2.3.2 PRINZIP DER ZWEIDIMENSIONALEN NMR-SPEKTROSKOPIE

Die physikalischen Grundlagen wurden anhand der eindimensionalen NMR-Spektroskopie erläutert. Dabei entspricht die Abszisse der Frequenzachse und die Ordinate den Signalintensitäten. Ein zweidimensionales NMR-Spektrum besteht nun aus zwei Frequenzachsen und den Signalintensitäten, welche der dritten Dimension entsprechen.

Bei den zweidimensionalen Verfahren wird eine Kopplung von Kerndipolen vorausgesetzt. Man unterscheidet zwischen zweidimensionalen J-aufgelösten NMR-Spektren und zweidimensionalen korrelierten NMR-Spektren. Bei Ersteren werden auf einer Frequenzachse die chemischen Verschiebungen aufgetragen und auf der anderen die Kopplungskonstanten. Bei den korrelierten NMR-Spektren stellen beide Frequenzachsen chemische Verschiebungen dar.

Die zweite Frequenzachse liefert Informationen über räumliche oder Bindungswechselwirkungen zwischen Atompaaaren.

Da in dieser Arbeit nur homonukleare (H,H)-korrelierte und heteronukleare (H,C)-korrelierte NMR-Spektren gemessen wurden, wird hier nur auf ^1H - und ^{13}C -Kerne eingegangen. Die Theorie ist aber selbstverständlich auch auf andere Kerne und Kernkombinationen übertragbar.

Die Signale werden als Funktionen von zwei unabhängigen Zeit-Variablen gemessen und durch zweidimensionale Fouriertransformation in die Frequenzdomäne transferiert. Die Aufnahme von zweidimensionalen NMR-Spektren lässt sich in drei Teile unterteilen: Präparation, Evolution und Mischzeit sowie Detektion.

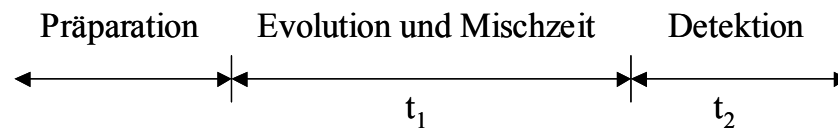


Abbildung 2-8: Aufbau eines zweidimensionalen NMR-Experiments

In der Präparationsphase relaxiert das Spinsystem und wird durch einen Puls aus der Gleichgewichtslage gebracht.

Der Entkoppler im ^1H - bzw. im ^{13}C -Kanal ist nur während der Detektion eingeschaltet. Dies führt zu Kopplung der ^{13}C -Kerne und der Protonen während der Evolutions- und Mischphase. Die Dauer dieser Phase ist durch die Zeit t_1 festgelegt, welche von Experiment zu Experiment um jeweils den gleichen Betrag (einige ms) zunimmt.

Während der Detektionszeit t_2 wird das NMR-Signal aufgenommen.

Somit sind die NMR-Signale Funktionen von zwei Zeit-Variablen t_1 und t_2 . Durch die Fouriertransformation werden die zeitabhängigen Spektren in die bekannte, leichter auswertbare Frequenzdomäne überführt (57), (61), (62).

2.3.3 GEPULSTE FELDGRADIENTEN (PFG) IN DER NMR-SPEKTROSKOPIE

Die Einführung von gepulsten Feldgradienten in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie in den 90er Jahren war eine der signifikantesten Entwicklungen in der experimentellen Methodik. Obwohl PFGs schon seit längerem in medizinischen Anwendungen der NMR-Spektroskopie, dem sogenannten MRI (Magnetic Resonance Imaging), genutzt werden, haben technische Limitierungen ihre Einführung in der High-Resolution-NMR-Spektroskopie verzögert.

Heutzutage finden PFGs Anwendung in zahlreichen ein- und zweidimensionalen NMR-Techniken, indem die interessierenden Signale selektiert und detektiert werden, während die nicht interessierenden Signale unterdrückt werden können. Die der Funktion der Feldgradienten zugrundeliegenden Prinzipien sollen hier kurz aufgeführt werden (63), (64), (65).

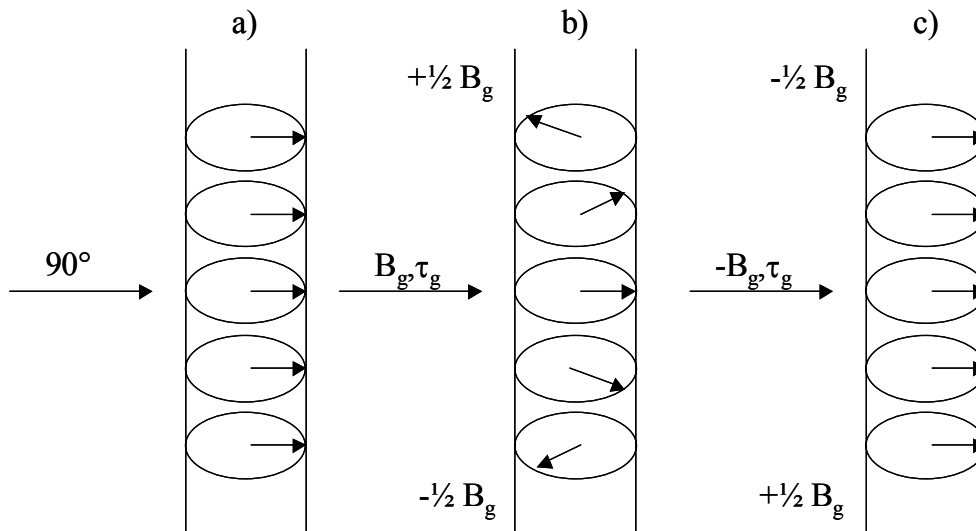


Abbildung 2-9: Schematische Darstellung der Wirkung von gepulsten Feldgradienten. a) Homogenes Magnetfeld nach einem rf-Puls; b) Dephasierung; c) Rephasierung

Ein Feldgradient induziert entlang der z-Achse eine z-Abhängigkeit der Resonanzfrequenzen und somit eine Phasenabhängigkeit der Magnetisierung. Das homogene Magnetfeld B_0 (a) wird durch den Gradientenpuls räumlich inhomogen. Man spricht von einer Dephasierung der Magnetisierung (b). Die räumlich abhängige Phase $\Phi(r, \tau)$ nach einem PFG der Dauer τ ergibt sich wie folgt:

$$\Phi(r, \tau) = s \cdot B_g(r) \cdot \tau \cdot \sum_j p_j \gamma_j \quad \text{Gleichung 2-10}$$

Hierbei sind s der Formfaktor, $B_g(r)$ das räumlich abhängige Magnetfeld und p und γ die Kohärenzordnung bzw. das gyromagnetische Verhältnis der jeweiligen individuellen j -Kernarten, die in der Kohärenz involviert sind. Da moderne Spektrometer mit einem Gradienten in z-Richtung ausgestattet sind, variiert das vom Gradienten entwickelte magnetische Feld linear entlang dieser Achse folgendermaßen:

$$B_g(r) = G \cdot z \quad \text{Gleichung 2-11}$$

G : Gradientenstärke in cm^{-1}

Bei der Kohärenzordnung p handelt es sich um eine Quantenzahl. Transversale Magnetisierung entspricht einer Einquantenkohärenz ($p = \pm 1$). Doppelquantenkohärenz ($p = \pm 2$) ergibt sich aus der Summe der Frequenzen der chemischen Verschiebungen von zwei Spins ($\nu_A + \nu_X$) und Nullquantenkohärenz aus deren Differenz ($\nu_A - \nu_X$). Auch höhere Kohärenzordnungen sind möglich. Nach den quantenmechanischen Auswahlregeln sind nur Übergänge mit $\Delta m = \pm 1$ im Spektrum sichtbar. Das bedeutet, dass nur Einquantenkohärenz ($p = \pm 1$) direkt beobachtet werden kann. Mehrquantenkohärenz kann indirekt detektiert werden, indem sie durch einen Gradienten vor der Detektion in Einquantenkohärenz

umgewandelt wird. Kohärenztransferwege (CTP) erlauben eine einfache Darstellung des Verlaufes der Magnetisierung während einer Pulssequenz, da sie im Gegensatz zum Vektormodell auch Mehrquantenkohärenz anzeigen können.

Die Auswahl der gradientabhängigen Kohärenztransferwege (CTP) ergibt sich aus der Refokussierungsbedingung (c): Nur die CTP werden detektiert, deren Summe der Effekte aller angewandten n-Feldgradienten während einer Sequenz vor der Aquisition null ist:

$$\sum_{i=1}^n s_i \cdot G_i \cdot \tau_i \cdot \left(\sum_j p_{ij} \gamma_{ij} \right) = 0 \quad \text{Gleichung 2-12}$$

Das bedeutet, dass alle CTPs mit Netzdephasierung am Ende einer Sequenz nicht beobachtet werden können ($p \neq \pm 1$). Unter der Annahme, dass alle n-Gradienten dieselbe Form und Länge haben, lässt sich Gleichung 2-12 vereinfachen:

$$\sum_{i=1}^n G_i \cdot \left(\sum_j p_{ij} \gamma_{ij} \right) = 0 \quad \text{Gleichung 2-13}$$

Die PFG-Spektroskopie birgt im Vergleich zur herkömmlichen „phase-cycling“-Methode zahlreiche Vorteile (64):

- **Qualität:** Von jedem Übergang wird nur das gewünschte Signal detektiert. Dadurch kann das Addieren und Subtrahieren der Signale in den Schritten eines Phasenzklus umgangen werden, was dazu führt, dass Differenzartefakte nicht entstehen und dass das t_1 -Rauschen in zweidimensionalen Spektren reduziert wird. Es resultieren „sauberere“ Spektren.
- **Geschwindigkeit:** Die Messung vollständiger Phasenzyklen ist nicht mehr nötig. Für Proben mit genügend hoher Sensitivität (= Konzentration) können 2D-Experimente mit nur einem Scan pro t_1 -Inkrement aufgenommen werden. Dadurch wird viel Zeit eingespart.
- **Dynamikbereich:** Da nur die gewünschten Signale detektiert und die unerwünschten im Probenkopf zerstört werden, können der Dynamikbereich des Empfängers optimal genutzt und höhere „receiver gains“ angewandt werden. Dadurch wird es möglich, auch niedriger konzentrierte Proben mit hoher Qualität aufzunehmen.
- **Signalunterdrückung:** Es können sehr hohe Signalunterdrückungsraten von über 1:10.000 erreicht werden. Dadurch werden beispielsweise Lösemittelsignale unterdrückt, während Resonanzen an nahezu derselben Position wie die Frequenz des Lösemittels detektiert werden können.
- **Einfache Nutzung:** Durch ein entsprechendes Design der heutigen NMR-Instrumente ist die PFG-Technik einfach anzuwenden und experimentell robust.

2.3.4 NMR-SPEKTROSKOPIE AN HUMINSTOFFEN - EIN ÜBERBLICK

Die NMR-Spektroskopie liefert bei der strukturellen Charakterisierung von Huminstoffen und anderen komplexen Gemischen organischer Verbindungen wertvolle Informationen. Die Intensitätsverteilungen über charakteristische chemische Verschiebungsbereiche geben Aufschluss über verschiedene Partialstrukturen in Huminstoffen. Erste NMR-spektroskopische Untersuchungen huminstoffhaltiger Proben wurden bereits im Jahre 1965 durchgeführt. Seit den 80er Jahren ist es möglich, eindimensionale Huminstoffspektren mit akzeptabler Auflösung in vertretbarer Messzeit zu erhalten, und seit den 90er Jahren ist die technische Entwicklung auf dem Gebiet der NMR-Spektroskopie soweit fortgeschritten, dass auch qualitativ hochwertige zweidimensionale NMR-Spektren aufgenommen werden können (21).

Inzwischen wurden schon nahezu alle bisher entwickelten NMR-Methoden auf Huminstoffe angewandt. So findet man in der Literatur Beispiele von eindimensionalen Einpuls- und Mehrpulseexperimenten (^1H , ^{13}C , ^{13}C -DEPT), von Festkörperspektroskopie und von zweidimensionalen NMR-Experimenten (COSY, TOCSY, HSQC, HSQC-TOCSY, HMQC, HMBC...) bis hin zu Experimenten mit verschiedenen Heterokernen wie z. B. ^{15}N , ^{17}O , ^{31}P oder ^{29}Si .

Die Mehrzahl der bisher publizierten Arbeiten befasst sich mit ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowohl im Festkörper als auch in Lösung. Der Nachteil der NMR-Spektroskopie gegenüber anderen molekülspektroskopischen Methoden ist ihre Unempfindlichkeit. Bei HS sind Messzeiten von einigen Tagen für eindimensionale ^{13}C -NMR-Spektren keine Seltenheit, für zweidimensionale NMR-Spektren müssen derart lange Messzeiten sogar immer einkalkuliert werden. Dafür liefert die NMR-Spektroskopie, wie keine andere Methode, eine strukturelle Beschreibung des HS-Grundgerüsts und seiner funktionellen Gruppen. Hierbei liefert vor allem die 2D-NMR-Spektroskopie hervorragende Strukturinformationen. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über den Stand der NMR-Forschung auf dem Gebiet der Huminstoffcharakterisierung gegeben werden.

2.3.4.1 Eindimensionale NMR-Spektroskopie

In den eindimensionalen Spektren überlagern sich die Signale der Huminstoffe stark. Um eine quantitative Auswertung der einzelnen Strukturelemente zu erhalten, werden die Spektren über mehrere verschiedene Signalbereiche integriert.

Die ^1H -Spektren geben Informationen über den Anteil an aliphatischen Methylprotonen, aliphatischen Wasserstoffen, O-Alkyl-Wasserstoffen, Aromaten und Aldehyden (2), (66),

(67), (68), (69), (70), (71), (72), (73). Neuerdings wird auch ^1H HR-MAS NMR-Spektroskopie zur Untersuchung der Übergangsphase (Interface) Festkörper-Lösung eingesetzt (74).

Die Verschiebungsbereiche innerhalb der ^{13}C -Spektren lassen sich aufteilen in Aliphaten, eine Übergangsphase (Aliphaten, O-Alkyl-Kohlenstoffe, Methoxygruppen, quartäre aliphatische Kohlenstoffe, $\alpha\text{-C}$ von Aminosäuren, sekundäre aliphatische Amine und einfache aliphatische Ether), O-Alkyl-Kohlenstoffe, Aromaten, Carboxylfunktionen und Carbonylfunktionen. Die Integrationsbereiche variieren leider von Literatur zu Literatur geringfügig, somit sind direkte Vergleiche oft schwierig (2), (71), (72), (73), (75).

Eindimensionale Pulssequenzen wie beispielsweise DEPT, QUAT, Spin-Echo editieren gemäß der Multiplizitäten und ermöglichen so eine Unterscheidung zwischen C, CH, CH_2 und CH_3 (66), (72), (76), (77), (78), (79), (80).

2.3.4.2 Zweidimensionale NMR-Spektroskopie

Wie bereits eingangs erwähnt, wurde die Aufnahme von zweidimensionalen Spektren erst durch den technischen Fortschritt der letzten Jahre auf dem Gebiet der NMR-Spektroskopie zeitlich und qualitativ gesehen interessant. Die ersten J-aufgelösten 2D-NMR-Experimente von HS wurden allerdings schon Ende der 80er Jahre von Buddrus und Lambert aufgenommen (76), (77). J-aufgelöste Spektren ermöglichen die Quantifizierung von verschiedenen Strukturelementen mit nur einem Spektrum.

Die zweidimensionale homo- und heteronukleare korrelierte NMR-Spektroskopie hat sich erst Mitte der 90er Jahre auf dem Gebiet der HS-Forschung etabliert (12), (69), (72), (73), (81), (82). Simpson bzw. Simpson et al. stellen in mehreren Arbeiten eine kombinierte Auswertungsmethode für COSY-, TOCSY-, HSQC-, HSQC-TOCSY- und andere 2D-NMR-Spektren von HS vor (80), (83), (84). Seit 1997 wird auch die DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy)-Technik für die Untersuchung von HS bezüglich Diffusionskoeffizienten und Molekülgröße eingesetzt (12), (85), (86), (87).

Als eine der ersten hat H. Knicker 2D-Festkörper-NMR-Verfahren auf Bodenhuminstoffe angewandt (88).

Auch derivatisierte HS wurden schon mittels 2D-NMR-Spektroskopie untersucht. Annette Günzl hat in ihrer Doktorarbeit silylierte HS mittels (^1H , ^{13}C)- und (^1H , ^{29}Si)-HSQC gemessen. Die Spektren geben Aufschluss über die Umgebung funktioneller Gruppen und ermöglichen die Unterscheidung verschiedener Hydroxylgruppen (89), (90).

2.3.4.3 Festkörper-NMR-Spektroskopie

Mit der Festkörper-NMR-Spektroskopie können sowohl extrahierte HS als auch unbehandelte organische Materie, wie beispielsweise Böden oder Komposte, direkt untersucht werden. Dies hat den großen Vorteil, dass physikalische und chemische Veränderungen der HS durch Extraktion und Lösung ausgeschlossen werden können. Man erhält so eine genauere Information über die HS, wie sie in der Natur vorliegen. Der Nachteil der Festkörper-NMR-Spektroskopie liegt in der derzeit noch geringen Auflösung der Spektren (71), (91), (92), (93), (94), (95), (96).

2.3.4.4 Heterokern-NMR-Spektroskopie

Zur strukturellen Charakterisierung stickstoffhaltiger Partialstrukturen in HS werden ^{15}N -NMR-Spektren aufgezeichnet. Es zeigt sich, dass der Stickstoff in HS überwiegend amidischer Natur ist. Auch in der Festkörperspektroskopie werden ^{15}N -NMR-Spektren sowohl von extrahierten HS als auch von Böden aufgenommen (93), (97).

Wie bereits erwähnt, wurden ^{29}Si -NMR-Spektren von silylierten HS zur Abschätzung der Konzentrationen alkoholischer bzw. phenolischer Hydroxygruppen in der Doktorarbeit von Frau Günzl gemessen (89), (90). In dieser Arbeit und in einer Publikation von Simpson et al. wurden auch ^{17}O -NMR-Spektren erstellt, welche Informationen über den Gesamtsauerstoff liefern (80), (89). Es existieren ebenso zahlreiche Originalarbeiten und Buchbeiträge von ^{31}P -NMR-Spektroskopie an HS. ^{19}F -NMR-Spektroskopie wurde bisher noch nicht in der HS-Analytik eingesetzt.

2.3.5 PULSSEQUENZEN DER VERWENDETEN EXPERIMENTE

2.3.5.1 Eindimensionale NMR-Experimente

Das ^1H -NMR-Experiment

Durch das ^1H -Experiment erhält man Informationen zur chemischen Umgebung der Protonen, wie beispielsweise chemische Verschiebungen, Spin-Spin-Kopplungen und die Intensitäten der einzelnen Strukturbereiche. Das in dieser Arbeit verwendete Pulsschema für die Aufnahme der ^1H -Spektren sieht folgendermaßen aus:

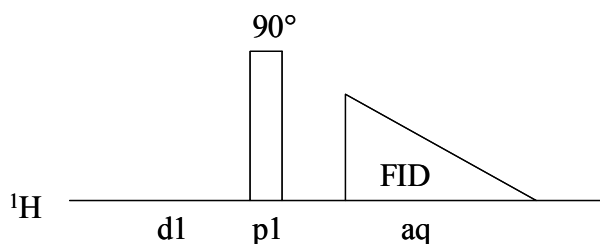


Abbildung 2-10: Pulsschema des ^1H -NMR-Experiments

Es wurden die in der Literatur üblichen Parametersätze verwendet (siehe Tabelle 3-2 in Materialien und Methoden). Zur Aufnahme von ^1H -Routine-NMR-Spektren wird in der Literatur (98) oftmals statt dem 90° - ^1H -Transmitter-Puls ein 30° -Puls verwendet. Dadurch verkürzt sich die „Pulse Repetition Time“ (Aquisitionszeit + d1: bei einem 90° -Puls hier ca. 10 s) stark. Für einen 90° -Puls muss diese $5 \cdot T_1$ betragen. Da Huminstoffe aufgrund ihrer Größe recht kurze T_1 -Zeiten haben, wurde in dieser Arbeit ein 90° -Puls gewählt, um die maximale Signalintensität zu erhalten.

Das ^{13}C -NMR-Experiment

Die ^{13}C -Spektren wurden mit „inverse gated“ ^1H -Entkopplungstechnik durchgeführt. Diese Pulssequenz wird sehr häufig für die Bestimmung der Verteilung von Kohlenstoff in HS angewandt. Sie liefert ^1H -entkoppelte ^{13}C -detektierte NMR-Spektren ohne Signalverstärkung durch den „Nuclear Overhauser Effect“ (NOE), der zu einer Verzerrung der Signalintensitäten aufgrund der unterschiedlichen chemischen Umgebungen der ^{13}C -Kerne im HS-Molekül führen würde. Dadurch erhält man im Gegensatz zur konventionellen Einpulstechnik fast quantitative NMR-Spektren (98). Abbildung 2-11 zeigt das Pulsschema des „inverse gated“ ^1H -entkoppelten ^{13}C -NMR-Experiments. Die Parametersätze sind in Tabelle 3-3 in Materialien und Methoden aufgeführt.

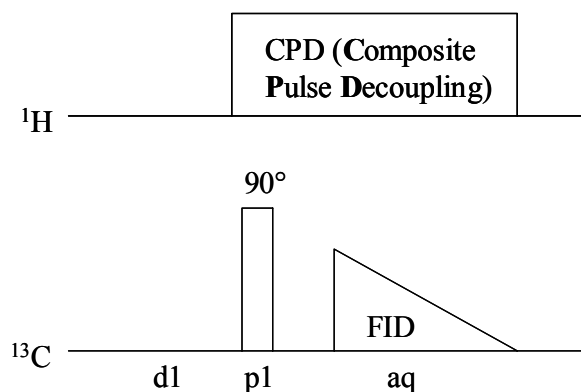


Abbildung 2-11: Pulssequenz des „inverse gated“ ^{13}C -NMR-Experiments

Das ^{13}C -DEPT-Experiment

DEPT steht für „Distortionless Enhancement by Polarization Transfer“. Anhand dieses Experiments ist es möglich, zwischen CH_3 -, CH_2 - und CH -Gruppen zu differenzieren. Auch hier wird ^{13}C -Magnetisierung detektiert, wie im Pulsschema ersichtlich ist.

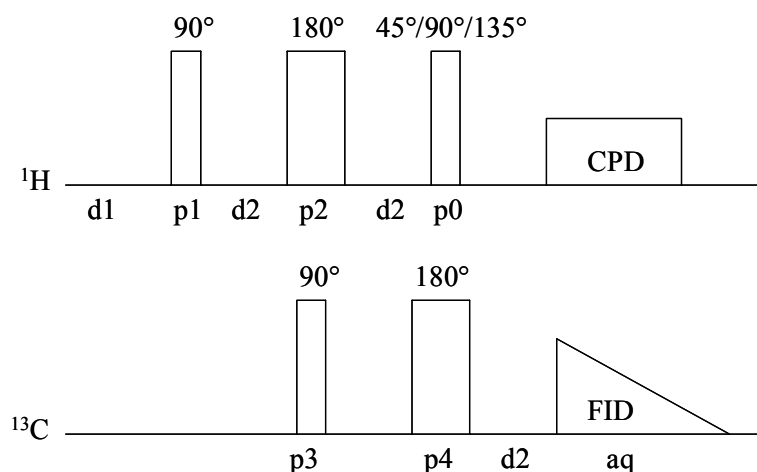


Abbildung 2-12: Pulssequenz des ^{13}C -DEPT-Experiments

Wichtig ist hier, dass die Wartezeit $d2$ auf einen Wert von $1/[2J(\text{C,H})]$ eingestellt wird. Ausgehend von einer $^1J(\text{C,H})$ -Kopplung für HS von 145 Hz ergibt sich für $d2$ ein Wert von 3,45 ms. Entscheidend bei dieser Sequenz sind die 90° -Pulse im ^1H - und ^{13}C -Kanal, während die 180° -Pulse der Refokussierung der Magnetisierungsvektoren mit unterschiedlichen Resonanzfrequenzen dienen. Während der ersten Wartezeit $d2$ nach dem ersten 90° -Puls im ^1H -Kanal entwickelt sich Antiphasen- ^1H -Magnetisierung. Durch den 90° -Puls im ^{13}C -Kanal wird diese in Doppelquantenmagnetisierung umgewandelt. Die Doppelquantenmagnetisierung bleibt bis zum zweiten Puls (je nach Experiment: 45° , 90° oder 135°) im ^1H -Kanal erhalten, der diese wiederum in Antiphasen- ^{13}C -Magnetisierung überführt. In der letzten Wartezeit $d2$ wird aus der Antiphasen- ^{13}C -Magnetisierung In-Phasen-Magnetisierung, die schließlich unter CPD-Entkopplung detektiert wird. Wird als zweiter Puls im ^1H -Kanal ein 45° -Puls gewählt,

erscheinen alle Signale der CH₃-, CH₂- und CH-Gruppen positiv. Bei Anlegen eines 90°-Pulses sind nur die Signale der CH-Gruppen zu erkennen und ein 135°-Puls erzeugt die Signale von CH- und CH₃-Gruppen positiv und die von CH₂-Gruppen negativ. Durch Addition und Differenzbildung dieser drei Spektren erhält man Spektren, welche nur CH- bzw. nur CH₂- bzw. nur CH₃-Gruppen enthalten (98).

2.3.5.2 Zweidimensionale NMR-Experimente

Homonukleare NMR-Experimente

Das DQF-COSY-Experiment (Double Quantum Filtered Correlation Spectroscopy)

Das COSY-Experiment detektiert nur Kopplungen zwischen benachbarten Protonen. Dies sind geminale und vicinale Spin-Kopplungen. Da COSY-Spektren generell eine recht gute Auflösung besitzen, eignen sie sich ideal als Startpunkt für die Spektrenauswertung (80), (83).

Unter Standardbedingungen detektiert das COSY-NMR-Experiment „Crosspeaks“ von Protonen mit ähnlicher chemischer Verschiebung sehr nahe an der Diagonale. Diese können so überlagert oder maskiert werden. In der DQF-COSY-Sequenz kommt ein dritter Puls hinzu und eine Gradientensequenz, die die gewünschte Selektion ermöglichen. Der zweite 90°-Puls erzeugt multiple Quanten-Kohärenz, welche nicht direkt sichtbar vom Detektor erfasst werden kann. Diese Kohärenz kann allerdings durch einen dritten Puls in Einquantenkohärenz zurückverwandelt werden, welche dann detektiert werden kann. Die gewählte Gradientenkombination selektiert nur die Signale, die zwischen den letzten beiden Pulsen als Doppelquantenkohärenz vorlagen. Alle anderen Signale werden gelöscht und erscheinen somit nicht im Spektrum (64). Das DQF-COSY-Spektrum enthält somit nur Signale von gekoppelten Protonen. Es ist „sauberer“, aber die Sensitivität ist niedriger als im konventionellen COSY-Spektrum, was zu verlängerten Messzeiten führt (84).

Das Gradientenverhältnis für das in dieser Arbeit genutzte DQF-COSY-Experiment ist 4:3:10. Im Prinzip sollte man mit dem Verhältnis 1:1:(n+1) eine ideale n-Filterung erhalten. Die Kombination 4:3:10 hat sich aber im Experiment als besser geeignet für die Entfernung von Artefakten erwiesen (65), (99), (100). Abbildung 2-13 zeigt die Pulssequenz und den CTP des DQF-COSY-Experiments.

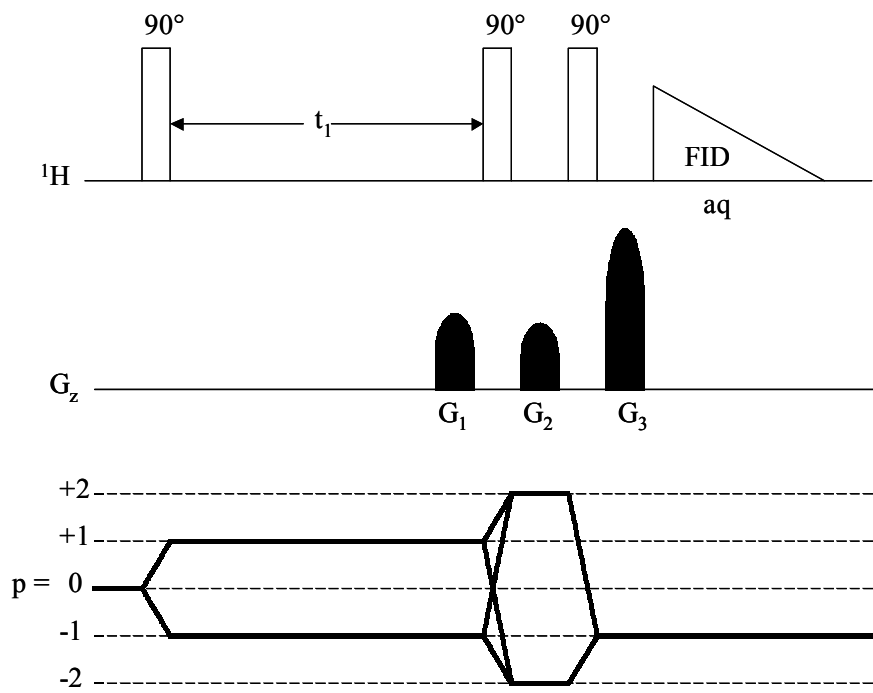


Abbildung 2-13: Pulssequenz und Kohärenztransferpfad (CTP) des DQF-COSY-Experiments

Das TOCSY-Experiment (*Total Correlation Spectroscopy*)

Das TOCSY-Experiment, auch als **homonukleares-Hartmann-Hahn** (HOHAHA)-Experiment bezeichnet, ist eine Abwandlung des COSY-Experiments. COSY- und TOCSY-NMR-Experimente sind hinsichtlich Physik und der Anforderungen an ein NMR-Spektrometer sehr verschieden, liefern aber häufig sich ähnelnde NMR-Spektren (68). Der Kohärenztransfer in TOCSY-NMR-Spektren wird durch J-Kopplungen vermittelt. Die entstehenden „Crosspeaks“ enthalten Informationen von Protonen, die über Bindungen und über den Raum miteinander korrelieren (82). Beim in dieser Arbeit verwendeten Experiment handelt es sich um ein phasensensitives homonukleares Hartmann-Hahn (HOHAHA)-Experiment mit Echo/Antiecho-Gradienten-Selection und MLEV17-Mischschema (Abbildung 2-14). Das Gradientenverhältnis ist 1:1 bzw. -1:1

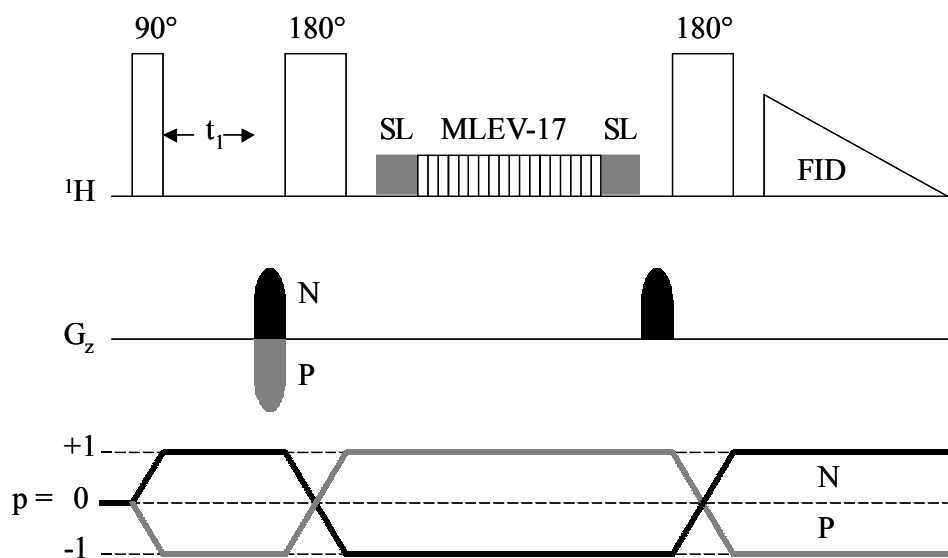


Abbildung 2-14: Pulssequenz und Kohärenztransferpfad (CTP) des TOCSY-Experiments

Heteronukleare NMR-Experimente

Das HSQC-Experiment (*H*eteronuclear *S*ingle *Q*uantum *C*oherence)

Mit dieser Technik werden H-C-Kopplungen über eine Bindung detektiert. Bei HSQC-Experimenten handelt es sich um invers-detektierte Experimente, die die chemischen Verschiebungs- und Kopplungsinformationen von einem relativ unsensitiven Kern (^{13}C) zu einem sensitiveren Kern (^1H) transferieren (101). Dadurch wird die Empfindlichkeit aufgrund der viel höheren natürlichen Häufigkeit und des höheren gyromagnetischen Verhältnisses von ^1H (Häufigkeit: 99,985 %, γ : $26,7519 \cdot 10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$) im Vergleich zu ^{13}C (Häufigkeit: 1,108 %, γ : $6,7283 \cdot 10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$) stark erhöht. Im Vergleich zum HMQC-Experiment (*H*eteronuclear *M*ultiple *Q*uantum *C*oherence), das die gleichen Informationen liefert, zeichnet sich das HSQC-Experiment durch schärfere „Crosspeaks“ und weniger Überlagerung aus. Als Pulssequenz für die Aufnahme der HS-Spektren wurde eine phasensensitive, gradientenselektierte Pulssequenz gewählt. Zur Sensitivitätserhöhung wurden Echo/Antiecho-TPPI-Gradienten im Verhältnis 4:1 bzw. 4:-1 gewählt (65), (102), (103), (104).

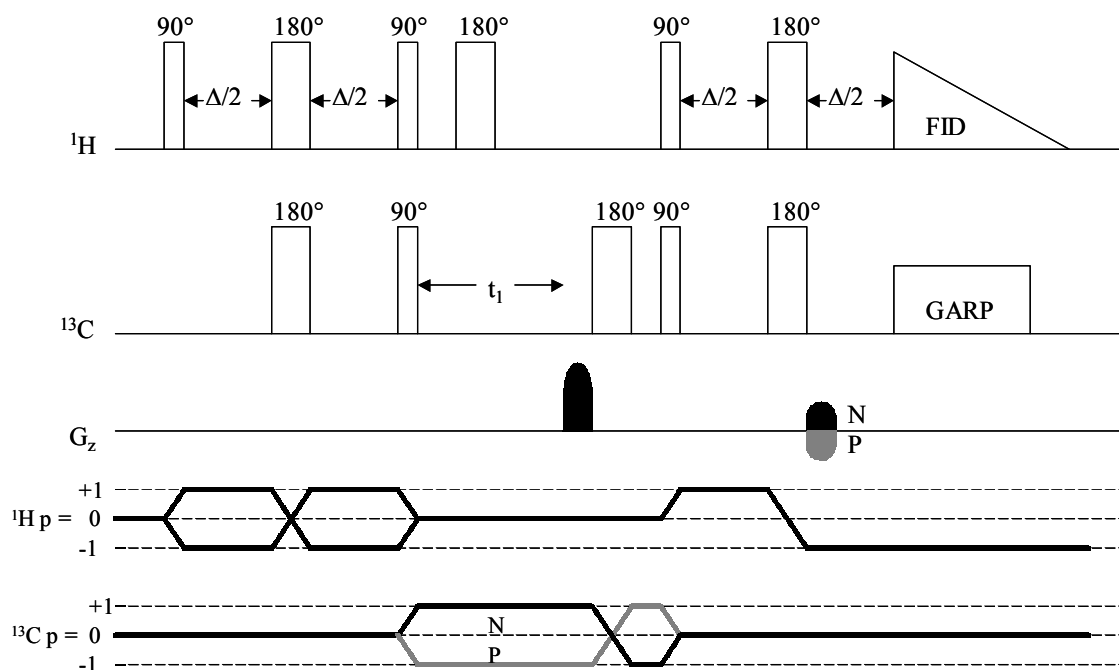


Abbildung 2-15: Pulssequenz und Kohärenztransferpfad (CTP) des HSQC-Experiments. $\Delta = 1/2J_{\text{CH}}$

Das HSQC-TOCSY-Experiment

Das HSQC-TOCSY-Experiment ist, wie der Name schon sagt und wie die Pulssequenz zeigt, eine Verknüpfung eines HSQC- und eines TOCSY-Experiments. Es werden heteronukleare (H,C)-Weitbereichskopplungen („long-range“) gemessen. Somit können Konnektivitäten zwischen protonierten Kohlenstoffen eines Spinsystems identifiziert werden (105), (106), (107), (108), (109). Das verwendete Experiment impliziert die o.g. HSQC- und TOCSY-Parameter.

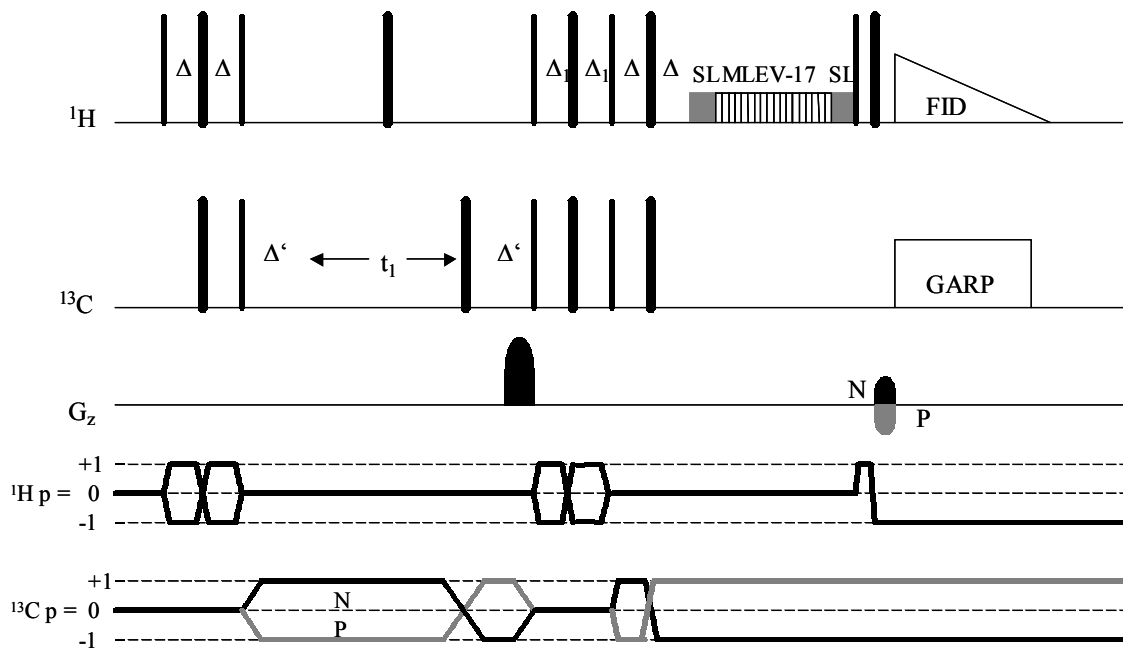


Abbildung 2-16: Pulssequenz und Kohärenztransferpfad (CTP) des HSQC-TOCSY-Experiments. Die dünneren Striche stehen für 90°-Pulse, die dickeren für 180°-Pulse. $\Delta' = 2\Delta = J_{CH}$; $\Delta_1 = 1/2J_{CH}$, $1/4J_{CH}$, $1/6J_{CH}$

2.4 FELDFLUSSFRAKTIONIERUNG (FFF)

2.4.1 DIE FFF ALS ANALYTISCHE TRENNTECHNIK

2.4.1.1 Historische Entwicklung und Anwendungsbereiche

Die Feldflussfraktionierung (FFF) ist eine chromatographieähnliche Analysetechnik, mit der schnell und leistungsfähig gelöste Makromoleküle und suspendierte Partikel getrennt werden können. Dabei deckt die FFF den Größenbereich von ca. 1 nm bis zu 100 μm (10^3 bis 10^{18} Da) ab (41), (110), (111). Die Methode wurde bereits 1966 von J.C. Giddings entwickelt (112), die ersten kommerziell erhältlichen Geräte kamen aber erst Ende der 80er bzw. Anfang der 90er Jahre auf den Markt. Bei der Feldflussfraktionierung handelt es sich um eine Gruppe von Trennmethoden, die alle auf einem gemeinsamen Prinzip beruhen. Die Anwendungsgebiete der FFF sind sehr mannigfaltig und erstrecken sich von

umweltrelevanten Partikeln über Anwendungen in der Pharmazie- und Medizinforschung bis in den Bereich der Materialwissenschaften (39), (113), (114), (115), (116), (117), (118), (119), (120), (121), (122), (123), (124). Die folgende Tabelle zeigt die Anwendungsgebiete in den einzelnen Sparten (41), (125):

Tabelle 2-4: Anwendungsgebiete der Feldflussfraktionierung

Umwelt	Pharmazie	Medizin	Materialwissenschaften
<ul style="list-style-type: none"> • Bodenkolloide • Metalloxide • Tonmineralien • Huminstoffe • Pflanzenzellen • Bakterien • Schwermetallkolloide 	<ul style="list-style-type: none"> • Liposome • Drug-Carrier • Transgene Viren • Pharmazeutische Emulsionen 	<ul style="list-style-type: none"> • Blutzellen • Proteinkomplexe • HSA • Antikörper / Antikörperaggregate 	<ul style="list-style-type: none"> • Technische Polymere • Polyolefine • Pigmente • Latexemulsionen

Die Hauptvorteile der FFF gegenüber konventionellen chromatographischen Techniken sind die sehr geringe Oberfläche des Kanals und das Fehlen des Säulenfüllmaterials und somit der stationären Phase, welche zu Wechselwirkungen der Probe mit dem Packmaterial führen kann (38), (110), (111), (123). Zudem trennt die FFF strikt nach dem Molekulargewicht bzw. dem hydrodynamischen Durchmesser der Proben, die Retentionszeiten sind somit direkt proportional zu physikochemischen Parametern, welche die Wechselwirkungen der Probe mit dem Kraftfeld widerspiegeln (123). Dies ist vor allem dann von großer Wichtigkeit, wenn empfindliche Proben, wie z.B. Huminstoffe, untersucht werden, die stark zur Bildung von Aggregaten neigen können.

2.4.1.2 Allgemeines Trennprinzip: Normal-Modus

Die Trennung erfolgt in einem dünnen Trennkanal, welcher beispielsweise bei der in dieser Arbeit verwendeten Fluss-FFF ca. 30 cm lang, 1,8 cm breit und je nach Spacer 250-500 µm hoch ist. Senkrecht zu diesem Trennkanal wird die eigentlich wirksame, je nach FFF-Methode verschiedene Kraftkomponente angelegt. Durch den Trennkanal wird der Trägerstrom (Laminarfluss) gepumpt. Dadurch bildet sich im Inneren des Kanals ein laminares Strömungsprofil aus. Senkrecht auf den Trägerstrom wird ein chemisches oder physikalisches Kraftfeld angelegt. Das Feld tritt in Wechselwirkung mit der Probe, indem es diese entlang der Fließachse des Trägerstroms gegen die untere Kanalbegrenzung (Akkumulationswand) presst. Der so entstandene Konzentrationsgradient induziert einen Diffusionsfluss in entgegengesetzter Richtung zum Kraftfeld. Kleine Partikel wandern aufgrund ihres größeren

Diffusionskoeffizienten weiter von der Akkumulationswand weg in den Kanal hinein als größere Partikel mit entsprechend kleineren Diffusionskoeffizienten (125). Durch die beiden entgegengerichteten Kräfte (Kraftfeld: hier Querfluss versus Diffusionskraft) bildet sich ein dynamisches Gleichgewicht aus, das zu einer exponentiellen Verteilung der „Partikelwolken“ im Kanal führt. Partikelwolken von kleinen Teilchen haben dabei im zeitlichen Mittel einen größeren Gleichgewichtsabstand l von der Akkumulationswand als Partikelwolken von größeren Teilchen. Dadurch befinden sich kleinere Teilchen im Bereich von schnelleren Strömungslinien als größere Teilchen. Kleine Teilchen werden deshalb vor größeren Teilchen aus dem Kanal eluiert.

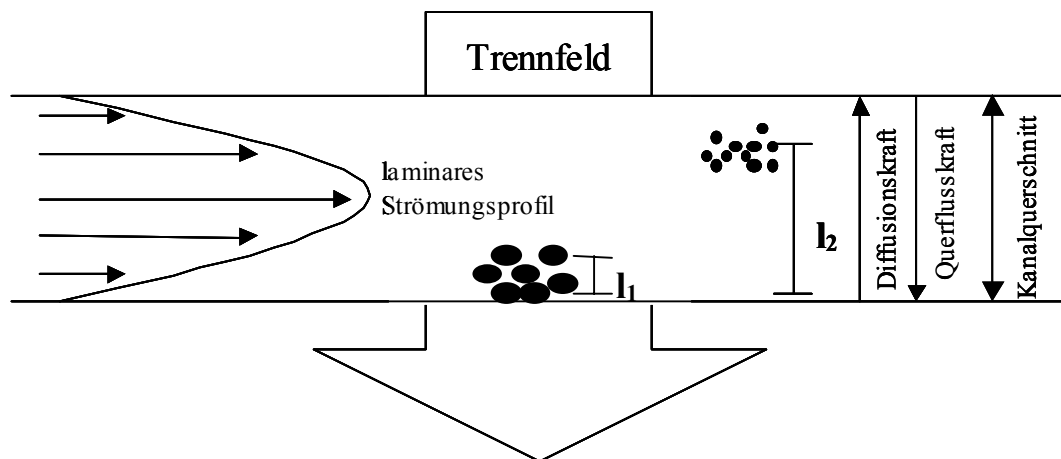


Abbildung 2-17: Allgemeines Trennprinzip der FFF

2.4.1.3 Spezielle Trennmodi

Das zuvor beschriebene allgemeine Trennprinzip gilt für Partikel mit hydrodynamischen Durchmessern $HD < 1 \mu\text{m}$. Größere Partikel werden nach anderen Mechanismen im Kanal getrennt. Man unterscheidet hierbei zwischen dem sterischen und dem Hyperlayer-Modus.

Gemeinsam ist diesen beiden Modi, dass im Gegensatz zum Normal-Modus große Partikel vor kleineren Partikeln eluieren. Partikel mit $HD > 1 \mu\text{m}$ haben so kleine Diffusionskoeffizienten, dass diese keinen signifikanten Einfluss mehr auf die Rückdiffusion von der unteren Kanalbegrenzung (Akkumulationswand) haben. Im sterischen Modus werden die Teilchen durch den Querfluss auf die Akkumulationswand gepresst. Aufgrund ihres höheren Massenschwerpunktes ragen die größeren Teilchen weiter in Richtung Strömungsmitte und werden deshalb durch den laminaren Trägerstrom schneller eluiert.

Im Hyperlayer-Modus werden die großen Teilchen wegen ihrer im Vergleich zu den kleinen Teilchen höheren hydrodynamischen Auftriebskräfte nicht ganz auf die Akkumulationswand des Kanals gepresst, sondern befinden sich mehr in der Mitte des Kanals und somit im

Einflussbereich schnellerer Strömungslinien. Dementsprechend treten diese großen Partikel noch schneller als bereits im sterischen Modus aus dem Kanal aus (110).

In Abb. 2-18 sind die drei unterschiedlichen Trennmechanismen der FFF schematisch dargestellt.

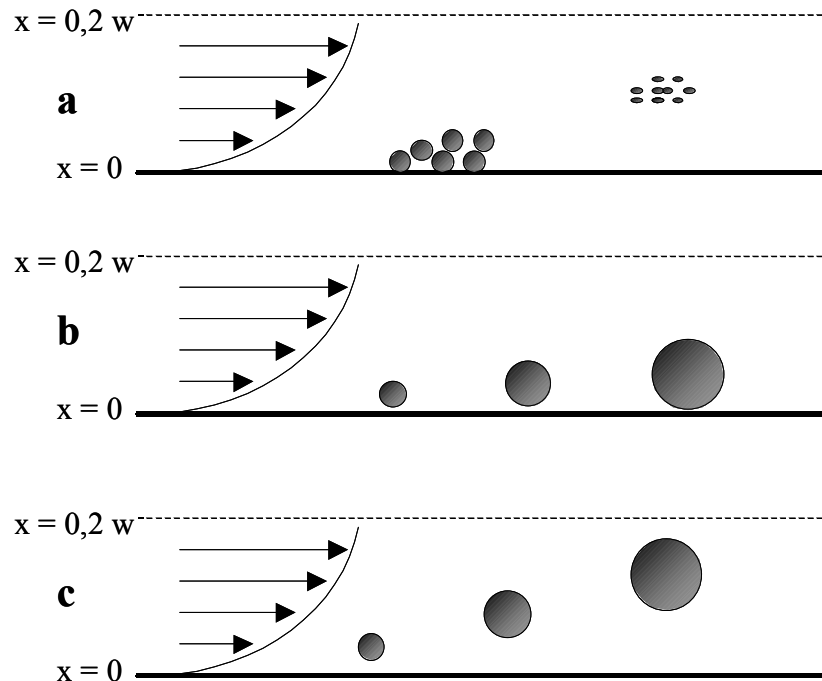


Abbildung 2-18: Trennmechanismen der FFF: (a) Normal-Modus, (b) sterischer Modus, (c) Hyperlayer-Modus. Es ist nur der untere Teil des Strömungsprofils nahe an der Akkumulationswand dargestellt (126)

2.4.1.4 Verschiedene FFF-Varianten

Die Feldflussfraktionierung besteht aus einer Gruppe von verwandten Trennmethode, welche sich nur in der zur Trennung verwendeten Kraft unterscheiden. Die Retentionszeit t_R der Probe ist direkt proportional zur Stärke des angelegten Kraftfeldes F und zur Kanalhöhe w :

$$t_R \propto F \times w$$

Bei allen FFF-Methoden finden die Trennungen in einem dünnen Trennkanal statt, in welchem eine laminare Strömung gebildet wird. Der Kanal der Sedimentations-FFF ist rund und arbeitet nach dem Funktionsprinzip einer Zentrifuge. Die Retentionszeit hängt von der Probengröße und der Differenz der Probendichte zur Dichte des Lösemittels ab. Die thermische FFF nutzt als Trennfeld einen Temperaturgradienten, somit hängt die Retentionszeit vom Verhältnis des Diffusionskoeffizienten D zum thermischen Diffusionskoeffizienten D_T ab. Die elektrische FFF arbeitet mit einem elektrischen Feld als Kraftvektor, somit ergibt sich die Retentionszeit aus dem Verhältnis Diffusionskoeffizient D und elektrophoretische Mobilität. Bei der Fluss-FFF ist die Retentionszeit nur von einer

probenspezifischen Kenngröße abhängig, nämlich dem Diffusionskoeffizienten D . Dies hat den großen Vorteil, dass der Diffusionskoeffizient direkt aus der Retentionszeit errechnet werden kann, ohne dass die Dichte der Probe bekannt sein muss bzw. der thermische Diffusionskoeffizient oder die elektrophoretische Mobilität experimentell bestimmt werden müssen (110).

Abb. 2-19 zeigt die gerade beschriebenen FFF-Methoden.

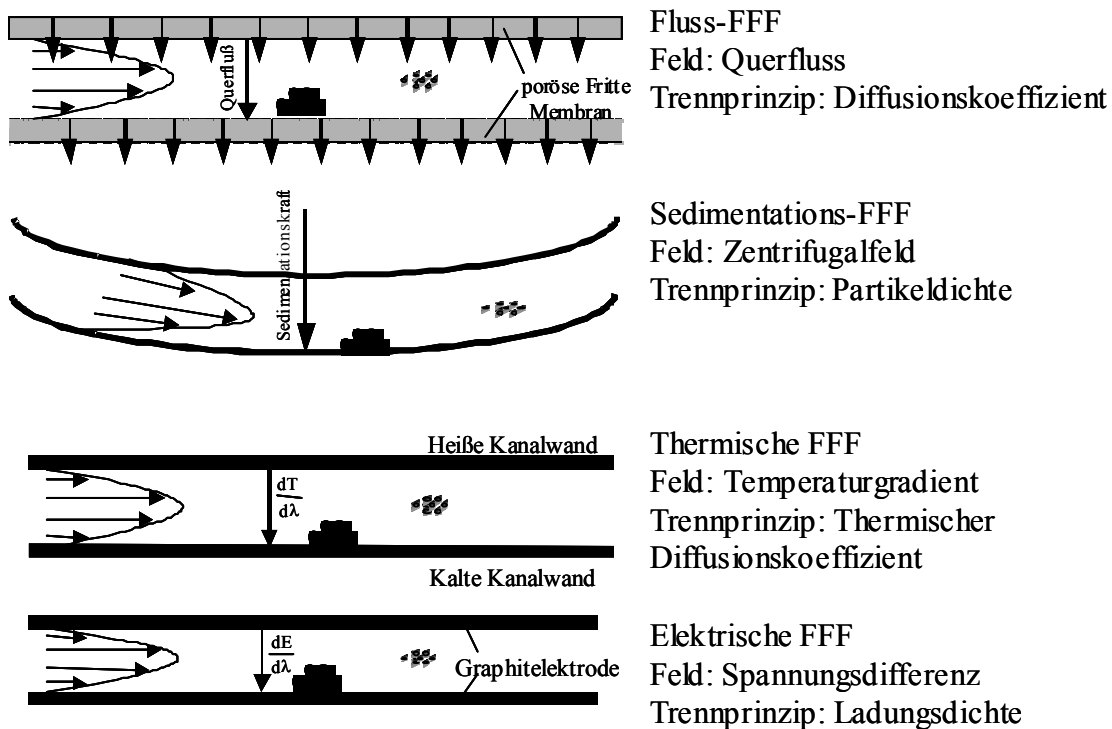


Abbildung 2-19: Die wichtigsten FFF-Methoden, ihre Kraftfelder und Trennprinzipien (41)

2.4.1.5 Trennbereiche der FFF-Varianten

Mit den unterschiedlichen FFF-Methoden ist es möglich, Partikel und Polymere über einen sehr großen Trennbereich (1 nm bis 100 μm bzw. 1000 Da bis 10^{18} Da) zu separieren. Im Folgenden werden die Trennbereiche der am häufigsten verwendeten FFF-Methoden und andere analytische Trenntechniken mit ähnlichem Trennbereich vorgestellt.

Die untere Trenngrenze der FFF kann nicht mit Methoden wie LC, GC oder CE konkurrieren. Den oberen Trennbereich decken die FFF-Methoden allerdings fast alleine ab. Nur die Zentrifugation und die Ultrafiltration können auch in diesem Bereich noch Partikel auftrennen. In Kapitel 2.4.1.6 werden die Vor- und Nachteile der FFF-Methoden gegenüber den gerade genannten Analysetechniken genauer beschrieben (41).

Im Vergleich der verschiedenen FFF-Methoden untereinander deckt die Fluss-FFF den größten Trennbereich ab. Dies, und der zuvor schon genannte Vorteil der direkten Proportionalität der Retentionszeit zu nur einem Parameter, dem Diffusionskoeffizienten,

macht diese Methode zur anwendungstechnisch und kommerziell interessantesten FFF-Technik. Die Fluss-FFF lässt sich in drei Untermethoden gliedern. Die Hohlfaser-Fluss-FFF (HFFFF), die symmetrische Fluss-FFF (SFFFF) und die asymmetrische Fluss-FFF (AFFFF) (41). Unter diesen drei Methoden hat sich die AFFFF als die leistungsfähigste herauskristallisiert (127), (128), (129), (130), (131).

Die Sedimentations-FFF bietet die höchste Auflösung im Vergleich zu den anderen FFF-Methoden, deckt aber einen geringeren Trennbereich (20 nm bis 100 μm) als die Fluss-FFF ab. Die thermische FFF, welche nur einen Trennbereich von 1 nm (1000 Da) bis ca. 50 nm (ca. 10^8 Da) abdeckt, hat ihre Hauptanwendung in der Polymerchemie gefunden und spielt, wie auch die elektrische FFF (80 nm bis 20 μm), in der praktischen Anwendung eine eher untergeordnete Rolle. Somit ist die in dieser Arbeit verwendete AFFFF die vielseitigste aller FFF-Trennmethode (41).

2.4.1.6 Andere analytische Methoden im Trennbereich der FFF

Hydrodynamische Chromatographie (HDC)

Zur Gruppe der Hydrodynamischen Chromatographie zählen die Kapillarhydrodynamische Fraktionierung (CHDC), die SEC (Size-Exclusion-Chromatography) und GPC (Gelpermeationschromatographie). Die Unterschiede liegen im Säulenmaterial. Bei der SEC ist das Packmaterial porös, bei der GPC bildet die stationäre Phase ein Gel und die CHDC verzichtet gänzlich auf das Packmaterial (41).

Das Funktionsprinzip der CHDC unterscheidet sich von dem der FFF dadurch, dass das Kraftfeld F gleich null gesetzt wird. Folglich werden die großen Analyten zuerst eluiert, da die Massenschwerpunkte der größeren Analyten, bedingt durch den größeren Durchmesser, in den schnelleren Geschwindigkeitszonen liegen (132). Ein Nachteil gegenüber der FFF ist, dass die CHDC, wie auch die ihr verwandten Techniken SEC und GPC, nicht im organischen Medium betrieben werden kann. Der Trennbereich aller drei Methoden liegt zwischen 20 nm und 1,1 μm .

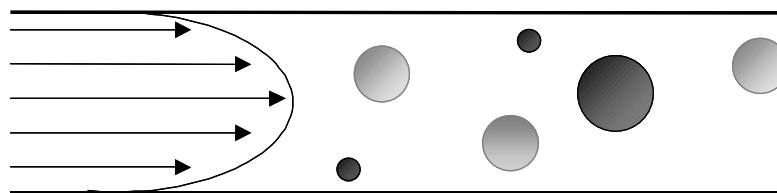


Abbildung 2-20: Trennprinzip der CHDC

Wie schon erwähnt, werden zur Trennung unterschiedlich großer Moleküle bei der GPC / SEC Gele bzw. poröse Partikel eingesetzt. Die Trennung erfolgt aufgrund von Geschwindigkeitsgradienten der durch die Poren der Packung fließenden mobilen Phase. Analyten, welche kleiner als die Porengröße sind, können in die Partikel eindringen und wandern daher langsamer voran als größere Partikel, welche sich in schnelleren Stromlinien sammeln und so vor den kleineren Teilchen eluiert werden. Analyten, welche die Porengröße überschreiten, werden von den Poren nicht eingeschlossen und eluieren alle zur gleichen Zeit (Ausschlussgrenze). Da die Porengröße des Packmaterials im Größenbereich der zu vermessenden Moleküle liegen muss, ist eine relativ genaue Größenvorstellung des Probenmaterials schon im Vorfeld der Versuche nötig.

Kapillarelektrophorese (CE)

Bei der Elektrophorese werden geladene Moleküle im elektrischen Feld getrennt. Kapillarelektrophorese ist ein elektrophoretisches Trennverfahren, bei dem die Trennung in mit Puffern oder Gelen gefüllten Quarzkapillaren erfolgt. Durch Anlegen von Hochspannung (2 - 35 kV) werden geladene Moleküle auf Grund unterschiedlicher Ladungszahl und Mobilität und / oder Größe (Kapillar-Gel-Elektrophorese) getrennt. Unter Verwendung von speziellen Micellen an Stelle der Puffer oder Gele können auch ungeladene Analyten getrennt werden. Die Kapillarelektrophorese zeichnet sich durch eine sehr hohe Trennleistung aus (bis zu einer Million theoretischer Böden pro Meter) (41), (133).

Ultrazentrifugation

Bei der Ultrazentrifugation werden die Proben in einem Rotor beschleunigt. Die sich aufbauende Fliehkraft kann bis zu 260 000 mal größer als die Erdbeschleunigung werden, wenn man die Höchstgeschwindigkeit von 60 000 U / min einstellt. Durch diese enorme Fliehkraft werden selbst nur wenige Nanometer große Teilchen in wenigen Stunden oder gar schneller sedimentiert. Während der Sedimentation ermitteln optische Systeme das Konzentrationsprofil innerhalb der Proben-Messzelle. Diese Profile geben nicht nur Informationen über die Masse der Teilchen wieder, sondern auch über deren Dichte und Form. Bei der Ultrazentrifugation handelt es sich um eine sehr genaue Methode; sie ist allerdings in der Anschaffung sehr kostspielig und erfordert Fachpersonal (125).

2.4.2 ASYMMETRISCHE FLUSS-FFF (AFFFF)

Für die Größenbestimmung der Huminstoffe und der methylierten Huminstoffe wurde in dieser Arbeit eine asymmetrische Fluss-FFF (AFFFF) der Firma POSTNOVA Analytics verwendet. Hier soll nun im Detail auf instrumentellen Aufbau, Trennprinzip, Funktionsweise und theoretische Grundlagen dieser FFF-Untermethode eingegangen werden.

2.4.2.1 Trennprinzip und instrumenteller Aufbau der AFFFF

Das allgemeine Trennprinzip der FFF wurde bereits in Kapitel 2.4.1.2 beschrieben. Hier soll nun das spezielle Trennprinzip der AFFFF im Detail vorgestellt werden. Es ist dem der HPLC sehr ähnlich. Die Trennung der Analyten erfolgt allerdings nicht in einer Säule, sondern in einem Trennkanal.

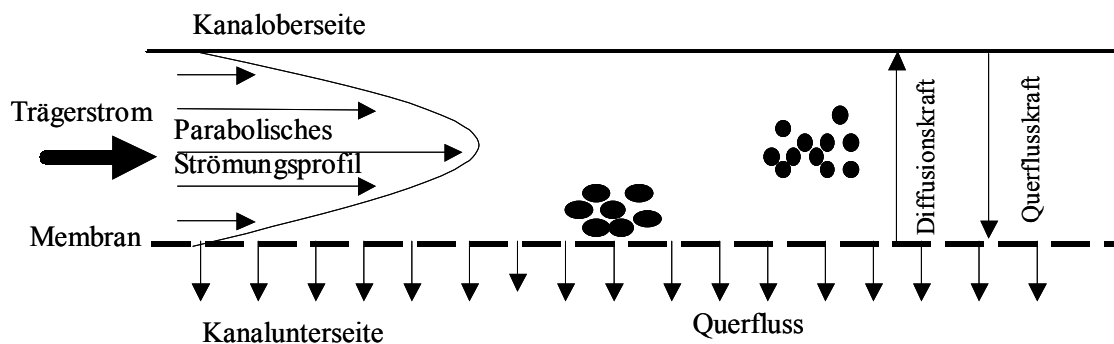


Abbildung 2-21: Spezielles Trennprinzip der AFFFF

Die AFFFF arbeitet mit drei Pumpen. Mit der Injektionspumpe wird die Probe in den Kanal eingeleitet. Die Laminarpumpe dient zur Erzeugung des Trägerstroms. Im Kanal teilt sich der Trägerstrom in zwei Teilströme auf. Ein Teil des Trägerstroms wird mit der Spritzenpumpe, welche den Querfluss regelt, durch die Membran und die Keramikfritte aus dem Kanalblock herausgezogen. Dadurch wird die Probe an die untere Akkumulationswand gepresst. Der zweite Teil des Trägerstroms transportiert Lösemittel und Probe durch den Kanal und leitet sie durch den Kanalauslass weiter zu den Detektoren. Abb. 2-22 und 2-23 zeigen den instrumentellen Aufbau einer AFFFF. Zur Anlage an der GSF gehören zusätzlich noch ein, im Photo nicht gezeigter RI-Detektor.



Abbildung 2-22: Grundbestandteile einer POSTNOVA Analytics AFFF

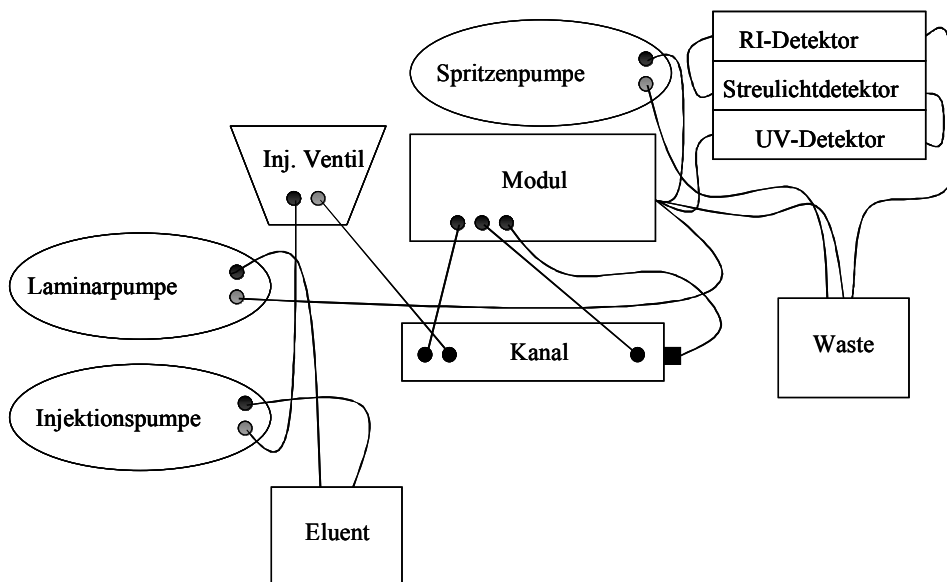


Abbildung 2-23: Aufbau einer AFFF

Das Herzstück der AFFF ist der Kanal. Er ist ca. 30 cm lang, 4 cm breit und 5 cm hoch. Die untere und die obere Kanalbegrenzung sind aus Teflon gefertigt, um auch Lösemitteln wie Methanol und THF zu widerstehen. Für Anwendungen im wässrigen Bereich kann für die Kanalunterseite, den sogenannten Kanalblock, auch PMMA (Polymethylmethacrylat) und für die Deckplatte auch Plexiglas verwendet werden. Ein Edelstahlkanal wird zur Zeit entwickelt. Im Kanalblock befindet sich eine Keramikfritte mit einer Porengröße von ca. 5 μm . Auf dieser Keramikfritte liegt eine Ultrafiltrationsmembran. Der „Cut-off“ dieser Membran legt den unteren Trennbereich der AFFF fest, da Partikel mit einem kleineren Durchmesser als dem Cut-off mit dem Querfluss ausgespült werden können. Um die Keramikfritte herum läuft ein runder Kanal mit ca. 0,5 cm Durchmesser für den O-Ring. Als O-Ring-Material wird

Kalrez verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Stoff, der sowohl resistent gegen fast alle Lösemittel ist, als auch unter Druck nicht zu Quellung neigt. In die obere Kanalbegrenzung, die Deckplatte, ist ein Spacer eingegossen. Je nach Applikation können Spacerhöhen zwischen 0,25 und 0,5 mm Höhe verwendet werden. Der Spacer dient der Festlegung der Kanalhöhe und gleichzeitig der Abdichtung des Kanaltrennbereichs. In der Deckplatte befinden sich außerdem Bohrungen für den Einlass des Trägerstroms, für die Injektion der Probe und für den Auslass von Probe und Trägerstrom. Abb. 2-24 zeigt den Aufbau eines AFFFF-Kanals.

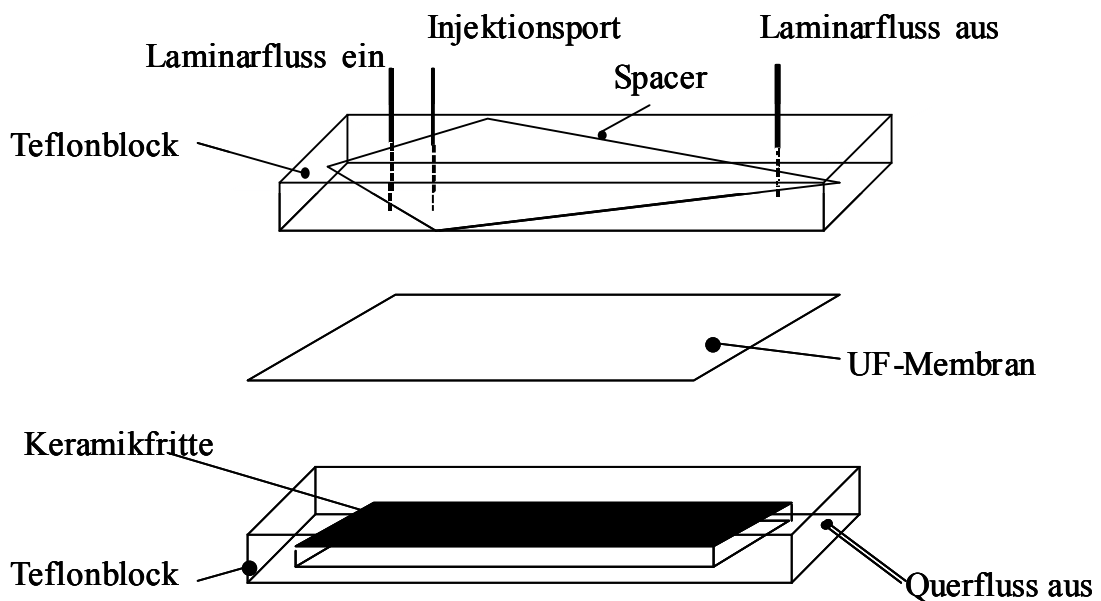


Abbildung 2-24: Aufbau eines AFFFF-Kanals

2.4.2.2 Ablauf einer Trennung

Der Ablauf einer Trennung im AFFFF-Kanal kann in vier Schritte unterteilt werden: die Injektion, die Relaxation, die Fokussierung und die Elution.

Bei der Injektion arbeiten Laminar- und Injektionspumpe. Die Laminarpumpe leitet das Lösemittel sowohl beim Ein- als auch beim Auslass, also von beiden Seiten, in den Kanal ein. Das Verhältnis der Teilströme wird so gewählt, dass sie sich am Injektionseinlass treffen und dort nach unten durch die Membran und die Keramikfritte entweichen. Dadurch entsteht ein Trichter, in welchen die Probe injiziert wird. Anschließend erfolgen zeitgleich die Relaxation und die Fokussierung. Bei der Fokussierung wird wieder vom Ein- und Auslass her Lösemittel in den Kanal gefördert. Dadurch wird die Probe von einem zuvor größeren Fleck auf eine sehr schmale Bande zusammengeschoben. Die Fokussierung führt zu einer starken

Verringerung der Bandenverbreiterung der Probenpeaks und dadurch zu einer höheren Trennleistung. Im letzten Schritt, der Elution, wird der Trägerstrom beim Einlass eingeleitet und wandert mit der Probe nach dem zuvor genannten Trennprinzip durch den Kanalauslass zu den Detektoren. Abb. 2-25 zeigt schematisch die Abläufe im Kanal.

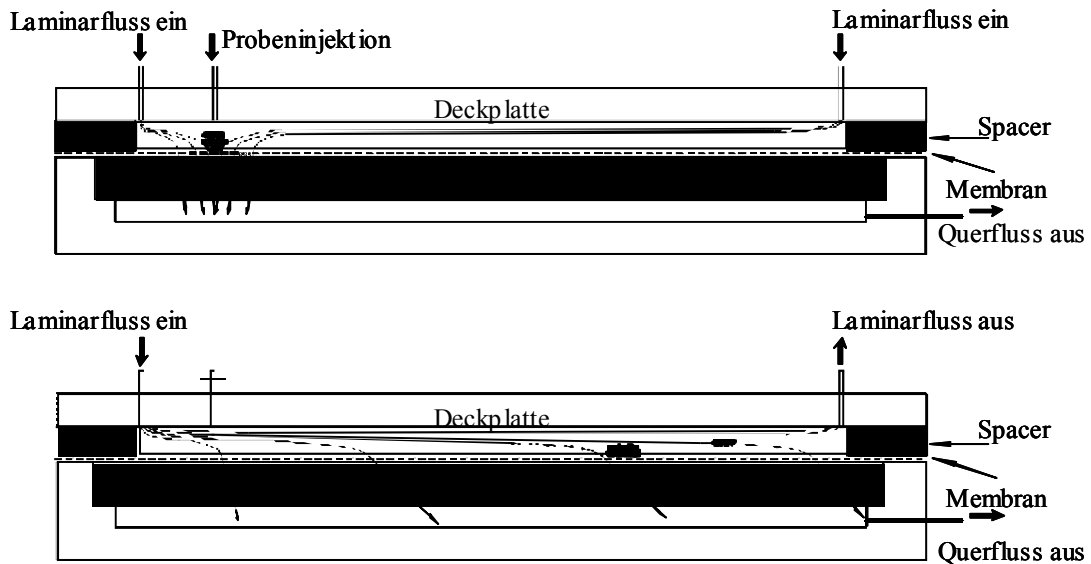


Abbildung 2-25: Ablauf einer Trennung in einem AFFF-Kanal; oben: Injektion, Relaxation und Fokussierung, unten: Elution

2.4.2.3 Theoretische Grundlagen

Die Herleitung der Theorie der AFFF geht von einem rechteckigen oder trapezförmigen Kanal aus (41), (127), (128), (130). Ein Kanal in Form einer verzerrten Raute mit den in folgenden Gleichungen benutzten Abstandsbezeichnungen ist in Abb. 2-26 gezeigt:

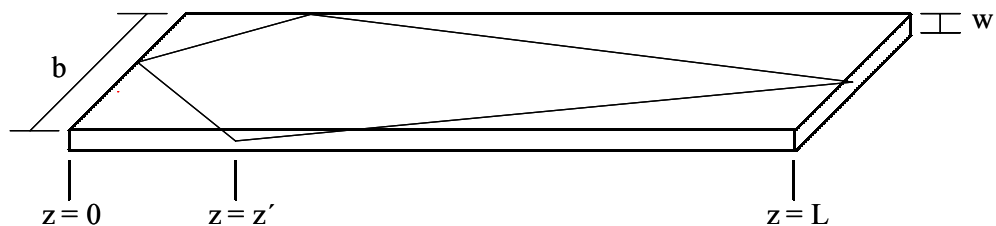


Abbildung 2-26: Verzerrt rautenförmiger Kanal mit den Abstandsbezeichnungen für die AFFF

Theorie des normalen Trennmodus

Dem parabolischen Flussprofil nach Poiseuille zufolge hängt die Strömungsgeschwindigkeit v von den Parametern x : Abstand eines Teilchens von der Membran, w : Kanaldicke und $\langle v \rangle$: über die Kanalbreite gemittelte Strömungsgeschwindigkeit ab.

$$v = 6 \cdot \langle v \rangle \cdot \left[\frac{x}{w} - \left(\frac{x}{w} \right)^2 \right] \quad \text{Gleichung 2-14}$$

Hierbei wird vorausgesetzt, dass die Geschwindigkeit an den Wänden gleich null ist und dass der Querfluss keinen Einfluss auf den Laminarfluss hat. Tatsächlich wird das ursprünglich symmetrische Laminarprofil durch den Querfluss asymmetrisch deformiert. Dadurch liegen die schnellsten Strömungslinien in der Realität nicht mehr im Kanalzentrum, sondern näher an der Akkumulationswand (134).

Die Änderung des Querflusses in Richtung der x -Koordinate lässt sich nach einem Massengleichgewichtsmodell (135) beschreiben:

$$u = -|u_0| \cdot \left(1 - \frac{3 \cdot x^2}{w^2} + \frac{2 \cdot x^3}{w^3} \right) \quad \text{Gleichung 2-15}$$

u : Querflussgeschwindigkeit im Abstand x von der Membran, u_0 : Querflussgeschwindigkeit für $x = 0$ an der Membranoberfläche

Durch den Querfluss geht ein Teil des Laminarstromes auf seinem Weg durch den Kanal verloren. Dadurch nimmt die Laminarflussgeschwindigkeit entlang des Kanals ständig ab.

Diese Abnahme kann wie folgt veranschaulicht werden:

$$\langle v \rangle = \langle v_0 \rangle - \frac{|u_0|}{w} \cdot z \quad \text{Gleichung 2-16}$$

z : Abstand vom Kanaleinlass, $\langle v \rangle$: mittlere Strömungsgeschwindigkeit am Punkt z , $\langle v_0 \rangle$: mittlere Strömungsgeschwindigkeit am Punkt $z = 0$

Diese Gleichung setzt voraus, dass der Querfluss entlang des Kanals konstant bleibt. Diese Annahme ist unter den in dieser Arbeit genutzten Bedingungen (Verwendung von Ultrafiltrationsmembranen und hohen Querflussraten) in erster Näherung gültig.

Im Idealfall stellt sich im Kanal bei ausgeschaltetem Laminarstrom zwischen der Kraft des Querflusstromes und der entgegengerichteten Diffusionskraft ein stationäres Gleichgewicht ein, bei dem der Nettofluss der Proben gleich null ist:

$$J_x = c \cdot u - D \cdot \frac{dc}{dx} = 0 \quad \text{Gleichung 2-17}$$

J_x : resultierende Kraft auf ein Teilchen in x -Richtung, c : Analytkonzentration im Abstand x von der Membran, D : Diffusionskoeffizient

Durch Lösen dieser Differentialgleichung erhält man die Konzentrationsverteilung für die Partikel im stationären Zustand:

$$c = c_0 \cdot \exp\left(\frac{-|u_0| \cdot x}{D} \cdot \left[1 - \frac{x^2}{w^2} + \frac{x^3}{2 \cdot w^3}\right]\right) \quad \text{Gleichung 2-18}$$

c_0 : Analytkonzentration an der Membran bei $x = 0$. Der Ausdruck in den eckigen Klammern ist charakteristisch für AFFFF-Kanäle und geht für kleine x -Werte gegen eins. Daraus folgt, dass die Querflussgeschwindigkeit in kleinen Abständen von der Membran fast konstant ist.

Der durchschnittliche Abstand l der Moleküle von der Membran kann im Falle der AFFFF durch die folgende Gleichung ausgedrückt werden:

$$l = \frac{D}{|u_0|} \quad \text{Gleichung 2-19}$$

l hängt auch mit der dimensionslosen Größe λ , dem sogenannten FFF-Parameter zusammen, welcher wie folgt umschrieben werden kann:

$$\lambda = \frac{l}{w} = \frac{D}{|u_0| \cdot w} \quad \text{Gleichung 2-20}$$

Wenn u_0 bekannt ist und l oder λ experimentell bestimmt worden sind, kann der Diffusionskoeffizient direkt aus dieser Gleichung berechnet werden. λ errechnet sich aus dem folgenden Retentionsverhältnis:

$$R = \frac{v_z}{\langle v \rangle} = \frac{t_0}{t_R} \quad \text{Gleichung 2-21}$$

R : Retentionsverhältnis, v_z : Probenzonengeschwindigkeit entlang des Kanals, $\langle v \rangle$: Kanalflussgeschwindigkeit, t_0 : Totzeit = Retentionszeit des Voidpeaks (\sim Totvolumen des Kanals), t_R : Retentionszeit des Analyten. Für t_0 gilt die folgende Beziehung:

$$t_0 = \frac{V_0}{\dot{V}_c} \cdot \ln \left(1 + \frac{\dot{V}_c}{\dot{V}_{\text{out}}} \cdot \left[1 - \frac{w \cdot \left(b_0 z' - \frac{(b_0 - b_L)}{2 \cdot L} \cdot z'^2 - y \right)}{V_0} \right] \right) \quad \text{Gleichung 2-22}$$

V_0 : Totvolumen des Kanals (Voidvolumen) = $t_0 \cdot V_{\text{out}} - V_{K \rightarrow D}$

V_{out} : Flussrate am Kanalausgang, $V_{K \rightarrow D}$: Kapillar- und Detektorzellenvolumen vom Kanalausgang bis zum messenden Detektor, V_c : Querflussrate, z' : Abstand des Injektionsports von $z = 0$, y : Verringerung der Kanalfläche durch Verengung am Einlass, L : Kanallänge, $(b_0 - b_L)$: Differenz der Kanalbreite am Kanaleingang und -ausgang (bei einem rechtwinkligen Kanal ist $(b_0 - b_L)$ gleich null).

Die Probenzonengeschwindigkeit v_z ist abhängig von der exponentiellen Konzentrationsverteilung:

$$v_z = \frac{\langle c \cdot v \rangle}{\langle c \rangle} \quad \text{Gleichung 2-23}$$

Somit kann sie mit l oder λ in Beziehung gesetzt werden, und man erhält durch Kombination und Integration der beiden letzten Gleichungen:

$$R = \frac{6}{w} \cdot \frac{\int_0^w e^{\left(\frac{-x}{l}\right) \cdot B(x)} \cdot x \cdot dx - \frac{1}{w} \cdot \int_0^w e^{\left(\frac{-x}{l}\right) \cdot B(x)} \cdot x^2 \cdot dx}{\int_0^w e^{\left(\frac{-x}{l}\right) \cdot B(x)} \cdot x \cdot dx} \quad \text{Gleichung 2-24}$$

Die Funktion $B(x)$ beschreibt die Änderung der Querflussgeschwindigkeit in Abhängigkeit des Abstandes x von der Membran

$$B(x) = 1 - \frac{x^2}{w^2} + \frac{x^3}{w^3} \quad \text{Gleichung 2-25}$$

Für $x \ll w$ geht $B(x)$ gegen eins. Durch Einsetzen von $B(x) = 1$ in Gleichung 2-25 erhält man die für die meisten FFF-Varianten gültige Retentionsgleichung (136):

$$R = \frac{V_0}{V_R} = 6 \cdot \lambda \cdot \left(\coth \frac{1}{2 \cdot \lambda} - 2 \cdot \lambda \right) \quad \text{Gleichung 2-26}$$

Im Messbereich der AFFFF gelten R -Werte von ca. 10^3 . Unter diesen Umständen nähert sich R in oben stehender Gleichung 6λ an. Da der Fehler bei einem Wert $R < 0,006$ noch unter 2 % liegt, wird zur Vereinfachung $R = 6 \lambda$ angenommen. Durch Kombination der letzten Gleichungen kann der Diffusionskoeffizient wie folgt aus den experimentellen Daten berechnet werden:

$$D = \frac{t_0 \cdot w^2 \cdot V_c}{V_0 \cdot 6 \cdot t_R} \quad \text{Gleichung 2-27}$$

$$D = \frac{\lambda \cdot w^2 \cdot V_c}{V_0} \quad \text{Gleichung 2-28}$$

Der Diffusionskoeffizient für ein sphärisches Partikel mit dem Durchmesser d kann aus der Stokes-Gleichung berechnet werden:

$$D = \frac{k \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d} \quad \text{Gleichung 2-29}$$

k : Boltzmannkonstante, T : Temperatur, η : Viskositätskoeffizient des Eluenten

Durch Zusammenfassen der Gleichungen 2-27 und 2-29 erhält man den Zusammenhang zwischen der Retentionszeit eines Analyten und seinem Äquivalentdurchmesser:

$$d = \frac{2 \cdot k \cdot T \cdot V_0 \cdot t_R}{w^2 \cdot V_c \cdot \pi \cdot \eta \cdot t_0} \quad \text{Gleichung 2-30}$$

Zur genaueren Umschreibung der Größenverteilung von Molekülen betrachtet man nicht nur die Masse am Peakmaximum (M_p), sondern auch die numerisch gemittelte Masse (M_n) und das Gewichtsmittel (M_w). M_n und M_w lassen sich wie folgt berechnen:

$$M_n = \frac{\sum h_i}{\sum (h_i / M_i)} \quad \text{Gleichung 2-31}$$

$$M_w = \frac{\sum h_i \cdot M_i}{\sum h_i} \quad \text{Gleichung 2-32}$$

h_i : Höhe des Detektorsignals zur Retentionszeit i , M_i : Masse zur Retentionszeit i (42)

2.4.3 DETEKTION DER FFF-TRENNUNGEN

Das generelle Ziel aller Trennverfahren ist die Charakterisierung von unbekanntem Proben bezüglich Partikelgröße, Molekulargewicht und Konzentration. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt generell mit Hilfe der UV-Spektroskopie und der Differentialrefraktometrie (RI). Durch die Kopplung mit einem Laserlichtstreuendetektor können die Partikelgröße und das Molekulargewicht direkt bestimmt werden.

2.4.3.1 UV / VIS-Absorptionsdetektion

Bei der UV-Spektroskopie werden elektronische Übergänge im Molekül durch elektromagnetische Strahlung angeregt. Die Abhängigkeit der Konzentration von der Absorption wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben.

$$\log \frac{I_0}{I} = c \cdot \varepsilon \cdot l \quad \text{Gleichung 2-33}$$

I_0 : Intensität zum Zeitpunkt $t = 0$, I : Intensität, c : Konzentration, ε : Extinktionskoeffizient, l : Schichtdicke der Küvette (137)

2.4.3.2 Differentialrefraktometrie (RI)

Hier wird die Konzentration aus dem Unterschied des Brechungsindices der Lösung n zum Lösemittel n_0 bestimmt. Der Brechungsindex lässt sich durch eine Geradengleichung beschreiben, deren Proportionalitätskonstante das sogenannte Brechungsindexinkrement (dn/dc) ist.

$$c = \frac{n - n_0}{(dn/dc)} \quad \text{Gleichung 2-34}$$

2.4.3.3 Laserlichtstreuung

Die Laserlichtstreuung beruht auf der Wechselwirkung von Licht mit Materie. Sie ist eine absolut arbeitende Methode zur Bestimmung von Molmasse und Größe von Polymeren und Partikeln. Man unterscheidet zwischen statischer und dynamischer Lichtstreuung, welche auch untereinander gekoppelt werden können. Zudem erhält man durch die Kopplung von Lichtstreuungs- und Konzentrationsdetektoren wichtige zusätzliche Informationen (41), (110), (125).

Statische Laserlichtstreuung

Mit der statischen Lichtstreuung können absolute Molmassen und Gyrationradien direkt und ohne Kalibrierung bestimmt werden. Dabei wird Laserlicht auf eine Probe eingestrahlt und die Streulichtintensität unter einem oder mehreren Streuwinkeln detektiert. Abhängig von der Wellenlänge des eingestrahlt Lichtes und der Größe der Probe kann man die Streustrahlung in drei Bereiche einteilen: Für Teilchengrößen, die weniger als einem Zwanzigstel der Wellenlänge des Lichtes entsprechen, gilt die Theorie der Rayleigh-Streuung. Die Intensität der Strahlung ist in diesem Bereich proportional zur Konzentration und zur Molmasse. Liegen die Teilchengrößen im Bereich zwischen einem Zwanzigstel der Wellenlänge und der Wellenlänge, so tritt destruktive Interferenz innerhalb der Teilchen auf. Man spricht hier von Debye-Streuung. Bei Teilchendimensionen oberhalb der Wellenlänge wird die Streuung als Mie-Streuung bezeichnet. In diesem Bereich treten konstruktive und destruktive Interferenzen nebeneinander auf.

Die Rayleigh- und die Debye-Streuung werden durch folgende Gleichung beschrieben:

$$R_\theta = c \cdot M \cdot (dn/dc)^2 \cdot P_\theta \cdot K_\theta \quad \text{Gleichung 2-35}$$

R_θ ist das Detektorsignal. Es handelt sich hierbei um die Streuintensität unter dem Beobachtungswinkel θ . c ist die Konzentration der Probe, M die Molmasse, dn/dc das

Brechungsindexinkrement, P_θ der Shapefaktor ($P_\theta = 1$ für ein kugelförmiges Teilchen) und K_θ eine geräteabhängige optische Konstante.

Wurde das Konzentrationssignal mit dem UV- oder dem RI-Detektor bestimmt, können die absoluten Molmassen, die Molmassenverteilung und die Gyrationradien direkt berechnet werden. Allerdings erhält man bei der statischen, wie auch bei der dynamischen Laserlichtstreuung erst ein Detektorsignal für Teilchengrößen ab 100 kDa im Fall von Polymeren und ab einer Million Dalton bei Proteinen.

Dynamische Laserlichtstreuung

Wie bei der statischen Lichtstreuung wird auch hier Laserlicht auf eine Probe eingestrahlt. Unter einem bestimmten Streuwinkel wird sodann die Streulichtphotonenzahl detektiert. Über die Darstellung der Frequenzfluktuation in zeitlicher Abhängigkeit kann man die in Gleichung 2-36 dargestellte Autokorrelationsfunktion berechnen.

$$C(\tau) = B \cdot \left[1 + A^{(-2\Gamma\tau)} \right] \quad \text{mit } \Gamma = D q^2 \quad \text{Gleichung 2-36}$$

$C(\tau)$: Summe der Produkte der Intensität gemessen zur Zeit τ und $(\tau - \tau_0)$, B: Basislinie, A:

Gerätekonstante, D: Diffusionskoeffizient, $q: q = \frac{4 \cdot \pi \cdot n}{\sin\left(\frac{\theta}{2}\right)}$, n: Brechungsindex des Lösemittels

Mit der Autokorrelationsfunktion lässt sich der Diffusionskoeffizient bestimmen, welcher eingesetzt in die Stokes-Einstein-Gleichung die Berechnung des hydrodynamischen Durchmessers ermöglicht.

$$D = \frac{k \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d} \quad \text{Gleichung 2-29}$$

D: Diffusionskoeffizient, k: Boltzmannkonstante, T: Temperatur, η : Viskosität des Lösemittels, d: hydrodynamischer Durchmesser

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 HUMINSTOFFE UND REFERENZSUBSTANZEN

Die in dieser Arbeit untersuchten Huminstoffe wurden alle nach dem IHSS-Standardverfahren zur Isolierung von ROS (refraktäre organische Säuren) über das Adsorberharz XAD-8 aufgearbeitet und gefriergetrocknet (138). Die Huminstoffe aus dem DFG-ROSIG-Programm wurden von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Frimmel (Engler-Bunte-Institut, Universität Karlsruhe) isoliert und zur Verfügung gestellt. Bei MPDOM handelt es sich um ein DOM, welches durch reverse Osmose aus dem Suwanee River gewonnen wurde. Es ist mittlerweile auch als IHSS-Standardmaterial erhältlich. Die IHSS-Standards wurden kommerziell erworben, Carminsäure wurde aufgrund ihrer, in Huminstoffen enthaltenen funktionellen Gruppen als Referenzsubstanz gewählt. In Tabelle 3-1 sind alle verwendeten Huminstoffe mit Angaben zu ihrer Herkunft, Bezugsquelle und Probennahme aufgeführt. Elementaranalytische Daten der verwendeten HS wurden entweder der Literatur entnommen oder von den DFG-ROSIG-Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt.

Die Nomenklatur der ROSIG-Substanzen sei hier noch kurz erläutert:

- Die ersten beiden Buchstaben beschreiben den Probennahmeort.
- Die darauf folgende Zahl gibt die Probennahme in chronologischer Reihenfolge an. So stammt SV1 aus der ersten Wasserprobennahme des Schwelvollertsees.
- Die weiteren Buchstaben bezeichnen die einzelnen Fraktionen des IHSS-Verfahrens. FA steht für Fulvinsäure, HA für Huminsäure.

Tabelle 3-1: Überblick über die untersuchten Huminstoffe und Carminsäure

Abkürzung	Fraktion	Probennahme	Herkunft	Bezugsquelle
1S101H	HA	—	Fließgewässer (Suwanee River, USA)	IHSS- Referenzmaterialien
1S102H	HA	—	Boden	
1S103H	HA	—	Torf	
1S104H	HA	—	Leonardite	
HO10 HA	HA	Oktober 1994	Braunwassersee (Hohlohsee, Schwarzwald)	Engler-Bunte- Institut, Universität Karlsruhe
HO10 FA	FA	Oktober 1994		
HO13 HA	HA	Juli 1997	Schwelwasserdeponie Schwelvollertsee	
HO13 FA	FA	Juli 1997		
SV1 HA	HA	Juni 1995	Suwanee River, USA	
SV1 FA	FA	Juni 1995		
MPDOM	FA	—		Georgia Institute of Technology, Atlanta, USA
Carminsäure	—	—	—	Merck

3.2 METHYLIERUNG VON HUMINSTOFFEN

Die Huminstoffe und ROSIG-Materialien wurden gemäß einer optimierten und etwas von der Literatur (46), (47), (48), (49), (50) abweichenden Diazomethan / Hakamori-Kombinationsmethode methyliert. Sämtliche Methylierungsreaktionen wurden in trockenen Lösungsmitteln mit ^{13}C -markierten Methylierungsreagentien und solchen mit natürlicher Isotopenhäufigkeit ausgeführt. Somit entstanden pro Substanz vier Proben, welche dann mit NMR und AFFFF (nur die unmarkierten) vermessen wurden. Im Folgenden wird die Kombinationsmethode in beiden Richtungen vorgestellt. Die Angaben in Klammern beziehen sich auf die unmarkierten Methylierungsreagenzien.

Hakamori- / Diazomethan-Methode

Hakamori-Methylierung

Unter Stickstoffatmosphäre werden 0,2 g (0,5 g) NaH und 10 ml (20 ml) wasserfreies DMSO vereinigt. 20 mg (50 mg) trockener Huminstoff (Vakuumanlage: 2-3 Stunden) werden in 3 ml (5 ml) wasserfreiem DMSO gelöst und langsam im Eisbad mit dem NaH / DMSO-Reagenz versetzt. Nach einer Rührzeit von 4 Stunden bei RT werden im Eisbad 0,75 ml $^{13}\text{CH}_3\text{I}$ (2 ml) und nach einer weiteren Stunde nochmals 0,75 ml $^{13}\text{CH}_3\text{I}$ (2 ml) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei RT gerührt. Zur Extraktion wird die Lösung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$, ca. 4 ml (8 ml) 0,1 M HCl und Chloroform mehrfach ausgeschüttelt. Man erhält eine orange bis dunkelrot-braune organische Phase. Die Chloroformphasen werden vereinigt und das Chloroform wird im Vakuum entfernt. Es verbleibt ein oranger bis rot-schwarzer, meist öliges Rückstand.

Diazomethan-Methylierung

Ca. die Hälfte des Rückstandes der Hakamori-Methylierung wird in 5 ml Methanol gelöst und mit 0,825 mmol ^{13}C -Diazomethan (2 mmol) in Ether im Eisbad versetzt (139). Dabei erfolgt eine Aufhellung von dunkelbraun nach hellbraun bis gelb. Nach einer Reaktionszeit von 4 Stunden werden weitere 0,825 mmol ^{13}C -Diazomethan (2 mmol) zugesetzt und über Nacht bei RT gerührt. Die Lösung wird bis zur Trockene an der HV eingengt. Es verbleibt ein gelbbrauner Rückstand. Bei ^{12}C -methyliertem MPDOM in der Reihenfolge h+d (Hakamori + Diazomethan), ebenso bei den ^{13}C -methylierten HO10- und HO13-FAs in beiden Reihenfolgen und bei HO13HA,d+h und bei SV1FA in beiden Reihenfolgen sowohl bei der ^{12}C - als auch bei der ^{13}C -Methylierung wurde eine Spatelspitze p-Toluolsulfonsäure als Katalysator im Eisbad zugegeben.

*Diazomethan- / Hakamori-Methode**Diazomethan-Methylierung*

20 mg (50 mg) vakuumgetrockneter (2-3 h) Huminstoff werden in 4 ml (6 ml) Methanol gelöst und im Eisbad unter Rühren mit 0,825 mmol kalter etherischer ^{13}C -Diazomethan-Lösung (2 mmol) versetzt. Es resultiert eine hellbraune bis gelbe Lösung. Nach einer Reaktionszeit von 4 Stunden wird die Reaktionslösung mit weiteren 0,825 mmol ^{13}C -Diazomethan (2 mmol) versetzt und über Nacht gerührt. Beim Einengen zur Trockene im Vakuum verbleibt ein gelbbrauner Rückstand. Bei den oben genannten HS wurde eine Spatelspitze p-Toluolsulfonsäure als Katalysator im Eisbad zugegeben.

Hakamori-Methylierung

Bei Zugabe von 0,75 ml $^{13}\text{CH}_3\text{I}$ (2 ml) im Eisbad zum ^{13}C - (^{12}C -) Diazomethan-Methylierungsprodukt in 5 ml DMSO erwärmt sich die Lösung unter Gasentwicklung und wird klar (nicht alle Zwischenprodukte sind in DMSO vollständig löslich). Nach einer Stunde wird nochmals 0,75 ml $^{13}\text{CH}_3\text{I}$ (2 ml) zugegeben und über Nacht gerührt. Zur Extraktion wird die Lösung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$, ca. 4 ml (8 ml) 0,1 M HCl und Chloroform mehrfach ausgeschüttelt. Man erhält eine orange bis rot-braune organische Phase. Die Chloroformphasen werden vereinigt und das Chloroform wird im Vakuum entfernt.

Die Produkte der Kombinationsmethode werden je nach Löslichkeit in deuteriertem Chloroform bzw. deuteriertem Methanol für die NMR- und AFFFF-Messungen aufgehoben.

3.3 NMR-SPEKTROSKOPIE**3.3.1 APPARATIVE AUSSTATTUNG**

Die 1D- ^1H - und die 2D-Spektren wurden an einem DMX 500-Spektrometer der Firma Bruker, Rheinstetten, mit einem 5 mm Invers-Probenkopf mit z-Gradient mit einer Resonanzfrequenz von 500 MHz für Protonen aufgenommen. Die 1D- ^{13}C - und ^{13}C -DEPT-Messungen wurden an einem AC 400-Spektrometer der Firma Bruker, Rheinstetten, mit einem 5 mm C,H-Dualprobenkopf durchgeführt.

3.3.2 PROBENVORBEREITUNG

Die Huminstoffe wurden nach der in Kapitel 3.2 beschriebenen Kombinationsmethode methyliert und je nach Löslichkeit in etwas deuteriertem Chloroform (Merck) bzw. deuteriertem Methanol (Merck) gelöst. Die Lösungen wurden zentrifugiert und die Filtrate in NMR-Röhrchen umgefüllt.

3.3.3 PARAMETER DER NMR-EXPERIMENTE

Im folgenden werden die Aufnahme- und Prozessierungsparameter der in dieser Arbeit verwendeten NMR-Experimente tabellarisch aufgelistet. Die verschiedenen Experimente wurden im Allgemeinen Teil unter 2.3.7 beschrieben.

3.3.3.1 Eindimensionale NMR-Experimente

¹H-Einpuls-Experiment

Tabelle 3-2: Aufnahme- und Prozessierungsparameter der ¹H-Spektren

Aufnahmeparameter	
Pulsprogramm	zg
Probenkopf	5 mm BBI
Sendefrequenz des ¹ H-Kerns	500,13 MHz
Spektrale Breite (SWH)	11468 Hz
Aquisitionszeit (AQ)	5,71 s
Anzahl der Datenpunkte des FIDs	131072
Anzahl der addierten Einzel-FIDs (ns)	320
Relaxationsdelay	4,3 s
¹ H-Transmitter Puls	90°
Prozessierungsparameter	
Nullpunktfüllung (Anzahl komplexwertiger Punkte nach FT)	131072
Filter	Exponentialfunktion
Linienverbreiterungsfaktor	0,3 Hz

*¹³C-Experiment*Tabelle 3-3: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für „invers-gated“ entkoppelte ¹³C-Experimente

Aufnahmeparameter	
Pulsprogramm	invgate
Probenkopf	5 mm BBO
Sendefrequenz des ¹³ C-Kerns	100,61 MHz
Spektrale Breite (SWH)	35714 Hz
Aquisitionszeit (AQ)	0,917 s
Anzahl der Datenpunkte des FIDs	65536
Anzahl der addierten Einzel-FIDs (ns)	20000 - 40000
Relaxationsdelay	8 s
Entkopplung	WALTZ-16
Prozessierungsparameter	
Nullpunktfüllung (Anzahl komplexwertiger Punkte nach FT)	32768
Filter	Exponentialfunktion
Linienverbreiterungsfaktor	3 Hz

*¹³C-DEPT-Experimente (45°, 90°, 135°)**Tabelle 3-4: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für ¹³C-DEPT Experimente*

Aufnahmeparameter	
Pulsprogramm	dept
Probenkopf	5 mm BBO
Sendefrequenz des ¹³ C-Kerns	100,61 MHz
Spektrale Breite (SWH)	35714 Hz
Aquisitionszeit (AQ)	0,917 s
Anzahl der Datenpunkte des FIDs	65536
Anzahl der addierten Einzel-FIDs (ns)	ca. 7000 (DEPT 45°, 135°) und ca. 14000 (2 × ns DEPT 45° bzw 135°) bei DEPT 90°
Relaxationsdelay	2,75 s
Wartezeit d2 (1/[2J(C,H)])	3,45 ms
Entkopplung	WALTZ-16
Prozessierungsparameter	
Nullpunktfüllung (Anzahl komplexwertiger Punkte nach FT)	32768
Filter	Exponentialfunktion
Linienverbreiterungsfaktor	3 Hz

3.3.3.2 Zweidimensionale NMR-Experimente

*Homonukleare 2D-NMR-Experimente**COSY**Tabelle 3-5: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für gs-(¹H, ¹H)-COSY-Experimente*

F2-Aufnahmeparameter	
Pulsprogramm	cosygsmf
Probenkopf	Invers 5 mm BBI
Sendefrequenz des ¹ H-Kerns	500,13 MHz
Spektrale Breite (SWH)	6010 Hz
Kopplungskonstante	150 Hz
Aquisitionszeit (AQ)	0,170 s
Anzahl der Datenpunkte des FIDs	2048
Anzahl der addierten Einzel-FIDs (ns)	32 (Carminsäure), 48 (¹³ C-methyliert), 64 (¹² C-methyliert)
Relaxationsdelay	1,5 s
Gradientenpulse	1000 µs
Gradientenverhältnis (doppelquanten gefiltert)	4 : 3 : 10
F1-Aufnahmeparameter	
Anzahl der Datenpunkte des FIDs	384
Spektrale Breite (SW)	12 ppm
F2-Prozessierungsparameter	
Nullpunktfüllung (Anzahl komplexwertiger Punkte nach FT)	2048
Filter	Quadrat der Sinus-Funktion
SSB	0
F1-Prozessierungsparameter	
Datenprozessierung	quantengefiltert
Nullpunktfüllung (Anzahl komplexwertiger Punkte nach FT)	512
Filter	Sinus-Funktion
SSB	0

TOCSY

Tabelle 3-6: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für TOCSY-Experimente

F2-Aufnahmeparameter	
Pulsprogramm	mlevelgp
Probenkopf	Invers 5 mm BBI
Sendefrequenz des ^1H -Kerns	500,13 MHz
Spektrale Breite (SWH)	6010 Hz
Aquisitionszeit (AQ)	0,341 s
Anzahl der Datenpunkte des FIDs	4096
Anzahl der addierten Einzel-FIDs (ns)	32 (Carminsäure) sonst 64
Relaxationsdelay	1,5 s
TOCSY-Mischzeit	70 ms
Trimpuls	2500 μs
Gradientenpulse	1000 μs
Gradientenverhältnis (Echo-Antiecho)	30 : 30
F1-Aufnahmeparameter	
Anzahl der Datenpunkte des FIDs	512
Spektrale Breite (SW)	12 ppm
F2-Prozessierungsparameter	
Nullpunktfüllung (Anzahl komplexwertiger Punkte nach FT)	4096
Filter	Quadrat der Sinus-Funktion
SSB	6
F1-Prozessierungsparameter	
Datenprozessierung	Echo-Antiecho
Nullpunktfüllung (Anzahl komplexwertiger Punkte nach FT)	512
Filter	Sinus-Funktion
SSB	6

*Heteronukleare 2D-NMR-Experimente**HSQC**Tabelle 3-7: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für HSQC-Experimente*

F2-Aufnahmeparameter	
Pulsprogramm	invietgs
Probenkopf	Invers 5 mm BBI
Sendefrequenz des ¹ H-Kerns	500,13 MHz
Sendefrequenz des ¹³ C-Kerns	125,75 MHz
Spektrale Breite (SWH)	6010 Hz
Aquisitionszeit (AQ)	0,170 s
Anzahl der Datenpunkte des FIDs	2048
Anzahl der addierten Einzel-FIDs (ns)	32 (Carminsäure), 64 (¹³ C-methylierte HS), 128 (¹² C-methylierte HS)
Relaxationsdelay	1,5 s
Trimpuls	2000 µs
Gradientenpulse	1000 µs
Gradientenverhältnis (Echo-Antiecho)	4 : 1 : 4 : -1
$d = 1 / 4J_{H,C}$	1,7 ms
Kopplungskonstante J (C,H)	135 Hz, 145 Hz, 150 Hz
Entkopplung	GARP
F1-Aufnahmeparameter	
Anzahl der Datenpunkte des FIDs	1024
Spektrale Breite (SW)	220 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)	1024
Filter	Sinus-Funktion
SSB	6

*HSQC-TOCSY**Tabelle 3-8: Aufnahme- und Prozessierungsparameter für HSQC-TOCSY-Experimente*

F2-Aufnahmeparameter	
Pulsprogramm	invietgsm1
Probenkopf	Invers 5 mm BBI
Sendefrequenz des ¹ H-Kerns	500,13 MHz
Sendefrequenz des ¹³ C-Kerns	125,75 MHz
Spektrale Breite (SWH)	6010 Hz
Aquisitionszeit (AQ)	0,170 s
Anzahl der Datenpunkte des FIDs	2048
Anzahl der addierten Einzel-FIDs (ns)	32 (Carminsäure), 64 (¹³ C-methylierte HS), 128 (¹² C-methylierte HS)
Relaxationsdelay	1,5 s
TOCSY-Mischzeit	70 ms
Trimpuls	2000 µs
Gradientenpulse	1000 µs
Gradientenverhältnis (Echo-Antiecho)	4 : 1 : 4 : -1
$d = 1 / 4J_{H,C}$	1,7 ms
Kopplungskonstante J (C,H)	135 Hz, 145 Hz, 150 Hz
Entkopplung	GARP
F1-Aufnahmeparameter	
Anzahl der Datenpunkte des FIDs	1024
Spektrale Breite (SW)	250 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)	1024
Filter	Sinus-Funktion
SSB	6

3.3.4 HILFEN ZUR AUSWERTUNG DER NMR-ERGEBNISSE

3.3.4.1 Erstellung von Minimum- und Differenzspektren

Die Minimum- und Differenzspektren wurden mit dem Amix-Viewer Version 3.0.2 der Firma Bruker, Rheinstetten, erstellt. Als Basis zur Errechnung von Minimum- und Differenzspektren müssen die zu vergleichenden Spektren kompatibel sein. Das heißt, sie müssen mit weitgehend identischer Parametrierung aufgenommen worden sein. Neben der Kalibrierung der Spektren ist auch auf eine genaue Phasenkorrektur zu achten. Um „sauberere“ Spektren zu erhalten (weniger T1-Rauschen, geringeres S/N-Verhältnis), werden die Spektren in sogenannten „spectra bases“ (SBASES) bearbeitet und gespeichert (140). Zur Datenarchivierung besteht die Nomenklatur der erstellten Files jeweils aus den Substanznamen, der Art der Methylierung und einer Angabe der jeweiligen Rechenoperation. Um die Spektren direkt und sinnvoll miteinander vergleichen zu können, müssen sie auch identische Volumen-Verhältnisse besitzen. Dies experimentell zu gewährleisten, ist in der Praxis nahezu unmöglich. Um gleiche Signalintensitätsverhältnisse zu erlangen, müssen die Spektren normiert werden. Entsprechende Rechenoperationen des Amix-Viewers ermöglichen dies. Hierzu wird lediglich ein Signal benötigt, welches in allen zu vergleichenden Spektren enthalten ist. Dieses Signal wird als Normierungssignal angegeben und die Signalintensitäten werden an diesem Signal angeglichen. Das Lösemittelsignal kommt für die Normierung nicht in Frage, da die Konzentration dieses Signals nicht der Konzentration der Probe entspricht (141). Das Normierungssignal variiert von Spektrenvergleich zu Spektrenvergleich. Alle produzierten Minimum- und Differenzspektren werden vom Amix-Viewer als XWINNMR-Daten produziert. Zur Weiterverarbeitung der Spektren wurden diese Daten wiederum in SBASES gespeichert. Die Berechnung aller Differenzspektren erfolgte über die Stufe der Bildung von Minimumspektren. Versuche, Spektren direkt voneinander abzuziehen, erzielten unbefriedigende Ergebnisse.

3.3.4.2 Modellrechnungen als Zuordnungshilfe für NMR-Spektren

NMR-Spektren von Modellsubstanzen wurden mit der ACD / Labs-Software ^1H / ^{13}C -Prediktor (Version 4.1) berechnet und mittels EXCEL hinsichtlich Multiplizität bzw. Substanzklasse dargestellt.

3.4 ASYMMETRISCHE FLUSS-FELDFLUSSFRAKTIONIERUNG

3.4.1 GERÄTEPARAMETER

Die AFFFF-Messungen wurden an einem „HRFFF-10000“-Gerät der Firma POSTNOVA Analytik, Eresing, Deutschland, durchgeführt. Alle Komponenten wurden vom Hersteller aufeinander abgestimmt und als Komplettsystem von diesem bezogen. Das Gerät besteht aus einem Autosampler, einem Entgaser, dem AFFFF-Trennkanal, zwei HPLC-Pumpen für den Laminar- und den Injektionsfluss, einer Spritzenpumpe, welche den Querfluss reguliert, dem AFFFF-Modul und einem UV- ($\lambda = 254 \text{ nm}$), einem RI- ($\lambda = 620 \text{ nm}$, Messzellenwinkel: 45°) Detektor und einem Laserstreulicht-Detektor.

Als Trennkanalmaterial wurde in dieser Arbeit Teflon benutzt. Der in den Kanal eingebaute 0,5 mm hohe Spacer ist ebenfalls aus Teflon. Als Dichtung für den Kanal wurde ein Kalrez O-Ring der Firma DOW-DuPont verwendet. Andere, preisgünstigere Materialien, wie beispielsweise verschiedene Kautschuk O-Ringe und ein Viton-Ring, wurden getestet. Aufgrund ihrer Quellneigung unter Druck und mit organischen Lösemitteln mussten diese Materialien alle ausgeschlossen werden.

Die Membranen wurden von der Firma POSTNOVA Analytik und von der Firma DOW bezogen. Für die Tetrahydrofuran(THF)-Messungen wurde eine speziell für organische Anwendungen entwickelte Membran aus besonders behandelte regenerierter Cellulose der Firma POSTNOVA Analytik mit einem Cut-off von 10 kDa benutzt. Die Messungen in Methanol und im wässrigen Milieu wurden mit einer 1 kDa-Membran aus regenerierter Cellulose der Firma POSTNOVA Analytik durchgeführt. Im wässrigen Bereich wurde zudem noch die Nanofiltrationsmembran NF200B der Firma DOW getestet. Diese Membran wird bei Filmtec Membranes, Schwalbach, Deutschland, gefertigt, besteht aus Polypiperazin und hat einen „Cut-off“ von 200 Da.

3.4.2 STANDARDS UND FLIEßMITTEL

Die Messungen wurden in stabilisiertem THF (Roth), Methanol (Merck) und in 0,01 M NaCl (Merck) und 0,1 M NaCl (Merck) durchgeführt. Für die Herstellung der NaCl-Lösungen wurde demineralisiertes Wasser (Milli-Q Plus, Millipore) verwendet. Alle in diesem Kapitel genannten Lösungen wurden an der Wasserstrahlpumpe über einen $45 \mu\text{m}$ Filter filtriert.

Zur Molekulargewichtskalibrierung wurden Polymere aus Polystyrol (POSTNOVA Analytik), Polyethylenglycol (Fluka) und Polystyrolsulfonat (POSTNOVA Analytik) benutzt. In THF wurden je 3 mg / ml Polystyrol der Größen $M_p = 376, 1100, 2280, 4920, 19000$ und 54000 Da eingewogen. Die Retentionszeiten wurden mit dem RI-Detektor bestimmt.

Die Standardreihe wurde sechsmal gemessen. Aus den Mittelwerten wurden die Diffusionskoeffizienten und die Radien der Standards errechnet.

Für die Methanol-Messungen wurden je 15 mg / ml Polyethylenglykol (M_p : 420, 600, 970, 2010, 4450, 6240, 8500, 12 000, 23 000 Da) gelöst und ebenfalls mit dem RI-Detektor vermessen. Wegen der großen Probenanzahl (methylierte und unmethylierte Huminstoffe) und der dadurch entstehenden langen Messzeit pro Probenreihe wurde die Reproduzierbarkeit der Kalibrierstandards an zwei Standards (420 und 4450 Da) getestet. Da die Standardabweichungen unter ein Prozent lagen, wurde auf eine mehrmalige Messung der gesamten Kalibrierreihe verzichtet. Es wurden nach jeweils drei Proben die beiden genannten Standards gemessen. Dadurch entstanden zehn Messwerte pro Standard.

Die wässrigen Lösungen wurden mit dem UV-Detektor detektiert. Hierzu wurden je 1,5 mg / ml Polystyrolsulfonat (M_p : 208, 1100, 2290, 4480, 5280, 6430, 13 500, 15 800 und 29 500 Da) eingewogen. Die Standardreihe wurde dreimal in 0,1 M NaCl und zweimal in 0,01 M NaCl gemessen.

3.4.3 PROBENVORBEREITUNG UND TRENNBEDINGUNGEN

In THF wurden nur die methylierten Huminstoffe (HS) gemessen. Hierzu wurde jeweils etwas methylierter HS in $CDCl_3$ (von den NMR-Messungen) in ein leeres Vial gefüllt. Das $CDCl_3$ wurde mit einem leichten Stickstoffstrom verdampft und der Rückstand mit 1,5 ml THF aufgenommen. Die methylierten HS haben sich alle vollständig gelöst. Die durchschnittliche Huminstoffkonzentration in THF war 3 mg/ml. Die Probenlösungen wurden mit dem RI-Detektor vermessen.

Nach dem selben Prinzip wurden auch die methylierten Huminstoffe in Methanol vorbereitet. Von den unmethylierten Fulvin- und Huminsäuren wurden jeweils 4 mg / ml eingewogen, von den IHSS-Standards jeweils 8 mg / ml. Die Fulvinsäuren haben sich in Methanol bei Raumtemperatur vollständig gelöst. Die Huminsäuren und MPDOM gingen nach kurzem Erwärmen auf 50 °C fast vollständig in Lösung, während sich die IHSS-Standards auch nach Erwärmung nur zu ca. 50 % gelöst haben. Die Signale wurden mit dem RI-Detektor detektiert.

Im wässrigen Milieu wurden die Huminstoffe in 0,01 M und 0,1 M NaCl mit dem UV-Detektor vermessen. 2 mg gefriergetrockneter Huminstoff wurde jeweils in 1 ml 0,01 M bzw. 0,1 M NaCl gelöst. Hierbei gingen die Fulvinsäuren bei Raumtemperatur vollständig in Lösung. Nach Erwärmung auf 50 °C gingen auch die Huminsäuren in Lösung. Die IHSS-Standards ließen sich nur teilweise lösen. Der IHSS-Leonardite-Standard blieb fast ungelöst

und konnte somit auch nicht vermessen werden. Die Trennbedingungen für die verschiedenen Lösemittel sind in Tabelle 3-9 zusammengefasst.

Tabelle 3-9: Trennbedingungen für die AFFF-Messungen

Parameter	THF	Methanol	0,1 M NaCl / 0,01 M NaCl
Eluent	THF	Methanol	0,1 M NaCl / 0,01 M NaCl
pH-Wert	—	—	6,0 / 7,4
Membran	10 kDa, POSTNOVA	1 kDa, POSTNOVA	1 kDa, POSTNOVA, NF200B, DOW
Injektionsvolumen	100 µl	100 µl	100 µl
Injektionsfluss	0,1 ml / min	0,1 ml / min	0,1 ml / min
Laminarfluss bei Injektion	1,5 ml / min	1,5 ml / min	1,5 ml / min
Injektionszeit	70 sec.	70 sec.	70 sec.
Fokussierzeit	ohne Fokussierung	80 sec.	60 sec.
Laminarfluss bei Fokussierung	—	1 ml / min	1 ml / min
Laminarfluss am Kanalausgang	0,1 ml / min	0,1 ml / min	0,2 ml / min
Querfluss	80 % (0 - 500s) 78 % (501 - 670s) 74 % (671 - 770s) 70 % (771 - 850s) 67 % (851 - 910s) 65 % (911 - 960s) 62 % (961 - 1015s) 56 % (1016 - 1050s) 52 % (1051 - 1120s) 45 % (1121 - 1140s) 38 % (1141 - 1170s) 30 % (1171 - 1200s) 20 % (1201 - 1230s)	80 % (0 - 500s) 78 % (501 - 670s) 74 % (671 - 770s) 70 % (771 - 850s) 67 % (851 - 910s) 65 % (911 - 960s) 62 % (961 - 1015s) 56 % (1016 - 1050s) 52 % (1051 - 1120s) 45 % (1121 - 1140s) 38 % (1141 - 1170s) 30 % (1171 - 1200s) 20 % (1201 - 1230s) 12 % (1231 - 1400s)	80 % (0 - 500s) 78 % (501 - 670s) 74 % (671 - 770s) 70 % (771 - 850s) 67 % (851 - 910s) 65 % (911 - 960s) 62 % (961 - 1015s) 58 % (1016 - 1050s) 55 % (1051 - 1120s) 51 % (1121 - 1200s) 38 % (1201 - 1260s) 30 % (1261 - 1340s) 20 % (1341 - 1420s) 12 % (1421 - 1480s)

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 ERGEBNISSE UND DISKUSSION DER NMR-SPEKTROSKOPIE

Zur Auswertung der Huminstoff-NMR-Spektren werden diese in Strukturbereiche unterteilt. Darauf folgt die qualitative und quantitative Untersuchung dieser Strukturbereiche. Die quantitative Auswertung, die Integration, liefert die prozentuale Zusammensetzung von einzelnen Partialstrukturen. In der qualitativen Auswertung kann man so stark ins Detail gehen, dass bei 2D-NMR-Spektren von methylierten HS einzelne Kreuzsignale charakterisiert werden können. Aufgrund der Komplexität der Zusammensetzung von Huminstoffen ist zur Bestimmung von Partialstrukturen eine gemeinsame Analyse der im allgemeinen Teil vorgestellten NMR-Experimente nötig. Die folgende Abbildung zeigt die Kopplungen, welche von den verschiedenen 2D-NMR-Experimenten erfasst werden. Die Identifizierung von einzelnen Strukturelementen und ihre Verknüpfung mit anderen Partialstrukturen im HS durch 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie soll in den folgenden Abschnitten unterstützt werden durch Modellrechnungen, Vergleich der Spektren der ^{12}C - mit den ^{13}C -methylierten HS und quantitative Auswertungen der 1D- und der 2D-NMR-Spektren.

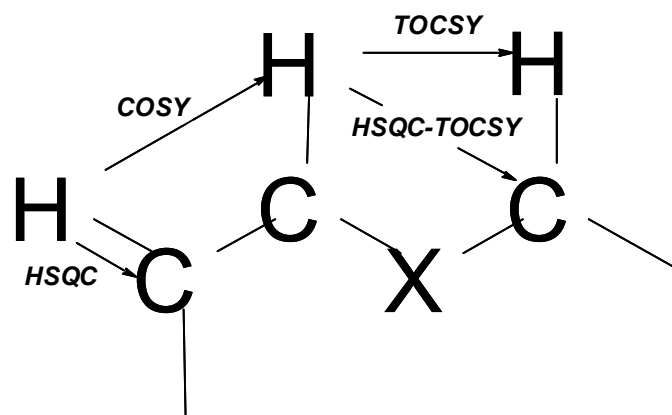


Abbildung 4-1: Erstellung von Partialstrukturen aus der gemeinsamen Auswertung mehrerer NMR-Spektren (X=Heteroatom)

4.1.1 NMR-VERSCHIEBUNGSBEREICHE DER HS-PARTIALSTRUKTUREN

Die NMR-Verschiebungsbereiche der einzelnen Experimente sollen hier nur kurz vorgestellt werden. Die ausführliche Diskussion erfolgt in den Unterkapiteln.

Die in den Tabellen dargestellten Verschiebungsbereiche und Strukturzuordnungen basieren auf Literaturdaten (3), (56), (142) sowie auf Modellrechnungen und sind teilweise an die Intensitätsverhältnisse in methylierten Huminstoffen angepasst.

*Eindimensionale NMR-Spektren**¹H-NMR-Spektren*

Der aliphatische Bereich (0 – 3,2 ppm) lässt sich bei den Spektren der methylierten HS in zwei Unterbereiche aufteilen. Im Bereich von 0 bis 1,7 ppm findet man Protonen von Methyl- und Methingruppen in aliphatischen Ketten. Von 1,7 – 3,2 ppm befinden sich aliphatische Protonen neben Carbonyl-Gruppen und Aminen. In beiden Bereichen überlagern die Signale, so dass sich die Methylgruppen nicht eindeutig von den restlichen aliphatischen Signalen abgrenzen lassen. Die O-Alkyl-Wasserstoffe, Ether und Lactone erstrecken sich über einen breiten Bereich von 3,2 bis 6,0 ppm und überlagern mit aliphatischen Signalen. Zwischen 6,0 und 9,0 ppm bzw. 9,0 bis 11,0 ppm erscheinen die Verschiebungen von Aromaten und Olefinen bzw. Aldehyden. Diese Verschiebungsbereiche sind klar abgegrenzt.

Tabelle 4-1: Chemische Verschiebung und Strukturvorschläge in ¹H-NMR-Spektren methylierter Huminstoffe

Chemische Verschiebung (ppm)	Strukturelemente
0 – 1,7	H ₃ C-C ; C-CH ₂ -C
1,7 – 3,2	H ₃ C-C(X)- ; C-CH ₂ -C(X)-, X = O, N
3,2 – 6,0	O-Alkyl-Wasserstoff, Methoxyl-Wasserstoff, Lactone
6,0 – 9,0	Aromaten, Olefine
9,0 – 11,0	Aldehyde

¹³C-NMR-Spektren

In den Überlappungsregionen zwischen aliphatischen und O-Alkyl-Strukturen (45 – 60 ppm) und zwischen O-Alkyl-Strukturen und Aromaten (90 – 110 ppm) findet man in der Literatur häufig unterschiedliche Integrationsgrenzen. Für HS liegt zwischen 50 und 60 ppm ein eigenständiger Überlappungsbereich vor. In vielen HS wird ein deutlicher Anteil an Signalen verzweigter aliphatischer Strukturen festgestellt (0 – 50 ppm). Signale von N- / O-substituierten sp³-hybridisierten C-Atomen treten im Überlappungsbereich auf. In allen hier untersuchten HS ist auch ein Methoxysignal bei 55 / 56 ppm nachweisbar. Eine einheitliche Zuordnung zu Aliphaten oder O-Alkyl-Strukturen ist somit nicht sinnvoll. Der Verschiebungsbereich der O-Alkyl-C-Atome kann nicht als reiner Kohlenhydratbereich bezeichnet werden, da hier mit einem deutlichen Anteil an Signalen von beispielsweise Propan-Seitenketten der Lignin-Strukturen zu rechnen ist. Die Auftrennung der chemischen Verschiebungsbereiche bei 145, 165 und 185 ppm ergibt sich aus den Verschiebungen von Ligninen und Tanninen.

Tabelle 4-2: Chemische Verschiebung und Strukturvorschläge in ^{13}C -NMR-Spektren methylierter Huminstoffe

Chemische Verschiebung (ppm)	Strukturelemente
-30 – 0	C- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-I}$
0 – 48	Aliphaten sp^3 -Kohlenstoff in verzweigten und unverzweigten Ketten / Ringen Methylgruppen primäre aliphatische Amine
48 – 60	Überlappungsregion Aliphaten + O-Alkyl-Kohlenstoff Methoxylgruppen quartärer aliphatischer Kohlenstoff α -C von Aminosäuren sekundäre aliphatische Amine aliphatische Ether
60 – 105	O-Alkyl-Kohlenstoff sp^3 -Kohlenstoff mit ein- oder zweifacher O- / N-Substitution (Kohlenhydrate etc.)
105 - 165	Aromaten (ungesättigter) sp^2 -Kohlenstoff in Ringen (Aromaten) oder Ketten (Olefine)
105 – 145	un- / C-substituierter aromatischer / olefinischer Kohlenstoff mehrfach O- / N-substituierter sp^3 -Kohlenstoff (z.B. anomeres C)
145 - 165	O- / N-substituierter aromatischer / olefinischer Kohlenstoff
165 – 185	Carboxylfunktionen Carboxylgruppen, Ester, Amide
185 - 220	Carbonylfunktionen aliphatische Ketone, Phenone, Chinone, Aldehyde

Zweidimensionale NMR-Spektren

Aufgrund der zweiten Dimension und der somit erzielten besseren Auftrennung der in 1D-NMR-Spektren überlagerten Signale lassen sich die für die 1D-Spektren definierten chemischen Verschiebungsbereiche in detailliertere Strukturbereiche weiter unterteilen. Da durch die Methylierung eine viel bessere Auflösung der Spektren erzielt wurde, können in einigen Fällen sogar einzelne Partialstrukturen direkt den entsprechenden Kreuzsignalen zugeordnet werden.

COSY- und TOCSY-NMR-Spektren

Die Strukturbereiche der COSY- und TOCSY-NMR-Spektren sind ähnlich. Durch „long-range“-Korrelationen in TOCSY-NMR-Spektren ist in den in dieser Arbeit aufgenommenen Spektren nur ein Bereich mit zusätzlichen Signalen, welche vor allem besser aufgelöst sind, zu erkennen. Dieser liegt bei δ (^1H) F1: 0,8 – 1,4 ppm und δ (^1H) F2: 3,4 – 4 ppm. Es handelt sich hierbei um Kopplungen zwischen methylierten Kohlenhydratprotonen.

Nun sollen die Strukturbereiche für die COSY-NMR-Spektren detailliert beschrieben werden.

Der Bereich A enthält intra-aliphatische Korrelationen mit den Unterbereichen A1 (Kopplungen zu terminalen Methylresonanzen) und A2 (Kopplungen zwischen aliphatischen Ketten). Der Bereich B verknüpft aliphatische und Heteroatom-Strukturelemente und kann in die Unterbereiche B1-B3 aufgeteilt werden. B1 und B2 stellen Kopplungen in methylierten Kohlenhydraten dar. In B2 treten zusätzlich alkylierte Ether auf. Der Hochfeldbereich B3 zeigt Korrelationen von Alkylgruppen zu Stickstoff-, Carbonyl- und aromatischen Funktionen. Innerhalb des Bereiches C kann die Untergruppe der Kohlenhydrat-Kreuzsignale C1 weiter in C1A und C1B unterteilt werden. Der Hochfeldbereich C3 enthält Kopplungen zwischen Etherprotonen und an (mehrfach) funktionalisierte C-Atome gebundene Protonen. Der Bereich C3 koppelt C1 mit C2 ebenso wie der Bereich B2 jene von C mit A2. Im Bereich D treten chemische Umgebungen des Typs $-\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{OH})-\text{CH}(\text{OH})-$ auf, wie sie z. B. für anomere Positionen in Kohlenhydraten erwartet werden.

Der Bereich E stellt Strukturelemente des Typs $\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{OH})-\text{CH}(\text{OR})-$ wie z. B. anomere Protonen in C2-alkylierten Kohlenhydraten dar, die charakteristische Zellwandbestandteile von Bakterien sind. Die Kreuzsignale der Bereiche G und F liegen im Bereich von Alkenen, die mit Aliphaten (Bereich F) bzw. heteroatomsubstituiertem CH (Bereich G) koppeln. Die Kreuzsignale im Bereich H liegen für reine aromatische Korrelationen sehr weit hochfeldverschoben, selbst wenn man mehrfach oxygenierte Aromaten heranzieht.

Bedeutende Hinweise auf die chemische Umgebung aller Kreuzsignale liefert die aus HSQC-Spektren erhältliche ^{13}C -Verschiebung der Protonen.

Tabelle 4-3: Verschiebungsbereiche in COSY-Spektren methylierter Huminstoffe mit Strukturvorschlägen

Index	Strukturelement	$\delta (^1\text{H})$ F2	$\delta (^1\text{H})$ F1
A	C-C(H) _{1/2} -C(H) _{1/2} -C	1,9.....0,6	1,9.....0,6
A1		1,9.....0,6	1,0.....0,6
A2		1,7.....1,0	1,7.....1,0
B	O/X-C(H) _{1/2} -C(H) _{1/2} -C	4,3.....2,2	1,7.....1,0
B1		4,3.....3,4	1,7.....1,0
B2		3,4.....2,6	1,7.....1,0
B3		2,6.....2,2	1,7.....1,0
C	O-C(H) _{1/2} -C(H) _{1/2} -O	4,5.....2,7	4,5.....2,7
C1		4,3.....3,1	4,3.....3,1
C1A		4,2.....3,5	4,2.....3,5
C1B		3,8.....3,1	3,8.....3,1
C2		3,2.....2,6	3,2.....2,6
C3		4,1.....3,6	3,1.....2,7
D	-O-CH(OH)-CH(OH)-	5,0.....3,8	5,0.....3,8
E	O-CH(OH)-CH(OR)-	4,6.....4,0	2,0.....1,6
F	C(H) _{1/2} -C(H) _{1/2} -CH=CH	5,9.....5,5	2,1.....1,8
G	O-C(H) _{1/2} -CH=CH-	6,1.....5,7	4,4.....4,0
H	C _{ar} (O) _x H-	7,0.....6,6	6,2.....5,8

X = Heteroatom

HSQC-NMR-Spektren

Das rein aliphatische Strukturelement A enthält die zwei Untergruppen A1 und A2. Hochfeldverschiebende ^{13}C -Inkrementen (A1) werden beispielsweise durch Carbonylverbindungen (Ketone, Amide, Carboxyl) oder Heteroatome in γ -Position oder γ -Alkylgruppen verursacht, während Kettenverzweigungen in α - und β -Position deutliche Tieffeldverschiebungen (A2) bewirken. Die Summe der α -, β - und γ -Substituenten definiert die Resonanzposition. So repräsentieren die extrem hochfeldverschobenen Resonanzen ($\delta (^{13}\text{C}) < 10$ ppm) mehrfach γ -substituierte, aber nicht an α - und β -Position substituierte Alkane (A1). Andererseits werden ^{13}C -Verschiebungswerte über 35 ppm nur durch mehrfache Kettenverzweigung an α - und β -Positionen erreicht (A2).

Die Bereiche B und C zeigen funktionalisierte Alkane unterschiedlicher sterischer und elektronischer Substitution. Zunehmende Elektronegativität von α -Substituenten bewirkt Entschirmungen in $\delta (^1\text{H})$ und $\delta (^{13}\text{C})$. Kettenverzweigungen in α - und β -Position bewirken Tieffeldverschiebungen in F1 (^{13}C) mit geringem, gleichgerichteten Einfluss auf F2 (^1H). Die chemische Shift-Anisotropie von Carbonylverbindungen und Aromaten liefert entschirmende

Beiträge zu $\delta(^1\text{H})$ und induziert für $\text{H}\alpha$ an Ketonen und Aromaten eine Protonen-Mindestverschiebung von 2,1 ppm. Die Kombination von Elektronegativität und Kettenverzweigung bestimmt die Resonanzposition innerhalb der Bereiche B und C.

Die Differenzierung der Methoxy-Kreuzsignale aliphatischer und aromatischer Methylether und Methylester wird durch Unterteilung des Bereichs D möglich. Die entsprechenden Kreuzsignale erscheinen in den vier separaten Bereichen D1-D4 und können daher getrennt quantifiziert werden.

Die Kreuzsignale aliphatischer (D3) und aromatischer Methylester (D4) überlappen geringfügig. Besonders letztere zeigen bei höchster F1 (^{13}C)-Auflösung eine Vielzahl unterschiedlicher chemischer Umgebungen. Aliphatische Methylether (D3) liefern ein intensitätsstarkes Kreuzsignal mit relativ niedriger Signaldispersion in F1 und F2.

Tabelle 4-4: relevante Strukturelemente und deren Verschiebungsbereiche in (H,C)-HSQC-NMR-Spektren

Index	Strukturelement	$\delta(^1\text{H})$ F2	$\delta(^{13}\text{C})$ F1
A1	C-C(H) _{1/2} -CH ₃	1,1.....0,7	30..... 8
A2	-C-C(H) _{1/2} -CH-C / -C-CH(¹³ CH ₃)-CH-	1,6.....1,1	35..... 5
B	-(X)C α H-CH-C-	3,0.....1,3	55..... 13
C	O-C α (H) _{1/2} -C β (H) _{1/2} -C-	3,5.....2,0	50..... 5
C1	-S-C(H) _{1/2} - (Vorschlag)	4,3.....1,2	45..... 10
D	terminales OCH ₃	4,3.....3,0	60..... 50
D1	C _{ar} -C(O)OCH ₃	4,3.....3,85	54..... 50
D2	C _{al} -C(O)OCH ₃	3,85...3,0	54..... 50
D3	C _{al} -OCH ₃	3,6.....3,0	60..... 56
D4	C _{ar} -OCH ₃	4,3.....3,6	58..... 54
E	O-CH-CH-O	4,3.....2,7	90..... 60
F	anomere CH	5,1.....4,6	100.... 88
G	Alkene	6,2.....5,5	122.....116
H	Aromaten	8,0.....6,5	135.....120

X = Heteroatom

Das HSQC-TOCSY-Experiment

Gegenüber HMBC zeigen HSQC-TOCSY-NMR-Spektren eine deutlich verbesserte Empfindlichkeit von Kreuzsignalen aus Weitbereichskorrelationen. In den nicht phasensensitiven HMBC-Spektren stören insbesondere nicht vollständig unterdrückte (durch ^{13}C -Kopplung zusätzlich aufgespaltene) $^1\text{J}(\text{CH})$ -Kreuzsignale. Die Kreuzsignale, die in HSQC-TOCSY-NMR-Spektren und nicht im HSQC-NMR-Spektrum erscheinen, enthalten die entscheidenden „long-range“-Informationen.

Mit dem Strukturelement-Vorschlag in Tabelle 4-5 ist das Strukturelement gemeint, welches in einer oder mehreren J(HH)-Kopplungsentfernungen zum betrachteten Strukturelement aus

dem HSQC-Spektrum (A2, B, C, D, E und G) steht. Die hinzugekommenen Signale lassen sich grob in die folgenden Strukturtypen unterteilen.

Bei den Atomen, deren Resonanzen im Bereich A' liegen, handelt es sich um -CH₂-O-Gruppen in α -Stellung zu Resonanzen im Bereich A2. A'' ist ebenfalls eine CH₂-Gruppe, allerdings substituiert mit beispielsweise Aromaten, Alkenen oder Ketonen.

Bei den Signalen in den Bereichen B', B'' und B''' handelt es sich um O- bzw. S-Alkylgruppen, welche an Atome mit Signalen in den Bereichen B und C gebunden sind.

Bei den Signalen in den Bereichen B'''' ebenso wie D'' und E'' handelt es sich um CH₃-Gruppen, welche an die jeweils zu betrachtenden CH-Gruppen in α - und/oder β -Stellung substituiert sind. D' und E' sind -CH₂-O-Gruppen in Nachbarschaft zu Signalen der Bereiche D und E.

Tabelle 4-5: Verschiebungsbereiche in HSQC-TOCSY-Spektren methylierter Huminstoffe mit Strukturvorschlägen

Index	Strukturelement	δ (¹ H) F2	δ (¹³ C) F1	Korrelation mit
A'	-CH ₂ -O-	4,5.....3,4	20..... 6	A2, C
A''	CH ₂ -Aryl/Alkyl/Keton	3,4.....2,5	25..... 6	A2, B, C
B'	O-CH ₂ -CR ₃ / (R ₃ C) ₂ -CH-O	4,2.....4,0	43..... 41	B, C
B''	O-C(H) _{1/2} -C(H) _{1/2} -O	4,5.....3,5	50..... 35	B, C
B'''	-S-C(H) _{1/2} - (Vorschlag)	3,4.....3,2	52..... 32	B, C
B''''	CH ₃ -	2,0.....0,7	52..... 30	B, C
D'	O/X-C(H) _{1/2} -C(H) _{1/2} -C	3,1.....2,6	60..... 52	D
D''	CH ₃ -	1,4.....1,1	60..... 50	D
E'	O/X-C(H) _{1/2} -C(H) _{1/2} -C	3,1.....2,5	75..... 60	E
E''	CH ₃ -	1,3.....1,0	76..... 60	E
G'	H ₃ C-C	2,0.....1,6	120.....112	G

X = Heteroatom

4.1.2 INTEGRATIONS DATEN DER FUNKTIONELLEN GRUPPEN UND DER GERÜSTSTRUKTUR VON METHYLIERTEN HUMINSTOFFEN IN DEN VERSCHIEDENEN NMR-EXPERIMENTEN

Die Integration von Huminstoff-NMR-Spektren wird speziell in der eindimensionalen NMR-Spektroskopie zur Quantifizierung von Strukturbereichen herangezogen (2), (71), (72), (75). Die Integrale wurden mit den Programmen „AMIX-AURELIA 3.0“ (1D-NMR-Spektren) und „XWINNMR 3.0“ (2D-NMR-Spektren) der Firma Bruker, Rheinstetten, berechnet. Durch die Integration erhält man einen Überblick über die prozentuale Zusammensetzung der Huminstoffe. Einzelne definierte Partialstrukturen sind aus den 1D-Integrationsdaten aufgrund von Überlappungen nicht direkt ersichtlich. Diese können teilweise durch

Integration der 2D-Spektren, aber hauptsächlich nur durch direkte Auswertung der Signale identifiziert werden. Durch die Methylierung erhält man sowohl eine deutlich verbesserte Auflösung als auch eine wesentlich erhöhte Anzahl an Resonanzen und Kreuzsignalen bei gleichzeitiger Veränderung der mittleren Signalpositionen. Durch zusätzliche Auftrennung in zwei Dimensionen und die gemeinsame Auswertung verschiedener 2D-Experimente können einzelne Strukturen definiert werden. Die chemischen Verschiebungsbereiche der „long-range“-Experimente TOCSY und HSQC-TOCSY wurden nicht integriert. Eine Integration erscheint hier wenig sinnvoll, da „long-range“-Kopplungen weniger intensiv als ^1J -Kopplungen sind und somit prozentuale Aussagen nicht direkt zugeordnet bzw. verglichen werden können.

4.1.2.1 Eindimensionale ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren

Die folgenden beiden Abbildungen zeigen Protonen- und ^{13}C -NMR-Spektren eines ^{12}C - und ^{13}C -methylierten Huminstoffes. Auf die Bedeutung der Methylierung mit ^{13}C -markierten Reagenzien wird später genauer eingegangen. Es sind deutlich voneinander abgegrenzte Signalbereiche zu erkennen. Die Integrationsbereiche und Strukturzuordnungen stimmen mit den in 4.1.1 vorgestellten chemischen Verschiebungsbereichen überein.

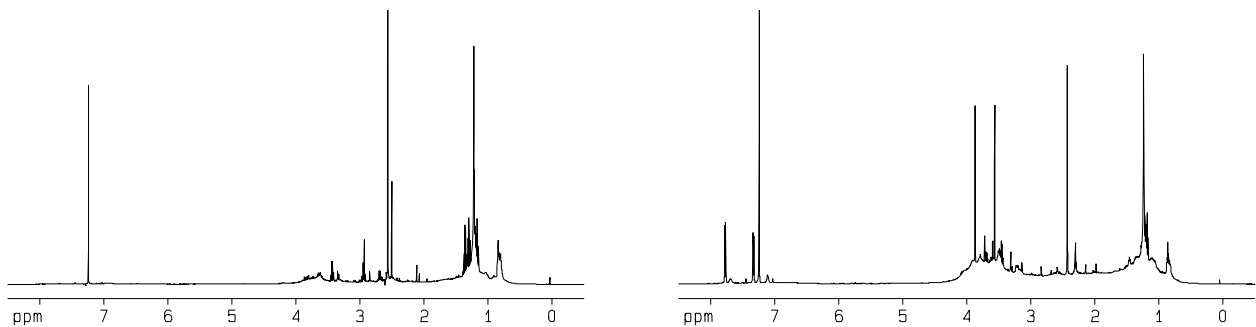


Abbildung 4-2: ^1H -NMR-Spektren eines ^{12}C (links) und ^{13}C (rechts) methylierten Huminstoffes (SVIFA nach ^{12}C - bzw. ^{13}C -h+d-Methylierung)

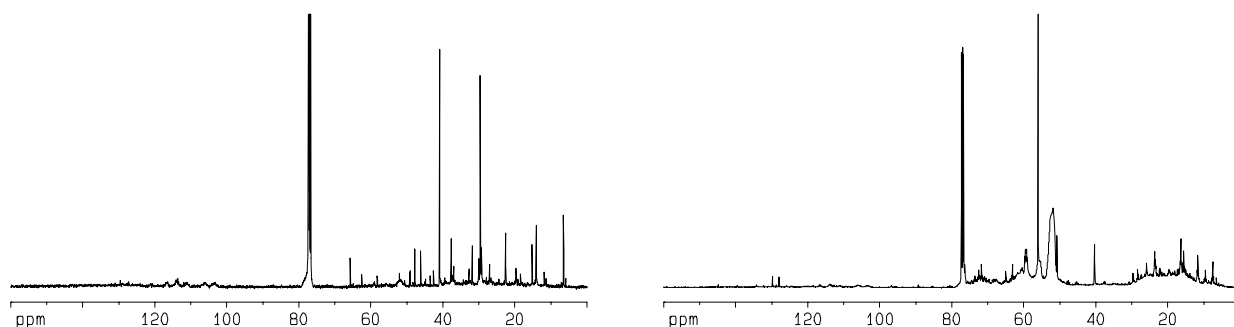


Abbildung 4-3: ^{13}C -NMR-Spektren eines ^{12}C (links) und ^{13}C (rechts) methylierten Huminstoffes (SV1FA nach ^{12}C - bzw. ^{13}C -h+d-Methylierung)

Tabellen zur prozentualen Intensitätsverteilung der Strukturbereiche in den einzelnen Humin- und Fulvinsäuren befinden sich in Anhang A. Die folgenden Abbildungen zeigen Balkendiagramme dieser Verteilungen. Die Bezeichnung h+d bzw. d+h steht für die jeweilige Methylierungsreihenfolge. Bei den mit * versehenen Substanzen handelt es sich um ^{13}C -methylierte Proben.

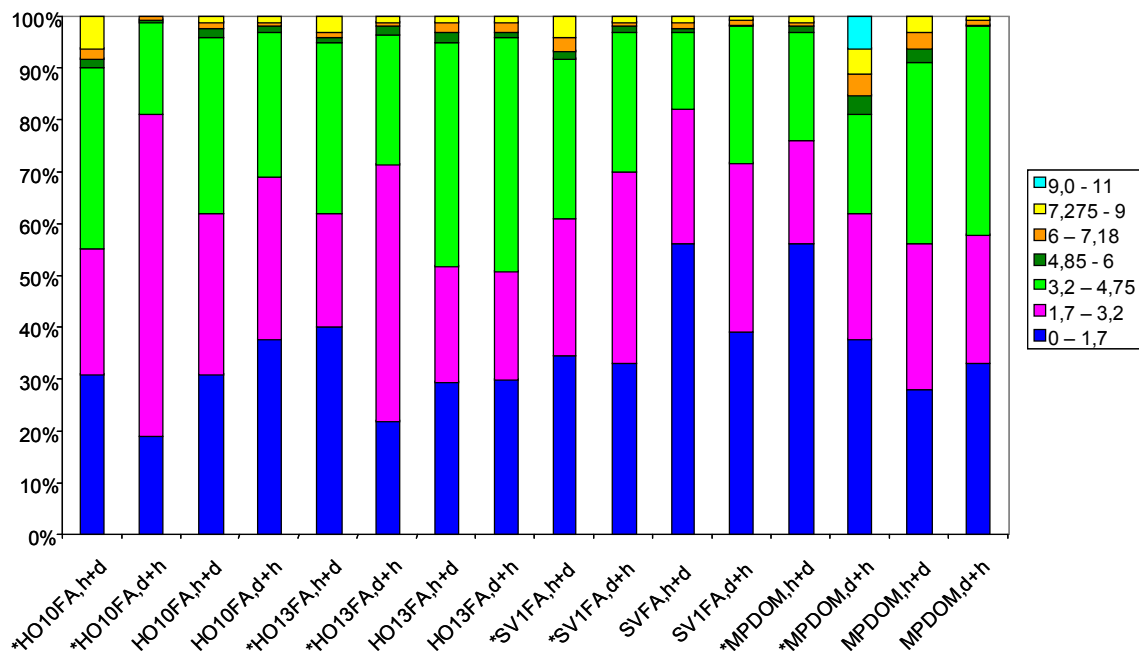


Abbildung 4-4: Balkendiagramm der Integrationsdaten der ^1H -Spektren von methylierten Fulvinsäuren

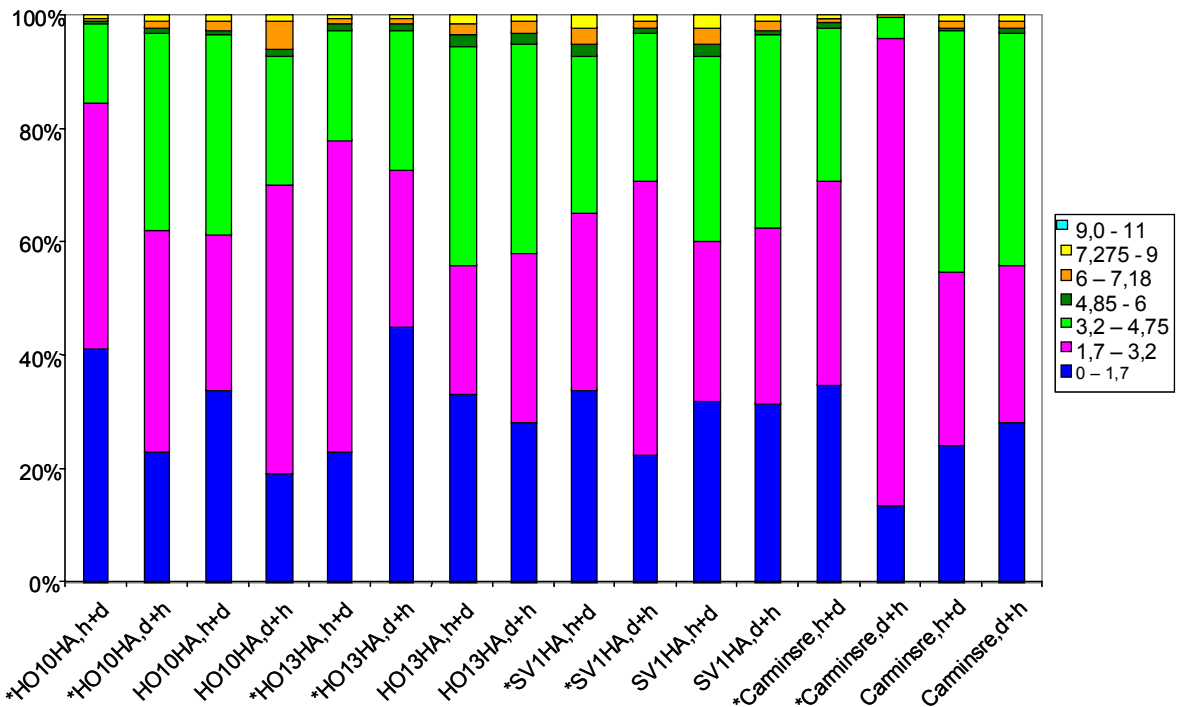


Abbildung 4-5: Balkendiagramm der Integrationsdaten der ^1H -Spektren von methylierten Huminsäuren und von Carminsäure

Aus den ^1H -Spektren geht hervor, dass die methylierten Huminstoffe zu 50-80 % aus aliphatischen Anteilen (dunkelblaue und pinke Balken) bestehen, wobei die Summe des aliphatischen Anteils bei den Huminsäuren durchschnittlich etwas höher ist als bei Fulvinsäuren. Der Anteil an O-Alkyl-Wasserstoffen entspricht größenordnungsmäßig etwa der Hälfte des gesamtaliphatischen Bereichs. Bei der Erstellung der Integrationsdaten wurde dieser Bereich unter Auslassung der Verschiebung von deuteriertem Methanol (δ (CD_3OD): 4,8 ppm) in zwei Bereiche (hellgrün und dunkelgrün) unterteilt, um eine Verfälschung der Daten durch unterschiedliche Lösemittelkonzentrationen zu umgehen. Der aromatische und olefinische Bereich wurde ebenfalls unter Auslassung des Lösemittelsignals Chloroform (δ (CDCl_3): 7,24 ppm) in zwei Bereiche unterteilt (orange und gelb). Aromatische und olefinische Protonen kommen bei allen HS nur in geringen Mengen von durchschnittlich zwei bis vier Prozent vor, Aldehyde sind bis auf *MPDOM,d+h (6 %) nicht Bestandteile der untersuchten methylierten Huminstoffe. Eventuell im Ausgangsmaterial vorhandene Aldehyde könnten durch Insertionsreaktionen von Methylen zwischen die aldehydische CH-Bindung (während der Methylierung) in Ketone umgewandelt worden sein.

Systematische Unterschiede zwischen den Fulvin- und den Huminsäuren sind bis auf den aliphatischen Bereich nicht ersichtlich. Auch systematische Unterschiede bedingt durch die Methylierungsreihenfolge sind aus den Integrationsdaten nicht zu erkennen. Die einzelnen

Strukturbereiche werden bei der gemeinsamen Auswertung von verschiedenen NMR-Experimenten noch ausführlich diskutiert.

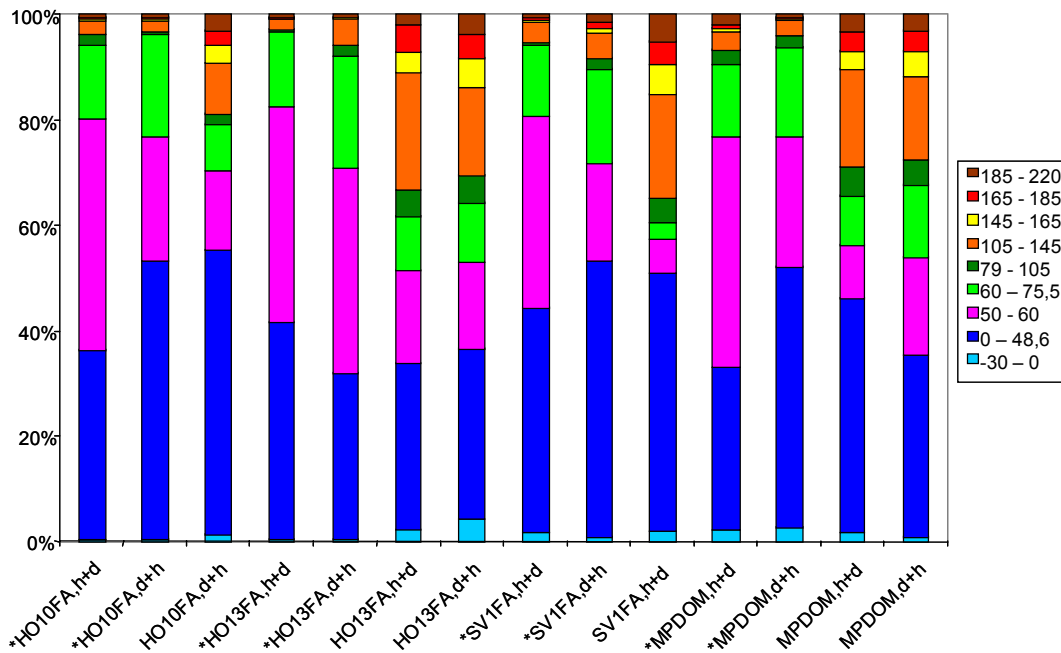


Abbildung 4-6: Balkendiagramm der Integrationsdaten der ^{13}C -Spektren von methylierten Fulvinsäuren

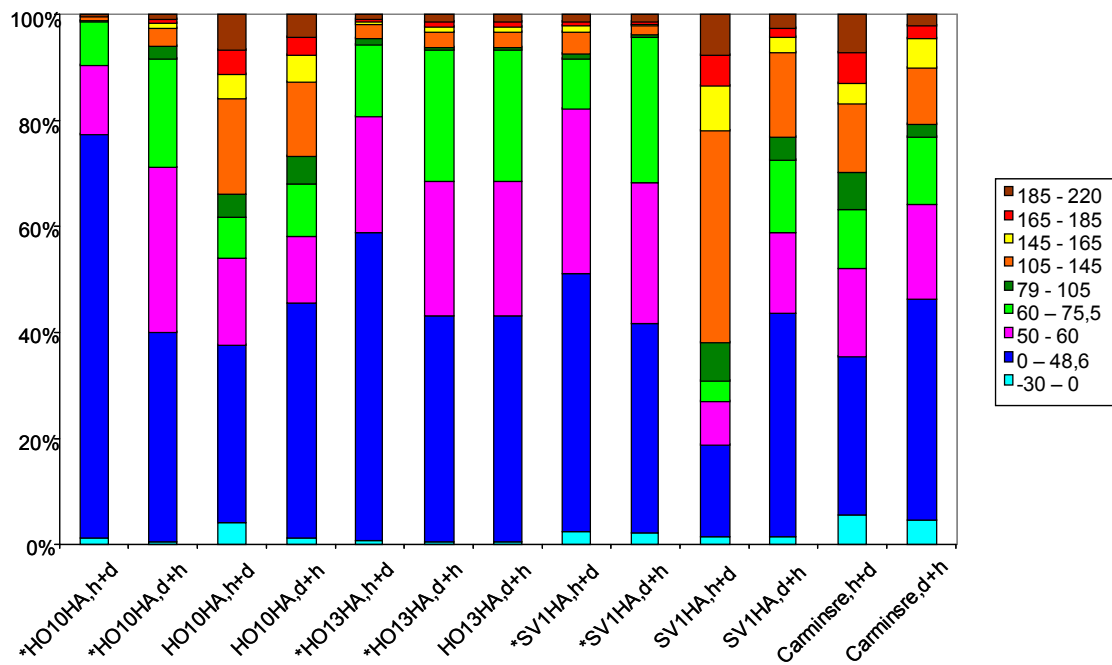


Abbildung 4-7: Balkendiagramm der Integrationsdaten der ^{13}C -Spektren von methylierten Huminsäuren und von Carminsäure

Signale im Bereich von an Iodid gebundenem Kohlenstoff (siehe Tabelle 4-2) treten nur bei einigen Substanzen auf und dort auch nur in geringen Mengen (zwischen durchschnittlich 0,4 und 2 %, bei manchen bis zu 4 %). Den Hauptanteil bilden auch bei den ^{13}C -Spektren wie zu erwarten die Aliphaten mit einem Anteil von ca. 30 bis 50 % bei den Fulvinsäuren und 40 bis 60 % bei den Huminsäuren. HO10HA,h+d (76 %) und SV1HA,h+d (17 %) fallen etwas aus dem Rahmen. In der Überlappungsregion sind deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen HS zu erkennen. Generell unterscheiden sich die Fulvinsäuren (6 – 42 %) untereinander in dieser Region stärker als die Huminsäuren (8 – 31%). Der O-Alkylbereich ist wegen der Auslassung des Chloroform-Signals (δ (CDCl_3): 77 ppm) in zwei Teile unterteilt (dunkelgrün und hellgrün). Die einzelnen Fulvin- und Huminsäuren unterscheiden sich in diesem Bereich deutlich. Die Spanne liegt für die Fulvinsäuren zwischen 8 und 23 % und für die Huminsäuren zwischen 8 und 28 %. Noch uneinheitlicher verhalten sich die verschiedenen HS im Bereich von 105 - 145 ppm. Es ergeben sich Standardabweichungen von 80 % (Fulvinsäuren) und 100 % (Huminsäuren), die Mittelwerte liegen bei 9 % (Fulvinsäuren) bzw. 10 % (Huminsäuren). O-/N-substituierter aromatischer bzw. olefinischer Kohlenstoff kommt bei allen HS in ungefähr gleichem prozentalem Anteil wie Carboxylfunktionen und Carbonylfunktionen vor, deren Methylierungsprodukte in andere chemische Verschiebungsbereiche gerückt sind. Diese Anteile schwanken je nach HS jeweils zwischen 0 und 5 bzw 8 % (SV1HA,h+d). In allen Verschiebungsbereichen sind keine systematischen Unterschiede bedingt durch die Methylierungsreihenfolge zu erkennen.

4.1.2.2 Zweidimensionale NMR-Spektren

Die Ergebnisse der Integration der 2D-Spektren müssen sehr kritisch betrachtet werden und sind für die Auswertung und Interpretation der Spektren nur als Tendenzen anzusehen. Eine Verfälschung der realen Intensitäten bei 2D-Spektren entsteht durch t_1 -Rauschen, Artefakte, Schräglage der Basisebene und geringes S/N-Verhältnis in Bereichen geringer Intensität. In den folgenden Tabellen werden die Integrationsbereiche mit den zugehörigen Strukturelementen für die verschiedenen 2D-NMR-Experimente vorgestellt. Diese stimmen teilweise nicht mit den chemischen Verschiebungsbereichen, welche in Kapitel 4.1.1 vorgestellt wurden, überein, da es bei diesen zu Überschneidungen in einigen Verschiebungsbereichen kommt. Die Ergebnisse zeigen aufgrund der oben genannten Schwierigkeiten nur Tendenzen auf und können von daher nicht zum Vergleich mit den 1D-Integrationsergebnissen oder anderen Methoden herangezogen werden. Zudem sind die Ergebnisse recht uneinheitlich. Deshalb sollen sie an dieser Stelle nicht im Detail ausgeführt werden. In Anhang A befinden sich Tabellen der 2D-NMR-Integrationsergebnisse.

Das COSY-Experiment

Tabelle 4-6: Integrationsbereiche in COSY-NMR-Spektren methylierter Huminstoffe mit Strukturvorschlägen

Index	Strukturelement	$\delta (^1\text{H})$ F2	$\delta (^1\text{H})$ F1
A1	C-C(H) _{1/2} -C(H) _{1/2} -C, Kopplungen zu terminalen Methylresonanzen	1,9.....0,6	1,0.....0,6
A2	Kopplungen zwischen aliphatischen Ketten	1,7.....1,0	1,7.....1,0
B1	O/X-C(H) _{1/2} -C(H) _{1/2} -C, Kopplungen in methylierten Kohlenhydraten	4,3.....3,4	1,7.....1,0
B2	Kopplungen in methylierten Kohlenhydraten, alkylierte Ether	3,4.....2,6	1,7.....0,9
B3	Korrelationen von Alkylgruppen zu Stickstoff-, Carbonyl- und aromatischen Funktionen	2,6.....2,2	1,7.....0,9
C1	O-C(H) _{1/2} -C(H) _{1/2} -O, Kohlenhydrat-Kreuzsignale	4,6.....3,0	4,6.....3,0
C2		3,2.....2,5	3,2.....2,5
C3	Kopplungen zwischen Etherprotonen und an (mehrfach) funktionalisierte C-Atome gebundene Protonen	4,5.....3,4	3,3.....2,6
D	-O-CH(OH)-CH(OH)-	5,0.....3,7	5,0.....3,7
E	O-CH(OH)-CH(OR)-	4,6.....3,8	2,0.....1,6
F	C(H) _{1/2} -C(H) _{1/2} -CH=CH	5,9.....5,5	2,1.....1,8
G	O-C(H) _{1/2} -CH=CH-	6,1.....5,7	4,4.....4,0
H	C _{ar} (O) _x H-	7,0.....6,6	6,2.....5,8

X = Heteroatom

Das HSQC-Experiment

Tabelle 4-7: Relevante Integrationselemente und deren Verschiebungsbereiche in (H,C)-HSQC-NMR-Spektren

Index	Strukturelement	$\delta (^1\text{H})$ F2	$\delta (^{13}\text{C})$ F1
A1	C-C(H) _{1/2} -CH ₃	1,1.....0,7	30.....2,5
A2	-C-C(H) _{1/2} -CH-C / -C-CH(¹³ CH ₃)-CH-	2,3.....1,1	35.....2,5
B / C	-(X)C _α H-CH-C-, O-C _α (H) _{1/2} -C _β (H) _{1/2} -C-	3,2.....2,2	50.....4,2
D	terminales OCH ₃	4,6.....2,8	60.....50
E	O-CH-CH-O	4,7.....2,7	90.....60
F	anomere CH	5,1.....4,6	100.....88
G	Alkene	6,2.....5,5	122.....113
H	Aromaten	8,0.....6,5	135.....120

X = Heteroatom

4.1.3 ERSTELLUNG VON MINIMUM- UND DIFFERENZSPEKTREN

Um die meist recht geringen Unterschiede zwischen NMR-Spektren verschiedener Huminstoffe deutlicher zu machen, wurden Differenz- und Minimum-Spektren angefertigt. Minimum-Spektren enthalten die gemeinsamen Signale zweier bzw. mehrerer zu vergleichender Spektren. Man zieht zur Veranschaulichung von Minimum-Spektren auch den Begriff des „lower envelops“ (140) heran. Zur Darstellung der Unterschiede zu den anderen Spektren, also von probenspezifischen Signalen, wird die Differenz aus dem Spektrum des interessierenden HS und des Minimum-Spektrums gebildet. In den folgenden Kapiteln werden Minimum- und Differenzspektren gebildet, um sowohl die Anteile an nativen und durch die Methylierung hinzugekommenen Methylgruppen als auch den Einfluss der Methylierungsreihenfolge auf die Ergebnisse zu untersuchen. Außerdem lassen sich durch Differenzspektren auch die verschiedenen HA und FA untereinander leichter vergleichen. Ebenfalls werden auch die Minimumspektren aller HA den Minimumspektren aller FA gegenübergestellt, um strukturelle Unterschiede zwischen FA und HA aufzuklären. Zur Erleichterung der Auswertung der HSQC-TOCSY-Spektren werden die HSQC-Spektren von diesen abgezogen. Die resultierenden Spektren sollten nur noch „long-range“-Informationen enthalten und sind durch den Wegfall der $^1J(C,H)$ -Kopplungen um ein Vielfaches übersichtlicher.

4.1.4 ANTEILE AN NATIVEN UND DURCH DIE METHYLIERUNG HINZUGEKOMMENEN METHYLGRUPPEN

4.1.4.1 Vergleich von Spektren derivatisierter und underivatisierter Huminstoffe

Am einfachsten lassen sich die durch die Methylierung hinzugekommenen Methylgruppen bestimmen, indem man deren Spektren mit Spektren des Ausgangsmaterials vergleicht. 2D-NMR-Spektren der untersuchten Substanzen liegen leider nicht vor. Ulrich Lankes (91), (92) und Stephan Haiber (72), (75) haben 1D- ^{13}C -NMR-Spektren verschiedener ROSIG-HS im Festkörper bzw. 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren in Lösung gemessen. Durch die Methylierung hinzugekommene CH_3 -Gruppen finden sich in den Protonenspektren hauptsächlich im Methoxy-Bereich zwischen $\delta(^1H)$ 3,2 und 4 ppm. In den ^{13}C -Spektren liegen die eingebrachten Methylgruppen in den Bereichen $\delta(^{13}C) = 5 - 30$ ppm und $\delta(^{13}C) = 50 - 65$ ppm. Die Integrationsdaten dieser eben genannten Strukturbereiche in den ^{12}C -methylierten Spektren werden nun mit den entsprechenden Bereichen in den underivatisierten Spektren verglichen. Die underivatisierten 1D-NMR-Spektren weisen in allen Strukturbereichen sehr starke Überlagerungen auf. Die Methylierung bewirkt sowohl eine deutlich verbesserte

Auflösung, als auch eine wesentlich erhöhte Anzahl an Resonanzen und Kreuzsignalen bei gleichzeitiger Veränderung der mittleren Signalpositionen. Die prozentualen Angaben in Tabelle 4-8 müssen somit kritisch betrachtet werden. Leere Zeilen in dieser Tabelle und in allen folgenden Tabellen bedeuten, dass die entsprechenden Spektren nicht vorliegen. Der in Kapitel 4.1.4.2 vorgestellte Vergleich von ^{12}C - und ^{13}C -methylierten Huminstoffspektren verspricht einen genaueren Überblick über die Anteile an nativen und durch die Methylierung hinzugekommenen Methylgruppen.

Tabelle 4-8: Integrationsdaten (%) des aliphatischen Bereichs und der Überlappungsregion von underivatisierten ^{13}C -CPMAS- und ^{13}C -NMR-Spektren in Lösung und von methylierten ^{13}C -NMR-Spektren

Probe	Spektrum	Überlappungsregion (%)	CH _n (%)
HO10FA	CPMAS	4,8	17,8
	Lösung	5	16
	h+d-methyliert	n.d.	n.d.
	d+h-methyliert	15	54
HO10HA	CPMAS	5,2	15,5
	Lösung	4	16
	h+d-methyliert	16,1	33,8
	d+h-methyliert	12,6	44,2
HO13FA	CPMAS	4,9	20,4
	Lösung	5	28
	h+d-methyliert	17,8	31,4
	d+h-methyliert	16,3	32,4
HO13HA	CPMAS	5,4	20,1
	Lösung	5	22
	h+d-methyliert	n.d.	n.d.
	d+h-methyliert	25,4	42,6
SV1FA	CPMAS	5,6	27,7
	Lösung	n.d.	n.d.
	h+d-methyliert	6,4	48,9
	d+h-methyliert	n.d.	n.d.
SV1HA	CPMAS	5,2	28,3
	Lösung	n.d.	n.d.
	h+d-methyliert	8	17,6
	d+h-methyliert	15,2	42,3

Tabelle 4-8 zeigt, dass sich der Anteil an Methylgruppen im aliphatischen Bereich und in der Überlappungsregion bei fast allen HS verdreifacht bis zu verfünffacht (Überlappungsregion) bzw. verdoppelt (aliphatischer Bereich) hat. Nur bei SV1HA,d+h hat sich der aliphatische Anteil um 38 % verringert. Diese Huminsäure unterscheidet sich allerdings auch deutlich von ihrem entsprechenden h+d-methylierten Pendant. Bei den anderen HS ähneln sich die Werte. Bei HO13FA liegt der Unterschied zwischen h+d und d+h sogar nur bei 8 %

(Überlappungsregion) bzw. 5 % (CH_n). Die Verdopplung der Signalintensität im aliphatischen Bereich deutet auf einen recht hohen Anteil an C-Methylierung hin.

Bei den Protonenspektren liegen nur Vergleichsdaten für HO10 und HO13 vor. Im Fall von HO13 hat der Anteil an O-Alkyl- und Methoxyl-Protonen im Vergleich zu den underivatisierten Substanzen stark zugenommen (100 % bei FA und 25 % bei HA), während HO10 keine wesentlichen Unterschiede aufweist.

Tabelle 4-9: Integrationsdaten (%) von O-Alkyl-Wasserstoff und Methoxyl-Wasserstoff von underivatisierten und methylierten ^1H -NMR-Spektren in Lösung

Probe	Spektrum	O-Alkyl-H, Methoxyl-H %
HO10FA	underivatisiert	34
	h+d-methyliert	34
	d+h-methyliert	28
HO10HA	underivatisiert	28
	h+d-methyliert	35
	d+h-methyliert	23
HO13FA	underivatisiert	21
	h+d-methyliert	43
	d+h-methyliert	45
HO13HA	underivatisiert	29
	h+d-methyliert	38,5
	d+h-methyliert	37

4.1.4.2 Vergleich der ^{12}C - und der ^{13}C -methylierten Huminstoffspektren

Die Huminstoffe wurden sowohl mit ^{12}C - als auch mit ^{13}C -Methylierungsreagenzien umgesetzt. Durch Vergleich dieser Spektren können die nativen von den durch die Methylierung eingebrachten Methylgruppen unterschieden werden. Die Verwendung von ^{13}C -markierten Reagenzien erhöht die NMR-Empfindlichkeit um das ca. 100-fache, lässt aber ^1H -NMR- und homonukleare 2D-Korrelationsspektren bis auf die zusätzliche Aufspaltung direkt gebundener Protonen durch markiertes ^{13}C unbeeinflusst ($^1J(\text{CH}) = 135\text{-}140\text{ Hz}$). Somit erscheinen durch die ^{13}C -Methylierung neu eingebrachte $^{13}\text{CH}_3$ -Gruppen in heteronuklearen NMR-Experimenten mit einer ca. 100 mal größeren Intensität als die substanzspezifischen bereits vorhandenen (nativen) CH_3 -Gruppen, welche dadurch im Spektrum nicht bzw. fast nicht erkennbar sind.

In den ^1H -NMR-Spektren ist die eben genannte zusätzliche Aufspaltung besonders im Methoxy-Bereich zwischen $\delta(1\text{H})$ 3,2 und 4 ppm deutlich zu erkennen. Die COSY-Spektren zeigen aufgrund der Aufspaltung Unterschiede im Bereich C. Ansonsten sind ^{13}C - und ^{12}C -methylierte ^1H -Spektren fast identisch. Deutliche Unterschiede sind in den ^{13}C -Spektren zu sehen. Hier überwiegt die Signalintensität der durch die Methylierung eingebrachten CH_3 -

Gruppen deutlich die Intensität der anderen Signale. Die eingebrachten Methylgruppen liegen in den Bereichen $\delta(^{13}\text{C}) = 5 - 30$ ppm und $\delta(^{13}\text{C}) = 50 - 65$ ppm. Dagegen sind im ^{12}C -methylierten Spektrum die Signale im Bereich $\delta(^{13}\text{C}) = 100 - 135$ ppm sehr deutlich zu erkennen. Abgesehen von den zu erwartenden Intensitätsunterschieden sind sich auch die ^{13}C -Spektren sehr ähnlich, was auf eine gute Reproduzierbarkeit der Methode schließen lässt.

Zur Verdeutlichung der Unterschiede zwischen den markierten und unmarkierten 2D-NMR-Spektren wurden Minimum- und Differenzspektren der HSQC-Spektren angefertigt. Durch die Normierung werden die Intensitäten der CH_3 -Gruppen in den markierten und unmarkierten Spektren gleichgesetzt. Das Minimumspektrum enthält folglich die HS-Grundstruktur und durch Methylierung eingebrachte CH_3 -Gruppen. Durch das Abziehen der markierten von den unmarkierten Spektren verbleiben neben der HS-Grundstruktur nur noch die nativen $^{12}\text{CH}_3$ -Gruppen. Angaben zu den Anteilen an nativen und durch die Methylierung eingebrachten Methylgruppen können sowohl durch genaue Betrachtung der Spektren als auch durch die Bildung von Minimum- und Differenzspektren nur als Tendenzen angesehen werden, da die Reproduzierbarkeit der Methylierung zwar laut den Ergebnissen recht gut ist, aber niemals 100 % sein wird. Anhang B enthält jeweils die ^{12}C -methylierten und die Differenzspektren der HSQC-NMR-Spektren von allen gemessenen $^{12}\text{C} / ^{13}\text{C}$ -HS-Paaren. Generell kann zusammengefasst werden, dass die ^{13}C -markierten Spektren einen besseren Überblick über die durch die Methylierung neu entstandenen Strukturbestandteile gewähren, während die ^{12}C -methylierten Spektren für den allgemeinen Überblick über die Gesamtstruktur und ihre quantitative Zusammensetzung vor und nach der Methylierung unerlässlich sind.

4.1.5 EINFLUSS DER METHYLIERUNGSREIHENFOLGE AUF DIE ERGEBNISSE

Der Einfluss der Methylierungsreihenfolge auf die Ergebnisse wurde einerseits durch Untersuchung von Gemeinsamkeiten und Ungleichheiten der Integrale, also der prozentualen Anteile der verschiedenen Strukturelemente, andererseits durch den Vergleich von verschiedenen Minimum- und Differenzspektren ermittelt.

Abbildung 4-8 zeigt das Balkendiagramm der Integrationsdaten von ^{13}C -NMR-Spektren verschiedener, nach h+d- ^{13}C -methylierter FAs (links) und nach d+h- ^{13}C -methylierter FAs (rechts).

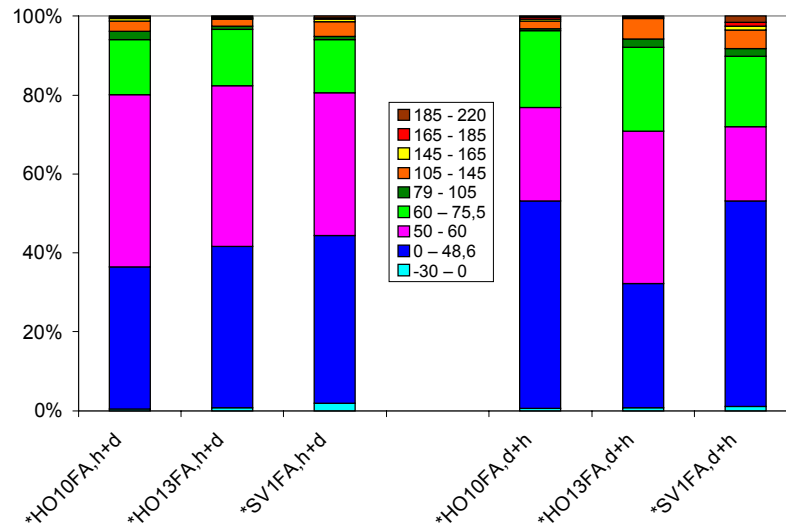


Abbildung 4-8: Integrationsdaten von ^{13}C -methylierten Fulvinsäuren; links: h+d, rechts: d+h

Die Zusammensetzung der Produkte der in unterschiedlicher Reihenfolge methylierten HS zeigt durchaus bei allen HS Unterschiede auf, systematische Abweichungen bedingt durch die Reihenfolge der Methylierung sind allerdings nur mit jeweils einigen Ausnahmen zu verzeichnen. Im Vergleich der ^1H -Spektren ist tendenziell ein höherer Anteil an aliphatischen Protonen im Bereich von 1,7 bis 3,2 ppm bei den d+h-methylierten HS auszumachen. Da die Unterschiede aber sehr uneinheitlich sind und auch nicht bei allen untersuchten HS diese Tendenz zu erkennen ist, macht es keinen Sinn, Prozentwerte anzugeben. In den anderen Integrationsbereichen der ^1H -Spektren sind keine einheitlichen Tendenzen feststellbar. Auch in den ^{13}C -Spektren der d+h-methylierten HS ist der aliphatische Anteil etwas höher als in den in der entgegengesetzten Reihenfolge methylierten Proben. Im Überlappungsbereich von 50 bis 60 ppm treten in den h+d-methylierten Spektren etwas mehr Resonanzen auf. Der O-Alkyl-Kohlenstoff-Bereich bis 105 ppm überwiegt dagegen wieder in den d+h-methylierten Spektren.

Da aus den Integrationsdaten keine einheitliche Systematik zu erkennen ist, wurden COSY- und HSQC-Minimumspektren von allen ^{12}C - und ^{13}C -h+d- bzw. d+h-methylierten FAs bzw. HAs gebildet. Aus den dadurch erhaltenen (jeweils zwei) Minimumspektren wurden wiederum Minimum- und Differenzspektren gebildet. Wie aus den entstandenen Minimum- und Differenzspektren ersichtlich ist, unterscheiden sich die h+d- und die d+h-methylierten Spektren nur in Kleinigkeiten voneinander. Die verschiedenen ^{12}C -methylierten HAs sind sich in beiden Methylierungsreihenfolgen sehr ähnlich. Auch die COSY-NMR-Spektren der anderen Vergleichssubstanzen ähneln sich sehr, weisen allerdings in den d+h-methylierten Spektren zusätzliche Kreuzsignale im Bereich von methylierten Kohlenhydraten und

alkylierten Ethern auf. Die ^{13}C -methylierten HAs zeigen zudem noch Signale von Kopplungen zwischen Etherprotonen und an funktionalisierte C-Atome gebundene Protonen (C3). Die h+d-methylierten FAs zeigen im Bereich D und E mehr Signale als die in der anderen Reihenfolge methylierten Substanzen. Das selbe gilt für die HAs im Bereich E. Im Bereich der Alkene und methylierten Phenole (G, H) zeigen die h+d-methylierten HAs etwas weniger Signale als ihre Pendants.

Während auch bei den HSQC-NMR-Spektren die Spektren der ^{12}C -methylierten HAs in beiden Methylierungsreihenfolgen fast identisch sind, erscheinen in den anderen Differenzspektren zusätzliche Signale im Bereich A1, A2, C und D (hauptsächlich in D2). Bei den ^{13}C -methylierten FAs enthalten die h+d-methylierten Substanzen zusätzliche Signale in den Bereichen A1, A2 und C. Dasselbe gilt für die ^{12}C -derivatisierten FAs, hier allerdings für die Methylierungsreihenfolge d+h. Die ^{13}C -methylierten HAs haben zusätzliche Signale im Bereich C und D. Im Großen und Ganzen sind aber keine gravierenden Unterschiede bedingt durch die Methylierungsreihenfolge zu erkennen. Auch hier sind geringe Unterschiede bei den Gerüstprotonen erkennbar, allerdings nur bei den ^{12}C -methylierten. Es überwiegt die Anzahl an Signalen im Bereich der Alkene (G) bei den d+h-methylierten FAs und HAs. Umgekehrt verhält es sich im Bereich H (Aromatische CH). Es überwiegen die Signale in den h+d-derivatisierten Spektren.

Auf die Errechnung von Minimum- und Differenzspektren von jeweils einer in zwei Reihenfolgen methylierten Substanz wurde aufgrund der guten Übereinstimmung der erstellten Differenzspektren verzichtet. In Anhang C sind jeweils das Minimum- und die dazugehörigen Differenzspektren aller ^{12}C - und ^{13}C -methylierter FAs und HAs aufgeführt.

4.1.6 ERGEBNISSE DER WEITBEREICHSKOPPLUNGS-NMR-SPEKTREN (HSQC-TOCSY)

Um eine detailliertere und erweiterte Interpretation der HSQC-NMR-Spektren zu ermöglichen, wurden Weitbereichskopplungs- („long-range“) NMR-Spektren aufgenommen. Durch die direkt nach der HSQC-Pulssequenz geschaltete TOCSY- „spin-lock“-Mischzeit wird die Magnetisierung vom C-Atom der betrachteten CH-Gruppe zurück zum Proton, von dem sie ausgegangen ist, transferiert und von dort zu benachbarten J-gekoppelten Protonen.

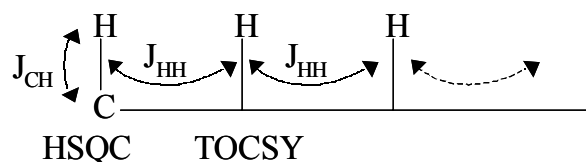


Abbildung 4-9: Schematische Darstellung der HSQC-TOCSY-Sequenz und des Kopplungspfad

Je nach Einstellung der Mischzeit kann ein komplettes Protonen-Subspektrum des molekularen Fragments, zu dem das Heteroatom gehört, erzeugt werden. Das HSQC-TOCSY-Experiment ist somit ein ^{13}C -editiertes TOCSY-Experiment. Die Protonen-Korrelationen erscheinen als Signal-Reihen entlang der chemischen Verschiebung des C-Atoms in F1.

Die durch die HSQC-TOCSY-Sequenz theoretisch erhaltenen enormen Zusatzinformationen gegenüber den HSQC-Spektren werden allerdings durch die stark herabgesetzte Empfindlichkeit etwas getrübt. Diese kommt dadurch zustande, dass die „Crosspeaks“ im ^{13}C -editierten Experiment durch die dem TOCSY-Experiment vorangestellte HSQC-Sequenz nur von ^{13}C -Satelliten stammen. Hier führt der Einsatz von ^{13}C -markierten Methylierungsreagenzien zu verbesserten Ergebnissen (60), (61), (64). Die im HSQC-TOCSY-Experiment interessierenden chemischen Verschiebungsbereiche wurden bereits in Kapitel 4.1.1 vorgestellt. Hier sollen nun die einzelnen Spektren ausgewertet werden.

Um einen besseren Überblick zu erhalten, wurden Differenzspektren gebildet. Die HSQC-Spektren wurden von den HSQC-TOCSY-Spektren abgezogen. Die sich dann ergebenden Differenzspektren enthalten somit hauptsächlich nur noch die Weitbereichskorrelationen.

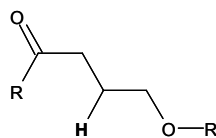
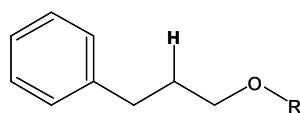
Insgesamt betrachtet sind sich die HSQC-TOCSY-Spektren der verschiedenen Substanzen sehr ähnlich. Dies lässt auf weitgehend ähnliche Grundstrukturen schließen, welche sich nur im Detail unterscheiden. Sowohl bei den ^{12}C - als auch in den ^{13}C -methylierten Substanzen ist eine höhere Anzahl an neu hinzugekommenen Signalen in den Spektren der HA zu erkennen. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass die HA größer bzw. weiter verzweigt sind als die entsprechenden FA. Deutlich zu erkennen ist, dass die Spektren der ^{13}C -methylierten HS alle über eine erhöhte Anzahl an Signalen, eine höhere Empfindlichkeit und auch über eine bessere Auflösung im Vergleich zu denen der unmarkierten Methylierungsprodukte verfügen. Dies war, wie oben beschrieben, zu erwarten.

Neue Signale treten bei fast allen Spektren in nahezu allen in Kapitel 4.1.1 beschriebenen chemischen Verschiebungsbereichen auf. Besonders auffällig ist die hohe Anzahl an Signalen von CH_3 -Gruppen, welche an aliphatische $-\text{CH}$ bzw. $-\text{CH}_2$ gebunden sind. Dies spricht für eine der erwarteten Nebenreaktionen, nämlich die C-Methylierung. An Schwefel gebundene $-\text{C}(\text{H})_{1/2}$ -Gruppen im Bereich B^{““} treten in keinem der Spektren auf. Diese wären in den

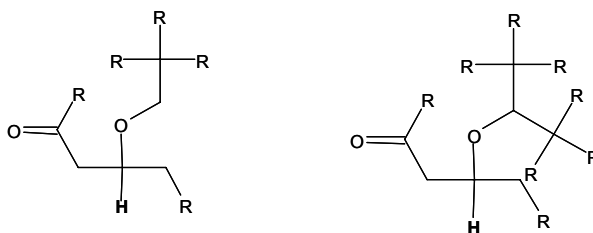
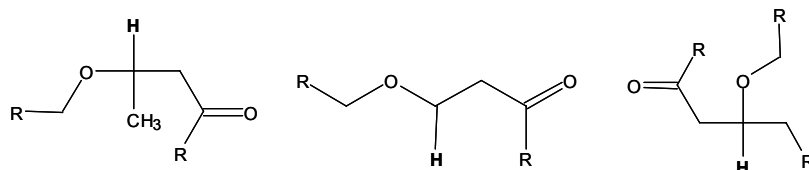
Spektren von SV1 wegen des, laut Elementaranalyse, recht hohen Schwefelgehalts von ca. 9 % (143) zu erwarten gewesen. Im Bereich G' finden sich nur in einigen Spektren Signale. Dies sind HO10FA und HO13FA bei den ¹³C-markierten und HO13HA bei den unmarkierten Spektren. In einigen Spektren sind in der F2-Reihe der F1-Verschiebung der Gruppe G noch weitere Signale im Bereich $\delta(^1\text{H})$ F2: 3,8 – 4,5 ppm (G'') feststellbar. Dies ist bei den ¹³C-methylierten Substanzen HO10FA, HO13FA und SV1HA der Fall. Hierbei handelt es sich um -CH₂-O-Gruppen in α -Stellung zu Alkenen. Des Weiteren befinden sich in fünf ¹³C-methylierten Spektren (HO10 und HO13 HA und FA, SV1HA) Signale im Bereich $\delta(^1\text{H})$ F2: 5,5 – 6,8 ppm und $\delta(^{13}\text{C})$ F1: 65 – 75 ppm. Hierbei kann es sich um CH-Gruppen in Alkenen handeln. Diese sind an Strukturen des Bereiches E gebunden und erhalten deshalb die Bezeichnung E'''. Die Anwesenheit von Alkenen in den HS-Strukturen spricht dafür, dass entweder Ligninbestandteile vorhanden sind oder / und Methylierungsreaktionen wie C-Methylierung und Spaltungsreaktionen stattgefunden haben.

Aus den im HSQC-TOCSY-Spektrum dazugekommenen Signalen und den im HSQC-Spektrum herauslesbaren ¹J(CH)-Kopplungen lassen sich „Nachbarschaftsreihen“ bilden. So stehen die Signale des Bereichs A2 in Korrelation mit Signalen aus A' und A'', B / C bildet eine Reihe mit B''', B' und B'', D mit D' und D'', E mit E', E'' und E''' und G mit G' und G''. Es sind in den HSQC-TOCSY-Spektren der methylierten HS etwa drei bis fünf Korrelationen in Spinsystemen, in denen der chemische Verschiebungsbereich A2 enthalten ist, zu erkennen. Für B / C sind es ca. fünf bis sieben, für D3 und G höchstens zwei und für E zwei bis vier.

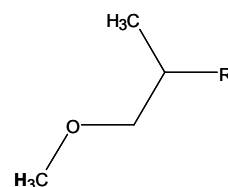
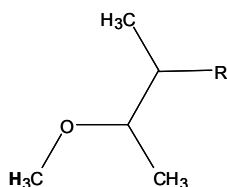
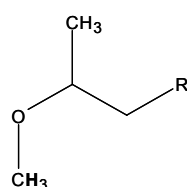
Den eben genannten Reihen werden nun mögliche Strukturteile zugewiesen, die in Kapitel 4.1.8 unter Zuhilfenahme der Ergebnisse der anderen NMR-Experimente noch ausführlicher diskutiert werden.



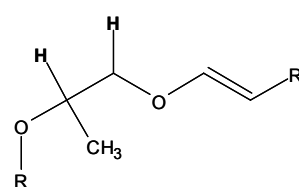
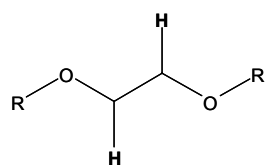
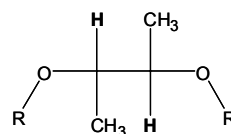
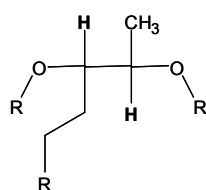
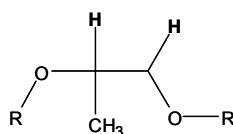
A2



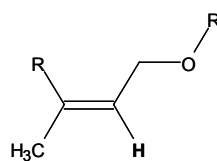
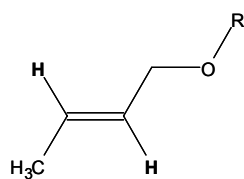
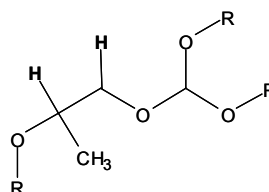
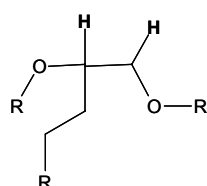
B / C



D



E



G

Abbildung 4-10: Strukturvorschläge für die Weitbereichskorrelationsreihen der chemischen Verschiebungsbereiche A2, B / C, D3, E und G. Von den fett markierten eingezeichneten Protonen gehen die beobachteten Korrelationen aus.

4.1.7 VERGLEICH DER 2D-NMR-SPEKTREN VON METHYLIERTEN FULVIN- UND HUMINSÄUREN

Es wurden aus den COSY- und den HSQC-NMR-Spektren der FAs und der HAs Differenz- und Minimumspektren gebildet (Anhang D). Aus ihnen ist ersichtlich, dass sich die einzelnen Spektren nur im Detail unterscheiden und auch dort nicht substanz- oder fraktionsspezifisch (FA / HA).

Aus den 2D-NMR-Spektren geht hervor, dass sowohl in den HAs als auch in den FAs sämtliche in Kapitel 4.1.1 aufgeführten Partialstrukturen vorkommen. Stuft man die verschiedenen FAs bzw. HAs danach ein, wie groß ihr Anteil an den jeweiligen Partialstrukturen ist, lässt sich auch hier keine Systematik erkennen. Bei underivatisierten HS bestehen generell deutliche Unterschiede zwischen FAs und HAs. Momentan liegen keine 2D-NMR-Spektren der untersuchten ROSIG-HS vor, so dass ein direkter Vergleich nicht möglich ist.

Die Ähnlichkeit der HAs und der FAs deutet auf starke Strukturänderungen durch die Methylierung hin. Die gute Auflösung und die Signale im Alkenbereich sprechen für Nebenreaktionen wie Spaltung und Olefinbildung. Der recht hohe Anteil an endständigen –CH₃-Gruppen hat seinen Ursprung in der C-Methylierung. Da, wie bereits erwähnt, die Spektren der verschiedenen HS alle sehr ähnlich sind, wird im folgenden Kapitel eine detaillierte Signalauswertung unter Zuhilfenahme sämtlicher gemessener und gerechneter NMR-Experimente nur an einem HS (FAs und HAs) präsentiert.

4.1.8 STRUKTUR VON METHYLIERTEN HUMINSTOFFEN AM BEISPIEL HO10

Zur Auswertung der Strukturbausteine wurden zur Differenzierung von Signalmultiplizitäten und der stereochemischen Umgebungen - speziell der Strukturen im aliphatischen Bereich - Modelle verzweigter Alkylketten erstellt. Um die Strukturbausteine in HS den möglicherweise natürlich vorkommenden und in HS enthaltenen Substanzen zuzuordnen, wurde in einem Modell eine Mischung aus derartigen Substanzen dargestellt.

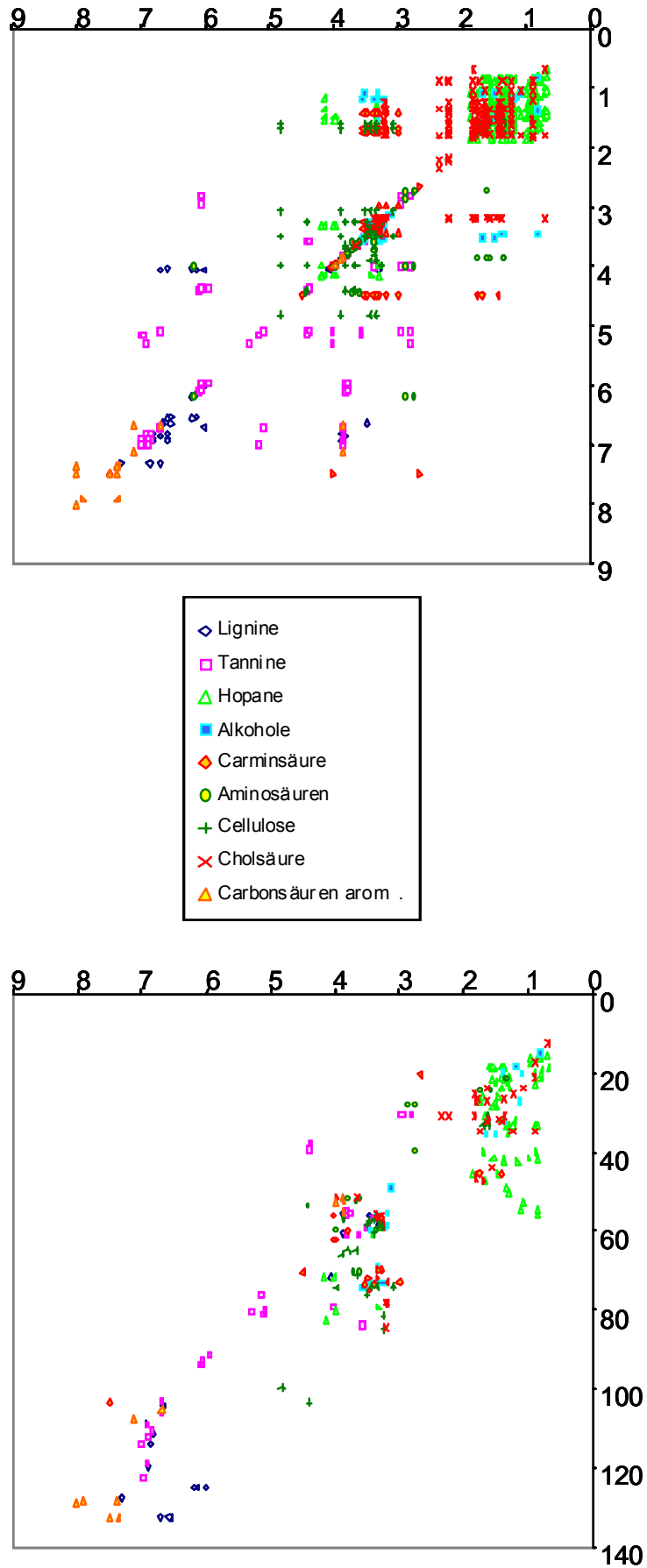


Abbildung 4-11: Strukturmodell für HS-relevante Substanzen; links: COSY, rechts: HSQC

Im Folgenden sollen nun die verschiedenen 1D- und 2D-NMR-Experimente dafür genutzt werden, einen möglichst detaillierten Überblick über die Struktur von methylierten HS zu erlangen. Der aliphatische Bereich im ^1H -Spektrum enthält zwar sehr gut aufgelöste Signale, diese überlagern allerdings stark. Für einen besseren Überblick über die Signalmultiplizitäten bei den verschiedenen Verschiebungen werden zunächst das ^{13}C - und das DEPT 135-Spektrum zu Rate gezogen. Im DEPT-Spektrum erscheinen die CH- und CH_3 -Kohlenstoffe positiv, die CH_2 -Kohlenstoffe sind negativ. Die ^{13}C -Spektren geben neben den Multiplizitäten auch Auskunft über die nativen und durch die Methylierung eingebrachten CH_3 -Kohlenstoffe. So heben sich die endständigen CH_3 -Kohlenstoffe (ca. 8 ppm) in den ^{13}C -methylierten Spektren in ihrer Intensität deutlich vom Restspektrum und von der entsprechenden Gruppe in den unmarkierten Spektren ab. Auch die COOCH_3 - (ca. 50 ppm) und die OCH_3 -Kohlenstoffe (56 – 58 ppm) zeigen in den markierten Spektren deutlich höhere Intensitäten an. Im Bereich von 28 bis 35 ppm finden sich zahlreiche CH_2 -Kohlenstoffe. Dabei handelt es sich um $\alpha\text{-CH}_2$, welche an COOR bzw. um $\beta\text{-CH}_2$, welche an COOR, COR oder OCOR (R = Methyl, Alkyl) gebunden sind. Die $\beta\text{-CH}_2$ an COOR sind wegen der COOR-Gruppe zu etwas tieferem Feld hin verschoben als die an COR und OCOR. In diesem Verschiebungsbereich kommen auch die gerade beschriebenen entsprechenden CH-Kohlenstoffe vor. In den Spektren der HO10-HS können aber nur wenige CH-Kohlenstoffe in diesem Bereich (um 37 ppm) nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um $\beta\text{-CH}$ an COOR oder OR. Zwischen 43 und 50 ppm erscheinen neben einigen CH-Gruppen vor allem sehr intensitätsstarke CH_2 -Kohlenstoffe, gefolgt von den bereits erwähnten Methoxyl- und COOCH_3 -Gruppen. Bis 77 ppm treten zahlreiche CH_2 -Kohlenstoffe (bis ca. 70 ppm: $\alpha\text{-CH}_2\text{-OCOR}$, ab 72 ppm: $\alpha\text{-CH}_2\text{-OR}$) und ein CH-Kohlenstoff (ca. 69 ppm) auf. Die im Vergleich zu CH-Gruppen sehr hohe Anzahl an CH_2 -Resonanzen deutet auf einen weitaus höheren Anteil an Ethern als an methylierten Kohlenhydraten hin. FA und HA sind sich im ^{13}C -Spektrum sehr ähnlich.

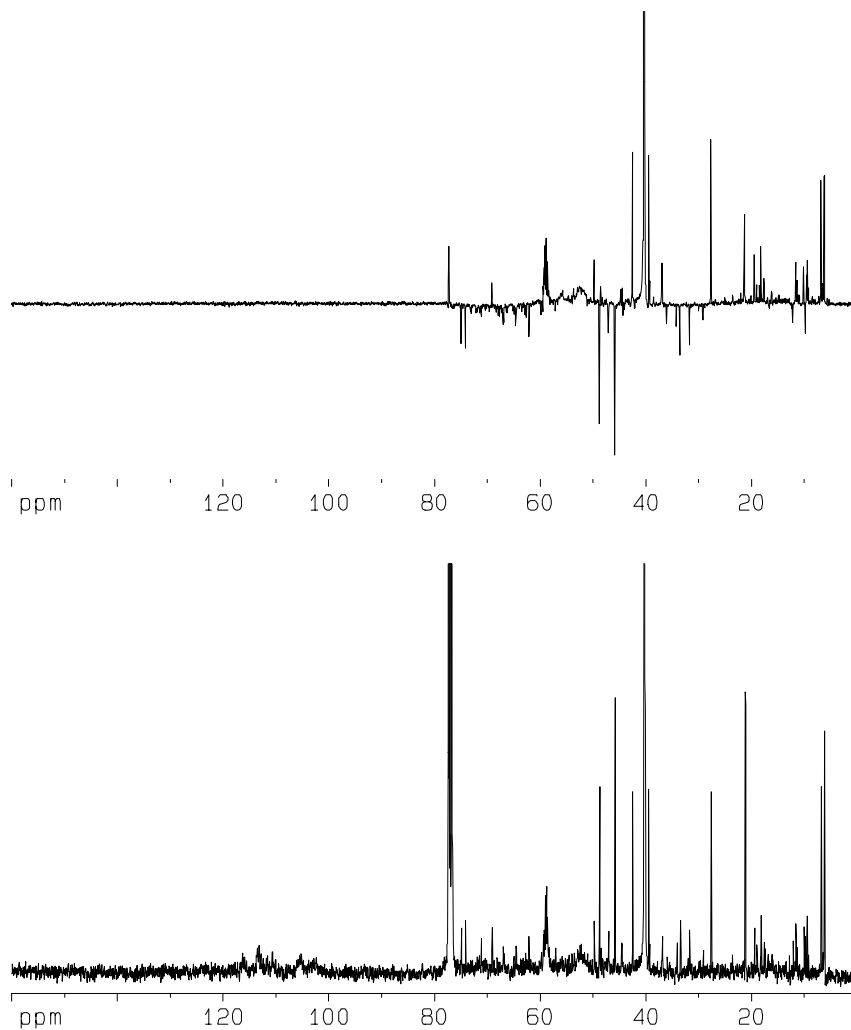


Abbildung 4-12: ^{13}C - (unten) und ^{13}C -DEPT 135 (oben)-Spektrum von $12\text{C},\text{HO}10\text{HA},d+h$

An der insgesamt großen Anzahl an CH- und endständigen CH_3 -Kohlenstoffen ist zu erkennen, dass die Methylierung eine starke Verzweigung mit sich gebracht hat. Dies erklärt auch die zahlreichen Überlagerungen in den Protonen-Spektren. Wegen der zahlreichen Kopplungen der verschiedenen CH- und CH_2 -Gruppen untereinander nehmen die Signale durch die Aufspaltung stark an Intensität ab und einzelne Strukturbausteine sind nur noch schwer zu unterscheiden. Zusätzliche Überlagerungen in den ^{13}C -derivatisierten Spektren entstehen durch die Aufspaltung der Signale aufgrund der ^{13}C -Methylierung. So überdecken die CH_3 -Signale zwischen 1,2 und 1,6 ppm die in den ^{12}C -methylierten Spektren gut abgetrennten mittelständigen CH- und CH_2 -Gruppen. Auch hier sind keine großen Unterschiede zwischen den FAs und den HAs auszumachen. In den HAs erscheinen

zusätzliche Signale im Bereich von 2,5 – 3 ppm. Sehr viel intensiver ist in den HAs das Signal der stark tieffeldverschobenen α -CH₂-Gruppen an OCOR (3,85 – 4 ppm).

Abbildung 4-13 zeigt Protonen-NMR-Spektren von mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen (COOCH₃, COOCH₃ 2x, OCOCH₃, OCH₃) substituierten aliphatischen Ketten. Die Ketten enthalten jeweils fünf C-Atome und sind systematisch verzweigt. Dieses Modell wurde gewählt, um zu veranschaulichen, dass CH- bzw. CH₂-Gruppen in Aliphaten in Umgebung von unterschiedlichen funktionellen Gruppen in ihren chemischen Verschiebungen sehr stark zu Überlagerungen neigen und somit nur schwer unterschieden werden können. Der Anteil an Aliphaten, welche an die jeweiligen funktionellen Gruppen gebunden sind, ist im Protonenspektrum nur durch die Anwesenheit bzw. Intensität der chemischen Verschiebung der CH₃-Gruppe am Sauerstoff abzuschätzen.

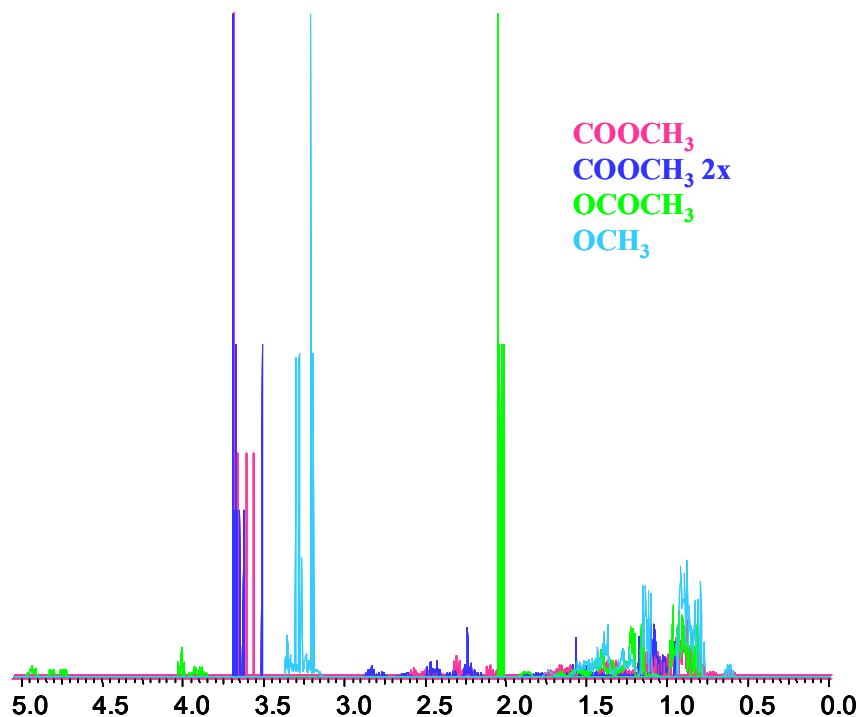


Abbildung 4-13: ¹H-Spektren von verschieden substituierten, systematisch verzweigten aliphatischen Partialstrukturen (fünf C-Atome nach bzw. zwischen den funktionellen Gruppen)

Zur genaueren Aufklärung helfen die 2D-Experimente. Speziell für den aliphatischen Bereich erfolgte die Errechnung eines systematisch polymethylierten Alkylmodells. Jeweils vier Kohlenstoffe werden von Ether- bzw. Carbonylfunktionen eingefasst. Sämtliche Varianten der Substitutionsmuster durch Methylgruppen fanden Anwendung. Heteroatome, außer Sauerstoff, und weitere funktionelle Gruppen werden hier nicht berücksichtigt. Das Modell zeigt sehr übersichtlich die erwarteten Strukturbereiche und auch die Verschiebungsbereiche der unterschiedlichen Multiplizitäten an.

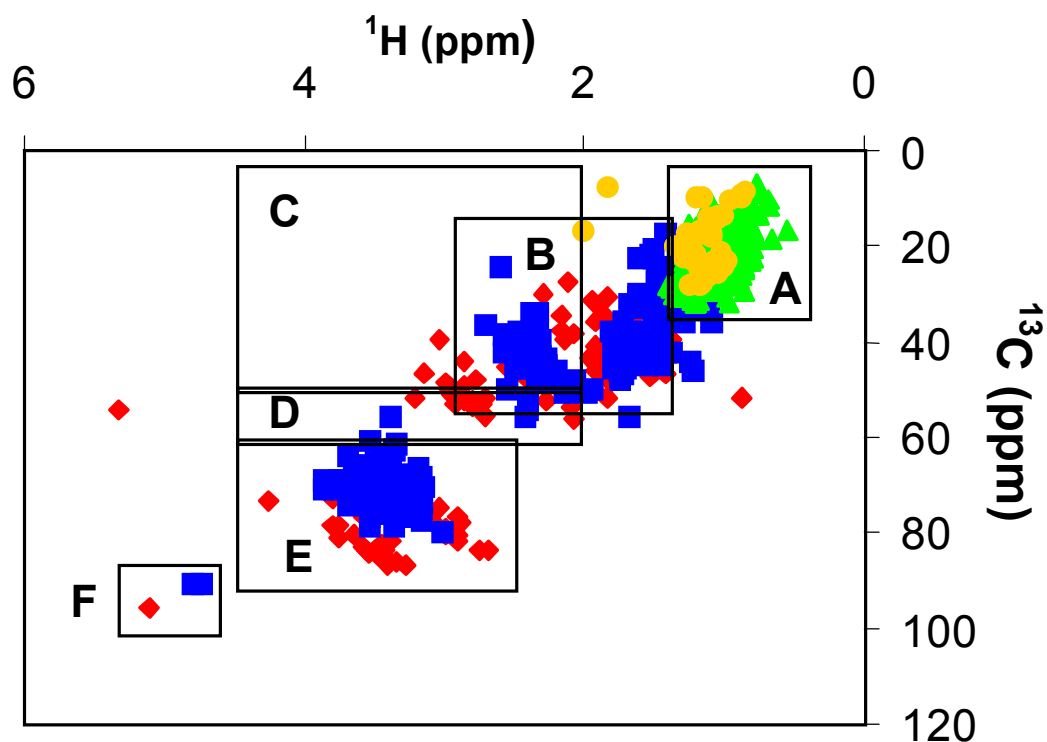


Abbildung 4-14: HSQC-Spektrum des systematisch polymethylierten Alkylmodells; rot: CH, blau: CH₂, grün: CH₃, gelb: H₃CCO

Die COSY-Spektren enthalten zahlreiche „Crosspeaks“. Aufgrund der eben angeführten Probleme der genauen Zuordnung der ¹H-Signale sind einzelne „Crosspeaks“ allerdings wegen Überlagerungen schwer genau zu identifizieren. Die in Punkt 4.1.1 vorgestellten Bereiche der COSY-Spektren grenzen sich aber trotzdem deutlich voneinander ab. Neben zahlreichen Signalen von endständigen CH₃-Gruppen im Bereich A1 sind hier auch Kreuzsignale von den im ¹H-Spektrum bei 0,8 – 0,9 ppm fast nicht auszumachenden CH-Gruppen erkennbar. Auch Kopplungen in aliphatischen Ketten (A2) treten zahlreich auf. Über die genaue Verknüpfung müssen hier die heteronuklearen Experimente Auskunft geben. Das HSQC-Experiment von ¹²C-methylierter HO10HA zeigt hervorragend aufgelöste Kreuzsignale. Bei der FA finden sich in diesem Bereich deutlich mehr Signale, speziell im Bereich A2. Im Bereich der aliphatischen Ketten (A2) bis 25 ppm sind die Kreuzsignale CH₂-Gruppen zuzuschreiben. Im Bereich von 29 – 35 ppm treten Kreuzsignale von CH- und CH₂-Gruppen auf, allerdings deutlich weniger als unter 25 ppm. Somit handelt es sich bei der Protonenverschiebung bei 1,4 ppm um CH₂- und CH-Gruppen, wobei der Anteil an CH₂-Gruppen überwiegt. Aus den ¹³C-methylierten Spektren kristallisieren sich die kleinen Signale zwischen den zahlreichen hohen aufgespaltenen CH₃-Kohlenstoffen ebenfalls als CH₂- bzw. CH-Gruppen heraus. Aufgrund der Aufspaltung und der 100 mal höheren Intensität der ¹³C-

Kohlenstoffe wirken diese HSQC-Spektren etwas überladen. Zu deren genaueren Differenzierung sind die HSQC-TOCSY-Spektren von großer Wichtigkeit. In diesen sind bei allen Substanzen mehrere Signale vorhanden, die Bindungen der CH₃-Gruppen sowohl an CH- als auch an CH₂-Gruppen kennzeichnen.

Verzweigte Alkylketten mit einem hohen Anteil an CH-Gruppen treten in der Natur in Hopanoiden auf. Dabei handelt es sich um pentacyclische Triterpenoide, die für die Stabilität der Zellwände in eukaryotischen Mikroben (Biohopanoiden) verantwortlich sind. Hopanoide kommen praktisch in allen Sedimenten vor, hier allerdings als Geohopanoide. Die Hopanoide sind laut Römpp mit einem geschätzten Vorkommen von 10¹² t nach Cellulose die mengenmäßig bedeutendste organische Verbindung auf der Erde.

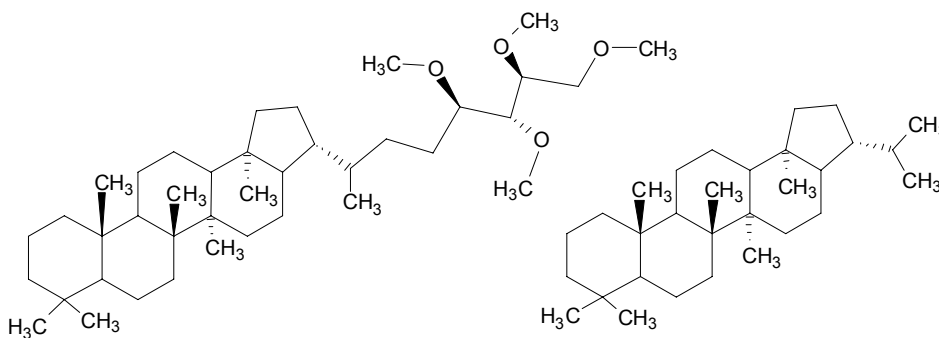


Abbildung 4-15: Hopanoidstrukturen; links: Biohopanoid, rechts: Geohopanoid

Die Bereiche B und C zeigen in den COSY-Spektren zahlreiche überlagerte Kreuzsignale. Genauere Informationen über Ether- und Kohlenhydratstrukturen liefern die TOCSY-Spektren, die allerdings von schlechter Qualität sind. Sie zeigen nur Signale im Bereich B1 (methylierte Kohlenhydrate) und B2 (methylierte Kohlenhydrate und Ether), aber nicht in B3. Der Hauptanteil der Signale liegt sowohl im TOCSY als auch im COSY in B2 (siehe Ether-Ketonmodell). Dies lässt darauf schließen, dass Kohlenhydrate höchstens noch als Fragmente vorliegen und der Hauptanteil der hier auftretenden Signale von funktionalisierten Ethern stammt. Die geringe Anzahl der Kreuzsignale im Hochfeldbereich B3 besagt, dass fast keine Korrelationen zu Stickstoff-, Carbonyl- und aromatischen Funktionen auftreten. Dies war auch schon aus den Integrationsdaten ersichtlich.

Die Einteilung der CH- und CH₂-Gruppen als Ethersubstituenten bestätigt sich in den COSY-Spektren im Bereich C nicht auf den ersten Blick. Die meisten Signale treten hier sowohl bei den HAs, als auch bei den FAs im Unterbereich C1 – dem so definierten Kohlenhydratbereich – auf. Die Bezeichnung Kohlenhydratbereich, welche aus der Definition der chemischen Verschiebungsbereiche von underivatisierten HS stammt, ist hier etwas irreführend. Als Produkt der Methylierung liegen keine intakten methylierten Kohlenhydrate

mehr vor. Vielmehr sind Nebenreaktionen wie Methyleninsertion und C-Methylierung aufgetreten, was aus den Kohlenhydratstrukturen eine Mischung aus Ethern und Ketonen gemacht hat. Man könnte diese eventuell als Kohlenhydratfragmente bezeichnen.

Die deutliche Abtrennung der Bereiche C1, C2 und C3 ist nur in den FA erkennbar. Die HAS enthalten im Bereich C mehr Kreuzsignale als die FAs und deshalb gehen die Unterbereiche fast fließend ineinander über. Die hohe Intensitätsstärke, bei gleichzeitig sehr guter Auflösung im Bereich C3, markiert den hohen Anteil an Protonen, welche zwischen Etherprotonen stehen oder an zum Teil mehrfach funktionalisierte C-Atome gebundenen sind.

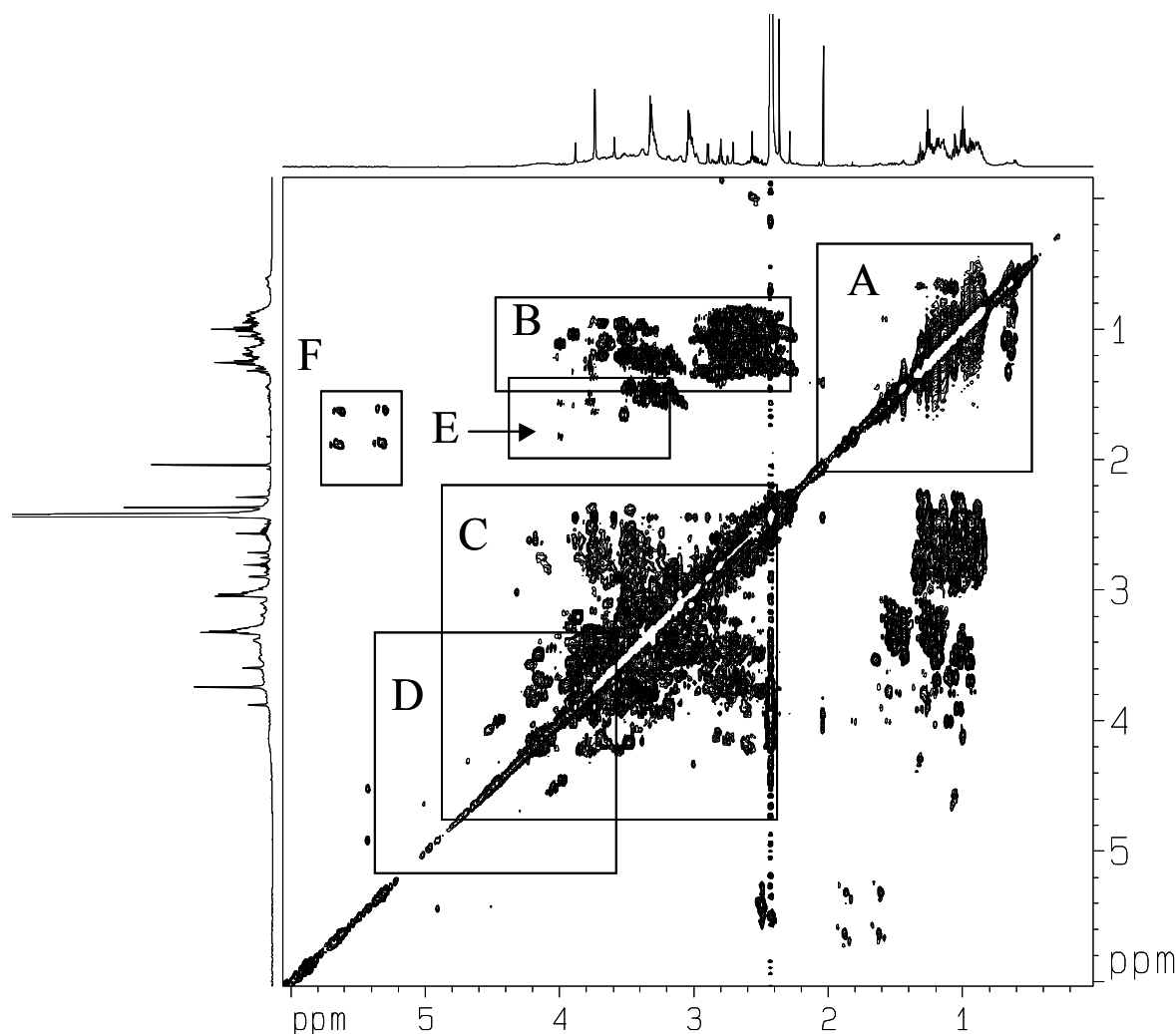


Abbildung 4-16: Ausschnitt des COSY-Spektrums von ^{13}C -methyliertem HO10FA,d+h

Diese Aussagen werden durch die HSQC-Spektren bestätigt. Im Bereich von δ (^{13}C): 30 - 50 ppm, δ (^1H): 2,2 – 4,3 ppm sind zahlreiche CH_2 - und CH -Konnektivitäten zu etwa gleichen Teilen zu sehen. Dies zeigt an, dass bei den Signalüberlagerungen von CH - und CH_2 -Gruppen in den ^1H -Spektren die etwas intensiveren Signale CH_2 -Gruppen sind. Dies bestätigt sich auch aus ihrer Multiplizität. Der hohe Anteil an CH -Gruppen lässt auf starke Verzweigung schließen, die entweder schon im Ausgangsmaterial (z.B. Cholsäure) vorhanden war oder

durch methylierungsspezifische Nebenreaktionen wie die C-Methylierung entstanden ist. Die in den Spektren enthaltenen Signale stimmen sehr gut mit den chemischen Verschiebungen im Ether-Ketonmodell überein, was die Vermutung über den hohen Anteil an diesen Gruppen bestätigt.

Der Bereich E im HSQC-Spektrum, welcher CH- und CH₂-Gruppen in mehrfach funktionalisierten Ethern zeigt, enthält ungefähr die gleiche Menge an Kreuzsignalen wie der Bereich A. Laut DEPT-Spektrum liegen in diesem ¹³C-Verschiebungsbereich fast ausschließlich CH₂-Gruppen. Dies spricht eindeutig gegen Strukturen von intakten methylierten Kohlenhydraten. Vielmehr ist hier deutlich die Insertion von Methylen als Folge der Methylierung mit Diazomethan zu erkennen.

Die teils überlagerten CH- und CH₂-Signale der Carminsäure erscheinen in diesem Bereich. Auch laut der ¹H- und der COSY-Spektren befinden sich unter und zwischen den intensitätsstärkeren CH₂-Gruppen einige CH-Gruppen. Allerdings sprechen auch die Kopplungen der COSY-Spektren im Bereich E eher für CH₂-Gruppen. Im Vergleich zum HSQC-Spektrum erscheinen hier aber etwas weniger Signale. In den ¹³C-methylierten HSQC-TOCSY-Spektren befinden sich „long-range“-Kopplungen im Bereich δ (¹H): 5,5 –6,8 ppm. Hier erwartet man CH-Signale von Alkenen. Dies lässt auf Bindungen zwischen Alkenen und CH-O-Gruppen schließen.

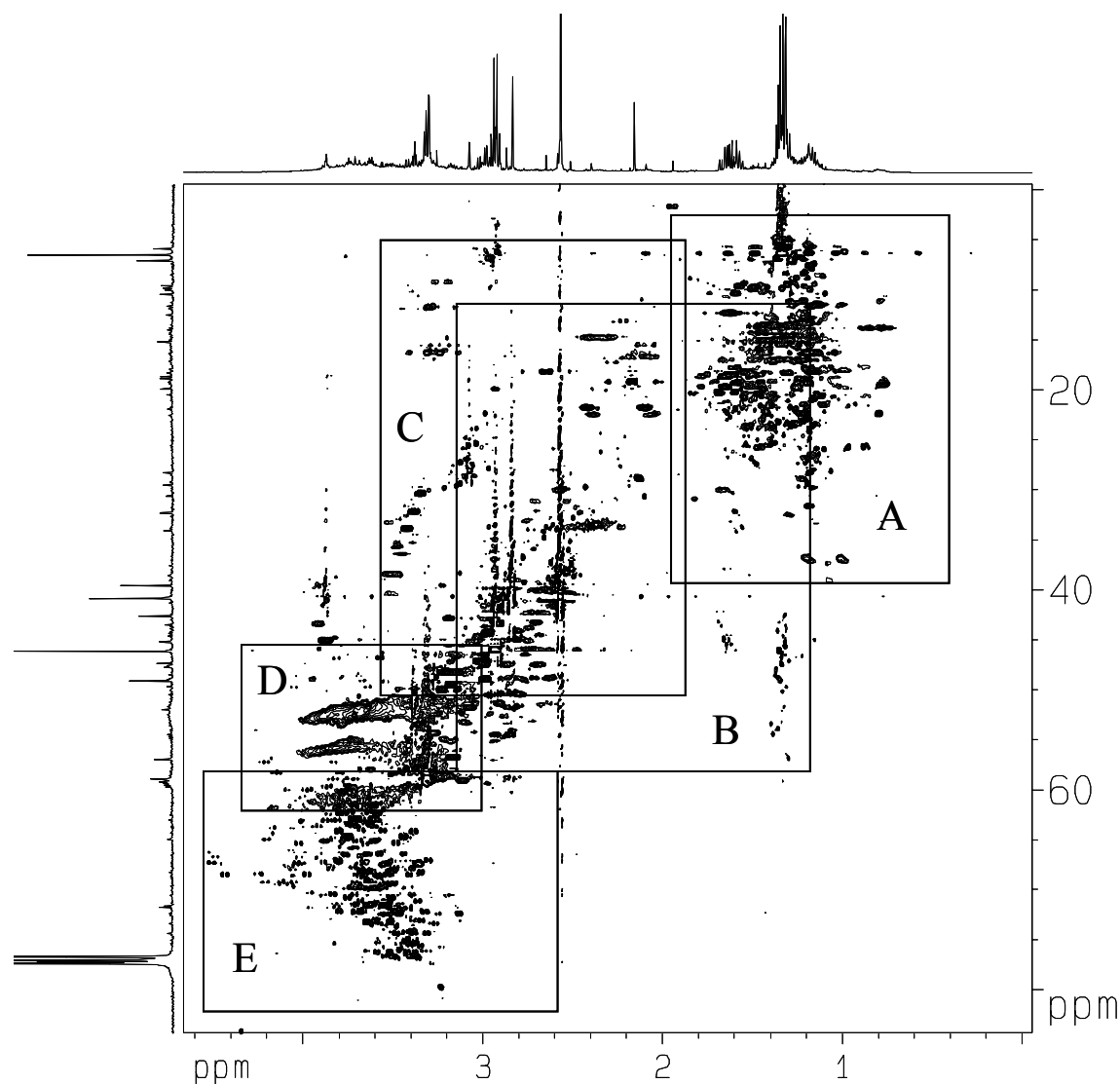


Abbildung 4-17: Ausschnitt des HSQC-Spektrums von $^{12}\text{C}, \text{HO10FA}, d+h$

Der Bereich D repräsentiert terminale OCH_3 -Gruppen sowie aliphatische und aromatische Methylester und -ether. D1 - D4 können im HSQC-Spektrum getrennt abgebildet und quantifiziert werden.

Die Anzahl der Signale in den einzelnen Unterbereichen ergibt sich wie folgt: $\text{D2} \sim \text{D3} > \text{D4} \gg \text{D1}$. Das zeigt, dass weitaus mehr aliphatische als aromatische Methylester und -ether vorhanden sind. Dies entspricht auch den COSY-Spektren. Trotz relativ niedriger Signaldispersion in F1 sind bei hoher Auflösung eine Vielzahl an Kreuzsignalen erkennbar.

Für diese Bereiche zusammengefasst lässt sich feststellen, dass Ether-Strukturen einen sehr hohen Anteil an den aliphatischen Strukturbausteinen und an den HS-Strukturen insgesamt haben. Die Etherstrukturen stammen wahrscheinlich nur zu einem geringen Teil aus aliphatischen Alkoholen. Man kann davon ausgehen, dass durch Nebenreaktionen wie die C-Methylierung und CH_2 -Insertionen für HS typische Komponenten wie Kohlenhydrate und

Aminosäuren weitgehend deutlich verändert wurden. Durch diese Veränderungen entsteht eine hauptsächlich aus Aliphaten, Ethern und Ketonen zusammengesetzte Struktur.

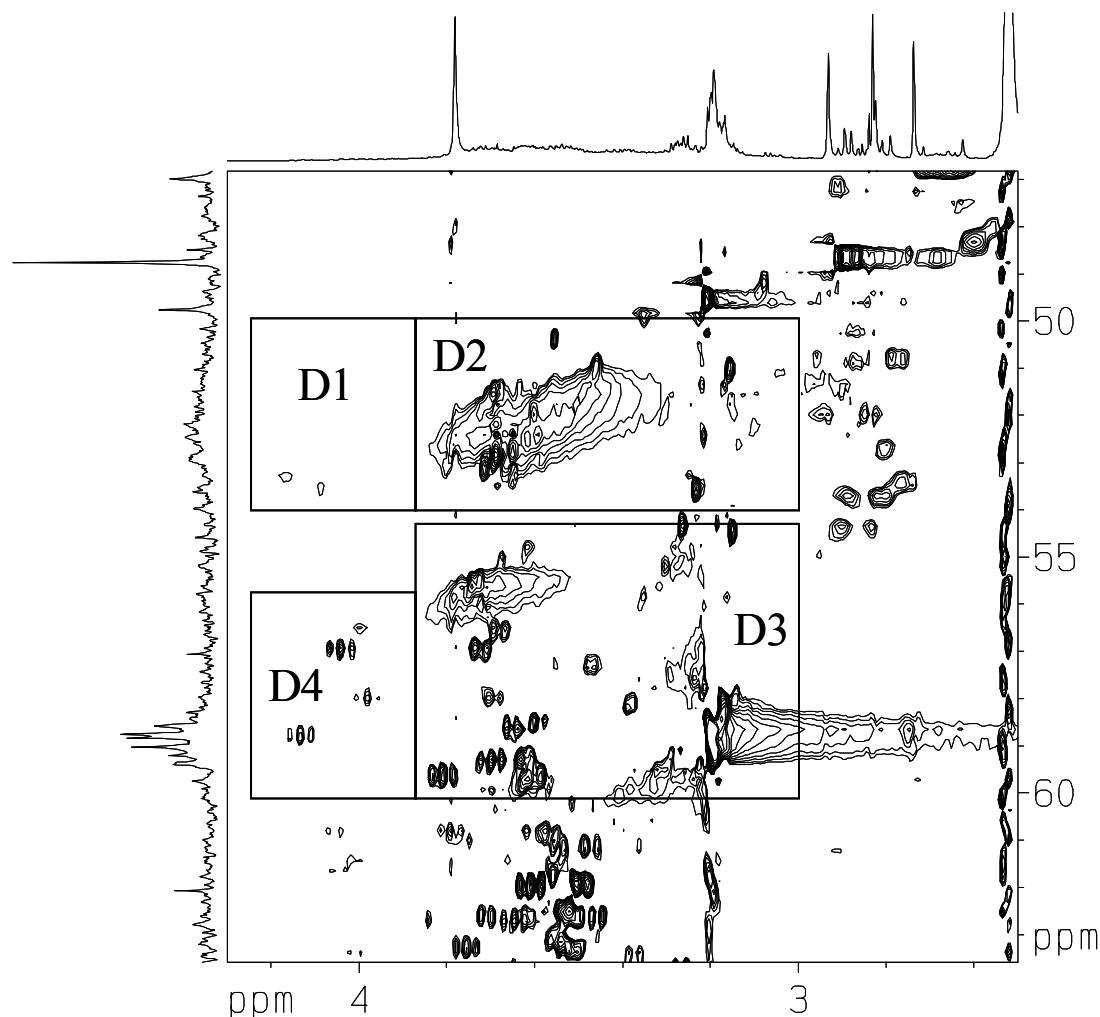


Abbildung 4-18: Ausschnitt D aus dem HSQC-Spektrum von ^{12}C -methyliertem HO10HA,d+h; D1: $\text{C}_{ar}\text{-C(O)OCH}_3$, D2: $\text{C}_{al}\text{-C(O)OCH}_3$, D3: $\text{C}_{al}\text{-OCH}_3$, D4: $\text{C}_{ar}\text{-OCH}_3$

Anomere CH-Gruppen finden sich in allen Spektren nur sehr vereinzelt. Dies deutet auch darauf hin, dass die sogenannten ehemaligen „Kohlenhydratstrukturen“ nicht von unabgebauten bzw. durch die Methylierung unzerstörten Zuckerbausteinen herrühren können. Mit Aliphaten koppelnde Alkene sind in allen Spektren des HS HO10 zu finden. Die COSY- und HSQC-Spektren sprechen hierfür. Laut der DEPT-Spektren handelt es sich bei der Multiplizität um Methin. Die Alkene sind eventuell durch Spaltungsreaktionen während der Methylierung entstanden. Dies würde das Fehlen der olefinischen Kreuzsignale von Ligninen und Tanninen bei δ (^1H) F1: ca. 4 ppm und δ (^1H) F2: 6,5 – 7 ppm erklären. Um die Nachbarschaft der Alkene zu bestimmen, werden die HSQC-TOCSY-Spektren zu Rate gezogen.

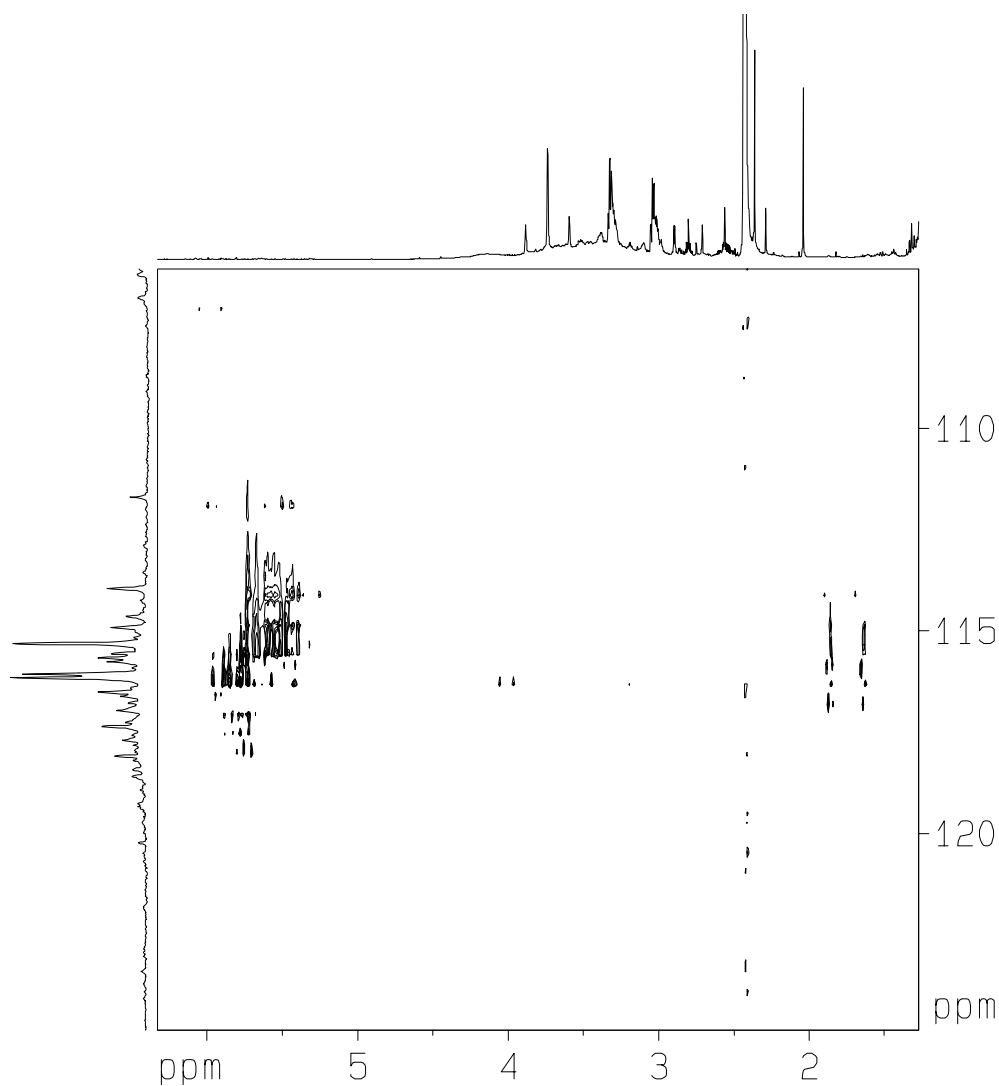


Abbildung 4-19: Ausschnitt des Alkenbereichs aus dem HSQC-TOCSY-Spektrum von ^{13}C -methylierter HO10HA, $d+h$

Diese zeigen bei den ^{13}C -methylierten FA- und HA-Spektren Kreuzsignale bei δ (^1H) 4,22 / 4,15 und 2,0 / 1,3 ppm.

Erstere stehen für CH-Gruppen, letztere für CH_2 -Gruppen, welche an ein quartäres C-Atom gebunden sind. Es ergeben sich die folgenden Strukturen:

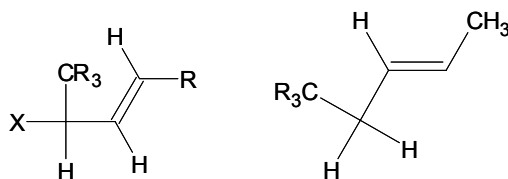


Abbildung 4-20: Spinsysteme von Alkenen; $X = \text{RCO-}$

Signale von Aromaten sind - wie aus den Integrationsdaten schon zu erwarten war - nur in sehr kleiner Anzahl auszumachen. In den HSQC-Spektren sind aromatische CH fast nicht zu erkennen. Nicht so in den COSY-Spektren. Diese zeigen zwar sehr intensitätsschwache, aber hervorragend aufgelöste Kreuzsignale im Bereich der aromatischen und olefinischen CH. Die olefinischen CH müssen vicinal zueinanderstehen und mit einem Aromaten und einem Keton substituiert sein oder mit einer CH_2OR -Gruppe, wie es bei Ligninen der Fall ist, um zu so hohem Feld verschoben zu werden. Ihre chemische Verschiebung überschneidet sich mit der der methylierten Phenole. Wie bei der Aufklärung des Bereichs D in HSQC-Spektren festgestellt wurde, enthalten die HO10-HS mehr methylierte Phenole als aromatische Estergruppen. Tatsächlich sind die Protonen der veresterten aromatischen Carboxysäuren ($\delta(^1\text{H}) > 7,3$ ppm) intensitätsschwächer und haben somit einen geringeren Anteil an aromatischen Wasserstoffen.

Der für Huminstoffe sehr niedrige Anteil an aromatischen Bestandteilen kann wahrscheinlich hauptsächlich auf die Abtrennung dieser Bestandteile bei der nicht vollständigen Lösung der Methylierungsprodukte in CDCl_3 bzw. CD_3OD zurückzuführen sein. Haiber hat Größenfraktionen der ROSIG-HS durch Mehrstufenultrafiltration gewonnen und durch NMR-Messungen festgestellt, dass die großen Moleküle vorwiegend aus aromatischen und kohlenhydratartigen Partialstrukturen bestehen, während kleinere Moleküle mehr aliphatische Partialstrukturen enthalten (75).

Das gerechnete Modell zeigt für Lignine und Tannine Kreuzsignale im gesuchten Bereich. Sowohl die Aromaten der Lignine als auch die der Tannine sind ein- bis mehrfach substituiert. Somit ergibt sich eine schwer zu quantifizierende Mischung.

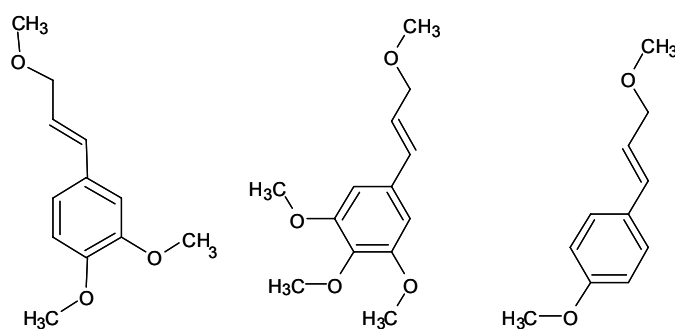


Abbildung 4-21: Struktur von Ligninen

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die methylierten HS bis zu ca. 95 % aus aliphatischen Anteilen bestehen. Diese untergliedern sich in teilweise stark verzweigte aliphatische Ketten und Ringe (ca. 40 %) und in Ether, Ketone und Ester (ca. 55 %), wobei

hier der Ether-Anteil der höchste ist. Die aromatischen Verbindungen spielen nur eine Nebenrolle. Auch Heteroatomstrukturen treten nur in sehr kleinen Mengen auf.

4.1.9 ZUSAMMENFASSUNG DER NMR-ERGEBNISSE

Alle hier angeführten NMR-Experimente geben detaillierte Informationen über die Struktur und / oder die Zusammensetzung von HS.

Die Methylierung mit ^{13}C -markierten und unmarkierten Reagenzien erlaubt speziell in den ^{13}C - und den HSQC-Spektren die Unterscheidung von nativen und durch die Methylierung eingebrachten CH_3 -Gruppen. Der Vergleich mit Spektren von underivatisierten HS und die Bildung von Differenzspektren zeigen, dass neben der Methylierung von aciden OH-Gruppen auch Nebenreaktionen wie C-Methylierung, Olefinbildung, Methyleninsertion und Spaltungsreaktionen aufgetreten sind.

Die Methylierungsreihenfolge wirkt sich nur geringfügig auf die Produktzusammensetzung aus. Unterschiede zwischen den verschiedenen Spektren sind zu erkennen, diese sind aber nicht systematisch. Lediglich die d+h-methylierten COSY-Spektren weisen im Vergleich zu ihren Pendants zusätzliche Kreuzsignale im Bereich von methylierten Ethern auf.

Die Integrationsdaten der 1D-Spektren stimmen gut mit den in der optischen Auswertung der 2D-Spektren festgestellten Anteilen an Partialstrukturen in den verschiedenen chemischen Verschiebungsbereichen überein. Die 2D-Integrationsdaten können nur als Tendenzen angesehen werden. Neben qualitativen Problemen verfälscht hier auch die Überschneidung einiger Strukturbereiche die Ergebnisse.

Nach der Methylierung lassen sich keine systematischen Unterschiede in Struktur bzw. Zusammensetzung von HAs und FAs ausmachen. Dies spricht für starke Strukturänderungen durch die Methylierung. Die gute Auflösung sowie die Signale im Alkenbereich lassen auf Nebenreaktionen wie Spaltungen und Olefinbildung deuten. Der hohe Anteil an CH-Gruppen, also die starke Verzweigung, weist auf C-Methylierung hin. Die weitgehende Abwesenheit von Kohlenhydrat- und Aminosäurestrukturen spricht für Methyleninsertionen. Das dadurch entstandene komplexe Gemisch verzweigter Alkane und Ether erklärt auch die weitgehende Ähnlichkeit der NMR-Spektren untereinander und die Gleichförmigkeit der NMR-Spektren von ^{12}C - und ^{13}C -markierten Materialien.

Aus den Integrationsdaten der 1D-NMR-Spektren und aus der gemeinsamen Auswertung aller NMR-Experimente ergibt sich für die methylierten ROSIG-HS die folgende Zusammensetzung:

Den Hauptbestandteil von ca. 90 – 95 % der HS machen aliphatische Partialstrukturen aus, welche sich aus freien, stark verzweigten aliphatischen Ketten und Ringen (ca. 35 - 40 %), bis

zu 55 % aus Ethern, Estern und Kohlenhydratfragmenten (Ether und Ketone) und aus Alkenen (ca. 5 %) zusammensetzen. Die aromatischen Verbindungen spielen nur eine untergeordnete Rolle.

Der hohe Anteil an verzweigten Alkylketten spricht stark für hopanoide Bestandteile in den HS. Hopane stellen mit einem geschätzten Vorkommen von 10^{12} t nach Cellulose die mengenmäßig bedeutendste organische Verbindung auf der Erde dar.

Der hohe Anteil an Methylethern und Ketonstrukturen (siehe Ether-Ketonmodell), welche aufgrund ihrer chemischen Verschiebung in Form von Ketten vorliegen, weist auf Cellulose- und sonstige Kohlenhydratfragmente hin.

Die Alkenstrukturen stammen entweder aus von Aromaten abgespaltenen Ligninstrukturen und/oder sind durch Spaltungen bedingt durch die Methylierung entstanden. Die aromatischen Strukturen, deren Substitutionsgrad aufgrund von Mischstrukturen auf ein- bis mehrfach vermutet wird, weisen ebenfalls auf Lignin- bzw. Tanninstrukturen hin. Die fehlenden Alken-Kreuzsignale im HSQC-Spektrum bestärken die Annahme der Abspaltung der Alkenstrukturen von den Aromaten in Ligninen.

4.2 ERGEBNISSE DER ASYMMETRISCHEN FLUSS- FELDFLUSSFRAKTIONIERUNG (AFFFF)

4.2.1 KALIBRIERUNG DER AFFFF

Bei Partikelgrößen über 100 kDa im Fall von Polymeren und ab einer Million Dalton bei Proteinen kann die Größenverteilung von Partikeln direkt, ohne Kalibrierung mit einem Konzentrationsdetektor (UV- oder RI-Detektor) und einem Lichtstredetektor, bestimmt werden. Bei kleineren Teilchen, wozu auch die Huminstoffe zählen, ist eine Kalibrierung des Gerätes notwendig. Hier soll zuerst das allgemeine Prinzip der Kalibrierung erklärt werden. Die Ergebnisse der verschiedenen Kalibrierstandards sind in 4.2.1.1 bis 4.2.1.3 aufgeführt. Um eine präzise Kalibrierung zu gewährleisten, sollten die verschieden großen Standards alle unter den selben Trennbedingungen (v.a. Trägerstrom, Querfluss) aufgenommen werden. Aus den Retentionszeiten der Standards am Peakmaximum (M_p) lassen sich die Diffusionskoeffizienten bestimmen. Eine doppelt logarithmische Auftragung des Molekulargewichts bzw. des Partikelradius gegen den Diffusionskoeffizienten ergibt die Kalibrationsgerade. Aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeiten der methylierten und der unmethylierten Huminstoffe wurden in dieser Arbeit verschiedene Eluenten und somit auch verschiedene Kalibrierstandards verwendet.

4.2.1.1 Polystyrolstandards in THF

Methylierte Huminstoffe sind sehr unpolar und deshalb nicht in Wasser löslich. Aus diesem Grund wurde THF als Eluent gewählt. THF ist das am häufigsten in der Literatur erwähnte Lösemittel für die FFF im organischen Bereich (110), (144), (145), (146). Die bisher in der Literatur genannten Messungen mit THF wurden fast alle mit einer thermischen FFF-Anlage durchgeführt. Als Kalibrierstandards werden Polystyrole (PS) genutzt, da sie über eine enge, fast Gauß-förmige Molmassenverteilung verfügen. Diese resultiert aus der ionischen Polymerisationsreaktion. Die Polydispersität M_w/M_n beträgt nur ungefähr 1 (110). Abbildung 4-22 zeigt die Retentionszeiten der Standards aufgetragen gegen die RI-Absorption.

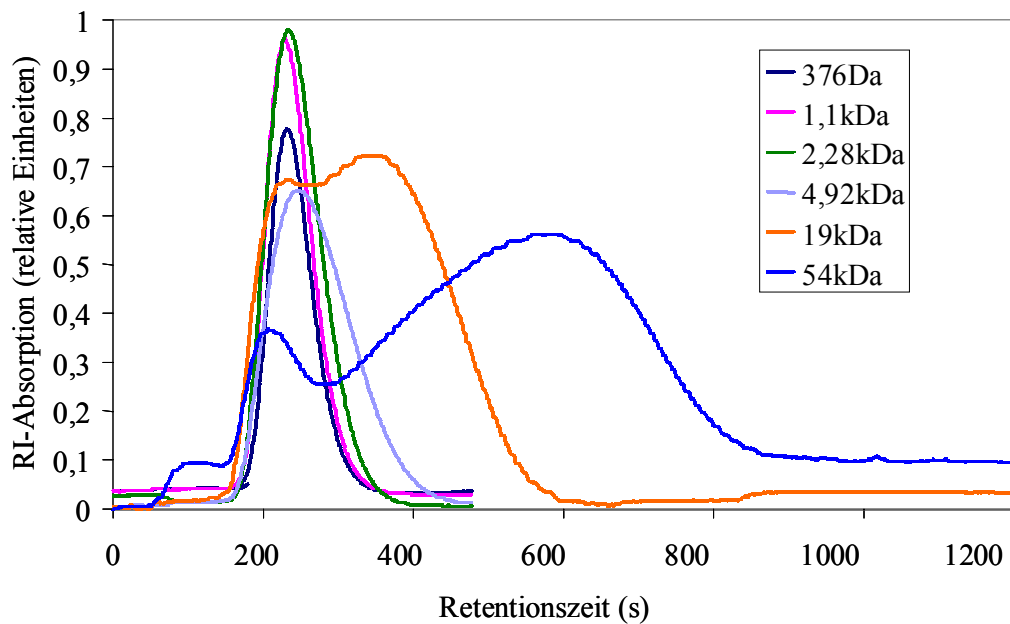


Abbildung 4-22: Polystyrolstandards in THF

Bei den drei kleinsten Standards ist kein wesentlicher Unterschied in den Retentionszeiten zu erkennen. Das ist mit dem großen „Cut-off“ der Membran von 10 kDa zu erklären. Dadurch entweicht ein großer Teil der kleinen Proben durch den Querfluss und der Rest eluiert mit dem Voidpeak. Um den Fehler der Geradengleichung der Kalibriergeraden möglichst gering zu halten, wurden für die Kalibrierung nur die Standards von 2,28 kDa bis 54 kDa berücksichtigt. Die Standardabweichung der Retentionszeiten liegt zwischen 0,31 und 1,16 %. Für den logarithmierten Diffusionskoeffizienten ergibt das eine Abweichung von 0,02 bis 0,09 %. Dies zeigt eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse an. Die folgende Abbildung zeigt die Kalibrationsgerade für die Bestimmung des Molekulargewichts (Da). Der Äquivalentradius lässt sich über den Diffusionskoeffizienten berechnen (siehe Kapitel 2.4.2.3).

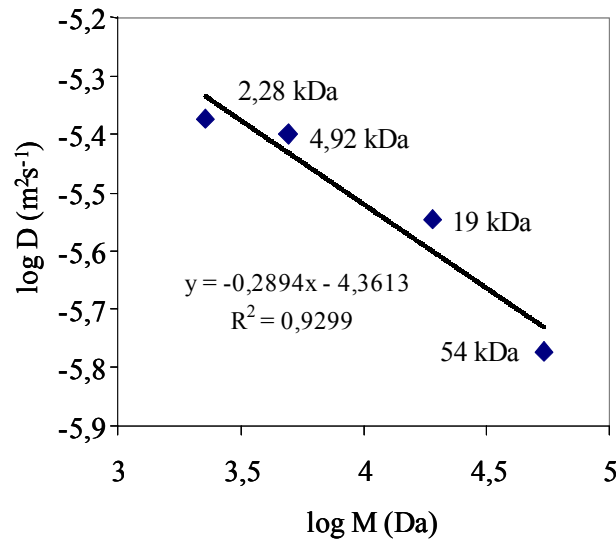


Abbildung 4-23: Kalibrationsgerade für die Bestimmung des Molekulargewichts mit der AFFFF

4.2.1.2 Polyethylenglykolstandards in Methanol

Die Polyethylenglykolstandards (PE) wurden für die Kalibrierung in Methanol eingesetzt (144). Die Wahl fiel auf Methanol als Flussmittel, da sich darin sowohl die methylierten als auch die unmethylierten Huminstoffe recht gut lösen. Dadurch ist ein direkter Vergleich der Größenverteilungen dieser Stoffe möglich. Fehler, welche durch Unterschiede in den Standards bzw. durch unterschiedliches Verhalten der Huminstoffe in den verschiedenen Lösemitteln entstehen, können somit ausgeschlossen werden. Wegen der großen Probenanzahl (methylierte und unmethylierte Huminstoffe) und der dadurch entstehenden langen Messzeit pro Probenreihe wurde die Reproduzierbarkeit der Kalibrierstandards an zwei Standards (420 und 4450 Da) getestet. Die Standardabweichung betrug 0,83 % für den 420 Da-Standard und 0,36 % für den 4,45 kDa-Standard. Trägt man die Retentionszeit gegen das Molekulargewicht auf, so ist, wie bei den PS-Standards, keine deutliche Auftrennung der Retentionszeit im niedermolekularen Bereich zwischen 420 und 970 Da zu erkennen. Der etwas besser passende lineare Trend ist mit der Membran zu begründen, welche einen Cut-off von 1 kDa hat. Wegen der geringen Trennleistung in diesem Bereich wurde für die Kalibriergerade auch hier auf die zwei kleinsten Standards verzichtet. Zwei Arten von Kalibrationsgeraden zur Bestimmung des Molekulargewichts sind in Abb. 4-24 gezeigt. Aus der rechten Kalibriergeraden lässt sich über den Diffusionskoeffizienten der Äquivalentradius bestimmen.

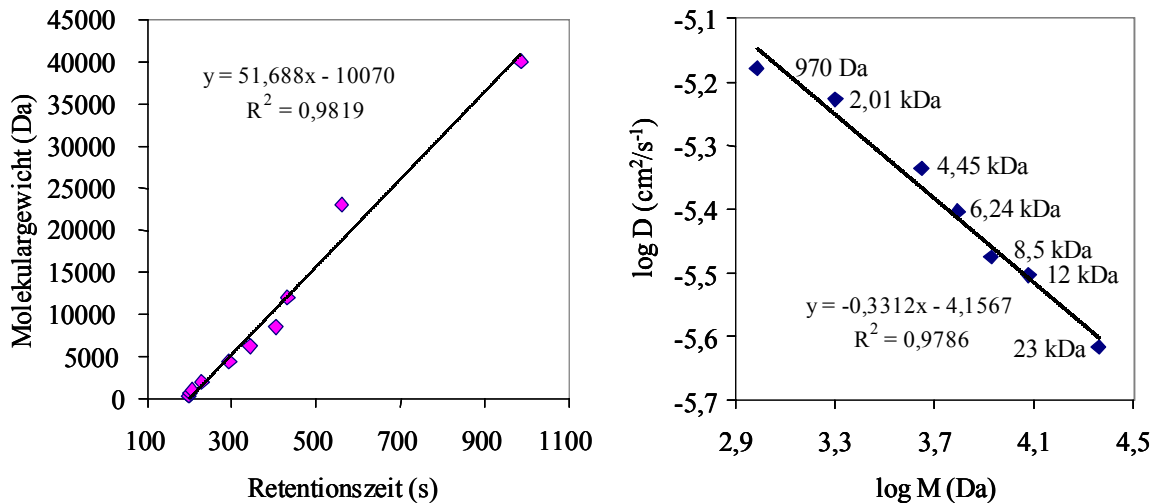


Abbildung 4-24: Kalibriergeraden von Polyethylenglykol für die Bestimmung des Molekulargewichts

4.2.1.3 Polystyrolsulfonatstandards im wässrigen Bereich

Die Spektren der unmethylierten Huminstoffe wurden in 0,1 M NaCl und 0,01 M NaCl aufgenommen. Polystyrolsulfonate (PSS) haben sich in der Vergangenheit als Standards für Huminstoffe in wässrigen Lösungen bewährt (36), (37), (38), (39), (40), (42), (110), (147), (148), (149), (150), (151), (152), (153), (154). Wegen ihrer polyelektrolytischen Beschaffenheit und ihrem sauren Charakter sind sie den Huminstoffen, was die Viskosität, den hydrodynamischen Radius usw. betrifft, viel ähnlicher als beispielsweise Polydextrane oder auch Polyethylenglykole (147). Die Standardabweichungen von den Retentionszeit-Mittelwerten lagen bei allen Standards in beiden NaCl-Konzentrationen unter 0,9 %, außer bei PSS-1100 Da in 0,1 m NaCl und 15,8 kDa in 0,01 M NaCl. Bei diesen beiden Standards betrug die Abweichung jeweils 2 %. Die Messungen im wässrigen Medium wurden mit der selben Membran wie die Methanolmessungen durchgeführt. Bemerkenswert ist hier, dass sich die PSS-Standards auch im sehr kleinen Molmassenbereich sehr gut trennen lassen. Dies kann u.a. damit erklärt werden, dass sich eine Hydrathülle um die Standards bildet, welche diese dann in der Fraktionierung größer erscheinen lässt. Solange die Standards den Huminstoffproben ähnlich genug sind und man davon ausgehen kann, dass auch die Huminstoffe eine Hydrathülle bilden, entsteht dadurch kein Fehler. Ein Grund für die sehr guten Trenneigenschaften generell können die idealen Trennbedingungen sein. Thang et al. (42) fanden heraus, dass das Elutionsvolumen, welches der Retentionszeit der Peakmaxima entspricht, stark konzentrationsabhängig ist. Diese Konzentrationsabhängigkeit wird allerdings erst bei Standards mit M_p größer 8 kDa sehr deutlich. Die kleineren Standards unterliegen nur einer nicht signifikanten Konzentrationsabhängigkeit (1,37 kDa: 0 % bis

8 kDa: 14 %). Somit trägt die Wahl von kleinen PSS-Konzentrationen zwar dazu bei, eine Retentionszeitenverteilung über einen größeren Zeitraum zu erhalten, eine Erklärung für die hervorragende Auftrennung der kleinen PSS-Standards liefert sie allerdings nicht. Nguyen und Beckett (154) haben die Ergebnisse von symmetrischen Fluss-Feldflussfraktionierungsmessungen mit den vom Hersteller mittels SEC angegebenen Molekulargewichten am Peakmaximum (M_p) verglichen. Es wurden Standards mit M_p 1,37 kDa bis 18,5 kDa untersucht. Die Abweichungen von den SEC-Angaben betragen bis zu 12 %. Abb. 4-25 zeigt die Retentionszeiten der PSS-Standards aufgetragen gegen die UV-Absorption. Daraus wurden die Diffusionskoeffizienten errechnet und die Kalibriergerade für die Bestimmung des Molekulargewichts entwickelt. Abb. 4-26 zeigt die Kalibriergeraden der PSS-Standards in 0,1 M NaCl und 0,01 M NaCl.

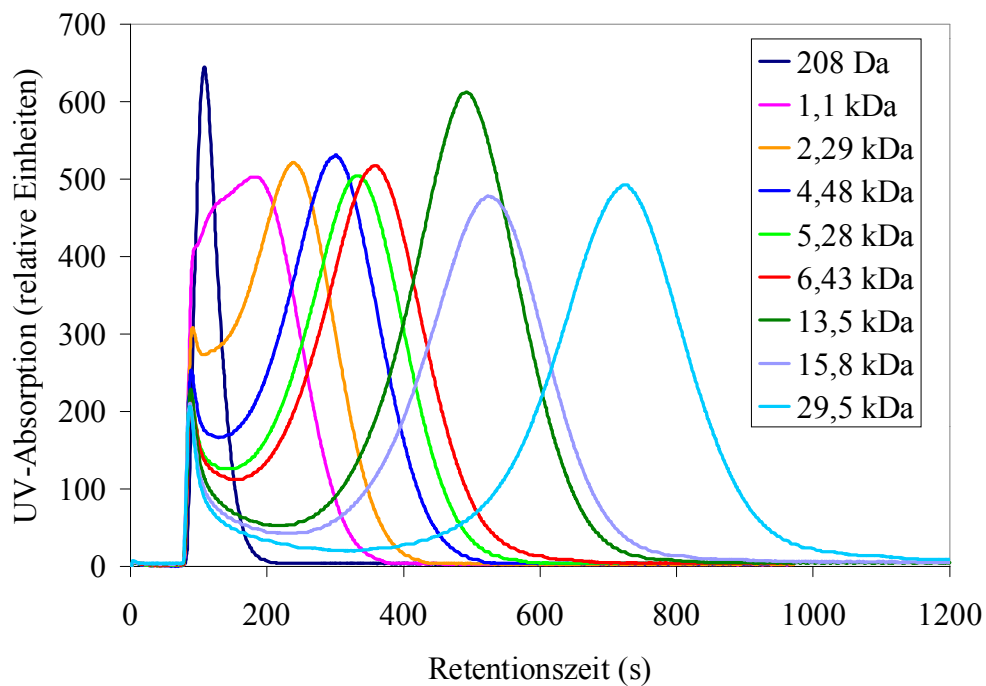


Abbildung 4-25: Molekulargewichtsverteilungen der PSS-Standards in 0,1m NaCl

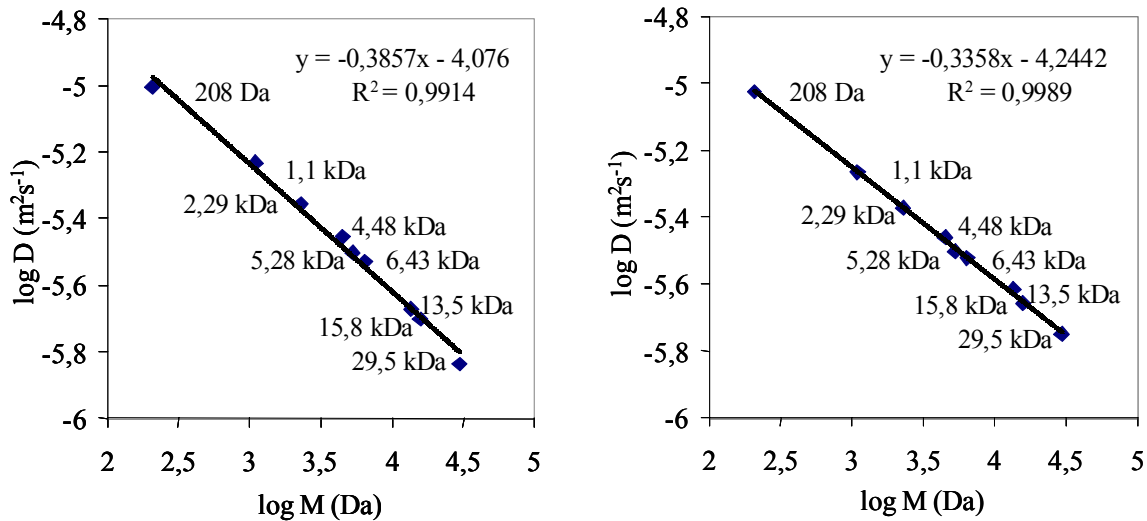


Abbildung 4-26: Kalibriergeraden der PSS-Standards; links in 0,1 m NaCl, rechts; in 0,01 m NaCl

Für beide Kalibriergeraden wurden wegen der guten Trennbedingungen auch im kleinen Molmassenbereich die Standards der Größen von 208 Da bis 29,5 kDa eingesetzt. Beide Geraden zeichnen sich durch ein sehr hohes Bestimmtheitsmaß von 0,9914 (0,1 M NaCl) und 0,9989 (0,01 M NaCl) aus.

4.2.2 MOLEKULARGEWICHTS- UND GRÖßENVERTEILUNGEN DER HUMINSTOFFE UND IHRER METHYLIERTEN DERIVATE

Wie schon unter 4.2.1 erwähnt, wurden die Huminstoffe und ihre methylierten Derivate aufgrund von Polaritäts- und Löslichkeitsunterschieden in verschiedenen Lösemitteln vermessen. Die Größenverteilungen der methylierten Huminstoffe wurden in THF und Methanol bestimmt, die des Ausgangsmaterials in Methanol und Natriumchlorid-Lösungen.

Aus den Retentionszeiten wurden, bezogen auf die jeweiligen Kalibrierstandards, die Diffusionskoeffizienten und das Molekulargewicht berechnet. Aus dem Diffusionskoeffizienten lassen sich die hydro- bzw. solvatodynamischen Durchmesser der untersuchten Moleküle berechnen. Eine genauere Berechnung des hydro- bzw. solvatodynamischen Durchmessers ist zu erreichen, wenn das Massen-Volumenverhältnis und die Form der betrachteten Substanz bekannt sind.

Zur Beschreibung der Größenverteilung von Molekülen werden drei Größen herangezogen: das Zahlenmittel, oder auch numerisch gemittelt Molekulargewicht (M_n) genannt, welches sich aus der Mittelung der Zahlenhäufigkeit aller Spezies einer Verteilung ergibt, das gewichtsgemittelte Molekulargewicht (M_w), das als das massennormalisierte Molekulargewicht definiert ist, und das Molekulargewicht am Peakmaximum (M_p). Diese

Parameter korrelieren mit den physiko-chemischen Eigenschaften der Probe. Das Verhältnis M_w/M_n umschreibt die Polydispersität ($M_w/M_n = 1$ entspricht einem monodispersen System) (42), (110).

4.2.2.1 Methylierte Huminstoffe in THF

Zur Größenbestimmung mit der AFFFF wurden die ^{12}C -methylierten (unmarkierten) Huminstoffe eingesetzt. Die Substanzen wurden mit der im Material- und Methodenteil beschriebenen Kombinationsmethode sowohl in der Reihenfolge Hakamori gefolgt von Diazomethan als auch Diazomethan gefolgt von Hakamori methyliert. Somit erhält man pro Huminstoff zwei methylierte Proben.

Die Werte der Diffusionskoeffizienten am Peakmaximum liegen zwischen $3,8 \times 10^{-10}$ und $5,2 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$. Das entspricht Molekulargewichten und solvatodynamischen Durchmessern am Peakmaximum von 3,57 kDa (2,30 nm) bis 4,47 kDa (2,38 nm). Die entsprechenden numerisch- (M_n) und gewichts- (M_w) gemittelten Molekulargewichte liegen zwischen 3,63 kDa und 5,95 kDa (M_n) und zwischen 4,83 kDa und 9,21 kDa (M_w). Eine systematische Beeinflussung der Größenverteilung durch die Reihenfolge der Methylierung ist nicht ersichtlich. Die folgende Abbildung zeigt die Größenverteilungen der ROSIG-Huminstoffe nach Methylierung mit Methyljodid (nach Hakamori) gefolgt von Diazomethan.

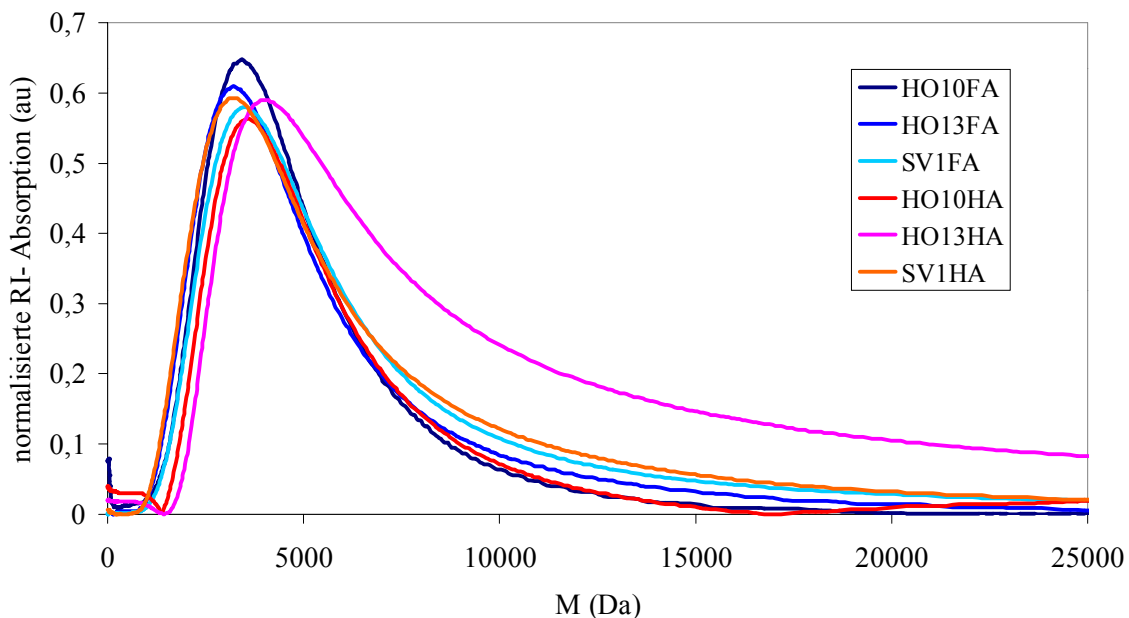


Abbildung 4-27: Größenverteilung der methylierten ROSIG-Huminstoffe; blau: Fulvinsäuren, rot: Huminsäuren

Die methylierten Huminstoffe unterscheiden sich untereinander in ihrer Größenverteilung nur wenig. Die methylierten Fulvinsäuren sind etwas kleiner als die entsprechenden Huminsäuren. Dies entspricht den Erwartungen. Die Form der Verteilung ist, bis auf HO13HA, recht eng und fast symmetrisch mit einem leichten Tailing zu größeren Molmassen hin. HO13HA,h+d zeigt eine breitere Molmassenverteilung, speziell im Molmassenbereich über dem Peakmaximum. Dies ist eine Ausnahme, da die Probe HO13HA,d+h (Diazomethanmethylierung gefolgt von Methyljodid) ansonsten ähnliche Eigenschaften wie auch alle anderen Huminstoffe aufweist. Die Ergebnisse der methylierten Referenzsubstanz Carminsäure liegen im selben Bereich wie die der Huminstoffe.

Die solvatodynamischen Durchmesser sind vergleichsweise klein. Eine direkte Korrelation von Molmasse und solvatodynamischem Durchmesser ist nur dann möglich, wenn die Molekülform bekannt ist. Dies ist bei Huminstoffen nicht der Fall. Der solvatodynamische Durchmesser errechnet sich aus dem Diffusionskoeffizienten (siehe Allgemeiner Teil). Literatur über Diffusionskoeffizienten von Huminstoffen in THF liegt bisher nicht vor. Gründe für die hohen Werte für die Diffusionskoeffizienten und die daraus resultierenden kleinen solvatodynamischen Durchmesser werden in Kapitel 4.2.3 diskutiert. Die Diffusionskoeffizienten, Molekulargewichts- und Größenbereiche der Huminsäuren in NaCl-Lösungen sind in Tabelle 4-10 zusammengefasst. Tabellen zu den M_p -, M_n - und M_w -Werten, den Polydispersitäten, den Diffusionskoeffizienten und den solvatodynamischen Durchmessern für alle untersuchten methylierten Huminstoffe befinden sich in Anhang G.

Tabelle 4-10: Diffusionskoeffizienten, Zahlenmittel und Gewichtsmittel von methylierten Huminstoffen in THF; FA: Fulvinsäure, HA: Huminsäure, SD: solvatodynamischer Durchmesser

	FA	HA
M_w (kDa)	4,83-6,47	5,87-9,21
M_n (kDa)	3,63-4,26	3,91-5,95
M_p (kDa)	3,57-3,93	3,57-4,47
M_w / M_n	1,26-1,59	1,34-1,60
SD_w (nm)	2,45-2,59	2,54-2,88
SD_n (nm)	2,39-2,50	2,45-2,77
SD_p (nm)	2,30-2,37	2,30-2,38
D^a	3,97-5,22	3,82-4,08

^a: D ($\times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$)

4.2.2.2 Huminstoffe in Methanol

In der über mit FFF-Technik vermessene Huminstoffe vorliegenden Literatur wird Methanol als Lösemittel nicht erwähnt. Zum einen liegt das sicher daran, dass bisher nur underivatisierte Huminstoffe betrachtet wurden. Da Huminstoffe organische Substanzen mit natürlichem Vorkommen im Boden bzw. in Gewässern sind, kommt ein wässriger Eluent verständlicherweise den Eigenschaften der Huminstoffe am nächsten und ist somit am geeignetsten. Außerdem haben sich die Polystyrolsulfonat-Standards aufgrund ihres polyelektrolytischen und sauren Charakters als den Huminstoffen sehr ähnlich erwiesen (147), (155). Da Polystyrolsulfonate in Methanol nicht löslich sind, muss man sich eines anderen Standards bedienen, und zwar den Polyethylenglykolen. Polyethylenglykole werden als Standards in der Size-Exclusion-Chromatography (SEC) für Huminstoffe eingesetzt. Dabei werden der polyelektrolytische Charakter und die strukturellen Besonderheiten der Huminstoffe vernachlässigt, was zu Abweichungen vom „wahren“ Molekulargewicht führen kann (32).

Da sich aber sowohl Huminstoffe als auch ihre methylierten Derivate in Methanol größtenteils lösen, wurde es gewählt, um Molekulargewichte und Durchmesser der methylierten Huminstoffe direkt mit denen der unmethylierten zu vergleichen.

Die Diffusionskoeffizienten aller gemessenen Proben in Methanol umspannen einen sehr kleinen Bereich von $6,09 \times 10^{-10}$ bis $6,32 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$. Dies weist auf nur geringe Unterschiede bzgl. Größe und Molekulargewicht hin.

Die Molekulargewichte am Peakmaximum (M_p) für die methylierten Fulvinsäuren sind fast identisch. Sie variieren nur zwischen 1,40 kDa (1,26 nm) und 1,57 (1,31 nm) kDa. Ein sehr ähnliches Bild zeigt sich bei den underivatisierten Fulvinsäuren. Der Größenbereich liegt hier zwischen 1,38 kDa (1,26 nm) und 1,51 kDa (1,30 nm). Auch die entsprechenden Huminsäuren umspannen nur einen sehr kleinen Bereich. Die Peakmaxima liegen zwischen 1,42 kDa (1,27 nm) und 1,53 kDa (1,3 nm) im Fall der methylierten Huminsäuren und zwischen 1,38 kDa (1,26 nm) und 1,51 kDa (1,3 nm) für die unmethylierten ROSIG- und IHSS-HS. Es ist bei den Peakmaxima somit kein wesentlicher Unterschied in der Größe und der Molmasse der methylierten und der unmethylierten Huminstoffe zu erkennen. Auch die Fulvin- und Huminsäuren haben ihre Peakmaxima im selben Bereich.

Ganz ähnlich verhalten sich auch die Zahlenmittel (M_n) und die Gewichtsmittel (M_w). Fulvin- und Huminsäuren unterscheiden sich hier nur unwesentlich voneinander. Die methylierten Derivate sind tendenziell nur minimal größer als die Ausgangsmaterialien. Auch in der Signalform unterscheiden sich die methylierten nicht von den unmethylierten Proben. Die

Signale verfügen über eine enge, fast symmetrische Verteilung mit einem leichten Tailing zu größeren Molmassen bzw. Durchmessern hin. Tabelle 4-11 zeigt die Diffusionskoeffizienten, Molekulargewichts- und Größenbereiche der Zahlen- und der Gewichtsmittel. Die M_p -, M_n - und M_w -Werte für alle untersuchten Proben befinden sich in Anhang G.

Tabelle 4-11: Diffusionskoeffizienten, Zahlenmittel und Gewichtsmittel von Huminstoffen in Methanol. FA: Fulvinsäure, HA: Huminsäure

	FA methyliert	FA	HA methyliert	HA
M_w (kDa) R ^a	2,40-2,67	2,29-2,74	2,17-4,24	2,27-2,80
M_w (kDa) I ^b	n.d.	n.d.	n.d.	2,24-2,68
M_n (kDa) R ^a	1,47-1,76	1,53-1,68	1,55-1,86	1,47-1,65
M_n (kDa) I ^b	n.d.	n.d.	n.d.	1,45-1,70
M_p (kDa) R ^a	1,40-1,57	1,38-1,51	1,42-1,53	1,38-1,51
M_p (kDa) I ^b	n.d.	n.d.	n.d.	1,40-1,46
M_w / M_n R ^a	1,43-1,68	1,49-1,67	1,41-2,29	1,55-1,75
M_w / M_n I ^b	n.d.	n.d.	n.d.	1,53-1,62
SD_w (nm) R ^a	1,42-1,47	1,41-1,47	1,41-1,61	1,40-1,48
SD_w (nm) I ^b	n.d.	n.d.	n.d.	1,40-1,47
SD_n (nm) R ^a	1,35-1,41	1,35-1,40	1,36-1,47	1,34-1,40
SD_n (nm) I ^b	n.d.	n.d.	n.d.	1,34-1,40
SD_p (nm) R ^a	1,26-1,31	1,26-1,30	1,27-1,30	1,26-1,30
SD_p (nm) I ^b	n.d.	n.d.	n.d.	1,26-1,28
D ^c R ^a	6,09-6,32	6,18-6,35	6,15-6,29	6,18-6,35
D ^c I ^b	n.d.	n.d.	n.d.	6,23-6,32

^a: R: ROSIG-Huminstoff

^b: I: IHSS-Huminstoffe

^c: D ($\times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$)

Da keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Retentionszeiten sowohl der Fulvin- und der Huminsäuren als auch der methylierten und der unmethylierten Substanzen zu erkennen sind, und da Peakmaxima, Gewichts- und numerische Mittel der verschiedenen Proben in einen erstaunlich engen Bereich fallen, muss man sich Gedanken über die Qualität der Ergebnisse machen. Zu Molekulargewichtsverteilungen von Huminstoffen in reinem Methanol liegt zwar keine Literatur vor, Conte und Piccolo (18) beschreiben allerdings Größenveränderungen von FAs und HAs durch Zugabe von etwas Methanol zu den wässrigen Lösungen. Demnach sind die HS durch die Zugabe von Methanol kleiner geworden. Die ermittelten Ergebnisse stimmen mit dieser Aussage überein. Allerdings waren bei Conte und Piccolo die HAs auch nach der Zugabe von Methanol größer als die FAs. Die fast identischen Ergebnisse für FAs und HAs könnten auch darauf hinweisen, dass Methanol aufgrund von Reaktionen mit den methylierten Huminstoffen als Lösemittel nicht geeignet ist. Weiterhin ist es auch möglich, dass die Huminstoffe Wechselwirkungen mit der Membran eingehen, was neben Quellung der Membran auch zu deren teilweiser Auflösung führen kann. Beides ist

unwahrscheinlich, da es unter diesen Umständen nicht möglich gewesen wäre, über mehrere Tage hinweg konstante, reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Außerdem kommt durch Wechselwirkungen mit den methylierten Huminstoffen noch ein Aufladen der Membran in Frage, welches dazu führen könnte, dass die Huminstoffe von der Membran abgestoßen werden und deshalb alle zur selben Zeit eluieren. Auch dies ist eher unwahrscheinlich, da derartige Wechselwirkungen in den NaCl-Lösungen der underivatisierten HS, welche mit der selben Membran aufgenommen wurden, nicht beobachtet wurden.

Aufgrund der eben genannten Unsicherheiten und da sich, wie an fehlender Literatur ersichtlich ist, Methanol als Flussmittel für die AFFFF bisher nicht durchsetzen konnte, sind die Ergebnisse interessant, jedoch kritisch zu betrachten.

4.2.2.3 Huminstoffe in 0,1 M und 0,01 M NaCl

Wässrige Lösungen sind die gängigen Flussmittel für die Huminstoffuntersuchung mittels Feldflussfraktionierung. Die Fluss-FFF hat sich unter den FFF-Techniken als die für Huminstoffe am geeignetsten etabliert (26), (36), (37), (38), (39), (40), (42), (150), (151), (152), (153). Für die hier beschriebenen Ergebnisse wurde eine Membran der Firma POSTNOVA Analytik aus regenerierter Cellulose mit einem „Cut-off“ von 1 kDa genutzt. Als Flussmittel wurden in der vorliegenden Arbeit Natriumchlorid-Lösungen verwendet. Da die Ionenstärke laut Klein (41) einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Intensität und die Verteilungsbreite der Huminstoffe hat, wurden zur Evaluierung der idealen Ionenstärke Polystyrolsulfonat-Standards (PSS) und Huminstoffe in 0,01 M, 0,1 M und 0,5 M NaCl aufgenommen. Es wurde kein Unterschied in der Intensität der Signale für die Konzentrationen 0,01 und 0,1 M NaCl festgestellt. Bei 0,5 M NaCl nahm die Intensität stark ab. Die Verteilungen waren in 0,01 M NaCl etwas breiter als in 0,1 M NaCl. Bei der Erhöhung auf 0,5 M NaCl machte sich ein wesentlicher Unterschied hin zu breiteren Verteilungen bemerkbar. Klein fand eine starke Steigerung der Intensität der Verteilungen bis zu 0,1 M NaCl und einen schnellen, sehr starken Abfall bei weiterer Erhöhung der Ionenstärke. Laut Schimpf et al. (37) wirkt sich die Variation der Ionenstärke nicht auf die Intensität und die Verteilungsbreite aus. Im Gegensatz zu den Messungen in Methanol und THF ist der Voidpeak bei den Messungen im wässrigen Bereich sehr viel stärker ausgeprägt. Da die Huminstoffe sehr klein sind und nahe am unteren Detektionslimit liegen, treten Voidpeak und Probenpeak bei ähnlichen Retentionszeiten auf und überlagern sich. Bei der Methodenentwicklung war es deshalb auch wichtig, neben der Intensität die Bedingungen für die beste Abtrennung des Probensignals vom Voidsignal zu optimieren. Da einige Huminstoffe bei 0,1 M NaCl und andere bei 0,01 M NaCl eine etwas bessere Abtrennung

zeigten, wurden alle Huminstoffe sowohl bei einer Salzkonzentration von 0,01 M NaCl- als auch in 0,1 M NaCl-Lösung aufgenommen. Die Signalform zeichnete sich im Gegensatz zu den Signalformen in Methanol und THF durch ein starkes Tailing zu großen Molmassen bzw. Durchmessern hin aus. Dies entspricht auch den Literaturangaben (26), (40), (42). In Abb. 4-28 werden die Kurven von HO10 (FA und HA) und von drei PSS-Standards gegenübergestellt.

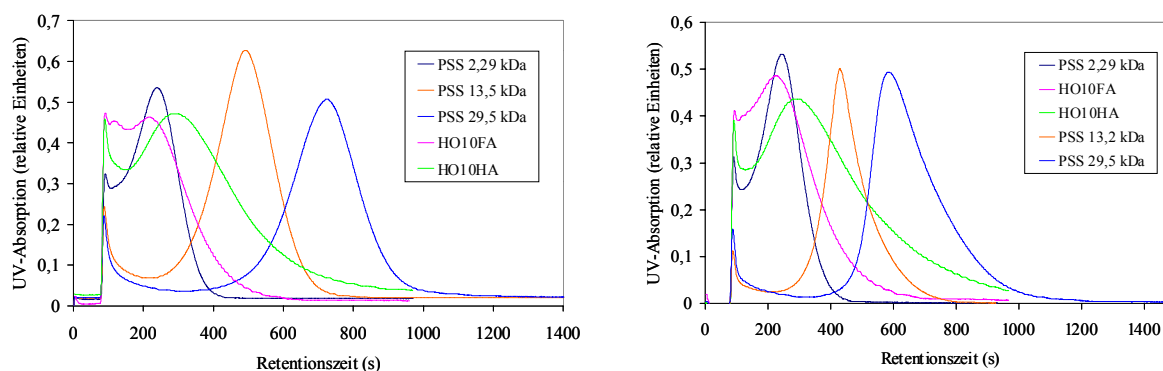


Abbildung 4-28: HO10 (FA und HA) und PSS-Standards in 0,1 M NaCl (links) und 0,01 M NaCl (rechts)

Die Diffusionskoeffizienten liegen in einem Bereich von $3,6$ bis $5,2 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Die M_p -Werte der Fulvinsäuren sind zwischen 28 und 54 % kleiner als die entsprechenden Huminsäuren. Die IHSS-Bodenuminsäuren liegen sowohl in ihren Peakmaxima als auch in ihren M_n - und M_w -Werten zwischen den ROSIG-Fulvin- und den ROSIG-Huminsäuren. Die Fulvin- und die Huminsäure von HO13 wurden im Rahmen des DFG-ROSIG-Programms mittels SEC relativ zu Polyethylenglycol-Standards und zu IHSS-FA-Standards gemessen. Die relativ zu den Polyethylenglycol-Standards erzielten M_n -Werte (FA: 2768 g / mol, HA: 3121 g / mol) stimmen sehr gut mit den Ergebnissen der AFFFF in 0,1 M NaCl überein (FA: 2450 g / mol, HA: 3070 g / mol) (143).

Die Diffusionskoeffizienten, Molekulargewichts- und Größenbereiche der HS in NaCl-Lösungen sind in Tabelle 4-12 zusammengefasst. Tabellen zu den M_p -, M_n - und M_w -Werten, den Polydispersitäten, den Diffusionskoeffizienten und den hydrodynamischen Durchmessern für alle untersuchten HS befinden sich in Anhang G.

Tabelle 4-12: Diffusionskoeffizienten, Molekulargewichts- und Größenbereiche der HS in NaCl-Lösungen sowie Literaturwerte

	0,1 m NaCl		0,01 m NaCl		Literatur	
	FA	HA	FA	HA	FA	HA
M_w (kDa) R/L ^a	4,49-12,10	6,82-11,34	6,44-9,37	12,57-17,90	0,75-4,10	3,00-20,00
M_w (kDa) I ^b	n.d.	4,62-6,44	n.d.	5,30-10,86	n.d.	3,09-3,38
M_n (kDa) R/L ^a	1,15-3,55	3,07-3,26	1,12-3,09	2,76-3,18	0,61-1,60	1,10-3,73
M_n (kDa) I ^b	n.d.	2,10-2,30	n.d.	1,03-1,95	n.d.	3,02-3,25
M_p (kDa) R/L ^a	1,29-1,84	1,91-3,56	1,33-1,85	1,73-3,63	0,98-4,40	1,35-11,00
M_p (kDa) I ^b	n.d.	1,60-1,91	n.d.	1,71-1,92	n.d.	n.d.
M_w / M_n R/L ^a	2,72-3,90	2,20-3,69	2,43-8,36	3,95-6,48	0,90-2,80	0,98-6,00
M_w / M_n I ^b	n.d.	2,12-2,81	n.d.	4,05-5,56	n.d.	0,98-1,06
HD_w (nm) R/L ^a	1,00-1,60	1,38-1,59	0,98-1,33	1,51-1,67	n.d.	n.d.
HD_w (nm) I ^b	n.d.	1,18-1,30	n.d.	1,09-1,38	n.d.	n.d.
HD_n (nm) R/L ^a	0,89-1,32	1,23-1,31	0,96-1,20	1,28-1,35	n.d.	n.d.
HD_n (nm) I ^b	n.d.	1,05-1,12	n.d.	0,90-1,12	n.d.	n.d.
HD_p (nm) R/L ^a	0,81-0,94	0,95-1,21	0,85-0,95	0,93-1,19	1,00-3,00	1,60-4,65
HD_p (nm) I ^b	n.d.	0,89-0,95	n.d.	0,92-0,96	n.d.	n.d.
D^c R/L ^a	4,62-5,17	3,59-4,56	4,56-5,10	3,64-4,66	1,90-3,90	1,05-2,95
D^c I ^b	n.d.	4,56-4,88	n.d.	4,50-4,68	n.d.	2,74-2,95

^a: R: ROSIG-Huminstoff, L: Huminstoffe aus der Literatur

^b: I: IHSS-Huminstoffe

^c: D ($\times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$)

Die Literaturwerte entstanden alle in wässrigen Eluenten in Relation zu PSS-Standards. Lösemittelzusammensetzungen, pH-Werte und Ionenstärken variierten von Literatur zu Literatur (26), (36), (37-42).

Die Molekulargewichte der HAs liegen alle im Literaturbereich. Auch die Polydispersitäten stimmen mit den Literaturwerten überein. Selbiges gilt für die Molekulargewichte der FAs am Peakmaximum. Die dazugehörigen M_w - und M_n -Werte sowie die Polydispersitäten liegen dagegen oft oberhalb der Literaturbereiche. Vor allem in 0,01 M NaCl-Lösung liegen die Ergebnisse weit über den Literaturwerten. Wie zuvor schon erwähnt, neigen sowohl Standards als auch Huminstoffe bei einer Ionenkonzentration von 0,01 M NaCl zu breiteren Verteilungen. Die Breite der Verteilung ist mit der Wahl des Flussmittels zu begründen. Dycus et al. (40) haben in einer Veröffentlichung Molekulargewichte und Diffusionskoeffizienten von IHSS-Standards untersucht. Die Werte sind nicht direkt vergleichbar, da die Standards aus verschiedenen Chargen stammen, was bei HS schnell zu völlig unterschiedlichen Ergebnissen führen kann. Das wäre eine Erklärung für die fehlende Übereinstimmung der Ergebnisse. Die hydrodynamischen Durchmesser aller gemessenen Proben, bis auf die FAs in 0,01 M NaCl, liegen unterhalb des Bereichs der Literaturwerte. Im Gegensatz zu den Molekulargewichten werden die hydrodynamischen Durchmesser nicht

direkt gemessen, sondern über die Diffusionskoeffizienten berechnet, welche im Vergleich zur Literatur um den Faktor 1,2 bis 3 zu groß sind. Auf die Gründe hierfür wird in Kapitel 4.2.3 eingegangen.

Unter den selben Messbedingungen wurde auch eine Piperazin-Membran der Firma DOW (FILMTEC NF200) mit einem „Cut-off“ von 200 Da getestet. Wie in Abb. 4-29 zu erkennen ist, haben die Signale vergleichbare Formen mit den Signalen, welche mit der POSTNOVA-Membran gemessen wurden. Allerdings sind die Voidpeaks schlechter von den Probenpeaks abgetrennt, weswegen die POSTNOVA-Membran für weitere Messungen genutzt wurde.

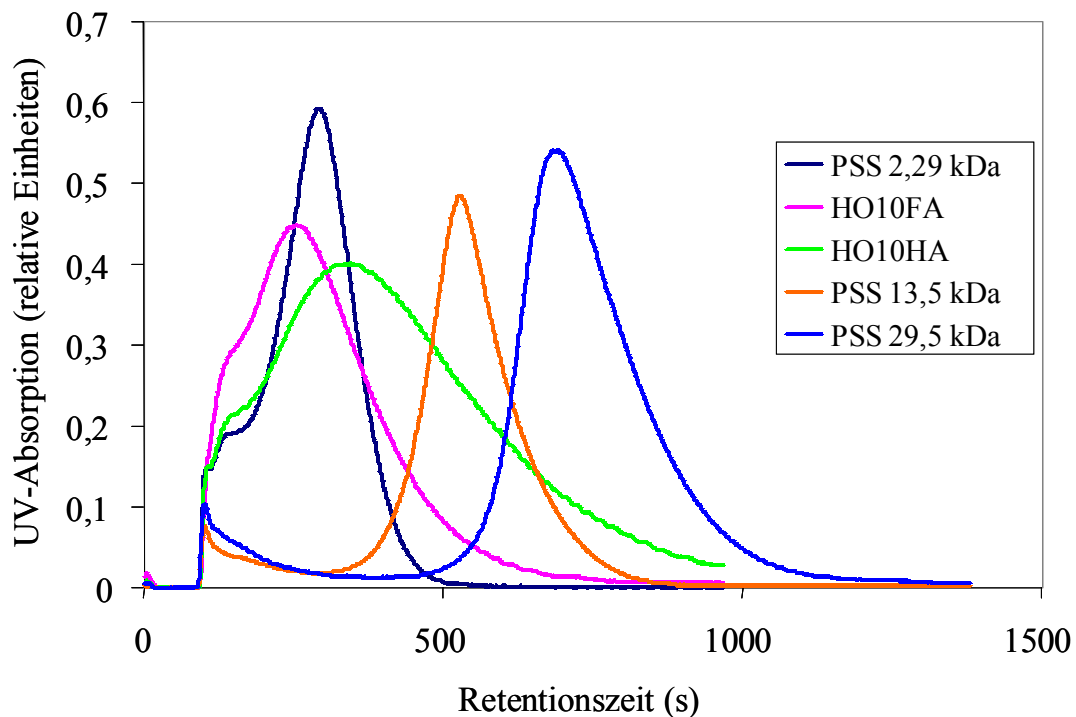


Abbildung 4-29: HO10 (FA und HA) und PSS-Standard-Messungen in 0,01 M NaCl mit DOW-Membran

4.2.3 DISKUSSION DER BERECHNUNG DER DIFFUSIONSKOEFFIZIENTEN

Wie bereits unter 2.4.2.3 hergeleitet, lässt sich der Diffusionskoeffizient wie folgt aus den experimentellen Daten berechnen:

$$D = \frac{t_0 \cdot w^2 \cdot V_c}{V_0 \cdot 6 \cdot t_R} \quad \text{Gleichung 2-27}$$

t_0 : Retentionszeit des Voidpeaks, w : Kanalhöhe, V_c : Querflussrate, V_0 : Totvolumen des Kanals, t_R : Retentionszeit der Probe

Der Diffusionskoeffizient für ein sphärisches Partikel mit dem Durchmesser d kann aus der Stokes-Gleichung berechnet werden:

$$D = \frac{k \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d} \quad \text{Gleichung 2-29}$$

k: Boltzmannkonstante, T: Temperatur, η : Viskositätskoeffizient des Eluenten

Durch Zusammenfassen von Gleichung 2-27 und Gleichung 2-29 erhält man den Zusammenhang zwischen der Retentionszeit eines Analyten und seinem Äquivalentdurchmesser:

$$d = \frac{2 \cdot k \cdot T \cdot V_0 \cdot t_R}{w^2 \cdot V_c \cdot \pi \cdot \eta \cdot t_0} \quad \text{Gleichung 2-30}$$

Die Retentionszeit des Voidpeaks ist, sofern das Probensignal den Voidpeak nicht überlagert, eindeutig zu bestimmen. Da die Huminstoffe teilweise nur schlecht vom Voidsignal abgetrennt sind, wurden zur Bestimmung von t_0 entsprechend große Standards verwendet. Die Abweichungen der t_0 -Werte von den Mittelwerten lagen unter 1 % für Methanol und NaCl-Lösungen und unter 5 % für THF. Somit ist der durch die Totzeit entstehende Fehler sehr gering.

Die Kanalhöhe kann durch ein Quellen der Membran variieren. Laut Angaben der Firma POSTNOVA Analytics quillt die Membran für die Methanol- und Wassermessungen („Cut-off“: 1 kDa) um 100 μm in beiden Lösemitteln, die Membran für die THF-Messungen („Cut-off“: 10 kDa) um 150 μm . Eine exakte Abschätzung der Kanalhöhe ist nicht möglich, da die Membran während der Messungen etwas „flattert“, was zu unterschiedlichen Kanalhöhen sogar während einer Messung führen kann. Die Spacerhöhe (entspricht der theoretischen Kanalhöhe) beträgt bei der verwendeten Anlage 0,5 mm. Ein Quellen der Membran von 100 μm entspricht also schon einer 20 % kleineren Höhe. Da die Kanaldicke quadratisch in die Gleichung des Diffusionskoeffizienten eingeht, führen kleine Abweichungen der Kanalhöhe schon zu großen Fehlern der wahren Werte des Diffusionskoeffizienten. Die Werte für die errechneten Diffusionskoeffizienten liegen über den in der Literatur angegebenen. Ein Grund dafür kann sein, dass die Membranen mehr als angegeben gequollen sind, was zu einer geringeren Kanalhöhe führt, welche wiederum kleinere Diffusionskoeffizienten ergeben würde.

Durch die Querflussrate V_c entstehen bei einwandfreier Funktionstüchtigkeit der Spritzenpumpe keine nennenswerten Fehler.

Das Totvolumen des Kanals kann auf mehrere Arten berechnet werden. Zum einen kann man es über die Abmessungen des Kanals errechnen. Die Kanalfäche beträgt 25,19 cm^2 . Bei einer Höhe von 0,035 bzw. 0,04 cm ergibt sich ein Totvolumen von 0,88 bzw. 1,01 ml. Bei dieser Berechnung geht man davon aus, dass sich der Trägerstrom und die Probe über das gesamte Kanalvolumen verteilen. Da sich der Injektionsport aber 1,5 cm vom Port des Trägerstroms

entfernt befindet, durchläuft die Probe nicht die ganze Kanalfläche. Dies wird in der folgenden Definition des Totvolumens des Kanals berücksichtigt.

$$V_0 = t_0 \cdot \text{Lam}_{\text{out}} - V_{\text{K} \rightarrow \text{D}}$$

Gleichung 4-1

t_0 : Retentionszeit des Voidpeaks, Lam_{out} : Laminarfluss am Auslass-Port, $V_{\text{K} \rightarrow \text{D}}$: Volumen der Kapillaren bis zum Detektor

Setzt man in diese Gleichung die lösemittelabhängigen Totzeiten und Laminar-out-Flüsse ein, so erhält man für THF und Methanol ein Totvolumen des Kanals von 0,29 ml, für NaCl-Lösungen von 0,26 ml. Das mittlere Totvolumen ist 0,28 ml mit einer Standardabweichung von 7 %. Diese Werte unterscheiden sich maßgeblich von den direkt berechneten Werten von 0,88 ml bzw. 1,01 ml. In der Literatur wird nicht beschrieben, wie jeweils das Totvolumen des Kanals bestimmt wurde. Um experimentell festzustellen, welches der Totvolumina eher dem wahren Totvolumen entspricht, wurde eine gefärbte Probe mehrmals im Kanal aufgetrennt. Anschließend wurde die Membran entnommen. Der Farbstoff lief vom Injektionsport geradlinig, also über eine geringere Fläche als die Kanalgrundfläche zum Ausflussport. Somit entspricht die Berechnung des Totvolumens über die Totzeit, den Laminarfluss-out und das Kapillarenvolumen wohl eher dem wahren Totvolumen.

Diese Berechnung birgt allerdings mehrere Fehlerquellen. Zum einen betragen die Laminar-out-Flüsse aufgrund des hohen Querflusses nur 0,1 bzw. 0,2 ml. Bei derart geringen Flüssen neigt die Laminarpumpe zu leichten Unregelmäßigkeiten, welche den Wert des Totvolumens verfälschen. Außerdem mussten die Kapillaren vom Kanalausgang bis zu den Detektoren mit einem Maßband vermessen werden, da Angaben zu ihrem Totvolumen vom Hersteller nicht vorlagen. Die Kapillarlängen innerhalb der Detektoren wurden vom Hersteller abgeschätzt, beinhalten also auch einen Fehler.

Zum Vergleich der Auswirkungen der verschiedenen Totvolumina und Kanalhöhen auf Diffusionskoeffizient, hydrodynamischen Durchmesser und M_p wurde die methylierte Huminsäure HO10HA_{h+d} in THF für die Variation Totvolumen / Kanalhöhe von 0,28 ml / 0,05 cm (keine Quellung der Membran), 0,28 ml / 0,035 cm (Berücksichtigung der Quellung der Membran) und 0,88 ml / 0,035 cm untersucht. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse:

Tabelle 4-13: Vergleich der Auswirkungen verschiedener V_0 und w auf M_p , D und SD_p

	M_p (kDa)	D ($\times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$)	SD_p (nm)
0,28 ml / 0,05 cm	3,56	7,93	1,2
0,28 ml / 0,035 cm	3,98	3,95	2,36
0,88 ml / 0,035 cm	3,98	1,32	7,1

Während bei den M_p -Werten keine großen Abweichungen zu erkennen sind, halbiert sich der Diffusionskoeffizient bei einer Quellung der Membran um 150 μm nahezu, was zu einer Verdopplung des solvatodynamischen Durchmessers führt. Noch stärker wirkt sich das unterschiedliche Totvolumen aus. Der Diffusionskoeffizient beträgt bei einem Totvolumen von 0,88 ml nur noch ein Drittel des Wertes bei 0,28 ml Totvolumen, was zu einem dreimal so großen Durchmesser führt. Für die in Abschnitt 4.2.2 beschriebenen Berechnungen wurde von einer Kanalhöhe von 0,035 cm und einem Totvolumen von 0,28 ml ausgegangen.

4.2.4 ABHÄNGIGKEIT DER ERGEBNISSE VON DEN GEWÄHLTEN STANDARDS

Das gängige Flussmittel in der FFF-Technik ist Wasser. Da zu Anwendungen im wässrigen Bereich zahlreiche Literatur vorliegt, stand im Mittelpunkt, die den Eigenschaften der Huminstoffe am ehesten entsprechenden Standards zu finden, um eine möglichst genaue Darstellung des Molekulargewichts und der dazugehörigen Größen zu erhalten.

Der Betrieb der Fluss-Feldflussfraktionierung mit organischen Flussmitteln ist noch nicht so etabliert. Von daher war das Ziel, zum einen Flussmittel zu finden, in denen die methylierten HS löslich sind, und zum anderen Standards, welche reproduzierbare Kalibrierreihen in den entsprechenden Flussmitteln liefern.

4.2.4.1 Wässrige Lösungen

Die effektive hydrodynamische Größe eines Moleküls ist eine Funktion von Masse, Wechselwirkungen mit dem Trägerstrom (z.B. Bildung einer Hydrathülle in Wasser) und der Geometrie. Das Verhältnis zwischen Molmasse und Größe ist in Abbildung 4-30 für kugelförmige Proteine, Dextrane und Polystyrolsulfonate dargestellt.

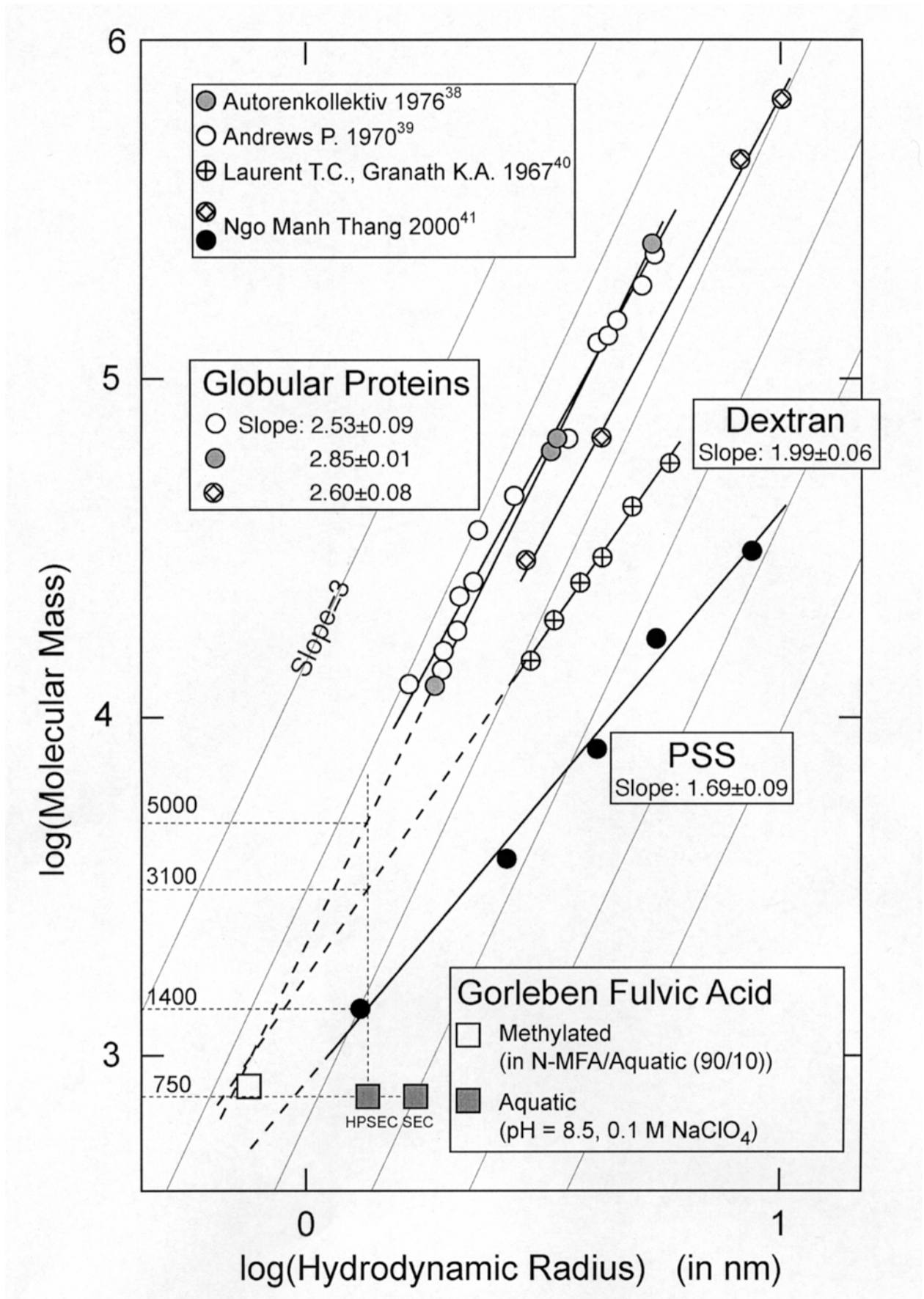


Abbildung 4-30: Verhältnis zwischen Molmasse und Größe von HS in Relation zu verschiedenen Standards

Es würde sich eine Steigung von drei ergeben, wenn sich die effektive Dichte eines Moleküls, welche durch Masse geteilt durch Volumen umschrieben wird, mit steigender Masse nicht ändern würde. Kugelförmige Proteine zeigen, wie zu erwarten war, ein ähnliches Verhalten. Die anderen Standards haben eine kleinere Steigung, was bedeutet, dass das Verhältnis Größe zu Masse mit steigender Masse ebenfalls steigt. Diese Abweichung von der Kugelform könnte mit der Bildung von größeren Hydrathüllen bei größeren Massen erklärt werden. Für die Fulvinsäure Gohy-573 wurden mit SEC und HPSEC eine Molmasse von 750 Da und hydrodynamische Radien von 1,7 nm (SEC) bzw. 1,3 nm (HPSEC) ermittelt. Der Vergleich mit den Kalibrierstandards ergibt Molmassen von 1,4 kDa (PSS), 3,1 kDa für Dextrane und 5 kDa für die kugelförmigen Proteine (26). Da die erhaltenen Ergebnisse doch stark variieren, ist es wichtig, Standards zu wählen, die in ihren Eigenschaften und in ihrem Verhalten im entsprechenden Lösemittel den zu messenden Proben sehr ähnlich sind. Wie bereits erwähnt, haben sich die Polystyrolsulfonatstandards im wässrigen Medium wegen ihrer polyelektrolytischen Beschaffenheit und ihres sauren Charakters bewährt (155).

4.2.4.2 Methanol

Über den Einsatz von Methanol als Fließmittel für die AFFFF liegt noch nicht viel Literatur vor. In einer Arbeit von Mori (156) werden Polystyrol-Latex-Partikel-Standards mit Sedimentations-Feldflussfraktionierung untersucht. Nach seinen Erkenntnissen ist die Retentionszeit der Partikel in reinem Methanol etwas kürzer, als durch die Giddingsche Retentionstheorie berechnet (siehe Allgemeiner Teil). Nach Zugabe eines ionischen Aerosol-OT-Surfactants zum Methanolträgerstrom stimmen die Retentionszeiten mit der Theorie überein. Allerdings kann Mori nicht ausschließen, dass die leichten Abweichungen von der Theorie durch eine Quellung der Standards in Methanol entstanden sind.

Kirkland et al. (144) publizierten 1992 als erste in Methanol erzielte Ergebnisse mit der Fluss-Feldflussfraktionierung. Die Experimente wurden mit einer Membran aus unmodifizierter regenerierter Cellulose durchgeführt. Mehrere Lösemittel wurden mit Polystyrol- und Poly(methylmethacrylat)-Standards getestet. Diese Standards wurden in den getesteten nichtprotischen, organischen Lösemitteln Toluol, Methylethylketon und Dioxan von der Membran adsorbiert. Die Kombinationen dieser Standards mit den genannten Lösemitteln waren also nicht geeignet. Die polaren Polyethylenoxide eluierten der Theorie entsprechend unter bestimmten Umständen mit Methanol. In reinem Methanol zeigten die Fraktogramme zwei Signale. Es wurde eine zerstörerische Wechselwirkung der Polyethylenoxide mit sich selbst oder mit der Membran vermutet. Dieser Effekt konnte durch die Zugabe von Ammoniumacetat beseitigt werden.

In dieser Arbeit wurden Polyethylenglykole eingesetzt. Wechselwirkungen mit sich selbst oder der Membran konnten nicht festgestellt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Standards in reinem Methanol der Theorie entsprechend eluieren. Ob diese Standards für den Vergleich mit HS und ihren methylierten Derivaten geeignet sind, lässt sich nur schwer sagen, da über das Verhalten der HS in organischen Lösemitteln nicht viel bekannt ist.

4.2.4.3 THF

THF ist das am häufigsten eingesetzte Lösemittel in der organischen FFF, fast ausschließlich in der thermischen FFF (110), (146), (157). Kirkland et al. (144) haben es als erste als Trägerstrom in der Fluss-FFF verwendet. Alle genannten Autoren verwenden für unterschiedliche Anwendungen Polystyrolstandards und haben unabhängig voneinander eine gute Übereinstimmung mit Ergebnissen aus anderen Analysetechniken, wie z.B. SEC, erzielt. Für die Eignung von Polystyrolen im Vergleich zu methylierten Huminstoffen gelten dieselben Aussagen wie für Methanol.

4.2.5 VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER METHYLIERTEN HUMINSTOFFE IN METHANOL UND THF

Die Ergebnisse der methylierten Huminstoffe in Methanol stimmen bis auf den Faktor zwei gut mit denen in THF überein. Die Verteilungen der Molmassen und der solvatodynamischen Durchmesser befinden sich innerhalb der jeweiligen Lösemittel alle in einem recht engen Bereich. Die Molekulargewichte der methylierten FAs am Peakmaximum zeigen Standardabweichungen von durchschnittlich 3 %. Dasselbe gilt für die methylierten HAs in Methanol. In THF weichen diese durchschnittlich 7 % vom Mittelwert ab.

Der einzige wesentliche Unterschied ist, dass sich die Molekulargewichte und somit auch die Größen der Fulvinsäuren in Methanol nicht wesentlich von denen der HAs unterscheiden, während die FAs in THF, wie erwartet, etwas kleiner sind als die HAs. Durchschnittlich sind die FAs in THF am Peakmaximum (M_p) 4 % kleiner als die Huminsäuren, in ihren numerischen (M_n) und Gewichtsmitteln (M_w) unterscheiden sie sich um 11 bzw. 14 %. Dass Molmassen, Diffusionskoeffizienten und solvatodynamische Durchmesser in Methanol nur etwa halb so groß wie in THF sind, kann folgende Ursachen haben.

THF ist ein unpolares Lösemittel als Methanol. Da die HS durch die Methylierung an Polarität stark abnehmen, lösen sie sich in THF besser als in Methanol. Dies kann dazu führen, dass größere Bestandteile der Huminstoffe in Methanol nicht in Lösung gegangen sind und somit bei der Fraktionierung nicht berücksichtigt wurden. Dies würde vergleichsweise geringere M_w - und M_n -Werte zur Folge haben. Diese Begründung unterstützen die sehr

ähnlichen Polydispersitäten der derivatisierten Huminstoffe in den beiden Lösemitteln allerdings nicht. Sie liegen im Fall von Methanol sogar leicht über den Werten in THF.

Ein weitaus wichtigerer Grund ist die Berücksichtigung der Kalibrierstandards. Es handelt sich hier um eine relative Kalibrierung. Polystyrol kann in THF eine andere Konformation haben als die Huminstoffe, d.h. wenn Polystyrol in THF kugelförmig wäre und die methylierten Huminstoffe die Form von Stäbchen hätten, so würde ein methylierter Huminstoff im Vergleich zu Polystyrol relativ groß erscheinen. Weiterhin muss die Konformation von Polystyrolen in THF nicht der Konformation von Polyethylenglykol in Methanol entsprechen. Dasselbe gilt für die Konformation der methylierten Huminstoffe in THF und Methanol.

Die eben genannten eventuellen Konformationsunterschiede könnten zumindest teilweise durch die Wahl eines Standards gelöst werden, welcher sowohl in THF als auch in Methanol löslich ist. Ein solcher Standard wurde in dieser Arbeit nicht gefunden, das Problem wäre aber nur unzureichend gelöst, da nicht gesagt ist, dass ein solcher Standard in Methanol und THF eine identische Konformation aufweist.

Ein weiterer Lösungsansatz ist die Mark-Houwink-Konstante. Über sie lässt sich der Lösemittelleffekt herausrechnen. Man hätte somit eine universelle Kalibration. Dafür müssten allerdings die Werte für die Konstante für methylierte Huminstoffe in Methanol und in THF bekannt sein, was nicht der Fall ist.

4.2.6 VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER HUMINSTOFFE IN METHANOL UND WÄSSRIGEM MEDIUM

Die underivatisierten Huminstoffe verhalten sich in Methanol und wässrigem Medium untereinander ebenfalls sehr ähnlich. Die ROSIG-Fulvinsäuren sind in Methanol am Peakmaximum 8 bis 20 % und die IHSS-Huminsäuren 10 bis 30 % kleiner als in den NaCl-Lösungen. Die ROSIG-Huminsäuren sind in Methanol um 20 bis 60 % kleiner. Diese Größenabweichungen lassen sich teilweise wie unter 4.2.5 beschrieben erklären. Conte und Piccolo (18) erzielten mit HPSEC-Messungen im wässrigen Medium (A) und in einer Mischung des wässrigen Mediums mit Methanol (B) um 8 bis 13 % (FA) bzw. 2,5 bis 53,5 % (HA) geringere Werte in Lösung B als in Lösung A. Für beide Fließmittel wurde die HPSEC mit Polysacchariden kalibriert. Diese Werte bestätigen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse. Da in der Arbeit von Conte und Piccolo darauf geachtet wurde, dass Ionenstärke und pH konstant bleiben, lässt sich die Größenänderung nur wie folgt erklären: Methanol ist in der Lage, sowohl Van der Waals Bindungen mit den hydrophoben HS-Komponenten als auch Wasserstoffbindungen mit den sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen in HS-

Kolloiden zu bilden. Schon kleine Mengen Methanol reichen aus, um schwache Kräfte, welche HS-Assoziationen stabilisieren, in offenbar große Aggregate zu spalten. Es resultiert also eine Auftrennung in kleinere HS-Moleküle. Conte und Piccolo beobachteten auch eine Reduzierung der Signalintensität. Das indiziert, dass die totale molekulare Absorptivität der Probe in Methanol niedriger (Hypochromismus) ist als im wässrigen Kontrollmedium, weshalb eine Separierung der Moleküle wahrscheinlicher ist als ein Zusammenpacken zu einem „random coil“. Eine logische Folgerung ist, dass durch die Zugabe von Methanol HS-Assoziationen gespalten werden und sich kleinere Aggregate bilden (18).

Wie schon bei den methylierten HS beobachtet, ist auch bei den unmethylierten HS in Methanol kein Größenunterschied zwischen den ROSIG-Fulvin- und den dazugehörigen Huminsäuren auszumachen, während die Fulvinsäuren im wässrigen Medium um 28 bis 50 % kleiner als die Huminsäuren sind.

Generell erhält man im wässrigen Milieu breitere Molekulargewichts- und Größenverteilungen als in Methanol. Dies zeigen auch die HPSEC-Messungen von Conte und Piccolo. Die Signale im wässrigen Milieu neigen zu einem deutlichen Tailing zu höheren Molekulargewichten bzw. Größen. Die Molekulargewichte der verschiedenen Huminstoffe liegen am Peakmaximum in Wasser etwas weniger dicht beisammen als in Methanol. Während die Standardabweichung der Werte für die Peakmaxima bei den Huminstoffen in Methanol nur 3 % (FA) bzw. 4 % (HA) beträgt, liegt sie in den NaCl-Lösungen bei 14 % (FA) bzw. 25 % (HA). Die breitere Verteilung in Wasser macht sich vor allem bei den Polydispersitäts- und den M_w -Werten bemerkbar. Polydispersitäten von durchschnittlich 1,6 (ROSIG-FA und -HA und IHSS-HA) in Methanol stehen Werten von 2,4 bis 3,35 (0,1 M NaCl) bzw. 4,9 bis 5,5 (0,01 M NaCl) in Wasser gegenüber. Conte und Piccolo fanden für die Fulvinsäuren in Methanol ähnliche Werte, generell trat bei ihnen aber nur eine leichte unregelmäßige Änderung der Polydispersitäten auf. Die HS-Polydispersitäten rangierten zwischen 1,6 und 2,1 (FA) und 1,5 und 5,3 (HA) in Lösung B (Methanol) und 1,6 und 2,1 (FA) und 2,0 und 5,3 (HA) in Lösung A (wässriges Medium).

Insgesamt wurde festgestellt, dass die Molekulargewichts- und Größenverteilungen der unmethylierten Huminstoffe sowohl in Methanol als auch in Wasser im Bereich der Literaturwerte liegen. Erstaunlich ist, dass Fulvin- und Huminsäuren in Methanol keine wesentlichen Größenunterschiede zeigen, während die Fulvinsäuren, den Erwartungen entsprechend, sowohl in THF als auch in den NaCl-Lösungen vor den Huminsäuren eluierten. Dies lässt darauf schließen, dass die Huminstoffe eventuell mit Methanol reagiert haben bzw.

dass Wechselwirkungen der Membran mit Methanol oder /und mit den Huminstoffen auftraten.

4.2.7 ERGEBNISSE VON CARMINSÄURE UND IHREN METHYLIERTEN DERIVATEN IN DEN VERSCHIEDENEN FLIEßMITTELN

Carminsäure wurde als Referenzsubstanz gewählt, da sie die wichtigsten, in Huminstoffen vorkommenden, funktionellen Gruppen enthält. Die methylierte Carminsäure liegt größen- und molekulargewichtsmäßig in THF im Bereich der Huminsäuren. Auch in Methanol unterscheiden sich weder die Retentionszeiten der methylierten noch der unmethylierten Carminsäure von denen der entsprechenden HS. Somit ist die methylierte Carminsäure in Methanol gleich groß wie die unmethylierte und liegt im selben Größenordnungsbereich wie die methylierten und unmethylierten Huminstoffe. In den wässrigen Lösemitteln zeigte die Carminsäure allerdings, den Erwartungen entsprechend, sehr viel kleinere Werte an als die HS. Das Molekulargewicht am Peakmaximum beträgt nur 243 Da (0,1 M NaCl) bzw. 222 Da (0,01 M NaCl), was einem Verkleinerungsfaktor von ca. 5-6 im Vergleich zu den Fulvinsäuren bzw. 8-10 zu den Huminsäuren entspricht. Diese Ergebnisse zeigen wiederum die Abweichungen der Ergebnisse in Methanol auf. Es war zu erwarten, dass die Carminsäure aufgrund ihrer monomeren Struktur in Methanol wie in Wasser sehr viel kleiner ist als die HS. Die Tatsache, dass die methylierte Carminsäure in THF mit dem Größenbereich der Huminstoffe übereinstimmt, könnte daran liegen, dass die Aggregate der HS durch die Methylierung aufgebrochen sind und somit die Huminstoffe kleiner geworden sind. Zahlreiche Nebenreaktionen der Methylierung (siehe Kapitel 2.2.2) können aber auch dazu beitragen, dass die Carminsäure durch die Methylierung sehr viel größer geworden ist.

4.2.8 GEWICHTS- UND GRÖSSENVERÄNDERUNG DER HUMINSTOFFE DURCH DIE METHYLIERUNG

Ein direkter Vergleich der methylierten mit den unmethylierten Huminstoffen ist nur in Methanol möglich, da hier eine sogenannte universelle Kalibrierung vorliegt, was bedeutet, dass für beide Probengruppen dieselben Standards im selben Lösemittel verwendet wurden. Wie bereits erwähnt, konnten keine großen Unterschiede festgestellt werden. Die methylierten Derivate sind tendenziell nur minimal größer als die Ausgangsmaterialien. Auch in der Signalform unterscheiden sich die methylierten nicht von den unmethylierten Proben.

Da aber sowohl die methylierten FAs in THF als auch die unmethylierten FAs in Wasser kleiner als die entsprechenden Huminsäuren sind, während Fulvin- und Huminsäuren in Methanol nahezu gleich groß sind, müssen die Ergebnisse kritisch betrachtet werden.

Ein sinnvoller Vergleich der Molekulargewichte und solvatodynamischen Durchmesser der methylierten HS in THF mit den unmethylierten in Wasser ist aufgrund der relativen Kalibrierung (siehe Kapitel 4.2.4 und 4.2.5) nicht möglich.

4.2.9 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER ASYMMETRISCHEN FLUSSFELDFLUSSFRAKTIONIERUNG

In dieser Arbeit wurden erstmals neben der Untersuchung von Huminstoffen im wässrigen Milieu auch methylierte Huminstoffe in organischen Lösemitteln analysiert.

Als Lösemittel dienten THF, Methanol und 0,1 M und 0,01 M NaCl in Wasser. Zur Kalibrierung wurden Polystyrole (THF), Polyethylenglykole (Methanol) und Polystyrolsulfonate (0,1 M und 0,01 M NaCl) eingesetzt.

Relativ zur Kalibrierung hatten die methylierten Huminstoffe in THF die größten Molmassen und Durchmesser. Diese betragen am Peakmaximum im Mittel 3793 Da / 2,34 nm (FA) und 3916 Da / 2,36 nm (HA). Die Huminstoffe in Wasser folgten mit durchschnittlich 1540 Da / 0,88 nm (FA) und 2800 Da / 1,09 (HA). Die Werte in 0,01 M NaCl lagen ca. 50 Da über denen in 0,1 M NaCl. Sowohl in THF als auch in den NaCl-Lösungen hatten die Fulvinsäuren kleinere Retentionszeiten als die Huminsäuren. Dies entspricht den Erwartungen. Die methylierten und die unmethylierten HS sowie Fulvin- und Huminsäuren in Methanol zeigten in ihren Retentionszeiten nur minimale Unterschiede. Eventuelle Wechselwirkungen der Huminstoffe mit Methanol oder / und der Membran mit den in Methanol gelösten Huminstoffen sollten untersucht werden, um die Ergebnisse zu stützen. Insgesamt waren die Ergebnisse der ROSIG-Fulvinsäuren in Methanol am Peakmaximum 8 bis 20 %, der IHSS-Huminsäuren 10 bis 30 % und der ROSIG-Huminsäuren 20 bis 60 % kleiner als in Wasser.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Zur Untersuchung von Struktur sowie Molekulargewichts- und Größenverteilung wurden HS und ihre methylierten Derivate mittels NMR-Spektroskopie und Asymmetrischer Flussfeldflussfraktionierung analysiert. Dabei wurde die AFFFF erstmals auf methylierte Huminstoffe in organischen Lösemitteln angewandt.

Sowohl bei der NMR-Spektroskopie als auch bei der AFFFF handelt es sich um nichtinvasive und nichtzerstörerische Techniken, die zahlreiche Vorteile gegenüber anderen destruktiven analytischen Techniken bieten.

In der 2D-NMR-Spektroskopie wird der Anteil an Signalüberlappungen, wie er in den 1D-NMR-Spektren auftritt, durch die Einführung einer zweiten Frequenzvariablen minimiert. Es können dadurch Aussagen über mindestens zwei chemische Verschiebungen gemacht werden. Die meisten strukturellen Informationen können aus den COSY- und HSQC-Experimenten in Kombination mit 1D-Protonen- und ^{13}C / ^{13}C -DEPT-Spektren gewonnen werden. Die Weitbereichskopplungsexperimente HSQC-TOCSY und TOCSY geben zusätzlich wertvolle Hinweise auf die Verknüpfung einzelner Bausteine in einem Spinsystem.

Die Einteilung in unterschiedliche Verschiebungsbereiche in den 2D-NMR-Experimenten macht die Unterscheidung von verschiedenen funktionellen Gruppen wie aliphatischen und aromatischen Methylestern und -ethern und veretherten Kohlenhydraten möglich.

Die Methylierung verursachte neben der Derivatisierung von funktionellen Gruppen, wie Carboxylen, Alkoholen und Phenolen, auch Nebenreaktionen, wie C-Methylierung, Methyleninsertion und Spaltungsreaktionen. Dadurch entstanden NMR-Spektren mit einem hohen Verzweigungsgrad im aliphatischen Bereich sowie einer erhöhten Anzahl an Resonanzen und Kreuzsignalen bei gleichzeitiger Veränderung der mittleren Signalpositionen.

Die Verwendung von ^{13}C -markierten Derivatisierungsreagenzien ermöglichte die Differenzierung nativer und durch die Methylierung hinzugekommener CH_3 -Gruppen. Der Anteil an CH_3 -Gruppen in aliphatischen Ketten hat sich im Vergleich zum Ausgangsmaterial verdoppelt, der Anteil der Methoxygruppen sogar verdrei- bis verfünffacht. Der hohe Anteil an Methylgruppen in aliphatischen Ketten deutet auf C-Methylierung hin.

Die Methylierungsreihenfolge hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Zusammensetzung der Ergebnisse. Dies wird durch die AFFFF-Ergebnisse bestätigt.

Um die Grundstruktur von Huminstoffgruppen zu identifizieren, wurden Minimumspektren von allen FAs und HAs aufgenommen. Ein Minimumspektrum enthält nur die Signale,

welche in allen zu vergleichenden Spektren auftreten. Die Minimumspektren der FAs und der HAs sind sich sehr ähnlich. Auch die Differenzspektren der einzelnen FAs und HAs zeigen nur geringfügige unsystematische quantitative Unterschiede. Qualitative Unterschiede in Struktur und Zusammensetzung der einzelnen HS sind nicht zu erkennen. Dies deutet auf starke Strukturänderungen, wie beispielsweise Spaltungsreaktionen und Methyleninsertion durch die Methylierung hin, da im Ausgangsmaterial laut zahlreicher Veröffentlichungen durchaus Unterschiede in der Zusammensetzung der FAs und HAs bestanden. Die NMR-Spektren der methylierten HS konnten aufgrund fehlender NMR-Spektren des Ausgangsmaterials nicht mit diesen verglichen werden. Die Ergebnisse der AFFFF-Untersuchungen der underivatisierten ROSIG-HS zeigen ebenfalls der Literatur entsprechend Unterschiede in der Molekulargewichts- und Größenverteilung auf. Das Molekulargewicht am Peakmaximum (M_p) der FAs in 0,1 M NaCl liegt 28 bis 54 % unter dem der entsprechenden HAs. Die FAs haben in 0,1 M NaCl ein durchschnittliches Molekulargewicht (M_p) von 1540 Da, was einem Durchmesser von 0,88 nm entspricht. Entsprechend ergeben sich für die HAs 2800 Da und 1,09 nm. Vergleicht man das Molekulargewicht bzw. die Durchmesser der methylierten HS in Methanol mit den NMR-Ergebnissen, so stimmen diese auf den ersten Blick überein. Auch bei den AFFFF-Ergebnissen sind keine wesentlichen Unterschiede zwischen den FAs und den HAs auszumachen. Ferner scheint sich hier auch der unwesentliche Einfluss der Methylierungsreihenfolge zu bestätigen. Die methylierten FAs und HAs in Methanol haben nämlich nicht nur ähnliche Molekulargewichte und Durchmesser, sondern nahezu identische. Zudem lagen die Ergebnisse der methylierten HS in Methanol am Peakmaximum 8 bis 20 % unter denen der unmethylierten FAs in 0,1 M NaCl, was auch auf eine Verkleinerung durch Spaltungsreaktionen schließen lassen könnte.

Allerdings ist der direkte Molekulargewichts- bzw. Größenvergleich von Substanzen in unterschiedlichen Lösemitteln und in Relation zu ungleichen Referenzstandards nicht ohne weiteres zulässig, somit können die eben aufgeführten Ergebnisse nicht alleine als Beweis für Spaltungsreaktionen herangezogen werden.

Auf den zweiten Blick fällt zudem bei der Betrachtung der Molekulargewichte und Durchmesser der underivatisierten FAs und HAs in Methanol auf, dass diese sich weder untereinander noch von den Molekulargewichten und Durchmessern der methylierten Substanzen unterscheiden. Somit muss die Übereinstimmung der NMR- und der AFFFF-Ergebnisse in diesem Punkt kritisch betrachtet werden, da die Ähnlichkeiten der AFFFF-Ergebnisse der derivatisierten HS und des Ausgangsmaterials auch auf Wechselwirkungen der Huminstoffe mit Methanol und / oder der Membran zurückzuführen sein könnten.

Dass unterschiedliche Flussmittel und der Einsatz von unterschiedlichen Referenzstandards zu voneinander abweichenden Ergebnissen führen können, wird auch bei den AFFFF-Ergebnissen in THF sichtbar. THF diente als Flussmittel für die Messungen der methylierten HS. Als Referenzstandards wurden Polystyrole verwendet. Relativ zur Kalibrierung hatten die methylierten HS in THF durchschnittliche Molmassen am Peakmaximum von 3793 Da (FAs) und 3916 Da (HAs). Dies entspricht Durchmessern von 2,34 nm (FAs) und 2,36 nm (HAs). Somit erscheinen die methylierten HS in THF sehr viel größer als in Methanol. Abgesehen vom Größenunterschied, welcher auch durch Flussmittel und Referenzstandards bedingt sein könnte, ist allerdings in THF durchaus ein Unterschied zwischen FAs und HAs auszumachen. Die FAs sind hier zwar am Peakmaximum nur noch durchschnittlich 4 % kleiner als die HAs, die Tendenz, dass die FAs kleiner als die HAs sind, ist aber durchaus ersichtlich.

Aus den Integrationsdaten der 1D-NMR-Spektren und aus der direkten Auswertung der 2D-NMR-Experimente ergibt sich für die methylierten HS die folgende Zusammensetzung:

- ca. 30 – 40 % stark verzweigte freie aliphatische Ketten und Ringe
- ca. 50 – 60 % an Ether, Ester und Ketone gebundene Aliphaten
- ca. 5 % Alkene
- ca. 1 – 5 % Aromaten

Der hohe Anteil an aliphatischen Partialstrukturen in Form von verzweigten Ketten spricht für einen hohen Anteil an hopanoiden Bestandteilen.

Die gute Auflösung der HSQC-Spektren ermöglichte die Trennung und Quantifizierung von aliphatischen und aromatischen Methylestern und –ethern. Der Anteil an aliphatischen Methylestern und –ethern ist ungefähr gleich groß, der an aromatischen Methylethern deutlich geringer (ca. $\frac{1}{4}$). Signale von aromatischen Methylestern sind fast keine auszumachen. Die Ether- und Ketonstrukturen liegen hauptsächlich in Form von Ketten vor. Der hohe Anteil an aliphatischen Methylethern und Ketonen weist auf Fragmente von Cellulose und sonstigen Kohlenhydraten hin.

Die Alkenstrukturen deuten auf Ligninbestandteile hin, können aber auch zusätzlich aus Olefinbildungsnebenreaktionen entstanden sein.

Der für Huminstoffe sehr niedrige Anteil an aromatischen Bestandteilen kann wahrscheinlich hauptsächlich auf die Abtrennung dieser Bestandteile bei der nicht vollständigen Lösung der Methylierungsprodukte in CDCl_3 bzw. CD_3OD zurückzuführen sein. Haiber hat Größenfraktionen der ROSIG-HS durch Mehrstufenultrafiltration gewonnen und durch NMR-Messungen festgestellt, dass die großen Moleküle vorwiegend aus aromatischen und kohlenhydratartigen Partialstrukturen bestehen, während kleinere Moleküle mehr aliphatische

Partialstrukturen enthalten (75). Die ein- bis mehrfach substituierten Aromaten sind vermutlich Spaltprodukte aus Ligninen und Tanninen. Die fehlenden Alken-Kreuzsignale in den HSQC-Spektren sind ein Hinweis hierfür.

Eine wichtige Aufgabe in künftigen Arbeiten wird es sein, die 2D-NMR-Spektren der methylierten Substanzen mit den Spektren des Ausgangsmaterials zu vergleichen. Nur so können durch die Methylierung entstandene Änderungen, v. a. das Auftreten von Nebenreaktionen, eindeutig geklärt werden und dann die entsprechenden Rückschlüsse auf die Struktur des Ausgangsmaterials gezogen werden.

Um noch detailliertere Informationen über die Struktur von HS zu erhalten, kann zum einen inzwischen auf sehr hochauflösende NMR-Instrumente (bis zu 800 MHz, 1000 MHz in Entwicklung) zurückgegriffen werden, zum anderen wäre mit sehr interessanten Ergebnissen zu rechnen, wenn man die Techniken der Derivatisierung, der NMR-Spektroskopie und der AFFFF kombinieren würde. Durch die Möglichkeit des Auftrennens der methylierten HS in beliebig viele Größenfraktionen mittels AFFFF und anschließende NMR-Spektroskopie könnten noch viel genauere Strukturinformationen erhalten werden. Um exaktere Aussagen über die Molekulargewichte und Durchmesser von methylierten HS zu erhalten, sollte nach weiteren organischen Lösemitteln und entsprechenden, den HS möglichst ähnlichen Standards gesucht werden. Parallel hierzu wäre die Entwicklung eines AFFFF-Kanals aus Edelstahl oder einem anderen sehr resistenten und langlebigen Material eine große Hilfe für die reproduzierbare Datenaufnahme im nichtwässrigen Milieu.

6 LITERATUR

- (1) Ziechmann W. *"Humic Substances", A Study about their Theory and Reality*; BI-Wiss.-Verl.: Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, **1994**.
- (2) Stevenson F. J. *Humus Chemistry -Genesis, Composition, Reactions*, 2nd ed.; Wiley and Sons: New York, **1994**.
- (3) Hayes M. H. B.; MacCarthy P.; Malcolm R. L.; Swift R. S. In *Humic Substances II, In Search of Structure*; Hayes M. H. B. et al. Ed.; Wiley: Chichester, **1989**.
- (4) Ede R. M.; Ralph J. Assignment of 2D TOCSY Spectra of Lignins: the Role of Lignin Model Compounds, *Magnetic Resonance in Chemistry* **1996**, *34*, pp 261-268.
- (5) Garver T. M.; Maa K. J.; Marat K. Conformational Analysis and 2D NMR Assignment Strategies for Lignin Model Compounds: The Structure of Acetoguaiacyl-Dehydro-Diisoeugenol Methyl Ether, *Canadian Journal of Chemistry* **1996**, *74*, pp 173-184.
- (6) Hedges J. I.; Keil R. G.; Benner R. What Happens to Terrestrial Organic Matter in the Ocean ?, *Organic Geochemistry* **1997**, *27*, pp 195-212.
- (7) Schulten H-R. In *Humic and Fulvic Acids: Isolation, Structure and Environmental Role*; Gaffney J. S., et al. Eds.; American Chemical Society, ACS Symposium Series: Washington DC, **1996**; Vol. 651, pp 42-56.
- (8) Schulten H-R.; Schnitzer M. A State of the Art Structural Concept for Humic Substances, *Naturwissenschaften* **1993**, *80*, pp 29-30.
- (9) Piccolo A.; Nardi S.; Concheri G. Micelle-like Conformation of Humic Substances as Revealed by Size Exclusion Chromatography, *Chemosphere* **1996**, *33*, pp 595-602.
- (10) Piccolo A.; Conte P.; Cozzolino A. Effects of Mineral and Monocarboxylic Acids on the Molecular Association of Dissolved Humic Substances, *European Journal of Soil Science* **1999**, *50*, pp 687-694.
- (11) Wershaw R. L. Molecular Aggregation of Humic Substances, *Soil Science* **1999**, *164*, pp 803-813.
- (12) Simpson A. J.; Kingery W. L.; Hayes M. H. B.; Spraul M.; Humpfer E.; Dvortsak P.; Kerssebaum R.; Godejohann M.; Hofmann M. Molecular Structures and Associations of Humic Substances in the Terrestrial Environment, *Naturwissenschaften* **2002**, *89*, pp 84-88.
- (13) Weber J. H. In *Humic Substances and their Role in the Environment*; Frimmel F.H., Christmann R. F. Eds.; Wiley: Chichester, **1988**, pp 165-178.

-
- (14) In *dtv Brockhaus Lexikon Band 11 Len-Mec*; F. A. Brockhaus GmbH und Deutscher Taschenbuch Verlag GmbH & Co. KG: Mannheim, München, **1988**.
- (15) MacCarthy P.; Rice J. A. In *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health*; al., S. M. e. Ed.; Elsevier: Amsterdam, **1994**, pp 1209-1223.
- (16) McKnight D. M.; Aiken G. R. In *Aquatic Humic Substances*; Hessen D. O., Tranvik L. J. Eds.; Springer: Berlin, **1998**; Vol. 133, pp 9-39.
- (17) Burba P. *Zur Analytik von Huminstoffen und ihren Metallspezies in Gewässern*; Springer: Berlin; Heidelberg, **1998**.
- (18) Conte P.; Piccolo A. Conformational Arrangement of Dissolved Humic Substances. Influence of Solution Composition on Association of Humic Molecules, *Environmental Science and Technology* **1999**, 33, pp 1682-1690.
- (19) Bloom P. R.; Leenheer J. A. In *Humic Substances II: In Search of Structure*; Hayes M. H. B., MacCarthy P., Malcolm R. L., Swift R. S. Eds.; Wiley: Chichester, **1989**, pp 409-448.
- (20) Zimmermann U. Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Struktur-Wechselwirkungseigenschaften von Huminstoffen und polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, Doktorarbeit, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen-Nürnberg, **1999**.
- (21) Preston C. M. Applications of NMR to Soil Organic Matter Analysis: History and Prospects, *Soil Science* **1996**, 161, pp 144-166.
- (22) Leenheer J. A.; Noyes T. I. In *Humic Substances II: In Search of Structure*; Hayes M. H. B., MacCarthy P., Malcolm R. L., Swift R. S. Eds.; Wiley: Chichester, **1989**, pp 257-280.
- (23) Parsons J. W. In *Humic Substances II: In Search of Structure*; Hayes M. H. B., MacCarthy P., Malcolm R. L., S., S. R. Eds.; Wiley: Chichester, **1989**, pp 99-120.
- (24) Jahnel J. B.; Schmiedel U.; Abbt-Braun G.; Frimmel F. H. Anwendung einer enzymatischen Methode zur Charakterisierung von Huminstoffen, *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* **1993**, 21, pp 43-50.
- (25) Swift R. S. In *Humic Substances II: In Search of Structure*; Hayes M. H. B., MacCarthy P., Malcolm R. L., Swift R. S. Eds.; Wiley: Chichester, **1989**, pp 450-466.
- (26) Wolf M.; Buckau G.; Geckeis, H.; Thang, N. M.; Hoque E.; Szymczak W.; Kim, J. I. In *Humic Substances Structure, Models and Functions*; Ghabbbour E.A., Davies G.

- Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2001**; Vol. Special Publication No. 273, pp 51-60.
- (27) Aiken G. R.; Gillam A. H. In *Humic Substances II: In Search of Structure*; Hayes M. H. B., MacCarthy P., Malcolm R. L., Swift R. S. Eds.; Wiley: Chichester, **1989**, pp 515-544.
- (28) Wershaw R. L. In *Humic Substances II: In Search of Structure*; Hayes M. H. B., MacCarthy P., Malcolm R. L., Swift R. S. Eds.; Wiley: Chichester, **1989**, pp 545-560.
- (29) Chen Y.; Schnitzer M. In *Humic Substances II: In Search of Structure*; Hayes M. H. B., MacCarthy P., Malcolm R. L., Swift R. S. Eds.; Wiley: Chichester, **1989**, pp 622-638.
- (30) Swift R. S. In *Humic Substances in Soil, Sediment and Water*; Aiken G. R., McKnight D. M., Wershaw R. L., MacCarthy P. Eds.; Wiley: New York, **1985**, pp 387-408.
- (31) Leenheer J. A. In *Humic Substances in Soil, Sediment and Water (Geochemistry, Isolation and Characterization)*; Aiken G. R., McKnight D. M., Wershaw R. L., MacCarthy P. Eds.; Wiley: New York, **1985**, pp 409-429.
- (32) DeNobili M.; Gjessing E.; Sequi P. In *Humic Substances II: In Search of Structure*; Hayes M. H. B., MacCarthy P., Malcolm R. L., S., S. R. Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, **1989**, pp 561-592.
- (33) Buffle J.; Perret D.; Newman M. In *Environmental Particles*; Buffle, J., Leeuwen van H.P. Eds.; Lewis: Boca Raton Ann Harbor, London, Tokyo, **1992**; Vol. 1, pp 171-220.
- (34) Aster B. Fraktionierung und Charakterisierung von aquatischen Huminstoffen und ihrer Metallspezies: Untersuchungen mittels Mehrstufen-Ultrafiltration, Metallaffinitäts-Chromatographie sowie Austauschreaktionen, Doktorarbeit, TU-Dortmund, Dortmund, **1998**.
- (35) Swift R. S. In *Humic Substances II: In Search of Structure*; Hayes M. H. B., MacCarthy P., Malcolm R. L., Swift R. S. Eds.; Wiley: Chichester, **1989**, pp 476-496.
- (36) Anderson T.; Shifley L.; Amarasiriwardena D.; Siripinyanond A.; Xing B.; Barnes R. M. In *Humic Substances Structures, Models and Functions*; Ghabbbour E.A., Davies G. Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge UK., **2001**; Vol. 273, pp 165-177.
- (37) Schimpf, M. E.; Petteys, M. P. Characterization of Humic Materials by Flow Field-Flow Fractionation, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1997**, 120, pp 87-100.

- (38) Schimpf, M. E.; Wahlund, K.-G. Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation as a Method to Study the Behavior of Humic Acids in Solution, *Journal of Microcolumn Separations* **1997**, *9*, pp 535-543.
- (39) Beckett R.; Hart B. T. In *Environmental Particles- CRC Press: Boca Raton*; Buffle, J. Ed.; Lewis Publishers, **1993**; Vol. 2, pp 165-205.
- (40) Dycus, P. J. M.; Healy, K. D.; Stearman, G. K.; Wells, M. J. M. Diffusion Coefficients and Molecular Weight Distributions of Humic and Fulvic Acids Determined by Flow Field-Flow Fractionation, *Separation Science and Technology* **1995**, *30*, pp 1435.
- (41) Klein T. Entwicklung und Anwendung einer Asymmetrischen Fluss-Feldflussfraktionierung zur Charakterisierung von Hydrosolen, Doktorarbeit, Technischen Universität München, München, **1998**.
- (42) Thang, N. M.; Geckeis, H.; Kim, J. I.; Beck H. P. Application of the Flow Filed Flow Fractionation (FFFF) to the Characterization of Aquatic Humic Colloids: Evaluation and Optimatization of the Method, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2001**, *181*, pp 289-301.
- (43) Schmitt P.; Kettrup A.; Freitag D.; Garrison A. W. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1996**, *351*, pp 74.
- (44) Duxbury J. M. In *Humic Substances II: In Search of Structure*; Hayes M. H. B., MacCarthy P., Malcolm R. L., Swift R. S. Eds.: Chichester, **1989**, pp 357-409.
- (45) Szymczak W.; Wolf M.; Wittmaack K. Characterisation of Fulvic Acids and Glycyrrhizic Acid by Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry, *Acta Hydrochimica et Hydrobiologia* **2000**, *28*, pp 350-358.
- (46) Abbt-Braun G.; Frimmel F. H. Alkylierungsreaktionen als Schlüssel für die Charakterisierung isolierter aquatischer Huminstoffe, *Vom Wasser* **1990**, *74*, pp 307-324.
- (47) Mikita M. A., S. C., Wershaw R. L. Carbon-13 Enriched Nuclear Magnetic Resonance Method for the Determination of Hydroxyl Functionality in Humic Substances, *Analytical Chemistry* **1991**, *53*, pp 1715-1717.
- (48) Wershaw R. L.; Pinckney D. J. Methylation of Humic Acid Fractions, *Science* **1978**, *199*, pp 906-907.
- (49) Herzog H.; Burba P.; Buddrus J. Quantification of hydroxylic groups in a river humic substance by ^{29}Si -NMR, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1996**, *354*, pp 375-377.

- (50) Thorn K. A., S. C., Wershaw R. L. Methylation Patterns of Aquatic Humic Substances Determined by ^{13}C NMR Spectroscopy, *Organic Geochemistry* **1987**, *11*, pp 123-137.
- (51) Clemow L. M.; Favas G.; Jackson W. R.; Marshall M.; Patti A. F.; Redlich P. J. Humic Acids and Methylated Humic Acids as Models for Reactions of Brown Coal with $\text{CO}/\text{H}_2\text{O}$ and with H_2 , *Fuel* **1999**, *78*, pp 567-572.
- (52) Arsenie I.; Boren H.; Allard B. Determination of the Carboxyl Content in Humic Substances by Methylation, *The Science of the Total Environment* **1992**, *116*, pp 213-220.
- (53) Ricca G.; Severini F.; Di Silvestro G.; Yuan C. M.; Adani F. Derivatization and Structural Studies by Spectroscopic Methods of Humic Acids from Leonardite, *Geoderma* **2000**, *98*, pp 115-125.
- (54) Sachs S.; Bubner M.; Schmeide K.; Choppin G. R.; Heise K. H.; Bernhard G. Carbon-13 NMR Spectroscopic Studies on Chemically Modified and Unmodified Synthetic and Natural Humic Acids, *Talanta* **2002**, *57*, pp 999-1009.
- (55) Pizey J. S. et al. *Synthetic Reagents 2 - N-Bromsuccinimide, Diazomethane, Manganese Dioxide, Raney Nickel*; Pizey J. S. Ed.; John Wiley & Sons, **1974**; Vol. II, pp 66-142.
- (56) Hesse M.; Meier H.; Zeeh B. *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*, 5. ed.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, **1995**.
- (57) Friebolin H. *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, 3rd ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, **1998**.
- (58) Kalinowski H.-O.; Berger S.; Braun S. *^{13}C -NMR-Spektroskopie*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York, **1984**.
- (59) Hore P. J. *Nuclear Magnetic Resonance*; Oxford University Press: Oxford, **1995**.
- (60) Günther H. *NMR-Spektroskopie Grundlagen, Konzepte und Anwendungen der Protonen und Kohlenstoff-13 Kernresonanz-Spektroskopie in der Chemie*, 3rd ed.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, **1992**.
- (61) Croasmun W. R.; Carlson R. M. K. *Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, 2nd ed.; VCH Publishers, Inc.: New York, **1994**.
- (62) Ernst R. R.; Bodenhausen G.; Wokaun A. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*; Clarendon Press: Oxford, **1994**.
- (63) Berger S. NMR Techniques Employing Selective Radiofrequency Pulses in Combination with Pulsed Field Gradients, *Progress in NMR Spectroscopy* **1997**, *30*, pp 137-156.

- (64) Claridge T. D. W. *High Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*; Elsevier Science Ltd: Oxford, **1999**.
- (65) Parella T. Pulsed Field Gradients: a New Tool for Routine NMR, *Magnetic Resonance in Chemistry* **1998**, *36*, pp 467-495.
- (66) Buddrus J.; Lambert J. Isolated Paraffinic Methyl Groups in Humic Substances, *Organic Geochemistry* **1995**, *23*, pp 269-271.
- (67) Herzog H.; Haiber S.; Burba P.; Buddrus J. Quantification of Partial Structures of Aquatic Humic Substances by ¹H-NMR and WATR Conditions, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1997**, *359*, pp 167-170.
- (68) Simpson A. J.; Boersma R.; Kingery W. L.; Hicks R.; Hayes M. H. B. In *Humic Substances, Peats and Sludges*; Hayes M. H. B., Wilsoon W. Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, **1997**, pp 46-62.
- (69) Wang K.; Dickinson L. C.; Ghabbbour E.A.; Davies G.; Xing B. In *Humic Substances Structures, Models and Functions*; Ghabbbour E.A., Davies G. Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2001**, pp 73-82.
- (70) Liming W.; Xi'an M.; Yuhui Y. Application of Newly-Developed ¹H NMR Techniques to the Study of Humic Acids, *Chinese Journal of Magnetic Resonance* **1998**, *15*, pp 411-420.
- (71) Lambert J.; Lankes U. In *Refractory Organic Substances in the Environment*; Frimmel F.H., Abbt-Braun G., Heumann K. G., Hock B., Lüdemann H-D., Spitteller M. Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, **2002**, pp 89-95.
- (72) Haiber S.; Herzog H.; Buddrus J.; Burba P.; Lambert J. In *Refractory Organic Substances in the Environment*; Frimmel F. H., Abbt-Braun G., Heumann K. G., Hock B., Lüdemann H-D., Spitteller M. Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, **2002**, pp 115-128.
- (73) Hertkorn N.; Permin A.; Perminova I. V.; Kovalevskii D.; Yudov M.; Petrosyan V.; Kettrup A. Comparative Analysis of Partial Structures of a Peat Humic and Fulvic Acid Using One- and Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *Journal of Environmental Quality* **2002**, *31*, pp 375-387.
- (74) Simpson A. J.; Kingery W. L.; Shaw D. R.; Spraul M.; Humpfer E.; Dvortsak P. The Application of ¹H HR-MAS NMR Spectroscopy for the Study of Structures and Associations of Organic Components at the Solid-Aqueous Interface of a Whole Soil, *Environmental Science and Technology* **2001**, *35*, pp 3321-3325.

- (75) Haiber S. Quantifizierung von Partialstrukturen in Erdölen und aquatischen Huminstoffen durch ^1H - und ^{13}C -NMR Spektroskopie, Doktorarbeit, TU-Dortmund, Dortmund, **1998**.
- (76) Buddrus J.; Burba P.; Herzog H.; Lambert J. Quantification of Partial Structures of Aquatic Humic Substances by One- and Two-Dimensional Solution ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *Analytical Chemistry* **1989**, *61*, pp 628-631.
- (77) Lambert J.; Burba P.; Buddrus J. Quantification of Partial Structures in Aquatic Humic Substances by Volume Integration of Two-Dimensional ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectra. Comparison of One- and Two-Dimensional Techniques, *Magnetic Resonance in Chemistry* **1992**, *30*, pp 221-227.
- (78) Lambert J.; Buddrus J. Quantification of Isolated Methyl Groups in Aquatic Humic Substances by Means of ^1H - and ^{13}C -NMR Spectroscopy, *Magnetic Resonance in Chemistry* **1996**, *34*, pp 276-282.
- (79) Shin H.; Moon H. An "Average" Structure Proposed for Soil Fulvic Acid by DEPT/QUAT ^{13}C NMR Pulse Techniques, *Soil Science* **1996**, *161*, pp 250-256.
- (80) Simpson A. J.; Burdon J.; Graham C. L.; Hayes M. H. B.; Spencer N.; Kingery W. L. Interpretation of Heteronuclear and Multidimensional NMR Spectroscopy of Humic Substances, *European Journal of Soil Science* **2001**, *52*, pp 495-509.
- (81) Haiber S.; Burba P.; Herzog H.; Lambert J. Elucidation of Aquatic Humic Partial Structures by Multistage Ultrafiltration and Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1999**, *364*, pp 215-218.
- (82) Kingery W. L.; Simpson A. J.; Hayes M. H. B.; Locke M. A.; Hicks R. The Application of Multidimensional NMR to the Study of Soil Humic Substances, *Soil Science* **2000**, *165*, pp 483-494.
- (83) Simpson A. J. Multidimensional Solution State NMR of Humic Substances: A Practical Guide and Review, *Soil Science* **2001**, *166*, pp 795-809.
- (84) Simpson A. J.; Salloum M. J.; Kingery W. L.; Hatcher P. G. Improvements in the Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Humic Substances, *Journal of Environmental Quality* **2002**, *31*, pp 388-392.
- (85) Simpson A. J.; Kingery W. L.; Spraul M.; Humpfer E.; Dvortsak P.; Kerssebaum R. Separation of Structural Components in Soil Organic Matter by Diffusion Ordered Spectroscopy, *Environmental Science and Technology* **2001**, *35*, pp 4421-4425.

- (86) Dixon A. M.; Larive C. K. Modified Pulsed-Field Gradient NMR Experiments for Improved Selectivity in the Measurement of Diffusion Coefficients in Complex Mixtures: Application to the Analysis of the Suwannee River Fulvic Acid, *Analytical Chemistry* **1997**, *69*, pp 2122-2128.
- (87) Morris K. F.; Cutak B. J.; Dixon A. M.; Larive C. K. Analysis of Diffusion Coefficient Distributions in Humic and Fulvic Acids by Means of Diffusion Ordered NMR Spectroscopy, *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, pp 5315-5321.
- (88) Knicker H. Double Cross Polarization Magic Angle Spinning ^{15}N ^{13}C NMR Spectroscopic Studies for Characterization of Immobilized Nitrogen in Soils, IHSS 10, Toulouse **2000**; pp 1105-1108.
- (89) Günzl A. NMR-Spektroskopische Verfahren für eine verbesserte quantitative Beschreibung der Sauerstoff-Funktionalität in Huminstoffen, Doktorarbeit, TU-München, München, **2001**.
- (90) Hertkorn N.; Günzl A.; Freitag D.; Kettrup A. In *Refractory Organic Substances in the Environment*; Frimmel F. H., Abbt-Braun G., Heumann K. G., Hock B., Lüdemann H-D., Spiteller M. Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, **2002**, pp 129-145.
- (91) Lankes U.; Lüdemann H-D. In *Refractory Organic Substances in the Environment*; Frimmel F. H., Abbt-Braun G., Heumann K. G., Hock B., Lüdemann H-D., Spiteller M. Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, **2002**, pp 96-114.
- (92) Lankes U. Festkörper-NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung von Refraktären Organischen Säuren in Gewässern, Doktorarbeit, Universität Regensburg, Regensburg, **2001**.
- (93) Knicker H.; Hatcher P. G.; Gonzales-Vila F. J. Formation of Heteroatomic Nitrogen after Prolonged Humification of Vascular Plant Remains as Revealed by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *Journal of Environmental Quality* **2002**, *31*, pp 444-449.
- (94) Kögel-Knabner I.; Hatcher P. G.; Tegelaar E. W.; Leeuw J. W. Aliphatic Components of Forest Soil Organic Matter as Determined by Solid-state ^{13}C NMR and Analytical Pyrolysis, *The Science of the Total Environment* **1992**, *113*, pp 89-106.
- (95) Kögel-Knabner I.; Hatcher P. G.; Zech W. Chemical Structural Studies of Forest Soil Humic Acids: Aromatic Carbon Fraction, *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1991**, *55*, pp 241-247.
- (96) Kögel-Knabner I.; Zech W.; Hatcher P. G. Chemical Composition of the Organic Matter in Forest Soils: The Humus Layer, *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **1988**, *151*, pp 331-340.

- (97) Knicker H.; Fründ R.; Lüdemann H-D. In *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Environmental Chemistry*; Nanny M. A., Minear R. A., Leenheer J. A. Eds., **1997**, pp 272-294.
- (98) Braun S.; Kalinowski H.-O.; Berger S. *150 and More Basic NMR Experiments*; Wiley-VCH: Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, **1998**.
- (99) Shaw A. A.; Salaun C.; Dauphin J.-F.; Ancian B. Artifact-Free PFG-Enhanced Double-Quantum-Filtered COSY Experiments, *Journal of Magnetic Resonance* **1996**, *A120*, pp 110-115.
- (100) Ancian B.; Bourgeois I.; Dauphin J.-F.; Shaw A. A. Artifact-Free Pure Absorption PFG-Enhanced DQF-COSY Spectra Including a Gradient Pulse in the Evolution Period, *Journal of Magnetic Resonance* **1997**, *125*, pp 348-354.
- (101) Bax A.; Marzilli L. G.; Summers M. F. New Insights into the Solution Behavior of Cobalamin Studies of the Base-off Form of Coenzyme B₁₂ Using Modern Two-Dimensional NMR Methods, *Journal of the American Chemical Society* **1987**, *109*, pp 566-574.
- (102) Kay L. E.; Keifer P.; Saarinen T. Pure Absorption Gradient Enhanced Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy with Improved Sensitivity, *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, pp 10663-10665.
- (103) Palmer A. G.; Cavanagh J.; Wright P. E.; Rance M. Sensitivity Improvement in Proton-Detected Two-Dimensional Heteronuclear Correlation NMR Spectroscopy, *Journal of Magnetic Resonance* **1991**, *93*, pp 151-170.
- (104) Schleucher J.; Schwendinger M.; Sattler M.; Schmidt P.; Schedletzky O.; Glaser S. J.; Sorensen O. W.; Griesinger C. A General Enhancement Scheme in Heteronuclear Multidimensional NMR Employing Pulsed Field Gradients, *Journal of Biomolecular NMR* **1994**, *4*, pp 301-306.
- (105) Domke T. A New Method to Distinguish Between Direct and Remote Signals in Proton-Relayed X,H Correlations, *Journal of Magnetic Resonance* **1991**, *95*, pp 174-177.
- (106) John B. K.; Plant D.; Heald S. L.; Hurd R. E. Efficient Detection of CH-HN Correlations in Proteins Using Gradient-Enhanced Nitrogen-15 HMQC-TOCSY, *Journal of Magnetic Resonance* **1991**, *94*, pp 664-669.
- (107) Lerner L.; Bax A. Sensitivity-Enhanced Two-Dimensional Heteronuclear Relayed Coherence Transfer NMR Spectroscopy, *Journal of Magnetic Resonance* **1986**, *69*, pp 375-380.

- (108) Martin G. E.; Spitzer T. D.; Crouch R. C. Inverted and Suppressed Direct Response HMQC-TOCSY Spectra. A Convenient Method of Spectral Editing, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1992**, *29*, pp 577-582.
- (109) Willker W.; Leibfritz D.; Kerssebaum R.; W., B. Gradient Selection in Inverse Heteronuclear Correlation Spectroscopy, *Magnetic Resonance in Chemistry* **1993**, *31*, pp 287-292.
- (110) Klein J.; Kulicke W.-M.; Hollmann J. *Chromatographie zur Bestimmung der Molmassen und Teilchengrößenverteilung von Polymeren.*; Springer: Berlin, Heidelberg, **1998**.
- (111) Kulicke W.-M.; Heins D.; Schittenhelm N. Determination of the Absolute Molar Mass and Particle Size Distribution of Water-Soluble Cellulose and Starch Derivatives, *Polymeric Materials Science and Engineering* **1998**, *79*, pp 427-428.
- (112) Giddings J.C.; Thomson G. H.; Myers M.N. An Observation of a Field Flow Fractionation Effect with Polystyrene Samples, *Separation Science and Technology* **1967**, *2*, pp 797-800.
- (113) Schimpf, M. E. Thermal Field-Flow Fractionation of Polymers, *Trends in Polymeric Science* **1993**, *1*, pp 74-78.
- (114) Schimpf, M. E.; Wheeler L. M. Thermal Field-Flow Fractionations of Copolymers, *Polymeric Materials Science and Engineering* **1991**, *65*, pp 15-16.
- (115) Schimpf, M. E.; Rue C.; Mercer G.; Wheeler L. M.; Romeo P. F. Studies in the Thermal Diffusion of Copolymers Using Field-Flow Fractionation, *Journal of Coating Technology* **1993**, *65*, pp 51-56.
- (116) Schimpf, M. E. Characterization of Macromolecules by Field-Flow Fractionation, *Indian Journal of Technology* **1993**, *31*, pp 443-457.
- (117) Schimpf, M. E.; Wheeler L. M.; Romeo P. F. Copolymer Retention in Thermal Field-Flow Fractionation. Dependence on Composition and Conformation, *ACS Symposium Series* **1993**, *521*, pp 63-76.
- (118) Schimpf, M. E.; Russell D. D.; Lewis J. K. Separation of Charged Latex Particles by Electrical Field-Flow Fractionation, *Journal of Liquid Chromatography* **1994**, *17*, pp 3221-3238.
- (119) Schimpf, M. E. Determination of Molecular Weight and Composition in Copolymers Using Thermal Field-Flow Fractionation Combined with Viscometry, *Advances in Chemistry Series* **1995**, *247*, pp 183-196.

- (120) Schimpf, M. E.; Caldwell K. D. Electrical Field-Flow Fractionation for Colloid and Particle Analysis, *American Laboratory* **1995**, *27*, pp 64-68.
- (121) Schimpf, M. E. Tutorial: Field-Flow Fractionation, *Chemical Education* **1996**, *1*, pp 34-41.
- (122) Schimpf, M. E. Advances in Field-Flow Fractionation for Polymer Analysis, *Trends in Polymeric Science* **1996**, *4*, pp 114-121.
- (123) Schimpf, M. E.; Petteys, M. P. Characterization of Humic Materials by Flow Field-Flow Fractionation, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1997**, *120*, pp 87-100.
- (124) Jensen K. D.; Williams S. K. R.; Giddings J.C. High Speed Particle Separation and Steric Inversion in Thin Flow Field-Flow Fractionation Channels, *Journal of Chromatography A* **1996**, *746*, pp 137-145.
- (125) Klein T. Seminar: Bio-, Polymer und Partikelanalytik mit der FFF, München, **2001**.
- (126) Myers M.N. Overview of Field-Flow Fractionation, *Journal of Microcolumn Separations* **1997**, *9*, pp 151-162.
- (127) Wahlund K.-G.; Giddings J. C. Properties of an Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation Channel having One Permeable Wall, *Analytical Chemistry* **1987**, *59*, pp 1332.
- (128) Litzen A.; Wahlund K.-G. Improved Separation Speed and Efficiency for Proteins, Nucleic Acids and Viruses in Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation, *Journal of Chromatography* **1989**, *476*, pp 413-421.
- (129) Wahlund K.-G.; Litzen A. Application of an Asymmetrical Flow FFF Channel to the Separation and Characterization of Proteins, Plasmids, Plasmid Fragments, Polysaccharids and Unicellular Algae, *Journal of Chromatography* **1989**, *461*, pp 73-78.
- (130) Litzen A. Separation Speed, Retention, and Dispersion in Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation as Functions of Channel Dimensions and Flow Rates, *Analytical Chemistry* **1993**, *65*, pp 461-470.
- (131) Litzen A.; Walter J. K.; Krischollek H.; Wahlund K.-G. Separation and Quantification of Monoclonal Antibody Aggregates by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation and Comparison to Gel Permeation Chromatography, *Analytical Biochemistry* **1993**, *212*, pp 469-480.
- (132) Barth H. G.; Flippen R. B. Particle Size Analysis, *Analytical Chemistry* **1995**, *67*, pp 257.

- (133) Wätzig H. Grundlagen der Kapillarelektrophorese, <http://www.tu-bs.de/institute/pharmchem/phchem-waetz-cep.htm>, last visit 05.09.2002, Technische Universität Braunschweig - Institut für Pharmazeutische Chemie, **2002**.
- (134) Liu M. K.; Li P.; Giddings J.C. Rapid Protein Separation and Diffusion Coefficient Measurement by Frit Inlet Flow Field-Flow Fractionation, *Protein Science* **1993**, *2*, pp 1520-1531.
- (135) Giddings J.C. Simplified Nonequilibrium Theory of Secondary Relaxation Effects in Programmed Field-Flow Fractionation, *Analytical Chemistry* **1986**, *58*, pp 735-740.
- (136) Ratanathanawongs S. K.; Giddings J.C. Particle Size Analysis Using Flow Field-Flow Fractionation, *Polymeric Materials Science and Engineering* **1991**, *65*, pp 24-26.
- (137) Atkins P. W. *Physical Chemistry*, 5th ed.; Oxford University Press: Oxford, **1995**.
- (138) Thurman E. M.; Malcolm R. L. Preparative Isolation of Aquatic Humic Substances, *Environmental Science and Technology* **1981**, *15*, pp 463-466.
- (139) Fales H. M.; Jarura T. M.; Babashak J. F. Simple Device for Preparing Etheral Diazomethane without Resorting to Codistillation, *Analytical Chemistry* **1973**, *45*, pp 2302-2303.
- (140) Neidig K.-P. Amix-Viewer & Amix Software Manual, Vers. 3.0, Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, **2001**.
- (141) Neidig K.-P., Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, personal communication, **2001**.
- (142) Aiken G. R.; McKnight D. M.; Wershaw R. L.; MacCarthy P. *An Introduction to Humic Substances in Soil, Sediment, and Water*; John Wiley & Sons, Inc., **1985**.
- (143) Abbt-Braun G.; Frimmel F. H. In *Refractory Organic Substances in the Environment*; Frimmel F. H., Abbt-Braun G., Heumann K. G., Hock B., Lüdemann H-D., Spiteller M. Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, **2002**, pp 1-38.
- (144) Kirkland J.J.; Dilks C.H. Flow Field-Flow Fractionation of Polymers in Organic Solvents, *Analytical Chemistry* **1992**, *64*, pp 2836-2840.
- (145) Wijnhoven J.E.G.; Bommel van M.R.; Poppe H.; Kok W.Th. Practical Experience with Organic Solvent Flow Field-Flow Fractionation, *Chromatographia* **1996**, *42*, pp 409-415.
- (146) Nguyen, M.; Beckett, R. Calibration Methods for Field-Flow Fractionation Using Broad Standards. I. Thermal Field-Flow Fractionation, *Separation Science and Technology* **1996**, *31*, pp 291-317.

- (147) Perminova I. V.; Frimmel F. H.; Kovalevskii D. V.; Abbt-Braun G.; Kudryavtsev A. V.; Hesse S. Development of a Predictive Model for Calculation of Molecular Weight of Humic Substances, *Water Research* **1998**, *32*, pp 872-881.
- (148) Hoop van den M. A. G. T.; Leeuwen van H.P. Influence of Molar Mass Distribution on the Complexation of Heavy Metals by Humic Material, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1996**, *120*, pp 235-242.
- (149) Moon M.H.; Park I.; Kim Y. Size Characterization of Liposomes by Flow Field-Flow Fractionation and Photon Correlation Spectroscopy - Effect of Ionic Strength and pH of Carrier Solutions, *Journal of Chromatography A* **1998**, *813*, pp 91-100.
- (150) Wolf M.; Teichmann G.; Hoque E.; Szymczak W.; Schimmack W. Copper Speciation in Aqueous Solutions of Fulvic Acid and Related Molecular Weight Distributions, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1999**, pp 596-599.
- (151) Klein T.; Nießner R. Charakterisierung schwermetallhaltiger Hydrokolloide aus dem Sickerwasser einer kommunalen Hausmülldeponie mit Ultrafiltration und Fluss-Feldflussfraktionierung, *Vom Wasser* **1996**, *87*, pp 373-385.
- (152) Lead, J. R.; Wilkinson, K. J.; Balnois, E.; Cutak, B. J.; Larive, C. K.; Assemi, S.; Beckett, R. Diffusion Coefficients and Polydispersities of the Suwannee River Fulvic Acid: Comparison of Fluorescence Correlation Spectroscopy, Pulsed-Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance, and Flow Field-Flow Fractionation, *Environmental Science and Technology* **2000**, *34*, pp 3508-3513.
- (153) Lead, J. R.; Wilkinson, K. J.; Starchev, K.; Canonica, S.; Buffle, J. Determination of Diffusion Coefficients of Humic Substances by Fluorescence Correlation Spectroscopy: Role of Solution Conditions, *Environmental Science and Technology* **2000**, *34*, pp 1365-1369.
- (154) Nguyen, M.; Beckett, R. Calibration Methods for Field Flow-Fractionation Using Broad Standards. II. Flow Field-Flow Fractionation, *Separation Science and Technology* **1996**, *31*, pp 453.
- (155) Chin Y. P.; Aiken G. R.; O'Loughlin E. Molecular Weight, Polydispersity, and Spectroscopic Properties of Aquatic Humic Substances, *Environmental Science and Technology* **1994**, *28*, pp 1853-1858.
- (156) Mori Y. Sedimentation Field-Flow Fractionation of Polystyrene Latex Particles in Alcohol Solvent, *Journal of Microcolumn Separations* **1997**, *10*, pp 57-63.

- (157) Asten van A. C.; Kok W. Th.; Tijssen R.; Poppe H. Characterization of Thermal Diffusion of Polystyrene in Binary Mixtures of THF/Dioxane and THF/ Cyclohexane, *Journal of Polymer Science* **1996**, *34*, pp 283-295.

Anhang A

Integrationsdaten der 1D- und der 2D-COSY- und HSQC-Spektren

Anhang A Tabelle 1: Integrationsdaten der 1D-¹H-Spektren, Angaben in %

δ (ppm)	*HO10FA,h+d	*HO10FA,d+h	HO10FA,h+d	HO10FA,d+h
0 – 1,7	31	19	31	38
1,7 – 3,2	24	62	31	31
3,2 – 4,75	35	18	34	28
4,85 - 6	2	0,5	1,5	1
6 – 7,18	2	0,5	1,5	1
7,275 - 9	6	0	1	1
9 - 11	0	0	0	0

δ (ppm)	*HO13FA,h+d	*HO13FA,d+h	HO13FA,h+d	HO13FA,d+h
0 – 1,7	40	22	29,5	30
1,7 – 3,2	22	49,5	22,5	21
3,2 – 4,75	33	25	43	45
4,85 - 6	1	1,5	2	1
6 – 7,18	1	1	2	2
7,275 - 9	3	1	1	1
9 - 11	0	0	0	0

δ (ppm)	*SV1FA,h+d	*SV1FA,d+h	SVFA,h+d	SV1FA,d+h
0 – 1,7	34,5	33	56	39
1,7 – 3,2	26,5	37	26	33
3,2 – 4,75	31	27	15	26
4,85 - 6	1,5	1	0,5	0,5
6 – 7,18	2,5	1	1,5	1
7,275 - 9	4	1	1	0,5
9 - 11	0	0	0	0

δ (ppm)	*MPDOM,h+d	*MPDOM,d+h	MPDOM,h+d	MPDOM,d+h
0 – 1,7	56	38	28	33
1,7 – 3,2	20	24	28	25
3,2 – 4,75	21	19	35	40
4,85 - 6	1	4	3	0,5
6 – 7,18	1	4	3	1
7,275 - 9	1	5	3	0,5
9 - 11	0	6	0	0

δ (ppm)	*HO10HA,h+d	*HO10HA,d+h	HO10HA,h+d	HO10HA,d+h
0 – 1,7	41	23	34	19
1,7 – 3,2	43,5	39	27,5	51
3,2 – 4,75	14	35	35	23
4,85 - 6	0,5	1	1	1
6 – 7,18	0,5	1	1,5	5
7,275 - 9	0,5	1	1	1
9 - 11	0	0	0	0

*) ¹³C methyliert

Anhang A Tabelle 2: Integrationsdaten der 1D-¹H-Spektren, Angaben in %

δ (ppm)	*HO13HA,h+d	*HO13HA,d+h	HO13HA,h+d	HO13HA,d+h
0 – 1,7	23	45	33	28
1,7 – 3,2	55	27,5	23	30
3,2 – 4,75	19,5	25	38,5	37
4,85 – 6	1	1	2	2
6 – 7,18	1	1	2	2
7,275 – 9	0,5	0,5	1,5	1
9 – 11	0	0	0	0

δ (ppm)	*SV1HA,h+d	*SV1HA,d+h	SV1HA,h+d	SV1HA,d+h
0 – 1,7	34	22,5	32	31,5
1,7 – 3,2	31	48,5	28	31
3,2 – 4,75	28	26	33	34
4,85 – 6	2	1	2	1
6 – 7,18	3	1	3	1,5
7,275 – 9	2	1	2	1
9 – 11	0	0	0	0

δ (ppm)	*Carminsre,h+d	*Carminsre,d+h	Carminsre,h+d	Carminsre,d+h
0 – 1,7	35	13,4	24	28
1,7 – 3,2	36	82,3	30,5	28
3,2 – 4,75	27	4	43	41
4,85 – 6	0,6	0,2	0,5	1
6 – 7,18	0,8	0,1	1	1
7,275 – 9	0,6	0	1	1
9 – 11	0	0	0	0

*) ¹³C methyliert

Anhang A Tabelle 3: Integrationsdaten der 1D-¹³C-Spektren, Angaben in %

δ (ppm)	*HO10FA,h+d	*HO10FA,d+h	HO10FA,h+d	HO10FA,d+h
-30 – 0	0,4	0,5	n.d.	1,4
0 – 48,6	36	52,7	n.d.	54
50 - 60	43,7	23,6	n.d.	15
60 – 75,5	14	19,5	n.d.	9
79 - 105	2	0,5	n.d.	2
105 - 145	2,7	2	n.d.	9,5
145 - 165	0,6	0,5	n.d.	3,3
165 - 185	0,3	0,4	n.d.	3
185 - 220	0,3	0,3	n.d.	2,8

δ (ppm)	*HO13FA,h+d	*HO13FA,d+h	HO13FA,h+d	HO13FA,d+h
-30 – 0	0,7	0,65	2,5	4,2
0 – 48,6	41	31,6	31,4	32,4
50 - 60	40,7	38,6	17,8	16,3
60 – 75,5	14,3	21,2	10,1	11,6
79 - 105	0,7	2,15	5	5,2
105 - 145	1,9	5,2	22,4	16,45
145 - 165	0,2	0,35	3,8	5,65
165 - 185	0,2	0	5	4,5
185 - 220	0,3	0,25	2	3,7

δ (ppm)	*SV1FA,h+d	*SV1FA,d+h	SV1FA,h+d	SV1FA,d+h
-30 – 0	1,8	1	2	n.d.
0 – 48,6	42,6	52,2	48,9	n.d.
50 - 60	36,2	18,8	6,4	n.d.
60 – 75,5	13,5	17,8	3,3	n.d.
79 - 105	0,8	2	4,5	n.d.
105 - 145	3,7	4,7	19,9	n.d.
145 - 165	0,6	1	5,4	n.d.
165 - 185	0,4	1	4,7	n.d.
185 - 220	0,4	1,5	4,9	n.d.

δ (ppm)	*MPDOM,h+d	*MPDOM,d+h	MPDOM,h+d	MPDOM,d+h
-30 – 0	2,1	2,9	1,7	1
0 – 48,6	31	49,4	44,7	34,4
50 - 60	43,7	24,5	10	18,6
60 – 75,5	13,7	17,2	9,4	13,8
79 - 105	2,9	2	5,3	4,6
105 - 145	3,3	3,2	18,7	15,8
145 - 165	0,9	0,2	3,5	5
165 - 185	0,5	0,2	3,5	3,9
185 - 220	1,9	0,4	3,2	2,9

*) ¹³C methyliert
n.d.: no data

Anhang A Tabelle 4: Integrationsdaten der 1D-¹³C-Spektren, Angaben in %

δ (ppm)	*HO10HA,h+d	*HO10HA,d+h	HO10HA,h+d	HO10HA,d+h
-30 – 0	1,3	0,4	4,1	1,3
0 – 48,6	76,4	39,8	33,8	44,2
50 - 60	13	31,1	16,1	12,6
60 – 75,5	8,3	20,5	7,8	9,9
79 - 105	0,2	2,4	4,3	5,5
105 - 145	0,7	3,5	18,3	14
145 - 165	0	1	4,6	5
165 - 185	0	0,6	4,5	3,6
185 - 220	0,1	0,7	6,5	3,9

δ (ppm)	*HO13HA,h+d	*HO13HA,d+h	HO13HA,h+d	HO13HA,d+h
-30 – 0	0,7	0,5	n.d.	0,5
0 – 48,6	58,1	42,6	n.d.	42,6
50 - 60	22,1	25,4	n.d.	25,4
60 – 75,5	13,7	25	n.d.	25
79 - 105	1,1	0,5	n.d.	0,5
105 - 145	2,6	2,9	n.d.	2,9
145 - 165	0,6	1	n.d.	1
165 - 185	0,5	1	n.d.	1
185 - 220	0,6	1,1	n.d.	1,1

δ (ppm)	*SV1HA,h+d	*SV1HA,d+h	SV1HA,h+d	SV1HA,d+h
-30 – 0	2,5	2	1,5	1,4
0 – 48,6	48,6	39,7	17,6	42,3
50 - 60	31,3	26,6	8	15,2
60 – 75,5	9,5	27,6	4,1	13,8
79 - 105	1	0,5	7,2	4,4
105 - 145	4	1,8	40	16,1
145 - 165	1,3	0,3	8,5	2,9
165 - 185	0,7	0,5	5,7	1,6
185 - 220	1,1	1	7,4	2,3

δ (ppm)	*Carminsre,h+d	*Carminsre,d+h	Carminsre,h+d	Carminsre,d+h
-30 – 0	n.d.	n.d.	5,5	4,5
0 – 48,6	n.d.	n.d.	30,1	41,8
50 - 60	n.d.	n.d.	16,5	17,8
60 – 75,5	n.d.	n.d.	11	13,1
79 - 105	n.d.	n.d.	7,1	2,4
105 - 145	n.d.	n.d.	13,2	10,6
145 - 165	n.d.	n.d.	3,9	5,5
165 - 185	n.d.	n.d.	5,7	2,5
185 - 220	n.d.	n.d.	7	1,8

*) ¹³C methyliert
n.d.: no data

Anhang A Tabelle 5: COSY-Integrationsdaten, ¹²C-methyliert, Angaben in %

	13C,SV1FA,d+h	12C,Carmin,d+h	12C,Carmin,h+d	12C,MPDOM,d+h	12C,HO10FA,d+h	12C,HO10FA,h+d	12C,HO13FA,d+h	12C,HO13FA,h+d
A1	3,5	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,3	0,2
A2	21,7	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	1,0	0,7
B1	0,2	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
B2	2,7	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0
B3	0,1	0,0	0,4	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
C1	33,6	42,1	46,5	36,0	38,0	42,9	33,9	37,8
C2	17,7	2,7	1,8	1,7	15,0	3,1	4,4	1,7
C3	0,6	0,4	1,2	0,1	1,4	0,9	0,0	0,1
D	19,8	54,6	49,9	61,7	45,5	53,0	60,1	59,5
E	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
F	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
G	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
H	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

	12C,SV1FA,d+h	12C,SV1FA,h+d	12C,HO10HA,d+h	12C,HO10HA,h+d	12C,HO13HA,h+d	12C,SV1HA,d+h	12C,SV1HA,h+d
A1	0,0	34,6	0,0	0,0	32,0	0,0	0,4
A2	0,0	33,2	0,4	0,0	1,7	0,1	0,4
B1	0,0	1,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,2
B2	0,0	3,5	0,0	0,0	0,6	0,0	0,2
B3	0,0	0,1	0,0	0,0	0,8	0,0	0,2
C1	38,7	13,5	46,6	42,4	35,8	35,8	40,9
C2	3,0	8,9	6,6	1,9	23,9	7,5	1,2
C3	0,3	0,7	0,2	1,1	0,6	0,4	0,2
D	57,7	4,3	46,1	54,5	4,4	56,1	56,0
E	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1
F	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
G	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
H	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Anhang A Tabelle 6: COSY-Integrationsdaten, ¹³C-methyliert, Angaben in %

	13C,Carmin,d+h	13C,Carmin,h+d	13C,MPDOM,d+h	13C,MPDOM,h+d	13C,HO10FA,d+h	13C,HO10FA,h+d	13C,HO13FA,d+h	13C,HO13FA,h+d
A1	0,0	0,0	2,3	1,1	0,0	0,0	0,1	0,1
A2	4,2	0,1	2,0	55,8	0,7	0,1	16,9	21,5
B1	2,2	0,1	2,7	0,8	0,0	0,1	0,0	0,0
B2	1,5	0,0	2,5	0,7	0,0	0,0	0,1	0,1
B3	0,0	0,1	1,3	0,5	0,0	0,0	0,2	0,2
C1	54,3	47,2	24,9	17,0	48,1	36,0	35,6	32,7
C2	21,8	5,5	48,0	3,1	1,7	14,7	4,5	1,6
C3	0,6	1,6	2,7	0,8	0,0	0,2	0,2	0,0
D	14,9	45,4	10,1	14,2	49,2	48,7	42,3	41,0
E	0,4	0,1	1,4	5,3	0,2	0,0	0,2	2,8
F	0,0	0,0	0,6	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
G	0,0	0,0	0,8	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
H	0,0	0,0	0,8	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0

	13C,SV1FA,d+h	13C,SV1FA,h+d	13C,HO10HA,d+h	13C,HO10HA,h+d	13C,HO13HA,d+h	13C,HO13HA,h+d	13C,SV1HA,d+h	13C,SV1HA,h+d
A1	3,5	12,6	0,0	0,0	17,5	2,7	0,0	0,2
A2	21,7	23,0	0,0	0,0	26,0	43,9	0,1	0,4
B1	0,2	1,2	0,0	0,0	0,4	0,7	0,0	0,2
B2	2,7	0,2	0,0	0,0	1,0	9,5	0,0	0,3
B3	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,2	0,0	0,0
C1	33,6	41,1	37,6	38,0	36,4	18,2	32,8	41,5
C2	17,7	6,3	12,3	21,0	6,1	16,9	13,8	9,5
C3	0,6	0,3	0,1	1,0	1,1	1,3	0,5	0,3
D	19,8	15,2	50,0	39,9	11,3	6,5	52,7	47,5
E	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
F	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
G	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
H	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1

Anhang A Tabelle 7: HSQC-Integrationsdaten, ¹²C-methyliert, Angaben in %

	12C,Carmin,d+h	12C,Carmin,h+d	12C,MPDOM,d+h	12C,HO10FA,d+h	12C,HO10FA,h+d	12C,HO13FA,d+h	12C,HO13FA,h+d	12C,SV1FA,d+h
A1	0,8	0,0	0,6	0,0	-1,4	0,0	0,5	0,1
A2	10,2	7,5	18,6	12,8	-4,9	16,9	17,2	12,5
B/C	10,7	22,3	19,8	32,8	18,8	22,6	22,6	34,8
D	18,7	12,8	9,9	24,3	14,6	8,6	8,3	18,7
E	57,9	56,2	49,4	29,7	71,4	50,9	50,3	33,3
F	0,9	1,0	0,3	-0,6	0,7	0,2	0,4	0,0
G	0,1	0,0	0,1	0,0	0,2	-0,1	-0,1	0,1
H	0,8	0,2	1,3	1,0	0,5	0,9	0,8	0,6

	12C,SV1FA,h+d	12C,HO10HA,d+h	12C,HO10HA,h+d	12C,HO13HA,d+h	12C,HO13HA,h+d	12C,SV1HA,d+h	12C,SV1HA,h+d
A1	18,4	0,4	-0,1	0,0	18,5	0,7	0,0
A2	43,9	14,1	10,1	12,7	0,8	17,2	21,9
B/C	13,4	3,8	32,2	16,5	6,6	19,8	20,1
D	14,0	45,0	12,0	24,0	3,7	20,3	7,1
E	8,2	36,1	44,9	45,7	69,1	40,7	49,4
F	0,1	0,1	0,3	0,4	0,1	0,1	0,1
G	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	-0,1	0,0
H	2,1	0,6	0,6	0,7	1,0	1,3	1,4

Anhang A Tabelle 8: HSQC-Integrationsdaten, ¹³C-methyliert, Angaben in %

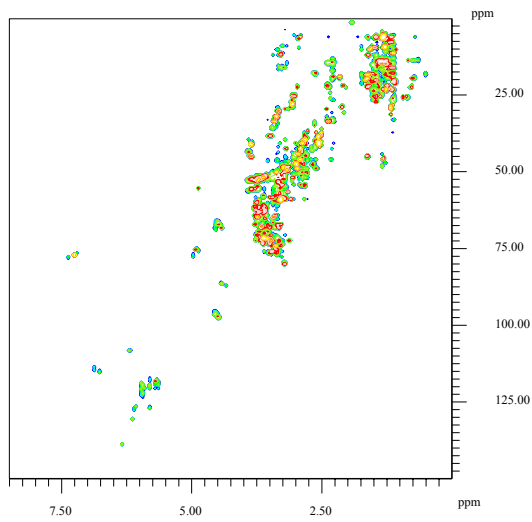
	¹³ C,Carmin,d+h	¹³ C,Carmin,h+d	¹³ C,MPDOM,d+h	¹³ C,MPDOM,h+d	¹³ C,HO10FA,d+h	¹³ C,HO10FA,h+d	¹³ C,HO13FA,d+h	¹³ C,HO13FA,h+d
A1	-0,1	-1,5	1,2	-1,6	0,0	0,0	0,0	-0,6
A2	27,8	10,3	38,7	2,3	17,8	14,3	26,7	26,6
B/C	1,9	21,7	3,9	35,9	8,0	22,9	9,5	18,5
D	10,6	2,5	45,7	3,5	2,7	0,5	38,4	5,1
E	59,8	66,4	9,7	60,1	69,8	63,3	23,0	53,7
F	0,0	0,7	0,3	-0,1	0,4	-1,2	-0,2	-3,4
G	0,0	0,0	0,4	-0,1	0,1	0,0	0,0	0,1
H	0,0	-0,2	0,2	0,1	1,1	0,3	2,5	0,0

	¹³ C,SV1FA,d+h	¹³ C,SV1FA,h+d	¹³ C,HO10HA,d+h	¹³ C,HO10HA,h+d	¹³ C,HO13HA,d+h	¹³ C,HO13HA,h+d	¹³ C,SV1HA,d+h	¹³ C,SV1HA,h+d
A1	4,0	3,7	-0,1	0,9	3,8	2,5	-0,1	0,6
A2	33,2	23,1	12,4	15,7	26,5	36,3	14,8	17,8
B/C	10,8	4,3	28,6	46,2	3,1	9,2	28,1	27,0
D	26,5	40,8	7,2	13,8	22,5	30,0	3,2	4,5
E	24,4	27,6	51,7	23,0	43,4	22,0	51,7	49,7
F	0,1	0,3	-0,3	0,1	0,2	0,1	0,5	0,0
G	0,8	0,2	0,0	0,0	0,5	0,1	0,0	0,1
H	0,2	0,1	0,5	0,2	0,0	-0,1	1,7	0,2

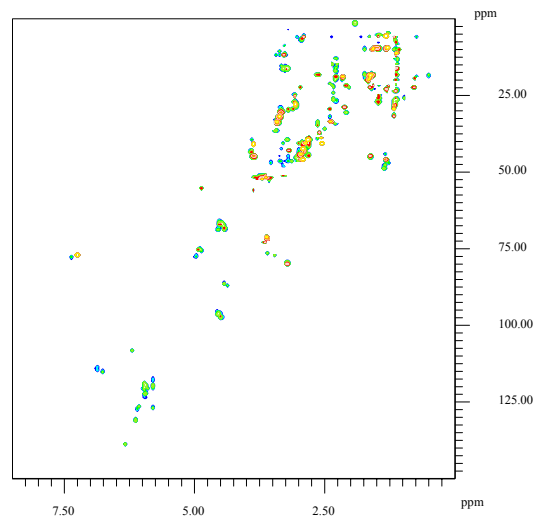
Anhang B

¹²C-methylierte HSQC-Spektren und Differenzspektren des Gerüsts und der nativen CH₃-Gruppen der methylierten HS

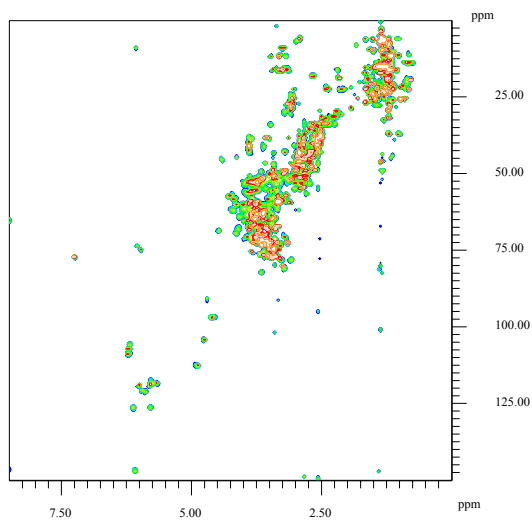
HO10FA,d+h
¹²C-methyliert



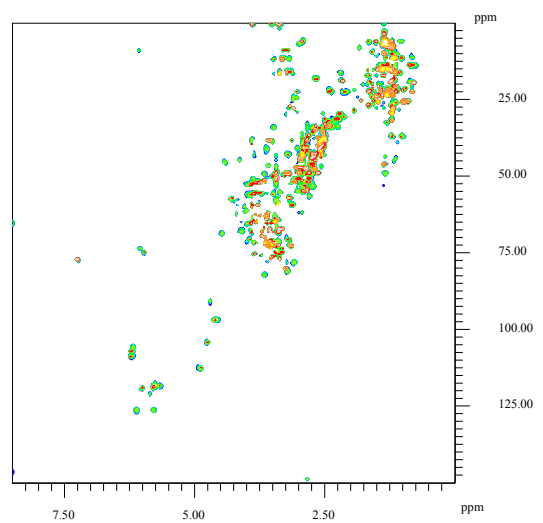
Differenzspektrum: Gerüst + native CH₃



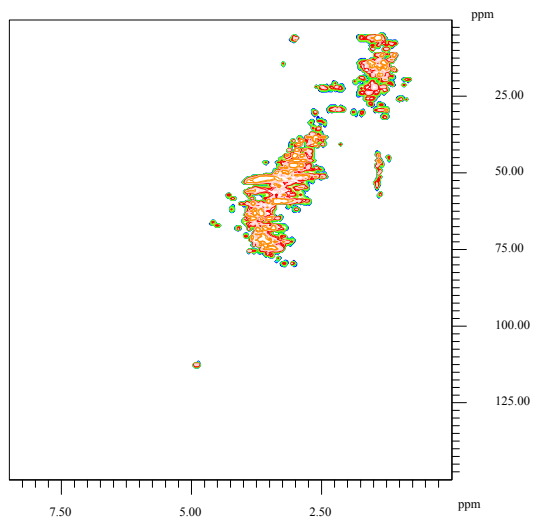
SV1FA,d+h
¹²C-methyliert



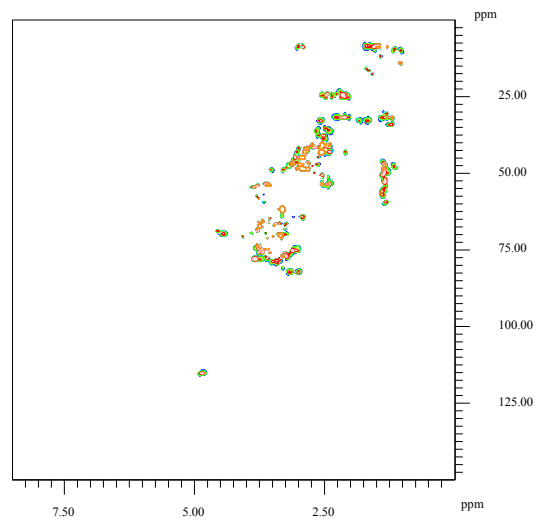
Differenzspektrum: Gerüst + native CH₃



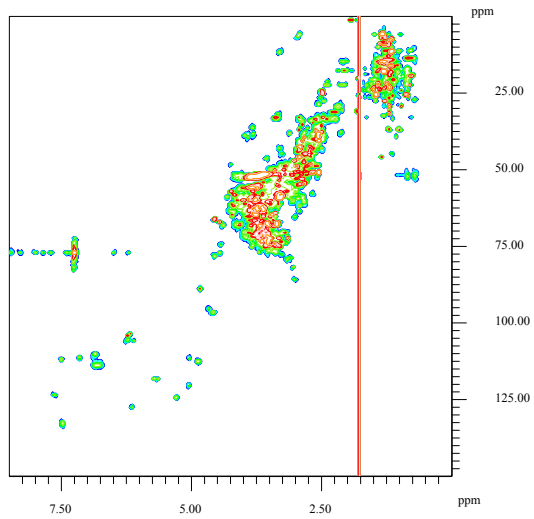
HO10FA,h+d
¹²C-methyliert



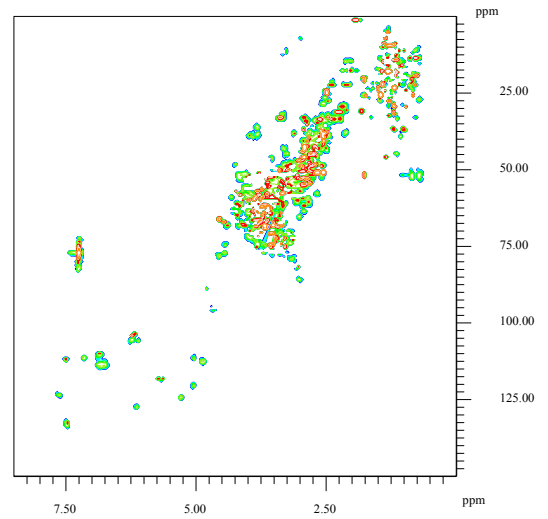
Differenzspektrum: Gerüst + native CH₃



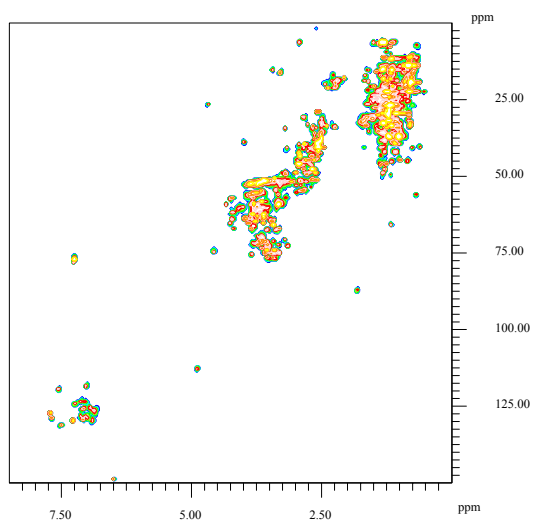
HO13FA,h+d
¹²C-methyliert



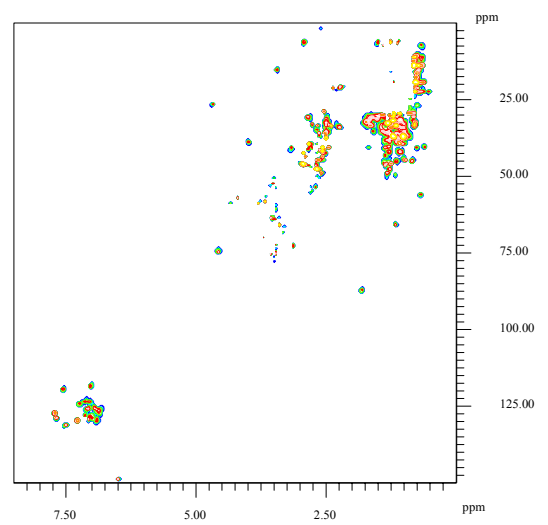
Differenzspektrum: Gerüst + native CH₃



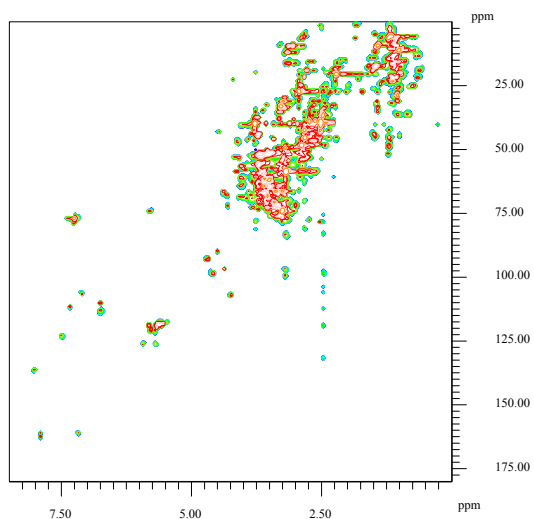
SV1FA,h+d
¹²C-methyliert



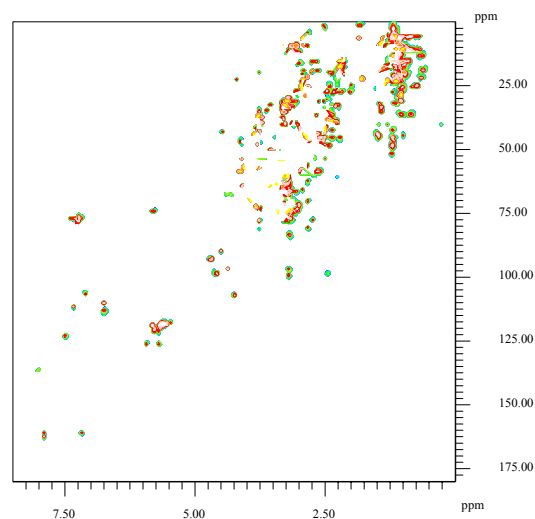
Differenzspektrum: Gerüst + native CH₃



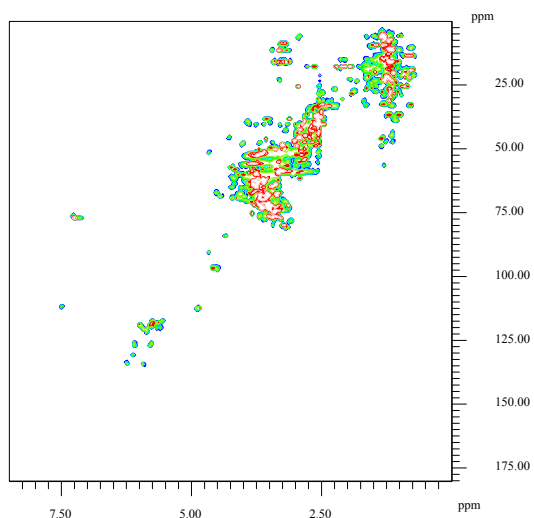
HO10HA,d+h
¹²C-methyliert



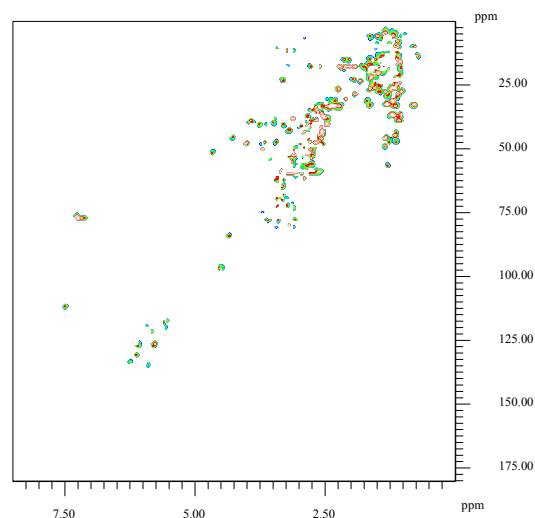
Differenzspektrum: Gerüst + native CH₃



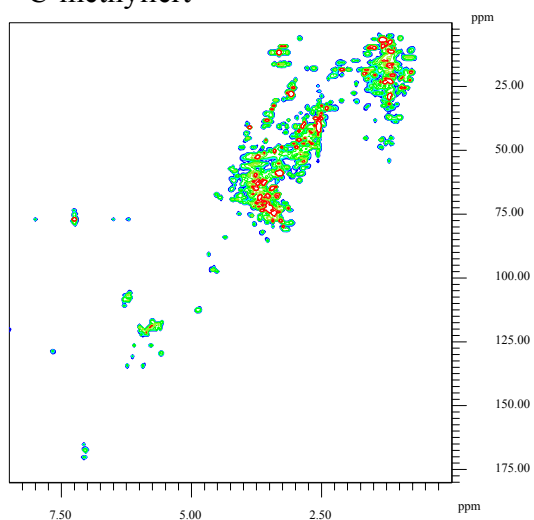
HO13HA,d+h
¹²C-methyliert



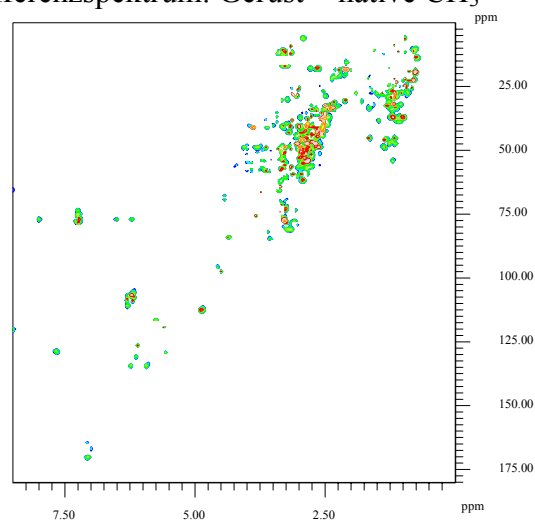
Differenzspektrum: Gerüst + native CH₃



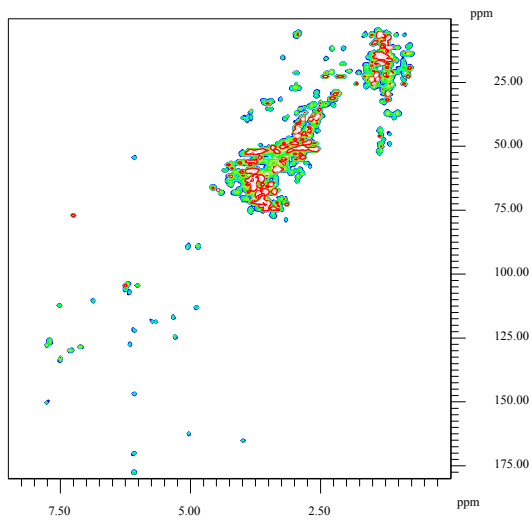
SV1HA,d+h
¹²C-methyliert



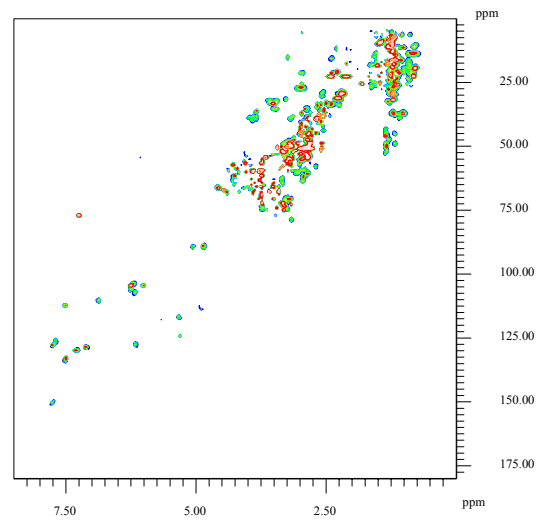
Differenzspektrum: Gerüst + native CH₃



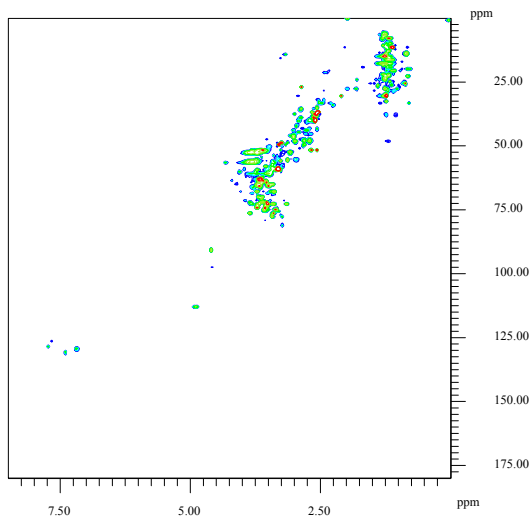
HO10HA,h+d
¹²C-methyliert



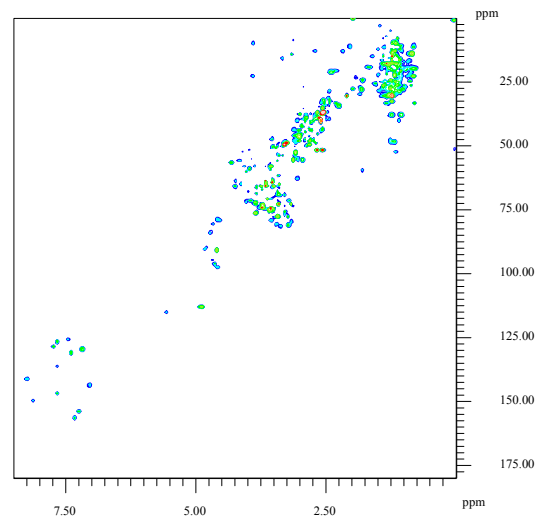
Differenzspektrum: Gerüst und native CH₃



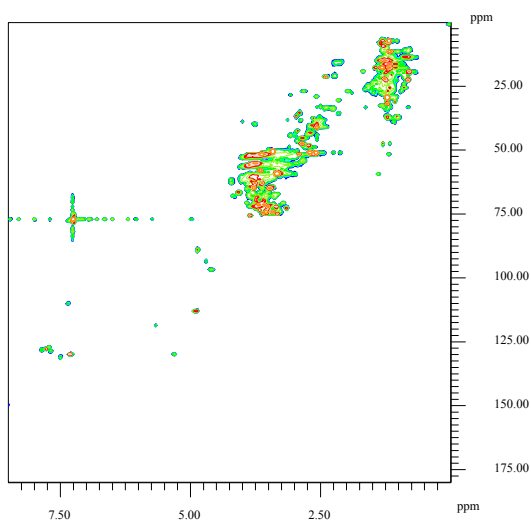
HO13HA,h+d
¹²C-methyliert



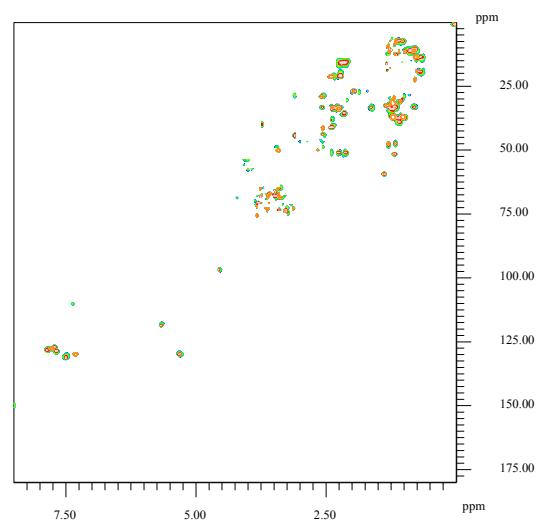
Differenzspektrum: Gerüst und native CH₃



SV1HA,h+d
¹²C-methyliert



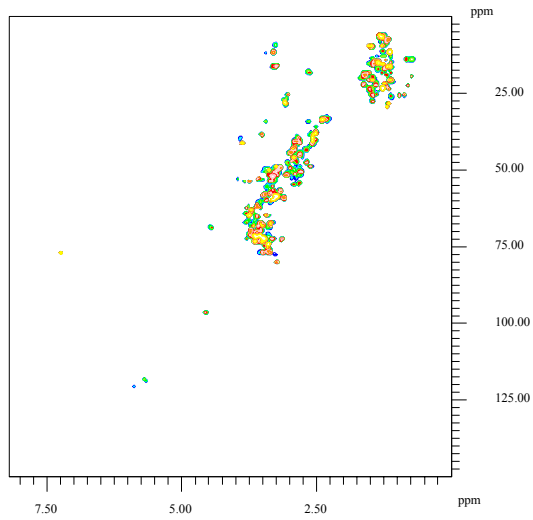
Differenzspektrum: Gerüst und native CH₃



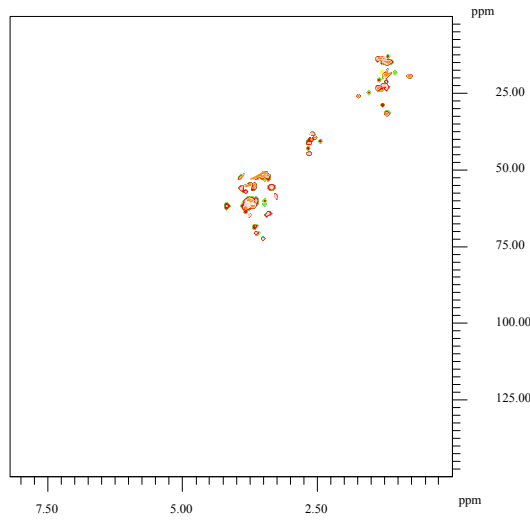
Anhang C

HSQC- und COSY-Differenzspektren aller FAs und HAs in beiden Methylierungsreihenfolgen und daraus resultierende Minimumspektren

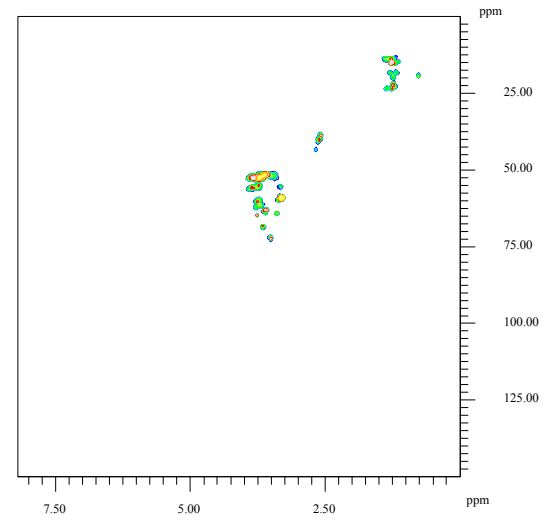
12C,FA,d+h Differenzspektrum



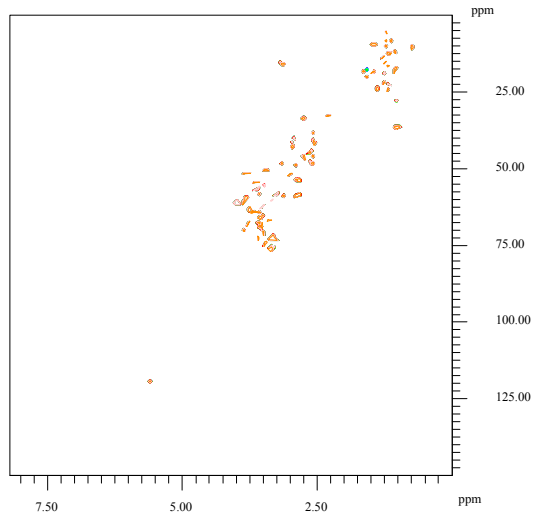
12C,FA,h+d Differenzspektrum



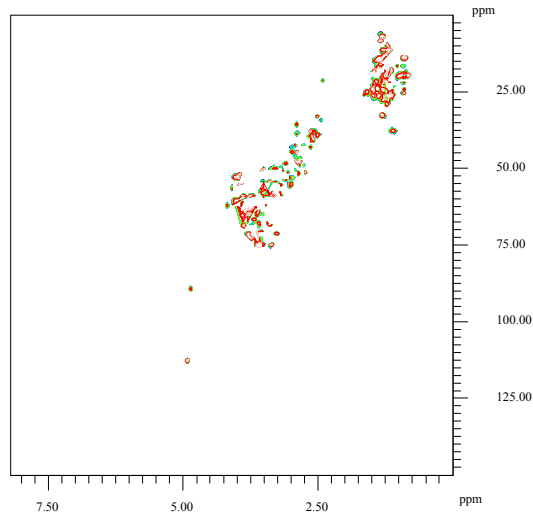
Minimumspektrum



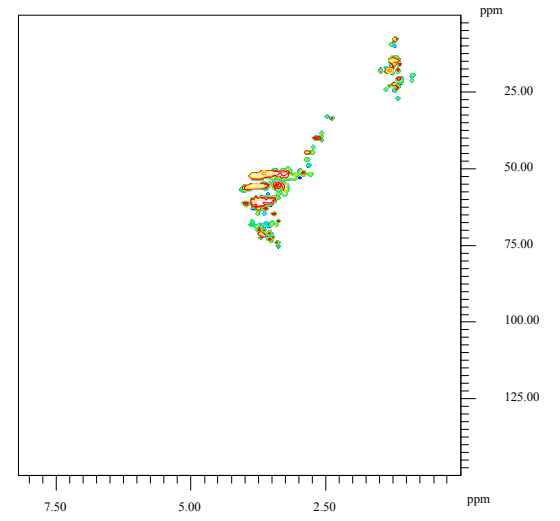
12C,HA,d+h Differenzspektrum



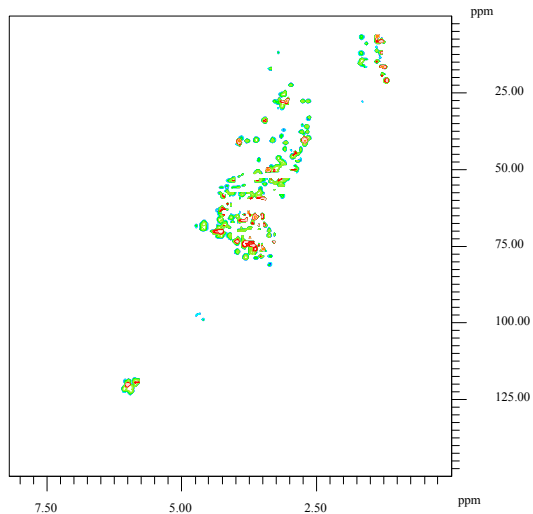
12C,HA,h+d Differenzspektrum



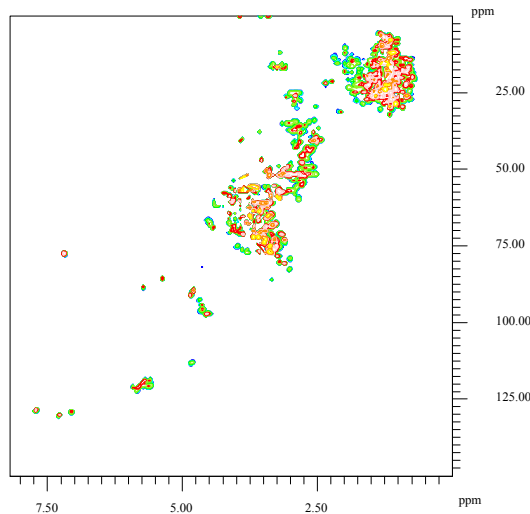
Minimumspektrum



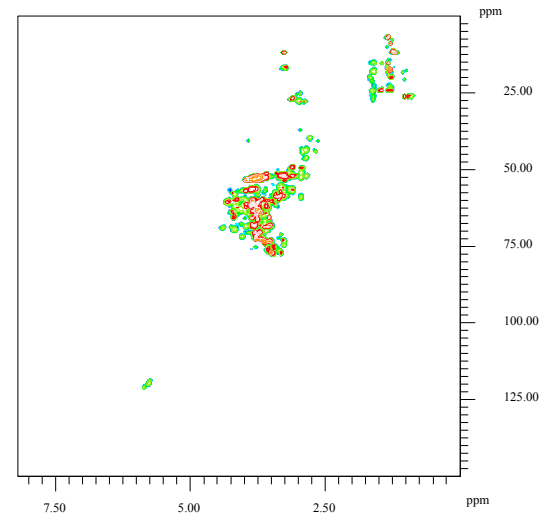
$^{13}\text{C,FA,d+h}$ Differenzspektrum



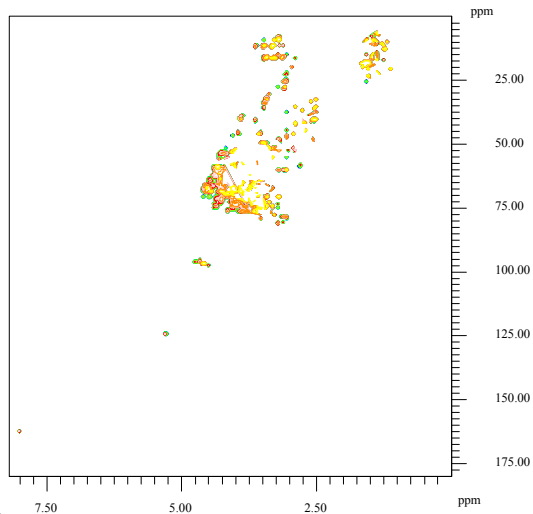
$^{13}\text{C,FA,h+d}$ Differenzspektrum



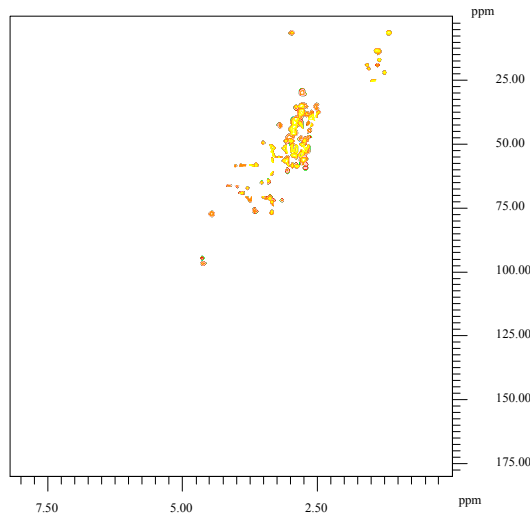
Minimumspektrum



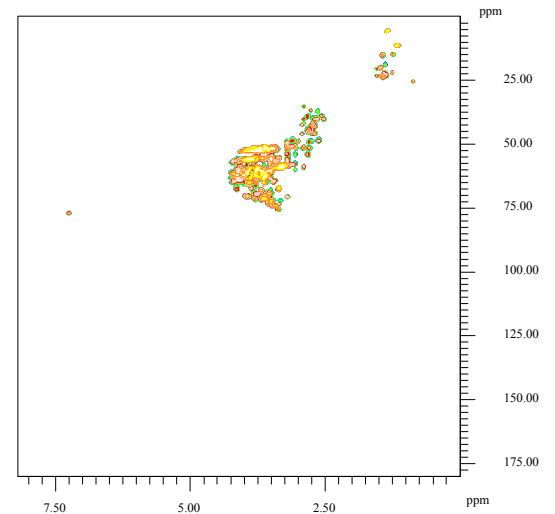
$^{13}\text{C,HA,d+h}$ Differenzspektrum



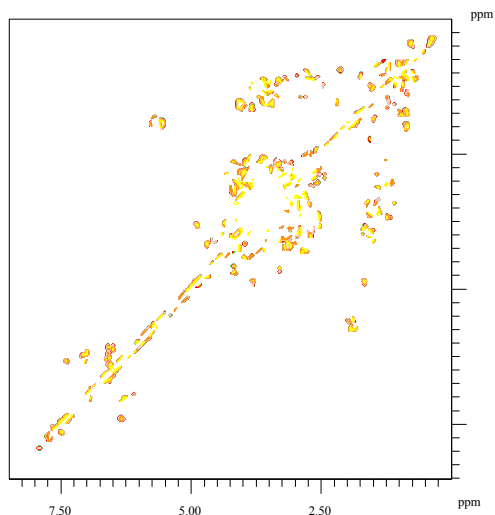
$^{13}\text{C,HA,h+d}$ Differenzspektrum



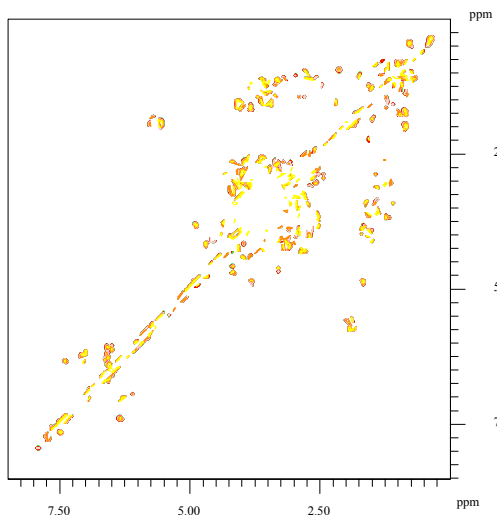
Minimumspektrum



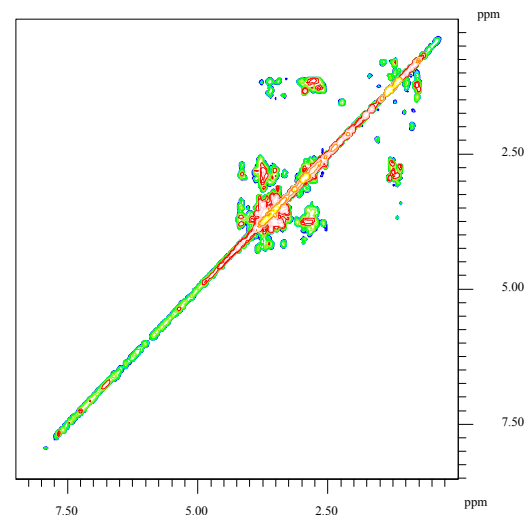
12C,FA,d+h Differenzspektrum



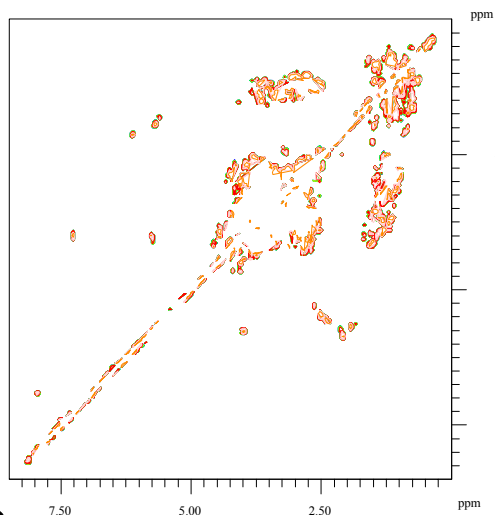
12C,FA,h+d Differenzspektrum



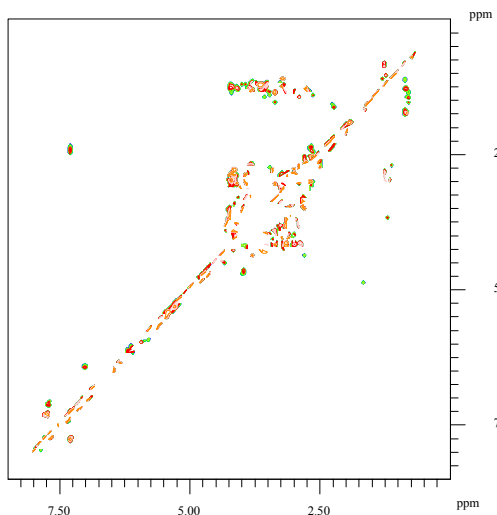
Minimumspektrum



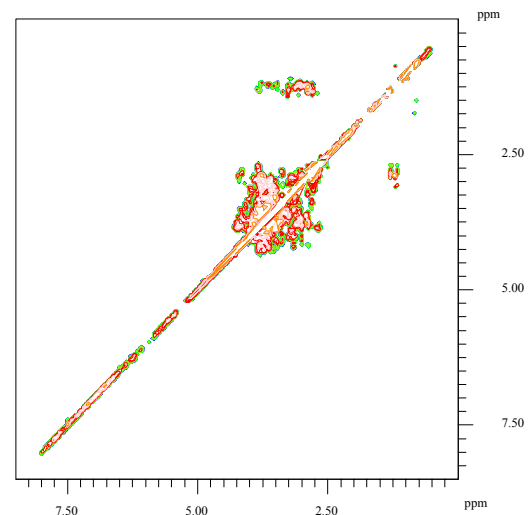
12C,HA,d+ h Differenzspektrum



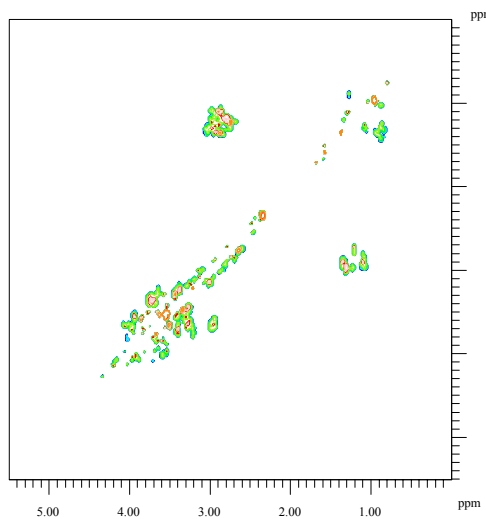
12C,HA,h+ d Differenzspektrum



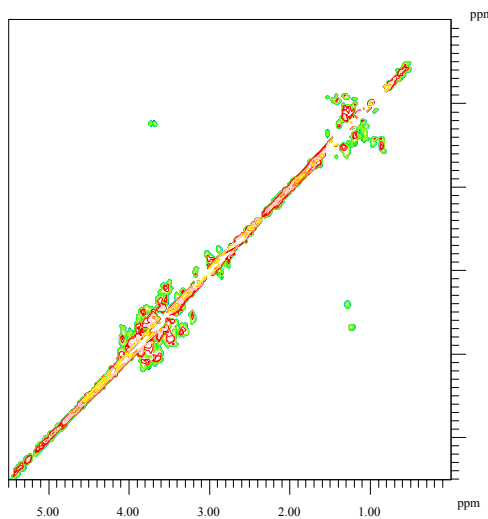
Minimumspektrum



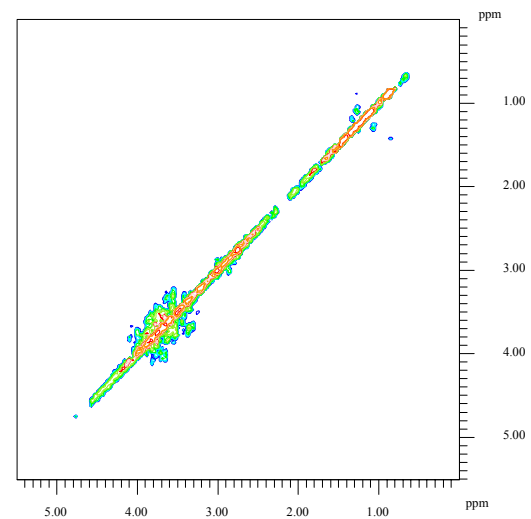
$^{13}\text{C,FA,d+h}$ Differenzspektrum



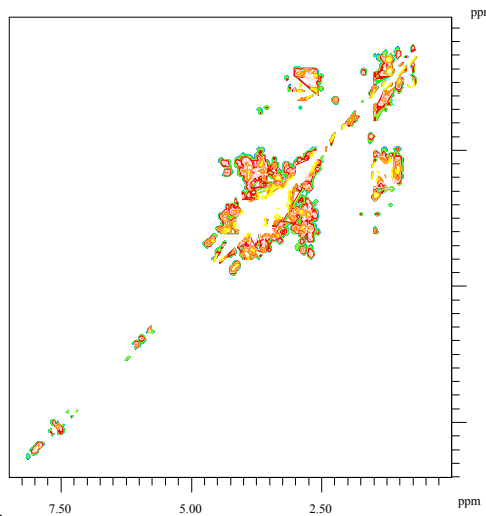
$^{13}\text{C,FA,h+d}$ Differenzspektrum



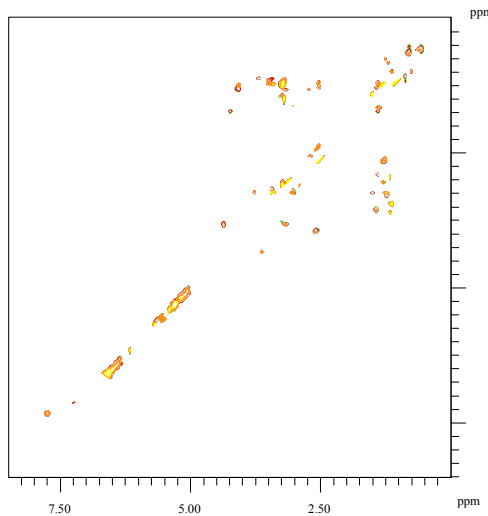
Minimumspektrum



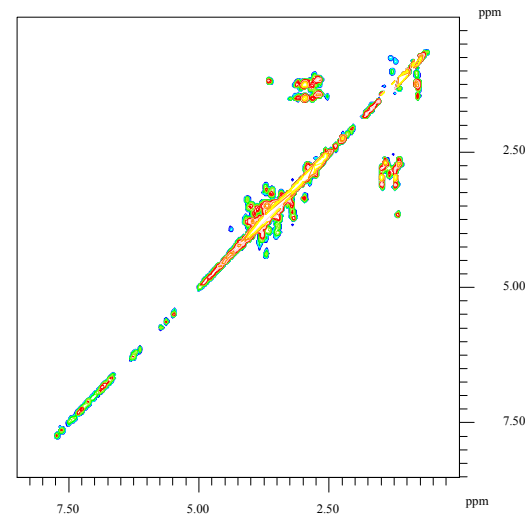
$^{13}\text{C,HA,d+h}$ Differenzspektrum



$^{13}\text{C,HA,h+d}$ Differenzspektrum



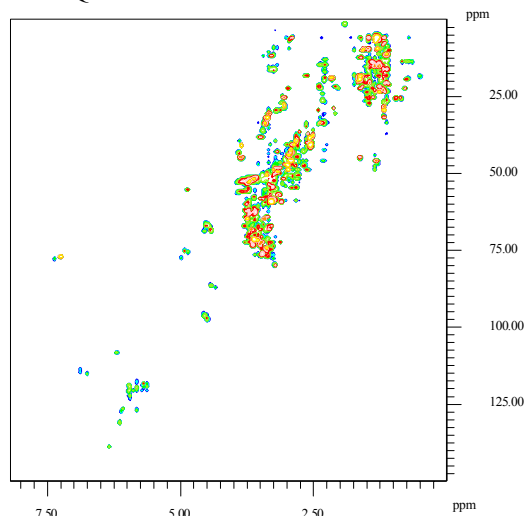
Minimumspektrum



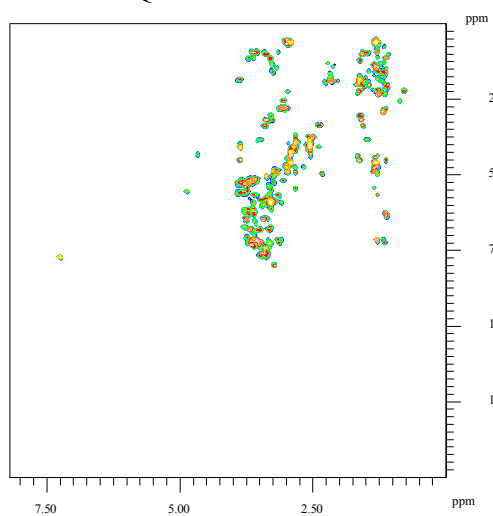
Anhang D

Weitbereichskopplungsinformationen:
HSQC-, HSQC-TOCSY- und deren Differenzspektren

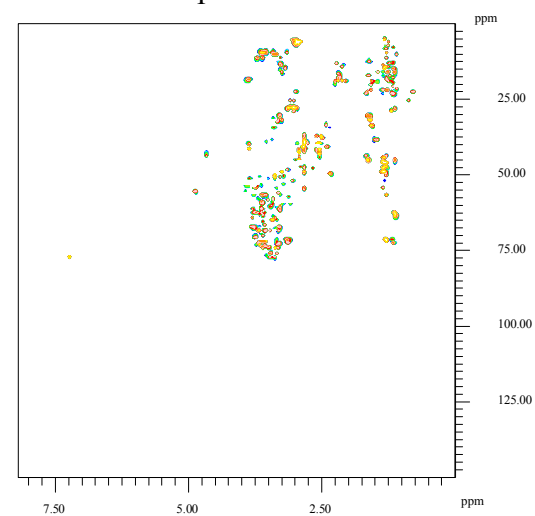
12C,HO10FA,d+h
HSQC



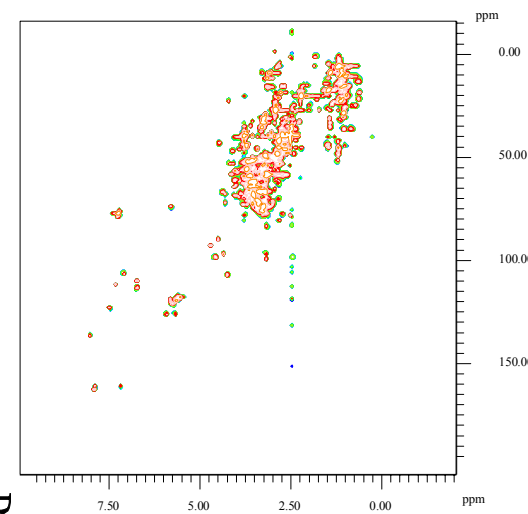
HSQC-TOCSY



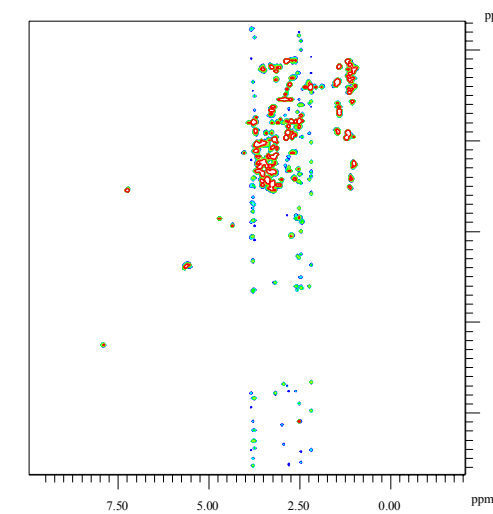
Differenzspektrum



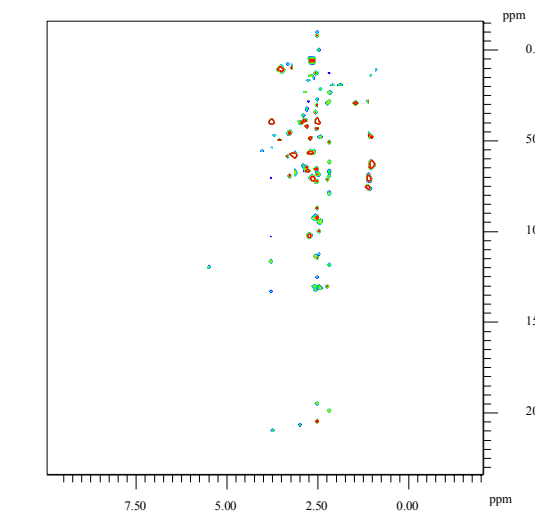
12C,HO10HA,d+h
HSQC



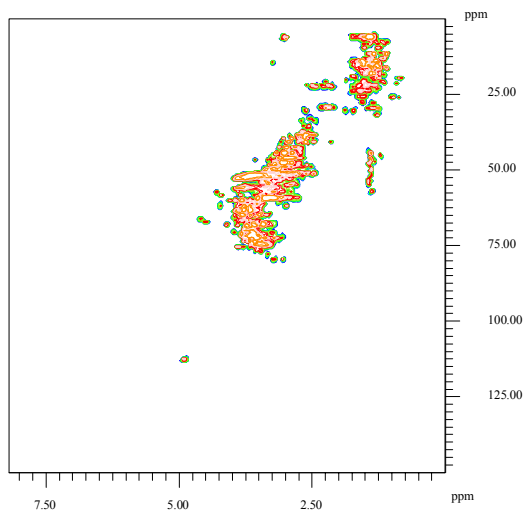
HSQC-TOCSY



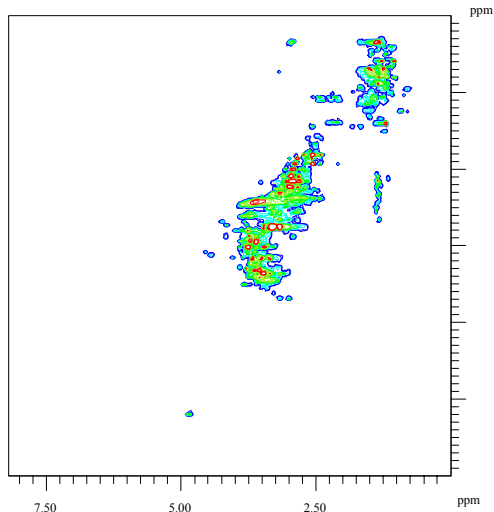
Differenzspektrum



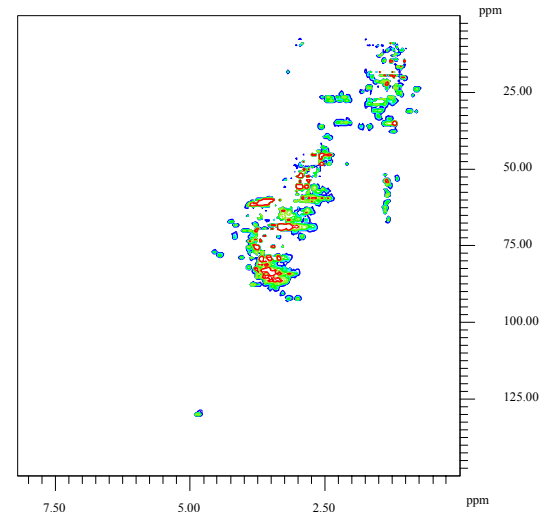
¹²C,HO10FA,h+d
HSQC



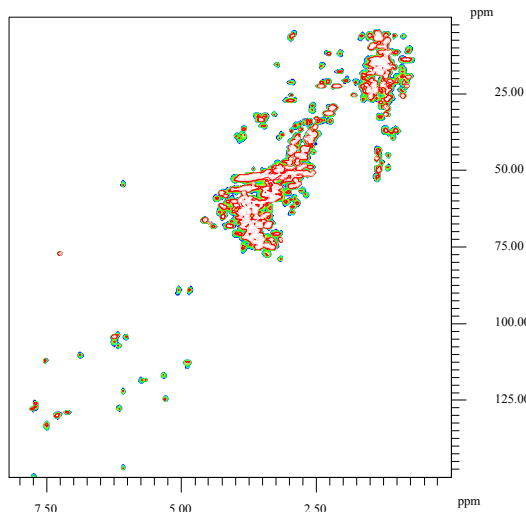
HSQC-TOCSY



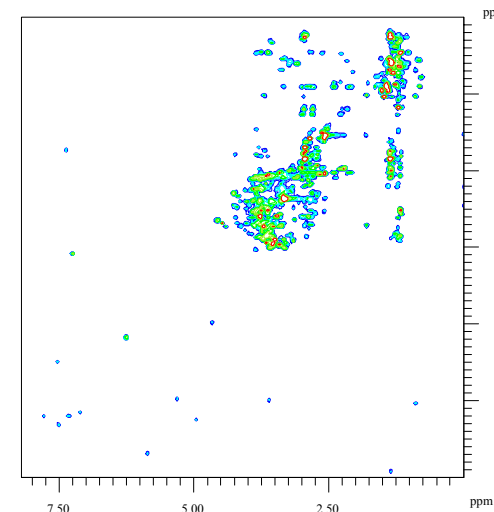
Differenzspektrum



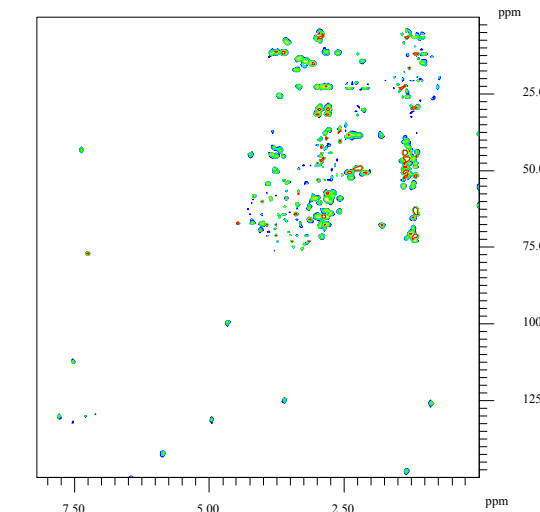
¹²C,HO10HA,h+d
HSQC



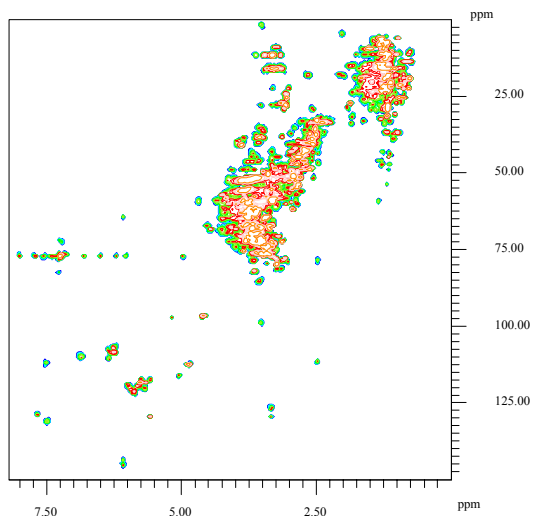
HSQC-TOCSY



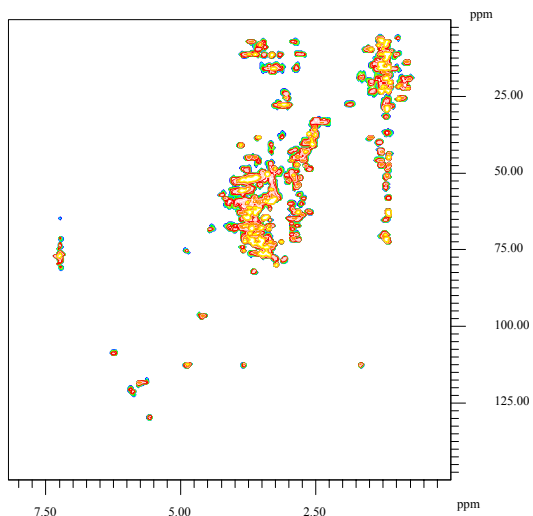
Differenzspektrum



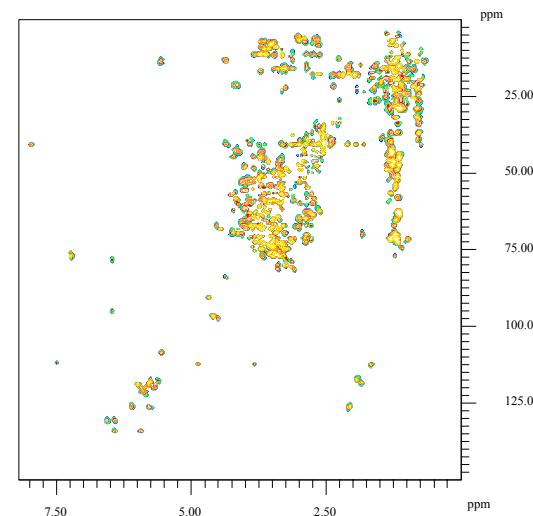
¹²C,¹H/¹³CFA,d+h
HSQC



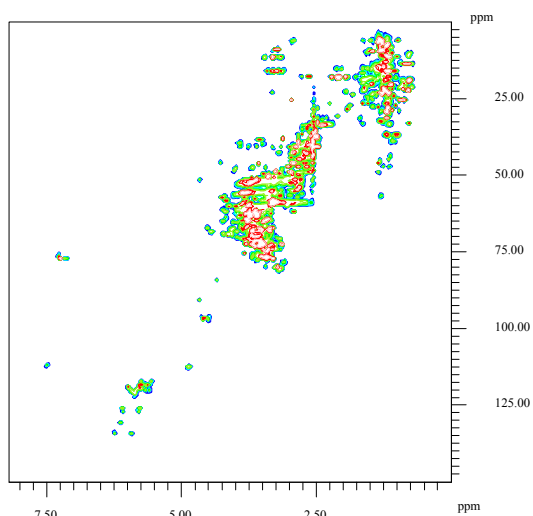
HSQC-TOCSY



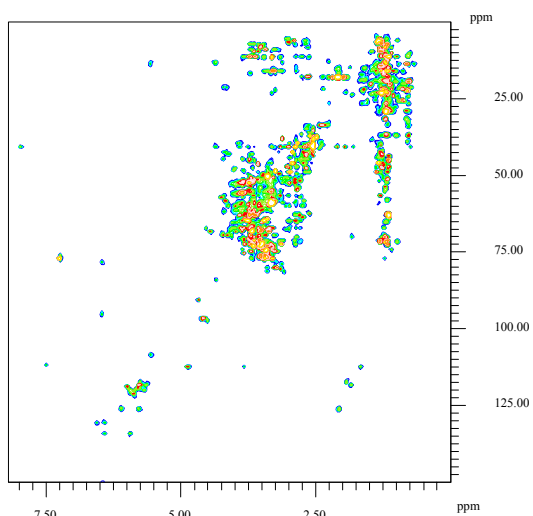
Differenzspektrum



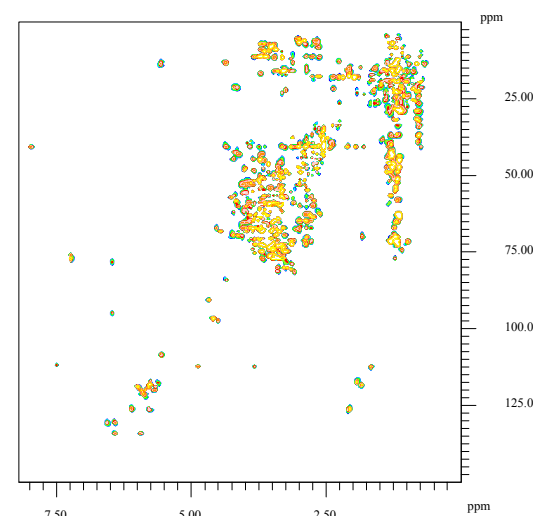
¹²C,¹H/¹³CHA,d+h
HSQC



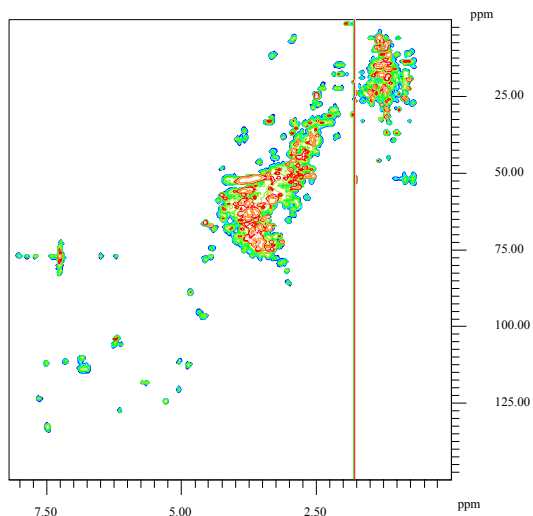
HSQC-TOCSY



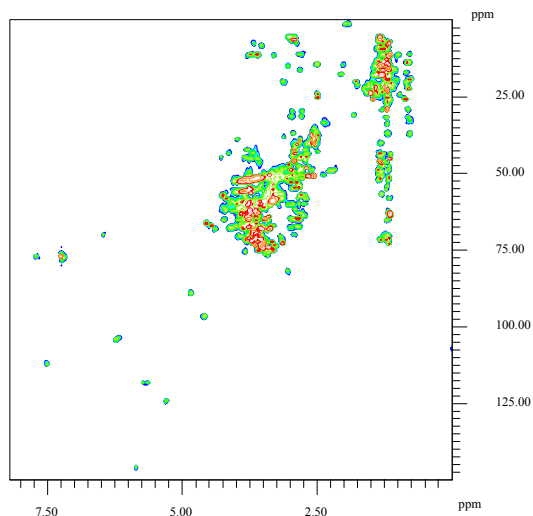
Differenzspektrum



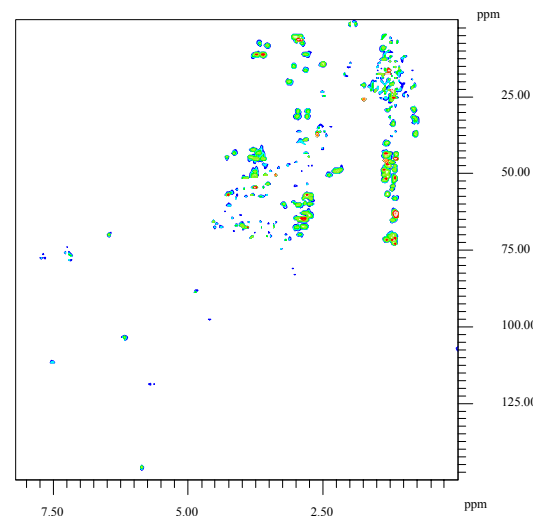
¹²C,HO¹³FA,h+d
HSQC



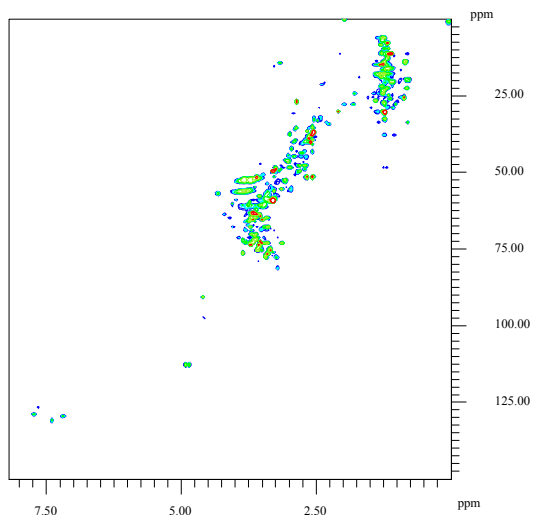
HSQC-TOCSY



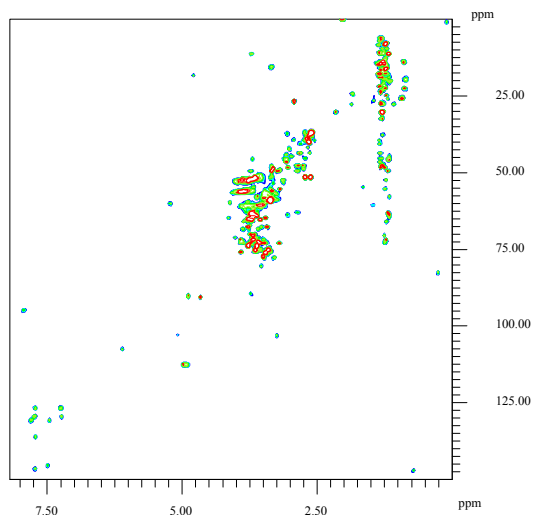
Differenzspektrum



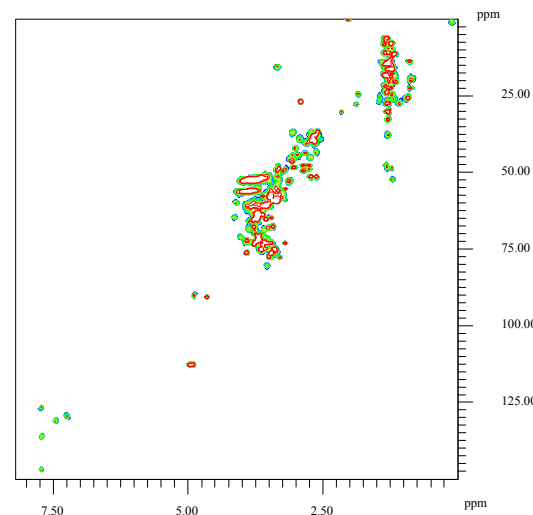
¹²C,HO¹³HA,h+d
HSQC



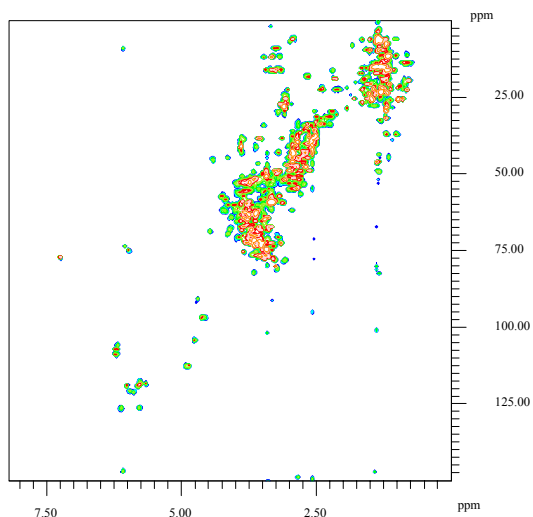
HSQC-TOCSY



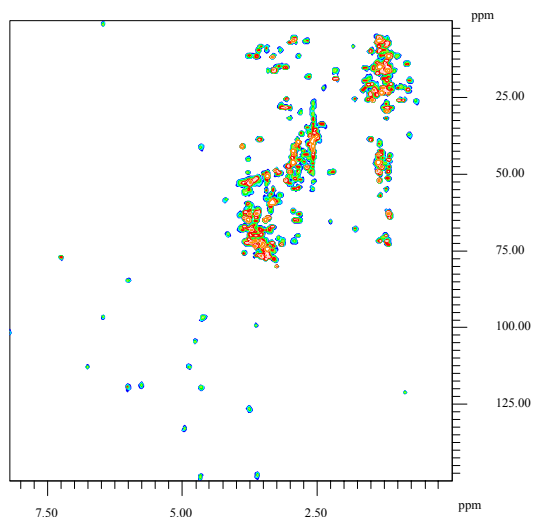
Differenzspektrum



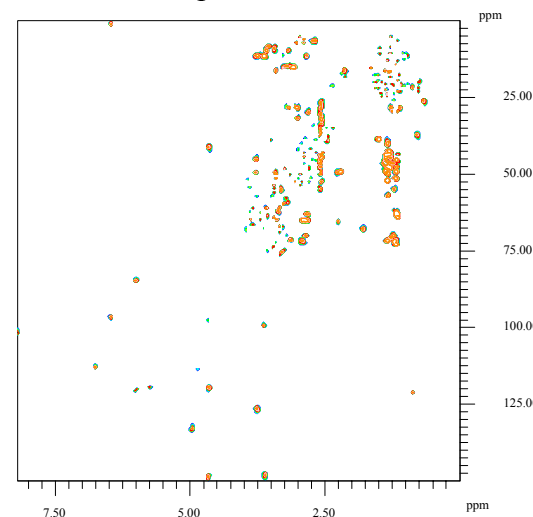
12C,SV1FA,d+h
HSQC



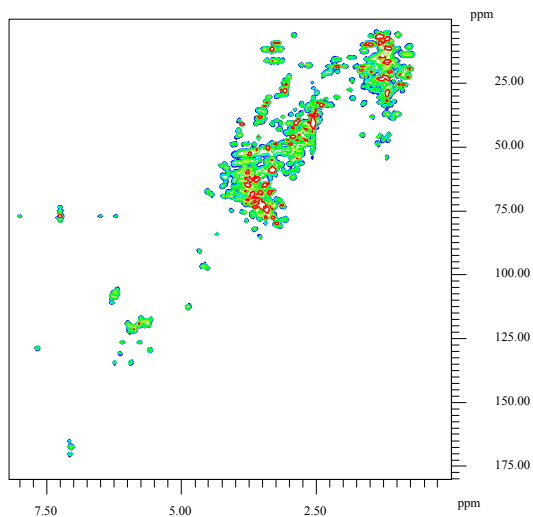
HSQC-TOCSY



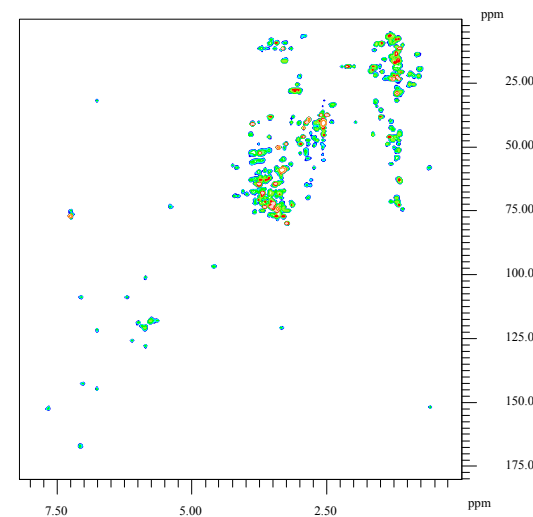
Differenzspektrum



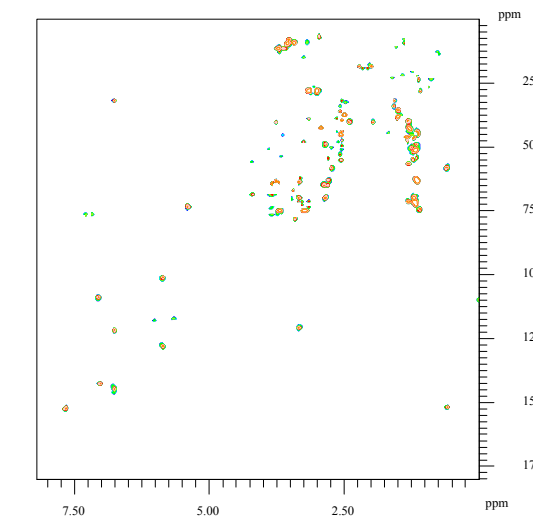
12C,SV1HA,d+h
HSQC



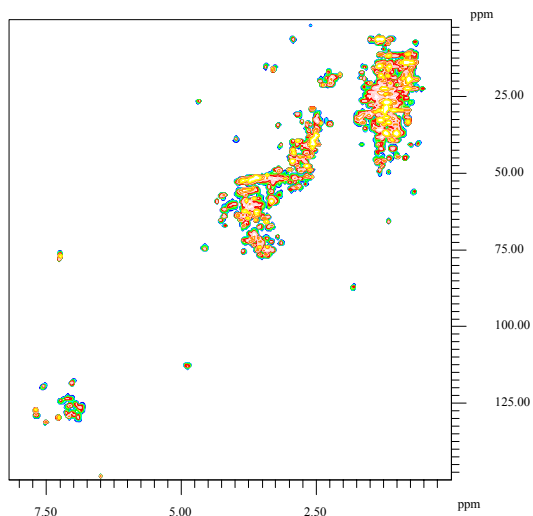
HSQC-TOCSY



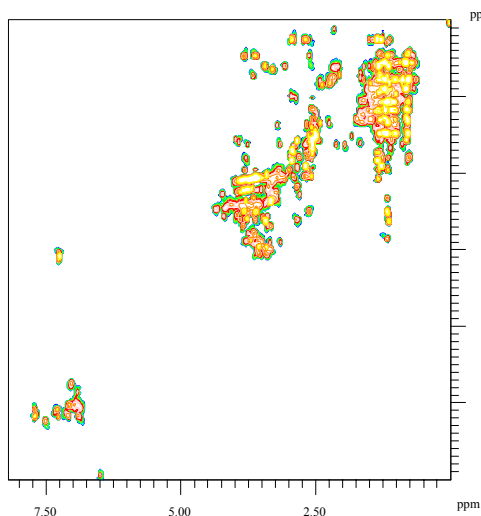
Differenzspektrum



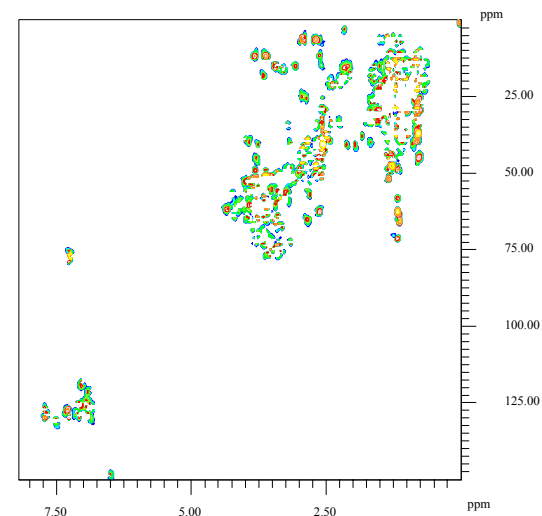
12C,SV1FA,h+d
HSQC



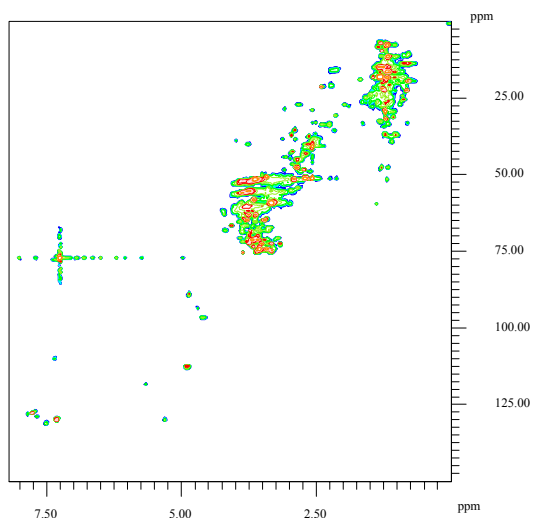
HSQC-TOCSY



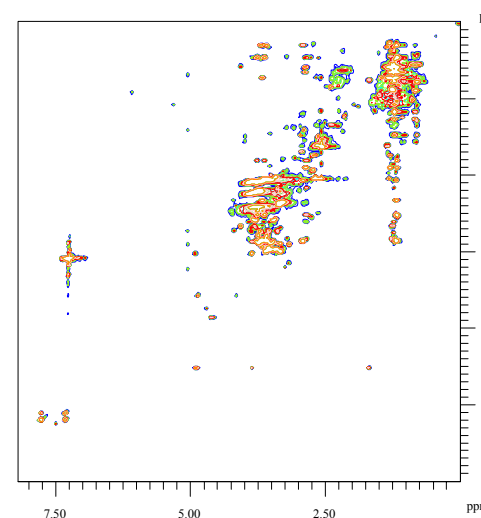
Differenzspektrum



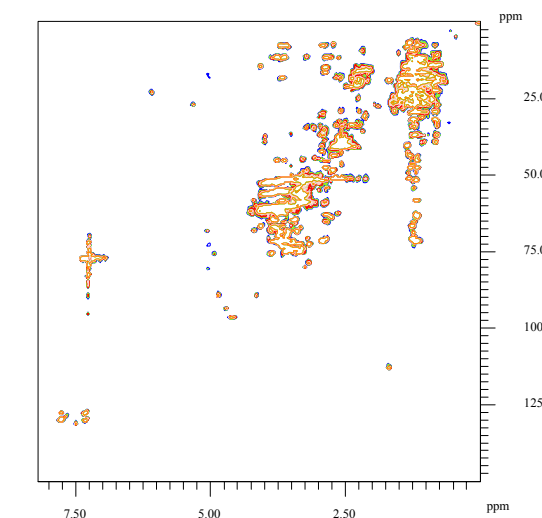
12C,SV1HA,h+d
HSQC



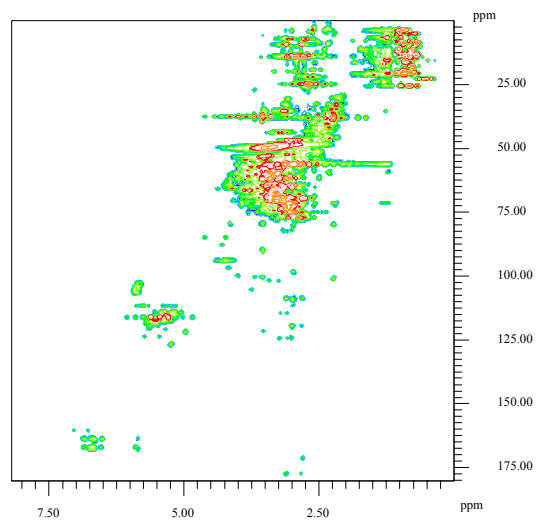
HSQC-TOCSY



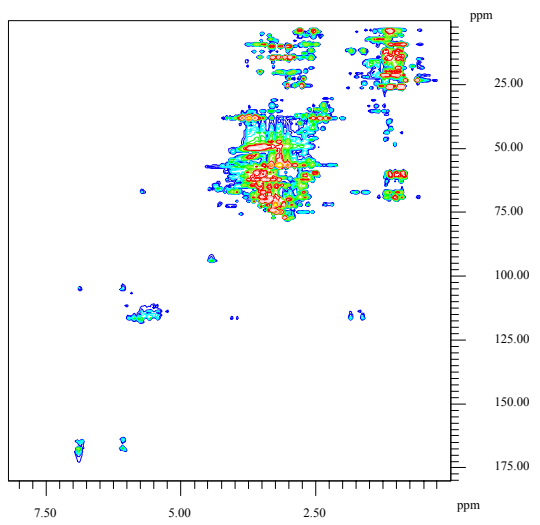
Differenzspektrum



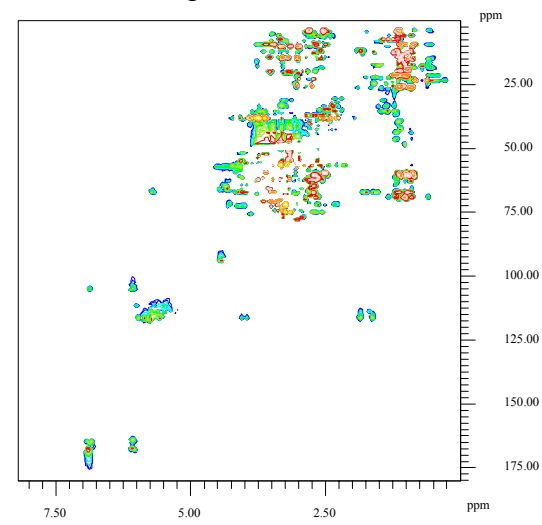
$^{13}\text{C}, \text{HO10FA}, \text{d+h}$
HSQC



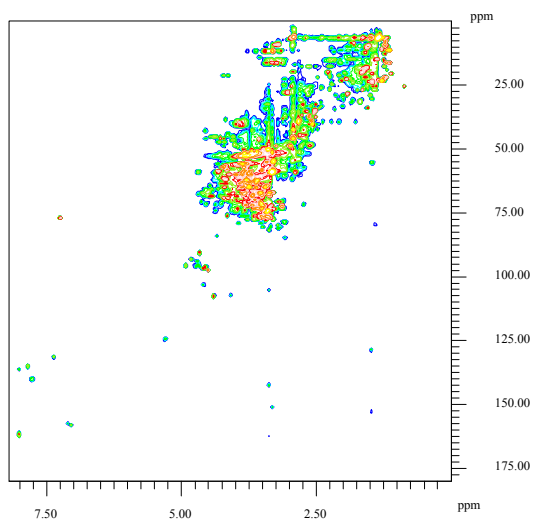
HSQC-TOCSY



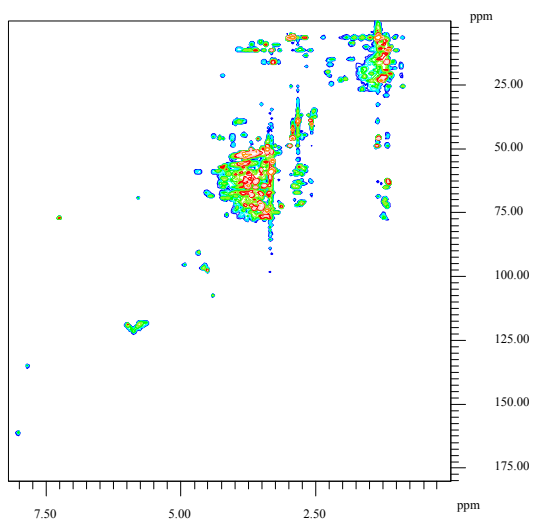
Differenzspektrum



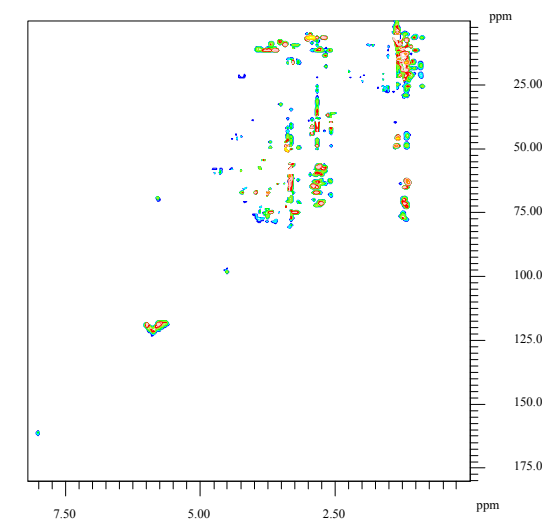
$^{13}\text{C}, \text{HO10HA}, \text{d+h}$
HSQC



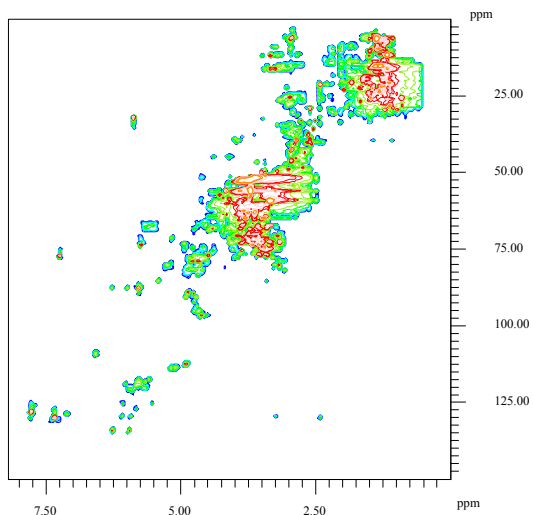
HSQC-TOCSY



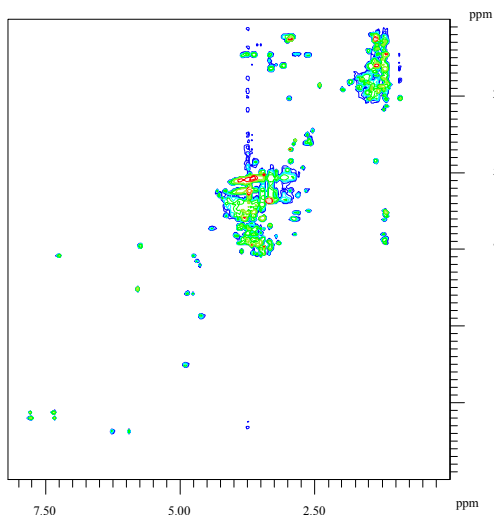
Differenzspektrum



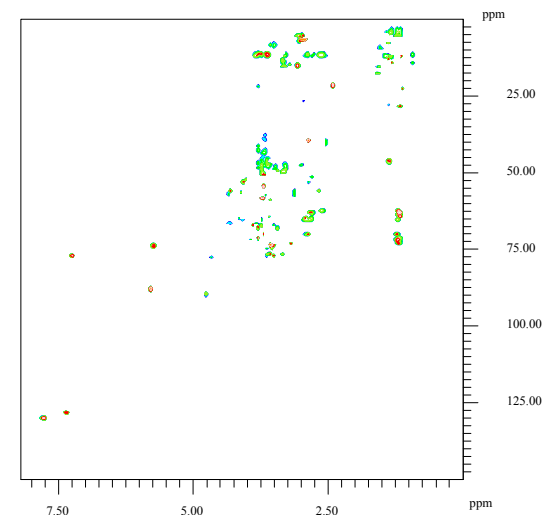
$^{13}\text{C}, \text{HO10FA}, \text{h+d}$
HSQC



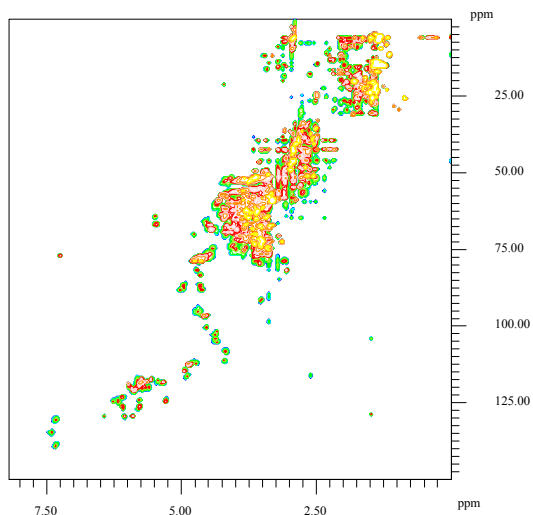
HSQC-TOCSY



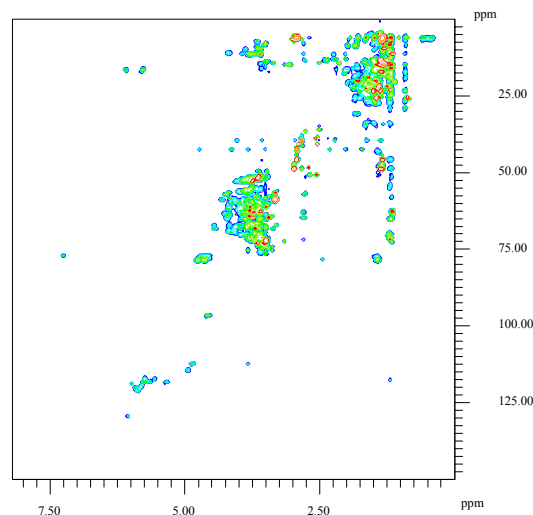
Differenzspektrum



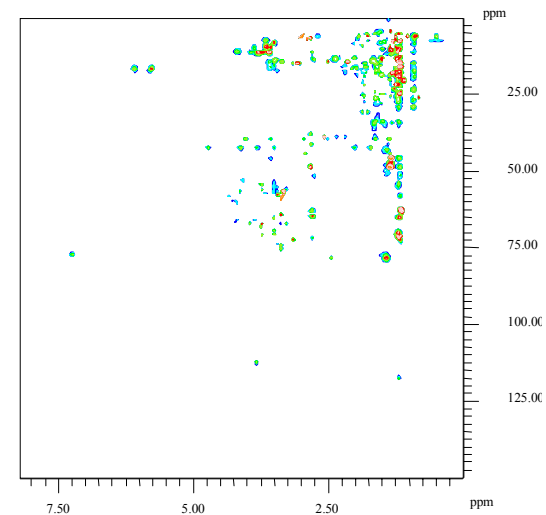
$^{13}\text{C}, \text{HO10HA}, \text{h+d}$
HSQC



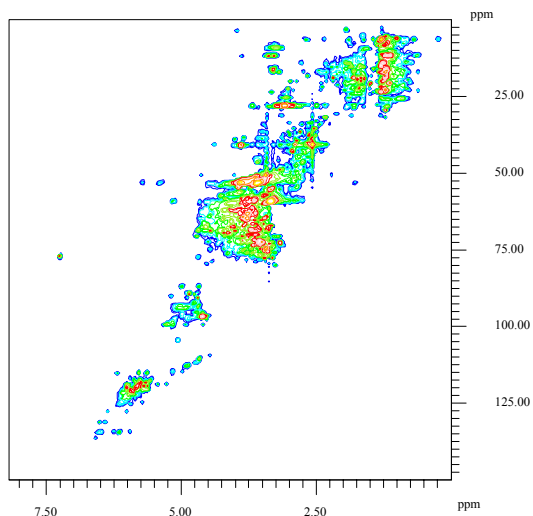
HSQC-TOCSY



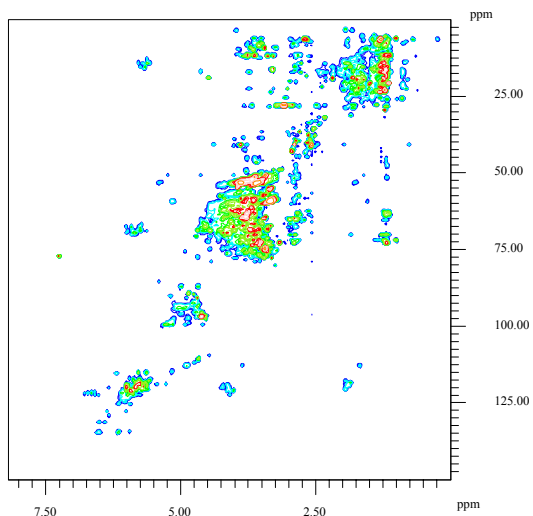
Differenzspektrum



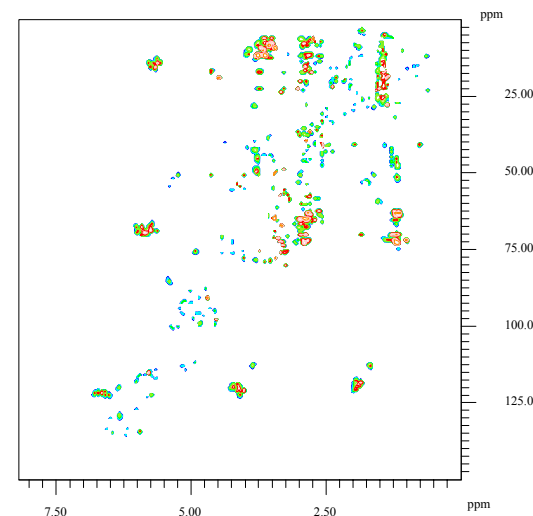
$^{13}\text{C}, \text{HO}^{13}\text{FA}, \text{d+h}$
HSQC



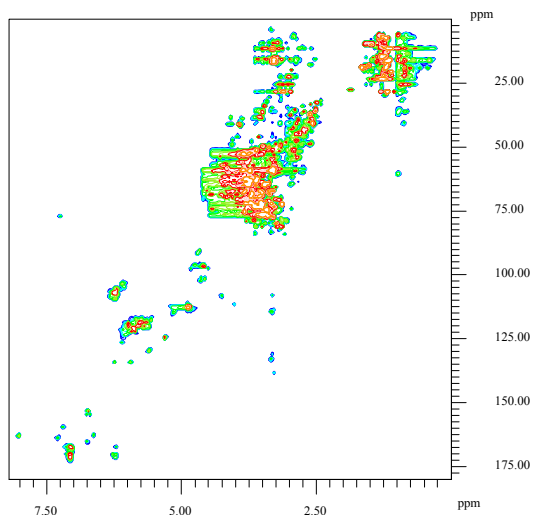
HSQC-TOCSY



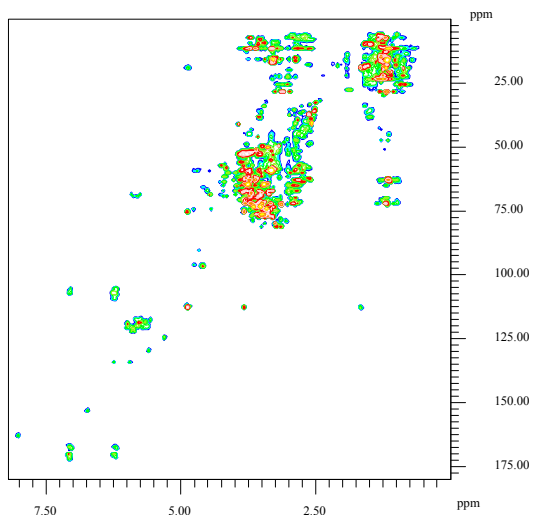
Differenzspektrum



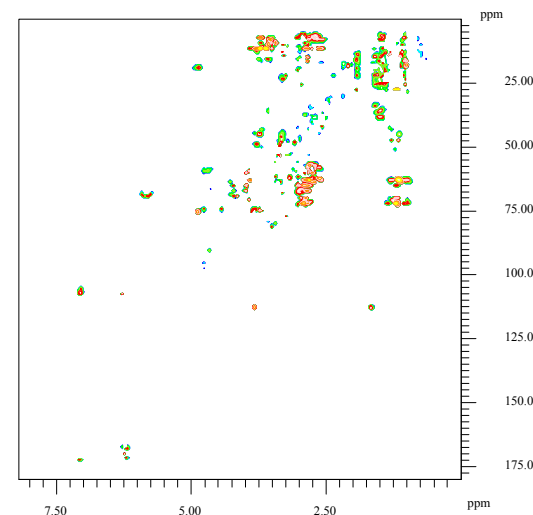
$^{13}\text{C}, \text{HO}^{13}\text{HA}, \text{d+h}$
HSQC



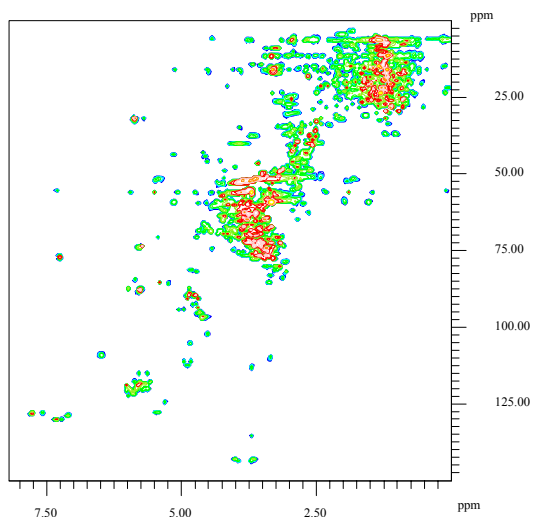
HSQC-TOCSY



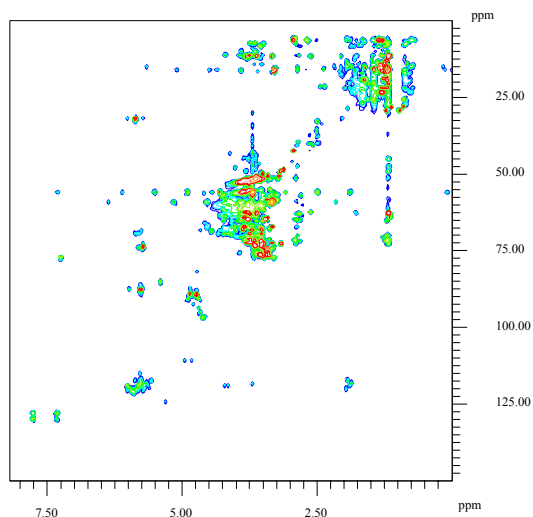
Differenzspektrum



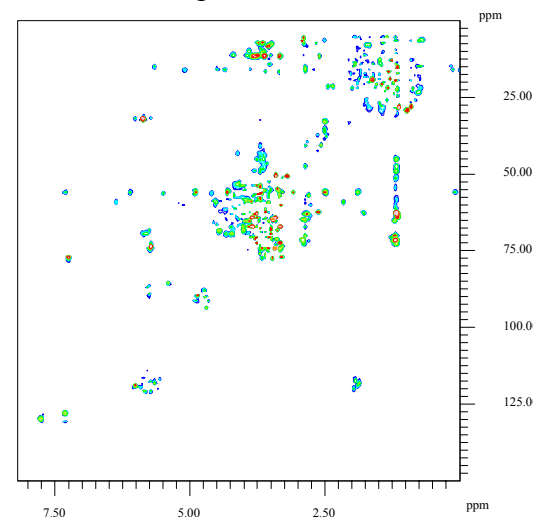
$^{13}\text{C}, \text{HO}^{13}\text{FA}, \text{h+d}$
HSQC



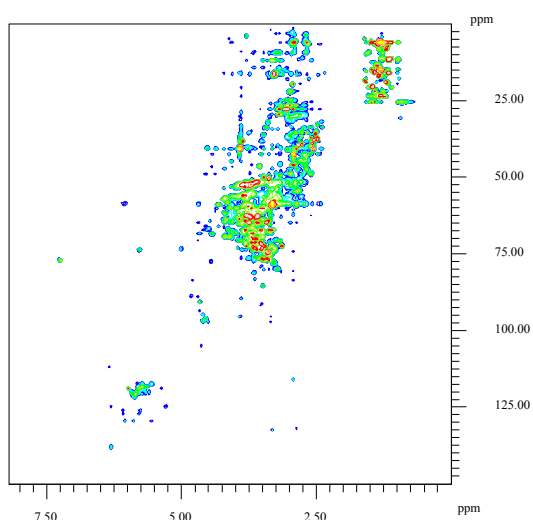
HSQC-TOCSY



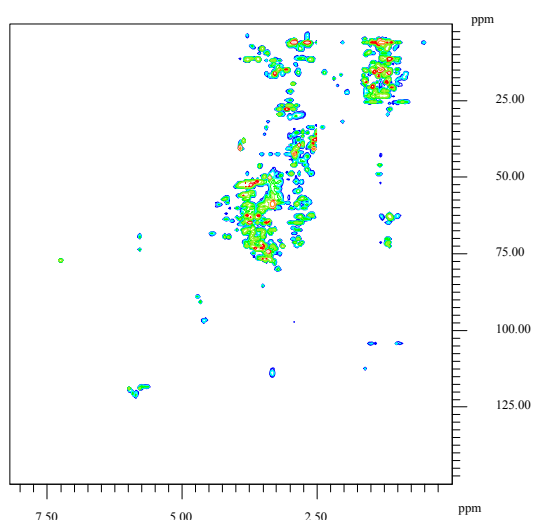
Differenzspektrum



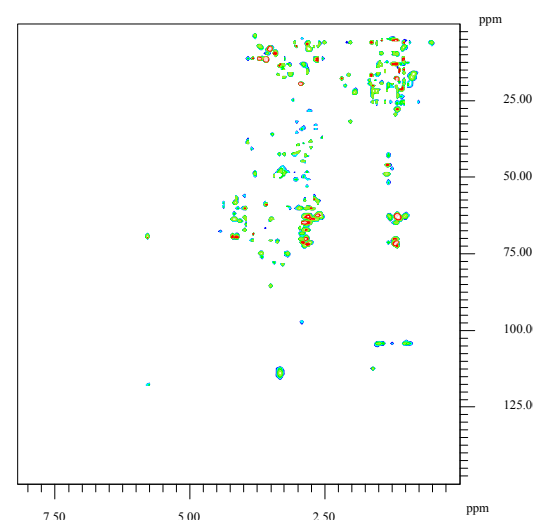
$^{13}\text{C}, \text{HO}^{13}\text{HA}, \text{h+d}$
HSQC



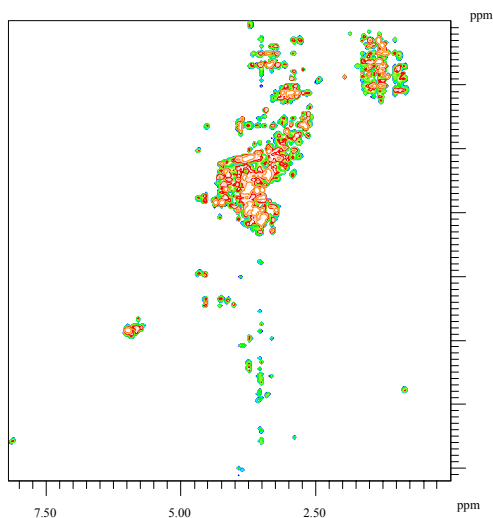
HSQC-TOCSY



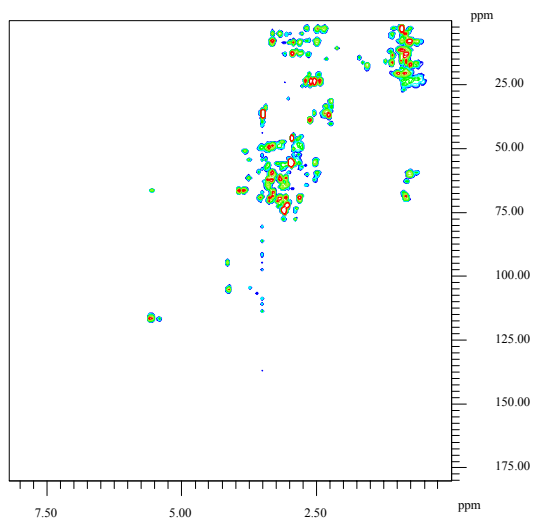
Differenzspektrum



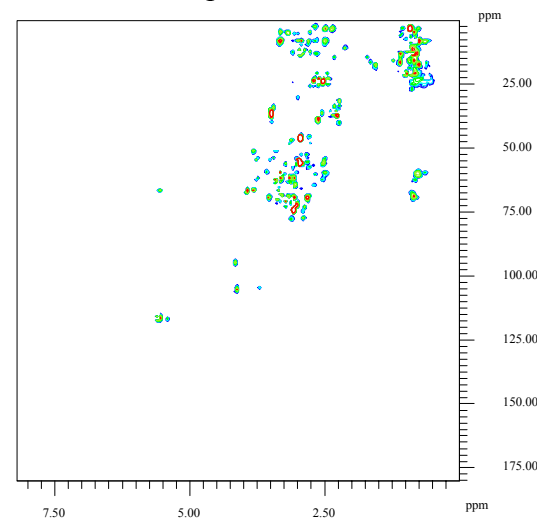
¹³C,SV1FA,d+h
HSQC



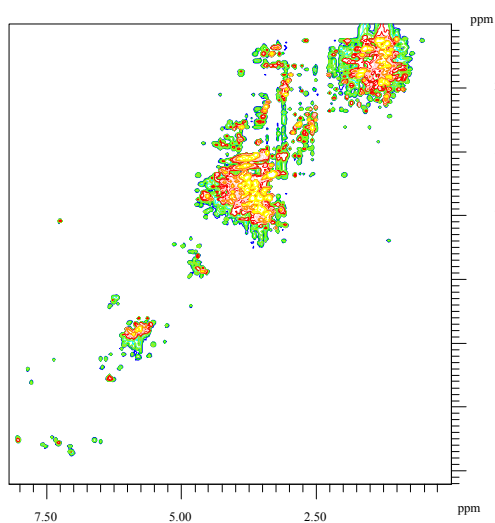
HSQC-TOCSY



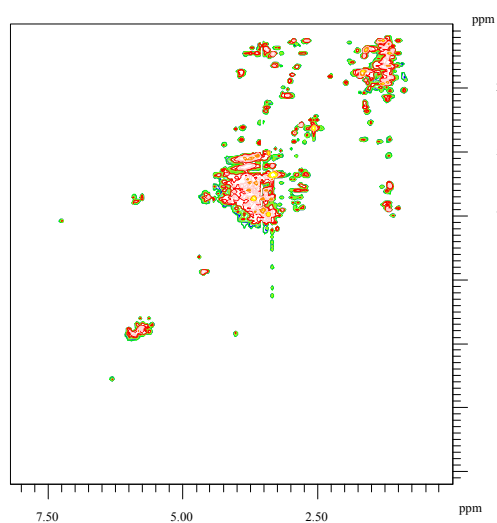
Differenzspektrum



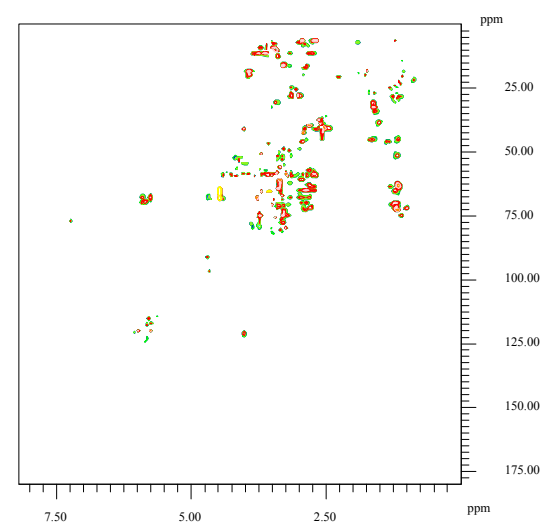
¹³C,SV1HA,d+h
HSQC



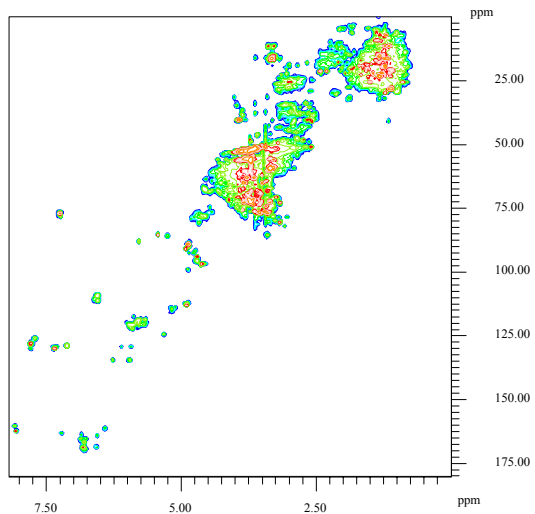
HSQC-TOCSY



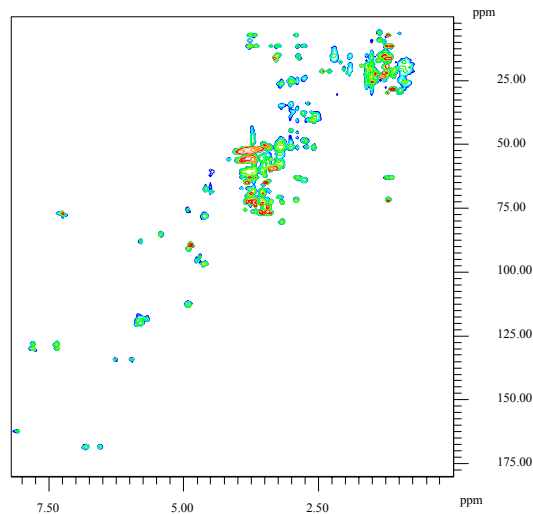
Differenzspektrum



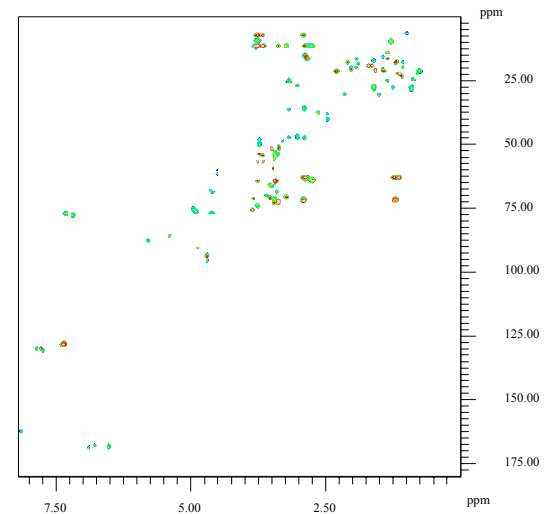
¹³C,SV1FA,h+d
HSQC



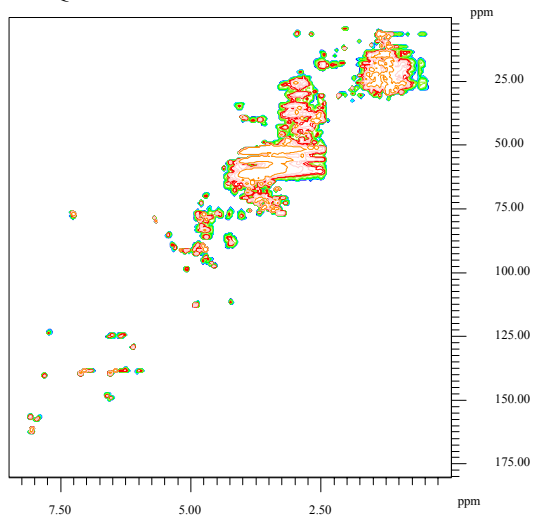
HSQC-TOCSY



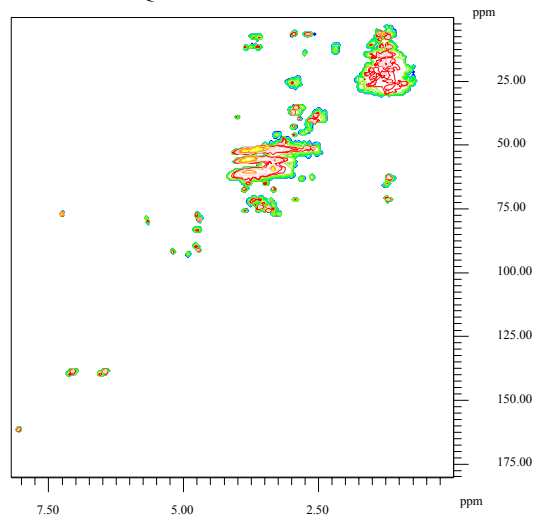
Differenzspektrum



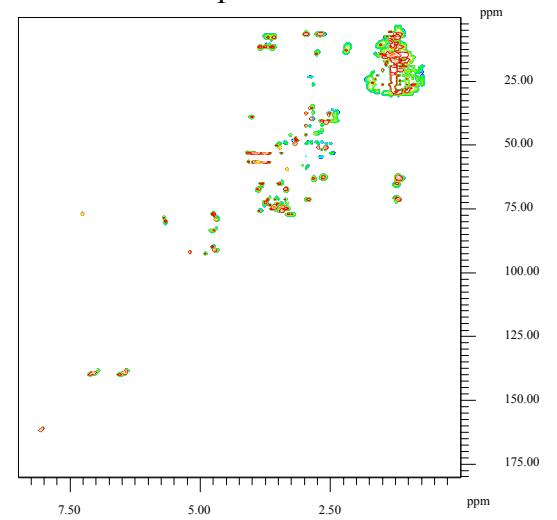
¹³C,SV1HA,h+d
HSQC



HSQC-TOCSY



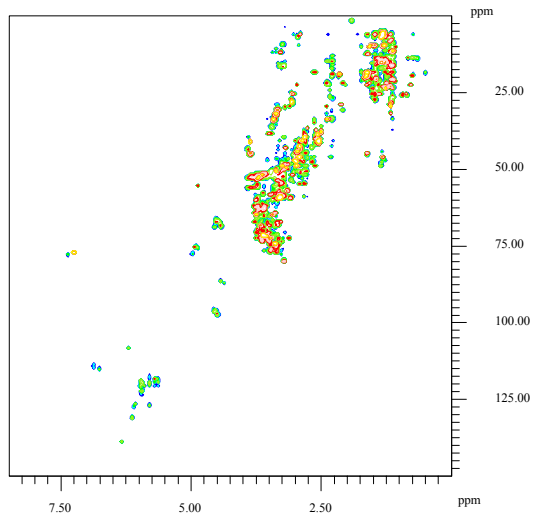
Differenzspektrum



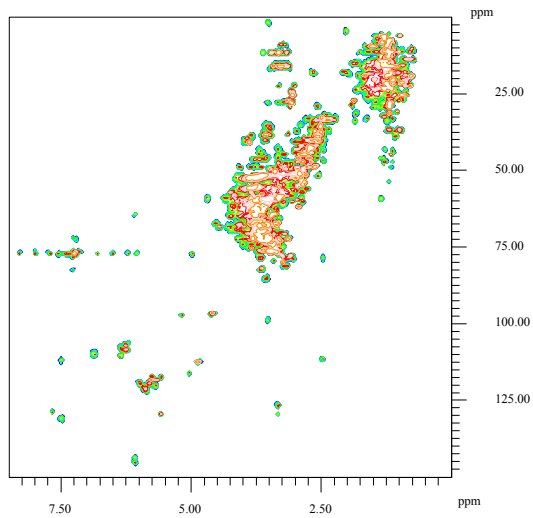
Anhang E

Vergleich der verschiedenen FAs und HAs:
HSQC- und COSY-Spektren aller FAs und HAs,
aus den Substanzgruppen resultierende Minimumspektren,
Differenzspektren für alle Substanzen

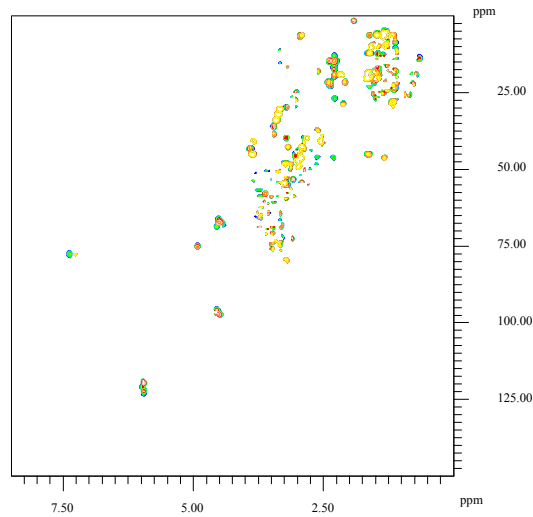
12C,HO10FA,d+h



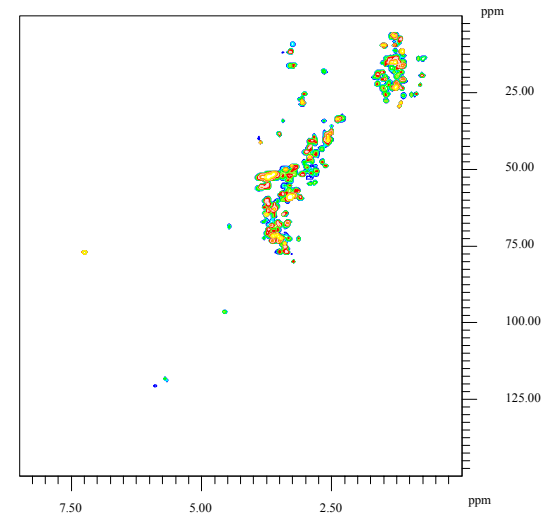
12C,HO13FA,d+h



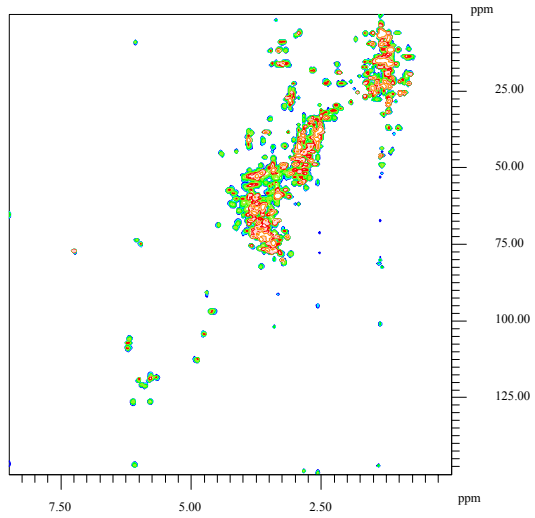
Differenzspektrum



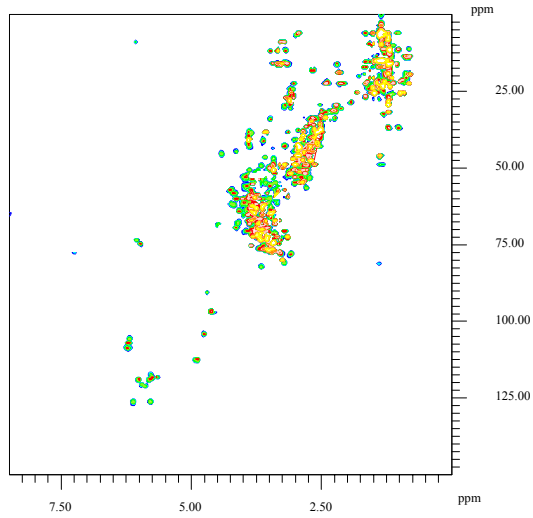
Minimumspektrum



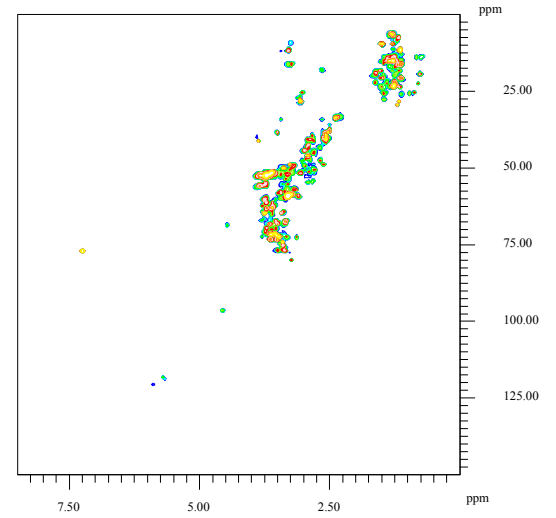
12C,SV1FA,d+h



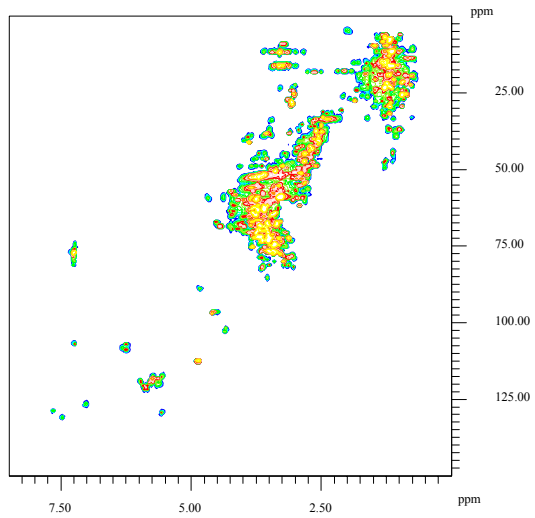
Differenzspektrum



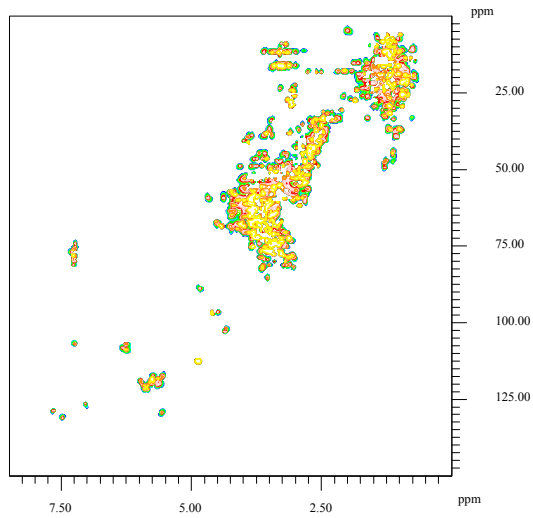
Minimumspektrum



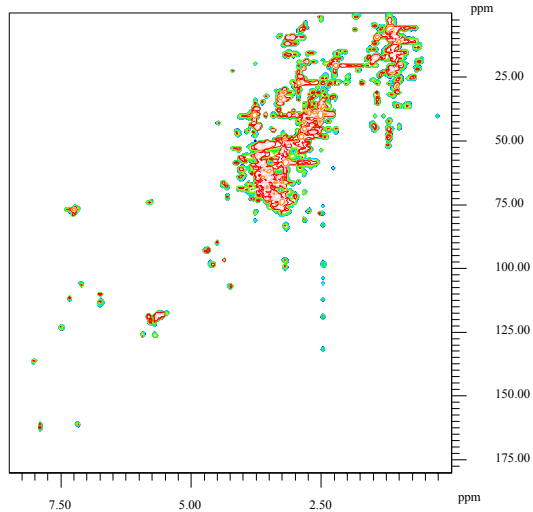
12C,MPDOM,d+h



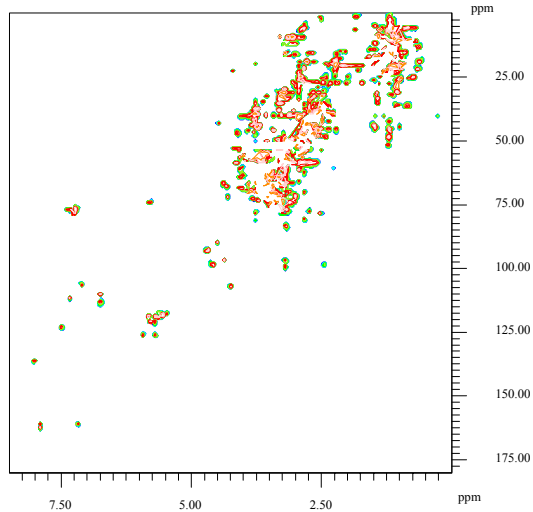
Differenzspektrum



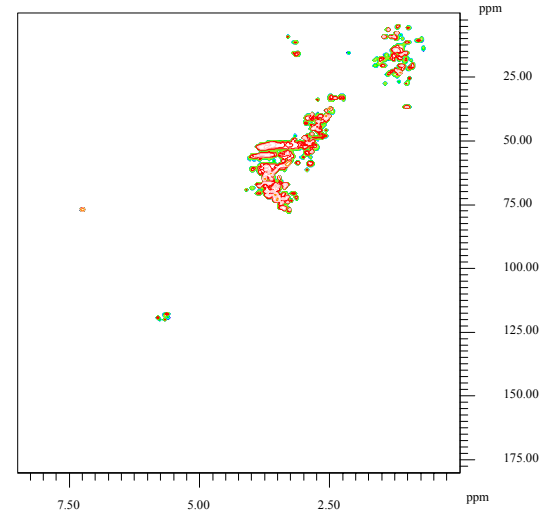
$^{12}\text{C}, \text{HO10HA}, \text{d+h}$



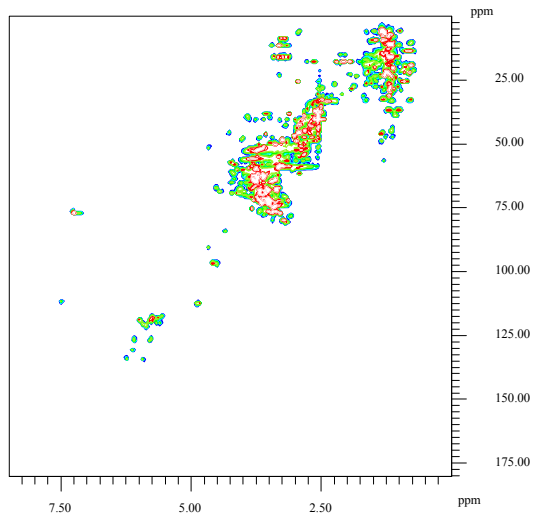
Differenzspektrum



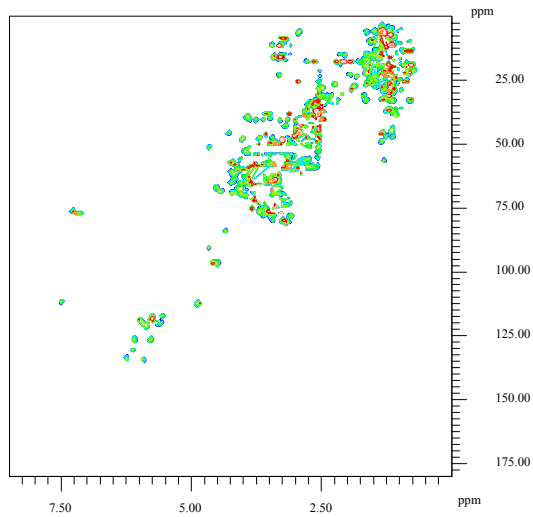
Minimumspektrum



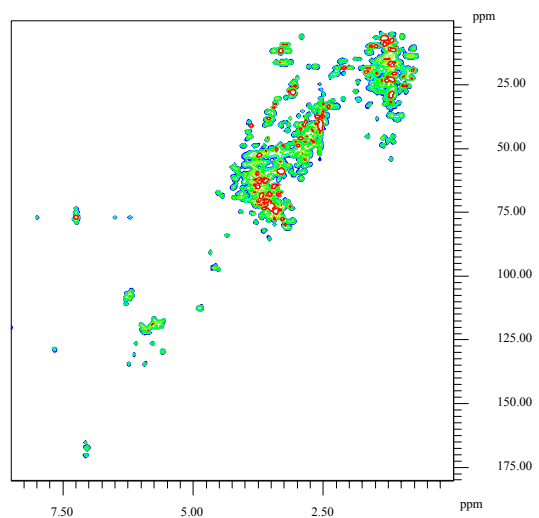
$^{12}\text{C}, \text{HO13HA}, \text{d+h}$



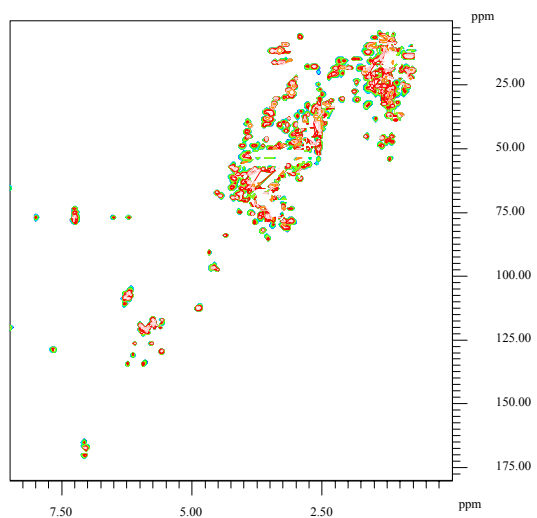
Differenzspektrum



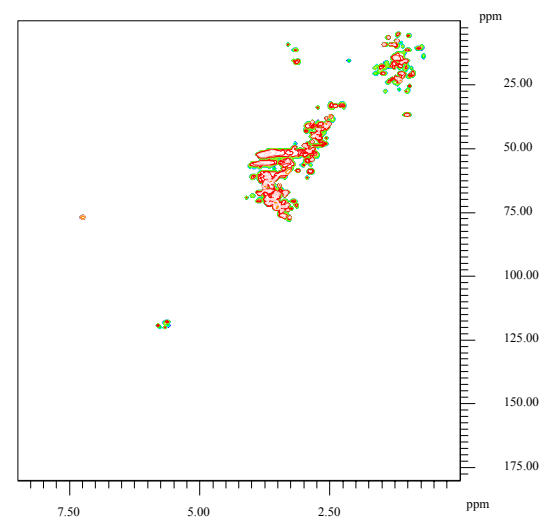
12C,SV1HA,d+h



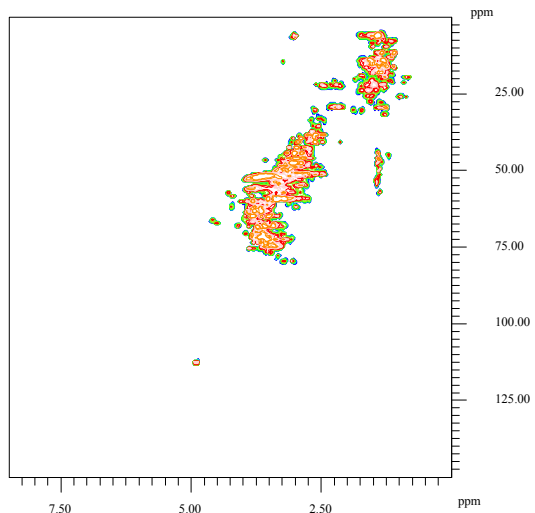
Differenzspektrum



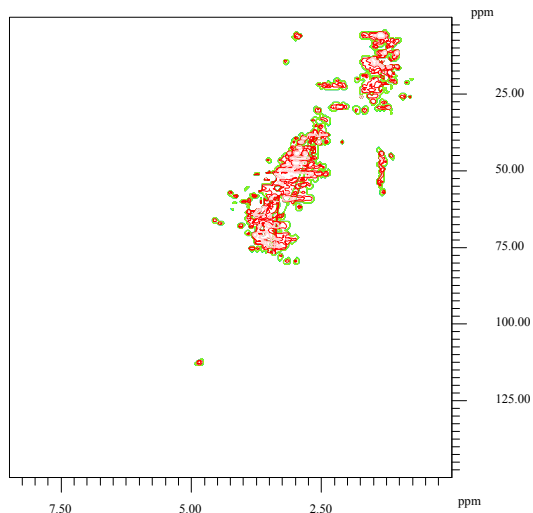
Minimumspektrum



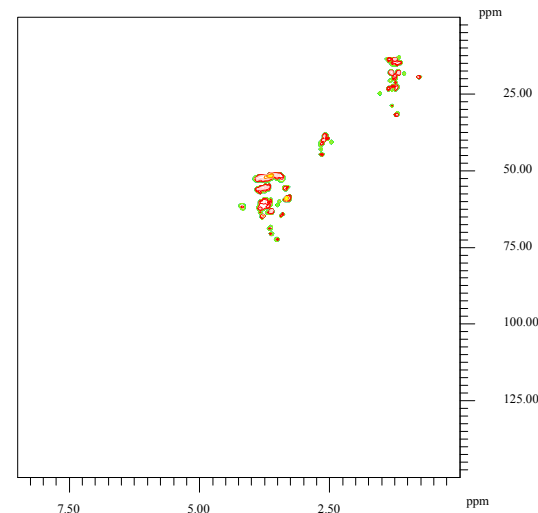
12C,HO10FA,h+d



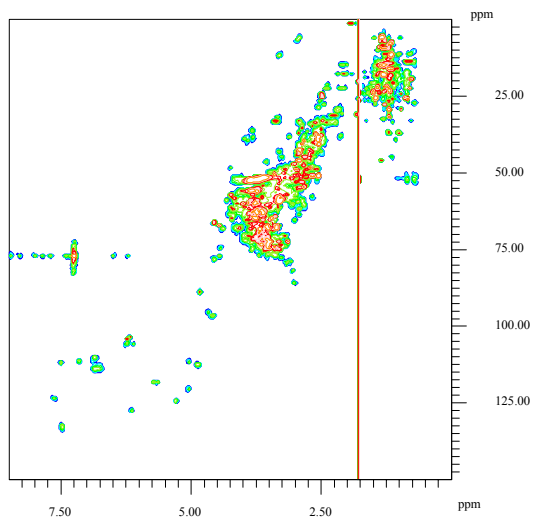
Differenzspektrum



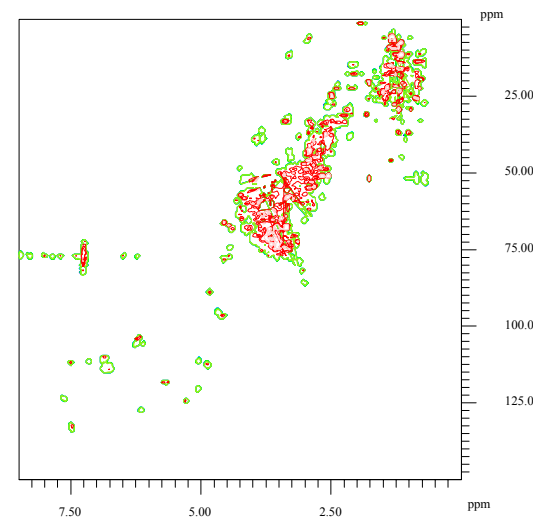
Minimumspektrum



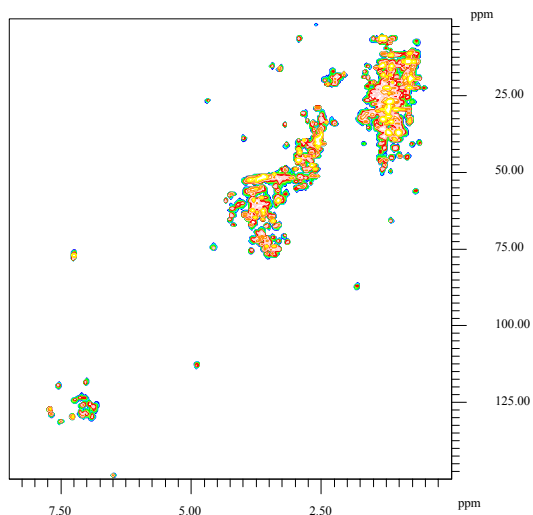
12C,HO13FA,h+d



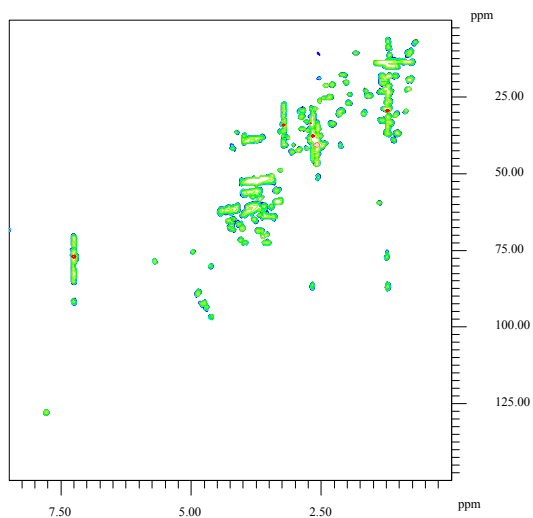
Differenzspektrum



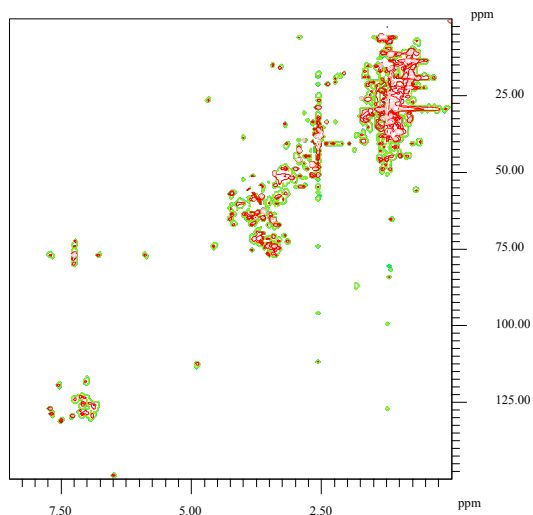
12C,SV1FA,h+d



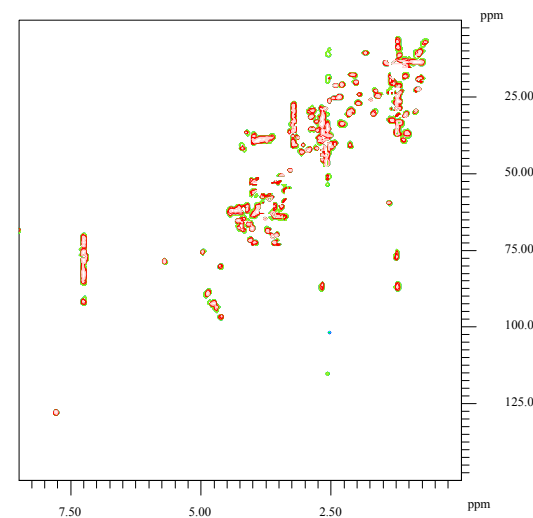
12C,MPDOM,h+d



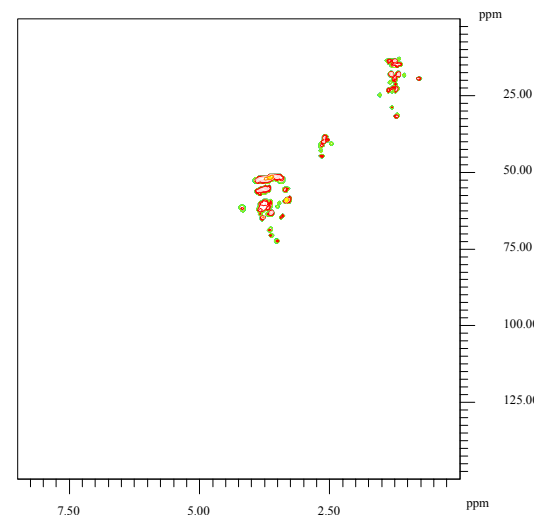
Differenzspektrum



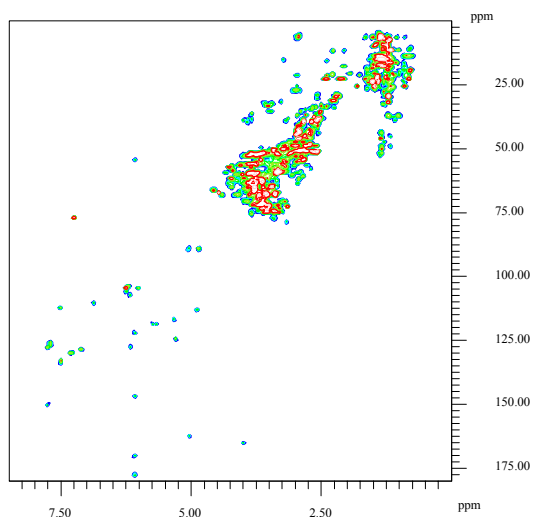
Differenzspektrum



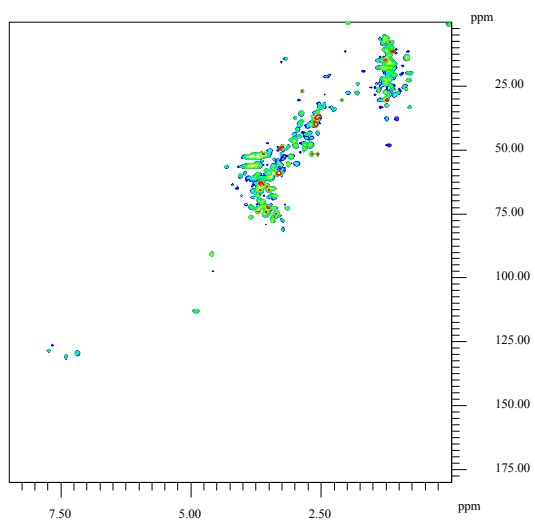
Minimumspektrum



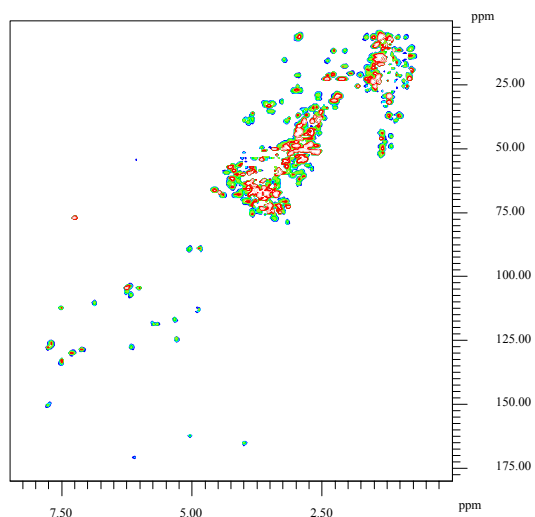
12C,HO10HA,h+d



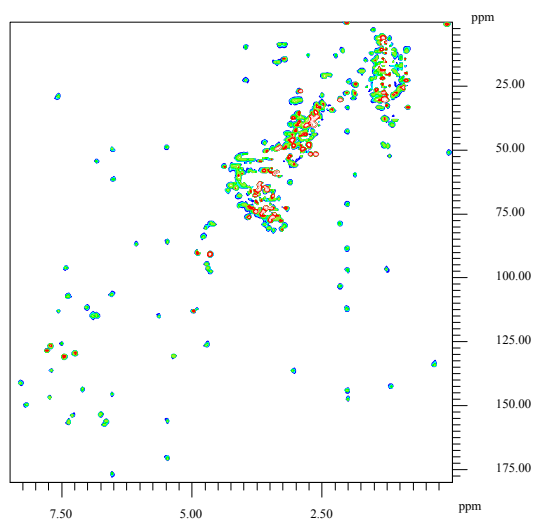
12C,HO13HA,h+d



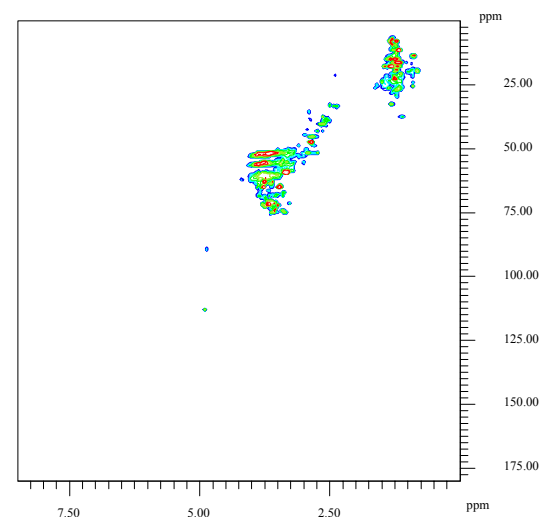
Differenzspektrum



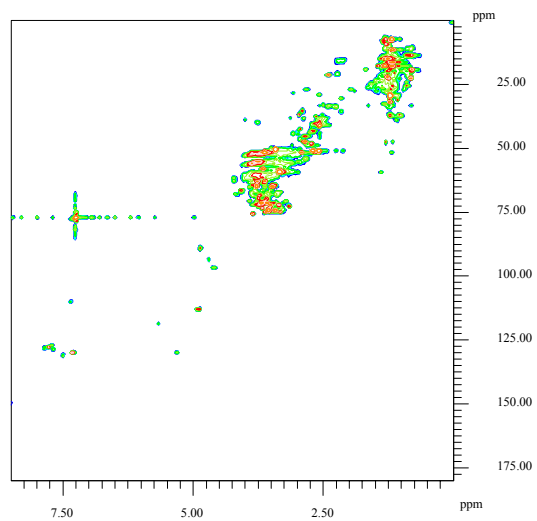
Differenzspektrum



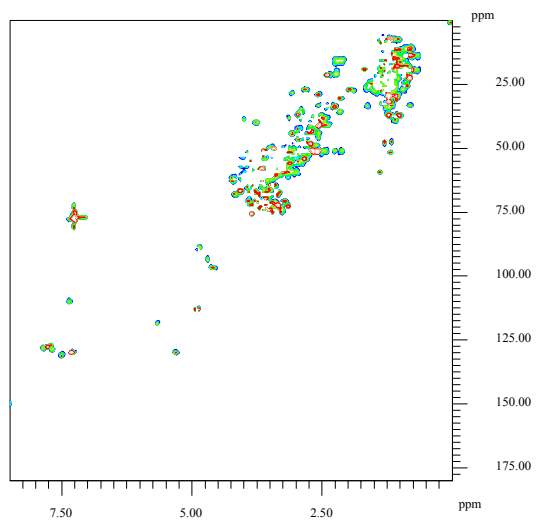
Minimumspektrum



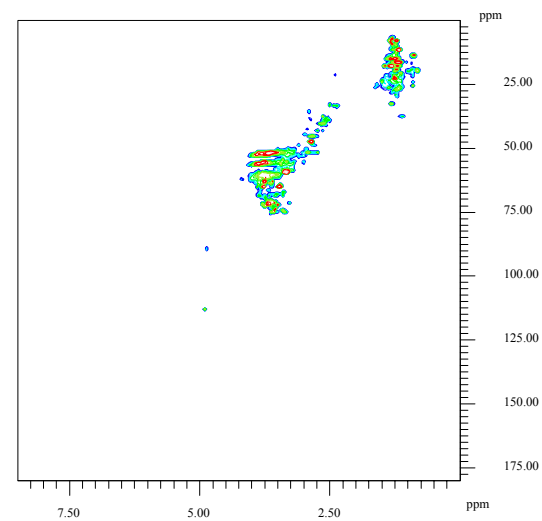
12C,SV1HA,h+d



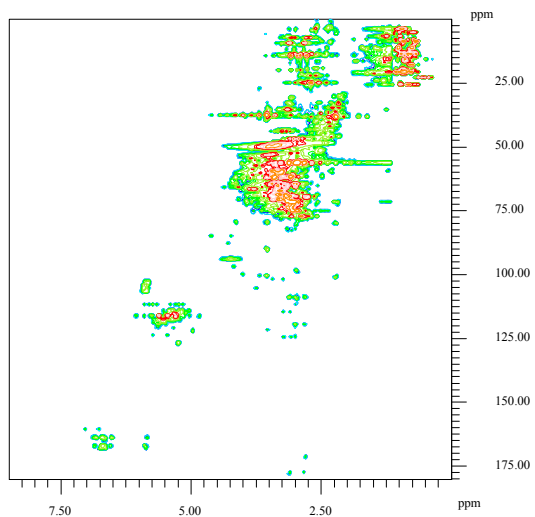
Differenzspektrum



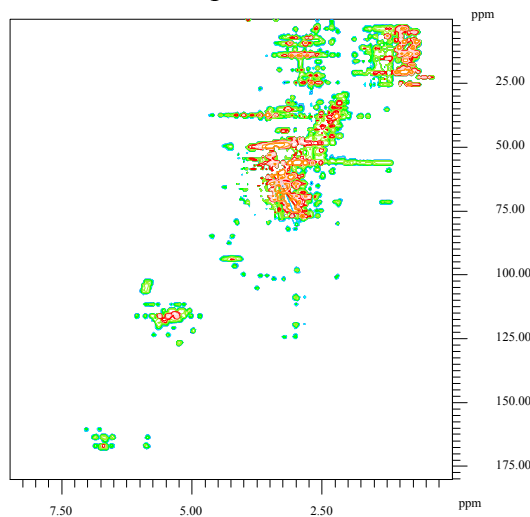
Minimumspektrum



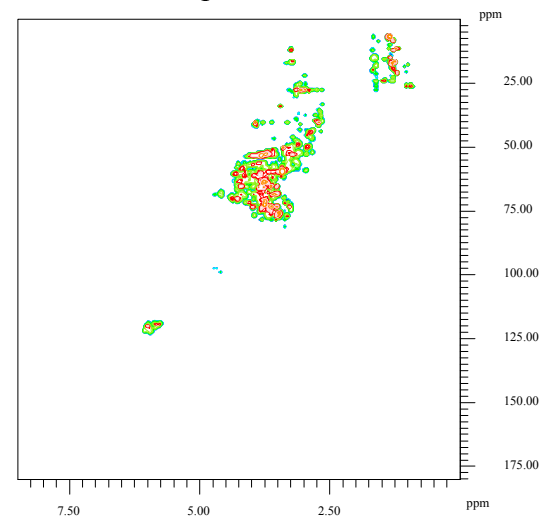
¹³C,HO10FA,d+h



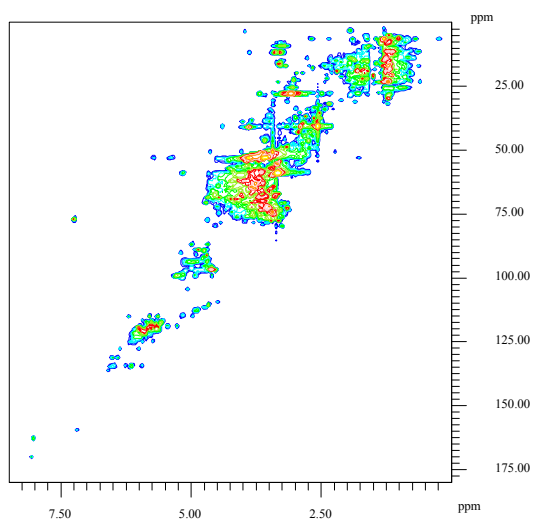
Differenzspektrum



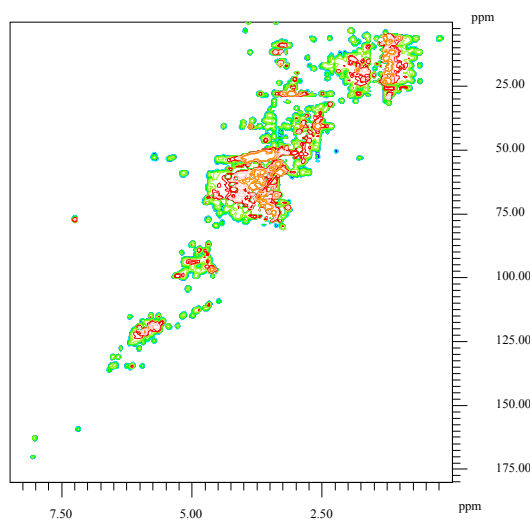
Minimumspektrum



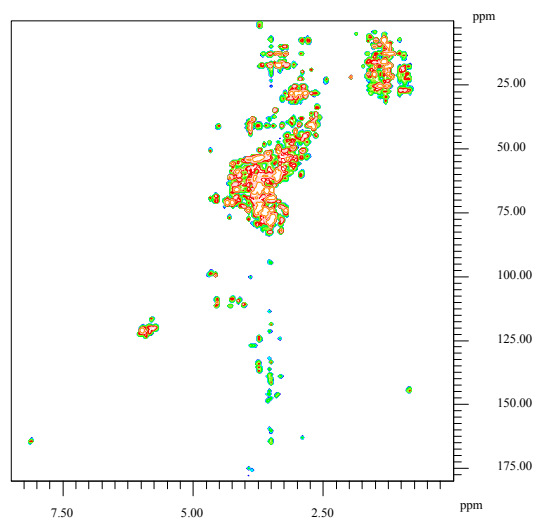
¹³C,HO13FA,d+h



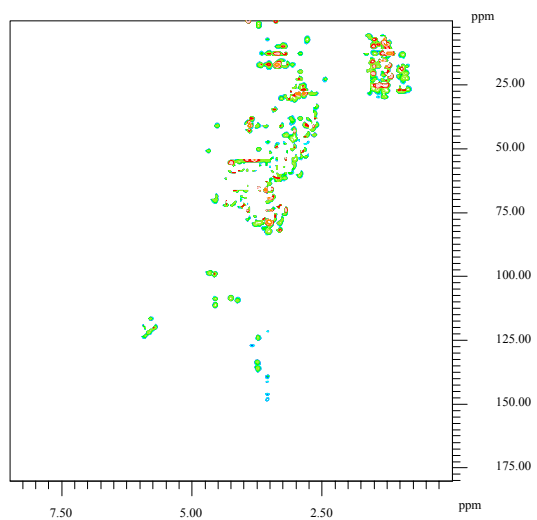
Differenzspektrum



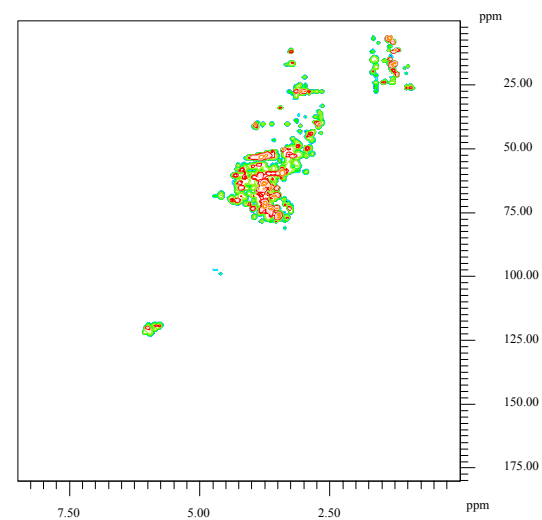
¹³C,SV1FA,d+h



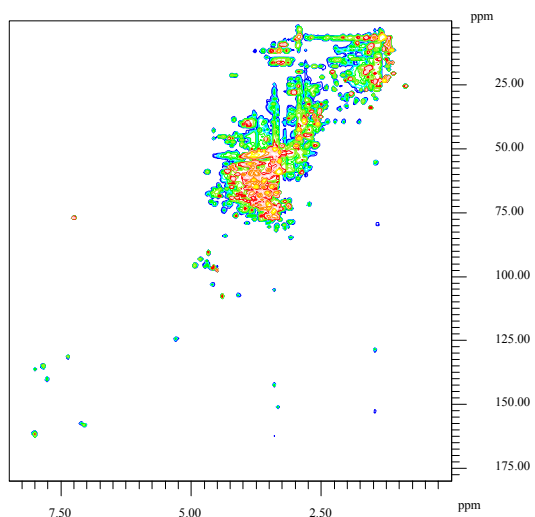
Differenzspektrum



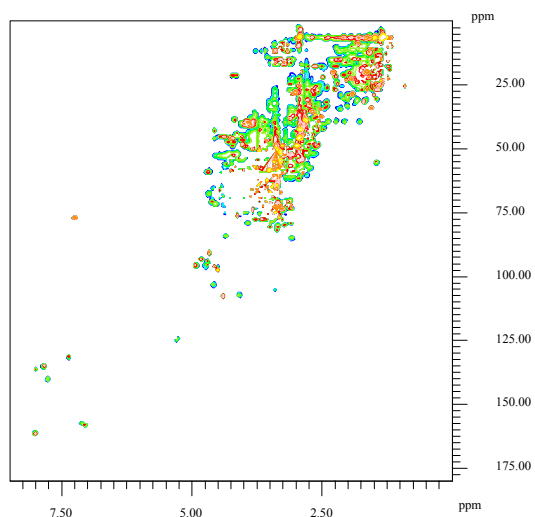
Minimumspektrum



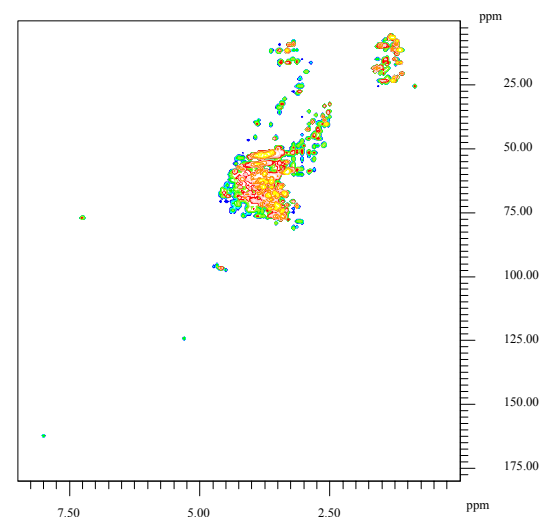
$^{13}\text{C}, \text{HO10HA}, \text{d+h}$



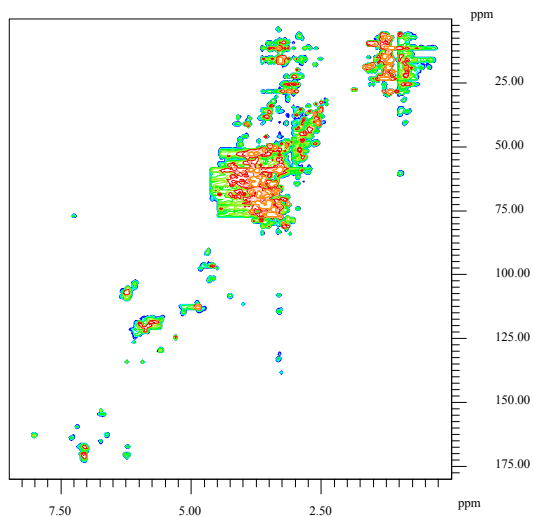
Differenzspektrum



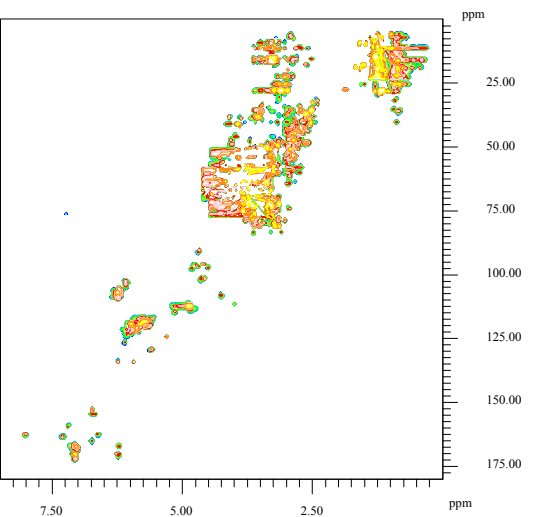
Minimumspektrum



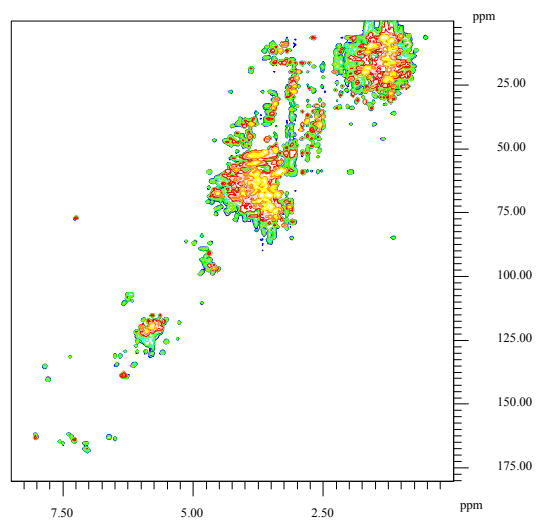
$^{13}\text{C}, \text{HO13HA}, \text{d+h}$



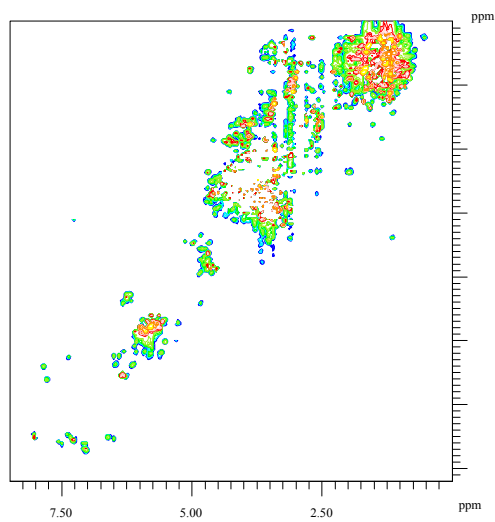
Differenzspektrum



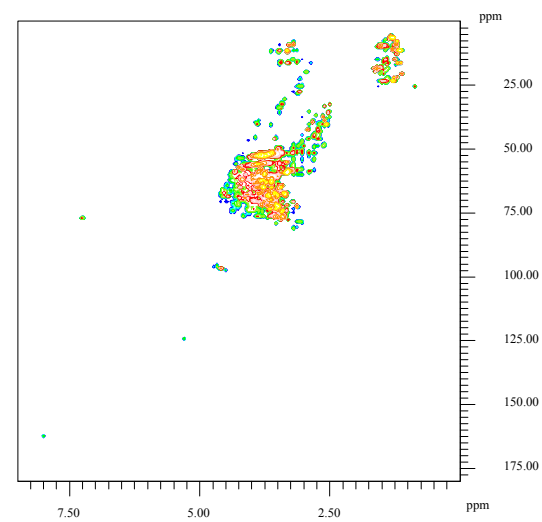
$^{13}\text{C}, \text{SV1HA}, \text{d+h}$



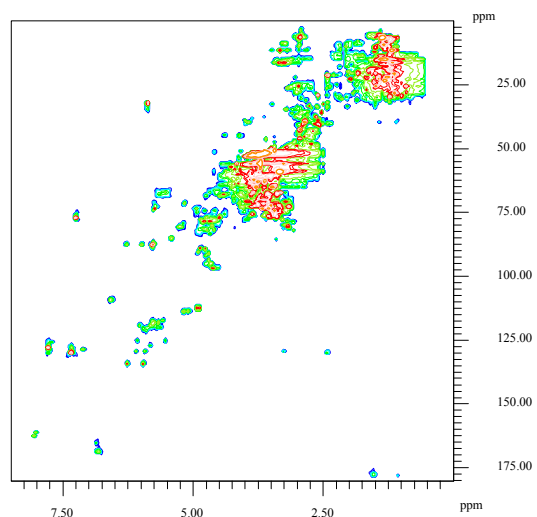
Differenzspektrum



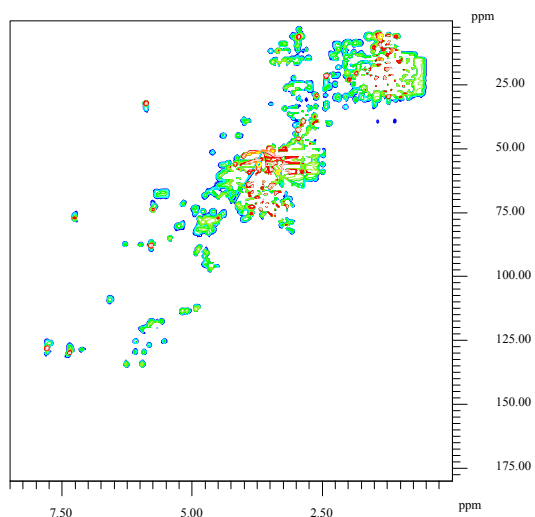
Minimumspektrum



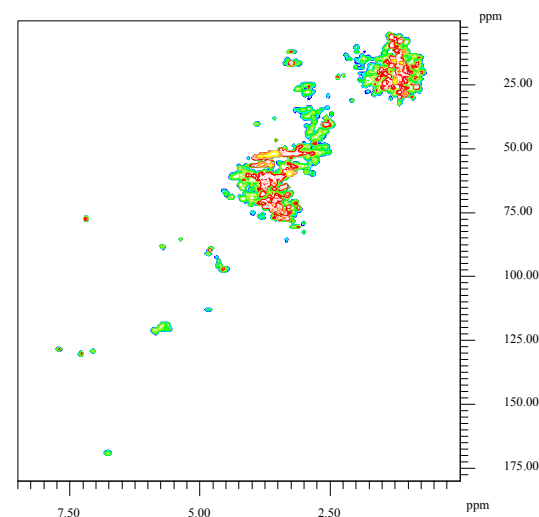
¹³C,HO10FA,h+d



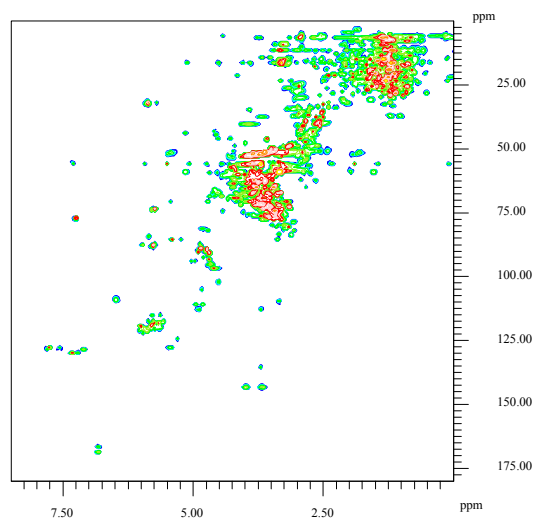
Differenzspektrum



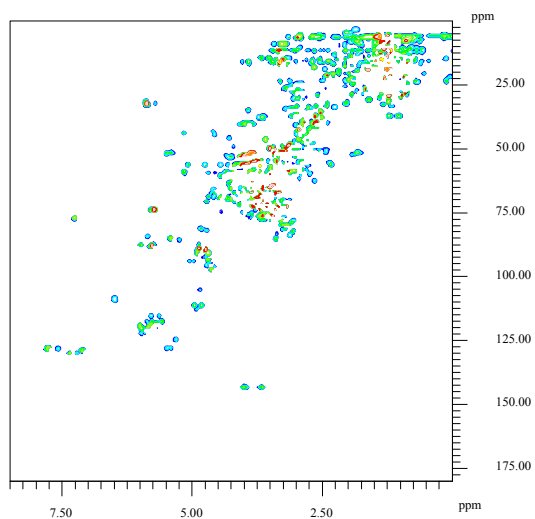
Minimumspektrum



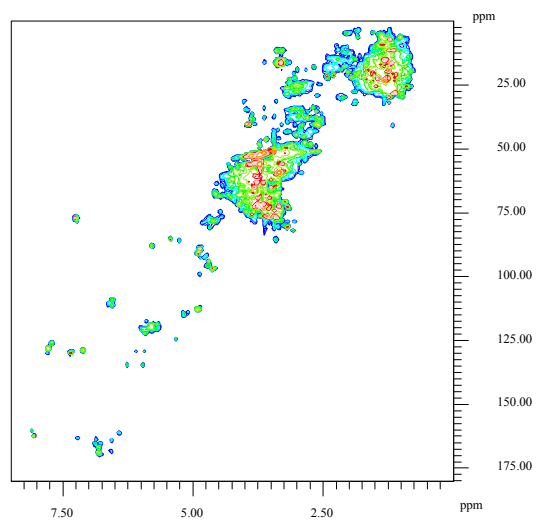
¹³C,HO13FA,h+d



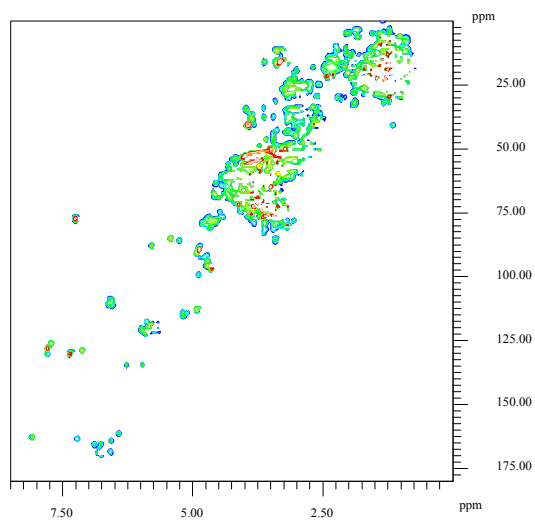
Differenzspektrum



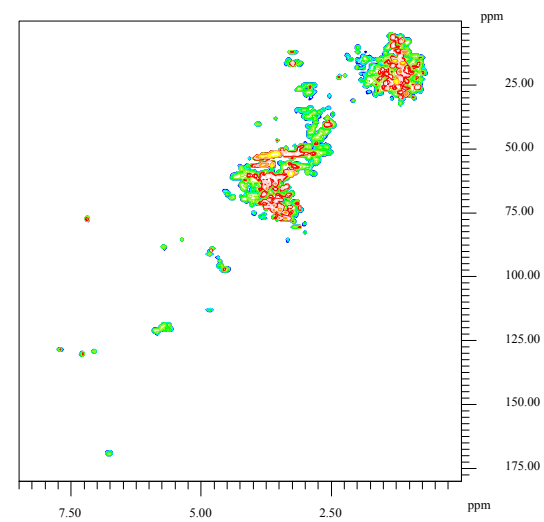
$^{13}\text{C}, \text{SV1FA}, \text{h+d}$



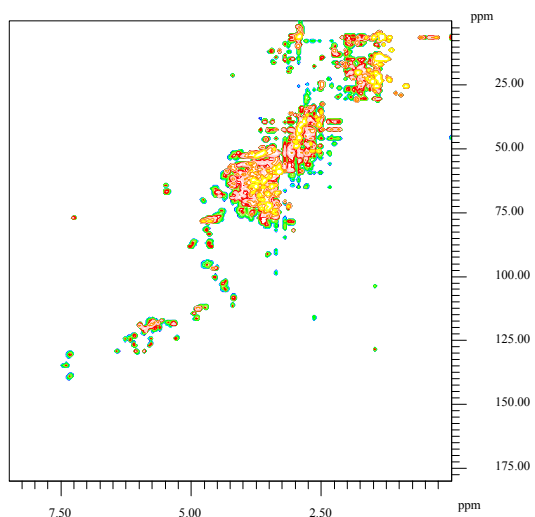
Differenzspektrum



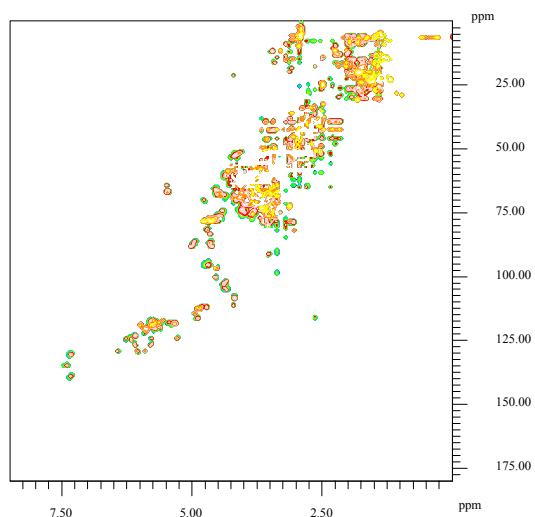
Minimumspektrum



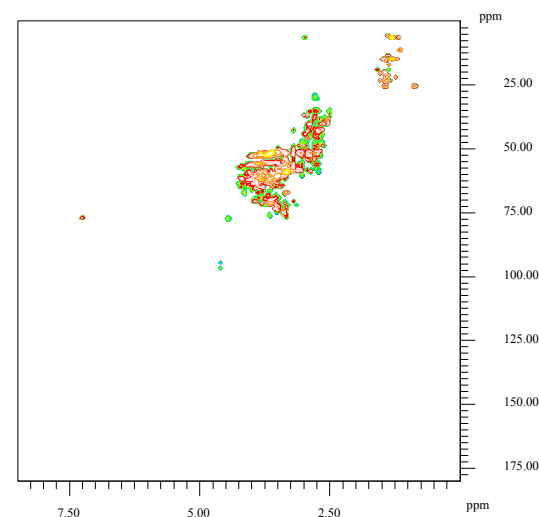
$^{13}\text{C}, \text{HO10HA}, \text{h+d}$



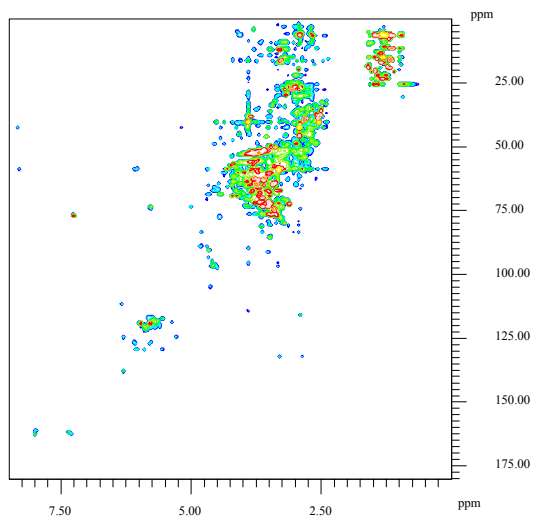
Differenzspektrum



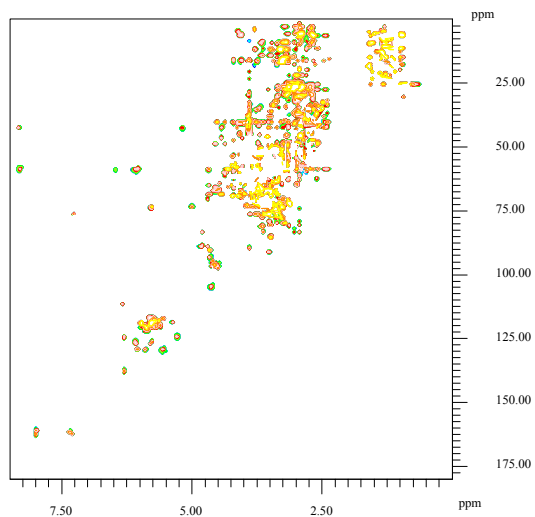
Minimumspektrum



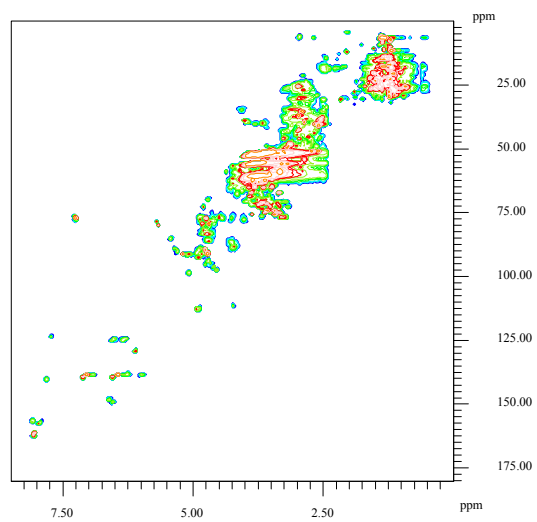
$^{13}\text{C}, \text{HO13HA}, \text{h+d}$



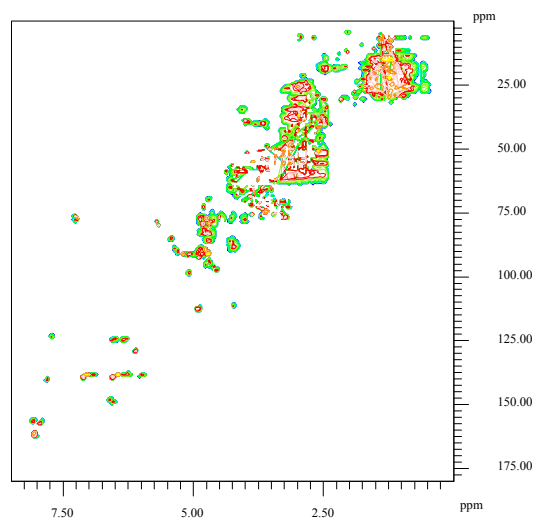
Differenzspektrum



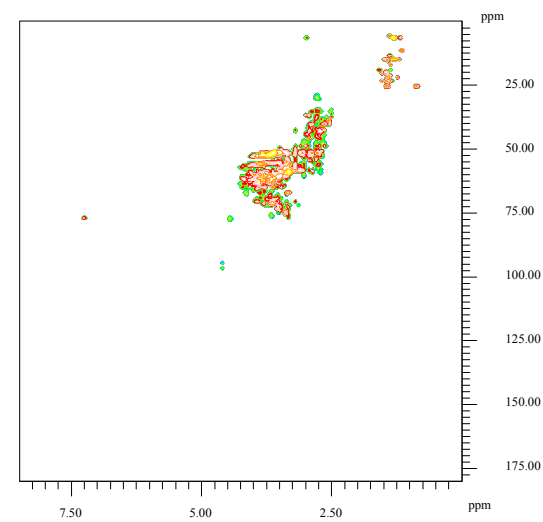
$^{13}\text{C}, \text{SV1HA}, \text{h+d}$



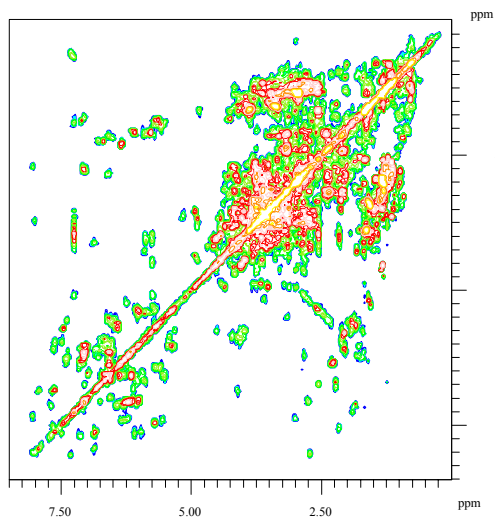
Differenzspektrum



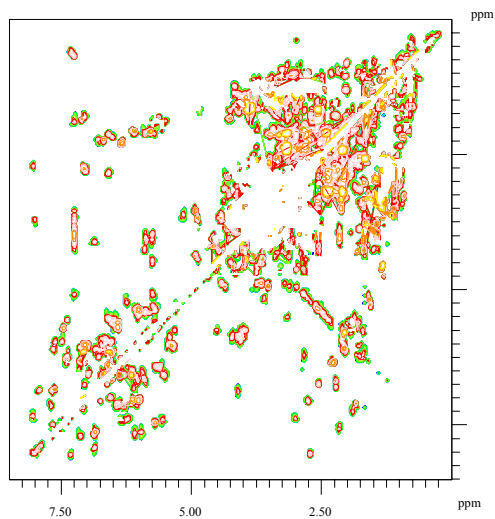
Minimumspektrum



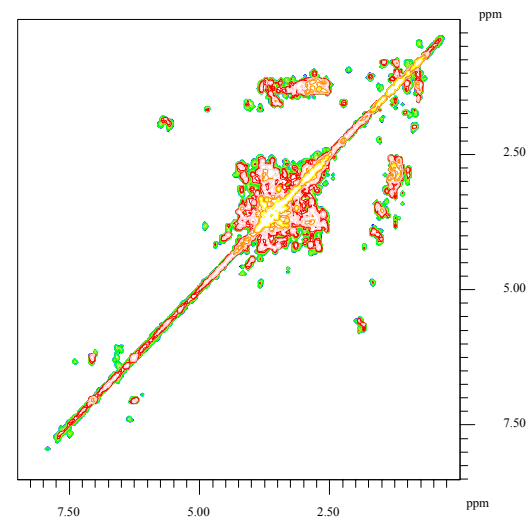
12C,HO10FA,d+h



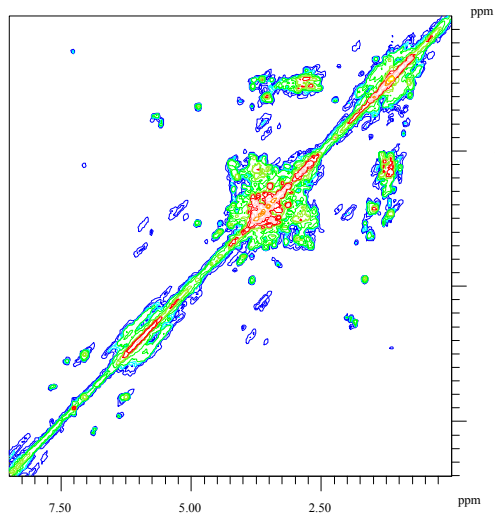
Differenzspektrum



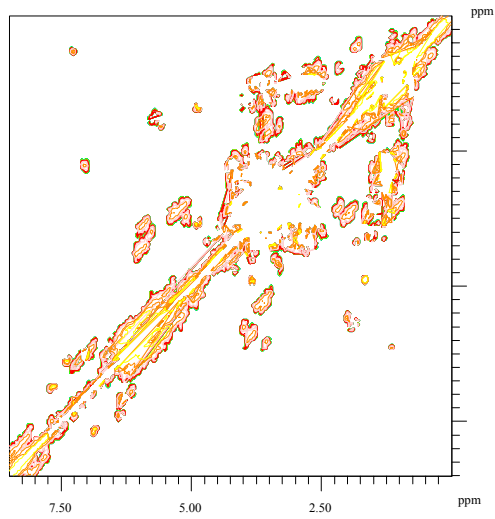
Minimumspektrum



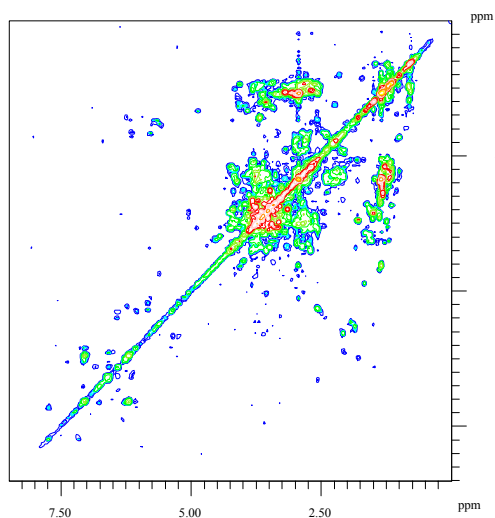
12C,HO13FA,d+h



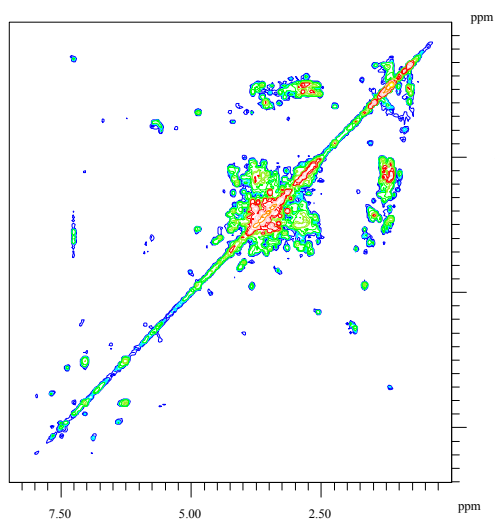
Differenzspektrum



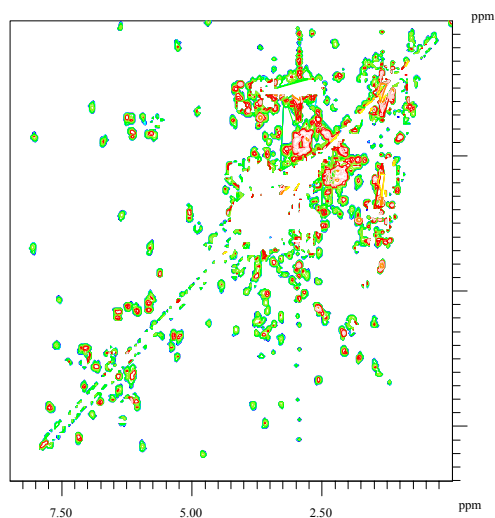
12C,SV1FA,d+h



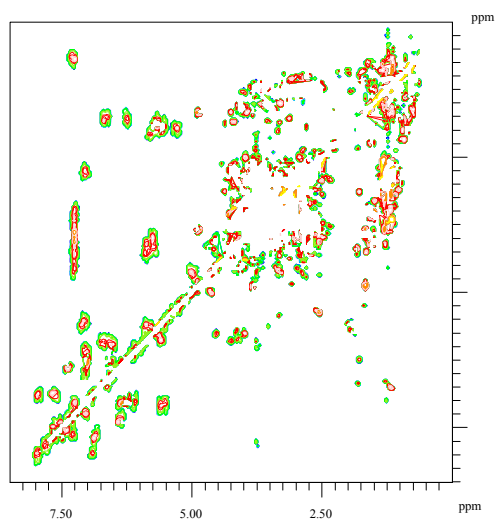
12C,MPDOM,d+h



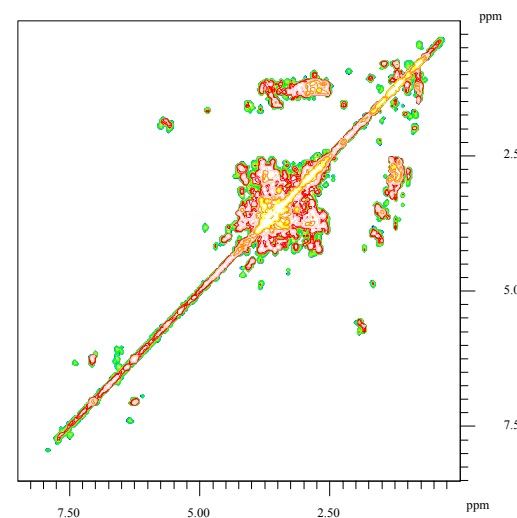
Differenzspektrum



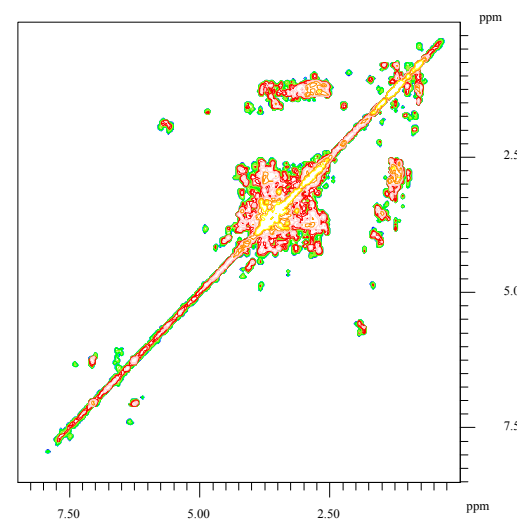
Differenzspektrum



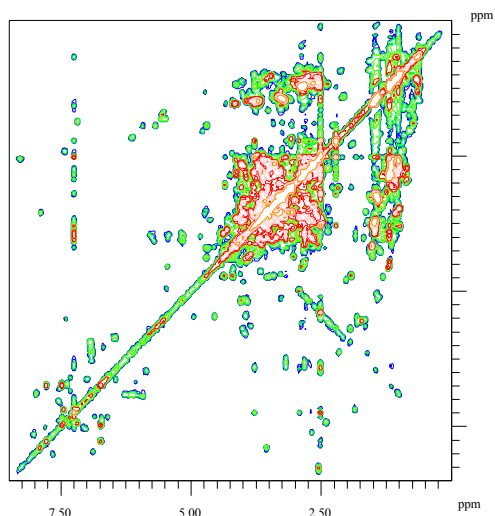
Minimumspektrum



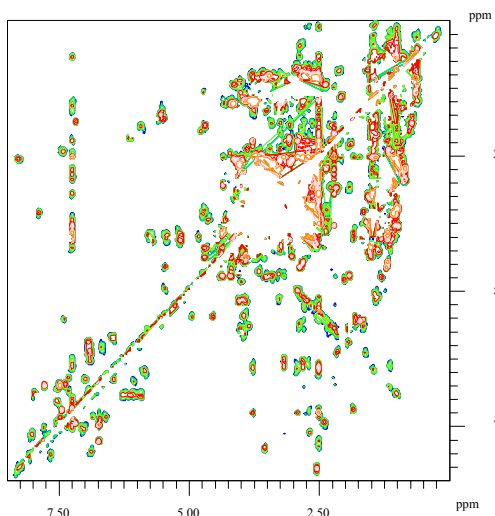
Minimumspektrum



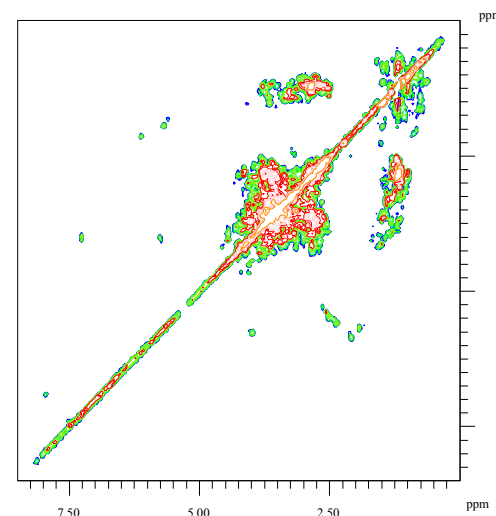
$^{12}\text{C}, \text{HO10HA}, \text{d+h}$



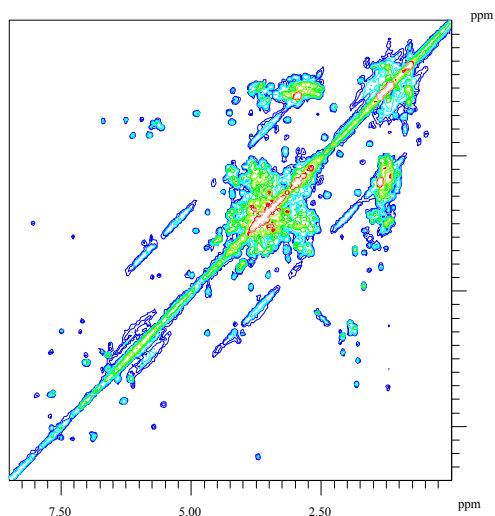
Differenzspektrum



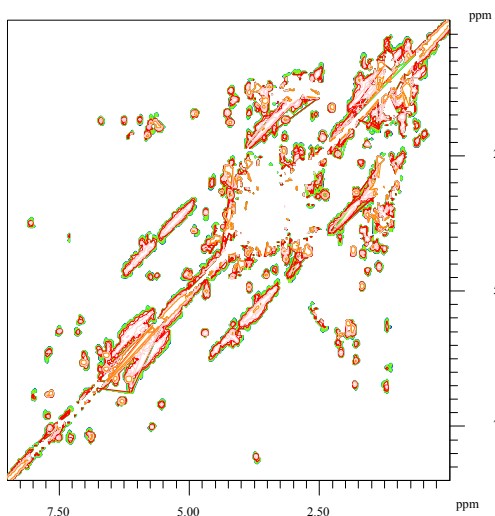
Minimumspektrum



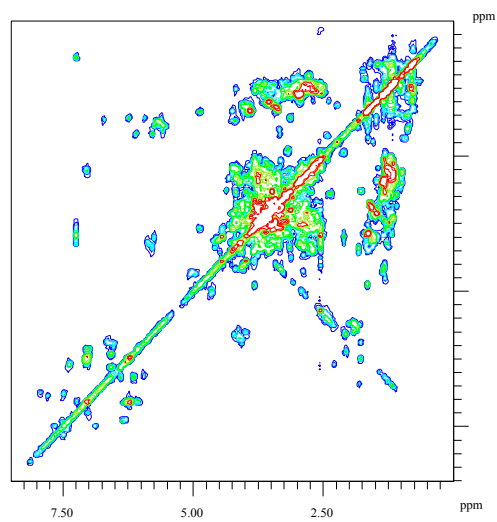
$^{12}\text{C}, \text{HO13HA}, \text{d+h}$



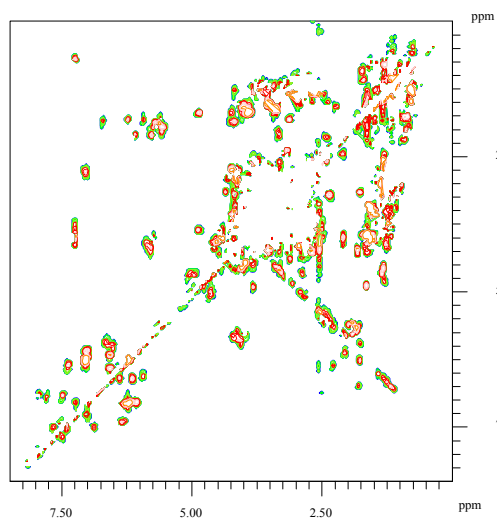
Differenzspektrum



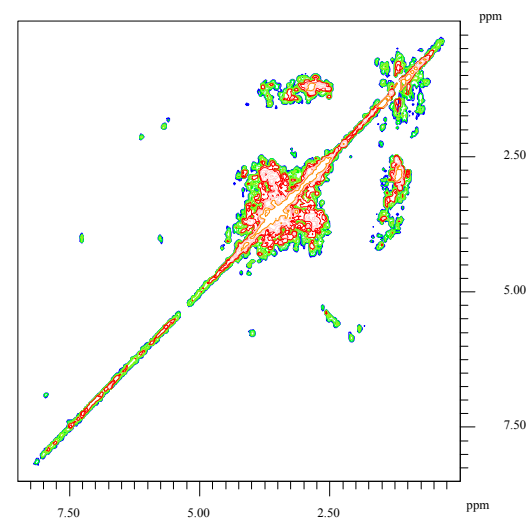
¹²C,SV1HA,d+h



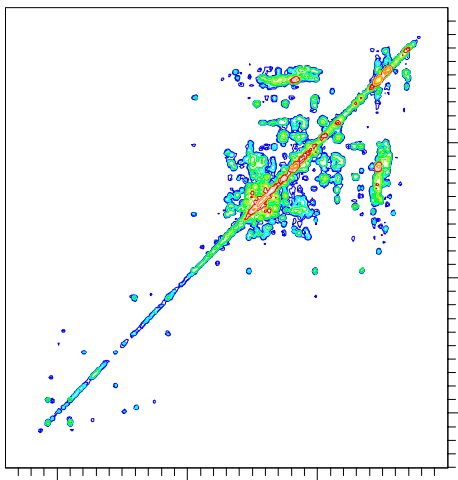
Differenzspektrum



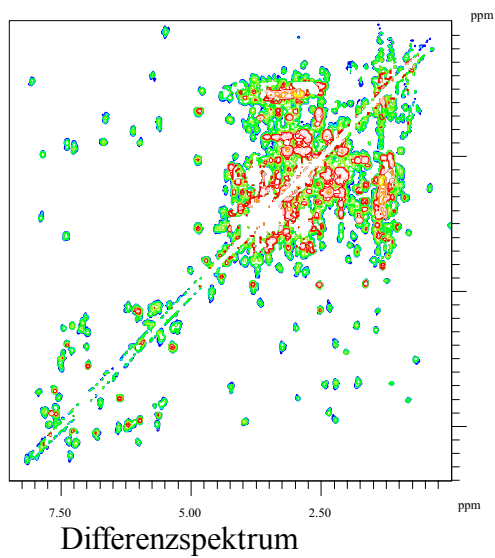
Minimumspektrum



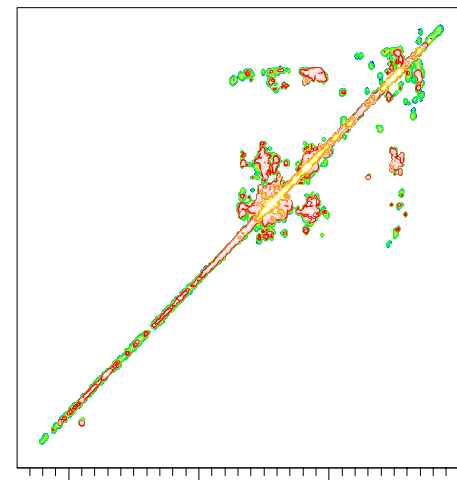
12C,HO10FA,h+d



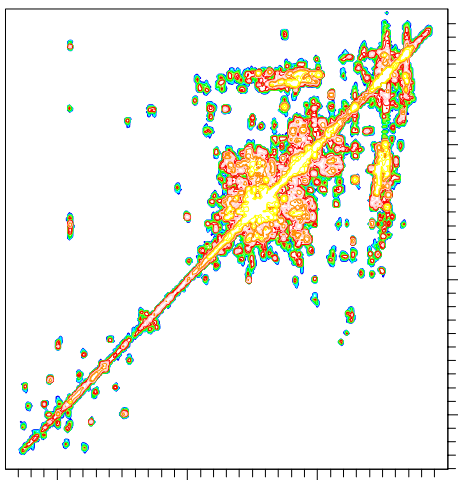
Differenzspektrum



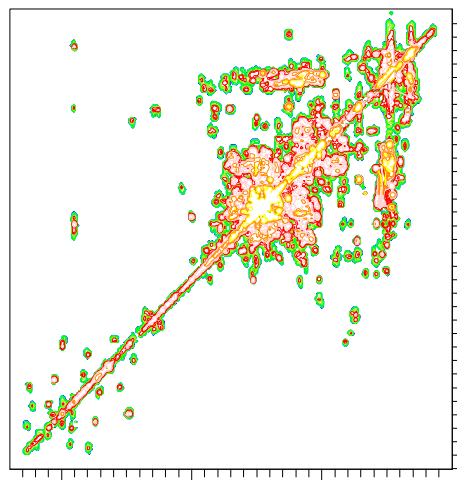
Minimumspektrum



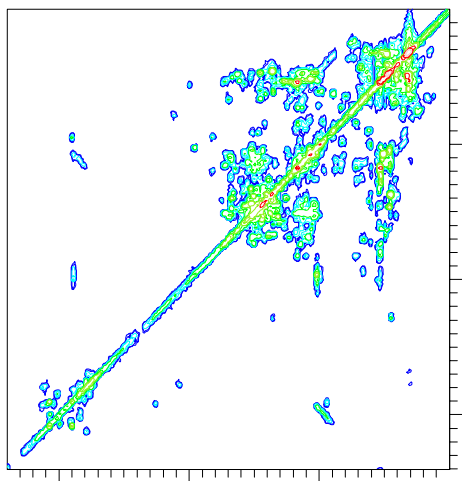
12C,HO13FA,h+d



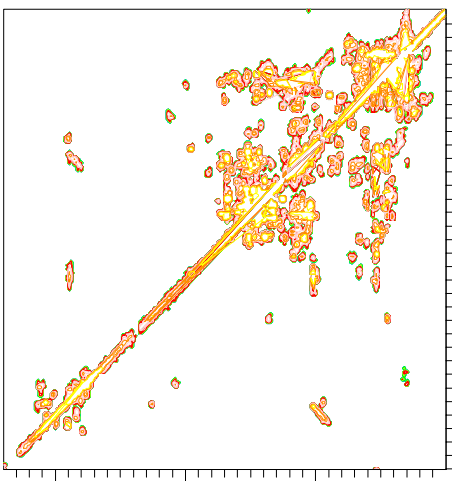
Differenzspektrum



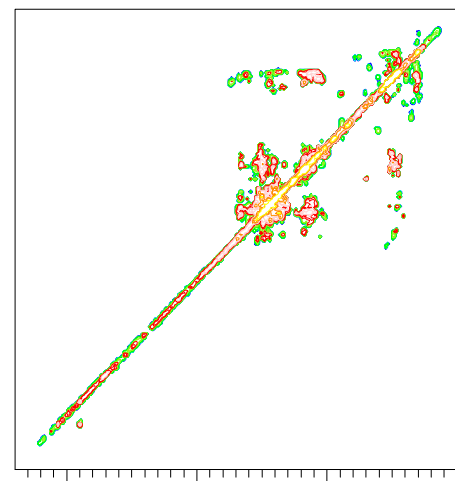
12C,SV1FA,h+d



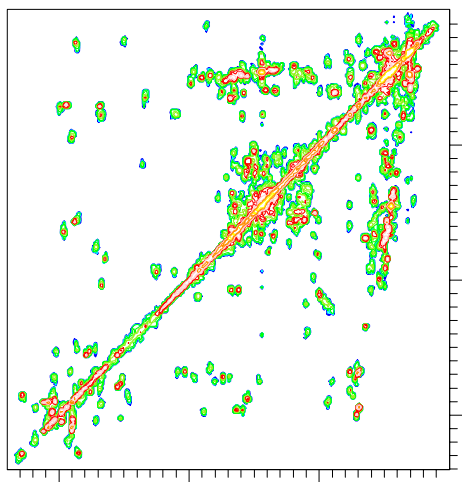
Differenzspektrum



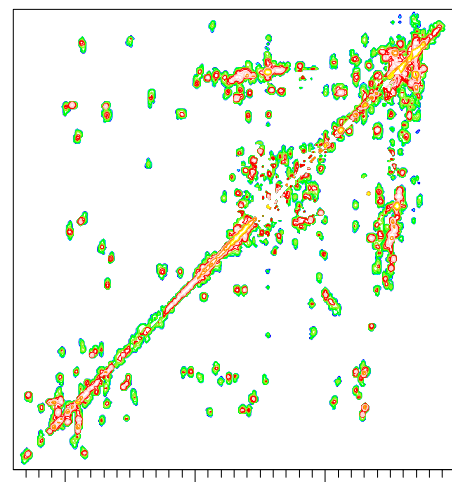
Minimumspektrum



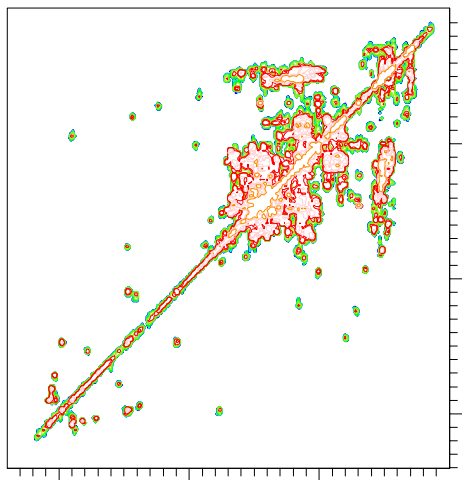
12C,MPDOM,h+d



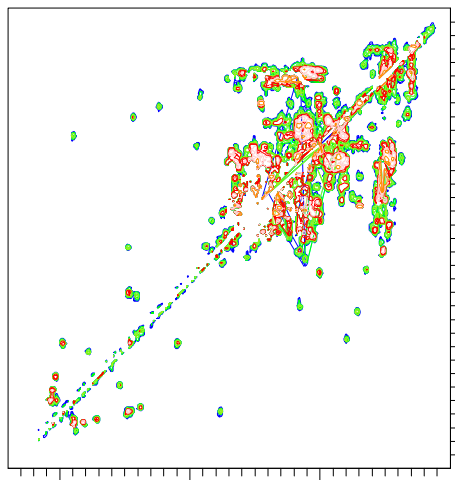
Differenzspektrum



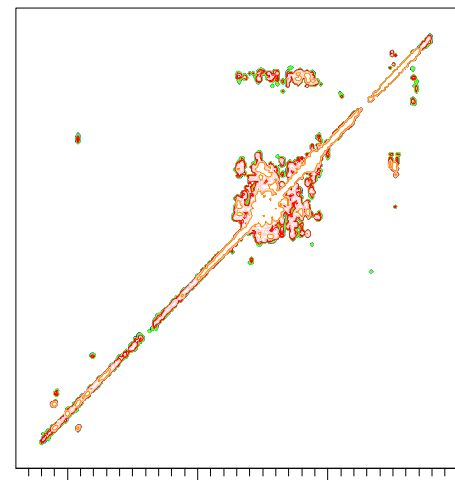
12C,HO10HA,h+d



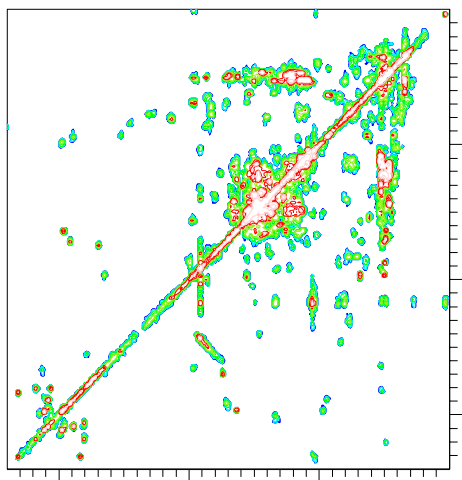
Differenzspektrum



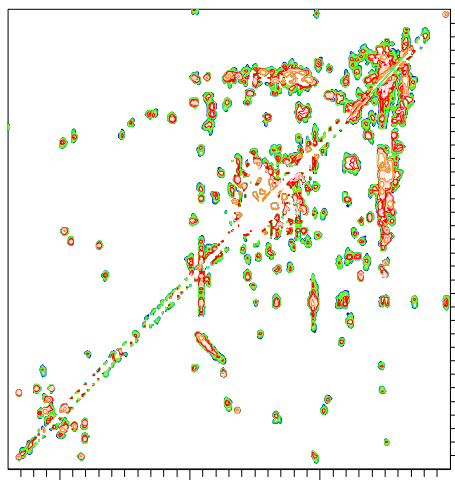
Minimumspektrum



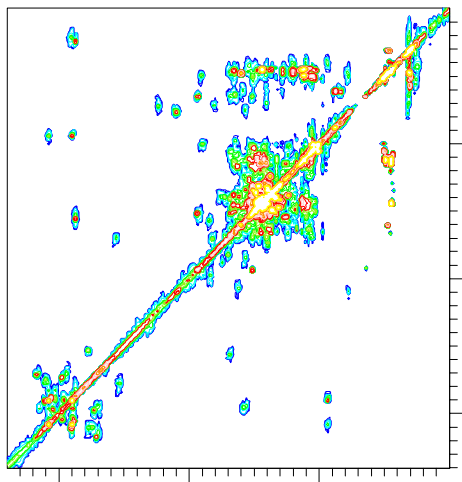
12C,HO13HA,h+d



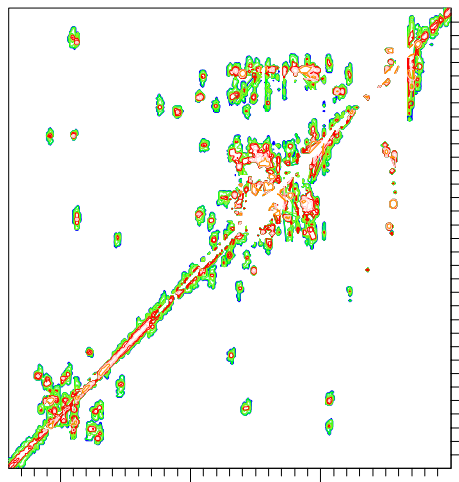
Differenzspektrum



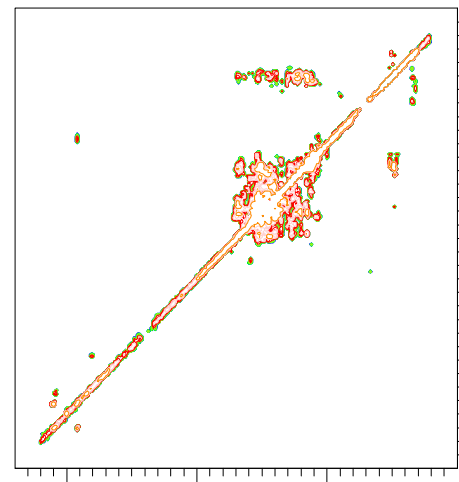
12C,SV1HA,h+d



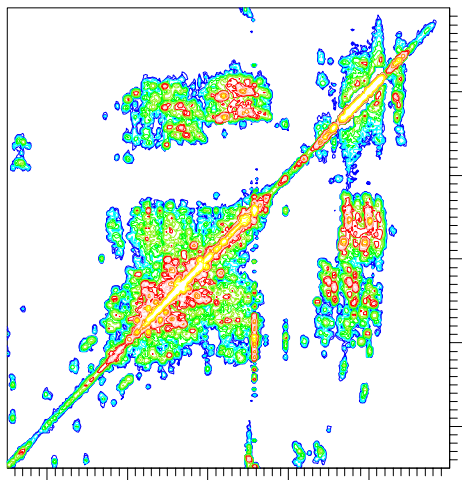
Differenzspektrum



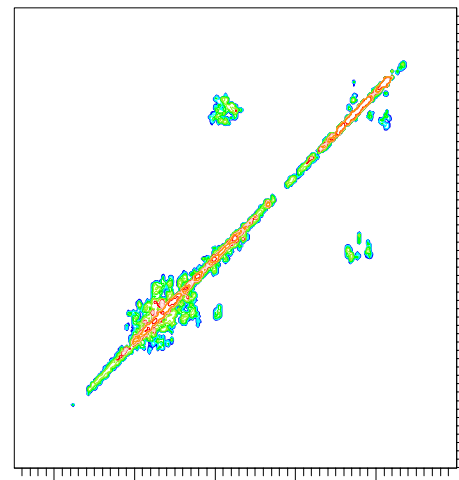
Minimumspektrum



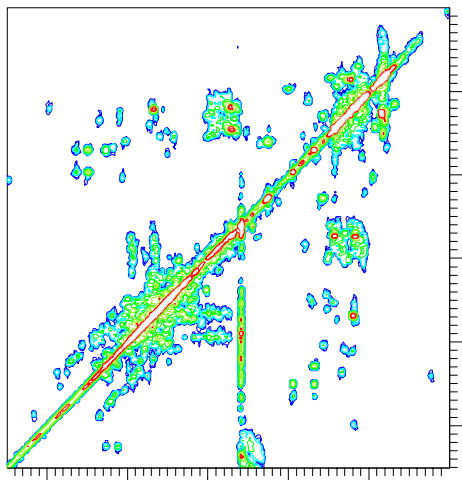
13C,HO10FA,d+h



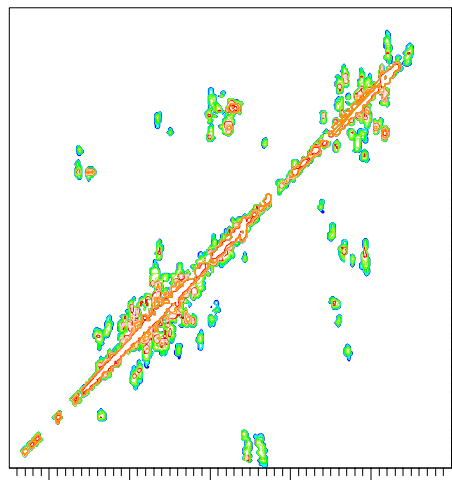
Minimumspektrum



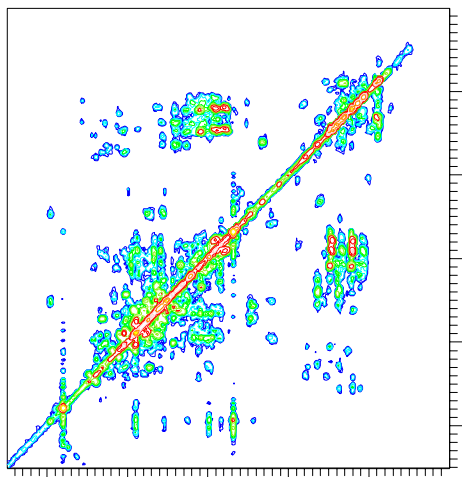
13C,HO13FA,d+h



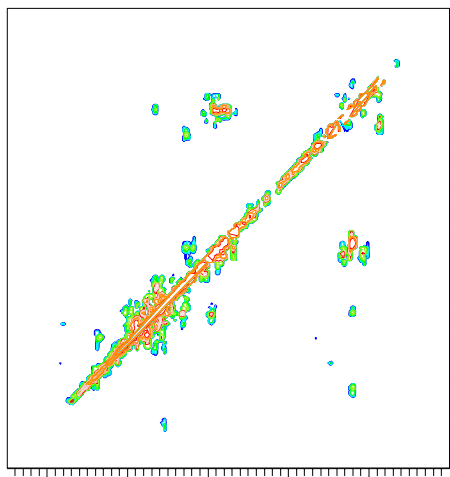
Differenzspektrum



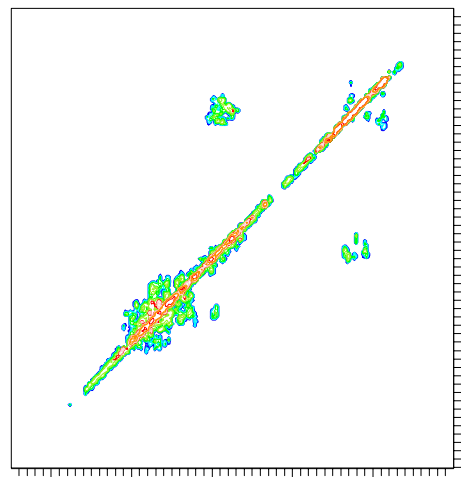
^{13}C ,SV1FA,d+h



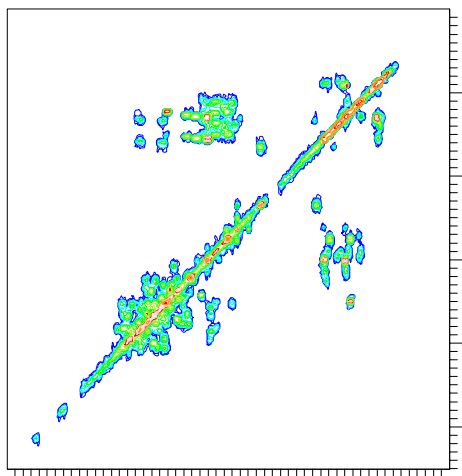
Differenzspektrum



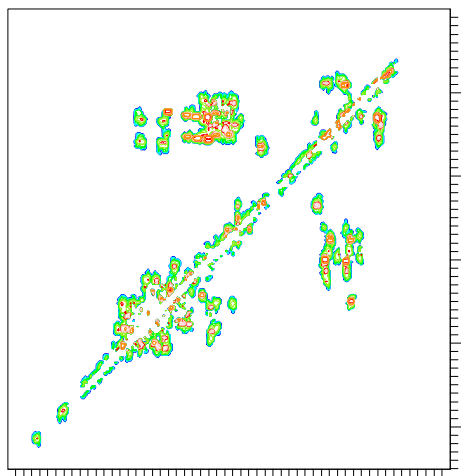
Minimumspektrum



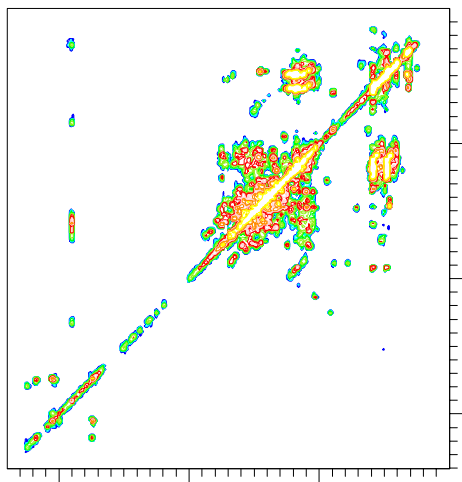
^{13}C ,MPDOM,d+h



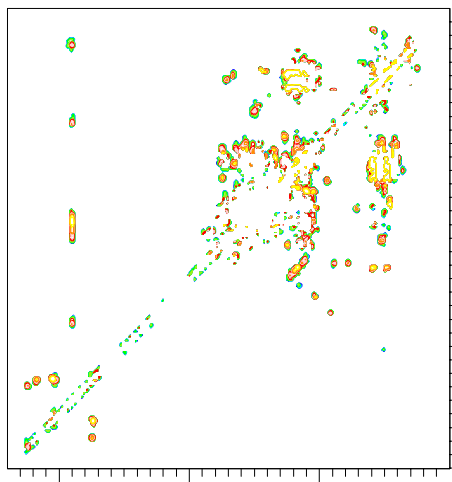
Differenzspektrum



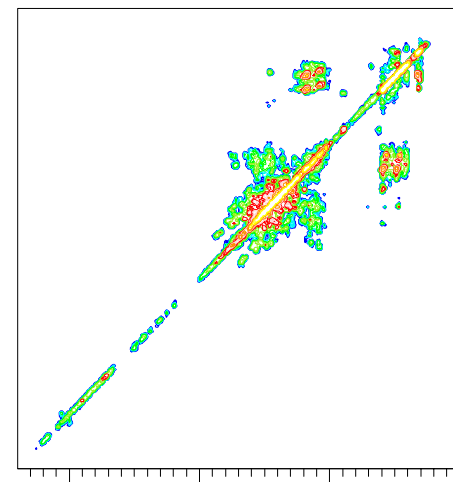
$^{13}\text{C}, \text{HO}10\text{HA}, \text{d+h}$



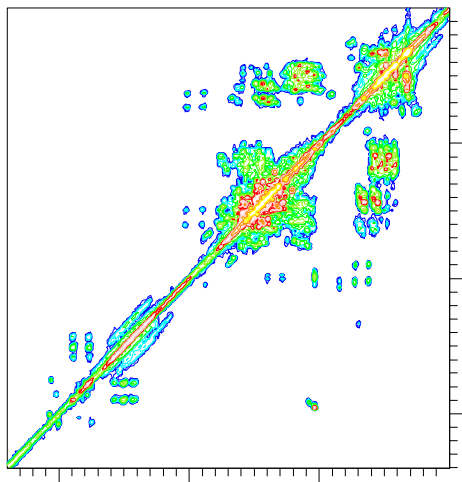
Differenzspektrum



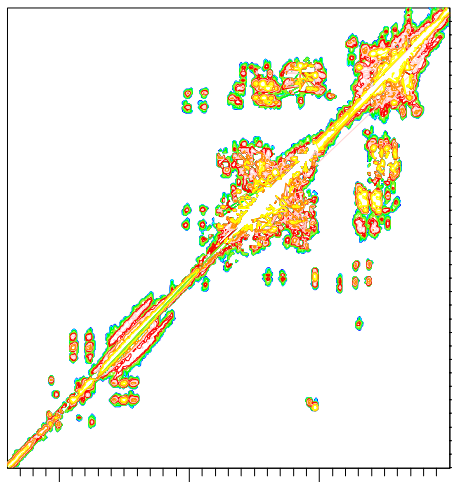
Minimumspektrum



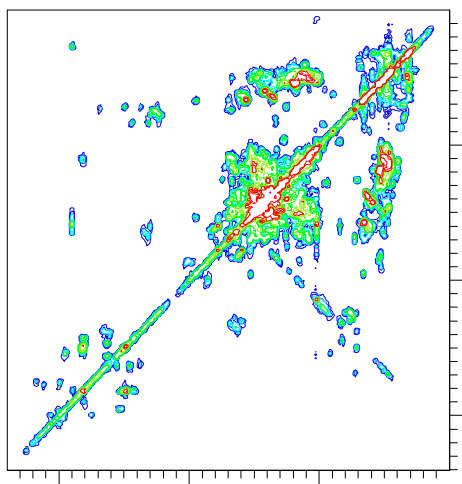
$^{13}\text{C}, \text{HO}13\text{HA}, \text{d+h}$



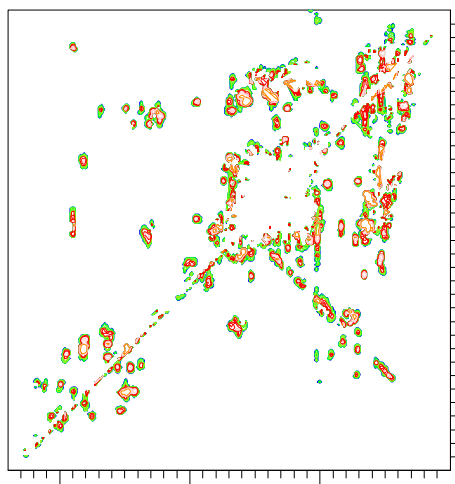
Differenzspektrum



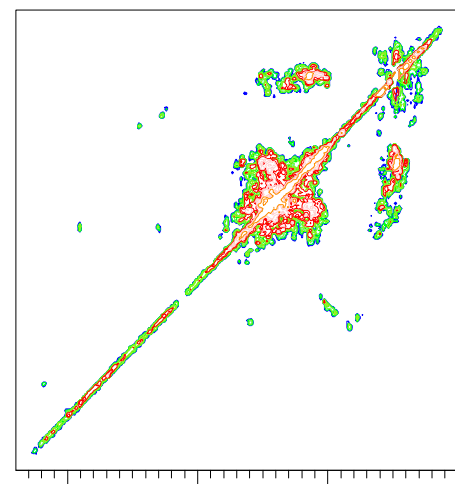
12C,SV1HA,d+h



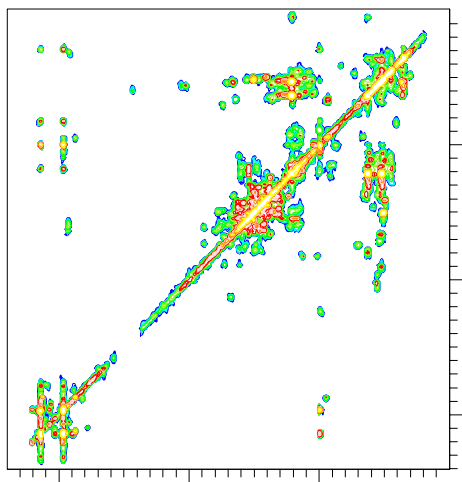
Differenzspektrum



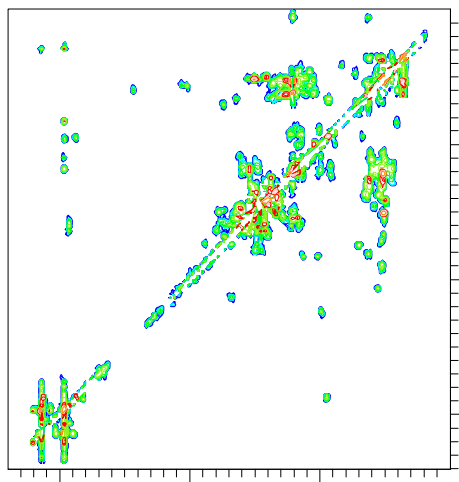
Minimumspektrum



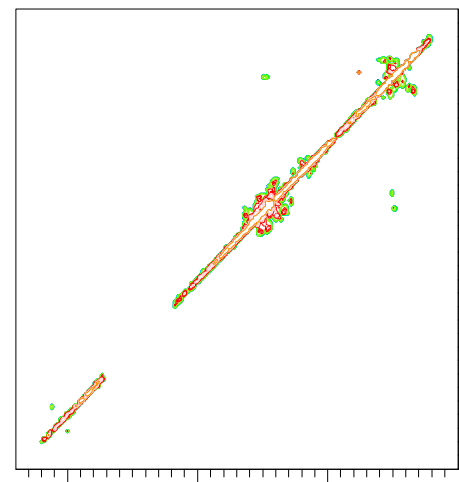
13C,HO10FA,h+d



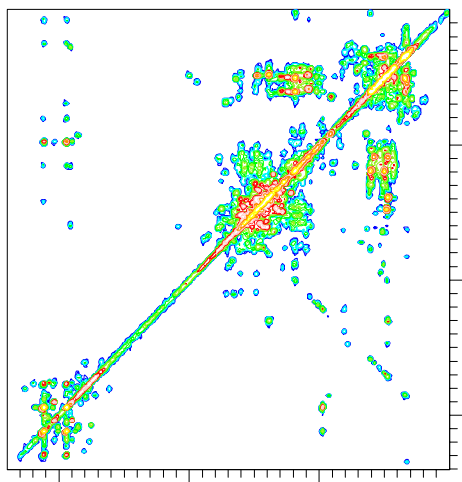
Differenzspektrum



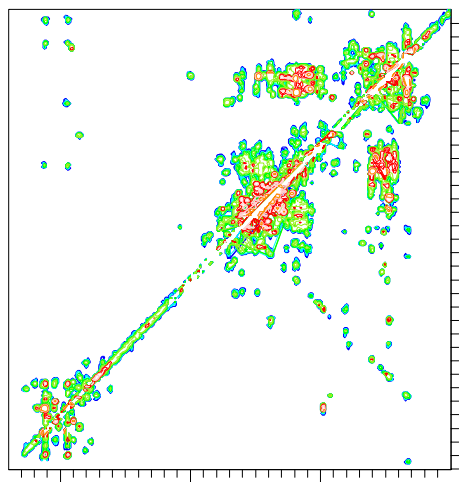
Minimumspektrum



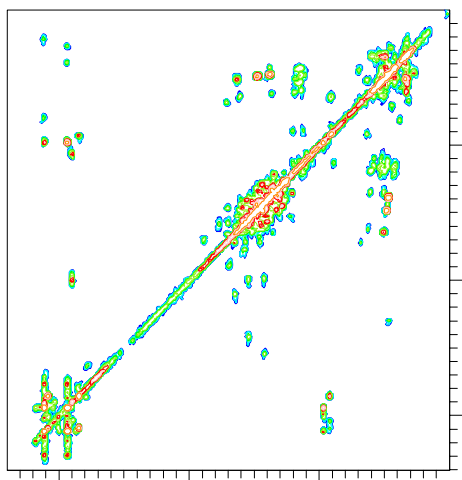
13C,HO13FA,h+d



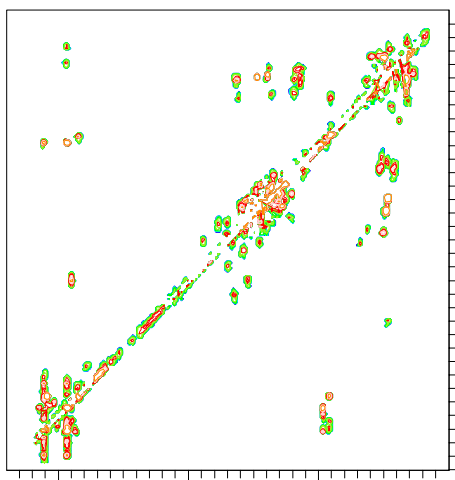
Differenzspektrum



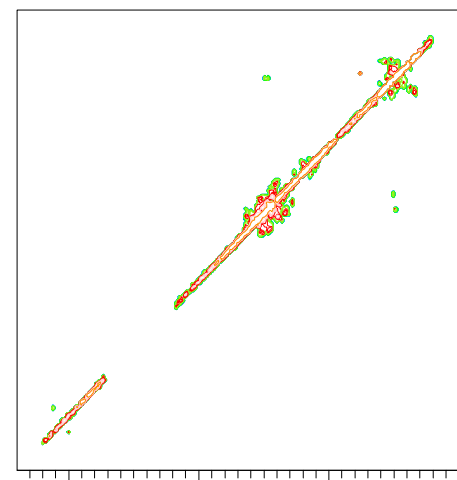
^{13}C ,SV1FA,h+d



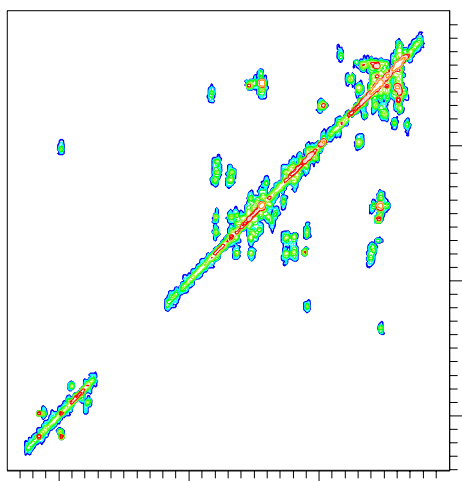
Differenzspektrum



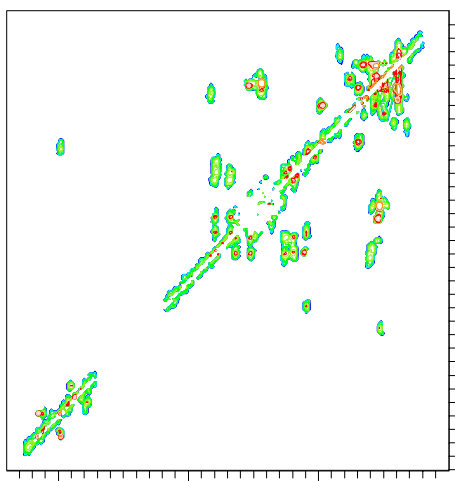
Minimumspektrum



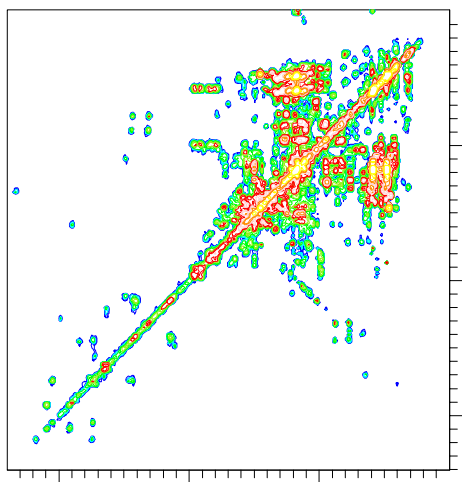
^{13}C ,MPDOM,h+d



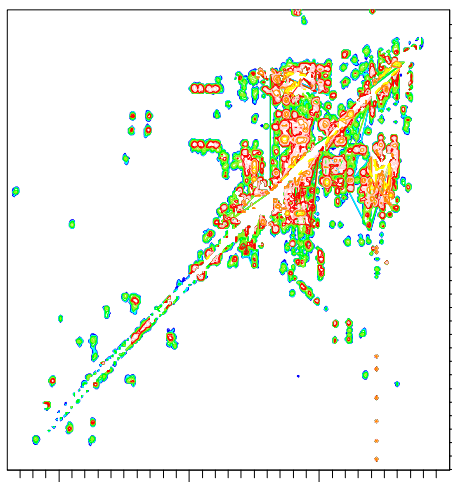
Differenzspektrum



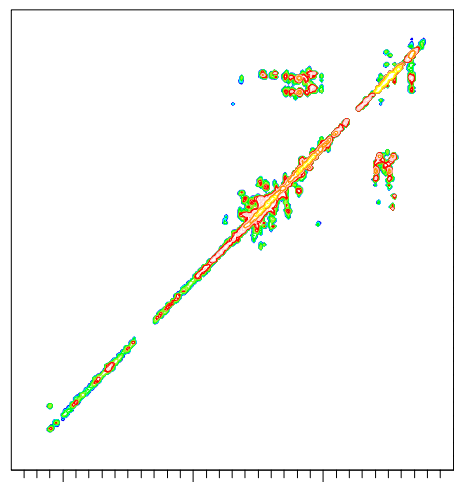
$^{13}\text{C}, \text{HO10HA}, \text{h+d}$



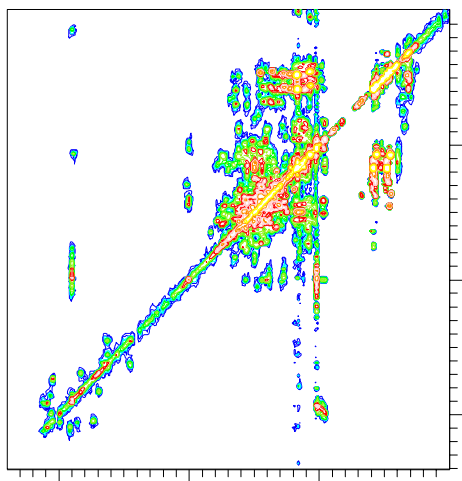
Differenzspektrum



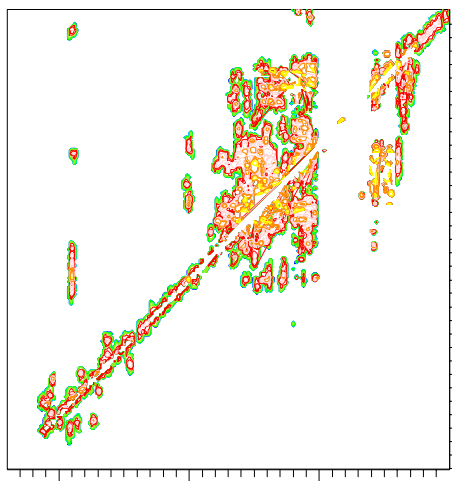
Minimumspektrum



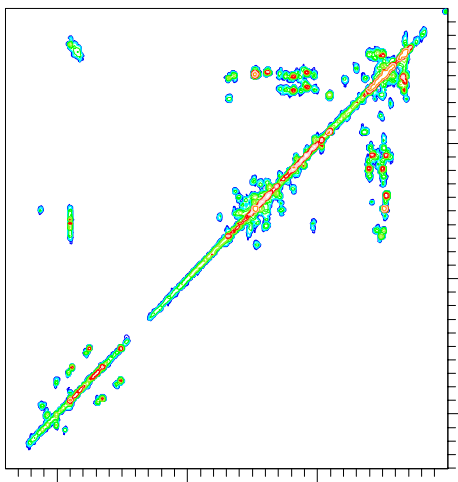
$^{13}\text{C}, \text{HO13HA}, \text{h+d}$



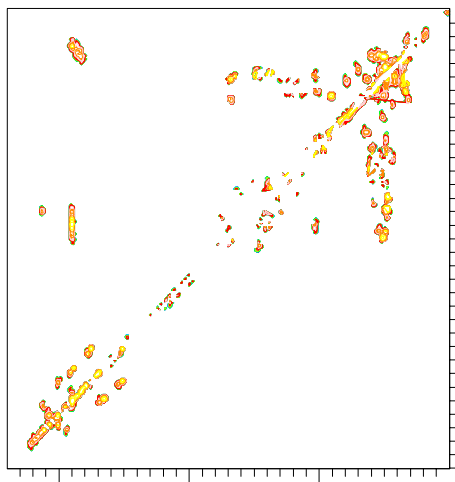
Differenzspektrum



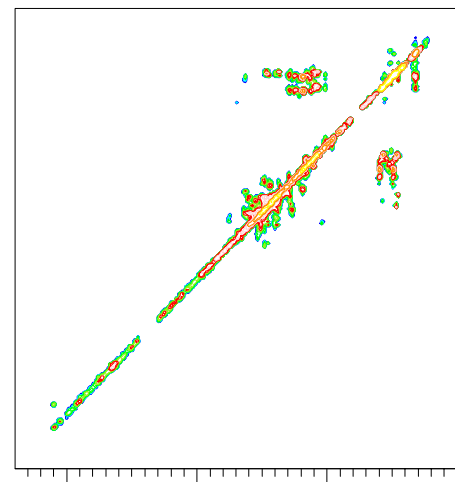
^{13}C ,SV1HA,h+d



Differenzspektrum



Minimumspektrum



Anhang F

Liste der verwendeten Substanzen für das ACD-Labs Modell

Liste der methylierten Substanzen für die Berechnung der COSY- und HSQC-NMR-Spektren mittels ACD-LABS

Substanzen	
Aliphatische Carboxylgruppen	Cholsäure Lysin L-Cystein L-Serin
Aromatische Carboxylgruppen	Benzoessäure Salicylsäure Phthalsäure Carminsäure
Primäre Alkohole	Cellulose Glucose 1-Butanol 1,3-Butandiol 1,2-Propandiol L-Serin Carminsäure Lignin Biohopanoid
Sekundäre Alkohole	Cholsäure 1,3-Butandiol 1,2-Propandiol Carminsäure Cellulose Glucose Tannin Biohopanoid
Tertiäre Alkohole	tert.-Butanol Lignin
Aliphatische Ketten	Aliphatisch verzweigte Ether- bzw. Carbonyl- Modellstruktur
Phenole	Tannin Lignin Salicylsäure Carminsäure
Amine / Thiole	L-Cystein L-Serin Lysin

Anhang G

M_w -, M_n -, M_p -Werte, Diffusionskoeffizienten,
Polydispersitäten, HD_w -, HD_n - und HD_p -Werte methylierter
und unmethylierter Substanzen in THF, Methanol und 0,1
bzw. 0,01 M NaCl

Molekulargewichte (M_w , M_n , M_p), Polydispersitäten, Größenverteilungen (HD_w , HD_n , HD_p) und Diffusionskoeffizienten von methylierten Huminstoffen und methylierter Carminsäure in THF

	HO10FA,h+d	HO10FA,d+h	HO13FA,h+d	HO13FA,d+h	SV1FA,h+d	SV1FA,d+h	MPDOM,h+d	MPDOM,d+h
M_w (kDa)	4,83	5,35	5,15	6,47	6,12	6,06	5,47	5,95
M_n (kDa)	3,84	4,02	3,63	4,06	4,20	4,26	4,16	3,99
M_p (kDa)	3,82	3,82	3,57	3,72	3,88	3,93	3,93	3,67
M_w / M_n	1,26	1,33	1,42	1,59	1,46	1,42	1,32	1,49
HD_w (nm)	2,45	2,50	2,46	2,59	2,57	2,57	2,52	2,55
HD_n (nm)	2,40	2,44	2,39	2,49	2,49	2,50	2,47	2,46
HD_p (nm)	2,35	2,35	2,30	2,33	2,36	2,37	2,37	2,32
D^b	3,99	5,22	4,08	4,02	3,98	3,97	3,97	4,04

	HO10HA,h+d	HO10HA,d+h	HO13HA,h+d	HO13HA,d+h	SV1HA,h+d	SV1HA,d+h	Carmin ^a ,h+d	Carmin ^a ,d+h
M_w (kDa)	5,87	6,97	9,21	6,56	5,94	6,51	6,05	5,70
M_n (kDa)	4,38	4,35	5,95	4,16	3,91	4,30	4,40	4,17
M_p (kDa)	3,98	3,77	4,47	3,82	3,57	3,87	4,03	3,88
M_w / M_n	1,34	1,60	1,55	1,58	1,52	1,51	1,37	1,37
HD_w (nm)	2,56	2,63	2,88	2,60	2,54	2,61	2,58	2,54
HD_n (nm)	2,50	2,53	2,77	2,50	2,45	2,52	2,51	2,47
HD_p (nm)	2,37	2,34	2,46	2,35	2,30	2,36	2,38	2,36
D^b	3,95	4,01	3,82	4,00	4,08	3,98	3,94	3,98

^a Carmin: Carminsäure

^b $D \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$

Molekulargewichte (M_w , M_n , M_p), Polydispersitäten, Größenverteilungen (HD_w , HD_n , HD_p) und Diffusionskoeffizienten von Huminstoffen und Carminsäure und ihren methylierten Derivaten und von IHSS-HS-Standards in Methanol

	HO10FA,h+d	HO10FA,d+h	HO13FA,h+d	HO13FA,d+h	SV1FA,h+d	SV1FA,d+h	MPDOM,h+d	MPDOM,d+h
M_w (kDa)	2,48	2,67	2,40	2,58	2,43	2,56	2,59	2,46
M_n (kDa)	1,67	1,72	1,68	1,66	1,49	1,76	1,67	1,47
M_p (kDa)	1,49	1,51	1,51	1,49	1,42	1,57	1,49	1,40
M_w / M_n	1,49	1,56	1,43	1,55	1,63	1,48	1,54	1,68
HD_w (nm)	1,44	1,47	1,44	1,45	1,42	1,47	1,45	1,43
HD_n (nm)	1,39	1,40	1,39	1,39	1,35	1,41	1,39	1,35
HD_p (nm)	1,29	1,29	1,29	1,29	1,27	1,31	1,29	1,26
D^b	6,20	6,18	6,18	6,20	6,29	6,09	6,20	6,32

	HO10HA,h+d	HO10HA,d+h	HO13HA,h+d	HO13HA,d+h	SV1HA,h+d	SV1HA,d+h	Carmin,h+d	Carmin,d+h
M_w (kDa)	2,18	2,39	2,94	4,24	2,17	2,61	2,13	2,52
M_n (kDa)	1,55	1,69	1,74	1,86	1,59	1,55	1,45	1,50
M_p (kDa)	1,42	1,51	1,53	1,49	1,46	1,42	1,38	1,40
M_w / M_n	1,41	1,41	1,69	2,29	1,36	1,68	1,47	1,67
HD_w (nm)	1,41	1,44	1,50	1,61	1,41	1,44	1,38	1,43
HD_n (nm)	1,36	1,39	1,42	1,47	1,36	1,37	1,32	1,35
HD_p (nm)	1,27	1,29	1,30	1,29	1,28	1,27	1,26	1,26
D^b	6,29	6,18	6,15	6,20	6,23	6,29	6,35	6,32

^a Carmin: Carminsäure

^b $D \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$

	HO10FA	HO13FA	SV1FA	MPDOM	HO10HA	HO13HA	SV1HA	Carmin
M_w (kDa)	2,55	2,51	2,29	2,74	2,27	2,80	2,55	4,13
M_n (kDa)	1,66	1,68	1,53	1,65	1,47	1,60	1,65	1,71
M_p (kDa)	1,51	1,49	1,38	1,42	1,38	1,51	1,49	1,46
M_w / M_n	1,54	1,50	1,49	1,67	1,55	1,75	1,55	2,41
HD_w (nm)	1,45	1,45	1,41	1,47	1,40	1,48	1,45	1,60
HD_n (nm)	1,39	1,40	1,35	1,40	1,34	1,40	1,39	1,46
HD_p (nm)	1,29	1,29	1,26	1,27	1,26	1,29	1,29	1,28
D^b	6,18	6,20	6,35	6,29	6,35	6,18	6,20	6,23

	IHSS-Summit	IHSS-Leo	IHSS-Peat	IHSS-Soil
M_w (kDa)	2,24	2,34	2,47	2,68
M_n (kDa)	1,45	1,52	1,52	1,70
M_p (kDa)	1,44	1,40	1,46	1,42
M_w / M_n	1,54	1,53	1,62	1,57
HD_w (nm)	1,40	1,41	1,43	1,47
HD_n (nm)	1,34	1,35	1,36	1,40
HD_p (nm)	1,28	1,26	1,28	1,27
D^b	6,26	6,32	6,23	6,29

^a Carmin: Carminsäure

^b D × 10⁻¹⁰ m²s⁻¹

Molekulargewichte (M_w , M_n , M_p), Polydispersitäten, Größenverteilungen (HD_w , HD_n , HD_p) und Diffusionskoeffizienten von Huminstoffen, IHSS-
HS-Standards und Carminsäure in 0,1 m NaCl

	HO10FA	HO13FA	SV1FA	MPDOM	HO10HA	HO13HA	SV1HA	Carmin
M_w (kDa)	4,49	8,29	12,10	7,59	9,37	11,34	6,82	1,13
M_n (kDa)	1,15	2,45	3,55	2,79	3,26	3,07	3,09	329
M_p (kDa)	1,64	1,84	1,37	1,29	3,55	2,93	1,91	243
M_w / M_n	3,90	3,38	3,40	2,72	2,87	3,69	2,20	3,44
HD_w (nm)	1,09	1,00	1,60	1,39	1,54	1,59	1,38	0,58
HD_n (nm)	0,89	1,21	1,32	1,19	1,31	1,29	1,29	0,51
HD_p (nm)	0,89	0,93	0,83	0,81	1,20	1,12	0,95	0,43
D^b	4,83	4,62	5,17	5,30	3,58	3,86	4,56	10,09

	IHSS-Summit	IHSS-Peat	IHSS-Soil
M_w (kDa)	4,68	6,44	4,62
M_n (kDa)	2,21	2,30	2,10
M_p (kDa)	1,60	1,91	1,66
M_w / M_n	2,11	2,81	2,20
HD_w (nm)	1,19	1,30	1,18
HD_n (nm)	1,07	1,12	1,05
HD_p (nm)	0,88	0,95	0,90
D^b	4,88	4,56	4,81

^a Carmin: Carminsäure

^b $D \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$

Molekulargewichte (M_w , M_n , M_p), Polydispersitäten, Größenverteilungen (HD_w , HD_n , HD_p) und Diffusionskoeffizienten von Huminstoffen, IHSS-HS-Standards und Carminsäure in 0,01 m NaCl

	HO10FA	HO13FA	SV1FA	MPDOM	HO10HA	HO13HA	SV1HA	Carmin
M_w (kDa)	6,44	6,82	7,51	9,37	17,10	17,90	12,57	3,32
M_n (kDa)	1,23	1,15	3,09	1,12	3,01	2,76	3,18	316
M_p (kDa)	1,80	1,85	1,33	1,37	3,63	3,23	1,73	222
M_w / M_n	5,23	5,93	2,43	8,36	5,68	6,48	3,95	10,517
HD_w (nm)	1,17	0,98	1,33	1,26	1,67	1,57	1,51	0,70
HD_n (nm)	0,96	0,98	1,20	0,97	1,35	1,28	1,28	0,57
HD_p (nm)	0,94	0,95	0,85	0,86	1,19	1,14	0,93	0,46
D^b	4,60	4,56	5,10	5,05	3,63	3,78	4,66	9,28

	IHSS-Summit	IHSS-Peat	IHSS-Soil
M_w (kDa)	5,30	10,86	6,16
M_n (kDa)	1,03	1,95	1,52
M_p (kDa)	1,75	1,92	1,71
M_w / M_n	5,16	5,56	4,05
HD_w (nm)	1,09	1,38	1,16
HD_n (nm)	0,90	1,12	0,99
HD_p (nm)	0,93	0,96	0,92
D^b	4,64	4,5	4,68

^a Carmin: Carminsäure

^b $D \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$

Lebenslauf

Friederike Jäkle
geboren am 23. April 1974 in Kempten / Allgäu
unverheiratet

Schulbildung

September 1980 – Juli 1984	Haubenschloss-Schule, Kempten
September 1984 – Juli 1993	Carl-von-Linde-Gymnasium, Kempten
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

November 1993 – Juli 1996	Studiengang Chemie (Diplom), Ludwig-Maximilians-Universität, München Diplomvorprüfung: Mai 1996
September 1996 – September 1997	MSc in ‘Environmental Analysis and Assessment’, Imperial College, University of London, England Abschluss: International Diploma of the Imperial College
April 1997 – September 1997	Master Thesis und Diplomarbeit im R&D-Centre von British American Tobacco, Southampton, England Thema: Environmental Impact Assessment of the Release of Phosphine
November 1997 – Februar 1999	Studiengang Chemie (Diplom), Ludwig-Maximilians-Universität, München Abschluss: Diplom-Chemikerin
Juli 1999 – September 2002	Doktorarbeit bei Prof. Kettrup am Institut für ökologische Chemie der GSF, Neuherberg Thema: Struktur- und Größencharakterisierung von Huminstoffen und ihren methylierten Derivaten