



Masterarbeit

zur Erlangung des Grades
Master of Science (M. Sc.)

im Studiengang

Biotechnologie

an der

Hochschule Bremerhaven

Optimierung der Festphasenextraktion des natürlichen organischen Materials: Molekulare und spektroskopische Online-Validierung

am 29.11.2012
vorgelegt von

Thomas Jendrossek

Die Abschlussarbeit umfasst 43 Seiten.

Erstprüfer: Prof. Dr. rer. nat. Boris Koch
Hochschule Bremerhaven
Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung

Zweitprüfer: Dr. rer, nat. Martin Graeve
Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Thomas Jendrossek, versichere eidesstattlich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig, ohne Hilfe Dritter und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen angefertigt wurde. Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, sind als Zitate gekennzeichnet.

Bremerhaven, den 29.11.2012

Thomas Jendrossek

Danksagungen

Ich danke **Prof. Dr. Boris Koch** für die Möglichkeit meine Masterarbeit am Alfred-Wegener-Institut anfertigen zu dürfen und für seine konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn **Dr. Martin Graeve** danke ich für die interessierte Übernahme des Korreferates und für seine ermutigende Unterstützung.

Ein großer Dank gilt **Kai-Uwe Ludwichowski** für die hervorragende Betreuung im Laboralltag, die kritisch-motivierenden Gespräche und das herrliche Arbeitsklima. Ich werde die Arbeiten mit ihm im Labor vermissen.

Oliver Lechtenfeld möchte ich dafür danken, dass er in inspirierenden Diskussionen und Gesprächen immer wieder neue Blickwinkel aufgezeigt hat.

Herzlichen Dank auch an alle **Kollegen** und **Freunde** innerhalb der Arbeitsgruppe (Claudia, Dieter, Doreen, Stefanie und Mandy), die mich in meinen Arbeiten unterstützt und mir ein schönes gemeinschaftliches Gefühl vermittelt haben.

Kristin Hardge möchte ich für das Korrekturlesen und die konsequente und liebevolle Unterstützung besonders in der Endphase sehr danken.

Der größte Dank gilt meinen **Eltern**, ohne ihre seelische und finanzielle Unterstützung wäre das Studium nicht machbar gewesen.

Kurzfassung

Gelöste organische Substanzen (DOM) stellen einen der größten dynamischen Kohlenstoffspeicher der Erde dar. Dabei trägt das Wissen über DOM dazu bei, globale Stoffkreisläufe besser verstehen zu können. Zur Analyse werden unter anderem chromatographische und optische Verfahren angewendet, welche die Aufklärung von molekularen Verteilungen und Trends unterstützen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war das Adsorptionsverhalten gelöster organischer Substanzen im Verlauf der Festphasenextraktion (SPE) zu charakterisieren. Zur Extraktion wurden die SPE-Kartuschen ‚Bond Elut PPL‘ und ‚Bond Elut C8‘ (Agilent Technologies) verwendet.

Versuche mit unterschiedlichen Anreicherungs volumina zeigten, dass sich die Extraktionseffizienz und die Polaritätsverteilung der organischen Substanzen, nicht aber die Aminosäurezusammensetzung der angereicherten Extrakte mit zunehmendem Probenvolumen deutlich veränderten. Diese Effekte waren dabei unabhängig von Probenherkunft (Ästuar-, Meeres-, Flussprobe) und verwendetem Extraktions sorbens (C8, PPL). Außerdem konnte durch den Einsatz eines zusätzlichen Elutionsmittels (Acetonitril) eine weitere DOM-Fraktion isoliert werden, die nur in Extrakten des PPL-Sorbens nachweisbar war. Diese Fraktion zeichnete sich durch geringe Mengen organischer Substanzen aus, die mittels Umkehrphasenchromatographie (RP-HPLC) effektiv in einzelne Peaks aufgetrennt wurden und ein Potential als künftige Markersubstanzen besitzen.

Zur Konzentrationsbestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs wurden erstmals Echtzeit-Fluoreszenzmessungen des Kartuschendurchflusses während der Festphasenextraktion durchgeführt. Dabei wurde die Fluoreszenz im Emissionsbereich von 420 – 700 nm bei den gleichzeitig verwendeten Anregungswellenlängen 270 und 365 nm detektiert. Es konnten Beziehungen zwischen der Fluoreszenzintensität und der extrahierten Kohlenstoffmenge sowie eine starke Korrelation mit der Kohlenstoffkonzentration im Durchfluss nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurden neue Erfahrungen bezüglich der Extraktionsstabilität von PPL-Kartuschen gewonnen. In Experimenten wurden Flussproben künstlich mit unterschiedlichen Mengen an Natriumchlorid versetzt und angereichert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Anwesenheit von Salz keinen nachweisbaren Einfluss auf die Extraktion gelöster organischer Substanzen hatte. Mittels Umkehrphasen- und Größenausschlusschromatographie wurden jedoch salzinduzierte Unterschiede der Größenverteilung bei den angereicherten Substanzen festgestellt.

Abstract

Dissolved organic matter (DOM) represents one of the biggest dynamic carbon pool on the planet. The knowledge of DOM helps to understand global biochemical cycles better. For instance chromatographic and optical methods are used to exposure molecular distributions and trends. The aim of this study was to characterize the adsorption behaviour of DOM during a solid-phase extraction (SPE). For extraction the SPE cartridges ‚Bond Elut PPL’ and ‚Bond Elut C8’ (Agilent Technologies) has been used.

Experiments with different enrichment volumes showed that the extraction efficiency and the polarity distribution of the organic substances, but not the amino acid composition of the enriched extracts changed significantly with increasing sample volume. These effects were independent of sample origin (estuarine, marine, river sample) and used sorbent (C8, PPL). In addition another DOM fraction could be isolated by the use of an additional eluent (acetonitrile). It could only be detected in extracts of the PPL sorbent. This fraction contained small amounts of organic substances, which were effectively separated into individual peaks by reversed-phase chromatography (RP-HPLC) and have potential as future markers.

In order to determinate the concentration of dissolved organic carbon real-time fluorescence measurements of the cartridge outflow were performed for the first time during the solid-phase extraction. Here, the fluorescence emission in the range of 420 – 700 nm was detected while simultaneous excitation at the wavelengths 270 and 365 nm. Relations between the fluorescence intensity and the amount of extracted carbon as well as strong correlations with the carbon concentration in the cartridge outflow were recognized.

Furthermore, new experiences regarding the extraction stability of PPL cartridges were gained. In experimental series river samples were spiked with different amounts of sodium chloride and enriched. The results showed that the presence of salt had no remarkable effect on the extraction of dissolved organic matter. By using reversed-phase and size-exclusion chromatography salt-induced differences in the size distribution of the enriched substances were identified.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	iii
Danksagungen	iv
Kurzfassung	v
Abstract	vi
Abkürzungen	ix
Einheiten	x
Faktoren	x
1. Einleitung	1
1.1 Bedeutung und Quellen natürlichen organischen Materials	1
1.2 Zusammensetzung des gelösten organischen Materials.....	2
1.3 Festphasenextraktion.....	3
1.4 Fluoreszenzverhalten des gelösten organischen Materials	4
1.5 Forschungsziele.....	5
2. Material und Methoden	6
2.1 Probenahme und -vorbereitung.....	6
2.2 Festphasenextraktion mit Echtzeit-Fluoreszenzmessungen.....	8
2.2.1 Extraktion der Ästuar-, Meeres- und Flussprobe	9
2.2.2 Fluoreszenzmessungen mit Hafenwasserproben.....	10
2.2.3 Einfluss unterschiedlicher Salzgehalte auf Flusswasser	10
2.3 Gelöster organischer Kohlenstoff und Stickstoff.....	11
2.4 UV/VIS-Spektralphotometrie	11
2.5 Hochdruckflüssigkeitschromatographie.....	12
2.5.1 Umkehrphasenchromatographie – Methanolextrakte (Aminosäureanalytik)	12
2.5.2 Umkehrphasenchromatographie – Acetonitrilextrakte	13
2.5.3 Umkehrphasenchromatographie – Methanolextrakte (Polaritätsverteilung).....	14
2.5.4 Größenausschlusschromatographie – Methanolextrakte.....	15
2.6 Statistische Auswertungsmethoden.....	15
3. Ergebnisse	16
3.1 Einfluss des Probenvolumens auf die Extraktion des organischen Materials	16
3.1.1 Extraktionseffizienz	16
3.1.2 Aminosäureverteilung.....	18
3.1.3 Polaritätsverteilung des organischen Materials.....	20
3.2 Spektrale Eigenschaften des organischen Materials	21
3.2.1 Fluoreszenzverhalten	21
3.2.2 Extinktionseigenschaften	25
3.3 Alternatives Elutionsmittel	26
3.4 Einfluss von Salz auf die Extraktion gelösten organischen Materials	28

4. Diskussion	31
4.1 Einfluss des Probenvolumens auf die Extraktion des organischen Materials	31
4.2 Spektrale Eigenschaften des organischen Materials	34
4.3 Einfluss von Salz auf die Extraktion gelösten organischen Materials	35
5. Zusammenfassung und Ausblick	37
6. Quellen	39
Abbildungsverzeichnis	44
Tabellenverzeichnis.....	45
Anhang	46

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
CDOM	Chromophores DOM (englisch: Chromophoric DOM)
DAD	Diodenarray-Detektor
DOC	Gelöster organischer Kohlenstoff (englisch: dissolved organic carbon)
DOM	Gelöstes organisches Material (englisch: dissolved organic matter)
FDOM	Fluoreszierendes DOM (englisch: Fluorescent DOM)
FT-ICR-MS	Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie (englisch: fourier transform ion cyclotron mass spectrometry)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (englisch: high pressure liquid chromatography)
Kap.	Kapitel
ME	Mercaptoethanol
NaCl	Natriumchlorid
NOM	Natürliches organisches Material (englisch: natural organic matter)
OPA	Orthophtal-Aldehyd
RP18	Umkehrphase mit C18-Seitenketten (englisch: reversed-phase)
SEC	Größenausschlusschromatographie (englisch: size-exclusion chromatography)
SPE	Festphasenextraktion (englisch: solid phase extraction)
Tab.	Tabelle
TDN	Gelöster Gesamtstickstoff (englisch: total dissolved nitrogen)
UV	Ultraviolett
VIS	Licht im sichtbaren Bereich (englisch: visible)

Einheiten

Ω	Ohm
M	„Molar“ (1 M = 1 mol/L)
mol	Stoffmenge
g	Gramm
h	Stunde
psu	Practical salinity units
L	Liter
Da	Dalton
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
min	Minute
Å	Ångström (0,1 nm)
AU	Absorptionseinheit
LU / counts	relative Fluoreszenz
W	Watt

Faktoren

M	Mega	10^6
m	Milli	10^{-3}
μ	Micro	10^{-6}
n	Nano	10^{-9}
ppb	Parts per billion	10^{-9}

1. Einleitung

1.1 Bedeutung und Quellen natürlichen organischen Materials

Natürliches organisches Material (NOM) ist in allen aquatischen Systemen präsent. Es besteht aus einem komplexen und heterogenen Gemisch von Huminsäuren, Fulvinsäuren, Kohlenhydraten, Proteinen und weiteren organischen Substanzklassen und stellt die Hauptfraktion gelöster organischer Substanzen (DOM) dar (Nystrom et al., 1996, Yuan und Zydney, 1999). Diese resultieren aus dem Abbau pflanzlicher und mikrobieller Stoffe (Hedges und Keil, 1995, Cory et al., 2010). Der Anteil von gelöstem organischem Kohlenstoff (DOC) an DOM wird mit ca. 50 % beziffert (Millero, 1996). Dabei wird zum gelösten Anteil alles gezählt, das kleiner als 0,45 µm ist. DOM hat eine große Bedeutung für das Verständnis der globalen biochemischen Stoffkreisläufe von Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphor (Francko und Heath, 1982, Bushaw et al., 1996). Dabei dient DOM als Substrat für Mikroorganismen, welche durch den Abbau des organischen Materials wiederum Stoffe freisetzen. Von allen Eigenschaften, die bezüglich gelöster organischer Substanzen analysiert werden, ist die Polarität von großer Bedeutung, da bestimmte Prozesse in direkter Abhängigkeit mit der Polaritätsverteilung stehen (Philibert et al., 2008). Beispielsweise können Huminstoffe mit ihrer Oberfläche, durch die Ausbildung von Zentren unterschiedlicher Polarität, organische sowie anorganische Komponenten des Wassers binden. Hydrophobe Zentren haben die Fähigkeit Verbindungen wie polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe zu fixieren, während Ionen von Schwermetallen an Carboxyl-Gruppen adsorbieren (Xue und Sigg, 1999, Peuravuori et al., 2002, Sakkas et al., 2002).

Die Hauptquelle organischer Stoffe im Meerwasser sind Substanzen, die infolge der Primärproduktion von Makroalgen, Phytoplankton sowie photosynthetischer Bakterien gebildet werden. Diese Stoffe werden durch Abscheidungen (Exsudate) während des Wachstums (Hellebust, 1974), durch die virale Zellyse oder die mikrobielle Mineralisierung abgestorbener Zellen verfügbar (Ramsay, 1974). Weitere heterotrophe Aktivitäten haben eine Freisetzung neuen gelösten organischen Materials in das Ökosystem zur Folge. Einen Einfluss auf die Zusammensetzung des organischen Materials in küstennahen Gewässern haben, neben der Primärproduktion, sowohl der DOM-Eintrag vom Festland über die Flüsse als auch die Resuspension des Sediments, infolge einer tideninduzierten Aufwirbelung. Im Gegensatz dazu beeinflussen größtenteils terrestrisch-organische Substanzen, die über Pflanzen oder Erde ins Wasser gelangen, die Komposition von Flusswasser. Dabei wird zwischen organischen Substanzen, welche an Land (allochthon) oder im Wasser (autochthon) produziert wurden, differenziert.

1.2 Zusammensetzung des gelösten organischen Materials

Die Bestandteile des DOMs können unter Einbezug der chemischen Eigenschaften in zwei Gruppen unterteilt werden. Circa 15 – 30 % des DOMs können chemisch charakterisiert werden. Identifizierbare Substanzen sind Aminosäuren, Kohlenhydrate, Fettsäuren oder Phenole (Leenheer, 1981, Williams und Druffel, 1988). Freie und verknüpfte Aminosäuren, wie Polypeptide oder Proteine, stellen die wichtigste Gruppe des charakterisierten organischen Stickstoffs dar. Deswegen kann eine Charakterisierung der Aminosäurezusammensetzung wertvolle Einblicke liefern, wo das extrahierte, organische Material seinen Ursprung hat und wie frisch und reaktiv es noch ist (Spitzzy und Ittekkot, 1991, Dauwe und Middelburg, 1998, Dauwe et al., 1999).

Der restliche Teil des DOMs besteht aus chemisch uncharakterisierbaren Substanzen wie den Huminstoffen. Diese Substanzklasse besteht aus Stoffen wie den Huminen und den Humin- und Fulvinsäuren. Fulvinsäuren sind durch ein relativ niedriges Molekulargewicht und einer hohen Anzahl funktioneller Gruppen (Hydroxyl- und Carboxylgruppen) gekennzeichnet, welche sie unabhängig vom pH-Wert wasserlöslich machen (Peuravuori und Pihlaja, 1998, Kim et al., 2006). Darüber hinaus sind sie gegen mikrobiellen und abiotischen Abbau beständig und zeigen eine große Mobilität im Wasser (Kirkpatrick et al., 2003). Demgegenüber sind Huminsäuren wasserunlöslich und können nur unter alkalischen Bedingungen in Lösung gebracht werden. Sie haben mit 2 – 300 kDa ein höheres Molekulargewicht als die Fulvinsäuren (1,5 – 5 kDa) und sind aufgrund einer größeren Anzahl von aromatischen Ringen hydrophober (Shin et al., 1999, McDonald et al., 2004). Die Molekülstruktur und -größe von Huminsäuren wird sowohl von dem pH-Wert und der Ionenstärke der Lösung als auch durch die Anwesenheit von Metallionen beeinflusst (Glazewski und Wójcik, 2009). Humine sind wasserunlösliche Substanzen, die aus der Zersetzung von Pflanzenmaterial entstehen, und machen nur einen kleinen Anteil der vorkommenden Huminstoffe aus. Die Gruppe der Huminstoffe stellt nur noch schwer abbaubare katabolische Endprodukte organischen Materials dar (Skopintsev 1981). Es kann keine einheitliche Strukturformel angegeben werden, da die chemische Zusammensetzung der Huminstoffe sehr variabel ist und überwiegend von Herkunft der Substanzen und den Bedingungen der Abbauprozesse abhängt.

1.3 Festphasenextraktion

Zum Zweck einer genaueren Analyse der gelösten organischen Substanzen ist der Einsatz einer Methode erforderlich, welche die gewünschten Analyten effizient aufkonzentriert und sie dabei von Störkomponenten wie Salzen befreit. Da in früheren Versuchen die Flüssig-Flüssig-Extraktion zum Teil zu Emulsionsbildungen und zu einem hohen Lösungsmittelverbrauch führte, wurde die Festphasenextraktion etabliert (Aiken et al., 1979). Bei diesem Verfahren werden die Analyten aus einer Wasserprobe angereichert, indem die Probe durch ein Sorbens geleitet wird. Dabei passiert das Wasser das Sorbens, während die organischen Substanzen durch Wechselwirkungen mit dem Sorbensbett zurückgehalten werden. Die Verwendung gepackter Kartuschen bietet eine robuste Methode, die aufgrund einer leichten Handhabung und eines geringen Gerätebedarfs auch direkt im Feld anwendbar ist (Dittmar et al., 2008).

Als Sorbensmaterial stehen viele Phasen unterschiedlicher Selektivität zur Verfügung. Es gibt zum einen Sorbenzien auf Silicatbasis, die durch Modifizierungen mit funktionellen Gruppen polarere (Cyano- oder Aminogruppen) oder unpolare (Ethyl- oder Octadecylgruppen) Eigenschaften erhalten. Zum anderen existieren Polymerphasen wie Polystyrol-Divinylbenzol, welche relativ unselektiv organisches Material anreichern können. Polymersorbenzien werden nicht nur häufiger verwendet, sondern sind auch flexibler einsetzbar als Silicatphasen. Sie besitzen neben einer größeren Oberfläche auch einen breiteren pH-Wert Bereich, in welchem sie stabil sind (León-González und Pérez-Arribas, 2000).

Nach der Extraktion können die angereicherten Substanzen durch den Einsatz eines geeigneten Lösungsmittels vom Sorbens gelöst werden. Bei der Elution muss ein Lösungsmittel Anwendung finden, in dem alle Analyten lösbar sind und das die Fähigkeit besitzt sowohl polare als auch unpolare Substanzen vom Sorbens herunterzulösen. Es besteht die Möglichkeit durch den Einsatz von Lösungsmitteln unterschiedlicher Elutionskraft die Analyten schon bei der Elution abhängig von der Polarität in Fraktionen aufzutrennen. Die Gesamtheit der eluierten Substanzen wird als festphasenextrahierbares, gelöstes organisches Material bezeichnet (SPE-DOM).

1.4 Fluoreszenzverhalten des gelösten organischen Materials

Die Fluoreszenz einer Fraktion des natürlichen organischen Materials ist ein sehr sensitives Merkmal, welches eine zerstörungsfreie Untersuchung von Wasserproben ermöglicht. Aus diesem Grund wäre es wünschenswert, wenn diese Eigenschaft zur Untersuchung von Trends und dem Verhalten von beispielsweise Huminstoffen, welche ein wichtiger Bestandteil des aquatischen, natürlich-organischem Material sind, eingesetzt werden könnte (Beck et al., 1974, Alberts und Takács, 2004). Seit den Untersuchungen von Kalle (1949) wird immer wieder versucht die physikochemischen Eigenschaften des DOMs in der Wassersäule mittels optischer Messungen der Absorption oder Fluoreszenz zu erfassen. Die dominierende Fraktion der Huminstoffe im DOM sind die Fulvinsäuren, welche im Vergleich zu den Huminsäuren im Verhältnis 9:1 vorkommen (Malcolm, 1985). Die Molekülstruktur der Fulvinsäuren enthält neben Carboxyl- und Phenolgruppen auch Fluorophore wie Chromon- oder Xanthonderivate (Senesi, 1990; Leenheer and Croue, 2003). In natürlichen Gewässern sind fulvinsäure- und protein-ähnliche Substanzen die Hauptkomponenten der fluoreszierenden gelöst-organischen Substanzen (FDOM) (Senesi, 1990, Coble, 1996).

Zur Charakterisierung des Fluoreszenzverhaltens organischer Substanzen, wurden Anregungs-Emissions-Matrizen von kommerziellen Standards und reellen Proben mittels Fluoreszenzspektroskopie erstellt (Coble, 1996, Pingqing et al., 2004, Fellman et al., 2009). Infolgedessen kann zwischen verschiedenen Fluorophorkategorien differenziert werden: huminstoff-ähnlich und protein-ähnlich (Chen et al., 2003). Während die protein-ähnlichen Fluorophore ausschließlich mit UV-Licht (240 – 280 nm) angeregt werden können, liegen die Anregungswellenlängen der unterschiedlichen huminstoff-ähnlichen Fluorophore in einem breiteren Bereich von 260 – 440 nm (Coble, 1996, Wu und Tanoue, 2001, Wu et al., 2001, Baker, 2001, Leenheer und Croue, 2003). Huminstoff-ähnliche Fluorophore emittieren vor allem im violett bis grünen Wellenlängenbereich (400 – 500 nm), was durch die Anwesenheit chinonartiger Strukturen verursacht wird. Diese Strukturen entstehen beim Abbau von terrestrischem Biomaterial wie Lignin (Ariese et al., 2004, Cory und McKnight, 2005). Im Gegensatz dazu emittieren protein-ähnliche Fluorophore im UV-nahen Bereich bei 300 – 380 nm. Diese Kenntnisse können dafür genutzt werden, um Wasserproben unterschiedlicher Herkunft auf Grundlage der Fluoreszenzeigenschaften zu differenzieren. Des Weiteren belegen Versuche von Smart (1976) und Downing et al. (2009), dass vermutlich eine Beziehung zwischen der Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs und der Fluoreszenzintensität des gelösten organischen Materials existiert.

1.5 Forschungsziele

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, Kenntnisse darüber zu gewinnen, ob ein variables Anreicherungs-volumen Auswirkungen auf die Extraktion organischer Stoffe mittels Festphasenextraktion hat. Im Mittelpunkt stand hauptsächlich der Einfluss auf die Extraktionseffizienz gelösten organischen Kohlenstoffs sowie auf die Aminosäure- und Polaritätsverteilung in den angereicherten Extrakten. Zu diesem Zweck wurden drei Wasserproben (Ästuar-, Meer-, Flusswasser) unter Verwendung zweier Extraktionskartuschenarten angereichert. Es wurde ebenfalls untersucht, ob Echtzeit-Fluoreszenzmessungen zur Aufklärung und Beschreibung des Adsorptionsverhaltens der Extraktionskartuschen beitragen und zur direkten Bestimmung der DOC-Konzentration verwendet werden können.

Weitere Fragen waren zum einen, inwiefern der Einsatz weiterer Lösungsmittel zur Elution organischen Materials von den Extraktionskartuschen beiträgt. Zum anderen wurde analysiert, ob unterschiedliche Salzkonzentrationen in Wasserproben einen Einfluss auf die Extraktionseffizienz von PPL-Kartuschen und auf die Größenverteilung der extrahierten organischen Substanzen haben.

2. Material und Methoden

Alle mit der Probe in Kontakt tretenden Gegenstände und Gefäße wurden entweder fünf Stunden lang bei 500 °C geblüht oder mit 10%iger Salzsäure behandelt und anschließend gründlich mit Reinstwasser ausgespült, um Kontaminationen zu vermeiden. Des Weiteren wurde bei Probenahme, Filtration und Extraktion darauf geachtet, dass, zur Benetzung aller Oberflächen, die Probenflaschen sowie Zubehör mit ausreichend Probe vorgespült wurden. Das Reinstwasser, das ebenfalls zum Verdünnen und zur Erstellung von Blindwerten genutzt wurde, hatte eine Leitfähigkeit von 18,2 MΩ und enthielt 4 – 7 ppb organischen Kohlenstoff (Milli-Q-Plus 185, MILLIPORE).

2.1 Probenahme und -vorbereitung

Die Untersuchung basiert auf drei Proben (Abb. 1): Die Proben Nordsee (**P2**) und Wesermündung (**P1**) wurden auf einer Ausfahrt des Forschungskutters „Uthörn“ genommen. Die Probe Weser (**P3**) wurde von einem Fährsteg aus an einer Flussenge der Weser nahe der Stadt Minden entnommen. Zur Gewinnung von frischem Probenmaterial zur weiterführenden Charakterisierung des Extraktionsverhaltens der verwendeten PPL-Extraktionskartuschen (Kap. 2.2.2 und 2.2.3), wurden die Proben **H1** und **H2** aus dem Hafenbecken „Alter Hafen“ bei der Anlegestelle des Forschungskutters „Uthörn“ und die Flussproben **F1** und **F2** an dem gleichen Fähranleger wie **P3** genommen. Die filtrierten Proben (Sartorius GF/F, 13400-142-K) wurden dunkel und kühl gelagert und innerhalb von 2 Tagen extrahiert.

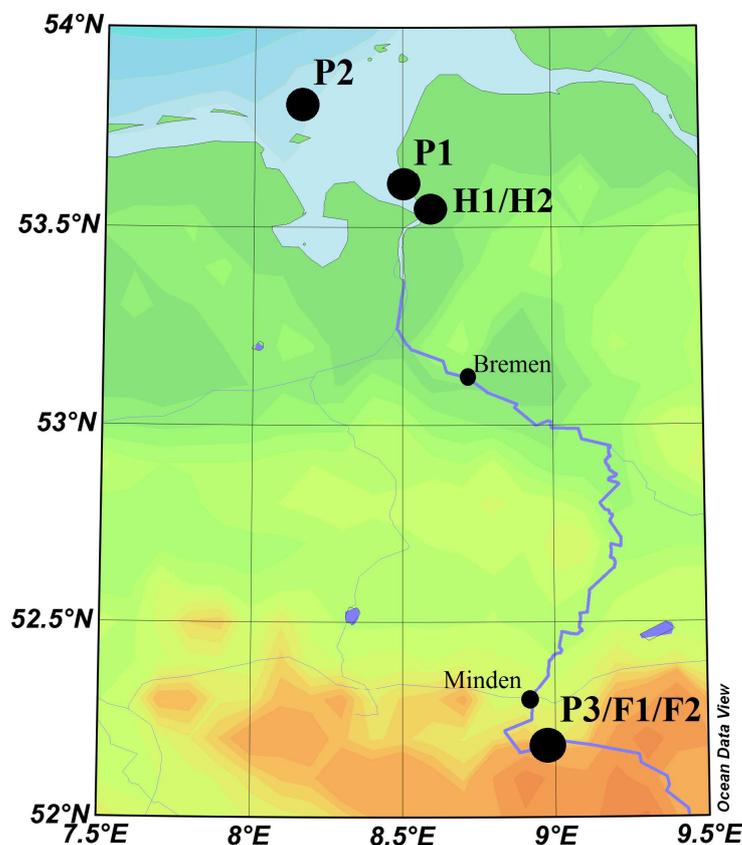


Abb. 1: Probenahmeorte P1-3, H1/H2 und F1/F2.

Tab. 1: Probendetails

Probenname	Zeitpunkt	geographische Position		Salinität [psu]	pH-Wert	Beschreibung
P1	22.05.12 / 9:15	8.502 °E	53.607 °N	13,8	7,90	Ästuar
P2	22.05.12 / 12:10	8.163 °E	53.813 °N	30,2	8,22	Nordsee
P3	26.05.12 / 11:30	8.977 °E	52.183 °N	0,9	8,17	Fluss
H1	27.07.12 / 10:50	8.581 °E	53.533 °N	14,3	8,05	Hafenbecken
H2	22.08.12 / 12:00	8.581 °E	53.533 °N	14,2	8,12	Hafenbecken
F1	02.09.12 / 17:00	8.977 °E	52.183 °N	0,9	6,4	Fluss
F2	23.09.12 / 16:20	8.977 °E	52.183 °N	0,8	7,72	Fluss

Für die Zusammensetzung der Ästuar- und marinen Probe ist die Tide ein wichtiger Faktor (Abb. 2).

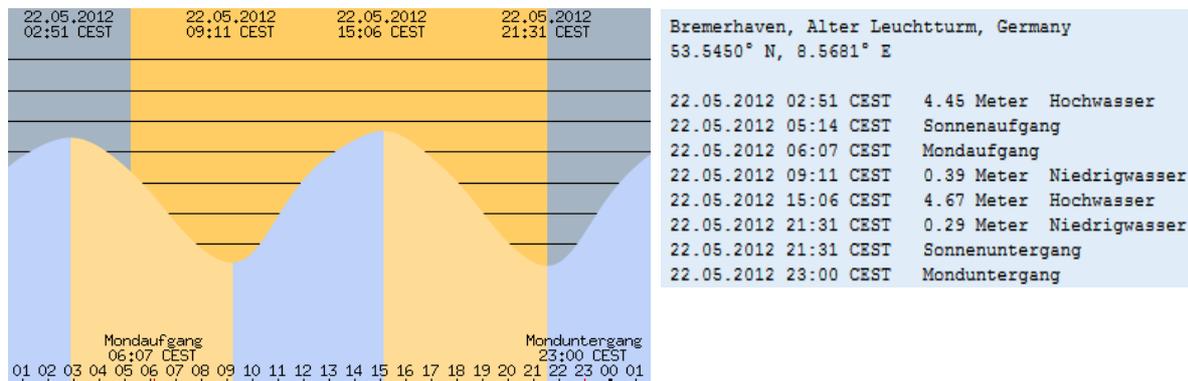


Abb. 2: Tidekurve für den Zeitraum der Probenahme 1 und 2 (gezeiten-kalender.de).

Die Proben **P1** – **P3** wurden unter Verwendung eines Druckfiltrationsgeräts (Sartorius Typ 16275), einer Peristaltikpumpe, eines Vorfilters (Sartorius GF/F, 13400-142-K) und eines Membranfilters (Sartorius Cellulose Acetat Filter, 11107-142-G) filtriert. Bei der Filtration wurden die ersten 500 mL Filtrat aus Gründen der Kontaminationsgefahr durch den Membranfilter verworfen. Die filtrierten Proben wurden in gespülten Glasballons aufbewahrt und bis zur Analyse bei 4 °C dunkel gelagert.

2.2 Festphasenextraktion mit Echtzeit-Fluoreszenzmessungen

Die Extraktion und Anreicherung des organischen Materials aus den Wasserproben erfolgte nach einer modifizierten Version der von Dittmar et al. (2008) entwickelten Methode. Die Festphasenextraktionskartuschen (C8, PPL, Bond Elut, Agilent Technologies) wurden mit zwei Kartuschenfüllungen Methanol (99,9% LiChrosolv®, Merck) gespült und anschließend mit drei Kartuschenfüllungen Reinstwasser, das mit Salzsäure (30% Suprapur, Merck) auf einen pH-Wert von 2 eingestellt wurde, konditioniert. Die Extraktion erfolgte mit Hilfe einer Extraktionshalterung (Visiprep, Supelco).

Tab. 2: Spezifikation der verwendeten Fertigkartuschen

Sorbens	Bond Elut C8	Bond Elut PPL
Seriennummer	12102026	12105005
Kategorie	unpolar	unpolar / elektrostatisch
Gebundene funktionelle Gruppe / Grundmaterial	Octyl / Silicatbasis	funktionalisiertes Styrol- Divinylbenzol
Format	Festbett	Festbett
Sorbensmasse [mg]	200	200
Oberfläche [m ² /g]	500	600
Partikelform, -größe [µm]	unregelmäßig, 40 und 120	sphärisch, 125
Mittlere Porengröße [Å]	60	150

Im Anschluss wurde die Wasserprobe mit Hilfe eines Spritzenaufsatzes und einer Peristaltikpumpe (ISM931C, ISMATEC) durch die Kartusche gepumpt. Der Volumenstrom lag bei ca. 3,0 – 3,1 mL/min und es wurde darauf geachtet, dass die Kartusche nicht trocken lief, damit die gesamte Oberfläche des Festbetts benetzt blieb und zur Extraktion des organischen Materials zur Verfügung stand. Der Kartuschendurchfluss wurde durch eine Durchflussküvette ($V = 750 \mu\text{L}$, 175.050-QS, Hellma) geleitet und während der ganzen Extraktion (ca. 5,5 h) durch den Einsatz von lichtemittierenden Dioden mit Licht der Wellenlängen 365 nm (LLS-LED 2432, Ocean Optics) und 270 nm (LLS-LED 2433, Ocean Optics) angeregt. Das emittierte Fluoreszenzsignal wurde mit einem optischen Glasfaserspektrometer (USB2000, Ocean Optics) gemessen. Die Verarbeitung und Visualisierung der Daten erfolgte mit dem Programm Spectrasuite (Ocean Optics, Tab. 3).

Tab. 3: *spectrasuite*-Parameter der Fluoreszenzmessung

Integrationszeit [s]	2
Scans zur Mittelwertbildung	3
Mittelwertbildung angrenzender Punkte	5
Elektro-Dunkel-Korrektur	deaktiviert
Nichtlinearitätskorrektur	aktiviert
Streulichtkorrektur	aktiviert
Integrationsbereich	420,11 – 700,28 nm
Integrationsmethode	rechteckig

Am Ausgang der Durchflussküvette wurden Proben zur Bestimmung der DOC-Konzentration genommen. Zur vollständigen Entfernung von Salz wurden die Kartuschen am Ende jeder Extraktion mit einer Kartuschenfüllung Reinstwasser pH 2 gespült und anschließend ca. 5 – 10 Minuten mit Stickstoff getrocknet. Die extrahierten organischen Substanzen wurden bei beiden verwendeten Kartuschenarten nacheinander mit 1,5 mL Methanol und 1 mL Acetonitril von dem Sorbens eluiert. Zwischen den Elutionsschritten wurde die Kartusche erneut unter Stickstoffatmosphäre getrocknet. Die Methanol- und Acetonitrilfraktionen wurden bis zur Analyse bei -18 °C gelagert.

Des Weiteren wurden zur Reinheitsprüfung der Kartuschen Blindwerte für die C8- und die PPL-Kartuschen durch die Anreicherung von jeweils 100 mL und 1000 mL Reinstwasser pH 2 erstellt und den gleichen Analysen unterzogen wie die normalen Proben.

2.2.1 Extraktion der Ästuar-, Meeres- und Flussprobe

Die Proben **P1**, **P2** und **P3** wurden in jeweils vier verschiedenen Volumina (100 mL, 250 mL, 500 mL und 1000 mL) und jeweils mit zwei unterschiedlichen Festphasenextraktionskartuschen (C8, PPL) angereichert (Abb. 3).

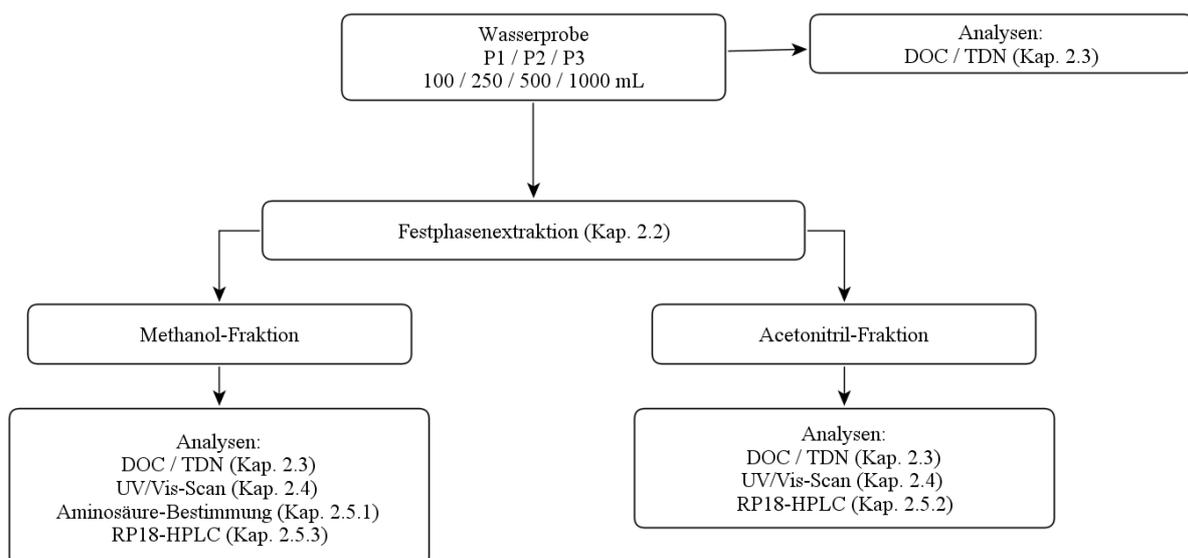


Abb. 3: Probenbehandlung – Ästuar-, Meeres-, Flussprobe.

2.2.2 Fluoreszenzmessungen mit Hafengewasserproben

Zum direkten Nachweis einer Beziehung zwischen der Fluoreszenz und der Konzentration gelösten organischen Kohlenstoffs im Kartuschendurchfluss wurden in kurzen Zeitintervallen Proben des Kartuschendurchflusses genommen. Von der Hafengewasserprobe **H1** wurden insgesamt 900 mL Probe angereichert (PPL) und es wurde alle 30 Minuten eine Probe zur Bestimmung der DOC-Konzentration genommen. Bei der Anreicherung (PPL) von 100 mL der Probe **H2** wurde der gesamte Durchfluss in Fraktionen von je 7,4 mL in gegliederten Glasröhrchen aufgefangen und die DOC-Konzentration bestimmt.

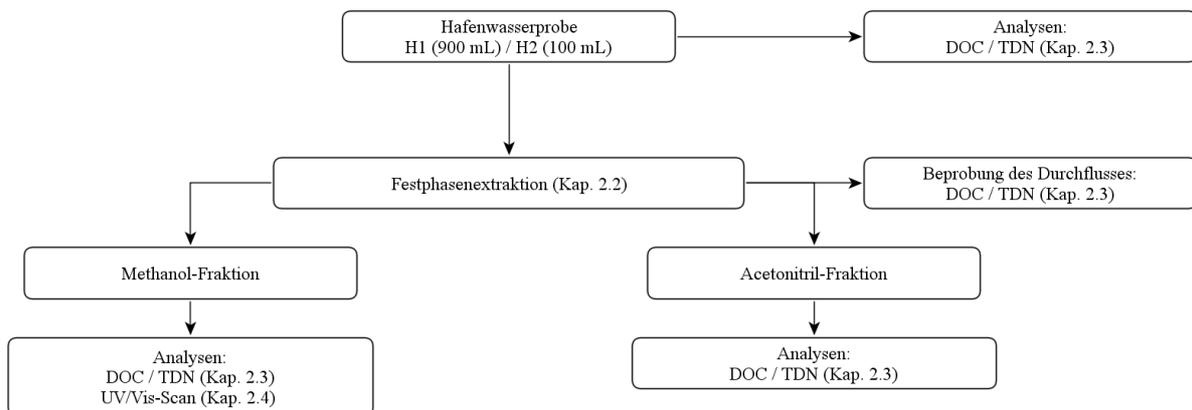


Abb. 4: Probenbehandlung – Hafengewasserproben.

2.2.3 Einfluss unterschiedlicher Salzgehalte auf Flusswasser

Um beurteilen zu können in welchem Maße Salz einen Einfluss auf die Extraktion hat, wurden salzarme Flussproben mit definierten Mengen Natriumchlorid (5 Stunden bei 500 °C gegliedert) versetzt und mit PPL-Kartuschen angereichert. Es wurden jeweils 150 mL Probe extrahiert und die Salzgehalte wurden so gewählt, dass die Konzentration innerhalb der fünf Ansätze kontinuierlich von 0 g/L hin zu 35 g/L Natriumchlorid ansteigt (Tab. 4).

Tab. 4: Parameter nach Salzzugabe

Zugesetzte Menge Natriumchlorid [g/L]	Probe F1 / F2 Salinität [psu]
0	0,9 / 0,8
8,75	9,5 / 9,4
17,5	18,1 / 18
26,25	26,7 / 26,6
35	35,3 / 35,2

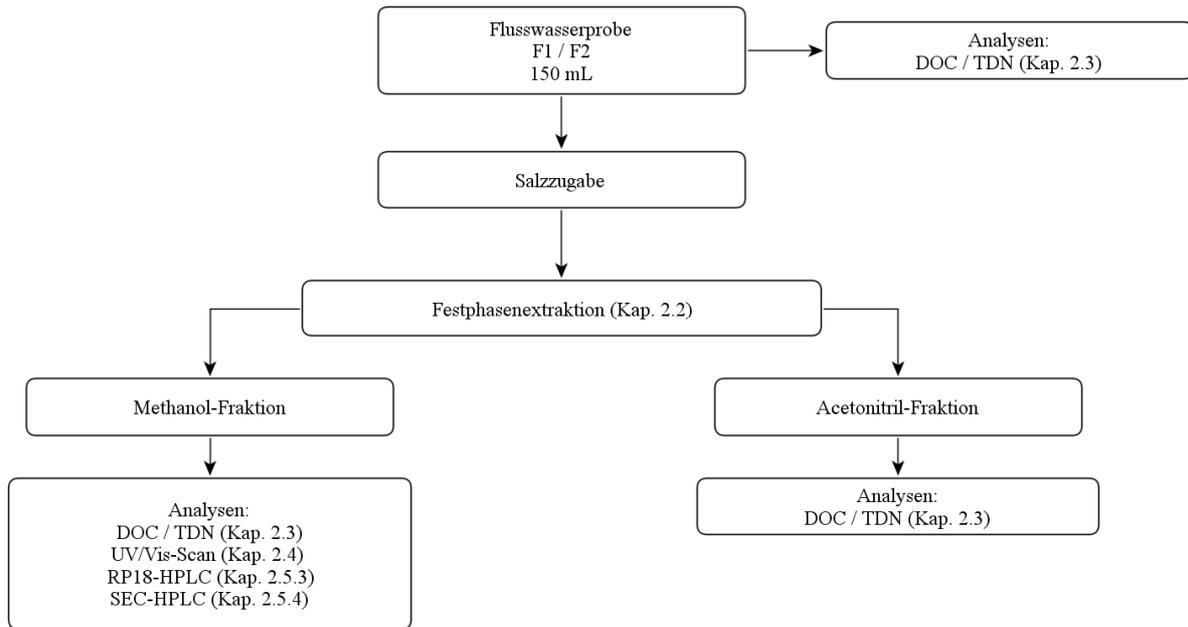


Abb. 5: Probenbehandlung – Flusswasserproben mit Salz.

2.3 Gelöster organischer Kohlenstoff und Stickstoff

Gelöster organischer Kohlenstoff und Gesamtstickstoff wurde mittels hochtemperaturkatalytischer Oxidation und nicht dispersiver Infrarotspektroskopie bzw. per Chemilumineszenz-Methode ermittelt ($\text{TOC-V}_{\text{CPN}}$, SHIMADZU). Zu messende Wasserproben wurden direkt in mit Reinstwasser gespülten Glasröhrchen abgefüllt und in den Autosampler (ASI-V, SHIMADZU) gestellt.

Die DOC- und TDN-Konzentrationen der Methanol- und Acetonitrilfraktionen wurden bestimmt, indem 50 μL des Extrakts in ein geglühtes Autosampler-Röhrchen pipettiert, mittels Stickstoff abgedampft und in 7 mL Reinstwasser aufgenommen wurden. Um sicher zu gehen, dass sich die extrahierten organischen Substanzen in dem Reinstwasser lösen und nicht an der Gefäßwand angelagert bleiben, wurden die Proben vor der Analyse im Vortex 15 Sekunden geschüttelt und im Ultraschallbads (5 Min. / 240 W) behandelt. Stets mitgeführte Laborstandards, kommerzielle Standards (Deep Sea Reference, Batch 11) und Blindwerte dienten als Qualitäts- und Leistungsmerkmal für die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der ermittelten Daten.

2.4 UV/VIS-Spektralphotometrie

Die Extinktion der Festphasenextrakte wurde mit einem Spektralphotometer (UV1, Thermo Scientific; Software: VISION Lite™ 2.2) im Wellenlängenbereich von 205 – 700 nm bei einer Messgeschwindigkeit von 200 nm/min bestimmt. Die 1:100 verdünnten Methanol- und 1:10 verdünnten Acetonitrilfraktionen wurden in einer Quarzküvette der Firma Agilent Technologies (5061-3387, Schichtdicke: 10 mm) vermessen.

2.5 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

2.5.1 Umkehrphasenchromatographie – Methanolextrakte (Aminosäureanalytik)

Eine einfache und hochempfindliche HPLC-Methode, die eine Vorsäulenderivatisierung zur Generierung hydrophober und fluoreszierender Aminosäurederivate und eine anschließende chromatographische Auftrennung beinhaltet, wurde für die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der Methanolextrakte angewendet.

Zur Probenaufbereitung wurden 20 µL der Extrakte in Glasampullen eingedampft, in 400 µL 4,5 M Salzsäure aufgenommen und luftdicht verschlossen für 24 Stunden bei 110 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Ampullen geöffnet, sodass die Flüssigkeit bei 70 °C langsam verdampfen konnte. Zum Neutralisieren wurden jeweils 200 µL Reinstwasser auf das eingetrocknete Hydrolysat gegeben und erneut bei 70 °C verdampft, bevor die freigesetzten Aminosäuren in 400 µL eines Boratpuffers (30,91 g Borsäure in 1 L Natriumhydroxid (32%, Merck) aufgenommen und zur Analyse in 2 mL HPLC-Vials überführt wurden.

Tab. 5: Grundeinheiten der Aminosäure-HPLC; *: DAD-Detektor wurde nur für die Untersuchung der Acetonitrilextrakte verwendet (siehe Kap. 2.5.2)

HPLC-Komponente	Hersteller / Modell
Pumpe	Agilent Technologies 1200 Series G1312A
Autosampler	Agilent Technologies 1200 Series G1329A
Säulenofen	Agilent Technologies 1260 Infinity G1316A
Detektoren	Agilent Technologies 1260 Infinity G1315D* Agilent Technologies 1200 Series G1321A

Über den Autosampler wurden 20 µL der hydrolysierten Probe in der Injektionsnadel mit 3 µL eines Orthophtal-Aldehyd/Mercaptoethanol-Gemisches (26 µL OPA / mL ME) zwei Minuten lang derivatisiert und anschließend injiziert. Zur Auftrennung der derivatisierten Aminosäuren wurde eine auf 32 °C temperierte C18-Umkehrphasensäule (Kinetex 2.6u 100Å, 150 x 4,6 mm, Phenomenex) als stationäre Phase verwendet. Die mobile Phase bestand aus zwei Eluenten; Natriumacetat-Puffer (3,4 g/L pH 6,0, Merck) und Acetonitril (LiChrosolv®, Merck), deren Gradientenprogramm in der folgenden Tabelle aufgeführt ist (Tab. 6).

Tab. 6: Gradientenprogramm der Aminosäureanalytik

Zeit [min]	Natriumacetat [%]	Acetonitril [%]	Volumenstrom [mL/min]
0	92	8	0,7
10	90	10	0,7
60	66	34	0,7
65	0	100	0,7
67	0	100	0,7
74	92	8	0,7
76	92	8	0,7

Die derivatisierten Aminosäuren wurden mittels Fluoreszenzdetektor bei einer Wellenlänge von 330 nm angeregt, bei 445 nm detektiert und unter der Verwendung von Aminosäurestandards (Agilent Technologies: 5061-3333) und der Software ‚EZChrom Elite‘ analysiert. Die Aminosäuren Asparagin/Asparaginsäure und Glutamin/Glutaminsäure wurden dabei als Summenparameter Asx und Glx zusammengefasst, da die Bildung der korrespondierenden Säure infolge der sauren Hydrolyse begünstigt wird.

2.5.2 Umkehrphasenchromatographie – Acetonitrilextrakte

Zur Charakterisierung der Acetonitrilextrakte wurde die Methode der Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie eingesetzt, wobei das in Tab. 5 beschriebene HPLC-System, die gleiche Säule und die gleichen Laufmittel, welche zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung benutzt wurden (Kap. 2.5.1), Anwendung fanden. Lediglich das Gradientenprogramm wurde für die Analyse angepasst (Tab. 7).

Tab. 7: Gradientenprogramm der RP18-HPLC (Acetonitril)

Zeit [min]	Natriumacetat [%]	Acetonitril [%]	Volumenstrom [mL/min]
0	95	5	0,2
6	95	5	0,2
30	0	100	0,6
45	0	100	0,6
55	95	5	0,6
60	95	5	0,6
67	95	5	0,2

Nach der Injektion von 10 µL des Extrakts, wurden die in der Säule aufgetrennten Probenmoleküle anhand ihrer optischen Eigenschaften mit dem Fluoreszenzdetektor (Anregung: 260 nm; Emission: 350 / 430 / 460 nm) und dem Diodenarray-Detektor mit den Spuren 210 / 230 / 250 / 254 / 280 nm erfasst.

2.5.3 Umkehrphasenchromatographie – Methanolextrakte (Polaritätsverteilung)

Für die Größenausschluss- und Umkehrphasenchromatographie der Methanolextrakte wurde das in Tab. 8 beschriebene HPLC-System verwendet.

Tab. 8: Grundeinheiten der HPLC

HPLC-Komponente	Hersteller / Seriennummer
System	Hitachi Organizer
Pumpe	Hitachi L-2130
Säulenofen	Hitachi L-2300
Autosampler	Hitachi L-2200
Detektoren	Hitachi Diode Array Detector L-2485 Hitachi Fluorescence Detector L-2485

Jeweils 5 µL der Methanolextrakte wurden injiziert (Trennsäule PLRP-S 3u 300Å, 150 x 2,1 mm, Agilent Technologies; Laufmittel: Reinstwasser pH 7,0 und Methanol), wobei die extrahierten organischen Substanzen durch den Einsatz eines Gradientenprogramms (Tab. 9) aufgrund ihrer Polarität aufgetrennt wurden.

Tab. 9: Gradientenprogramm der RP18-HPLC (Methanol); *der Phosphat-Puffer wurde nur bei der Auftrennung der Flusswasserproben, die mit Salz versetzt wurden, eingesetzt

Zeit [min]	Reinstwasser pH 7 / Phosphat-Puffer* [%]	Methanol [%]	Volumenstrom [mL/min]
0	99	1	0,2
1	99	1	0,2
10	0	100	0,4
20	0	100	0,4
30	99	1	0,4
50	99	1	0,3
55	99	1	0,2

Am Ende der Trennsäule wurden die separierten Substanzen mittels Fluoreszenzdetektor (Anregung: 260 nm, Emission: 430 nm) und Diodenarray-Detektor (Wellenlängenbereich 200 – 500 nm) optisch charakterisiert.

Die Extrakte, die aus der Anreicherung der mit Salz versetzten Flussproben resultierten (Kap. 2.2.3), wurden ebenfalls mit Phosphat-Puffer (1,5 g/L Di-natriumhydrogenphosphat, 2,5 g/L Kaliumdihydrogenphosphat) als polares Laufmittel statt Reinstwasser pH 7 analysiert, um den Einfluss der Ionenstärke des Laufmittels auf die Auftrennung im polar-organischen Bereich zu verfolgen.

2.5.4 Größenausschlusschromatographie – Methanolextrakte

Ausschließlich die Extrakte der Flussproben, die mit Salz versetzt wurden, wurden mittels Größenausschlusschromatographie analysiert. Dazu wurden 10 µL Extrakt isokratisch mit Reinstwasser pH 7 als Laufmittel bei einem Volumenstrom von 0,45 mL/min durch die Säule (PolySep-GFC-P 1000, 300 x 7,8 mm, Phenomenex) gepumpt und mit den gleichen Detektorparametern wie im vorherigen Kapitel 2.5.3 detektiert. Des Weiteren wurde auch diese Analyse zum einen mit Reinstwasser pH 7 und zum anderen mit Phosphat-Puffer durchgeführt.

2.6 Statistische Auswertungsmethoden

Die Aminosäurezusammensetzungen von den Methanolextrakten wurden mittels Clusteranalyse und Hauptkomponentenanalyse ausgewertet. Die Clusteranalyse wurde zur Ermittlung von Gruppen (Clustern) innerhalb der Daten verwendet, welche die gleichen Ähnlich- und Unähnlichkeiten aufwiesen. Durch die Anwendung der Hauptkomponentenanalyse konnten die umfangreichen Datensätze strukturiert und veranschaulicht werden, indem versucht wurde, alle Ausgangsvariablen mit Hilfe von wenigen und aussagekräftigen Variablen zu beschreiben.

Beide Verfahren wurden unter Einsatz des Programms PRIMER 6 zur Analyse und Darstellung der Aminosäurezusammensetzungen von den Methanolextrakten (**P1**, **P2**, **P3**) angewendet (Kap. 4.1). Die relativen Aminosäurezusammensetzungen der Methanolextrakte wurden dabei mittels Ähnlichkeitsmatrizen (S17 Bray-Curtis similarity), die auf dem Bray-Curtis Ähnlichkeitskoeffizienten basieren, vergleichend analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss des Probenvolumens auf die Extraktion des organischen Materials

Um die Frage zu klären, ob das angereicherte Probenvolumen einen Einfluss auf die Effizienz der Extraktion organischer Substanzen hat (speziell auf Aminosäuren, sowie auf das Polaritätsprofil der jeweiligen Probe) wurden definierte Volumina dreier Proben unterschiedlicher Herkunft und Zusammensetzung (Kapitel 2.2.1) mit den Kartuschen ‚Bond Elut PPL‘ und ‚Bond Elut C8‘ angereichert. In Tabelle 10 sind die DOC-Konzentrationen sowie die C/N-Verhältnisse der Originalproben aufgelistet.

Tab. 10: DOC-Konzentration und C/N-Verhältnis der Originalproben

Probe	DOC-Konzentration [μM]	C/N-Verhältnis
Ästuar (P1)	302	2,6
Meer (P2)	148	7,2
Fluss (P3)	267	1,8

3.1.1 Extraktionseffizienz

Die Extraktionseffizienzen wurden durch das Verhältnis der DOC-Konzentrationen des Methanolextraktes und der Originalprobe unter Berücksichtigung des Anreicherungs-faktors während der Extraktion und des Verdünnungsfaktors bei der Lösung des Extraktes in Reinstwasser errechnet.

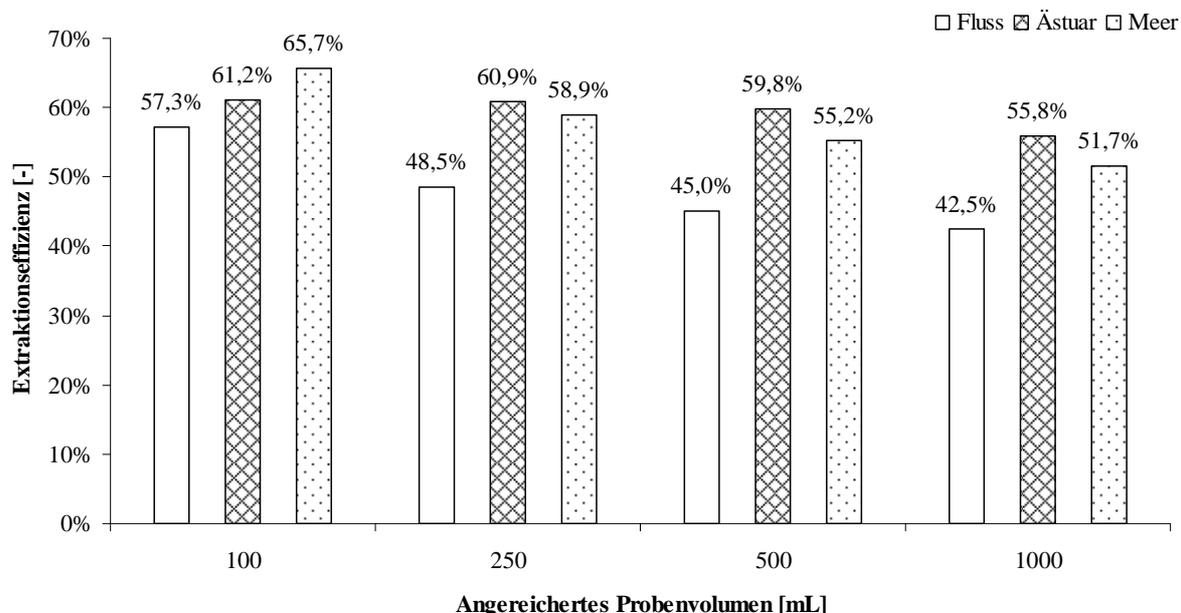


Abb. 6: Extraktionseffizienzen der Festphasenextraktion unterschiedlicher Volumina dreier Proben (Ästuar-, Meeres- und Flussprobe) unter Einsatz von PPL-Kartuschen.

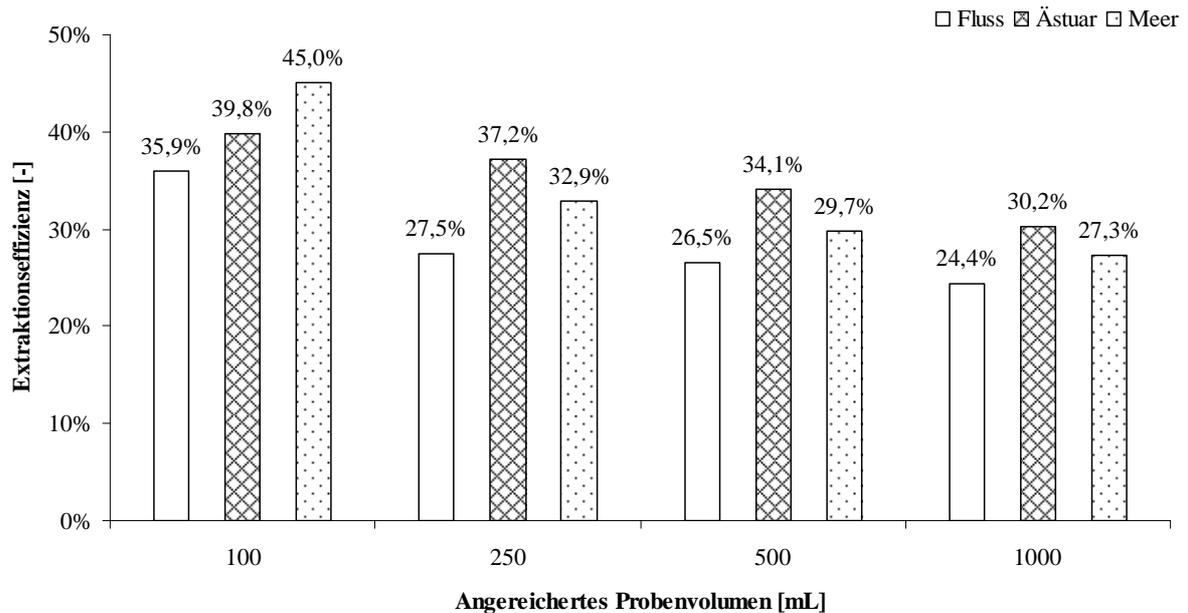


Abb. 7: Extraktionseffizienzen der Festphasenextraktion unterschiedlicher Volumina dreier Proben (Ästuar-, Meeres- und Flussprobe) unter Einsatz von C8-Kartuschen.

Die Ergebnisse zeigten bei beiden Kartuschenarten sowie bei den drei unterschiedlichen Wasserproben die Tendenz, dass die Extraktionseffizienz mit zunehmendem Probenvolumen sinkt. Die Effizienz der Ästuarprobe, welche mit PPL-Kartuschen angereichert wurde, ist bei steigendem Anreicherungs-volumen am stabilsten geblieben und nur um maximal 5 % gesunken. Dahingegen sind die Effizienzen der übrigen Proben mit Erhöhung des Anreicherungs-volumens im Maximum um 9 – 17 % gefallen (Abb. 6 und 7). Um die Abnahme der Effektivität im Verlauf einer Extraktion besser aufklären zu können, wurde ein Online-Monitoring der Fluoreszenzintensität des Kartuschendurchflusses durchgeführt (Kapitel 3.2.1).



Abb. 8: Elution des SPE-DOMs (Probe P3) von PPL-Kartuschen mit Methanol; sortiert nach ansteigendem Anreicherungs-volumen (von links 100 mL bis rechts 1000 mL).

Im direkten Vergleich reicherten die C8-Festphasenextraktionskartuschen organische Substanzen um circa 35 – 50 % schlechter an, als PPL-Kartuschen. Die Abnahme der Extraktionseffizienz bei steigendem Probenvolumen spiegelte sich ebenso in der Abnahme der festphasenextrahierbaren Menge an gelösten organischen Kohlenstoffs (SPE-DOC) pro extrahierten Milliliter Probe wider (Abb. 9).

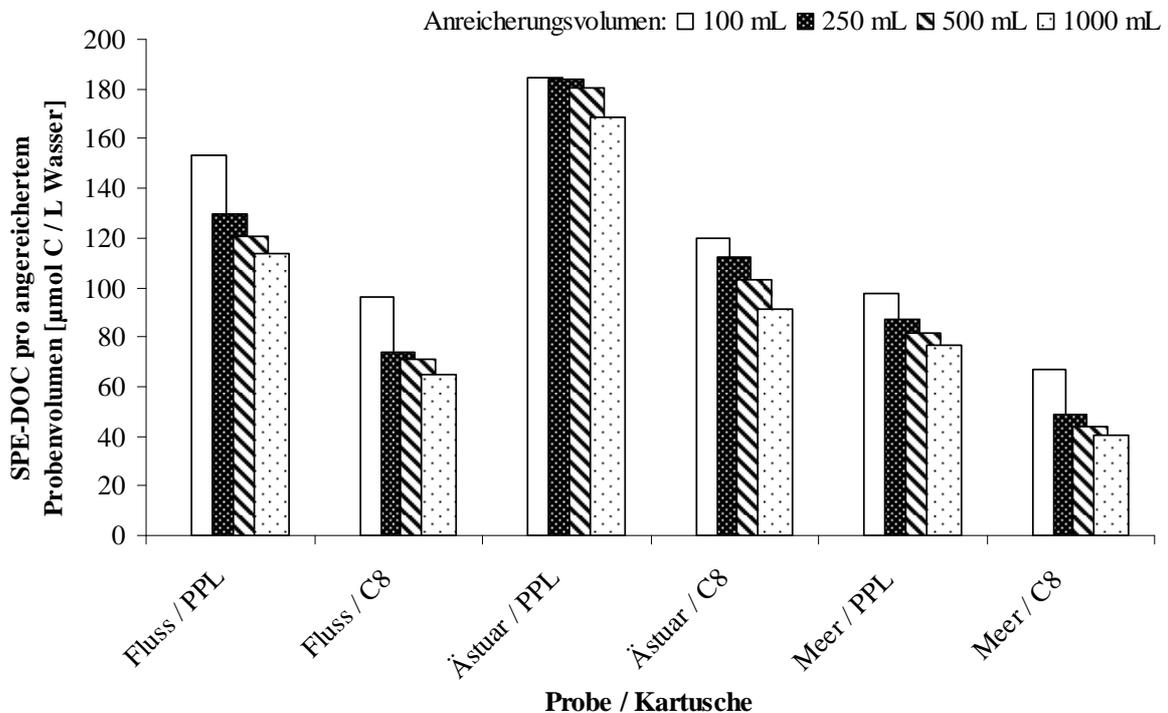


Abb. 9: Festphasenextrahierbare gelöste organische Kohlenstoffmenge bezogen auf das Anreicherungs-volumen der mittels C8- und PPL-Kartuschen angereicherten Ästuar-, Meeres- und Flussprobe.

3.1.2 Aminosäureverteilung

Da bei der Extraktion im Allgemeinen die Gewinnung repräsentativer Proben von hoher Priorität ist, stand bei den Untersuchungen bezüglich der Aminosäuren ebenfalls im Fokus, ob die unterschiedlichen Anreicherungs-volumina einen Einfluss auf die Zusammensetzung der extrahierten Gesamtaminosäuren hatten. Mit der Methode zur Aminosäurebestimmung (Kapitel 2.5.1) konnten nach saurer Hydrolyse und der Derivatisierung mit OPA/ME insgesamt 12 Aminosäuren bestimmt werden. Bei der Anreicherung unterschiedlicher Volumina einer Probe, waren keine gravierenden Unterschiede in der Aminosäure-zusammensetzung zu erkennen. Die Anteile der einzelnen Aminosäuren schwankten zwar um ca. 1 – 3 %, jedoch ist kein Trend zu erkennen und davon auszugehen, dass die relative Verteilung der Aminosäuren unabhängig vom Anreicherungs-volumen gleich bleibt (Tab. 11).

Tab. 11: Aminosäureverteilung der Methanolextrakte aller mittels PPL- und C8-Kartuschen angereicherten Proben – Vergleichende Darstellung der Verteilungen im Hinblick auf das verwendete Anreichervolumen, sowie auf die Herkunft der angereicherten Proben und der verwendeten Kartuschenart; P1: Ästuarprobe, P2: Meeresprobe, P3: Flussprobe, Asx: Asparaginsäure/Asparagin, Glx: Glutaminsäure/Glutamin, Ser: Serin, Gly: Glycin, Thr: Threonin, Arg: Arginin, Ala: Alanin, Tyr: Tyrosin, Val: Valin, ILe: Isoleucin, Phe: Phenylalanin, Leu: Leucin

		Aminosäureverteilung [%]											
Angereichertes Volumen [mL]		Asx	Glx	Ser	Gly	Thr	Arg	Ala	Tyr	Val	ILe	Phe	Leu
P1 - PPL	100	17,4	9,9	6,6	32,8	3,8	0,8	15,8	2,3	4,7	2,5	1,3	2
	250	19	10,7	5,5	31,7	4,1	1,1	15,6	2,1	4,8	2,4	1,2	1,9
	500	19,2	10,9	5,4	30,1	4,9	1,1	15,6	2	5	2,6	1,2	2
	1000	19,1	11,1	5,3	28,7	5,3	1,7	15,8	1,9	5,1	2,7	1,2	2,1
P2 - PPL	100	17,6	10,2	7,3	30,3	4,5	1,7	14,8	1,6	5,4	2,7	1,5	2,4
	250	18,4	10,4	6,6	29,7	4,6	1,4	15,1	1,7	5,4	3	1,4	2,3
	500	19,7	10,6	6,4	27,4	5,3	1,2	15,4	1,7	5,6	3	1,4	2,3
	1000	19,6	10	6,6	29,1	5,2	1	15	1,6	5,4	3	1,3	2,2
P3 - PPL	100	23	11,9	4,3	14,1	7,8	2,8	10,2	0,2	11,2	6,7	2,7	5,1
	250	23,6	11,1	4,1	14,1	8,2	2,5	10,1	0,7	11,1	6,7	2,7	5
	500	23,8	12,3	7,2	13,3	7,3	2,1	9,9	1,1	10	5,8	2,4	4,6
	1000	26,9	10,9	5	12,8	8,2	2,3	9,6	1	10,2	6	2,4	4,6
P1 - C8	100	20,9	11	7,5	28,4	4,4	1,4	14,7	0,4	3,6	3,4	1,6	2,6
	250	20,5	10,8	6,3	26,9	4,3	1,5	13,9	2	6	3,4	1,6	2,7
	500	21	11,2	5,7	26,8	4,7	1,4	13,7	1,9	6	3,7	1,5	2,5
	1000	19,7	10,9	5,8	27,9	5	1,2	13,8	1,9	5,9	3,7	1,5	2,7
P2 - C8	100	21,2	12,2	9,1	25,1	3,3	1,2	11,2	0,5	6,7	4,1	1,9	3,5
	250	21	12,2	9,8	23,3	3,7	1	11,5	0,8	7,1	4,1	2	3,6
	500	20,5	12,6	5,8	25,8	4	1,1	12,8	1,2	6,7	4,3	1,9	3,4
	1000	20,4	12,3	6,2	25,2	4	1,1	12,7	1,3	6,9	4,6	1,9	3,4
P3 - C8	100	18,9	14	6,8	10,3	6,9	3,3	9,7	0,8	12	7,6	3,7	6,4
	250	17,2	13,3	6,3	9,6	7	3,5	9,2	0,7	16	7,3	3,3	6,4
	500	16,1	13,7	6,6	10,7	7,7	3,7	9,9	1,2	13	7,5	3,3	6,6
	1000	16,8	13	6,7	10,6	8,4	4,2	10,5	1,2	12	7,4	3,4	6,4

Die Aminosäuren, welche überwiegend bei der Ästuar- und Meerwasserprobe extrahiert wurden, waren Glycin, Asparaginsäure/Asparagin, Glutaminsäure/Glutamin, Alanin und Serin. Sie machten insgesamt 80 – 83 % (PPL-Extrakt) bzw. 77 – 83 % (C8-Extrakt) der Gesamtaminosäureverteilung aus. Im Gegensatz dazu wies die Verteilung der Aminosäuren (Glycin, Asparaginsäure/Asparagin, Glutaminsäure/Glutamin, Alanin) in den Extrakten der untersuchten Flussprobe Werte von 58 – 62 % (PPL-Extrakt) bzw. 49 – 53 % (C8-Extrakt) auf.

3.1.3 Polaritätsverteilung des organischen Materials

Die Mengen der aufgetrennten organischen Substanzen wurden per Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 210 nm detektiert. In der folgenden Abbildung 10 sind die Chromatogramme der Methanolextrakte, welche aus der Anreicherung von jeweils 1000 mL Ästuar-, Meeres- und Flusswasser resultierten, dargestellt.

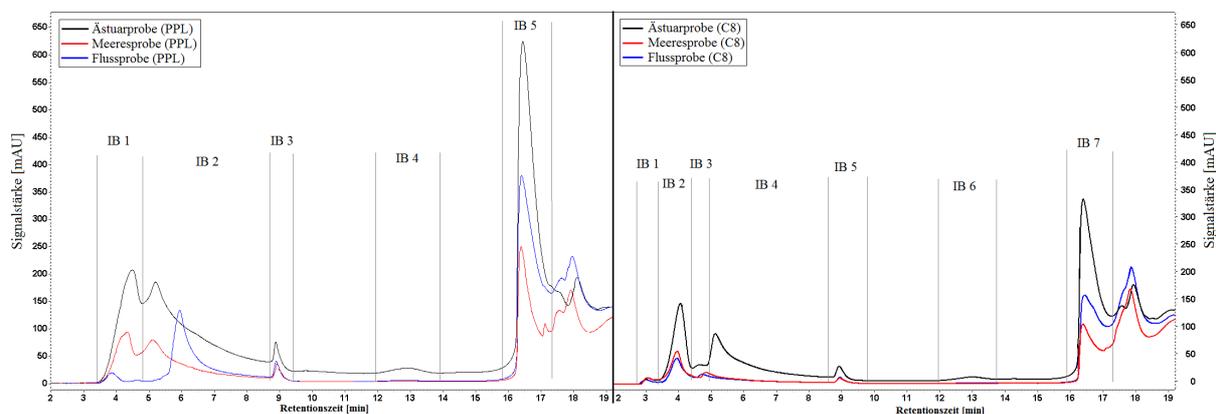


Abb. 10: Chromatogramme der mittels RP18-HPLC aufgetrennten Methanolextrakte (Extrakte der mittels C8- und PPL-Kartuschen angereicherten Ästuar-, Meeres- und Flussprobe (1000 mL); IB: Integrationsbereich).

Die aus dem Gradientenprogramm resultierenden Flächen für polare und unpolare Substanzen wurden ins Verhältnis gesetzt. Dabei waren Substanzen, die im Zeitintervall von 0 – 16 Minuten eluierten, polare Substanzen, da ab ca. 16 Minuten ausschließlich unpolare Substanzen durch die höhere Elutionskraft des Methanols von der Säule gelöst wurden. Die Ergebnisse zeigten einen deutlichen Trend der Polaritätsverteilung extrahierter, organischer Substanzen der Ästuar-, Meeres- und Flussprobe (Abb. 11 und 12).

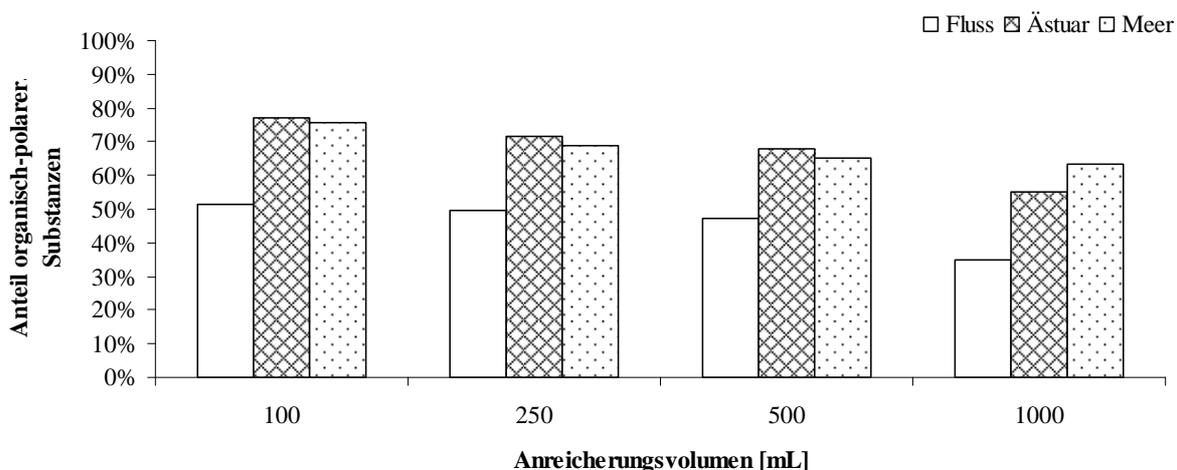


Abb. 11: Vergleichende Darstellung des Anteils mittels PPL-Kartusche extrahierter, polar-organischer Substanzen bezüglich Probenart und Anreicherungsvolumen.

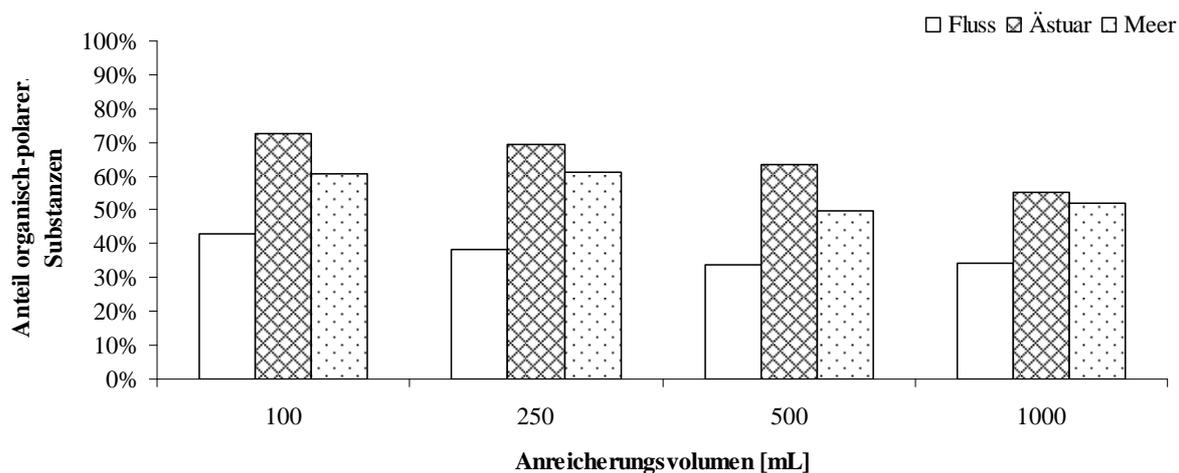


Abb. 12: Vergleichende Darstellung des Anteils mittels C8-Kartusche extrahierter, polar-organischer Substanzen bezüglich Probenart und Anreicherungs-volumen.

Je mehr Probe angereichert wurde, desto geringer wurde der Anteil an organisch-polaren Substanzen im Extrakt. Bei zunehmendem Probenvolumen von 100 – 1000 mL ist eine stetige Abnahme von bis zu 20 % des polaren Anteils zu vermerken. Im direkten Vergleich konnte durch den Einsatz von PPL-Extraktionskartuschen ein größerer Anteil an organisch-polaren Substanzen extrahiert werden, als mit C8-Kartuschen.

3.2 Spektrale Eigenschaften des organischen Materials

3.2.1 Fluoreszenzverhalten

Um das Adsorptionsverhalten der Kartuschen im Verlauf einer Extraktion besser charakterisieren zu können, wurden bei den Anreicherungen der drei Probearten unter Verwendung der C8- und PPL-Kartuschen Echtzeit-Fluoreszenzmessungen des Durchflusses durchgeführt (Abb. 13). Der Kartuschendurchfluss wurde gleichzeitig mit Licht der Wellenlängen 270 und 365 nm angeregt. Bei jeder Extraktion wurde die Fluoreszenz der Originalprobe gemessen, um die maximale Fluoreszenz und damit einen Bezugswert für vergleichende Darstellungen zu ermitteln. Die Werte der Fluoreszenzintensität wurden auf Grundlage des Verhältnisses der Maximalfluoreszenz der Originalproben normiert.

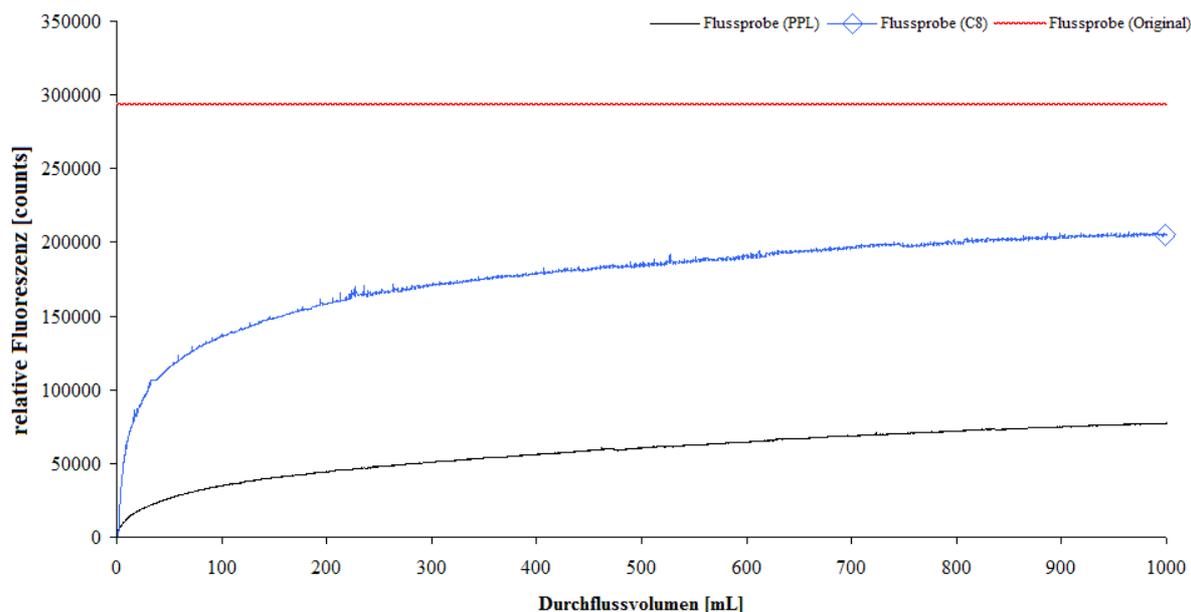


Abb. 13: Verlauf der Fluoreszenzintensität im Kartuschendurchfluss während der Festphasenextraktion – Vergleichende Darstellung der Flussprobenextraktion mittels C8- und PPL-Kartusche.

Bei allen durchgeführten Extraktionen zeigte sich eine stetige Zunahme der Fluoreszenz im Durchfluss (Abb. 13). Die höhere Menge an fluoreszierenden Substanzen im Durchfluss während der C8-Extraktion stimmt mit der Tatsache überein, dass die Extraktionseffizienz dieses Sorbens im Vergleich deutlich niedriger war. Anschließend wurden theoretische Fluoreszenzwerte für die vom Sorbens retardierten Substanzen errechnet.

Dazu wurden die Flächen der fluoreszierenden Substanzen im Durchfluss von der Fläche der Maximalfluoreszenz der Originalprobe subtrahiert. Diese Flächenwerte wurden gegen die ermittelten Konzentrationen an gelöstem organischem Kohlenstoff in den Methanolextrakten aufgetragen (Abb. 15).

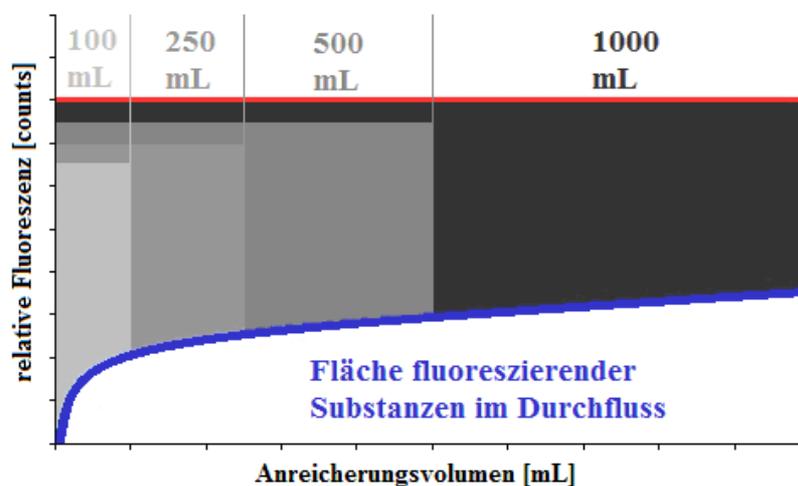


Abb. 14: Schematische Darstellung zur Berechnung der theoretischen Flächen fluoreszierender Substanzen, die am Sorbens adsorbieren (Graustufen); rote Linie: Fluoreszenz der Originalprobe; blaue Linie: Fluoreszenzverlauf der extrahierten Probe.

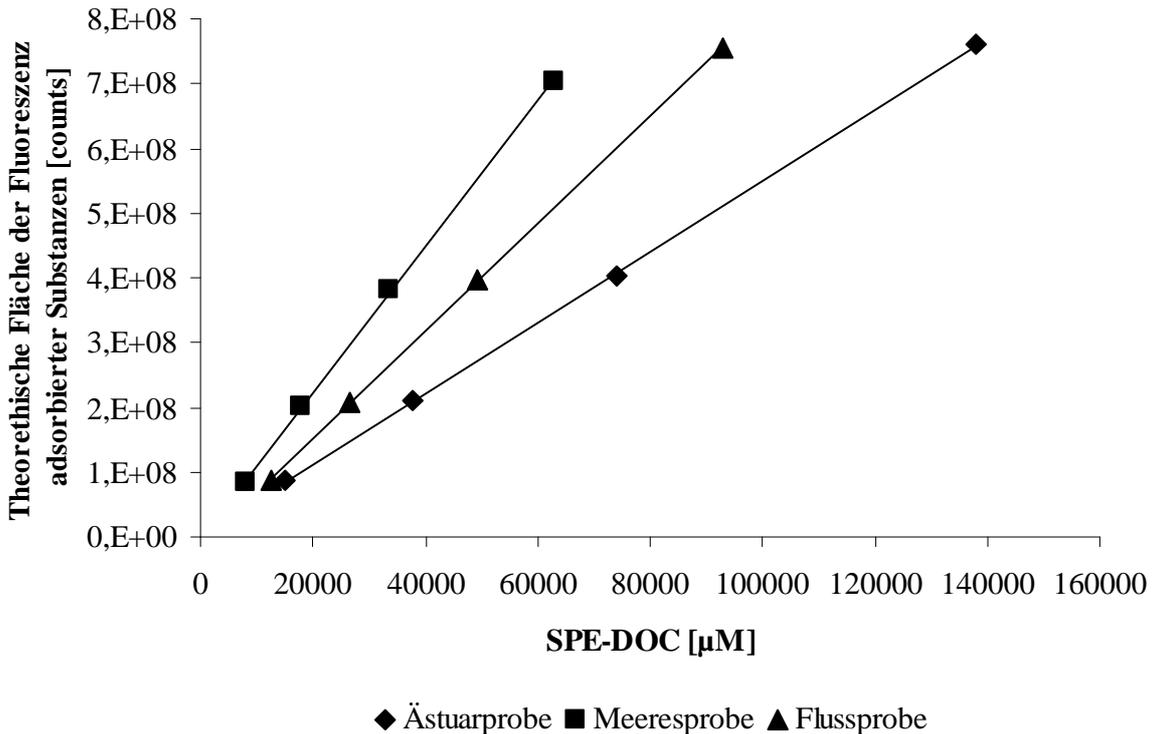


Abb. 15: Beziehung zwischen der theoretischen Fläche fluoreszierender, am Sorbens adsorbierter Substanzen und der Konzentration des festphasenextrahierbaren gelösten organischen Kohlenstoffs im Methanolextrakt (Werte der mittels PPL-Kartuschen angereicherten Ästuar-, Meeres- und Flusswasserproben).

Die Ergebnisse bestätigten eine deutliche Abhängigkeit der beiden Dimensionen mit Bestimmtheitsmaßen von jeweils $R^2 > 0,999$. Um die Resultate zu bekräftigen wurden weitere Versuche zum Beweis einer Beziehung zwischen dem emittierten Fluoreszenzsignal und der DOC-Konzentration des Durchflusses durchgeführt. Hierfür wurden neben den Echtzeit-Fluoreszenzmessungen Proben vom Kartuschendurchfluss genommen. Die Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs wurde anschließend gegen die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt der Probennahme aufgetragen (Abb. 16 und 17).

Zum Beweis einer Beziehung zwischen Fluoreszenz und DOC-Konzentration wurden mehrere Versuchsreihen durchgeführt. Diese waren notwendig, da das zum Spülen verwendete Methanol oft noch zu einem großen Teil im Sorbens zurückblieb und die Messungen des gelösten organischen Kohlenstoffs in den Durchflussfraktionen verfälschte. Neben der DOC-Konzentration wurde ebenfalls die Stickstoffkonzentration gemessen. Aus diesen beiden Werten ließ sich das C/N-Verhältnis berechnen, welches während der ganzen Extraktion relativ konstant blieb. Für den Fall, dass die Methanolkontamination schnell aus dem System gewaschen wurde, bestand die Möglichkeit, aufgrund des konstanten C/N-Verhältnisses, korrigierte DOC-Konzentrationen der ersten, unkorrekten Messpunkte zu berechnen (Abb. 17).

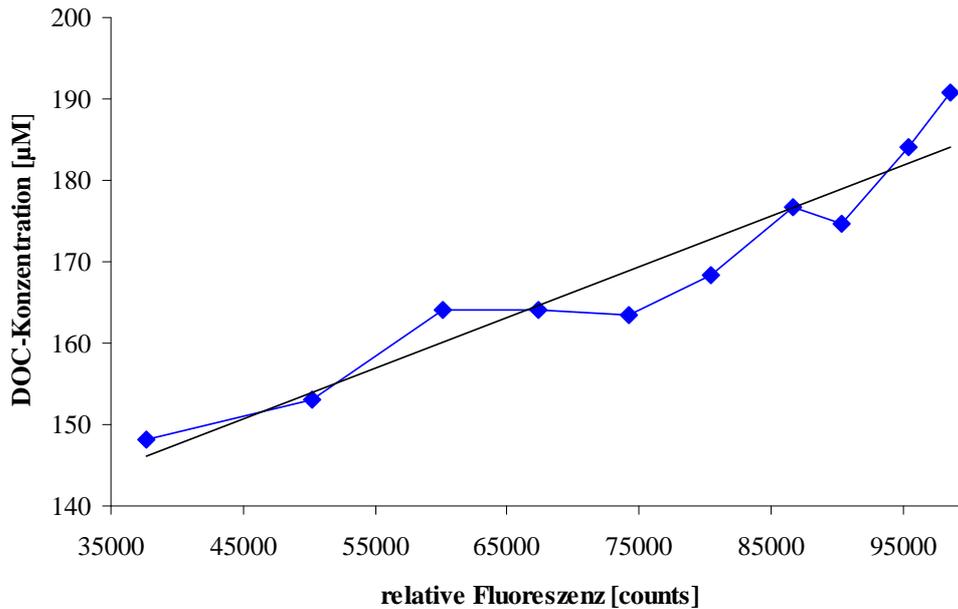


Abb. 16: Beziehung zwischen emittierter Fluoreszenzintensität und DOC-Konzentration des Durchflusses im Verlauf der Extraktion von Probe H1 (900 mL) mittels PPL-Kartusche.

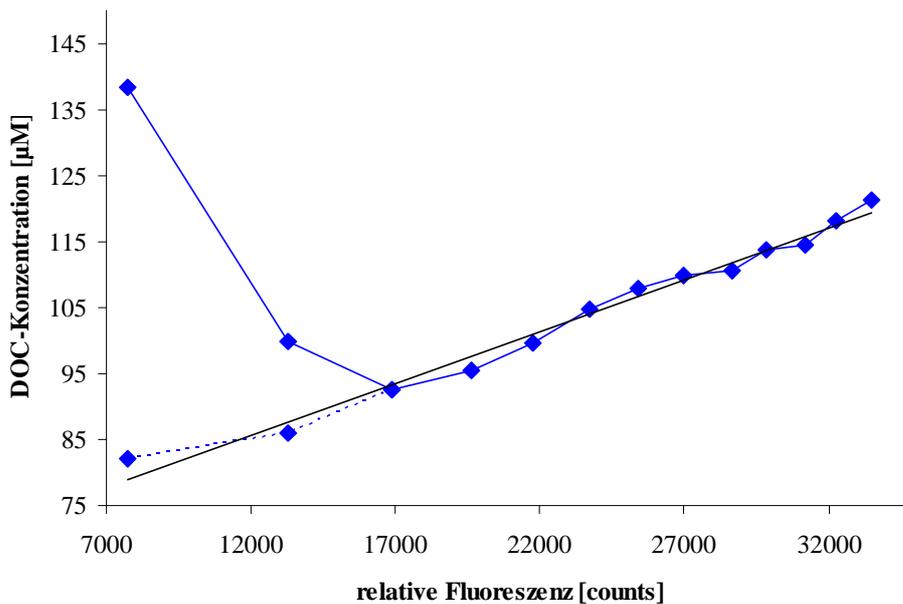


Abb. 17: Beziehung zwischen emittierter Fluoreszenzintensität und DOC-Konzentration des Durchflusses im Verlauf der Extraktion von Probe H2 (100 mL) mittels PPL-Kartusche; gestrichelte Linie: durch das C/N-Verhältnis korrigierte DOC-Werte.

In den Anreicherungsversuchen dieser Arbeit wurde der Kartuschendurchfluss bei 365 nm und 270 nm angeregt, während die Emission im Bereich von 420 – 700 nm detektiert wurde. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Beziehung zwischen der Zunahme der Fluoreszenzintensität und der Konzentrationszunahme des gelösten organischen Kohlenstoffs im Kartuschendurchfluss. Die Bestimmtheitsmaße der beiden extrahierten Proben **H1** ($R^2 = 0,91$) und **H2** ($R^2 = 0,98$) wiesen hochkorrelierte Abhängigkeiten auf.

3.2.2 Extinktionseigenschaften

Von den Methanolextrakten aller angereicherter Proben (Kap. 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3) wurde die molare Absorbanz im Bereich von 205 – 700 nm gemessen. In der folgenden Abbildung wurde der Extinktionswert bei 210 nm der Extrakte gegen die ermittelte DOC-Konzentration aufgetragen (Abb. 18).

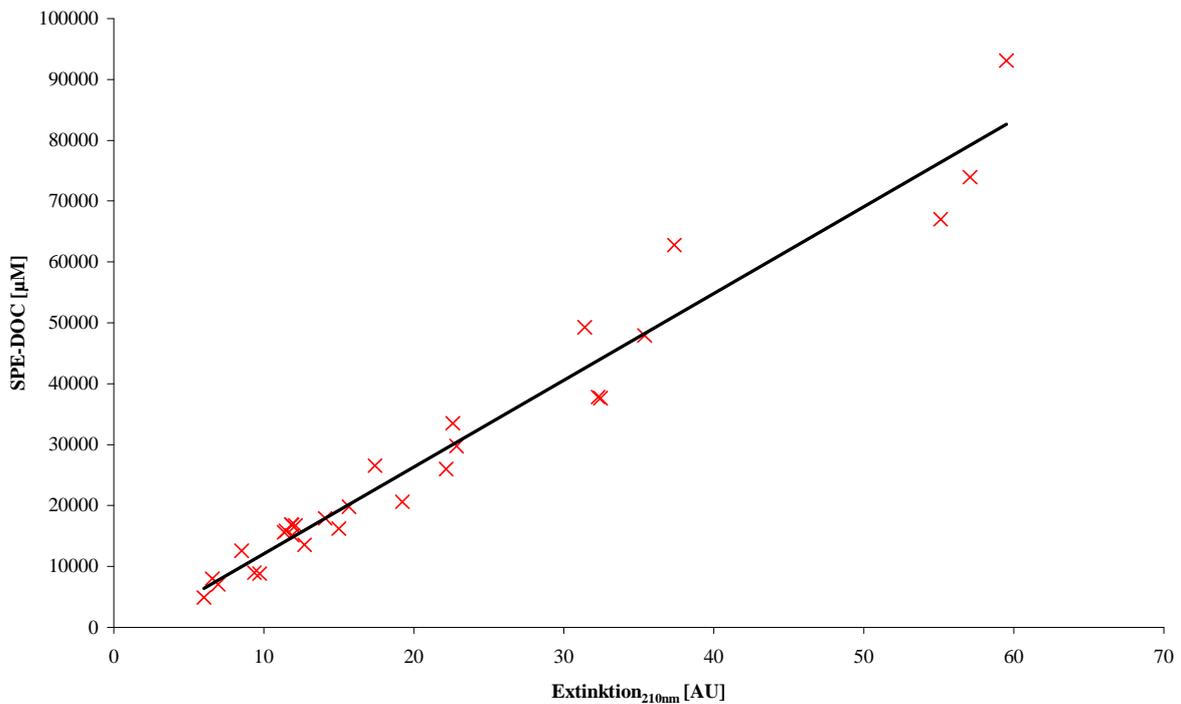


Abb. 18: Beziehung zwischen der Extinktion (210 nm) und der festphasenextrahierbaren DOC-Konzentration der Methanolextrakte (Werte - ohne Verdünnungsfaktoren - der mittels C8- und PPL-Kartuschen extrahierten Hafengewasser-, Ästuar-, Meeres- und Flusswasserproben); Die Werte der Extrakte von den angereicherten Proben H1 (PPL, 900 mL) und P1 (PPL, 1000 mL) wurden nicht dargestellt, da sie in einem zu hohen Bereich lagen und die Korrelation verfälschen würden.

Die hier ermittelten Extinktionswerte korrelierten ebenfalls stark mit den jeweiligen Konzentrationen gelösten organischen Kohlenstoffs ($R^2 = 0,96$). Somit kann die Extinktionsmessung als Alternativmethode zur Bestimmung der ungefähren Kohlenstoffkonzentration der Extrakte genutzt werden.

3.3 Alternatives Elutionsmittel

Festphasenkartuschen können auch mit deutlich unpolareneren Lösungsmitteln eluiert werden. Aus diesem Grund wurden die organischen Substanzen zuerst mit Methanol und anschließend mit Acetonitril als zweitem Elutionsmittel vom Sorbens eluiert. Von den Acetonitrilextrakten wurde, wie auch bei den Methanolextrakten, eine Extinktionsmessung für den Bereich von 205 – 700 nm durchgeführt. Beim Vergleich der Ergebnisse fiel auf, dass nur bei den Extrakten der PPL-Kartuschen die Extinktion bei steigendem Anreicherungs volumen zunahm (Abb. 19). Aus den Ergebnissen ließ sich eine kartuschen- und lösungsmittelspezifische Anreicherung bzw. Elution organischer Substanzen ableiten. Bei 324 nm fand ein automatischer Lampenwechsel statt, da es für den UV- und den VIS-Bereich jeweils eine Lichtquelle gibt. Dadurch lässt sich das Hintergrundsignal in dem Bereich erklären.

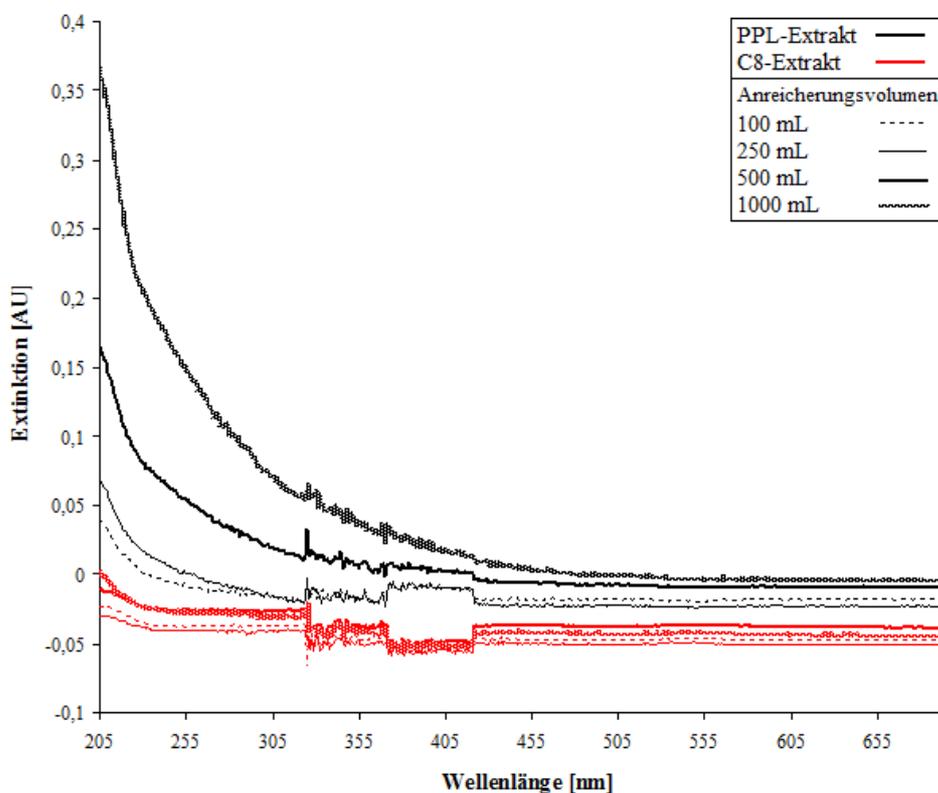


Abb. 19: UV/Vis-Scans der Acetonitrilextrakte (Extrakte der mittels C8- und PPL-Kartuschen angereicherten Flussprobe).

Durch das Messen des gelösten organischen Kohlenstoffs der Acetonitrilextrakte konnte eine Anreicherung organischer Substanzen ausschließlich in den Extrakten der PPL-Kartuschen bestätigt werden. Unter Verwendung des zweiten Elutionsmittels konnte somit die Extraktionseffizienz bei den Anreicherungen mit PPL-Kartuschen um 0,7 – 1,5 % gesteigert werden, wobei auch hier bei steigendem Anreicherungs volumen die Effizienz sank. Da die Extinktionswerte der Methanolextrakte bei 210 nm sehr zuverlässig die DOC-Konzentrationen repräsentierten, wurden die gemessenen und die aus den Extinktionswerten berechneten DOC-Konzentrationen der Acetonitrilextrakte in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 12: Gemessene und berechnete DOC-Konzentration der Acetonitrilextrakte (PPL)

Probe / Volumen	gemessene DOC-Konzentration [μM]	berechnete DOC-Konzentration [μM]
Fluss / 100 mL	565	-669
Fluss / 250 mL	772	-331
Fluss / 500 mL	1225	888
Fluss / 1000 mL	2583	3380
Ästuar / 100 mL	856	-1278
Ästuar / 250 mL	919	-220
Ästuar / 500 mL	2057	1226
Ästuar / 1000 mL	3440	3366
Meer / 100 mL	702	-320
Meer / 250 mL	707	-52
Meer / 500 mL	1094	1326
Meer / 1000 mL	2156	3051

Im Vergleich mit den gemessenen DOC-Konzentrationen waren die berechneten Konzentrationen besonders bei den Proben mit kleinem Anreicherungs volumen zu niedrig. Dies führt zur Annahme, dass in den Acetonitrilextrakten optisch aktive Substanzen vorkommen, für deren korrekte Korrelation mit der DOC-Konzentration eine separate Kalibrierkurve für den niedrigeren Konzentrationsbereich erstellt werden muss. Außerdem muss beachtet werden, dass die Extrakte zur Bestimmung der DOC-Konzentration in Wasser gelöst werden. Die niedrigen gemessenen DOC-Konzentrationen könnten dadurch erklärt werden, dass unpolare Substanzen sich nicht vollständig in Wasser gelöst haben und damit nicht analysiert wurden. Diese mit Acetonitril eluierten Substanzen konnten mittels Umkehrphasenchromatographie (Kap. 2.5.2) aufgetrennt und per Diodenarray- und Fluoreszenzdetektor nachgewiesen werden (Abb. 20).

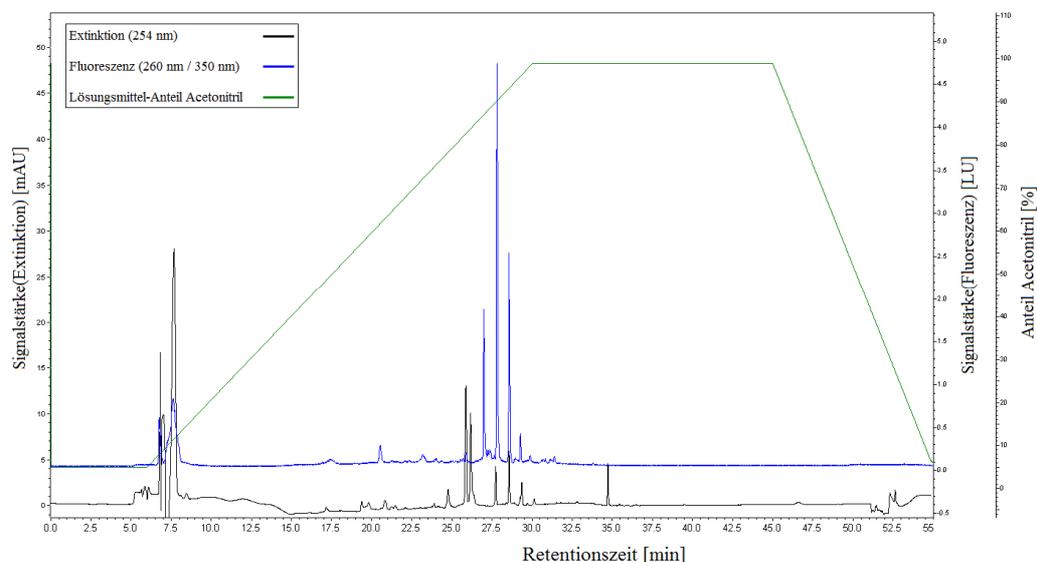


Abb. 20: Chromatogramm eines per RP18-HPLC aufgetrennten Acetonitrilextrakts (Extrakt der mittels PPL-Kartusche angereicherten Meeresprobe (1000 mL)).

3.4 Einfluss von Salz auf die Extraktion gelösten organischen Materials

Im Fokus der folgenden Versuchsreihen stand die Frage, ob Salz einen Einfluss auf die Extraktion organischer Substanzen mittels Polymersorbens hat. Hierzu wurden möglichst salzarme Flussproben (**F1** / **F2**) mit unterschiedlichen Konzentrationen Natriumchlorid versetzt und mit PPL-Kartuschen angereichert (Kap. 2.2.3). Analog zu Kapitel 3.1.1 wurden die Extraktionseffizienzen der einzelnen Anreicherungsansätze berechnet (Abb. 21).

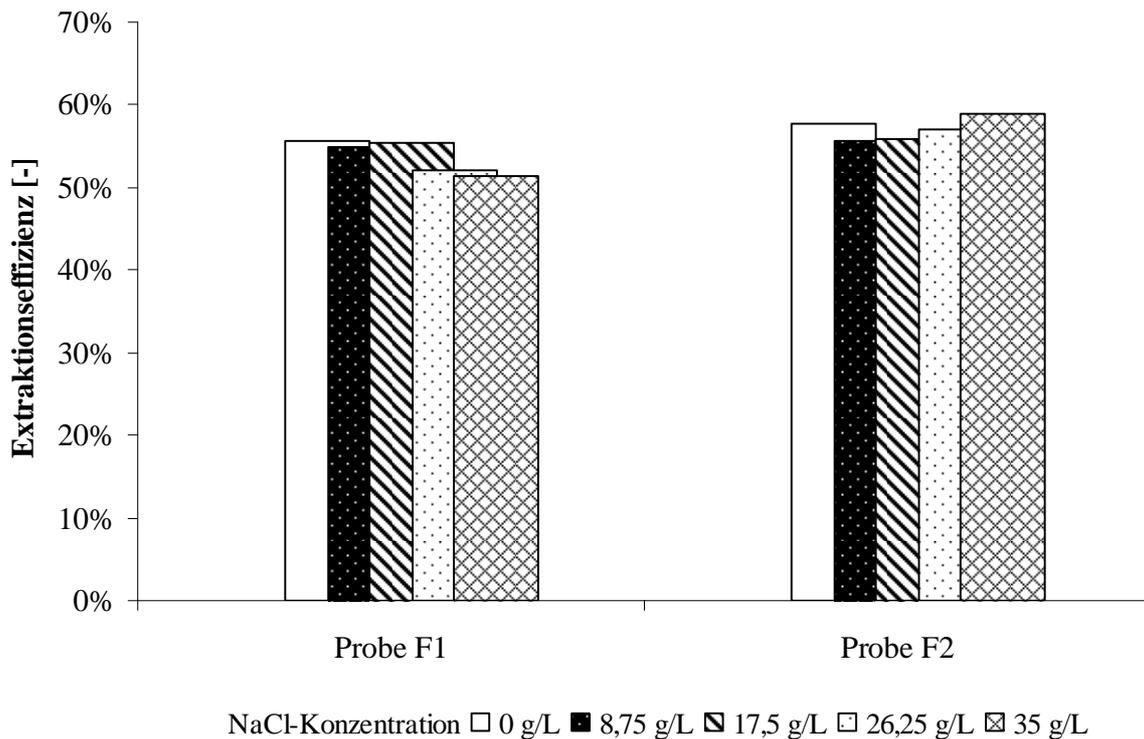


Abb. 21: Extraktionseffizienzen der mit Salz versetzten Flussproben.

Während die Extraktionseffizienz mit zunehmender Salinität bei Probe **F1** um bis zu 4 % sank, war bei Probe **F2** erst eine Abnahme um 4 % und anschließend ein ansteigender Verlauf der Effizienz zu beobachten. Die Ergebnisse zeigten somit, dass die ansteigende Salzkonzentration keinen gravierenden Effekt auf die Extraktion der Flussproben hatte.

Die Methanolextrakte dieser Versuchsreihen wurden zur Ermittlung der Polaritätsverteilung per Umkehrphasenchromatographie analysiert. Der unpolare Bereich der resultierenden Chromatogramme gestaltete sich, unabhängig von der Salzkonzentration der angereicherten Probe, immer gleich (Anhang 8). Lediglich im polaren Bereich waren unterschiedliche Verteilungen der eluierten organischen Substanzen festzustellen (Abb. 22).

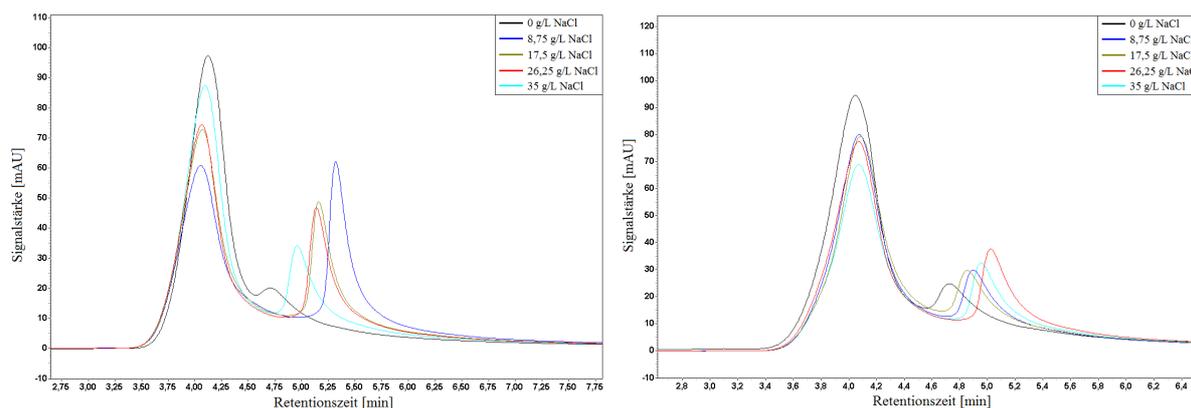


Abb. 22: Polarer Bereich der mittels RP18-HPLC aufgetrennten organischen Substanzen; polares Laufmittel: Reinstwasser pH 7 (links: Flussprobe F1; rechts: Flussprobe F2).

Bei den Chromatogrammen der Proben **F1** und **F2** sind im polaren Bereich zwei Peaks erkennbar. Die Variation der Salinität hatte eine Veränderung der Flächenverteilung zwischen diesen beiden Peaks zur Folge. Des Weiteren wurde ebenfalls die Retentionszeit des zweiten Peaks beeinflusst. Ohne Salzzusatz war der zweite Peak nur schwach ausgeprägt. Dagegen war der zweite Peak bei den Extrakten, die aus den mit Salz versetzten Proben resultierten, markanter. Bei der Versuchsreihe mit Probe **F1** ließ sich die Tendenz erkennen, dass sich Peakfläche und Retentionszeit des zweiten Peaks mit zunehmender Salinität verringern. Zwar bestätigte sich dieser Trend in den Chromatogrammen der Probenreihe **F2** nicht, jedoch wurde erneut ein Einfluss des Salzes auf die Polaritätsverteilung der aufgetrennten organischen Substanzen nachgewiesen.

Um nachzuweisen, ob diese Strukturänderung dauerhaft ist, wurden die Methanolextrakte erneut mittels Umkehrphasenchromatographie analysiert (Abb. 23). Bei dieser Untersuchung wurde jedoch Phosphatpuffer als polares Laufmittel benutzt, welcher eine höhere Ionenstärke als Reinstwasser aufweist.

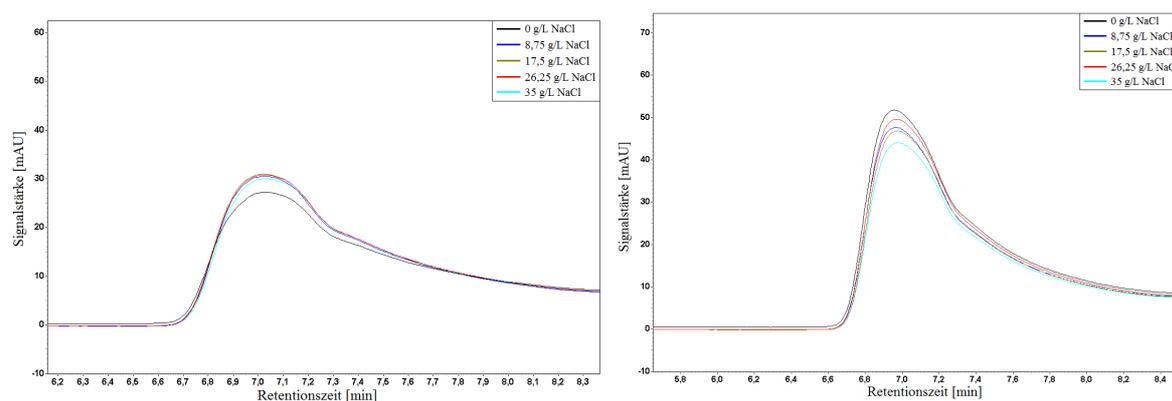


Abb. 23: Polarer Bereich der mittels RP18-HPLC aufgetrennten organischen Substanzen; polares Laufmittel: Phosphatpuffer (links: Flussprobe F1; rechts: Flussprobe F2).

Durch den Einsatz des Phosphatpuffers ist bei den Chromatogrammen im polaren Bereich nur noch ein Peak erkennbar. Zwischen den Peaks der einzelnen Ansätze zeigten sich keine Unterschiede bei der Fläche oder der Retentionszeit. Im Gegensatz zum Reinstwasser war die höhere Ionenstärke des Phosphatpuffers Ursache für eine uniforme Umstrukturierung der

organischen Substanzen, welche sich in einer einheitlichen Peakform der eluierten organischen Substanzen zeigte. Um beurteilen zu können, ob die wechselhafte Größenverteilung der organischen Substanzen, neben den Wechselwirkungen mit der stationären Phase, entscheidend für den in Abb. 22 sichtbaren Trend waren, wurden die Methanolextrakte per Ausschlusschromatographie (SEC-HPLC) analysiert. Die Probenmoleküle wurden isokratisch mit Reinstwasser pH 7 (Abb. 24) bzw. Phosphatpuffer (Abb. 25) durch die Trennsäule gepumpt und bezüglich ihrer Größe aufgetrennt.

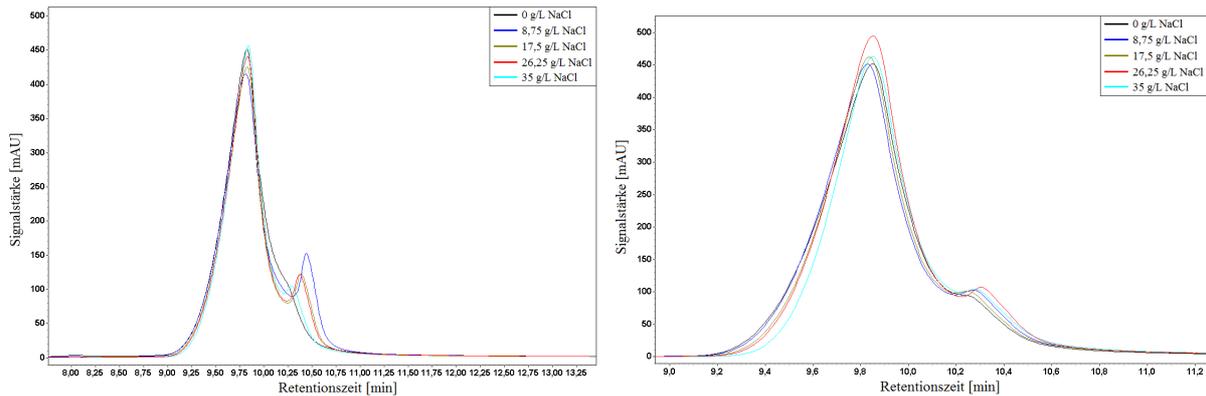


Abb. 24: Chromatogramm der mittels SEC-HPLC aufgetrennten organischen Substanzen; Laufmittel: Reinstwasser pH 7 (links: Flussprobe F1; rechts: Flussprobe F2).

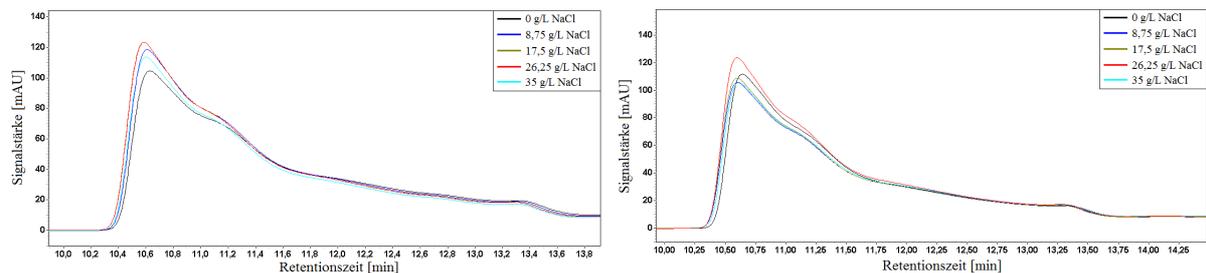


Abb. 25: Chromatogramm der mittels SEC-HPLC aufgetrennten organischen Substanzen; Laufmittel: Phosphatpuffer (links: Flussprobe F1; rechts: Flussprobe F2).

Unter der Verwendung von Reinstwasser wurden im Verlauf der Elution zwei Peaks detektiert, während die Chromatogramme der mit Phosphatpuffer aufgetrennten Substanzen einen breiten Peak zeigten. Dieser breite Peak ergab sich aus der Überlagerung kleinerer Peaks. Bei der Betrachtung des zweiten Peaks in Abbildung 24 ist der gleiche Trend zu beobachten wie bei den Chromatogrammen der RP18-HPLC mit Reinstwasser als polarem Laufmittel (Abb. 22). Die Chromatogramme der Ausschlusschromatographie bekräftigten die Vermutung, dass sich die Molekülstruktur von Huminstoffen abhängig von der Ionenstärke des Mediums in ihrer Größe verändern. Außerdem wurde bestätigt, dass diese Strukturänderung reversibel ist und beim Einsatz eines Laufmittels mit hoher Ionenstärke wieder aufgehoben werden konnte (Abb. 25). Somit lassen sich die Verteilungen in Abb. 22 nicht nur durch Wechselwirkungen der organischen Substanzen mit der stationären und mobilen Phase, sondern auch durch Größeneffekte erklären.

4. Diskussion

4.1 Einfluss des Probenvolumens auf die Extraktion des organischen Materials

Die Abnahme der Extraktionseffizienz mit zunehmendem Anreicherungsvolumen lässt sich nicht durch das Überschreiten der Kartuschenkapazität begründen. Der Hersteller Agilent Technologies gibt folgende Kapazitäten für die verwendeten Kartuschen an: Silikatkartuschen können 1 – 4 % und Polymerkartuschen bis zu 12 % der eingesetzten Sorbensmasse extrahieren (mündliche Überlieferung, Dr. Ulrike Jegle). Somit würde die Kapazität lediglich bei den 1000 mL-Anreicherungen der drei Proben mittels C8-Kartusche überlastet worden sein. Eine Überbeanspruchung war beim Vergleich der Extraktionseffizienzen unter Berücksichtigung des negativen Trends nicht erkennbar.

Im Vergleich zeichneten sich PPL-Festphasenextraktionskartuschen dadurch aus, dass sie gelöstes organisches Material effizienter anreicherten als C8-Kartuschen. Dieses Ergebnis belegte auch eine frühere Studie (Dittmar et al., 2008). Die Extraktion von organischem Material, welches besonders in Meerwasser und anderen aquatischen Systemen überwiegend eine Größe von $<1 - 5$ kDa hat (Thurman, 1986, Benner et al., 1997), wird durch das Silicatsorbens aufgrund der kleineren Porengrößen begünstigt. Jedoch hat das Sorbens der PPL-Kartuschen erwartungsgemäß eine höhere Ausbeute als die C8-Kartuschen, da es sehr polare sowie unpolare Substanzen bindet und eine größere Oberfläche besitzt (600 m²/g im Gegensatz zu 500 m²/g bei dem C8-Sorbens).

Die Ergebnisse haben ergeben, dass die relative Verteilung der Aminosäuren unabhängig von Anreicherungsvolumen gleich bleibt. Diese Annahme ließ sich durch den Einsatz der Clusteranalyse eindeutig bestätigen. Durch den Vergleich der Aminosäureverteilungen auf Analogie ergaben sich abgegrenzte Cluster, in denen die angereicherten Proben sich abhängig von ihrem Ursprung und vom verwendeten Sorbens jedoch unabhängig vom Anreicherungsvolumen arrangierten (Abb. 26).

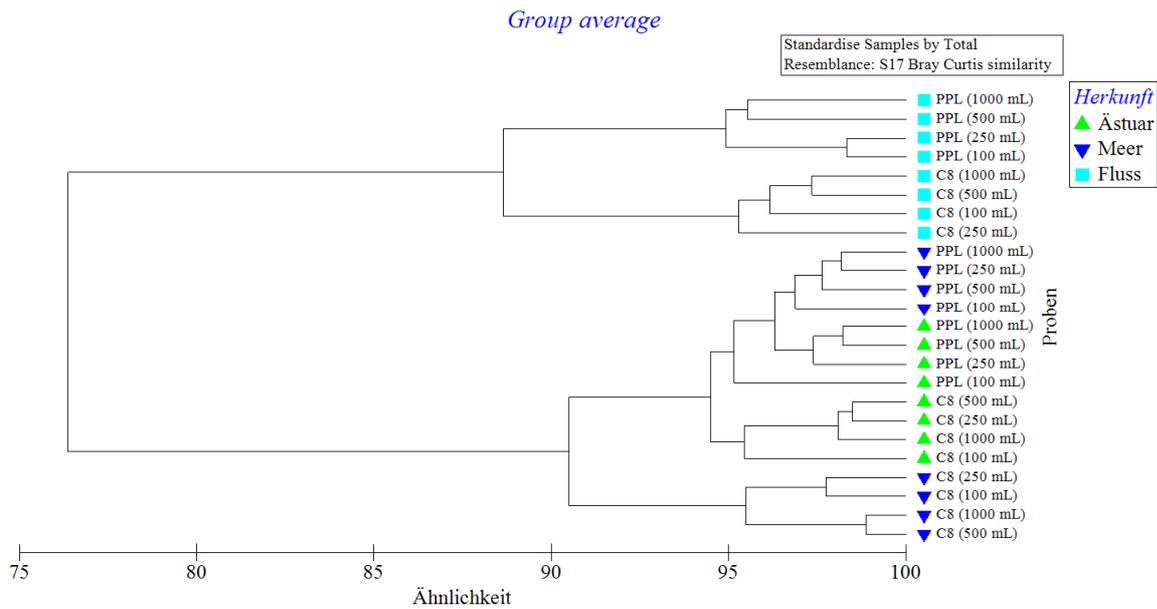


Abb. 26: Clusteranalyse der relativen Aminosäureverteilungen aller Methanolextrakte, die aus der Anreicherung unterschiedlicher Volumina der Ästuar-, Meeres- und Flussprobe mittels C8- und PPL-Kartuschen hervorgingen.

Insgesamt 95,8 % der Variabilität der Proben ließen sich durch die Hauptkomponenten 1 und 2 darstellen (Abb. 27). Dabei waren die Faktoren (Eigenvektoren), die den größten Einfluss auf die räumliche Verteilung der Datenpunkte hatten, die relativen Beträge der Aminosäuren Glycin, Valin und Alanin bei Hauptkomponente 1, während Hauptkomponente 2 überwiegend von dem Summenparameter Asx beeinflusst wurde. Durch die klare Gruppierung der Datenpunkte unter Einbezug der Eigenvektoren wird sichtbar, dass die Aminosäurezusammensetzungen der Ästuar- und Meeresprobe ähnlich sind und sich deutlich von der Flussprobe unterscheiden, wobei der Glycinanteil der differenzierende Faktor ist.

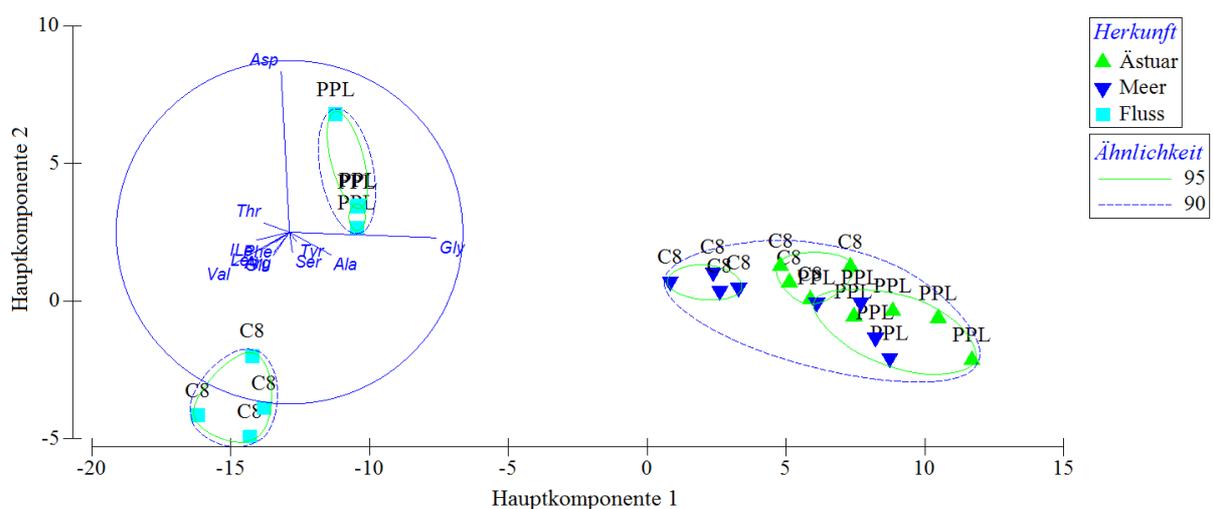


Abb. 27: Hauptkomponentenanalyse der relativen Aminosäureverteilungen aller Methanolextrakte, die aus der Anreicherung unterschiedlicher Volumina der Ästuar-, Meeres- und Flussprobe mittels C8- und PPL-Kartuschen hervorgingen.

Nach Hecky et al. (1973) werden Glycin und Serin in den Zellwänden von Diatomeen angereichert. Diese zellwandassoziierten Aminosäuren haben eine geringere Anfälligkeit gegenüber enzymatischem Abbau als jene, die im Zellplasma vorkommen (Laursen et al., 1996). Das erklärt jedoch noch nicht den deutlichen Unterschied, da neben den weitverbreiteten marinen Diatomeenarten auch Süßwasserarten existieren. Der höhere Glycinanteil in den Extrakten der Flussmündung und des Meerwassers lässt sich mit den Ergebnissen von Carlson et al. (1985) besser erklären. In ihrer Arbeit wurde die Fähigkeit von marinen, gelösten organischen Makromolekülen beschriebenen Monomere wie Glycin, Alanin oder Valin zu binden. Dieser Bindungsprozess kann wiederum einen protektiven Effekt haben, nämlich den Schutz des gebundenen Monomers vor Abbau, und weiterhin zum Beispiel Aminosäuren konservieren.

Ergebnisse von Hubberten et al. (1994) zeigten ähnlich hohe Anteile der fünf Aminosäuren (Glycin, Asparaginsäure/Asparagin, Glutaminsäure/Glutamin, Alanin und Serin) bei untersuchtem Meerwasser von bis zu 80 %. Im Gegensatz dazu repräsentieren die häufig in Huminstoffen des Süßwassers vorkommenden Aminosäuren (Glycin, Asparaginsäure/Asparagin, Glutaminsäure/Glutamin, Alanin) laut Thurman (1985) 40 – 65 % der gelösten Gesamtaminosäuren.

Die Detektion der chromatographisch aufgetrennten organischen Substanzen erfolgte durch eine Extinktionmessung bei 210 nm, da nach Hertkorn et al (2006) Carboxyl- und Ethergruppen die am häufigsten im DOM vorkommenden funktionellen Gruppen sind. Der niedrigere Anteil polar-organischer Substanzen in den C8- und PPL-Extrakten der Flussprobe (Abb. 10 und 11) lässt sich durch den größeren Beitrag terrestrisch-organischer Substanzen erklären. Diese Biomakromoleküle, wie Lignine oder Cutin, enthalten nahezu keinen Stickstoff, haben ihren Ursprung in Gefäßpflanzen und besitzen einen größtenteils unpolaren Charakter (de Leeuw und Largeau, 1993).

Die Ergebnisse zeigten, dass bei zunehmendem Anreicherungs-volumen der Anteil polar-organischer Substanzen stetig sinkt. Dieser negative Trend lässt sich dadurch erklären, dass die hauptsächlich hydrophoben Oberflächen der hier verwendeten C8- und PPL-Kartuschen die polar-organischen Substanzen nicht stark genug binden bzw. retardieren. Diese polar-organischen Substanzen stehen ebenfalls in Wechselwirkung mit der durch die Kartusche fließenden Probe. Eine weitere Erklärung wäre, dass die hydrophoben Substanzen die polaren Substanzen aufgrund einer höheren Affinität zur hydrophoben Oberfläche im Verlauf der Extraktion verdrängen. Sorbenzien auf Polystyrol-divinylbenzol-Basis haben den Nachteil eine geringe Kapazität für hochpolare Substanzen zu besitzen (León-González und Pérez-Arribas, 2000). Diese Effekte können Gründe für die nachgewiesene Abnahme der Extraktionseffizienz bei steigendem Anreicherungs-volumen sein.

Die ungleichmäßige Anreicherung organischer Substanzen hat zur Folge, dass bei steigendem Probenvolumen die Repräsentativität der Polaritätsverteilung des Extrakts für die Verteilung der Originalprobe schlechter wird. In Untersuchungen von Masqué et al. (1998) wurden drei Kartuschenarten zur Isolation von Phenolen und Pestiziden verglichen. Ihre Ergebnisse bestätigten ebenfalls eine geringere Wiederfindung speziell von polaren Substanzen bei Zunahme des Anreicherungs volumens unter Verwendung von PPL-Kartuschen. Beispielsweise lag die Wiederfindung von Phenol bei der Anreicherung von 50 mL Probe bei 68 % und sank mit steigendem Probenvolumen (200 mL) auf 23%.

Beim Vergleich der beiden Kartuschenarten zeigte sich eindeutig, dass unter Verwendung der PPL-Kartuschen stets mehr polar-organische Substanzen extrahiert wurden. Bei der Extraktion polarer Verbindungen mit diesen hydrophoben Sorbenzien ist einer der wichtigsten Parameter die spezifische Oberfläche, die für Wechselwirkungen mit dem Analyten zur Verfügung steht (Fontanals et al., 2007). Die Adsorption von organischen Substanzen am C8-Sorbens lässt sich ausschließlich durch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Vaals-Kräften erklären. Neben dem Vorteil, eine um 100 m²/g größere Oberfläche zu besitzen, begünstigt eine hohe Anzahl an aromatischen Ringen des PPL-Sorbens zusätzliche π - π -Interaktionen. Diese Interaktionen tragen zu einer besseren Retardierung größtenteils polarer Substanzen bei (León-González und Pérez-Arribas, 2000, Fontanals et al., 2005).

4.2 Spektrale Eigenschaften des organischen Materials

Bei den Anregungswellenlängen, die in den Versuchen verwendet wurden (270 und 365 nm), fluoreszieren, neben den Huminstoffen, wie Humin- und Fluvinsäuren, auch Substanzen mit proteinähnlichen Spektren.

Tab. 13: Anregungs-Emissionswellenlängenpaare von Stoffen des aquatischen, natürlichen organischen Materials (Coble, 1996, Wu und Tanoue, 2001, Wu et al., 2001, Baker, 2001, Leenheer und Croux, 2003)

Fluoreszierende Substanz	Anregungswellenlänge [nm]	Emissionswellenlänge [nm]
huminstoff-ähnlich	260	380 – 460
huminstoff-ähnlich	350	420 – 480
huminstoff-ähnlich	350 – 440	430 – 510
fulvinsäure-ähnlich	240 – 270	370 – 440
fulvinsäure-ähnlich	310 – 360	370 – 450
tyrosin-ähnlich	275	310
tryptophan-ähnlich	275	340

Auf der Suche nach einer zuverlässigen Messmethode für die Konzentration gelösten organischen Kohlenstoffs in Oberflächenwasser haben Smart et al. (1976) herausgefunden, dass die Fluoreszenz der untersuchten Wasserproben im Emissionsbereich von 400 – 600 nm bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm statistisch hoch signifikant ($R^2 = 0,87 - 0,98$) mit der DOC-Konzentration korreliert. Für weitere Untersuchungen sollte daher der analysierte Emissionsbereich auf 420 – 600 nm (statt 700 nm) verkürzt werden, da die

Emissionswellenlängen der fluoreszierenden Substanzen nicht sehr weit in den Bereich längerer Wellenlängen reichen (Tab. 13). Bei der Anwendung dieser alternativen Messmethode ist zu beachten, dass der sonnenlichtinduzierte Photoabbau des fluoreszierenden DOMs (FDOM) Probleme bei der Interpretation der Daten verursachen kann. Die Ergebnisse von Mostofa et al. (2007) zeigten, dass fulvinsäure-ähnliches FDOM anfälliger gegenüber Photoabbau ist als protein-ähnliche Substanzen und DOC.

Die Beziehung zwischen der molaren Absorbanz und der DOC-Konzentration der Methanolextrakte wurde schon in früheren Studien nachgewiesen. Bei Extrakten von Oberflächenwasser aus dem Südatlantik und der Antarktis bestand eine hoch signifikante Abhängigkeit ($R^2 = 0,92$) zwischen der DOC-Konzentration und der Extinktion bei 210 nm (Lechtenfeld et al., 2001). Voraussetzung für diese Korrelation ist eine lineare Beziehung zwischen den Konzentrationen von CDOM und DOC. Die Untersuchungen von Vodacek et al. (1997) ergaben, dass der Abbau von CDOM aufgrund von Photooxidation diese Beziehung stark beeinflusst. In Monaten mit wenig Sonneneinstrahlung beobachteten sie eine lineare Beziehung zwischen der Absorption und der DOC-Konzentration. Dagegen war diese Beziehung im Sommer, bedingt durch Photooxidation bzw. Photobleaching, nicht linear, da bis zu 70 % des CDOMs im Oberflächenwasser in nicht-chromophoren, gelösten organischen Kohlenstoff und gelösten anorganischen Kohlenstoff umgewandelt wurden.

4.3 Einfluss von Salz auf die Extraktion gelösten organischen Materials

Die Anwesenheit von Salz hatte keinen nachweisbaren Einfluss auf die Effizienz, mit welcher gelöst organisches Material extrahiert wurde. Die Untersuchungen von Kruger et al. (2011) handelten von dem Einfluss der Salinität auf die Isolation von DOM mittels Ultrafiltration und Festphasenextraktion mit C18-Kartuschen. Dabei fanden sie heraus, dass Salzionen die Effektivität, mit welcher gelöste organische Substanzen angereichert werden, beeinflussen. Bei Extraktionen von mit Salz versetzten Flusswasserproben mit C18-Kartuschen waren die Wiederfindungsraten sehr unterschiedlich und zeigten keinen signifikanten Trend. Es wurde dargelegt, dass die negativen Effekte, die Salzionen auf die Extraktion haben, bei der Extraktion mit C18-Kartuschen je nach Herkunft und Zusammensetzung der organischen Substanzen variieren.

Durch die chromatographische Auftrennung der Methanolextrakte wurde ein Einfluss des Salzes auf die Polaritäts- bzw. Größenverteilung der aufgetrennten organischen Substanzen nachgewiesen (Abb. 22 und 24). Diese Ergebnisse ließen die Vermutung zu, dass sich die Struktur organischer Substanzen in Abhängigkeit von der Ionenstärke der Wasserprobe verändert. Diese Veränderung war so stabil, dass sie nach der Festphasenextraktion und Elution im Methanolextrakt trotzdem weiterhin nachweisbar blieb. Tsutsuki und Kuwatsuka (1984) sahen im Verhalten der Molekülstruktur von Huminstoffen eine Ähnlichkeit zu der von polyelektrolytischen Partikeln. Während sie in Medien mit geringen Ionenstärken eine

lineare Molekülstruktur aufweisen, bilden sich bei steigender Ionenstärke starre, sphärisch-kolloide Strukturen. Diese variable Starrheit der Moleküle von Huminstoffen wurde auch von Cameron et al. (1972) beschrieben.

Pédrot et al. (2010) fanden in ihren Untersuchungen heraus, dass im Gegensatz zur Ionenstärke der pH-Wert den größten Einfluss auf die Strukturstabilität von Huminstoffen hat. Bei niedrigen pH-Werten konnte eine Destabilisierung der Konformation beobachtet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Proben vor der Festphasenextraktion auf einen pH-Wert von ca. 2 gebracht. Es ist deswegen davon auszugehen, dass die Molekülstrukturen der Huminstoffe in allen Ansätzen vergleichbar destabilisiert wurden. Aus diesem Grund war der einzige Unterschied zwischen den Ansätzen die Salinität, so dass die nachgewiesenen Größeneffekte nur auf die Ionenstärke der jeweiligen Probe zurückzuführen ist.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein variables Anreicherungsvolumen einen Einfluss auf die Festphasenextraktion von gelösten organischen Substanzen aus Wasserproben hat. Ein zunehmendes Probenvolumen hatte eine Abnahme der Extraktionseffizienz sowie eine verstärkte Anreicherung unpolarer Substanzen zur Folge. Die relative Aminosäureverteilung blieb dabei unabhängig vom Probenvolumen gleich. Diese Trends waren unabhängig von Probenherkunft bei beiden Extraktionskartuschentypen zu beobachten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine lineare Beziehung zwischen FDOM und DOC besteht. Damit wurde bewiesen, dass die Fluoreszenzmessung das Potential besitzt als alternative Methode zur Bestimmung der DOC-Konzentration eingesetzt zu werden. Die Methode konnte ebenfalls bei der Charakterisierung des Adsorptionsverhaltens von Festphasenextraktionskartuschen Anwendung finden. Die in früheren Studien nachgewiesene nahezu lineare Korrelation zwischen DOC-Konzentration und Extinktion bei 210 nm der Festphasenextrakte (Methanol) konnte bestätigt werden.

Durch den Einsatz von Acetonitril als zweites Elutionsmittel (nach Methanol) konnte nur von den PPL-Kartuschen zusätzliches SPE-DOM vom Sorbens gelöst werden. Diese zweite Elution steigerte die Extraktionseffizienz der Extraktionskartuschen (PPL) um bis zu 1,5 %. Unterschiedliche Salzkonzentrationen zeigten keinen Einfluss auf die Effizienz, mit welcher organische Substanzen aus Flusswasser mittels PPL-Extraktionskartuschen extrahiert wurden. Es konnten jedoch salzabhängige Veränderungen der Größenverteilung polarer organischer Substanzen nachgewiesen werden.

Im Mittelpunkt zukünftiger Untersuchungen könnte die Aufklärung des Adsorptionsverhaltens anderer, chemisch-charakterisierter DOM-Fraktionen (z.B. von Phenolen oder Kohlenhydraten) stehen. Ergebnisse würden dazu beitragen optimale Parameter (z.B. Anreicherungsvolumen, Extraktionssorbens, Elutionsvolumen oder -mittel) für eine gezielte Anreicherung relevanter Substanzgruppen zu ermitteln. Außerdem wären Versuche interessant, in denen Anreicherungsvolumina von 10 – 50 mL verwendet werden. Dabei würde die Frage im Mittelpunkt stehen, ob weiterhin ein nachweisbarer Einfluss des Probenvolumens auf die Extraktionseffizienz besteht oder ob die Anreicherung für den niedrigen Volumenbereich linear ist. Durch die Anwendung kleinerer Anreicherungsvolumina wäre zu erwarten, dass sich die Repräsentativität des Extrakts für die Zusammensetzung der Originalprobe verbessert. Die Adsorption von freien Aminosäuren und Peptiden am Sorbens könnte ferner unter Einsatz von Standardlösungen, die Aminosäurestandards oder enzymatisch teilverdaute Standardproteine beinhalten, weiter erforscht werden.

Zur Verbesserung der Extraktion organischer Substanzen mittels Festphasenextraktion wären Versuchsreihen denkbar, in denen Wasserproben mit nacheinander geschalteten Kartuschen angereichert werden. Die größere Oberfläche und die unterschiedlichen einsetzbaren

Sorbentien bieten dem organischen Material mehr Möglichkeiten, um mit der festen Phase zu interagieren. Sowohl höhere Extraktionseffizienzen als auch eine Partitionierung der organischen Substanzen in sorbensspezifische Fraktionen wären denkbar. Diese Vorabtrennung würde einen Beitrag dazu leisten, den großen DOM-Pool in nachfolgenden Analysen besser differenzieren zu können (z.B. FT-ICR-MS). Eine vorstellbare Kartuschenkombination ist beispielsweise PPL → NH₂ → C18. Dabei wäre zu erwarten, dass die PPL-Extraktionskartusche unspezifisch organische Substanzen anreichert, während alle Substanzen, die nicht retardiert werden, in eine unpolare (C18) und eine polare Fraktion (NH₂) aufgetrennt werden. Bei den Versuchsreihen könnte durch den Einsatz der Echtzeit-Fluoreszenzmessung des Durchflusses schon während der Extraktion eine Aussage über die Zu- oder Abnahme der Extraktionseffizienz gemacht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und früherer Studien zeigen, dass die DOC-Konzentration durch den Einsatz von Fluoreszenzmessungen bestimmt werden kann. Es wäre interessant inwieweit diese optische Methode mit den verwendeten Parametern das Potential für in-situ-Langzeitmessungen der DOC-Konzentration besitzt. Zu diesem Zweck müsste das Messsystem so optimiert und vereinfacht werden, dass es in eine Messstation integriert werden kann. Bei der Optimierung müssten Faktoren beachtet werden, wie die stetige Verschmutzung der Durchflussküvette durch Biofouling oder die Kondenswasserbildung im Inneren des Fluorometers aufgrund des Temperaturunterschieds. Anschließend müsste das Messsystem durch gleichzeitige Messungen der Fluoreszenz und der DOC-Konzentration (dazu Probenahmen des Wassers) für den Einsatz vor Ort kalibriert werden. Durch diese Langzeitmessungen des gelösten organischen Kohlenstoffs an verschiedenen Standorten könnten sich neue Einblicke in die globalen Kohlenstoffflüsse ergeben.

Die Etablierung eines weiteren Elutionsmittels (z.B. Acetonitril) nach Methanol zum Lösen von relativ unpolaren organischen Substanzen von Polymersorbentien sowie die Identifizierung dieser Substanzen sollte bei der Durchführung zukünftiger Extraktionen berücksichtigt werden. Zum Zweck einer genaueren Charakterisierung und Identifizierung dieser Substanzen wären weitere Untersuchungen mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrikopplung (LC-MS) von großem Interesse.

Außerdem wären weitere Untersuchungen bezüglich des salzinduzierten Größeneffekts auf polare organische Substanzen anzustreben. Vorstellbare Resultate wären neue Erkenntnisse bezüglich der Molekülstruktur und der formgebenden Faktoren der noch wenig charakterisierten Huminstoffe. Dabei sollten die Reproduzierbarkeit dieses Effekts sowie der Einfluss von Probenherkunft im Fokus künftiger Analysen stehen.

6. Quellen

- Aiken, G. R., Thurman, E. M., Malcolm, R. L., Walton, H. F. (1979): Comparison of XAD macroporous resins for the concentration of fulvic acid from aqueous solution. *Analytical Chemistry* 51, 1799–1803.
- Alberts, J.J., Takács, M. (2004): Total luminescence spectra of IHSS standard and reference fulvic acids, humic acids and natural organic matter: comparison of aquatic and terrestrial source terms. *Organic Geochemistry* 35, 243–256.
- Ariese, F., van Assema, S., Gooijer, C., Bruccoleri, A.G., Langford, C.H. (2004): Comparison of Laurentian fulvic acid luminescence with that of the hydroquinone/quinone model system: evidence from low temperature fluorescence studies and EPR spectroscopy. *Aquatic Sciences* 66, 86–94.
- Baker, A. (2001): Fluorescence excitation-emission matrix characterization of some sewage-impacted rivers. *Environmental Science and Technology* 35, 5, 948–953.
- Beck, K.C., Reuter, J.H., Perdue, E.M., (1974): Organic and inorganic geochemistry of some coastal plain rivers of the southeastern United States. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 38, 361–364.
- Benner, R., Biddanda B., Black B., McCarthy M. (1997): Abundance, size distribution, and stable carbon and nitrogen isotopic compositions of marine organic matter isolated by tangential-flow ultrafiltration. *Marine Chemistry* 57, 243–263.
- Bushaw, K.L., Zepp, R.G., Tarr, M.A., Schulz-Janders, D., Bourbonniere, R.A., Hodson, R.E., Miller, W.L., Bronk, D.A., Moran, M.A. (1996): Photochemical release of bioavailable nitrogen from aquatic dissolved organic matter. *Nature* 381, 404–407.
- Cameron, R.S., Thornton, B.K., Swift, R.S., Posner, A.M. (1972): Molecular weight and shape of humic acid from sedimentation and diffusion measurements on fractionated extracts, *J. Soil Sci.* 23, 394–408.
- Carlson, D.J., Mayer, L.M., Brann, M.L., Mague, T.H. (1985): Binding of monomeric organic compounds to macromolecular dissolved organic matter in seawater. *Marine Chemistry* 16, 141–153.
- Chen, W., Westerhoff, P., Leenheer, J.A., Booksh, K. (2003): Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology* 37, 5701–5710.
- Coble, P.G. (1996): Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry* 51, 4, 325–346.
- Cory, R.M., McKnight, D.M. (2005): Fluorescence spectroscopy reveals ubiquitous presence of oxidized and reduced quinones in dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology* 39, 8142–8149.

- Cory, R.M., Miller, M.P., McKnight, D.M., Guerard, J.J., Miller, P.L. (2010): Effect of instrument-specific response on the analysis of fulvic acid fluorescence spectra. *Limnology and Oceanography: Methods* 8, 67–78
- Dauwe B., Middelburg J.J. (1998): Amino acids and hexosamines as indicators of organic matter degradation state in North Sea sediments. *Limnology and Oceanography* 43, 782–798.
- Dauwe B., Middelburg J.J., Herman P.M.J., Heip C.H.R. (1999): Linking diagenetic alteration of amino acids and bulk organic matter reactivity. *Limnology and Oceanography* 44, 1809–1814.
- Dittmar, T., Koch, B., Hertkorn, N., Kattner, G. (2008): A simple and efficient method for the solid-phase extraction of dissolved organic matter (SPE-DOM) from seawater. *Limnology and Oceanography: Methods* 6, 230–235.
- Downing, B.D., Boss, E., Bergamaschi, B.A. Fleck, J.A., Lionberger, M.A., Ganju, N.K., Schoellhamer, D.H., Fujii, R. (2009): Quantifying fluxes and characterizing compositional changes of dissolved organic matter in aquatic systems in situ using combined acoustic and optical measurements. *Limnology and Oceanography: Methods* 7, 119–131
- Fellman, J.B., Miller, M.P., Cory, R.M., D'Amore, D.V., White, D. (2009): Characterizing Dissolved Organic Matter Using PARAFAC Modeling of Fluorescence Spectroscopy: A Comparison of Two Models. *Environmental Science and Technology* 43, 6228–6234
- Fontanals N., Marcé R.M., Borrull F. (2005): New hydrophilic materials for solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry* 24, 5, 395.
- Fontanals N., Marcé R.M., Borrull F. (2007): New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds. *Journal of Chromatography A*, 1152, 14–31.
- Francko, D.A., Heath, R.T. (1982): UV-sensitive complex phosphorus: association with dissolved humic material and iron in a bog lake. *Limnology and Oceanography* 27, 564–569.
- Głazewski R., Wójcik I. (2009): Preliminary Investigations of Relative Polarity of Dissolved Humic Substances in Select Lakes of the Ełk Discrit, Poland. *Polish Journal of Environmental Studies* 18, 4, 599–606.
- Hecky, R.E., Mopper, K., Kilham, P., Degens E.T. (1973): The amino acid and sugar composition of diatom cell walls. *Marine Biology* 19, 323–331.
- Hedges, J.I., Keil, R.G. (1995): Sedimentary organic matter preservations: an assessment and speculative synthesis. *Marine Chemistry* 49, 81–115.
- Hellebust, J. A. (1974): Extracellular products. In: Stewart, W. D. P. (ed.), *Algal Physiology and Biochemistry*. Botanical Monographs 10, 838–863.

- Hertkorn, N., Benner, R., Frommberger, M., Schmitt-Kopplin, P., Witt, M., Kaiser, K., Kettrup, A., Hedges, J. I. (2006): Characterization of a major refractory component of marine dissolved organic matter. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 70, 2990–3010.
- Hubberten, U., Lara R.J., Kattner, G. (1994): Amino acid composition of seawater and dissolved humic substances in the Greenland Sea. *Marine Chemistry* 45, 121–128.
- Kalle, K. (1949): Fluoreszenz und Gelbstoff im Bottnischen und Finnischen Meerbusen. *Ocean Dynamics*, 2, 117–124.
- Kim, H.C., Yu, M.J., Han, I. (2006): Multi-method study of characteristics chemical nature of aquatic humic substances isolated from the Han River, Korea. *Applied Geochemistry* 21, 1226.
- Kirkpatrick, G.J., Orrico, C., Moline, M.A., Oliver, M., Schofield, O.M. (2003): Continuous hyperspectral absorption measurements of colored dissolved organic material in aquatic systems. *Applied Optics* 42, 33, 6564.
- Kruger, B.R., Dalzell, B.J., Minor, E.C. (2011): Effect of organic matter source and salinity on dissolved organic matter isolation via ultrafiltration and solid phase extraction. *Aquatic Sciences* 73, 405–417.
- Laursen, A.K., Mayer, L.M., Townsend D.W. (1996): Lability of proteinaceous material in estuarine seston and subcellular fractions of phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* 136, 227–234.
- Lechtenfeld, O.J., Koch, B.P., Geibert, W., Ludwichowski, K.U., Kattner, G. (2011): Inorganics in Organics: Quantification of Organic Phosphorus and Sulfur and Trace Element Speciation in Natural Organic Matter Using HPLC-ICPMS. *Analytical Chemistry* 83, 8968–8974.
- Leenheer, J.A. (1981): Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of DOC from natural waters and wastewaters. *Environmental Science and Technology* 15, 587–592.
- Leenheer, J.A., Croué, J.P. (2003): Characterizing aquatic dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology* 37, 1, 18A –26A.
- Leeuw J.W. de, Largeau C. (1993): A review of macromolecular organic compounds that comprise living organisms and their role in kerogen, coal and petroleum formation. In: Engel M. H., Macko S. A. (eds.) *Organic Geochemistry principles and applications*. Plenum Publishing Corp., New-York. 23–72.
- León-González, M.E., Pérez-Arribas, L.V. (2000): Chemically modified polymeric sorbents for sample Preconcentration. *Journal of Chromatography A* 902, 3–16.

- Malcolm, R. L. (1985): Geochemistry of stream fulvic and humic substances. In: Aiken, G. R., McKnight, D. M., Wershaw, R. L. and MacCarthy, P. (eds.) *Humic Substances in Soil, Sediment, and Water: Geochemistry, Isolation and Characterization* 181–209, Wiley.
- Masqué N., Marcé R.M., Borrull F. (1998): Comparison of different sorbents for on-line solid-phase extraction of pesticides and phenolic compounds from natural water followed by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 793, 257–263
- McDonald, S., Bishop, A.G., Prenzler, P.D., Robards, K. (2004): Analytical chemistry of freshwater humic substances. *Analytica Chimica Acta* 527, 105.
- Millero, M.J. (1996): *Chemical Oceanography*, Second Edition, CRC Press
- Mostofa, K.M.G., Yoshioka, T., Konohira, E., Tanoue, E. (2007): Photodegradation of fluorescent dissolved organic matter in river waters. *Geochemical Journal* 41, 323–331.
- Nystrom, M., Ruohomaki, K., Kaipia, L. (1996): Humic acid as a fouling agent in filtration. *Desalination* 106, 79–87.
- Philibert, M., Bush, S., Rosario-Ortiz, F. L., Suffet, I. H. (2008): Advanced in the characterization of the polarity of DOM under ambient water quality conditions using the polarity rapid assessment method. *Water Science and Technology: Water Supply* 8, 6, 725–733.
- Peuravuori, J., Pihlaja, K. (1998): Multimethod characterization of lake aquatic humic matter isolated with sorbing solid and tangential membrane filtration. *Analytica Chimica Acta* 364, 203.
- Peuravuori J., Paaso, N., Pihlaja, K. (2002): Sorption behaviour of some chlorophenols in lake aquatic humic matter. *Talanta* 56, 523.
- Pingqing, F.U., Fengchang, W.U., Congqiang. L.I.U. (2004): Fluorescence Excitation-Emission Matrix Characterization of a Commercial Humic Acid. *Chinese Journal of Geochemistry* 23, 309–318.
- Ramsay, A. J. (1974): The use of autoradiography to determine the proportion of bacteria metabolizing in an aquatic habitat. *Journal of General Microbiology* 80, 363–373.
- Sakkas, V., Lambropoulou, D., Albanis, T. (2002): Photochemical degradation study of irgarol 1051 in natural waters: influence of humic and fulvic substances on the reaction. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 147, 135.
- Senesi, N. (1990): Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals. Part II. The fluorescence spectroscopy approach. *Analytica Chimica Acta* 232, 77–106.

- Shin, H.S., Monsallier, J.M., Choppin, G.R. (1999): Spectroscopic and chemical characterizations of molecular size fractionated humic acid. *Talanta* 50, 3, 641–647.
- Skopintsev, B.A. (1981): Decomposition of organic matter of plankton, humification and hydrolysis, In: Duursma, E.K., Dawson, R. (eds.) *Marine Organic Chemistry*. Elsevier, Amsterdam, 125–177.
- Smart, P.L., Finalyson, B.L., Rylands, W.D., Ball, C.M. (1976): The relation of fluorescence to dissolved organic carbon in surface waters. *Water Research* 10, 805–811.
- Spitzzy, A., Ittekkot, V. (1991): Dissolved and particulate organic matter in rivers. In: Mantoura R.F.C., Martin J.M., Wollast R. (eds.) *Ocean margin processes in global change*. Wiley, London, 5–17.
- Thurman, E.M., (1985): *Organic Geochemistry of Natural Waters*. Nijhoff/Junk, Dordrecht, Netherlands.
- Thurman, E.M. (1986): *Organic geochemistry of natural waters*. Dordrecht, Netherlands, Martinus Nijhoff/ Dr. W. Junk Publishers, 497 p.
- Tsutsuki, K., Kawatsuka, S. (1984): Molecular size distribution of humic acids as affected by the ionic strength and the degree of humification. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 30, 151–162.
- Vodacek, A., Blough, N.V., DeGrandpre, M.D., Peltzer, E.T., Nelson, R.K. (1997): Seasonal variation of CDOM and DOC in the Middle Atlantic Bight: Terrestrial inputs and photooxidation. *Limnology and Oceanography* 42, 4, 674–686.
- Williams, P.M., Druffel, E. (1988): Dissolved organic matter in the ocean: Comments in a controversy. *Oceanography* 1, 14–17.
- Wu, F.C., Tanoue, E. (2001): Molecular mass distributions and fluorescence characteristics of organic ligands for copper (II) in Lake Biwa, Japan. *Organic Geochemistry* 32, 1, 11–20.
- Wu, F.C., Midorikawa, T., Tanoue, E. (2001): Fluorescence properties of organic ligands for copper (II) in Lake Biwa and its rivers. *Geochemical Journal* 35, 5, 333–346.
- Xue, H., Sigg, L. (1999): Comparison of the Complexation of Cu and Cd by Humic or Fulvic Acids and by Ligands Observed in Lake Waters. *Aquatic Geochemistry* 5, 313.
- Yuan, W., Zydney, A.L. (1999): Humic acid fouling during microfiltration. *Journal of Membrane Science* 157, 1, 1–12.

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: Probenahmeorte P1-3, H1/H2 und F1/F2.....</i>	6
<i>Abb. 2: Tidekurve für den Zeitraum der Probenahme 1 und 2.</i>	7
<i>Abb. 3: Probenbehandlung – Ästuar-, Meeres-, Flussprobe.</i>	9
<i>Abb. 4: Probenbehandlung – Hafengewässerproben.</i>	10
<i>Abb. 5: Probenbehandlung – Flusswasserproben mit Salz.....</i>	11
<i>Abb. 6: Extraktionseffizienzen der Festphasenextraktion unterschiedlicher Volumina dreier Proben (Ästuar-, Meeres- und Flussprobe) unter Einsatz von PPL-Kartuschen.</i>	16
<i>Abb. 7: Extraktionseffizienzen der Festphasenextraktion unterschiedlicher Volumina dreier Proben (Ästuar-, Meeres- und Flussprobe) unter Einsatz von C8-Kartuschen.</i>	17
<i>Abb. 8: Elution des SPE-DOMs (Probe P3) von PPL-Kartuschen mit Methanol</i>	17
<i>Abb. 9: Festphasenextrahierbare gelöste organische Kohlenstoffmenge bezogen auf das Anreicherungsvolumen der mittels C8- und PPL-Kartuschen angereicherten Ästuar-, Meeres- und Flussprobe.</i>	18
<i>Abb. 10: Chromatogramme der mittels RP18-HPLC aufgetrennten Methanolextrakte (Extrakte der mittels C8- und PPL-Kartuschen angereicherten Ästuar-, Meeres- und Flussprobe (1000 mL)</i>	20
<i>Abb. 11: Vergleichende Darstellung des Anteils mittels PPL-Kartusche extrahierter, polarorganischer Substanzen bezüglich Probenart und Anreicherungsvolumen.....</i>	20
<i>Abb. 12: Vergleichende Darstellung des Anteils mittels C8-Kartusche extrahierter, polarorganischer Substanzen bezüglich Probenart und Anreicherungsvolumen.....</i>	21
<i>Abb. 13: Verlauf der Fluoreszenzintensität im Kartuschendurchfluss während der Festphasenextraktion – Vergleichende Darstellung der Flussprobenextraktion mittels C8- und PPL-Kartusche.</i>	22
<i>Abb. 15: Beziehung zwischen der theoretischen Fläche fluoreszierender, am Sorbens adsorbierter Substanzen und der Konzentration des festphasenextrahierbaren gelösten organischen Kohlenstoff.....</i>	23
<i>Abb. 16: Beziehung zwischen emittierter Fluoreszenzintensität und DOC-Konzentration des Durchflusses im Verlauf der Extraktion von Probe H1 (900 mL) mittels PPL-Kartusche.</i>	24
<i>Abb. 17: Beziehung zwischen emittierter Fluoreszenzintensität und DOC-Konzentration des Durchflusses im Verlauf der Extraktion von Probe H2 (100 mL) mittels PPL-Kartusche.</i>	24
<i>Abb. 18: Beziehung zwischen der Extinktion (210 nm) und der DOC-Konzentration der Methanolextrakte.....</i>	25
<i>Abb. 19: UV/Vis-Scans der Acetonitrilextrakte.....</i>	26
<i>Abb. 20: Chromatogramm eines per RP18-HPLC aufgetrennten Acetonitrilextrakts.....</i>	27
<i>Abb. 21: Extraktionseffizienzen der mit Salz versetzten Flussproben.</i>	28
<i>Abb. 22: Polarer Bereich der mittels RP18-HPLC aufgetrennten organischen Substanzen; polares Laufmittel: Reinstwasser pH 7</i>	29
<i>Abb. 23: Polarer Bereich der mittels RP18-HPLC aufgetrennten organischen Substanzen; polares Laufmittel: Phosphatpuffer.</i>	29

Abb. 24: Chromatogramm der mittels SEC-HPLC aufgetrennten organischen Substanzen; Laufmittel: Reinstwasser pH 7 30

Abb. 25: Chromatogramm der mittels SEC-HPLC aufgetrennten organischen Substanzen; Laufmittel: Phosphatpuffer 30

Abb. 26: Clusteranalyse der relativen Aminosäureverteilungen aller Methanolextrakte, die aus der Anreicherung unterschiedlicher Volumina der Ästuar-, Meeres- und Flussprobe mittels C8- und PPL-Kartuschen hervorgingen 32

Abb. 27: Hauptkomponentenanalyse der relativen Aminosäureverteilungen aller Methanolextrakte, die aus der Anreicherung unterschiedlicher Volumina der Ästuar-, Meeres- und Flussprobe mittels C8- und PPL-Kartuschen hervorgingen 32

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Probandetails 7

Tab. 2: Spezifikation der verwendeten Fertiggartuschen 8

Tab. 3: spectrasuite-Parameter der Fluoreszenzmessung 9

Tab. 4: Parameter nach Salzzugabe 10

Tab. 5: Grundeinheiten der Aminosäure-HPLC 12

Tab. 6: Gradientenprogramm der Aminosäureanalytik 13

Tab. 7: Gradientenprogramm der RP18-HPLC (Acetonitril) 13

Tab. 8: Grundeinheiten der HPLC 14

Tab. 9: Gradientenprogramm der RP18-HPLC (Methanol) 14

Tab. 10: DOC-Konzentration und C/N-Verhältnis der Originalproben 16

Tab. 11: Aminosäureverteilung der Methanolextrakte aller mittels PPL- und C8-Kartuschen angereicherten Proben – Vergleichende Darstellung der Verteilungen im Hinblick auf das verwendete Anreicherungsvolumen, sowie auf die Herkunft der angereicherten Proben und der verwendeten Kartuschenart 19

Tab. 12: Gemessene und berechnete DOC-Konzentration der Acetonitrilextrakte (PPL) 27

Tab. 13: Anregungs-Emissionswellenlängenpaare von Stoffen des aquatischen, natürlichen organischen Materials 34

Anhang

Anhang 1: Extinktion (210 nm), DOC- und TDN-Konzentrationen der Methanolextrakte und Extinktion (210 nm) der Acetonitrilextrakte (PPL); P1: Ästuarprobe, P2: Meeresprobe, P3: Flussprobe (Kap. 3.1.1, 3.2.2, 3.3)

	Angereichertes Volumen [mL]	DOC [μM]	TDN [μM]	Extinktion _{210 nm} (Methanolextrakte) [AU]	Extinktion _{210 nm} (Acetonitrilextrakte) [AU]
P1 - PP L	100	15127	260,5	11,9	0,64
	250	37632	1174	32,5	1,38
	500	73948	2454	57,1	2,40
	1000	138110	4964	102,2	3,90
P2 - PP L	100	7987	192,5	6,6	1,31
	250	17885	441,7	14,1	1,50
	500	33523	1283	22,6	2,47
	1000	62804	2260	37,4	3,68
P3 - PP L	100	12544	239,4	8,5	1,07
	250	26544	1113	17,4	1,31
	500	49294	2215	31,4	2,16
	1000	93086	4103	59,5	3,91
P1 - C8	100	8827	234,6	9,7	
	250	20608	1030	19,3	
	500	37807	810,2	32,3	
	1000	67032	1540	55,1	
P2 - C8	100	4908	-193,5	6,0	
	250	8978	438,9	9,4	
	500	16198	315,1	15,0	
	1000	29736	364,1	22,8	
P3 - C8	100	7054	-172,3	7,0	
	250	13522	352,2	12,7	
	500	26026	1149	22,2	
	1000	47908	1492	35,4	

Anhang 2: Peakdaten der mittels RP18-HPLC aufgetrennten organischen Substanzen der PPL-Methanolextrakte (Kap. 3.1.3); P1: Ästuarprobe, P2: Meeresprobe, P3: Flussprobe, RZ: Retentionszeit

	Angereichertes Volumen [mL]	RZ	Fläche	RZ	Fläche	RZ	Fläche	RZ	Fläche	RZ	Fläche	RZ	Fläche	
P1	L	100	4,1	11729018	4,947	8721414	8,973	658077	16,347	6072017	-	-	-	-
	PP	250	4,293	19364770	4,973	22437739	8,947	1196999	16,373	16662572	-	-	-	-
	·	500	4,387	26570127	5,12	46371655	8,92	1403916	12,833	861110	16,4	35367538	-	-
	L	1000	4,48	37047093	5,193	85266266	8,893	1873603	9,753	370410	12,927	3224758	16,44	103151195
P2	L	100	3,993	3291048	4,987	2731211	8,947	335686	16,353	1853376	-	-	-	-
	PP	250	4,1	7001216	4,98	6910095	8,94	637702	16,353	6372074	-	-	-	-
	·	500	4,127	9596720	4,927	15032569	8,947	1056746	16,347	13514205	-	-	-	-
	L	1000	4,327	14277013	5,1	30180034	8,947	1456610	12,627	206707	16,387	26279004	-	-
P3	L	100	2,907	30299	3,767	653440	4,313	274075	5,767	4918677	8,927	455027	16,353	5399453
	PP	250	2,913	29057	3,94	2276539	-	-	5,753	10994309	8,947	870064	16,535	13750614
	·	500	-	-	3,887	3467261	-	-	5,767	19827185	8,947	1342495	16,373	26925350
	L	1000	2,853	35874	3,853	2078730	4,62	685535	5,933	28242893	8,92	1433655	16,407	59213982

Anhang 3: Peakdaten der mittels RP18-HPLC aufgetrennten organischen Substanzen der C8-Methanolextrakte (Kap. 3.1.3); P1: Ästuarprobe, P2: Meeresprobe, P3: Flussprobe, RZ: Retentionszeit

	Angereichertes Volumen [mL]	RZ	Fläche	RZ	Fläche	RZ	Fläche	RZ	Fläche	RZ	Fläche	RZ	Fläche	
P1	C8	100	3,053	59855	3,913	4223611	5,04	4330412	8,96	378645	16,36	3149268	-	-
	·	250	3,08	128312	4	10314485	4,933	9095774	8,973	646972	16,367	8587493	-	-
	·	500	3,06	366147	4,04	16139274	4,927	15718771	8,947	953642	16,36	18668885	-	-
	L	1000	3,06	877366	4,06	16893716	4,647	2971915	5,12	27244242	8,947	1373812	12,967	1111385
P2	C8	100	3,84	1439751	4,793	659459	8,953	188133	16,34	1074507	-	-	-	-
	·	250	3,06	122815	3,873	2216994	4,907	1532139	8,933	263937	16,333	2228681	-	-
	·	500	3,033	250082	3,893	3404257	5,02	3243890	8,94	390438	16,367	6721006	-	-
	L	1000	3,047	820394	3,96	7650941	4,84	5126384	8,94	558179	16,387	12510817	-	-
P3	C8	100	3,02	56146	3,893	871870	4,607	502186	8,96	235077	16,547	1380621	-	-
	·	250	2,993	151007	3,907	2192246	4,58	1264085	8,933	318971	16,347	5293849	-	-
	·	500	3	414803	3,92	3474490	4,727	3016395	8,933	461084	16,387	13314859	-	-
	L	1000	2,993	655368	3,947	5844415	4,713	5989675	8,933	898904	16,433	24586634	-	-

Anhang 4: DOC- und TDN-Konzentrationen der Hafengewässer- und Flusswasserproben (Kap. 3.2.1 und 3.4)

Originalprobe	DOC [μM]	TDN [μM]
Hafengewässer (H1)	382,1	67,8
Hafengewässer (H2)	378,1	65,5
Flusswasser (F1)	247,3	219,4
Flusswasser (F2)	200,8	215,5

Anhang 5: Extinktion (210 nm), DOC- und TDN-Konzentrationen der Methanolextrakte (Kap. 3.2.1 und 3.4); n.b.: nicht bestimmt

Probe	Angereichertes Volumen [mL]	DOC [μM]	TDN [μM]	Extinktion _{210 nm} [AU]
Hafengewässer (H1)	900	158200	6316	120,5
Hafengewässer (H2)	100	19796	731,9	15,7
Flusswasser (F1) 0 g/L NaCl	150	16877	727,6	11,8
Flusswasser (F1) 8,75 g/L NaCl	150	16716	570,3	12,1
Flusswasser (F1) 17,5 g/L NaCl	150	16807	603,2	11,9
Flusswasser (F1) 26,25 g/L NaCl	150	15806	522,1	11,5
Flusswasser (F1) 35 g/L NaCl	150	15603	533,3	11,4
Flusswasser (F2) 0 g/L NaCl	150	14224	512,5	n.b.
Flusswasser (F2) 8,75 g/L NaCl	150	13717	506,4	n.b.
Flusswasser (F2) 17,5 g/L NaCl	150	13809	733,6	n.b.
Flusswasser (F2) 26,25 g/L NaCl	150	14067	541,7	n.b.
Flusswasser (F2) 35 g/L NaCl	150	14546	644,8	n.b.

Anhang 6: Relative Fluoreszenz, DOC- und TDN-Konzentrationen des Durchflusses während der Festphasenextraktion von Probe H1 (Kap. 3.2.1, Abb. 16)

Angereichertes Volumen [mL]	Relative Fluoreszenz [counts]	DOC [µM]	TDN [µM]
92,1	37609	148,3	54,4
184,2	50227	153,0	54,1
276,3	60101	164,0	51,9
368,4	67404	164,1	91,6
460,5	74279	163,5	62,1
552,6	80410	168,4	58,1
644,7	86650	176,7	82,9
736,8	90374	174,7	68,6
828,9	95471	184,1	63,0
890,3	98611	190,7	65,7

Anhang 7: Relative Fluoreszenz, DOC- und TDN-Konzentrationen des Durchflusses während der Festphasenextraktion von Probe H2 (Kap. 3.2.1, Abb. 17); korrigierte DOC-Werte in Klammern

Angereichertes Volumen [mL]	Relative Fluoreszenz [counts]	DOC [µM]	TDN [µM]
3,7	7725	138,3 (82,1)	38,63
11,1	13299	99,73 (86,0)	40,45
18,5	16848	92,42	43,49
25,9	19622	95,5	40,61
33,3	21761	99,67	43,63
40,7	23730	104,8	42,97
48,1	25391	107,8	43,29
55,5	26966	109,8	43,21
62,9	28650	110,5	44,56
70,3	29816	113,6	44,89
77,7	31166	114,5	44,8
85,1	32272	118,1	45,65
92,5	33494	121,3	48,34

Anhang 8: Mittels RP18-HPLC aufgetrennte organische Substanzen des Methanolextrakts der angereicherten, mit Salz versetzten Flussprobe F1 (Kap. 3.4)

