

Band 40

Schriftenreihe des Lehrstuhls für Wasserchemie und  
der DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut  
der Universität Karlsruhe (TH)

**Bewertung von Anreicherungs- und Fraktionierungs-  
verfahren für die strukturelle Charakterisierung der  
gelösten organischen Substanz in Gewässern**

Margit B. Müller

Herausgeber  
Fritz H. Frimmel

Karlsruhe 2004

Margit B. Müller

Bewertung von Anreicherungs- und Fraktionierungsverfahren für die strukturelle Charakterisierung der gelösten organischen Substanz in Gewässern

Herausgeber: Fritz H. Frimmel

Band 40

Schriftenreihe des Lehrstuhls für Wasserchemie und der DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut der Universität Karlsruhe (TH)

Karlsruhe 2004

ISSN: 1612-118X

Lehrstuhl für Wasserchemie und DVGW-Forschungsstelle  
am Engler-Bunte-Institut der Universität Karlsruhe (TH)

Engler-Bunte-Ring 1

D-76131 Karlsruhe

Tel.: +49-(0)721-608-2580

Fax: +49-(0)721-699154

E-mail: [fritz.frimmel@ebi-wasser.uni-karlsruhe.de](mailto:fritz.frimmel@ebi-wasser.uni-karlsruhe.de)

<http://www.wasserchemie.uni-karlsruhe.de>

Titelbild: Ultrafiltrationsfraktionen der gelösten organischen Substanz des Hohlohsees,  
<sup>13</sup>C MAS NMR-Spektrum der Hohlohsee-Originalprobe (HO21) und  
Strukturformel des (+)-Catechins.

Dieses Werk wird durch das deutsche Urheberrechtsgesetz und internationale Verträge urheberrechtlich geschützt. © 2004 Prof. Dr. F. H. Frimmel. Alle Rechte vorbehalten. All rights reserved.

# **Bewertung von Anreicherungs- und Fraktionierungs- verfahren für die strukturelle Charakterisierung der gelösten organischen Substanz in Gewässern**

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
**Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)**  
an der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik  
der Universität Fridericiana Karlsruhe (TH)

genehmigte

**Dissertation**

von

**Dipl.-Geoökol. Margit B. Müller**

aus Sindelfingen

Tag des Kolloquiums: 07.07.2004  
Referent: Prof. Dr. Dr. F. H. Frimmel  
Korreferent: Prof. Dr.-Ing. C. Posten



## **Vorwort**

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 1998 bis Juli 2004 am Lehrstuhl für Wasserchemie der Universität Karlsruhe. Für die wertvolle Mitarbeit und Unterstützung möchte ich mich an dieser Stelle bei vielen Menschen bedanken.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Fritz H. Frimmel für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe sowie die stets vorhandene mentale und finanzielle Unterstützung und Förderung. Durch seine liberale Gangart, insbesondere aber durch seine Offenheit für Neues und seine Begeisterungsfähigkeit hat er es mir ermöglicht, selbständig zu arbeiten und verschiedenste Forschungsinteressen zu verfolgen.

Herrn Prof. Clemens Posten danke ich für die Übernahme des Korreferats und für zahlreiche interessante Fragen und Anregungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt allen, die durch experimentelle Arbeiten zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Herrn Dr. Ulrich Lankes danke ich für die exzellente Durchführung der kernresonanzspektroskopischen Messungen und die tatkräftige Unterstützung bei der Auswertung, Interpretation und Veröffentlichung der Messergebnisse. Herrn Dr. Sebastian Hesse, Axel Heidt und Gabi Kolliopoulos danke ich für die Mithilfe bei der Probennahme und –anreicherung bzw. die Durchführung von SEC-UV/OCD Messungen. Bei Dr. Philip Hörsch und Peter Krolla-Sidenstein (Forschungszentrum Karlsruhe) bedanke ich mich herzlich für ihre sachkundige Unterstützung bei biologischen Fragestellungen und Methoden. Frau Christel Weins (MPI für Informatik, Saarbrücken) danke ich für ihre kompetente Einführung in das Gebiet der Dünnschichtchromatographie und Bioautographie. Für ihr sorgfältiges und fleißiges Arbeiten danke ich meinen Seminar- und Diplomarbeitern Vera Hübner, Anubha Goel, Shweta Tripathi, Wolfgang Fritz, Christine Dausend und Carola Neidhardt sowie meinen HiWis Esther Geiß, Simon Gropp, Djaka Camara, Daniel Rossol und Agus Wijaya. Die Zusammenarbeit mit ihnen allen war lehrreich, spannend und produktiv.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes gilt mein Dank für ihre Hilfsbereitschaft und für die gute Arbeitsatmosphäre, in der ich mich sehr wohl gefühlt habe. Danken möchte ich insbesondere Frau Dr. Gudrun Abbt-Braun für ihr unermüdliches und unverzichtbares organisa-

torisches Arbeiten. Meinen Bürokollegen Dr. Thomas Brinkmann und Dr. Mariana Neamtu danke ich für gemeinsame Gespräche ebenso wie für gemeinsames „stilles“ Arbeiten in angenehmer Umgebung.

Danken möchte ich weiterhin Dr. Thomas Brinkmann, Dr. Ulrich Lankes, Dr. Jörg Meyer und Dr. Daniel Schmitt für ihre sorgfältigen und kritischen Korrekturen, die sich in ihrer Gesamtheit positiv auf die Qualität dieser Arbeit ausgewirkt haben.

Diese Arbeit wurde unter anderem mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des Projektes „Einsatz eines neuen summarischen Konzepts für die wirkungsspezifische Beurteilung der organischen Belastung eines Gewässers (WISBOB)“ gefördert. Ein Reisestipendium der International Humic Substances Society (IHSS) ermöglichte die Präsentation eines Teils der Ergebnisse beim 12<sup>th</sup> IHSS Meeting in São Pedro, Brasilien im Jahr 2004.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern Judith und Wilhelm Müller für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit bedanken.

You need to challenge yourself.

Kelly K. Falkner





# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1</b>	<b>Gelöste organische Substanz in Gewässern.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2</b>	<b>Anreicherung und Isolierung von gelöster organischer Substanz .....</b>	<b>8</b>
<b>2.3</b>	<b>Fraktionierung von gelöster organischer Substanz.....</b>	<b>9</b>
2.3.1	Größenausschlusschromatographie, Size Exclusion Chromatography (SEC).....	9
2.3.2	Ultrafiltration .....	15
<b>2.4</b>	<b>Physikochemische Charakterisierung der gelösten organischen Substanz.....</b>	<b>18</b>
2.4.1	Elementaranalyse .....	18
2.4.2	UV/Vis-Spektroskopie .....	19
2.4.3	Fluoreszenzspektroskopie .....	20
2.4.4	NMR-Spektroskopie .....	21
2.4.5	Analytische SEC .....	26
2.4.6	Asymmetrische Fluss Feld-Fluss-Fraktionierung (AF <sup>4</sup> ).....	27
<b>2.5</b>	<b>Modellschadstoffe .....</b>	<b>27</b>
2.5.1	Alkylphenoethoxylate .....	28
2.5.2	Coffein .....	32
2.5.3	Analytik mittels Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie .....	32
<b>3</b>	<b>Experimentelle Angaben.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Gelöste organische Substanz.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>Anreicherung von gelöster organischer Substanz .....</b>	<b>37</b>
<b>3.3</b>	<b>Fraktionierung von gelöster organischer Substanz.....</b>	<b>38</b>
3.3.1	Fraktionierung mittels SEC.....	38
3.3.1.1	Vorgehensweise bei der SEC-Fraktionierung.....	38
3.3.1.2	Kalibrieren der SEC-Säulen.....	40
3.3.1.3	Ermittlung des DOC-Eintrags.....	40
3.3.2	Fraktionierung mittels mehrstufiger Ultrafiltration (mst-UF) .....	40
3.3.2.1	Vorgehensweise bei der mst-UF-Fraktionierung.....	40

3.3.2.2	Überprüfen der UF-Membranen .....	42
3.3.2.3	Ermittlung des DOC-Eintrags .....	42
<b>3.4</b>	<b>Physikochemische Charakterisierung der gelösten organischen Substanz .....</b>	<b>43</b>
3.4.1	Probenvorbereitung .....	43
3.4.2	Elektrische Leitfähigkeit und pH-Wert .....	44
3.4.3	DOC-Gehalt .....	44
3.4.4	Elementaranalyse .....	45
3.4.5	UV/Vis-Spektroskopie .....	46
3.4.6	Fluoreszenz-Spektroskopie .....	46
3.4.7	NMR-Spektroskopie .....	46
3.4.8	Analytische SEC .....	47
3.4.9	Asymmetrische Fluss Feld-Fluss-Fraktionierung .....	48
<b>3.5</b>	<b>Fraktionierung von Modellschadstoffen .....</b>	<b>49</b>
3.5.1	Modellschadstoffe .....	49
3.5.2	Analytik der Modellschadstoffe .....	50
3.5.2.1	Bestimmung von 4-NP und NPEO – Kammermethode .....	51
3.5.2.2	Bestimmung von 4-NP und NPEO – AMD-Methode .....	51
3.5.2.3	Bestimmung von Coffein .....	52
3.5.3	Fraktionierung von Modelllösungen durch mehrstufige Ultrafiltration .....	52
3.5.4	Extraktion der Modellschadstoffe aus Fraktionen und Membranen .....	53
<b>4</b>	<b><i>Ergebnisse und Diskussion</i> .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>Stabilität gelöster organischer Substanz über die Zeit .....</b>	<b>55</b>
4.1.1	Stabilität angereicherter Proben .....	55
4.1.2	Stabilität von Fraktionen .....	58
<b>4.2</b>	<b>Einflussparameter der SEC .....</b>	<b>60</b>
4.2.1	Einfluss des Säulenmaterials .....	61
4.2.2	Einfluss der Probeneigenschaften .....	63
4.2.2.1	DOC-Konzentration .....	63
4.2.2.2	Ionenstärke .....	65
4.2.2.3	pH-Wert .....	68
<b>4.3</b>	<b>Anreicherung gelöster organischer Substanz für die SEC-Fraktionierung .....</b>	<b>69</b>
4.3.1	Vergleich verschiedener Anreicherungsverfahren .....	70
4.3.2	Anreicherung der Proben HO und Alb5 mittels Ultrafiltration .....	75

<b>4.4</b>	<b>Vergleich der Fraktionierungsmethoden SEC und mst-UF .....</b>	<b>80</b>
4.4.1	Kalibrierung mit Molmassenstandards .....	80
4.4.2	Reproduzierbarkeit.....	82
4.4.3	DOC-Eintrag .....	83
4.4.4	Fraktionierung der Proben HO12 K a und Alb5 K.....	83
4.4.4.1	DOC-Konzentration der Fraktionen.....	84
4.4.4.2	Molekülgrößenverteilung der Fraktionen .....	85
4.4.4.2.1	Asymmetrische Fluss Feld-Fluss-Fraktionierung.....	85
4.4.4.2.2	Analytische SEC .....	86
<b>4.5</b>	<b>Fraktionierung gelöster organischer Substanz natürlichen Ursprungs (HO) .....</b>	<b>89</b>
4.5.1	Fraktionierung mittels SEC (Probe HO12 K b).....	89
4.5.1.1	Molekülgrößenverteilung und Basisparameter der Fraktionen.....	91
4.5.1.2	Dialyse der SEC-Fraktionen .....	94
4.5.1.3	<sup>13</sup> C MAS NMR-spektroskopische Charakterisierung der Fraktionen .....	101
4.5.1.4	Interpretation der Ergebnisse der strukturellen Charakterisierung im Hinblick auf Trennmechanismen der SEC.....	113
4.5.2	Fraktionierung mittels mst-UF (Probe HO21 K) .....	118
4.5.2.1	Molekülgrößenverteilung und Basisparameter der Fraktionen.....	119
4.5.2.2	<sup>13</sup> C MAS NMR-spektroskopische Charakterisierung der Fraktionen .....	121
4.5.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der SEC- und mst-UF-Fraktionierung der Braunwasserproben.....	126
<b>4.6</b>	<b>Fraktionierung gelöster organischer Substanz anthropogenen Ursprungs (Alb5).....</b>	<b>129</b>
4.6.1	Molekülgrößenverteilung und Basisparameter der mst-UF-Fraktionen .....	129
4.6.2	Charakterisierung der chemischen Strukturen auf der Grundlage von Literaturdaten .....	134
4.6.3	Biologische Schadwirkungen von mst-UF-Fraktionen der Probe Alb5 .....	136
<b>4.7</b>	<b>Verhalten von Modellschadstoffen bei der Fraktionierung mittels mehrstufiger Ultrafiltration .....</b>	<b>137</b>
4.7.1	Analytik der Modellschadstoffe.....	137
4.7.2	Verhalten der Modellschadstoffe bei der mst-UF-Fraktionierung.....	141

<b>5</b>	<b><i>Zusammenfassung und Ausblick</i></b> .....	<b>147</b>
	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b> .....	<b>153</b>
	<b><i>Verzeichnis der Abbildungen</i></b> .....	<b>163</b>
	<b><i>Verzeichnis der Tabellen</i></b> .....	<b>167</b>
	<b><i>Abkürzungs- und Symbolverzeichnis</i></b> .....	<b>169</b>
 <b><i>Anhang</i></b>		
<b>Anhang A</b>	Ethoxylatverteilung von NPEO-Gemischen.....	<b>175</b>
<b>Anhang B</b>	Probenauftragung auf die HPTLC-Platten.....	<b>176</b>
<b>Anhang C</b>	Programm der AMD-Entwicklung zur Trennung von 4-NP und NPEO.....	<b>177</b>
<b>Anhang D</b>	PSS-Kalibrierung der SEC-Trennsäulen.....	<b>178</b>
<b>Anhang E</b>	Ergänzungen zu Kapitel 4.1.....	<b>179</b>
<b>Anhang F</b>	Ergänzungen zu Kapitel 4.2.....	<b>180</b>
<b>Anhang G</b>	Ergänzungen zu Kapitel 4.4.....	<b>181</b>
<b>Anhang H</b>	Ergänzungen zu Kapitel 4.5.....	<b>184</b>
<b>Anhang I</b>	Ergänzungen zu Kapitel 4.6.....	<b>185</b>

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Gelöste organische Substanz (Dissolved Organic Matter, DOM) ist in allen aquatischen Systemen vorhanden. Die Zusammensetzung und Konzentration der DOM verschiedener Gewässer kann sehr unterschiedlich sein (LEENHEER UND CROUÉ 2003). DOM können sowohl natürliche Verbindungen als auch Stoffe anthropogener Herkunft enthalten. In der Mehrzahl der aquatischen Systeme überwiegt der Anteil der Verbindungen natürlichen Ursprungs. Unter diesen stellen die Huminstoffe (HS) den größten Anteil dar (FRIMMEL 2001). Für das Verhalten der DOM in Gewässern und bei der Wasseraufbereitung sind Molekülgröße und chemische Struktur von entscheidender Bedeutung. Durch Wechselwirkungen mit organischen Schadstoffen und Metallen kann DOM deren Löslichkeit, Transport und Bioverfügbarkeit in Gewässern beeinflussen (ENFIELD ET AL. 1989, SUFFET UND MACCARTHY 1989). Sowohl die Wechselwirkung der DOM mit anderen Wasserinhaltsstoffen als auch ihr Verhalten bei verschiedenen Verfahren der Wasseraufbereitung wie (Membran-)Filtration, Flockung, Adsorption oder Oxidation ist abhängig von der Molekülgröße (BECHER ET AL. 1985, JOHANNSEN ET AL. 1993, KILDUFF ET AL. 1996, CHIN ET AL. 1997, FRIMMEL ET AL. 2001, SCHMITT 2002, MYLLYKANGAS ET AL. 2002). Es wird angenommen, dass das unterschiedliche Verhalten verschiedener DOM-Größenfraktionen zum Teil auf unterschiedliche hydrodynamische Eigenschaften, vor allem aber auf strukturelle Unterschiede zurückzuführen ist.

Um das Verhalten von DOM in Gewässern und bei der Wasseraufbereitung besser zu verstehen, ist es wichtig, die Molekülgrößenverteilung und die chemischen Strukturen der DOM zu kennen. Von besonderem Interesse sind Informationen über die unterschiedliche Verteilung der Strukturbestandteile in verschiedenen Größenfraktionen der DOM. Strukturuntersuchungen erfordern oft eine aufwändige Probenvorbehandlung: Für viele Verfahren zur Charakterisierung von DOM ist wegen der geringen natürlichen Konzentrationen eine vorherige Anreicherung notwendig. Die Herstellung von Fraktionen ist zudem sehr zeitaufwändig. Lange Bearbeitungs- und Lagerungszeiträume sowie durch einzelne Herstellungsschritte verursachte Veränderungen der Probenzusammensetzung (Salzgehalt, pH-Wert) können chemische Veränderungen der Probe verursachen.

DOM-haltige Lösungen werden unter anderem mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatography, SEC) und der Ultrafiltration (UF) fraktioniert. Unter idealen Bedingungen werden die gelösten organischen Moleküle dabei nach ihrem hydrodynamischen

Radius aufgetrennt. Durch Wechselwirkungen der Probenbestandteile mit dem Trennmedium (SEC-Säulenmaterial, UF-Membran) kann die Größentrennung jedoch beeinträchtigt werden (MORI UND BARTH 1999). Dies gilt insbesondere für die Fraktionierung polyfunktioneller Gemische wie HS oder DOM (POSNER 1963, SWIFT UND POSNER 1971, AHO UND LEHTO 1984). Bei der Fraktionierung derartiger Proben sind daher aus dem Elutionsverhalten der Probenbestandteile nur eingeschränkt Rückschlüsse auf deren Molekülgröße möglich.

Bisher liegen nur unzureichende Kenntnisse darüber vor, wie sich die Zusammensetzung der DOM bei verschiedenen Anreicherungs- und Fraktionierungsschritten verändert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, verschiedene Verfahren für die Anreicherung und Fraktionierung von DOM-haltigen Wässern systematisch zu untersuchen und zu bewerten. Auf der Basis dieser Untersuchungen war dann die Identifikation der Strukturbestandteile der DOM in verschiedenen Größenfraktionen zu betreiben.

Ein grundlegendes Problem bei diesen Untersuchungen ist die zeitliche Stabilität von DOM-Lösungen in Abhängigkeit von der Konzentration der DOM sowie der Lagerungsdauer. Zur Überprüfung der zeitlichen Stabilität sind verschiedene analytische Methoden (analytische SEC,  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektroskopie) geeignet (Kap. 4.1). Darüber hinaus war als Grundlage für die präparative Fraktionierung mittels SEC der Einfluss verschiedener Probeneigenschaften (Konzentration, Ionenstärke, pH-Wert) auf die Trennung zu untersuchen (Kap. 4.2). Für die Gewinnung angereicherter Proben stehen verschiedene Methoden (Rotationsverdampfung, Adsorption an XAD-Harz, Ultrafiltration) zur Verfügung. Als Kriterien zur Bewertung dieser Methoden waren die Wiederfindung der DOM (Massenbilanz) und die Eignung der Konzentrate für die nachfolgende SEC-Fraktionierung heranzuziehen (Kap. 4.3).

Um die unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Trennmedium und Probenmolekülen zu erfassen, waren SEC und Ultrafiltration als Fraktionierungsmethoden miteinander zu vergleichen. Die Molekülgrößenverteilung der Fraktionen lässt sich durch Einsatz der asymmetrischen Fluss Feld-Fluss-Fraktionierung (AF<sup>4</sup>) als unabhängiger Methode untersuchen (Kap. 4.4).

Auf der Grundlage des detaillierten Vergleichs der Anreicherungs- und Fraktionierungsmethoden war eine belastbare Identifizierung von Strukturbestandteilen der DOM-Größenfraktionen zu erwarten. Die chemischen Strukturen der Originalproben und Fraktionen können mit Hilfe der  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden. Zur physikochemischen Charakterisierung der DOM waren zusätzlich weitere spektroskopische Methoden (UV/Vis- und Fluoreszenz-

Spektroskopie) sowie Methoden zur Untersuchung der Molekülgrößenverteilung einzusetzen (AF<sup>4</sup>, analytische SEC)

Um zu verallgemeinernden Aussagen zu kommen, sollten SEC- und UF-Fractionen von DOM unterschiedlicher Herkunft untersucht werden. Um den anthropogenen Einfluss auf die DOM der Gewässer zu erfassen, sollten typische Stoffe eines Kläranlagenablaufs (Probe Alb5, Kap. 4.6) mit DOM natürlicher Herkunft aus einem Braunwassersee (Probe Hohlohsee, Kap. 4.5) auf der Basis ihres Fraktionierungsverhaltens verglichen werden. Die Auswahl des Hohlohsees erfolgte aufgrund seiner Bedeutung als national und international bekanntes Huminstoff-Referenzgewässer. In Ergänzung zu früheren Arbeiten (siehe z. B. HUBER UND FRIMMEL 1996, FRIMMEL ET AL. 2002) sollten insbesondere die chemischen Strukturen der SEC-Fractionen der Hohlohsee-DOM identifiziert werden. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse ist eine bessere Interpretation der SEC-Chromatogramme zu erwarten.

In einer früheren Arbeit wurde die Schadwirkung höhermolekularer DOM-Fractionen auf die Wechselwirkung der DOM mit niedermolekularen Schadstoffen zurückgeführt (FORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE GMBH, PtWT+E 2002). Da diese Wechselwirkung für die Ökologie der Gewässer von weitreichender Bedeutung ist, sollte die Wechselwirkung von DOM-Größenfractionen mit typischen Abwasserinhaltsstoffen untersucht werden. Es wurden exemplarisch das synthetische 4-Nonylphenol (4-NP) und die Nonylphenoethoxylate (NPEO) sowie Coffein als Modellschadstoffe (MSS) ausgewählt. 4-NP und NPEO sind aufgrund ihrer estrogenen und toxischen Wirkungen sowie ihrer Hydrophobizität von ökotoxikologischem Interesse. Coffein kann als ubiquitärer Abwasserinhaltsstoff als Indikator für anthropogene Einflüsse auf Gewässer herangezogen werden. Durch UF der MSS in Ab- und Anwesenheit von DOM war zu untersuchen, ob eine größen- bzw. strukturelektive Anreicherung von MSS infolge von Wechselwirkungen zwischen MSS und DOM-Fractionen zu beobachten ist. Zum Nachweis der MSS war eine Analysenmethode unter Einsatz der High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) mit automatischer Mehrfachentwicklung (Automated Multiple Development, AMD) zu entwickeln (Kap. 4.7). Durch die Etablierung der HPTLC als Analysenverfahren sollte über den Rahmen dieser Arbeit hinaus eine Grundlage für den Einsatz der Methode für die wirkungsbezogene Analytik von estrogen wirksamen Schadstoffen geschaffen werden.





## 2 Grundlagen

### 2.1 Gelöste organische Substanz in Gewässern

Gelöste organische Substanz (Dissolved Organic Matter, DOM) ist ubiquitär in allen aquatischen Systemen vorhanden. Zusammensetzung und Konzentration der DOM können von System zu System stark variieren (LEENHEER UND CROUÉ 2003). Die Konzentration der DOM wird üblicherweise in Form des Summenparameters gelöster organischer Kohlenstoff (Dissolved Organic Carbon, DOC) angegeben. Dieser beinhaltet per Definition alle organischen Substanzen, welche nach Filtration einer wässrigen Probe über einen Filter mit der Porengröße 0,45 µm und Oxidation zu CO<sub>2</sub> im Filtrat gemessen werden können. Die DOC-Konzentrationen in Gewässern liegen nach THURMAN (1985) für Meerwässer zwischen 0,2 und 2,0 mg/L, für Grundwässer zwischen 0,1 und 2,0 mg/L, für Fließgewässer zwischen 1 und 10 mg/L und für stehende Gewässer zwischen 1 und 50 mg/L.

Der Großteil der DOM in natürlichen Gewässern besteht aus Huminstoffen (HS) (FRIMMEL 2001). Der Begriff „Huminstoffe“ bezeichnet ein heterogenes Gemisch aus verschiedenen natürlichen organischen Substanzen biogenen Ursprungs, deren genaue Zusammensetzung und Struktur unbekannt sind (HAYES ET AL. 1989, SWIFT 1999). HS besitzen eine gelb-braune Farbe, vermögen zu fluoreszieren und weisen Molmassen zwischen 500 und 5000 g/mol auf (CHRISTMAN UND GHASSEMI 1966, AIKEN ET AL. 1985). Wegen ihrer breiten Molmassenverteilung und ihrer zahlreichen funktionellen Gruppen werden HS oft als polydisperse und polyfunktionelle (polyelektrolytische) Substanzen bezeichnet (SWIFT 1989). Die Bildung der HS erfolgt hauptsächlich durch biotische Vorgänge. Hierbei werden zwei mögliche Entstehungswege angenommen. Dies sind zum einen die biochemische Modifikation höhermolekularer Vorläufersubstanzen durch oxidativen Abbau und zum anderen die Neusynthese von Molekülen durch Mikroorganismen (HAYES ET AL. 1989). Durch den oxidativen Abbau werden schlecht biologisch verwertbare Verbindungen relativ angereichert. Dies begründet den refraktären Charakter der HS. Als Vorläufersubstanzen der HS kommen alle Stoffgruppen in Frage, die als strukturbildende Elemente Bestandteile von Lebewesen sind. Die Vorläufersubstanzen der aquatischen HS stammen aus autochthonen (Gewässerorganismen, z. B. Algen) und allochthonen Quellen (Pflanzen, Boden) (FRIMMEL 2001). Bei den pflanzlichen Vorläufersubstanzen sind als mengenmäßig bedeutendste Stoffgruppen strukturbildende Kohlenhydrate wie Cellulosen und Hemicellulosen sowie Lignine und Proteine zu nennen (NUHN 1997). Weitere, für die hier betrachteten aquatischen Huminstoffe wichtige Ausgangssubstanzen sind kondensierte Tannine

und Terpenoide sowie die als Bestandteile von Pilzen und Bakterien vorkommenden Polysaccharide Chitin und Murein (Peptidoglykan) (LANKES 2001, LEENHEER ET AL. 2003).

Aufgrund der Heterogenität der HS ist die Bezeichnung „Huminstoffe“ operationell definiert. HS werden anhand ihrer Löslichkeit in Mineralsäuren unterschieden in die säureunlöslichen Huminsäuren (Humic Acids, HAs) und in die säure- und alkalilöslichen Fulvinsäuren (Fulvic Acids, FAs) (AIKEN ET AL. 1985). In Oberflächengewässern betragen die Massenanteile der HS an der DOM zwischen 40 und 60 %. In Moorwässern können mehr als 80 % erreicht werden. Der Großteil der aquatischen Huminstoffe besteht aus FAs (ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002, LEENHEER UND CROUÉ 2003). Diese unterscheiden sich von den HAs durch ihre niedrigeren Molmassen, die höheren Gehalte an sauren funktionellen Gruppen, einen polareren Charakter und die daraus resultierende bessere Wasserlöslichkeit (ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002).

Zur Konformation der Huminstoffmoleküle in wässrigen Lösungen existieren verschiedene Modellvorstellungen. Gemäß dem weitverbreiteten „Random Coil“ Modell werden HS als Makromoleküle betrachtet, die eine sphärische, zeitlich variable Gestalt besitzen (CAMERON ET AL. 1972a, SWIFT 1999). Die „Random Coil“-Konformation wird unter anderem aufgrund intramolekularer elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen funktionellen Gruppen der HS-Moleküle angenommen. Einige Autoren vertreten ein gegensätzliches Modell, bei dem von einer Assoziation niedermolekularer HS zu größeren Einheiten ausgegangen wird (PICCOLO ET AL. 1996). Zur Beschreibung der Molekülgröße wird allgemein der hydrodynamische (Äquivalent-)Radius  $R_e$  verwendet. Dieser entspricht dem Radius eines sphärischen Moleküls, welches unter Transportbedingungen die gleichen Widerstandskräfte erfährt wie das betrachtete Molekül (SWIFT 1989). Die Größe der Huminstoffmoleküle beträgt wenige Nanometer (1 bis 2 nm; BALNOIS ET AL. 1999, LEAD ET AL. 2000, AVENA UND WILKINSON 2002). Die Konformation hängt von der Struktur und Konzentration der HS-Moleküle sowie der Ionenstärke (IS) und dem pH-Wert der Lösung ab. Eine Zunahme der IS oder eine Abnahme des pH-Wertes führen zu einer Abnahme des  $R_e$ . Bei hohen Konzentrationen (mehreren Hundert mg je L) kann es vor allem bei hydrophoben Huminsäuren zur reversiblen Aggregation kommen, die zu Aggregatgrößen von mehreren Hundert Nanometern führen kann. Eine Disaggregation kann durch Verdünnen der Lösung bewirkt sowie durch Erhöhen des pH-Wertes stark beschleunigt werden (AVENA UND WILKINSON 2002).

Die für Huminstoffe angegebenen Molmassen hängen zum einen von der Methode ab, mit der sie ermittelt werden, zum anderen aufgrund der obengenannten Einflussfaktoren auf die

Molekülgröße der HS jedoch auch von den jeweiligen experimentellen Bedingungen. Methoden wie Size Exclusion Chromatography (SEC) oder Ultrafiltration (UF), welche auf einer Auftrennung der Teilchen nach ihrem  $R_e$  beruhen, erfordern zur Ermittlung der Molmasse die Kalibrierung der Trennmethode mit Molmassenstandards, welche in ihrer Struktur mit derjenigen der Analyten übereinstimmen sollten. Diese Voraussetzung ist für HS nicht gegeben und stellt daher ein großes Problem bei der Molmassenbestimmung für diese Stoffgruppe dar. EGEBERG ET AL. (2002) haben die mit Hilfe verschiedener Methoden ermittelten Molmassen der Umkehrosomose-Isolate von DOM-Proben verglichen. Für dieselbe Probe wurden, je nach Methode, Molmassen zwischen 400 g/mol und 58000 g/mol angegeben. Methoden wie SEC ergaben generell niedrige, auf Lichtstreuung basierende Methoden dagegen hohe Werte. Die mittels UF bestimmten Molmassen hingen wesentlich von den verwendeten Membranmaterialien sowie der Betriebsweise ab und reichten für dieselbe Probe von 1500 bis etwa 30000 g/mol. In den Arbeiten der letzten Jahre ist ein Trend zu niedrigeren Molmassen zu erkennen, wobei für aquatische HS meist Werte unter 10000 g/mol ermittelt wurden (CHIN ET AL. 1994, EVERETT ET AL. 1999, PELEKANI ET AL. 1999, ZHOU ET AL. 2000, HER ET AL. 2002b, ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002, PERMINOVA ET AL. 2003). Für die IHSS-Standardfulvinsäure Suwannee River Fulvic Acid wurde mittels SEC eine mittlere Molmasse ( $M_n$ -Wert, siehe Kapitel 2.3.1) von etwa 1000 g/mol bestimmt. Der für die entsprechende HA angegebene Wert betrug 1700 g/mol (HER ET AL. 2002b). LEENHEER UND CROUÉ (2003) führen in ihrem Übersichtsartikel für aquatische HS Molmassen zwischen 100 und 2000 g/mol auf.

Die Molekülgröße der Huminstoffe ist in mehrfacher Hinsicht von Bedeutung. Es wurde gezeigt, dass sich HS-Größenfraktionen in ihren Wechselwirkungen mit anderen Wasserinhaltsstoffen wie Metallen (SCHMITT 2002), organischen Schadstoffen (SUFFET UND MACCARTHY 1989, CHIN ET AL. 1997, MÜLLER ET AL. 2003) sowie anorganischen Kolloiden (SPECHT ET AL. 2000) unterscheiden. Bei Verfahren der Wasseraufbereitung wie der Filtration, Flockung, Adsorption, Ozonung und Chlorung kommt es zu einer gröbenselektiven Entfernung oder Reaktion von Huminstoffen (BECHER ET AL. 1985, FUCHS 1985a, JOHANNSEN ET AL. 1993, ABBT-BRAUN ET AL. 1994, KILDUFF ET AL. 1996, HESSE ET AL. 1999, LIN ET AL. 1999, LIN ET AL. 2000, FRIMMEL ET AL. 2001, MYLLYKANGAS ET AL. 2002, GORENFLO 2003). Es kann angenommen werden, dass das unterschiedliche Verhalten sowie die unterschiedliche Reaktivität verschiedener HS-Größenfraktionen neben deren unterschiedlichen hydrodynamischen Eigenschaften vor allem eine Folge struktureller Unterschiede ist. Solche strukturellen Unterschiede zwischen HS-Größenfraktionen wurden von zahlreichen Autoren sowohl für aquatische als auch für terrestrische Huminstoffe nachgewiesen (SWIFT ET AL. 1992, EVERETT ET AL. 1999, PELEKANI ET AL. 1999, CHRISTL ET AL.

2000, LANKES 2001, KHALAF ET AL. 2003). Bei Vorliegen komplexer Gemische (HS, DOM) erfordert die weitergehende strukturelle Charakterisierung von Größenfraktionen eine Fraktionierung der Probe unter Verwendung präparativer Methoden.

## **2.2 Anreicherung und Isolierung von gelöster organischer Substanz**

Vor der physikochemischen Charakterisierung ist aufgrund der komplexen Zusammensetzung der DOM, des niedrigen DOC-Gehalts der meisten Gewässer sowie der begrenzten Empfindlichkeit der analytischen Methoden häufig eine Anreicherung der gelösten organischen Substanz erforderlich (LEENHEER UND CROUÉ 2003). Als Anreicherungsverfahren werden in dieser Arbeit Verfahren bezeichnet, die mit dem Ziel eingesetzt werden, eine Anreicherung der gesamten DOM zu erreichen. Als Methoden zur Anreicherung von DOM kommen unter anderem Membranfiltrationsverfahren, Rotationsverdampfung (Evaporation) und Gefriertrocknung zum Einsatz. Im Gegensatz zu Anreicherungsverfahren werden Isolierungsverfahren zur selektiven Anreicherung bestimmter Stoffgruppen angewendet. Isolierungsverfahren sind folglich immer mit einer Fraktionierung der Probe verbunden. Als Isolierungsverfahren wird auch die Verfahrenskombination der IHSS (International Humic Substances Society, IHSS) bezeichnet, in welchem Adsorptionsschritte an neutralen, makroporösen Harzen (XAD 8-Harz, Polymethacrylsäuremethylester) mit einer Fraktionierung durch Säurefällung kombiniert werden (XAD-Verfahren). Als Erweiterung des klassischen Huminstoffbegriffs (vergleiche Kap. 2.1) wird unter Huminstoffen die Fraktion der DOM verstanden, welche mit dem genannten bzw. ähnlichen Verfahren aus der gesamten gelösten organischen Substanz isoliert werden kann (MANTOURA UND RILEY 1975, THURMAN UND MALCOLM 1981, ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002). Die Fraktion, die nach Einstellen der Probe auf einen pH-Wert von 2 nicht an das Harz adsorbiert, wird als Nicht-Huminstoff (Non-humic Substances, NHS) bezeichnet.

Die verschiedenen Anreicherungsverfahren ermöglichen teilweise eine hohe Wiederfindung der DOM. Eine gewisse Fraktionierung der Probe ist jedoch auch hier meist nicht vermeidbar. Die Konzentrate verschiedener Anreicherungsverfahren unterscheiden sich daher in ihrer Zusammensetzung und damit ihren physikochemischen Eigenschaften voneinander sowie von XAD-Isolaten derselben Probe (ABBOT-BRAUN ET AL. 1991a, LANKES 2001, MAURICE ET AL. 2002). Durch den Eintrag anorganischer Basen bzw. Säuren sowie die Anreicherung anorganischer Salze bei der Isolierung bzw. Anreicherung kann darüber hinaus eine Spaltung chemischer Bindungen (z. B. Hydrolyse unter stark alkalischen Bedingungen beim XAD-Verfahren) oder eine Aggregation und Ausflockung von DOM verursacht werden. Die An-

reicherung und Isolierung von DOM birgt daher immer auch die Gefahr einer unerwünschten Veränderung der chemischen Strukturen der jeweiligen Probe. Der Eintrag anorganischer Salze kann für die nachfolgende Fraktionierung bzw. Charakterisierung der Probe von Nachteil sein.

## 2.3 Fraktionierung von gelöster organischer Substanz

Ziel eines Fraktionierungsverfahrens ist es, eine heterogene Ausgangsprobe komplexer Zusammensetzung in homogenere Untereinheiten aufzutrennen. Die Fraktionierung wird als präparative Methode zur Isolierung von Substanzen oder Substanzgruppen sowie als Probenvorbereitung für nachfolgende Untersuchungen (Abtrennung von Störkomponenten) durchgeführt. In der Huminstoffforschung werden Fraktionierungsverfahren zudem als Teil der physikochemischen Charakterisierung eingesetzt (SWIFT 1985). Über die für Huminstoffe ausgearbeiteten Isolierungsverfahren hinaus haben mehrere Autoren umfangreiche Fraktionierungsverfahren zur Auftrennung und Charakterisierung der gesamten DOM in Gewässern entwickelt (BARBER ET AL. 2002, IMAI ET AL. 2002). Wichtige, zur Fraktionierung der DOM häufig eingesetzte Methoden sind die SEC und UF.

### 2.3.1 Größenausschlusschromatographie; Size Exclusion Chromatography (SEC)

Die Größenausschlusschromatographie oder Size Exclusion Chromatography (SEC) ist eine weitverbreitete chromatographische Methode zur Trennung von natürlichen und synthetischen Polymeren (MORI UND BARTH 1999). Bei der SEC unterscheidet man nach Art des Trennsystems zwischen der Gelpermeationschromatographie (GPC), bei welcher organische Lösemittel als mobile Phase verwendet werden, und der Gelfiltrationschromatographie (GFC), bei welcher wässrige Eluenten zum Einsatz kommen. Die Trennung erfolgt nach dem unterschiedlichen hydrodynamischen Radius der Moleküle. Als stationäre Phase wird ein Gel mit definierter Partikel- und Porengröße verwendet, in dessen Poren die Moleküle je nach Größe unterschiedlich weit eindringen können und dadurch retardiert werden. Große Moleküle passen nicht in die Gelporen und eluieren daher am Ausschlussvolumen ( $V_0$ ) der Säule, welches dem Flüssigkeitsvolumen zwischen den Gelpartikeln entspricht. Kleine Moleküle können den intrapartikelären Porenraum vollständig ausnutzen und werden maximal retardiert. Sie eluieren erst am Permeationsvolumen ( $V_p$ ), welches die Summe aus den Volumina der Flüssigkeit in den Poren und zwischen den Gelpartikeln darstellt. Moleküle, deren hydrodynamischer Radius zwischen den vorgenannten liegt, werden nach ihrer Größe aufgetrennt und eluieren zwischen  $V_0$  und  $V_p$ . Zur Beschreibung des Elutionsverhaltens eines Moleküls wird der Verteilungskoeffizient  $K_D$  verwendet:

$$K_D = (V_e - V_0)/(V_p - V_0) \quad (2.1)$$

wobei  $V_e$  das Elutionsvolumen des Moleküls bezeichnet. Das Ausschlussvolumen wird üblicherweise unter Verwendung von Dextran Blau (Molmasse 2000000 g/mol) ermittelt. Das Permeationsvolumen kann bei Verwendung eines salzhaltigen Eluenten und von Wasser als Probe mit Hilfe eines Leitfähigkeitsdetektors bestimmt werden. Größentrennung findet nur zwischen  $K_D = 0$  und 1 statt. Der gesamte Trennbereich der SEC umfasst Molmassen von etwa  $10^2$  bis  $10^6$  g/mol, wobei der Trennbereich eines bestimmten Gels im wesentlichen von dessen Porengröße abhängt (MORI UND BARTH 1999).

Die SEC wird über die reine Größentrennung hinaus zur Bestimmung der Molmassenverteilung (Polydispersität) bzw. der mittleren Molmasse eingesetzt. Da die SEC als relative Methode lediglich Auskunft über Größenunterschiede gibt, jedoch keine absoluten Größenangaben liefert, erfordert dies eine Kalibrierung der verwendeten Trennsäule mit geeigneten Molmassenstandards. Bei Verwendung von Kalibrierstandards mit ähnlicher Struktur und Form wie die der Probenmoleküle kann aus dem Elutionsvolumen auf die Molmasse der Substanzen rückgeschlossen werden. Bei Auftragen des Logarithmus der Molmasse gegen das Elutionsvolumen werden lineare Kalibrierfunktionen erhalten, welche den Trennbereich der Säule charakterisieren und mit deren Hilfe die Molmassen der Probenmoleküle ermittelt werden können. Zur Charakterisierung der mittleren Molmassen sowie der Molmassenverteilung werden unter anderem das arithmetische ( $M_n$ ) und das gewichtete Mittel ( $M_w$ ) der Molmassenverteilung sowie die Polydispersität  $P$  berechnet (Gleichungen 2.2 bis 2.6):

$$M_n = \Sigma w_i / \Sigma N_i = \Sigma H_i / \Sigma (H_i/M_i) \quad (2.2)$$

$$M_w = \Sigma (w_i M_i) / \Sigma w_i = \Sigma (H_i M_i) / \Sigma H_i \quad (2.3)$$

$$\text{mit } w_i = M_i N_i \text{ und } w_i = H_i \quad (2.4)$$

wobei  $w_i$  = Masse von  $i$  Molekülen mit der Molmasse  $M_i$ ; diese ist gleichbedeutend mit der Höhe  $H_i$  des chromatographischen Signals beim Elutionsvolumen  $V_e = V_i$ ;  $N_i$  = Anzahl der Moleküle mit der Molmasse  $M_i$  und  $M_i$  = Molmasse beim Elutionsvolumen  $V_e = V_i$  (mit Hilfe der Kalibrierfunktion zu ermitteln).

Die Polydispersität ist definiert als:

$$P = M_w/M_n \quad (2.5)$$

Für monodisperse Moleküle gilt:  $M_n = M_w$  und  $P = 1$ . Polymerlösungen mit  $P > 2$  gelten als extrem polydispers (SWIFT 1989). Als weitere Größe wird neben  $M_n$  und  $M_w$  der Parameter  $M_p$  benutzt, welcher der Molmasse am Peakmaximum entspricht. Als Molmassenstandards werden bei der GPC unter anderem Polystyrole und Polymethylmethacrylate verwendet. Bei der GFC werden wasserlösliche Polymere wie Dextrane, Pullulane (lineare Polysaccharide), Polyethylenglykole oder Polystyrolsulfonate (PSS, Natriumsalze) eingesetzt. Darüber hinaus werden Serien von Proteinen (Rinderserumalbumin, Ovalbumin, Hämoglobin, Lysozym etc.) unterschiedlicher Molmassen zur Kalibrierung benutzt. Die  $M_n$ - und  $M_w$ -Werte der kommerziellen Standards werden mit unabhängigen Methoden (Membranosmometrie, Lichtstreuung) experimentell ermittelt. Die Molmassenstandards sind in der Regel nicht monodispers, sollten jedoch eine möglichst geringe Polydispersität aufweisen.

Im Gegensatz zu anderen chromatographischen Methoden wie der Normal-, Umkehrphasen- oder auch der Ionenchromatographie, welche auf enthalpischen Wechselwirkungen der Analyten mit der stationären Phase beruhen, liegen dem Trennvorgang bei der idealen SEC entropische Effekte zugrunde (MORI UND BARTH 1999). Nach dem thermodynamischen Modell erfährt ein in die Gelporen eindringendes Molekül aufgrund der Beschränkung seiner Konformationsmöglichkeiten eine Abnahme seiner Entropie. Diesem thermodynamisch ungünstigen Effekt steht der Gradient entgegen, der zwischen der Konzentration des Moleküls im Partikelzwischenraum und im Poreninnern herrscht und die treibende Kraft für den diffusiven Transport des Moleküls ins Poreninnere darstellt. Moleküle mit großem  $R_e$  erfahren eine stärkere Abnahme ihrer Entropie, was zur Folge hat, dass sie nicht (Elution bei  $V_0$ ) oder nur begrenzt ins Poreninnere eindringen. Im Gegensatz dazu erfahren kleine Moleküle keine Entropieänderung und gelangen vollständig ins Innere der Poren (Elution bei  $V_p$ ).

In der Praxis ist es jedoch schwierig, enthalpische Effekte zu unterbinden, was zur Folge hat, dass die SEC-Trennung von sogenannten unspezifischen Wechselwirkungen (WW) zwischen Gelmatrix und Probenbestandteilen überlagert werden kann. Daraus resultiert eine Verfälschung der reinen Größentrennung. Art und Stärke der unspezifischen Wechselwirkungen hängen vor allem von der Struktur der Probenbestandteile sowie des Gelmaterials und der Zusammensetzung der mobilen Phase ab. Zum einen können Kräfte zwischen geladenen Gruppen, zum anderen

adsorptive Effekte aufgrund hydrophober WW oder als Folge von Wasserstoffbrückenbindungen auftreten. Derartige WW sind insbesondere bei der GFC von Bedeutung, wo hydrophile Polymergele oder mit hydrophilen Gruppen (z. B. Diol) modifizierte Silicagele als Trennmaterialeien gebraucht werden. Beide Arten von Materialien enthalten saure funktionelle Gruppen, welche in Abhängigkeit vom pH-Wert des Eluenten dissoziieren und damit negative Ladungen aufweisen können. Dies kann zum Ionenausschluss negativ geladener Moleküle und damit zur verfrühten Elution bis hin zum Ausschlussvolumen  $V_0$  ( $K_D = 0$ ) führen. Adsorptive Effekte dagegen können an Restsilanolgruppen der kieselgelbasierten Gele (Wasserstoffbrückenbindungen) oder durch Adsorption von hydrophoben Molekülen (Aromaten, Peptide) an hydrophoben Bereichen der Polymergele auftreten. Sie führen – im Falle reversibler Adsorption – zu einer verspäteten Elution von Molekülen. Im Falle irreversibler Adsorption kann es darüber hinaus zu einem Verlust eines Teils der Probe kommen (Wiederfindungen  $< 100\%$ ).

Durch die Wahl der für die jeweiligen Probenmoleküle geeigneten experimentellen Bedingungen (Säulenmaterial, Eluentenzusammensetzung) können unspezifische Wechselwirkungen verringert werden. Mögliche Maßnahmen zur Vermeidung elektrostatischer Effekte sind die Verwendung saurer ( $\text{pH} < 4$ ) oder elektrolythaltiger (Ionenstärke  $\mu = 0,01$  bis  $0,2$  mol/L) Eluenten. Hydrophobe WW können durch Zugabe organischer Lösemittel (z. B. Acetonitril oder Alkohole; bis zu  $30\%$  (v/v)) oder von Tensiden zum Eluenten sowie durch Erniedrigen der Elektrolytkonzentration (Verringerung von Aussalzeffekten) minimiert werden (MORI UND BARTH 1999). Die Wahl der geeigneten Trennbedingungen ist umso einfacher, je homogener die Struktur der Probenmoleküle ist. Bei Proben, welche aus einer Vielzahl unterschiedlich gebauter Moleküle bestehen, ist diese Optimierung jedoch stark erschwert, und es kann u. U. nicht eindeutig beurteilt werden, ob das experimentell beobachtete Elutionsverhalten eine Folge reiner Größentrennung oder einer Kombination von Größentrennung und unspezifischer WW ist.

Auf dem Gebiet der Huminstoffforschung findet die SEC praktisch ausschließlich in Form der GFC sowohl in analytischem als auch in präparativem Maßstab (Fraktionierung) Verwendung (ANDERSON UND HEPBURN 1977, BECHER ET AL. 1985, ABBT-BRAUN ET AL. 1991b, CHIN ET AL. 1994, HONGVE ET AL. 1996, EVERETT ET AL. 1999, PELEKANI ET AL. 1999, SPECHT 2002). Die ersten Anwendungen erfolgten bei der Trennung von pedogenen HAs und FAs in den sechziger Jahren unter Verwendung von Sephadex-Gelen (verzweigte Dextrane) (POSNER 1963, LINDQVIST 1967, GJESSING UND LEE 1967). Schon zu Anfang wurde jedoch klar, dass unspezifische Wechselwirkungen bei der Anwendung der Methode auf die polyfunktionellen Huminstoffe in Abhängigkeit von den Trennbedingungen in bedeutendem Ausmaß auftreten und die Größen-



trennung beeinflussen können. Bei niedrigen pH-Werten oder hohen Ionenstärken des Eluenten wurde eine Retardierung (Elution nach  $V_p$ ), bei geringen IS des Eluenten dagegen eine vorzeitige Elution der Huminstoffe beobachtet (POSNER 1963, SWIFT UND POSNER 1971, DELL'AGNOLA UND FERRARI 1971, AHO UND LEHTO 1984, HINE UND BURSILL 1984, SWIFT 1985).

Um den Einfluss der Molekülstruktur auf das Elutionsverhalten zu untersuchen, führten verschiedene Autoren Experimente mit Einzelsubstanzen durch. GELOTTE (1959) sowie FUCHS (1985b) untersuchten den Einfluss von Salzart und Ionenstärke auf die SEC-Trennung organischer Verbindungen. SPECHT UND FRIMMEL (2000) führten später ähnliche Experimente mit Modellsubstanzen durch. Sie verwendeten ein Polymergel (TSK HW50-(S)) als stationäre Phase und einen Phosphatpuffer als Eluenten. Die Autoren konnten zeigen, dass niedere Alkohole sowie aromatische Carbonsäuren Elutionsvolumina aufweisen, die über dem Permeationsvolumen liegen. Bei aromatischen Verbindungen waren die experimentell beobachteten Elutionsvolumina teilweise um ein Vielfaches größer als das Permeationsvolumen. Im Fall der Alkohole führten sie dieses Verhalten auf die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zurück, bei den Aromaten dagegen auf hydrophobe Wechselwirkungen. Bei aliphatischen Carbonsäuren waren sowohl die Anzahl an Säuregruppen als auch Ionenstärkedifferenzen zwischen Probe und Eluent von Bedeutung. Dicarbonsäuren eluierten stets deutlich vor  $V_p$  und vor den Monocarbonsäuren und wurden in ihrem Verhalten weniger durch IS-Unterschiede beeinflusst als Letztere. SPECHT UND FRIMMEL (2000) schlossen daraus, dass die IS des Eluenten nicht ausreichte, um die negativen Stellen des Gels abzuschirmen, was zur Abstoßung der negativ geladenen Dicarbonsäuren und damit zur verfrühten Elution führte. Die Einführung einer zusätzlichen Carboxylgruppe in die Molekülstruktur hatte jedoch keinen vollständigen Ausschluss (Elution bei  $V_0$ ), sondern lediglich eine Abnahme des Elutionsvolumens um wenige Milliliter (von etwa 50 mL auf ca. 40 mL an der TSK HW 50-(S)-Säule) zur Folge. Die Molekülgröße ist für das Elutionsverhalten der Substanzen neben Art und Stärke der WW folglich weiterhin von Bedeutung.

Schon in den ersten Arbeiten wurde darüber hinaus festgestellt, dass Ionenstärkedifferenzen zwischen Probe und mobiler Phase bei der SEC von Huminstoffen von großer Bedeutung sind. Sie können zu methodischen Artefakten führen, welche in Form eines scharfen Peaks in der Nähe des  $V_p$  auftreten. Besitzt die Probe eine höhere IS als der Eluent, so erscheint dieser Peak kurz nach dem Permeationsvolumen. Dieser Fall wurde erstmals von POSNER (1963) unter dem Begriff „salt boundary peak“ beschrieben. LINDQVIST (1967) erklärte den Effekt damit, dass ein Teil der Probe in der Zone höherer IS ausgesalzen wird und erst wieder vom Gel desorbiert,

wenn die IS durch den nachfolgenden Eluenten verringert wird. Der Aussalzeffekt beruht auf einer Änderung der Viskosität des Wassers in Anwesenheit strukturverstärkender Salze (z. B. Phosphat). Dies hat eine Verringerung der Löslichkeit insbesondere hydrophober organischer Verbindungen zur Folge (FUCHS UND HEIDT 1994). LINDQVIST (1967) betonte, dass Ionenstärkegradienten während der Elution unbedingt vermieden werden müssten. Ein ähnlicher Peak wird auch im umgekehrten, bei HS-Proben häufiger vorkommenden Fall beobachtet, nämlich bei der Injektion salzarmer Proben in einen Eluenten höherer IS. Der hier unmittelbar vor  $V_p$  auftretende Peak wird ebenfalls als Artefakt gedeutet (SPECHT 2002). In beiden Fällen wird die Elution der Moleküle des Artefaktpeaks stets nach Absinken der Leitfähigkeit des Eluenten beobachtet.

Unter bestimmten experimentellen Bedingungen ist auch bei der SEC von Huminstoffen eine Minimierung der unspezifischen Wechselwirkungen möglich (CHIN ET AL. 1994, DE NOBILI UND CHEN 1999, PERMINOVA ET AL. 2003). Dies kann durch die Wahl geeigneter Trennmaterialien und Eluenten erreicht werden. Als stationäre Phasen werden häufig TSK-Trenngele (Typ HW, Copolymer aus Ethylenglykol und Methacrylat) eingesetzt, welche aufgrund ihrer Hydrophilie in geringerem Maße zu hydrophoben Wechselwirkungen neigen. Da diese Gele in wässriger Lösung aufgrund der Dissoziation funktioneller Restgruppen eine negative Ladung tragen, ist es jedoch erforderlich, Pufferlösungen zur Elution zu verwenden. Bei der SEC von HS werden üblicherweise Elutionspuffer mit Ionenstärken zwischen 0,02 und 0,1 mol/L eingesetzt (PERMINOVA ET AL. 1998). CAMERON ET AL. konnten Huminstofffraktionen, deren Molmassen mittels Ultrazentrifugation bestimmt worden waren, an SEC-Gelen auf Agarose- oder Dextranbasis bei konstanter IS und gleichbleibendem pH-Wert auftrennen (CAMERON ET AL. 1972a und 1972b). Das Elutionsvolumen korrelierte linear mit dem Logarithmus der Molmasse der Fraktionen, was die Autoren als Beleg dafür ansahen, dass die Auftrennung auf Größenunterschieden beruhte. Von anderen Autoren wurden gute Trennergebnisse mit Silikagelen erzielt (CHIN ET AL. 1994, PELEKANI ET AL. 1999, BECHER ET AL. 1985, ZHOU ET AL. 2000, HER ET AL. 2002a und b, MYLLYKANGAS ET AL. 2002). Bei Verwendung von Puffersystemen als Eluenten ist der pH-Wert der Probe von untergeordneter Bedeutung, da während der Elution der pH-Wert der mobilen Phase bestimmend ist. Dagegen sollte die Ionenstärke der Probe möglichst an die des Eluenten angeglichen werden, um die bereits beschriebene Artefaktbildung zu vermeiden. Dies ist bei salzhaltigen Proben (z. B. Abwasser) jedoch schwierig, da der genaue Salzgehalt und damit die IS meist unbekannt sind. Zur Vermeidung unspezifischer WW bei der SEC der polyfunktionellen HS kommen die oben beschriebenen Maßnahmen nur teilweise in Frage. Die Zugabe organischer Lösemittel zum Eluenten beispielsweise kann nur in Verbindung mit UV-Detektoren (HOQUE ET

AL. 2003), nicht dagegen bei Verwendung von *Online*-DOC-Detektoren durchgeführt werden, da sie hier die Detektion der DOM stören würden.

Bei der Anwendung der SEC zur Bestimmung der Molmassen von HS stellt die Wahl geeigneter Standardsubstanzen ein weiteres Problem dar. Aufgrund der unbekannteten Struktur von Huminstoffen ist die Wahl idealer, d. h. strukturell identischer Standards nicht möglich. Wegen ihres aromatischen Charakters und ihrer negativen Ladung gelten Polystyrolsulfonate als bedingt geeignet (CHIN ET AL. 1994, PERMINOVA ET AL. 1998). Für die polyelektrolytischen PSS wird in wässriger Lösung, ähnlich wie für Huminstoffe, angenommen, dass sie als statistische Knäuel ("random coil configuration") vorliegen (CHIN UND GSCHWEND 1991, HOFE 2003). Möglich ist auch eine Kalibrierung mit Huminstoffen oder HS-Fractionen, deren Molmassen mit unabhängigen Methoden ermittelt wurden (CAMERON ET AL. 1972 a und 1972 b). Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass verschiedene HS strukturell nicht identisch sind (SWIFT 1999). Die mittels SEC bestimmten Molmassen sind daher mit Unsicherheiten behaftet und bedürfen des Abgleichs mit anderen Methoden.

### 2.3.2 Ultrafiltration

Als weiteres Verfahren zur präparativen Fraktionierung von DOM wurde die Ultrafiltration (UF) verwendet. Die Trennung beruht, ähnlich wie bei der SEC, auf Unterschieden in den hydrodynamischen Radien der Moleküle und kann auch hier durch sekundäre Effekte wie elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen beeinflusst werden (AIKEN ET AL. 1985, AMY ET AL. 1987, CAI 1999, CHO ET AL. 2000, SCHÄFER ET AL. 2002, EGEBERG ET AL. 2002, CHANG ET AL. 2003, KIMURA ET AL. 2003).

Bei der UF wird der Stofftransport über die Membran durch Anlegen eines Druckgradienten erreicht ( $\Delta p = 0,1$  bis 1 MPa). Zur Beschreibung der Vorgänge wird das Modell der idealen Porenmembran herangezogen. Hierbei wird die Membran als Feststoff mit heterogener Porenstruktur (Porengrößenverteilung) betrachtet. Mit einer Porenmembran können nur Stoffe voneinander getrennt werden, die erhebliche Unterschiede in ihren  $R_e$  aufweisen.

Bei der Membranfiltration wird zwischen dem Konzentrat und dem Filtrat unterschieden. Das Konzentrat oder Retentat ist der Anteil der Lösung, der von der Membran zurückgehalten wird, und das Permeat oder Filtrat ist der Anteil, der die Membran passieren kann. Das Rückhaltever-

mögen  $R$  für einen gelösten Stoff ist ein Maß für die Membranselektivität für diesen Stoff und wird gemäß Gleichung 2.6 berechnet.

$$R = 1 - c_f / c_r \quad (2.6)$$

$c_f$  ist die Konzentration der gelösten Komponente auf der Permeatseite der Membran,  $c_r$  die entsprechende Konzentration auf der Konzentratseite. Für eine streng semipermeable Membran, die nur für das Lösemittel durchlässig ist, also für vollständigen Rückhalt, ist  $c_f = 0$  und  $R = 1$ . Für eine Membran, die die gleiche Permeabilität für Lösemittel und gelösten Stoff besitzt, ist  $c_f = c_r$  und  $R = 0$  (STAUDE 1993).

Eine Porenmembran wird durch die Angabe der molekularen Trenngrenze (molecular weight cutoff, MWCO) und der Schärfe dieser Trenngrenze charakterisiert. Die Trenngrenze wird durch den Porenradius und die Schärfe der Trenngrenze durch die Porengrößenverteilung bestimmt. Beide Größen werden experimentell durch Filtration von Molmassenstandards ermittelt. Die Schärfe der Trenngrenze wird durch die Kennlinie einer Membran beschrieben. Dabei wird der Rückhalt von Molekülen einer bestimmten Größe über der Molmasse aufgetragen. Aufgrund der Porengrößenverteilung einer Membran ist es nicht möglich, scharfe molekulare Trenngrenzen zu erreichen. Als MWCO einer Membran wird die Molmasse bezeichnet, die mit einem Rückhalt von mindestens 90 % aus dem Zulauf entfernt werden kann. Der MWCO hängt sowohl von der Molekülgröße als auch von der Molekülform der für die Bestimmung des Rückhaltes verwendeten Standardsubstanzen ab.

Bei der Membranfiltration wird eine Lösung durch Konvektion an die Oberfläche einer semipermeablen Membran gebracht. Während das Lösemittel die Membran unter Einwirkung der treibenden Kraft durchdringt, werden die gelösten Komponenten mehr oder weniger vollständig zurückgehalten. Sie reichern sich in der Grenzschicht unmittelbar an der Membranoberfläche an. Der dadurch entstehende Konzentrationsgradient bewirkt einen diffusiven Transport der Moleküle von der Membranoberfläche zurück in die freie Lösung. Schon nach kurzer Filtrationsdauer stellt sich ein stationärer Zustand zwischen konvektivem und diffusivem Transport ein. Die Anreicherung des gelösten Stoffes in der laminaren Grenzschicht wird als „Konzentrationspolarisation“ bezeichnet (STAUDE 1993). Die Konzentrationspolarisation führt bei der Filtration von Makromolekülen zur Bildung einer Gel- oder Deckschicht (Fouling). Fouling kann den Filtrationsvorgang in zweifacher Hinsicht negativ beeinflussen. Die zusätzliche, mehr oder weniger feste Deckschicht auf der Membranoberfläche führt zur Erhöhung des hydro-

dynamischen Widerstandes, was eine Verminderung des Permeatflusses bewirkt. Die entstandene Deckschicht wirkt darüber hinaus häufig selbst wie eine Membran, deren Trenneigenschaften jedoch sehr verschieden von denen der ursprünglichen Membran sein können. Bei der UF ist die starke Konzentrationspolarisation vor allem in den niedrigen Diffusionskoeffizienten der zurückgehaltenen makromolekularen Substanzen begründet. Maßnahmen zur Vermeidung bzw. Verringerung der Deckschichtbildung sind unter anderem die Filtration möglichst verdünnter Lösungen oder die Filtration bei höherer Temperatur, die Filtration bei ausreichend niedrigen Betriebsdrücken (geringerer Fluss des Lösemittels) sowie eine Erhöhung der Turbulenz durch eine möglichst hohe Rühr- bzw. Strömungsgeschwindigkeit. Beim Einsatz von Membranverfahren zur Aufbereitung huminstoffhaltiger Rohwässer stellt die Deckschichtbildung vor allem wegen des Permeatflussrückgangs ein finanziell bedeutsames Problem dar. Die Deckschichtbildung wirkt sich insbesondere bei Ultrafiltrationsmembranen negativ auf die Filtrationsleistung aus, da diese im Gegensatz zu Nanofiltrationsmembranen sowohl zu Oberflächen- als auch zu Porenfouling neigen (GORENFLO 2003).

Membranverfahren können in zwei verschiedenen Betriebsarten durchgeführt werden. Je nach Art der Anströmung der Membran unterscheidet man zwischen Dead End-Filtration und Cross Flow- oder Tangentialfluss-Filtration. Diese Unterscheidung wird, streng genommen, nur für die Mikrofiltration getroffen. Die Bezeichnungen werden jedoch teilweise auch in Bezug auf die UF verwendet. Bei der Dead End-Filtration wird die Membran senkrecht zu ihrer Ausdehnung von der zu filtrierenden Lösung angeströmt. Wegen der Deckschichtbildung geht der Permeatfluss mit zunehmender Betriebsdauer kontinuierlich zurück. Bei der Cross Flow- oder Tangentialfluss-Filtration wird versucht, durch eine möglichst hohe tangentiale Anströmung der Membran die Ausbildung einer Deckschicht zu vermeiden. Bei der verfahrenstechnischen Anwendung der UF wird praktisch nur der Tangentialfluss-Modus durchgeführt (STAUDE 1993). Bei der Dead End-Filtration wird zwischen dem sogenannten Konzentrationsmodus und dem Diafiltrationsmodus unterschieden (DUARTE ET AL. 2001, MILLIPORE 2001). Im Konzentrationsmodus wird als Ausgangsvolumen nur das der Probelösung verwendet. Während der Filtration wird das Lösemittel teilweise aus dem Konzentrat entfernt, was zur Folge hat, dass die Konzentration der zurückgehaltenen Moleküle zunimmt. Die Konzentration der nicht zurückgehaltenen Moleküle im Permeat und im Konzentrat entspricht der Ausgangskonzentration. Im Diafiltrationsmodus wird zusätzlich zur Ausgangslösung weiteres Lösemittel zugegeben, um ein Auswaschen niedermolekularer Bestandteile zu erreichen. Das Volumen des Retentats und die Konzentration der zurückgehaltenen Moleküle ( $R = 1$ ) bleiben mehr oder weniger konstant und entsprechen denjenigen der Ausgangslösung. Die Konzentration der niedermolekularen Ver-

bindungen im Permeat nimmt aufgrund der Verdünnung durch das Lösemittel ab. Die Diafiltration wird unter anderem als Alternative zur Dialyse, beispielsweise zur Abtrennung anorganischer Salze, verwendet. Da Membranverfahren keine extremen Temperaturen, pH-Werte oder Lösemittel benötigen, bieten sie sich für die Aufkonzentrierung bzw. Reinigung empfindlicher Produkte besonders an. Aus diesem Grund werden sie auch häufig zur Fraktionierung von HS- oder DOM-Lösungen gebraucht. Bei der UF kommen sowohl Cross Flow-Module als auch Rührzellen zum Einsatz. Letztere werden häufig bei der diskontinuierlichen Filtration im Labormaßstab verwandt. Die tangentielle Strömung wird hier durch intensives Rühren über der Membran realisiert (STAUDE 1993).

## 2.4 Physikochemische Charakterisierung der gelösten organischen Substanz

Die größte Herausforderung bei der Analytik sowohl der DOM als auch der HS stellt die Heterogenität beider operationell definierter Stoffgruppen und die damit verbundenen niedrigen Konzentrationen einzelner Verbindungen dar. Aus diesem Grund erfolgt die Charakterisierung meist mit Hilfe summarischer Parameter. Hiermit ist allerdings ein Informationsverlust im Hinblick auf die Molekülstruktur verbunden.

### 2.4.1 Elementaranalyse

Grundlegende Informationen über die Zusammensetzung können durch Quantifizierung der Gehalte der Hauptelemente erhalten werden. Für HS werden üblicherweise die Gehalte an Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Stickstoff sowie zusätzlich an Schwefel und Phosphor bestimmt. Huminstoffe bestehen aus etwa 50 % (w/w) Kohlenstoff, 3 bis 5 % Wasserstoff, 35 bis 40 % Sauerstoff und 1 bis 2 % Stickstoff. Die Massengehalte an S und P betragen meist weniger als 1 % (AIKEN ET AL. 1985, THURMAN 1985, STEELINK 1985, FRIMMEL UND ABBT-BRAUN 1999, ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002). Allerdings sind die Elementgehalte aufgrund der unterschiedlichen Aschegehalte verschiedener Proben wenig aussagekräftig. Der Aschegehalt repräsentiert anorganische Salze und Spurenelemente (Metalle), welche zum Teil erst bei Isolierungsverfahren eingetragen werden (z. B. Chlorid). Zur Charakterisierung werden daher die Elementverhältnisse auf Kohlenstoffbasis herangezogen (H/C, O/C, N/C). Das H/C-Verhältnis gilt als Indikator für den Sättigungs- und Verzweigungsgrad der Kohlenstoffatome. Ein H/C-Verhältnis  $> 1$  deutet auf einen höheren Anteil an aliphatischen, ein H/C-Verhältnis  $< 1$  dagegen auf einen erhöhten Anteil an aromatischen und olefinischen Strukturen hin. Das O/C-Verhältnis dient als Indikator für den Oxidationsgrad und damit auch die Hydrophilie bzw. den Grad der Humifizierung. Erhöhte O/C-Verhältnisse können jedoch auch durch höhere Gehalte an Kohlen-

hydraten verursacht werden (STEELINK 1985, ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002). Ein hohes N/C-Verhältnis indiziert Proteine, Peptide oder N-acetylierte Kohlenhydrate (z. B. Peptidoglykan), welche als Vorläufersubstanzen für HS von Bedeutung sein können.

#### 2.4.2 UV/Vis-Spektroskopie

Die gelöste organische Substanz und besonders Huminstoffe absorbieren elektromagnetische Strahlung im UV- und sichtbaren (Vis) Wellenlängenbereich. Die Absorption dieser Strahlung ist auf die Anregung von Valenzelektronen zurückzuführen. Nach dem Gesetz von Bouguer-Lambert-Beer ist die Absorption  $A_\lambda$  monochromatischer Strahlung in verdünnten Lösungen proportional zur molaren Konzentration  $c$  der gelösten, absorbierenden Verbindung und zur Schichtdicke  $d$  der Probe:

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda c d \quad (2.7)$$

$$A_\lambda = a_\lambda d \quad (2.8)$$

$\varepsilon_\lambda$  steht für den molaren Absorptionskoeffizienten in L/(mol m), welcher eine stoff- und wellenlängenspezifische Größe ist. Da für DOM und HS nur die Gesamtaborption aller Moleküle messtechnisch zugänglich ist, wird das Gesetz in der abgewandelten Form (Gl. 2.8) angegeben, wobei  $a_\lambda$  für den spektralen dekadischen Absorptionskoeffizienten in 1/m bei der Wellenlänge  $\lambda$  und  $d$  für die Schichtdicke der Küvette in m steht. Für den Vergleich verschiedener HS-Lösungen wird die spezifische Absorption (Specific UV Absorbance,  $SUVA_\lambda$ ) in L/(m mg) herangezogen. Dabei wird die Absorption auf die DOC-Konzentration normiert:

$$SUVA_\lambda = a_\lambda / \rho(DOC) \quad (2.9)$$

Die UV/Vis-Spektroskopie dient bei der Anwendung auf Huminstoffe bzw. DOM meist der strukturellen Charakterisierung. Der Einsatz zur Konzentrationsbestimmung ist im Gegensatz zur Verwendung dieser Methode in der instrumentellen Analytik von untergeordneter Bedeutung. Zur strukturellen Charakterisierung der HS werden üblicherweise  $SUVA$ -Werte für die Wellenlängen  $\lambda = 254$  nm (UV-Bereich) und 436 nm (Vis-Bereich; Gelb-Braunfärbung) ermittelt. Die Absorption im UV-Bereich (254 nm) wird vor allem durch aromatische und konjugierte Systeme sowie durch Carbonylgruppen verursacht. Ursache für die Absorption bei 436 nm sind chinoide Systeme, Keto-Enol-Strukturen und Charge-Transfer-Banden. Einfache aromatische Strukturen absorbieren im Vis-Bereich nicht (BLOOM ET AL. 1989). Die Absorption hängt aufgrund der

sauren funktionellen Gruppen der HS vom pH-Wert der Lösung ab und sinkt mit abnehmendem pH-Wert (MACCARTHY UND RICE 1985, BLOOM UND LEENHEER 1989, ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002). Dies gilt insbesondere für die Absorption im sichtbaren Bereich. Die Absorption im UV-Bereich wird dagegen durch pH-Änderungen weniger stark beeinflusst. WEISHAAR ET AL. (2003) konnten für aquatische DOM unterschiedlichen Ursprungs zeigen, dass durch eine pH-Erhöhung von 4 auf 8 nur bei einer von 7 Proben eine Zunahme der Absorption bei 254 nm um etwa 10 % bewirkt wurde. Bei den restlichen Proben blieb die Absorption praktisch konstant. HS weisen bei einem pH-Wert von 7  $SUVA_{254}$ -Werte zwischen etwa 2,5 und 7 L/(m mg) auf. Die  $SUVA_{436}$ -Werte liegen zwischen 0,1 und 0,9 L/(m mg). Die höhermolekularen Huminsäuren eines bestimmten aquatischen Systems zeigen stets eine stärkere Absorption als die jeweiligen Fulvinsäuren (HAUTALA ET AL. 2000, ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002). Für verschiedene aquatische HS sowie für HS-Fractionen wurde eine Korrelation zwischen  $SUVA_{254}$ -Werten und der Molekülgröße bzw. der Aromatizität der HS festgestellt (ABBT-BRAUN ET AL. 1991b, CHIN ET AL. 1994, PEURAVUORI UND PIHLAJA 1997, ABBT-BRAUN ET AL. 2002, LEENHEER UND CROUÉ 2003, WEISHAAR ET AL. 2003).

### 2.4.3 Fluoreszenzspektroskopie

Das Fluoreszenzvermögen der Huminstoffe wurde, ähnlich wie ihre Absorptionseigenschaften, schon früh entdeckt (CHRISTMANN UND GHASSEMI 1966). Es ist bekannt, dass von der Vielzahl der absorbierenden Naturstoffe nur ein relativ kleiner Teil zur Fluoreszenz befähigt ist. Hierzu gehören insbesondere Verbindungen mit konjugierten oder aromatischen Systemen (MACCARTHY UND RICE 1985, HAUTALA ET AL. 2000). Bei aromatischen Systemen bewirkt die Substitution mit Carbonyl-, Hydroxy- oder Aminogruppen eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums zu größeren Wellenlängen. Die Substitution mit elektronenschiebenden funktionellen Gruppen wie z. B. Carboxylgruppen führt zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität (SENESI 1990). Die Fluoreszenzintensität der Huminstoffe sinkt mit abnehmendem pH-Wert, vermutlich vor allem infolge der gleichfalls abnehmenden Absorption (BLOOM UND LEENHEER 1989, HAUTALA ET AL. 2000). Sie ist weiterhin von der Konformation und der Wechselwirkung der HS mit Metallionen und organischen Molekülen abhängig (LEENHEER UND CROUÉ 2003). Ähnlich wie bei der UV/Vis-Spektroskopie überlagern sich bei der Fluoreszenzspektroskopie eine Vielzahl von Signalen einzelner Moleküle. Dies erschwert den Rückschluss auf strukturelle Charakteristika der HS aus den Fluoreszenzspektren. Dennoch konnten Maxima bei charakteristischen Kombinationen der Anregungs- und Emissionswellenlänge bestimmten Stoffgruppen zugeordnet werden. Anregungsmaxima zwischen 330 und 350 nm und Emissionsmaxima zwischen 420 und



480 nm gelten als charakteristisch für Huminstoffe. Bei einigen HS wird zusätzlich ein zweites Maximum bei  $\lambda_{ex} \sim 250-260$  nm und  $\lambda_{em} \sim 380-480$  nm beobachtet (COBLE 1996, KUMKE UND FRIMMEL 2002). Anregungsmaxima zwischen 270 und 280 nm und Emissionsmaxima zwischen 300 und 320 nm bzw. 320 und 350 nm gelten als Indizien für die Anwesenheit von Tyrosin bzw. Tryptophan. Aus dem Vorhandensein dieser Maxima wurde auf die Anwesenheit von Proteinen bzw. auf einen Eintrag von DOM aus Abwässern geschlossen (COBLE 1996, BAKER 2002). Die Lage und Intensität solcher Maxima können durch Aufnahme sogenannter Excitation-Emission-Matrices (EEM) veranschaulicht werden. Hierbei wird eine Variation der Anregungswellenlänge über einen ausgewählten spektralen Bereich vorgenommen, und es erfolgt eine Aufnahme des zu jedem  $\lambda_{ex}$  zugehörigen Emissionsspektrums (COBLE 1996, KUMKE UND FRIMMEL 2002, MCKNIGHT ET AL. 2001, PATEL-SORRENTINO ET AL. 2002). Im Gegensatz zur Absorption konnte für die Fluoreszenzintensität der HS eine Korrelation mit abnehmender Molekülgröße nachgewiesen werden. Niedermolekulare Huminstoffe sowie Fulvinsäuren fluoreszieren stärker als höhermolekulare Fraktionen und die entsprechenden Huminsäuren (HAUTALA ET AL. 2000, LEENHEER UND CROUÉ 2003).

#### 2.4.4 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) spielt eine herausragende Rolle für die Strukturaufklärung organischer Verbindungen. Bestimmte Kerne wie beispielsweise  $^{13}\text{C}$  besitzen einen Gesamtdrehimpuls und damit ein magnetisches Moment. Bei der NMR-Spektroskopie werden die Kerne in ein statisches, homogenes Magnetfeld gebracht, wobei auf den magnetischen Dipol eine Kraft ausgeübt wird. Die Dipolachse, die sich in der Feldrichtung des angelegten Magnetfeldes ausrichten will, weicht der Krafrichtung senkrecht aus und beschreibt eine Präzessionsbewegung um die Achse der magnetischen Induktion  $B_0$  des äußeren Magnetfeldes. Die Kreisfrequenz dieser Präzessionsbewegung wird als Larmor-Frequenz bezeichnet (WILSON 1989). Für die Orientierung des Spins im äußeren Magnetfeld existieren diskrete Einstellmöglichkeiten, welche energetisch verschieden sind. Durch Einstrahlung hochfrequenter elektromagnetischer Strahlung können Übergänge zwischen verschiedenen Energieniveaus des Kernes induziert werden. Eine Resonanz tritt dann ein, wenn die Frequenz der eingestrahnten elektromagnetischen Welle der Larmor-Frequenz entspricht:

$$\Delta E = h \nu_0 = \gamma B_0 \hbar / 2\pi \quad (2.10)$$

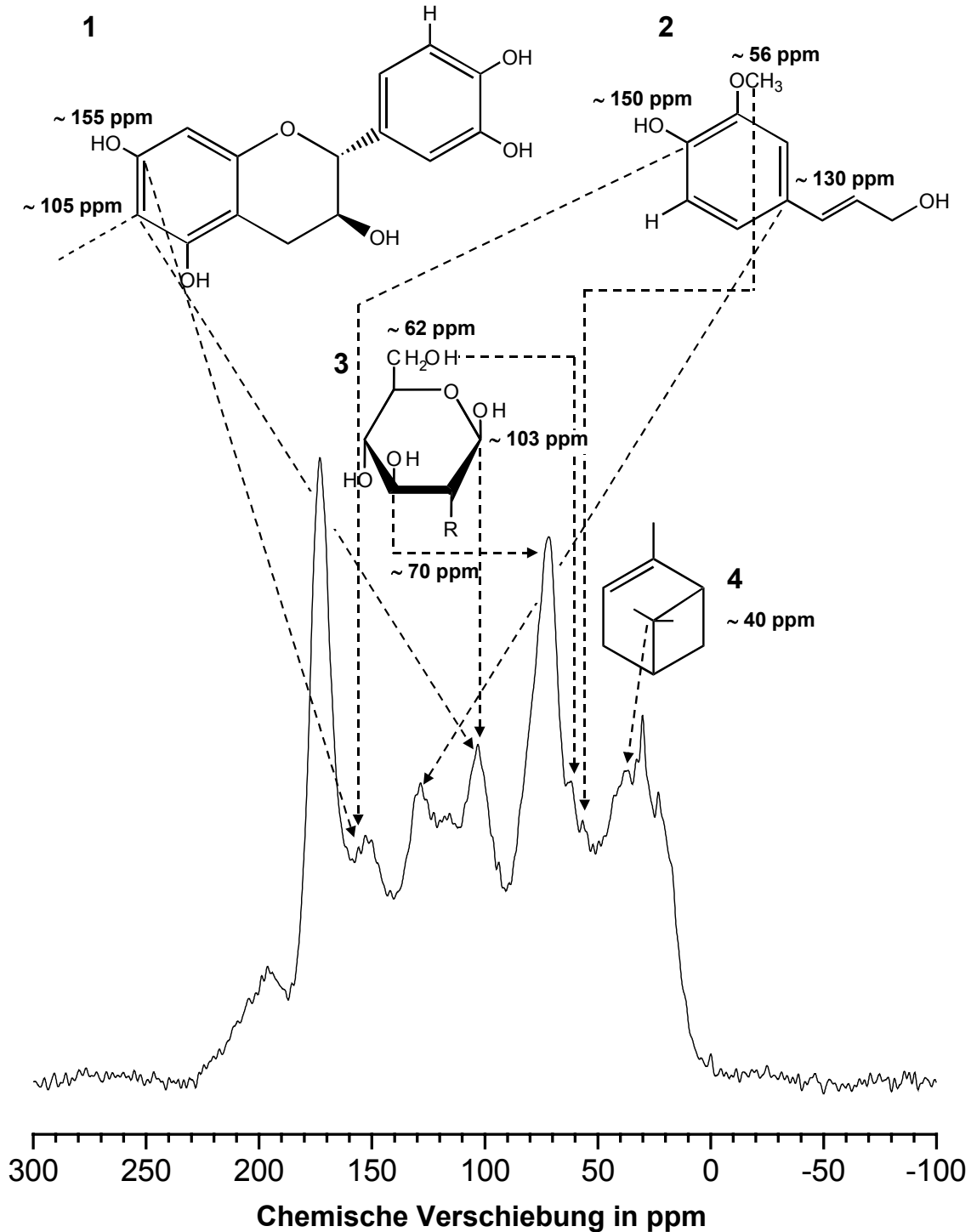
Die Energiedifferenz  $\Delta E$  und die ihr zugehörige Resonanzfrequenz  $\nu_0$  sind dabei proportional zur magnetischen Induktion  $B_0$  des Magnetfeldes. Das gyromagnetische Verhältnis  $\gamma$  stellt eine kernspezifische Konstante dar. Im Resonanzfall erfolgt eine Absorption von Energie, welche den Übergang vom Spin-Grundzustand in einen energetisch höheren Spinzustand ermöglicht (FRIEBOLIN 1999). Die NMR registriert die zur Überführung in den energiereicheren Zustand erforderliche Energie als Signal der dazugehörigen Frequenz. Die effektive magnetische Induktion am Kernort wird durch die Umgebung des betrachteten Atomkerns beeinflusst, da das äußere Magnetfeld durch die Elektronenhülle des Kerns abgeschirmt wird. Diese Abschirmung führt zu einer Änderung der Resonanzfrequenz. Die Abhängigkeit der Lage der Resonanzfrequenz von der Elektronendichteverteilung um den Kern erlaubt Rückschlüsse auf den chemischen Bindungszustand des Atoms. Die Änderung der Resonanzfrequenz wird als sogenannte chemische Verschiebung  $\delta$  in ppm angegeben. Sie wird auf eine Referenzsubstanz bezogen, deren chemische Verschiebung gleich Null gesetzt wird. Als Referenzsubstanz für die NMR-Spektroskopie an  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  Kernen wird Tetramethylsilan (TMS) verwendet. (WILSON 1989). Die Empfindlichkeit der NMR-Messung für einen bestimmten Kern ist sehr gering (Boltzmannverteilung) und von der natürlichen Häufigkeit und dem magnetischen Dipolmoment des Kerns abhängig. Die Intensität des Messsignals ist proportional zur Anzahl der vorhandenen Kerne. Bei der Festkörper-NMR-Spektroskopie führen anisotrope Wechselwirkungen (chemische Verschiebungsanisotropie, heteronukleare Dipol-Dipol-Wechselwirkungen) zu starken Signalverbreiterungen in  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren. Zur Unterdrückung bzw. Verminderung dieser WW werden spezielle Techniken wie das Magic Angle Spinning (MAS) und die Hochleistungs-Protonen-Entkopplung angewandt.

Bei der Anwendung der NMR auf Huminstoffe sind vor allem  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Kerne von Interesse. In dieser Arbeit wurde die Festkörper-Spektroskopie an  $^{13}\text{C}$ -Kernen eingesetzt. Bezüglich der Zuordnung der chemischen Verschiebungsbereiche in  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektren von Huminstoffen zu verschiedenen Strukturelementen herrscht in der Literatur eine weitgehende Übereinstimmung (HATCHER ET AL. 1983, SWIFT ET AL. 1992, DESHMUKH ET AL. 2001, LANKES 2001). Für die quantitative Auswertung der Spektren wurde die in Tabelle 2.1 angegebene Zuordnung verwendet.

**Tab. 2.1:** Zuordnung von chemischen Verschiebungsbereichen zu Strukturelementen in  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektren von Huminstoffen (TMS-Skala) aus LANKES (2001).

Chemische Verschiebung in ppm	Strukturelemente
0 – 50	<b>Aliphaten</b> sp <sup>3</sup> -C in Ketten und Ringen; Methylgruppen; primäre aliphatische Amine
50 – 60	<b>Überlappungs-Region</b> Aliphaten + O-Alkyl-C; Methoxygruppen; quartärer aliphat. C; α-C von Aminosäuren; sekundäre aliphat. Amine; einfache aliphat. Ether
60 – 100	<b>O-Alkyl-Kohlenstoff</b> sp <sup>3</sup> -Kohlenstoff mit 1- oder 2-facher O-/N-Substitution (Kohlenhydrate etc.)
100 – 140	<b>Un-/C-substituierte Aromaten und Olefine</b> sp <sup>2</sup> -C; mehrfach O-/N-substituierter sp <sup>3</sup> -C (z. B. anomeres C von Kohlenhydraten)
140 – 160	<b>O-/N-substituierte Aromaten und Olefine</b>
160 – 190	<b>Carboxylfunktionen</b> Carboxylgruppen; Ester; Amide
190 – 220	<b>Carbonylfunktionen</b> Aliphat. Ketone, Aldehyde, Phenone, Chinone

Quantitative Informationen über die relativen Anteile verschiedener Strukturelemente werden durch Integration der Spektren innerhalb der Grenzen der chemischen Verschiebungsbereiche erhalten. Eine mehr oder weniger starke Überlappung von Bereichen und Signalgruppen schränkt die quantitative Auswertung jedoch ein. Einzelne Leitsignale und deren Intensität können in diesem Fall genauere Auskünfte über das Vorhandensein bestimmter Strukturen geben. Bei der  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektroskopie weisen folgende Leitsignale auf charakteristische Vorläufersubstanzen hin (Abb. 2.1): Bei ca. 70 ppm liegt das Intensitätsmaximum der strukturbildenden Kohlenhydrate, deren anomere C-Atome Signale im chemischen Verschiebungsbereich von 100 bis 105 ppm ergeben (HATCHER ET AL. 1983, LANKES 2001). Das bei ca. 56 ppm auftretende Signal der Methoxygruppen ist charakteristisch für Ligninstrukturen (SWIFT ET AL. 1992, DESHMUKH ET AL. 2001, LANKES 2001). Die Signale der C- und O-substituierten Aromaten von Phenylpropan-Derivaten wie Lignin treten bei etwa 130 ppm bzw. 150 ppm auf. In kondensierten Tanninen sind dagegen Signale bei etwa 105 ppm bzw. 155 ppm charakteristisch für C- bzw. O-substituierte Aromaten. Im Aliphatenbereich werden Signale bei 40 ppm verzweigten Aliphaten (CH-Gruppen) zugeordnet, während Signale bei 30 ppm und 23 ppm durch Methylen- und Methylgruppen hervorgerufen werden (LANKES 2001, DESHMUKH ET AL. 2001).



**Abb. 2.1:** Leitsignale charakteristischer Vorläufersubstanzen im  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektrum der Hohllohsee-DOM.  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektrum der Probe HO21 Original. **1:** (+)-Catechin (Strukturbestandteil kondensierter Tannine); **2:** Coniferylalkohol (Strukturbestandteil des Nadelholzlignins); **3:**  $\beta$ -D-Glucose (Monomer der Cellulose); R = OH, N-Acetyl-D-glucosamin (Monomer des Chitins); R =  $\text{NHCOCH}_3$ ; **4:**  $\alpha$ -Pinen (Monoterpen).

Das Braunwasser des Hohlohsees (0,45 µm-filtrierte Probe) besteht zu etwa 50 bis 65 % des DOC aus Humin- und Fulvinsäuren (ca. 20 % HA, 30 bis 45 % FA) und zu etwa 30 % aus NHS (ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002). Die XAD-Fraktionen dieses aquatischen Systems wurden ausführlich mit NMR-spektroskopischen Methoden charakterisiert (LANKES 2001, LANKES UND LÜDEMANN 2002). Charakteristisch für die NHS-Fraktion ist die Anreicherung von Kohlenhydrat- und *n*-Alkanstrukturen gegenüber der Original-Braunwasserprobe. Die aromatischen Strukturen der FAs und HAs werden hauptsächlich Ligninen bzw. Phenylpropanderivaten und Tanninen (Polyphenolen) zugeordnet. In den Huminsäuren wurde mit etwa 43 bis 48 % stets ein höherer Anteil an aromatischem Kohlenstoff nachgewiesen als in Fulvinsäuren (35 bis 40 %). Trotz der unterschiedlichen Anteile ist das Substitutionsmuster der Aromaten in beiden Fraktionen sehr einheitlich. Die FAs und HAs des Hohlohsees enthalten etwa 20 % an O-Alkyl-Kohlenstoff, wovon maximal die Hälfte Kohlenhydraten zugeordnet wird. Der relative Anteil der Aliphaten liegt bei den FAs zwischen 21 und 29 % und bei den HAs zwischen 15 und 22 %. FAs und HAs unterscheiden sich deutlich in der Art der vorliegenden aliphatischen Strukturen. Verzweigte aliphatische Strukturen (~ 40 ppm) sind charakteristisch für FAs. Diese werden für HS unterschiedlicher Herkunft auf Terpenoide als Vorläufersubstanzen zurückgeführt (LANKES 2001, LEENHEER ET AL. 2003). In den Huminsäuren wurden vor allem *n*-Alkanstrukturen nachgewiesen (~ 30 ppm), die beispielsweise aus Suberinen und Cutinen stammen können. FAs enthalten etwa 17 bis 19 % und HAs etwa 15 bis 17 % an carboxylischen C-Atomen. Für die carboxylischen Funktionen der Fulvinsäuren wurde aus dem Vergleich mit Titrationsexperimenten gefolgert, dass diese im Unterschied zu den COOR-Funktionen der HAs zum überwiegenden Anteil als freie Carboxylgruppen vorliegen. Für beide Fraktionen wird von einer Verknüpfung der COOH- bzw. COOR-Strukturen mit aromatischen Strukturen ausgegangen. Derartige Strukturen entstehen beispielsweise beim biologischen Abbau von Ligninen. LANKES legte dar, dass ein oxidativer Abbau von HS-Vorläufersubstanzen (z. B. Ligninen) zu einer Zunahme des Anteils der Carboxylfunktionen sowie zu einer Abnahme der Molekülgröße bzw. einer Zunahme des Oberflächen zu Volumen-Verhältnisses der Moleküle führt. Da aromatische Strukturen vor allem in zentralen Molekülbereichen zu finden sind, kann aus einer Zunahme des Verhältnisses des Anteils sog. Endgruppen (z. B. COOH, CH<sub>3</sub>) zum Anteil der sog. "core"-Gruppen (Aromaten) auf eine Zunahme des Oberflächen zu Volumen-Verhältnisses und damit auf eine abnehmende Molekülgröße geschlossen werden. Für die HS des Hohlohsees folgerte LANKES aus dem höheren relativen Anteil an Endgruppen sowie aus einem höheren Verzweigungsgrad der C-Atome auf eine geringere Molekülgröße der FAs gegenüber den HAs (LANKES 2001).

Die Überlegungen von LANKES gelten nicht nur in Bezug auf die HS des Hohlohsees, sondern stellen eine allgemein gültige Beschreibung der mit dem aeroben biologischen Abbau von Vorläufersubstanzen verbundenen Änderungen der Molekülstruktur und -größe von HS dar. SWIFT stellte bereits 1970 die Hypothese auf, dass der fortschreitende aerobe Abbau organischer Substanz mit einer Abnahme der Molekülgröße sowie einer zunehmenden Oxidation verbunden ist. Als experimentelle Bestätigung dieser Hypothese führte er unter anderem die Zunahme des relativen Anteils an Carboxylfunktionen in SEC-Fraktionen eines Bodenhuminstoffs mit abnehmender Molekülgröße (zunehmendem Elutionsvolumen) der Fraktionen an. Der Anteil der O-Alkyl-Strukturen folgte einem gegenläufigen Trend und nahm mit abnehmender Molekülgröße ab (SWIFT ET AL. 1992).

Aus den Erkenntnissen beider Autoren ergibt sich die für diese Arbeit wesentliche Konsequenz, dass bei Betrachtung der Huminstoffe eines bestimmten Gewässers (gleiche Vorläufersubstanzen) durch Interpretation der Strukturdaten qualitative Informationen über Molekülgrößenunterschiede verschiedener Fraktionen erhalten werden können. Diese Informationen können zur Interpretation der Trennergebnisse der SEC- bzw. mst UF-Fraktionierung herangezogen werden.

#### 2.4.5 Analytische SEC

Zur Untersuchung der Molekülgrößenverteilung der Proben wurde die Größenausschlusschromatographie eingesetzt. In den letzten Jahren wurden analytische SEC-Systeme entwickelt, mit welchen eine kontinuierliche DOC-Detektion möglich ist (HUBER 1992, SPECHT ET AL. 2000, HER ET AL. 2002a und b). Dies erlaubt eine direkte Bestimmung des Gehalts an gelöster organischer Substanz während der chromatographischen Trennung. Im von HUBER entwickelten LC-UV/OCD-System (Liquid Chromatography-Ultraviolet Absorbance/Organic Carbon Detection) wird ein spezieller Reaktortyp (Dünnschichtreaktor) zur Oxidation der gelösten organischen Substanz verwendet (HUBER UND FRIMMEL 1991). Dies ermöglicht eine Untersuchung der DOM ohne vorherige Anreicherung. Von SPECHT wurde ebenfalls ein analytisches SEC-System entwickelt, welches im Gegensatz zum erwähnten LC-UV/OCD-System die Injektion von Proben mit höheren Salzgehalten erlaubt (SPECHT ET AL. 2000).

#### 2.4.6 Asymmetrische Fluss Feld-Fluss-Fraktionierung (AF<sup>4</sup>)

Als weitere Methode zur Untersuchung der Molekülgrößenverteilung wurde die asymmetrische Fluss Feld-Fluss-Fraktionierung (AF<sup>4</sup>) eingesetzt. Die Methode eignet sich vor allem zur Trennung von Partikeln (1 nm bis 100 µm), kann jedoch auch für größere gelöste Moleküle und Polymere mit Molmassen zwischen 10<sup>3</sup> und 10<sup>12</sup> g/mol verwendet werden. Bei der Fluss Feld-Fluss Fraktionierung (F<sup>4</sup>) wird zur Trennung an Stelle einer stationären Phase ein dünner Kanal (Höhe < 300 µm) benutzt, der laminar vom Eluenten durchströmt wird und ein parabolisches Profil der Strömungsgeschwindigkeit aufweist. Durch einen Fluss quer zur Richtung der laminaren Strömung (Cross Flow) wird eine zusätzliche Strömungsfeldkomponente erzeugt (BECKETT ET AL. 1987). Die querströmende Flüssigkeit wird an der Oberseite des Kanals eingebracht und kann über eine Membran an der Unterseite entweichen. Durch den Querfluss wird ein Transport der Teilchen zur unteren Kanalwand hin verursacht. Der resultierende Konzentrationsgradient führt zur Diffusion der Moleküle zurück zur Kanalmitte in Bereiche höherer Strömungsgeschwindigkeit. Kleinere Teilchen gelangen aufgrund ihres höheren Diffusionskoeffizienten schneller zurück in die Kanalmitte und eluieren demzufolge zuerst. Bei der F<sup>4</sup> wird also, ähnlich wie bei der idealen SEC, eine Trennung der Teilchen aufgrund unterschiedlicher hydrodynamischer Radien erreicht. Im Gegensatz zur SEC ergibt sich hier jedoch eine umgekehrte Elutionsreihenfolge (kleine Moleküle eluieren vor großen). Die AF<sup>4</sup> stellt eine Variante der F<sup>4</sup> dar, welche sich von der F<sup>4</sup> dadurch unterscheidet, dass die Membran an der Kanaloberseite durch eine feste Wand ersetzt ist. Der Cross-Flow-Eluentenstrom wird hier lokal durch eine Kapillare eingebracht. Dies ermöglicht ein gezieltes Einstellen der Crossflow- und Laminarfluss-Strömungen und damit auch eine Anreicherung der injizierten Probe vor Beginn der eigentlichen Elution. Des Weiteren ist es möglich, das Verhältnis von Laminar- zu Querfluss während eines Laufes zu variieren und so die Trennung zu beeinflussen.

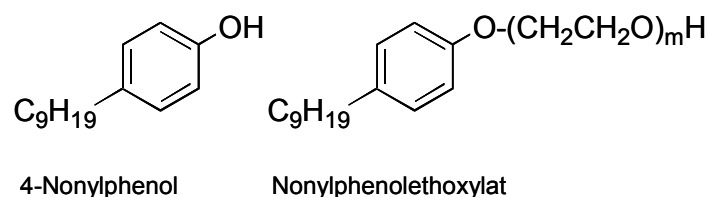
### 2.5 Modellschadstoffe

Durch Ultrafiltrationsexperimente mit Modellschadstoffen (MSS) sollte untersucht werden, inwiefern das Verhalten niedermolekularer organischer Einzelsubstanzen ( $M < MWCO$  der UF-Membranen) bei der mst-UF-Fraktionierung von deren physikochemischen Eigenschaften abhängt. Des weiteren sollte durch Filtration in Ab- und Anwesenheit weiterer gelöster organischer Substanzen (DOM-Matrix) untersucht werden, ob Wechselwirkungen zwischen MSS und DOM-Fractionen beobachtbar sind. WW zwischen organischen Schadstoffen und DOM wurden insbesondere für hydrophobe Substanzen gut untersucht bzw. nachgewiesen (CHIN ET AL. 1997, DOLL ET AL. 1999, MACKENZIE ET AL. 2002, SALLOUM ET AL. 2002, YAMAMOTO ET AL.

2003). Die Polarität organischer Moleküle beeinflusst sowohl die Art und Stärke der WW mit DOM als auch das Verhalten der Moleküle in wässrigen Lösungen. Als Modellschadstoffe wurden daher niedermolekulare Verbindungen unterschiedlicher Polarität ausgewählt. 4-Nonylphenol (4-NP), Nonylphenoethoxylate (NPEO) und Coffein wurden als MSS eingesetzt. NPEO stellen Gemische verschiedener Ethoxylathomologe dar, wobei die Polarität der einzelnen Homologe von der Anzahl an Ethoxygruppen im Molekül abhängt. 4-NP enthält keine Ethoxygruppe und hat hydrophobe Eigenschaften. Coffein besitzt eine ähnliche Molmasse wie 4-NP, ist jedoch hydrophiler als letzteres.

### 2.5.1 Alkylphenoethoxylate

Alkylphenoethoxylate (APEO) gehören als oberflächenaktive Substanzen zur Gruppe der nicht-ionischen Tenside (KOSSWIG UND STACHE 1993). Der hydrophobe Teil des Moleküls besteht aus einem Alkylphenol (AP) mit einer unterschiedlich stark verzweigten Alkylkette mit meist 8 oder 9 Kohlenstoffatomen (Abb. 2.2). Der hydrophile Molekülteil wird von einer unverzweigten Ethoxylatkette (EO) mit einer Länge von 1 bis 100 Ethoxyeinheiten gebildet, welche sich meist (> 90 %) in para-Stellung zum Alkylteil am aromatischen Ring befindet (MAGUIRE 1999).



**Abb. 2.2:** Strukturen des 4-Nonylphenols und der Nonylphenoethoxylate. m: Anzahl an Ethoxygruppen.

Die technische Synthese der APEO erfolgt durch basenkatalysierte Umsetzung eines Alkylphenols mit Ethylenoxid. Dabei wird ein Gemisch aus verschiedenen APEO mit unterschiedlich langen EO-Ketten erhalten. Die Massenanteile der einzelnen Ethoxylate folgen einer Poissonverteilung. Aufgrund dieser technischen Synthese stellen APEO immer ein Gemisch aus verschiedenen, unterschiedlich hoch ethoxylierten Alkylphenolisomeren dar. Das unverzweigte Alkylphenol (4*n*-AP) kommt in den technischen Produkten nicht vor, was seinen Einsatz als internen Standard bei der Analytik ermöglicht. Nach einem freiwilligen Verzicht der Industrie im Jahr 1986 auf den Einsatz von APEO in Produkten, die dem Wasch- und Reinigungsmittelgesetz unterliegen, finden die Tenside in Deutschland inzwischen ausschließlich industrielle Verwendung. Sie sind unter anderem Bestandteile von Reinigungs-, Papier-, Textil- und Lederhilfsmitteln und werden außerdem als Emulgatoren in der Emulsionspolymerisation, als Formu-



lierungshilfsmittel bei der Pestizidherstellung und bei der Produktion von Farben und Lacken eingesetzt. Aufgrund der zahlreichen Verwendungsmöglichkeiten werden APEO in großen Mengen hergestellt. Im Jahr 1990 lag die weltweite Produktion bei 300000 t/a, davon wurden zwei Drittel allein in den U.S.A. erzeugt (THIELE ET AL. 1997). Die Nonylphenoethoxylate (NPEO) nehmen mit ca. 80 % den überwiegenden Anteil der APEO ein. Weitere 15 % werden durch die Octylphenoethoxylate (OPEO) gestellt (STAPLES ET AL. 1998). Die Alkylphenole selbst sind vor allem als Zwischenprodukte von Bedeutung (LEISEWITZ UND SCHWARZ 1997).

**Tab. 2.2:** Stoffdaten der Alkylphenole und ausgewählter APEO-Metabolite. k. A.: Keine Angaben. 4t-OP: 4t-Octylphenol, 4-NP: 4-Nonylphenol, NP1EO: Nonylphenolmonoethoxylat, NP2EO: Nonylphenoldiethoxylat.

Parameter	4t-OP	4-NP	NP1EO	NP2EO
CAS	140-66-9	140-40-5 ( <i>n</i> -Isomer) 25154-52-3 (techn. Produkt)	k. A.	20427-84-3
<i>M</i> in g/mol	206,32	220,35	264,40	308,46
Löslichkeit in H <sub>2</sub> O in mg/L (20 °C) (AHEL UND GIGER 1993a)	12,6	5,43	3,02	3,38
log <i>K<sub>OW</sub></i> -Wert (AHEL UND GIGER 1993b)	4,12	4,48	4,17	4,21
p <i>K<sub>S</sub></i> -Wert (MAGUIRE 1999)	10,7	k. A.	k. A.	k. A.

Die Wasserlöslichkeit der APEO nimmt mit zunehmender Länge der Ethoxylatkette und abnehmender Länge der Alkylkette zu (Tab. 2.2). Die Löslichkeit der Alkylphenole ist aufgrund der Hydroxygruppe etwas höher als die der Mono- und Diethoxylate. Die nichtionischen Tenside besitzen relativ niedrige kritische Micellbildungskonzentrationen (cmc). Für ein OPEO mit einer durchschnittlichen EO-Kettenlänge von 10 (Handelsname Triton X 100) wird vom Hersteller eine cmc von 0,22 bis 0,24 mM angegeben. Dies entspricht etwa einer Konzentration von 137 bis 150 mg/L (SIGMA-ALDRICH PRODUKTINFORMATION 1999). Zur Charakterisierung des Verhältnisses von hydrophilem zu hydrophobem Molekülteil in nichtionischen Tensiden wurde von GRIFFIN der HLB-Wert (hydrophile-lipophile balance) eingeführt (GRIFFIN 1949). Dieser kann experimentell oder rechnerisch ermittelt werden (Gleichung 2.11).

$$HLB = m_{rel} / 5 \quad (2.11)$$

Der Parameter  $m_{rel}$  beschreibt den Massenanteil des hydrophilen Molekülteils. NPEO mit mehr als 6 Ethoxygruppen haben HLB-Werte  $> 10$  und werden daher als hydrophil eingestuft (z. B. NPEO mit durchschnittlich 9 EO-Einheiten:  $HLB = 12,7$ ). Sowohl die Alkylphenole als auch die APEO zeichnen sich durch Absorption von elektromagnetischer Strahlung im UV-Bereich sowie Fluoreszenzverhalten aus. Die Absorptionsmaxima der Substanzen in wässrigen Lösungen liegen bei etwa 227 nm und 277 nm. Für Triton X 100 und 4t-OP werden in wässriger Lösung und für 224 nm molare Absorptionskoeffizienten von 6898 L/(mol·cm) und 8035 L/(mol·cm) angegeben (DESTAILLATS ET AL. 2000). Das Emissionsmaximum der Substanzen in wässriger Lösung bei einer Anregungswellenlänge von 228 nm liegt bei 305 nm (AHEL ET AL. 2000).

Zur Untersuchung der Alkylphenoethoxylate und ihrer Metabolite wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl an Analysemethoden entwickelt (LEE 1999). Eine chromatographische Trennung der Ethoxylathomologen kann nur durch Anwendung der Normalphasenchromatographie erreicht werden. Hier existieren sowohl flüssigkeits- (AHEL UND GIGER 1985a, AHEL UND GIGER 1985b, AHEL ET AL. 2000) als auch dünnschichtchromatographische Methoden (PATTERSON ET AL. 1967, JUN ET AL. 1998). In den letzten Jahren kommen zunehmend massenspektrometrische Detektionsmethoden, meist nach HPLC-Trennung, zum Einsatz (DI CORCIA ET AL. 1998, FERGUSON ET AL. 2000, JONKERS ET AL. 2001). Eine Quantifizierung verschiedener Nonylphenolisomere ist nur nach chromatographischer Trennung möglich, da die einzelnen Isomere mittels massenspektrometrischer Detektion nicht unterschieden werden können (WHEELER ET AL. 1997, GUNDERSEN 2001).

Die nichtionischen Tenside selbst sind relativ gut biologisch abbaubar und werden in Kläranlagen mit einem hohen Wirkungsgrad eliminiert (Eliminationsleistung  $> 95\%$  (THIELE ET AL. 1997)). Die biologische Abbaubarkeit der APEO nimmt mit abnehmendem Verzweigungsgrad und abnehmender Länge der Alkylkette zu (SWISHER 1987). Beim biologischen Abbau der APEO wird eine Vielzahl an Metaboliten gebildet. Unter aeroben Bedingungen findet vor allem eine Verkürzung und/oder Carboxylierung der EO-Kette statt. Entsprechend werden als Zwischenprodukte unter aeroben Bedingungen vor allem die Alkylphenoxy- und phenoxyethoxyessigsäure und Alkylphenolmono- und -diethoxylat gefunden (AHEL ET AL. 1994). Weitere wichtige Metabolite sind an der Ethoxy- und Alkylkette carboxylierte Verbindungen (DI CORCIA ET AL. 1998). AP werden nur unter anaeroben Bedingungen gebildet, wo sie zusammen mit den Mono- und Diethoxylaten die Hauptmetabolite darstellen (AHEL ET AL. 1994).

Die Bedeutung des unvollständigen biologischen Abbaus der APEO wird dann erkennbar, wenn die biologischen Wirkungen der verschiedenen Metabolite im Vergleich zu den Ausgangsprodukten betrachtet werden. Vor allem die lipophilen Metabolite (Alkylphenole, Alkylphenolmono- und -diethoxylate) zeichnen sich durch eine erhöhte Toxizität gegenüber aquatischen Organismen aus (SERVOS 1999, NAYLOR 1995). Ein ähnliches Bild ergibt sich bei Betrachtung der estrogenen Wirkung. Über die estrogenen Wirkung von 4-Nonylphenol wurde 1991 von SOTO ET AL. berichtet. Seither wurde sie für 4-NP und weitere APEO-Metabolite in zahlreichen anderen Testsystemen bestätigt bzw. nachgewiesen (WHITE ET AL. 1994, ROUTLEDGE UND SUMPTER 1996, NIMROD UND BENSON 1996, KÖRNER ET AL. 1999). Die Alkylphenole besitzen im Vergleich zum natürlichen Hormon  $17\beta$ -Estradiol eine schwache estrogenen Wirkung, wobei die Octylphenolverbindungen stärker wirksam sind als die Nonylphenolverbindungen (Wirkung etwa 1/1500 bzw. 1/10000 in Bezug auf  $17\beta$ -Estradiol). Die verschiedenen Nonylphenolisomere unterscheiden sich in ihrer estrogenen Potenz (KIM ET AL. 2004). Alkylphenole mit einer tertiär verzweigten Alkylkette mit einer Länge von 8 bis 9 C-Atomen in para-Stellung zur Hydroxygruppe besitzen die stärkste estrogenen Wirkung. Bei den APEO nimmt die relative Potenz mit zunehmender Länge der Ethoxykette stark ab (ROUTLEDGE UND SUMPTER 1997).

**Tab. 2.3:** Konzentrationen an NPEO und Metaboliten in Gewässern und Trinkwasser in  $\mu\text{g/L}$ .  
k. A.: Keine Angaben. Angaben aus THIELE ET AL. 1997, BENNIE 1999, KUCH UND BALLSCHMITTER 2001, KOLPIN ET AL. 2002. NP1EC: Nonylphenoxyessigsäure, NP2EC: Nonylphenoxyethoxyessigsäure.

Matrix	NPEO (Summe)	NP1EO, NP2EO	4-NP	NP1EC, NP2EC
Abwasser	37 bis 9000	2 bis 254	2,7 bis 280	7 bis 1100
Kläranlagenablauf	4,7 bis 480	1 bis 198	< 0,2 bis 330	1,5 bis 1600
Fliessgewässer	0,47 bis 70	< 0,2 bis 69	< 0,01 bis 180	< 1 bis 116
Trinkwasser	k. A.	k. A.	0,002 bis 0,015	k. A.

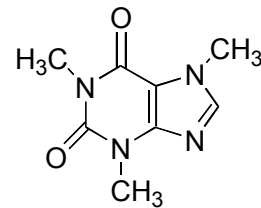
4-NP ist heutzutage als ubiquitär vorhandener Schadstoff zu betrachten. Es wurde bereits in Abwässern, Kläranlagenabläufen, Flüssen, Grundwasser, Trinkwasser und Lebensmitteln gefunden (Tab. 2.3). Ähnliches gilt für die niedrigethoxylierten NPEO und NPEC (THIELE ET AL. 1997, BENNIE 1999, GUENTHER ET AL. 2002). Die Schadwirkung der Alkylphenole ist inzwischen allgemein anerkannt. Dies spiegelt sich auch in offiziellen Bewertungen der Verbindungen wider. So stuft die Europäische Kommission im Rahmen der EU-Wasserrahmenrichtlinie die Nonylphenole als "priority hazardous substances" und die Octylphenole als "priority substances" ein (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES 2001).

### 2.5.2 Coffein

Coffein (CAS 58-08-2) ist ein zu den Purinen zählendes Pflanzenalkaloid mit der Summenformel  $C_8H_{10}N_4O_2$  und einem Molekulargewicht von 194,19 g/mol (Abb. 2.3). Es gehört ebenso wie die verwandten Verbindungen Theobromin und Theophyllin zu den Trimethylxanthinen. Die Löslichkeit in Wasser bei 20 °C beträgt 20 g/L. Der log  $K_{OW}$ -Wert liegt bei -0,07 (SRC PHYSPROP DATABASE 2003).

Coffein ist in den Genussmitteln Kaffee, Tee und Kakao in großen Mengen enthalten und ist aufgrund des hohen Konsums dieser Getränke das meistgebrauchte Pharmakon überhaupt. Weiterhin wird Coffein als Bestandteil vieler Pharmaka eingesetzt; beispielsweise zusammen mit Acetylsalicylsäure oder anderen Analgetika in Schmerzmittel-Kombinationspräparaten (FORTH ET AL. 2001).

Etwa 95 % des Coffeins werden nach oraler Aufnahme in metabolisierter Form ausgeschieden. Als Metabolite treten vor allem hydroxylierte und demethylierte Verbindungen auf. Aufgrund seines vielfältigen Gebrauchs gelangen beträchtliche Mengen an Coffeinmetaboliten und Coffein über Kläranlagenabläufe in die Gewässer. Coffein gilt zwar selbst nicht als Schadstoff, jedoch ist die Anwesenheit dieses organischen Moleküls in natürlichen Gewässern ein Hinweis für anthropogene Belastungen. Als Abwassermarker kommt dem Coffeinmolekül deshalb eine große Bedeutung zu (STANDLEY ET AL. 2000, KOLPIN ET AL. 2002, BUERGE ET AL. 2003).



**Abb. 2.3:** Struktur des Coffeins.

### 2.5.3 Analytik mittels Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie

Zur analytischen Bestimmung der Modellschadstoffe wurde in dieser Arbeit die Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC) eingesetzt. Die Dünnschichtchromatographie steht als Planarchromatographie im Gegensatz zu den säulenchromatographischen Trennverfahren wie HPLC und Gaschromatographie (GC). Die stationäre Phase liegt in Form einer dünnen Schicht vor, welche auf ein Trägermaterial (Glas oder Aluminiumfolie) aufgebracht wird. In Analogie zur HPLC wird bei der Dünnschichtchromatographie anhand der Charakteristika der eingesetzten stationären Phasen zwischen TLC und HPTLC unterschieden. HPTLC-Phasen zeichnen sich durch geringere mittlere Korngrößen (5 bis 7  $\mu\text{m}$ ), eine geringere Schichtdicke (100 bis 200  $\mu\text{m}$ ) der stationären Phase und daraus resultierende geringere Auftragevolumina (0,1 bis 1  $\mu\text{L}$ ) und kürzere Analysenzeiten (3 bis 20 min) aus. Als stationäre Phasen stehen Kieselgele, Aluminiumoxide, sowie hydrophil (Diol-, Cyano-, Amino-Phasen) und hydrophob ( $C_{18}$ -Phasen)

modifizierte Kieselgele zur Verfügung. Bei der überwiegenden Anzahl (> 80 %) der HPTLC-Methoden wird die Trennung im Normalphasenmodus unter Verwendung von Kieselgel als stationärer Phase durchgeführt (HAHN-DEINSTROPP 1998). Im Gegensatz zur Säulenchromatographie ist bei der HPTLC ein schneller Wechsel des Trennsystems möglich, da die stationäre Phase nur einmal verwendet wird.

Auf dem Gebiet der HPTLC wurden in den letzten Jahren zahlreiche apparative und materialbezogene Weiterentwicklungen getätigt, welche die Anwendung als quantitative und spurenanalytische Methode ermöglichen (WEINS UND HAUCK 1996, BURGER ET AL. 1990, HAUCK ET AL. 2001, SHERMA 2002). Die wichtigsten apparativen Entwicklungen stellen die Automatisierung der Probenauftragung, die Einführung der Automated Multiple Development (AMD)-Technik sowie hochleistungsfähiger Scanner und Bilddokumentationssysteme für die Detektion dar. Die AMD-Technik ist eine vollautomatisierte Entwicklungsmethode, bei der eine Mehrfachentwicklung in Form von 10 bis 30 Teilschritten abläuft. Dabei ist die Laufstrecke jedes Teilschrittes um ein konstantes Inkrement (1 bis 3 mm) länger als die des vorhergehenden Teilschrittes. Bei der AMD-Entwicklung kann die Fließmittelzusammensetzung für jeden Teilschritt geändert werden. Dies ermöglicht die Durchführung von Gradientenelutionen auf polaren stationären Phasen (BURGER ET AL. 1990). Dabei wird die Fließmittelzusammensetzung von polar nach unpolar modifiziert. Als Universalgradient wird eine AMD-Entwicklung bezeichnet, welche den gesamten Polaritätsbereich von sehr polar (z. B. Methanol) bis sehr unpolar (z. B. Hexan) umfasst. Die Polaritätsabstufung kann darüber hinaus mit pH-Wert-Änderungen kombiniert werden. Mit Hilfe der AMD-Entwicklung lassen sich Stoffgemische mit weitem Polaritätsbereich auftrennen. Diese Technik ist daher beispielsweise geeignet für die Auftrennung pharmazeutischer Wirksubstanzen und deren Metabolite oder auch für die Anwendung auf Umweltproben (DIN V 38407-11 (1995), DE LA VIGNE ET AL. 1991, KOEBER UND NIESSNER 1996).

Zur Detektion der Substanzen stehen neben der häufig eingesetzten Absorptions- oder Fluoreszenzmessung mit Hilfe von Dünnschichtscannern (Densitometrie) zusätzlich *online*-Kopplungstechniken wie TLC-Raman-, TLC-FTIR- und TLC-Massenspektrometrie zur genauen Identitätsbestimmung der Substanzen zur Verfügung (JORK 1993a, HAHN-DEINSTROPP 1998, CRECELIUS ET AL. 2002, VAN BERKEL ET AL. 2002). Da die zu analysierenden Substanzen nach der Trennung als inneres Chromatogramm auf der Platte fixiert sind, können verschiedene physikalische und chemische Nachweismethoden miteinander kombiniert werden. Durch Absorptionsmessung können bei der HPTLC minimale Stoffmengen von 0,5 bis 5 ng nachgewiesen werden.

Die Fluoreszenzmessung ermöglicht Nachweisgrenzen zwischen 10 und 100 pg. Zusätzlich zu den genannten physikalischen Detektionsverfahren hat JORK in seinen Nachschlagewerken (1993a, 1993b) eine Vielzahl an chemischen Methoden zusammengestellt, welche einen prä- oder postchromatographischen, gruppen- oder substanzspezifischen Nachweis oder eine Derivatisierung erlaubt. Des Weiteren werden vermehrt biologische Detektionsverfahren ergänzend zu den oben genannten eingesetzt (Bioautographie). Es stehen Nachweismethoden für antibiotische (HAMBURGER UND CORDELL 1987, HORVATH ET AL. 2002), fungizide (HOSTETTMANN ET AL. 1997) und enzymhemmende Wirkungen (WEINS UND JORK 1996, MARSTON ET AL. 2002) zur Verfügung. Darüber hinaus wurde eine bioautographische Variante des Leuchtbakterientestes (EBERZ ET AL. 1996) sowie des Yeast Estrogen Screens auf estrogene Wirkung nach ROUTLEDGE UND SUMPTER (1996) entwickelt (MÜLLER ET AL. 2004).

### 3 Experimentelle Angaben

#### 3.1 Gelöste organische Substanz

Stellvertretend für das in Gewässern anzutreffende Spektrum an gelöster organischer Substanz wurden zwei unterschiedliche DOM-Typen ausgewählt. Als repräsentativ für DOM mit weitgehend natürlicher Zusammensetzung und hohem Huminstoffgehalt wurden Proben aus einem Braunwassersee (Hohlohsee, Probenkürzel HO) entnommen. Als Vertreter einer anthropogen belasteten DOM wurde der Ablauf einer kommunalen Kläranlage (Kläranlage Neureut, Probenkürzel Alb5) ausgewählt.

Der Hohlohsee gehört neben dem Wildsee und der Breitlohmiß zu den Hochmooren auf dem Kaltenbronn im Nordschwarzwald. Das Areal ist als Naturschutzgebiet ausgewiesen. Die Hochmoore befinden sich auf einer Höhe von etwa 1000 m ü. NN in regenreichem, kühl-gemäßigtem Klima (Jahresdurchschnittstemperatur 6 °C; Niederschlag 1600 mm/a). Geologischer Untergrund ist hier der Buntsandstein. (BNL BROSCHÜRE 1999). Aufgrund seines hohen Huminstoffgehaltes wurde der Hohlohsee als Referenzgewässer im Rahmen eines mehrjährigen DFG-Forschungsschwerpunktes („Refraktäre Organische Substanzen in Gewässern (ROSIG)“) ausgewählt und ausführlich charakterisiert (FRIMMEL UND ABBT-BRAUN 1999, FRIMMEL ET AL. 2002). Die DOC-Konzentration des Hohlohseewassers variiert je nach Probenahmezeitpunkt zwischen etwa 20 und 30 mg/L. Der pH-Wert beträgt 3,5 bis 4,2, und die elektrische Leitfähigkeit liegt zwischen 30 und 48 µS/cm (22 °C). Die spezifischen Absorptionswerte reichen von  $SUVA_{254} = 3,98$  bis 4,81 L/(m mg) und  $SUVA_{436} = 0,28$  bis 0,38 L/(m mg). Der Huminstoffanteil des Hohlohseewassers beträgt 55 bis 66 % (Massenanteil am DOC). Der Anteil der Fulvinsäuren bzw. der Huminsäuren liegt bei 32 bis 45 % und 19 bis 23 % des DOC (ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002). Für diese Arbeit wurden Proben von zwei unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten verwendet. Die Probe HO12 K wurde im Rahmen des ROSIG-Projektes im Juli 1996 entnommen, über eine 0,45 µm Cellulosenitrat-Membran filtriert und mittels Ultrafiltration angereichert. Als UF-Membran wurde eine Polyethersulfonmembran mit einem MWCO von 4000 g/mol eingesetzt. Die Filtration wurde im Diafiltrationsmodus durchgeführt (FRIMMEL UND ABBT-BRAUN 1999, ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002). Die angereicherte Probe hatte einen DOC-Gehalt von 877 mg/L, was 65 % der Originalmasse an Kohlenstoff entspricht (ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002, ABBT-BRAUN 2003). Die Probe HO21 wurde im Juli 2001 entnommen und über 5 µm Glasfaserfilter und 0,45 µm-Membranen aus Cellulosenitrat (Sartorius, Göttingen, Deutschland) filtriert. Beide Proben wurden bis zur Verwendung bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Die Probe Alb5 stammt aus dem Ablauf der kommunalen Kläranlage der Stadt Karlsruhe. Die Kläranlage erhält Mischabwasser aus häuslichen und industriellen Quellen im Umfang von etwa 700000 Einwohnergleichwerten. Als Aufbereitungsstufen werden unter anderem mechanische Vorklärung, Belebungsbecken, Tropfkörper und Nachklärung eingesetzt. Vorfluter für den Ablauf der Kläranlage ist ein Sammelkanal, der in das Fließgewässer Alb bei Karlsruhe entwässert. Die Probenahmestelle Alb5 sowie fünf weitere Probenahmeorte entlang der Alb wurden innerhalb eines dreijährigen BMBF-Verbundprojektes physikochemisch charakterisiert (MÜLLER ET AL. 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Fraktionierung und weitergehende Charakterisierung dieser Probe durchgeführt. Der Kläranlagenablauf wurde mehrfach beprobt, und die entnommenen Proben wurden über 5 µm Glasfaserfilter und über 0,45 µm Cellulosenitratfilter filtriert. Die filtrierten Proben wurden bei 4 °C dunkel gelagert und baldmöglichst weiterverwendet. Die Probenahmestelle ist identisch mit dem im ROSIG-Projekt als ABV bezeichneten Probenahmeort. Die HS-Gehalte der Probe ABV liegen typischerweise zwischen 9 bis 18 % des DOC. Die Anteile der FAs bzw. der HAs betragen 6 bis 11 % und 3 bis 7 % des DOC. Die Zusammensetzung und somit die physikochemischen Eigenschaften der DOM dieser Probe zeigen eine ausgeprägtere zeitliche Variabilität als die der DOM des Brauwassers (ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002).

Die Bezeichnung „Originalproben“ bezieht sich im Folgenden auf die filtrierten Proben der beiden Probenahmeorte (HO, Alb5). Vor der eigentlichen Fraktionierung wurden die Originalproben mittels Ultrafiltration angereichert (Kap. 3.2). Das Konzentrat („K“) des Anreicherungsschrittes wurde sodann fraktioniert. Da die Probe HO12 K eine sehr hohe DOC-Konzentration aufwies und von dieser Probe nur ein begrenztes Volumen zur Verfügung stand, wurde dieses Konzentrat für einzelne Experimente vor der Fraktionierung mit Reinstwasser verdünnt. Die Probe wurde zu verschiedenen Zeitpunkten fraktioniert, welche im Folgenden jeweils durch Verwendung erweiterter Probenkürzel gekennzeichnet werden (HO12 K a, HO12 K b). Je Fraktionierung wurden zwischen 4 und 22 Fraktionen hergestellt (Probenkürzel „F“ für Fraktion). Eine Übersicht über die durchgeführten Fraktionierungen ist in Tabelle 3.1 gegeben.



**Tab. 3.1:** Übersicht über die mittels SEC und mst-UF-fraktionierten Proben.

Fraktionierung Nummer	Fraktionierte Probe(n)	Jahr der Probenahme	Jahr der Fraktionierung	Fraktionierungsmethode	DOC in mg/L
I	HO12 K a	1996	2000	SEC und mst-UF	25
	Alb5 K	2000	2000		29
II	Modellschadstoffe	keine	2001	mst-UF	nicht bestimmt
III	HO12 K a	1996	1999	SEC	180
IV	HO12 K b	1996	2002	SEC	543
V	HO21 K	2001	2001	mst-UF	104
VI	Alb5 K	2001	2001	mst-UF	46

### 3.2 Anreicherung von gelöster organischer Substanz

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass im Folgenden aus sprachlichen Gründen auf eine Differenzierung zwischen Anreicherung (der DOM) und Isolierung (von HS) verzichtet wird. Der Begriff „Anreicherung“ wird im weiteren als übergeordnete Bezeichnung gebraucht. Folgende Methoden wurden hinsichtlich ihrer Eignung für eine Fraktionierung der Konzentrate bzw. Isolate mittels Größenausschlusschromatographie verglichen:

#### *Anreicherung mittels Rotationsverdampfer nach Kationenaustausch*

Die 0,45 µm-filtrierte Probe ( $V = 0,5$  L) wurde zur Abtrennung anorganischer Elektrolyte an einem Dowex WX8-Kationenaustauscher (Dow, Schwalbach, Deutschland) vorbehandelt. Die Desorption erfolgte mit Salzsäure ( $c = 0,1$  mol/L). Das Eluat des Kationenaustauschers wurde am Rotationsverdampfer bei 35 °C und 60 rpm eingengt (ca. 10-fache Volumenverringerung). Das Konzentrat dieser Anreicherungsmethode wurde mit dem Probenkürzel „G“ bezeichnet.

#### *Anreicherung an Amberlit XAD8-Adsorberharz*

Die Isolierung wurde in drei Varianten durchgeführt. Bei der XAD-Variante A wurde die unfiltrierte Probe ( $V = 4$  L) beim Original-pH-Wert eingesetzt. Die XAD-Varianten B und C wurden mit Probenaliquoten durchgeführt, welche zuvor 0,45 µm bzw. 1,2 µm filtriert worden waren. Beide Proben wurden vor der Aufgabe auf das Harz durch Zugabe von HCl ( $c = 1$  mol/L) auf einen pH-Wert von 2 eingestellt. (Probenkürzel „XAD A“ etc.). Zur Isolierung wurde eine mit XAD 8-Harz (Rohm & Haas, Bremen, Deutschland) befüllte Glassäule mit einem Durchmesser

von 5 cm und einer Länge von 50 cm verwendet. Die Flussrate betrug 10 mL/min. Der adsorbierte Anteil der Probe wurde mit Natronlauge ( $c = 0,1 \text{ mol/L}$ ) desorbiert. Das Eluat (Hauptfraktion; ( $V \approx 0,4 \text{ L}$ )) wurde durch Zugabe von Salzsäure ( $c = 1 \text{ mol/L}$ ) auf einen pH-Wert von etwa 2 angesäuert. Bei der XAD-Anreicherung der Probe Alb5 konnte keine Ausfällung von organischem Material (Huminsäuren) beobachtet werden.

#### *Anreicherung mittels Ultrafiltration im Konzentrationsmodus*

Die  $0,45 \mu\text{m}$ -filtrierte Probe ( $V = 13 \text{ L}$  (Alb5) bzw.  $40 \text{ L}$  (HO21)) wurde in einer 2 L-Ultrafiltrations-Rührzelle (Millipore, Eschborn, Deutschland) unter Verwendung einer Ultrafiltrationsmembran vom Typ YM1 aus regenerierter Cellulose (MWCO =  $1000 \text{ g/mol}$ , Millipore) 15- bzw. 5-fach aufkonzentriert (Probe „K“).

### **3.3 Fraktionierung von gelöster organischer Substanz**

#### **3.3.1 Fraktionierung mittels SEC**

##### *3.3.1.1 Vorgehensweise bei der SEC-Fraktionierung*

Die SEC-Fraktionierung der DOM wurde mit dem präparativen HPLC-System Äkta Explorer 100 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) durchgeführt. Die Injektion der Proben erfolgte mit Hilfe einer Schlauchpumpe über eine Probenschleife. Es wurden 2 unterschiedliche SEC-Säulen eingesetzt (Tab. 3.2). Die Flussrate des Eluenten betrug  $1 \text{ mL/min}$ . Das System ist mit einem UV/Vis- und einem Leitfähigkeitsdetektor sowie einer pH-Messzelle ausgestattet. Als Detektionswellenlängen wurden  $\lambda = 254 \text{ nm}$  für DOM-Proben und  $\lambda = 224 \text{ nm}$  für PSS-Standards verwendet. Fraktionen wurden am Säulenausgang als Eluate unterschiedlicher Elutionsvolumina (= Elutionszeiten) gesammelt. Größere Volumina der einzelnen Fraktionen wurden durch Mehrfachinjektion der Probe erhalten. Das Sammeln der Fraktionen geschah bei kleinen Volumina (mL-Bereich) mit Hilfe eines Fraktionensammlers, bei Volumina über  $50 \text{ mL}$  über das Auslassventil (bis zu 7 Fraktionen). Die Aufnahme und Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Analysensoftware UNICORN (Version 3.00, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, 1998) sowie mit dem Programm Origin 6.0 der Firma Microcal. Die experimentellen Details zu den SEC-Fraktionierungen sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

**Tab. 3.2:** Experimentelle Angaben zur Fraktionierung mit dem präparativen SEC-System.

Parameter	Säule 1	Säule 2
Fraktionierungen Nr.	I und III	IV
Säule	<b>Superdex 75 HR10/30</b>	<b>TSK HW 50 (S)</b>
Material	Kompositgel aus Agarose und Dextran (Amersham Pharmacia Biotech)	Copolymer aus Methacrylsäure und Ethylenglykol (Toso Haas)
Partikelgröße	11 - 15 $\mu\text{m}$	20 - 40 $\mu\text{m}$
Trennbereich	70000 - 3000 g/mol (globuläre Proteine); 30000 - 500 g/mol (Dextrane)	80000 - 500 g/mol (globuläre Proteine); 20000 - 500 g/mol (Dextrane)
Dimensionen (Länge x Durchmesser)	300 x 10 mm	250 x 20 mm
Säulenvolumen (Column Volume, CV)	24 mL	79 mL
Ausschlussvolumen ( $V_0$ )	9,5 mL (I) 8,5 mL (Dextran Blau; UV-Detektion) (III)	26,7 mL (Dextran Blau; UV-Detektion)
Permeationsvolumen ( $V_p$ )	19,4 mL (I) 18,3 mL (Leitfähigkeitsdetektion) (III)	48 mL (Leitfähigkeitsdetektion)
Kapillartyp (Material: PEEK)	1 mm Innendurchmesser (I) 0,75 mm Innendurchmesser (III)	1 mm Innendurchmesser
Totvolumen zwischen UV- und LF-Detektor	1 mm ID: 0,4 mL 0,75 mm ID: 0,2 mL	0,4 mL
Injektionsvolumen ( $V_{inj}$ )	0,5 mL	2 mL
$V_{inj}$ als % von CV (Säule)	2,1	2,5
Eluent	Phosphatpuffer (Eluent 1) $\rho(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = 1,5 \text{ g/L}$ $\rho(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 2,5 \text{ g/L}$ pH = 6,8; $\kappa = 2,8 \text{ mS/cm}$ ; $\mu = 0,04 \text{ mol/L}$	Phosphatpuffer (Eluent 2) $\rho(\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}) = 1,725 \text{ g/L}$ $\rho(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 1,7745 \text{ g/L}$ pH = 6,9; $\kappa = 2,9 \text{ mS/cm}$ ; $\mu = 0,025 \text{ mol/L}$
Fraktionierung mit	Auslassventil (I) Fraktionensammler (III)	Auslassventil
Anzahl und Volumen der Fraktionen	4 Fraktionen mit Volumina von 0,5; 1,2; 2,7 und 5,5 mL (I) 22 Fraktionen à 1 mL (III)	6 Fraktionen mit Volumina von 5,7; 2,6; 6,2; 3,5; 4,5 und 4,0 mL (IV)
Anzahl Injektionen	80 (I) 36 (III)	823 (IV)

Die verwendeten Trennsäulen wurden regelmäßig gereinigt. Dies geschah bei beiden Säulen durch Elution mit Natronlauge ( $c = 0,5 \text{ mol/L}$ ) für die Dauer von je 1,5 Säulenvolumina. Anschließend wurde mit Elutionspuffer nachgespült. Zusätzlich wurde in regelmäßigen Abständen eine Teilentkeimung der Säulen durch Elution mit Natriumazid-haltigem Elutionspuffer ( $\rho(\text{NaN}_3) = 0,5 \text{ g/L}$ ) vorgenommen. Die Superdex-Säule wurde, wie vom Hersteller empfohlen, bei Nicht-Gebrauch in einem Ethanol-Wasser-Gemisch (20:80 v/v) gelagert. Vor Verwendung wurde die Säule sorgfältig mit Eluent gespült, um DOC-Kontaminationen der Fraktionen durch

Ethanolreste zu vermeiden. Derartige Kontaminationen konnten nicht festgestellt werden. Die TSK HW 50 (S)-Säule wurde in Eluent gelagert und vor Gebrauch zunächst mit Azidpuffer gereinigt. Eine die Trennleistung beeinträchtigende Verkeimung wurde bei keiner der beiden Säulen beobachtet.

### 3.3.1.2 Kalibrieren der SEC-Säulen

Die verwendeten SEC-Säulen wurden in regelmäßigen Abständen kalibriert. Die Kalibrierung diente zum einen der Überprüfung der Trennleistung der Säule während der Fraktionierung. Zum anderen wurde eine Kalibrierung mit dem Ziel durchgeführt, standardisierte Größenfraktionen herzustellen, welche mit den mittels mst-UF produzierten Fraktionen verglichen werden sollten (Fraktionierung Nr. I, Kap. 4.4). Das Ausschlussvolumen der Säulen wurde unter Verwendung von Dextran Blau ermittelt. Das Permeationsvolumen wurde unter Verwendung von Wasser als Probe mit Hilfe der Leitfähigkeitsdetektion bestimmt (Minimum der elektrischen Leitfähigkeit). Als Kalibriersubstanzen wurden Polystyrolsulfonate (PSS; Natriumsalze) der Firma Polymer Standards Services (Mainz, Deutschland) mit  $M_p$ -Werten von 148500, 35700, 15800, 6430, 4480 und 1100 g/mol (Fraktionierungen Nr. I und IV) bzw. 16900, 13400, 8000, 6710, 3800 und 1370 g/mol (Fraktionierung Nr. III) verwendet. Die Standards wurden als Einzellösungen mit einer Konzentration von etwa 20 mg/L in Elutionspuffer angesetzt. Die Lösungen wurden bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen waren sie über mehrere Monate hinweg haltbar.

### 3.3.1.3 Ermittlung des DOC-Eintrags

Zur Ermittlung des Eintrags an gelöster organischer Substanz aus dem Eluenten sowie der jeweiligen Trennsäule wurden Fraktionen ohne eine vorhergehende Probeninjektion gesammelt, und die DOC-Konzentrationen in den erhaltenen Fraktionen bestimmt. Der DOC-Gehalt des verwendeten Puffers wurde während der Fraktionierung regelmäßig überprüft.

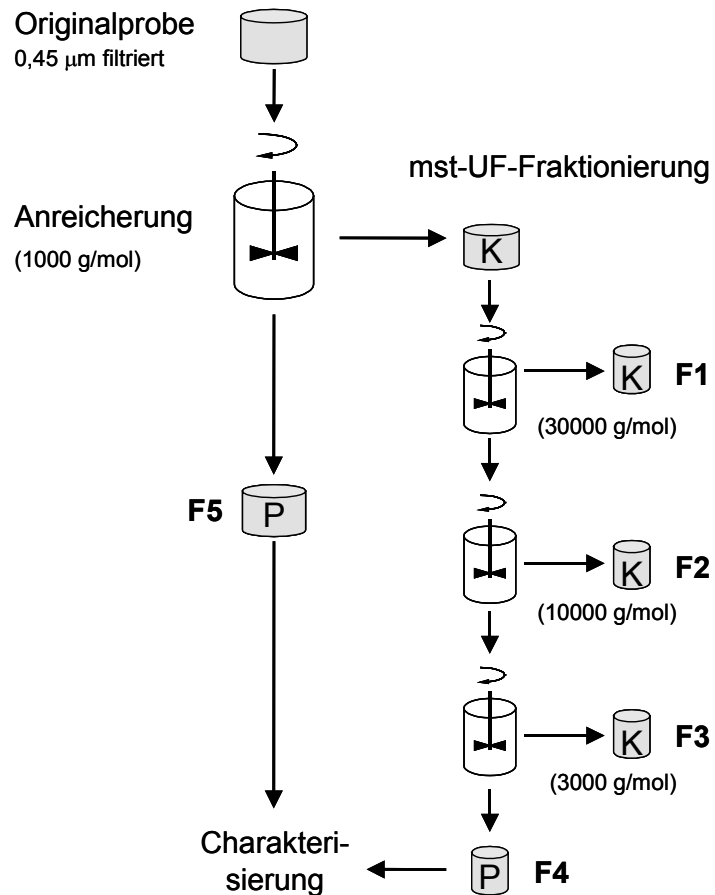
## 3.3.2 Fraktionierung mittels mehrstufiger Ultrafiltration (mst-UF)

### 3.3.2.1 Vorgehensweise bei der mst-UF-Fraktionierung

Die Ultrafiltration wurde sowohl zur Fraktionierung der DOM unterschiedlicher Herkunft (HO, Alb5) als auch zur Fraktionierung von Modellschadstoffen (APEO, Coffein) verwandt. Die Membranfiltrationen wurden in UF-Rührzellen (Millipore) durchgeführt. Zur Filtration der Lösungen über die UF-Membranen wurde Stickstoffgas (5.0 Qualität) mit einem Druck von

0,3 MPa eingesetzt. Die mehrstufige Filtration wurde in diskontinuierlicher Form im Konzentrationsmodus durchgeführt (Abb. 3.1).

Sämtliche Membranen wurden vor Gebrauch für etwa 2 h in entmineralisiertes Wasser eingelegt und anschließend in den Rührzellen durch Filtration von H<sub>2</sub>O gespült, um die Glycerinschutzschicht zu entfernen. Die Reinigung wurde solange durchgeführt, bis im Permeat die gleichen DOC- und  $a_{254}$ - bzw.  $a_{436}$ -Werte wie im vorgelegten Wasser erreicht wurden. Jede Membran wurde nur ein Mal verwendet. Der erste Schritt bestand in einer Anreicherung der filtrierten Probe in einer 2L-Rührzelle unter Verwendung einer UF-Membran aus regenerierter Cellulose mit einem MWCO von 1000 g/mol (Typ YM1, Millipore). Das Permeat dieser Anreicherung stellte die nieder-



**Abb. 3.1:** Schema der Probenanreicherung und -fraktionierung durch mehrstufige Ultrafiltration (mst-UF). K: Konzentrat, P: Permeat, F: Fraktion. MWCO der UF-Membranen in Klammern.

molekulare Fraktion F5 dar (DOM < 1000 g/mol). Das Konzentrat der Anreicherung ( $V = 1$  bzw. 1,1 L) wurde anschließend nacheinander in 200 mL-Rührzellen durch UF-Membranen mit Trenngrenzen von 30000, 10000 und 3000 g/mol filtriert (Tab. 3.3). Die Filtration erfolgte von hohem zu niedrigem MWCO, wobei die Konzentrate jeweils als Fraktionen gesammelt und die Permeate mit der nächstkleineren Membran weiterfraktioniert wurden. Hierdurch wurden vier weitere Fraktionen mit folgenden nominellen Molmassen erhalten: Fraktion 1 (F1):

$0,45 \mu\text{m} > \text{DOM} > 30000 \text{ g/mol}$ , Fraktion 2 (F2):  $30000 \text{ g/mol} > \text{DOM} > 10000 \text{ g/mol}$ ; Fraktion 3 (F3):  $10000 > \text{DOM} > 3000 \text{ g/mol}$  und Fraktion 4 (F4):  $3000 > \text{DOM} > 1000 \text{ g/mol}$ .

Das Volumen der Fraktionen F1 bis F3 betrug jeweils 0,2 bis 0,25 L. Die Fraktion F4 umfasste mit etwa 0,4 L das restliche Volumen. Die Fraktionierung der Probe HO21 K sowie der Modellschadstoffe wurde im Dreifachansatz durchgeführt.

**Tab. 3.3:** Verwendete Membranen bei der mst-UF-Fraktionierung von DOM und Modellschadstoffen.  
<sup>1</sup>: Danish Separation Systems (Nakskov, Dänemark), <sup>2</sup>: Millipore.

Fraktionierung Nr. Proben Anzahl der Replikate (n)	Membranen	Material, Hersteller	MWCO in g/mol	PSS- Standard $M_p$ in g/mol
Nr. I:	FS50PP	Fluorpolymer <sup>1</sup>	30000	35700
HO12 K a und Alb5 K (n = 1)	GR81PP	Polyethersulfon <sup>1</sup>	10000	15800
	YM3	Regen. Cellulose <sup>2</sup>	3000	4480
Nr. II, V und VI:	YM30	Regen. Cellulose <sup>2</sup>	30000	35700
Modellschadstoffe, HO21 K, Alb5 K (n = 3, n = 3 bzw. n = 1)	YM10	Regen. Cellulose <sup>2</sup>	10000	15800
	YM3	Regen. Cellulose <sup>2</sup>	3000	4480

### 3.3.2.2 Überprüfen der UF-Membranen

Die Auswahl der UF-Membranen erfolgte anhand ihrer vom Hersteller angegebenen Molecular Weight Cutoffs (MWCO). Um die Herstellerangaben zum MWCO zu überprüfen, wurde der Rückhalt ausgewählter Polystyrolsulfonate durch die UF-Membranen bestimmt (siehe Tab. 3.3). Als Standards dienten Einzellösungen der PSS ( $\rho$  (PSS) = 20 mg/L) in Reinstwasser. Die YM1-Membran wurde zusätzlich unter Verwendung eines PSS-Standards mit  $M_p = 1100$  g/mol überprüft. Je Membran wurden 0,25 L der Standardlösung vorgelegt und bis zu einem Konzentratvolumen von 0,1 L filtriert. Der Gehalt an PSS wurde durch Absorptionsmessung bei  $\lambda = 224$  nm quantifiziert. Das Rückhaltevermögen der Membran für den ausgewählten Standard wurde durch eine Massenbilanz über Original, Konzentrat und Permeat quantifiziert.

### 3.3.2.3 Ermittlung des DOC-Eintrags

Zur Quantifizierung des Eintrags von DOC aus der verwendeten Apparatur sowie den UF-Membranen wurden 20 L einer Nullprobe (entmineralisiertes Wasser) etwa 20-fach angereichert und wie obenstehend beschrieben fraktioniert. Die DOC-Konzentrationen sämtlicher Fraktionen wurden bestimmt, und der DOC-Eintrag wurde durch eine DOC-Massenbilanz über Anreicherung (1000 g/mol-Membran YM1) und mst-UF-Fraktionierung ermittelt.

### 3.4 Physikochemische Charakterisierung der gelösten organischen Substanz

#### 3.4.1 Probenvorbereitung

Die zur physikochemischen Charakterisierung eingesetzten Analysemethoden erforderten unterschiedliche Probenvorbereitungen. Für die Bestimmung des DOC-Gehaltes wurden die Proben mit Reinstwasser auf eine DOC-Konzentration von weniger als 10 mg/L verdünnt. Das Reinstwasser wurde durch Aufbereitung von entmineralisiertem Wasser in einer MilliQ-PLUS Anlage (Millipore) gewonnen. Sein DOC-Gehalt beträgt weniger als 0,1 mg/L. Für die analytische SEC sowie die AF<sup>4</sup>-Trennung wurden die Proben auf einen DOC  $\leq$  10 mg/L verdünnt. Vor der SEC-Analyse wurde die Ionenstärke der Proben, wenn nicht anders angegeben, durch Zugabe von 1 mL 10-fach konzentriertem Elutionspuffer zu 9 mL Probe an die des jeweiligen Eluenten angeglichen (Bezeichnung: „Probe gepuffert“). SEC-Fraktionen wurden direkt mit dem jeweiligen Elutionspuffer verdünnt (Bezeichnung: „Probe mit Puffer verdünnt“). Für die Absorptionsmessungen (UV/Vis-Spektroskopie) sowie die Aufnahme der Excitation-Emission-Matrices (Fluoreszenz-Spektroskopie) wurde die Probenkonzentration durch Verdünnen mit Reinstwasser an die Konzentration der Fraktion mit dem niedrigsten DOC-Gehalt angeglichen (meist Fraktion 5; DOC  $\leq$  10 mg/L); die Proben wurden ebenfalls gepuffert.

Vor der Elementaranalyse sowie der <sup>13</sup>C NMR-spektroskopischen Untersuchung der Proben wurden diese unter Verwendung eines Alpha 2-4 (LOC-1m)-Gerätes (Christ, Deutschland) bei einem Druck von  $p = 30$  Pa gefriergetrocknet. Die SEC-Fraktionen (TSK HW 50-Säule) der Probe HO12 K b (Fraktionierung Nr. IV) wurden zur Abtrennung der anorganischen Salze des SEC-Puffers (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) dialysiert. Hierfür wurden die Fraktionen zunächst lyophilisiert, dann in einem geringen Volumen an Reinstwasser wieder aufgelöst bzw. dispergiert und portionsweise in Dialyseschläuchen gegen entmineralisiertes Wasser dialysiert. Für die Dialyse wurde ein Thomapor<sup>®</sup>-Dialyseschlauch aus Celluloseester mit einem MWCO von 500 g/mol und einer Breite von 16 mm gebraucht (Typ Biospektra, Reichelt Chemietechnik, Heidelberg, Deutschland). Der Schlauch wurde in Stücke von etwa 25 cm zerschnitten, in welche die Probenaliquote eingebracht wurden. Die Schlauchstücke wurden mit 50 mm breiten Klemmen (Universal Closures, Spectrum Laboratories, Kalifornien, U.S.A.) verschlossen. Die Dialyse erfolgte in 5 L-Glasflaschen bei einer Temperatur von 12 °C, um eine Veränderung der Fraktionen beispielsweise durch mikrobiologischen Abbau der DOM zu vermeiden. Das entmineralisierte Wasser wurde mehrfach in Abständen von einigen Stunden erneuert. Die Dialyse wurde solange durchgeführt, bis eine minimale elektrische Leitfähigkeit im Dialysat (ent-

mineralisiertes Wasser) erreicht war. Nach der Dialyse wurden die Proben erneut gefriergetrocknet und dann für die NMR-Messungen und Elementaranalyse verwendet.

### 3.4.2 Elektrische Leitfähigkeit und pH-Wert

Die elektrische Leitfähigkeit (ELF) wurde mit Hilfe eines temperaturkompensierten Leitfähigkeitsmessgerätes vom Typ LF 318 der Wissenschaftlich-technischen Werkstätten (wtw, Weilheim, Deutschland) und eines wtw TetraCon 325 Messensors gemessen. Die Referenztemperatur betrug 25 °C. Der pH-Wert wurde unter Verwendung einer SenTix 97 T-Elektrode und eines Messgerätes pH 325 (wtw) bestimmt. Die pH-Elektrode wurde unmittelbar vor Gebrauch mit Hilfe zweier Pufferlösungen (pH = 7 und pH = 4) bei der Temperatur der Messlösungen kalibriert.

### 3.4.3 DOC-Gehalt

Zur Ermittlung der Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs wurden, je nach Verfügbarkeit und Eignung, verschiedene Messgeräte eingesetzt. Innerhalb einer Fraktionierung wurde jeweils nur ein Messgerät verwendet. Die Messgeräte wurden vor Gebrauch mit Kaliumhydrogenphthalatlösungen (KHP) im Konzentrationsbereich von DOC = 1 bis 10 mg/L kalibriert (lineare Regression). Die KHP-Lösungen wurden unmittelbar vor der Verwendung durch Verdünnen einer 1 g/L-Stammlösung mit Reinstwasser hergestellt. Die KHP-Stammlösung wurde durch Zugabe von Natriumazid ( $\rho(\text{NaN}_3) = 0,5 \text{ g/L}$ ) konserviert und portionsweise eingefroren. Folgende Messgeräte wurden benutzt:

#### *Sievers Total Organic Carbon Analyzer, Modell 820*

Die Oxidation der gelösten organischen Substanz (DOC) zu  $\text{CO}_2$  erfolgt bei diesem Gerät durch eine Kombination von nasschemischer Oxidation durch Ammoniumperoxodisulfat mit UV-Strahlung. Die Detektion des bei der Oxidation entstandenen  $\text{CO}_2$  sowie des nach Ansäuern der Probe aus dem anorganischen Kohlenstoff (Inorganic Carbon, IC) freigesetzten  $\text{CO}_2$  erfolgt jeweils über Leitfähigkeitsmessung nach Passage des Gases durch eine semipermeable Membran und Lösen in Reinstwasser (Dissoziation zu Hydrogencarbonat). Zunächst wird die gesamte Konzentration an Kohlenstoff in Form des Total Carbon (TC) gemessen. Da zur Messung filtrierte Proben eingesetzt werden, gilt:

$$\text{TC} = \text{DOC} + \text{IC}$$



Im zweiten Schritt wird die Konzentration des IC bestimmt. Die Quantifizierung des DOC erfolgt durch Differenzbildung. Bei Proben mit einem hohen Gehalt an IC (Verhältnis von TC zu IC kleiner 10) muss dieser vor der eigentlichen Messung mit Hilfe eines Membranmoduls (Inorganic Carbon Removal Unit) weitgehend entfernt werden.

#### *LC-UV/OCD*

Das in Abschnitt 3.4.8 beschriebene analytische SEC-System mit kontinuierlicher DOC-Detektion wurde auch zur Bestimmung der Konzentration der gelösten organischen Substanz benutzt. Zu diesem Zweck wurde eine Analyse ohne vorherige chromatographische Trennung der Probe durchgeführt (Bypass-Modus;  $V_{inj} = 0,4$  mL). Die Oxidation der gelösten organischen Substanz durch UV-Strahlung findet bei diesem System im sogenannten Dünnschichtreaktor statt (HUBER UND FRIMMEL 1991, HUBER 1992). Dieser besteht aus einem rotierenden inneren Zylinder aus Quarzglas, der eine Quecksilberniederdrucklampe enthält, und einem äußeren, die Reaktorwand bildenden Glaszylinder. Die wässrige Probe befindet sich zwischen beiden Zylindern. Unter dem Einfluss der Zentrifugalkraft bildet die Probe einen dünnen Film auf der Innenseite des äußeren Zylinders. Das Dünnschichtverfahren gewährleistet eine hohe Oxidationsausbeute. Das gebildete  $\text{CO}_2$  wird nicht-dispersiv IR-spektroskopisch erfasst. Das in der Probe enthaltene Hydrogencarbonat wird durch Ansäuern der Probe in Kohlendioxid überführt und räumlich getrennt vom  $\text{CO}_2$  organischen Ursprungs quantifiziert.

#### *Shimadzu TOC-5000*

Die Oxidation des DOC wird hier durch thermisch-katalytische Oxidation erreicht. Vor der Oxidation des organischen Kohlenstoffs muss die Probe mit Salzsäure ( $c = 2$  mol/L) angesäuert werden, um den anorganischen Kohlenstoff durch Ausblasen mit Stickstoff in Form von  $\text{CO}_2$  zu entfernen. Beim Ausblasen können jedoch auch flüchtige organische Verbindungen entfernt werden. Der mit Hilfe dieses Messprinzips ermittelte Parameter wird daher auch als Non-Purgeable Organic Carbon bezeichnet. Die Quantifizierung des gebildeten  $\text{CO}_2$  erfolgt hier ebenfalls über IR-Spektroskopie.

#### 3.4.4 Elementaranalyse

Die Ermittlung der Elementgehalte (C, H, N) erfolgt nach einer erneuten Trocknung der gefriergetrockneten Proben bei  $42$  °C und  $0.107$  kPa bis zur Gewichtskonstanz. Die Analyse wurde als Doppelbestimmung durch das Analysenlabor Pascher (Remagen, Deutschland) durchgeführt.

### 3.4.5 UV/Vis-Spektroskopie

Zur Bestimmung der DOC-spezifischen Absorptionswerte wurde die Absorption der wässrigen Proben bei  $\lambda = 254$  nm und  $\lambda = 436$  nm an einem Cary 50 Spektrometer (Varian, Deutschland) gemessen. Für die Messung wurden Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von  $d = 0,01$  m verwendet. Der Nullabgleich des Gerätes wurde mit dem Lösemittel der Proben (Reinstwasser bzw. SEC-Eluent) durchgeführt.

### 3.4.6 Fluoreszenz-Spektroskopie

Das Fluoreszenzverhalten der DOM-Lösungen wurde durch Aufnahme von Excitation-Emission-Matrices (EEM) charakterisiert. Die Spektren wurden mit einem FL900CDT Fluoreszenzspektrometer (Edinburgh Analytical Instruments, Großbritannien) unter Verwendung einer 450 W Xenonlampe aufgenommen. Die Anregungswellenlänge  $\lambda_{ex}$  wurde von 254 bis 401 nm ( $\Delta\lambda = 3$  nm) variiert. Die Aufnahme der Emissionsspektren erfolgte im Bereich  $\lambda_{em} = 260$  bis 545 nm ( $\Delta\lambda = 1$  nm). Die spektrale Bandbreite wurde in Abhängigkeit vom Probenotyp und von der Probenkonzentration gewählt.

### 3.4.7 NMR-Spektroskopie

Die  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektren der gefriergetrockneten (HO12 K b, HO21 K) und ggf. dialysierten (HO12 K a) Proben wurden bei einer  $^{13}\text{C}$  Resonanzfrequenz von 100,6 MHz mit einem Bruker Avance 400 MHz-Spektrometer aufgenommen. Die Proben befanden sich dabei in Zirkoniumdioxid-Rotoren (Durchmesser 4 mm), die mit Kappen aus fluoriertem Kunststoff (Kel-F) verschlossen waren. Die Rotation um den magischen Winkel ( $54,7^\circ$ ) geschah mit 15 kHz in einem CPMAS Probenkopf (Cross Polarization Magic Angle Spinning). Der freie Induktionsabfall (Free Induction Decays, FIDs) wurde mit 4096 Datenpunkten während einer Akquisitionszeit von 10 ms und mit einer spektralen Breite von 200 kHz aufgezeichnet. Die Akquisition erfolgte nach Anregung mit einem  $90^\circ$   $^{13}\text{C}$ -Impuls (Dauer 4  $\mu\text{s}$ ) und einer Totzeit von 20  $\mu\text{s}$  unter Hochleistungsprotonenentkopplung. Die Störsignale (Ring Down Signals) des abklingenden Spulenstroms wurden durch Anwendung einer phasenzyklischen RIDE (Ring Down Elimination) Sequenz eliminiert. Das einzelne Pulsexperiment wurde nach 5 Sekunden wiederholt. Damit war eine vollständige Relaxation aller  $^{13}\text{C}$ -Kerne gewährleistet. Je Probe wurden zwischen 30000 und 50000 Scans aufgenommen. Die FIDs wurden mit einer Exponentialfunktion mit einer Linienverbreiterung von 20 Hz multipliziert. Zusätzlich erfolgte ein Auffüllen auf 16384 Datenpunkte. Nach der Fouriertransformation der Daten wurden manuelle Phasen- und Grundlinien-

korrekturen durchgeführt. Die chemische Verschiebung wurde mit Hilfe einer externen Kalibrierung auf die Resonanzfrequenz der Carboxylgruppe von Glycin (176,03 ppm) in Bezug auf Tetramethylsilan ermittelt (TMS-Skala). Die Zuordnung der Verschiebungsbereiche zu verschiedenen funktionellen Gruppen ist in Tabelle 2.1 gegeben. Zur quantitativen Auswertung wurden die Integrale der Spektren im Bereich von 220 bis 0 ppm auf 100 % normiert. Die relativen Anteile verschiedener funktioneller Gruppen wurden durch Integration der Flächen der einzelnen chemischen Verschiebungsbereiche ermittelt.

#### 3.4.8 Analytische SEC

Zur Untersuchung der Molekülgrößenverteilung wurden zwei verschiedene analytische SEC-Systeme benutzt (Tab. 3.4). Es kam überwiegend das LC-UV/OCD-System zum Einsatz (HUBER UND FRIMMEL 1992, HUBER UND FRIMMEL 1996). Bei der Analyse der Fraktionen der Probe HO12 K b (Fraktionierung Nr. IV, Kap. 4.5.1) wurde das von SPECHT ET AL. (2000) entwickelte analytische System verwendet, da hier erweiterte Detektionsmöglichkeiten bestanden. Zur besseren Vergleichbarkeit verschiedener Proben wurden die Peakflächen der Chromatogramme in ausgewählten Fällen auf gleiche Flächen normiert (z. B. Gesamtfläche = 100 FE) oder entsprechend der relativen DOC-Anteile verschiedener Fraktionen skaliert (z. B. Gesamtflächen = 25 FE bzw. 75 FE bei 25 % bzw. 75 % DOC-Anteil). Dies wurde durch eine entsprechende Bezeichnung der Ordinate gekennzeichnet („normiertes Signal“ bzw. „skaliertes Signal“).

**Tab. 3.4:** Experimentelle Angaben zu den analytischen SEC-Systemen.

Parameter	LC-UV/OCD-System	SEC-System nach SPECHT ET AL. (2000)
Säule	<b>TSK HW 50 (S)</b>	<b>TSK HW 50 (S)</b>
Material	Copolymer aus Methacrylsäure und Ethylenglykol	Copolymer aus Methacrylsäure und Ethylenglykol
Partikelgröße	20 - 40 $\mu\text{m}$	20 - 40 $\mu\text{m}$
Trennbereich	80000 - 500 g/mol (globuläre Proteine); 20000 - 500 g/mol (Dextrane)	80000 - 500 g/mol (globuläre Proteine); 20000 - 500 g/mol (Dextrane)
Dimensionen (Länge x Durchmesser)	250 x 20 mm	250 x 20 mm
Säulenvolumen	79 mL	79 mL
Ausschlussvolumen ( $V_0$ )	22,2 mL	nicht bestimmt
Permeationsvolumen ( $V_p$ )	47 mL	nicht bestimmt
Injektionsvolumen ( $V_{inj}$ )		
Säulenmessung	2 mL	2 mL
Bypassmessung	0,4 mL	nicht verwendet
$V_{inj}$ als % von CV (Säule)	2,5	2,5
Eluent	Phosphatpuffer (Eluent 1) $\rho(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}) = 1,5 \text{ g/L}$ $\rho(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 2,5 \text{ g/L}$ pH = 6,8; $\kappa = 2,8 \text{ mS/cm}$ ; $\mu = 0,04 \text{ mol/L}$	Phosphatpuffer (Eluent 2) $\rho(\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}) = 1,725 \text{ g/L}$ $\rho(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 1,7745 \text{ g/L}$ pH = 6,9; $\kappa = 2,9 \text{ mS/cm}$ ; $\mu = 0,025 \text{ mol/L}$
Detektion	UV (254 nm), DOC	UV (254 nm), ELF; DOC; Fluoreszenz ( $\lambda_{ex} = 254 \text{ nm}$ ; $\lambda_{em} = 430 \text{ nm}$ )

### 3.4.9 Asymmetrische Fluss Feld-Fluss-Fraktionierung

Die Molekülgrößenverteilung der DOM-Fractionen wurde unter Verwendung eines HRFFF-10.000 AF<sup>4</sup>-Systems (Postnova Analytics, München, Deutschland) untersucht. Das Trennsystem besteht aus einem 300 x 40 mm PMMA-Kanal, der mit einem 250  $\mu\text{m}$  Teflon-Spacer ausgestattet ist. Als Membran wurde eine Nanofiltrationsmembran aus Polypiperazin mit einem MWCO von 200 g/mol verwendet (NF200-400 B, Firma Dow). Das Injektionsvolumen betrug 500  $\mu\text{L}$ . Als Eluent wurde Reinstwasser gebraucht. Die Detektion erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei 254 nm mit einem Linear UVIS 200 Detektor. Sämtliche Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Die Einstellungen für die Injektions-, Cross Flow- und Laminarflussströme sind in Tabelle 3.5 gegeben.

**Tab. 3.5:** Elutionsprogramm für die AF<sup>4</sup>-Analytik.

Parameter	Wert
Spülen des Systems	$t = 300$ s; Laminarfluss: 1 mL/min
Injektion	$t = 660$ s; Injektionsfluss: 0,1 mL/min; Laminarfluss: 2,7 mL/min
Fokussierung	$t = 60$ s; Laminarfluss: 2,7 mL/min
Elution	$t = 1260$ s Gesamtfluss: 3 mL/min Querfluss (Angabe als Anteil des Cross Flows am Gesamtfluss in %): 0 s: 90 % 600 s: 80 % 1200 s: 60 % 1230 s: 20 % 1260 s: 10 %

### 3.5 Fraktionierung von Modellschadstoffen

#### 3.5.1 Modellschadstoffe

Als Modellschadstoffe (MSS) zur Untersuchung des Verhaltens von Einzelsubstanzen bei der mehrstufigen Ultrafiltration wurden 4-Nonylphenol, technische Gemische verschiedener Nonylphenolethoxylate (Handelsbezeichnung: Marlophen) und Coffein ausgewählt (Tab. 3.6). Die beiden nichtionischen Tenside Marlophen NP3 und Marlophen NP10 sind technische Gemische verschiedener Nonylphenolethoxylate mit unterschiedlich verzweigten Alkyl- und unterschiedlich langen Ethoxyketten. Die Ethoxylatverteilung verschiedener Marlophen-Produkte ist in Anhang A aufgelistet. Marlophen NP3 enthält Homologe mit 0 bis 8 Ethoxyeinheiten. Das Maximum der Poissonverteilung der EO liegt bei 3 Einheiten. Marlophen NP10 besteht aus Homologen mit 1 bis 20 EO-Einheiten und einem Maximum bei 10 EO-Einheiten. Die Strukturen und Anteile einzelner Isomere (Alkylketten) beider Produkte sind unbekannt. Bei der Entwicklung der Analysemethoden zur Trennung und Quantifizierung verschiedener Nonylphenolethoxylate wurden zusätzlich zu den oben aufgeführten Verbindungen 4*n*-Nonylphenol (Reinheit 99,8 %, Sigma-Aldrich) sowie 4*n*-Nonylphenolmonoethoxylat (Reinheit 99 %, Promochem, Wesel, Deutschland) als Standardsubstanzen verwendet.

**Tab. 3.6:** Modellschadstoffe für die mst-UF-Fraktionierung. <sup>1</sup>: Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland. <sup>2</sup>: Handelsname; Hersteller: Sasol Germany GmbH, Marl, Deutschland. k. A.: keine Angabe.

Substanz bzw. Substanzgemisch, Hersteller	Reinheit	CAS-Nr.	<i>M</i> in g/mol	Stammlösung $\rho$ in g/L
4-Nonylphenol (4-NP) <sup>1</sup>	Technisch; 85 % para-Isomere	25154-52-3	220,35	5 g/L in Methanol
Marlophen NP3 <sup>2</sup> (Mar NP3)	Technisch	k. A.	k. A.	5 g/L in Methanol (Summe aller Ethoxylate)
Marlophen NP10 <sup>2</sup> (Mar NP10)	Technisch	k. A.	k. A.	5 g/L in Methanol (Summe aller Ethoxylate)
Coffein <sup>1</sup>	> 99 %	58-08-2	194,19	1 g/L in Methanol

### 3.5.2 Analytik der Modellschadstoffe

Die Analytik der Modellschadstoffe erfolgte durch chromatographische Trennung der Substanzen mittels HPTLC und nachfolgende Detektion durch Absorptions- oder Fluoreszenzmessung. Als stationäre Phasen wurden Kieselgel 60-Platten mit (KG 60 F<sub>254</sub>) bzw. ohne Fluoreszenzindikator (KG 60) der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Plattengröße betrug 20 x 10 cm und die Schichtdicke 200  $\mu\text{m}$ . Die HPTLC-Platten wurden vor Gebrauch durch Leerchromatographie mit *i*-Propanol für 2 Stunden und anschließende Lagerung in *i*-Propanol für mindestens 8 h gereinigt. Nach der Reinigung wurden die Platten durch Trocknen bei 110 °C für 30 min aktiviert, mit einer Glasplatte abgedeckt und bis zur Verwendung für maximal 1 Woche in einer Hygrokammer bei einer relativen Luftfeuchte von 30 bis 35 % gelagert. Die Auftragung der Proben auf die HPTLC-Platten erfolgte automatisch unter Verwendung eines ATS III-Probenauftragegerätes der Firma Camag (Berlin, Deutschland). Bis zu 20 Proben mit Volumina von 1  $\mu\text{L}$  (Coffein) bzw. 10  $\mu\text{L}$  (4-NP und NPEO) wurden bandförmig auf eine Kieselgelplatte aufgetragen (Anhang B). Die Bandlänge betrug 5 mm, und der Bahnabstand 9 mm. Der Abstand vom unteren Plattenrand betrug  $y_0 = 8$  mm. Auf Bahn 1 wurde zur Justierung des Messspaltes ein hydrophiles Testfarbstoffgemisch (F<sub>H</sub>; Merck) aufgetragen. Proben und Standards wurden jeweils doppelt auf eine HPTLC-Platte appliziert. Als Blindprobe wurde zusätzlich das Probenlösemittel (Methanol) aufgetragen. Die manuelle Entwicklung (Kammermethoden) wurde in einer 20 x 10 cm Doppeltrogkammer aus Glas als aufsteigende Entwicklung ohne Kammersättigung bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die automatische Entwicklung wurde ein AMD2-Gerät (Camag) verwendet. Sämtliche für die HPTLC-Entwicklung eingesetzten Lösemittel waren von HPLC- oder LiChroSolv-Qualität. Bei Verwendung von

Fliessmittelgemischen wurden die jeweiligen Lösemittel unmittelbar vor Gebrauch vermischt und nur einmalig verwendet. Zur Detektion wurde die Absorption oder Fluoreszenz unter Verwendung eines TLC-Scanners (Modell 3; Camag) im Remissionsmodus gemessen. Die Dimension des Messspalts betrug 4 x 0,45 mm. Der Nullabgleich wurde auf Position 30 mm der Methanolbahn durchgeführt. Die Empfindlichkeitseinstellung erfolgte im Automatikmodus auf der Bahn mit der höchsten Standardkonzentration nach einem Scan über alle Bahnen. Zur Datenerfassung und -auswertung wurde die Software CATS (Version 4.06, Camag) verwendet.

#### 3.5.2.1 Bestimmung von 4-NP und NPEO – Kammermethode

Die HPTLC-Trennung des 4-NP und der NPEO wurde auf KG60-Platten (ohne Fluoreszenzindikator) durchgeführt. Das Auftragevolumen betrug 10  $\mu\text{L}$ . Als Fliessmittel bei der manuellen Entwicklung wurden 10 mL eines Gemisches aus *n*-Hexan:Ethylacetat:Ameisensäure (92:8:1 v/v) verwendet. Die Entwicklungsstrecke betrug 5,5 cm. Nach der Entwicklung wurde die Platte im Abzug liegend getrocknet und anschließend zur Verstärkung und Stabilisierung der Fluoreszenz für 2 Sekunden unter Verwendung eines Tauchgerätes (Camag) in ein Gemisch aus dünnflüssigem Paraffin und *n*-Hexan getaucht (1:2 v/v) (DEV GRUPPE F, TEIL 7, 2000). Zur Fluoreszenzmessung wurde die Deuteriumlampe des TLC-Scanners bei einer Anregungswellenlänge von 227 nm sowie ein Kantenfilter mit einem *Cutoff* von 280 nm gebraucht (Emissionsmaximum der APEO und AP bei  $\lambda = 305$  nm). Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer externen Kalibrierung durch lineare Regression über die Peakfläche.

#### 3.5.2.2 Bestimmung von 4-NP und NPEO – AMD-Methode

Zur Trennung der Ethoxylate auf KG60-Platten wurde eine 22-stufige AMD-Gradientenentwicklung mit 2 mm-Schritten von Methanol und Aceton über Ethylacetat nach *n*-Hexan durchgeführt (Entwicklungsprogramm siehe Anhang C). Die Entwicklungsstrecke betrug 5,2 cm. Die Probenauftragung, Fluoreszenzverstärkung, Detektion und Auswertung erfolgten in Analogie zur Kammermethode. Die Quantifizierung des 4-NP und ausgewählter Nonylphenoethoxylate in den Ultrafiltrationsfraktionen und -membranen erfolgte unter Verwendung von Mischstandards mit 4-NP-Konzentrationen zwischen 125 und 600 mg/L und NPEO-Konzentrationen zwischen 250 und 1200 mg/L (Gesamtkonzentration aller Ethoxylate).

Die Ermittlung der Nachweisgrenze für 4-NP (Kammermethode) und ausgewählte Ethoxylate (AMD-Methode) erfolgte nach der in DIN 32645 (1994) beschriebenen Kalibriergeradenmethode. Durch Verdünnen der 4-NP- und Marlophen-Stammlösungen mit Methanol wurden

jeweils 10 Standardlösungen mit äquidistanten Schritten der Analytkonzentrationen hergestellt. Die Konzentrationen einzelner Ethoxylate in den NPEO-Gemischen wurden unter Verwendung der in Anhang A angegebenen Massenanteile aus der Gesamtkonzentration aller Ethoxylate errechnet.

### 3.5.2.3 Bestimmung von Coffein

Als stationäre Phasen wurden KG 60 F<sub>254</sub>-HPTLC-Platten gebraucht. Zur Quantifizierung des Analyten in den mst-UF-Fraktionen und -Membranen wurden je 1 µL von Coffein-Standardlösungen der Konzentrationen 5, 25, 50, 75 und 100 mg/L in Methanol (entsprechend Stoffmengen von 5 bis 100 ng/Band) zusammen mit den Probenextrakten auf eine Platte aufgetragen. Nach der Auftragung wurde die Platte bis zu einer Distanz von 4,2 cm unter Verwendung eines Fließmittelgemisches aus Ethylacetat, MeOH und 25%-iger Ammoniaklösung (85:10:5 v/v) manuell entwickelt. Die Detektion erfolgte durch Absorptionsmessung bei  $\lambda = 275$  nm. Zur Auswertung wurde eine lineare Regression über die Peakfläche durchgeführt. Für die Bestimmung der Nachweisgrenze wurden 10 Standardlösungen mit Konzentrationen zwischen 3 und 21 mg/L verwendet.

### 3.5.3 Fraktionierung von Modelllösungen durch mehrstufige Ultrafiltration

Die Fraktionierung der Modellschadstoffe wurde in ähnlicher Weise wie die in Kapitel 3.3.2.1 beschriebene Fraktionierung der DOM, jedoch ohne vorhergehende Anreicherung, durchgeführt. Um den Einfluss der Anwesenheit und Konzentration von gelöster organischer Substanz (Matrix) auf das Verhalten der Modellschadstoffe während der mst-UF-Fraktionierung zu untersuchen, wurden die ausgewählten Verbindungen in verschiedenen DOM-Matrices (Tab. 3.7) gelöst und fraktioniert. Für die Dotierung der Wässer wurden Stammlösungen der Substanzen in Methanol hergestellt. Die NPEO-Stammlösung enthielt Marlophen NP10 und Marlophen NP3 mit Konzentrationen von jeweils 1 g/L (Gesamtkonzentration aller Ethoxylate) sowie technisches Nonylphenol mit  $\rho(4\text{-NP}) = 0,5$  g/L. Die Konzentration der Coffein-Stammlösung betrug  $\rho(\text{Coffein}) = 100$  mg/L. Durch Zugabe von je 1 mL Stammlösung auf 1 L DOM-Matrix wurden Modelllösungen mit  $\rho(4\text{-NP}) = 0,5$  mg/L,  $\rho(\text{Mar NP3}) = 1$  mg/L und  $\rho(\text{Mar NP10}) = 1$  mg/L bzw.  $\rho(\text{Coffein}) = 100$  µg/L in drei verschiedenen DOM-Matrices hergestellt. Insgesamt wurden so 6 Modelllösungen erhalten. Jede Modelllösung wurde im Dreifachansatz fraktioniert. Die Gehalte der Modellschadstoffe in den Original-Modelllösungen und den Replikaten der einzelnen Fraktionen wurden nach Festphasenextraktion mittels HPTLC bestimmt.



**Tab. 3.7:** DOM-Matrices zur Herstellung der Modellschadstoff-Lösungen.

Parameter	Entmineralisiertes Wasser	Trinkwasser	Braunwasser (HO21) (mit Reinstwasser verdünnt)
DOC in mg/L	0,08 ± 0,01	0,65 ± 0,01	10,32 ± 0,11
pH-Wert (22 °C)	4,5 (nach Zugabe von HCl mit $c = 0,1$ mol/L)	7,1	4,5

### 3.5.4 Extraktion der Modellschadstoffe aus Fraktionen und Membranen

Vor der Bestimmung der Gehalte der Modellschadstoffe in den mst-UF-Fractionen war eine Probenanreicherung und -extraktion erforderlich. Die Modelllösungen, Fraktionen und Blindproben (undotierte DOM-Matrix) wurden mittels Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) an Oasis<sup>TM</sup> HLB SPE-Kartuschen (Waters, Eschborn, Deutschland) mit einem Volumen von 6 mL und einer Sorbensmenge von 200 mg extrahiert. Die Kartuschen wurden vor Gebrauch mit 5 mL Methanol konditioniert und mit 4 mL Reinstwasser äquilibriert. Das extrahierte Probevolumen betrug 0,25 L, und die Flussrate während der Extraktion 4 bis 5 mL/min. Nach der Extraktion wurden die Probenbehälter, Extraktionsschläuche und Kartuschen mit 10 mL eines MeOH:H<sub>2</sub>O-Gemisches (5:95 v/v) gespült und durch Durchsaugen von Luft getrocknet. Die Elution der Kartuschen erfolgte durch Aufgaben von 2 x 2 mL MeOH für Coffein bzw. 3,5 mL Dichlormethan für die NPEO-Mischung. Die erhaltenen Eluate wurden bei 40 °C im Stickstoffstrom eingengt und anschließend in 250 µL MeOH wieder aufgenommen (1000-fache Anreicherung).

Die Wiederfindung und Reproduzierbarkeit der SPE-Methode wurden durch Dreifachextraktion von Modelllösungen in Trink- bzw. Braunwasser (HO21, DOC ca. 10 mg/L) ermittelt. Die Konzentrationen der MSS betragen  $\rho$  (Coffein) = 100 µg/L bzw.  $\rho$  (4-NP) = 0,5 mg/L,  $\rho$  (Mar NP3) = 1 mg/L und  $\rho$  (Mar NP10) = 1 mg/L ermittelt. Zur Untersuchung des Einflusses der Konzentration der organischen DOM-Matrix auf SPE und HPTLC-Analytik der MS wurden Coffein- und NPEO-Modelllösungen in Braunwassermatrix (HO21) mit DOC-Konzentrationen zwischen 1 mg/L und 20 mg/L hergestellt und wie beschrieben extrahiert und analysiert ( $n = 1$ ).

Die Ultrafiltrationsmembranen wurden nach Fraktionierung der Modelllösungen extrahiert, um eventuelle Rückstände der MSS in Deckschichten oder Membranen quantifizieren zu können. Da niedrige Gehalte an Modellschadstoffen erwartet wurden, wurden die Membranen der jeweiligen

Replikate vor der Extraktion vereinigt. Die Membranen wurden kleingeschnitten und in 40 mL-Glasgefäßen für 4 Stunden im Überkopfschüttler mit 6 mL Methanol extrahiert. Das Lösemittel wurde durch Trocknen im Stickstoffstrom bei 40 °C entfernt. Der Rückstand wurde in 250 µL MeOH gelöst und mittels HPTLC analysiert.

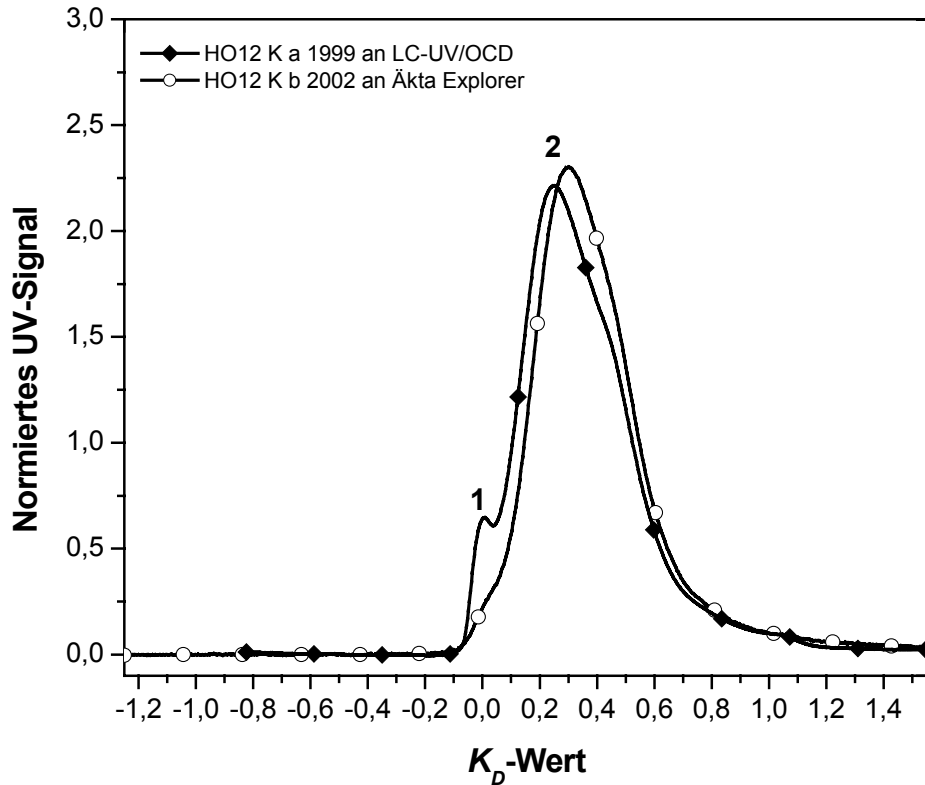
## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Stabilität gelöster organischer Substanz über die Zeit

Die Anreicherung und präparative Fraktionierung der gelösten organischen Substanz wurden mit dem Ziel durchgeführt, ausreichende Stoffmengen für die strukturelle Charakterisierung der Fraktionen mittels NMR-Spektroskopie zu gewinnen. Im Laufe der Anreicherung bzw. Fraktionierung kann es zu Verlusten an Probenmaterial kommen. Dies erfordert die Verwendung ausreichend großer Ausgangsmengen an organischem Material. In dieser Arbeit wurden daher angereicherte Proben zur Fraktionierung eingesetzt. Sowohl die Arbeitsschritte zur Anreicherung als auch zur Fraktionierung sind mit einem hohen zeitlichen Aufwand verbunden. Bei der Lagerung DOM-haltiger Proben kann es zur Aggregation und Ausflockung und damit zur Veränderung der Molekülgröße und/oder chemischen Struktur der in Lösung bleibenden organischen Substanz kommen. Die Aggregationsneigung der DOM hängt dabei unter anderem von deren Konzentration in der Lösung ab. Daher wurde zunächst die Stabilität angereicherter (hohe DOC-Konzentration) bzw. fraktionierter (niedrige DOC-Konzentration) Proben über die Zeit untersucht.

#### 4.1.1 Stabilität angereicherter Proben

Die Probe HO12 K wurde im Jahr 1996 am Hohlohsee entnommen und durch Ultrafiltration angereichert (FRIMMEL UND ABBT-BRAUN 1999, FRIMMEL ET AL. 2002). Aliquote dieser Probe wurden im Rahmen dieser Arbeit in den Jahren 1999 (Probe HO12 K a) und 2002 (Probe HO12 K b) mittels SEC fraktioniert (siehe Tab. 3.1). Nach längerer Lagerungsdauer wurde eine Ausflockung von Material festgestellt, was eine erneute Filtration (0,45 µm-Filter) der Probe vor den Fraktionierungen erforderlich machte. Durch die Lagerung und Filtration kam es sowohl zu quantitativen als auch zu qualitativen Veränderungen der aufkonzentrierten, flüssigen Probe. Über einen Zeitraum von 6 Jahren nahm die DOC-Konzentration der Probe um etwa 40 % ab (Tab. 4.1). Diese Abnahme ist vor allem auf die Ausflockung oder Aggregation von gelöster organischer Substanz zurückzuführen. Der ungelöste Anteil der DOM wurde durch die Filtration der Probe entfernt. Dies hatte Änderungen der Molekülgrößenverteilung und der Zusammensetzung (chemischen Strukturen) des in Lösung bleibenden Anteils der Probe zur Folge.

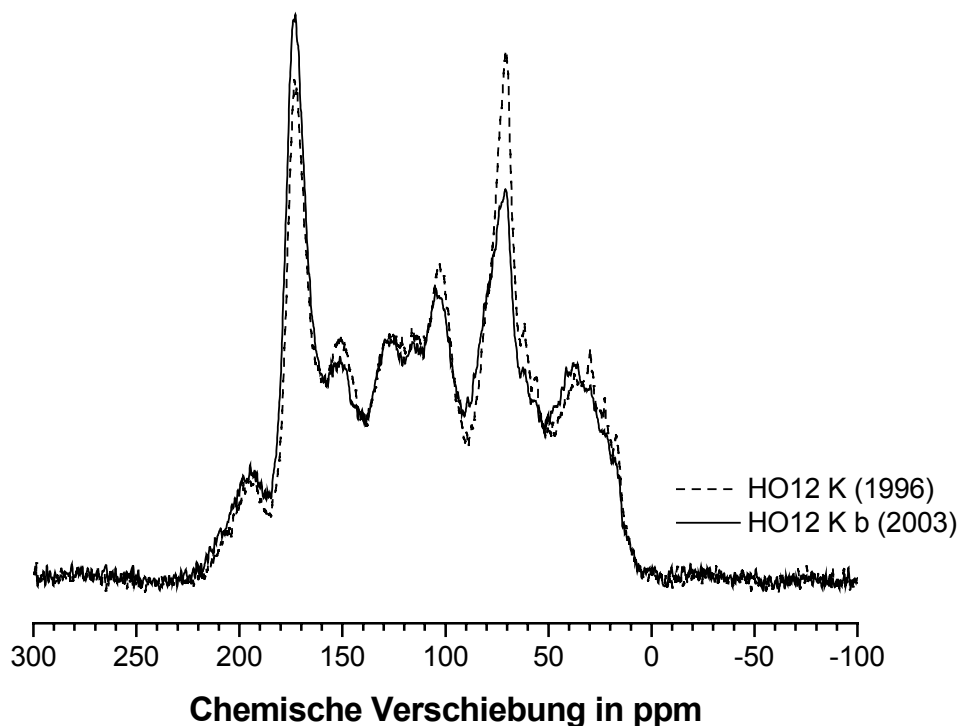


**Abb. 4.1:** SEC-Chromatogramme der Proben HO12 K a (1999) und HO12 K b (2002). Analytisches (LC-UV/OCD) bzw. präparatives System (Äkta Explorer), TKS HW 50-(S)-Säulen, UV<sub>254</sub>-Detektion.

Die SEC-Chromatogramme zeigen eine Abnahme des UV-Signals im Bereich von  $K_D$ -Werten zwischen 0 und 0,1 (Abb. 4.1). Durch die Aggregation und nachfolgende Filtration wurden folglich vor allem höhermolekulare Bestandteile aus der Probe entfernt. Für die Probe HO12 K aus dem Jahr 1996 war keine SEC-Analyse an der TSK HW 50-(S)-Säule durchgeführt worden. Vergleichsdaten stehen hier somit nicht zur Verfügung. SCHMITT (2002) stellte bei einem Vergleich der Metallgehalte der Proben HO12 K (1996) und HO12 K a (1999) fest, dass mit dem Verlust an DOM auch ein Verlust an Metallen verbunden war. Eisen und Aluminium wurden zwischen 1996 und 1999 zu über 60 % bzw. über 20 % entfernt (relative Abnahme der DOC-spezifischen Metallgehalte). Im Falle des Eisens konnte er die beobachtete Abnahme auf die bevorzugte Bindung dieser Metallionen an höhermolekulare Bestandteile der DOM des Hohlohsees zurückführen.

Die Proben HO12 K (1996) und HO12 K b (2002) wurden gefriergetrocknet und mittels <sup>13</sup>C MAS NMR-Spektroskopie analysiert, um Aufschluss über Änderungen der Anteile verschiedener chemischer Strukturen zu erhalten. Die Gefrierdrying der Probe HO12 K erfolgte im Jahr 1996, die der Probe HO12 K b im Jahr 2003 (nach erneuter Filtration). Die

Messungen an beiden Proben wurde im Jahr 2003 durchgeführt. In der Probe HO12 K b (2002) sind O-Alkylstrukturen im Vergleich zu HO12 K (1996) deutlich abgereichert (Abb. 4.2, Tab. 4.1). Neben der Abnahme der Intensität des Signals bei 70 ppm (Kohlenhydrate) ist eine Abnahme der Signalintensitäten bei  $\sim 103$  ppm (anomeres C-Atom von Kohlenhydraten) sowie bei  $\sim 23$  ppm (Methylgruppen) zu erkennen.



**Abb. 4.2:**  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektren der Proben HO12 K (1996) und HO12 K b (2003).

Dies zeigt, dass die Abnahme im O-Alkylbereich auf den selektiven Verlust von Kohlenhydraten aus der Probe zurückzuführen ist. Diese selektive Abreicherung in Verbindung mit der beobachteten Änderung der Molekülgrößenverteilung der Probe (Abb. 4.1) ist ein Hinweis darauf, dass Kohlenhydrate einen Teil der im  $K_D$ -Bereich von 0 bis 0,1 eluierenden DOM-Bestandteile stellen. Infolge des Verlustes an kohlenhydrathaltiger DOM kam es zu einer relativen Anreicherung carboxylierter Strukturen (173 ppm) sowie verzweigter aliphatischer Strukturen ( $\sim 40$  ppm). Das Vorhandensein von Carboxylgruppen in der Molekülstruktur bewirkt eine größere Löslichkeit und bessere Stabilität der DOM in Lösung. Carboxylierter Funktionen kommen in der DOM der Braunwasserprobe in Fulvinsäuren mit Kohlenstoffanteilen von 17 bis 19 % und in Huminsäuren mit 15 bis 19 % vor (LANKES 2001). Fulvinsäuren stellen 34 % und Huminsäuren 23 % des DOC dieser Originalprobe (Probe HO13, ABBT-BRAUN UND FRIMMEL

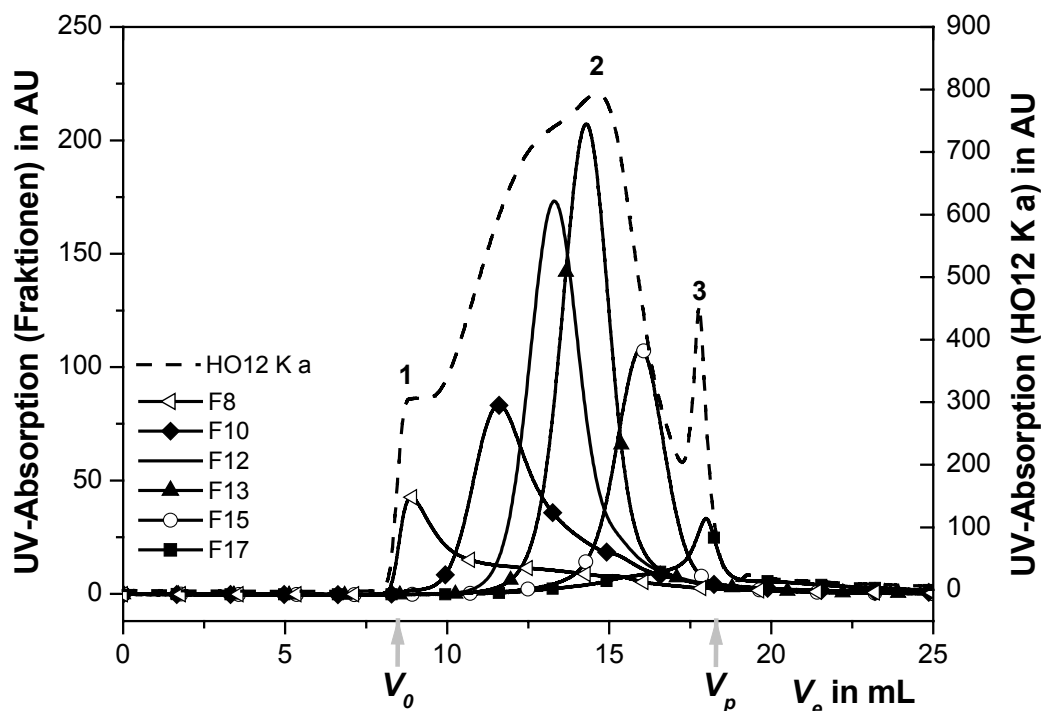
2002). Verzweigte Aliphaten wurden vor allem in den FA dieser DOM nachgewiesen, während in den HA Signale von *n*-Alkanstrukturen (30 ppm) deutlich erkennbar waren (LANKES 2001). Die Zunahme der Signalintensität bei 40 ppm sowie die Abnahme der Intensität bei 30 ppm deuten darauf hin, dass der erhöhte Anteil der carboxylischen Strukturen vor allem durch die relative Anreicherung von Fulvinsäuren verursacht wird. Insgesamt kam es somit über den Lagerungszeitraum zu einer relativen Abreicherung schlechter löslicher Kohlenhydrate und zu einer relativen Anreicherung gut löslicher DOM.

**Tab. 4.1:** DOC-Konzentrationen, relative Anteile chemischer Strukturen und Elementaranalysedaten der Probe HO12 K für die Jahre 1996, 1999 und 2002. <sup>1</sup>: Angabe nach ABBT-BRAUN 2003, <sup>2</sup>: Messung im Jahr 2002, <sup>3</sup>: Messungen im Jahr 2003. n. b.: nicht bestimmt.

Probe	DOC in mg/L	DOC- Abnahme in %	<sup>13</sup> C MAS NMR <sup>3</sup> Rel. Kohlenstoffanteil in %		Elementar- analyse <sup>3</sup>	
			Carboxyl C 190-160 ppm	O-Alkyl C 100-50 ppm	H/C	N/C
HO12 K (1996)	877 <sup>1</sup>	0	17,4	30,4	1,033	0,028
HO12 K a (1999)	720	18	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
HO12 K b (2002)	543 <sup>2</sup>	38	20,4	28,2	1,051	0,030

#### 4.1.2 Stabilität von Fraktionen

Die Probe HO12 K a wurde mittels SEC unter Verwendung der Superdex-Säule fraktioniert (Fraktionierung Nr. III, s. Tab. 3.1). Es wurden 22 Fraktionen mit einem Fraktionsvolumen von je 1 mL hergestellt. Die DOC-Gehalte der Fraktionen lagen zwischen 1 und 15 mg/L (Anhang E). Die Fraktionen wurden bei etwa 4 °C dunkel gelagert und nach einem Tag sowie nach 1, 2 und 5 Wochen am präparativen System reinjiziert, um zu überprüfen, ob eine Stabilität der Molekülgrößenverteilung gegeben ist. Die Reinjektion der einzelnen Fraktionen ergab Peaks, die sich in ihren Elutionsbereichen und Peakbreiten voneinander unterschieden (Abb. 4.3).



**Abb. 4.3:** SEC-Chromatogramme der Probe HO12 K a und der Fraktionen F8, F10, F12, F13, F15 und F17. Reinjektion nach 1 Woche am präparativen System. Superdex-Säule, Eluent 1, UV<sub>254</sub>-Detektion.

Die  $V_e$ -Werte der reinjizierten Fraktionen am Peakmaximum lagen innerhalb der Elutionsbereiche, in denen die verschiedenen Fraktionen gesammelt worden waren. Die  $V_e$ - und  $K_D$ -Werte und Peakflächen der reinjizierten Fraktionen blieben im Rahmen der Reproduzierbarkeit der Methode über den Beobachtungszeitraum hinweg konstant (Tab. 4.2). Die Stabilität der SEC-Fraktionen in Bezug auf deren Molekülgrößenverteilung ist somit über den Untersuchungszeitraum von etwa 5 Wochen gegeben.

Die Polydispersität der Fraktionen F12 bis F15 ist mit Werten um 1,09 sehr gering und erreicht nahezu den für monodisperse Polymere charakteristischen Wert von  $P = 1$  (Ausgangssprobe HO12 K a: Polydispersitätswert = 1,74). Über den Lagerungszeitraum hinweg war keine Zunahme der Polydispersität zu beobachten. Dies zeigt, dass keine Aggregation der fraktionierten Probenbestandteile stattfand. Die Ergebnisse sprechen gleichzeitig gegen die von einigen Autoren vertretene Hypothese, dass Huminstoffmoleküle in Lösung als Assoziate bzw. Aggregate niedermolekularer Verbindungen vorliegen (PICCOLO ET AL. 1996), da in diesem Fall nach der Fraktionierung huminstoffreicher DOM eine Re-Assoziation zu erwarten wäre.

**Tab. 4.2:** Mittlere  $V_e$ -,  $K_D$ -Werte und Peakflächen der 4 Reinjektionen ( $MW \pm 1$  s) sowie Polydispersitätswerte der HO12 K a SEC-Fractionen. Werte berechnet mit Kalibrierdaten der Superdex-Säule des präparativen Systems (Anhang D). n. b.: nicht bestimmt. F15: MW aus 3 Reinjektionen.

Fraktion	$V_e$ in mL	$K_D$ -Wert	Peakfläche in FE	Polydispersitätswert
F7	$8,83 \pm 0,03$	$0,034 \pm 0,003$	$14 \pm 4$	n. b.
F8	$8,90 \pm 0,03$	$0,040 \pm 0,003$	$111 \pm 7$	1,90
F9	$10,98 \pm 0,09$	$0,253 \pm 0,009$	$153 \pm 11$	1,59
F10	$11,69 \pm 0,08$	$0,325 \pm 0,008$	$229 \pm 10$	1,39
F11	$12,50 \pm 0,08$	$0,408 \pm 0,008$	$296 \pm 3$	1,25
F12	$13,40 \pm 0,08$	$0,500 \pm 0,008$	$338 \pm 6$	1,15
F13	$14,36 \pm 0,07$	$0,598 \pm 0,007$	$373 \pm 7$	1,09
F14	$15,23 \pm 0,08$	$0,687 \pm 0,008$	$341 \pm 8$	1,08
F15	$16,10 \pm 0,20$	$0,780 \pm 0,020$	$196 \pm 2$	1,09
F16	$17,30 \pm 0,40$	$0,900 \pm 0,037$	$111 \pm 10$	1,21
F17	$18,01 \pm 0,02$	$0,970 \pm 0,002$	$51 \pm 8$	1,21
F18	$18,92 \pm 0,08$	$1,063 \pm 0,008$	$1 \pm 0,3$	n. b.

Die Ergebnisse belegen die ausgezeichnete Stabilität der SEC-Fractionen über den Beobachtungszeitraum. Dies steht im Gegensatz zur angereicherten Probe HO12 K, wo deutliche Veränderungen der DOM-Konzentration sowie der Molekülgrößenverteilung und chemischen Struktur auftraten. Die unterschiedliche Stabilität der untersuchten Proben ist vor allem auf die sehr unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen an gelöster organischer Substanz (DOC max. 15 mg/L gegenüber ca. 900 mg/L) sowie auf die unterschiedlich lange Lagerungsdauer (5 Wochen gegenüber ca. 6 Jahren) bei vergleichbaren Lagerungsbedingungen zurückzuführen. Zur Vorbeugung von selektiven Verlusten an organischer Substanz sollte folglich eine längerfristige Lagerung flüssiger Proben mit hoher DOM-Konzentration vermieden werden.

## 4.2 Einflussparameter der SEC

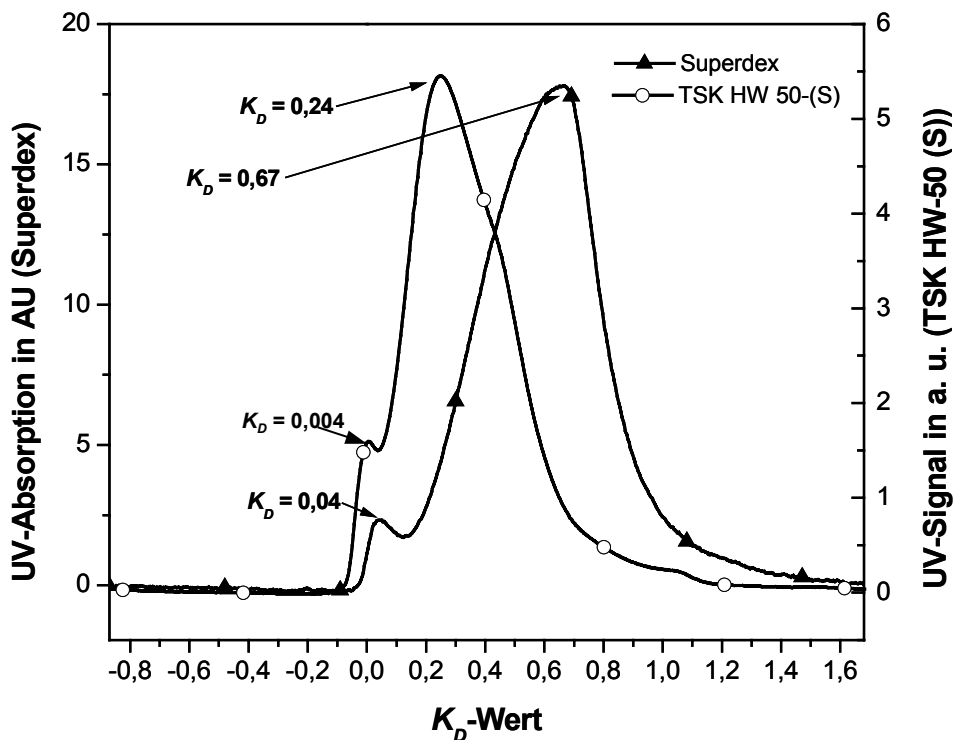
Die SEC wurde in dieser Arbeit sowohl als präparative (Kap. 4.4 und 4.5.1) als auch als analytische Methode (z. B. Kap. 4.5.2) eingesetzt. In Kapitel 2.3.1 wurde dargelegt, dass die Trennqualität der SEC unter anderem vom verwendeten Säulenmaterial sowie von den Eigenschaften der Probelösung, insbesondere deren Ionenstärke und pH-Wert, abhängen. Für die analytische bzw. präparative Größenausschlusschromatographie wurden zwei verschiedene Säulentypen benutzt, die sich sowohl hinsichtlich des Trennmaterials (Superdex 75 bzw. TSK HW 50-(S)) als



auch hinsichtlich der Säulendimension unterschieden (siehe Tab. 3.2, Tab. 3.4). Beim Einsatz der SEC als präparative Methode wurden angereicherte Proben als Ausgangsproben verwendet. Bei der Anreicherung von DOM kann es in Abhängigkeit von der jeweiligen Anreicherungs- methode neben den (erwünschten) Änderungen der DOC-Konzentration auch zu (uner- wünschten) Änderungen der Salzkonzentration (Ionenstärke) bzw. des pH-Wertes kommen. Als Voraussetzung für den Einsatz der SEC als präparative Methode wurde daher zunächst der Einfluss der Probeneigenschaften sowie des Säulenmaterials auf die SEC-Trennung untersucht. Diese grundlegenden Experimente wurden unter Verwendung von DOM aus dem Referenz- gewässer Hohlohsee durchgeführt.

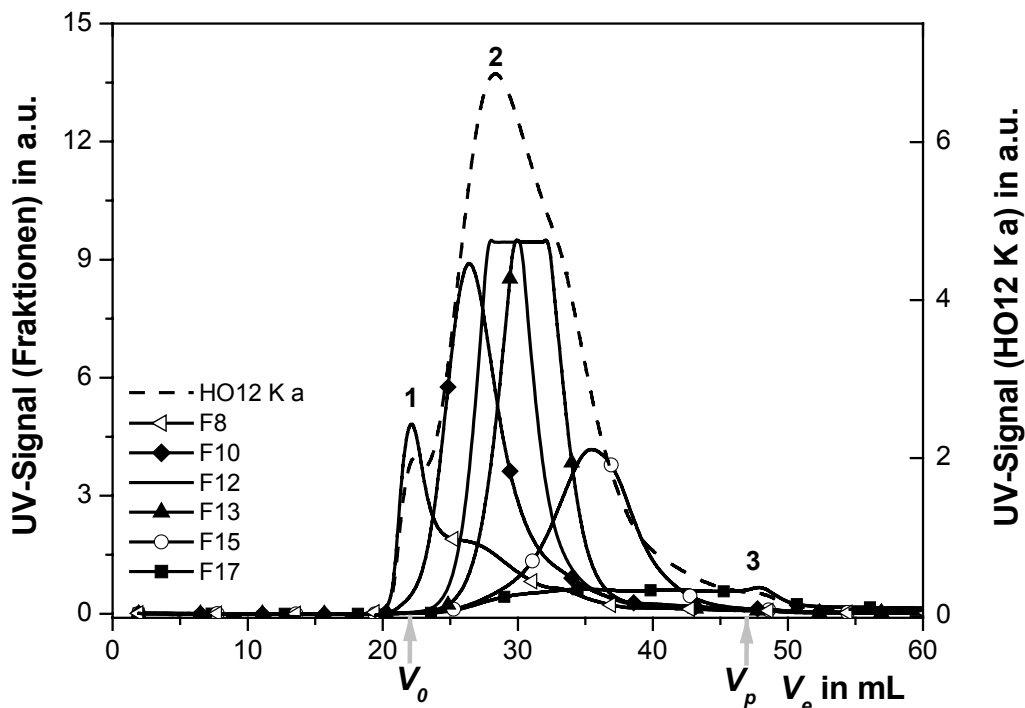
#### 4.2.1 Einfluss des Säulenmaterials

Die beiden stationären Phasen unterscheiden sich in ihren Trenneigenschaften. Dies ist anhand des Chromatogramms der Probe HO12 K a erkennbar (Abb. 4.4). An der TSK HW 50-(S)-Säule eluiert der Hauptpeak (Peak 2) der Probe früher als an der Superdex-Säule. Der Trennbereich des TSK-Gels ist gegenüber dem des Superdex-Materials zu geringeren Molekülgrößen verschoben.



**Abb. 4.4:** SEC-Chromatogramme der Probe HO12 K a an der Superdex-Säule bzw. der TSK HW 50 (S)-Säule des analytischen bzw. präparativen Systems. UV<sub>254</sub>-Detektion, Probe (1:50 v/v) mit Puffer verdünnt.

An beiden Säulen findet die Elution der Probe zwischen dem Ausschluss- und dem Permeationsvolumen statt. Ein derartiges Elutionsverhalten huminstoffreicher DOM ist nach SWIFT UND POSNER (1971) ein Indiz dafür, dass die Trennung hauptsächlich auf Größenausschlussmechanismen basiert. Die SEC-Faktionen der Probe HO12 K a wurden sowohl an der Superdex- als auch an der TSK-Säule reinjiziert (Abb. 4.3, Abb. 4.5). Die SEC-Faktionen eluieren an der TSK-Säule bei niedrigeren  $K_D$ -Werten als an der Superdex-Säule. Aus den  $K_D$ -Werten (Tab. 4.3) der Fraktionen wird somit, ähnlich wie für die Ausgangsprobe HO12 K a, erkennbar, dass sich die beiden Säulenmaterialien in ihren Trennbereichen unterscheiden.



**Abb. 4.5:** SEC-Chromatogramme der Probe HO12 K a und der Fraktionen F8, F10, F12, F13, F15 und F17. Reinjektion nach 1 Woche am analytischen System. TSK HW 50-(S)-Säule, Eluent 1, UV<sub>254</sub>-Detektion, Proben mit Puffer verdünnt.

**Tab. 4.3:**  $K_D$ -Werte ausgewählter SEC-Faktionen der Probe HO12 K a an der Superdex- bzw. TSK HW 50-(S) Säule.

Fraktion	$K_D$ -Wert Superdex	$K_D$ -Wert TSK HW 50-(S)
F8	0,03	0
F10	0,33	0,17
F12	0,50	0,27
F13	0,60	0,36
F15	0,78	0,53
F17	0,97	1

Eine Trennung der mit der Superdex-Säule hergestellten Fraktionen ist auch unter Verwendung des TSK-Gels möglich (SEC-Chromatogramme mit DOC-Detektion siehe Anhang F). Dies zeigt, dass beide Säulenmaterialien für die Fraktionierung der DOM der Braunwasserprobe geeignet sind.

#### 4.2.2 Einfluss der Probeneigenschaften

Der Einfluss von DOC-Konzentration, Ionenstärke und pH-Wert der Probe auf die SEC-Trennung wurde unter Verwendung der Probe HO12 K a untersucht. Die DOC-Konzentration wurde durch Verdünnen der Probe mit Eluent 1 variiert. Die Ionenstärke wurde durch Zugabe von NaCl und der pH-Wert durch Zugabe von NaOH bzw. HCl ( $c = 0,1 \text{ mol/L}$ ) eingestellt.

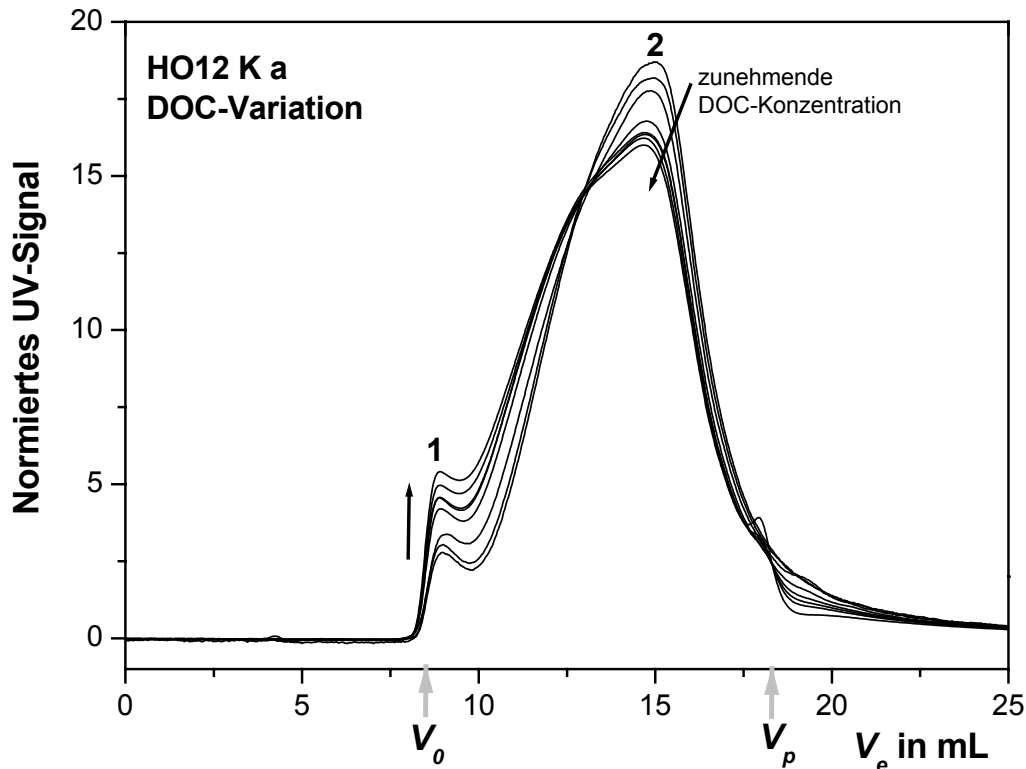
##### 4.2.2.1 *DOC-Konzentration*

Die Variation der DOC-Konzentration hat Auswirkungen auf die Form des SEC-Chromatogramms (Abb. 4.6). Mit ansteigender DOC-Konzentration kommt es zu einer Abnahme des Elutionsvolumens von Peak 2 sowie zu einer Abnahme des Flächenanteils an der Gesamtfläche des chromatographierbaren, UV-aktiven Anteils der Probe (Tab. 4.4). Gleichzeitig nimmt der Anteil von Peak 1 an der Gesamtfläche zu. Diese Änderungen sind jedoch keine Folge unspezifischer Wechselwirkungen zwischen Proben- und Trennmateriale, sondern auf die Überladung der Säule bei hohen DOC-Konzentrationen zurückzuführen. Die Änderungen der  $V_e$ - und  $A_{rel}$ -Werte sind in Anbetracht des weiten Bereichs, innerhalb dessen die DOC-Konzentrationen variiert wurden, nur gering ausgeprägt und daher von untergeordneter Bedeutung für die präparative Fraktionierung von DOM mittels SEC. Als wesentlich bedeutsamer ist dagegen die Abhängigkeit der Wiederfindung der Trennmethode von der DOC-Konzentration der Probe zu werten. Die Wiederfindung kann durch Vergleich der Peakflächen der Säulen ( $A_{Säule}$ )- bzw. Bypassmessung ( $A_{Bypass}$ ) quantifiziert werden. Bei Verwendung eines UV-Detektors ergibt sich der sogenannte chromatographierbare, UV-aktive Anteil der DOM ( $c_{UV}$ ) aus:

$$c_{UV} \text{ in } \% = A_{Säule}/A_{Bypass} \times 100 \quad (4.1)$$

Der Parameter  $h_{UV}$  (hydrophober, UV-aktiver Anteil) entspricht folglich dem Verlust an DOM:

$$h_{UV} \text{ in } \% = 100 - c_{UV} \quad (4.2)$$



**Abb. 4.6:** SEC-Chromatogramme der Probe HO12 K a bei verschiedenen DOC-Konzentrationen. Präparatives SEC-System, Superdex-Säule, Eluent 1, UV<sub>254</sub>- und ELF-Detektion. DOC = 5 bis 200 mg/L (siehe Tab. 4.4).

Die Variation der DOC-Konzentration hat Auswirkungen auf den *hUV*-Anteil der Probe. Dieser nimmt mit abnehmender Probenkonzentration von etwa 16 % bei einem DOC von 100 mg/L auf etwa 23 % des injizierten, UV-aktiven Materials bei einem DOC von 10 mg/L zu (Tab. 4.4). Für DOC-Konzentrationen unter 5 mg/L wurden *hUV*-Werte über 30 % ermittelt. Für die präparative Fraktionierung bedeutet dies, dass bei niedrigeren DOC-Gehalten geringere Wiederfindungen der DOM erzielt werden. Niedrige DOC-Konzentrationen der Ausgangsprobe sollten daher möglichst vermieden werden.

Der Verlust von Probenmaterial wird durch die irreversible Sorption von DOM am Gelmaterial (Dextran-Agarose-Copolymer) verursacht. Aus der irreversiblen Sorption eines Teils der gelösten organischen Substanz wurde auf hydrophobe Eigenschaften dieses nicht chromatographierbaren Anteils geschlossen (HUBER ET AL. 1994). Auf der Grundlage der hier gezeigten Ergebnisse muss diese Hypothese jedoch in Frage gestellt werden. Der (Massen-)Anteil der hydrophoben Strukturen an der DOM der Probe HO12 K a ist unabhängig von der DOC-Konzentration der Probe. Dennoch wurden für die gleiche Probe sehr unterschiedliche *hUV*-Anteile ermittelt. Eine Konzentrationsabhängigkeit des *hUV* wurde selbst bei Einzelsubstanzen mit

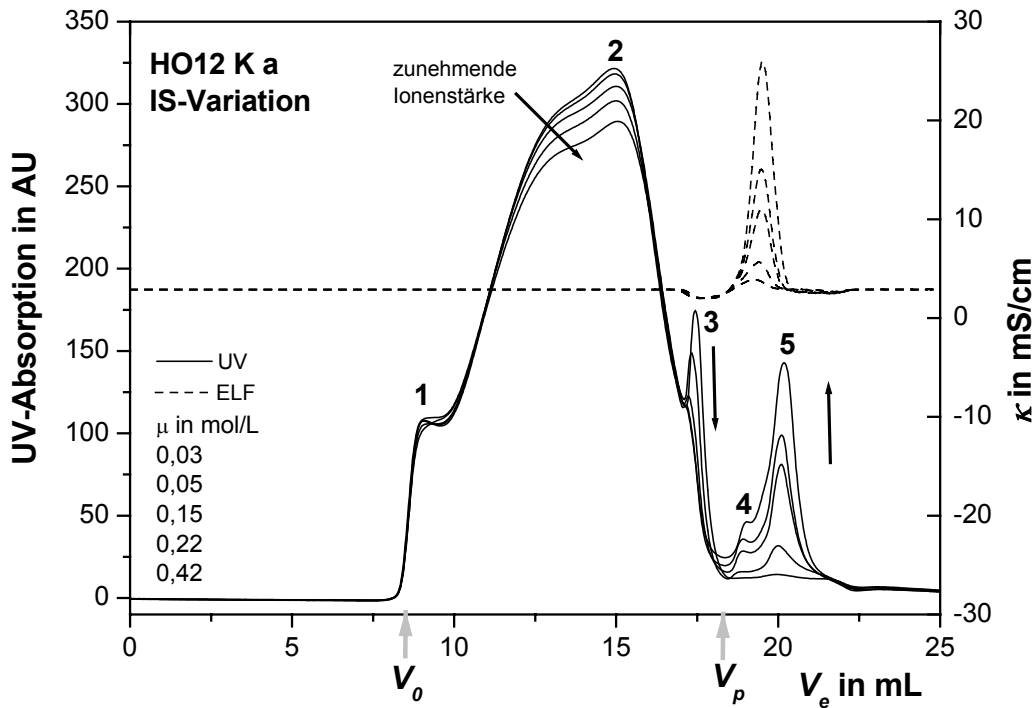
bekannter Struktur und definierten physikochemischen Eigenschaften beobachtet (Zunahme des  $hUV$  von Kaliumhydrogenphthalat von ca. 20 % auf 40 % bei Abnahme der DOC-Konzentration von 10 mg/L auf 2,5 mg/L). Dies zeigt, dass es sich hierbei nicht bzw. nur zu einem geringen Anteil um einen strukturselektiven Verlust handeln kann. Der Parameter  $hUV$  stellt folglich keine zuverlässige Größe zur Beschreibung struktureller Eigenschaften der DOM dar.

**Tab. 4.4:** Elutionsvolumina und Flächenanteile ( $A_{rel}$ ) der Peaks 1 und 2 sowie  $hUV$  als Funktion der DOC-Konzentration der Probe HO12 K a. n. b.: nicht bestimmt.

DOC in mg/L	$V_e$ Peak 1 in mL	$V_e$ Peak 2 in mL	$A_{rel}$ Peak 1 in %	$A_{rel}$ Peak 2 in %	$hUV$ in %
5	9,0	15,0	4	96	24
7	9,0	14,9	4	96	23
10	9,0	14,8	4	96	23
20	8,9	14,7	5	95	23
50	8,9	14,6	5	95	20
70	8,9	14,6	5	95	16
100	8,9	14,6	5	95	16
200	8,9	14,6	6	94	n. b.

#### 4.2.2.2 Ionenstärke

Durch die Erhöhung der Ionenstärke (IS) der Probe ( $IS(\text{Probe}) > IS(\text{Eluent})$ ) können wesentlich ausgeprägtere Änderungen der Chromatogrammform herbeigeführt werden als durch die Änderung der DOC-Konzentration. Schon ab einer IS von 0,05 mol/L kommt es zur Elution von Probenbestandteilen nach dem Permeationsvolumen (Peaks 4 und 5 in Abb. 4.7). Der Flächenanteil des nach  $V_p = 18,3$  mL eluierenden Teils der Probe steigt mit zunehmender IS von 2 % der Gesamtfläche ( $\mu = 0,03$  mol/L) auf 9 % ( $\mu = 0,42$  mol/L; Tab. 4.5). Dies ist ein Anzeichen für eine Beeinträchtigung der Größentrennung durch reversible WW zwischen DOM und Gelmaterial (s. Kap. 2.3.1). Eine präparative Fraktionierung von Proben mit hoher Ionenstärke auf der Grundlage reiner Größenausschlussmechanismen ist bei Verwendung der SEC als Fraktionierungsmethode somit nicht möglich. Durch die Erhöhung der Ionenstärke der Probe (Erhöhung der Polarität des Lösemittels der Probe) kommt es zu einer Hydrophobisierung gelöster organischer Verbindungen und einer Verdrängung aus der flüssigen Phase. Dies resultiert in einer Zunahme des Anteils der DOM, der reversibel am Gelmaterial sorbiert. Das Leitfähigkeitssignal zeigt, dass die Elution dieses Anteils erst nach der Elution der zugegebenen Elektrolyte stattfindet.



**Abb. 4.7:** SEC-Chromatogramme der Probe HO12 K a bei verschiedenen Ionenstärken. Präparatives SEC-System, Superdex-Säule, Eluent 1, UV<sub>254</sub>- und ELF-Detektion.

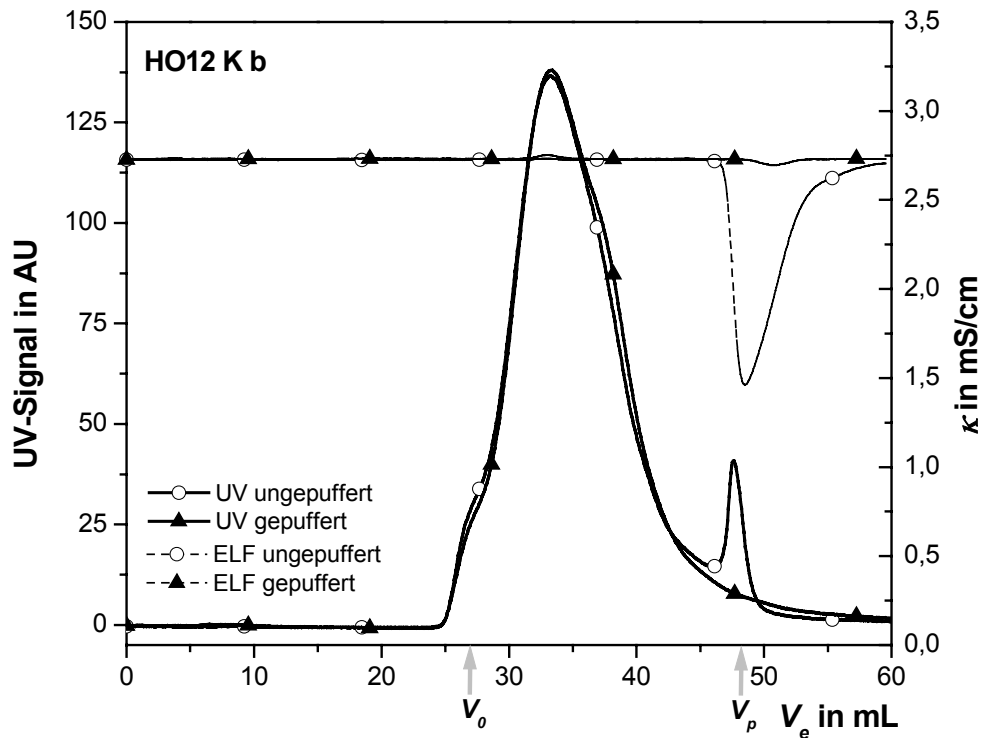
**Tab. 4.5:** Anteil des  $hUV$  und Peakflächenanteile nach  $V_p$  ( $A_{rel>Vp}$ ) als Funktion der Ionenstärke und des pH-Wertes der Probe HO12 K a. n. b.: nicht bestimmt.

IS-Variation (DOC = 64 mg/L)			pH-Variation (DOC = 5 mg/L, $\mu = 0,12$ mol/L)	
$\mu$ in mol/L	$A_{rel>Vp}$ In %	$hUV$ in %	pH-Wert	$A_{rel>Vp}$ in %
0,03	2	11	2,4	12
0,05	3	9	4,2	8
0,09	4	5	6,0	8
0,15	5	5	6,7	9
0,22	6	5	7,9	8
0,29	7	5	9,4	8
0,36	8	5	11,4	5
0,42	9	5	-	-

Die Erhöhung der IS der Probe gegenüber der des Eluenten bewirkt gleichzeitig eine Abnahme des Flächenanteils des Salzpeaks. Dieser sinkt von 6 % auf < 1 % (Daten nicht gezeigt). Die Erhöhung der IS der Probe wirkt sich weiterhin auf den *hUV*-Anteil aus, welcher von 11 % auf 5 % abnimmt. FUCHS (1985b) stellte ebenfalls fest, dass der Anteil der irreversibel sorbierenden, UV-aktiven DOM durch Zugabe von Salz zur Probe verringert werden kann. Bei  $\mu > 0,5$  mol/L beobachtete er jedoch gegensätzliche Effekte für verschiedene Salze. Die Zugabe von Phosphatsalzen führte ab Ionenstärken von 1 mol/L wegen der strukturverstärkenden Wirkung dieser Salze wieder zu einer Zunahme des *hUV* (FUCHS 1985b).

Ist die Ionenstärke der Probe gegenüber der des Eluenten (Puffer) gering, so kommt es zum Auftreten des Salzpeaks (SPECHT 2002). Dieser Fall ist bei der in dieser Arbeit verwendeten Braunwasserprobe gegeben. Der Salzpeak lässt sich durch Angleichen der IS der Probe an die des Eluenten vermeiden (Abb. 4.8). Bei elektrolytarmen Proben kann die Ionenstärke beispielsweise durch Zugabe einer konzentrierten Lösung des Eluenten eingestellt werden („gepufferte Probe“). Bei elektrolytreichen Proben (z. B. Abwasser) ist ein exaktes Angleichen der IS jedoch schwierig. Da die Ionenstärke von Probe und Eluent bei elektrolytarmen Proben hauptsächlich durch die gleichen, aus dem Eluenten stammenden Elektrolytspezies bestimmt wird, können Änderungen der Ionenstärke während der Chromatographie anhand der Leitfähigkeitsdetektion verfolgt werden.

Die IS der gepufferten Probe konnte nahezu vollständig an die des Eluenten angeglichen werden. Ein Salzpeak trat nicht auf (UV-Detektion). Der Flächenanteil des Salzpeaks in der ungepufferten Probe ist mit 7 % gering (Tab. 4.6). Das Angleichen der IS der Probe an die des Eluenten bewirkt eine Abnahme der Fläche von Peak 3 und eine Zunahme der Fläche des zweiten Peaks. Die DOM des Salzpeaks eluiert nach Angleichen der IS zum Teil bereits bei kleineren Elutionsvolumina als in der ungepufferten Probe. Da im Salzpeak nur ein kleiner Anteil der DOM der Braunwasserprobe enthalten ist, wirkt sich die Pufferzugabe nicht auf die Elutionsvolumina der DOM im Bereich  $V_e < V_p$  aus. Damit ist ein Vergleich verschiedener Chromatogramme in diesem Elutionsbereich prinzipiell auch ohne vorheriges Angleichen der Ionenstärke der Probe an die des Eluenten möglich. Dies ist für den analytischen Einsatz der Methode von Vorteil.



**Abb. 4.8:** SEC-Chromatogramme der ungepufferten und gepufferten Probe HO12 K b. Präparatives System; TSK HW 50-(S)-Säule, Eluent 2, UV<sub>254</sub>-Detektion.

**Tab. 4.6:** Flächenanteile von Peak 1, 2 und 3 in % der Gesamtfläche. Probe HO12 K b (1:50 v/v).

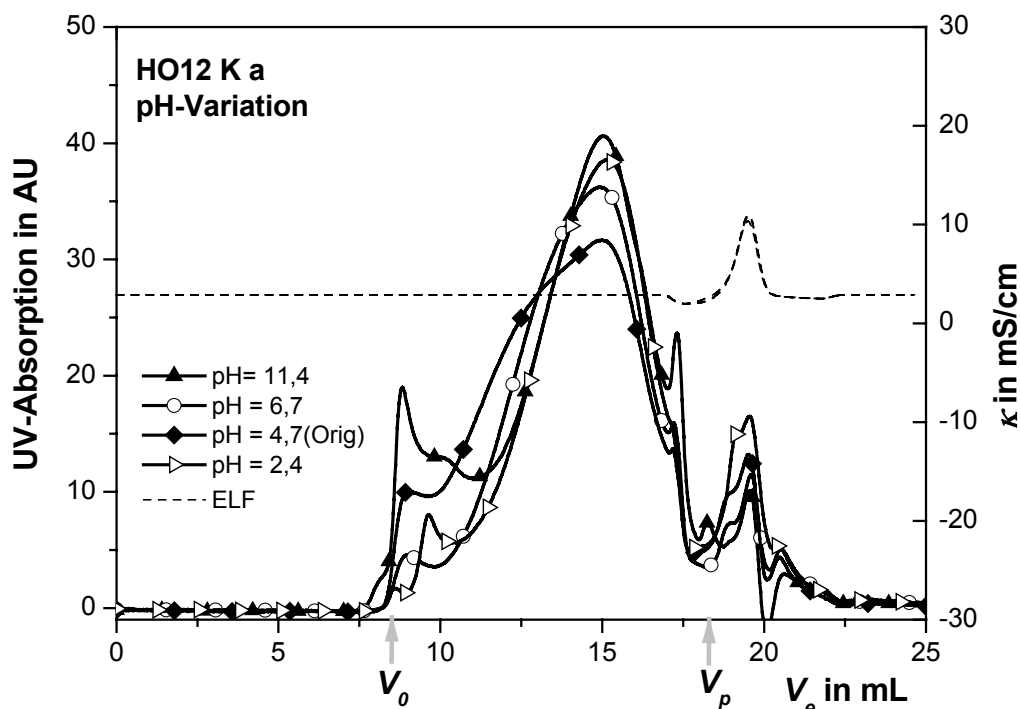
	$A_{rel}$ Peak 1 in %	$A_{rel}$ Peak 2 in %	$A_{rel}$ Peak 3 in %
Ungepufferte Probe	4	89	7
Gepufferte Probe	4	92	4

#### 4.2.2.3 pH-Wert

Die Zugabe von  $\text{H}_3\text{O}^+$ - bzw.  $\text{OH}^-$ -Ionen zur Probe verursacht gleichzeitig eine, wenn auch geringfügige, Änderung der Ionenstärke. Um die durch die pH-Einstellung bewirkte relative IS-Änderung möglichst gering zu halten, wurde die Probe vorher durch Zugabe von NaCl auf eine IS von  $\mu = 0,12 \text{ mol/L}$  eingestellt. Bei der Probe HO12 K a kommt es nur bei stark sauren oder stark alkalischen pH-Werten zu deutlichen Veränderungen der Chromatogrammform (Abb. 4.9). Der Flächenanteil der nach  $V_p$  eluierenden Probe sinkt von etwa 12 % bei  $\text{pH} = 2,4$  über 8 bis



9 % auf 5 % bei pH = 11,4 (Tab. 4.5). Niedrige pH-Werte begünstigen folglich, ähnlich wie hohe IS, die reversible Sorption eines Teils der DOM.



**Abb. 4.9:** SEC-Chromatogramme der Probe HO12 K a bei verschiedenen pH-Werten. Präparatives SEC-System, Superdex-Säule, Eluent 1, UV<sub>254</sub>- und ELF-Detektion.

Die in Kapitel 4.2.2 gezeigten Ergebnisse belegen, dass bereits eine geringe Erhöhung der Ionenstärke der Probe zu einer deutlichen Beeinträchtigung der SEC-Trennung führen kann. Die Auswirkungen der Variation der DOC-Konzentration bzw. des pH-Wertes auf die Chromatogrammform sind dagegen gering ausgeprägt oder erst bei starken Veränderungen der Probeneigenschaften erkennbar. Bei der Verwendung der SEC als präparativer Fraktionierungsmethode sollten niedrige DOC-Konzentrationen, hohe Ionenstärken sowie stark saure bzw. stark alkalische pH-Werte der zu fraktionierenden Probe vermieden werden. Da vor der SEC-Fraktionierung oftmals eine Anreicherung der Probe erforderlich ist, sollte auch bei der Wahl der Anreicherungsmethode darauf geachtet werden, dass durch die Anreicherung möglichst geringe Änderungen der beiden letztgenannten Parameter herbeigeführt werden.

### 4.3 Anreicherung gelöster organischer Substanz für die SEC-Fraktionierung

Bei der Fraktionierung gelöster organischer Substanz unter Einsatz chromatographischer Methoden kommt es wegen der Zugabe von Eluenten zu einer Verdünnung der Probe. Um lange Fraktionierungszeiträume und erhöhte Verluste durch die Sorption von DOM am Gelmaterial zu

vermeiden (vgl. Kap. 4.2.2) sowie analytisch erfassbare DOM-Konzentrationen in den Fraktionen zu gewährleisten, ist eine Anreicherung der zu fraktionierenden Probe vor der SEC-Fraktionierung erforderlich. Im Gegensatz zur Fraktionierung mittels SEC kann bei der Fraktionierung mittels Ultrafiltration bei der Durchführung im Konzentrationsmodus gleichzeitig eine Anreicherung der Probe erreicht werden. Eine vorherige Probenanreicherung ist bei dieser Methode daher nicht unbedingt notwendig. Der Vergleich verschiedener Anreicherungsverfahren wurde folglich auf deren Einsatz in Verbindung mit einer nachfolgenden SEC-Fraktionierung beschränkt. Auf Grundlage der in Kapitel 4.2.2 geschilderten Ergebnisse wurde dabei insbesondere untersucht, ob durch die jeweilige Anreicherungsverfahren Änderungen der Ionenstärke sowie des pH-Wertes der Probe verursacht werden.

#### 4.3.1 Vergleich verschiedener Anreicherungsverfahren

Die Anreicherungs- bzw. Isolierungsmethoden Rotationsverdampfung (nach Kationenaustausch), Adsorption am Polymerharz XAD 8 (XAD-Variante A, siehe Kap. 3.2) sowie die Ultrafiltration im Konzentrationsmodus (1000 g/mol-Membran aus regenerierter Cellulose) wurden hinsichtlich ihrer DOC-Wiederfindung und Verwendbarkeit der Konzentrate für die SEC-Fraktionierung verglichen. Aus sprachlichen Gründen wird im Folgenden auf die Unterscheidung zwischen Anreicherungs- (Rotationsverdampfung, Ultrafiltration) und Isolierungsmethoden (Adsorption an XAD 8) verzichtet. Die angereicherten Proben aller drei Varianten werden als Konzentrate bezeichnet. Bei der XAD-Anreicherung stellt die Hauptfraktion des Eluats der XAD-Säule nach Ansäuern mit Salzsäure auf einen pH-Wert von etwa 2 das Konzentrat dar.

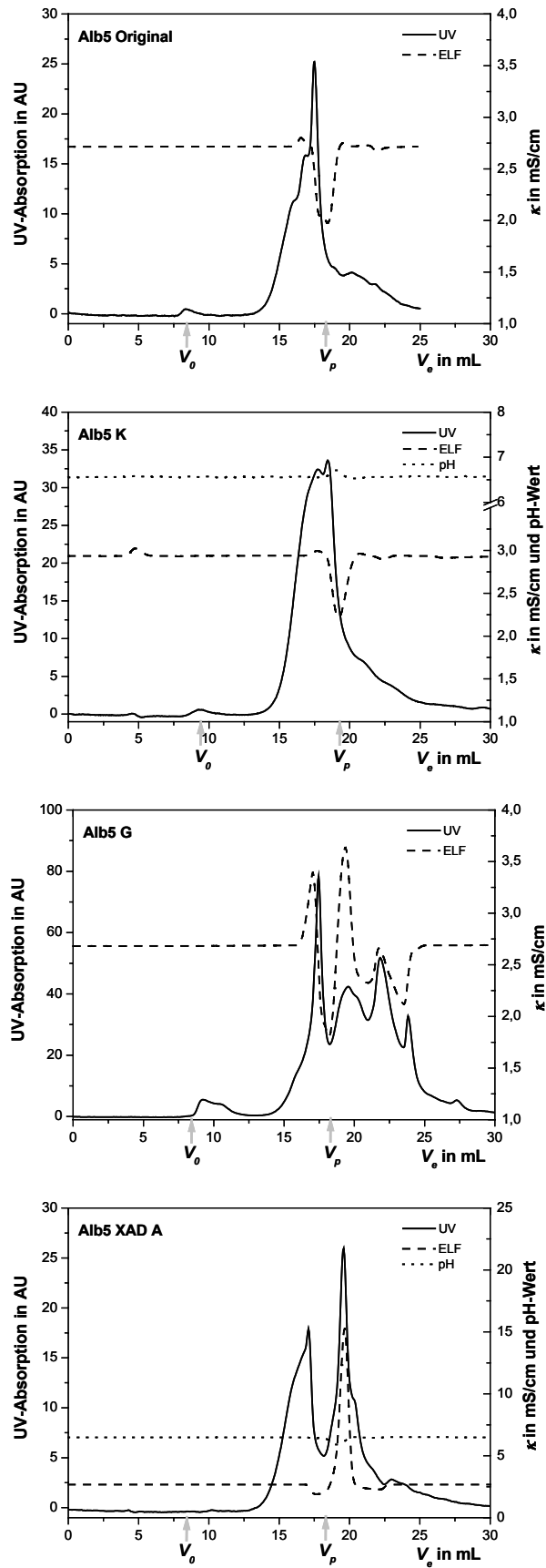
Der Vergleich wurde unter Verwendung der Probe Alb5 durchgeführt. Durch die Anreicherung mittels Rotationsverdampfung bzw. Ultrafiltration konnten etwa 50 % bzw. 60 % der DOM des Kläranlagenablaufs im Konzentrat wiedergewonnen werden (DOC-Bilanz, Tab. 4.7). Alle drei Varianten des XAD 8-Isolierungsverfahrens ergaben ähnlich niedrige DOC-Wiederfindungen von etwa 20 % (Daten für XAD B und C nicht gezeigt). In vorangegangenen Arbeiten war bereits gezeigt worden, dass mit dem XAD-Verfahren nur etwa 20 % des DOC dieser Probe isoliert werden können (ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002). Die Anreicherungsvarianten Kationenaustausch + Rotationsverdampfung und Adsorption an XAD-Harz verursachten einen starken Anstieg der Leitfähigkeit und eine Erniedrigung des pH-Wertes der Probe. Durch den Kationenaustausch sollte eine Entfernung anorganischer Ionen erreicht und damit eine Ausfällung bei der nachfolgenden Rotationsverdampfung vermieden werden.

**Tab. 4.7:** Basisparameter der Konzentrate der Probe Alb5 (Probenahme Oktober 1999). G: Rotationsverdampfer-Konzentrat nach Kationenaustausch, XAD A: Isolierung an XAD 8-Harz bei Original-pH-Wert, K: Ultrafiltrations-Konzentrat (1000 g/mol). DOC-Angaben: Mittelwert (MW)  $\pm 1$  s für  $n = 2$ .

Probe	DOC in mg/L	DOC in %	$\kappa$ in $\mu\text{S/cm}$ (25 °C)	pH (25 °C)	Peakflächen- anteil $A_{rel > V_p}$ in %
Alb5 Original	11,1 $\pm$ 0,2	100	1067	7,3	26
Alb5 G	58 $\pm$ 2	53	16300	2,0	68
Alb5 XAD A	21,1 $\pm$ 0,1	17	37700	ca. 2	52
Alb5 K	28,5 $\pm$ 0,1	63	1100	8,1	20

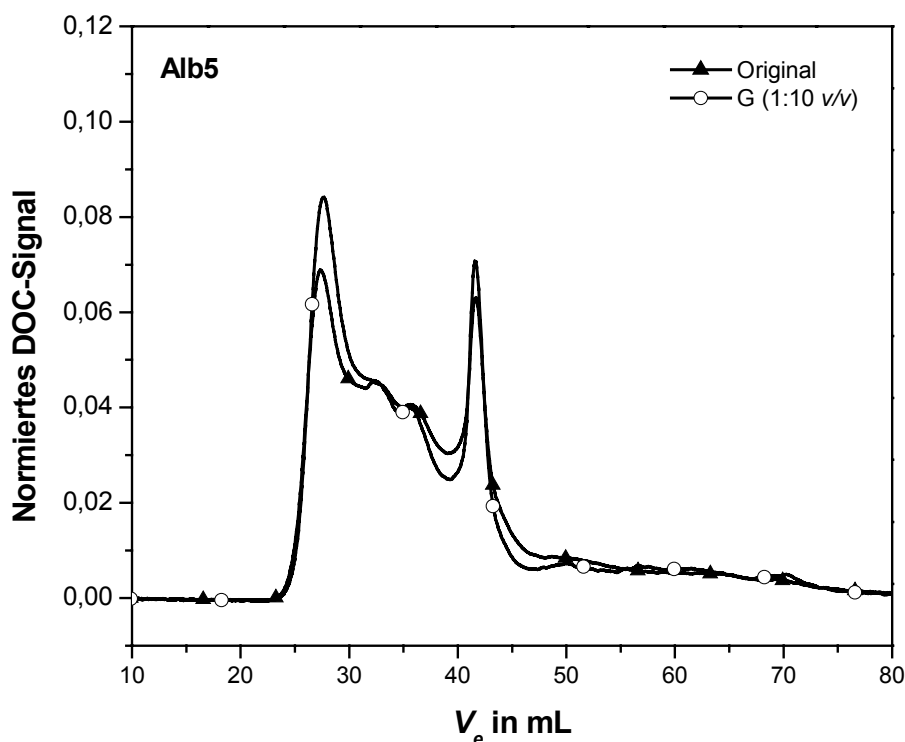
Bei der Ultrafiltration findet kein Eintrag von HCl oder NaOH in die Probe statt. Aus der Probe stammende anorganische Salze werden darüber hinaus teilweise entfernt. Mit dieser Anreicherungsmethode sind daher keine wesentlichen Änderungen der ELF oder des pH-Wertes verbunden. Dies lässt bereits erwarten, dass die UF im Hinblick auf die SEC-Fraktionierung die am besten geeignete Anreicherungsvariante darstellt.

Diese Erwartung wird durch die Ergebnisse der SEC-Trennung der angereicherten Proben bestätigt. Die Konzentrate wurden in unverdünnter und ungepufferter Form in das präparative System (Äkta Explorer, Superdex-Säule) injiziert (Abb. 4.10). Das Chromatogramm des Konzentrats Alb5 K weist die größte Ähnlichkeit mit der Originalprobe auf. Ein Teil der DOM der Probe Alb5 eluiert im Gegensatz zur Probe HO stets nach dem Permeationsvolumen (siehe Kapitel 4.3.2). Dieser Anteil beträgt bei Alb5 Original und Alb5 K 26 % bzw. 20 % des chromatographierbaren, UV-aktiven Materials. In den Konzentraten Alb5 G und Alb5 XAD A stellt das nach  $V_p$  eluierende UV-aktive Material mit 68 % und 52 % dagegen den größten Teil der chromatographierbaren Substanz. Dieser Effekt wurde auch für XAD- und Rotationsverdampfungs-Konzentrate der DOM anderer Herkunft (Oberflächengewässer, Kläranlagenabläufe) beobachtet.



**Abb. 4.10:** SEC-Chromatogramme der Originalprobe Alb5 und der Konzentrate Alb5 G, Alb5 K und Alb5 XAD A. Präparatives SEC-System, Superdex-Säule, Eluent 1, UV<sub>254</sub>-, ELF- und pH-Detektion.

Das Konzentrat Alb5 G wurde zusätzlich mit Hilfe des analytischen SEC-Systems (LC-UV/OCD) analysiert. Zu diesem Zweck wurde die Probe im Verhältnis 1 zu 10 mit Reinstwasser verdünnt. Die Chromatogrammform des verdünnten Konzentrats ist nahezu identisch mit der der Originalprobe (Abb. 4.11).

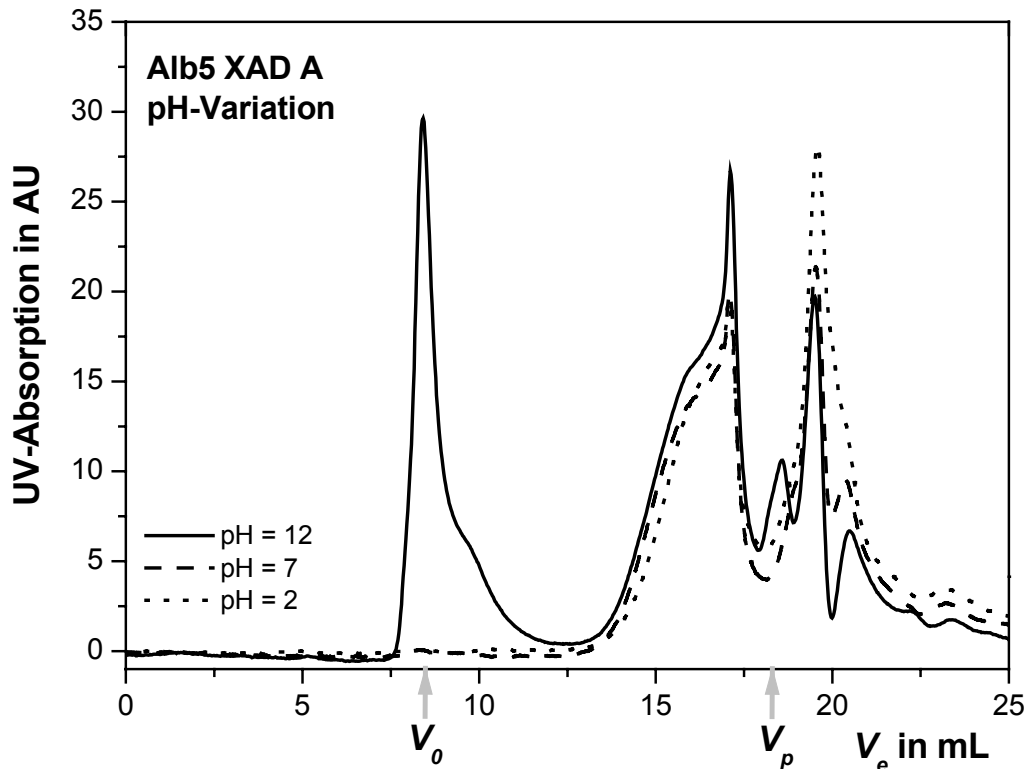


**Abb. 4.11:** SEC-Chromatogramme der Proben Alb5 Original und Alb5 G (1:10 v/v). Analytisches System, TSK HW 40-(S)-Säule, Eluent 1, DOC-Detektion.

Auf der Grundlage dieses Ergebnisses kann ausgeschlossen werden, dass das in Abb. 4.10 erkennbare ungewöhnliche Elutionsverhalten der DOM des Konzentrats auf eine Kontamination der Probe (z. B. durch Eintrag von Kationenaustauschermaterial) zurückzuführen ist. Eine durch die Anreicherung verursachte Veränderung der Molekülgrößenverteilung der Probe (z. B. durch Aggregation, Spaltung von Bindungen) scheidet als Erklärungsmöglichkeit ebenfalls aus. Als mögliche Ursache für das Elutionsverhalten der DOM (Alb5 G, Alb5 XAD A) kann dagegen eine unterschiedliche strukturelle Selektivität der Anreicherungsverfahren in Betracht gezogen werden. Mit Hilfe der XAD-Methode werden insbesondere hydrophobe Bestandteile der DOM angereichert (THURMAN UND MALCOM 1981, MAURICE ET AL. 2002, LEENHEER UND CROUÉ 2003). Zwischen den durch Adsorption an XAD aus dem Kläranlagenablauf isolierbaren (FA, HA) und den nicht isolierbaren Anteilen (NHS) wurden strukturelle Unterschiede nachgewiesen (LANKES 2001). Das Konzentrat der Rotationsverdampfung enthält mit etwa 50 % einen

größeren Anteil der DOM der Ausgangsprobe als das XAD-Isolat und muss daher sowohl nicht-isolierbare als auch isolierbare Anteile der DOM des Kläranlagenablaufs enthalten. Hieraus kann auf strukturelle Unterschiede zwischen der DOM des RV-Konzentrats und des XAD-Isolats geschlossen werden. Dennoch wurde für die Proben Alb5 G und Alb5 XAD A ein ähnliches Verhalten der DOM bei der SEC beobachtet (Elution des Großteils der UV-aktiven Substanz nach  $V_p$ ). Dies deutet darauf hin, dass das Elutionsverhalten nicht allein auf strukturelle Unterschiede zwischen beiden Konzentraten zurückgeführt werden kann. Die in Kapitel 4.2.2 gezeigten Ergebnisse legen statt dessen den Schluss nahe, dass auch bei den Konzentraten Alb5 G und Alb5 XAD A eine Beeinträchtigung der Größentrennung durch unspezifische WW aufgrund der sehr hohen Salzgehalte (Ionenstärken) und niedrigen pH-Werte der Proben vorliegt. Diese Beeinträchtigung ist bei der Probe Alb5 offensichtlich besonders stark ausgeprägt. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass ein Teil der DOM dieser Probe bereits bei niedrigen Ionenstärken und neutralen pH-Werten Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingeht.

Hohe Ionenstärken und niedrige pH-Werte wirken sich nachteilig auf die SEC-Trennung aus, da sie zur Elution von Probenmaterial nach dem Permeationsvolumen führen. Im Elutionsbereich  $V_e > V_p$  findet keine Größentrennung mehr statt. Folglich kann ein Großteil der in den Proben Alb5 G und Alb5 XAD A enthaltenen DOM mit der SEC nicht größenfraktioniert werden. Hierfür ist eine weitere Aufbereitung (pH-Einstellung, Entfernung anorganischer Salze) der Konzentrate erforderlich. Das Chromatogramm des Konzentrats Alb5 XAD A in Abbildung 4.12 zeigt, dass eine Einstellung des pH-Wertes (Zugabe von 0,1 molarer NaOH bzw HCl) der Probe als Aufbereitungsmaßnahme nicht ausreicht. Die Elution eines Großteils der UV-aktiven DOM der Probe nach  $V_p$  bleibt weitgehend erhalten. Unterschiede im Chromatogramm sind erst bei pH-Werten von 12 bzw. 2 erkennbar. Bei pH = 12 kommt es durch elektrostatische WW zwischen negativ geladenen DOM-Molekülen und dem Gelmaterial zum Ausschluss eines Teils der Probe, während bei pH = 2 eine verstärkte Adsorption stattfindet. Dieses Ergebnis sowie die Tatsache, dass der pH-Wert der Probe aufgrund der geringen, in den pufferhaltigen Eluenten injizierten Volumina ( $V_{inj} = 0,5$  mL), von untergeordneter Bedeutung ist, deuten darauf hin, dass die beobachteten Effekte vor allem eine Folge der Ionenstärkeänderungen sind.



**Abb. 4.12:** SEC-Chromatogramme des Konzentrats Alb5 XAD A bei verschiedenen pH-Werten der Probe. Präparatives SEC-System, Superdex-Säule, Eluent 1, UV<sub>254</sub>- und ELF-Detektion.

Mit der Ultrafiltration konnte für die Probe Alb5 die höchste DOC-Wiederfindung erzielt werden (Tab. 4.7). Die Anreicherung führte zu keiner wesentlichen Änderung der Probenleitfähigkeit (Ionenstärke) oder des pH-Wertes. Der Anteil der nach dem  $V_p$  eluierenden Probe war mit etwa 20 % der UV-aktiven DOM geringer als bei den anderen Konzentraten und sogar niedriger als in der Originalprobe (26 %). Aufgrund der eindeutigen Vorteile dieser Methode wurde die Ultrafiltration zur Anreicherung sämtlicher fraktionierter Proben eingesetzt.

#### 4.3.2 Anreicherung der Proben HO und Alb5 mittels Ultrafiltration

Die Ultrafiltration wurde zur Anreicherung von DOM natürlichen (Braunwasser-DOM, HO) und anthropogenen Ursprungs (Kläranlagenablauf, Alb5) gebraucht. Die beiden Originalproben unterscheiden sich grundlegend in ihren physikochemischen Eigenschaften (Tab. 4.8) und Molekülgrößenverteilungen (Abb. 4.13).

**Tab. 4.8:** Basisparameter der Originalproben HO21 und Alb5 (Probenahmen Juli 2001). DOC-Angaben:  $MW \pm 1 s$  für  $n = 3$  (HO21) bzw.  $n = 2$  (Alb5).

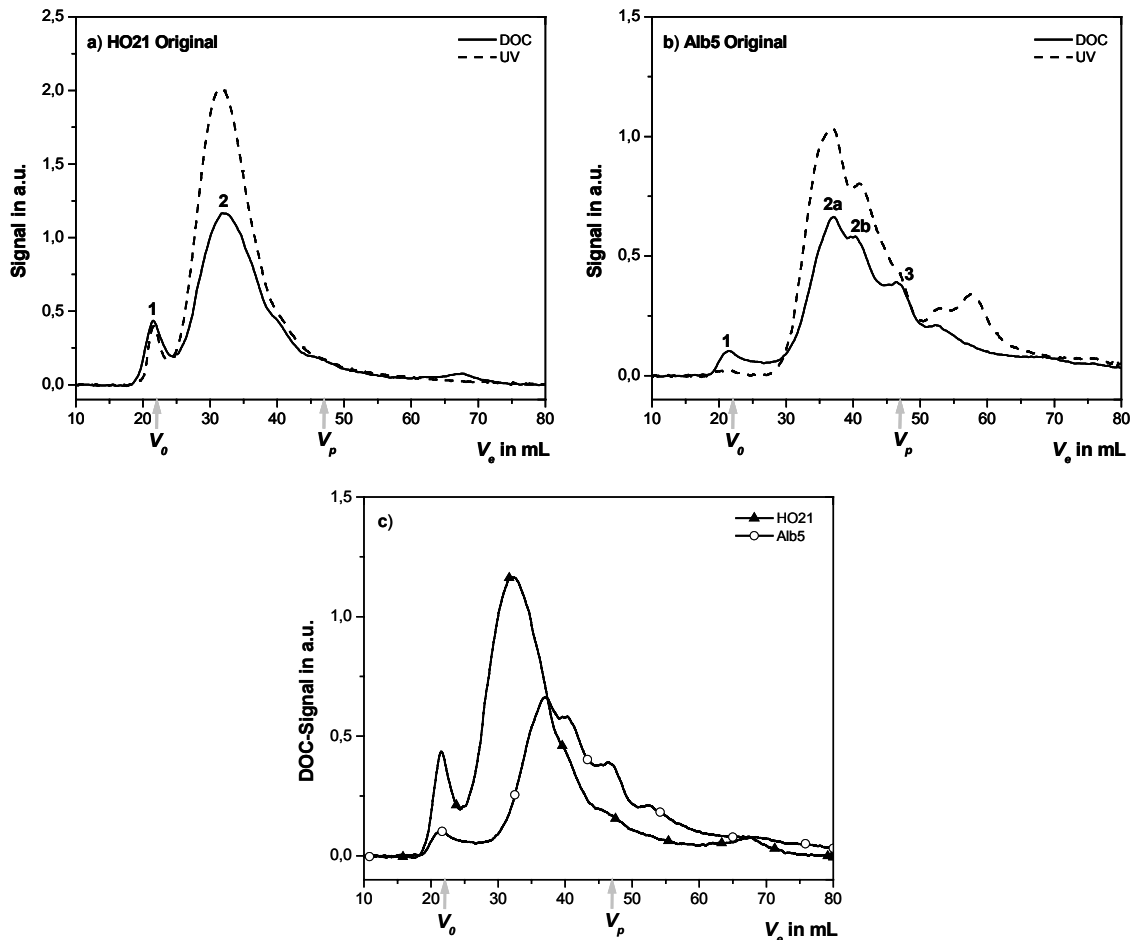
Probe	DOC in mg/L	$\kappa$ in $\mu\text{S}/\text{cm}$ (25 °C)	pH- Wert (25 °C)	$SUVA_{254}$ in L/(m mg)	$SUVA_{436}$ in L/(m mg)
HO21	22,1 $\pm$ 0,1	32	4,5	4,77	0,42
Alb5	7,5 $\pm$ 0,4	988	8,0	2,10	0,19

Die Braunwasserprobe HO21 weist hohe, für huminstoffreiche Proben charakteristische  $SUVA$ -Werte auf. Die DOC-Konzentration dieser Probe ist im Vergleich zu anderen Oberflächengewässern ebenfalls hoch (ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002, LEENHEER UND CROUÉ 2003). Aufgrund des niedrigen Gehaltes an anorganischen Wasserinhaltsstoffen (Gesamtkonzentration aller Elektrolyte etwa 1,5 mg/L (HEUMANN ET AL. 2002)) ist die Leitfähigkeit des Braunwassers sehr gering. Der niedrige pH-Wert ist auf den hohen Huminstoffgehalt der Probe von etwa 60 % des DOC zurückzuführen.

Im SEC-Chromatogramm ist ein breiter Peak (Peak 2) erkennbar, welcher sich ab einem Elutionsvolumen von etwa 25 mL über den gesamten Trennbereich der Säule erstreckt und die breite Molekülgrößenverteilung der Probe charakterisiert. Peak 1 entspricht Molekülen, die aufgrund ihres hydrodynamischen Radius  $R_e$  oder ihrer Ladung vom Gel ausgeschlossen werden. Der Großteil der DOM dieser Probe eluiert zwischen dem Ausschluss- ( $V_0$ ) und dem Permeationsvolumen ( $V_p$ ). Die Probe Alb5 unterscheidet sich insbesondere in den  $SUVA$ -Werten von der Probe HO21. Die Werte deuten auf einen höheren Anteil an UV-absorbierenden aromatischen und olefinischen Strukturen in der Braunwasserprobe hin. Der HS-Gehalt der DOM von Alb5 ist mit 9 bis 18 % gering (ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002). Die hohe Leitfähigkeit sowie der alkalische pH-Wert sind typisch für Kläranlagenabläufe. Im SEC-Chromatogramm sind mehrere Peaks (Peak 2a und 2b) zu erkennen. Die DOM von Alb5 enthält offensichtlich höhere Anteile definierter Molekülgruppen, die sich deutlicher in ihrem Elutionsverhalten unterscheiden als die der Probe HO. Der Peak bei  $V_p \sim 47$  mL (Peak 3) ist der sogenannte Salzpeak, welcher durch Ionenstärkedifferenzen zwischen Probe und Eluent zustande kommt. Aufgrund der hohen Ionenstärke des Kläranlagenablaufs ist ein Angleichen der IS an die des Eluenten erschwert (vgl. Kap. 4.2.2.2). Das Chromatogramm der Probe Alb5 ist im Vergleich zur Probe HO21 zu größeren Elutionsvolumina verschoben (Abb. 4.13 c). Ein Teil der DOM von Alb5 eluiert aufgrund reversibler Adsorption der Moleküle an der Gelphase nach dem Permeationsvolumen.



Peak 1 bei Alb5 zeigt im Gegensatz zur Probe HO21 kaum UV-Absorption. Zwischen beiden Proben liegen folglich sowohl strukturelle Unterschiede als auch Unterschiede hinsichtlich der Molekülgrößenverteilung der DOM vor.



**Abb. 4.13:** SEC-Chromatogramme der Originalproben HO21 (a), Alb5 (b) und beider Proben im Vergleich (c). Analytisches SEC-System, TSK HW 50-(S)-Säule, Eluent 1, DOC- und UV<sub>254</sub>-Detektion. Proben gepuffert.

Die Originalproben HO21 und Alb5 wurden durch Ultrafiltration im Konzentrationsmodus in einer 2 Liter-Rührzelle unter Verwendung einer UF-Membran aus regenerierter Cellulose (Typ YM1, MWCO = 1000 g/mol) angereichert. Bei der Probe HO12 erfolgte die Anreicherung im Tangentialflussmodus unter Verwendung einer Polyethersulfonmembran mit einem MWCO von 4000 g/mol (FRIMMEL UND ABBT-BRAUN 1999, ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002). Ein Vergleich der Charakterisierungsparameter der Konzentrate (Tab. 4.9) mit denen der Originalproben (Tab. 4.8) zeigt, dass es durch die UF nur zu einer geringfügigen Abnahme der *SUVA*-Werte der Probe HO21 kommt (*SUVA*<sub>254</sub>: 1 %, *SUVA*<sub>436</sub>: 7 % Abnahme).

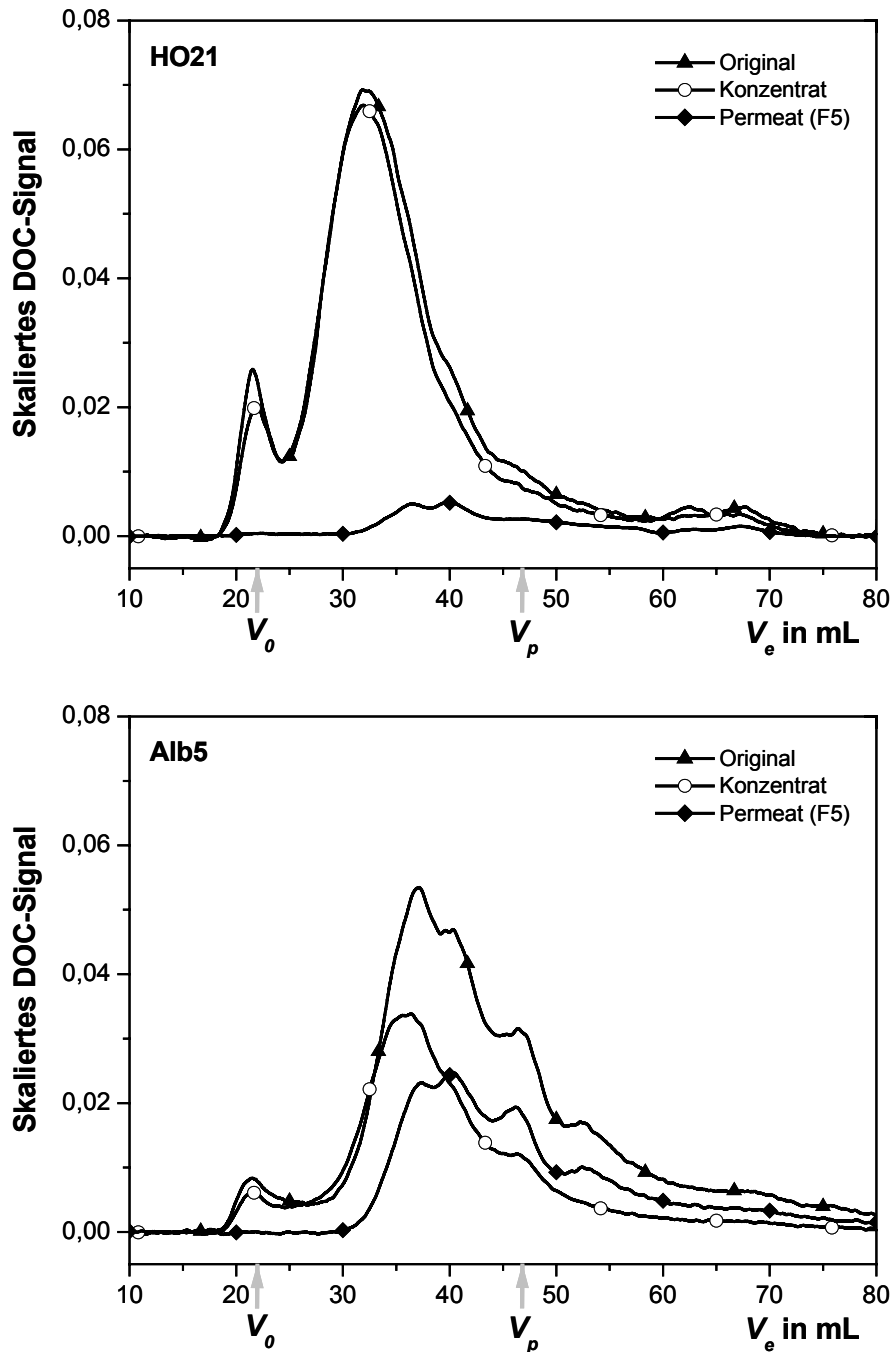
**Tab. 4.9:** Basisparameter der UF-Konzentrate HO12 K, HO21 K und Alb5 K. (Probenahmen Juli 1996 (HO12) und Juli 2001 (HO21, Alb5)). <sup>1</sup>Daten aus (ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002) und (ABBT-BRAUN 2003). DOC-Angaben: Mittelwert (MW)  $\pm$  1 Standardabweichung (s) für  $n = 2$ .

Probe	DOC in mg/L	DOC in %	$\kappa$ in $\mu\text{S/cm}$ (25 °C)	pH- Wert (25 °C)	$SUVA_{254}$ in L/(m mg)	$SUVA_{436}$ in L/(m mg)
HO12 K <sup>1</sup> (4000 g/mol)	877 $\pm$ k. A.	65	43	3,1	4,27 (pH = 2)	0,37 (pH = 2)
HO21 K (1000 g/mol)	104 $\pm$ 9	91	76	3,9	4,72	0,39
Alb5 K (1000 g/mol)	46,2 $\pm$ 0,4	54	1122	8,0	1,60	0,17

Die SEC-Chromatogramme zeigen für HO21 eine sehr gute Übereinstimmung der Molekülgrößenverteilungen des Originals und des Konzentrats (Abb. 4.14). Die Ergebnisse belegen, dass durch die Ultrafiltration nur geringfügige quantitative und qualitative Veränderungen der Braunwasserprobe verursacht werden. Im Vergleich zur Probe HO12 K, bei welcher eine Membran mit einem MWCO von 4000 g/mol verwendet wurde, konnten zusätzlich 26 % des DOC der Ausgangsprobe im Konzentrat gewonnen werden. Im Permeat der YM1-Membran (Fraktion F5; DOM < 1000 g/mol; DOC-Anteil 9 %) waren vor allem niedermolekulare Verbindungen enthalten.

Bei der Probe Alb5 konnten nur 54 % des DOC im Konzentrat angereichert werden (Tab. 4.9). Im Konzentrat einer vergleichbaren Probe, die an der gleichen Stelle entnommen wurde, waren nach Filtration über eine 4000 g/mol-Membran nur 21 % des DOC der Originalprobe enthalten (Probe ABV3, ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002). Ein Vergleich beider Anreicherungen (Probe HO vs. Probe Alb5 bzw. ABV) mittels UF zeigt, dass bei der Braunwasserprobe ein deutlich größerer Anteil der DOM im Konzentrat enthalten ist als beim Kläranlagenablauf. Dies deutet auf einen höheren Gehalt an hochmolekularen Bestandteilen in der Braunwasserprobe hin. Diese Schlussfolgerung wird durch die Resultate der analytischen SEC bestätigt. Aus den SEC-Chromatogrammen ist ersichtlich, dass die DOM der Probe Alb5 aus Molekülen mit kleineren hydrodynamischen Radien besteht als die der Probe HO (Abb. 4.13 c). Bei der Ultrafiltration der Probe Alb5 werden niedermolekulare Bestandteile aus der Probe entfernt und im Permeat gesammelt (46 % des DOC). Das Konzentrat unterscheidet sich daher in seiner Molekülgrößenverteilung deutlich vom Original. Die Abnahme der  $SUVA$ -Werte bei der Probe Alb5 ( $SUVA_{254}$ : 24 %;  $SUVA_{436}$ : 11 % Abnahme) wird durch den Verlust an DOM mit  $SUVA_{254} > 2,10$  bzw.

$SUVA_{436} > 0,19$  L/(m mg) verursacht. Im Gegensatz zur Probe HO21 kommt es bei Alb5 durch die Ultrafiltration zu einer starken Veränderung der Probenzusammensetzung. Damit stehen auch für die weitere Fraktionierung bei beiden Proben unterschiedliche Ausgangsproben zur Verfügung.



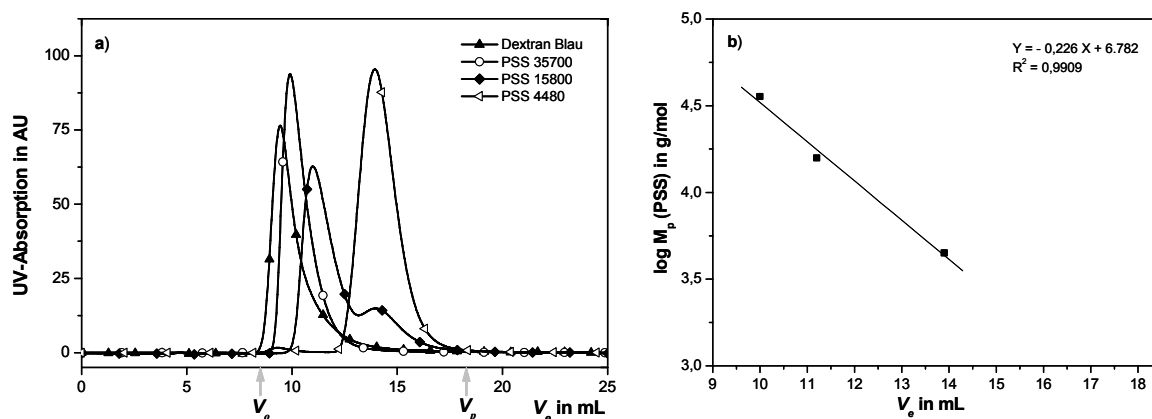
**Abb. 4.14:** SEC-Chromatogramme der Originalproben, UF-Konzentrate (1000 g/mol) und -Permeate von HO21 und Alb5. Analytisches SEC-System, TSK HW 50-(S)-Säule, Eluent 1, DOC-Detektion. Proben gepuffert.

## 4.4 Vergleich der Fraktionierungsmethoden SEC und mst-UF

Vor der Verwendung der SEC und mehrstufigen Ultrafiltration als Methoden zur präparativen Fraktionierung von gelöster organischer Substanz sollte ein Vergleich der beiden Verfahren vorgenommen werden. Als Grundlage für den Vergleich wurden die Reproduzierbarkeit und der DOM-Eintrag beider Methoden ermittelt. Des Weiteren wurde eine Kalibrierung unter Verwendung von Molmassenstandards durchgeführt. Die Kalibrierung diente zum einen der Überprüfung der Trennleistung der Methoden. Auf Grundlage der Kalibrierdaten wurden zum anderen Fraktionierungsgrenzen zur Herstellung sogenannter Standardfraktionen festgelegt (SEC-Fraktionierung, Kap. 4.4.4). Die Proben HO12 K a und Alb5 wurden sodann entsprechend der festgelegten Grenzen bzw. unter Verwendung der kalibrierten UF-Membranen je ein Mal mit SEC und mst-UF fraktioniert (Fraktionierung Nr. I, Tab. 3.1). Die Molekülgrößenverteilung der SEC- und mst-UF-Standardfraktionen beider Proben wurden mit Hilfe der asymmetrischen Fluss Feld-Fluss-Fraktionierung untersucht.

### 4.4.1 Kalibrierung mit Molmassenstandards

Beide Fraktionierungsmethoden wurden hinsichtlich ihrer Trennleistung in Bezug auf Molmassenstandards überprüft. Als Standardsubstanzen wurden Polystyrolsulfonate (PSS) mit Molmassen zwischen  $M_p = 148000$  g/mol und 1100 g/mol ( $M_p$ : Molmasse am Peakmaximum) verwendet. Mit den beiden für die SEC-Fraktionierung verwendeten Säulen (Superdex und TSK HW 50-(S)) war eine Trennung der PSS-Standards im Molmassenbereich zwischen 35700 g/mol und 4480 g/mol möglich (Abb. 4.15, Anhang D). Der PSS-Standard mit  $M_p = 1100$  g/mol ergab im SEC-Chromatogramm einen Doppelpeak und konnte daher für die Kalibrierung nicht verwendet werden. Die gleiche Beobachtung wurde auch von ZHOU ET AL. (2000) und ZHANG UND MINEAR (2002) gemacht. Die Kalibrierung der Superdex-Säule, welche über einen Zeitraum von etwa 2 Jahren verwendet wurde, wurde in regelmäßigen Abständen überprüft. Die  $V_e$ -Werte der PSS-Standards blieben über diese Zeit konstant.



**Abb. 4.15:** a) SEC-Chromatogramme von Dextran Blau, PSS35700, PSS15800 und PSS4480. Präparatives SEC-System, Superdex-Säule, Eluent 1, UV<sub>224</sub>-Detektion. b) Zugehörige Kalibriergerade.

Mit den für die mst-UF-Fraktionierung verwendeten Membranen konnten über 90 % des jeweiligen PSS-Standards im Konzentrat zurückgehalten werden (Tab. 4.10, Massenbilanz). Polystyrol-sulfonate gelten aufgrund ihrer aromatischen Struktur sowie ihrer negativen Ladung als bedingt geeignete Molmassenstandards für Huminstoffe (CHIN ET AL. 1994, PERMINOVA ET AL. 1998). Es wurde daher angenommen, dass mit den verwendeten Trennmaterialien (SEC-Säule, UF-Membranen) sowie unter den gewählten experimentellen Bedingungen (Pufferkonzentration und pH-Wert) auch für HS eine Größentrennung erreicht werden kann.

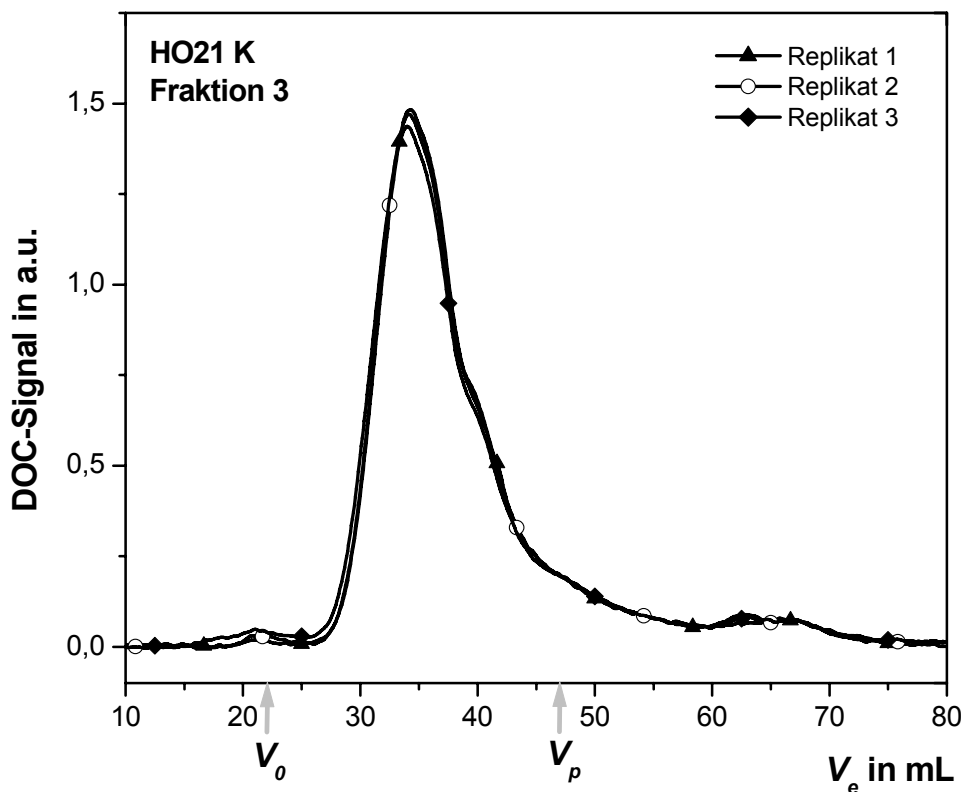
**Tab. 4.10:** Wiederfindungen der PSS-Standards in UF-Konzentraten (Massenbilanz; Angaben: MW  $\pm$  s für  $n = 3$ ; YM1-Membran:  $n = 1$ . k. a.: keine Angabe).

Membran	$M_p$ (PSS) in g/mol	Anteil im Konzentrat in %
YM30	35700	90 $\pm$ 7
YM10	15800	100 $\pm$ 2
YM3	4480	100 $\pm$ 2
YM1	1100	90 $\pm$ k. a.

#### 4.4.2 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der SEC-Fraktionierung wurde durch Ermittlung der Variationskoeffizienten (VK) der  $V_e$ -Werte und Peakflächen von PSS-Standards sowie der Braunwasserprobe nach Mehrfachinjektion am präparativen System bestimmt. Die Mehrfachinjektion des PSS-Standards mit  $M_p = 15800$  g/mol ergab ein mittleres Elutionsvolumen von  $28,9 \pm 0,1$  mL ( $n = 6$ ,  $MW \pm 1$  s;  $VK = 0,5$  %) und eine mittlere Peakfläche von  $780 \pm 10$  FE ( $VK = 1,5$  %). Für die Braunwasserprobe waren die VK der Elutionsvolumina der Peaks 1 bis 3 (Abb. 4.17) kleiner als 1 % ( $n = 8$ , Superdex-Säule). Die VK der Peakflächen lagen zwischen 1 und 10 %. Die SEC-Trennung zeichnete sich durch eine hervorragende Reproduzierbarkeit aus.

Die Reproduzierbarkeit der mehrstufigen UF wurde anhand der Molekülgrößenverteilungen der Replikate einer bestimmten Größenfraktion beurteilt. In den analytischen SEC-Chromatogrammen der Fraktion 3 der Probe HO21 K ist eine ausgezeichnete Übereinstimmung der drei Replikate erkennbar (Abb. 4.16). Dies zeigt, dass auch diese Fraktionierungsmethode eine sehr gute Reproduzierbarkeit aufweist.



**Abb. 4.16:** SEC-Chromatogramme der drei Replikate von Fraktion 3 der Braunwasserprobe HO21 K. Analytisches SEC-System, TSK HW 50-(S)-Säule, Eluent 1, DOC-Detektion. Proben gepuffert.

#### 4.4.3 DOC-Eintrag

Ein Eintrag von organischem Fremdmaterial in die DOM-Probe kann bei Fraktionierungsverfahren nicht vollständig vermieden werden. UF-Membranen sowie die verwendeten SEC-Polymerphasen bestehen aus organischen Materialien, die DOC an die Probe abgeben und diese kontaminieren können. Eine weitere DOC-Quelle stellen die zur Reinigung der Anlagen und Herstellung von SEC-Eluent verwendeten Wässer (entmineralisiertes Wasser, Reinstwasser) dar. Eine Abschätzung dieses Eintrags wurde durch Fraktionierung von Nullproben (entmineralisiertes Wasser) und DOC-Bestimmung in den erhaltenen Fraktionen sowie -Bilanzierung vorgenommen. Der DOC-Gehalt des für die SEC-Fraktionierung verwendeten Eluenten wurde regelmäßig überprüft. Als repräsentativer Wert kann ein DOC von 0,1 mg/L angegeben werden. Bei Fraktionierung Nr. I (Tab. 3.2) kommt es damit bei 80 Injektionen zu einem theoretischen DOC-Eintrag von etwa 0,08 mg durch den Puffer. Der durch Fraktionierung der Nullprobe experimentell bestimmte DOC-Eintrag betrug für das gleiche Volumen etwa 0,16 mg. Die Differenz kann durch zusätzlichen Eintrag z. B. aus Säulenmaterial verursacht werden. Bei der Fraktionierung einer Nullprobe mit der mehrstufigen Ultrafiltration wurde ein DOC-Eintrag von etwa 2 mg je Fraktionierung ermittelt (Anreicherung und Fraktionierung, 4 Membranen, siehe Verfahrensschema in Abb. 3.1). Durch die Fraktionierung wird folglich nur ein sehr geringer Eintrag von organischem Material in die Probe verursacht (DOC-Anteil < 5 %).

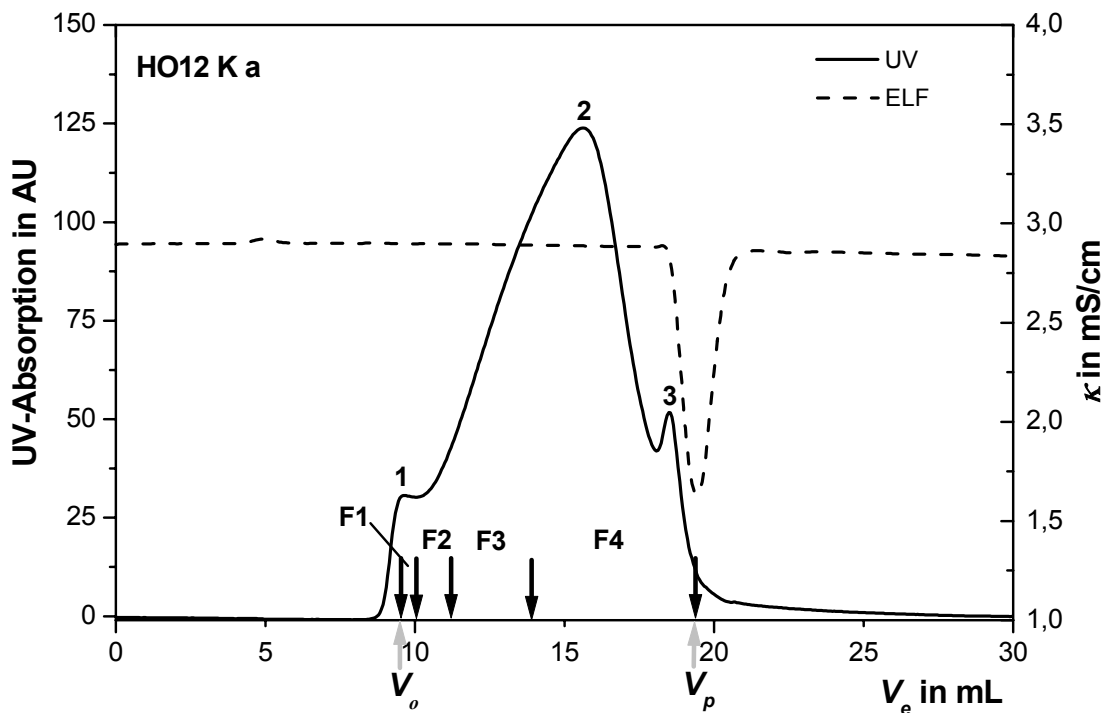
#### 4.4.4 Fraktionierung der Proben HO12 K a und Alb5 K

Ein Vergleich der beiden Fraktionierungsmethoden wurde anhand der Fraktionierung der UF-Konzentrate HO12 K a und Alb5 K vorgenommen (Tab. 4.11). Die Elutionsbereiche der SEC-Fraktionen wurden anhand der  $V_e$ -Werte der PSS-Standards festgelegt (vgl. Abb. 4.15 a), welche auch zur Überprüfung der UF-Membranen eingesetzt worden waren. Die 4 Fraktionen wurden in den folgenden  $V_e$ -Bereichen gesammelt: F1 von 9,5 mL bis 10 mL ( $V_0$  bis  $V_e(\text{PSS35})$ ), F2 von 10 mL bis 11,2 mL, F3 von 11,2 mL bis 13,9 mL und F4 von 13,9 mL bis 19,4 mL (Abb. 4.17).

Durch die Kalibrierung beider Fraktionierungsverfahren mit den gleichen Molmassenstandards sollte ein Abgleich der beiden Methoden durchgeführt werden, um die damit hergestellten Fraktionen auf der Basis gleicher nomineller Molmassenbereiche vergleichen zu können. Die Fraktionierung mit mst-UF wurde entsprechend des in Abbildung 3.1 gezeigten Schemas durchgeführt. Der Methodenvergleich wird im Folgenden exemplarisch anhand der Probe HO12 K a vorgenommen. Die Daten zur Probe Alb5 K sind in Anhang G dargestellt.

**Tab. 4.11:** Basisparameter der UF-Konzentrate HO12 K a und Alb5 K (Alb5: Probenahme Dezember 2000). <sup>1</sup>: Nach Verdünnen mit Reinstwasser. DOC-Angaben: MW  $\pm$  1 s für  $n = 2$ .

Probe	DOC in mg/L	$\kappa$ in $\mu\text{S}/\text{cm}$ (25 °C)	pH- Wert (25 °C)	$a_{254}$ in 1/m	$a_{436}$ in 1/m
HO12 K a <sup>1</sup>	25,20 $\pm$ 0,19	24	3,7	139	15
Alb5 K	28,50 $\pm$ 0,13	1100	8,1	44	5



**Abb. 4.17:** SEC-Chromatogramm der Probe HO12 K a mit Fraktionierungsgrenzen. Präparatives SEC-System, Superdex-Säule, Eluent 1, UV<sub>254</sub>-Detektion. Ungepufferte Probe.

#### 4.4.4.1 DOC-Konzentration der Fraktionen

Bezüglich der DOC-Gehalte der Fraktionen unterscheiden sich die beiden Methoden deutlich (Tab. 4.12). Mit der mst-UF konnten bis zu 200-fach höhere DOC-Konzentrationen für einzelne Fraktionen der gleichen Probe erreicht werden als mit der SEC. Bei der UF findet eine weitere Anreicherung der Probe statt, während es bei der SEC wegen der Zugabe des Eluenten zu einer Verdünnung kommt. Da für die physikochemische Probencharakterisierung gewisse Mindestmengen bzw. -konzentrationen an Probensubstanz benötigt werden, ist die Fraktionierung mittels UF in dieser Hinsicht von Vorteil.



**Tab. 4.12:** DOC-Gehalte der SEC- und UF-Fractionen der Braunwasserprobe HO12 K a. DOC-Angaben: MW  $\pm$  1s für  $n = 2$ .

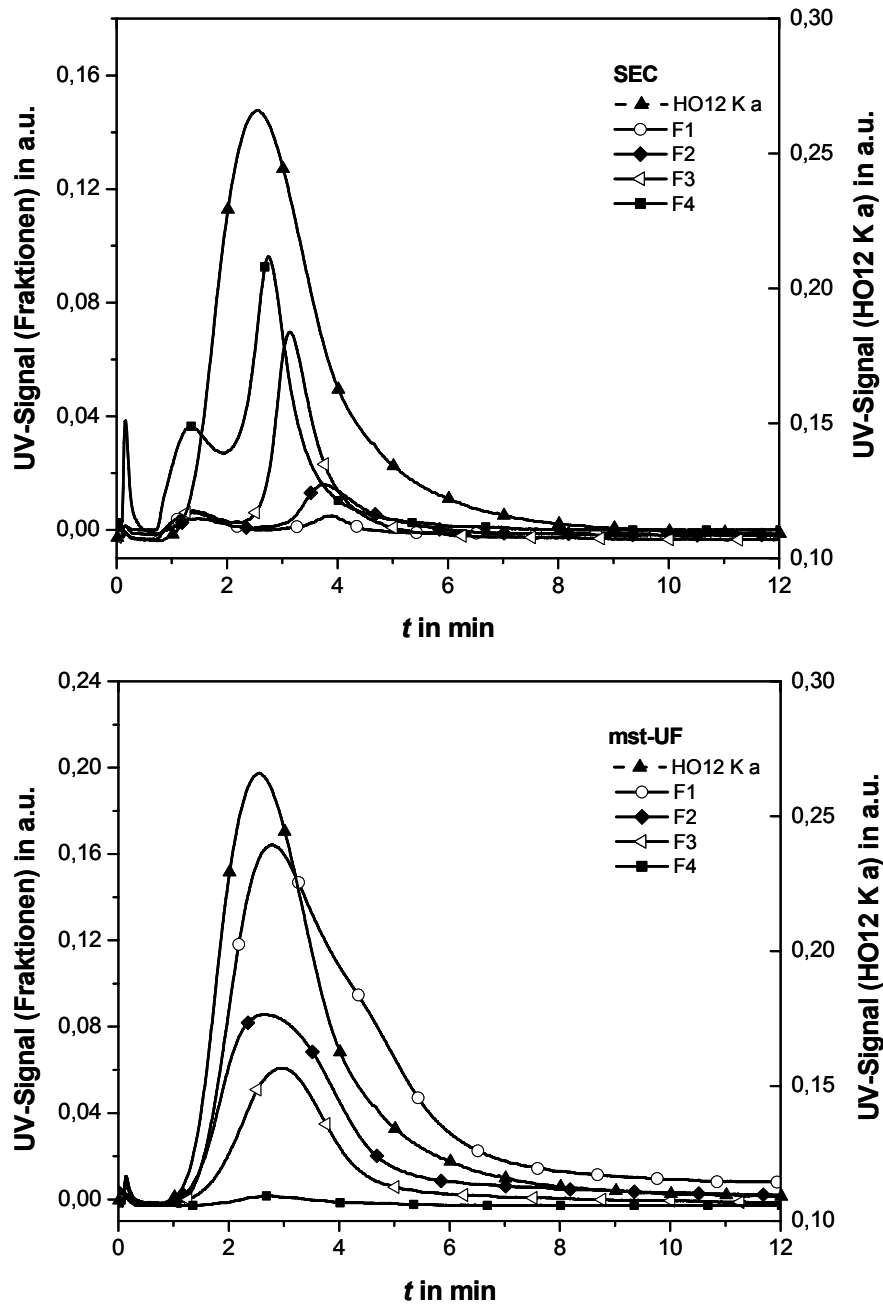
Probe	SEC-Fractionen	mst-UF-Fractionen
	DOC in mg/L	DOC in mg/L
HO12 K a	25,20 $\pm$ 0,19	25,20 $\pm$ 0,19
F1	0,72 $\pm$ 0,01	131,60 $\pm$ 0,39
F2	0,87 $\pm$ 0,01	22,81 $\pm$ 0,03
F3	0,89 $\pm$ 0,02	4,64 $\pm$ 0,01
F4	1,81 $\pm$ 0,01	0,39 $\pm$ 0,01

#### 4.4.4.2 Molekülgrößenverteilung der Fraktionen

##### 4.4.4.2.1 Asymmetrische Fluss Feld-Fluss-Fraktionierung

Die Molekülgrößenverteilung des SEC- und mst-UF-Fractionen wurde mit Hilfe der AF<sup>4</sup> untersucht. Die Fraktogramme der SEC-Fractionen zeigen schmale Peaks, deren Maxima bei unterschiedlichen Elutionszeiten auftreten (Abb. 4.18). Mit der SEC-Methode konnte folglich eine Größenfraktionierung erreicht werden. Im Fraktogramm von F4 sind zwei Maxima erkennbar. In dieser Fraktion ist unter anderem der sogenannte Salzpeak enthalten (Peak 3 in Abb. 4.17). Das Auftreten dieses Peaks beruht nicht auf Größenausschlussmechanismen. Die SEC-Methode liefert daher in diesem Elutionsbereich keine einheitliche Größenfraktion. In den Fraktogrammen der mst-UF-Fractionen traten für alle Fraktionen breite Peaks auf. Eine Auftrennung der DOM der 4 Fraktionen konnte mit der AF<sup>4</sup> nicht nachgewiesen werden.

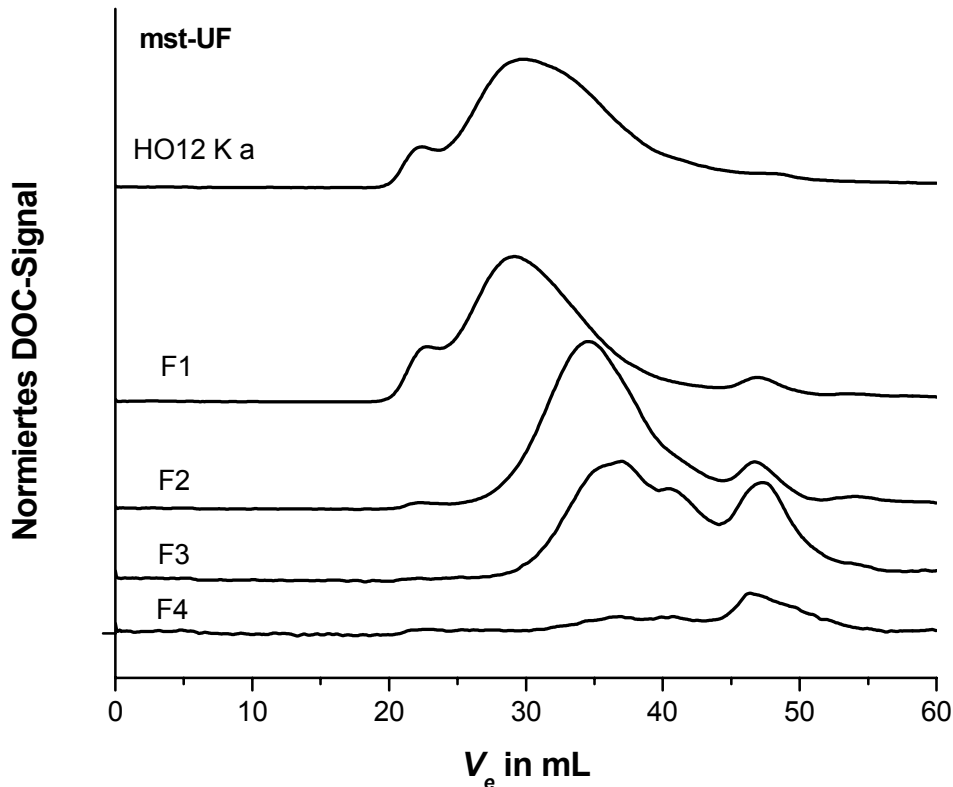
Anhand der Ergebnisse der AF<sup>4</sup>-Analytik wird deutlich, dass sich die SEC- und mst-UF-Fractionen der Probe HO12 K a in ihren Molekülgrößenverteilungen unterscheiden. Dies gilt auch für die Fraktionen der Probe Alb5 K (Anhang G). Für die SEC-Fractionen konnte im Vergleich zur Originalprobe eine Verringerung der Polydispersität erreicht werden. Die mst-UF-Fractionen weisen dagegen breite Molekülgrößenverteilungen auf. Um festzustellen, ob sich die mst-UF-Fractionen in ihren Molekülgrößenverteilungen unterscheiden, wurden diese zusätzlich mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie analysiert.



**Abb. 4.18:** AF<sup>4</sup>-Fraktogramme der HO12 K a SEC- und mst-UF-Fractionen. SEC-Fractionen: UV-Detektion bei 203 nm, mst-UF-Fractionen: UV-Detektion bei 254 nm.

#### 4.4.4.2.2 Analytische SEC

Die SEC-Chromatogramme zeigen im Gegensatz zu den AF<sup>4</sup>-Fraktogrammen Unterschiede in den Molekülgrößenverteilungen der mst-UF-Fractionen der Probe HO12 K a auf (Abb. 4.19). Mit ansteigender Fraktionsnummer findet eine Verschiebung der Chromatogramme zu größeren Elutionsvolumina und damit kleineren hydrodynamischen Radien statt.



**Abb. 4.19:** SEC-Chromatogramme der mst-UF-Fractionen von HO12 K a. Analytisches SEC-System, TSK HW 50-(S)-Säule, Eluent 1, DOC-Detektion. Proben mit Puffer verdünnt.

Fraktion 1 weist jedoch eine ähnlich breite Molekülgrößenverteilung wie die Ausgangsprobe HO12 K a auf und enthält auch niedermolekulare Bestandteile. Dies ist unter anderem auf die Ultrafiltration im Konzentrationsmodus zurückzuführen. Hierbei werden niedermolekulare Bestandteile im Gegensatz zur Diafiltration nicht durch Rückverdünnen des Konzentrats während der Filtration ausgewaschen, sondern sind bei Filtrationsende noch zu einem gewissen Anteil im Konzentrat enthalten. Darüber hinaus ist bekannt, dass bei der UF von Huminstoffen auch Moleküle zurückgehalten werden können, deren Molmassen unterhalb des für die jeweilige Membran angegebenen MWCO liegen. Dieser Effekt wird auf unspezifische Wechselwirkungen zwischen Probe und Membran zurückgeführt (AIKEN 1984, CAI 1999, PELEKANI ET AL. 1999, EGEBERG ET AL. 2002). Die möglichen Ursachen dieses Sachverhaltes werden in Kapitel 4.5.2 diskutiert. BECHER ET AL. (1985) und PELEKANI ET AL. (1999) verwendeten ebenfalls die analytische SEC, um die Polydispersität der Ultrafiltrationsfraktionen verschiedener Oberflächengewässer zu untersuchen. Beide Autoren stellten fest, dass die UF-Fractionen breite Molekülgrößenverteilungen besaßen, wobei in den SEC-Chromatogrammen verschiedener Fraktionen teilweise Überlappungen erkennbar waren. PELEKANI ET AL. (1999) erklärten dies damit, dass bei

der UF-Fraktionierung wegen der Porengrößenverteilung von UF-Membranen keine scharfe Auftrennung der Bestandteile polydisperser Gemische möglich sei.

Als quantitatives Maß für die Breite von Molekülgrößenverteilungen können Polydispersitätswerte herangezogen werden. Für die mst-UF-Fractionen der Proben HO12 K a und HO21 K (siehe Kapitel 4.5.2) wurden die Polydispersitätswerte nach Molmassenkalibrierung der SEC-Trennsäulen und SEC-Analyse der Proben bestimmt.

**Tab. 4.13:** Polydispersitätswerte der mst-UF-Fractionen von HO12 K a und HO21 K. n. v.: nicht vorhanden. Werte berechnet mit Kalibrierdaten der TSK HW 50-(S)-Säule des analytischen Systems LC-UV/OCD (Anhang D).

Probe	HO12 K a	HO21 K
	Fraktionierung Nr. I	Fraktionierung Nr. V
Ausgangssprobe (Konzentrat)	1,75	1,88
Fraktion 1	1,76	1,78
Fraktion 2	1,49	1,51
Fraktion 3	1,45	1,39
Fraktion 4	1,87	1,34
Fraktion 5	n. v.	1,72

Die Ausgangssproben für die jeweilige Fraktionierung (Originalproben) weisen mit  $P$ -Werten um 1,8 die höchsten Werte auf (Tab. 4.13). Makromolekulare Polymerlösungen mit  $P > 2$  gelten allgemein als extrem polydispers (SWIFT 1985, WERSHAW UND AIKEN 1985). Für unfraktionierte aquatische Huminstoffe werden in der Literatur Werte zwischen 1,73 und 3,06 angegeben (PERMINOVA ET AL. 2003). Die Polydispersitätswerte der Fraktionen F4 (HO12 K a) und F5 (HO21 K) waren aufgrund der geringen DOC-Gehalte der Fraktionen nicht mehr zuverlässig bestimmbar. Für die Fraktionen F1 bis F3 bzw. F1 bis F4 ist eine Abnahme der Polydispersität mit ansteigender Fraktionsnummer zu erkennen. Auch durch mst-UF-Fraktionierung kann folglich eine Größenfraktionierung und Verringerung der Polydispersität der Ausgangssprobe erreicht werden. Aus dem Ergebnis, dass beide Methoden zur Herstellung von Fraktionen unterschiedlicher Molekülgröße und Molekülgrößenverteilungen geeignet sind, kann gefolgert werden, dass die Trennung bei beiden Methoden überwiegend auf Grundlage der hydrodynamischen Radien

der DOM-Bestandteile erfolgt. Eine Beeinträchtigung durch unspezifische Wechselwirkungen zwischen DOM und Trennmaterial kann auf Grundlage dieser Untersuchungen jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Aus verschiedenen Gründen (Porengrößenverteilung der Membranen, fehlende Verfügbarkeit an Membranen mit unterschiedlichen MWCO, Abhängigkeit der Trennleistung vom Filtrationsmodus, Deckschichtbildung, unspezifische Wechselwirkungen) ist die Trennleistung der mst-UF der der SEC unterlegen. Aufgrund der unterschiedlichen Molekülgrößenverteilungen der SEC- und mst-UF-Fractionen repräsentieren diese jeweils andere Ausschnitte aus der fraktionierten Probe. Aus diesem Grund können die beiden Fraktionen nur im Hinblick auf übereinstimmende Trends der physikochemischen Eigenschaften als Funktion der Molekülgröße verglichen werden.

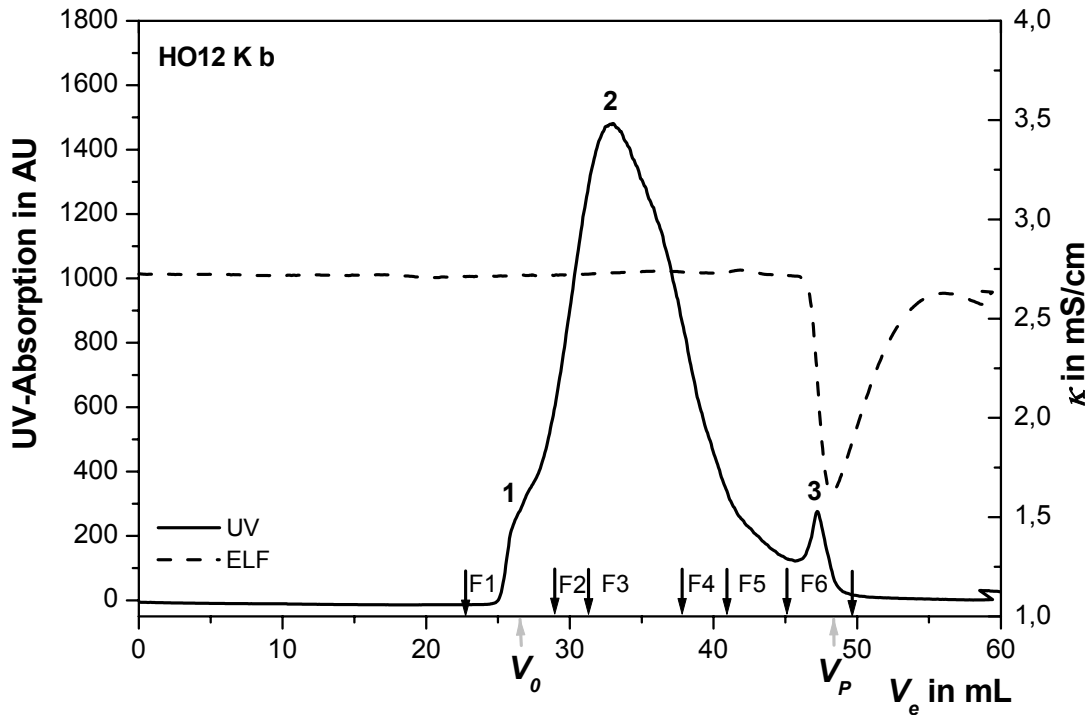
#### **4.5 Fraktionierung gelöster organischer Substanz natürlichen Ursprungs (HO)**

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die strukturelle Charakterisierung von Fraktionen der Braunwasserprobe aus dem Hohlohsee. In Ergänzung zu früheren Arbeiten (LANKES 2001, FRIMMEL ET AL. 2002) wurde die Size Exclusion Chromatography als Methode zur präparativen Fraktionierung eingesetzt. Des Weiteren wurde die mehrstufige Ultrafiltration zur Fraktionierung der DOM verwandt. Die Aufklärung der chemischen Strukturen der Fraktionen erfolgte mit Hilfe der  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektroskopie. Die Strukturinformationen sollten weiterhin zur Bewertung der Bedeutung unspezifischer Wechselwirkungen bei der SEC bzw. mst-UF der Braunwasser-DOM herangezogen werden. Als Grundlage für diese Verwendung diente die Überlegung, dass übereinstimmende strukturelle Eigenschaften der SEC- und mst-UF-Fractionen als Beleg für eine Trennung dient, die überwiegend auf Größenausschlussmechanismen beruht. Aufgrund der Komplexität von Huminstofflösungen sowie der in Kapitel 4.4 geschilderten qualitativen Unterschiede zwischen SEC- und mst-UF-Fraktion können dabei übereinstimmende Trends bereits als ausreichender Nachweis angesehen werden. Aus den NMR-Strukturdaten können weitere Hinweise auf die Molekülgröße der DOM erhalten werden (s. Kap. 2.4.4). Dieser Sachverhalt kann ebenfalls für die Bewertung genutzt werden.

##### **4.5.1 Fraktionierung mittels SEC (Probe HO12 K b)**

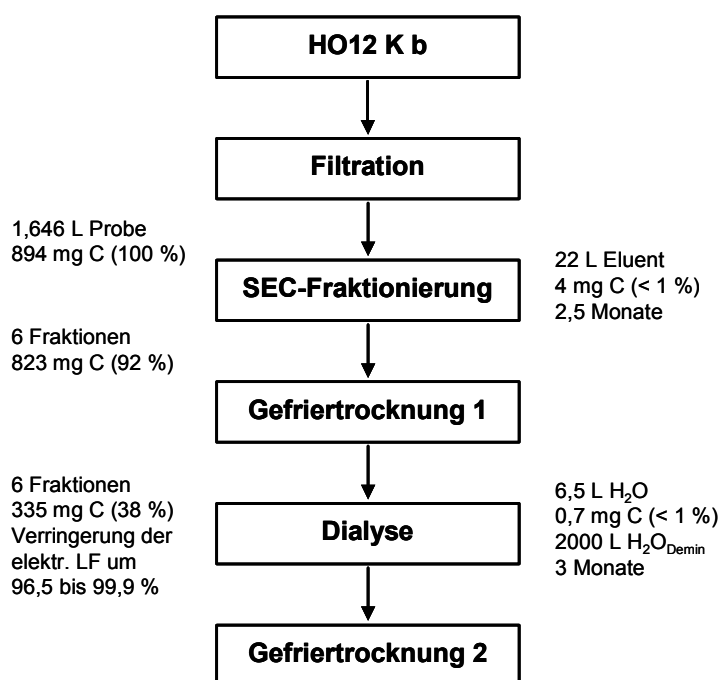
Die SEC-Fraktionierung der Probe HO12 K b wurde im Jahr 2002 nach Lagerung und erneuter Filtration der Probe durchgeführt. Durch die Lagerung und Filtration der angereicherten Probe kam es zu einer Abreicherung von Kohlenhydraten sowie zu einer Anreicherung von carboxylischen Strukturen und verzweigten Aliphaten (siehe Kap. 4.1.1). Die Ausgangsprobe für diese

Fraktionierung unterscheidet sich damit in ihrer Zusammensetzung und Molekülgrößenverteilung von der angereicherten Probe (HO12 K) und der Originalprobe (HO). Aus der Probe HO12 K b wurden 6 Fraktionen hergestellt (Abb. 4.20). Die Ionenstärke der Probe wurde bewusst nicht an die des Eluenten angeglichen, da der Salzpeak (Peak 3) als eigenständige Fraktion gesammelt werden sollte.



**Abb. 4.20:** SEC-Chromatogramm der Probe HO12 K b mit Fraktionierungsgrenzen. Präparatives System, TSK HW 50-(S)-Säule, Eluent 2, UV<sub>254</sub>-Detektion. Ungepufferte Probe.

Die gesamte Fraktionierung dauerte etwa zweieinhalb Monate (Abb. 4.21). Während dieses Zeitraums wurden die bereits hergestellten Fraktionen in Glasflaschen gesammelt und bei 12 °C im Dunkeln gelagert. Es wurden keine Ausflockungen oder Trübungen in den Fraktionen beobachtet. Nach Beenden der Fraktionierung wurden 30 mL-Aliquote der Fraktionen für spätere Untersuchungen in Glasflaschen abgefüllt, während das restliche Fraktionsvolumen der weiteren Probenvorbereitung und -analyse zugeführt wurde. Von den Fraktionen vor Dialyse wurden vor und nach einer Lagerung für 8 Monate die Molekülgrößenverteilungen analysiert sowie die *SUVA*-Werte bestimmt. Mit Ausnahme der *SUVA*-Werte der Fraktion 2 (siehe Abb. 4.26) kam es dabei zu keiner signifikanten Änderung der Probeneigenschaften. Die Stabilität der SEC-Fraktionen ist somit auch über den bereits untersuchten Zeitraum von 5 Wochen hinaus gegeben (vergleiche Kap. 4.1.2).



**Abb. 4.21:** Arbeitsschritte bei der Herstellung der SEC-Fractionen der Probe HO12 K b.

#### 4.5.1.1 Molekülgrößenverteilung und Basisparameter der Fraktionen

Die pH-Werte und die ELF der Fraktionen F1 bis F5 entsprechen denen des Eluenten (Phosphatpuffer, Tab. 4.14). Bei der SEC-Trennung kommt es zu einem Lösemittelwechsel der bei  $V_e < V_p$  eluierenden Probenbestandteile. Diese liegen nach der Elution in Puffer gelöst vor. Die Lösemittelmoleküle der Probe (Wasser) eluieren erst am Permeationsvolumen. Dies hat eine niedrigere Leitfähigkeit in Fraktion 6 zur Folge.

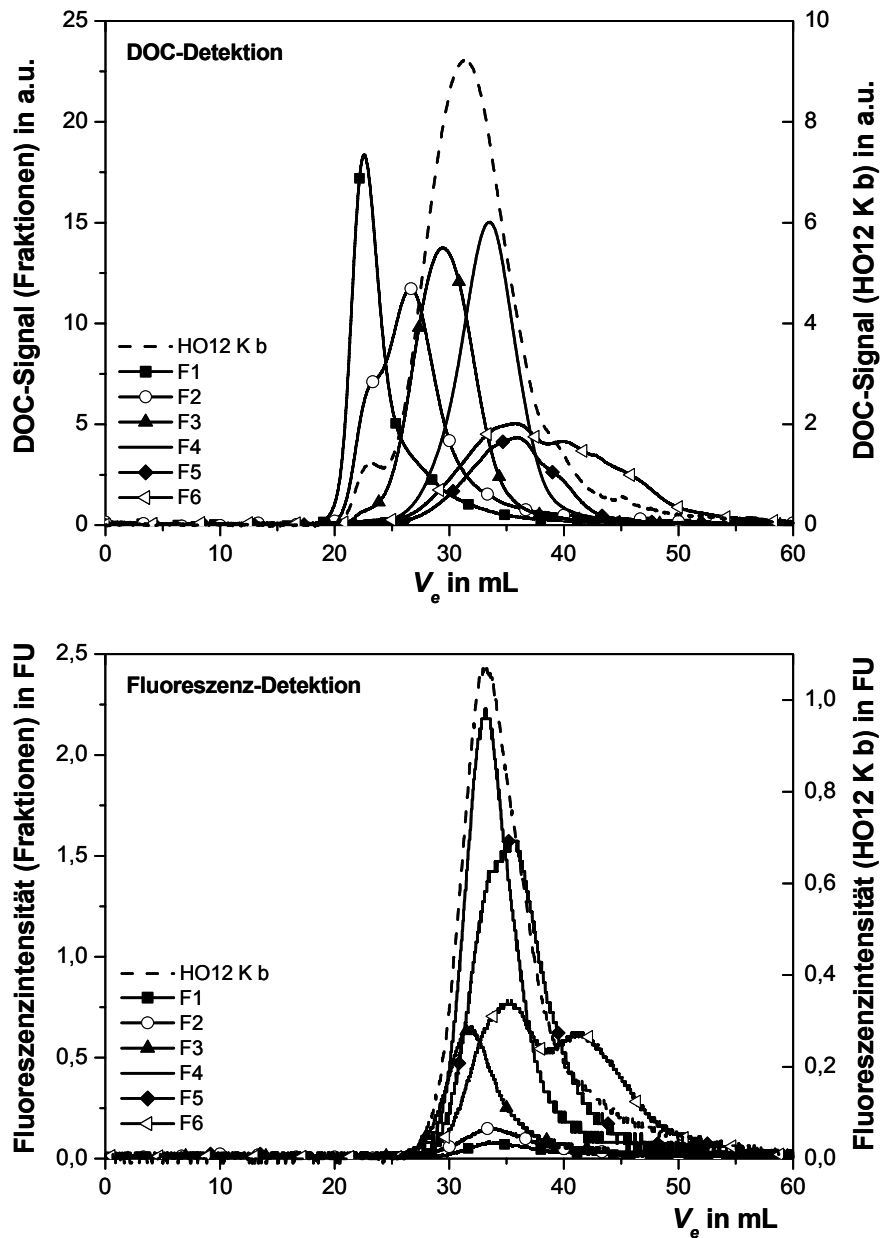
**Tab. 4.14:** Volumina, ELF und pH-Wert der Probe HO12 K b und der SEC-Fractionen.

Probe	Volumen in L	$\kappa$ in mS/cm (25 °C)	pH-Wert (12 °C)
HO12 K b	1,646	0,36	3,43
F1	4,691	2,90	6,72
F2	2,140	2,90	6,72
F3	5,103	2,91	6,71
F4	2,881	2,90	6,72
F5	3,704	2,91	6,72
F6	3,292	2,61	6,75
Eluent	-	2,90	6,72

Die mittels DOC- und Fluoreszenzdetektion aufgenommenen Chromatogramme der Fraktionen vor der Entsalzung mittels Dialyse sind in Abbildung 4.22 gezeigt. Für Fraktion 1 wurde im SEC-Chromatogramm mit DOC-Detektion ein schmaler, scharfer Peak erhalten. Die in F1 enthaltene DOM entspricht der im Chromatogramm der Ausgangsprobe als Peak 1 bezeichneten organischen Substanz (Abb. 4.20). Ein Teil der DOM dieses Elutionsbereichs (Peak 1) ist als vorgelagerter Peak in Fraktion 2 zu erkennen (DOC-Detektion). Fraktion 2 enthält DOM aus Peak 1 und Peak 3 und stellt folglich ein Gemisch dar. Fraktion 6 ergibt einen breiten Doppelpeak, der zum Großteil vor dem Permeationsvolumen eluiert. Das Elutionsverhalten der in Fraktion 6 enthaltenen Moleküle ist insofern bemerkenswert, als diese im Gegensatz zur DOM der anderen Fraktionen bei der Reinjektion ein anderes Elutionsverhalten zeigen als während der Fraktionierung. Die Aufklärung der chemischen Strukturen dieser Fraktion ist daher für das Verständnis der der SEC-Trennung zugrundeliegenden Vorgänge von Interesse.

Die DOM der Fraktionen F1 und F2 zeigt eine sehr geringe Fluoreszenzintensität und ist mittels Fluoreszenzmessung im SEC-Chromatogramm nur schlecht detektierbar. Diese Beobachtung wurde bereits in früheren Arbeiten von FRIMMEL ET AL. (1992) und SPECHT (2002) gemacht. Die DOM der Fraktionen F3 bis F6 besitzt dagegen ein hohes Fluoreszenzvermögen. Das Maximum der Fluoreszenzintensität wurde in den Fraktionen F4 und F5 detektiert (größte Peakflächen bei gleicher DOC-Konzentration aller Fraktionen). In Fraktion 6 tritt der Doppelpeak gegenüber der DOC-Detektion deutlicher zutage. Auffällig ist sowohl für die Fraktionen als auch für die Originalprobe eine Verschiebung der Peakmaxima zu höheren Elutionsvolumina gegenüber der DOC-Detektion. Von der in der Braunwasserprobe enthaltenen DOM fluoresziert offensichtlich nur ein Teil der organischen Moleküle. Die Ergebnisse der SEC-Analyse zeigen, dass es sich hier überwiegend um Verbindungen mittlerer bis geringer Molekülgröße handelt. SPECHT ET AL. (2000) und SCHMITT (2002) beschrieben diese Eigenschaft der DOM des Hohlohsees bereits in einer früheren Arbeit. HER ET AL. (2003) berichteten, dass auch andere aquatische Huminstoffe diese Eigenschaft besitzen. Es ist bekannt, dass aquatische Fulvinsäuren ein stärkeres Fluoreszenzvermögen besitzen als die entsprechenden Huminsäuren (HAUTALA ET AL. 2000, KUMKE UND FRIMMEL 2002). Die Fulvinsäuren der Braunwasserprobe eluieren bei der SEC an TSK HW-Gelen bei größeren Elutionsvolumina als die Huminsäuren (ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002). Dies lässt vermuten, dass der Anteil der Fulvinsäuren mit ansteigender Fraktionsnummer zunimmt.





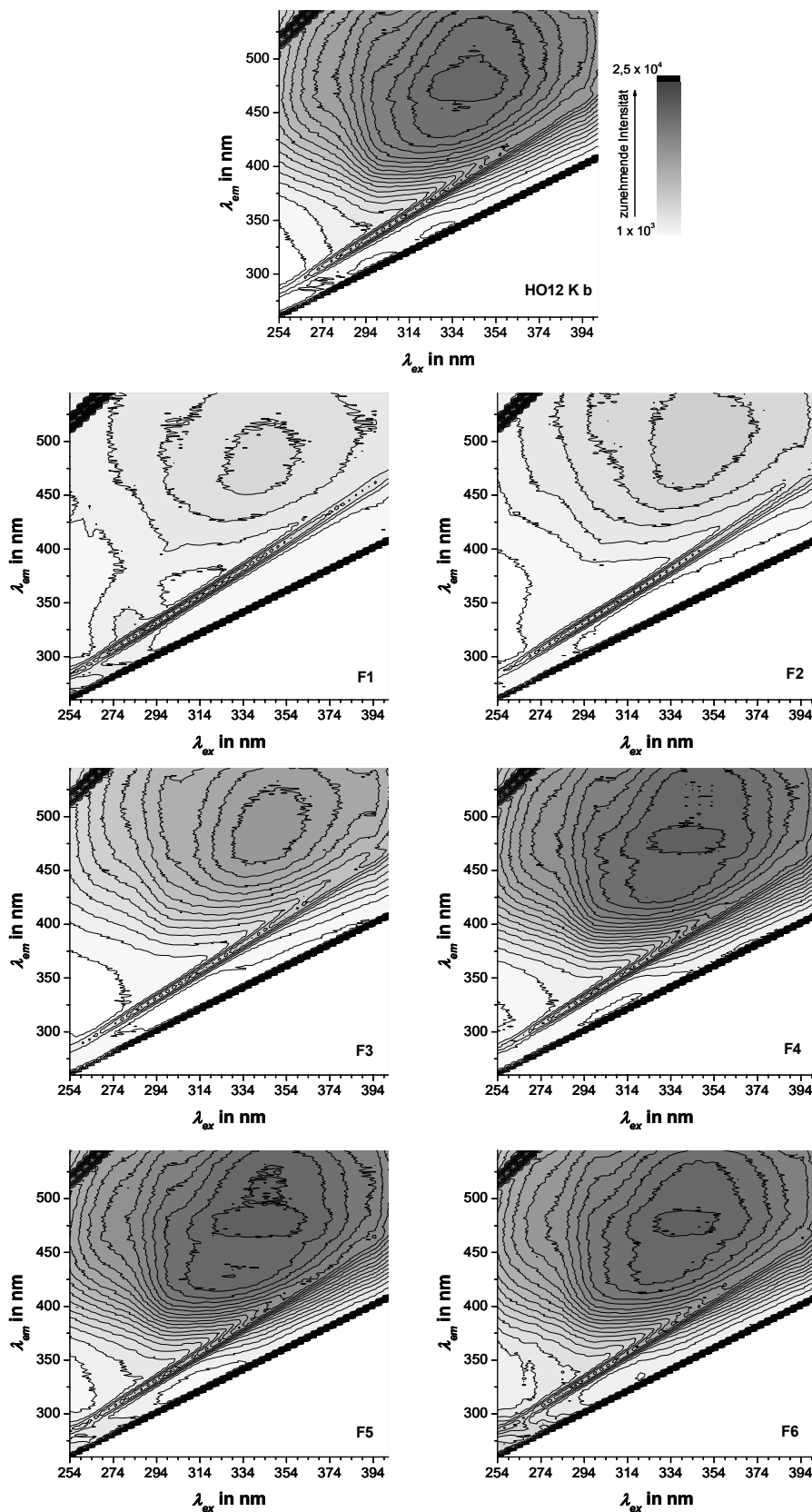
**Abb. 4.22:** SEC-Chromatogramme der Probe HO12 K b und der SEC-Fractionen vor Dialyse. Analytisches SEC-System nach SPECHT ET AL. (2000), TSK HW 50-(S)-Säule, Eluent 2, DOC- und Fluoreszenzdetektion ( $\lambda_{ex} = 254$  nm,  $\lambda_{em} = 430$  nm). Proben mit Puffer verdünnt, DOC = 10 mg/L.

Die Ergebnisse der *Offline*-Fluoreszenzdetektion geben weitere Aufschlüsse über die in der Braunwasserprobe vorhandenen Fluorophore. In den EEM der Probe HO12 K b ist ein Maximum bei einer Wellenlängenkombination von  $\lambda_{ex} \sim 340$  nm und  $\lambda_{em} \sim 480$  nm zu erkennen (Abb. 4.23). Anregungsmaxima zwischen 330 und 350 nm und Emissionsmaxima zwischen 420 und 480 nm gelten als charakteristisch für Huminstoffe (COBLE ET AL. 1996, MCKNIGHT ET AL. 2001, KUMKE UND FRIMMEL 2002, BAKER 2002). Dieses Maximum tritt in allen Fraktionen mit Ausnahme von Fraktion 2 auf. In Fraktion 2 ist eine Verschiebung der Lage des Emissions-

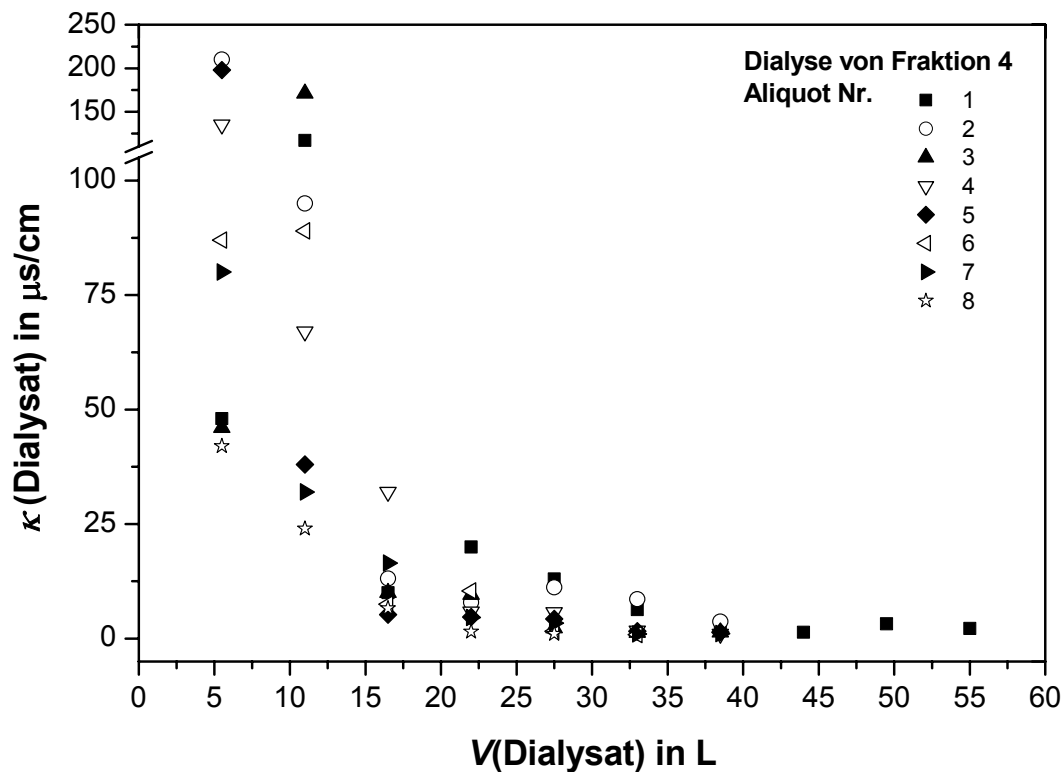
maximums zu 510 nm zu beobachten. In Fraktion 1 ist zusätzlich ein zweites Maximum bei einer Wellenlängenkombination von etwa 280 nm (Anregung) und 330 nm (Emission) zu erkennen. Diese Wellenlängenkombination gilt als charakteristisch für aromatische Aminosäuren wie Tyrosin und Tryptophan bzw. allgemein als charakteristisch für Proteine (COBLE ET AL. 1996). Die höchste Fluoreszenzintensität wurde in Fraktion 5 detektiert, während die Fluoreszenzintensität der Fraktionen F1 und F2 gering war. Die Ergebnisse der *Offline*-Messungen stimmen diesbezüglich mit denen der *Online*-Detektion bei der SEC-Analyse der Fraktionen überein. Das geringe Fluoreszenzvermögen sowie die niedrigen *SUVA*-Werte (Abb. 4.26) der Fraktion 1 weisen darauf hin, dass diese Fraktion einen geringeren Anteil an aromatischen Strukturen enthält als die DOM der Fraktionen F2 bis F6.

#### 4.5.1.2 Dialyse der SEC-Fraktionen

Vor der NMR-spektroskopischen Analyse wurde zur Abtrennung der anorganischen Salze des SEC-Eluenten ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) von der DOM eine Dialyse der Fraktionen gegen entmineralisiertes Wasser unter Verwendung eines Dialyseschlauches mit einer Trenngrenze von 500 g/mol durchgeführt. Zur Verringerung der Volumina der zu dialysierenden Fraktionen wurden diese zunächst gefriergetrocknet, dann bei Raumtemperatur in einem geringen Volumen an Reinstwasser wieder aufgelöst bzw. dispergiert und anschließend portionsweise dialysiert. Der Dialysevorgang wurde beendet, wenn die elektrische Leitfähigkeit des Dialysats einen Wert von etwa 1  $\mu\text{S}/\text{cm}$  erreicht hatte. Dies war bei einem Probenvolumen von ungefähr 50 mL und einem Dialysatvolumen von etwa 50 Litern nach 3 Tagen der Fall (Abb. 4.24). Durch die Dialyse konnten etwa 96 bis 99 % der in den Fraktionen enthaltenen Natriumhydrogenphosphatsalze abgetrennt werden (Bilanzierung über elektrische Leitfähigkeit, Tab. 4.15).



**Abb. 4.23:** EEM der Probe HO12 K b und der SEC-Fractionen F1 bis F6 vor Dialyse.  $\lambda_{ex} = 254$  bis  $401$  nm,  $\Delta = 3$  nm,  $\lambda_{ex} = 260$  bis  $545$  nm,  $\Delta = 1$  nm; spektrale Bandbreite  $3,6$  nm; Proben mit Puffer verdünnt, DOC =  $10$  mg/L.



**Abb. 4.24:** Abnahme der elektrischen Leitfähigkeit des Dialysats der Fraktion 4 als Funktion des Dialysatvolumens.

**Tab. 4.15:** Verringerung der elektrischen Leitfähigkeit durch die Dialyse.

Fraktion	$\kappa$ nach Dialyse in mS/cm (25 °C)	Verringerung der ELF in %
F1	0,011	99,9
F2	0,195	96,5
F3	0,063	99,4
F4	0,115	98,5
F5	0,033	99,8
F6	0,149	98,1

Vor der Dialyse waren in den 6 Fraktionen 92 % des DOC der Ausgangsprobe enthalten (Tabelle 4.16). Die Fraktionen F3 und F4 enthielten mit 40 % und 20 % den Grossteil der gelösten organischen Substanz der Probe HO12 K b. In den restlichen Fraktionen waren maximal je 12 % des DOC enthalten. Die SEC-Fraktionierung zeichnet sich durch eine sehr hohe Wiederfindung

aus. Dies gilt jedoch nicht für die Dialyse. Bei diesem Aufbereitungsschritt kam es zu einem beträchtlichen Verlust an gelöster organischer Substanz. Im Gegensatz zur Fraktionierung, bei der über 90 % des DOC der Ausgangsprobe wiedergewonnen werden konnten, waren in den 6 Fraktionen nach der Dialyse nur noch 38 % des DOC enthalten. Bei der Herstellung der SEC-Fraktionen für die NMR-spektroskopische Analyse stellt folglich trotz äußerst sorgfältiger Durchführung nicht die Fraktionierung, sondern die Probenvorbereitung (Gefriertrocknung, Auflösen, Dialyse) den kritischen Schritt dar. Aufgrund des hohen DOC-Verlustes bei der Dialyse stand nicht die gesamte, in den SEC-Fraktionen enthaltene DOM für die strukturelle Charakterisierung zur Verfügung. Von entscheidender Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Frage, ob durch die Dialyse ein strukturselektiver oder ein unselektiver Verlust an DOM verursacht wurde.

**Tab. 4.16:** DOC-Konzentrationen und DOC-Bilanz für SEC-Fraktionierung und Dialyse. DOC-Angaben: MW  $\pm$  1 s für  $n = 3$ . <sup>1</sup>: 100 % =  $m(\text{DOC})$  der Originalprobe; <sup>2</sup>: 100 % =  $m(\text{DOC})$  vor Dialyse.

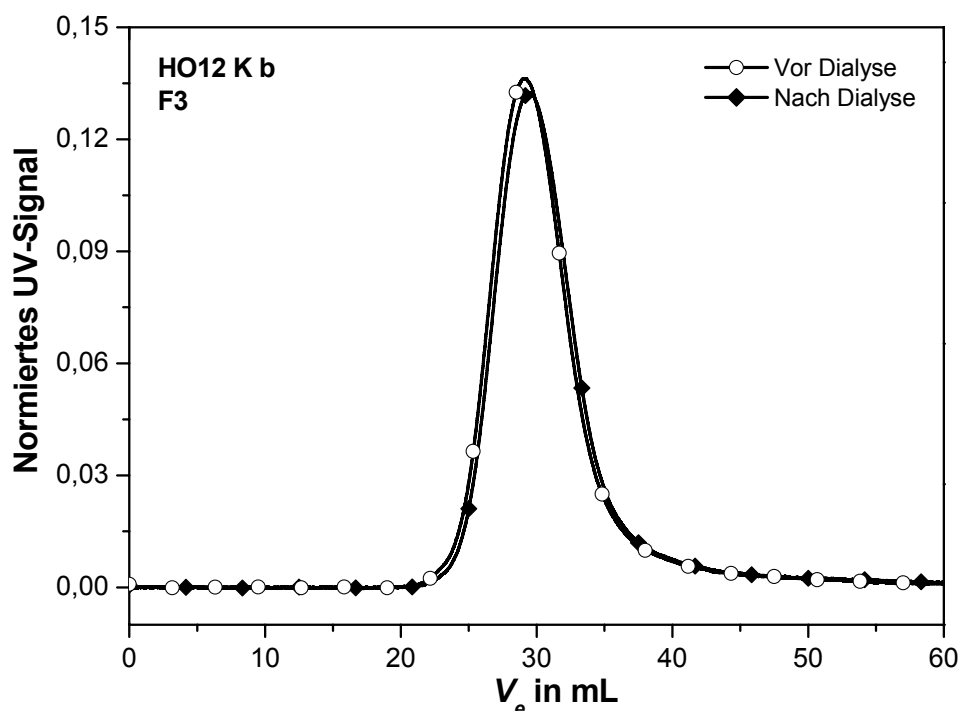
Probe	VOR Dialyse			NACH Dialyse			Verlust durch Dialyse
	DOC in mg/L	$m(\text{DOC})$ in mg	DOC-Anteil in % <sup>1</sup>	DOC in mg/L	$m(\text{DOC})$ in mg	DOC-Anteil in % <sup>1</sup>	DOC-Verlust in % <sup>2</sup>
HO12 K b	543	894	<b>100</b>	-	-	-	-
F1	12,7 $\pm$ 0,3	60	<b>7</b>	31,8 $\pm$ 0,3	42	<b>5</b>	<b>29</b>
F2	29,1 $\pm$ 0,9	60	<b>7</b>	25,7 $\pm$ 0,1	29	<b>3</b>	<b>53</b>
F3	70,7 $\pm$ 0,4	361	<b>40</b>	128,0 $\pm$ 0,9	132	<b>15</b>	<b>63</b>
F4	61,3 $\pm$ 0,1	177	<b>20</b>	80,2 $\pm$ 0,1	89	<b>10</b>	<b>50</b>
F5	28,7 $\pm$ 0,4	106	<b>12</b>	34,3 $\pm$ 0,3	27	<b>3</b>	<b>74</b>
F6	17,5 $\pm$ 0,1	58	<b>6</b>	14,0 $\pm$ 0,1	15	<b>2</b>	<b>74</b>
Summe Fraktionen	-	823	<b>92</b>	-	335	<b>38</b>	-

Als Ursachen für die geringe DOC-Wiederfindung kommen mehrere Sachverhalte in Frage. Der hohe Salzgehalt der wiederaufgelösten Fraktionen von etwa 100 g/L verursachte einen hohen osmotischen Druck der im Dialyseschlauch enthaltenen Probe. Dies führte in einem Fall sogar zum Platzen eines Schlauches bei der Dialyse von Fraktion 3 und damit zu einem Probenverlust und einer geringeren DOC-Wiederfindung bei dieser Fraktion. Dies stellte zwar ein einmaliges Ereignis dar, legt jedoch die Vermutung nahe, dass es infolge des hohen Druckes auch zu Undichtigkeiten der zum Verschluss der Schläuche verwendeten Dialyseklappen kam. In diesem Fall ist ein unselektiver Verlust an Probenmaterial zu erwarten. Alternativ ist ein größen-selektiver Verlust an DOM über die Membran des Dialyseschlauches denkbar. Ein derartiger

Verlust lässt Änderungen in der Molekülgrößenverteilung der Fraktionen erwarten. Die in Tabelle 4.16 gezeigte DOC-Bilanz gibt einen ersten Hinweis auf einen gröbenselektiven Verlust über die Dialysemembran. Von Fraktion 1 zu Fraktion 6 ist eine Zunahme des DOC-Verlustes durch die Dialyse von etwa 30 % auf über 70 % erkennbar.

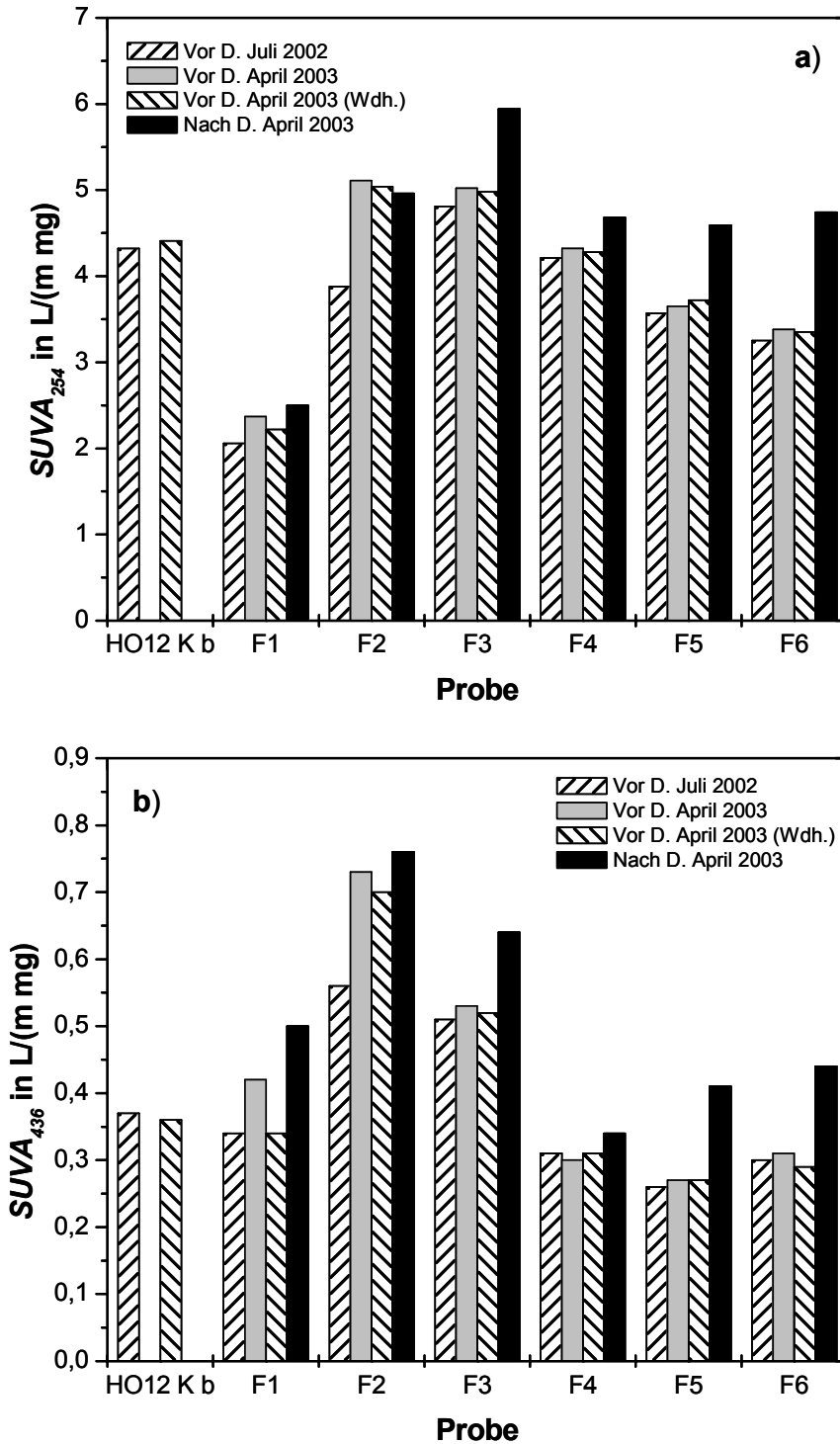
Da für die Dialyse aller Fraktionen insgesamt etwa 2000 Liter an entmineralisiertem Wasser benötigt wurden (Abb. 4.21), war eine kontinuierliche Überprüfung der DOC-Konzentration der Dialysate aus praktischen Gründen nicht möglich. Aufgrund des sehr großen Dialysatvolumens war darüber hinaus nur eine geringe Erhöhung der DOC-Konzentration des entmineralisierten Wassers durch den Eintrag von Probenmaterial in das Dialysat zu erwarten. Diese Erwartung wird durch die folgende Abschätzung bestätigt: Der Eintrag von 488 mg C aus den Fraktionen (entspricht der fehlenden Kohlenstoffmenge, siehe Abb. 4.21) in 2000 L entmineralisiertes Wasser ergibt eine Erhöhung der DOC-Konzentration des Dialysats um lediglich 0,25 mg/L auf einen DOC-Gehalt von etwa 0,35 mg/L. Dieser relativ niedrige Wert erlaubt keine zuverlässige kontinuierliche Überwachung des Dialysevorgangs.

Um zu überprüfen, ob der beobachtete DOC-Verlust mit einer Größenfraktionierung der in den Fraktionen enthaltenen DOM verbunden war, wurden die Molekülgrößenverteilungen der Fraktionen vor und nach Dialyse mittels SEC untersucht. (Abb. 4.25, Chromatogramme der Fraktionen F1, F2 und F4 bis F6 siehe Anhang H). Zum Zeitpunkt der Untersuchung der Fraktionen nach Dialyse stand kein funktionstüchtiger *Online*-DOC-Detektor zur Verfügung. Der Vergleich der Fraktionen vor und nach Dialyse wird daher anhand der SEC-Chromatogramme mit UV-Detektion vorgenommen. Die SEC-Analyse der Fraktionen zeigt, dass durch die Dialyse keine Änderungen in den Molekülgrößenverteilungen der Fraktionen verursacht wurden. Der Verlust an DOM erfolgte somit nicht über die Dialysemembran, sondern hauptsächlich über die Dialyseklappen.



**Abb. 4.25:** SEC-Chromatogramme der SEC-Fraktion F3 vor und nach Dialyse. Analytisches SEC-System nach SPECHT UND FRIMMEL (2002), TSK HW 50-(S)-Säule, Eluent 2, UV<sub>254</sub>-Detektion.

Im Gegensatz zur Molekülgrößenverteilung waren für die *SUVA*-Werte der Fraktionen Änderungen durch die Dialyse zu beobachten (Abb. 4.26). Nach Gefriertrocknung 1, Auflösen und Dialyse (siehe Abb. 4.21) waren die *SUVA*-Werte der Fraktionen mit Ausnahme von Fraktion 2 erhöht. Ein Anstieg des *SUVA*-Wertes kann durch einen selektiven Verlust von DOM mit niedriger spezifischer Absorption (z. B. aliphatische Strukturen) oder durch eine relative Anreicherung aromatischer/ungesättigter Strukturen verursacht werden. Die Änderungen der *SUVA*-Werte können als Hinweis auf qualitative Veränderungen der DOM durch die Probenvorbereitung für die NMR-Spektroskopie gedeutet werden. Bei der Bewertung dieser Veränderung ist zu beachten, dass es sich beim *SUVA* um einen selektiven Parameter handelt, mit dem nur der lösliche, ungesättigte Anteil der gefriergetrockneten Probe erfasst wird. Bei der NMR-spektroskopischen Analyse wird dagegen sowohl der unlösliche als auch der lösliche Anteil der Probe detektiert. Eine Änderung der *SUVA*-Werte hat daher nicht notwendigerweise eine Änderung der mittels NMR-Analyse detektierbaren Strukturen zur Folge.



**Abb. 4.26:** *SUVA*-Werte der Probe HO12 K b und der SEC-Fractionen vor und nach Lagerung (Vor D., Juli 2002 bzw. April 2003) bzw. Dialyse (Nach D., April 2003). a) *SUVA*<sub>254</sub>-Werte, b) *SUVA*<sub>436</sub>-Werte.

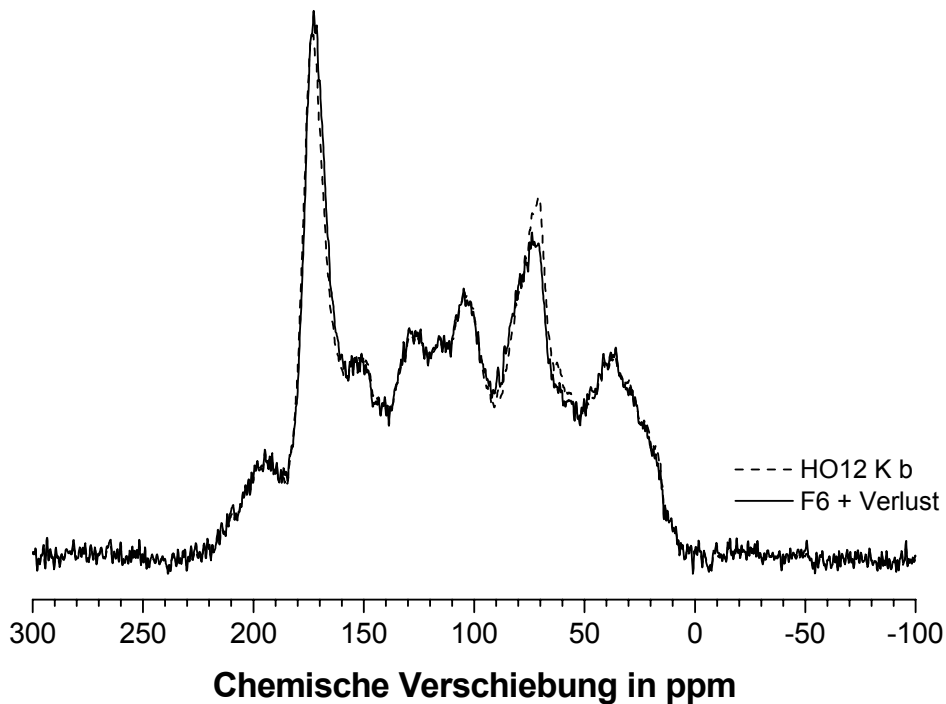
Die DOM der Fraktion 1 zeichnet sich durch einen *SUVA*<sub>254</sub>-Wert von etwa 2,3 L/(m mg) aus. Dieser Wert ist wesentlich niedriger als die üblicherweise für Humin- und Fulvinsäuren ermittelten Werte der spezifischen UV-Absorption (HAUTALA ET AL. 2000, ABBT-BRAUN UND FRIMMEL



2002, LEENHEER UND CROUÉ 2003). Das Maximum der spezifischen Absorption bei 254 nm trat in Fraktion 3 auf, wogegen das Maximum des  $SUVA_{436}$  in Fraktion 2 ermittelt wurde (Werte nach Dialyse). Im Unterschied zu anderen Arbeiten (ABBT-BRAUN ET AL. 1991b, CHIN ET AL. 1994, PEURAVUORI UND PIHLAJA 1997) wurde hier keine kontinuierliche Zunahme des  $SUVA_{254}$  mit zunehmender Molekülgröße der DOM sondern ein Maximum im Bereich mittlerer  $V_e$ -Werte gefunden. Aus den unterschiedlichen SUVA-Werten der Fraktionen kann auf strukturelle Unterschiede der DOM geschlossen werden, wobei sich insbesondere Fraktion 1 in ihren chemischen Strukturen deutlich von denen der Fraktionen F2 bis F6 unterscheiden sollte. Der gewichtete  $SUVA_{254}$ -Wert der Fraktionen (Wert vor Dialyse) ist mit  $SUVA_{254} = 4,00 \text{ L}/(\text{m mg})$  niedriger als der der Probe HO12 K b. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es bei der SEC-Fraktionierung an der TSK HW50-(S)-Säule trotz der hohen DOC-Wiederfindung zu einem selektiven Verlust ungesättigter Strukturen durch irreversible Adsorption am Gelmaterial kam. FUCHS (1985b) stellte ebenfalls fest, dass die Wiederfindung des UV-aktiven Anteils der DOM (UVA-Bilanz) stets geringer war als die der gesamten gelösten Substanz (DOC-Bilanz) und schloss daraus, dass UV-aktive Substanzen eine stärkere Affinität zur Gelmatrix zeigen. Er machte diese Beobachtung sowohl für DOM aus Oberflächen-, als auch aus Grund- und Abwässern. Der selektive Verlust aromatischer bzw. ungesättigter Strukturen tritt folglich bei DOM unterschiedlicher Herkunft und Zusammensetzung auf.

#### 4.5.1.3 $^{13}\text{C}$ MAS NMR-spektroskopische Charakterisierung der Fraktionen

Die NMR-Spektren der SEC-Fraktionen wurden an dialysierten, gefriergetrockneten Fraktionen aufgenommen. Bei der Dialyse kam es zu einem beträchtlichen Verlust an DOM (Tab. 4.16). Anhand des aus den Einzelspektren der Fraktionen rekonstruierten Summen- bzw. Verlustspektrums sollte zunächst beurteilt werden, ob es sich in Bezug auf die mittels NMR-Analyse detektierbaren chemischen Strukturen um einen selektiven oder unselektiven Verlust handelte. Die Flächen der Spektren der Fraktionen F1 bis F5 wurden auf die DOC-Anteile nach Dialyse (insgesamt 36 % des DOC; Tab. 4.16) skaliert. Diese Spektren wurden anschließend aufsummiert. Da für Fraktion 6 kein quantitativ auswertbares Spektrum aufgenommen werden konnte, wurde der DOC-Anteil dieser Fraktion dem Verlustspektrum hinzugerechnet. Das in Abbildung 4.27 gezeigte Spektrum der Fraktion 6 + DOM-Verlust (64 % des DOC) wurde durch Subtraktion des Summenspektrums vom Spektrum der Probe HO12 K b erhalten. Die Flächenanteile der verschiedenen Strukturen im Verlustspektrum wurden durch Integration bestimmt (Tab. 4.17).



**Abb. 4.27:**  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektrum der Proben HO12 K b und berechnetes Spektrum der Fraktion 6 + DOM-Verlust.

Im Verlustspektrum ist lediglich eine geringe Abnahme der Signalintensität bei 70 ppm zu erkennen. Durch die Fraktionierung und Probenvorbereitung (Gefriertrocknung, Auflösen, Dialyse) kam es somit zu einer geringfügigen Abreicherung von Kohlenhydratstrukturen in Fraktion 6 + DOM-Verlust und zu einer Anreicherung in den Fraktionen F1 bis F5. Eine eindeutige Zuordnung dieser chemischen Strukturen zur Fraktion 6 oder dem DOM-Verlust ist nicht möglich. Die Zusammensetzung der Fraktionen wurde durch die Probenvorbereitung in Bezug auf die NMR-spektroskopische Analyse nur geringfügig verändert. Die NMR-Analyse liefert folglich zuverlässige Informationen über die chemischen Strukturen der SEC-Fraktionen F1 bis F5. Die Integrationsdaten der  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektren sowie die Elementaranalysedaten der Probe HO12 K b und der SEC-Fraktionen sind in den Tabellen 4.17 und 4.18 angegeben. Aus den niedrigen Kohlenstoff-Massenanteilen in den Fraktionen F2, F4 und F6 kann auf erhöhte Aschegehalte in diesen Fraktionen geschlossen werden. Hohe Aschegehalte werden im Fall der SEC-Fraktionen durch Rückstände der Puffersalze ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) in den Fraktionen nach Dialyse verursacht. Die Elementaranalysedaten dieser Fraktionen sind infolge der hohen Aschegehalte mit Unsicherheiten behaftet (Tab. 4.18, Angaben in Klammern).

**Tab. 4.17:** Integrationsdaten der chemischen Verschiebungsbereiche der  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektren der Probe HO12 K b und der SEC-Fractionen. <sup>1</sup>Daten der Messung im Jahr 2003, <sup>2</sup>: Integrationsdaten des Verlustspektrums (Abb. 4.27).

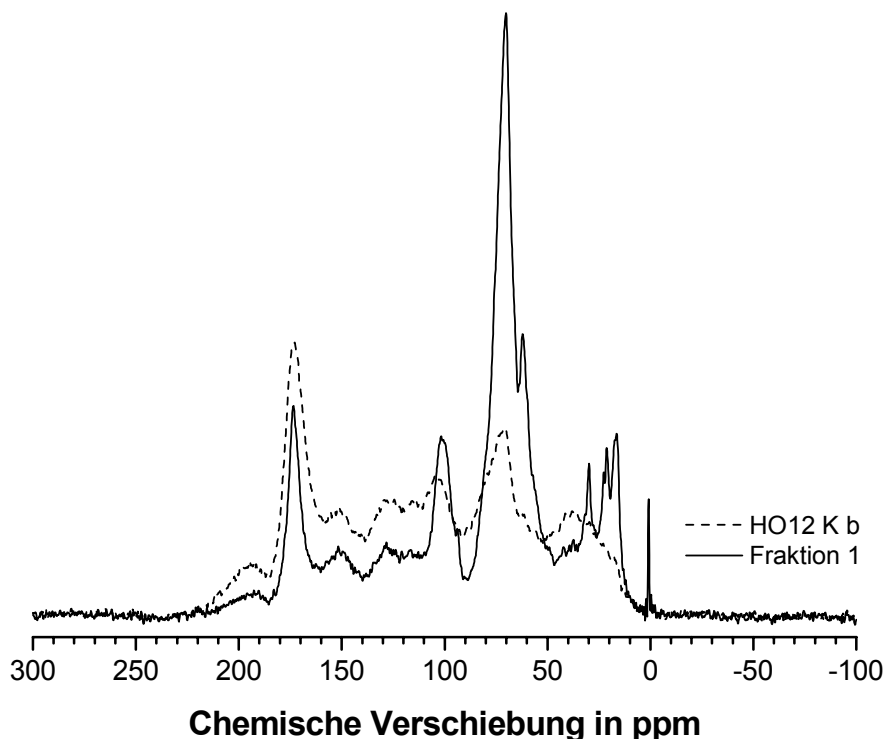
Probe	Relativer Kohlenstoffanteil in %					
	Carbonyl C	Carboxyl C	Aromaten		O-Alkyl C	Aliphat. C
	220-190 ppm	190-160 ppm	O/N-subst. 160-140 ppm	C/H-subst. 140-100 ppm	100-50 ppm	50-0 ppm
HO12 K (1996) <sup>1</sup>	3,8	17,4	10,1	22,8	30,4	15,5
HO12 K b (2002)	4,6	20,4	9,4	22,1	28,2	15,3
F1	2,0	10,7	5,4	14,7	48,8	18,5
F2	4,2	17,1	11,2	21,7	29,6	16,2
F3	5,4	20,2	10,9	24,3	25,4	13,8
F4	4,7	21,9	9,4	22,3	26,1	15,6
F5	4,4	19,8	9,3	21,7	28,4	16,5
F6 + Verlust <sup>2</sup>	4,7	21,1	9,2	22,0	27,5	15,3

**Tab. 4.18:** Elementaranalytische Daten der Probe HO12 K b und der SEC-Fractionen. <sup>1</sup>Daten der Messung im Jahr 2003.

Probe	Massenanteil in %			Elementverhältnisse	
	C	H	N	H/C	N/C
HO12 K (1996) <sup>1</sup>	48,2	4,2	1,6	1,033	0,028
HO12 K b (2002)	44,1	3,9	1,6	1,051	0,030
F1	42,9	5,2	1,6	1,435	0,032
F2	8,8	1,9	0,6	(2,598)	(0,054)
F3	46,2	3,5	1,4	0,900	0,026
F4	28,6	2,7	0,8	(1,134)	(0,025)
F5	41,3	3,4	1,0	0,973	0,020
F6	5,8	1,8	0,3	(3,794)	(0,046)

### Fraktion 1

Durch NMR-Analyse der Fraktionen nach Dialyse und Gefriertrocknung konnten die Annahmen hinsichtlich der unterschiedlichen chemischen Strukturen der SEC-Fraktionen verifiziert werden (vergleiche Kap. 4.5.1.1 und 4.5.1.2). Fraktion 1 unterscheidet sich hinsichtlich der NMR-Daten in außergewöhnlich starker Weise von der Probe HO12 K b sowie von den Fraktionen F2 bis F5. Die Integrationsdaten des Spektrums der Probe F1 (Tab. 4.17) zeigen eine besonders starke relative Anreicherung von O-Alkyl-Strukturen (nahezu 50 %) gegenüber dem Spektrum der Probe HO12 K b (28 %). Der relative Anteil von aromatischen C-Atomen (20 %) sowie die Anteile von Carboxyl- (11 %) und Carbonylfunktionen (2 %) sind deutlich geringer als in der Ausgangsprobe. Im NMR-Spektrum (Abb. 4.28) sind intensive Signale bei 70 ppm und 101 ppm zu erkennen. Die Signalgruppe am Intensitätsmaximum wird den  $\text{CR}_2\text{HOH}$ -Gruppen in Kohlenhydraten und die Signalgruppe mit dem Maximum bei 101 ppm den anomeren C-Atomen zugeordnet. Das Signal der Gruppe bei 70 ppm ist sehr schmal, so dass bei 62 ppm eine weitere Signalgruppe zu erkennen ist. Diese wird den  $\text{CRH}_2\text{OH}$ -Gruppen von Kohlenhydraten zugeordnet.



**Abb. 4.28:**  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektren der Probe HO12 K b und der Fraktion F1.

In NMR-Spektren von Huminstoffen sind im Allgemeinen wesentlich breitere Signalgruppen vorhanden (LANKES 2001). Das Signal bei 62 ppm tritt daher in der Regel nicht als Maximum hervor. Die Auflösung des Spektrums dieser Fraktion erreicht eine Qualität, wie sie beispielsweise in Spektren von isolierten Polysacchariden wie Cellulosen oder Xanthenen gefunden werden kann. Die schmale Signalgruppenbreite belegt, dass die Kohlenhydratstrukturen einen für Huminstoffproben außergewöhnlichen Grad an Homogenität bzw. Reinheit aufweisen.

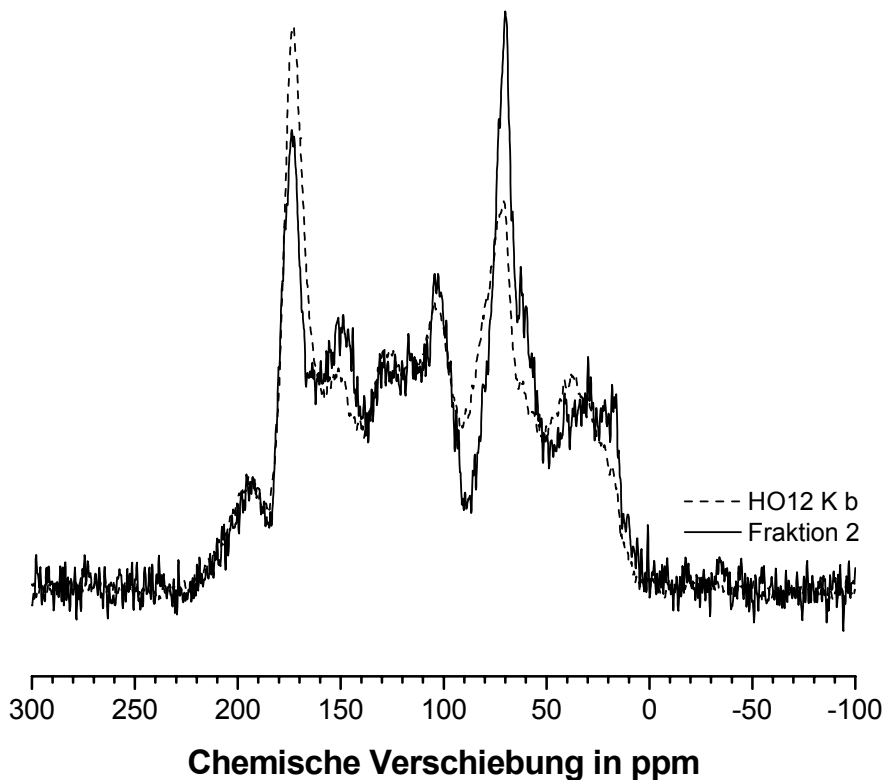
Die Kohlenhydratstrukturen in Huminstoffen enthalten häufig Seitenketten wie z. B. N-Acetylgruppen, die auch in Chitinen (Homopolysaccharide) oder Mureinen (Peptidoglykan; komplexe Polysaccharide) vorkommen (NUHN 1997). Im Spektrum der Fraktion 1 sind im chemischen Verschiebungsbereich der Aliphaten deutlich Signale von Methylgruppen bei 21 ppm und 17 ppm zu erkennen. Während das erste Methylgruppen-Signal sehr häufig in Zusammenhang mit den Kohlenhydratstrukturen in Spektren nachgewiesen werden konnte (LANKES 2001), konnte das intensivste Aliphaten-Signal (17 ppm) bisher wegen starker Signalüberlagerung nicht separat aufgelöst werden. Verzweigte aliphatische Strukturen (Signal bei ca. 40 ppm) sind in F1 zu einem deutlich niedrigeren Anteil enthalten als in der Probe HO12 K b. Die Amid-C-Atome der N-Acetyl-Seitenketten ergeben Signale im Bereich der Carboxylfunktionen, können jedoch nicht von Carboxylgruppen und Ester-Strukturen unterschieden werden. Peptide bzw. Proteine, deren Amid-C-Atome ebenfalls in diesem Bereich zur Signalintensität beitragen, weisen zusätzlich noch eine Signalgruppe von  $\alpha$ -C-Atomen der Aminosäuren bei ca. 55 ppm auf. In diesem Bereich des Spektrums der Probe F1 ist lediglich eine kleine Signalschulter zu erkennen. Damit können Mureine oder proteinhaltige Zellfragmente von Mikroorganismen als Haupt-Prekursor der Kohlenhydrat-Strukturen ausgeschlossen werden. Die NMR-Daten stehen diesbezüglich jedoch nicht im Widerspruch zum aus der EEM erhaltenen Hinweis auf die Anwesenheit von proteinähnlicher DOM in Fraktion 1 (vergleiche Abb. 4.23). Die Fluoreszenzmessung stellt eine sehr empfindliche Detektionsmethode dar, mit der im Gegensatz zur NMR-Spektroskopie auch geringe Mengen einzelner Strukturen in komplexen Gemischen nachgewiesen werden können, sofern die Substanzen eine ausreichende Fluoreszenzquantenausbeute besitzen. In Fraktion 1 können folglich geringe Anteile proteinähnliche DOM enthalten sein, die mittels NMR-Spektroskopie nicht detektiert werden können.

Die Abschätzung der Gesamtmenge an C-Atomen, die den Kohlenhydratstrukturen in Fraktion 1 zugeordnet werden können, ergibt einen Anteil von mindestens 50 %. Für die Probe HO12 K (1996) schätzte LANKES (2001) aus Dekonvolutionsdaten einen maximalen Anteil von 21 %

bzw. von 16 % C bei Annahme von reinen Hexosen ab. Unter der Annahme, dass N-acetylierte Strukturen wie Chitin die einzigen Kohlenhydrat-Prekursoren bilden, kann auf ein N/C-Verhältnis der Probe von mindestens 0,07 geschlossen werden. Der tatsächliche Wert ist mit  $N/C = 0,03$  nur unwesentlich höher als der der Probe HO12 K b (Tab. 4.18). Daraus folgt, dass in Fraktion 1 insbesondere auch Kohlenhydrat-Strukturen ohne N-Funktionen angereichert sein müssen. Das gegenüber der Probe HO12 K b (1,05) deutlich höhere H/C-Verhältnis (1,44) ist auf diese Anreicherung von Kohlenhydrat-Strukturen, die Methylgruppen in den Seitenketten besitzen, zurückzuführen. Methylengruppen, die durch ein schmales, intensives Signal bei 30 ppm nachgewiesen werden können, tragen ebenfalls zum hohen H/C-Verhältnis bei.

### Fraktion 2

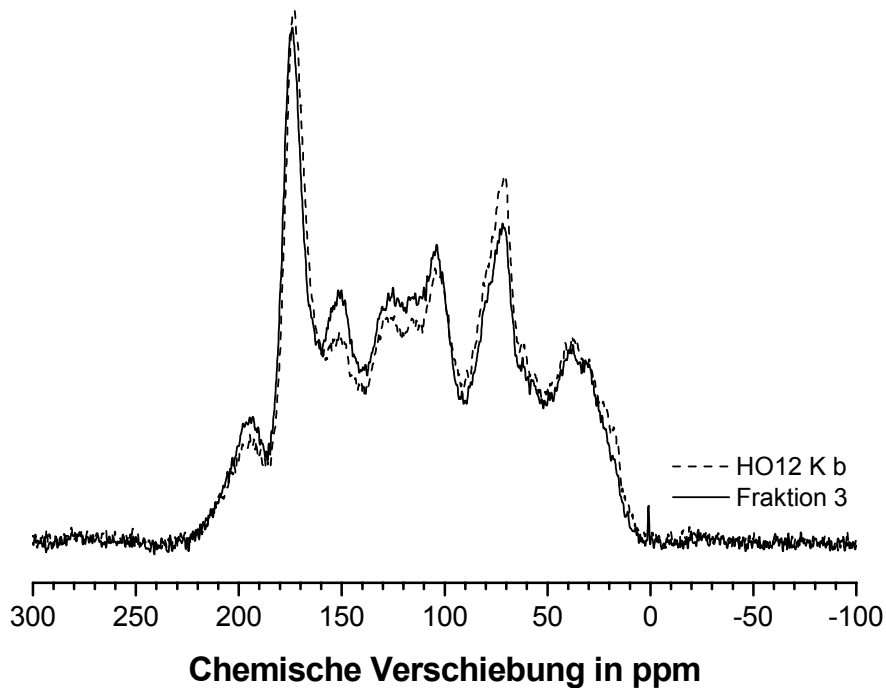
Das NMR-Spektrum der Probe F2 wird hier nicht ausführlich diskutiert (Abb. 4.29). Die Probe weist nur einen kleinen C-Gehalt auf (9 %). Das Signal/Rausch-Verhältnis ist sehr niedrig, so dass die Quantifizierung nur eingeschränkt möglich ist. Das Spektrum weist sowohl qualitativ als auch quantitativ die Merkmale in Mischform auf, die einerseits im Spektrum der Fraktion F1, andererseits im Spektrum der Fraktion F3 erkennbar sind.



**Abb. 4.29:**  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektren der Probe HO12 K b und der Fraktion F2.

### Fraktion 3

Fraktion 3 enthält mit etwa 15 % (nach Dialyse) den größten Anteil des DOC der fraktionierten Probe. Die spektroskopischen Unterschiede zwischen F3 und dem Ausgangsmaterial HO12 K b (Abb. 4.30) sind deutlich geringer als zwischen F1 und HO12 K b. Der Anteil an aromatischen C-Atomen ist in Fraktion 3 größer (35 %) als in der Ausgangsprobe (32 %). O-Alkyl-C-Atome sind dagegen relativ abgereichert (25 % gegenüber 28 %). Anhand des NMR-Spektrums der Probe F3 ist eine relative Abreicherung von Kohlenhydratstrukturen gegenüber der Ausgangsprobe zu erkennen. Die Intensität der für Kohlenhydratstrukturen charakteristischen Signalgruppe ist niedriger, und ihr Signalmaximum liegt gegenüber der Probe F1 (70 ppm) bei höheren Werten der chemischen Verschiebung (72 ppm). Diese Signalgruppe weist eine ausgeprägte Schulter im Bereich höherer Werte der chemischen Verschiebung auf. Dies deutet auf einen deutlich höheren Anteil von verzweigten O-Alkyl-Strukturen und einen niedrigeren Anteil von Kohlenhydratstrukturen hin. Die Abreicherung an Kohlenhydratstrukturen ist auch aus dem Fehlen der Intensitätsmaxima der anomeren C-Atome (101 ppm) sowie der Methylgruppen ersichtlich. Da keine ausgeprägte Signalgruppe von anomeren C-Atomen (101 ppm) vorhanden ist, ist im Spektrum der Probe F3 bei 105 ppm ein deutliches Signal von aromatischen C-Atomen zu erkennen. Dieses Signal ist nach LORENZ ET AL. (2000) C-substituierten polyphenolischen Strukturen zuzuordnen, die beispielsweise in kondensierten Tanninen vorkommen. LANKES (2001) konnte dieses Signal in NMR-Spektren der Hohlohsee-DOM durch Anwendung spezieller Techniken in hohen Intensitäten nachweisen. Der hohe Anteil an Tannin-Derivaten in dieser Probe hat eine intensiv ausgeprägte Signalgruppe mit einem Maximum bei 150 ppm zur Folge (O-substituierte aromatische C-Atome). Neben Tannin-Derivaten tragen auch Phenylpropan-Derivate, die insbesondere in Lignin-Strukturen vorkommen, zu Intensitäten im chemischen Verschiebungsbereich der Aromaten bei. Der Anteil der  $sp^2$ -hybridisierten C-Atome (220 bis 100 ppm) ist in Fraktion 3 mit 61 % höher als in allen anderen Fraktionen. Die relative Abreicherung von Kohlenhydratstrukturen und die relative Anreicherung an  $sp^2$ -hybridisierten C-Atomen resultieren im niedrigsten H/C-Verhältnis (0,90) dieser Fraktion. Das N/C-Verhältnis ist nur geringfügig niedriger als in der Probe HO12 K b.

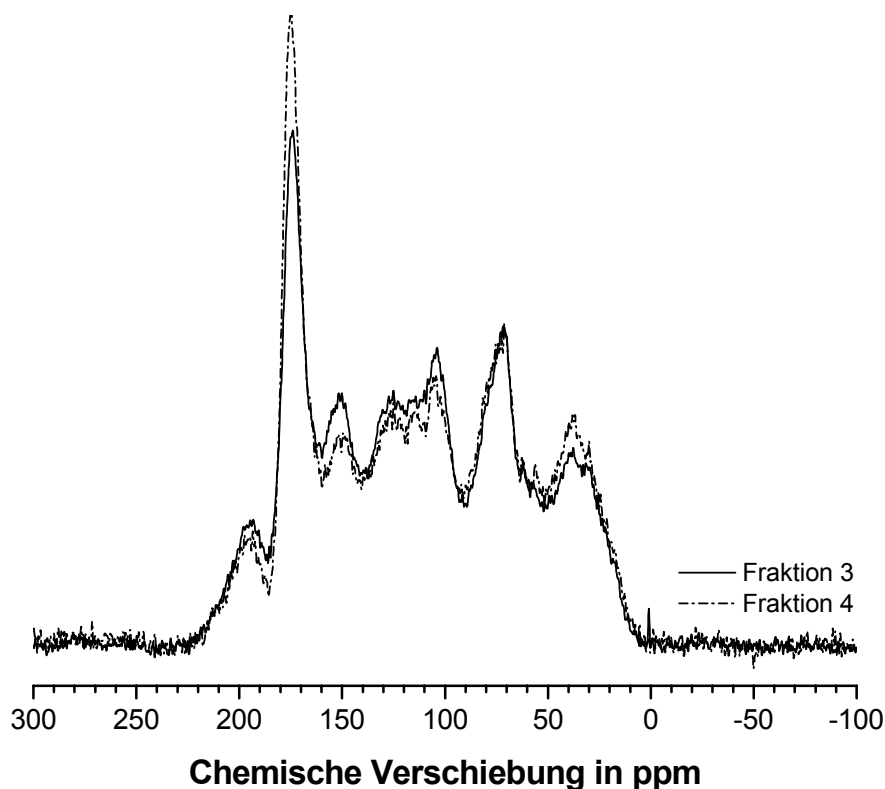


**Abb. 4.30:**  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektren der Probe HO12 K b und der Fraktion F3.

#### Fraktion 4

Das Spektrum der Probe F4 weist nur kleine Unterschiede zum Spektrum der Probe F3 auf (Abb. 4.31). Der Anteil an aromatischen C-Atomen ist mit 32 % niedriger als in der Probe F3 (35 %) und entspricht dem relativen Anteil in der Probe HO12 K b. Nur in dieser Fraktion sind Carboxylfunktionen mit einem Anteil von 22 % gegenüber allen anderen Proben relativ angereichert. Dies resultiert in einem größeren Verhältnis des Anteils der Randgruppen (COOR) zu dem der "core"-Gruppen (Aromaten) von 0,69 gegenüber 0,57 in Fraktion 3. Eine Erhöhung dieses Verhältnisses gibt Hinweise auf eine abnehmende Molekülgröße als Folge der zunehmenden biologischen Modifikation der Vorläufersubstanzen (LANKES 2001, siehe auch Kapitel 2.4.4). Bei der Interpretation dieses Wertes muss allerdings berücksichtigt werden, dass ein Teil der COOR-Funktionen nicht als freie Carboxylgruppe vorliegt (z. B. erhöhter Anteil an Amidstrukturen in Fraktion 1).





**Abb. 4.31:**  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektren der Fraktionen F3 und F4.

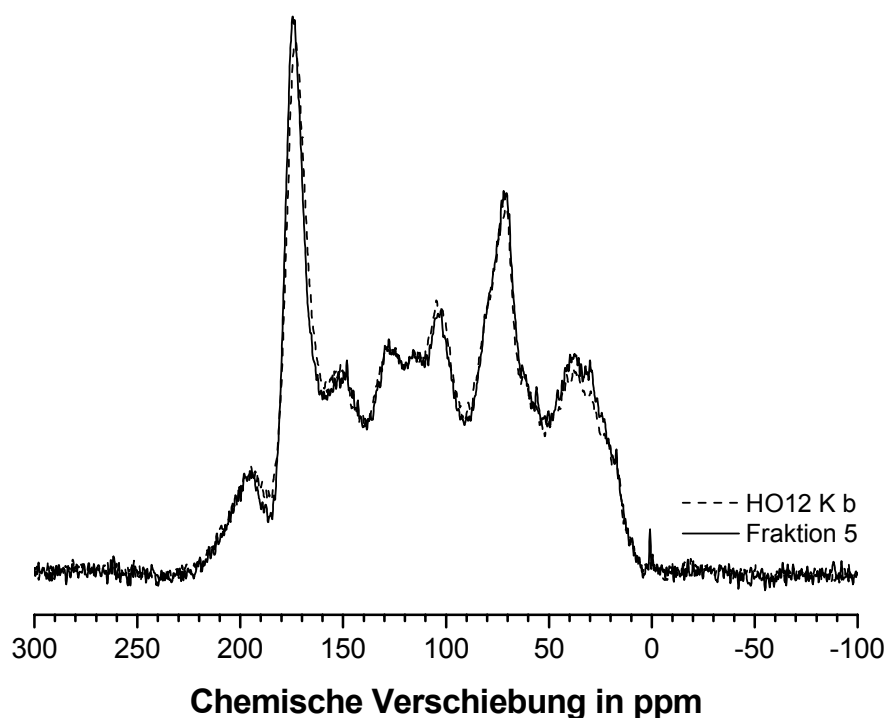
Die Integrale im chemischen Verschiebungsbereich der O-Alkyl-C-Atome und der restlichen aliphatischen C-Atome zeigen keine ausgeprägten Unterschiede. Aussagekräftiger sind hingegen die Intensitätsdaten für bestimmte Leitstrukturen: Die Intensitätsmaxima von Kohlenhydratstrukturen treten bei 70 und 17 ppm auf. Verzweigte O-Alkyl-C-Atome, die beispielsweise in den Seitenketten von Lignin- und Tannin-Derivaten zu finden sind, ergeben Signale im Bereich um 80 ppm, verzweigte aliphatische C-Atome ergeben Signale um 40 ppm. Die Verhältnisse dieser Signalintensitäten geben Hinweise auf Verteilungsunterschiede. Das Verhältnis  $I_{80}/I_{70}$  der Intensitäten bei 80 und 70 ppm nimmt in den Spektren der Fraktionen F1, F3 und F4 von 0,27 über 0,79 auf 0,84 zu. Je größer der Wert dieses Verhältnisses dieser Intensitäten ist, desto höher ist der Anteil der verzweigten O-Alkyl- gegenüber dem der Kohlenhydratstrukturen. Eine entsprechende Aussage liefert der Quotient  $I_{40}/I_{30}$  für den Anteil an verzweigten aliphatischen Strukturen im Vergleich zu *n*-Alkanstrukturen. In den Spektren der Proben F4 und F3 liegt dieses Verhältnis bei 1,08 gegenüber einem Wert von 0,44 im Spektrum der Fraktion 1.

Aus den NMR-Daten der SEC-Fraktionen F1 bis F4 werden somit folgende Merkmale einer kontinuierlichen strukturellen Differenzierung des organischen Materials ersichtlich: Der Gehalt an Kohlenhydratstrukturen nimmt von der Fraktion 1 bis 4 ab; der Gehalt an verzweigten O-

Alkyl-Strukturen und verzweigten aliphatischen Strukturen dagegen zu. Das Verhältnis der Anteile von Carboxylgruppen-C-Atomen zu aromatischen C-Atomen nimmt von F2 zu F4 ebenfalls zu ( $F2 < F3 < F4$ :  $0,52 < 0,57 < 0,69$ ). Wegen des höheren Anteils an Amidstrukturen in Fraktion 1 folgt das Verhältnis für diese Probe (0,53) nicht dem allgemeinen Trend. Ein höherer Anteil an Amid-C-Atomen kann aus den strukturellen Unterschieden (N-acetylierte Kohlenhydratstrukturen) und dem höheren N/C-Verhältnis von F1 gefolgert werden.

### **Fraktion 5**

Fraktion 5 unterscheidet sich in auffälliger Weise von den Fraktionen F1 bis F4. Eine Fortsetzung der beschriebenen strukturellen Differenzierung der DOM ist für diese Fraktion nicht erkennbar. Die Intensitätsverteilung des Spektrums der Probe F5 ähnelt statt dessen stark der Verteilung des Spektrums der Probe HO12 K b (Abb. 4.32). Das H/C-Verhältnis ist mit 0,97 in der Fraktion F5 etwas niedriger als in der Probe HO12 K b (1,05). Da der Anteil an chemischen Strukturelementen in beiden Proben relativ gleich ist, ist der niedrigere H/C-Quotient nur durch einen höheren Veretherungsgrad in F5 erklärbar. Ein hoher Veretherungsgrad ist beispielsweise charakteristisch für Ligninstrukturen, wo Ether-Brücken häufig als Verknüpfung zwischen den Phenylpropan-Einheiten zu finden sind. Lignine gehören zu den Hauptpräkursoren der DOM des Hohlohsees (LANKES 2001). Das N/C-Verhältnis ist in Fraktion F5 mit 0,02 am niedrigsten. Das N/C-Verhältnis in natürlichen Huminstoffsystemen korreliert in der Regel mit dem Gehalt an Kohlenhydratstrukturen (N-Acetyl-Gruppen, Interpeptidbrücken, LANKES 2001). Der Gehalt an Kohlenhydratstrukturen in Fraktion F5 und der Probe HO12 K b ist jedoch praktisch gleich (Tab. 4.17). Das niedrigere N/C-Verhältnis dieser Fraktion zeigt daher, dass in F5 Kohlenhydratstrukturen enthalten sein müssen, die einen niedrigeren N-Anteil aufweisen als die der Ausgangsprobe (z. B. Derivate von Cellulosen, Hemicellulosen). Derartige Strukturen sind beispielsweise in Lignocellulosen zu finden. Dies lässt auf eine relative Anreicherung von wenig modifizierten Lignocellulose-Derivaten in Fraktion 5 schließen.



**Abb. 4.32:**  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektren der Probe HO12 K b und der Fraktion F5.

Folgende Feinheiten im Spektrum der Probe F5 unterstützen diese Hypothese: Das Intensitätsmaximum im chemischen Verschiebungsbereich der O-substituierten aromatischen C-Atome liegt bei 148 ppm (151 ppm bei HO12 K b). Bei 56 ppm ist ein Signalmaximum erkennbar, das Methoxylgruppen zugeordnet werden kann (SWIFT ET AL. 1992, DESHMUKH ET AL. 2001, LANKES 2001). Methoxylgruppen kennzeichnen gering modifizierte Lignin-Strukturen, da diese Gruppen beim biologischen Abbau in der Regel zuerst metabolisiert werden. Das Intensitätsmaximum der überlagerten Signalgruppen von anomeren C-Atomen und C-substituierten polyphenolischen aromatischen C-Atomen liegt im Spektrum der Probe F5 bei 102 ppm gegenüber 105 ppm in HO12 K b. Diese spektroskopischen Charakteristika können Hinweise auf eine Abreicherung von Tannin-Derivaten zugunsten von Lignin-Derivaten geben. Aufgrund ihres geringen Modifikationsgrades müssen diese Lignin-Derivate eine höhere Molmasse bzw. einen größeren hydrodynamischen Radius als die carboxylreicheren, stärker modifizierten aromatischen Strukturen der Fraktionen F3 und F4 besitzen. Die Bedeutung dieses Sachverhalts wird in Kapitel 4.5.1.4 diskutiert.

### Fraktion 6

Von Fraktion 6 stand nach der SEC-Fraktionierung nur eine geringe Ausgangsmenge an organischem Kohlenstoff zur Verfügung (58 mg, Tab. 4.17). Durch die Dialyse kam es zu einem weiteren Verlust von etwa 70 % dieses Materials. des DOC. Der Kohlenstoffgehalt der dialysierten Probe betrug nur etwa 6 %. Im Spektrum sind Signale von Carboxylfunktionen erkennbar. Wegen des niedrigen C-Gehaltes konnte von dieser Fraktion kein quantitativ auswertbares NMR-Spektrum aufgenommen werden. (Abb. 4.33).

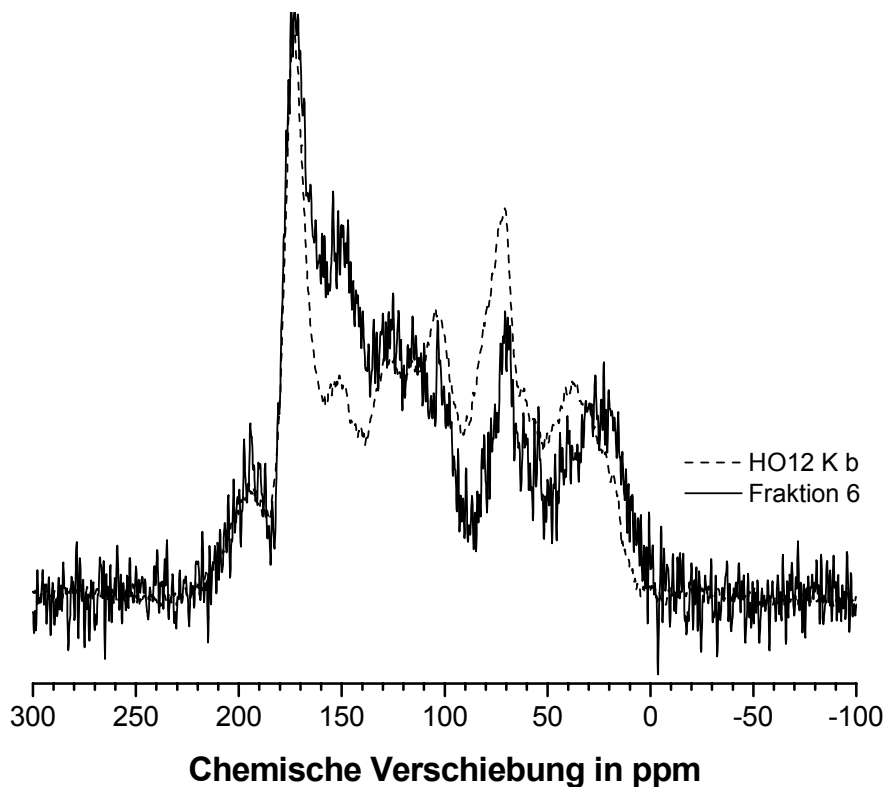
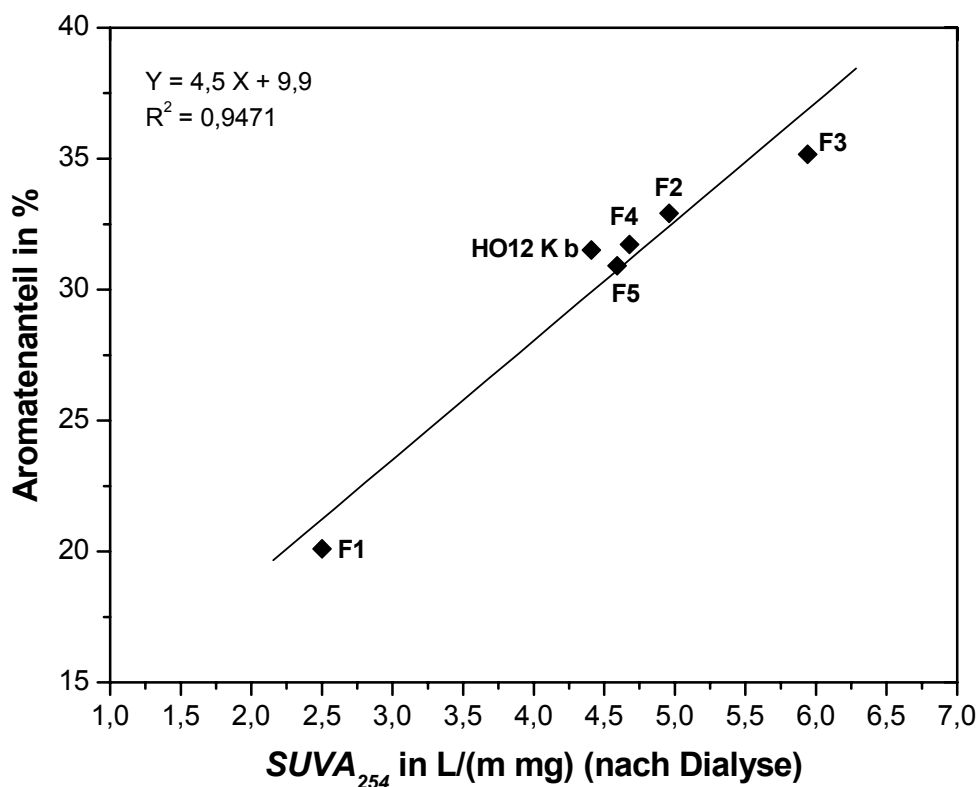


Abb. 4.33: <sup>13</sup>C MAS NMR-Spektren der Probe HO12 K b und der Fraktion F6.

### Korrelation von Aromatenanteil und $SUVA_{254}$ -Wert

Der Aromatengehalt der SEC-Fractionen F1 bis F5 sowie der Probe HO12 K b korrelierte mit den Werten der spezifischen UV-Absorption bei 254 nm (Abb. 4.34). Der höchste Anteil an aromatischem Kohlenstoff war mit etwa 35 % in Fraktion 3 enthalten. Der  $SUVA_{254}$ -Wert dieser Fraktion (nach Dialyse) war mit 5,94 L/(m mg) höher als der für die Huminsäure der Brauwasserprobe angegebene Wert von 5,37 L/(m mg) (HO13 HA, ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002). Der Anteil der Aromaten in Fraktion 1 war mit ca. 20 % wesentlich geringer als der der FAs und HAs des Hohlohsees. Der  $SUVA_{254}$ -Wert dieser Fraktion war mit 2,50 L/(m mg) eben-

falls deutlich niedriger als der der FA und HA-Fractionen (HO13 FA:  $SUVA_{254} = 4,86 \text{ L}/(\text{m mg})$ , ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002). Eine Korrelation beider Parameter wurde auch für die Fulvin- und Huminsäuren der Braunwasserprobe sowie anderer Gewässer nachgewiesen (CHIN ET AL. 1994, ABBT-BRAUN ET AL. 2002, WEISHAAR ET AL. 2003). Der quantitative Zusammenhang beider Parameter bestätigt die Anwendbarkeit des  $SUVA_{254}$  zur Abschätzung des Aromatenanteils der DOM in huminstoffhaltigen Gewässern und deren Fraktionen.



**Abb. 4.34:** Korrelation zwischen  $SUVA_{254}$ -Wert und Aromatenanteil der Probe HO12 K b und der SEC-Fractionen F1 bis F5.

#### 4.5.1.4 Interpretation der Ergebnisse der strukturellen Charakterisierung im Hinblick auf Trennmechanismen der SEC

Durch die NMR-spektroskopische Analyse konnten strukturelle Unterschiede zwischen den SEC-Fractionen der Braunwasser-DOM nachgewiesen werden. FUCHS folgerte bereits 1985 aus seinen Versuchen mit Modellverbindungen, dass eine Trennung verschiedener organischer Substanzen unterschiedlicher Struktur auf der Grundlage der reinen Größenausschlusschromatographie nicht möglich sei (FUCHS 1985b). Bei der SEC von Huminstoffen muss auch unter optimierten experimentellen Bedingungen davon ausgegangen werden, dass das Trennergebnis stets

auf einer Kombination aus Größenausschlussmechanismen und unspezifischen Wechselwirkungen zwischen DOM und Gelmaterial beruht. Art und Ausmaß der Beeinflussung der Größenfraktionierung durch unspezifische WW sind jedoch meist unbekannt. Aus den Ergebnissen der strukturellen Charakterisierung der SEC-Fractionen können Schlussfolgerungen bezüglich der Bedeutung unspezifischer Wechselwirkungen bei der SEC-Trennung der Brauwasser-DOM gezogen werden.

Fraktion 1 unterschied sich in ihrer Zusammensetzung und ihren Eigenschaften am deutlichsten von allen anderen DOM-Fractionen. Kohlenhydratstrukturen stellen den Hauptanteil der DOM dieser Fraktion. Dies hat eine niedrige spezifische UV-Absorption sowie ein geringes Fluoreszenzvermögen zur Folge. HUBER UND FRIMMEL stellten auf der Grundlage des geringen Elutionsvolumens und des niedrigen  $SUVA_{254}$ -Wertes dieser Fraktion bereits 1996 die Hypothese auf, dass Polysaccharide ein wesentlicher Bestandteil dieser Fraktion seien. Diese Hypothese konnte im Rahmen dieser Arbeit bewiesen werden. Die Beobachtung, dass durch die SEC-Fraktionierung eine derart ausgeprägte Selektion bestimmter chemischer Strukturen möglich ist, erscheint bemerkenswert. Diese Selektion kann zum einen durch Größentrennung, zum anderen durch unspezifische Wechselwirkungen der DOM mit dem Gelmaterial hervorgerufen werden (oder eine Kombination beider Mechanismen). Es ist bekannt, dass es bei Verwendung von Eluenten mit geringer Ionenstärke zur verfrühten Elution negativ geladener Moleküle am Ausschlussvolumen infolge elektrostatischer WW mit ebenfalls negativ geladenen funktionellen Gruppen des Säulenmaterials kommen kann. Da in Fraktion 1 die niedrigsten Anteile an Carboxylfunktionen nachgewiesen wurden, können derartige WW jedoch weitgehend ausgeschlossen werden. Die Elution der Fraktion 1 (Peak 1) bei  $V_0$  ist demnach hauptsächlich eine Folge der Größentrennung. Der  $V_e$ -Unterschied zwischen der DOM der Fraktion 1 und der restlichen DOM der Probe HO12 K b zeigt, dass die Moleküle in F1 bedeutend größere hydrodynamische Radien besitzen müssen als die restliche DOM der Probe HO12 K b. Diese Eigenschaft steht im Einklang mit den chemischen Strukturen dieser Fraktion. Natürliche Polysaccharide sind makromolekulare Verbindungen, die zum Teil hochgeordnete, lineare Strukturen (z. B. Cellulosen, Chitine) aufweisen. Durch biologischen Abbau werden diese Strukturen in wasserlösliche Verbindungen überführt (NUHN 1997). Die hohe Molmasse sowie die lineare Struktur resultieren in großen  $R_e$ -Werten und damit kleinen Elutionsvolumina bei der SEC. Alternativ ist denkbar, dass die DOM der Fraktion 1 in Form von Aggregaten oder Kolloiden vorliegt (BECHER ET AL. 1985, SCHMITT 2003). SCHMITT ET AL. (2003) beobachteten, dass es bei Zugabe von  $Al^{3+}$ - sowie von  $Fe^{3+}$ -Salzen zur Brauwasserprobe zu einer Zunahme der Peakfläche der Fraktion 1 kam und schlossen daraus auf eine Bildung von Metall-HS-Kolloiden in

Anwesenheit der dreiwertig geladenen Ionen (Flockungsvorgang). Diese Kolloidbildung findet jedoch wahrscheinlich unter Beteiligung weiterer chemischer Strukturen der DOM statt, so dass zu erwarten ist, dass sich die Kolloide in ihrer Zusammensetzung von Fraktion 1 unterscheiden. Eine Unterscheidung zwischen Aggregaten oder Kolloiden und gelösten Molekülen kann für die Fraktion 1 mit Hilfe der SEC nicht getroffen werden. Aus den im NMR-Spektrum erkennbaren Signalgruppen und der geringen Signalgruppenbreite wird jedoch die Homogenität der DOM dieser Fraktion ersichtlich. Eine derartige strukturelle Homogenität spricht gegen die Möglichkeit, dass die organischen Moleküle in Fraktion 1 in Form von Aggregaten vorliegen.

In den Fraktionen F1, F3 und F4 nimmt der Anteil der verzweigten O-Alkyl- gegenüber dem Anteil der Kohlenhydratstrukturen zu (Verhältnis  $I_{80}/I_{70}$ ). Der Anteil der verzweigten aliphatischen Strukturen im Vergleich zu *n*-Alkanstrukturen steigt ebenfalls von F1 zu F3 bzw. F4 (Verhältnis  $I_{40}/I_{30}$ ). Fraktion 2 stellt eine Übergangsfraction zwischen F1 und F3 dar. Die DOM der Fraktionen F2 bis F4 eluiert trotz des bedeutend höheren Anteils an Carboxylfunktionen bei größeren Elutionsvolumina als die der Fraktion 1. Dies belegt, dass elektrostatische Wechselwirkungen zwischen negativ geladenen funktionellen Gruppen der DOM und des Gelmaterials bei der SEC-Trennung der DOM dieser Fraktionen von untergeordneter Bedeutung sind. Das Verhältnis der Anteile von Carboxylgruppen-C-Atomen zu aromatischen C-Atomen steigt von 0,52 in Fraktion 2 auf 0,69 in Fraktion 4. Die Zunahme dieses Verhältnisses ist ein Indiz für eine abnehmende Molekülgröße der DOM von Fraktion 2 zu Fraktion 4 ((LANKES 2001), siehe auch Kapitel 2.4.4). Die Zunahme des Verhältnisses  $I_{40}/I_{30}$  sowie die ansteigende Fluoreszenzintensität deuten auf einen zunehmenden Anteil an niedermolekularen Fulvinsäuren von F2 zu F4 hin. Auf Grundlage der Ergebnisse der strukturellen Charakterisierung kann somit gefolgert werden, dass die SEC-Fraktionierung im Elutionsbereich der Fraktionen F2 bis F4 überwiegend auf einer Fraktionierung nach unterschiedlichen hydrodynamischen Radien beruht.

Für die Fraktion 5 kann diese Schlussfolgerung nicht gezogen werden. Die Signalverteilung im NMR-Spektrum dieser Fraktion ähnelt der des Ausgangsmaterials. Der der Probe HO12 K b vergleichbare Anteil an Kohlenhydratstrukturen bei einem niedrigeren N/C-Verhältnis der Fraktion 5 deutet auf die Anwesenheit wenig modifizierter Lignocellulosen in F5 hin. Im NMR-Spektrum der Fraktion 5 gibt es im Unterschied zum Spektrum der Ausgangsprobe sowie der Fraktionen F1 bis F4 Indizien, welche charakteristisch für wenig modifizierte Lignin-Derivate sind (z. B. Methoxylgruppensignal bei 56 ppm). Das Verhältnis von Rand- zu Kerngruppen ist mit 0,64 niedriger als in Fraktion 4. Dies sind Hinweise darauf, dass in Fraktion 5 organische Moleküle enthalten sein müssen, welche einen größeren mittleren  $R_e$  besitzen als die von F4. Das

Elutionsverhalten dieser Moleküle muss als Folge einer Beeinträchtigung der Größentrennung durch unspezifische WW betrachtet werden. Aufgrund der verspäteten Elution hochmolekularer Verbindungen kann auf retardierende WW wie hydrophobe Wechselwirkungen, Charge-Transfer-WW oder Wasserstoffbrückenbindungen geschlossen werden. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass derartige WW bei der SEC von lignin- und tannin-verwandten Substanzen auftreten. CATHALA ET AL. (2003) stellten bei der Gelpermeationschromatographie von Ligninen fest, dass deren Radius mit zunehmendem Elutionsvolumen zu- statt abnahm und schlossen daraus auf unspezifische WW (Wasserstoffbrückenbindungen) zwischen den Ligninmolekülen und dem Gelmaterial. FUCHS (1985b) untersuchte das Elutionsverhalten verschiedener aromatischer Naturstoffe an einer TSK HW50-(S)-Säule unter Verwendung eines 0,15 molaren Phosphatpuffers. Das Elutionsverhalten lignin-verwandter, niedermolekularer Verbindungen hing wesentlich von der Art des Substituenten am aromatischen Ring ab. Von Vanillinsäure über Vanillinalkohol bis zum Vanillinaldehyd nahm das Elutionsvolumen auf das 2-, 5- bzw. 8-Fache des theoretischen  $V_e$  zu und korrelierte mit dem Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient der Verbindungen. Für Coniferylalkohol, Ligninsulfonsäure sowie Gallussäure und Tannin beobachtete er eine starke Retardation. FUCHS führte die verspätete Elution auf hydrophobe WW bzw. Charge-Transfer-WW der aromatischen Verbindungen mit Etherbrücken des Gelmaterials zurück. Im Fall der Tannine spielen darüber hinaus möglicherweise Wasserstoffbrückenbindungen eine Rolle. Die besondere Struktur dieser Verbindungen resultiert in einer chemischen Selektion bei der SEC-Trennung. Das Vorkommen wenig modifizierter Lignin-Derivate in Fraktion 5 ist möglicherweise das Ergebnis einer ähnlichen Selektion. Für diese Strukturen muss gefolgert werden, dass die Trennung nach unterschiedlichen hydrodynamischen Radien gegenüber der auf WW beruhenden Trennung in den Hintergrund trat. Es kann vermutet werden, dass auch in den Fraktionen F2 bis F4 ähnliche, wenig modifizierte Lignin-Derivate enthalten sind. Bei gleichzeitiger Anwesenheit anderer, stärker modifizierter Verbindungen treten deren Signale im Spektrum der Fraktionen F2 bis F4 jedoch nicht deutlich hervor. Dies ist erst nach einer relativen Abreicherung der modifizierten Strukturen aus der Probe als Folge der SEC-Trennung möglich. Zur genaueren Klärung dieser Vermutung ist eine weitergehende NMR-spektroskopische Untersuchung erforderlich. Hierbei ist insbesondere eine Abschätzung der relativen Anteile der Methoxylgruppen in den Fraktionen anzustreben.

Für den sogenannten Salzpeak, der als Fraktion 6 gesammelt wurde, ist bekannt, dass es sich hierbei um ein Artefakt und nicht um das Ergebnis einer Größentrennung handelt. Für diese Fraktion konnte wegen des zu geringen Massenanteils an organischem Kohlenstoff im gefriergetrockneten Material kein quantitativ auswertbares NMR-Spektrum aufgenommen werden. Aus



den Ergebnissen der physikochemischen Charakterisierung sowie aus Literaturangaben können jedoch Hinweise auf die chemischen Strukturen dieser Fraktion erhalten werden. Die Abhängigkeit des Elutionsverhaltens der DOM des Salzpeaks von Ionenstärkedifferenzen zwischen Probe und Eluent zeigt, dass es sich hierbei um Moleküle handeln muss, welche beim pH-Wert des Elutionspuffers (pH  $\sim$  7) eine negative Ladung tragen. SPECHT (2002) konnte zeigen, dass das Elutionsverhalten niedermolekularer Monocarbonsäuren wie Essigsäure oder Valeriansäure durch Ionenstärkedifferenzen zwischen Probe und Eluent beeinflusst wird. Bei Injektion ungepufferter Lösungen der Säuren eluierten diese beim gleichen Elutionsvolumen wie der Salzpeak der Braunwasserprobe. Niedermolekulare Dicarbonsäuren traten stets bei  $V_e < V_p$  auf und können somit als Bestandteile des Salzpeaks ausgeschlossen werden. BRINKMANN konnte niedermolekulare Mono- und Dicarbonsäuren mittels Ionenchromatographie und Kapillarelektrophorese als Produkte nach photochemischem Abbau der Braunwasserprobe nachweisen. Die neugebildeten Verbindungen waren nach der Bestrahlung der Probe im SEC-Chromatogramm als Peaks bei den charakteristischen Elutionsvolumina der Di- und Monocarbonsäuren erkennbar (BRINKMANN 2003). Auf der Basis der Ergebnisse von SPECHT (2002) und BRINKMANN (2003) können niedermolekulare Monocarbonsäuren als wichtige Bestandteile der Fraktion 6 betrachtet werden. Darüber hinaus müssen jedoch noch weitere Verbindungen vorliegen. Einfache aliphatische Carbonsäuren zeigen bei 254 nm keine UV-Absorption. Die DOM der Fraktion 6 zeichnet sich dagegen sowohl durch UV-Aktivität als auch durch Fluoreszenzvermögen aus. Aus diesen Eigenschaften kann auf die Anwesenheit aromatischer Strukturen, beispielsweise aromatischer Carbonsäuren geschlossen werden. Das Elutionsverhalten monocyclischer aromatischer Carbonsäuren hängt nach SPECHT (2002) stark von Art und Anzahl der funktionellen Gruppen am aromatischen Ring ab. Eine einheitliche Elution verschiedener aromatischer Carbonsäuren bei  $V_p$  konnte er nicht beobachten. Die Experimente mit Modellsubstanzen erlauben daher mit Ausnahme der niedermolekularen aliphatischen Monocarbonsäuren keine Zuordnung bestimmter Verbindungen zu dieser Fraktion. Für die DOM der Fraktion 6 ist, ebenso wie für die anderen Fraktionen, davon auszugehen, dass eine Vielzahl an Verbindungen unterschiedlicher Struktur vorliegt. Die Gewinnung ausreichender Mengen an organischem Material oder der Einsatz alternativer NMR-Methoden ermöglicht unter Umständen eine Identifikation und Quantifizierung der funktionellen Gruppen dieser DOM-Fraktion.

Die Lagerung und Filtration der Probe HO12 K b sowie die SEC-Fraktionierung und insbesondere die Dialyse der SEC-Fraktionen waren mit hohen Verlusten an gelöster organischer Substanz verbunden. Dies hatte zur Folge, dass nur etwa ein Viertel der in der Probe HO12 K (1996) enthaltenen DOM strukturell charakterisiert werden konnten (23 %; 335 mg C in den

SEC-Fractionen nach Dialyse von ursprünglich 1,646 L mit DOC = 877 mg/L, entsprechend 1444 mg C). Dennoch konnte mit Hilfe der NMR-spektroskopischen Analyse gezeigt werden, dass strukturelle Unterschiede zwischen den SEC-Fractionen bestehen. Dies gilt insbesondere für die Fraktion 1, deren chemische Strukturen sich grundlegend von denen der restlichen Fractionen unterschieden. Aus der Beobachtung, dass den verschiedenen Elutionsbereichen des SEC-Chromatogramms der Braunwasserprobe unterschiedliche chemische Strukturen zugeordnet werden können, folgt jedoch nicht eindeutig auch eine chemische Selektivität dieser Fraktionierungsmethode. Für einen Teil der DOM der Fraktion 5 wird auf der Grundlage der NMR-Daten eine chemische Selektivität als Trennprinzip angenommen. Die Ergebnisse der strukturellen Charakterisierung der SEC-Fractionen F1 bis F4 legen im Gegensatz hierzu die Schlussfolgerung nahe, dass die Fraktionierung in diesen Elutionsbereichen überwiegend auf Größenunterschieden beruht.

#### 4.5.2 Fraktionierung mittels mst-UF (Probe HO21 K)

In Kapitel 4.4 wurde gezeigt, dass sowohl mittels SEC als auch durch mehrstufige Ultrafiltration DOM-Fractionen hergestellt werden können, die sich in ihrer Molekülgrößenverteilung voneinander unterscheiden. In Ergänzung zur strukturellen Charakterisierung von SEC-Fractionen der Braunwasserprobe sollten Ultrafiltrationsfractionen hergestellt und mittels  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektroskopie analysiert werden. Durch Vergleich der Strukturdaten der SEC- und mst-UF-Fractionen sollte beurteilt werden, inwieweit eine Übereinstimmung der Charakteristika beider Fractionen besteht. Die Probe HO21 wurde im Juli 2001 entnommen, filtriert und anschließend durch UF über eine Membran aus regenerierter Cellulose (MWCO = 1000 g/mol) angereichert (vergleiche Kap 4.3.2). Das Konzentrat HO21 K wurde zweigeteilt. Jedes Aliquot wurde, wie in Abbildung 3.1 dargestellt, fraktioniert. Die Fraktionierung im Dreifachansatz durchgeführt. Die Replikate jeder Fraktion aus beiden Fraktionierungen wurden anschließend vereinigt. Von den Fractionen F1 bis F3 (nominelle Molmasse > 3000 g/mol) sowie der Originalprobe konnten ausreichende Mengen für  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-spektroskopische Untersuchungen gewonnen werden. Für die Fractionen F4 und F5 (nominelle Molmasse < 3000 g/mol) war dies aufgrund zu geringer Substanzmengen nicht möglich.

#### 4.5.2.1 Molekülgrößenverteilung und Basisparameter der Fraktionen

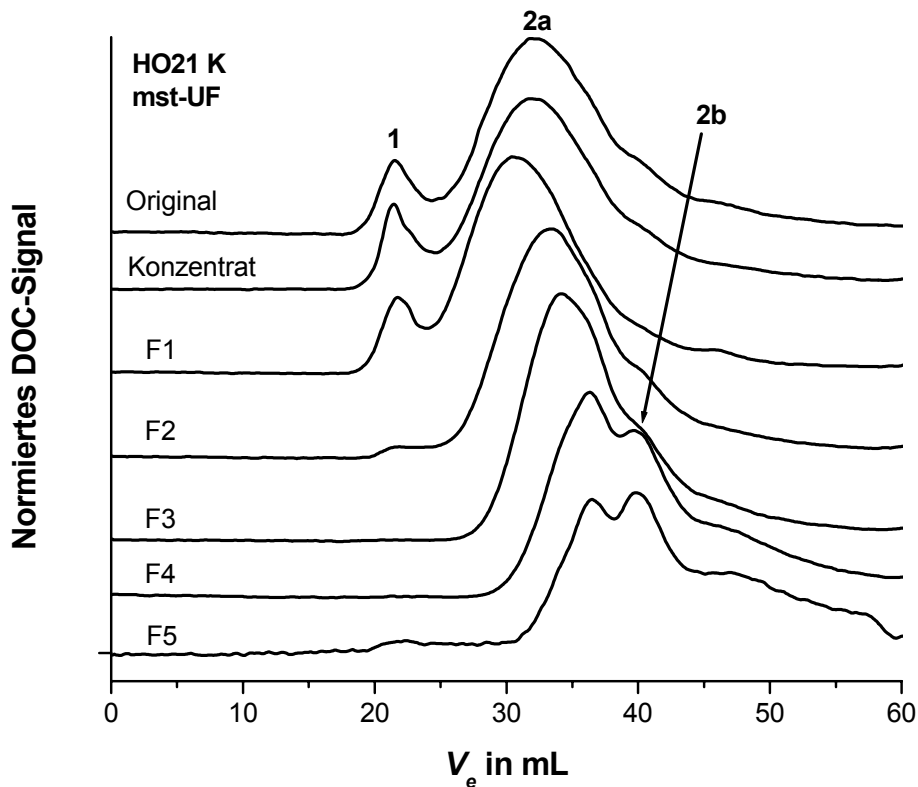
Nach der Anreicherung der Probe waren 91 % des DOC von HO21 im Konzentrat enthalten und standen für die weitere Fraktionierung zur Verfügung (Tab. 4.19). Die Fraktionen F1 bis F4 enthielten 86 % des gelösten organischen Kohlenstoffs. Bei der Fraktionierung trat somit ein Verlust von 5 % des DOC der Ausgangsprobe HO21 auf. Mehr als 60 % des DOC wurden in Fraktion 1 gesammelt, während die restlichen Fraktionen jeweils maximal 11 % des DOC enthielten. Während der Herstellung der Fraktion 1 unter Verwendung der UF-Membran YM30 wurde eine rasche Abnahme des Permeatflusses bereits innerhalb der ersten Stunde der Filtration beobachtet. Darüber hinaus kam es zu einer intensiven Braunfärbung der Membran. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde auf eine Deckschichtbildung auf der Membran geschlossen. Der dadurch bedingte DOC-Verlust war jedoch gering.

**Tab. 4.19:** Basisparameter und DOC-Bilanz der mst-UF-Fraktionierung der Probe HO21 K. DOC-Angaben: MW $\pm$  1 s für  $n = 3$ .

Probe	DOC in mg/L	DOC-Anteil in %	$\kappa$ in $\mu$ S/cm	pH- Wert	$SUVA_{254}$ in L/(m mg)	$SUVA_{436}$ in L/(m mg)
HO21	22,1 $\pm$ 0,1	100	32	4,5	4,77	0,42
K	104 $\pm$ 9	91	76	3,9	4,72	0,39
F1	208 $\pm$ 14	63	158	3,5	6,64	0,63
F2	48,3 $\pm$ 0,2	10	65	3,8	4,60	0,28
F3	51,3 $\pm$ 0,4	11	52	4,2	4,18	0,21
F4	8,3 $\pm$ 0,2	2	24	5,6	3,06	0,14
F5	2,4 $\pm$ 0,1	9	8	5,9	2,60	0,09

Die Fraktionen wiesen, ähnlich wie die mst-UF-Fraktionen der Probe HO12 K, relativ breite Molekülgrößenverteilungen auf (Abb. 4.35). Peak 1 wurde nur in der Originalprobe, dem Konzentrat und in den Fraktionen F1 und F2 (nominelle Molmasse > 10000 g/mol) detektiert. Der Flächenanteil dieses Peaks an der Gesamtfläche des chromatographierbaren DOC nahm von 9 % im Original auf 10 % bzw. 11 % in HO21 K und F1 zu. In Fraktion 2 betrug der Flächenanteil weniger als 2 % des chromatographierbaren DOC. Peak 1 war bei der SEC-Fraktionierung der Braunwasserprobe HO12 K b als Fraktion 1 isoliert worden (Kap. 4.5.1) Die Anreicherung der DOM dieses Peaks im Konzentrat der YM30-Membran (mst-UF-Fraktion F1) bestätigt, dass es sich hierbei um hochmolekulare Verbindungen handelt. Peak 2b trat im Gegensatz zu Peak 1 vor allem in den nominell niedermolekularen Fraktionen F4 und F5 auf. Aufgrund des Elutionsvolumens dieses Peaks kann ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um den Salz-

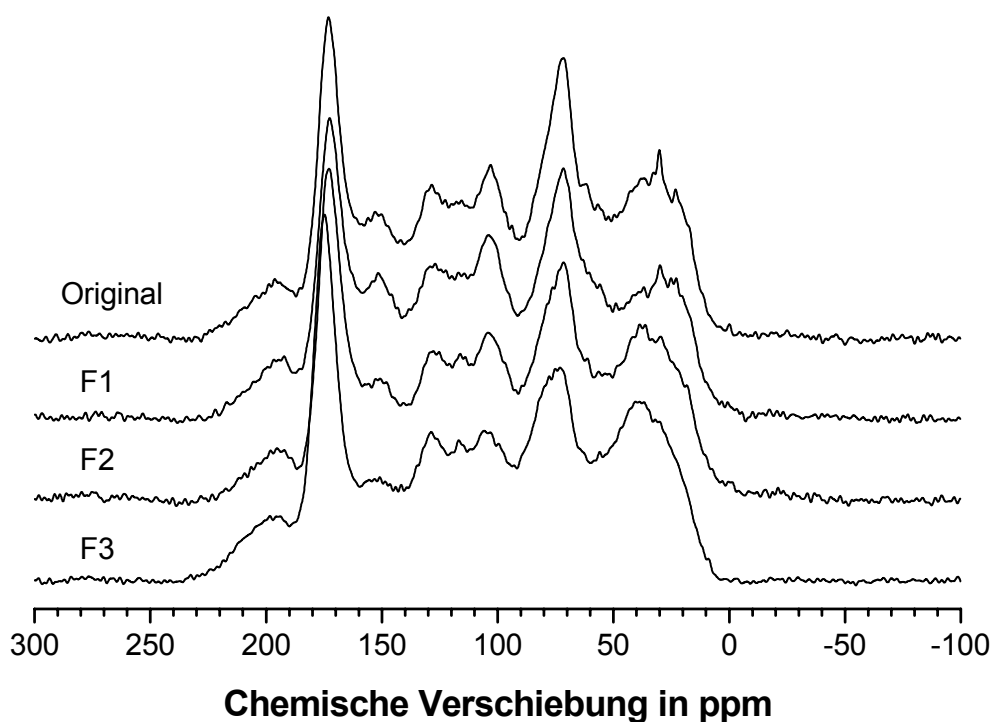
peak handelt. Auffällig ist ein Shift des Peakmaximums in F1 zu einem kleineren  $V_e$ -Wert gegenüber dem Original. Diese Verschiebung ist eine Folge der Anreicherung größerer Moleküle in und des Verlustes kleinerer Moleküle aus dieser Fraktion. Mit ansteigender Fraktionsnummer ist ab F2 eine Verschiebung des Peakmaximums zu größeren  $V_e$ -Werten erkennbar. Die SEC-Analyse bestätigt somit, dass mit der mehrstufigen Ultrafiltration Fraktionen unterschiedlicher Molekülgrößenverteilungen hergestellt werden konnten. In den mst-UF-Fractionen nahm der Anteil hochmolekularer Verbindungen von F1 zu F5 ab und der Anteil niedermolekularer Verbindungen zu. Niedermolekulare DOM war jedoch auch zu einem bedeutenden Anteil insbesondere im Konzentrat der YM30-Membran enthalten. Als Ursache hierfür wird eine Deckschichtbildung (Oberflächen- bzw. Porenfouling) angesehen, welche aufgrund der hohen DOC-Konzentration der Probe HO21 K bei der Membran YM30 besonders stark ausgeprägt war. Die Deckschichtbildung, insbesondere das Porenfouling, führt zu einer Änderung der Trenngrenze der UF-Membran und damit zu einem verstärkten Rückhalt von Molekülen mit kleinen hydrodynamischen Radien (STAUDE 1993). Der in F1 enthaltene DOC-Anteil von mehr als 60 % muss folglich auf der Basis der nominellen Trenngrenze als zu hoch betrachtet werden und spiegelt nicht die tatsächliche Molekülgrößenverteilung der Braunwasserprobe wider.



**Abb. 4.35:** SEC-Chromatogramme der Proben HO21, HO21 K und der mst-UF-Fractionen F1 bis F5. Analytisches System, TKS HW 50-(S)-Säule, Eluent 1, Proben gepuffert.

#### 4.5.2.2 $^{13}\text{C}$ MAS NMR-spektroskopische Charakterisierung der Fraktionen

Die Ergebnisse der  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-spektroskopischen Untersuchungen der Originalprobe sowie der Fraktionen F1, F2 und F3 sind in Abbildung 4.36 und Tabelle 4.20 dargestellt. Die Ergebnisse der Elementaranalyse sind in Tabelle 4.21 angegeben. Aufgrund geringer Probemengen wurden nur die Gehalte an Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff bestimmt. Für die Braunwasserprobe ist bekannt, dass sie einen sehr niedrigen Aschegehalt von etwa 4 bis 5 % aufweist. Im Konzentrat der UF-Membran (Probe HO12 K) ist dieser mit 3,5 % geringer als in der Original-Braunwasserprobe (ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002). Für die vorliegende Probe HO21 K können ähnliche Werte angenommen werden. Die C-, H- und N-Gehalte können somit als zuverlässig betrachtet werden. Der Sauerstoffgehalt der Originalprobe beträgt etwa 40 % (ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002).



**Abb. 4.36:**  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektren der Probe HO21 und der mst-UF-Fraktionen F1, F2 und F3.

**Tab. 4.20:** Integrationsdaten der chemischen Verschiebungsbereiche der  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektren der Probe HO21 K und Fraktionen F1, F2 und F3. <sup>1</sup>: Berechnete Werte.

Probe	Relativer Kohlenstoffanteil in %					
	Carbonyl C	Carboxyl C	Aromaten		O-Alkyl C	Aliphatic C
	220-190 ppm	190-160 ppm	O/N-subst. 160-140 ppm	C/H-subst. 140-100 ppm	100-50 ppm	50-0 ppm
HO21	4,1	17,5	8,4	20,3	29,7	19,9
F1	4,2	17,7	9,3	21,7	29,0	18,0
F2	3,6	18,2	8,1	20,5	28,8	20,7
F3	5,4	20,0	7,3	19,7	27,9	19,7
<i>F4 + F5 +Verlust<sup>1</sup></i>	<i>3,4</i>	<i>14,8</i>	<i>5,6</i>	<i>14,6</i>	<i>34,4</i>	<i>27,2</i>

**Tab. 4.21:** Elementaranalytische Daten der Probe HO21 K und Fraktionen F1, F2 und F3. <sup>1</sup>: Berechnete Werte.

Probe	Massenanteil in %			Elementverhältnisse	
	C	H	N	H/C	N/C
HO21	47,7	3,9	1,5	0,974	0,028
F1	48,2	3,7	1,2	0,926	0,021
F2	44,7	3,4	1,0	0,918	0,019
F3	43,9	3,2	1,1	0,874	0,021
<i>F4 + F5 +Verlust<sup>1</sup></i>	<i>50,3</i>	<i>5,3</i>	<i>3,6</i>	<i>1,246</i>	<i>0,061</i>

Zwischen der Originalprobe und den Fraktionen F1, F2 und F3 waren, ähnlich wie für die SEC-Fraktionen der Probe HO12 K b, strukturelle Unterschiede erkennbar. Diese waren jedoch im Gegensatz zu den SEC-Fraktionen infolge der breiteren Molekülgrößenverteilung der mst-UF-Fraktionen weniger deutlich ausgeprägt. Anders als bei den SEC-Fraktionen unterschied sich keine der mst-UF-Fraktionen derart signifikant von der restlichen DOM wie die SEC-Fraktion 1 der Probe HO12 K b. Änderungen der relativen Anteile funktioneller Gruppen waren vor allem in den chemischen Verschiebungsbereichen der O-Alkyl-Strukturen (100 bis 50 ppm), des carboxylischen (190 bis 160 ppm) sowie des aliphatischen Kohlenstoffs (50 bis 0 ppm) zu erkennen. Innerhalb des O-Alkyl-Kohlenstoffbereiches nahm der relative Anteil an Kohlenhydraten (~ 71 ppm) von der Originalprobe über F1 zu F3 ab. Damit war eine Abnahme der

Intensität des Methylgruppensignals (23 ppm) verbunden. Infolge des abnehmenden Gehaltes an Kohlenhydraten und Methylgruppen nahm das H/C-Verhältnis von HO21 zu F3 ebenfalls um etwa 10 % ab. Das N/C-Verhältnis ist in Fraktion 3 ebenfalls niedriger als in der Ausgangsprobe. Die Ergebnisse der NMR- und Elementaranalyse lassen auf eine Abreicherung von N-acetylierten Kohlenhydraten während der Fraktionierung schließen (LANKES 2001). Die Abnahme des Kohlenhydrat-Gehaltes von Fraktion 1 zu Fraktion 3 stimmt mit der Abnahme des Flächenanteils von Peak 1 (Abb. 4.35) überein. Aus den Experimenten der SEC-Fraktionierung mit nachfolgender struktureller Charakterisierung ist bekannt, dass dieser Anteil der DOM hauptsächlich aus Kohlenhydratstrukturen besteht (Kap. 4.5.1.3). Der Gehalt an Methylengruppen (30 ppm) überwog in der Originalprobe sowie in Fraktion 1. Verzweigte aliphatische Strukturen (CH-Gruppen bei 40 ppm) und Carboxylfunktionen waren gegenüber der Originalprobe und den Fraktionen F1 und F2 in Fraktion 3 angereichert. Trotz unterschiedlicher Durchführungsweisen der Ultrafiltration stimmen die Ergebnisse gut mit denjenigen von LANKES (2001) überein. LANKES konnte zeigen, dass Kohlenhydrate nach der Mikro- (0,45  $\mu\text{m}$  bzw. 0,1  $\mu\text{m}$ ) und Ultrafiltration (10000 g/mol) der Braunwasserprobe in den Filtrerrückständen und Deckschichten sowie im Konzentrat der UF-Membran angereichert und in der Permeatfraktion abgereichert waren. Verzweigte Aliphaten waren dagegen im Permeat der UF-Membran angereichert.

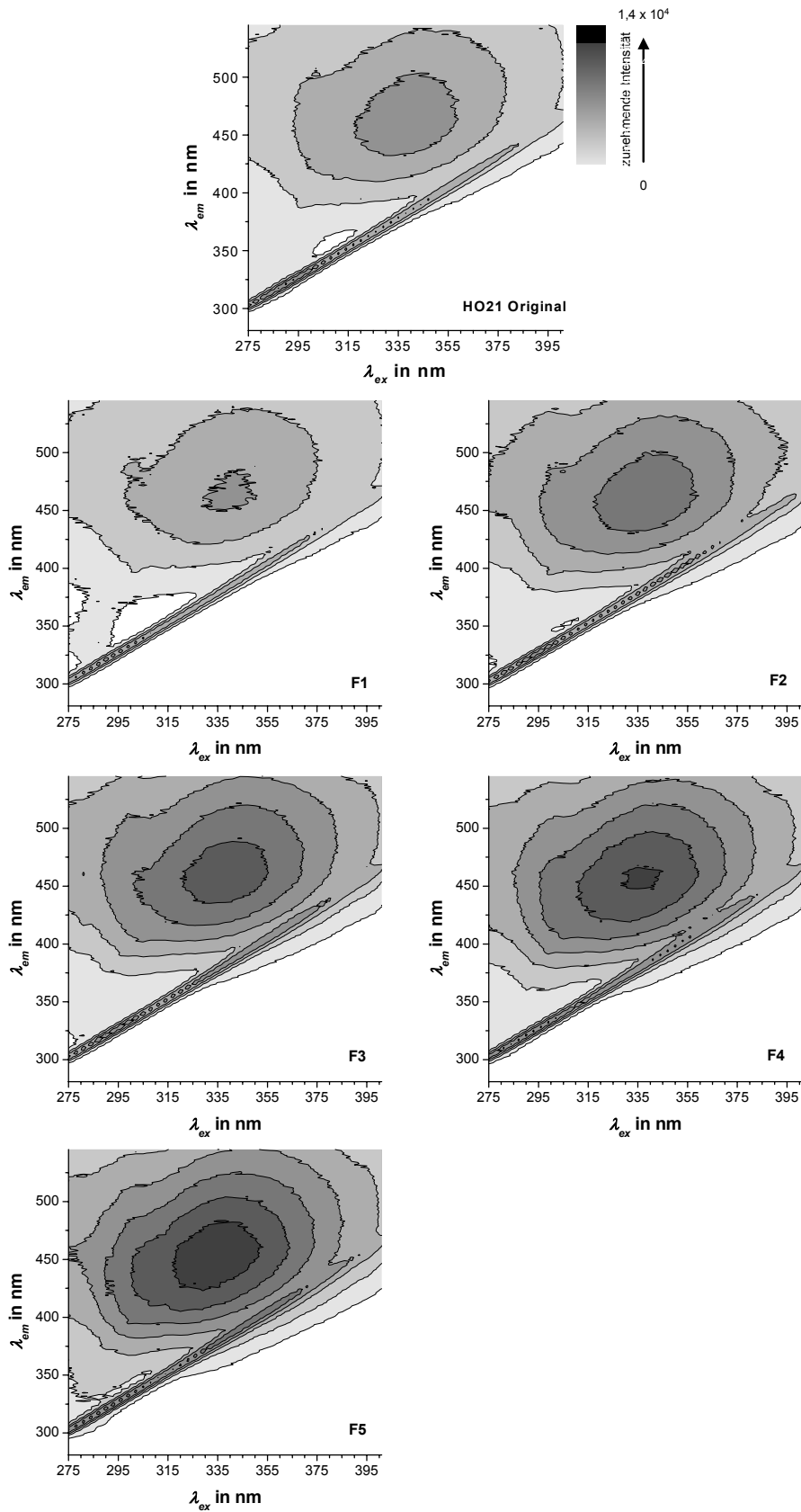
Die Bezeichnung "F4, F5 + Verlust" in den Tabellen 4.20 und 4.21 bezieht sich auf den Anteil der DOM, der nicht durch NMR-spektroskopische oder elementaranalytische Untersuchungen charakterisiert werden konnte. Dies entspricht der in den Fraktionen F4 und F5 enthaltenen DOM (11 % des DOC) sowie des bei der Anreicherung und Fraktionierung verlorengegangenen Materials (5 % des DOC; Deckschichtmaterial). Die NMR- und Elementaranalyse-Daten für diesen Anteil der DOM wurden auf der Grundlage von Massenbilanzen unter Verwendung der relativen DOC-Anteile der Fraktionen F1 bis F3 berechnet. Die Werte deuten darauf hin, dass dieser Anteil der DOM einen aliphatischeren Charakter als die Originalprobe und die Fraktionen F1 bis F3 besitzt. Stickstoffhaltige und O-Alkyl-Strukturen sind in dieser kollektiven Fraktion deutlich angereichert, wogegen Carboxylfunktionen und Aromaten gegenüber der Originalprobe abgereichert wurden. Anhand der berechneten Daten wird deutlich, dass die strukturellen Unterschiede zwischen dieser kollektiven Fraktion und der Originalprobe bzw. den Fraktionen F1 bis F3 wesentlich größer sind als die Unterschiede zwischen der Probe HO21 und den Fraktionen F1, F2 und F3. Eine Zuordnung der verschiedenen Strukturen zu den Fraktionen F4 oder F5 bzw. oder zum verlorengegangenen Material auf der Grundlage dieser Berechnungen ist nicht möglich. LANKES (2001), GORENFLO (2003) und SARAVIA ET AL. (2003) konnten durch experimentelle Bestimmung eine Anreicherung von Kohlenhydraten in Membrandeckschichten nach-

weisen. Die Anreicherung von O-Alkyl- und N-haltigen Strukturen kann folglich zum Teil dem Deckschichtanteil der kollektiven Fraktion zugeordnet werden. Die chemischen Strukturen der DOM der Fraktionen F4 und F5 können nur durch experimentelle Bestimmung aufgeklärt werden.

Die spezifische UV-Absorption der mst-UF-Fraktionen war in Fraktion 1 am höchsten und nahm mit abnehmender nomineller Molekülgröße der DOM ab (Tab. 4.19). Auf eine Korrelation der  $SUVA_{254}$ -Werte mit den Aromatenanteilen wird hier aufgrund der geringen Unterschiede zwischen den Anteilen aromatischer Strukturen an der DOM der Fraktionen verzichtet. Der gewichtete  $SUVA_{254}$  aller Fraktionen (F1 bis F5) betrug 5,4 L/(m mg) und war somit höher als der des Konzentrats. Hieraus kann geschlossen werden, dass bei der mst-UF-Fraktionierung im Gegensatz zur SEC-Fraktionierung vor allem DOM verloren ging, welche eine niedrige spezifische UV-Absorption besitzt. Dies trifft auf die bereits erwähnten Kohlenhydrate zu, welche nach Filtration der Braunwasserprobe als Bestandteile von Filterrückständen und Membrandeckschichten nachgewiesen werden konnten (LANKES 2001).

In den Excitation-Emission-Matrices der Originalprobe, des Konzentrats und der mst-UF-Fraktionen ist, ähnlich wie bei den SEC-Fraktionen der Probe HO12 K b, das für Huminstoffe charakteristische Maximum der Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von etwa 340 nm und einer Emissionswellenlänge von etwa 450 bis 460 nm erkennbar (Abb. 4.37). Im Unterschied zu den SEC-Fraktionen der Probe HO12 K b wurden keine weiteren Maxima beobachtet. Die Intensität der Fluoreszenz war in den Fraktionen F5 und F4 am stärksten. Im Gegensatz zu den SEC-Fraktionen F1 und F2 war hier auch in den mst-UF-Fraktionen F1 und F2 eine Fluoreszenzintensität detektierbar. Dies ist auf die Anwesenheit niedermolekularer DOM in den mst-UF-Fraktionen zurückzuführen.





**Abb. 4.37:** EEM der Probe HO21 und der mst-UF-Fractionen F1 bis F5.  $\lambda_{ex}$  = 275 bis 401 nm,  $\Delta$  = 3 nm,  $\lambda_{em}$  = 281 bis 545 nm,  $\Delta$  = 1 nm; spektrale Bandbreite 3,2 nm. Proben mit Reinstwasser verdünnt, DOC = 2,4 mg/L.

Die Untersuchung der mst-UF-Fractionen mittels SEC zeigte, dass vor allem im Konzentrat der YM30-Membran (Fraktion 1) noch ein bedeutender Anteil an niedermolekularen Verbindungen enthalten war (Abb. 4.35). Die SEC-Chromatogramme benachbarter Fraktionen zeigten zum Teil deutliche Überlappungen. Die mittels Ultrafiltration erreichbare Trennqualität war eingeschränkter gegeben als die der SEC-Fraktionierung. Dennoch konnten strukturelle Unterschiede zwischen den mst-UF-Fractionen der Braunwasserprobe nachgewiesen werden. Die physikochemischen Eigenschaften der mst-UF- und SEC-Fractionen werden abschließend verglichen.

#### 4.5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der SEC- und mst-UF-Fraktionierung der Braunwasserproben

Zwischen den SEC-Fractionen F1 bis F4 und den mst-UF-Fractionen F1 bis F3 der Braunwasserprobe wurden trotz der unterschiedlichen chemischen Strukturen der Ausgangsproben (HO12 K b und HO21 K) sowie der unterschiedlichen Molekülgrößenverteilungen der Fractionen Übereinstimmungen bezüglich der Eigenschaften der Fractionen gefunden. In den Fractionen beider Methoden war der Anteil an Kohlenhydraten und Methylgruppen in der nominell hochmolekularen Fraktion F1 am größten und nahm mit ansteigender Fraktionsnummer ab. Die relativen Anteile der Carboxylfunktionen, der verzweigten Aliphaten und der verzweigten O-Alkylstrukturen sowie das Fluoreszenzvermögen der DOM nahmen dagegen mit abnehmender nomineller Molekülgröße der Fractionen zu. Hieraus kann auf eine Zunahme des Gehaltes an Fulvinsäuren in den Fractionen geschlossen werden. Dies ist ein Indiz für eine Abnahme der mittleren Molekülgröße der Fractionen. Eine Abnahme des Anteils an Kohlenhydraten mit abnehmender Molekülgröße wurde auch von anderen Autoren sowohl für SEC- als auch für UF-Fractionen aquatischer und pedogener Huminstoffe festgestellt. Für die Carboxylfunktionen wurde stets eine Zunahme der relativen Anteile mit abnehmender Molekülgröße der Fractionen beobachtet (SWIFT ET AL. 1992, PELEKANI ET AL. 1999, CHRISTL ET AL. 2000, LANKES 2001, KHALAF ET AL. 2003). Die übereinstimmenden Ergebnisse für verschiedene Ausgangsproben und Fraktionierungsmethoden deuten darauf hin, dass die Fraktionierung der DOM dieser Probe mit beiden Methoden überwiegend auf der Grundlage unterschiedlicher hydrodynamischer Radien der Probenbestandteile beruht.

Die NMR-Daten ermöglichen weitere Aussagen hinsichtlich der Molekülgröße der DOM, die diese Schlussfolgerung unterstützen. Die Zunahme des Verhältnisses von End- zu "core"-Gruppen (Carboxylfunktionen, Methylgruppen gegenüber aromatischen Strukturen) sowie der

Signalintensitäten der verzweigten Aliphaten von Fraktion 2 zu F4 (SEC) bzw. von Fraktion 1 zu F3 (mst-UF) zeigt, dass die Anteile modifizierter Strukturen in den Fraktionen höherer Ordnungsnummern erhöht sind. Die Modifizierung der chemischen Strukturen der Vorläufer-substanzen der Huminstoffe durch aeroben biologischen Abbau ist mit einer Zunahme des Oxidationsgrades (COOH-Gruppen) und einer Verringerung der Molekülgröße verbunden (SWIFT ET AL. 1992, LANKES 2001). Die NMR-Daten bestätigen in Bezug auf die genannten Fraktionen folglich, dass mit beiden Fraktionierungsmethoden eine Größenfraktionierung erzielt werden konnte. Für die SEC-Fraktionen F5 und F6 sowie für die mst-UF-Fraktionen F4 und F5 ist ein derartiger Schluss dagegen nicht möglich.

Durch den Einsatz unabhängiger Analysenmethoden (AF<sup>4</sup> für SEC-Fraktionen; SEC für mst-UF-Fraktionen) konnte gezeigt werden, dass sich die Fraktionen beider Methoden in ihren Molekülgrößenverteilungen voneinander unterscheiden. Beide Methoden eignen sich zur Herstellung von Größenfraktionen für die strukturelle Charakterisierung. Diese Schlussfolgerung muss jedoch mit Einschränkungen versehen werden. Bei der Ultrafiltration kam es zur Deckschichtbildung und damit zu einer Veränderung der Trenneigenschaften der Membran (Membranfouling). Dies betraf insbesondere die Membran YM30 (MWCO = 30000 g/mol) und hatte eine Verschlechterung des Trennergebnisses für Fraktion 1 zur Folge. Für die SEC-Fraktionierung muss auf Grundlage der NMR-Ergebnisse angenommen werden, dass im Fall der Fraktion 5 eine Beeinträchtigung der Größentrennung durch unspezifische Wechselwirkungen zwischen Gelmaterial und DOM vorlag. Für die in Fraktion 6 enthaltene DOM (Salzpeak) ist bekannt, dass in diesem Fall eine Beeinträchtigung der Größentrennung durch unspezifische WW zwischen stationärer Phase und DOM vorliegt. Ein Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der chemischen Strukturen dieser Artefakt-Fraktion. Das Auftreten des Salzpeaks wurde daher bei der SEC-Fraktionierung der Probe HO12 K b bewusst herbeigeführt. Durch die Wahl geeigneter experimenteller Bedingungen kann das Auftreten dieses Peaks jedoch vermieden werden. Wegen zu geringer Probenmengen sowie wegen des hohen Aschegehalts (SEC-Puffersalze) dieser Fraktion konnte kein quantitativ auswertbares NMR-Spektrum von dieser Fraktion erhalten werden. Die Untersuchung dieser Fraktion sollte daher Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein.

Ein entscheidender Vorteil der SEC- gegenüber der mst-UF-Methode ist die Tatsache, dass einzelne, im SEC-Chromatogramm erkennbare Peaks gezielt in eigenständigen Fraktionen isoliert werden können. Dies ermöglicht eine detaillierte strukturelle Charakterisierung einzelner Elutionsbereiche des Chromatogramms. In der SEC-Fraktion 1 wurde der mit Peak 1 bezeichnete Peak der Probe HO12 K b (Abb. 4.20) isoliert. Dieser Peak kann im SEC-Chromatogramm der

Braunwasserprobe sowohl mittels UV- als auch mittels DOC-Detektion nachgewiesen werden. Die Abtrennung dieser Fraktion (Peak 1) von den Hauptfraktionen der DOM aus dem Hohlohsee (Peak 2) gelingt nur mit Hilfe der TSK HW 50-(S)- und der Superdex-Säule. Die TSK HW 40-(S)-Säule ist hierfür wegen des niedrigeren Trennbereiches dieses Säulenmaterials nicht geeignet. Durch die NMR-spektroskopische Analyse der DOM der SEC-Fraktion 1 konnte gezeigt werden, dass sich diese Fraktion grundlegend von den restlichen SEC-Fractionen sowie der Ausgangsprobe unterscheidet. In dieser Fraktion waren Kohlenhydrate in hohem Ausmaß gegenüber der Ausgangsprobe sowie den SEC-Fractionen F2 bis F5 angereichert. Peak 1 konnte mittels SEC-Analyse auch als Bestandteil der Braunwasserprobe HO21, des Ultrafiltrationskonzentrats HO21 K sowie der mst-UF-Fraktion F1 nachgewiesen werden. Das Auftreten dieses Peaks im Konzentrat der YM30-Membran zeigt, dass es sich hierbei um höhermolekulare Verbindungen handelt und bestätigt damit die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie. Auch in Filtrerrückständen und Deckschichtmaterial von UF-Membranen sowie im UF-Konzentrat der Braunwasserprobe (MWCO = 10000 g/mol) wurde eine Anreicherung von Kohlenhydraten beobachtet. (LANKES 2001, GORENFLO 2003, SARAVIA ET AL. 2003). Auf Grundlage der Ergebnisse der SEC- und mst-UF-Fraktionierung sowie anhand des Vergleichs mit Literaturdaten (LANKES 2001) kann festgestellt werden, dass in der Braunwasserprobe neben Fulvin- und Huminsäuren eine hochmolekulare Fraktion existiert, welche zu einem überwiegenden Anteil aus Kohlenhydraten besteht (O-Alkylanteil ca. 50 %). Der Anteil dieser Fraktion am Gesamt-DOC beträgt weniger als 10 %. Diese Kohlenhydratstrukturen werden bei verschiedenen Fraktionierungsmethoden übereinstimmend in den Fraktionen mit der größten nominellen Molekülgröße angereichert oder durch Überführung in den unlöslichen Zustand aus der Lösung abgereichert.

Die obigen Ausführungen beziehen sich nur auf die Fraktionierung der gelösten organischen Substanz des Hohlohsees. Dies gilt insbesondere für die Schlussfolgerung, dass die Fraktionierung der DOM dieser Probe bei beiden Methoden überwiegend auf der Grundlage unterschiedlicher hydrodynamischer Radien beruht. Eine Übertragung dieser Schlussfolgerung auf DOM anderer Herkunft ohne experimentelle Überprüfung ist nicht möglich. Die Existenz einer Fraktion, die sich strukturell grundlegend von der restlichen DOM unterscheidet (Fraktion 1), kann dagegen auch für DOM anderen Ursprungs als wahrscheinlich angesehen werden. Sowohl HUBER UND FRIMMEL (1996) als auch HER ET AL. (2003) stellten für DOM unterschiedlichen Ursprungs (Grundwasser, Oberflächengewässer, Abwasser) fest, dass sich die bei der SEC am Ausschlussvolumen eluierende Fraktion in ihren spektroskopischen Eigenschaften (Absorption, Fluoreszenzvermögen) deutlich von der restlichen DOM unterscheidet. Dies ist ein Indiz dafür,

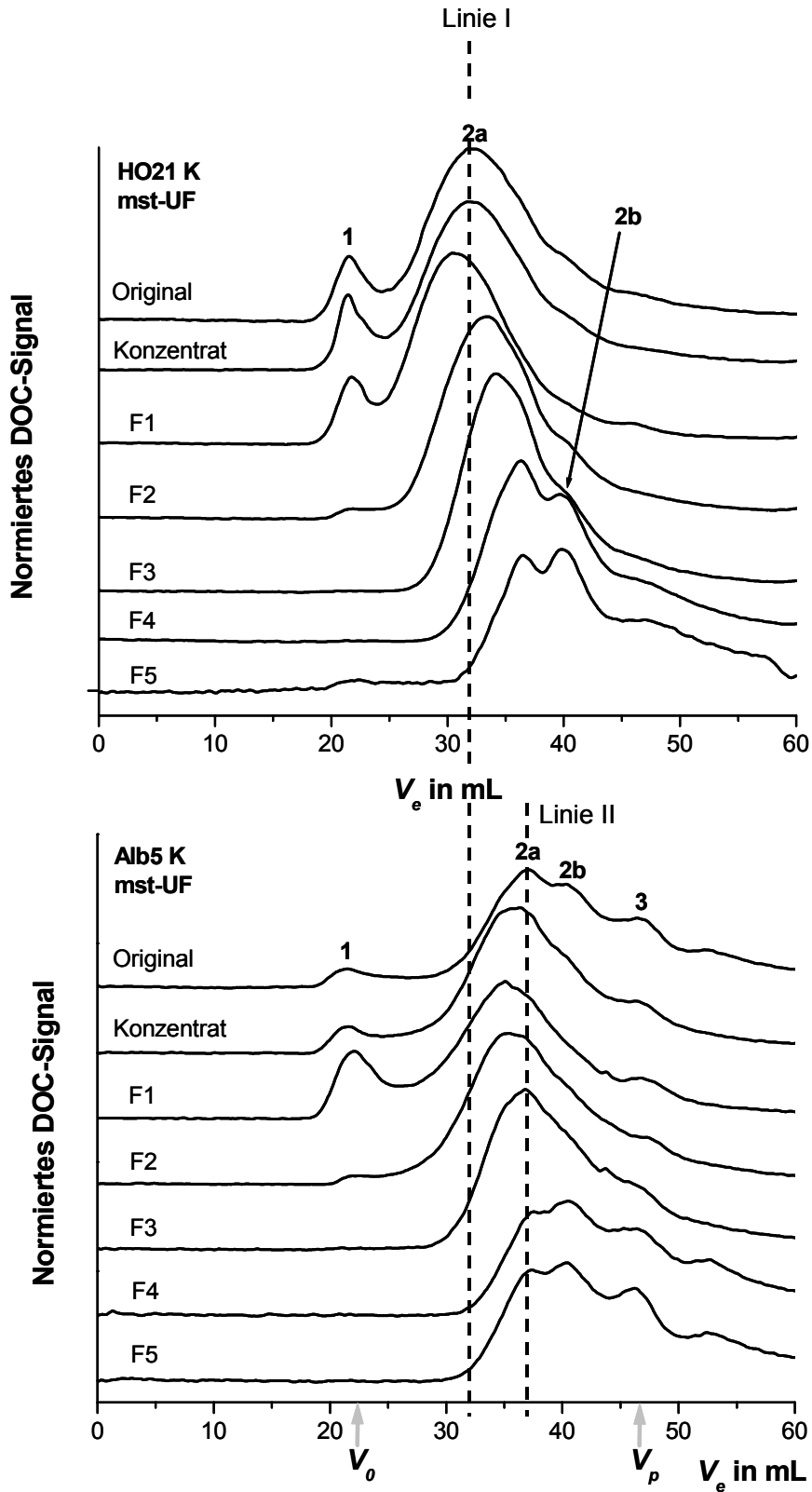
dass Unterschiede in den chemischen Strukturen der verschiedenen Fraktionen der jeweiligen DOM zugrunde liegen. Der experimentelle Nachweis durch den Einsatz strukturselektiver Methoden (z. B. NMR-Spektroskopie) steht jedoch für viele der unter Verwendung analytischer Methoden fraktionierten Proben noch aus. Für die Braunwasserprobe konnte dieser Nachweis hier bereits erbracht werden.

#### **4.6 Fraktionierung gelöster organischer Substanz anthropogenen Ursprungs (Alb5)**

Die Braunwasserprobe (HO21) und die aus dem Kläranlagenablauf entnommene Probe (Alb5 bzw. ABV) unterscheiden sich sowohl in ihren Molekülgrößenverteilungen als auch in ihren chemischen Strukturen (Kap. 4.3.2, LANKES 2001, FRIMMEL ET AL. 2002). Dies lässt auch für die mst-UF-Fractionen beider Proben Unterschiede erwarten. Durch die physikochemische Charakterisierung von mst-UF-Fractionen unter Verwendung verschiedener Summenparameter (Molekülgrößenverteilung der Fraktionen, *SUVA*, Fluoreszenz) sollten Unterschiede zwischen den Fraktionen beider Proben herausgearbeitet werden. Eine strukturelle Charakterisierung (NMR-spektroskopische Analyse) der Alb5-Fractionen war aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse sind daher auch als Anknüpfungspunkte für zukünftige Arbeiten zu betrachten.

##### 4.6.1 Molekülgrößenverteilung und Basisparameter der mst-UF-Fractionen

Die für die beiden Originalproben dargestellten Unterschiede hinsichtlich der Molekülgrößenverteilung der gesamten DOM (Kap. 4.3.2) sind auch in den SEC-Chromatogrammen der mst-UF-Fractionen beider Proben (HO21 K und Alb5 K) zu erkennen (Abb. 4.38). Die Molekülgrößenverteilung der Probe Alb5 zeigt im Vergleich zur Braunwasserprobe HO21 eine Verschiebung zu größeren Elutionsvolumina und somit zu kleineren hydrodynamischen Radien. Dies ist an den unterschiedlichen Elutionsvolumina des Hauptpeaks (Peak 2a) in den SEC-Chromatogrammen beider Proben sowie ihrer mst-UF-Fractionen F1 bis F3 zu erkennen (Linie I in Abb. 4.38).



**Abb. 4.38:** SEC-Chromatogramme der Proben Alb5, Alb5 K sowie der Proben HO21, HO21 K und der jeweiligen mst-UF-Fractionen F1 bis F5. Analytisches System, TKS HW 50-(S)-Säule, Eluent 1, DOC-Detektion. Proben gepuffert.

Nahezu die Hälfte der gelösten organischen Substanz der Probe Alb5 findet sich in der Fraktion mit der niedrigsten nominellen Molmasse wieder (F5,  $DOM < 1000 \text{ g/mol}$ ; Tab. 4.22) während bei der Probe HO21 über 60 % des DOC in Fraktion 1 enthalten waren (vergleiche Tab. 4.19). Aufgrund des hohen Anteils der niedermolekularen Fraktion an der DOM von Alb5 kommt es bereits durch die Anreicherung zu einer deutlichen Änderung der Molekülgrößenverteilung der Probe. Peak 2a tritt sowohl im Chromatogramm des Konzentrats als auch der Fraktionen F1 bis F3 bei kleineren  $V_e$ -Werten auf als im Chromatogramm der Originalprobe Alb5 (Linie II in Abb. 4.38). Im Konzentrat sowie in F1 bis F3 wurden durch die mehrstufige Ultrafiltration größere Moleküle relativ angereichert. Dieser Effekt war bei der Braunwasserprobe dagegen nur für die Fraktion 1 zu beobachten. Die relative Anreicherung von Molekülen mit größeren  $R_e$ -Werten ist auch anhand der Flächenanteile des am Ausschlussvolumen auftretenden Peaks 1 zu erkennen, welche für die Probe Alb5 von 4 % im Original auf 5 % im Konzentrat und 13 % in Fraktion 1 zunahm. Im Vergleich zur Braunwasserprobe, bei der die als Peak 1 eluierende gelöste organische Substanz mit etwa 10 % einen größeren Anteil der Gesamt-DOM der Originalprobe ausmacht (vgl. Kap. 4.5.2), kommt es bei der Probe Alb5 durch die Ultrafiltration zu einer stärkeren Anreicherung dieses bei  $V_0$  eluierenden Materials. Für die Braunwasserprobe konnte nachgewiesen werden, dass der als Peak 1 auftretende Teil der DOM zum überwiegenden Anteil aus Kohlenhydraten besteht. Für die Probe Alb5 sind die chemischen Strukturen dieser Fraktion derzeit unbekannt.

Charakteristisch für die Probe Alb5 ist der hohe Anteil der nach dem Permeationsvolumen eluierenden gelösten organischen Substanz an der Gesamt-DOM. Dieser lag für die Originalprobe (Alb5) an der Säule des analytischen Systems (TSK HW 50-(S)) bei über 30 % der Gesamtpeakfläche. Die Probe Alb5 enthält organische Substanzen, welche Wechselwirkungen mit dem Gelmaterial der SEC-Säule eingehen und dadurch retardiert werden. Diese Retardation kann sowohl durch polare (z. B. Wasserstoffbrückenbindungen) als auch durch unpolare (z. B. Van der Waals-Kräfte) Wechselwirkungen verursacht werden (SPECHT 2002). Aus der Elution nach  $V_p$  kann daher nicht auf die Struktur der retardierten Moleküle geschlossen werden. Das Elutionsverhalten der DOM der Probe Alb5 hat zur Folge, dass ein Drittel der DOM mittels SEC nicht größenfraktioniert werden kann. Bei dieser Probe erscheint der Einsatz der mehrstufigen Ultrafiltration zur Größenfraktionierung folglich sinnvoller. Hierbei ist jedoch ebenfalls zu überprüfen, inwieweit eine Beeinflussung der Fraktionierung durch unspezifische WW gegeben ist.

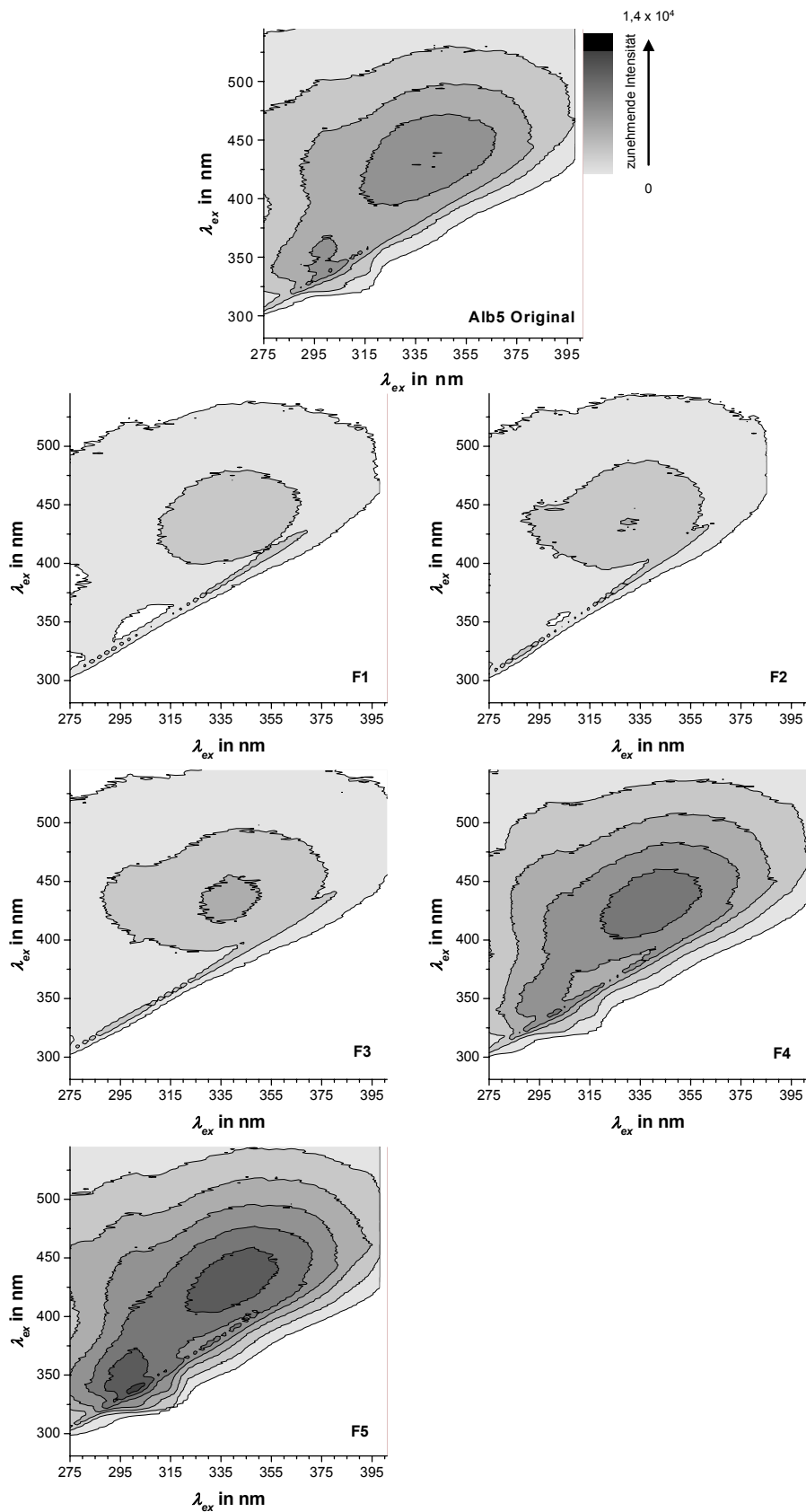
**Tab. 4.22:** Basisparameter und DOC-Bilanz der mst-UF-Fraktionierung der Probe Alb5 K (Probenahme Juli 2001). DOC-Angaben: MW $\pm$  1 s für  $n = 3$ .

Probe	DOC in mg/L	DOC-Anteil in %	$\kappa$ in $\mu\text{S}/\text{cm}$	pH- Wert (22 °C)	$SUVA_{254}$ in L/(m mg)	$SUVA_{436}$ in L/(m mg)
Alb5	7,5 $\pm$ 0,4	100	988	8,0	2,15	0,20
K	46,2 $\pm$ 0,5	54	1122	8,0	1,60	0,17
F1	51,3 $\pm$ 0,4	12	1140	7,6	1,59	0,17
F2	55,0 $\pm$ 0,4	13	1155	7,8	1,76	0,22
F3	51,2 $\pm$ 0,1	12	1121	8,3	2,05	0,18
F4	11,1 $\pm$ 0,1	5	1025	8,4	2,02	0,11
F5	4,5 $\pm$ 0,1	47	989	8,1	2,31	0,12

Die  $SUVA_{254}$ - und  $SUVA_{436}$ -Werte der Fraktionen sind mit Werten um 2 L/(m mg) und 0,2 L/(m mg) sehr niedrig. Der Anteil ungesättigter Strukturen an der DOM der Originalprobe und der mst-UF-Fractionen ist folglich geringer als in der Braunwasserprobe. Im Unterschied zu den mst-UF-Fractionen der Braunwasserprobe HO21 war für die Fraktionen von Alb5 K eine Zunahme der  $SUVA$ -Werte von Fraktion 1 zu Fraktion 5 zu beobachten. Hieraus kann auf eine Zunahme des Gehaltes an ungesättigten Strukturen von hoch- zu niedermolekularen Fraktionen geschlossen werden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zur Beobachtung verschiedener Autoren (CHIN ET AL 1994, PEURAVUORI UND PIHLAJA 1997), die für huminstoffhaltige Proben eine Zunahme der spezifischen UV-Absorption mit zunehmender Molekülgröße beobachteten. Die DOM der Probe Alb5 besteht allerdings nur zu einem geringen Anteil von maximal 20 % aus Huminstoffen (ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002). Für den restlichen Anteil der DOM dieser Probe hat die für HS erstellte Korrelation zwischen  $SUVA$  und Molekülgröße offensichtlich keine Gültigkeit.

Trotz des geringen Huminstoffgehaltes ist in den Excitation-Emission-Matrices der Probe Alb5 und ihrer mst-UF-Fractionen das für Huminstoffe charakteristische Maximum der Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von etwa 340 nm zu erkennen (Abb. 4.39). Das Emissionsmaximum ist gegenüber der Braunwasserprobe zu niedrigeren Wellenlängen verschoben und liegt bei etwa 430 nm. Für aus dieser Probe isolierte Fulvin- und Huminsäuren war ebenfalls eine derartige Verschiebung festgestellt worden. Es ist bekannt, dass die Lage des Emissionsmaximums in EEM von Huminstofflösungen eine größere Variabilität aufweist als diejenige des Anregungsmaximums (KUMKE UND FRIMMEL 2002).





**Abb. 4.39:** EEM der Probe Alb5 und der mst-UF-Fractionen F1 bis F5.  $\lambda_{em} = 275$  bis  $401$  nm,  $\Delta = 3$  nm,  $\lambda_{ex} = 281$  bis  $545$  nm,  $\Delta = 1$  nm; spektrale Bandbreite  $3,2$  nm. Proben mit Wasser verdünnt, DOC =  $4,5$  mg/L.

In der Originalprobe sowie in den Fraktionen F4 und F5 tritt ein zweites Maximum bei einer Wellenlängenkombination von etwa 300 nm (Anregung) und 340 nm (Emission) auf. Die stärkste Fluoreszenzintensität wurde für beide Maxima in Fraktion 5 gemessen. Für abwasserhaltige DOM sind Maxima bei einer Anregungswellenlänge von etwa 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 300 bis 320 nm (Tyrosin-ähnlich) bzw. 320 bis 350 nm (Tryptophan-ähnlich) charakteristisch. Das Auftreten dieser Maxima wird als Indiz für die Anwesenheit von aromatischen Aminosäuren bzw. Proteinen gedeutet (COBLE 1996, BAKER 2002, REYNOLDS 2003). Die in den EEM der Fraktionen F4 und F5 auftretenden Maxima stimmen jedoch hinsichtlich der Anregungswellenlänge nicht mit den in der Literatur aufgeführten Werten überein. Das beobachtete  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ -Maximum ist möglicherweise auf die Anwesenheit weiterer Wasserinhaltsstoffe anthropogener Herkunft (z. B. optische Aufheller, organische Schadstoffe) zurückzuführen. Diese können in Abhängigkeit von ihrer Fluoreszenzquantenausbeute auch bei Vorliegen von sehr niedrigen Konzentrationen ein deutliches Fluoreszenzsignal ergeben.

#### 4.6.2 Charakterisierung der chemischen Strukturen auf der Grundlage von Literaturdaten

Aus den unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften kann auf eine unterschiedliche Zusammensetzung der Proben HO und Alb5 und ihrer mst-UF-Fraktionen geschlossen werden. Bezüglich der chemischen Strukturen der DOM der Fraktionen der Probe Alb5 können auf Grundlage dieser Ergebnisse keine detaillierten Aussagen getroffen werden. Für die chemischen Strukturen anderer Fraktionen der Kläranlagenablauf-DOM liegen jedoch Daten aus früheren Untersuchungen vor. Die Fulvin- und Huminsäuren sowie das Konzentrat einer Ultrafiltration des Kläranlagenablaufs (ABV3 K; MWCO = 4000 g/mol) wurden mit NMR-spektroskopischen Methoden charakterisiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Anteil der Aliphaten, der O-Alkylstrukturen sowie der Carboxylfunktionen in der Probe ABV3 K im Vergleich zum UF-Konzentrat der Braunwasserprobe erhöht ist (Tab. 4.23). Die Carboxylfunktionen liegen bei der Probe ABV3 K hauptsächlich in Form von Säureamiden vor. Der Anteil der Aromaten ist in ABV3 K niedriger als in HO12 K (LANKES 2001, LANKES UND LÜDEMANN 2002). Die hohen Anteile der Aliphaten und O-Alkylstrukturen haben hohe H/C- und O/C-Verhältnisse von etwa 1,6 bzw. 1,4 der Probe ABV3 K zur Folge. Das hohe N/C-Verhältnis von 0,13 ist auf den mikrobiellen Ursprung eines Großteils der DOM zurückzuführen (ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002).

**Tab. 4.23:** Relative Kohlenstoffanteile chemischer Strukturen in den Proben HO12 K (1996) und ABV3 K. Daten aus LANKES (2001).

Probe	Relativer Kohlenstoffanteil in %					
	Carbonyl C	Carboxyl C	Aromaten		O-Alkyl C	Aliphat. C
	220-190 ppm	190-160 ppm	O/N-subst. 160-140 ppm	C/H-subst. 140-100 ppm	100-50 ppm	50-0 ppm
HO12 K	3,9	16,3	10,7	24,4	31,6	13,1
ABV3 K	3,7	20,0	5,0	12,8	35,3	23,2

Die O-Alkylstrukturen und Aliphaten stellen auch bedeutende Anteile der DOM der XAD-Fractionen dar. In den FAs und HAs des Kläranlagenablaufs waren die Anteile der Aliphaten mit Werten über 30 % wesentlich höher als in den FAs und HAs der Braunwasserprobe (HO13 FA: 26 %, HO13 HA: 19 %). Der Anteil der O-Alkylstrukturen war in der HA-Fraktion der Probe ABV3 mit 36 % wesentlich höher als in der HA-Fraktion des Hohlohsees (HO13 HA: 23 %; LANKES 2001). Der Anteil der hydrolysierbaren Kohlenhydrate am DOC war in der Probe ABV3 HA mit etwa 8 % im Vergleich zu Huminsäuren aus anderen Gewässern (Anteile von 1 bis 2 %) stark erhöht (JAHNEL ET AL. 2002). Die Anteile der Aromaten waren in den XAD-Fractionen des Kläranlagenablaufs mit etwa 20 % dagegen geringer als in den FAs und HAs des Hohlohsees (HO13: 27 bzw. 28 % Aromaten in FA bzw. HA; LANKES 2001). Im Konzentrat der Ultrafiltration (ABV3 K) sowie in den XAD-Fractionen waren maximal 20 % der DOM des Kläranlagenablaufs enthalten (ABBT-BRAUN UND FRIMMEL 2002). Damit konnte jeweils nur etwa ein Fünftel der gelösten organischen Substanz dieser Probe NMR-spektroskopisch charakterisiert werden. Aus den vorliegenden Daten ist dennoch ersichtlich, dass sich die Zusammensetzung der DOM grundlegend von der der Braunwasserprobe unterscheidet. Daraus folgt zwangsläufig, dass auch die mst-UF-Fractionen andere chemische Strukturen aufweisen müssen als die der Braunwasserprobe. Die gleiche Schlussfolgerung kann bezüglich einer SEC-Fraktionierung der DOM des Kläranlagenablaufs gezogen werden.

Aus den Ergebnissen der mst-UF-Fraktionierung und Charakterisierung beider Proben ergeben sich somit interessante Fragestellungen für zukünftige Untersuchungen. Für das Ultrafiltrationskonzentrat Alb5 K kann anhand der Literaturdaten eine Anreicherung von O-Alkylstrukturen, Carboxylfunktionen und aliphatischen Strukturen sowie eine Abreicherung von aromatischen Strukturen angenommen werden. Die SEC-Chromatogramme der UF-Konzentrate zeigen, dass

der Großteil der DOM von Alb5 K bei größeren  $V_e$ -Werten eluiert als die der Braunwasserprobe (Abb. 4.38). Es ist davon auszugehen, dass bei der Probe Alb5 K in den SEC-Fractionen höherer Ordnungsnummern ein nennenswerter Anteil der angereicherten Strukturen enthalten ist. Als Arbeitshypothese für zukünftige Arbeiten kann daher angenommen werden, dass für diese Probe kein ähnlich markanter Unterschied zwischen Fraktion 1 und den restlichen Fraktionen zu erwarten ist wie bei der Braunwasserprobe. Die Ergebnisse der SEC-Analyse der mst-UF-Fractionen der Probe Alb5 K machen deutlich, dass unspezifische Wechselwirkungen bei der SEC-Trennung dieser Probe nicht vernachlässigbar sind. Ein bedeutender Anteil der DOM eluiert nach dem Permeationsvolumen. Dieses Elutionsverhalten beruht nicht auf Größenausschlussmechanismen. Die präparative SEC-Fraktionierung in Verbindung mit einer strukturellen Charakterisierung durch Anwendung NMR-spektroskopischer Methoden bietet die Möglichkeit, die chemischen Strukturen des retardierten Teils der DOM aufzuklären. Dies kann zu einem erweiterten Verständnis der der SEC zugrundeliegenden Trennprinzipien beitragen.

#### 4.6.3 Biologische Schadwirkungen von mst-UF-Fractionen der Probe Alb5

In einem mehrjährigen, vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Forschungsvorhaben, wurde die Schadwirkung von mst-UF-Fractionen der Kläranlagenablauf-DOM unter Verwendung verschiedener biologischer Testverfahren untersucht (FORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE GMBH, PTWT+E 2002). Dabei wurden Unterschiede in den biologischen Wirkungen der Fractionen nachgewiesen. Höhermolekulare Fractionen (F1, F2) sowie F4 zeigten eine inhibierende Wirkung auf L-Alanin-Aminopeptidasen des Modellorganismus *Pseudomonas putida*. Auch für das Enzym Cholinesterase wurde eine inhibierende Wirkung der DOM der Fractionen F1 bis F3 nachgewiesen. In der bioautographischen Variante des Leuchtbakterientests wurden für die Fractionen F3 und F4 toxische Effekte ermittelt. Eine immun-toxische Wirkung der DOM wurde dagegen nur in den Fractionen F4 und F5 detektiert. Auf der Grundlage des Sachverhaltes, dass Schadwirkungen in aquatischen Systemen hauptsächlich durch niedermolekulare Verbindungen verursacht werden, wurde die Schadwirkung höhermolekularer Fractionen unter anderem auf Wechselwirkungen niedermolekularer Schadstoffe mit der DOM zurückgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welches Verhalten ausgewählte niedermolekulare organische Verbindungen bei der mehrstufigen Ultrafiltration zeigen und ob derartige Wechselwirkungen in Anwesenheit anderer gelöster organischer Substanzen (DOM) beobachtet werden können.

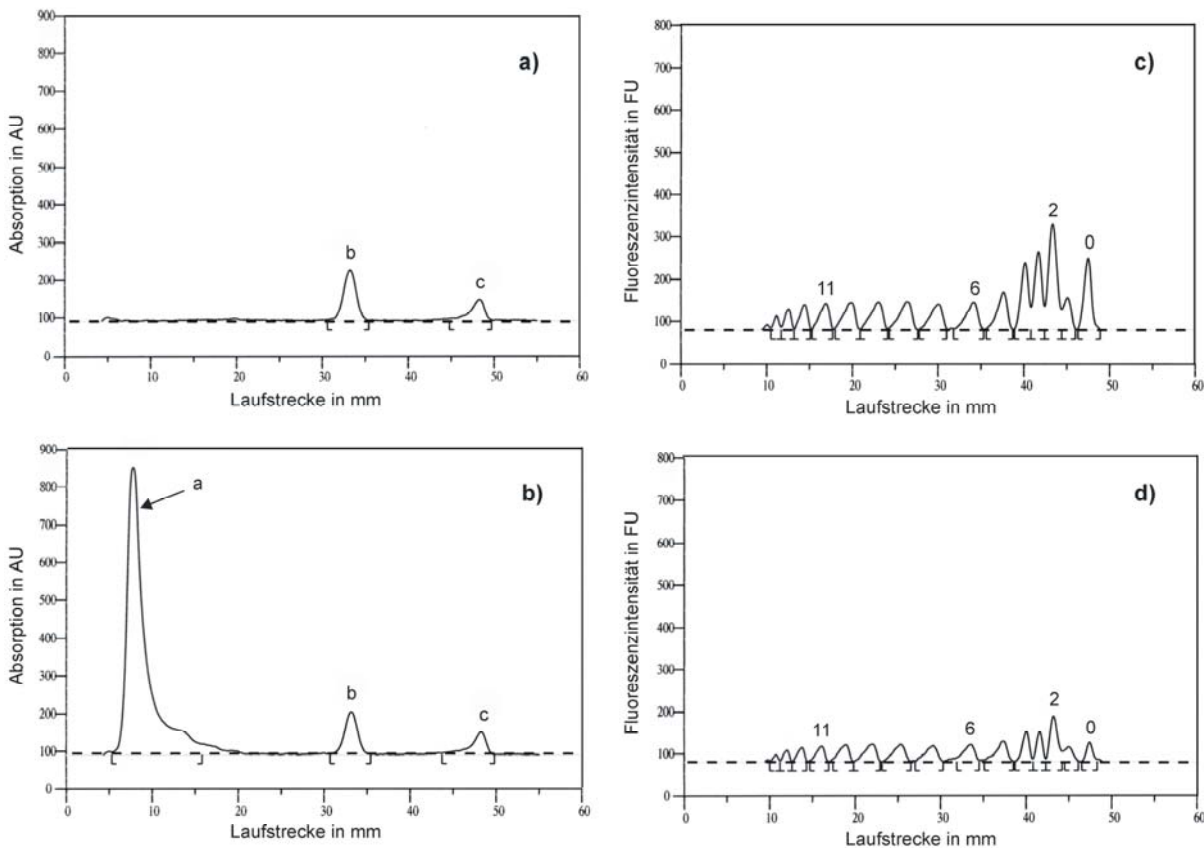
## 4.7 Verhalten von Modellschadstoffen bei der Fraktionierung mittels mehrstufiger Ultrafiltration

Stellvertretend für das Spektrum organischer Schadstoffe in Gewässern wurden verschiedene niedermolekulare Verbindungen unterschiedlicher Polarität als Modellschadstoffe (MSS) ausgewählt. Die Polarität organischer Moleküle beeinflusst sowohl deren Verhalten in wässrigen Lösungen als auch die Art und Stärke der WW mit DOM. Es wurde daher erwartet, dass MSS unterschiedlicher Polarität ein unterschiedliches Verhalten bei der mst-UF-Fraktionierung und in Bezug auf WW mit DOM-Fractionen zeigen. Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Betriebsweise der UF (Konzentrationsmodus) entspricht die maximal mögliche Konzentration nicht retardierter niedermolekularer Moleküle in den Fraktionen der Ausgangslösung (siehe Kap. 2.3.2). Eine relative Anreicherung von MSS in einer bestimmten Größenfraktion setzt somit einen Rückhalt der MSS durch die Membran voraus. Ein Rückhalt niedermolekularer Verbindungen ist nur möglich, wenn diese Wechselwirkungen mit höhermolekularen, retardierten DOM-Bestandteilen eingehen. Eine relative Anreicherung von MSS in einer bestimmten mst-UF-Fraktion kann folglich als Indiz für Wechselwirkungen zwischen der jeweiligen MSS und der DOM dieser Fraktion betrachtet werden. Eine derartige Schlussfolgerung ist jedoch nur zulässig, wenn die zur Bestimmung der MSS verwendete analytische Methode sowohl die Quantifizierung der freien (frei gelöst vorliegenden) als auch der gebundenen (wechselwirkenden) MSS erlaubt. Als Grundlage für die Quantifizierung der MSS in den mst-UF-Fractionen wurden daher zunächst HPTLC-Analysenmethoden zur Bestimmung der MSS ausgearbeitet und der Einfluss der Konzentration der Probenmatrix auf die analytische Bestimmung der MSS untersucht. 4-Nonylphenol, Nonylphenoethoxylylate und Coffein wurden als MSS verwendet. Die MSS wurden in drei verschiedenen Wässern (DOM-Matrices: Entmineralisiertes Wasser, Leitungswasser, Braunwasser) gelöst und mittels mst-UF fraktioniert. Durch Filtration in Abwesenheit von DOM sollte der Einfluss der Polarität auf das Verhalten der MSS bei der mst-UF-Fraktionierung untersucht werden. Durch Filtration in Anwesenheit von DOM (HO21) sollte untersucht werden, ob eine relative Anreicherung von MSS in einzelnen Fraktionen beobachtbar ist. Im Falle einer Anreicherung in bzw. Wechselwirkung mit einer bestimmten mst-UF-Fraktion der Hohlohsee-DOM sollte die Interpretation der Ergebnisse auf Grundlage der in Kapitel 4.5.2 dargestellten Strukturdaten der HO21-Fractionen erfolgen.

### 4.7.1 Analytik der Modellschadstoffe

Die Analyse der Modellschadstoffe erfolgte nach Festphasenextraktion (SPE) der dotierten Proben und UF-Fractionen mittels HPTLC-Trennung auf Kieselgelphase und Messung der

Absorption (Coffein) bzw. Fluoreszenz (4-NP, NPEO). Für Coffein konnte durch die Dünnschichtchromatographie eine sehr gute Abtrennung des Analyten von der Probenmatrix (DOM) erreicht werden (Abb. 4.40 a und b). Der überwiegende Anteil der DOM der Braunwasserprobe (HO21) verblieb nach der Entwicklung an der Auftrageposition ( $y_0 = 8$  mm). Dies ist auf Wechselwirkungen (Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen) der funktionellen Gruppen der Braunwasser-DOM mit der polaren stationären Phase zurückzuführen. Für die langkettigen, hydrophilen Nonylphenoethoxylate war keine vollständige Abtrennung von der Probenmatrix möglich. Da die huminstoffreiche DOM der Braunwasserprobe bei der verwendeten Anregungswellenlänge von 227 nm jedoch nur eine geringe Fluoreszenz zeigte, konnte durch Einsatz der Fluoreszenzdetektion eine zusätzliche Selektivität erreicht werden (Abb. 4.40 c und d).



**Abb. 4.40:** HPTLC-Chromatogramme der Modellschadstoffe.

a) Coffein-Standard ( $m = 100$  ng), b) Coffein in mst-UF-Fraktion 1 der dotierten Braunwasserprobe.

Absorptionsmessung bei  $\lambda = 275$  nm. Peak a: DOM, Peak b: Coffein.

c) NPEO-Standard ( $m = 12$   $\mu$ g (Summe aller Ethoxylate)), d) NPEO in mst-UF-Fraktion 1 der dotierten

Braunwasserprobe. Fluoreszenzdetektion bei  $\lambda_{\text{ex}} = 227$  nm, 280 nm-cut-off Filter. Peaknummern

kennzeichnen die Anzahl an Ethoxyeinheiten im Molekül.

Für die weiteren Auswertungen wurden aus dem NPEO-Gemisch drei Ethoxylate ausgewählt, die als repräsentativ für das Spektrum an Ethoxylaten unterschiedlicher Polarität erachtet wurden (NP2EO, NP6EO, NP11EO; Zahlenangabe kennzeichnet die Anzahl an Ethoxyeinheiten im Molekül). Mit der verwendeten SPE-Methode konnten die Modellschadstoffe 4-NP, NP2EO, NP6EO, NP11EO und Coffein bei hohen Wiederfindungen mit guter Reproduzierbarkeit extrahiert werden (Tab. 4.24).

**Tab. 4.24:** Wiederfindung (WF) der Modellschadstoffe aus dotiertem Leitungswasser- bzw. Braunwasser nach SPE (1000-fache Anreicherung).  $\rho$  (Coffein) = 100  $\mu\text{g/L}$  bzw.  $\rho$  (4-NP) = 0,5 mg/L,  $\rho$  (Mar NP3) = 1 mg/L und  $\rho$  (Mar NP10) = 1 mg/L. MW  $\pm$  1 s für  $n = 3$ .

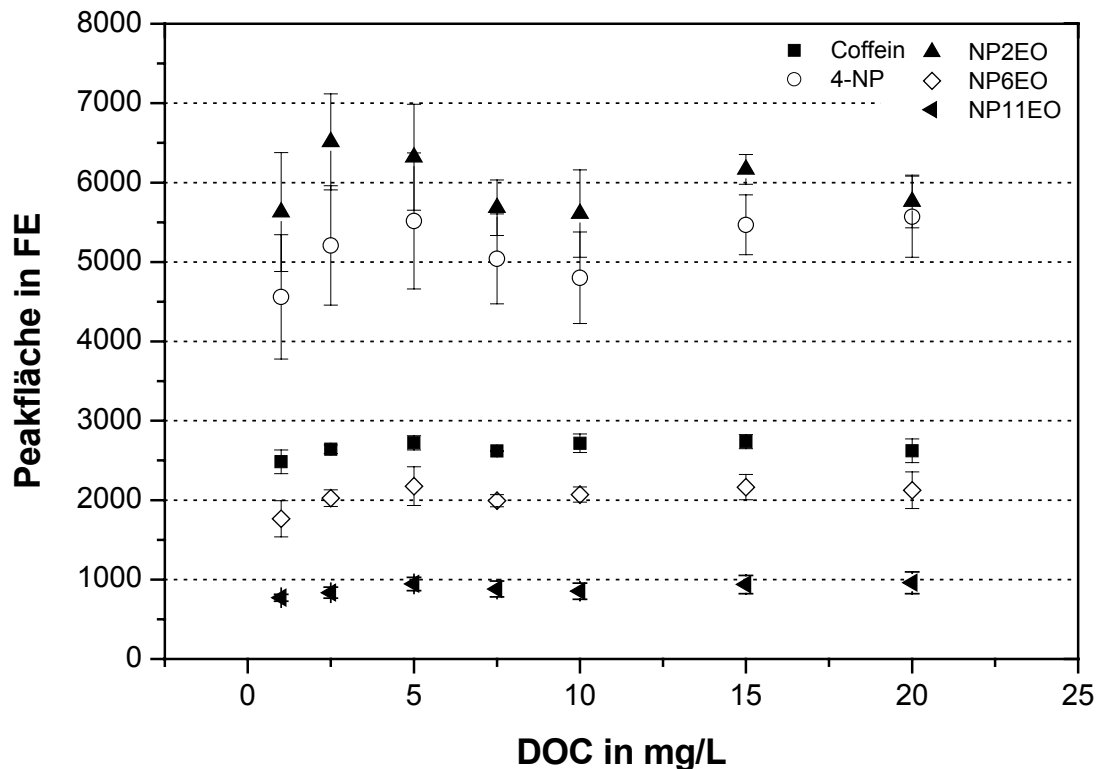
Substanz	Leitungswasser WF in %	Braunwasser WF in %
4-NP	80 $\pm$ 9	90 $\pm$ 4
NP2EO	100 $\pm$ 7	90 $\pm$ 3
NP6EO	100 $\pm$ 6	100 $\pm$ 4
NP11EO	100 $\pm$ 3	100 $\pm$ 2
Coffein	100 $\pm$ 10	100 $\pm$ 3

Die in Tabelle 4.25 angegebenen Nachweisgrenzen ( $m_{NG}$ ) wurden nach der Kalibrierkurvenmethode gemäß DIN 32645 für ein Signifikanzniveau von 0,01 berechnet (Schnellschätzung der Nachweisgrenze). Hierfür wurden Einzelmessungen an 10 Standardlösungen mit äquidistanten Schritten der Analytkonzentrationen durchgeführt. Die auf die HPTLC-Platte aufgetragenen Substanzmengen sind in Tabelle 4.25 (Spalte 2) angegeben (Kalibrierdaten siehe Anhang I).

**Tab. 4.25:** Verfahrenskenndaten der Bestimmung von 4-NP, NP2EO, NP6EO, NP11EO und Coffein mit HPTLC.  $a_0$ : Achsenabschnitt,  $a_1$ : Steigung der Kalibriergeraden, FE: Flächeneinheiten. <sup>1</sup>: Angaben für Leitungswasser.

Analyt	$m$ in ng	$a_0$ in FE	$a_1$ in FE/ng	R	$m_{NG}$ in ng	$\rho_{NG}$ in $\mu\text{g/L}$ <sup>1</sup>
4-NP	50 bis 500	250	10,1	0,999	20	2,5
NP2EO	120 bis 1200	410	6,6	0,986	260	26,0
NP6EO	50 bis 275	360	10,9	0,987	52	5,2
NP11EO	120 bis 660	110	6,1	0,992	80	8,0
Coffein	3 bis 21	21	27,8	0,997	2	2,0

Bei 1000-facher Anreicherung und Wiederfindungen zwischen 80 und 100 % (Tab 4.24) konnten die ausgewählten Substanzen in den dotierten Proben mittels HPTLC-Analytik im Mikrogramm pro Liter-Bereich nachgewiesen werden ( $\rho_{\text{NG}}$ -Angaben in Tab. 4.25). Dies entspricht dem Konzentrationsbereich belasteter Proben (vgl. Tabelle 2.3). In un- oder gering belasteten Wässern sind die Konzentrationen jedoch zu niedrig, um mit der hier beschriebenen Methode erfasst werden zu können. Für die Experimente mit Modellschadstoffen hat dies den Vorteil, dass der Gehalt der möglicherweise in den Matrixproben selbst enthaltenen MSS bei der Massenbilanz für die mst-UF der dotierten Proben vernachlässigt werden kann.



**Abb. 4.41:** Peakflächen der MSS bei unterschiedlichen DOC-Konzentrationen der Braunwasserprobe HO21.  $\rho$  (Coffein) = 100  $\mu\text{g/L}$  bzw.  $\rho$  (4-NP) = 0,5 mg/L,  $\rho$  (Mar NP3) = 1 mg/L und  $\rho$  (Mar NP10) = 1 mg/L. Fehlerbalken: MW  $\pm$  1 s für 2 HPTLC-Messungen.

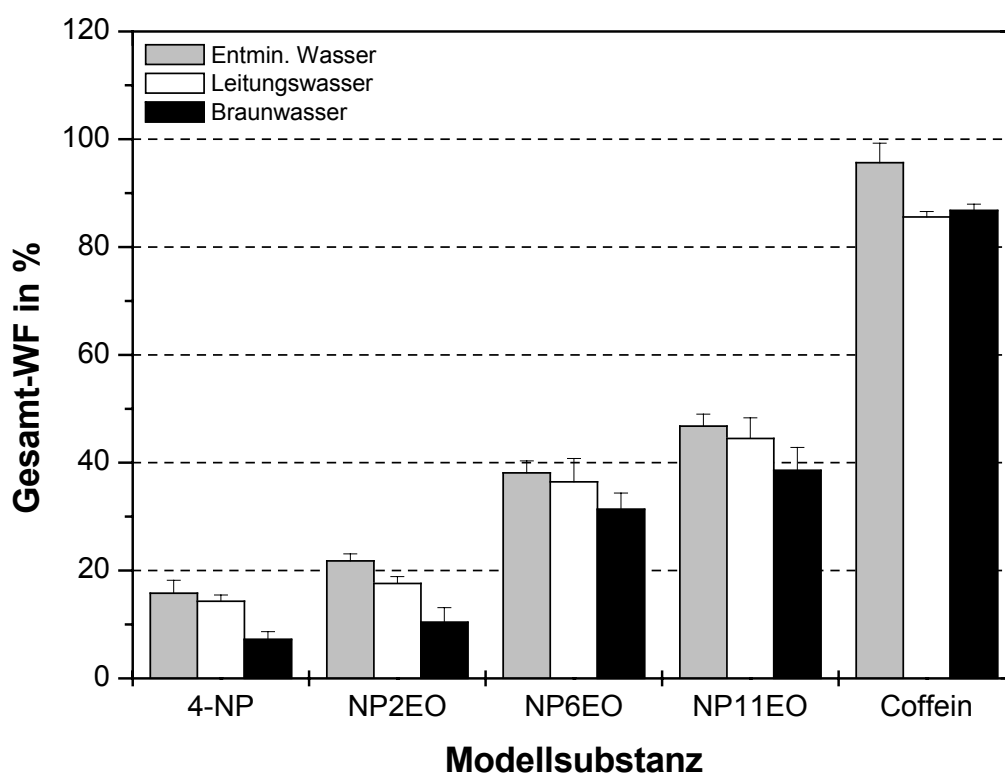
Bei der mst-UF-Fraktionierung der Modellschadstoffe sollte die Gesamtkonzentration (Summe aus freien und gebundenen Spezies) der in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Schadstoffe bestimmt werden. Dies setzt voraus, dass im Falle des Auftretens von WW zwischen MSS und DOM-Bestandteilen auch die gebundenen Spezies erfasst werden können. Die HPTLC-Trennung wurde daher als normalphasenchromatographische Trennung auf Kieselgel durchgeführt. Die dabei auftretenden starken Wechselwirkungen zwischen Analyt (Schadstoff) oder DOM und der stationären Phase führen im Falle schwacher (hydrophober) WW zwischen Schadstoff und DOM



zu einer Desorption der MSS von der DOM und ermöglichen damit die Quantifizierung der gebundenen Schadstoffanteile. Für DOC-Konzentrationen der DOM zwischen 1 und 20 mg/L wurden im Rahmen der Reproduzierbarkeit der Methode keine Änderungen der Peakflächen der MSS festgestellt (Abb. 4.41). Damit ist die HPTLC-Methode für die quantitative Bestimmung der Gesamtkonzentration der Modellschadstoffe in Anwesenheit von gelöster organischer Substanz geeignet.

#### 4.7.2 Verhalten der Modellschadstoffe bei der mst-UF-Fraktionierung

Bei Verwendung von entmineralisiertem Wasser als DOM-Matrix wurden für die Modellschadstoffe bei der mst-UF-Fraktionierung sehr unterschiedliche Gesamtwiederfindungen (Gesamt-WF; Summe der WF in Fraktionen 1 bis 4) ermittelt. Der niedrigste Wert wurde mit 17 % für 4-NP bestimmt. Für Coffein wurde mit 96 % die höchste GesamtWF festgestellt (Abb. 4.42).



**Abb. 4.42:** Gesamtwiederfindung (GesamtWF) der MSS für verschiedene DOM-Matrices. MW  $\pm$  1 s für  $n = 3$  Fraktionierungen.

Der DOC-Gehalt des entmineralisierten Wassers betrug weniger als 0,1 mg/L (Tab. 3.7). Das unterschiedliche Verhalten der MSS in dieser DOM-Matrix kann folglich nicht auf Wechselwirkungen mit der darin enthaltenen DOM zurückgeführt werden, sondern ist durch die unterschiedlichen Eigenschaften der Substanzen bedingt. Aufgrund ihrer Tenseigenschaften

neigen die NPEO zur Akkumulation an Grenzflächen. Dies verursacht einen Verlust dieser MSS und resultiert selbst in entmineralisiertem Wasser in GesamtWF von weniger als 50 %. Die niedrigste GesamtWF wurde für das am wenigsten polare Molekül 4-NP ermittelt.

Für diese Substanz wurde auch die stärkste Abnahme der relativen Konzentration  $\rho_{rel}$  festgestellt (Abb. 4.43). Zur Berechnung der relativen Konzentration wurde die Konzentration der MSS in einer Fraktion auf die der Originallösung bezogen. Aus diesem Parameters wird trotz der unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen der verschiedenen MSS unmittelbar ersichtlich, ob eine Anreicherung ( $\rho_{rel} > 100 \%$ ) oder eine Abreicherung (Verlust,  $\rho_{rel} < 100 \%$ ) bei der mst-UF-Fraktionierung stattfindet.

Eine Anreicherung von MSS in einer bestimmten Fraktion konnte nicht beobachtet werden. Die  $\rho_{rel}$ -Werte aller MSS waren in den Fraktionen sämtlicher DOM-Matrices kleiner als 100 %. Wechselwirkungen zwischen den MSS und DOM-Fractionen traten folglich entweder nicht auf oder wurden lediglich durch schwache zwischenmolekulare Kräfte verursacht. Die  $\rho_{rel}$  der Substanzen NP2EO, NP6EO und NP11EO nahmen von F1 zu F4, also mit zunehmender Anzahl an Fraktionierungsschritten, ebenfalls ab.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl die GesamtWF als auch die relativen Konzentrationen der verschiedenen NPEO mit abnehmender Länge der Ethoxykette, also mit abnehmender Hydrophilie der Moleküle abnahmen. Dies deutet darauf hin, dass das Verhalten dieser MSS bei der Ultrafiltration vor allem von der Polarität der Moleküle abhängt. Da keine Literaturangaben bezüglich der  $\log K_{OW}$ -Werte der langkettigen NPEO vorlagen, wurde zur Beschreibung der Polarität der Tensidmoleküle der HLB-Wert herangezogen. Die Gesamtwiederfindung korrelierte für 4-NP und die ausgewählten Ethoxylate positiv mit dem HLB-Wert der Modellschadstoffe (Abb. 4.44).

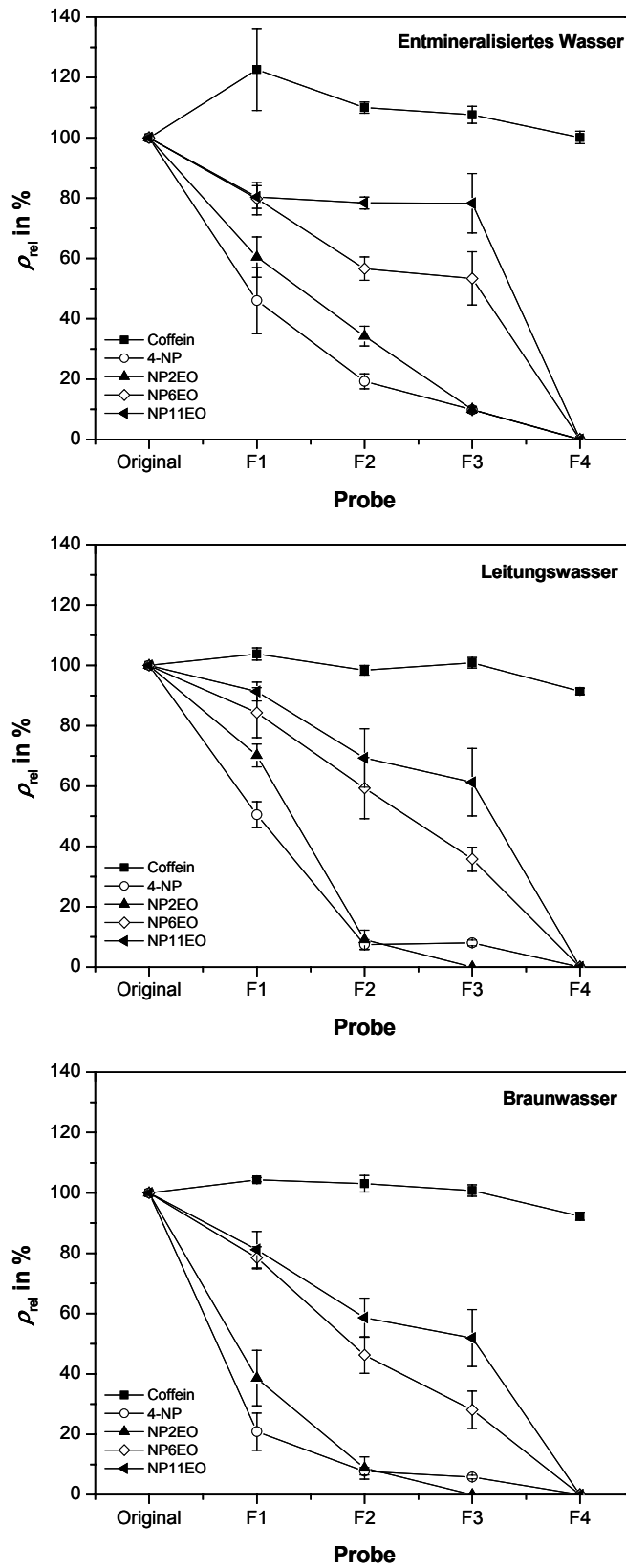
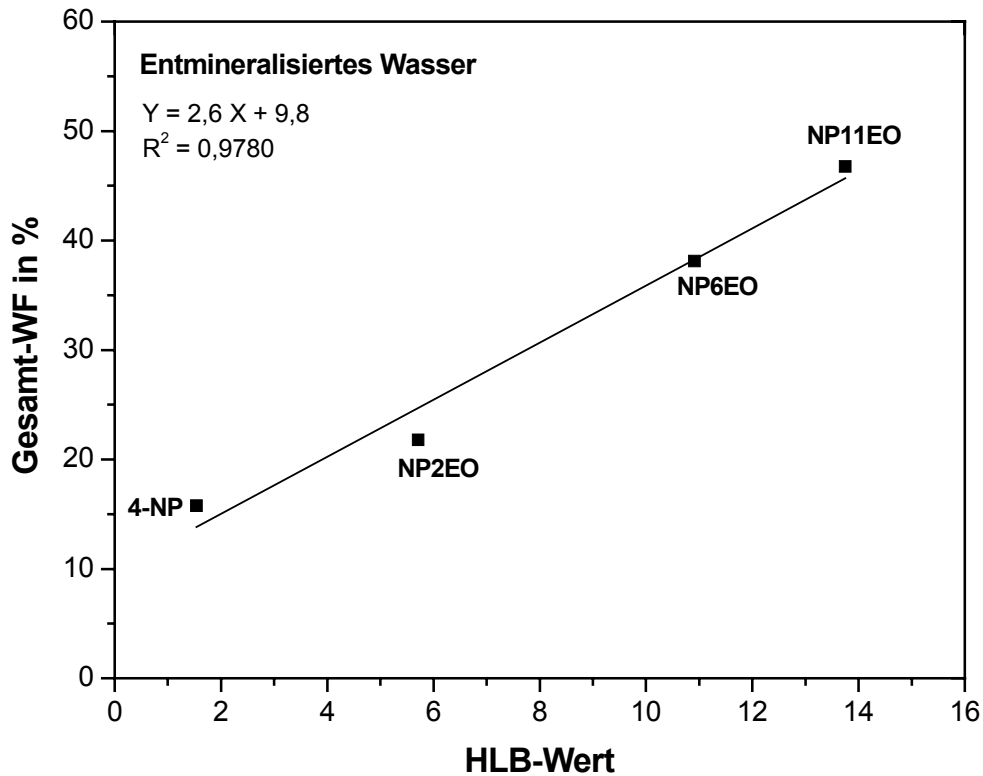


Abb. 4.43: Relative Konzentrationen  $\rho_{rel}$  der Modellschadstoffe in den mst-UF-Fractionen verschiedener DOM-Matrices. MW  $\pm$  1 s für  $n = 3$  Fraktionierungen.



**Abb. 4.44:** Korrelation von Gesamtwiederfindung und HLB-Wert für 4-NP, NP2EO, NP6EO und NP11EO. DOM-Matrix: Entmineralisiertes Wasser.

Der berechnete HLB-Wert für 4-NP von 1,54 kann wegen der strukturellen Unterschiede der hydrophilen Gruppen des Nonylphenols (phenolische OH-Gruppe als hydrophile Gruppe) und der Ethoxylate (Ethoxygruppen als hydrophile Gruppe) nur als Abschätzung betrachtet werden. Dennoch wird eine gute Korrelation beider Parameter erhalten. Dies zeigt, dass die Polarität dieser Modellschadstoffe einen starken Einfluss auf deren Verhalten bei der mst-UF-Fraktionierung hat. In Abwesenheit von DOM können Verluste der MSS vor allem durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Festphasen wie UF-Membranen, Rührzellen oder Schläuchen verursacht werden. Von der Adsorption hydrophober organischer Schadstoffe an Mikro- und Nanofiltrationsmembranen (bzw. der Filtrationsapparatur) wurde auch von CHANG ET AL. (2003) und KIMURA ET AL. (2003) berichtet. In den UF-Membranen wurden allerdings weniger als 2 % der eingesetzten Masse an MSS (4-NP, NPEO) wiedergefunden. Der Verlust ist folglich vor allem auf die Sorption an Rührzellen- und Schlauchmaterial zurückzuführen.

Die GesamtWF der Modellschadstoffe 4-NP und NPEO korrelierte in allen drei DOM-Matrices mit dem HLB-Wert der Verbindungen. In der Braunwassermatrix wurde jedoch ein zusätzlicher

Verlust dieser MSS beobachtet, der insbesondere bei den hydrophoben Verbindungen 4-NP und NP2EO stark ausgeprägt war (Abb. 4.42). Die GesamtWF an 4-NP betrug bei der Fraktionierung der dotierten Braunwasserprobe nur noch 7 % gegenüber 16 % für entmineralisiertes Wasser. Von der eingesetzten Masse an NP2EO wurden nur noch 10 % gegenüber 22 % wiedergefunden. Bei der Fraktionierung der dotierten Braunwasserprobe kam es vor allem bei der Membran mit dem höchsten MWCO (YM30, 30000 g/mol) zu einer Deckschichtbildung auf der UF-Membran. Es ist zu vermuten, dass der zusätzliche Verlust auf eine Sorption der MSS an dieses Deckschichtmaterial zurückzuführen ist. Diese Vermutung wird dadurch bestärkt, dass für Fraktion 1 auch die größte Abnahme der relativen Konzentrationen ermittelt wurde (Abb. 4.43). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Fraktionierung des dotierten entmineralisierten Wassers wurde auch hier für die hydrophoben MSS ein größerer Verlust beobachtet als für die hydrophilen NPEO. Dies zeigt, dass insbesondere die hydrophoben Verbindungen zur Sorption an Oberflächen neigen.

Die Sorption an Deckschichtmaterial kann als Anzeichen für WW zwischen MSS und dieser DOM-Fraktion gedeutet werden. In Kapitel 4.5.2 wurde dargelegt, dass von einer relativen Anreicherung von O-Alkyl-Strukturen und stickstoffhaltigen Verbindungen im Deckschichtmaterial gegenüber der Originalprobe ausgegangen werden kann. Auf Grundlage dieser strukturellen Unterschiede kann angenommen werden, dass der zusätzliche Verlust an MSS eine Folge strukturselektiver WW ist. Weiterhin ist anzumerken, dass auch bei dieser Fraktionierung nur sehr geringe Anteile (1 bis 2 %) an MSS aus den UF-Membranen extrahiert werden konnten. Dies legt die Vermutung nahe, dass es möglicherweise zur Bildung nicht extrahierbarer Rückstände ("bound residues") kam. Beide Annahmen bedürfen jedoch der experimentellen Überprüfung.

Die polare Modellsubstanz Coffein zeigte ein völlig anderes Verhalten als 4-NP und die ausgewählten Ethoxylate. Der Großteil der eingesetzten Masse verblieb während der Fraktionierung in der gelösten Form. Es wurde ein Verlust von maximal 14 % beobachtet. Auch für diese Substanz war jedoch in allen 3 Modelllösungen eine geringe Abnahme der  $\rho_{\text{rel}}$  im Verlauf der Fraktionierung festzustellen. In den Fraktionen des dotierten entmineralisierten Wassers wurden  $\rho_{\text{rel}}$  von über 100 % bestimmt, und die GesamtWF betrug 96 % gegenüber etwa 86 % in den anderen beiden Matrices. Dies ist durch einen Minderbefund der analytisch bestimmten Coffeinkonzentration der Originallösung ( $\rho_0 = 93 \mu\text{g/L}$ ) gegenüber der theoretischen Konzentration (100  $\mu\text{g/L}$ ) bedingt. Für Coffein wurde im Gegensatz zu den anderen MSS in allen drei Matrices ein ähnliches Verhalten beobachtet. In den UF-Membranen wurden weniger als 1 % der eingesetzten

Menge wiedergefunden. Die Anwesenheit der Braunwasser-DOM führte bei dieser Substanz zu keinem zusätzlichen Massenverlust. Das hydrophile Molekül neigt damit im Gegensatz zu 4-NP und den NPEO nicht zur Sorption an festen Oberflächen .

Das Verhalten des hydrophilen Moleküls Coffein entspricht den theoretischen Vorstellungen und zeigt, dass auch in den nominell höhermolekularen Fraktionen der UF-Trennung niedermolekulare Verbindungen enthalten sind. Die Ergebnisse der Experimente mit 4-NP und NPEO machen deutlich, dass die Polarität niedermolekularer organischer Substanzen für deren Verhalten während der mst-UF von großer Bedeutung ist. Für diese MSS konnte gezeigt werden, dass die Fraktionierung nach Polaritätsunterschieden gegenüber der Fraktionierung nach Größenunterschieden sogar in den Vordergrund treten kann. Aus dem Verhalten der MSS können wegen der strukturellen Unterschiede zwischen den hier ausgewählten Verbindungen und den polyfunktionellen Huminstoffen bzw. der Gesamtheit der DOM allerdings keine Rückschlüsse bezüglich des Verhaltens der letztgenannten Stoffgemische bei der mst-UF-Fraktionierung gezogen werden. Zur Klärung der Frage, ob unspezifische WW bei der Fraktionierung von DOM von Bedeutung sind, müssen alternative theoretische und experimentelle Ansätze gewählt werden. Dieser Aspekt wurde in Kapitel 4.5 ausführlich behandelt. Die hier geschilderten Experimente hatten ausschließlich die Untersuchung des Verhaltens von Einzelsubstanzen zum Ziel. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind über die Verwendung der Ultrafiltration als Fraktionierungsmethode hinaus für deren Einsatz in der Wasseraufbereitung von Bedeutung. Im Hinblick auf den technologischen Einsatz der Ultrafiltration ist das Verhalten der hydrophoben MSS als unerwünscht zu bezeichnen, da es eine unkontrollierte und damit unzuverlässige Entfernung dieser Substanzen bei der Membranfiltration zur Folge hat. Zur Entfernung der hier untersuchten Verbindungen empfiehlt sich daher die Kombination mit anderen Aufbereitungsmethoden (z. B. Adsorptionsverfahren).

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die gelöste organische Substanz (Dissolved Organic Matter, DOM) in Gewässern zeichnet sich durch eine außerordentlich große strukturelle Vielfalt und Polydispersität aus. Der Großteil der DOM natürlicher aquatischer Systeme besteht aus Huminstoffen (HS). Für das Verständnis des Verhaltens der DOM in Gewässern und bei der Trinkwasseraufbereitung sind Informationen über die chemischen Strukturen und die Molekülgrößenverteilung von grundlegendem Interesse. Zur Größenfraktionierung werden unter anderem die Größenausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatography, SEC) und die Ultrafiltration (UF) eingesetzt. Bei der Anwendung dieser Methoden auf polyfunktionelle und polydisperse Stoffgemische (DOM, HS) kann die Größentrennung durch Wechselwirkungen zwischen Probenbestandteilen und Trennmaterialien beeinträchtigt werden.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die SEC und die mehrstufige Ultrafiltration (mst-UF) für die Größenfraktionierung von DOM natürlichen Ursprungs geeignet sind. Der Einfluss von Probenlagerung, Anreicherung und Fraktionierung auf die physikochemischen Eigenschaften der DOM wurde anhand einer huminstoffreichen Wasserprobe aus dem Referenzgewässer Hohlohsee untersucht. Ein weiterer Schwerpunkt bestand darin, die chemischen Strukturen der SEC- und mst-UF-Fractionen der Hohlohsee-DOM aufzuklären. Dazu wurde die  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektroskopie eingesetzt. Die mst-UF wurde darüber hinaus zur Fraktionierung von DOM anthropogenen Ursprungs (Kläranlagenablauf) sowie zur Fraktionierung von Modellschadstoffen verwendet.

Bei der Lagerung HS-haltiger Proben mit hohem DOC-Gehalt (DOC: Dissolved Organic Carbon) über längere Zeiträume kann es zu starken Veränderungen der Probenkonzentration und –zusammensetzung kommen (Kap. 4.1). Der DOC-Gehalt der Probe HO12 K nahm über einen Zeitraum von 6 Jahren um etwa 40 % ab. Diese, im Wesentlichen durch Aggregations- und Ausfällungsvorgänge verursachte Konzentrationsverringerung, führte zu einer relativen Abreicherung von Kohlenhydratstrukturen, einer relativen Anreicherung von Carboxylfunktionen und verzweigten Aliphaten sowie zu einer Veränderung der Molekülgrößenverteilung des in Lösung bleibenden Anteils der Probe. Wurden DOM-Fractionen bei niedrigen DOC-Konzentrationen über einige Monate gelagert, war dagegen keine wesentliche Veränderung der Molekülgrößenverteilung und spezifischen UV-Absorption festzustellen (Kap. 4.1 und 4.5.1).

Es hat sich gezeigt, dass die Ionenstärke der Probe von entscheidender Bedeutung für die Elution organischer Moleküle bei der SEC-Trennung ist. Ein Einfluss der DOC-Konzentration bzw. des pH-Wertes auf das Elutionsverhalten der DOM war dagegen erst bei größeren Änderungen dieser Parameter erkennbar (Kap. 4.2). Für die Fraktionierung mittels SEC sind folglich Anreicherungsverfahren zu bevorzugen, mit denen eine Aufkonzentrierung bei hoher Wiederfindung und geringer Änderung der Ionenstärke und des pH-Wertes erreicht werden kann. Die Ultrafiltration hat sich hierfür als besonders geeignet erwiesen (Kap. 4.3).

Die Fraktionierungsmethoden SEC und mst-UF zeichneten sich durch eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit und einen niedrigen Eintrag an DOM (Kontamination) in die Fraktionen aus (Kap. 4.4). Bei der Fraktionierung der Hohlohsee-DOM wurde mit beiden Methoden eine hohe DOC-Wiederfindung von etwa 90 % erreicht (Kap. 4.5.1 und 4.5.2). Bei der Dialyse der SEC-Fraktionen der Probe HO12 K a trat dagegen ein erheblicher Verlust an DOM auf. Mit dem Verlust waren allerdings keine wesentlichen Änderungen der chemischen Struktur bzw. der Molekülgrößenverteilung der Fraktionen verbunden (Kap. 4.5.1). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es bei der Lagerung und Dialyse von DOM-Proben zu größeren Verlusten bzw. Veränderungen der Probenzusammensetzung kommen kann als bei der Fraktionierung. Die Fraktionierung selbst stellt bei der Herstellung von Fraktionen für die strukturelle Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie einen zeitaufwändigen, aber relativ problemlosen Aufbereitungsschritt dar.

Die mit SEC und mst-UF hergestellten Fraktionen enthielten DOM aus verschiedenen Molekülgrößenbereichen der Ausgangsprobe. Mit beiden Methoden konnte eine Größenfraktionierung erreicht werden; die beiden Fraktionierungsmethoden unterschieden sich jedoch in ihrer Trennleistung. Mit Hilfe der Asymmetrischen Fluss Feld-Fluss-Fraktionierung (AF<sup>4</sup>) konnte gezeigt werden, dass die mst-UF-Fraktionen eine breitere Molekülgrößenverteilung aufwiesen als die SEC-Fraktionen der gleichen Probe. In den nominell höhermolekularen mst-UF-Fraktionen waren aus verschiedenen Gründen (Dead-end Filtration im Konzentrationsmodus, Deckschichtbildung, Wechselwirkungen) auch niedermolekulare Verbindungen enthalten (Kap. 4.4).

Durch die <sup>13</sup>C MAS NMR-spektroskopische Analyse konnte erstmals eine strukturelle Charakterisierung der SEC-Fraktionen der Hohlohsee-DOM erreicht werden. Die am Ausschlussvolumen eluierende Fraktion F1 unterschied sich in ihrer Zusammensetzung grundlegend von der Probe HO12 K a sowie von sämtlichen anderen Fraktionen. Die DOM dieser Fraktion bestand überwiegend aus Kohlenhydraten (O-Alkylanteil von 50 %). Anhand der schmalen



Signalgruppenbreite im NMR-Spektrum kann auf eine, verglichen mit Huminstoffen, außerordentlich hohe Homogenität der DOM geschlossen werden. Die restlichen Fraktionen unterschieden sich weniger stark von der Ausgangsprobe. Mit zunehmendem Elutionsvolumen waren jedoch auch dort strukturelle Unterschiede erkennbar. Der Anteil an Kohlenhydratstrukturen nahm von F1 zu F4 ab, der Gehalt an verzweigten O-Alkyl-Strukturen und verzweigten aliphatischen Strukturen dagegen zu. Der Anteil der Carboxylfunktionen sowie das Verhältnis der Anteile von Carboxylgruppen-C-Atomen zu aromatischen C-Atomen nahmen von F1 zu F4 bzw. von F2 zu F4 ebenfalls zu. Derartige strukturelle Veränderungen geben Hinweise auf einen zunehmenden Modifikationsgrad sowie eine Abnahme der mittleren Molekülgröße der DOM als Folge des oxidativen biologischen Abbaus der Vorläufersubstanzen. Auf Grundlage der Strukturdaten sowie weiterer Literaturdaten kann gefolgert werden, dass die SEC-Trennung in den Elutionsbereichen der Fraktionen F1 bis F4 überwiegend auf Größenausschlussmechanismen beruht. Im Spektrum der Fraktion F5 finden sich Hinweise auf die Anwesenheit gering modifizierter, höhermolekularer Ligninderivate (z. B. Methoxylgruppensignal). Die Elution derartiger Strukturen bei größeren Elutionsvolumina deutet darauf hin, dass eine Beeinträchtigung der Größentrennung durch unspezifische Wechselwirkungen vorliegt. Hierbei handelt es sich jedoch um einen kleinen Anteil der DOM der Probe HO12 K a. Für die Fraktionen F1 bis F5 konnte eine Korrelation der spezifischen UV-Absorption bei 254 nm ( $SUVA_{254}$ ) mit ihrem Anteil an aromatischen Strukturen nachgewiesen werden (Kap. 4.5.1).

Die Ergebnisse der strukturellen Charakterisierung der SEC-Fraktionen stellen eine wertvolle Grundlage für den Einsatz der SEC als analytische Methode (LC-UV/OCD-System) dar. In dieser Arbeit konnte eine Zuordnung chemischer Strukturen zu den Elutionsbereichen des SEC-Chromatogramms der Hohlohsee-DOM getroffen werden. Dies ermöglicht für zukünftige Arbeiten eine weitergehende Interpretation der Ergebnisse der SEC-Trennung auf der Grundlage struktureller Informationen.

Die strukturellen Unterschiede der mst-UF-Fraktionen der Hohlohsee-DOM (Probe HO21) waren geringer ausgeprägt als die der SEC-Fraktionen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Charakterisierung der SEC-Fraktionen wurde eine Abnahme des Anteils der Kohlenhydratstrukturen sowie eine Zunahme der Anteile von Carboxylfunktionen und verzweigten Aliphaten bzw. verzweigten O-Alkylstrukturen mit abnehmender nomineller Molekülgröße gefunden. Der bei der SEC-Fraktionierung als Fraktion 1 isolierte Anteil der DOM konnte mit Hilfe der analytischen SEC auch als Bestandteil höhermolekularer mst-UF-Fraktionen nachgewiesen werden (Kap. 4.5.2). Diese Übereinstimmungen sowie die Übereinstimmung mit weiteren Literaturdaten

lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Fraktionierung des Großteils der DOM dieser Probe mit beiden Methoden überwiegend auf Größenausschlussmechanismen beruht.

Die DOM des Kläranlagenablaufs (Probe Alb5 bzw. ABV) unterscheidet sich in ihrer Molekülgrößenverteilung sowie in ihren chemischen Strukturen deutlich von der des Hohlohsees. Nach der Anreicherung mittels Ultrafiltration (MWCO = 1000 g/mol) waren nahezu 50 % des DOC im Permeat enthalten. Die Ergebnisse der analytischen SEC bestätigen, dass die DOM dieser Probe einen hohen Anteil an niedermolekularen Substanzen enthält. Ein Teil der DOM zeigte Wechselwirkungen mit dem SEC-Trennmateriale. Für die Fraktionen dieser Probe wurde eine Zunahme des  $SUVA_{254}$ -Wertes mit abnehmender nomineller Molekülgröße festgestellt. Die Ergebnisse der physikochemischen Charakterisierung (Molekülgrößenverteilung, UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie) zeigen deutliche Unterschiede zur Hohlohsee-DOM auf. Aus Literaturdaten ist bekannt, dass ausgeprägte strukturelle Unterschiede zwischen der Hohlohsee-DOM und der des Kläranlagenablaufs bestehen.

Durch Experimente mit Modellschadstoffen (4-Nonylphenol, Nonylphenoethoxylate, Coffein) konnte gezeigt werden, dass das Verhalten niedermolekularer organischer Verbindungen bei der mst-UF-Fraktionierung wesentlich von deren Polarität abhängt. Für die Nonylphenolderivate ergab sich eine Korrelation zwischen der Gesamtwiederfindung und dem HLB-Wert der Substanzen (hydrophile lipophile balance). Die Fraktionierung in Anwesenheit von DOM (Probe HO21) führte nicht zu einer relativen Anreicherung von Modellschadstoffen in einer bestimmten mst-UF-Fraktion. Dies deutet darauf hin, dass keine gröbenselektiven Wechselwirkungen zwischen den ausgewählten Substanzen und DOM-Fraktionen auftraten. Die Filtration in Anwesenheit von DOM hatte allerdings einen erhöhten Verlust hydrophober MSS zur Folge. Als Ursache hierfür kommt eine Adsorption an das durch DOM gebildete Deckschichtmaterial in Frage.

Aus dieser Arbeit ergeben sich interessante Fragestellungen für zukünftige Untersuchungen:

Die Probe HO12 K a, die zur SEC-Fraktionierung und zur NMR-spektroskopischen Analyse verwendet worden war, unterschied sich in ihrer Zusammensetzung vom im Jahr 1996 hergestellten UF-Konzentrat sowie von der Originalprobe (HO12 bzw. HO13, FRIMMEL ET AL. 2002). Durch eine erneute Fraktionierung unter Verwendung eines frisch hergestellten UF-Konzentrats und NMR-spektroskopische Untersuchung der Fraktionen kann überprüft werden, welche Auswir-

kungen die unterschiedliche Zusammensetzung der Ausgangsprobe auf die chemischen Strukturen der DOM der SEC-Fractionen hat.

Ein quantitativ auswertbares NMR-Spektrum der SEC-Fraktion 6 der Hohlohsee-DOM (Probe HO12 K b) konnte nicht aufgenommen werden, weil die Menge an organischer Substanz zu gering bzw. die Restgehalte an anorganischen Salzen in der Probe zu hoch waren. Die strukturelle Charakterisierung der DOM dieser Fraktion ist aufgrund ihres besonderen Elutionsverhaltens bei der SEC besonders interessant. Höhere Ausgangsmengen an Probenmaterial für die präparative Fraktionierung, die Verwendung anderer Methoden zur Abtrennung der anorganischen Salze (z. B. Nanofiltration) oder alternativer Analysenmethoden (z. B. NMR-spektroskopische Methoden, Infrarotspektroskopie) können die Identifizierung von Strukturbestandteilen in Fraktion 6 ermöglichen.

Dadurch, dass den Elutionsbereichen im SEC-Chromatogramm chemische Strukturen zugeordnet werden können, ist es möglich, die Veränderung der Chromatogramme nach verschiedenen wassertechnologischen Aufbereitungsverfahren (Flockung, Adsorption an Aktivkohle, Membranfiltration) weitergehend zu interpretieren. Die mit diesen Verfahren verbundenen Veränderungen der Molekülgrößenverteilung der Probe können dadurch u. U. auf ein strukturselektives Verhalten bzw. eine strukturselektive Reaktivität der Hohlohsee-DOM zurückgeführt werden. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die strukturelle Zuordnung keine Gültigkeit für Elutionsbereiche besitzt, in denen eine Zunahme der Signalintensität beobachtet wird (z. B. als Folge einer chemischen Reaktion). Die Kenntnis der chemischen Strukturen der SEC-Fractionen kann weiterhin genutzt werden, um die Wechselwirkung der Hohlohsee-DOM mit anderen Wasserinhaltsstoffen (z. B. Tonminerale, Metalle, Xenobiotika) zu untersuchen. Die beschriebenen Anwendungsmöglichkeiten sind nur bei Verwendung gleicher experimenteller Bedingungen für die SEC-Trennung gültig. Es ist insbesondere darauf zu achten, dass die Trennung unter Verwendung der TSK HW 50-(S)-Säule als stationärer Phase vorgenommen wird.

Wird die mst-UF-Fraktionierung im Diafiltrationsmodus durchgeführt, so kann u. U. eine bessere Größenfraktionierung der DOM erreicht werden. In diesem Fall sind ausgeprägtere strukturelle Unterschiede zwischen einzelnen Fraktionen zu erwarten. Die Qualität des Trennergebnisses kann mit Hilfe der SEC überprüft werden.

Für die Fraktionen der Kläranlagenablauf-DOM kann als Arbeitshypothese angenommen werden, dass deutliche strukturelle Unterschiede zwischen den Fraktionen dieser DOM und der Hohlohsee-DOM bestehen. Durch eine präparative Fraktionierung (SEC, mst-UF) und strukturelle Charakterisierung kann diese Annahme überprüft werden. Von Interesse ist weiterhin, ob auch für DOM anderer Herkunft derart markante Unterschiede zwischen der SEC-Fraktion 1 und der Ausgangsprobe sowie der restlichen DOM bestehen wie für die Hohlohsee-DOM. Da für die DOM des Kläranlagenablaufs Wechselwirkungen von DOM-Bestandteilen mit der stationären Phase beobachtet wurden, kann die Aufklärung der chemischen Strukturen der retardierten Fraktion außerdem zu einem erweiterten Verständnis der der SEC-Fraktionierung zugrundeliegenden Trennmechanismen beitragen.

## Literaturverzeichnis

- Abbt-Braun, G., Frimmel, F. H., Lipp, P. (1991a): Isolation of Organic Substances from Aquatic and Terrestrial Systems - Comparison of Some Methods. *Z. Wasser-Abwasser-Forsch.* 24: 285-292.
- Abbt-Braun, G., Weis, M., Frimmel, F. H. (1991b): Fractionation and Characterization of Humic Substances Using Gelchromatography in Preparative Scale. *Finnish Humus News* 3: 151-156.
- Abbt-Braun, G., Johannsen, K., Kleiser, M., Frimmel, F. H. (1994): Adsorption Behaviour of Humic Substances on Activated Carbon: Comparison with the Physical and Chemical Character of Material from Different Origin. *Environ. Int.* 20: 397-403.
- Abbt-Braun, G., Frimmel, F. H. (2002): The Relevance of Reference Materials – Isolation and General Characterization. In: Frimmel, F. H., Abbt-Braun, G., Heumann, K. G., Hock, B., Lüdemann, H.-D., Spiteller, M. (Hrsg.): *Refractory Organic Substances in the Environment*. Wiley-VCH, Weinheim, S. 1-38.
- Abbt-Braun, G., Lankes, U., Jahnel, J. B., Lambert, J., Lüdemann, H.-D., Frimmel, F. H. (2002): Chemical and Spectroscopical Data of the Reference Samples – Comparison and Evaluation. In: Frimmel, F. H., Abbt-Braun, G., Heumann, K. G., Hock, B., Lüdemann, H.-D., Spiteller, M. (Hrsg.): *Refractory Organic Substances in the Environment*. Wiley-VCH, Weinheim, S. 302-309.
- Abbt-Braun, G. (2003): Persönliche Mitteilung. Engler-Bunte-Institut, Universität Karlsruhe (TH).
- Ahel, M., Giger, W. (1985a): Determination of Alkylphenols and Alkylphenol Mono- and Diethoxylates in Environmental Samples by High-performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 57: 1577-1583.
- Ahel, M., Giger, W. (1985b): Determination of Nonionic Surfactants of the Alkylphenol Polyethoxylate Type by High-performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 57: 2584-2590.
- Ahel, M., Giger, W. (1993a): Aqueous Solubility of Alkylphenols and Alkylphenol Polyethoxylates. *Chemosphere* 26: 1461-1470.
- Ahel, M., Giger, W. (1993b): Partitioning of Alkylphenols and Alkylphenol Polyethoxylates Between Water and Organic Solvents. *Chemosphere* 26: 1471-1478.
- Ahel, M., Giger, W., Koch, M. (1994): Behaviour of Alkylphenol Polyethoxylate Surfactants in the Aquatic Environment – I. Occurrence and Transformation in Sewage Treatment. *Wat. Res.* 28: 1131-1142.
- Ahel, M., Giger, W., Molnar, E., Ibric, S. (2000): Determination of Nonylphenol Polyethoxylates and Their Lipophilic Metabolites in Sewage Effluents by Normal-phase High-performance Liquid Chromatography and Fluorescence Detection. *Croatica Chimica Acta* 73: 209-227.
- Aho, J., Lehto, O. (1984): Effect of Ionic Strength on Elution of Aquatic Humus in Gel Filtration Chromatography. *Arch. Hydrobiol.* 101: 21-38.
- Aiken, G. R. (1984): Evaluation of Ultrafiltration for Determining Molecular Weight of Fulvic Acid. *Environ. Sci. Technol.* 18: 978-981.
- Aiken, G. R., McKnight, D. M., Wershaw, R. L. (Hrsg.): *Humic Substances in Soil, Sediment, and Water*. Wiley, New York, 1985.
- Amy, G. L., Collins, M. R., Kuo, C. J., King, P. H. (1987): Comparing Gel Permeation Chromatography and Ultrafiltration for the Molecular Weight Characterization of Aquatic Organic Matter. *J. Am. Wat. Works Assoc.* 79: 43-49.
- Anderson, H. A., Hepburn, A. (1977): Fractionation of Humic Acid by Gel Permeation Chromatography. *J. Soil Sci.* 28: 634-644.
- Avena, J. M., Wilkinson, K. J. (2002): Disaggregation Kinetics of a Peat Humic Acid: Mechanism and pH Effects. *Environ. Sci. Technol.* 36: 5100-5105.

- Baker, A. (2002): Fluorescence Excitation-Emission Matrix Characterization of River Waters Impacted by a Tissue Mill Effluent. *Environ. Sci. Technol.* 36: 1377-1382.
- Balnois, E., Wilkinson, E. J., Lead, J. R., Buffle, J. (1999): Atomic Force Microscopy of Humic Substances: Effects of pH and Ionic Strength. *Environ. Sci. Technol.* 33: 3911-3917.
- Barber, L. B., Leenheer, J. A., Noyes, T. I., Stiles, E. A. (2002): Nature and Transformation of Dissolved Organic Matter in Treatment Wetlands. *Environ. Sci. Technol.* 35: 4805-4816.
- Becher, G., Carlberg, G. E., Gjessing, E. T., Hongslo, J. K., Monarca, S. (1985): High-performance Size Exclusion Chromatography of Chlorinated Natural Humic Water and Mutagenicity Studies Using the Microscale Fluctuation Assay. *Environ. Sci. Technol.* 19: 422-426.
- Beckett, R., Jue, Z., Giddings, J. C. (1987): Determination of Molecular Weight Distribution of Fulvic and Humic Acids Using Flow Field-Flow Fractionation. *Environ. Sci. Technol.* 21: 289-295.
- Bennie, D. T. (1999): Review of the Environmental Occurrence of Nonylphenol and Nonylphenol Ethoxylates in Aquatic Environments. *Water Qual. Res. J. Canada* 34: 79-122.
- Bloom, P. R., Leenheer, J. A. (1989): Vibrational, Electronic, and High-energy Spectroscopic Methods for Characterizing Humic Substances. In: Hayes, M. H. B., MacCarthy, P., Malcolm, R. L., Swift, R. S. (Hrsg.): *Humic Substances II – In Search of Structure*. Wiley, Chichester, S. 409-446.
- BNL Broschüre (1999): Hochmoore am Kaltenbronn. Bezirksstelle für Naturschutz und Landschaftspflege Karlsruhe.
- Brinkmann, T. (2003): Alkalischer und solarinduzierter Abbau von natürlicher organischer Materie. Dissertation Universität Karlsruhe (TH).
- Buerge, I. J., Poiger T., Müller, M. D., Buser, H.-R. (2003): Caffeine, an Anthropogenic Marker for Wastewater Contamination of Surface Waters. *Environ. Sci. Technol.* 37: 691-700.
- Burger, K., Köhler, J., Jork, H. (1990): Application of AMD to the Determination of Crop Protection Agents in Drinking Water. Part 1: Fundamentals and Method. *J. Planar Chromatogr.* 3: 504-510.
- Cai, Y. (1999): Size Distribution Measurements of Dissolved Organic Carbon in Natural Waters Using Ultrafiltration Technique. *Wat. Res.* 33: 3056-3060.
- Cameron, R. S., Swift, R. S., Thornton, B. K., Posner, A. M. (1972a): Calibration of Gel Permeation Chromatography Materials for Use with Humic Acid. *J. Soil Sci.* 23: 342-349.
- Cameron, R. S., Thornton, B. K., Swift, R. S., Posner, A. M. (1972b): Molecular Weight and Shape of Humic Acids from Sedimentation and Diffusion Measurements on Fractionated Extracts. *J. Soil Sci.* 23: 394-408.
- Cathala, B., Saake, B., Faix, O., Monties, B. (2003): Association Behaviour of Lignins and Lignin Model Compounds Studied by Multidetector Size-exclusion Chromatography. *J. Chromatogr. A* 1020: 229-239.
- Chang, S., Waite, T. D., Schäfer, A. I., Fane, A. G. (2003): Adsorption of the Endocrine-active Compound Estrone on Microfiltration Hollow Fiber Membranes. *Environ. Sci. Technol.* 37: 3158- 3163.
- Chin, Y.-P., Gschwend, P. M. (1991): The Abundance, Distribution, and Configuration of Porewater Organic Colloids in Recent Sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 55: 1309-1317.
- Chin, Y.-P., Aiken, G., O'Loughlin, E. (1994): Molecular Weight, Polydispersity, and Spectroscopic Properties of Aquatic Humic Substances. *Environ. Sci. Technol.* 28: 1853-1858.
- Chin, Y.-P., Aiken, G. R., Danielsen, K. M. (1997): Binding of Pyrene to Aquatic and Commercial Humic Substances: the Role of Molecular Weight and Aromaticity. *Environ. Sci. Technol.* 31: 1630-1635.
- Cho, J., Amy, G., Pellegrino, J. (2000): Membrane Filtration of Natural Organic Matter: Factors and Mechanisms Affecting Rejection and Flux Decline with Charged Ultrafiltration (UF) Membrane. *J. Membrane Sci.* 164: 89-110.

- Christl, I., Knicker, H., Kögel-Knabner, I., Kretzschmar, R. (2000): Chemical Heterogeneity of Humic Substances: Characterization of Size Fractions Obtained by Hollow-fibre Ultrafiltration. *Europ. J. Soil Sci.* 51: 617-625.
- Christman, R. F., Ghassemi, M. (1966): Chemical Nature of Organic Color in Water. *J. Am. Wat. Works Assoc.* 58: 723-741.
- Coble, P. G. (1996): Characterization of Marine and Terrestrial DOM in Seawater Using Excitation-emission Matrix Spectroscopy. *Mar. Chem.* 51: 325-346.
- Commission of the European Communities, Brussels (2001): Amended Proposal for a Decision of the European Parliament and of the Council Establishing the List of Priority Substances in the Field of Water Policy.
- Crececius, A., Clench, M. R., Richards, D. S., Parr, V. (2002): Thin-layer Chromatography-matrix-assisted Laser Desorption Ionisation-time-of-flight Mass Spectrometry Using Particle Suspension Matrices. *J. Chromatogr. A* 958: 249-260.
- De La Vigne, W., Jänchen, D. E., Weber, W. H. (1991): Application of High-performance Thin-layer Chromatography and Automated Multiple Development for the Identification and Determination of Pesticides in Water. *J. Chromatogr. A* 553: 489-496.
- De Nobili, M., Chen, Y. (1999): Size Exclusion Chromatography of Humic Substances: Limits, Perspectives, and Prospects. *Soil Sci.* 164: 825-833.
- Dell'Agnola, G., Ferrari, G. (1971): Molecular Sizes and Functional Groups of Humic Substances Extracted by 0.1 M Pyrophosphate from Soil Aggregates of Different Stability. *J. Soil Sci.* 22: 342-349.
- Deshmukh, A. P., Chefetz, B., Hatcher, P. G. (2001): Characterization of Organic Matter in Pristine and Contaminated Coastal Marine Sediments Using Solid-state <sup>13</sup>C NMR, Pyrolytic and Thermochemolytic Methods: a Case Study in the San Diego Harbor Area. *Chemosphere* 45: 1007-1022.
- Destailats, H., Hung, H.-M., Hoffmann, M. R. (2000): Degradation of Alkylphenol Ethoxylate Surfactants in Water with Ultrasonic Irradiation. *Environ. Sci. Technol.* 34: 311-317.
- Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung (2000): Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F) Teil 7: Bestimmung von sechs polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) in Trink- und Mineralwasser mittels Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie (HPTLC). Beuth Verlag, Berlin.
- DIN (Deutsches Institut für Normung e. V.) (1994): DIN 32645: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze.
- DIN (Deutsches Institut für Normung e. V.) (1995): DIN V 38407-11: Bestimmung ausgewählter organischer Pflanzenbehandlungsmittel mittels Automated-Multiple-Development (AMD)-Technik.
- Di Corcia, A., Costantino, A., Crescenzi, C., Marinoni, E., Samperi, R. (1998): Characterization of Recalcitrant Intermediates from Biotransformation of the Branched Alkyl Side Chain of Nonylphenol Ethoxylate Surfactants. *Environ. Sci. Technol.* 32: 2401-2409.
- Doll, T. E., Frimmel, F. H., Kumke, M. U., Ohlenbusch, G. (1999): Interaction Between Natural Organic Matter (NOM) and Polycyclic Aromatic Compounds (PAC) – Comparison of Fluorescence Quenching and Solid Phase Micro Extraction (SPME). *Fres. J. Anal. Chem.* 364: 313-319.
- Duarte, R. M. B. O., Santos, E. B. H., Duarte, A. (2001): Comparison Between Diafiltration and Concentration Operation Modes for the Determination of Permeation Coefficients of Humic Substances Through Ultrafiltration Membranes. *Anal. Chim. Acta* 442: 155-164.
- Eberz, G., Rast, H.-G., Burger, K., Kreiss, W., Weisemann, C. (1996): Bioactivity Screening by Chromatography-bioluminescence Coupling. *Chromatographia* 43: 5-9.
- Egeberg, P. K., Christy, A. A., Eikenes, M. (2002): The Molecular Size of Natural Organic Matter (NOM) Determined by Diffusivity and Seven Other Methods. *Wat. Res.* 36: 925-932.
- Enfield, C. G., Bengtsson, G., Lindqvist, R. (1989): Influence of Macromolecules on Chemical Transport. *Environ. Sci. Technol.* 23: 1278-1286.

- Everett, C. R., Chin, Y.-P., Aiken, G. R. (1999): High-pressure Size Exclusion Chromatography Analysis of Dissolved Organic Matter Isolated by Tangential-flow Ultrafiltration. *Limnol. Oceanogr.* 44: 1316-1322.
- Ferguson, P. L., Iden, C. R., Brownawell, B. J. (2000): Analysis of Alkylphenol Ethoxylate Metabolites in the Aquatic Environment Using Liquid Chromatography-electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 72: 4322-4330.
- Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, PtWt+E (Hrsg.): Abschlußbericht zum Forschungsverbundvorhaben "Einsatz eines neuen summarischen Konzepts für die wirkungsspezifische Beurteilung der organischen Belastung eines Gewässers (WISBOB)", 2002.
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Förstermann, U., Starke, K. (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer, München, 8. Auflage, 2001.
- Friebolin, H.: Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie – Eine Einführung. Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- Frimmel, F. H., Gremm, T., Huber, S. (1992): Liquid Chromatographic Characterization of Refractory Organic Acids. *Sci. Tot. Environ.* 117/118: 197-206.
- Frimmel, F. H., Abbt-Braun, G. (1999): Basic Characterization of Reference NOM From Central Europe – Similarities and Differences. *Environ. Int.* 25: 191-207.
- Frimmel, F. H. (2001): Aquatic Humic Substances. In: Steinbüchel, A., Hofrichter, M. (Hrsg.): Biopolymers. Wiley-VCH, Weinheim, S. 301-324.
- Frimmel, F. H., Abbt-Braun, G., Hesse, S., Kleiser, G. (2001): Fate of Organic Matter in Water Treatment – Degradation and Reaction. In: Swift, R. S., Spark, K. M. (Hrsg.): Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Conference of the International Humic Substances Society (IHSS), Adelaide, Australia, S. 453-465.
- Frimmel, F. H., Abbt-Braun, G., Heumann, K. G., Hock, B., Lüdemann, H.-D., Spitteller, M. (Hrsg.): Refractory Organic Substances in the Environment. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2002.
- Fuchs, F. (1985a): Gelchromatographische Trennung von organischen Wasserinhaltsstoffen. Teil II: Ergebnisse der Trennungen bei Oberflächenwässern und Abwässern. *Vom Wasser* 65: 93-106.
- Fuchs, F. (1985b): Gelchromatographische Trennung von organischen Wasserinhaltsstoffen. Teil III: Untersuchungen zu den Wechselwirkungen zwischen Gelmatrix, Probensubstanz und Elutionsmittel. *Vom Wasser* 66: 127-136.
- Fuchs, F., Heidt, A. (1994): Application of Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) in Water Analysis. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 22: 121-129.
- Gelotte, B. (1959): Studies on Gel Filtration Sorption Properties of the Bed Material Sephadex. *J. Chromatogr.* 3: 330-342.
- Gjessing, E., Lee, G. F. (1967): Fractionation of Organic Matter in Natural Waters on Sephadex Columns. *Environ. Sci. Technol.* 1: 631-638.
- Gorenflo, A. (2003): Rückhalt und Fouling von natürlichen organischen Substanzen bei der Nano- und Ultrafiltration. Dissertation Universität Karlsruhe (TH).
- Griffin, W. C. (1949): Classification of Surface-active Agents by HLB. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1: 311-326.
- Guenther, K., Heinke, V., Thiele, B., Kleist, E., Prast, H., Raecker, T. (2002): Endocrine Disrupting Nonylphenols are Ubiquitous in Food. *Environ. Sci. Technol.* 36: 1676-1680.
- Gundersen, J. (2001): Separation of Isomers of Nonylphenol and Selected Nonylphenol Polyethoxylates by High-performance Liquid Chromatography on a Graphitic Carbon Column. *J. Chromatogr. A* 914: 161-166.
- Hahn-Deinstropp, E.: Dünnschichtchromatographie – Praktische Durchführung und Fehlervermeidung. Wiley-VCH, Weinheim, 1998.
- Hamburger, M. O., Cordell, G. A. (1987): A Direct Bioautographic TLC Assay for Compounds Possessing Antibacterial Activity. *J. Natural Products* 50: 19-22.



- Hatcher, P. G., Breger, I. A., Dennis, L. W., Maciel, G. E. (1983): Solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR of Sedimentary Humic Substances: New Revelations on Their Chemical Composition. In: Gjessing, E. T., Christman, R. F. (Hrsg.): Aquatic, and Terrestrial Humic Materials. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, S. 37-82.
- Hauck, H. E., Bund, O., Fischer, W., Schulz, M. (2001): Ultra-thin Layer Chromatography (UTLC) – A New Dimension in Thin-Layer Chromatography. *J. Planar Chromatogr.* 14: 234-236.
- Hautala, K., Peuravuori, J., Pihlaja, K. (2000): Measurement of Aquatic Humus Content by Spectroscopic Analyses. *Wat. Res.* 34: 246-258.
- Hayes, M. H. B., MacCarthy, P., Malcolm, R. L., Swift, R. S. (1989): The Search for Structure: Setting the Scene. In: Hayes, M. H. B., MacCarthy, P., Malcolm, R. L., Swift, R. S. (Hrsg.): Humic Substances II – In Search of Structure. Wiley, Chichester, S. 3-32.
- Her, N., Amy, G., Foss, D., Cho, J. (2002a): Variations of Molecular Weight Estimation by HP-size Exclusion Chromatography with UVA versus Online DOC Detection. *Environ. Sci. Technol.* 36: 3393-3399.
- Her, N., Amy, G., Foss, D., Cho, J., Yoon, Y., Kosenka, P. (2002b): Optimization of Method for Detecting and Characterizing NOM by HPLC-size Exclusion Chromatography with UV and On-line DOC Detection. *Environ. Sci. Technol.* 36: 1069-1076.
- Her, N., Amy, G., McKnight, D., Sohn, J., Yoon, Y. (2003): Characterization of DOM as a Function of MW by Fluorescence EEM and HPLC-SEC Using UVA, DOC, and Fluorescence Detection. *Wat. Res.* 37: 4295-4303.
- Hesse, S., Kleiser, G., Frimmel, F. H. (1999): Characterization of Refractory Organic Substances (ROS) in Water Treatment. *Wat. Sci. Tech.* 40: 1-7.
- Heumann, K. G., Abbt-Braun, G., Behrens, K., Burba, P., Frimmel, F. H., Jakubowski, B., Knöchel, A., Mielcke, J., Rädlinger, G., Marx, G., Vogl, J. (2002): Elemental Determination and Its Quality Control in Fractions of Refractory Organic Substances and the Corresponding Original Water Samples. In: Frimmel, F. H., Abbt-Braun, G., Heumann, K. G., Hock, B., Lüdemann, H.-D., Spiteller, M. (Hrsg.): Refractory Organic Substances in the Environment. Wiley-VCH, Weinheim, S. 39-53.
- Hine, P. T., Bursill, D. B. (1984): Gel Permeation Chromatography of Humic Acid. Problems Associated with Sephadex Gel. *Wat. Res.* 18: 1461-1465.
- Hofe, T. (2003): Persönliche Mitteilung. PSS Standards Service, Mainz.
- Hongve, D., Baann, J., Becher, G., Lømo, S. (1996): Characterization of Humic Substances By Means of High-performance Size Exclusion Chromatography. *Environ. Int.* 22: 489-494.
- Hoque, E., Wolf, M., Teichmann, G., Peller, E., Schimmack, W., Buckau, G. (2003): Influence of Ionic Strength and Organic Modifier Concentrations on Characterization of Aquatic Fulvic and Humic Acids by High-performance Size-exclusion Chromatography. *J. Chromatogr. A* 1017: 97-105.
- Horvath, G., Kocsis, B., Botz, L., Nemeth, J., Szabo, L. (2002): Antibacterial Activity of Thymus Phenols by Direct Bioautography. *Acta Biol. Szegediensis* 46: 145-146.
- Hostettmann, K., Terreaux, C., Marston, A., Potterat, O. J. (1997): The Role of Planar Chromatography in the Rapid Screening and Isolation of Bioactive Compounds from Medicinal Plants. *J. Planar Chromatogr.* 10: 251-257.
- Huber, S. A., Frimmel, F. H. (1991): Flow Injection Analysis of Organic and Inorganic Carbon in the Low-ppb Range. *Anal. Chem.* 63: 2122-2130.
- Huber, S. (1992): Entwicklung und Einsatz eines Analysenverbundsystems zur chromatographischen Charakterisierung natürlicher organischer Wasserinhaltsstoffe. Dissertation Universität Karlsruhe (TH).
- Huber, S. A., Frimmel, F. H. (1992): A Liquid Chromatographic System with Multi-detection for the Direct Analysis of Hydrophilic Organic Compounds in Natural Waters. *Fres. J. Anal. Chem.* 342: 198-200.
- Huber, S. A., Balz, A., Frimmel, F. H. (1994): Identification of Diffuse and Point Sources of Dissolved Organic Carbon (DOC) in a Small Stream (Alb, Southwest Germany), Using Gel Filtration Chromatography with High-sensitivity DOC-detection. *Fres. J. Anal. Chem.* 350: 496-503.

- Huber, S. A., Frimmel, F. H. (1996): Gelchromatographie mit Kohlenstoffdetektion (LC-OCD): Ein rasches und aussagekräftiges Verfahren zur Charakterisierung hydrophiler organischer Wasserinhaltsstoffe. *Vom Wasser* 86: 277-290.
- Imai, A., Fukushima, T., Matsushige, K., Kim, Y.-H., Choi, K. (2002): Characterization of Dissolved Organic Matter in Effluents from Wastewater Treatment Plants. *Wat. Res.* 36: 859-870.
- Jahnel, J. B., Brinkmann, T., Abbt-Braun, G., Frimmel, F. H. (2002): Occurrence of Amino Acids, Carbohydrates, and Low-molecular-weight Organic Acids in Refractory Organic Substances. In: Frimmel, F. H., Abbt-Braun, G., Heumann, K. G., Hock, B., Lüdemann, H.-D., Spiteller, M. (Hrsg.): *Refractory Organic Substances in the Environment*. Wiley-VCH, Weinheim, S. 264-281.
- Johannsen, K., Assenmacher, M., Kleiser, M., Abbt-Braun, G., Sontheimer, H., Frimmel, F. H. (1993): Einfluss der Molekülgröße auf die Adsorbierbarkeit von Huminstoffen. *Vom Wasser* 81: 185-196.
- Jonkers, N., Knepper, T. P., Voogt, P. D. (2001): Aerobic Degradation Studies of Nonylphenol Ethoxylates in River Water Using Liquid Chromatography-electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 35: 335-340.
- Jork, H.: *Dünnschicht-Chromatographie. Reagenzien und Nachweismethoden. Band 1 a*. VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1993a.
- Jork, H.: *Dünnschicht-Chromatographie. Reagenzien und Nachweismethoden. Band 1 b*. VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1993b.
- Jun, Z., Leming, L., Yuesong, W., Guoxi, X., Yaje, Z. (1998): A Rapid Thin-layer Chromatographic Method for Comparison of Different Ethoxylation Products in the Manufacture of Non-ionic Surfactants. *Chromatographia* 47: 98-100.
- Khalaf, M., Kohl, S. D., Klumpp, E., Rice, J. A., Tombácz, E. (2003): Comparison of Sorption Domains in Molecular Weight Fractions of a Soil Humic Acid Using Solid-state <sup>19</sup>F NMR. *Environ. Sci. Technol.* 37: 2855-2860.
- Kilduff, J. E., Karanfil, T., Chin, Y.-P., Weber, W. J. (1996): Adsorption of Natural Organic Polyelectrolytes by Activated Carbon: A Size-exclusion Chromatography Study. *Environ. Sci. Technol.* 30: 1336-1343.
- Kim, Y.-S., Katase, T., Sekine, S., Inoue, T., Makino, M., Uchiyama, T., Fujimoto, Y., Yamashita, N. (2004): Variation in Estrogenic Activity Among Fractions of a Commercial Nonylphenol by High Performance Liquid Chromatography. *Chemosphere* 54: 1127-1134.
- Kimura, K., Amy, G., Drewes, J., Watanabe, Y. (2003): Adsorption of Hydrophobic Compounds Onto NF/RO Membranes: an Artifact Leading to Overestimation of Rejection. *J. Membrane Sci.* 221: 89-101.
- Koeber, R., Niessner, R. (1996): Screening of Pesticide-contaminated Soil by Supercritical Fluid Extraction (SFE) and High-performance Thin-layer Chromatography with Automated Multiple Development (HPTLC/AMD). *Fres. J. Anal. Chem.* 354: 464-469.
- Kolpin, D., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., Buxton, H. T. (2002): Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U. S. Streams, 1999-2000: a National Reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36: 1202-1211.
- Körner, W., Hanf, V., Schuller, W., Kempfer, C., Metzger, J., Hagenmaier, H. (1999): Development of a Sensitive E-screen Assay for Quantitative Analysis of Estrogenic Activity in Municipal Sewage Plant Effluents. *Sci. Tot. Environ.* 225: 33-48.
- Kosswig, K., Stache, H (Hrsg.): *Die Tenside*. Hanser Verlag, München, 1993.
- Kuch, H., Ballschmitter, K. (2001): Determination of Endocrine-disrupting Phenolic Compounds and Estrogens in Surface and Drinking Water by HRGC-(NCI)-MS in the Picogram per Liter Range. *Environ. Sci. Technol.* 35: 3201-3206.
- Kumke, M. U., Frimmel, F. H. (2002): Stationary and Time-resolved Fluorescence for Refractory Organic Substances Characterization. In: Frimmel, F. H., Abbt-Braun, G., Heumann, K. G., Hock, B., Lüdemann, H.-D., Spiteller, M. (Hrsg.): *Refractory Organic Substances in the Environment*. Wiley-VCH, Weinheim, S. 215-231.

- Lankes, U. (2001): Festkörper-NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung von refraktären organischen Säuren in Gewässern. Dissertation Universität Regensburg.
- Lankes, U., Lüdemann, H.-D. (2002): Structural Characterization of Refractory Organic Substances by Solid-state High-resolution  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  Nuclear Magnetic Resonance. In: Frimmel, F. H., Abbt-Braun, G., Heumann, K. G., Hock, B., Lüdemann, H.-D., Spiteller, M. (Hrsg.): *Refractory Organic Substances in the Environment*. Wiley-VCH, Weinheim, S. 96-114.
- Lead, J. R., Wilkinson, K. J., Balnois, E., Cutak, B. J., Larive, C. K., Assemi, S., Beckett, R. (2000): Diffusion Coefficients and Polydispersities of the Suwannee River Fulvic Acid: Comparison of Fluorescence Correlation Spectroscopy, Pulsed-field Gradient Nuclear Magnetic Resonance, and Flow Field-flow Fractionation. *Environ. Sci. Technol.* 34: 3508-3513.
- Lee, H. (1999): Review of the Analytical Methods for the Determination of Nonylphenol and Related Compounds in Environmental Samples. *Water Qual. Res. J. Canada* 34: 3-35.
- Leenheer, J. A., Croué, J.-P. (2003): Characterizing Aquatic Dissolved Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* 37: 18A-26A.
- Leenheer, J. A., Nanny, M. A., McIntyre, C. (2003): Terpenoids as Major Precursors of Dissolved Organic Matter in Landfill Leachates, Surface Water, and Groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 37: 2323-2331.
- Leisewitz, A., Schwarz, W. (1997): Stoffströme wichtiger endokrin wirksamer Industriechemikalien (Bisphenol A, Dibutylphthalat/Benzylbutylphthalat, Nonylphenol/Alkylphenoethoxylate). UBA-FB 99-127.
- Lin, C.-F., Huang, Y.-J., Hao, O. J. (1999): Ultrafiltration Processes for Removing Humic Substances: Effect of Molecular Weight Fractions and PAC Treatment. *Wat. Res.* 33: 1252-1264.
- Lin, C.-F., Lin, T.-L., Hao, O. (2000): Effects of Humic Substance Characteristics on UF Performance. *Wat. Res.* 34: 1097-1105.
- Lindqvist, I. (1967): Adsorption Effects in Gel Filtration of Humic Acid. *Acta Chem. Scand.* 21: 2564-2566.
- Lorenz, K., Preston, C. M., Raspe, S., Morrison, I., K. Feger, K. H. (2000): Litter Decomposition and Humus Characteristics in Canadian and German Spruce Ecosystems: Information from Tannin Analysis and  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR. *Soil Bio. Biochem.* 32: 779-792.
- MacCarthy, P., Rice, J. (1985): Spectroscopic Methods (other than NMR) for Determining Functionality in Humic Substances. In: Aiken, G. R., McKnight, D. M., Wershaw, R. L. (Hrsg.): *Humic Substances in Soil, Sediment, and Water*. Wiley, New York, S. 527-560.
- Mackenzie, K., Georgi, A., Kumke, M., Kopinke, F.-D. (2002): Sorption of Pyrene to Dissolved Humic Substances and Related Model Polymers. 2. Solid-phase Microextraction (SPME) and Fluorescence Quenching Technique (FQT) as Analytical Methods. *Environ. Sci. Technol.* 36: 4403-4409.
- Maguire, J. R. (1999): Review of the Persistence of Nonylphenol and Nonylphenol Ethoxylates in Aquatic Environments. *Wat. Qual. Res. J. Canada* 34: 37-78.
- Mantoura, R. F. C., Riley, J. P. (1975): The Analytical Concentration of Humic Substances from Natural Waters. *Anal. Chim. Acta* 76: 97-106.
- Marston, A., Kissling, J., Hostettmann, K. (2002): A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants. *Phytochem. Anal.* 13: 51-54.
- Maurice, P. A., Pullin, M. J., Cabaniss, S. E., Zhou, Q., Namjesnik-Dejanovic, K., Aiken, G. R. (2002): A Comparison of Surface Water Natural Organic Matter in Raw Filtered Water Samples, XAD, and Reverse Osmosis Isolates. *Wat. Res.* 36: 2357-2371.
- McKnight, D. M., Boyer, E. W., Westerhoff, P. K., Doran, P. T., Kulbe, T., Andersen, D. T. (2001): Spectrofluorimetric Characterization of Dissolved Organic Matter for Indication of Precursor Organic Material and Aromaticity. *Limnol. Oceanogr.* 46: 38-48.
- Millipore (2001): <http://www.millipore.com>.

- Mori, S., Barth, H. G.: *Size Exclusion Chromatography*. Springer Verlag, Berlin, 1999.
- Müller, M. B., Abbt-Braun, G., Frimmel, F. H. (2002): Chemisch/physikalische Bewertung mit summarischen Parametern. In: Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, PtWt+E (Hrsg.): Abschlußbericht zum Forschungsverbundvorhaben "Einsatz eines neuen summarischen Konzepts für die wirkungsspezifische Beurteilung der organischen Belastung eines Gewässers (WISBOB)".
- Müller, M. B., Vercammen, K., Frimmel, F. H. (2003): Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Ofloxacin und NOM mittels Fluoreszenzlöschung. *Vom Wasser* 100: 85-98.
- Müller, M. B., Dausend, C., Weins, C., Frimmel, F. H. (2004): A New Bioautographic Screening Method for the Detection of Estrogenic Compounds. *Chromatographia* 60: 207-211.
- Myllykangas, T., Nissinen, T. K., Rantakokko, P., Martikainen, P. J., Vartiainen, T. (2002): Molecular Size Fractions of Treated Aquatic Humus. *Wat. Res.* 36: 3045-3053.
- Naylor, C. G. (1995): Environmental Fate and Safety of Nonylphenol Ethoxylates. *Tex. Chem. Color.* 27: 29-33.
- Nimrod, A. C., Benson, W. H. (1996): Environmental Estrogenic Effects of Alkylphenol Ethoxylates. *Crit. Rev. Toxicol.* 26: 335-364.
- Nuhn, P.: *Naturstoffchemie. Mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe*. S. Hirzel Verlag, Stuttgart, 3. Auflage, 1997.
- Patel-Sorrentino, N., Mounier, S., Benaim, J. Y. (2002): Excitation-emission Fluorescence Matrix to Study pH Influence on Organic Matter Fluorescence in the Amazon Basin Rivers. *Wat. Res.* 36: 359-363.
- Patterson, S. J., Scott, C. C., Tucker, K. B. E. (1967): Nonionic Detergent Degradation. I. Thin-layer Chromatography and Foaming Properties of Alcohol Polyethoxylates. *J. Am. Oil Chemists Soc.* 44: 407-412.
- Pelekani, C., Newcombe, G., Snoeyink, V. L., Hepplewhite, C., Assemi, S., Beckett, R. (1999): Characterization of Natural Organic Matter Using High Performance Size Exclusion Chromatography. *Environ. Sci. Technol.* 33: 2807-2813.
- Perminova, I. V., Frimmel, F. H., Kovalevskii, D. V., Abbt-Braun, G., Kudryavtsev, A. V., Hesse, S. (1998): Development of a Predictive Model for Calculation of Molecular Weight of Humic Substances. *Wat. Res.* 32: 872-881.
- Perminova, I. V., Frimmel, F. H., Kudryavtsev, A. V., Kulikova, N. A., Abbt-Braun, G., Hesse, S., Petrosyan, V. S. (2003): Molecular Weight Characteristics of Humic Substances from Different Environments as Determined by Size Exclusion Chromatography and their Statistical Evaluation. *Environ. Sci. Technol.* 37: 2477-2485.
- Peuravuori, J., Pihlaja, K. (1997): Molecular Size Distribution and Spectroscopic Properties of Aquatic Humic Substances. *Anal. Chim. Acta* 337: 133-149.
- Piccolo, A., Nardi, S., Concheri, G. (1996): Micelle-like Conformation of Humic Substances as Revealed by Size Exclusion Chromatography. *Chemosphere* 33: 595-602.
- Posner, A. M. (1963): Importance of Electrolyte in the Determination of Molecular Weights by Sephadex Gel Filtration, with Special Reference to Humic Acid. *Nature* 198: 1161-1163.
- Rahalison, L., Hamburger, M., Hostettmann, K. (1991): A Bioautographic Agar Overlay Method for the Detection of Antifungal Compounds from Higher Plants. *Phytochem. Anal.* 2: 199-203.
- Reynolds, D. M. (2003): Rapid and Direct Determination of Tryptophan in Water Using Synchronous Fluorescence Spectroscopy. *Wat. Res.* 37: 3055-3060.
- Routledge, E. J., Sumpter, J. P. (1996): Estrogenic Activities of Surfactants and Some of their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 241-248.
- Routledge, E. J., Sumpter, J. P. (1997): Structural Features of Alkylphenolic Chemicals Associated With Estrogenic Activity. *J. Biol. Chem.* 272: 3280-3288.

- Salloum, M. J., Chefetz, B., Hatcher, P. G. (2002): Phenanthrene Sorption by Aliphatic-rich Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* 36: 1953-1958.
- Saravia, F., Lankes, U., Gorenflo, A., Frimmel, F. H. (2003): Untersuchung des Membranfoulings mit NMR-Spektroskopie. In: *Membrantechnik in der Wasseraufbereitung und Abwasserbehandlung: Perspektiven, Neuentwicklung und Betriebserfahrungen im In- und Ausland*. 5. Aachener Tagung, Siedlungswasserwirtschaft und Verfahrenstechnik. T. Melin, M. Dohmann-Aachen, W11.
- Schäfer, A.I., Mauch, R., Waite, T. D., Fane, A. G. (2002): Charge Effects in the Fractionation of Natural Organics Using Ultrafiltration. *Environ. Sci. Technol.* 36: 2572-2580.
- Schmitt, D. (2002): Charakterisierung der Bindung von Metallionen an natürliche organische Substanzen und deren Auswirkungen auf Adsorption und Transport. Dissertation Universität Karlsruhe (TH).
- Schmitt, D., Saravia, F., Frimmel, F. H., Schuessler, W. (2003): NOM-facilitated Transport of Metal Ions in Aquifers: Importance of Complex-dissociation Kinetics and Colloid Formation. *Wat. Res.* 37: 3541-3550.
- 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. *Anal. Chim. Acta* 232: 77-106.
- Servos, M. R. (1999): Review of the Aquatic Toxicity, Estrogenic Responses and Bioaccumulation of Alkylphenol and Alkylphenol Ethoxylates. *Wat. Qual. Res. J. Canada* 34: 123-177.
- Sherma, J. (2002): Planar Chromatography. *Anal. Chem.* 74: 2653-2662.
- Sigma-Aldrich Produktinformation (1999).
- Soto, A. M., Justicia, H. W., Wray, J. W., Sonnenschein, C. (1991): p-Nonyl-phenol: An Estrogenic Xenobiotic Released from "Modified" Polystyrene. *Environ. Health Perspect.* 92: 167-173.
- Specht, C. H., Frimmel, F. H. (2000): Specific Interactions of Organic Substances in Size-exclusion Chromatography. *Environ. Sci. Technol.* 34: 2361-2366.
- Specht, C. H., Kumke, M. U., Frimmel, F. H. (2000): Characterization of NOM Adsorption to Clay Minerals by Size Exclusion Chromatography. *Wat. Res.* 34: 4063-4069.
- Specht, C. (2002): Wechselwirkungen von organischen Substanzen mit mineralischen Festphasen – Untersuchungen mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie und der FTIR-Spektroskopie. Dissertation Universität Karlsruhe (TH).
- SRC PhysProp Database (2003): <http://esc.syrres.com/interkow/webpro.exe?CAS=58-08-2>.
- Standley, L. J., Kaplan, L. A., Smith, D. (2000): Molecular Tracers of Organic Matter Sources to Surface Water Resources. *Environ. Sci. Technol.* 34: 3124-3130.
- Staples, C. A., Weeks, J., Hall, F. F., Naylor, C. G. (1998): Evaluation of the Aquatic Toxicity and Bioaccumulation of C8- and C9-Alkylphenol Ethoxylates. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2470-2480.
- Staudte, E.: *Membranen und Membranprozesse – Grundlagen und Anwendungen*. VCH Verlag, Weinheim, 1993.
- Steelink, C. (1985): Implications of Elemental Characteristics of Humic Substances. In: Aiken, G. R., McKnight, D. M., Wershaw, R. L. (Hrsg.): *Humic Substances in Soil, Sediment, and Water*. Wiley, New York, S. 457-476.
- Suffet, I. H., MacCarthy, P.: *Aquatic Humic Substances – Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. American Chemical Society, Washington, D. C., 1989.
- Swift, R. S., Thornton, B. K., Posner, A. M. (1970): Spectral Characteristics of a Humic Acid Fractionated with Respect to Molecular Weight. *Soil Sci.* 110: 93-99.
- Swift, R. W., Posner, A. M. (1971): Gel Chromatography of Humic Acid. *J. Soil Sci.* 22: 237-249.

- Swift, R. S. (1985): Fractionation of Soil Humic Substances. In: Aiken, G. R., McKnight, D. M., Wershaw, R. L. (Hrsg.): Humic Substances in Soil, Sediment, and Water. Wiley, New York, S. 387-408.
- Swift, R. S. (1989): Molecular Weight, Size, Shape, and Charge Characteristics of Humic Substances: Some Basic Considerations. In: Hayes, M. H. B., MacCarthy, P., Malcolm, R. L., Swift, R. S. (Hrsg.): Humic Substances II – In Search of Structure. Wiley, Chichester, S. 450-465.
- Swift, R. S., Leonard, R. L., Newman, R. H., Theng, B. K. G. (1992): Changes in Humic Acid Composition with Molecular Weight as Detected by  $^{13}\text{C}$ -Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Sci. Tot. Environ.* 117/118: 53-61.
- Swift, R. S. (1999): Macromolecular Properties of Soil Humic Substances: Fact, Fiction, and Opinion. A Critical Review of „Random Coil“ and „Self-associating Aggregate“. *Soil Sci.* 164: 790-802.
- Swisher, R. D.: Surfactant Biodegradation. Marcel Dekker Inc., New York, 1987.
- Thiele, B., Günther, K., Schwuger, M. J. (1997): Alkylphenol Ethoxylates: Trace Analysis and Environmental Behavior. *Chem. Rev.* 97: 3247-4272.
- Thurman, E. M., Malcolm, R. L. (1981): Preparative Isolation of Aquatic Humic Substances. *Environ. Sci. Technol.* 15: 463-466.
- Thurman, M.: Organic Geochemistry of Natural Waters. Martinus Nijhoff / Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, 1985.
- Van Berkel, G. J., Sanchez, A. D., Quirke, J. M. E. (2002): Thin-layer Chromatography and Electrospray Mass Spectrometry Coupled Using a Surface Sampling Probe. *Anal. Chem.* 74: 6216-6223.
- Weins, C., Hauck, H. E. (1996): Advances and Developments in Thin Layer Chromatography. *LC-GC International* 14: 456-464.
- Weins, C., Jork, H. (1996): Toxicological Evaluation of Harmful Substances by In Situ Enzymatic and Biological Detection in High Performance Thin-layer Chromatography. *J. Chromatogr. A* 750: 403-407.
- Weishaar, J. L., Aiken, G. R., Bergamaschi, B. A., Fram, M. S., Fujii, R., Mopper, K. (2003): Evaluation of Specific Ultraviolet Absorbance as an Indicator of the Chemical Composition and Reactivity of Dissolved Organic Carbon. *Environ. Sci. Technol.* 37: 4702-4708.
- Wershaw, R. L., Aiken, G. R. (1985): Molecular Size and Weight Measurements of Humic Substances. In: Aiken, G. R., McKnight, D. M., Wershaw, R. L. (Hrsg.): Humic Substances in Soil, Sediment, and Water. Wiley, New York, S. 477-492.
- Wheeler, T. F., Heim, J. R., Latorre, M. R., Janes, A. B. (1997): Mass Spectral Characterization of p-Nonylphenol Isomers Using High-resolution Capillary GC-MS. *J. Chromatogr. Sci.* 35: 19-30.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S. A., Sumpter, J. P., Parker, M. G. (1994): Environmentally Persistent Alkylphenolic Compounds are Estrogenic. *Endocrinology* 135: 175-182.
- Wilson, M. A. (1989): Solid-state Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Humic Substances: Basic Concepts and Techniques. In: Hayes, M. H. B., MacCarthy, P., Malcolm, R. L., Swift, R. S. (Hrsg.): Humic Substances II – In Search of Structure. Wiley, Chichester, S. 309-338.
- Yamamoto, H., Liljestrand, H. M., Shimizu, Y., Morita, M. (2003): Effects of Physical-chemical Characteristics on the Sorption of Selected Endocrine Disruptors by Dissolved Organic Matter Surrogates. *Environ. Sci. Technol.* 37: 2646-2657.
- Zhang, X., Minear, R. A. (2002): Characterization of High Molecular Weight Disinfection Byproducts Resulting from Chlorination of Aquatic Humic Substances *Environ. Sci. Technol.* 36: 4033-4038.
- Zhou, Q., Cabaniss, S. E., Maurice, P. A. (2000): Considerations in the Use of High-pressure Size Exclusion Chromatography (HPSEC) for Determining Molecular Weights of Aquatic Humic Substances. *Wat. Res.* 34: 3505-3514.

## Verzeichnis der Abbildungen

**Abb. 2.1:** Leitsignale charakteristischer Vorläufersubstanzen im  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektrum der Hohlohsee-DOM.

**Abb. 2.2:** Strukturen des 4-Nonylphenols und der Nonylphenoethoxylate.

**Abb. 2.3:** Struktur des Coffeins.

**Abb. 3.1:** Schema der Probenanreicherung und –fraktionierung durch mehrstufige Ultrafiltration (mst-UF).

**Abb. 4.1:** SEC-Chromatogramme der Proben HO12 K a (1999) und HO12 K b (2002).

**Abb. 4.2:**  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektren der Proben HO12 K (1996) und HO12 K b (2003).

**Abb. 4.3:** SEC-Chromatogramme der Probe HO12 K a und der Fraktionen F8, F10, F12, F13, F15 und F17. Reinjektion nach 1 Woche am präparativen System.

**Abb. 4.4:** SEC-Chromatogramme der Probe HO12 K a an der Superdex-Säule bzw. der TSK HW 50 (S)-Säule des analytischen bzw. präparativen Systems.

**Abb. 4.5:** SEC-Chromatogramme der Probe HO12 K a und der Fraktionen F8, F10, F12, F13, F15 und F17. Reinjektion nach 1 Woche am analytischen System.

**Abb. 4.6:** SEC-Chromatogramme der Probe HO12 K a bei verschiedenen DOC-Konzentrationen.

**Abb. 4.7:** SEC-Chromatogramme der Probe HO12 K a bei verschiedenen Ionenstärken.

**Abb. 4.8:** SEC-Chromatogramme der ungepufferten und gepufferten Probe HO12 K b.

**Abb. 4.9:** SEC-Chromatogramme der Probe HO12 K a bei verschiedenen pH-Werten.

**Abb. 4.10:** SEC-Chromatogramme der Originalprobe Alb5 und der Konzentrate Alb5 G, Alb5 K und Alb5 XAD A.

**Abb. 4.11:** SEC-Chromatogramme der Proben Alb5 Original und Alb5 G (1:10 v/v).

**Abb. 4.12:** SEC-Chromatogramme des Konzentrats Alb5 XAD A bei verschiedenen pH-Werten der Probe.

**Abb. 4.13:** SEC-Chromatogramme der Originalproben HO21 (a), Alb5 (b) und beider Proben im Vergleich (c).

**Abb. 4.14:** SEC-Chromatogramme der Originalproben, UF-Konzentrate (1000 g/mol) und -Permeate von HO21 und Alb5.

**Abb. 4.15:** a) SEC-Chromatogramme von Dextran Blau, PSS35700, PSS15800 und PSS4480. Präparatives SEC-System, Superdex-Säule, Eluent 1, UV<sub>224</sub>-Detektion. b) Zugehörige Kalibriergerade.

**Abb. 4.16:** SEC-Chromatogramme der drei Replikate von Fraktion 3 der Braunwasserprobe HO21 K.

**Abb. 4.17:** SEC-Chromatogramm der Probe HO12 K a mit Fraktionierungsgrenzen.

**Abb. 4.18:** AF<sup>4</sup>-Fraktogramme der HO12 K a SEC- und mst-UF-Fractionen.

**Abb. 4.19:** SEC-Chromatogramme der mst-UF-Fractionen von HO12 K a.

**Abb. 4.20:** SEC-Chromatogramm der Probe HO12 K b mit Fraktionierungsgrenzen.

**Abb. 4.21:** Arbeitsschritte bei der Herstellung der SEC-Fractionen der Probe HO12 K b.

**Abb. 4.22:** SEC-Chromatogramme der Probe HO12 K b und der SEC-Fractionen vor Dialyse. DOC- und Fluoreszenzdetektion.

**Abb. 4.23:** EEM der Probe HO12 K b und der SEC-Fractionen F1 bis F6 vor Dialyse.

**Abb. 4.24:** Abnahme der elektrischen Leitfähigkeit des Dialysats der Fraktion 4 als Funktion des Dialysatvolumens.

**Abb. 4.25:** SEC-Chromatogramme der SEC-Fraktion F3 vor und nach Dialyse.

**Abb. 4.26:** *SUVA*-Werte der Probe HO12 K b und der SEC-Fractionen vor und nach Lagerung bzw. Dialyse. a) *SUVA*<sub>254</sub>-Werte, b) *SUVA*<sub>436</sub>-Werte

**Abb. 4.27:** <sup>13</sup>C MAS NMR-Spektrum der Proben HO12 K b und berechnetes Spektrum der Fraktion 6 + DOM-Verlust.

**Abb. 4.28:** <sup>13</sup>C MAS NMR-Spektren der Probe HO12 K b und der Fraktion F1.

**Abb. 4.29:** <sup>13</sup>C MAS NMR-Spektren der Probe HO12 K b und der Fraktion F2.

**Abb. 4.30:** <sup>13</sup>C MAS NMR-Spektren der Probe HO12 K b und der Fraktion F3.

**Abb. 4.31:** <sup>13</sup>C MAS NMR-Spektren der Fractionen F3 und F4.

**Abb. 4.32:** <sup>13</sup>C MAS NMR-Spektren der Probe HO12 K b und der Fraktion F5.

**Abb. 4.33:** <sup>13</sup>C MAS NMR-Spektren der Probe HO12 K b und der Fraktion F6.

**Abb. 4.34:** Korrelation zwischen *SUVA*<sub>254</sub>-Wert und Aromatenanteil der Probe HO12 K b und der SEC-Fractionen F1 bis F5.

**Abb. 4.35:** SEC-Chromatogramme der Proben HO21, HO21 K und der mst-UF-Fractionen F1 bis F5.



**Abb. 4.36:**  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektren der Probe HO21 und der mst-UF-Fractionen F1, F2 und F3.

**Abb. 4.37:** EEM der Probe HO21 und der mst-UF-Fractionen F1 bis F5.

**Abb. 4.38:** SEC-Chromatogramme der Proben Alb5, Alb5 K sowie der Proben HO21, HO21 K und der jeweiligen mst-UF-Fractionen F1 bis F5.

**Abb. 4.39:** EEM der Probe Alb5 und der mst-UF-Fractionen F1 bis F5.

**Abb. 4.40:** HPTLC-Chromatogramme der Modellschadstoffe.

**Abb. 4.41:** Peakflächen der MSS bei unterschiedlichen DOC-Konzentrationen der Braunwasserprobe HO21.

**Abb. 4.42:** Gesamtwiederfindung (GesamtWF) der MSS für verschiedene DOM-Matrices.

**Abb. 4.43:** Relative Konzentrationen  $\rho_{\text{rel}}$  der Modellschadstoffe in den mst-UF-Fractionen verschiedener DOM-Matrices.

**Abb. 4.44:** Korrelation von Gesamtwiederfindung und HLB-Wert für 4-NP, NP2EO, NP6EO und NP11EO.

**Abb. B:** Schema der Probenauftragung auf die HPTLC-Platten.

**Abb. D1 + D2:** PSS-Kalibrierungen der SEC-Trennsäulen, präparatives System.

**Abb. E1:** SEC-Chromatogramm der Probe HO12 K a mit Fraktionierungsgrenzen.

**Abb. F1:** SEC-Chromatogramme der Probe HO12 K a und der Fractionen F8, F10, F12, F13, F15 und F17.

**Abb. G1:** SEC-Chromatogramm der Probe Alb5 K mit Fraktionierungsgrenzen.

**Abb. G2:** AF<sup>4</sup>-Fraktogramme der Alb5 K SEC- und mst-UF-Fractionen.

**Abb. G3:** SEC-Chromatogramme der mst-UF-Fractionen von Alb5 K.

**Abb. H1:** SEC-Chromatogramme der SEC-Fractionen F1, F2, F4, F5 und F6 der Probe HO12 K b vor und nach Dialyse.

**Abb. I1:** Kalibriergeraden zur Ermittlung der Nachweisgrenze nach DIN 32645 (1994) für die HPTLC-Bestimmung von Coffein, 4-Nonylphenol, NP2EO, NP6EO und NP11EO.



## Verzeichnis der Tabellen

**Tab. 2.1:** Zuordnung von chemischen Verschiebungsbereichen zu Strukturelementen in  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektren von Huminstoffen (TMS-Skala) aus LANKES (2001).

**Tab. 2.2:** Stoffdaten der Alkylphenole und ausgewählter APEO-Metabolite.

**Tab. 2.3:** Konzentrationen an NPEO und Metaboliten in Gewässern und Trinkwasser in  $\mu\text{g/L}$ .

**Tab. 3.1:** Übersicht über die mittels SEC und mst-UF fraktionierten Proben.

**Tab. 3.2:** Experimentelle Angaben zur Fraktionierung mit dem präparativen SEC-System.

**Tab. 3.3:** Verwendete Membranen bei der mst-UF-Fraktionierung von DOM und Modellschadstoffen.

**Tab. 3.4:** Experimentelle Angaben zu den analytischen SEC-Systemen.

**Tab. 3.5:** Elutionsprogramm für die AF<sup>4</sup>-Analytik.

**Tab. 3.6:** Modellschadstoffe für die mst-UF-Fraktionierung.

**Tab. 3.7:** DOM-Matrices zur Herstellung der Modellschadstoff-Lösungen.

**Tab. 4.1:** DOC-Konzentrationen, relative Anteile chemischer Strukturen und Elementaranalyse-daten der Probe HO12 K für die Jahre 1996, 1999 und 2002.

**Tab. 4.2:** Mittlere  $V_e$ ,  $K_D$ -Werte und Peakflächen der 4 Reinjektionen ( $MW \pm 1$  s) sowie Polydispersitätswerte der HO12 K a SEC-Fractionen.

**Tab. 4.3:**  $K_D$ -Werte ausgewählter SEC-Fractionen der Probe HO12 K a an der Superdex- bzw. TSK HW 50-(S) Säule.

**Tab. 4.4:** Elutionsvolumina und Flächenanteile ( $A_{rel}$ ) der Peaks 1 und 2 sowie  $hUV$  als Funktion der DOC-Konzentration der Probe HO12 K a.

**Tab. 4.5:** Anteil des  $hUV$  und Peakflächenanteile nach  $V_p$  ( $A_{rel>Vp}$ ) als Funktion der Ionenstärke und des pH-Wertes der Probe HO12 K a.

**Tab. 4.6:** Flächenanteile von Peak 1, 2 und 3 in % der Gesamtfläche.

**Tab. 4.7:** Basisparameter der Konzentrate der Probe Alb5 (Probenahme Oktober 1999).

**Tab. 4.8:** Basisparameter der Originalproben HO21 und Alb5 (Probenahmen Juli 2001).

**Tab. 4.9:** Basisparameter der UF-Konzentrate HO12 K, HO21 K und Alb5 K.

**Tab. 4.10:** Wiederfindungen der PSS-Standards in UF-Konzentraten.

**Tab. 4.11:** Basisparameter der UF-Konzentrate HO12 K a und Alb5 K (Alb5: Probenahme Dezember 2000).

**Tab. 4.12:** DOC-Gehalte der SEC- und UF-Fractionen der Braunwasserprobe HO12 K a.

**Tab. 4.13:** Polydispersitätswerte der mst-UF-Fractionen von HO12 K a und HO21 K.

**Tab. 4.14:** Volumina, ELF und pH-Wert der Probe HO12 K b und der SEC-Fractionen.

**Tab. 4.15:** Verringerung der elektrischen Leitfähigkeit durch die Dialyse.

**Tab. 4.16:** DOC-Konzentrationen und DOC-Bilanz für SEC-Fractionierung und Dialyse.

**Tab. 4.17:** Integrationsdaten der chemischen Verschiebungsbereiche der  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektren der Probe HO12 K b und der SEC-Fractionen.

**Tab. 4.18:** Elementaranalytische Daten der Probe HO12 K b und der SEC-Fractionen.

**Tab. 4.19:** Basisparameter und DOC-Bilanz der mst-UF-Fractionierung der Probe HO21 K.

**Tab. 4.20:** Integrationsdaten der chemischen Verschiebungsbereiche der  $^{13}\text{C}$  MAS NMR-Spektren der Probe HO21 K und Fractionen F1, F2 und F3.

**Tab. 4.21:** Elementaranalytische Daten der Probe HO21 K und Fractionen F1, F2 und F3.

**Tab. 4.22:** Basisparameter und DOC-Bilanz der mst-UF-Fractionierung der Probe Alb5 K (Probenahme Juli 2001).

**Tab. 4.23:** Relative Kohlenstoffanteile chemischer Strukturen in den Proben HO12 K (1996) und ABV3 K. Daten aus LANKES 2001.

**Tab. 4.24:** Wiederfindung (WF) der Modellschadstoffe aus dotiertem Leitungs- bzw. Braunwasser nach SPE (1000-fache Anreicherung).

**Tab. 4.25:** Verfahrenskenndaten der Bestimmung von 4-NP, NP2EO, NP6EO, NP11EO und Coffein mit HPTLC.

**Tab. A:** Ethoxylatverteilungen der NPEO-Gemische Marlophen NP3 und Marlophen NP10.

**Tab. C:** Programm der AMD-Entwicklung zur Trennung von 4-Nonylphenol und Nonylphenol-ethoxylaten.

**Tab. E1:** DOC-Werte, DOC-Bilanz und  $SUVA_{254}$ -Werte der SEC-Fractionen der Probe HO12 K a.

**Tab. G1:** DOC-Gehalte der SEC- und mst-UF-Fractionen der Probe Alb5 K.

## Verzeichnis der Akronyme und Symbole

### Probenkürzel

ABV	Ablauf der Kläranlage Karlsruhe-Neureut (Bezeichnung nach FRIMMEL ET AL. 2002)
Alb5	Ablauf der Kläranlage Karlsruhe-Neureut
F	Fraktion
FA	Fulvic Acid
G	Konzentrat der Rotationsverdampfung nach Kationenaustausch
HA	Humic Acid
HO	Hohlohsee
HO12 K	Ultrafiltrationskonzentrat der Probe HO12; hergestellt im Jahr 1996
HO12 K a	Probe HO12 K im Jahr 1999
HO12 K b	Probe HO12 K im Jahr 2003
HO12	0,45 µm-filtrierte Originalprobe, Probenahme Juli 1996
HO21	0,45 µm-filtrierte Originalprobe, Probenahme Juli 2001
K	Konzentrat der Ultrafiltration
NHS	Non-humic Substances, Nichthuminstoffe
P	Permeat der Ultrafiltration
XAD	Isolat der Anreicherung an XAD 8-Harz

### Verzeichnis der Akronyme

4 <i>n</i> -NP	4 <i>n</i> -Nonylphenol, unverzweigtes Isomer
4-NP	4-Nonylphenol, Isomerengemisch
4 <i>t</i> -OP	4 <i>t</i> -Octylphenol
AF <sup>4</sup>	Asymmetrische Fluss Feld-Fluss-Fraktionierung
AMD	Automated Multiple Development
AP	Alkylphenol
APEO	Alkylphenoethoxylat
cmc	Critical Micelle Concentration
CPMAS	Cross Polarization Magic Angle Spinning
CV	Column Volume

DOC	Dissolved Organic Carbon
DOM	Dissolved Organic Matter
EEM	Excitation-Emission-Matrix
ELF	elektrische Leitfähigkeit
EO	Ethoxylat
F <sup>4</sup>	Fluss Feld-Fluss-Fraktionierung
FE	Flächeneinheit
F <sub>H</sub>	hydrophiles Testfarbstoffgemisch
FID	Free Induction Decay
FTIR	Fourier-Transformierte Infrarot-Spektroskopie
GC	Gaschromatographie
GFC	Gelfiltrationschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
HLB	Hydrophile-lipophile Balance
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
HS	Huminstoff
IC	Inorganic Carbon
IHSS	International Humic Substances Society
IR	Infrarotstrahlung
IS	Ionenstärke
KHP	Kaliumhydrogenphthalat
LC-UV/OCD	Liquid Chromatography-Ultraviolet Absorbance/ Organic Carbon Detection
LM	Lösemittel
Mar NP10	Marlophen NP10
Mar NP3	Marlophen NP3
MAS	Magic Angle Spinning
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MSS	Modellschadstoff
mst-UF	mehrstufige Ultrafiltration
MW	Mittelwert
MWCO	Molecular Weight Cutoff
NMR	Nuclear Magnetic Resonance

NP1EC	Nonylphenoxyessigsäure
NP1EO	Nonylphenolmonoethoxylat
NP2EC	Nonylphenoxyethoxyessigsäure
NP2EO	Nonylphenoldiethoxylat
NPEO	Nonylphenoethoxylat
OPEO	Octylphenoethoxylat
P1	Probe 1
PEEK	Polyetheretherketon
PMMA	Polymethylmethacrylat
PSS	Polystyrolsulfonat
RIDE	Ring Down Elimination
RV	Rotationsverdampfung
S1	Standard 1
SEC	Size Exclusion Chromatography
SPE	Solid Phase Extraction
TC	Total Carbon
TMS	Tetramethylsilan
UF	Ultrafiltration
UV	Ultraviolett-Strahlung
Vis	Sichtbares Licht
VK	Variationskoeffizient
WF	Wiederfindung
WW	Wechselwirkung

## Verzeichnis der Symbole

$a_0$	Achsenabschnitt der Kalibriergeraden in FE
$a_1$	Steigung der Kalibriergeraden in FE/ng
$A_{\text{Bypass}}$	Peakfläche der Bypassmessung
$A_{\text{rel}}$	Peakflächenanteil in %
$A_{\text{rel}>V_p}$	Peakflächenanteil nach dem Permeationsvolumen in %
$A_{\text{Säule}}$	Peakfläche der Säulenmessung
$A_\lambda$	Absorption bei der Wellenlänge $\lambda$
$\alpha_\lambda$	spektraler dekadischer Absorptionkoeffizient in 1/m
$B_0$	magnetische Induktion in V s <sup>2</sup> /m

$c$	Stoffmengenkonzentration in mol/L
$c_f$	Stoffmengenkonzentration auf der Filtratseite in mol/L
$c_r$	Stoffmengenkonzentration auf der Retentatseite in mol/L
$c_{UV}$	chromatographierbarer, UV-aktiver Anteil der DOM
$d$	Schichtdicke in m
$h$	Planck'sches Wirkungsquantum ( $6,626 \times 10^{-34}$ Js)
$H_i$	Signalhöhe beim Elutionsvolumen $V_i$
$h_{UV}$	hydrophober, UV-aktiver Anteil der DOM
$K_D$	Verteilungskoeffizient der SEC
$\log K_{ow}$	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
$m$	Masse in kg
$M$	molare Masse in g/mol
$M_i$	Molmasse des Moleküls $i$
$M_p$	Molmasse am Peakmaximum in g/mol
$M_n$	number-average molecular weight in g/mol
$m_{NG}$	Nachweisgrenze in ng
$m_{rel}$	Massenanteil in %
$M_w$	weight-average molecular weight in g/mol
$n$	Anzahl der Wiederholungsbestimmungen
$N_i$	Anzahl von $i$ Molekülen mit der Molmasse $M_i$
$p$	Druck in Pa
$P$	Polydispersität
$pK_S$	Aziditätskonstante
$R^2$	Bestimmtheitsmaß
$R$	Rückhalt der Ultrafiltration
$R_e$	hydrodynamischer Radius in nm
$SUVA_\lambda$	spezifische UV-Absorption in L/(m mg) bei der Wellenlänge $\lambda$
$t$	Zeit in min
$V$	Volumen in L
$v/v$	Volumenanteil in %
$V_0$	Ausschlussvolumen in mL
$V_e$	Elutionsvolumen in mL
$V_i$	Elutionsvolumen des Moleküls $i$
$V_{inj}$	Injektionsvolumen in mL
$V_p$	Permeationsvolumen in mL



---

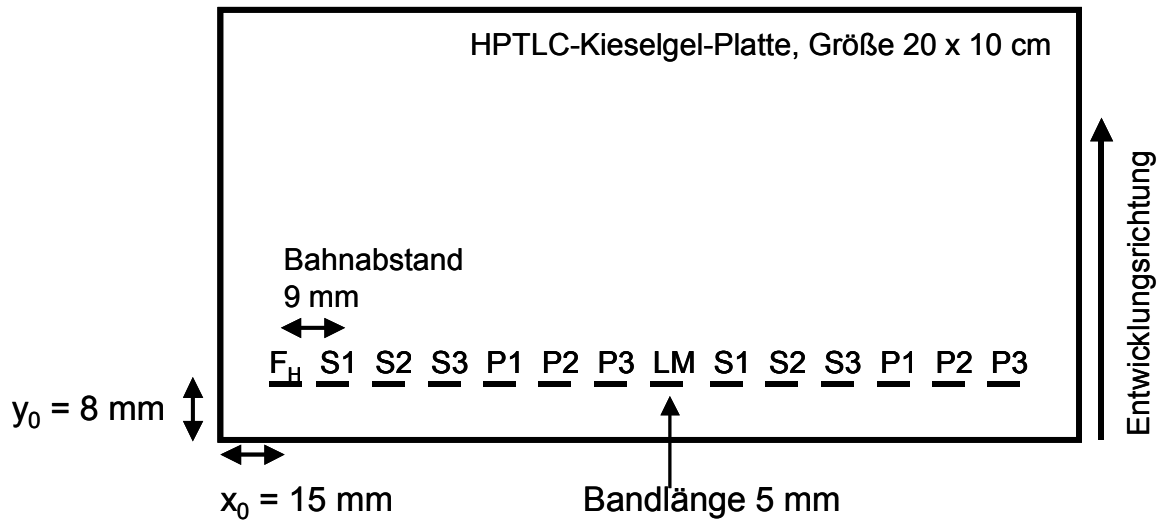
$w/w$	Massenanteil in %
$w_i$	Masse von $i$ Molekülen mit der Molmasse $M_i$
$y_0$	Auftrageposition in mm
$\Delta E$	Energiedifferenz in J
$\delta$	Chemische Verschiebung in ppm
$\varepsilon_\lambda$	molarer Absorptionskoeffizient bei der Wellenlänge $\lambda$ in L/(mol m)
$\gamma$	gyromagnetisches Verhältnis in $\text{m}^2/(\text{V s}^2)$
$\kappa$	elektrische Leitfähigkeit in $\mu\text{S}/\text{cm}$
$\lambda_{em}$	Emissionswellenlänge in nm
$\lambda$	Wellenlänge in nm
$\lambda_{ex}$	Anregungswellenlänge in nm
$\mu$	Ionenstärke in mol/L
$\nu_0$	Resonanzfrequenz in Hz
$\rho$	Massenkonzentration in mg/L
$\rho_{NG}$	Massenkonzentration in mg/L (Nachweisgrenze)
$\rho_{rel}$	relative Massenkonzentration in %



**Anhang A: Ethoxylatverteilungen der NPEO-Gemische Marlophen NP3 und Marlophen NP10 (Herstellerangaben von Sasol Germany GmbH)**

<b>Marlophen NP3</b>		<b>Marlophen NP10</b>	
Anzahl an Ethoxyeinheiten	Massenanteil in %	Anzahl an Ethoxyeinheiten	Massenanteil in %
0	1,9	0	0
1	11,8	1	0,1
2	23,8	2	0,6
3	26,4	3	1,7
4	21,4	4	3,0
5	9,5	5	5,0
6	4,4	6	7,2
7	1,7	7	9,7
8	0,8	8	11,5
		9	12,4
		10	12,1
		11	10,7
		12	8,7
		13	6,4
		14	4,3
		15	2,8
		16	1,7
		17	1,2
		18	0,7
		19	0,2
		20	0

## Anhang B: Probenauftragung auf die HPTLC-Platten



**Abb. B:** Schema der Probenauftragung auf die HPTLC-Platten.  $F_H$ : Hydrophiles Testfarbstoffgemisch, S1...n: Standard, P1...n: Probe, LM: Lösemittel.

## Anhang C: Programm der AMD-Entwicklung zur Trennung von 4-Nonylphenol und Nonylphenoethoxylaten

Angaben in den Spalten 2 bis 4: Volumenanteile in %

Startposition  $y_0 = 8$  mm

Trockenzeit nach jedem Schritt: 2 Minuten.

Schritt	Ethylacetat	Methanol	Aceton	<i>n</i> -Hexan	Laufstrecke in mm
1	92	8	0	0	10
2	87	8	5	0	12
3	82	8	10	0	14
4	79	6	15	0	16
5	74	6	20	0	18
6	64	6	30	0	20
7	56	4	40	0	22
8	46	4	50	0	24
9	36	4	60	0	26
10	28	2	70	0	28
11	18	2	80	0	30
12	0	0	100	0	32
13	0	0	100	0	34
14	0	0	90	10	36
15	0	0	80	20	38
16	0	0	70	30	40
17	0	0	60	40	42
18	0	0	50	50	44
19	0	0	40	60	46
20	0	0	30	70	48
21	0	0	20	80	50
22	0	0	0	100	52

### Anhang D: PSS-Kalibrierung der SEC-Trennsäulen.

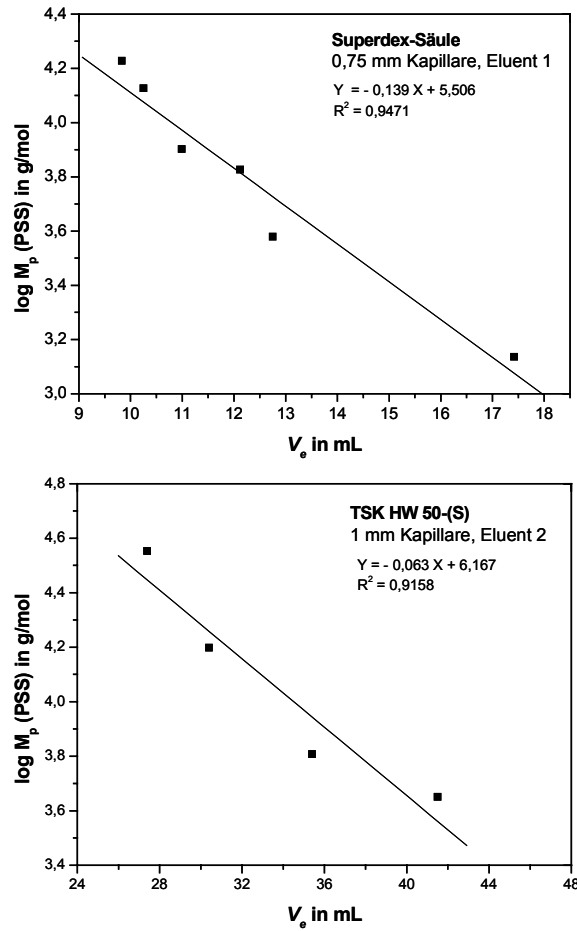


Abb. D1: Präparatives SEC-System, Superdex- bzw. TSK HW 50-(S)-Säule, UV<sub>254</sub>-Detektion.

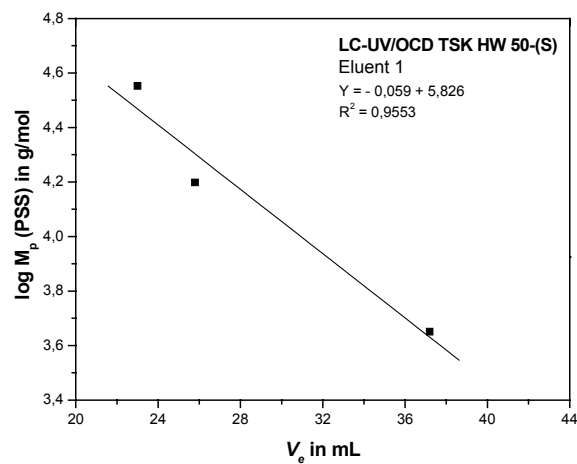
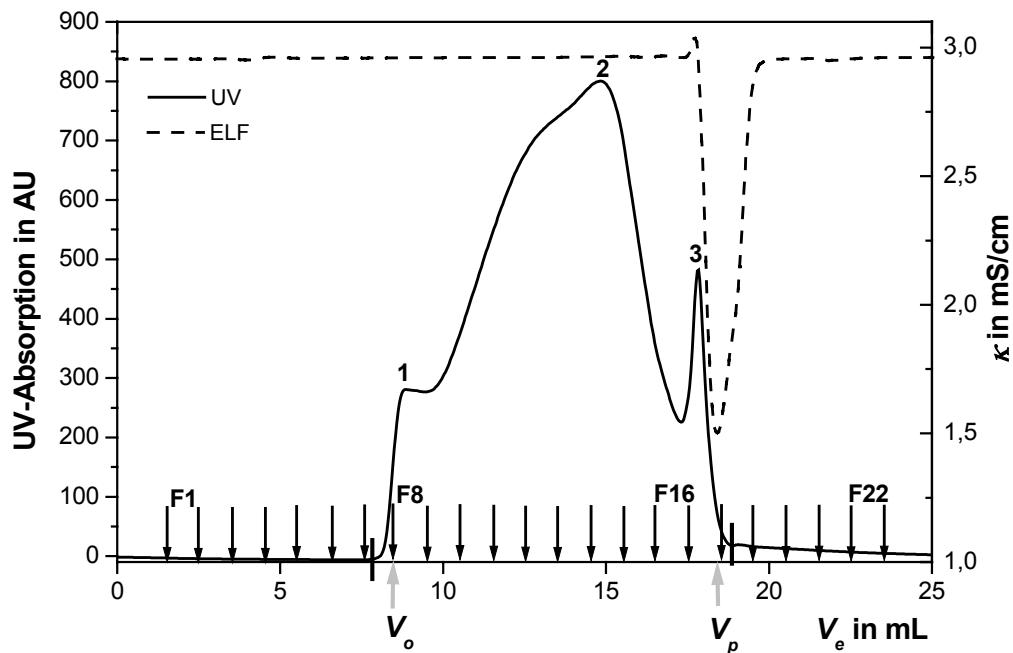


Abb. D2: Präparatives SEC-System LC-UV/OCD, TSK HW 50-(S)-Säule, DOC-Detektion.

## Anhang E: Ergänzungen zu Kapitel 4.1

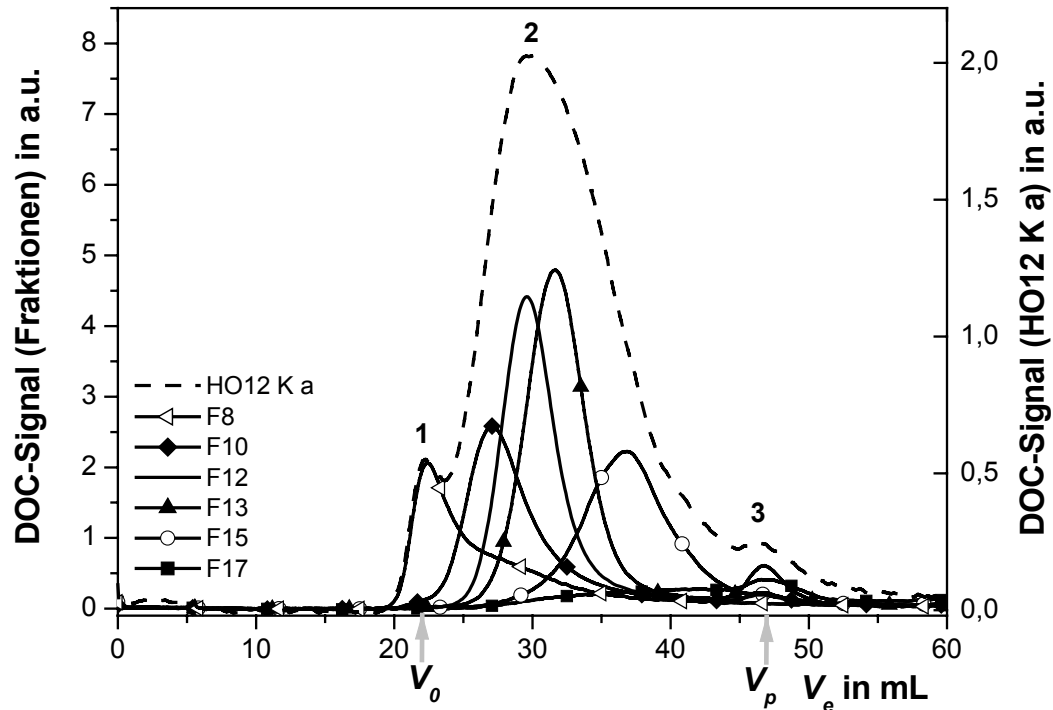


**Abb. E1:** SEC-Chromatogramm der Probe HO12 K a mit Fraktionierungsgrenzen (Fraktionierung Nr. III). Präparatives System, Superdex-Säule, Eluent 1, UV<sub>254</sub>-Detektion. Ungepufferte Probe.

**Tab. E1:** DOC-Werte, DOC-Bilanz und  $SUVA_{254}$ -Werte der SEC-Fractionen der Probe HO12 K a. DOC-Angaben: MW  $\pm$  1 s für  $n = 3$ . n. b. <sup>1</sup>: mit H<sub>2</sub>O verdünnte Probe (1:4 v/v).

Probe	DOC in mg/L	DOC-Anteil in %	$SUVA_{254}$ in L/(m mg)
HO12 K a	180 <sup>1</sup> $\pm$ 7	100	6,39
F7	4,05 $\pm$ 0,03	4	1,39
F8	5,68 $\pm$ 0,06	7	5,17
F9	8,31 $\pm$ 0,10	7	4,43
F10	8,64 $\pm$ 0,08	8	6,09
F11	14,18 $\pm$ 0,18	11	4,61
F12	14,40 $\pm$ 0,09	15	5,13
F13	17,60 $\pm$ 0,39	16	4,46
F14	15,17 $\pm$ 0,15	17	4,89
F15	13,60 $\pm$ 0,02	13	3,40
F16	7,33 $\pm$ 0,08	6	3,63
F17	5,10 $\pm$ 0,02	3	4,52

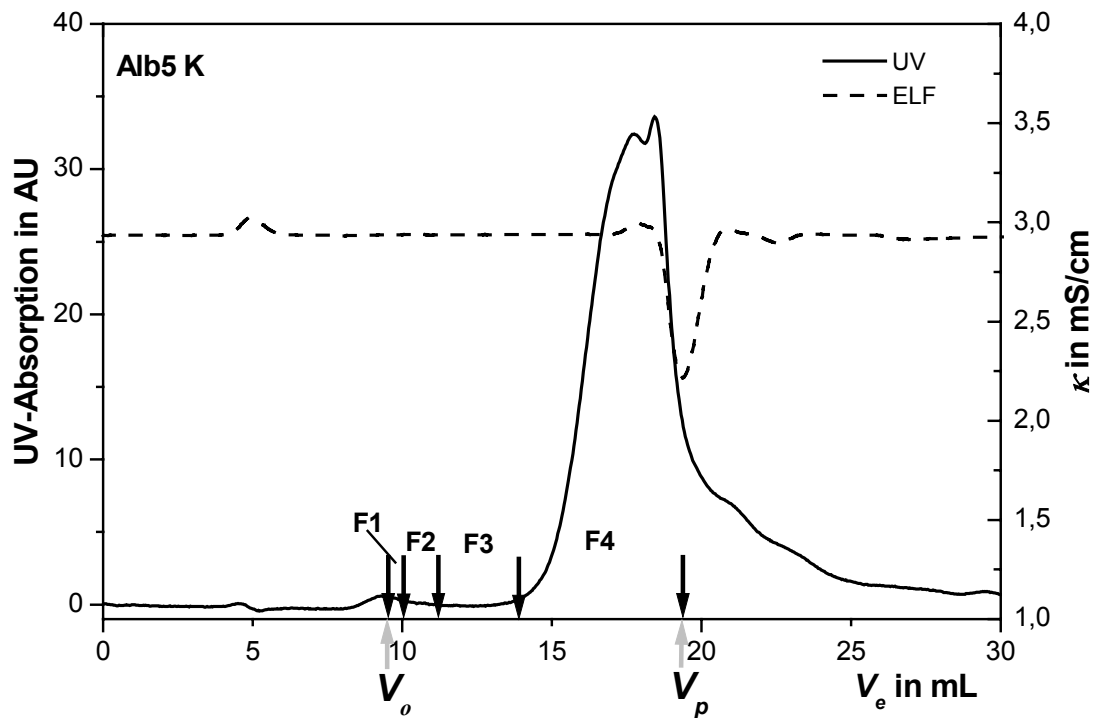
## Anhang F: Ergänzungen zu Kapitel 4.2



**Abb. F1:** SEC-Chromatogramme der Probe HO12 K a und der Fraktionen F8, F10, F12, F13, F15 und F17. Reinjektion nach 1 Woche am analytischen System. TSK HW 50-(S)-Säule, Eluent 1, DOC-Detektion. Proben mit Puffer verdünnt.



## Anhang G: Ergänzungen zu Kapitel 4.4

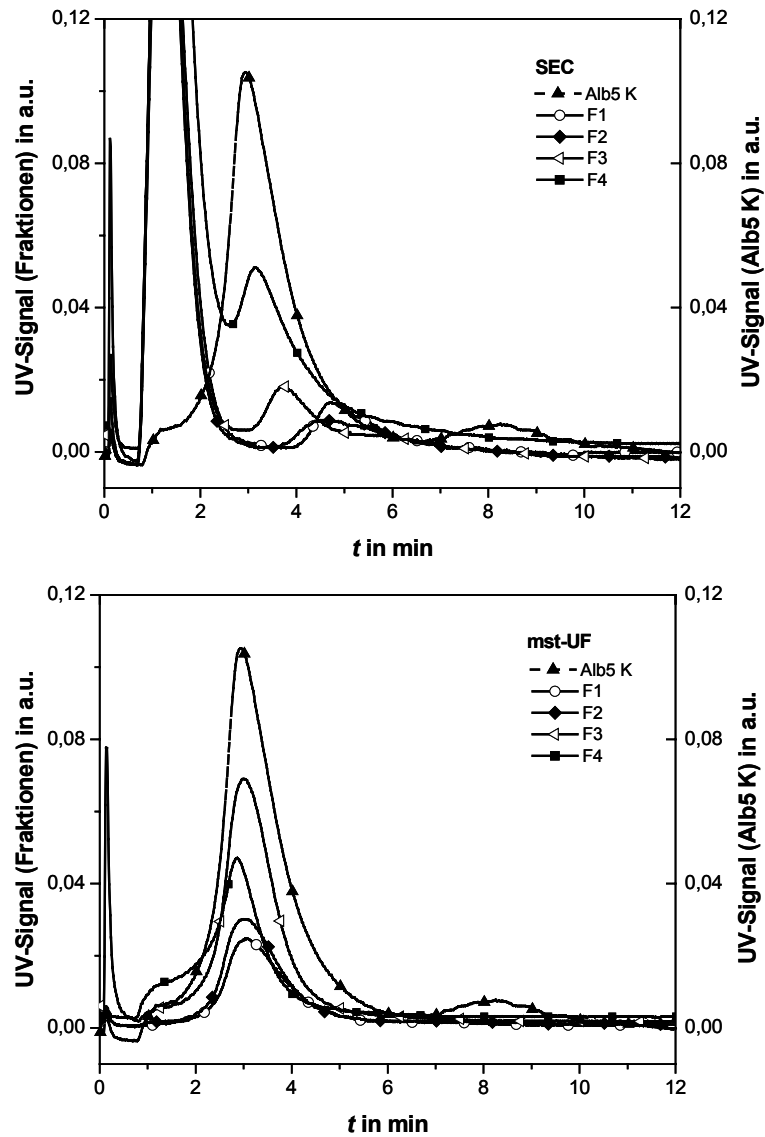


**Abb. G1:** SEC-Chromatogramm der Probe Alb5 K mit Fraktionierungsgrenzen. Präparatives SEC-System, Superdex-Säule, Eluent 1, UV<sub>254</sub>-Detektion. Ungepufferte Probe.

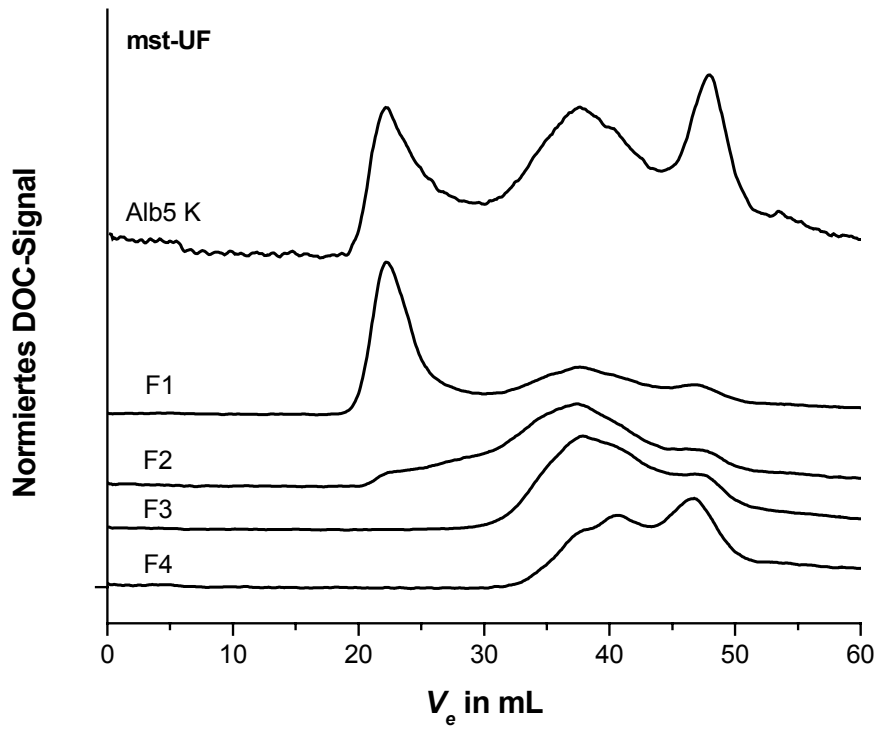
**Tab. G1:** DOC-Gehalte der SEC- und mst-UF-Fractionen der Probe Alb 5 K ( $n = 2$ ).

Probe	SEC-Fractionen	mst-UF-Fractionen
	DOC in mg/L	DOC in mg/L
Alb5 K	28,50 ± 0,13	28,50 ± 0,13
F1	1,40 ± 0,01	42,30 ± 0,48
F2	0,95 ± 0,01	30,77 ± 0,16
F3	0,37 ± 0,01	23,77 ± 0,02
F4	1,05 ± 0,02	6,48 ± 0,01

## Anhang G: Ergänzungen zu Kapitel 4.4

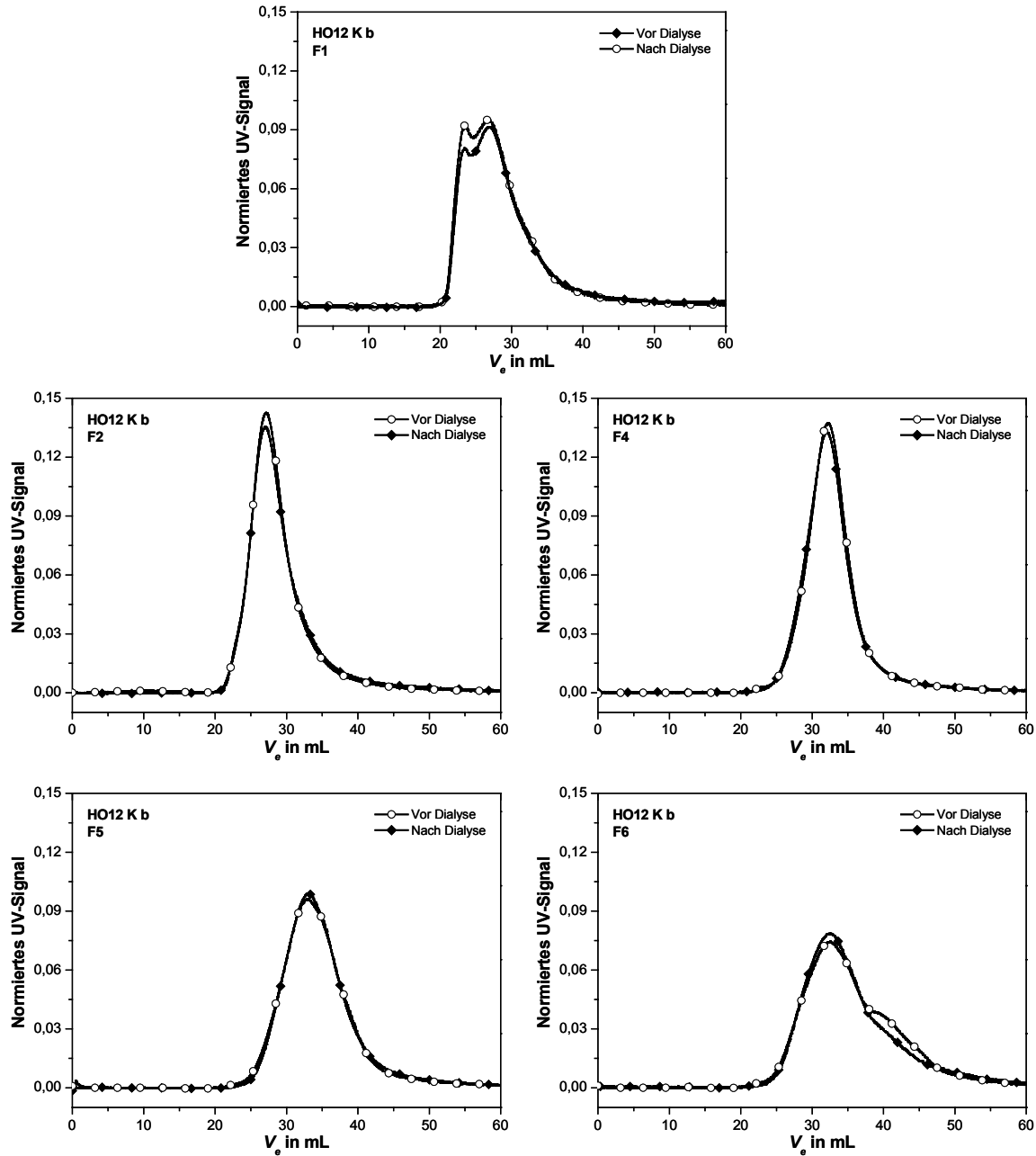


**Abb. G2:** AF<sup>4</sup>-Fraktogramme der Alb5 K SEC- und mst-UF-Fractionen. SEC-Fractionen: UV-Detektion bei 203 nm, mst-UF-Fractionen: UV-Detektion bei 254 nm.

**Anhang G: Ergänzungen zu Kapitel 4.4**

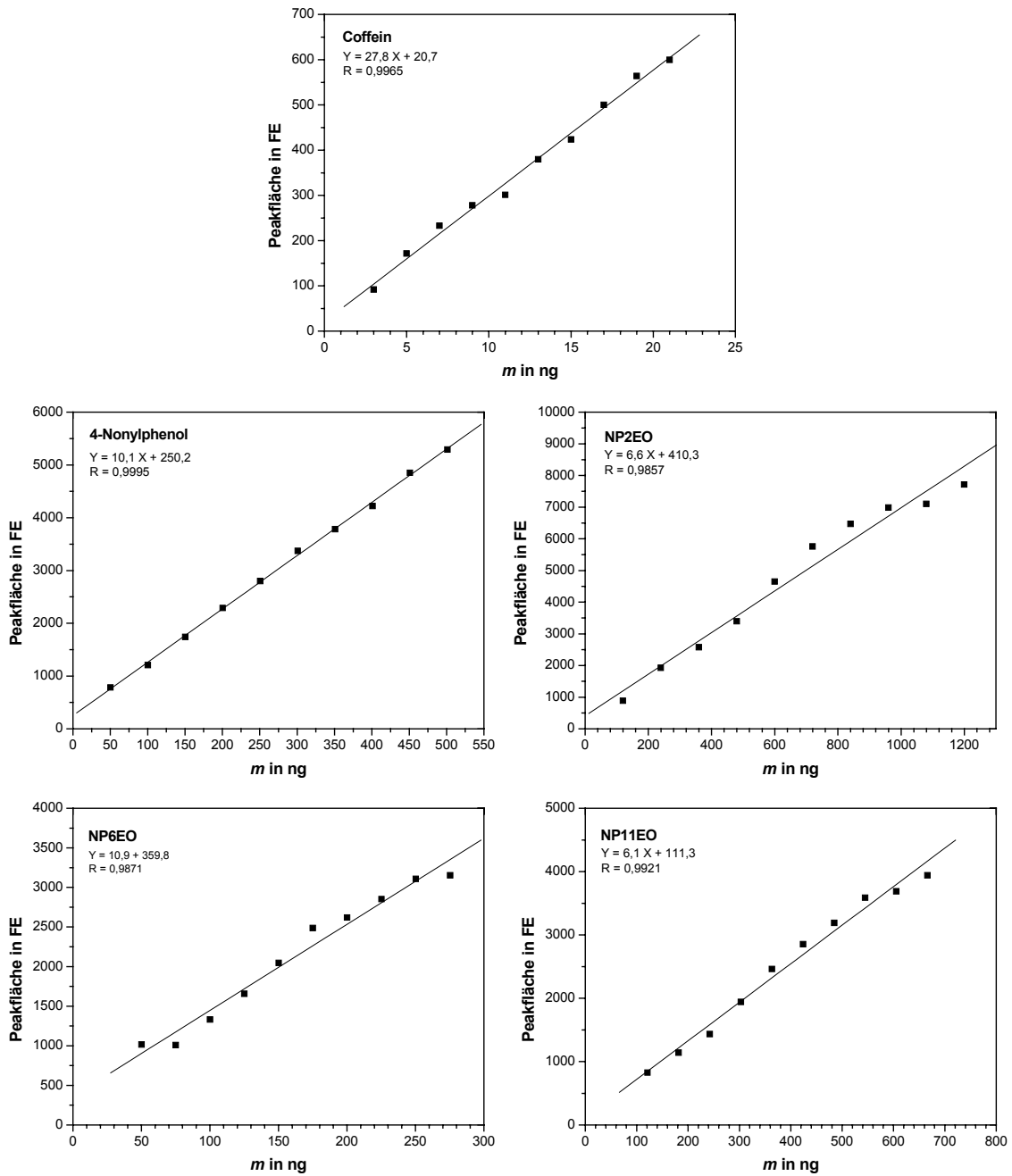
**Abb. G3:** SEC-Chromatogramme der mst-UF-Fractionen von Alb5 K. Analytisches SEC-System, TSK HW 50-(S)-Säule, Eluent 1, DOC-Detektion. Proben mit Puffer verdünnt.

## Anhang H: Ergänzungen zu Kapitel 4.5



**Abb. H1:** SEC-Chromatogramme der SEC-Fractionen F1, F2, F4, F5 und F6 der Probe HO12 K b vor und nach Dialyse. Analytisches SEC-System nach SPECHT ET AL. (2000), TSK HW 50-(S)-Säule, Eluent 2, UV<sub>254</sub>-Detektion.

## Anhang I: Ergänzungen zu Kapitel 4.7



**Abb. II:** Kalibriergeraden zur Ermittlung der Nachweisgrenze nach DIN 32645 (1994) für die HPTLC-Bestimmung von Coffein, 4-Nonylphenol, NP2EO, NP6EO und NP11EO.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Margit Barbara Müller  
geb. am 03.08.1972 in Sindelfingen  
deutsch  
ledig

## Beruflicher Werdegang

21.06.1991	Allgemeine Hochschulreife am Gymnasium Blaubeuren
10/1991 bis 06/1998	Studium der Geoökologie an der Universität Karlsruhe (TH)
09/1995 bis 06/1996	Studium an der Oregon State University (OSU) in Corvallis, Oregon, U. S. A. (Cusanuswerk-Stipendium)
15.06.1998	Abschluss als Diplom-Geoökologin
seit 10/1998	Promotion am Engler-Bunte-Institut, Bereich Wasserchemie, Universität Karlsruhe (TH)
seit 10/1998	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Engler-Bunte-Institut, Bereich Wasserchemie, Universität Karlsruhe (TH)





## Publikationen

1. Müller, M. B., Zwiener, C., Frimmel, F. H. (1999): Sample Cleanup and Reversed-phase High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Polar Aromatic Compounds in Groundwater Samples from a Former Gas Plant. *J. Chromatogr. A* 862: 137-145.
2. Müller, M. B., Schmitt, D., Frimmel F. H. (2000): Fractionation of Natural Organic Matter by Size Exclusion Chromatography – Properties and Stability of Fractions. *Environ. Sci. Technol.* 34 (23): 4867-4872.
3. Schmitt, D., Müller, M. B., Frimmel, F. H. (2000): Metal Distribution in Different Size Fractions of Natural Organic Matter. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 28 (7): 400-410.
4. Müller, M. B., Frimmel, F. H. (2002): A New Concept for the Fractionation of DOM as a Basis for Its Combined Chemical and Biological Characterization. *Wat. Res.* 36 (10): 2643-2655.
5. Müller, M. B., Abbt-Braun, G., Frimmel, F. H. (2002) in: Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, PtWt+E (Hrsg.): Abschlußbericht zum Forschungsverbundvorhaben “Einsatz eines neuen summarischen Konzepts für die wirkungsspezifische Beurteilung der organischen Belastung eines Gewässers (WISBOB)”.
6. Müller, M. B., Vercammen, K., Frimmel, F. H. (2003): Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Ofloxacin und NOM mittels Fluoreszenzlöschung. *Vom Wasser* 100: 85-98.
7. Goel, A., Müller, M. B., Sharma, M., Frimmel, F. H. (2003): Biodegradation of Nonylphenol Ethoxylate Surfactants in Biofilm Reactors. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 31 (2): 108-119.
8. Müller, M. B., Fritz, W., Lankes, U., Frimmel, F. H. (2004): Ultrafiltration of Nonionic Surfactants and Dissolved Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* 38 (4): 1124-1132.
9. Müller, M. B., Dausend, C., Weins, C., Frimmel, F. H. (2004): A New Bioautographic Screening Method for the Detection of Estrogenic Compounds. *Chromatographia* 60 (3/4): 207-211.
10. Müller, M. B., Lankes, U., Abbt-Braun, G., Frimmel, F. H. (2004): Structural Characterization of Brownwater SEC Fractions by <sup>13</sup>C MAS NMR Spectroscopy. Zur Veröffentlichung eingereicht.



Schriftenreihe des Lehrstuhls für Wasserchemie und  
der DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut  
der Universität Karlsruhe (TH)

**Band 35:** Symposium on Refractory Organic Substances in the Environment –  
ROSE, 1997, 248 S., 12,80 Euro.

**Band 36:** Symposium on Refractory Organic Substances in the Environment –  
ROSE II, 2000, 265 S., 12,80 Euro.

**Band 37:** Thomas Brinkmann: Alkalischer und solarinduzierter Abbau von  
natürlicher organischer Materie, 2003, 212 S., 15,00 Euro.

**Band 38:** Andreas Gorenflo: Rückhalt und Fouling von natürlichen organischen  
Substanzen bei der Nano- und Ultrafiltration, 2003, 219 S., 18,00 Euro.

**Band 39:** Philip Hörsch: Einfluss der chemischen Oxidation auf das toxische Potenzial  
und das biologische Abbauverhalten von Industrieabwässern, 2004, 210 S., 20,00 Euro.

**Band 40:** Margit B. Müller: Bewertung von Anreicherungs- und Fraktionierungsverfahren  
für die strukturelle Charakterisierung der gelösten organischen Substanz in Gewässern,  
2004, 185 S., 18,00 Euro.

Preise verstehen sich zzgl. der gesetzlichen Mehrwertsteuer und Versandkosten.

Bestellungen über:

Lehrstuhl für Wasserchemie und DVGW-Forschungsstelle  
am Engler-Bunte-Institut der Universität Karlsruhe (TH)

Engler-Bunte-Ring 1

D-76131 Karlsruhe

Tel.: +49-(0)721-608-2580

Fax: +49-(0)721-699154

E-mail: [fritz.frimmel@ebi-wasser.uni-karlsruhe.de](mailto:fritz.frimmel@ebi-wasser.uni-karlsruhe.de)