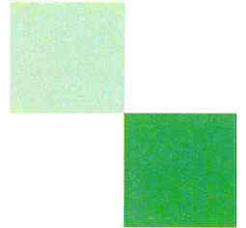


ARCHIVIERUNGSEXEMPLAR



UFZ-Umweltforschungszentrum
Leipzig-Halle GmbH
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Dissertation / Mai 2005

Untersuchungen zur Sorption an Huminstoffen:

**Molekulargewicht und
Kohlenstoff-Isotopenfraktionierung**

Michael Voskamp

ISSN 1860-0387

**Untersuchungen zur Sorption an Huminstoffen:
Molekulargewicht und Kohlenstoff-Isotopenfraktionierung**

Von der Fakultät für Chemie und Mineralogie

der Universität Leipzig

genehmigte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

DOCTOR RERUM NATURALIUM

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

von

Diplom-Chemiker **Michael Voskamp**

geboren am 02. Mai 1971 in Nordenham

Archiv

Angenommen aufgrund der Gutachten von:

Prof. Dr. W. Engewald

Prof. Dr. F.-D. Kopinke

Prof. Dr. P. Grathwohl

Tag der Verleihung: 20. Dezember 2004

Michael Voskamp

Untersuchungen zur Sorption an Huminstoffen: Molekulargewicht und Kohlenstoff-Isotopenfraktionierung

Universität Leipzig, Dissertation

200 Seiten, 72 Abbildungen, 26 Tabellen, 180 Literaturangaben

Referat:

In der vorliegenden Arbeit wurde das Sorptionsverhalten von gelösten Huminstoffen gegenüber hydrophoben organischen Substanzen (HOS) in Abhängigkeit von der Molekülgröße der gelösten Huminstoffe untersucht. Dazu wurde auf Basis der Fluoreszenzlöschtechnik eine schnelle Online-Methode zur Bestimmung von molekülgrößenauflösten Sorptionskoeffizienten entwickelt und auf ihren Einsatzbereich hin getestet.

Des Weiteren wurden Untersuchungen zum Einfluß der Sorption von HOS an eine huminstoffhaltige stationäre Phase auf das Kohlenstoffisotopenverhältnis der HOS durchgeführt. Der in Laborexperimenten ermittelte sorptionsbedingte Isotopenfraktionierungseffekt wurde dem Ausmaß des durch mikrobielle Abbauprozesse verursachten Isotopenfraktionierungseffektes gegenübergestellt. Anhand eines einfachen Modells zur Beschreibung des sorptionsbedingten Isotopenfraktionierungseffektes in kontaminierten Aquiferen wurde dessen Relevanz für die Anwendbarkeit der Isotopenanalytik als Methode zum Nachweis des biologischen Abbaus innerhalb des Natural Attenuation-Konzeptes dargestellt.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1999 bis Februar 2004 am UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Sanierungsforschung unter der Leitung von Herrn **Prof. Dr. F.-D. Kopinke** angefertigt.

Herrn **Prof. Dr. W. Engewald**, Herrn **Prof. Dr. F.-D. Kopinke** und Frau **Dr. Anett Georgi** danke ich in besonderem Maße für die Überlassung des Themas, die intensive Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Theoretischer Teil	4
2.1	Genese von Huminstoffen.....	4
2.2	Modelle für die Sorption von hydrophoben organischen Substanzen an gelöste Huminstoffe.....	6
2.3	Molmassendefinitionen und Methoden zur Molmassenbestimmung von gelösten Huminstoffen.....	10
2.3.1	Größenausschlußchromatographie (GPC/SEC).....	14
2.3.2	Einführung in die Asymmetrische Fluß-Feldflußfraktionierung (AF ⁴).....	22
2.3.3	Darstellung der Gleichungen zur Beschreibung der Fluß-F ³	26
2.4	Entwicklung und Einsatz eines Online-DOC-Detektors	32
2.5	Methoden zur Bestimmung des Sorptionskoeffizienten	35
2.5.1	Fluoreszenzlöschungsmethode (FQT)	36
2.5.2	Festphasenmikroextraktion (SPME).....	40
2.6	Einleitung und Literaturüberblick zur Isotopenfraktionierung	42
3	Experimenteller Teil	49
3.1	Allgemeine experimentelle Arbeiten	49
3.1.1	Reinigung der kommerziellen Huminsäuren	49
3.1.2	Bestimmung des Feuchtegehalts, des Kohlenstoffgehalts und des Aschegehalts der Huminsäuren.....	49
3.2	Durchführung der SEC-Experimente.....	50
3.3	Durchführung der AF ⁴ -Experimente.....	51
3.4	Durchführung der Experimente in Anlehnung an PICCOLO et al. zur Huminsäure-Struktur.....	54
3.5	DOC-Detektor.....	55
3.5.1	Vorarbeiten zum Einsatz des DOC-Detektors	57
3.5.2	Kalibrierung und Bestimmung der Nachweisgrenze des DOC-Detektors	57
3.5.3	Online-Kopplung des DOC-Detektors.....	58
3.6	Online-FQT-Untersuchungen	59
3.7	Offline-FQT-Experimente	60
3.8	SPME.....	62
3.9	Experimente zur Isotopenfraktionierung von HOS.....	63
3.9.1	Einstufiger Sorptionsversuch (Batchexperiment)	63
3.9.2	Isotopenfraktionierungsexperimente mit einer RP-HPLC-Säule.....	63
3.9.3	Präparation einer huminsäurehaltigen Säule.....	64
3.9.3.1	Partikuläre Huminsäure als Füllmaterial	64
3.9.3.2	In einer Quarzsandsuspension ausgefällte Huminsäure als Füllmaterial.....	64
3.9.3.3	Huminsäurebeschichtung von α - und γ -Al ₂ O ₃ als Füllmaterial.....	65

	3.9.3.4	Kovalent an eine anorganische Matrix gebundene Huminsäure als Füllmaterial	66
	3.9.4	Isotopenfraktionierungsexperimente mit dem HPLC-Säulenfüllmaterial, an das die Huminsäure kovalent gebunden ist	67
4		Ergebnisse und Diskussion	69
	4.1	Allgemeine Charakterisierung der verwendeten Huminsäuren	69
	4.2	Ergebnisse der SEC-Analysen	71
	4.3	Ergebnisse der AF ⁴ -Analysen von Huminsäure-Proben	75
	4.4	Experimente in Analogie zu den Untersuchungen von PICCOLO et al. zur Frage der Huminsäure-Struktur	85
	4.5	DOC-Detektor	92
	4.5.1	Voruntersuchungen zur Online-Kopplung des DOC-Detektors	92
	4.5.1.1	Bestimmung der Nachweisgrenze des DOC-Detektors	95
	4.5.1.2	Bestimmung des Oxidationsvermögens des DOC-Detektors	97
	4.5.2	DOC-Detektor als Online-Detektor in Kopplung mit UV-Detektion	104
	4.6	Kopplung der Größencharakterisierungsmethode SEC mit der FQT zur Online-Bestimmung eines molmassenaufgelösten Sorptionskoeffizienten	112
	4.7	Kopplung der Größentrennmethode AF ⁴ mit Online-FQT-Analysen	116
	4.8	Offline-FQT-Experimente	123
	4.8.1	Ermittlung des Sorptionskoeffizienten K _{DOC} bei verschiedenen Ionenstärken	123
	4.8.2	Offline-FQT-Experimente zur Abhängigkeit des Sorptionskoeffizienten von der HA-Molmasse	128
	4.9	SPME	132
	4.10	Ergebnisse und Diskussion der Isotopenfraktionierungsexperimente	133
	4.10.1	Einstufiger Sorptionsversuch (Batchexperiment)	133
	4.10.2	Isotopenfraktionierungsexperimente mit einer RP-HPLC-Säule	136
	4.10.3	Präparation einer huminsäurehaltigen Säule	144
	4.10.3.1	Partikuläre Huminsäure als Säulenfüllmaterial	144
	4.10.3.2	In einer Quarzsandsuspension ausgefällte Huminsäure	144
	4.10.3.3	Huminsäure als Coating auf α - und γ -Al ₂ O ₃	145
	4.10.4	Isotopenfraktionierungsexperimente mit dem HPLC-Säulenmaterial, an das die Huminsäure kovalent gebunden ist	145
	4.10.5	Übertragung der experimentellen Ergebnisse auf ein Aquifermodell	149
	4.10.5.1	Modell der (eindimensionalen) instationären Schadstoffahme	149
	4.10.5.2	Modell einer stationären Schadstoffahme	156
	4.11	Theoretische Betrachtungen zum homogenen und heterogenen Aquifermodell	159
5		Zusammenfassung	164
6		Literaturverzeichnis	168

7	Anhang	185
	Teil A: Abbildungsverzeichnis.....	185
	Teil B: Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	188
	Teil C: Verzeichnis der verwendeten Variablen	191
	Teil D: Molmassen und Dispersivitäten der verwendeten PSS-Standards	195
	Teil E: SEC-Vorversuche in Analogie zu den Experimenten von PICCOLO et al. zur Frage der Huminsäure-Struktur mit Roth-HA	195
	Teil F: Einfluß des Eluenten und der verwendeten Metallhülse auf die Temperatur innerhalb des Reaktorrohres des DOC-Detektors.....	199
	Teil G: Formeln zur Berechnung des Gesamtfehlers der Fluoreszenzquenchuntersuchungen von Pyren und Aldrich-HA bei Anwendung der Gleichung nach LAKOWICZ zur IFE-Korrektur.....	200

„Gute Theorie muß alsbald zur Praxis führen.
Man kann ihren Wert geradezu daran ermessen.“

Wilhelm Ostwald (1853 – 1932)
Professor für physikalische Chemie
an der Universität Leipzig,
Nobelpreis für Chemie 1909

1 Einleitung

Natürliche *Huminstoffe* (Humic Substances, HSs) stellen den größten Pool an *organischem Kohlenstoff* (Organic Carbon, OC) in der Umwelt dar. Ihre wäßrigen Lösungen sind gelb bis tief braun gefärbt. Sie liegen in immobilisierter Form als festes bzw. *partikuläres organisches Material* (Particular Organic Matter, POM)¹ oder gebunden an die anorganische Bodenmatrix vor. In gelöster und somit mobiler Form findet man HSs in Oberflächen-, Poren- und Grundwässern. Sie bilden dabei den größten Anteil der *gelösten organischen Substanzen* (Dissolved Organic Matter, DOM). Neben dem Begriff DOM wird häufig auch der auf den Gehalt an organischem Kohlenstoff bezogene Terminus des *gelösten organischen Kohlenstoffs* (Dissolved Organic Carbon, DOC) verwendet.

HSs besitzen durch ihre Wechselwirkungen mit *hydrophoben organischen Substanzen* (HOS) eine besondere Bedeutung für den Rückhalt bzw. die Ausbreitung dieser Substanzen in der Umwelt. HOS werden meist aus anthropogenen Quellen in die Umwelt eingetragen. Zu den HOS werden z. B. die Vertreter der Substanzklasse der *Polycyclischen Aromatischen Kohlenwasserstoffe* (PAKs) gezählt. Für einzelne Verbindungen dieser Klasse wurden kanzerogene, mutagene oder tumor-promovierende Wirkungen nachgewiesen. Sie stellen dadurch eine Gefährdung für Mensch und Umwelt dar. Die Sorption an Sedimente bzw. Böden und auch an gelöste HSs führt zu einer Reduzierung der Bioverfügbarkeit und Toxizität dieser Schadstoffe [KUKKONEN 1990, DiToro 1991, ALEXANDER 1995, PERMINOVA 2001]. Der Einfluß von HSs auf den mikrobiellen Abbau von HOS wird noch kontrovers diskutiert. HOLMAN et al. z. B. fanden eine starke Erhöhung der mikrobiellen Abbaugeschwindigkeit von Pyren in Gegenwart von gelösten HSs [HOLMAN 2002].

Während die Wechselwirkungen von HOS mit immobilen HSs zu einer Festlegung dieser Schadstoffe führen, erhöht die Sorption von HOS an DOC die (scheinbare) Wasserlöslichkeit dieser ansonsten in reinem Wasser nur gering löslichen Substanzen und führt damit zu einer verstärkten Ausbreitung der HOS in der Umwelt. Zur Abschätzung des Gefährdungspotentials, das von HOS ausgeht, ist eine Modellierung ihrer Verteilung in den verschiedenen Kompartimenten notwendig. Dazu müssen geeignete Modelle zur Beschreibung der Sorption von HOS an HSs zur Verfügung stehen. Darin müssen neben den Sorptiveigenschaften (wie ihrer Hydrophobie) auch Sorbenseigenschaften berücksichtigt werden. Die für das Sorptionspotential von HSs entscheidenden Strukturparameter sind bis heute noch nicht hinreichend aufgeklärt. Offensichtlich kommt der Molekülgröße der gelösten HSs aber eine wichtige, wenn nicht gar entscheidende Rolle zu.

Ein Ziel dieser Arbeit war deshalb, den Einfluß der Molekülgröße von gelösten HSs auf das Ausmaß der

¹ Bei entsprechend kleiner Partikelgröße kann POM allerdings auch durch die Bildung von wäßrigen Suspensionen zu den mobilen HSs gerechnet werden.

Sorption von HOS zu untersuchen. Einige in der Literatur zu dieser Fragestellung beschriebene Untersuchungen stellen Korrelationen des Sorptionskoeffizienten mit der mittleren Molmasse von HS-Isolaten unterschiedlicher Herkunft dar [z. B. PERMINOVA 1999]. Hierbei werden Sorbentien miteinander verglichen, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Abstammung (aquatische und bodenstämmige *Fulvinsäuren* (Fulvic Acids, FAs) und *Huminsäuren* (Humic Acids, HAs)) sich nicht nur in der mittleren Molmasse, sondern z. B. auch in ihrer Polarität oder Aromatizität voneinander unterscheiden. Andere Autoren bestimmten den Sorptionskoeffizienten von Größenfraktionen eines HS, die durch die *Ultrafiltrations* (UF)-Methode erhalten wurden [JOTA 1991].

Gleichzeitig gibt es jedoch Hinweise dafür, daß mittels der UF-Methode nach ihrer Größe aufgetrennte HS-Fraktionen zeitlich nicht stabil sind und sich erneut eine breite Größenverteilung einstellt [ASTER 1996]. Eine nachfolgende Untersuchung derartiger UF-Größenfraktionen mit Offline-Methoden zur Bestimmung des Sorptionspotentials dieser Fraktionen bzgl. HOS könnte so zu nicht repräsentativen Ergebnissen führen. Darüber hinaus besitzen solche Offline-Analysen einen relativ hohen Substanz- und Zeitbedarf.

Aus den genannten Gründen sollte in dieser Arbeit erstmalig eine Online-Kopplung von Größentrennmethode mit der *Fluoreszenzlöschtechnik* (Fluorescence Quench Technique, FQT) als Methode zur Bestimmung des Sorptionspotentials von HSs für HOS eingesetzt werden. Da der häufig zur Größenauftrennung von HSs eingesetzten *Größenausschlußchromatographie* (Size Exclusion Chromatography, SEC) eine Neigung zur Artefaktbildung nachgesagt wird [DENOBILI 1999, PERMINOVA 1999], wurde parallel dazu die Methode der Asymmetrischen Fluß-Feldflußfraktionierung (Asymmetric Flow Field Flow Fractionation, AF⁴) zur Größentrennung des HS eingesetzt und mit der FQT gekoppelt. Die AF⁴-Methode basiert auf einem anderen Trennmechanismus und die Apparatur besitzt eine deutlich geringere Oberfläche, die für unerwünschte Wechselwirkungen mit HSs zur Verfügung steht, als die SEC. Dadurch sollten von möglichen SEC-Artefakten unabhängige Ergebnisse erhalten werden. Aus demselben Grund sollte diese Methode auch auf die Überprüfung der SEC-Experimente angewandt werden, auf deren Ergebnisse aufbauend PICCOLO et al. ein Modell für die HS-Struktur vorgeschlagen haben [PICCOLO 1996]. Die ausschließliche Verwendung der SEC-Ergebnisse stellt in der wissenschaftlichen Gemeinschaft einen Kritikpunkt an dem von ihnen vorgeschlagenen HS-Modell dar [PERMINOVA 1999].

Im Kontext der Bestimmung des K_{DOC} -Wertes von HOS an nach ihrer Molekülgröße aufgelösten HS-Proben sollte ein Online-Detektor zur Bestimmung der DOC-Konzentration eingesetzt werden. Da zum Zeitpunkt der Durchführung der praktischen Arbeiten kein geeigneter Online-DOC-Detektor kommerziell verfügbar war, wurde ein solcher Detektor in Zusammenarbeit mit dem Institut für Nicht-klassische Chemie an der Universität Leipzig (INC) entwickelt und auf seine Anwendbarkeit im Rahmen der Aufgabenstellung geprüft.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluß der Sorption von HOS an immobilisierten HSs auf die Zusammensetzung der stabilen Kohlenstoffisotope der HOS untersucht. Die durch den mikrobiellen Abbau hervorgerufene Isotopenfraktionierung von HOS gilt als ein mögliches Werkzeug, um im Rahmen des Natural Attenuation-Konzeptes einen biologischen Abbau von HOS nachweisen zu können. Dazu muß jedoch ein Beitrag physikalischer Prozesse (z. B. Verdampfung, Verdünnung, Sorption) zur Isotopenfraktionierung ausgeschlossen werden oder zumindest dessen Größenordnung bekannt sein. Während Verdampfungsprozesse in der gesättigten Bodenzone vernachlässigbar sind und somit keinen signifikanten Einfluß auf die Isotopensignatur ausüben sollten, könnten (mehrfache) Sorptions-Desorptions-Schritte an (immobilisierter) *organischer Substanz* (Soil Organic Matter, SOM) innerhalb eines Aquifers zu einer Beeinflussung der Isotopenverhältnisse der HOS

führen. Ein möglicher Isotopenfraktionierungseffekt durch die Sorption von HOS an immobilisierter HA wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals untersucht. Durch die Entwicklung eines einfachen Aquifermodells wurde nachfolgend versucht, die Ergebnisse der Laborexperimente auf die Situation in einem realen Aquifer zu übertragen und somit die Relevanz von Sorptionsprozessen für die Anwendbarkeit der Isotopenfraktionierungsmethode als Nachweis für einen mikrobiellen Abbau einzuschätzen. An dieser Stelle sei auch auf den einleitenden Abschnitt zur Isotopenfraktionierung (Kap. 2.6) hingewiesen.

Da in dieser Arbeit methodische und apparative Entwicklungen im Vordergrund standen, wurde für die Untersuchungen auf kommerziell verfügbare HAs der Firmen Roth (Roth-HA) und Aldrich (Aldrich-HA) als Huminstoffmodellsubstanzen zurückgegriffen.

2 Theoretischer Teil

2.1 Genese von Huminstoffen

Der Begriff *Huminstoff* beschreibt keine einheitliche Verbindung mit einer definierten Konstitutionsformel, sondern ein Sammelsurium verschiedener Verbindungen, deren Zusammensetzung – je nach Herkunft der HSs – mitunter stark variiert. Daher können weder die Struktur eines „HS-Moleküls“ noch sein *Molekulargewicht* (Molecular Weight, MW) exakt angegeben werden. Entsprechend den unterschiedlichen Strukturen der Moleküle, die in ihrer Gesamtheit den HS bilden, besitzt das MW eines HS keinen diskreten Wert, sondern stellt vielmehr eine (relativ breite) MW-Verteilung dar [ZIECHMANN 1980]. Die Frage nach möglichen Strukturen (oder genauer: Strukturbestandteilen) von HS-Molekülen ist eng mit der Frage nach ihrer Entstehung verbunden. HS entstehen durch den chemischen und mikrobiellen Abbau von vor allem pflanzlicher Biomasse. So sollten sich die Strukturen der Ausgangsverbindungen auch in den Bestandteilen der HS-Moleküle wiederfinden lassen. Terrestrische HSs enthalten vor allem Bestandteile von Pflanzen, wie Lignine, Tannine, Cutin, Wachse, Proteine, etc. Strukturbildend für HS sollen vor allem vom Lignin, einem höhermolekularen Abkömmling des Phenylpropane, stammende Einheiten sein. An dieses Grundgerüst lagern sich kleinere Bestandteile wie Zucker und Aminosäuren an, die im Laufe der Diagenese auch in die Grundstruktur der HSs eingebaut werden können [KILLOPS 1993]. Fettsäuren, als Nebenprodukt mikrobieller Abbaureaktionen, können über Esterbindungen ebenfalls mit dieser Grundstruktur verknüpft sein und bilden neben den Wachsen den Hauptanteil aliphatischer Strukturen in HSs [KILLOPS 1993]. Durch die oxidative Überprägung weisen die HS-Strukturbestandteile aber höhere Gehalte an sauerstofffunktionalisierten Gruppen (wie Carboxyl-, Carbonyl-, phenolische, alkoholische, ketonische, chinoide und Methoxy-Gruppen) als ihre Ausgangsstrukturen auf [KILLOPS 1993]. Umstritten ist noch, ob HSs nun lediglich (die modifizierten) Abbauprodukte von höhermolekularen Verbindungen sind oder vielmehr durch Mikroorganismen aus kleineren Synthesebausteinen in Polymerisationsreaktionen zu größeren Molekülen zusammengesetzt werden. Wahrscheinlich sind HSs das Produkt beider Prozesse und stellen eine im Gleichgewicht befindliche energetische Senke der verschiedenen Ab- und Aufbaureaktionen dar [SWIFT 1999 und darin zitierte Literatur]. Dies liefert einen ersten Hinweis auf die zu erwartende Größenordnung der MW-Verteilung von HSs. Diese erfährt jedoch mit fortschreitender Alterung (Reaktionszeit) eine Veränderung hin zu höheren mittleren MWs. Bei diesem als *Humifizierung* bezeichneten Prozeß können sowohl kovalente Bindungen, z. B. durch Veresterungsreaktionen von Carboxyl-Gruppen, als auch andere Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, π - π^* -Wechselwirkungen von aromatischen Einheiten oder Charge-Transfer-Komplexe ausgebildet werden [SWIFT 1999 und darin zitierte Literatur]. Aufgrund dieser Heterogenität der Moleküle, die die Gesamtheit der HSs bilden, werden HSs vorwiegend lediglich operativ in drei Untergruppen, entsprechend ihrer Löslichkeit, unterteilt:

- In einer wäßrigen Lösung mit einem pH-Wert von 10 unlösliche SOM-Bestandteile werden als *Humine* bezeichnet.

- Verbindungen, die beim Absenken des pH-Wertes von 10 auf 2² ausfallen, werden als *Huminsäuren* (Humic Acids, HAs) und
- Verbindungen, die bei einem pH-Wert von 2 und darunter in Lösung bleiben, als *Fulvinsäuren* (Fulvic Acids, FAs) bezeichnet.

Generell nimmt das Sorptionspotential gegenüber HOS in der Reihe kommerzielle (da zumeist braunkohlestämmig) > bodenstämmige > aquatische HSs ab [CHIOU 1986, CHIOU 1987]. Dabei zeichnen sich die HAs allgemein durch ein größeres Sorptionspotential als FAs gleichen Ursprungs aus [CHIOU 1986]. Das geringere Sorptionsvermögen von FA gegenüber den nicht-ionischen hydrophoben Substanzen kann auf die höhere Dichte an funktionellen Gruppen und die damit verbundene höhere Polarität zurückgeführt werden. Dies erklärt gleichzeitig ihre bessere Wasserlöslichkeit im Vergleich zu den HAs gleicher Herkunft. Aber auch ihre kleinere mittlere Molmasse [SCHACHTSCHABEL 1992] kann für das geringere Sorptionsvermögen von FAs verantwortlich sein. Auf die mögliche Relevanz derartiger Strukturparameter für die Sorption von HOS an HS soll später noch genauer eingegangen werden.

Obwohl aufgrund ihrer Heterogenität eine Strukturaufklärung von HSs aus heutiger Sicht als wenig aussichtsreich erscheint, wurden immer wieder Vorschläge zur Struktur von HS-Molekülen gemacht. Das nachfolgend abgebildete HA-Strukturmodell basiert vor allem auf den Ergebnissen von Pyrolyse-GC/MS-Untersuchungen [SCHULTEN 1993] und sei zur Veranschaulichung des komplexen Aufbaus von HSs hier aufgeführt.

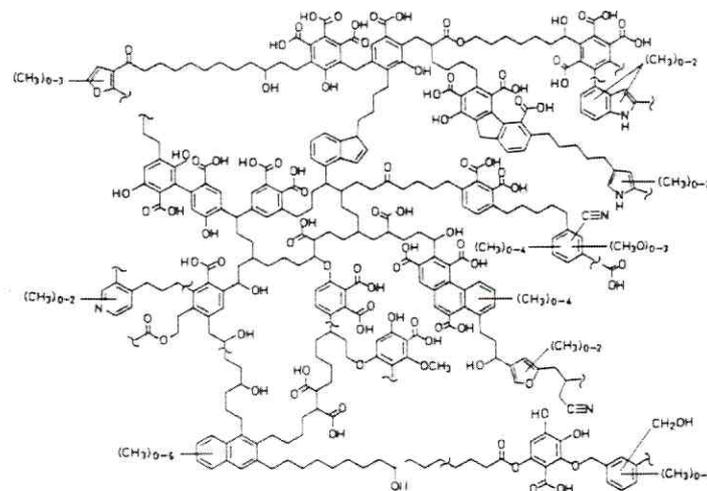


Abb. 2-1: Schematische Darstellung der makromolekularen HA-Struktur nach Schulten und Schnitzer. Das Zeichen ~ steht für einen weiten Bereich von Verknüpfungspunkten innerhalb des Makromoleküls z. B. mittels aliphatischer Kohlenstoffketten mit variierender Kettenlänge.

² Häufig wird von Bodenkundlern hier die Grenze abweichend bei einem pH-Wert von 1 gesetzt.

2.2 Modelle für die Sorption von hydrophoben organischen Substanzen an gelöste Huminstoffe

Schon in den 60er Jahren wurde eine Erhöhung der Löslichkeit von DDT bei Anwesenheit des Natriumsalzes einer aus Boden extrahierten HA in der wäßrigen Lösung ($5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ HA) beobachtet [WERSHAW 1969]. Den gleichen Effekt konnten CARTER und SUFFET auch für geringere und somit umweltrelevante HA-Konzentrationen ($16 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ HA) ermitteln. Sie erhielten lineare Sorptionsisothermen für drei verschiedene HAs [CARTER 1982]. Die Existenz von linearen Sorptionsisothermen impliziert einen Verteilungsmechanismus [CHIOU 1979, MCCARTHY 1985], bei dem gelöste HAs eine (mikroskopische) organische Phase darstellen, die mit der umgebenden wäßrigen Phase nicht mischbar ist. Die Abwesenheit von kompetitiven Effekten zwischen verschiedenen Sorptiven stützt diese These weiter [CHIOU 1986, MAXIN 1995]. Diese als Verteilungsmodell bezeichnete Vorstellung stellt das einfachste Sorptionsmodell für organische Sorptive und gelöste HSs dar. Zur quantitativen Beschreibung der Sorption von Analyten an HSs wird hierbei üblicherweise der auf den Gehalt an DOC im Sorbens normierte K_{DOC} -Wert verwendet. Dieser Verteilungs- oder Sorptionskoeffizient K_{DOC} ($\text{kg} \cdot \text{l}^{-1}$) stellt das Verhältnis zwischen der Konzentration des sorbierten Anteils des Analyten im Sorbens ($c_{\text{Analyt, DOC}}$ in $\text{mol} \cdot \text{kg DOC}^{-1}$) und der Konzentration des in der wäßrigen Phase gelösten Anteils des Analyten ($c_{\text{Analyt, w}}$ in $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) dar:

$$\text{Gl. 2-1} \quad K_{\text{DOC}} = \frac{c_{\text{Analyt, DOC}}}{c_{\text{Analyt, w}}}$$

Die Masse des sorbierten Anteils (im Sorbens) kann auch auf das Volumen der wäßrigen Phase bezogen werden. Entsprechend muß dann auch die Masse des DOC hierauf bezogen werden. So entspricht c_{DOC} der Konzentration des DOC in der wäßrigen Phase (c_{DOC} in $\text{kg} \cdot \text{l}^{-1}$). Da der sorbierte Anteil des Analyten im allgemeinen nicht direkt meßbar ist, kann seine auf das Volumen der wäßrigen Phase bezogene Konzentration (c_{sorbiert}) aus der Differenz der eingesetzten Gesamtkonzentration des Analyten (c_{ges}) und der Konzentration des frei gelösten Anteils des Analyten in der wäßrigen Lösung (c_{frei}) berechnet werden. Entsprechend gilt:³

$$\text{Gl. 2-2} \quad K_{\text{DOC}} = \frac{c_{\text{sorbiert}}}{c_{\text{frei}}} \cdot \frac{1}{c_{\text{DOC}}} = \frac{c_{\text{ges}} - c_{\text{frei}}}{c_{\text{frei}}} \cdot \frac{1}{c_{\text{DOC}}} = \left(\frac{c_{\text{ges}}}{c_{\text{frei}}} - 1 \right) \cdot \frac{1}{c_{\text{DOC}}}$$

Treibende Kraft für die Sorption von HOS an HSs ist - neben den schwachen van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen Sorptiv und Sorbens - vor allem die Erhöhung der Entropie des Systems. Diese resultiert aus dem Aufbrechen der stark strukturierten Hydrathülle beim Übergang von HOS-Molekülen aus der wäßrigen in die organische Phase. Diese These wird durch die geringen Sorptionsenthalpien, die für die Sorption von PAKs und PCBs an gelöste HSs gefunden wurden und die in der Größenordnung der Lösungsenthalpien liegen, gestützt [JOTA 1991, LÜERS 1996]. Zusammenfassend werden die Wechselwirkung aufgrund von van-der-Waals-Kräften und der entropiegetriebene Prozeß als hydrophobe Wechselwirkung bezeichnet.

³ Die Gleichung gilt analog auch für die Betrachtung von (nicht gelöstem) OC (vgl. Kap. 2.6). Hier muß entsprechend der Term c_{DOC} durch den Ausdruck c_{OC} ersetzt werden.

Ein Modell zur Erklärung eines derartigen Verteilungsmechanismus wurde von WERSHAW vorgeschlagen [WERSHAW 1986, WERSHAW 1989]. Demzufolge bilden gelöste HS-Moleküle eine Art Mizelle, in deren hydrophobem Inneren HOS eingelagert werden können. HS-Moleküle besitzen dabei ähnlich wie Tenside einen amphiphilen Charakter, wobei vor allem Carboxyl-Gruppen den polaren Teil des Moleküls und gesättigte bzw. aromatische Bereiche des HS-Moleküls den hydrophoben Teil darstellen.

Der HS-Mizellenverband selbst wird durch eine (relativ homogene) Mischung teilweise abgebauter molekularer Bestandteile lebender Organismen gebildet und durch schwache Wechselwirkungen (wie Wasserstoffbrückenbindungen, π -Bindungen, van-der-Waals-Wechselwirkungen) zusammengehalten [WERSHAW 1989]. In Analogie zur Betrachtung von Tensiden wurde eine *kritische Mizell-Bildungskonzentration* (Critical Micellization Concentration, CMC), also die Konzentration an HSs in Lösung, oberhalb derer sich ein Mizellenverband ausbildet, von 1 bis $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ HS ermittelt [HAYASE 1983]. Die Bildung von derartigen Aggregaten führen WAGONER und CHRISTMAN als eine mögliche Erklärung für die von ihnen ermittelten mittleren Molmassen für *natürliche organische Substanzen* (Natural Organic Matter, NOM) aus dem Suwanee River an [WAGONER 1998].

Da aber auch für Lösungen mit deutlich geringerer HS-Konzentration als die CMC für HSs eine Erhöhung der Wasserlöslichkeit von HOS beobachtet wurde, wird die Ausbildung von premizellaren Agglomeraten oder auch die Assoziation von HOS an die hydrophoben Bereiche von nicht agglomerierten, amphiphilen HS-Molekülen zur Erklärung herangezogen [CHIOU 1987]. Das von WERSHAW propagierte Mizellenmodell erfährt durch eine Reihe von Arbeiten, die von PICCOLO und Koautoren publiziert worden sind, eine starke Unterstützung [z. B. PICCOLO 1996A]. Auf die von PICCOLO et al. verwendete experimentelle Methodik, ihre Ergebnisse und die daraus gezogenen Schlußfolgerungen soll an späterer Stelle (ab Seite 21) noch genauer eingegangen werden, da diese Grundlage weiterführender Experimente im Rahmen dieser Arbeit waren.

Eine andere Modellvorstellung betrachtet HSs als Makromoleküle, die - in Abhängigkeit von den Lösungsbedingungen (pH-Wert, Ionenstärke (IS) und Ionenart) - eine mehr oder weniger stark geknäuelte Struktur besitzen [PLECHANOV 1983, BECKETT 1987, SWIFT 1989]. Bei einem hohen pH-Wert liegen die sauren funktionellen Gruppen überwiegend deprotoniert vor, so daß in Folge der Abstoßung vor allem der negativ geladenen Carboxyl-Gruppen das HS-Molekül eine gestreckte Konformation einnimmt. Bei niedrigen pH-Werten hingegen sind diese Gruppen größtenteils protoniert. Gleichermaßen führt auch die Anwesenheit einer ausreichenden Anzahl von Kationen zu einer Ladungsabschirmung, so daß die HS-Moleküle in einer geknäuelten Konformation vorliegen. Mehrwertige Kationen führen dabei häufig zu einer Stabilisierung dieser Struktur, indem sie zwischen polaren funktionellen Gruppen eines oder mehrerer HS-Moleküle verbrückend wirksam werden. Dadurch und durch inter- und intramolekulare Wechselwirkungen zwischen aromatischen Einheiten werden hydrophobe Bereiche ausgebildet, in die die HOS aus der Wasserphase hinein wandern können. Ein ganz ähnliches Bild propagierten SCHNITZER und KHAN in ihrem HS-Modell [SCHNITZER 1972]. Sie betrachteten HSs als ein durchbrochenes Netzwerk von wenig kondensierten aromatischen Ringen mit einer großen Anzahl von ungeordneten aliphatischen und alicyclischen Strukturen, die um einen aromatischen Kern angeordnet sind. Die HS-Struktur wird dabei durch Untereinheiten aus Phenol- und Benzoesäuren gebildet, die durch Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kräfte zusammengehalten werden und relativ stabile Aggregate bilden [SCHNITZER 1972]. Anhand dieser Vorstellung einer käfigartigen Struktur von HS mit einer hohen Anzahl von Sorptionsplätzen interpretierten SCHLAUTMANN und MORGAN ihre experimentellen Befunde,

die eine Abhängigkeit des Sorptionskoeffizienten für PAKs an der Suwanee River HA bzw. FA von den Lösungsparametern (pH-Wert, IS und Wertigkeit der Ionen) und der jeweiligen Größe des Sorptivs aufwiesen [SCHLAUTMANN 1993]. Die Sorption ähnelt damit eher der Bildung eines Wirt-Gast-Komplexes und ihr Ausmaß wird sowohl durch die geometrische Größe und Anzahl als auch durch die spezifische chemische Umgebung innerhalb der Käfige beeinflusst. Eine derartige Substanzspezifität der Sorption widerspricht den Vorstellungen eines einfachen Verteilungsmodells. Da eine quantitative Beschreibung solch spezifischer Wechselwirkungen zur Vorausberechnung des Ausmaßes der Sorption schwierig wenn nicht gar unmöglich ist, wird in der Praxis üblicherweise auf das einfache Verteilungsmodell zurückgegriffen [DITORO 1991, REBHUHN 1996].

Da eine treibende Kraft der Sorption von HOS an HSs durch die Unverträglichkeit der hydrophoben Substanzen mit der wäßrigen Phase - ihrer Hydrophobie - bestimmt wird, werden zur Vorausberechnung von Sorptionskoeffizienten von HOS an HSs häufig lineare Korrelationen zwischen dem K_{OC} -Wert und dem Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (K_{OW} -Wert) der HOS verwendet [KARICKHOFF 1984, SETH 1999, BURKHARD 2000]. Diese empirischen K_{OC} - K_{OW} -Korrelationen besitzen für spezifische Substanzklassen eine hohe Relevanz, lassen sich aber nur unzureichend auf unterschiedliche Klassen übertragen [BURKHARD 2000]. Dies läßt sich darauf zurückführen, daß das Ausmaß der Sorption nicht nur von der Hydrophobie der HOS, sondern auch von den Wechselwirkungen zwischen den HOS und dem HS abhängt. Im Fall von PAKs z. B. werden bevorzugte Wechselwirkungen zwischen deren π -Elektronensystem und aromatischen (hydrophoben) HS-Bereichen genannt, die durch die planare Struktur der PAKs begünstigt sein sollen [GAUTHIER 1987]. Aber auch Wasserstoffbrückenbindungen und Charge-Transfer-Wechselwirkungen [KUKKONEN 1990, PÜSCHEL 1996] wären hier zu nennen. Durch die Anwendung von komplizierteren Modellen, die z. B. auf der Flory-Huggins-Theorie [CHIOU 1983, CHIN 1989, KOPINKE 1995, GEORGI 2002] oder der *linearen Solvatationsenergie-Beziehung* (Linear Solvation Energy Relationships, LSERs) [POOLE 1999, OHLENBUSCH 2001] beruhen, wird versucht, derartigen Wechselwirkungen zwischen HOS und HSs (zumindest teilweise) Rechnung zu tragen. Diese Modelle lassen sich so auf eine größere Anzahl von Substanzklassen anwenden. Erschwerend für die Anwendung dieser Modelle auf gelöste HSs wirkt, daß sich gelöste HSs unterschiedlicher Herkunft viel stärker in ihrem Sorptionspotential unterscheiden als dies für feste HSs beobachtet wird, wie eine Reihe von Untersuchungen gezeigt haben [CARTER 1982, CHIOU 1986, GAUTHIER 1987, MCCARTHY 1989, BRANNON 1995, CHIN 1997, PERMINOVA 1999]. Dies wirft die Frage nach den für das Sorptionspotential für HOS entscheidenden Strukturparametern von gelösten HS auf. Eine Antwort auf diese Frage würde die Entwicklung von verbesserten Modellen für die Vorausberechnung der Sorptionskoeffizienten von gelösten HSs erlauben.

Aus diesem Grund wurden in verschiedenen Arbeiten Einparameter-Korrelationen zwischen Sorptionskoeffizienten eines Sorptivs und einzelnen strukturellen Eigenschaften von gelösten HSs aufgestellt. Eine Reihe von Autoren fanden dabei eine Abnahme der Sorptionsfähigkeit von HSs gegenüber HOS mit zunehmendem Gehalt an funktionellen Gruppen, d. h. mit zunehmender Polarität des Sorbens. Als Polaritätsindikator wurden das (O+N)/C- [RUTHERFORD 1992, XING 1994A], das H/O- [GRATHWOHL 1990] bzw. das O/C-Verhältnis [CHIOU 1987] verwendet. Des Weiteren wurden positive Korrelationen zwischen dem Sorptionskoeffizienten von PAKs und der Aromatizität von gelösten HSs erhalten [GAUTHIER 1987, MCCARTHY 1989, CHIN 1997, TANAKA 1997, PERMINOVA 1999]. Die Aromatizität der gelösten HSs wurde dabei durch den mittels ^{13}C - bzw. ^1H -NMR-Spektroskopie ermittelten Anteil an aromatischen C- bzw. H-Atomen oder den spezifischen Extinktionskoeffizienten im Bereich von 250-280 nm bestimmt. In einer von CHEFETZ et al. durchgeführten Untersuchung korreliert jedoch der Sorptionskoeffizient, der für die Wechselwirkung von Pyren

mit einer Reihe von NOM-Proben erhalten wurde, besser mit dem aliphatischen als mit dem aromatischen Kohlenstoffanteil in den Sorbentien. Die Kohlenstoffanteile der NOM wurden hier mit Hilfe der CPMAS ^{13}C -NMR-Methode bestimmt [CHEFETZ 2000]. Auf eine außerordentlich breite Datenbasis (drei PAKs und 26 HAS bzw. FAs) stützt sich die von PERMINOVA et al. durchgeführte Analyse des Zusammenhangs zwischen dem Ausmaß der Wechselwirkungen von HOS mit gelösten HSs und deren Strukturparametern [PERMINOVA 1999]. Sie erhielten für eine Reihe von Einparameter-Korrelationen von - mittels der FQT bestimmten - Sorptionskoeffizienten und Strukturparametern, wie z. B. der Aromatizität der HSs, allerdings nur niedrige Korrelationskoeffizienten ($R^2 \leq 0,74$). Erst nach einer Unterteilung der HSs in verschiedene Unterklassen, die sich aus ihrer Herkunft ergeben (aquatischen Ursprungs, aus Boden extrahiert, etc.), wurde beispielsweise für die Korrelation des Sorptionskoeffizienten mit der mittleren Molmasse ein zufriedenstellender Korrelationskoeffizient erhalten. Dabei wiesen die Korrelationen für boden- und torfstämmige HSs in unterschiedliche Richtungen. JOTA und HASSETT beobachteten einen Abfall der (mittels der Gaspurging-Methode bestimmten) K_{DOC} -Werte für ein PCB-Kongener und Aldrich-HA mit abnehmender nomineller Molmasse der Größenfraktion der HA. Die sechs Größenfraktionen der HA wurden zuvor durch Anwendung der Ultrafiltrationsmethode erhalten. Der mit Abstand höchste Sorptionskoeffizient wurde für die Fraktion > 300 kDa erhalten und war nur geringfügig höher als der K_{DOC} -Wert für die unfractionierte Gesamtprobe [JOTA 1991]. Eine ähnliche Abhängigkeit des K_{DOC} -Wertes von der Molmasse erhielten RABER und KÖGEL-KNABNER für Benzo[k]fluoranthen und DOM aus einem Haus- bzw. Pflanzenabfallkompost. Auch hier besaß jeweils die Fraktion mit dem höchsten nominellen Molekulargewicht (> 14 kDa) der drei durch Dialyse erhaltenen Fraktionen den mit Abstand höchsten K_{DOC} -Wert. Die jeweiligen K_{DOC} -Werte für die Fraktionen 1 bis 14 kDa und < 1 kDa unterschieden sich hingegen nur geringfügig [RABER 1997]. MCCARTHY et al. erhielten eine mäßige Korrelation zwischen den Sorptionskoeffizienten von Benzo[a]pyren an HSs verschiedener Herkunft und deren molaren Volumina, welche durch Messung der Fluoreszenzpolarisation bestimmt wurden [MCCARTHY 1989].

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Einparameter-Korrelationen (mit teilweise sehr geringen Korrelationskoeffizienten) führten KOPINKE et al. Zweiparameter-Korrelationen zwischen dem mittels *Festphasenmikroextraktion* (Solid Phase Micro Extraction, SPME) bestimmten Sorptionskoeffizienten und der Polarität sowie der Aromatizität von HSs durch. Sie erhielten für 11 HA- und FA-Proben, die um ca. eine Größenordnung unterschiedliche K_{DOC} -Werte für Pyren besaßen, einen sehr hohen Korrelationskoeffizienten von $R^2 = 0,97$. Dabei verwendeten sie das O/H-Atomverhältnis als Maß für die Polarität und den Extinktionskoeffizienten bei 280 nm als Maß für die Aromatizität der HS [KOPINKE 2001B]. Durch Reevaluierung der von CHIN et al. publizierten Daten [CHIN 1997], bei denen der K_{DOC} -Wert für Pyren mit Hilfe der Löslichkeitserhöhungsmethode bestimmt worden war, und Parametern für die Aromatizität (Signalbereich zwischen 110 und 160 ppm im ^{13}C -NMR-Spektrum) bzw. Polarität (Gewichtsanteil des Sauerstoffs in %) der HSs wurde ebenfalls ein hoher Korrelationskoeffizient ($R^2 = 0,96$) bei Anwendung der Zweiparameterkorrelation erhalten [GEORGI 1998].

Trotz des hohen Korrelationskoeffizienten sind derartige empirische Korrelationen zwischen dem Sorptionspotential und Strukturparametern der HSs mit Vorsicht zu interpretieren [KOPINKE 2001A], da einige HS-Strukturparameter, wie Aromatizität und Molmasse Interkorrelationen aufweisen [CHIN 1997].

Um derartige Zusammenhänge zwischen den Strukturparametern eines Sorbens und ihrem Einfluß auf das Sorptionspotential bezüglich HOS gezielt untersuchen zu können, verwendeten KOPINKE et al. Polyacrylsäureester (PAA-Ester) als Modellsorbentien [KOPINKE 2001A]. Hierbei wurden durch die Verwendung

unterschiedlicher Ester-Gruppen sowohl die Polarität und die Aromatizität der Modellsorbentien als auch die Molmasse der eingesetzten PAA-Ester variiert. Entgegen den Erwartungen wiesen die ein- und zweikernigen aromatischen Ester, bei denen zusätzlich die Elektronendichte im aromatischen Ring durch weitere Substituenten variiert wurde, keine höheren Sorptionskoeffizienten für Pyren auf, als die kurzkettigen aliphatischen Ester. Dies widerspricht der allgemeinen Annahme, daß besonders die aromatischen Bereiche eines Sorbens (wie z. B. in HSs) zu Wechselwirkungen mit HOS beitragen. Die Autoren betonen aber auch, daß möglicherweise die geringe räumliche Ausdehnung der von ihnen untersuchten aromatischen Ester-Gruppen für diesen Befund verantwortlich sein kann [KOPINKE 2001A].

Ein Vergleich zwischen Estern mit gleicher funktioneller Gruppe (und gleichem Veresterungsgrad) aber unterschiedlicher mittlerer Molmasse (2, 8, 250 und 450 kDa) zeigt eine deutliche Abhängigkeit des Sorptionskoeffizienten von der Molmasse der PAA-Ester. Der auf den Kohlenstoffgehalt der hydrophoben Estergruppe bezogene Sorptionskoeffizient ($K_{\text{DOC(R)}}$) steigt von $\log K_{\text{DOC(R)}} = 4,3$ für die PAA-Ester mit $M_w = 2$ kDa auf ca. 5 für die PAA-Ester mit 450 kDa an [KOPINKE 2001A].

Derartige Befunde werfen auch für HSs bzw. HAS als Sorbentien verstärkt die Frage nach dem Einfluß der Molmasse auf den Sorptionskoeffizienten von HOS auf. Ihre Untersuchung steht im Mittelpunkt des ersten Teils der vorliegenden Arbeit.

2.3 Molmassendefinitionen und Methoden zur Molmassenbestimmung von gelösten Huminstoffen

Monodisperse Substanzen besitzen - abgesehen von Isotopomeren - nur eine, klar definierte, Molmasse. Zur Beschreibung von polydispersen Substanzen werden hingegen verschiedene mittlere Molmassenwerte herangezogen. So z. B. die Molmasse im Maximum (M_p) einer Molmassenverteilung. Daneben findet man vor allem die Angabe der zahlengemittelten Molmasse M_n bzw. der gewichtsgemittelten Molmasse M_w . Diese sind wie folgt definiert:

$$\text{Gl. 2-3} \quad M_n = \frac{\sum m_i}{\sum N_i} = \frac{\sum (N_i \cdot M_i)}{\sum N_i}$$

$$\text{Gl. 2-4} \quad M_w = \frac{\sum (m_i \cdot M_i)}{\sum m_i} = \frac{\sum (N_i \cdot M_i^2)}{\sum (N_i \cdot M_i)}$$

Hierbei sind m_i die Masse und N_i die Anzahl der Moleküle mit der Molmasse M_i . Der M_n -Wert wird besonders durch niedermolekulare Anteile einer Molmassenverteilung beeinflusst, wohingegen der M_w -Wert sensitiv für hochmolekulare Anteile einer Molmassenverteilung ist. Beide Werte liefern jedoch keine Informationen über die Breite der Molmassenverteilung einer Probe. Zu diesem Zweck wird üblicherweise der Quotient aus M_w und M_n

verwendet. Dieser wird als Dispersivität D_M^4 bezeichnet und ist ein Maß für die Breite einer Molmassenverteilung.

$$\text{Gl. 2-5} \quad D_M = \frac{M_w}{M_n}$$

Polymere mit einem Wert von $D_M > 1$ werden als polydispers bezeichnet. Bei einem Wert von $D_M = 1$ handelt es sich um eine monodisperse Probe.

Seltener findet man noch die Angabe einer z-gemittelten Molmasse M_z , die wie folgt definiert ist:

$$\text{Gl. 2-6} \quad M_z = \frac{\sum (N_i \cdot M_i^3)}{\sum (N_i \cdot M_i^2)}$$

Der Wert von M_z wird besonders durch sehr hochmolekulare Anteile einer Molmassenverteilung beeinflusst.

Für die oben genannten Molmassenwerte erhält man per Definition die folgende Beziehung:

$$M_n < M_w < M_z$$

Auf weitere, weniger gebräuchliche Molmassendefinitionen soll hier nicht eingegangen werden.

Aus den digitalisierten Meßdaten einer SEC- oder AF⁴-Analyse⁵ können die M_n - und M_w -Werte mittels der nachfolgenden Gleichungen berechnet werden:

$$\text{Gl. 2-7} \quad M_n = \frac{\sum H_i}{\sum (H_i / M_i)}$$

$$\text{Gl. 2-8} \quad M_w = \frac{\sum (H_i \cdot M_i)}{\sum H_i}$$

Der Term H_i bezeichnet hierbei die Höhe des Signals eines konzentrationsproportionalen Detektors über der Basislinie beim Retentionsvolumen⁶ V_i [MORI 1999]. Die Umrechnung des V_i -Wertes in einen M_i -Wert bei V_i erfolgt durch eine Kalibrierfunktion, die z. B. bei Anwendung der SEC durch eine vorangehende Analyse von engverteilten Polymerstandards mit bekannter Molmasse M_p bestimmt werden muß (vgl. Kap. 2.3.1).

Die geometrische Größe eines Teilchens wird in Abhängigkeit von der Partikelform durch unterschiedliche Parameter definiert: Kugel- und scheibenförmige Teilchen (engl. spherical) werden durch ihren Radius oder Durchmesser beschrieben. Ein starrer Stab (engl. rigid rod) hingegen wird durch seine Länge charakterisiert.

⁴ Üblicherweise wird lediglich der Buchstabe „D“ verwendet, der Index „M“ dient der Unterscheidung vom Diffusionskoeffizienten D.

⁵ Im Folgenden soll beispielhaft von einer SEC-Analyse ausgegangen werden.

⁶ In dieser Arbeit wird durchgängig der in der Literatur verwendete Begriff des „Retentionsvolumens“ benutzt. Dieser kann mit dem ebenfalls in der Literatur verwendeten Begriff des „Elutionsvolumens“ gleichgesetzt werden.

Synthetische Polymere haben häufig eine Geometrie, die als statistisch geformtes Knäuel (engl. random coil) bezeichnet wird⁷. Bei einer genügend hohen Anzahl von Segmenten mit der Masse m_i sind diese Segmente im Falle des statistischen Knäuels beweglich und ohne Rotationsbehinderung miteinander verbunden. Ein solches Molekül nimmt deshalb nie eine einfache Geometrie an, sondern die experimentell beobachteten Abmessungen sind vielmehr Mittelwerte über sehr viele, fluktuierende Konformationen [WYATT 1998]. Eine für diese zeitliche Mittelung geeignete Partikeldimension ist der Trägheitsradius r_G (engl. radius of gyration). Zur Veranschaulichung dieses Begriffs stelle man sich eine Polymerkette in Segmente (Atome oder Atomgruppen) unterteilt vor, die die Masse m_i besitzen. Der Abstand eines Massepunktes m_i vom Massenschwerpunkt des Teilchens wird mit R_i bezeichnet.

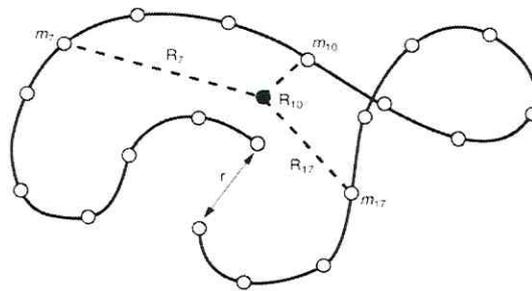


Abb. 2-2: Schematische Darstellung der Definition des Trägheitsradius einer statistisch (oder zufällig) geknäuelten Polymerkette aus 20 Masseelementen m_i . Mit R = Distanz der jeweiligen Masseelemente zum Schwerpunktzentrum (\bullet) und r = Ende-zu-Ende-Abstand der Kette. Aus [MORI 1999].

Der mittlere quadratische Trägheitsradius $\langle r_G^2 \rangle$ ist dann wie folgt definiert:

$$\text{Gl. 2-9} \quad \langle r_G^2 \rangle = \frac{\sum m_i \cdot R_i^2}{\sum m_i}$$

In polydispersen Systemen wird nicht nur über die Konformation eines einzelnen Moleküls, sondern zusätzlich über die unterschiedlichen mittleren (quadratischen) Trägheitsradien verschieden großer Moleküle gemittelt. Aus der obigen Gleichung folgt dann z. B. für den z-Mittelwert des mittleren Trägheitsradius einer Molekülgrößenverteilung:

$$\text{Gl. 2-10} \quad \sqrt{\langle r_G^2 \rangle_z} = \sqrt{\frac{\sum (c_i \cdot M_i \cdot \langle r_G^2 \rangle_i)}{\sum (c_i \cdot M_i)}}$$

⁷ Diese Geometrie wird auch für HAs postuliert [z. B. SWIFT 1999].

Dieser Wert kann aus statischen Lichtstreuungen erhalten werden. Daneben liefert die Methode der *statischen Lichtstreuung* (Static Light Scattering, SLS) die gewichtsgemittelte Molmasse M_w . Als absolute Methode benötigt sie keine Kalibrierung durch Standards. Ohne Vortrennung durch Größentrennmethode wie z. B. die SEC wird aus den SLS-Analysen nur ein über die gesamte Probe gemittelter M_w -Wert erhalten. Koppelt man die SLS mit einer Größentrennmethode, erhält man eine höhere Auflösung für die gewichtsgemittelte Molmasse M_w und somit nahezu die ‚wahre‘ Molmassenverteilung der Probe. Eine derartige Kopplung von SEC und SLS zur Analyse von NOM wurde bereits von WAGONER und CHRISTMAN verwendet [WAGONER 1997]. VON WANDRUSZKA verifiziert mittels der SEC/SLS-Analyse die Größenverteilung von durch präparative *Gelpermeationschromatographie* (Gel Permeation Chromatography, GPC) erhaltenen NOM-Fractionen [VON WANDRUSZKA 1999]. Eine Kombination von SLS mit einer F^+ -Vortrennung zur Analyse von hochmolekularen Polymeren wurde bereits erfolgreich durchgeführt [ROESSNER 1994, THIELKING 1995, WITTGREN 1997]. Problematisch für die Analyse von HA-Proben ist aber die geringe Empfindlichkeit der SLS-Methode für Moleküle mit einer Molmasse von < 1 kDa. Die geringe Streulichtintensität, die durch derart kleine Moleküle hervorgerufen wird, erfordert eine hohe Konzentration der (HA-)Probe⁸. Hohe Konzentrationen an HA können aber dazu führen, daß infolge verstärkter intermolekularer Wechselwirkungen die HA-Moleküle agglomerieren [GOSH 1980] und so eine höhere Molmasse vortäuschen. Einen derartigen Effekt führen WAGONER und CHRISTMAN als mögliche Erklärung für die vergleichsweise hohen Molmassen für die von ihnen untersuchten NOM-Proben an [WAGONER 1998, WAGONER 1999].

Bei der Kopplung eines SLS-Detektors mit der AF^+ -Methode führen hohe Konzentrationen sehr viel schneller als bei einer SEC-Säule zu einer Überladung des Trennsystems, so daß es infolge von Wechselwirkungen zwischen den Teilchen in einzelnen Strömungsschichten zu einer gestörten Trennung kommen kann.

Die Methode der *dynamischen Lichtstreuung* (Dynamic Light Scattering, DLS) mißt die Änderung der Streulichtintensität als Funktion der Zeit und man erhält daraus - nach Größenvortrennung - den Diffusionskoeffizienten einer Analytfraktion. Diese Methode benötigt - bei gleicher Molmasse - eine noch weitaus höhere Konzentration an Analytmolekülen als die SLS um zu aussagekräftigen Ergebnissen zu kommen. Die Ultrafiltration (UF) liefert Größenfraktionen der HA-Probe, die durch andere Charakterisierungsmethoden (wie z. B. 1H -NMR und IR-Spektroskopie) weiter untersucht werden können [z. B. BURBA 1995]. Als Ergebnis liefert die UF-Technik Fraktionen einer HA-Probe, deren (nomineller) Molmassenbereich durch den Bezug auf die angegebenen Cut-off-Werte der verwendeten UF-Membranen erhalten werden. Diese Grenzen wiederum werden mit Hilfe von (gelösten) Kalibrierstandards bestimmt und sind somit von den angewandten Lösungsparametern (IS, pH-Wert) und der Art der Standards abhängig. Die hohe Konzentration von HAS oberhalb der UF-Membran kann infolge einer möglichen Agglomeration der HA-Moleküle eine zu hohe Molmasse vortäuschen [TADANIER 2000]. Einen kritischen Vergleich zwischen der UF-Technik und der SEC zur Charakterisierung von DOM haben MÜLLER und FRIMMEL durchgeführt [MÜLLER 2002].

Aus der Anwendung der Ultrazentrifugation werden nur dann zuverlässige Aussagen über MW-Verteilungen erhalten, wenn hier vorfraktionierte Proben eingesetzt werden [SWIFT 1999]. Durch die Analyse einer HA-Probe mittels Ultrazentrifugation erhält man Diffusionskoeffizienten der Probenmoleküle. Diese Methode ist für kleine Moleküle nicht anwendbar.

⁸ In einer Applikationsnote der Firma Wyatt (1/1/1996) werden zur Analyse von engverteilten Polystyrol-Proben mit einer Molmasse von $M_w = 580$ Da; 1,4 kDa und 2,0 kDa Probenmengen von 7,1; 2,9 bzw. 2,2 mg beschrieben. Diese entsprechen bei einem injizierten Volumen von 200 μ l und 100 % Wiederfindung Konzentrationen der Probenlösungen von 35,5; 14,5 bzw. 11 $g \cdot l^{-1}$.

Mit der Viskosimetrie und der *Dampfdruckosmometrie* (Vapor Pressure Osmometry, VPO) können aus der Messung kolligativer Eigenschaften prinzipiell zuverlässige Werte für die zahlengemittelte Molmasse M_n einer Probe bestimmt werden. Sie gestatten jedoch keine Auflösung der Molmassenverteilung einer Probe.

Die Anwendung der Massenspektrometrie liefert absolute Werte für das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z-Verhältnis) von ionisierbaren Analyten. Zur Bestimmung der Molmasse muß somit die Ladung der Ionen bekannt sein. Im Fall von HA-Molekülen ist - im Gegensatz zu anderen Polyelektrolyten wie z. B. Proteinen - eine sichere Unterscheidung zwischen realer Molmasse und einer Mehrfachladung der Ionen aufgrund fehlender Regelmäßigkeiten im Molekülbau schwierig, wenn nicht gar unmöglich. Des weiteren wirkt sich die Art der eingesetzten Ionisierungstechnik stark auf die Form der Spektren und die scheinbaren Molmassenwerte für HAs aus [KLAUS 2000]. Die Anwendung der *matrixgestützten Laserdesorption/ionisierung* (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI) in Verbindung mit *Flugzeitmassenspektrometern* (Time-Of-Flight-MS, TOF-MS) führt zu einer schonenden Ionisierung der Analyten [REMMLER 1995]. Bei Anwendung der *Elektrospray-Ionisierung* (ElectroSpray Ionization, ESI) - bzw. der *Chemischen Ionisierung unter Atmosphärendruck* (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) werden je nach Polarität (positiver oder negativer Modus) verschiedene Spektren erhalten. Dies wird auf die Ionisierung unterschiedlicher funktioneller Gruppen der HA und auf die intermolekulare Bildung von Komplexen zurückgeführt. Die Polarität der Ionisierung beeinflusst die ESI- in stärkerem Maße als die APCI-Spektren. ESI-Spektren weisen im Vergleich zu APCI-Spektren im allgemeinen eine Molmassenverteilung mit höheren Werten auf. Dies ist auf die härtere Ionisierungsmethode im Fall der APCI zurückzuführen [KLAUS 2000].

Für eine Online-Kopplung mit nachfolgenden Analysemethoden können nur zerstörungsfreie Elutionstechniken zur Größentrennung von HA-Proben - wie z. B. SEC und AF⁴ - verwendet werden. Auf diese beiden, in dieser Arbeit angewandten Methoden soll daher im Folgenden näher eingegangen werden.

2.3.1 Größenausschlußchromatographie (GPC/SEC)

Der Begriff *Gelpermeationschromatographie* (Gel Permeation Chromatography, GPC) stammt aus einer Zeit, in der Gele als Säulenfüllmaterial zum ersten Mal eingesetzt worden sind, um Makromoleküle nach ihrem hydrodynamischen Radius bzw. der damit verknüpften Molmasse aufzutrennen. Die ersten Gelsäulen waren sehr druckempfindlich und ihre Porengrößenverteilung variierte stark infolge des unterschiedlichen Quellvermögens bei Verwendung verschiedener organischer Lösungsmittel als Eluent.

Heutzutage werden in der analytischen *Größenausschlußchromatographie* (Size Exclusion Chromatography, SEC) vor allem

- poröse Silikate mit einer modifizierten Oberfläche und
 - quervernetzte (Co-)Polymere
- als Säulenfüllmaterial eingesetzt.

Beide Materialien sind weitgehend druckunempfindlich und weisen ein sehr geringes Quellpotential auf. Der Trend hin zu kleinen Partikeln mit einer möglichst engen Partikelgrößenverteilung (wie in der HPLC auch) führte zur *Hochdruckgrößenausschlußchromatographie* (High Pressure SEC, HPSEC), die in der Literatur häufig nur mit dem Oberbegriff der SEC bezeichnet wird.

Die Trennschärfe bzw. *Zahl der theoretischen Trennböden* (Number of theoretical plates, N) einer SEC-Säule von ca. 30.000 m^{-1} ist im Vergleich zu GC- bzw. HPLC-Säulen (ca. 90.000 m^{-1}) geringer, da - durch den Trennmechanismus bedingt - die per Diffusion zurückgelegten Wegstrecken deutlich größer sind als bei den üblichen Dünnschichtsäulen der HPLC bzw. GC. Darüber hinaus ist - im Vergleich zur GC - die Viskosität der mobilen Phase um Größenordnungen höher. Die SEC ist nicht auf organische Lösemittel allein beschränkt. Durch Verwendung von hydrophilen Packungsmaterialien können auch wässrige Eluenten eingesetzt werden. Hierbei handelt es sich meist um salzhaltige wässrige Lösungen, die häufig auch Puffersubstanzen enthalten. Wichtig für die Anwendbarkeit dieser hydrophilen Packungsmaterialien ist, daß sie frei von hydrophoben Resten auf der für den Analyten zugänglichen Oberfläche sind, da es sonst zu unerwünschten, den Trennmechanismus beeinflussenden Wechselwirkungen mit den hydrophoben Anteilen des Analyten kommen kann. Das in dieser Arbeit verwendete Säulenfüllmaterial Hema Bio-Gel besteht aus einem hydrophilierten Grundgerüst aus Hydroxymethacrylat-Copolymer, welches durch Ethylenglykoldimethylacrylat vernetzt ist. Der SEC-Trennmechanismus kann z. B. durch das (konische) Porenmodell veranschaulicht werden:

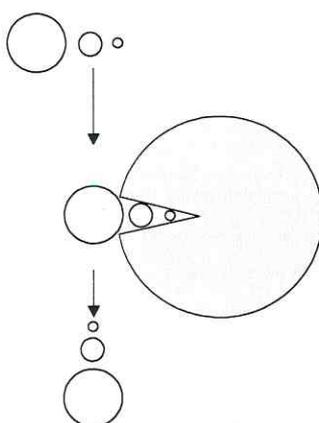


Abb. 2-3: Geometrisches Porenmodell einer konischen Porenöffnung [MORI 1999].

Vereinfacht dargestellt, besitzt das Säulenpackungsmaterial Poren, die eine konische Öffnung aufweisen. In diese konische Porenöffnung können die Moleküle je nach ihrem hydrodynamischen Radius (vereinfacht als Kreise unterschiedlicher Größe dargestellt) verschieden weit hinein diffundieren. Je kleiner der hydrodynamische Radius eines Moleküls ist, desto weiter vermag es in die Tiefe der Pore einzudringen, desto länger ist dadurch der durch Diffusion zurückzulegende Weg. Kleinere Moleküle halten sich somit länger in den Poren auf und eluieren daher nach größeren Molekülen, die weniger tief in den Porenraum einzudringen vermögen. Moleküle, deren hydrodynamischer Radius größer als der Radius der Porenöffnung ist, können nicht in die Pore diffundieren, unterliegen keiner Auftrennung und eluieren als erstes aus der Säule bei einem Retentionsvolumen, welches dem Zwischenkornvolumen V_0 des Packungsmaterials entspricht.

Addiert man zu dem Zwischenkorn⁹- das innere Porenvolumen V_{ip} , so erhält man das (totale) Permeationsvolumen V_t einer SEC-Säule:

⁹ Der Term V_0 entspricht bei Betrachtung einer SEC-Säule lediglich dem Zwischenkornvolumen des Packungsmaterials. Für die gesamte SEC-Apparatur hingegen stellt er das Totvolumen des Systems dar, also die Summe aus dem Zwischenkornvolumen und weiterer (häufig vernachlässigbarer) Kapillar- und Meßzellvolumina.

$$\text{Gl. 2-11} \quad V_t = V_0 + V_{ip}$$

Die Auftrennung entsprechend dem hydrodynamischen Radius der Moleküle erfolgt auf einer SEC-Säule - unter der Annahme eines reinen Größentrennmechanismus und eines sehr schnellen (diffusiven) Stoffaustauschs zwischen dem Zwischenkorn- und inneren Porenvolumen - zwischen V_0 und V_t [MORI 1999].

Das Verhalten eines Analyten auf einer SEC-Säule kann auch durch eine allgemeine chromatographische Gleichung beschrieben werden. Danach gilt für das Retentionsvolumen V_r eines Moleküls:

$$\text{Gl. 2-12} \quad V_r = V_0 + K_{SEC} \cdot V_{ip}$$

Der Term K_{SEC} stellt hier einen Verteilungskoeffizienten dar, der als das Verhältnis der mittleren Konzentration eines Analyten im gesamten Porenvolumen $\langle c_s \rangle$ zu der mittleren Konzentration des Analyten im Zwischenkornvolumen $\langle c_m \rangle$ definiert ist und kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen.

$$\text{Gl. 2-13} \quad K_{SEC} = \frac{\langle c_s \rangle}{\langle c_m \rangle}$$

Durch seine Einführung gelangt man zu einem anderen Erklärungsansatz für den SEC-Trennvorgang: Dem thermodynamischen SEC-Modell. Durch das Hinzunehmen eines enthalpischen Terms kann es die realen Vorgänge umfassender beschreiben. Allgemein läßt sich im thermodynamischen Gleichgewicht der Verteilungsprozeß zwischen dem Zwischenkorn- und dem Porenvolumen durch die folgende Gleichung beschreiben:

$$\text{Gl. 2-14} \quad K = \exp\left(-\frac{\Delta H^0}{R \cdot T}\right) \cdot \exp\left(\frac{\Delta S^0}{R}\right)$$

Der Verteilungskoeffizient K wird hier aus der Multiplikation zweier exponentieller Terme erhalten. Der erste enthält die Enthalpieänderung ΔH^0 , die universelle Gaskonstante R und die absolute Temperatur T , der zweite die Entropieänderung ΔS^0 und R .

Im Fall von Sorptionswechselwirkungen zwischen Analyt und stationärer Phase (entsprechend der HPLC) nimmt der Wert für ΔH^0 im allgemeinen negative Werte an. Unter idealen Größentrennbedingungen - also unter Ausschluß von sorptiven Wechselwirkungen - ist er 0 und die Gl. 2-14 geht in die Folgende über:

$$\text{Gl. 2-15} \quad K_{SEC} = \exp\left(\frac{\Delta S^0}{R}\right)$$

Daraus wird deutlich, daß bei idealer SEC die Temperatur keine Auswirkung auf die Trennleistung besitzt¹⁰. In Abb. 2-4 ist der Einfluß der Molekülgröße auf die Entropieänderung (ΔS) des Systems dargestellt. Kleine Moleküle mit geringer Molmasse können ungeschränkt in die Porenöffnung hineindiffundieren (A). Treibende Kraft ist dabei der anfängliche Gradient zwischen den Konzentrationen des Analyten im Zwischenkorn- und im Porenvolumen. Die kleinen Moleküle diffundieren in das gesamte Porenvolumen und eluieren bei V_1 . Größere Moleküle (B) erfahren in der Pore eine verminderte Bewegungsfreiheit. Der Wert der Entropieänderung nimmt dadurch einen von 0 verschiedenen, negativen Wert an. Die Moleküle eluieren zwischen V_0 und V_1 . Große Moleküle (C), die nicht in die Pore diffundieren können, erzeugen dadurch einen Zustand erhöhter Ordnung, einen Konzentrationsgradienten. Der Wert der Entropieänderung ist deutlich kleiner als 0. Sie verlassen die Trennsäule ohne Trennung bei V_0 .

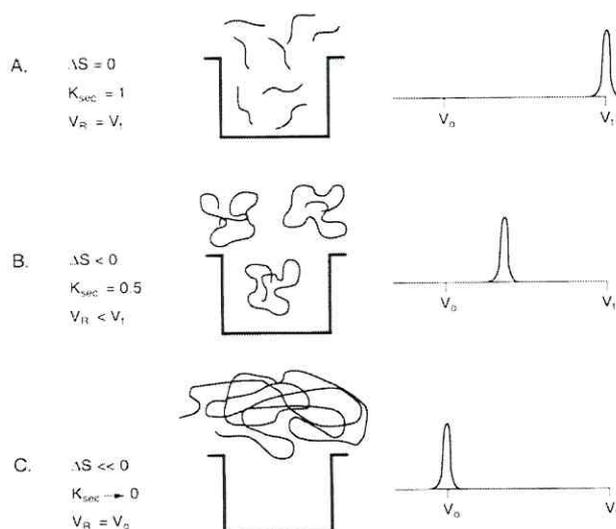


Abb. 2-4: Thermodynamisches Modell der SEC-Trennung. Elution von: A: vollständig permeierenden Molekülen, B: teilweise ausgeschlossenen Molekülen, C: vollständig ausgeschlossenen Molekülen. Aus [MORI 1999].

Da es sich bei der SEC nicht um eine absolute (wie etwa der SLS), sondern um eine relative Größenbestimmungsmethode handelt, muß die verwendete Säule bzw. die Kombination mehrerer Säulen zunächst mit geeigneten Standards kalibriert werden. Häufig werden hierzu Polymerstandards verwendet. Sie sollten eine schmale Molekülgrößenverteilung ($D_M \leq 1,2$) besitzen und ihre Molmasse sollte durch eine unabhängige physikalische Methode (SLS, Viskosimetrie, u.a.) bestimmt worden sein.

Die Kalibrierkurve wird aus der Auftragung des Logarithmus der Molmasse M_p gegen das Retentionsvolumen der Peakmaxima der einzelnen Standards erhalten. Eine sehr gute Beschreibung des Verlaufs der Kalibrierkurve erreicht man durch Anpassung einer kubischen Gleichung der Form:

¹⁰ Der Einsatz der Hochtemperatur-SEC dient lediglich dem Zweck, die Viskosität der mobilen Phase zu erhöhen bzw. polymere Analyten in Lösung zu halten.

$$\text{Gl. 2-16} \quad \log M = a \cdot V_r^3 + b \cdot V_r^2 + c \cdot V_r + d$$

mit V_r als Retentionsvolumen des Peakmaximums. Häufig ist bereits ein linearer Ansatz ausreichend, um den Verlauf hinreichend exakt zu beschreiben. So werden in dieser Arbeit die Kalibriergeraden in folgender Form angegeben:

$$\text{Gl. 2-17} \quad \log M = a \cdot V_r + b$$

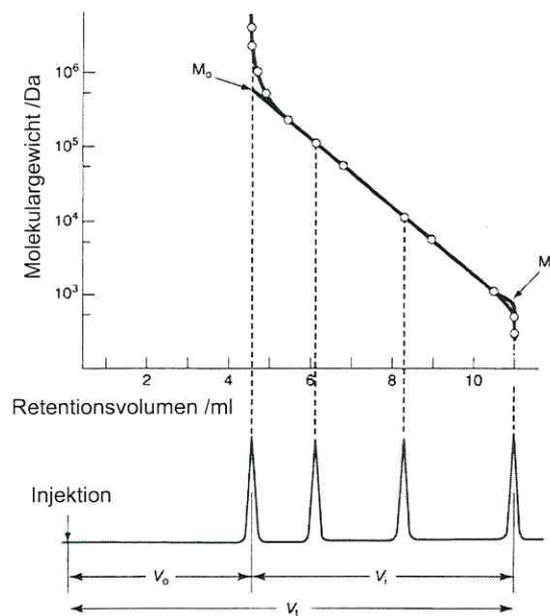


Abb. 2-5: Darstellung einer typischen SEC-Kalibriergeraden als logarithmische Auftragung des Molekulargewichts verschiedener Polymerstandards gegen ihr Retentionsvolumen. Das totale Permeationsvolumen V_i ist die Summe aus dem Totvolumen V_0 der SEC-Apparatur und dem Porenvolumen V_{ip} des Packungsmaterials. Modifizierte Abbildung aus [MORI 1999].

Die extrapolierte Molmasse bei dem Totvolumen V_0 wird mit M_0 bezeichnet und entspricht der Ausschlußgrenze der SEC-Säule. Analog wird mit M_1 die extrapolierte Molmasse definiert, welche formal der Permeationsgrenze der SEC-Säule bei dem totalen Permeationsvolumen V_i entspricht.

Wie bereits eingangs erwähnt ist das Trennkriterium einer SEC-Säule nicht die Molmasse, sondern der hydrodynamische Radius eines Analyten. Eine Übertragung des Retentionsvolumens eines (Polymer-)Standards mit gegebener Molmasse auf das Retentionsvolumen einer Probe (Kalibrierung) ist nur dann gerechtfertigt, wenn beide dieselbe Konformation besitzen. Während die Molmasse eines Polymermoleküls invariant ist, hängt der hydrodynamische Radius (häufig) von den Umgebungs-/Trennbedingungen wie z. B. dem pH-Wert und der

Ionenstärke (IS) des Eluenten ab. Die nachfolgende Abbildung verdeutlicht schematisch die Abhängigkeit des Verlaufs der Kalibriergeraden in Abhängigkeit von der Form eines Moleküls.

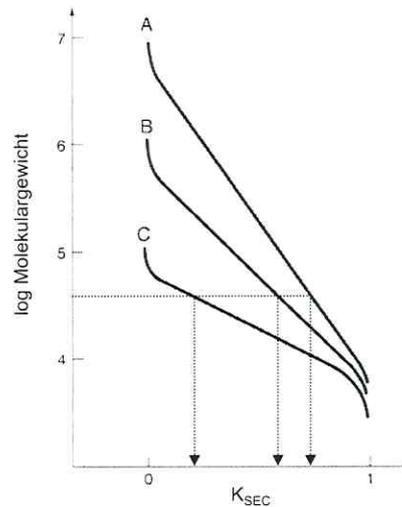


Abb. 2-6: Schematischer Verlauf der SEC-Kalibrierkurven von verschieden geformten Molekülen: A: kugelförmig (engl.: spherical), B: Zufallsknäuelung (engl.: random coil), C: stabförmig (engl.: rod-like). Modifizierte Abbildung aus [MORI 1999].

Bei gleicher Molmasse besitzt ein Molekül mit stabförmiger Konformation (C) einen größeren hydrodynamischen Radius ein als ein Molekül mit der Konformation einer Zufallsknäuelung (B) und eluiert daher früher. Derart geformte Moleküle eluieren - bei gleicher Molmasse - wiederum früher als kugelförmige Moleküle (A), die eine gegenüber der Zufallsknäuelung kompaktere Konformation besitzen.

Zur Kalibrierung von wässrigen SEC-Säulen für die HA-Analyse werden Polystyrolsulfonate (PSS) empfohlen [BERDEN 1990]. Diese Polyelektrolyten besitzen bei einer IS des Eluenten von 0,1 M eine vergleichbare Konformation wie HA. Die aus der Kalibrierung einer SEC-Apparatur mit PSS ermittelte Molmasse für Aldrich-HA stimmt gut mit den Ergebnissen anderer Methoden (wie F^3 , VPO, Ultrazentrifugation, Kleinwinkelröntgenstrahlbeugung) überein [CHIN 1991]. Gleichfalls fanden BECKETT et al. einen identischen linearen Zusammenhang aus der Auftragung des aus SF^4 -Analysen erhaltenen Logarithmus des Diffusionskoeffizienten ($\log D$) gegen den $\log M$ für PSS-Standards und verschiedene HAs, deren Molmassen zuvor durch unabhängige Methoden bestimmt worden waren [BECKETT 1987].

Die von den Herstellern zur Charakterisierung des Trennbereichs und der Ausschlußgrenze ihrer SEC-Säulen für wässrige Eluenten verwendeten Pullulane eignen sich hingegen nicht zur Kalibrierung von SEC-Säulen für die HA-Analytik. Diese durch Mikroorganismen aus Dextranbausteinen synthetisierten Polysaccharide zeichnen sich durch einen streng linearen Aufbau aus. Andere Substanzen wie z. B. globuläre Proteine führen generell zu einem höheren scheinbaren Wert der Molmasse von HA, wenn sie als Kalibrierstandards für HA-Proben verwendet werden [CHIN 1991].

Die funktionellen Gruppen der PSS und HAs liegen - in Abhängigkeit vom pH-Wert - teilweise unprotoniert vor und führen zu negativen Ladungen. Ebenso trägt die Oberfläche des SEC-Füllmaterials häufig eine negative

Ladung. Dadurch kommt es zwischen der stationären Phase und dem Analyten zu elektrostatischen Wechselwirkungen (Ionenausschlußeffekt), die den Mechanismus der Größenausschlußchromatographie überlagern. Auf diese Weise eluieren negativ geladene Moleküle infolge der Abstoßung früher, als es ihrem hydrodynamischen Radius entspricht. Durch die Verwendung eines Eluenten mit einer hohen IS können derartige Wechselwirkungen, die zu einem nicht-idealen Verhalten in der Größenausschlußmethode führen, weitgehend unterdrückt werden. Auf der anderen Seite kommt es – gerade bei der Verwendung eines Säulenfüllmaterials mit einem Polymergrundgerüst – bei Erhöhung der IS des Eluenten verstärkt zu Adsorptionseffekten zwischen dem Analyten und dem Säulenmaterial. Dadurch verursacht resultieren für einige Analyten Elutionsvolumina, die größer als das totale Permeationsvolumen sind. Besonders hydrophobe (anionische) Polymere wie PSS neigen zu derartigen Adsorptionseffekten. Zur Unterdrückung des Adsorptionseffektes werden dem salzhaltigen Eluenten deshalb bis zu 20 Vol% eines organischen Lösemittels (Acetonitril oder Methanol) zugesetzt [WU 1995]. PSS-Standards mit geringerem M_p sind - bei gleicher IS des Eluenten - stärker von diesem Effekt betroffen als hochmolekulare PSS-Standards [MORI 1989].

Neben der Kompensierung von Ionenausschlußeffekten bei einer SEC-Analyse kann eine hohe IS des Eluenten bei der Analyse auch zu einer Konformationsänderung des Analyten selbst führen, wie dies bereits in Kap. 2.2 beschrieben worden ist. Unter diesem Aspekt sollten bei einem Vergleich der Molmassen von HAs in der Literatur immer die IS und der pH-Wert des Eluenten (sowie der Probe) berücksichtigt werden. Dies erschwert einen Vergleich von Literatur-Ergebnissen, die bei unterschiedlichen Parametern gemessen wurden.

Weiterhin sollte - wenn möglich - die IS der Probe der des SEC-Eluenten angepaßt werden, um Artefakte bei der SEC-Analyse zu vermeiden. So fanden CHIN und GSCHWEND bei der Analyse einer Aldrich-HA-Lösung mit der IS von 0,6 M (NaCl) unter Verwendung eines Eluenten mit der IS von 0,03 M zwei deutlich getrennte Peaks; einen breiten Peak bei einem niedrigen Retentionsvolumen des Trennbereichs und einen schmalen Peak in der Nähe des totalen Permeationsvolumens [CHIN 1991]. Die erneute Injektion des im letzten Peak eluierenden Probenmaterials zeigt wiederum zwei Peaks, die in ihrer Breite und Lage den beiden vorstehend beschriebenen gleichen. Die Autoren schlußfolgerten daraus, daß es sich um die gleiche „Substanz“ und nicht um zwei unterschiedliche Fraktionen der Aldrich-HA-Probe handelt. Als Erklärung dieses Effektes wird der folgende Mechanismus betrachtet: Bei einem entsprechend großen Probenvolumen ändert sich die Salzkonzentration im Inneren dieses auf die Säule aufgegebenen Volumens kaum, so daß eine Art Salzfront durch die SEC-Säule wandert. Zu Beginn der SEC-Analyse wandert ein (großer) Teil der HA-Probe aufgrund seiner hohen Molmasse schneller als die niedermolekulare Salzfracht durch die Säule und unterliegt einer „normalen“ SEC-Trennung. Ein (kleinerer) Teil der HA-Probe wird jedoch hinter dem Salzpeak „gefangen“, der eine effektive Barriere bildet, die die höhermolekularen HA-Moleküle nicht passieren können. Dieser Teil der HA-Probe unterliegt somit keiner SEC-Trennung und eluiert bei einem Volumen, daß geringfügig größer als das totale Permeationsvolumen der Säule ist. Nach dem Auffangen und einer erneuten Injektion dieses vermeintlich niedermolekularen Probenanteils resultiert wiederum eine bimodale Peakverteilung mit einem zusätzlichen Peak im höhermolekularen Bereich des Chromatogramms [CHIN 1991]. Andererseits können Unterschiede in der IS von Probe und Eluent zur detaillierteren Analyse von NOM-Anteilen genutzt werden, wie SPECHT und FRIMMEL zeigen [SPECHT 2000]. Die Adsorption von verschiedenen Einzelsubstanzen wie Alkoholen, Monocarbonsäuren und Monoaromaten mit mehreren funktionellen Gruppen an die Säulenmatrix führte zu einem Retentionsvolumen, das größer als das totale Permeationsvolumen ist. Die untersuchten Alkohole und

Monocarbonsäuren zeigen ein unterschiedliches Verhalten für eine in der IS an den Eluenten nicht angepaßte bzw. eine angepaßte Probenlösung. In Verbindung mit der Vielzahl der verwendeten Detektoren (UV-, Leitfähigkeits- und DOC-Detektor) konnten so Rückschlüsse auf die nach dem totalen Permeationsvolumen eluierenden NOM-Anteile und deren funktionelle Gruppen gezogen werden [SPECHT 2000].

Gleichzeitig konnte gezeigt werden, daß sich die von CHIN gefundenen Doppelpeaks der HA-Probe durch eine Reduzierung des Probenvolumens eliminieren lassen, da aufgrund des geringeren Volumens eine stärkere Durchmischung des Probenvolumens mit dem Eluenten erfolgt [SPECHT 2000]. Dabei sollte man zwischen den Bezeichnungen „salt boundary effect“ und „salt-peak“ streng unterscheiden. Der erste Effekt resultiert aus den zuvor beschriebenen Wechselwirkungen von Probenlösung und Eluent mit unterschiedlicher IS in Anwesenheit einer (HA-)Probe [DE NOBILI 1999]. Ein „Salzpeak“ wird z. B. bei UV-Detektion auch dann erhalten, wenn die injizierte Lösung eine andere IS als der Eluent besitzt, ansonsten aber frei von weiteren Bestandteilen (wie z. B. HA) ist. Da der (positive bzw. negative) Peak wahrscheinlich durch die UV-aktiven Anionen des Elektrolyten verursacht wird, kann er unabhängig davon, ob die IS der Probe höher oder niedriger als die des Eluenten ist, aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen mit der stationären Phase immer vor dem totalen Permeationsvolumen der SEC-Säule beobachtet werden [PERMINOVA 1999].

Das Auftreten von Peaks oberhalb des totalen Permeationsvolumens war einer der Kritikpunkte, der von PERMINOVA an den experimentellen Ergebnissen von PICCOLO et al. und den daraus abgeleiteten Interpretationen angeführt wurde [PERMINOVA 1999]. PICCOLO et al. führten Experimente an HA-Proben unter Verwendung einer Niederdruck-SEC-Säule [PICCOLO 1996A, PICCOLO 1996B] und später auch mit einer höherauflösenden HPSEC-Säule durch [PICCOLO 1999]. Unter Verwendung eines 0,02 M bzw. 0,1 M Borat-Puffers (pH 9,2) erhielten sie für eine HA-Probe in Abhängigkeit vom pH-Wert der injizierten Probelösung unterschiedliche Chromatogramme. Mit zunehmendem Zusatz von organischen Säuren (und damit abnehmendem pH-Wert) zu der zunächst basischen HA-Ausgangslösung (pH 11,8) und nachfolgender SEC-Analyse wurde eine Verschiebung des Hauptpeaks vom Ausschlußvolumen zum totalen Permeationsvolumen beobachtet. Eine Reduzierung des pH-Wertes der Probelösung durch den Zusatz von Mineralsäuren bewirkte hingegen keine derartige Änderung der Retentionszeit des HA-Peaks. PICCOLO et al. führen dies auf eine HA-Struktur zurück, bei der HAS nicht aus einer Verteilung von unterschiedlich großen Polymereinheiten, sondern vielmehr aus sehr viel kleineren Einheiten bestehen. Diese lagern sich durch hydrophobe Wechselwirkungen zu größeren Agglomeraten zusammen [PICCOLO 1996A]. Damit entspricht dieses HA-Modell im Kernpunkt dem in der Einleitung dargestellten Mizellen-Modell von WERSHAW [1999].

An dem von PICCOLO et al. propagierten HA-Modell, das sie zunächst allein auf Basis ihrer experimentellen SEC-Ergebnisse entwickelt haben [PICCOLO 1996A, PICCOLO 1996B], wurde vielfach Kritik geäußert.

Einen - auch von PICCOLO et al. beschriebenen - Peak nahe dem totalen Permeationsvolumen führen andere Autoren auf einen Salzpeak zurück, der durch die hohe IS der Probelösung verursacht wird [PERMINOVA 1999, VARGA 2000].

Die bei Zugabe von organischen Säuren beobachtete Peakverschiebung (im Gegensatz zur Zugabe von Mineralsäuren) kann auch auf lokale pH-Effekte innerhalb der SEC-Säule zurückzuführen sein [PERMINOVA 1999, DE NOBILI 1999, VARGA 2000]. Das Auftreten eines Peaks beim Ausschlußvolumen der SEC-Säule könnte auch durch den von SCHMITT-KOPPLIN et al. beschriebenen Effekt erklärt werden, wonach bei

Anwendung von Borat-Puffern und basischen pH-Werten hochmolekulare Agglomerate von Borationen und HA-Anteilen gebildet werden [SCHMITT-KOPPLIN 1998].

Später haben PICCOLO et al. ihre SEC-Experimente methodisch variiert. Ebenso wie die Senkung des pH-Wertes der Probelösung führt auch der Zusatz von Methanol, HCl bzw. Essigsäure zu einer 0,05 M NaNO₃-Lösung (pH 7,01) als Eluent zu einer deutlichen Veränderung der Molmassenverteilung und einer Reduzierung der gewichtsgemittelten Molmasse M_w einer HA-Probe gegenüber dem unmodifizierten Eluenten [CONTE 1999]. Aufgrund der geringen zugesetzten Substanzmenge wird die IS des Eluenten kaum beeinflusst. Ebenso konnte durch den Zusatz der oben genannten Substanzen zum Eluenten keine Änderung des Elutionsverhaltens von Polysacchariden und Polystyrolsulfonaten - im Unterschied zu den HA-Proben - beobachtet werden [PICCOLO 2001]. Als Erklärung für ihre Ergebnisse führen CONTE und PICCOLO das Zerreißen von schwachen hydrophoben Bindungen an. Die HA solle sich somit mehr wie ein (aus kleineren Einheiten agglomeriertes) Supramolekül als ein ‚echtes‘ makromolekulares Polymer verhalten [CONTE 1999].

Eine Erhöhung der Molmassen für verschiedene HAs fanden PICCOLO et al. nach Durchführung einer durch Meerrettichperoxidase katalysierten Oxidationsreaktion und nachfolgender SEC-Analyse. Der Zusatz von Essigsäure vor einer SEC-Analyse führt bei dem Reaktionsprodukt nicht zu der für unbehandelte HAs beobachteten Veränderung des Retentionsvolumens. Dieser Befund wird auf eine - durch die enzymatische Reaktion hervorgerufene - Umwandlung der supramolekularen HA-Struktur (mit durch hydrophobe Wechselwirkungen nur lose gebundenen Bestandteilen) in eine Polymerstruktur mit kovalenten Bindungen zurückgeführt [PICCOLO 2000].

Wie oben gezeigt, wurde den von PICCOLO et al. gezogenen Schlußfolgerungen von anderen Forschergruppen teilweise heftig widersprochen. Einer der wichtigsten Kritikpunkte war dabei, daß lediglich SEC-Analysen zur Beweisführung herangezogen und die Resultate mit keiner anderen, unabhängigen Methode überprüft wurden [PERMINOVA 1999]. Eine solche unabhängige Methode wäre z. B. die AF⁴. Die Hypothesen von PICCOLO et al. und die sich darauf beziehende kritische Diskussion in der Fachliteratur gehen weit über den Rahmen einer rein experimentellen oder methodischen Fragestellung hinaus. Sie besitzen grundsätzliche Bedeutung für unser Bild über den Aufbau von Huminstoffen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher Vergleichsuntersuchungen unter Anwendung der SEC- wie auch der AF⁴-Technik auf jeweils identische HA-Probelösungen durchgeführt werden.

2.3.2 Einführung in die Asymmetrische Fluß-Feldflußfraktionierung (AF⁴)

Die *Asymmetrische Fluß-Feldflußfraktionierung* (AF⁴) gehört zur Familie der *Feldflußfraktionierungen* (F³). Ihnen allen gemeinsam ist, daß die Trennung von Analytgemischen durch ein Kraftfeld hervorgerufen wird, welches senkrecht zu einem axialen, parabolischen Strömungsprofil wirksam ist. Während das angelegte Kraftfeld dafür verantwortlich ist, daß verschiedene Analytfraktionen einen unterschiedlichen Abstand zur Anreicherungswand des Trennkanales einnehmen, werden diese verschiedenen Fraktionen aufgrund des parabolischen Strömungsprofils unterschiedlich schnell durch den Trennkanaal transportiert. Die Auswahl der optimalen Feldflußfraktionierungsmethode und damit die Art des verwendeten Kraftfeldes richtet sich nach den physikalisch-chemischen Eigenschaften des Analytgemisches.

Für die Größenanalyse von Kolloiden und Makromolekülen werden vor allem die Sedimentations- und die Fluß- F^3 -Subtechnik eingesetzt. Bei der Sedimentations- F^3 bewirken Unterschiede in der Teilchenmasse und -dichte eine Separierung der Fraktionen. Der variierbare Trennparameter ist dabei die Rotationsgeschwindigkeit des kreisförmig gebogenen Trennkanals. Für Teilchen mit einer Molmasse von $< 10^7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ reicht jedoch die Zentrifugalkraft nicht aus, um eine Trennung zu bewirken. Daher ist diese Methode auf hochmolekulare Substanzen und Kolloide beschränkt.

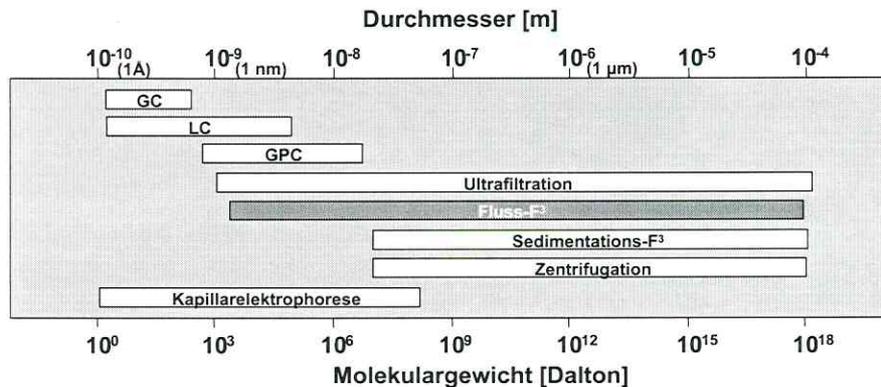


Abb. 2-7: Darstellung der unterschiedlichen Größentrennbereiche verschiedener Chromatographie- und Fraktionierungstechniken.

Die Fluß- F^3 besitzt mit einem Flüssigkeitsstrom quer zur axialen Flußrichtung des Kanalfusses ein Kraftfeld, welches Moleküle nach ihrem hydrodynamischen Radius trennt. Sie besitzt von allen F^3 -Techniken den weitesten Trennbereich. Dieser reicht von Makromolekülen über Bakterien bis hin zu Blutzellen. Die untere Grenze der analysierbaren Teilchengrößen wird dabei durch die Verfügbarkeit von Ultrafiltrationsmembranen (UF-Membranen) mit genügend kleinen Porendurchmessern gebildet. Analytmoleküle, die einen kleineren hydrodynamischen Radius als die (effektive) Porenweite der Membran besitzen, verlassen den Trennkanal durch die UF-Membran und können so am Detektorausgang des Trennkanals nicht detektiert werden. Die vom Hersteller der Membran angegebene Ausschlußgrenze (Cut-off der Membran) wird zumeist durch die Analyse von Proteinstandards ermittelt und kann nicht direkt auf HA übertragen werden. Hier findet man - in Abhängigkeit vom verwendeten Eluenten - häufig niedrigere Ausschlußgrenzen.

Im Folgenden soll auf die in dieser Arbeit verwendete und noch relativ junge Methode unter den F^3 -Techniken eingegangen werden: die *Asymmetrische Fluß-Feldflußfraktionierung* (AF^4). Sie stellt eine Weiterentwicklung der *Symmetrischen Fluß-Feldflußfraktionierung* (SF^4) dar. Darin begründen sich die Gemeinsamkeiten in den grundlegenden Trennmechanismen und die Anwendbarkeit der für die SF^4 entwickelten Gleichungen auch für die AF^4 , aber auch einige Unterschiede. Die AF^4 zeichnet sich zunächst gegenüber der SF^4 durch einen vereinfachten Aufbau aus:

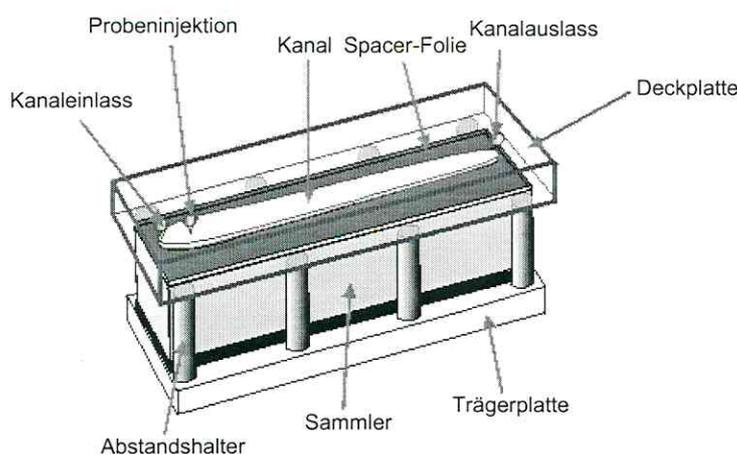


Abb. 2-8: Schematische Darstellung des AF⁴-Trennkanals von ConSensus (Quelle: <http://www.consensus.de>).

Die AF⁴-Apparatur besteht aus einer (Metall-)Fritte, auf die die UF-Membran aufgelegt wird. Damit diese Membran auch im Druckbereich einer AF⁴-Anlage von bis zu 30 bar formstabil bleibt, ist sie auf eine poröse Polymer-Matrix (z. B. aus Polypropylen) aufgebracht. Auf diese UF-Membran wird eine Spacer-Folie (z. B. aus Teflon) aufgelegt. Sie gibt die Kanalfläche und die Kanaldicke (w) vor. Da die UF-Membran kompressibel ist und je nach gewähltem Eluenten unterschiedlich stark quillt, entspricht die Kanaldicke nicht exakt der Stärke der verwendeten Spacer-Folie, sondern ist etwas geringer. Die Kanaldicke spielt aber bei der Ermittlung der physikalisch-chemischen Parameter eines Analyten eine entscheidende Rolle und muß daher experimentell möglichst genau bestimmt werden. Darauf soll an späterer Stelle genauer eingegangen werden.

Auf die Spacer-Folie wird ein Deckel aus Plexiglas (oder für organische Eluenten aus Glas) aufgelegt. Dieser Deckel dichtet den Kanal nach oben hin ab. In ihn sind drei Kapillaren eingeschraubt: Eine Einlaßkapillare für den Kanal- und Querfluß, eine Probenaufgabekapillare und eine Ausgangskapillare. Durch die Verwendung eines transparenten Deckels können bei Anwendung von gefärbten Probensubstanzen die Fließwege des Eluenten in Bezug auf Gleichförmigkeit der Strömungswege und Totvolumina gut kontrolliert werden. Der Querfluß (Crossflow, \dot{V}_x) wird unterhalb der Metallfritte im Sammler gesammelt und über eine Kapillare zu einer Meß- und Regeleinheit (LiquiFlow) geleitet. Diese mißt und regelt die Durchflußrate des Querflusses entsprechend den durch die Software vorgegebenen Werten.

Der zum Aufbau eines Kraftfeldes notwendige Querfluß wird bei der AF⁴ durch einen Teil des in den Kanal eingeleiteten Flusses (\dot{V}_{in}) erzeugt. Im Gegensatz zu einem SF⁴-System, bei dem Kanal- und Querfluß durch zwei unabhängige Pumpen erzeugt werden, bricht bei einem AF⁴-System bei Abschalten des Kanalflusses auch das Kraftfeld zusammen. Daher ist hier eine andere Probenaufgabemethode notwendig: Die Probe wird über ein Injektionsventil mittels einer zweiten Pumpe in den Kanal befördert. Um die Probe möglichst als schmale Startbande für eine nachfolgende Analyse im Trennkanal zu plazieren, wird bei der AF⁴ die sogenannte

„Injektion-Relaxation-Elution“-Methode angewendet. Das Prinzip wird durch die folgende Abbildung veranschaulicht:

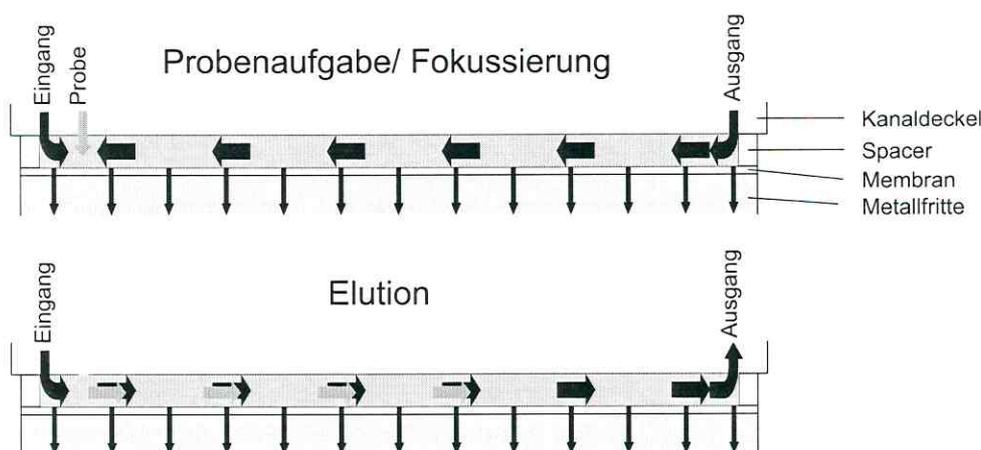


Abb. 2-9: Darstellung der beiden Schritte einer AF⁴-Trennung. Während der Probenaufnahme wird die Probe mittels einer Injektionspumpe in den separaten, vom Eluenteneinlaß kanalabwärts positionierten Probeneinlaß gepumpt. Der Fluß der Kanalpumpe tritt dabei sowohl am Eingang, als auch am Ausgang in den Kanal ein, die Flüsse treffen am Fokussierpunkt aufeinander und verlassen den Kanal durch die Membran am Boden. Durch Umlegen eines Mehrpositionsventils vor der Elution wird die Strömungsrichtung des Kanalflusses so geändert, daß der Flüssigkeitsstrom die Probe vom Eingang zum Ausgang transportiert und diese durch den Querfluß eine Auftrennung erfährt.

Während der Zeit der Probenaufnahme wird durch ein Mehrpositionsventil der Flußweg der Kanalpumpe so geschaltet, daß der Flüssigkeitsstrom sowohl am Kanaleingang als auch am -ausgang in den Kanal eintritt. Die Volumenströme werden dabei durch ein Nadelventil so eingestellt, daß die beiden Ströme ca. 5 mm kanalabwärts vom Probeneinlaß aufeinander treffen (Fokussierpunkt). In dieser Zeit kann der Eluent durch die Membran in den Kanalboden austreten. Aufgrund dieser Aufgabetechnik ist es bei der AF⁴-Methode möglich, gering konzentrierte Proben (z. B. natürliche Wässer) direkt im Trennkanal aufzukonzentrieren und anschließend zu analysieren. Weitere Vorteile des getrennten Probeneinlasses sind, daß Flußungleichmäßigkeiten im dreieckigen Kanal Anfang vermieden werden und sich dort keine Probe ansammelt [GIDDINGS 1986A, WILLIAMS 1986]. Nach Abschalten der Injektionspumpe kann der erzeugte „Injektionsfleck“ durch eine entsprechend gewählte (Nach-)Fokussierzeit weiter in seiner räumlichen Ausdehnung reduziert werden. Dies hat bei der anschließenden Analyse eine verringerte Peakbreite zur Folge.

Im Gegensatz zur SF⁴ befinden sich die Analytfraktionen während der Injektions- und Fokussierungsphase des AF⁴-Systems nicht in dem Abstand zur Anreicherungswand, den sie unter den Elutionsbedingungen einnehmen. Während die Probe beim Einspülen in den Kanal durch die gegeneinander gerichteten Flüssigkeitsströme an die Position des Fokussierpunktes befördert wird, werden alle Analytfraktionen durch das Kraftfeld in Richtung Anreicherungswand gezwungen und befinden sich so in einem geringeren Abstand zu dieser, als es dem Gleichgewicht zwischen Kraftfeld und entgegengerichteter Diffusion in der Elutionsphase entspricht.

Nach Umschalten des Mehrpositionsventils auf Elution stellt sich aber innerhalb sehr kurzer Zeit das Gleichgewicht zwischen dem - durch den Querfluß erzeugten - Kraftfeld in Richtung auf die Anreicherungswand und der - durch den entstehenden Konzentrationsgradienten bedingten - Diffusion in entgegengesetzter Richtung ein [GIDDINGS 1986B]. Moleküle bzw. Teilchen mit kleinem hydrodynamischen Durchmesser besitzen einen höheren Diffusionskoeffizienten als große Moleküle und diffundieren daher weiter von der Anreicherungswand weg in Richtung auf die Kanalmitte. LITZÉN et al. konnten zeigen, daß die Effektivität der Trennung nicht abnimmt, wenn die Querflußrate während der Injektions-/Fokussierphase von der der Elutionsphase abweicht [LITZÉN 1991]. Eine niedrige Flußrate während der Injektions-/Fokussierphase, sowie der leicht vom Probeneinlaß kanalabwärts gelegene Fokussierpunkt vermindern die Gefahr der Adsorption von Probenbestandteilen an die Anreicherungswand während dieser Zeit.

Die AF¹-Methode weist zwar eine geringere theoretische Trennstufenzahl (N ca. 1500) [TANK 1995] als die SEC-Methode auf (N ca. 9000 bei einer 30 cm langen SEC-Säule), dennoch besitzt sie gegenüber der SEC einige wesentliche Vorteile:

- Durch das variable Kraftfeld kann die Methode verschiedenen Proben mit unterschiedlichen Größenverteilungen sehr schnell angepaßt werden.
- Unter Verwendung der Gradientenelution können innerhalb kurzer Analysenläufe Proben untersucht werden, die neben Probenanteilen mit kleinen hydrodynamischen Radien auch Fraktionen mit sehr großen Radien enthalten.
- Die geringeren Scherkräfte innerhalb des offenen Kanals führen nicht zu dem aus der SEC bekannten Auseinanderreißen von empfindlichen Analytmolekülen.
- Bei Kenntnis der Kanaldicke w können die Diffusionskoeffizienten der Analyten ohne vorherige Kalibrierung direkt erhalten werden.
- Aufgrund der deutlich geringeren Membranoberfläche (ca. 36 cm²) gegenüber der Oberfläche des porösen Säulenfüllmaterials einer SEC-Säule sollten Adsorptionseffekte in viel geringerem Maße auftreten.

2.3.3 Darstellung der Gleichungen zur Beschreibung der Fluß-F³

Während der Elutionsphase der Fluß-F³ wirkt auf die Analytmoleküle eine durch das angelegte Feld verursachte Kraft F , die sie mit der Geschwindigkeit U_x in (transversaler) x -Richtung auf die Anreicherungswand bei $x = 0$ zu bewegt. Dadurch reichern sich die Moleküle in der Nähe der Anreicherungswand an.

Die erhöhte Konzentration in diesem Bereich erzeugt eine diffusive, dem Kraftfeld entgegengerichtete Bewegung der Moleküle. Der Nettofluß der Molekülgesamtheit in x -Richtung (J_x) ist durch das 1. Fick'sche Gesetz gegeben:

$$\text{Gl. 2-18} \quad J_x = U_x \cdot c(x) - D \cdot \left(\frac{dc(x)}{dx} \right)$$

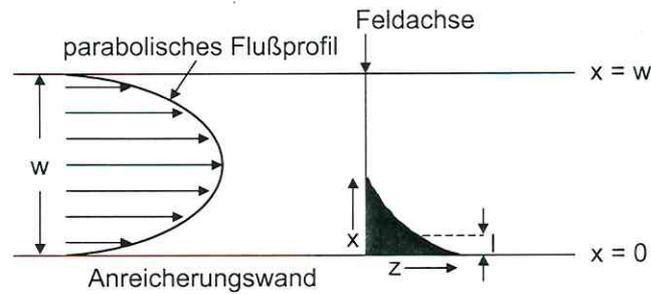


Abb. 2-10: Schematische Darstellung des exponentiellen Konzentrations- und des parabolischen Flußprofils im AF^4 -Trennkanal.

Da das Kraftfeld im Fall der AF^4 durch einen Teil des Kanaleingangsflusses erzeugt wird, ist das parabolische Strömungsprofil zur Anreicherungswand hin verschoben. Darüber hinaus ist die Querflußgeschwindigkeit in x -Richtung (U_x) im Fall eines AF^4 -Kanals nicht konstant, sondern eine Funktion des Abstandes zur Anreicherungswand ($U_x = f(x)$):

$$\text{Gl. 2-19} \quad U_x = U_0 \cdot \left(1 - \frac{3x^2}{w^2} + \frac{2x^3}{w^3} \right)$$

Dabei stellt U_0 die Geschwindigkeit in x -Richtung über der Anreicherungswand und w die Kanaldicke dar. Der Term in Klammern ist charakteristisch für einen AF^4 -Kanal. Er kann jedoch für $x/w < 0,1$ in guter Näherung unberücksichtigt bleiben, so daß gilt: $U_x = U_0 = \text{konstant}$ [WAHLUND 1987].

Im Zustand des dynamischen Gleichgewichts, also wenn der Nettofluß $J_x = 0$ ist, gilt somit:

$$\text{Gl. 2-20} \quad U_x \cdot c(x) = D \cdot \frac{dc(x)}{dx}$$

Die Integration der vorstehenden Gleichung führt zu:

$$\text{Gl. 2-21} \quad c(x) = c_0 \cdot \exp\left(\frac{x \cdot U_x}{D}\right)$$

Die Konzentration einer Analytfraktion in x -Richtung ($c(x)$) nimmt also exponentiell mit zunehmendem x ab. Die Konzentration c_0 entspricht der Konzentration an der Anreicherungswand bei $x = 0$. Wenn x als positiver Wert definiert wird, dann besitzt U_x immer einen negativen Wert und die vorstehende Gleichung kann wie folgt geschrieben werden:

$$\text{Gl. 2-22} \quad c(x) = c_0 \cdot \exp\left(-\frac{x \cdot |U_x|}{D}\right)$$

Der mittlere massegewichtete Abstand einer Analytzone soll mit l bezeichnet werden, d. h., die Hälfte der Gesamtanalytmasse liegt zwischen $x = 0$ und $x = l$ bzw. der andere Teil zwischen $x = l$ und $x = w$. Der exakte Ausdruck für l

$$\text{Gl. 2-23} \quad l = \frac{\int_0^w x \cdot c(x) \cdot dx}{\int_0^w c(x) \cdot dx}$$

kann unter Randbedingungen¹¹ durch einen einfacheren Ausdruck ersetzt werden. Das Verhältnis der thermischen Energie ($k \cdot T$) zur Kraft F , die auf ein Ensemble gleicher Moleküle wirkt, wird ebenfalls durch l beschrieben:

$$\text{Gl. 2-24} \quad l = \frac{k \cdot T}{F}$$

Zwischen der Kraft F und der Geschwindigkeit $|U_x|$ besteht folgender Zusammenhang:

$$\text{Gl. 2-25} \quad |U_x| = \frac{F}{f}$$

Hierbei ist f der Reibungskoeffizient des Analyten und wird durch die Nernst-Einstein-Gleichung definiert:

$$\text{Gl. 2-26} \quad f = \frac{k \cdot T}{D}$$

Für l ergibt sich daraus der Zusammenhang:

$$\text{Gl. 2-27} \quad l = \frac{k \cdot T}{F} = \frac{D}{|U_x|}$$

Eingesetzt in Gl. 2-22 ergibt sich:

$$\text{Gl. 2-28} \quad c(x) = c_0 \cdot \exp\left(-\frac{x}{l}\right)$$

¹¹ Randbedingungen:

1) Das Feld ist in x -Richtung konstant und das Konzentrationsprofil besitzt die durch Gl. 2-28 gegebene exponentielle Form.
2) l geht gegen 0 ($l \rightarrow 0$).

Der daraus resultierende Konzentrationsverlauf ist für zwei Analytfractionen mit l_1 und l_2 in Abb. 2-11 dargestellt.

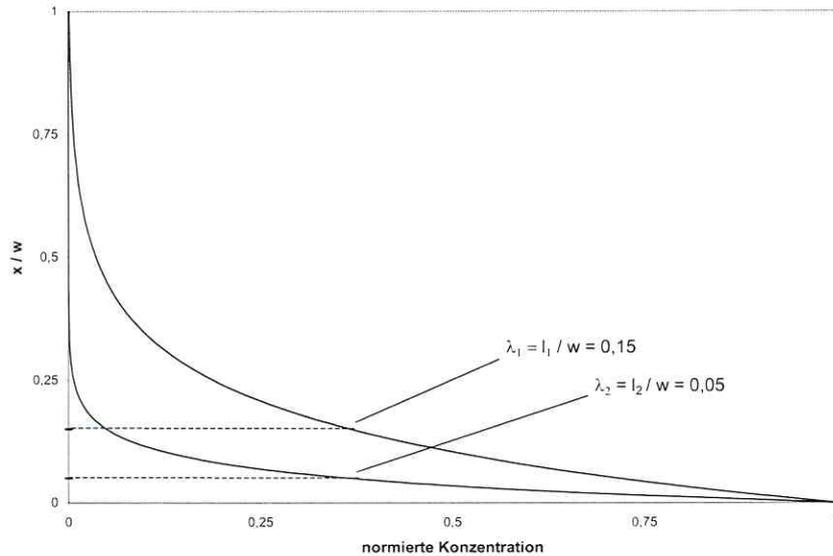


Abb. 2-11: Darstellung der exponentiellen Konzentrationsverläufe zweier Analytfractionen mit $\lambda_1 = 0,05$ und $\lambda_2 = 0,15$ in Abhängigkeit vom normierten Abstand (x/w) von der Anreicherungswand. Die gestrichelte Linie gibt jeweils den Masseschwerpunkt der Analytzone mit dem Abstand λ_i von der Anreicherungswand an.

Der Abstand l wird üblicherweise als dimensionslose Größe

$$\text{Gl. 2-29} \quad \lambda = \frac{l}{w}$$

angegeben und λ als Retentionsparameter bezeichnet. Dieser besitzt in der F^3 -Theorie eine zentrale Bedeutung. λ ist immer positiv und ein Indikator für den Grad der Zonenkompression, verknüpft darüber hinaus aber auch das Konzentrationsprofil mit fundamentalen physikalisch-chemischen Parametern des Analyten. Aus Gl. 2-27 und Gl. 2-29 folgt:

$$\text{Gl. 2-30} \quad \lambda = \frac{k \cdot T}{F \cdot w} = \frac{D}{|U_x| \cdot w}$$

D. h., je größer die Kraft F ist, die auf das Teilchen wirkt (Querfluß), desto schmaler wird die Analytzone über der Anreicherungswand.

Der Parameter λ stellt somit die Brücke zwischen der Theorie und dem Experiment dar [SCHURE 2000].

Die Fließgeschwindigkeit $|U_x|$ errechnet sich im Falle eines Fluß- F^3 -Systems nach:

$$\text{Gl. 2-31} \quad |U_x| = \frac{\dot{V}_x}{A} = \frac{\dot{V}_x \cdot w}{V^0}$$

Hierin ist \dot{V}_x die Querflußrate in ($\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$), A die Oberfläche der Anreicherungswand in (cm^2) und V^0 das geometrischen Volumen des Kanals in (cm^3) mit $V^0 = A \cdot w$.

Daraus ergibt sich für λ ¹²:

$$\text{Gl. 2-32} \quad \lambda = \frac{V^0 \cdot D}{\dot{V}_x \cdot w^2}$$

Der Zusammenhang zwischen λ und dem hydrodynamischen Durchmesser (d_{hyd}) eines Analytmoleküls ist durch das Gesetz von Stokes für den Reibungskoeffizienten ($f = 3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d_{\text{hyd}}$) gegeben:

$$\text{Gl. 2-33} \quad \lambda = \frac{k \cdot T \cdot V^0}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot \dot{V}_x \cdot w^2 \cdot d_{\text{hyd}}}$$

Bislang wurde eine Aufteilung einer polydispersen Probe im Fluß-F³-Kanal in verschiedene Analytzone mit einem jeweiligen Abstand l_i von der Anreicherungsmembran lediglich als Folge unterschiedlicher Diffusionskoeffizienten (D_i) bzw. hydrodynamischer Durchmesser ($d_{\text{hyd},i}$) betrachtet.

Bei Elution der verschiedenen Analytzone aus dem AF⁴-Kanal mit gleicher Fließgeschwindigkeit in axialer, d. h. in z-Richtung würde so keine Auftrennung in die verschiedenen Größenfraktionen erhalten werden. Da der axiale Fluß aber bei allen F³-Systemen ein parabolisches Strömungsprofil besitzt, werden die Analytfraktionen - je nach ihrem mittleren Abstand l_i von der Anreicherungswand - unterschiedlich schnell entlang der z-Richtung durch den Trennkana transportiert.

Da die Breite des Kanals (b) deutlich größer ist als seine Höhe w kann folgendes Modell für den AF⁴-Kanal verwendet werden: Dieser besteht aus zwei unendlich langen parallelen Platten. Die einzelnen „Schichten“ des Eluenten bewegen sich zwischen diesen Platten mit dem Abstand w in Abhängigkeit von x mit unterschiedlicher Geschwindigkeit $v(x)$. Eine ausführliche Herleitung der Gleichungen wurde z. B. von SCHURE [2000] dargestellt. Hier soll nur die daraus resultierende Gleichung dargestellt werden, die zum Verständnis der Trennung der Analytfraktionen notwendig ist:

$$\text{Gl. 2-34} \quad v(x) = 6 \langle v \rangle \left[\frac{x}{w} - \left(\frac{x}{w} \right)^2 \right]$$

Darin ist $\langle v \rangle$ die mittlere Geschwindigkeit aller Schichten, also die makroskopische Geschwindigkeit des Eluenten. Die mittlere Geschwindigkeit beträgt dabei 2/3 der maximalen Geschwindigkeit v_{max} (bei $x = w/2$).

¹² Dieser Term für λ ist spezifisch für die Fluß-F³. Im Fall der Sedimentations-, elektrischen oder thermischen F³-Subtechnik enthält der Ausdruck für λ andere, für diese Methoden spezifische physikalisch-chemische Parameter.

Entscheidend für die Trennung in einem AF¹-Kanal ist nun die Verknüpfung der Analytkonzentration entlang x ($c(x)$) mit der Geschwindigkeit der einzelnen Analytfraktionen in der Höhe x ($v(x)$). Die mittlere Geschwindigkeit einer Analytzone (v_{Zone}) ist definiert durch das gemittelte Produkt der Analytkonzentration und der Geschwindigkeit entlang x dividiert durch die mittlere Konzentration in x -Richtung:

$$\text{Gl. 2-35} \quad v_{Zone} = \frac{\langle c(x) \cdot v(x) \rangle}{\langle c(x) \rangle}$$

Führt man ein Retentionsverhältnis¹³ R^F ein, so erhält man seinen Wert aus:

$$\text{Gl. 2-36} \quad R^F = \frac{v_{Zone}}{\langle v \rangle}$$

Die Größe $\langle v \rangle$ wurde bereits als die mittlere Geschwindigkeit aller Schichten (makroskopische Geschwindigkeit des Eluenten) definiert und ergibt sich aus dem Kehrwert der Elutionszeit eines nicht retardierten Analyten (t_0). Analog kann v_{Zone} aus dem Kehrwert der Elutionszeit eines (infolge des einwirkenden Kraftfeldes) retardierten Analyten (t_r) erhalten werden.

$$\text{Gl. 2-37} \quad R^F = \frac{t_0}{t_r}$$

Die Verknüpfung der Gl. 2-28 und Gl. 2-29 führt zu:

$$\text{Gl. 2-38} \quad c(x) = c_0 \cdot \exp\left(-\frac{x}{\lambda \cdot w}\right)$$

Durch Integration der Konzentrationsverteilung gemäß Gl. 2-38 und anschließende Multiplikation mit dem Geschwindigkeitsprofil nach Gl. 2-34 erhält man eine exakte analytische Lösung für R^F :

$$\text{Gl. 2-39} \quad R^F = 6\lambda \left[\coth\left(\frac{1}{2\lambda}\right) - 2\lambda \right]$$

Dazu sind in der Literatur einige vereinfachte Gleichungen beschrieben, die eine Auflösung der Gleichung nach λ erleichtern. Die einfachste Form wird erhalten, wenn man sich alle Moleküle einer Analytfraktion nicht exponentiell verteilt, sondern in einer sehr schmalen Schicht über der Anreicherungswand vorstellt; also für $\lambda \rightarrow 0$:

$$\text{Gl. 2-40} \quad R^F = 6\lambda$$

¹³ Das Retentionsverhältnis R wird hier mit R^F bezeichnet, um es von weiteren Parametern, die in dieser Arbeit mit R bezeichnet werden, zu unterscheiden.

Diese Gleichung weicht für $R^F < 0,06$ um weniger als 2 % und für $R^F < 0,15$ um weniger als 5 % von der exakten Lösung ab.

Eine, gerade für gering retardierte Analyte wie Huminsäuren, wichtige Vereinfachung stellt die Gleichung nach [GIDDINGS 1977] dar:

$$\text{Gl. 2-41} \quad \frac{1}{R^F} = \frac{1}{6\lambda} + \frac{1}{3}$$

Diese Gleichung weicht für $R^F < 0,2$ um weniger als 4 % von der exakten Lösung ab. Daneben gibt es noch weitere in der Literatur beschriebene Annäherungen an Gl. 2-40, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll [z. B. SCHURE 2000].

Der Wert für R^F kann aus den experimentellen Daten gewonnen werden. Daraus läßt sich nach obigen Gleichungen der Wert für λ berechnen. Entsprechend Gl. 2-32 bzw. Gl. 2-33 können daraus die physikalisch-chemischen Parameter D bzw. d_{hyd} für jede Analytfraktion berechnet werden, wenn die AF^d -Parameter w , V^0 und \dot{V}_x sowie t_0 bekannt sind.

2.4 Entwicklung und Einsatz eines Online-DOC-Detektors

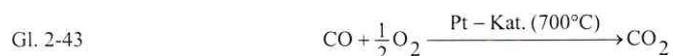
Eine der Voraussetzungen für die Bestimmung eines Sorptionskoeffizienten von HOS an gelösten HSs (K_{DOC}) besteht darin, daß die Konzentration des DOC ermittelt werden kann. Im Fall von Offline-Meßmethoden erfolgt dies durch die Analyse mittels eines DOC-Detektors oder im einfachsten Fall durch Bestimmung des DOC-Gehalts aus der Einwaage und dem Kohlenstoffgehalt der HA. Bei einer Online-Analyse könnte die DOC-Konzentration im Eluentenstrom mittels eines Online-DOC-Detektors bestimmt werden. Derartige Detektoren existierten aber zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit nur in wenigen Arbeitsgruppen durch Eigenbau bzw. durch Modifizierung von kommerziellen Offline-TOC-Detektoren¹⁴. Daher wird die DOC-Konzentration in der chromatographischen HA-Analytik zumeist mit Hilfe anderer Detektortypen, vor allem UV-Detektoren, bestimmt. Diese liefern ein vom Extinktionskoeffizienten und der Konzentration des Analyten abhängiges Signal, wobei man üblicherweise davon ausgeht, daß der massenspezifische Extinktionskoeffizient über den gesamten Substanzpeak konstant ist¹⁵. Diese Annahme ist dann gerechtfertigt, wenn in diesem Peak nur einheitliche Moleküle oder verschieden große Moleküle eines Polymers mit einer einheitlichen Zusammensetzung aus (definierten) Monomereinheiten eluieren. Für den Fall eines heterogenen „Polymers“ wie HA ist diese Annahme a priori nicht unbedingt gültig. In der Literatur werden dazu unterschiedliche Ergebnisse aufgeführt, auf die im Diskussionsteil näher eingegangen werden soll.

¹⁴ Alle zu diesem Zeitpunkt als Online-DOC-Detektoren beworbenen Geräte stellten lediglich automatisierte Offline-DOC-Detektoren dar, die eine Reihe von Batch-Analysen durch Verwendung eines Autosamplers nacheinander durchführen können. Die dadurch erzielbare Analysenfrequenz ist aber für eine chromatographische Online-Kopplung nicht ausreichend.

¹⁵ Auch bei einer definierten Änderung des Extinktionskoeffizienten als Funktion der Elutionszeit wäre eine Bestimmung der DOC-Konzentration aus dem UV-Signal möglich, jedoch deutlich komplizierter.

Zunächst soll an dieser Stelle auf die chemischen und technischen Grundlagen verschiedener Online-DOC-Bestimmungsmethoden und im besonderen auf die hier angewandte Methode eingegangen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Kooperation mit dem Institut für Nicht-klassische Chemie (INC) an der Universität Leipzig ein Durchfluß-Detektor zur Bestimmung der DOC-Konzentrationen wäßriger Proben entwickelt. Er basiert auf dem Prinzip der thermischen Oxidation des DOC durch Hochtemperaturverbrennung im Sauerstoffstrom. Dabei kann die DOC-haltige Probe wahlweise diskontinuierlich mittels einer HPLC-Spritze über einen septum-gedichteten Injektionskopf aufgegeben (Batchbetrieb) oder kontinuierlich bzw. diskontinuierlich durch einen Eluentenstrom aus einer HPLC-Pumpe über ein Injektionsventil mit Probenschleife in den Detektor befördert werden (Online-Modus). Dieser Anschlußport kann auch für die Kopplung mit einem chromatographischen System verwendet werden. Die Probe wird nach ihrer Aufgabe in einem zweistufigen Prozeß vollständig zu CO₂ umgesetzt. Zunächst findet im oberen Teil eines durch einen 2-Zonenofen beheizten Reaktors eine Verbrennung des gelösten Kohlenstoffs bei typischerweise 780 °C statt. Anschließend wird der Gasstrom über einen Pt-Katalysator geleitet, wo bei 700 °C unvollständig oxidiertes Kohlenstoff (CO) vollständig zu CO₂ umgesetzt wird¹⁶.



Der beim Verdampfen der Probe und durch die Oxidationsreaktion entstandene Wasserdampf wird in einem zweistufigen Trocknungsprozeß dem CO₂-haltigen Meßgasstrom entzogen. Zunächst wird ein Großteil des Wassers mittels eines Intensivkühlers auskondensiert. Der so vorgetrocknete Gasstrom wird anschließend in einem Membrantrockner vollständig von Wasser befreit. Die CO₂-Konzentration im trockenen Gasstrom wird nachfolgend mit der Methode der *nicht-dispersiven Infrarotspektroskopie* (NDIR) bestimmt.

Vom INC wurden bereits Vorarbeiten zur Optimierung der Reaktordimensionen (Länge, Breite, Durchmesser) und des Reaktormaterials (Quarzglas bzw. Edelstahl) durchgeführt. Darüber hinaus wurden unterschiedliche Methoden untersucht, den kontinuierlichen Flüssigkeits- und den O₂-Strom zusammenzuführen. Dabei erwies sich die Aufgabe des Flüssigkeitsstroms über eine dünne Quarzglaskapillare und die räumlich davon getrennte Zuführung des O₂-Gasstroms als die am besten geeignete Variante. Eine andere Variante, das Kapillare-in-Kapillare-Prinzip, führte zu Problemen bei der praktischen Anwendung: In dem Fall, wo der O₂-Strom mantelartig um den Flüssigkeitsstrahl, der aus der inneren Kapillare austrat, eingeleitet wurde, führte die Verwendung von salzhaltigen Eluenten schnell zu einer Verstopfung des Kapillarausgangs der inneren Kapillare infolge von Verkrustung. Bei der Zuführung des Flüssigkeitsstrahls durch die äußere Kapillare bewirkte der aus der inneren Kapillare austretende Sauerstoffstrom ein Verspritzen der Flüssigkeit. Dadurch wurden große Teile der Probe an die außerhalb des Ofens liegende, kühlere Reaktorwand geschleudert.

Nach diesen grundlegenden Optimierungsschritten sollen im Folgenden die Verwendbarkeit des entwickelten DOC-Detektors demonstriert und seine Eigenschaften umfassend charakterisiert werden.

¹⁶ Nachfolgend soll die im Heizofen gemessene Temperatur (Sollwert) als Ofentemperatur bezeichnet werden. Die reale Temperatur in der Verbrennungszone ist i.d.R. niedriger (Istwert) und soll vereinfachend als Verbrennungstemperatur bezeichnet werden. Die Angabe der Temperatur in der katalytischen Nachverbrennungszone bezieht sich immer auf den Sollwert.

Zunächst soll aber hier noch auf die Methoden weiterer, in der Literatur beschriebener Online-DOC-Detektoren eingegangen werden. Der wahrscheinlich erste Online-DOC-Detektor ist seit jüngerer Zeit auch kommerziell erhältlich. Ein vom DOC-Labor Dr. Huber vertriebenes Modell verwendet einen Dünnschichtreaktor nach Gräntzel als Kernstück der angebotenen SEC-UV/DOC-Komplettlösung [HUBER 2001]. Hierbei erfolgt die Oxidation des DOC durch Sauerstoffspezies, die im Reaktor selbst durch photolytische Zersetzung von Wasser bei einer Wellenlänge von 185 nm (UV-Lampe) erzeugt wird. Der Flüssigkeitsstrom wird dazu durch Lamellen außen an einem sich drehenden Quarzglasrohr (die UV-Lampe befindet sich innerhalb des Quarzglasrohres) als dünner Film ausgestrichen und durch die Anordnung und Orientierung der Lamellen entlang der Längsachse des Quarzglasrohres durch den Detektor geführt. Es wird kein zusätzlicher Sauerstoff zugeführt. Die ablaufenden Reaktionen lassen sich vereinfacht wie folgt formulieren:



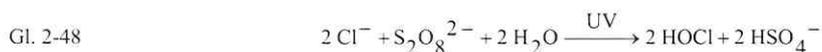
Nach der Umsetzung des DOC zu CO_2 erfolgt dessen Messung nach Strippung mit einem CO_2 -freien Gasstrom ebenfalls mittels der NDIR-Methode. Nach Vertreiberangaben ist die Oxidationsstärke dieses Verfahrens mit der einer thermischen Oxidation vergleichbar, ohne mit deren Nachteilen, wie Temperatur- und Druckschwankungen, behaftet zu sein. Anorganische Kohlenstoffverbindungen (vor allem Carbonate) werden bei diesem Detektor vorher durch Ansäuern des Flüssigkeitsstroms mit einer H_3PO_4 -Lösung ($\text{pH} = 2$) und Strippen mit N_2 entfernt [HUBER 2001].

Ein weiterer Online-DOC-Detektor ist bei ULLMANN [2000] und HER [2002] beschrieben. Er basiert auf der Modifizierung eines kommerziell erhältlichen Offline-TOC-Detektors (Sievers TOC 800-Analysator, Ionics-Sievers Instruments). Bei diesem System erfolgt die Oxidation des DOC ebenfalls in wässriger Lösung. Neben der photolytischen Zersetzung von Wasser (wie bereits oben beschrieben) wird bei höheren Kohlenstoffkonzentrationen (≥ 1 ppm) dazu eine weitere Hydroxylradikale erzeugende Reaktion ausgenutzt. Dem Eluentenstrom wird eine Ammoniumpersulfat-Lösung ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) zugesetzt. Das Persulfat reagiert unter Einwirkung von UV-Licht entsprechend der nachfolgenden Gleichungen:



Durch die so gebildeten Hydroxylradikale erfolgt eine vollständige Oxidation des DOC zu CO_2 , welches innerhalb des zuvor mit 6 M H_3PO_4 angesäuerten Probenstroms ($\text{pH} < 2$) als Kohlensäure (H_2CO_3) vorliegt. Diese zerfällt leicht in wässriges $\text{CO}_{2(\text{aq})}$ und H_2O . Das $\text{CO}_{2(\text{aq})}$ permeiert durch eine gasdurchlässige Membran (die laut Hersteller für Ionen und organische Bestandteile undurchlässig ist) in eine vom Probenstrom getrennte Kammer, die mit entionisiertem Wasser gefüllt ist. Hierin werden bei einem neutralen pH-Wert aus dem $\text{CO}_{2(\text{aq})}$ HCO_3^- - und H_3O^+ -Ionen gebildet und das so aus dem DOC gebildete CO_2 schließlich mittels eines elektrischen

Leitfähigkeitsdetektors bestimmt. Anorganische Kohlenstoffverbindungen werden ebenfalls vor der Oxidation des DOC durch Ansäuern mit H_3PO_4 und Anlegen von Unterdruck entfernt [SIEVERS 1999]. Entsteht aus der Oxidationsreaktion zuviel CO_2 (oder andere Gase), so kann dies durch Gasblasenbildung an der Membranoberfläche die Permeation behindern und so zu Minderbefunden führen. Bei der Verwendung eines NaCl-haltigen Eluenten (zur Optimierung der vorgeschalteten SEC-Trennung) fanden HER et al. einen nachteiligen Effekt des NaCl. Die Autoren vermuten, daß bei höherer NaCl-Konzentration das Chlorid-Anion mit dem gelösten organischen Kohlenstoff um das Oxidationsmittel konkurriert und dabei zu Hypochlorit oxidiert wird. Dieses kann mit dem DOC unter Bildung von halogenierten organischen Verbindungen weiter reagieren. Die Autoren fassen die ablaufenden Reaktionen vereinfacht wie folgt zusammen [HER 2002]:



HER et al. vermuten weiter, daß durch die in Gl. 2-48 beschriebene Reaktion ein Teil des Oxidationsmittels verbraucht wird und dadurch die verbleibende Menge für die vollständige Oxidation des DOC zu CO_2 nicht ausreicht. Im Ergebnis werde die Bestimmung der DOC-Konzentration verfälscht [HER 2002].

Als problematisch erwies sich auch ein Überschuß an Oxidationsmittel. ULLMANN beobachtete das Auftreten eines Optimums bei Variation der zugesetzten Menge an Oxidationsmittel für die Analyse von Kaliumhydrogenphthalat (KHP) sowie PSS-Standards. Bei zu hohen Gehalten an Persulfat wird gasförmiger Sauerstoff gebildet, der - wie bereits oben erwähnt - die Diffusion des zu messenden CO_2 durch die Membran behindert und so zu geringeren CO_2 -Signalen führt. Für eine Online-Kalibrierung des Detektors mit einer KHP-Verdünnungsreihe war deshalb die Zuführung von unterschiedlichen Mengen an Oxidationsmittel notwendig, um eine jeweils maximale Peakfläche für die einzelnen Konzentrationen an KHP zu erhalten. Dieser zu optimierende Parameter schränkt die universelle Verwendbarkeit dieses Detektors bei der Analyse einer z. B. durch SEC-Analyse gewonnenen, molmassenaufgelösten HA-Probe ein, die während der Elution unterschiedliche Konzentrationen besitzt [ULLMANN 2002].

2.5 Methoden zur Bestimmung des Sorptionskoeffizienten

In der Literatur sind verschiedene Möglichkeiten zur experimentellen Bestimmung eines Verteilungskoeffizienten (K_{DOC} -Wert) von HOS zwischen Wasser und gelösten HSs beschrieben. Zu ihnen gehören u.a. die Dialysemethode [CARTER 1982, MCCARTHY 1985, DE PAOLIS 1997], die Ultrafiltrations (UF)-methode [MEANS 1982], die Gaspurging-Methode [JOTA 1991], die Methode der Löslichkeitserhöhung (Solubility Enhancement) [CHIOU 1986, HUNCHAK-KARIOUK 1997, TANAKA 1997] und die Reversed-Phase (RP)-Methode [LANDRUM 1984, EADIE 1990, BRANNON 1995]. Alle genannten Methoden besitzen Vor- und Nachteile. Die Durchführung der RP-Methode z. B. setzt eine vollständige Trennung des Sorptivs vom Sorbat

zur Bestimmung eines K_{DOC} -Wertes voraus. Die dadurch verursachte Störung des Sorptionsgleichgewichtes wird zur Erklärung der niedrigeren K_{DOC} -Werte, die mittels der RP-Methode im Vergleich zu den anderen Methoden erhalten werden, genannt [KUKKONEN 1994]. Die *Fluoreszenzlöschungsmethode* (Fluorescence Quenching Technique, FQT) und die *Festphasenmikroextraktionsmethode* (Solid Phase Micro Extraction, SPME) zeichnen sich durch eine einfache Handhabbarkeit aus. Während die FQT eine etablierte Methode ist, handelt es sich bei der SPME um eine Methode, die erst unlängst zur Bestimmung der Sorptionskoeffizienten von HOS an DOC eingeführt wurde [KOPINKE 1995B, PÖRSCHMANN 1997]. Beide Methoden werden in dieser Arbeit zur Bestimmung des Sorptionskoeffizienten von HOS an HAs angewendet und sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

2.5.1 Fluoreszenzlöschungsmethode (FQT)

Die FQT ist zwar auf fluoreszenzaktive Sorptive beschränkt, wird aber für derartige Analyten (z. B. PAK) am häufigsten verwendet. Die Fluoreszenz von PAK ist aufgrund ihres ausgedehnten Elektronensystems sehr ausgeprägt. Dabei unterscheiden sich die einzelnen Verbindungen dieser Klasse in der Quantenausbeute. Diese ist definiert als der Quotient aus der Zahl der emittierten Lumineszenzquanten zur Zahl der eingestrahlten Lichtquanten. Für Pyren ist der Wert der Quantenausbeute vergleichsweise hoch. Es stellt deshalb eine – auch in niedrigen Konzentrationen – gut detektierbare Fluoreszenzsonde dar.

Die von gelösten HSs hervorgerufene Verringerung der Fluoreszenzintensität von Fluorophoren wird in der Literatur von den meisten Autoren auf eine statische Fluoreszenzlöschung zurückgeführt (vgl. Abb. 2-12): Ein Fluorophormolekül im Grundzustand 1S_0 bindet an ein Ligandenmolekül L (z. B. HA) zu einem 1:1-Komplex SL mit der Komplexbildungskonstante K_c . Der entstandene Grundzustandskomplex SL ist nicht fluoreszierend. Alle in SL-Komplexen gebundenen Fluorophormoleküle S tragen nicht zur Fluoreszenz der Gesamtlösung bei. Man mißt in Anwesenheit des Liganden L eine geringere Fluoreszenzintensität als in Abwesenheit von L (bei gleicher Konzentration an S)¹⁷.

Nicht-komplexierte Fluorophormoleküle 1S_0 werden durch Absorption des eingestrahlten Lichtes mit der Wellenlänge λ_{ex} energetisch angehoben und gehen in den angeregten $^1S_1^*$ -Zustand über. Sie verweilen in diesem angeregten Zustand mit einer mittleren Lebensdauer τ_F und kehren dann unter Abgabe von Licht der Wellenlänge λ_{em} in den Grundzustand zurück.

Neben der statischen Fluoreszenzlöschung ist noch ein weiterer, als dynamische Fluoreszenzlöschung bezeichneter Effekt möglich: Die von S aufgenommene Anregungsenergie kann bei Anwesenheit eines Liganden L auf diesen übertragen werden, so daß kein Licht durch $^1S_1^*$ emittiert wird. L hingegen stellt im Fall der Huminsäuren ein Makromolekül dar, welches die aufgenommene Energie in Schwingungs-, Rotations- und Translationsbewegung umwandeln kann, d. h. strahlungslos absorbiert. Durch die Anwesenheit von L wird also die Fluoreszenzintensität der Gesamtheit von $^1S_1^*$ gemindert. Das Ausmaß der Desaktivierung durch die

¹⁷ Bei Anwesenheit von HA als Komplexbildner L wird eine vollständige Auslöschung der Fluoreszenzintensität des SL-Komplexes gefunden. Andere (Makro-)Moleküle als Komplexbildner können auch lediglich zu einer Verschiebung von λ_{em} des SL-Komplexes in andere Wellenlängenbereiche führen.

dynamische Fluoreszenzlöschung wird durch die Desaktivierungskonstante k_q^F multipliziert mit der Konzentration an L (c_L) beschrieben.

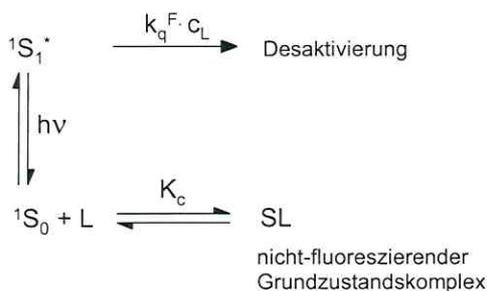


Abb. 2-12: Darstellung von Fluoreszenzlöschmechanismen: Im Fall der statischen Löschung bildet das Löschermolekül L mit dem Fluorophor S im Grundzustand einen nicht-fluoreszierenden Komplex mit der Komplexbildungskonstante K_c (statische Löschung). Bei dynamischer Löschung findet eine Desaktivierung des im angeregten Zustand befindlichen Fluorophors mit der Geschwindigkeitskonstante k_q^F durch Wechselwirkung mit dem Löscher statt.

Durch die Messung der Fluoreszenzlebenszeit von Fluorophoren in Gegenwart von gelösten HSs sowie durch die Untersuchung des Temperatureinflusses auf die Fluoreszenzlebenszeit konnte für mehr als 20 HAs (darunter auch Aldrich-HA) nachgewiesen werden, daß der Beitrag der dynamischen gegenüber der statischen Fluoreszenzlöschung durch HAs vernachlässigbar klein ist [ZIMMERMANN 1999B].

Bei der Auswertung von FQT-Experimenten ist zu berücksichtigen, daß

- die HA selbst, wenn auch in geringerem Maße als z. B. PAK, fluoreszenzaktiv ist und
- die HA das eingestrahlte und emittierte Licht teilweise absorbieren kann.

Die Eigenfluoreszenz der HA muß deshalb an einer reinen HA-Lösung gleicher Konzentration (F_{HA}) bestimmt und von der für die Sorptiv-HA-Lösung gemessenen Fluoreszenz (F_{gem}) abgezogen werden, um die Fluoreszenz des frei gelösten Sorptivs ($F_{Sorptiv}$) zu bestimmen:

$$\text{Gl. 2-50} \quad F_{\text{Sorptiv}} = F_{\text{gem}} - F_{\text{HA}}$$

Wie bereits erwähnt, absorbiert die HA einen Teil der mit der Anregungswellenlänge λ_{ex} in die Meßküvette eintretenden Lichtintensität. Damit wird die eingestrahlte Lichtintensität I_0 , die den Fluorophormolekülen zur Anregung zur Verfügung steht, verringert. Dieser Vorgang wird als *primärer „Innerer Filtereffekt“* (pIFE) bezeichnet.

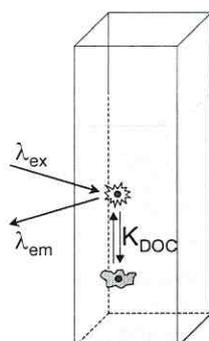


Abb. 2-13: Schematische Darstellung des Aufbaus eines FQT-Experiments. Angeregt werden nur die nicht an Huminsäure sorbierten Fluorophormoleküle (dargestellt durch Kreise).

Auf gleiche Weise wird die von den angeregten Fluorophoren durch den Fluoreszenzvorgang abgegebene Lichtintensität mit der (Emissions-)Wellenlänge λ_{em} beim Durchtritt durch die Lösung teilweise von den HA-Molekülen absorbiert. Hierbei handelt es sich um den sekundären „Inneren Filtereffekt“ (sIFE). PIFE und sIFE wirken beide in dieselbe Richtung: Sie schwächen die gemessene Fluoreszenzintensität eines Fluorophors in Gegenwart von HA ab. Der Wert für die Fluoreszenzintensität des Sorptivs ($F_{Sorptiv}$) muß also mittels einer Korrekturfunktion (f_{kor}) korrigiert werden:

$$\text{Gl. 2-51} \quad F_{kor} = F_{Sorptiv} \cdot f_{kor}$$

Für die Korrektur der IFE gibt es verschiedene Gleichungen, deren geometrische Parameter aus der häufig verwendeten 90°-Meßanordnung abgeleitet wurden (vgl. Abb. 2-14).

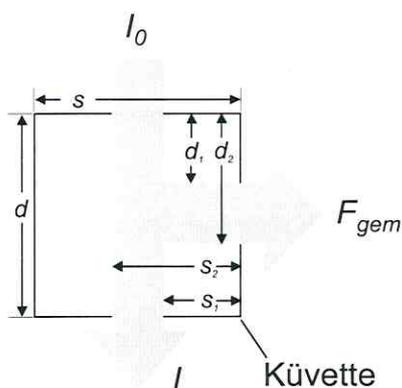


Abb. 2-14: Schematische Darstellung der geometrischen Parameter, die für die Ableitung der Korrektur des IFE nach PARKER et al. und LAKOWICZ et al. verwendet werden. I_0 : Intensität des Anregungslichtes, I : Intensität des Lichtes nach Durchtritt durch die Meßlösung, F_{gem} : Intensität des durch Fluoreszenz emittierten Lichtes.

Eine erste Gleichung wurde durch PARKER et al. [1968] veröffentlicht und ist in leicht modifizierter Form bei ZIMMERMANN [1999A] wiedergegeben:

$$\text{Gl. 2-52} \quad f_{\text{kor}} = \frac{2,303 \cdot a_{\text{ex}} \cdot (d_2 - d_1) \cdot 10^{a_{\text{ex}} \cdot d_1}}{1 - 10^{-a_{\text{ex}}(d_2 - d_1)}} \cdot \frac{2,303 \cdot a_{\text{em}} \cdot (s_2 - s_1) \cdot 10^{a_{\text{em}} \cdot s_1}}{1 - 10^{-a_{\text{em}}(s_2 - s_1)}}$$

Die Zuordnung der geometrischen Parameter s , s_1 , s_2 , d , d_1 und d_2 (in cm) ist Abb. 2-14 zu entnehmen. Die Parameter a_{ex} und a_{em} entsprechen den Extinktionen (engl. absorption) der HA-haltigen Lösung pro cm bei der Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge der Fluoreszenzanalyse.

Da die in Abb. 2-14 dargestellten geometrischen Parameter nicht immer bestimmbar sind, wird neben vereinfachten Gleichungen von GAUTHIER et al. [1986] und von KUBISTA et al. [1994] der Korrekturterm von LAKOWICZ et al. [1999] sehr häufig in der Literatur verwendet. Er stellt von allen vorgenannten Korrekturtermen die am stärksten vereinfachte Form der von PARKER et al. [1986] vorgeschlagenen Gleichung dar. Dabei wird angenommen, daß die Fluorophore nur in einem unendlich kleinen Volumenelement angeregt und ihre Fluoreszenz darin detektiert wird ($s_2 - s_1 \rightarrow 0$ und $d_2 - d_1 \rightarrow 0$)¹⁸ und daß dieses Probenvolumen in der Mitte der Küvette liegt ($s_1 = s / 2$ und $d_1 = d / 2$):

$$\text{Gl. 2-53} \quad f_{\text{kor}} = 10^{(a_{\text{ex}} \cdot d + a_{\text{em}} \cdot s) / 2}$$

Aufgrund der typischen Absorptionsspektren von HA, die einen exponentiellen Abfall der Absorption mit zunehmender Wellenlänge aufweisen, sollte der pIFE gegenüber dem sIFE dominieren.

Werden die Fluoreszenz- und die Absorptionsmessungen in der gleichen Küvette durchgeführt, so vereinfacht sich Gl. 2-53 weiter. Eine Umrechnung der gemessenen Extinktion (A_i) in die Extinktion pro cm (a_i) ist dann nicht mehr erforderlich:

$$\text{Gl. 2-54} \quad f_{\text{kor}} = 10^{(A_{\text{ex}} + A_{\text{em}}) / 2}$$

Durch Zusammenfassen der Gl. 2-50, Gl. 2-51 und Gl. 2-54 läßt sich der Wert der korrigierten Fluoreszenzintensität - bei Verwendung der gleichen Küvette für die Fluoreszenz- und Absorptionsmessungen - wie folgt berechnen:

$$\text{Gl. 2-55} \quad F_{\text{kor}} = (F_{\text{gem}} - F_{\text{HA}}) \cdot 10^{(A_{\text{ex}} + A_{\text{em}}) / 2}$$

Bei unterschiedlichen Dimensionen der Meßzellen im UV- und Fluoreszenzspektrometer (wie im Fall der Online-Detektion) muß an Stelle der Gl. 2-54 die Gl. 2-53 verwendet werden.

¹⁸ In der ursprünglichen Formulierung der Gleichung wurde nur der pIFE berücksichtigt.

Der auf den Kohlenstoffgehalt des Sorbens bezogene Sorptionskoeffizient (K_{DOC}) wird hieraus durch die folgende Gleichung erhalten, worin F_0 die Fluoreszenzintensität des Sorptivs in Abwesenheit von HA und c_{DOC} die auf den Kohlenstoffgehalt bezogene Konzentration der HA in der Lösung ist:

$$\text{Gl. 2-56} \quad K_{\text{DOC}} = \left(\frac{F_0}{F_{\text{kor}}} - 1 \right) \cdot \frac{1}{c_{\text{DOC}}}$$

In dieser Arbeit werden K_{DOC} -Werte mit der Einheit $\text{l} \cdot \text{kg}^{-1}$ in logarithmierter Form angegeben.

2.5.2 Festphasenmikroextraktion (SPME)

Bei der SPME-Methode wird eine immobilisierte Polymerphase zur Anreicherung von organischen Analyten verwendet. Diese ist als dünner Film auf das untere Ende einer Quarzfaser aufgebracht. Ein äußerer Metallmantel, in den die Quarzfaser mit der Polymerschicht vollständig hineingezogen werden kann, schützt die SPME-Faser vor mechanischen Beschädigungen während der Handhabung außerhalb von Sorptions-/Desorptionsexperimenten. Nach dem Sorptionsschritt, bei dem sich die Faser innerhalb des Probengefäßes befindet, erfolgt die thermische Desorption der Analyten im heißen Injektor eines Gaschromatographen, gefolgt von einer üblichen GC-Analyse. Bei dieser Methode können so auch mehrere, verschiedene Analyten pro Sorptionsversuch eingesetzt und dadurch Konkurrenzeffekte verschiedener Sorbentien untersucht werden.

Die Extraktion des Analyten durch die SPME-Faser kann sowohl aus der Gasphase über einer Analytlösung (Headspace-SPME) als auch direkt aus der Lösung (Lösungs-SPME) erfolgen. Beide Methoden liefern – wenn alle notwendigen Gleichgewichte eingestellt sind – das gleiche Ergebnis. Bei der Lösungs-SPME besteht allgemein die Gefahr, daß neben dem Sorptiv auch Anteile des Sorbens an die Faser binden können und dadurch das Ergebnis der Analyse verfälscht bzw. die Lebensdauer der Faser reduziert wird. Für SPME-Fasern, die mit Polydimethylsiloxan (PDMS) beschichtet sind, und HA als Sorbens wurde jedoch keine signifikante Störung der Lösungs-SPME beobachtet [KOPINKE 1999]. Die Lösungs-SPME wird z. B. bei Analyten mit einem sehr niedrigen Henry-Koeffizienten (z. B. PAKs mit mehr als vier Ringen) verwendet, bei denen die Headspace-SPME schwierig durchzuführen ist, da – aufgrund der geringen Flüchtigkeit dieser Verbindungen – die Einstellung des Extraktionsgleichgewichts sehr lange Extraktionszeiten (z. B. > 24 h) erfordern würde. Für PAKs mit bis zu vier Ringen wurde die Headspace-SPME allerdings erfolgreich eingesetzt [GEORGI 1998]. Die Sorptionskoeffizienten werden dabei aus dem Vergleich der von der Faser aufgenommenen Analytmenge für eine HA-haltige Lösung und einer Referenzlösung unter identischen Bedingungen (IS und pH-Wert), allerdings ohne HA, erhalten.

Nachfolgend sind die beiden SPME-Methoden und die bei ihrer Anwendung beteiligten Gleichgewichte schematisch dargestellt.

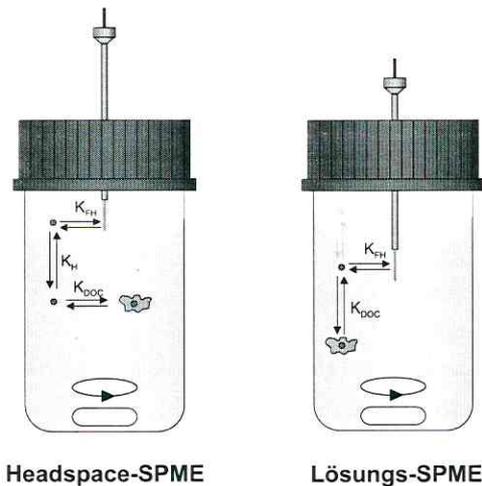


Abb. 2-15: Schematische Darstellung der experimentellen Anordnung für Sorptionsuntersuchungen von (hydrophoben) organischen Substanzen in Gegenwart von gelösten HAs mittels SPME-Fasern.

Für die Durchführung der Headspace-SPME werden die Gleichgewichtseinstellungen für die Verteilung des Analyten zwischen dem Sorbens (hier ausgedrückt als DOC) und der wässrigen Phase, zwischen der wässrigen Phase und dem darüber befindlichen Gasraum, sowie zwischen dem Gasraum und der Faser betrachtet. Die dazugehörigen Gleichgewichtskoeffizienten werden als K_{DOC} , K_H bzw. K_{FH} bezeichnet. Bei der Durchführung der Lösungs-SPME kann die Einbeziehung der Gleichgewichtsverteilung zwischen der wässrigen und der Gasphase (ausgedrückt als K_H -Wert) unberücksichtigt bleiben.

Da die SPME-Methode aber den Anteil der sorbierten Fraktion nur indirekt aus der Differenz der Analysen von Referenz- und HA-Lösung bestimmt, liefert sie gerade dann präzise Werte, wenn der Anteil der sorbierten Fraktion hoch ist. Dies ist im allgemeinen bei hohen Konzentrationen an HA der Fall. Bei der FQT-Methode führen aber hohe Konzentrationen an HA in der Lösung zu großen Werten des IFE-Korrekturterms. Die FQT-Methode liefert also besonders bei niedrigen HA-Konzentrationen zuverlässige Werte. In diesem Punkt ergänzen sich beide Methoden.

Eine ausführliche Herleitung der Gleichungen zur Auswertung von SPME-Experimenten findet sich z. B. bei [GEORGI 1998]. Unter der Bedingung, daß die in der Gasphase befindliche Menge und die aus dem gesamten System mit der Faser extrahierte Menge an Analyt gegenüber der in der wässrigen Phase vorliegenden Menge vernachlässigbar klein sind, läßt sich die folgende Gleichung anwenden:

$$\text{Gl. 2-57} \quad K_{DOC}^{SPME} = a \cdot \left(\frac{A^{St}}{A^{DOC}} - 1 \right) \cdot \frac{1}{c_{DOC}}$$

Weil die Peakfläche aus einer GC/FID bzw. GC/MS-Analyse der Menge an Analyt proportional ist, kann hier direkt das Peakflächenverhältnis A^{St}/A^{DOC} verwendet werden. Dabei ist A^{St} die resultierende Peakfläche des Analyten in Abwesenheit bzw. A^{DOC} die entsprechende Peakfläche in Anwesenheit von DOC. Der Faktor a dient zur Korrektur von unterschiedlichen Konzentrationen an Analyten in der Standard- und in der HA-Lösung.

2.6 Einleitung und Literaturüberblick zur Isotopenfraktionierung

Neben aktiven Sanierungskonzepten, wie z. B. etablierten ex-situ „pump and treat“-Verfahren oder dem Einbau von reaktiven Wänden in einen Grundwasserleiter (Aquifer) als innovative in-situ Maßnahme, hat das *Natural Attenuation* (NA)-Konzept in letzter Zeit unter wirtschaftlichen Aspekten wieder verstärkt an Bedeutung gewonnen. Der Begriff „Natural Attenuation“ läßt sich mit natürlicher Rückhalt und Abbau (eines Schadstoffes) übersetzen. Gemeinsam ist allen Anwendungen des NA-Konzeptes, daß sie einer besonders intensiven Erkundung der geologischen Gegebenheiten des Standortes und seiner Umgebung, einer umfassenden Bestimmung der vorhandenen Schadstoffe, sowie einer fortlaufenden Überwachung (Monitoring) der Konzentrationen der Edukte wie auch der (Abbau-)Produkte bedürfen. Der biologische Abbau erfolgt dabei durch die im Aquifer vorhandenen Mikroorganismen. Diese verwenden die organischen Schadstoffe als energieliefernde Substrate, indem sie diese unter Verbrauch von Elektronenakzeptoren oxidieren. Zunächst wird dabei vorhandener molekularer Sauerstoff als Elektronenakzeptor umgesetzt. Ist der molekulare Sauerstoff aufgezehrt, können auch andere Elektronenakzeptoren wie Nitrat, Eisen- und Manganoxide, sowie Sulfat zur Umsetzung herangezogen werden. In letzter Phase können organische Verbindungen auch in einer Methanogenese-Reaktion zu CO₂ und Methan umgesetzt werden. Der anaerobe Abbau ist deutlich langsamer als der aerobe.

Als Anzeichen für einen etablierten abiotischen oder mikrobiologischen Abbau und als Sanierungskontrolle wird z. B. der Nachweis einer der folgenden Punkte empfohlen [RIFAI 1995, NYER 1997]:

- Stärkere Abnahme der Konzentration eines abbaubaren Schadstoffes im unterstromigen Bereich des Schadensherdes im Vergleich zur Konzentration einer nicht reaktiven und nicht abbaubaren Substanz.
- Abnahme der Konzentration von potentiellen Elektronenakzeptoren (z. B. O₂, NO₃⁻, SO₄²⁻) im Vergleich zur Situation in einem unbelasteten Bereich des Aquifers und Auftreten von Abbauprodukten (z. B. CO₂, NO₂⁻, (N₂O, N₂), NH₄⁺, S²⁻, Methan) oder die Reduktion von Mn(IV) zu Mn(II) bzw. Fe(III) zu Fe(II).
- Nachweis der biologischen Aktivität im Aquifer und Demonstration mit originalem Aquifermaterial aus dem kontaminierten Bereich in Laborversuchen, daß die am Standort vorhandene Mikrobiozönose das vorhandene Schadstoffspektrum abzubauen vermag.

In letzter Zeit hat sich darüber hinaus noch eine weitere Methode etabliert, die einen aussagekräftigen Beweis für den biologischen Abbau von Schadstoffen in einem kontaminierten Aquifer liefern kann. In Laborversuchen konnte gezeigt werden, daß beim *biologischen Abbau* einer organischen Substanz bevorzugt jene Moleküle abgebaut werden, die vor allem ¹²C-Isotope enthalten. In der verbleibenden, frei gelösten Fraktion kommt es dadurch zu einer geringfügigen, aber meßbaren Anreicherung von ¹³C-haltigen Isotopomeren.

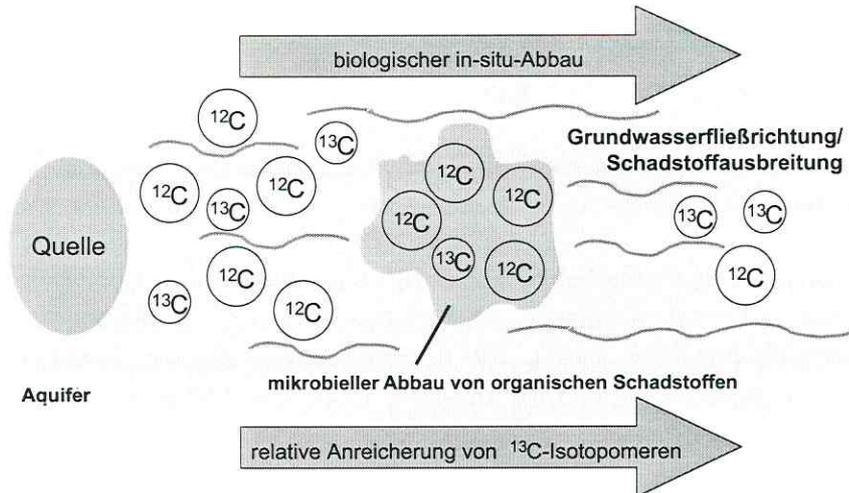


Abb. 2-16: Schematische Darstellung des biologischen in-situ Abbaus von organischen Schadstoffen im Aquifer. Es wird dabei eine relative Anreicherung von ^{13}C -Isotopomeren im verbleibenden, frei gelösten Rückstand beobachtet.

Diese Änderung des Isotopenverhältnisses der stabilen Kohlenstoffisotope ist das Ergebnis eines als kinetischer Isotopenfraktionierungseffekt (KIFE) bezeichneten Phänomens. Der KIFE drückt dabei das Verhältnis der (Abbau-)Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten zweier Isotopomeren aus (z. B. $\text{KIE} = k_{^{12}\text{C}}/k_{^{13}\text{C}}$). An Reinkulturen, die aus kontaminierten Aquiferen gewonnen wurden, konnte der Abbau von Schadstoffen unter Laborbedingungen untersucht werden. Unter Variation der Umgebungsparameter (aerobe bzw. anaerobe Bedingungen, Temperatur, Konzentration der Elektronenakzeptoren, usw.) konnten für Toluol, die Xylolisomeren und Ethylbenzol sowohl ein aerober als auch ein anaerober Abbau nachgewiesen und biologische Isotopenfraktionierungsfaktoren α^{19} für verschiedene Bakterienstämme bestimmt werden. Diese liefern einen Bezug zwischen dem Verhältnis der stabilen Kohlenstoffisotope $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ zum Startzeitpunkt (R_0) und zum Zeitpunkt t (R_t) und dem Verhältnis der Start- oder Ausgangskonzentration (c_0) zur Konzentration des frei gelösten Analyten zum Zeitpunkt t (c_t). R ist durch das Verhältnis der Konzentration in Atom% des ^{13}C - zum ^{12}C -Isotop definiert [CLARK 1997]:

Gl. 2-58
$$R_t = \frac{\left[\begin{matrix} ^{13}\text{C} \\ ^{12}\text{C} \end{matrix} \right]_t}{\left[\begin{matrix} ^{13}\text{C} \\ ^{12}\text{C} \end{matrix} \right]_0}$$

Für geschlossene Systeme und für ein Verhältnis der stabilen Kohlenstoffisotope, das in der Größenordnung ihrer natürlichen Häufigkeit liegt, definiert die Rayleigh-Gleichung den Wert von α :

¹⁹ Vereinfachend wird in dieser Arbeit der Kohlenstofffraktionierungsfaktor α^{C} nur mit α bezeichnet, da keine weiteren Elemente betrachtet werden.

Gl. 2-59
$$\frac{R_t}{R_0} = \left(\frac{c_t}{c_0} \right)^{\frac{1}{\alpha}-1} \quad (\text{Rayleigh-Gleichung})$$

Unter anaeroben Bedingungen konnte für Benzol bislang nur ein Abbau im Sediment nachgewiesen, aber noch keine Reinkultur isoliert werden, so daß kein α -Wert für den anaeroben Benzolabbau im Labor bestimmt werden konnte.

Für Toluol wurden unter aeroben Bedingungen je nach Bakterienstamm Fraktionierungsfaktoren von $\alpha = 1,0004$; $1,0017$ bzw. $1,0026^{20}$ gefunden [MECKENSTOCK 1999, MECKENSTOCK 2002]. Im Aquifer sind jedoch, abgesehen von den Randbereichen der Schadstoffahne, eher anaerobe Bedingungen anzunehmen. Für diesen Fall findet man für Toluol, Ethylbenzol und die Xylole α -Werte von $1,0015$ bis $1,0021$ [MECKENSTOCK 2002, RICHNOW 2003A, RICHNOW 2003B].

Um mit Hilfe der Methode der Isotopenfraktionierung einen biologischen Abbau innerhalb des NA-Konzeptes nachweisen zu können, muß sichergestellt werden,

- daß die Isotopenfraktionierung nur durch den biologischen Abbau und nicht durch physikalische Vorgänge wie Verdünnen, Verdampfen oder Sorption der Schadstoffe an eine Matrix oder andere chemische Vorgänge (z. B. Hydrolyse) verursacht wird und
- eine Methode zur hinreichend genauen Bestimmung der Isotopenverhältnisse zur Verfügung steht.

Auf die Frage, inwieweit eventuell auch abiotische Prozesse einen Beitrag zur Isotopenfraktionierung leisten können, soll in diesem Kapitel genauer eingegangen werden. Zunächst soll aber die Methode zur Bestimmung der Isotopenverhältnisse kurz beschrieben werden:

Die Anteile der Kohlenstoffisotope werden mit Hilfe von speziellen *Isotopenverhältnismassenspektrometern* (isotope ratio Mass Spectrometer, irMS) bestimmt. Nach einer möglichen chromatographischen Vortrennung der unterschiedlichen organischen Substanzen werden diese vor dem Einlaß in das irMS in einer *Verbrennungseinheit* (combustion unit, C) unter Zuhilfenahme von CuO als Sauerstoffquelle und eines Pt-Katalysators vollständig zu CO₂ umgesetzt, so daß das nachfolgende irMS lediglich die Massenspuren der CO₂-Molekülonen mit $m/z = 44, 45$ und 46^{21} so genau wie möglich bestimmen können muß. Diese Gerätekopplung wird als GC-C-irMS bezeichnet. Die Bestimmung der absoluten Konzentration der Kohlenstoffisotope ist jedoch immer noch schwierig. Deshalb wird üblicherweise nur die relative Konzentration der Isotope in der Probe bestimmt und als Unterschied zum Isotopenverhältnis eines Standards angegeben. Für die stabilen Kohlenstoffisotope wird dabei meistens *PeeDee Belemnite* (PDB) als Standard verwendet. Sein Isotopenverhältnis beträgt $R_{\text{PDB}} = R_{\text{St}} = 0,0112372$ [CRAIG 1957]. Der Unterschied im Isotopenverhältnis von Probe (R_{Probe}) und Standard (R_{St}) wird häufig in δ -Einheiten angegeben. Der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert ist dabei wie folgt definiert [HOEFS 1997]:

²⁰ Ein Wert von $\alpha = 1$ bedeutet, daß es keinen Isotopenfraktionierungseffekt gibt. Bei $\alpha > 1$ kommt es zu einer Anreicherung der ¹³C-Isotope in dem verbleibenden Rückstand, bei $\alpha < 1$ zu einer Abreicherung der ¹³C-Isotope.

²¹ Das Ion bei $m/z = 46$ wird zur Analyse des ¹²C¹⁸O¹⁶O-Moleküls verwendet. Die natürliche Häufigkeit des ¹⁸O-Isotops beträgt 0,204 %, die des ¹⁷O-Isotops nur 0,037 %.

Gl. 2-60

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{R_{\text{Probe}}}{R_{\text{St}}} - 1 \right) \cdot 1000 \text{ [‰]}$$

Vor dem Hintergrund, den Isotopenfraktionierungseffekt als Nachweis für einen biologischen Abbau innerhalb des NA-Konzeptes anwenden zu können, muß geklärt werden, ob möglicherweise abiotische Prozesse ebenfalls und wenn, in welchem Ausmaß zu einer Isotopenfraktionierung beitragen. Für einen Aquifer sind hierbei (Auf-)Lösungs-, Verdampfungs- und Sorptionsprozesse relevant. Beginnend mit dem Sorptionsprozeß soll im Folgenden ein kurzer Literaturüberblick gegeben werden.

Der *Sorption* von organischen Schadstoffen an die Matrix eines Aquifers kommt für das Transportverhalten dieser Verbindungen und damit ihrer Ausbreitung im Grundwasserleiter eine entscheidende Rolle zu. Innerhalb der Aquifermatrix sind die Wechselwirkungen der organischen Substanz (Organic Matter, OM) mit unpolaren organischen Kontaminanten wie Benzol und Toluol der wichtigste Sorptionsprozeß. Erst bei sehr geringen Gehalten an OM in der Matrix ($f_{\text{OM}} < 0,002$) müssen Wechselwirkungen mit den anorganischen Matrixbestandteilen als ein Beitrag zum Gesamtsorptionsvorgang betrachtet werden [SCHWARZENBACH 1993].

Der Einfluß der Sorption an verschiedene Sorbentien auf das Isotopenverhältnis von organischen Verbindungen wurde in unterschiedlichen experimentellen Ansätzen bereits untersucht:

Für die einstufige Sorption von Benzol, Toluol, TCE bzw. PCE aus ihren wäßrigen Lösungen an Graphit und Aktivkohle fanden SLATER et al. in Batchexperimenten keine signifikante Änderung des Isotopenverhältnisses bei einer Fehlergrenze von $\pm 0,5 \text{ ‰}$ [SLATER 2000]. Der sorbierte Anteil des Analyten wurde dabei von 10 bis 90 % durch Veränderung der Sorbenskonzentration variiert.

POULSEN et al. verwendeten eine RP-HPLC-Säule mit chemisch gebundenen C_{18} -Gruppen für mehrstufige Sorptionsexperimente [POULSEN 1997]. Die RP-HPLC-Säule diente dabei als Modell für einen Aquifer. Für vollständig deuterierte Proben fanden sie im Vergleich zu den undeuterten Substanzen deutliche Retentionszeitunterschiede. Aus einer Auftragung des chromatographischen Retentionsfaktors k' gegen den K_{OC} -Wert erhielten sie für verschiedene (undeuterte) Verbindungen eine Korrelation der Form $\log k' = a \cdot \log K_{\text{OC}} + b$. Aus den experimentell ermittelten Unterschieden der Retentionsfaktoren der undeuterten und vollständig deuterierten Verbindungen berechneten sie so mittels der oben genannten Korrelation das Verhältnis für die $\log K_{\text{OC}}$ -Werte der beiden Isotopomeren einer Verbindung ($\Delta \log K_{\text{OC}}$). Für z. B. Benzol fanden sie: $\Delta \log K_{\text{OC}}^{\text{H}} = -0,021 \pm 0,001$. Dies entspricht dem Quotienten $K_{\text{OC}}^{1\text{H}} / K_{\text{OC}}^{2\text{H}}$ mit einem Wert von 1,05. Für die vollständig deuterierten Verbindungen des Benzols, Toluols bzw. Ethylbenzols resultierten kleinere K_{OC} -Werte als für die undeuterten Proben. Die Moleküle mit den leichten ^1H -Isotopen reichern sich also bevorzugt in der unpolaren, stationären Phase an. Bei Verwendung einer Normalphasen-HPLC-Säule (d. h. mit polarer stationärer Phase) wurde gefunden, daß sich bevorzugt die schwereren Isotopomere in der stationären Phase anreichern und somit die leichteren Isotopomere schneller eluieren [KUDELIN 1993].

Diesem methodischen Ansatz folgend, gaben HARRINGTON et al. jeweils ein binäres Gemisch aus unmarkiertem und vollständig ^{13}C -markiertem Benzol bzw. Toluol auf eine RP-HPLC-Säule auf [HARRINGTON 1999]. Aus der fehlenden Auftrennung in zwei Substanzpeaks folgerten sie, daß ein Isotopenfraktionierungseffekt durch

sorptive Wechselwirkungen mit dem HPLC-Säulenmaterial für Kohlenstoff sehr klein sei. Aus der Unsicherheit bei der Bestimmung der Retentionszeit eines Substanzpeaks schätzten sie einen maximalen Unterschied der log K_{OC} -Werte von $\Delta \log K_{OC}^C = \log K_{OC}^{^{13}C\text{-markiert}} - \log K_{OC}^{\text{unmarkiert}} \leq \pm 0,006$ für Benzol bzw. $\pm 0,005$ für Toluol ab. Dies entspricht Ausschlußgrenzen von $0,986 \leq K_{OC}^{^{13}C} / K_{OC}^{^{12}C} \leq 1,014$ für Toluol bzw. $0,988 \leq K_{OC}^{^{13}C} / K_{OC}^{^{12}C} \leq 1,012$ für Benzol. Die Autoren betonten in diesem Zusammenhang, daß die so abgeschätzten Unterschiede in den K_{OC} -Werten sich auf vollständig ^{13}C -markierte und unmarkierte Verbindungen beziehen und der Effekt bei nur teilweise markierten Verbindungen *noch kleiner* sein dürfte.

Die Auswirkungen des Isotopenfraktionierungseffektes auf die *Verteilung von Kohlenstoffisotopen* nach Elution des Analyten über eine RP-HPLC-Säule untersuchten bereits mehrere Autorengruppen:

In Einzelanalysen fanden BAUMANN et al. für die polare Aminosäure Leucin bei Elution über eine RP- C_{18} -Säule, daß die an der Carboxylgruppe ^{13}C -markierte Verbindung eine höhere relative Retentionszeit (bei Bezug auf Norleucin als internen Standard) als die unmarkierte, vornehmlich ^{12}C -haltige Verbindung besitzt [BAUMANN 1992]. Zu einem inhaltlich identischen Ergebnis kamen sie bei Co-Elution von Mischungen aus unmarkiertem und markiertem Leucin: Ein in zwei Fraktionen aufgeteilter HPLC-Peak wurde nach Elution aus der RP- C_{18} -Säule hinsichtlich des Isotopenverhältnisses in den beiden Fraktionen untersucht. Dabei wurde eine Anreicherung des ^{13}C -Isotopomeren in der später eluierenden Fraktion gefunden [BAUMANN 1992].

GENSLER et al. fanden unterschiedliche Richtungen für die Anreicherung von ^{13}C -haltigen Isotopomeren polarer Verbindungen auf einer RP- C_8 -Säule [GENSLER 1994]: Während für Wein- und Citronensäure die $\delta^{13}C$ -Werte der drei Fraktionen, in die der jeweilige HPLC-Peak aufgeteilt wurde, mit zunehmender Retentionszeit anstiegen (zunehmend schwerere Isotopomere), eluierten die schwereren Isotopomere im Fall der Apfelsäure vorzugsweise zuerst. Die ermittelten Unterschiede zwischen den $\delta^{13}C$ -Werten der einzelnen Fraktionen waren dabei gering und für die drei Fruchtsäuren annähernd gleich (der Wert für $\Delta\delta^{13}C$ betrug zwischen erster und dritter Fraktion zwischen 1,3 und 2,2 ‰). Bei Elution der drei polaren Säuren über eine Anionenaustauschersäule wurden deutlich größere Unterschiede der $\delta^{13}C$ -Werte in den jeweiligen Fraktionen gefunden (der Wert für $\Delta\delta^{13}C$ nahm zwischen erster und dritter Fraktion Werte zwischen 26,3 und 37,9 ‰ an). Die Richtung der Anreicherung der ^{13}C -Isotopomere ist in diesem experimentellen Ansatz aber für alle 3 Fruchtsäuren identisch: Die ^{13}C -Isotopomere reichern sich in den schneller eluierenden Fraktionen an.

Eine derartige Elutionsreihenfolge fanden auch CAIMI et al. [1997]. Sie eluierten eine Probe von Hexadeensäuremethylester über eine präparative RP- C_8 -Säule und unterteilten das Eluat in 51 Fraktionen. Anschließend bestimmten sie das Isotopenverhältnis sowie die Analytkonzentration der einzelnen Fraktionen mittels GC-C-irMS-Analysen. Dabei nahm der $\delta^{13}C$ -Wert von anfangs -27,8 ‰ auf -32,4 ‰ im Tailingbereich des HPLC-Peaks ab. Der δ -Wert des Ausgangsmaterials betrug $\delta^{13}C = -31,4$ ‰. Eine Massenbilanz aus den Kohlenstoffgehalten an ^{12}C und ^{13}C in den einzelnen Fraktionen ergab ein Isotopenverhältnis der kumulierten Fraktionen, welches um 0,2 ‰ von dem des Ausgangsmaterials abwich. Diese Abweichung liegt innerhalb der von ihnen angegebenen Fehlergrenzen der Methode.

Eine wiederholte Elution der Probe über die HPLC-Säule durch eine Recycling-Chromatographie erbrachte keine Erhöhung der oben genannten Werte für die Isotopenfraktionierung, obwohl es durch das mehrmalige Durchströmen der Säule zu einer Vervielfachung der Trennstrecke kommt. Das Recyclieren führte hier nicht zu

einer Erhöhung der Trennstufenzahl. Wie die Autoren betonen, ist der Isotopenfraktionierungseffekt besonders im Anstieg des Peaks deutlich ausgeprägt.

Aus den aufgeführten Arbeiten kann folgendes Fazit abgeleitet werden: Ein signifikanter Kohlenstoff-Isotopenfraktionierungseffekt konnte an RP-HPLC-Säulen qualitativ nachgewiesen werden. Eine Quantifizierung dieses Effektes in Form von relativen Sorptionskoeffizienten wurde bisher noch nicht vorgenommen.

Nach diesen Literaturstellen zur Auswirkung der Sorption auf die Isotopenverteilung soll nun der Einfluß des (*Auf-*)*Lösungs-* bzw. des *Verdampfungsvorganges* betrachtet werden. Beiden Vorgängen kommt bei der Übertragung von Laborexperimenten auf einen realen Aquifer unterschiedliche Relevanz zu. Während bei Vorliegen von Schadstoffen in Phase ein Lösungsvorgang im Grundwasserleiter immer zu erwarten ist, findet eine Verdampfung nur an der Grenzfläche zwischen gesättigter und ungesättigter Zone im Aquifer statt.

Durch die GC-C-irMS-Analyse von BTEX in reiner Phase und den n-Pentanextrakten von wäßrigen Lösungen der BTEX konnten DEMPSTER et al. zeigen, daß es durch den Lösungsvorgang außerhalb der Fehlergrenze von 0,5 ‰ zu keiner Isotopenfraktionierung kommt [DEMPSTER 1997]. Dieses Resultat war unabhängig von der Ausgangskonzentration der wäßrigen Lösung und der erzielten Extraktionseffizienz.

SLATER et al. fanden bei Verwendung der online GC-C-irMS-Methode mit einer Meßgenauigkeit von 0,5 ‰ für den Lösungsvorgang sowie für die Verteilung zwischen wäßriger Lösung und Gasphase von Toluol und Trichlorethen (TCE) im Vergleich zu den Reinsubstanzen in flüssiger Phase keinen signifikanten Isotopenfraktionierungseffekt [SLATER 1999].

Einen sehr geringen, aber signifikanten Effekt auf die Isotopenverteilung der stabilen Kohlenstoffisotope nach Einstellen des Gas-Flüssigkeitsgleichgewichts (Verdampfungsprozeß) in einem geschlossenen System fanden HARRINGTON et al. bei Anwendung der off-line-Bestimmung der Isotopenverteilung [HARRINGTON 1999]. Für den untersuchten Temperaturbereich von 5 - 70 °C fanden sie für Benzol, Toluol und Ethylbenzol nahezu konstante Anreicherungseffekte von $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{Gas-Flüssigkeit}} \approx 0,20 \text{ ‰}$, d. h. einen Anstieg des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes der Substanz in der Gasphase im Vergleich zur organischen flüssigen Phase. Eine solch geringe Differenz kann nur durch die von den Autoren verwendete off-line-Methode nachgewiesen werden.

Anhand einer Modellrechnung für Toluol konnten die Autoren für ein offenes System, bei dem sich durch wiederholtes Entfernen der Dampfphase mehrfach das Verdampfungsgleichgewicht einstellte, die Auswirkung auf den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des flüssigen Toluols als Funktion des verbleibenden Anteils an flüssigem Toluol (f) demonstrieren. Bei einem Wert von $f < 0,1$ ergab sich eine ^{13}C -Abreicherung in der flüssigen Phase von $> 0,5 \text{ ‰}$. Eine derartige Differenz wäre auch mittels der GC-C-irMS-Methode nachweisbar. In Destillationskolonnen kann dieser Effekt zur Trennung von markierten Verbindungen genutzt werden. Dieses als inverser Isotopenfraktionierungseffekt bezeichnete Phänomen wurde auch von anderen Autoren gefunden [z. B. DIAS 1997]. Es führt dazu, daß bei einer gaschromatographischen Trennung die ^{13}C -Isotopomere die Säule als erste verlassen.

Die nachfolgend beschriebenen Experimente sollten dazu beitragen, eine Methode zu entwickeln, die hinreichend empfindlich ist, den durch Sorptionsvorgänge aus wäßriger Phase verursachten Isotopenfraktionierungseffekt analysieren zu können. Darüber hinaus sollte untersucht werden, wie groß ein solcher - durch

einen physikalischen Vorgang verursachter - Isotopenfraktionierungseffekt wäre und wie er sich auf die Anwendbarkeit der Isotopenfraktionierungsmethode zur Dokumentation des biologischen Abbaus auswirkt. Die Verwendung von Huminsäure als stationäre Phase an Stelle von typischen RP-Phasen und Wasser als Eluent sollte hierbei - gerade im Hinblick auf die vorgenannten Literaturbefunde - die Übertragbarkeit der Laborexperimente zur Beschreibung der Verhältnisse in einem realen Aquifer erhöhen.

3 Experimenteller Teil

3.1 Allgemeine experimentelle Arbeiten

3.1.1 Reinigung der kommerziellen Huminsäuren

50 g luftfeuchte HA wurden in 250 ml einer 0,3 M HF/0,1 M HCl-Lösung (Verhältnis 1:1) suspendiert und über Nacht geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren (30 Minuten bei 27000 U/min) wurde die Lösung abdekantiert und der Feststoff erneut mit 250 ml der HF/HCl-Lösung suspendiert. Nach mehrstündigem Rühren wurde wiederum abzentrifugiert und der Feststoff durch Suspendieren und Zentrifugieren mehrfach mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) gewaschen. Der so erhaltene Feststoff wurde zweimal mit je 250 ml 0,01 M EDTA-Lösung (aus Na-EDTA) wie folgt behandelt:

Nach Versetzen mit EDTA-Lösung wurde kurz geschüttelt und der pH-Wert durch Zugabe von 1 M NaOH auf pH 9 gebracht. Nach mehrstündigem Rühren (teilweise über Nacht) wurde die HA durch Einstellen eines pH-Wertes von ca. 2 (Zugabe von 1 M HCl) wieder ausgefällt. Das Zentrifugat wurde anschließend so lange mit VE-Wasser gewaschen, bis durch Zugabe von AgNO₃-Lösung zu Aliquoten der überstehenden Lösung des Zentrifugats kein erkennbarer (weißer) Niederschlag mehr erhalten wurde.

3.1.2 Bestimmung des Feuchtegehalts, des Kohlenstoffgehalts und des Aschegehalts der Huminsäuren

Zur Bestimmung des Feuchtegehalts der HAs wurden die luftfeuchten Proben bei 110 °C bis zur Gewichtskonstanz (nach ca. 3,5 h) getrocknet. Der Feuchtegehalt, bezogen auf das Feuchtgewicht, wurde nach Abkühlen der Probe in einem Exsikkator, der mit CaCl₂ befüllt war, nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Gl. 3-1} \quad \frac{(m_{\text{Einwaage}} - m_{\text{Trockengewicht}})}{m_{\text{Einwaage}}} \cdot 100 = \text{Feuchtegehalt in \%}$$

Der Kohlenstoffgehalt der unbehandelten und entaschten HAs (vgl. 3.1.1) wurde mit einem C-Analysator C-MAT (Ströhlein Instruments) bestimmt. Die Aschegehalte der Proben wurden nach Verbrennung im Sauerstoffstrom mittels eines Temperaturprogramms (600 K/min - 600 °C (2 min) - 400 K/min - 1000 °C (1 min)) durch Rückwaage ermittelt.

Der Kohlenstoffgehalt des Aldrich-HA-Natriumsalzes wurde darüber hinaus mit einem Elementaranalysator (RC-412, LECO) bestimmt.

3.2 Durchführung der SEC-Experimente

Die Eluenten für die SEC-Analysen wurden alle aus entionisiertem Wasser (VE-Wasser) unter Zusatz von entsprechenden Mengen an Salzen (Merck, Reinheit pro analysis oder höher) hergestellt. Es wurden jeweils 200 ppm (0,02 Ma%) NaN_3 als Bakterizid zugesetzt. Vor einer Filtration des Eluenten wurde der pH-Wert ggf. mit 0,1 M HCl bzw. NaOH auf den gewünschten Wert eingestellt. Die Filtration erfolgte über einen 0,2- μm -Filter (regenerierte Cellulose, Millipore) mit einer Vakuumfiltrationsanlage.

Eine weitere Entgasung und Filtration des Eluenten erfolgte durch Einsatz eines Online-Vakuumentgasers (Deg) (ERC) und eines Inline-Filters (IF) (0,2 μm Durapore, Millipore) innerhalb der kombinierten SEC/AF⁴-Apparatur, deren experimenteller Aufbau nachfolgend schematisch dargestellt ist.

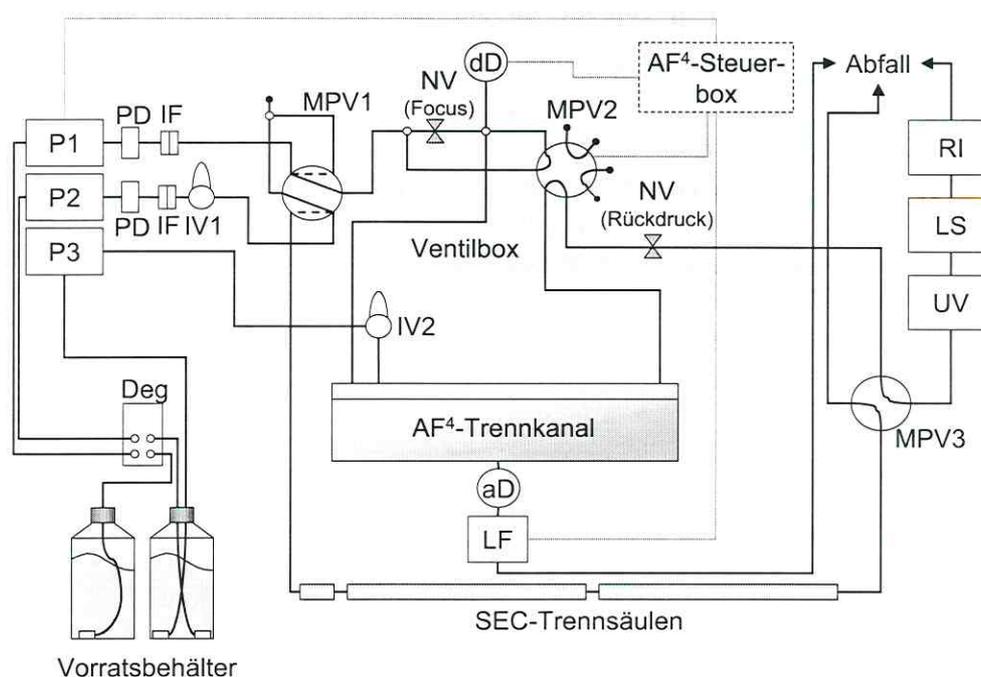


Abb. 3-1: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus der kombinierten SEC/AF⁴-Anlage. Deg: Online-Entgaser; P: Pumpe; PD: Pulsationsdämpfer; IF: Inline-Filter; IV: Injektionsventil; MPV: Multipositionsventil; NV: Nadelventil; dD bzw. aD: digitale bzw. analoge Druckanzeige; LF: LiquiFlow; UV, LS bzw. RI: UV-, Lichtstreu- bzw. Brechungsindex-Detektor.

Die Flußrate des Eluenten betrug, wenn nicht anders angegeben, $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ und wurde mit einer HPLC-Doppelkolbenpumpe (P2) (ConstaMetric 3200, tsp) mit nachfolgendem Pulsationsdämpfer (PD) (SSI) erzeugt. Zur Injektion der Proben wurde ein HPLC-Injektionsventil (IV1) (7725i, Rheodyne) verwendet. Alle SEC-Experimente wurden mit der folgenden Säulenkombination durchgeführt (mz Analysentechnik GmbH):

1. Vorsäule Hema-Bio Gel 40; Korngröße 10 μm , Länge: 50 mm, Durchmesser: 8 mm,

2. Trennsäule Hema-Bio Gel 40: Korngröße 10 μm , Länge: 300 mm, Durchmesser: 8 mm, Trennbereich²² < 20 kDa, Ausschlußgrenze 40 kDa,
3. Trennsäule Hema-Bio Gel 100: Korngröße 10 μm , Länge: 300 mm, Durchmesser: 8 mm, Trennbereich 2 – 80 kDa, Ausschlußgrenze 120 kDa.

Das verwendete Hema Bio-Gel ist eine hydrophilisierte Modifikation des Hema Gels, welches ein mit Ethylenglykoldimethylmethacrylat quervernetztes Hydroxyethylmethacrylat Copolymer ist. Die Bio-Gel Variante ist nur mit wäßrigen Medien kompatibel, die bis zu maximal 20 Vol% organische Lösemittel enthalten können.

Als Detektoren konnten ein UV-Detektor mit variabler Wellenlängeneinstellung (UV 150, tsp), ein Mehrwinkel-Streulichtdetektor (miniDawn, Wyatt) und ein Brechungsindex-Detektor (RI-2000F, Schambeck SFD) über ein Mehrpositionsventil (Vici) (MPV3) an den Ausgang der SEC-Säulen angeschlossen werden.

Eine Kalibrierung der SEC-Säulen zur Umrechnung des Retentionsvolumens in Molmassen erfolgte durch die Injektion von PSS-Standards über eine 200 μl -Probenschleife. Es wurden die folgenden Kalibrierstandards mit der vom Hersteller (Polymer Science Service, Mainz) angegebenen Molmasse M_p verwendet: 356000, 82800, 35700, 13400, 6710, 4480 und 1120 Da. Entsprechend den Empfehlungen [WU 1995] wurden Lösungen der Standards in dem jeweiligen Eluenten mit Konzentrationen zwischen 0,3 und 0,5 Ma% analysiert. Darüber hinaus wurde Aceton ($M = 58$ Da) als niedermolekularer Standard (1 Vol% in Eluent) benutzt.

Zur Herstellung der HA-Proben wurden die entsprechenden Einwaagen an HA in VE-Wasser gegeben. Durch Zugabe von 0,1 M NaOH wurde ein pH-Wert von > 10 eingestellt und die HA über Nacht unter Schütteln gelöst. Mittels 0,1 M HCl wurde der pH-Wert der Lösung üblicherweise auf pH 7 gesenkt und der Maßkolben mit VE-Wasser aufgefüllt. Wenn nicht anders angegeben wurde die so hergestellte Lösung ohne Filtration verwendet, um eine definierte HA-Konzentration zu erhalten. Wenn notwendig, wurde die HA-Lösung mittels eines Spritzenvorsatzfilters aus regenerierter Cellulose mit einer Porengröße von 0,45 μm filtriert (RC15, Sartorius).

Die Aufnahme der durch die drei Detektoren erzeugten Daten erfolgte mit Hilfe der MALLS-Detektor-Software (ASTRA). Zur Auswertung der Experimente wurden die konzentrationsproportionalen Meßsignale des UV- bzw. RI-Detektors als ASCII-Datensatz aus ASTRA exportiert und mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms (MS Excel) weiter verarbeitet.

3.3 Durchführung der AF⁴-Experimente

In dieser Arbeit wurde ein AF⁴-System der Firma ConSensus verwendet. Eine HPLC-Doppelkolbenpumpe (P1) (ConstaMetric 3200, tsp) diente als Kanalpumpe. Eine weitere HPLC-Pumpe (P3) (MicroStar, Knauer) wurde zur Injektion der Probe über ein HPLC-Injektionsventil (7000, Rheodyne) verwendet. Die Start- und Stopzeiten, die Flußrate der Kanalpumpe, sowie die Fließrichtungen des Eluenten innerhalb des AF⁴-Kanals (bestimmt durch die Stellung des Mehrwegeventils, MPV2) und die Querflußrate (LiquiFlow, LF) wurden durch eine Controllerbox gesteuert. In diese wurde das jeweilige abzuarbeitende AF⁴-Programm von einem angeschlossenen PC aus geladen. Die aktuellen Werte der Querflußrate sowie des Drucks im AF⁴-Kanal wurden

²² Die angeführten Herstellerangaben über die Arbeitsbereiche- und Ausschlußgrenzen beziehen sich auf eine Bestimmung mit linearen Polysacchariden (Pullulane) und können für andere Analytklassen davon abweichen.

von der Controllerbox an den PC zurückgeleitet. Eine Detektion der aus dem Trennkanal eluierenden Peaks erfolgte durch die im Kap. 3.2 genannten Detektoren, nachdem das Multipositionsventil (MPV3) entsprechend geschaltet wurde.

Der schematische Aufbau des AF⁴-Kanals ist in Abb. 2-8 dargestellt. Als Spacer wurden Teflonfolien mit unterschiedlichen Dicken oder Kombinationen daraus verwendet. Diese geben die Kanalgeometrie vor, die in Abb. 3-2 dargestellt ist.

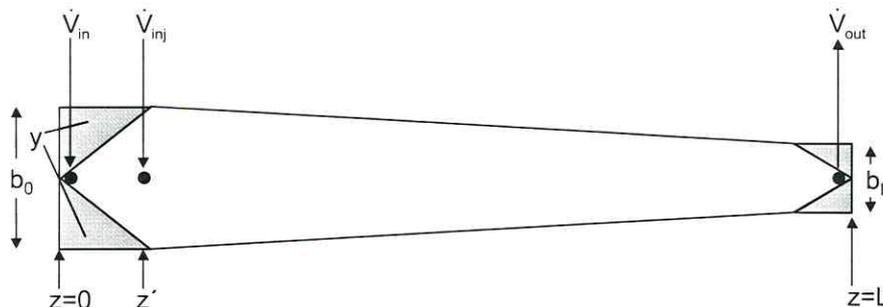


Abb. 3-2: Schematische Darstellung der Abmessungen des ConSensus-AF⁴-Kanals. Die Werte betragen für: $b_0 = 2,12 \text{ cm}$, $b_L = 0,47 \text{ cm}$, $L = 28,6 \text{ cm}$, $y = 2,25 \text{ cm}^2$, $z' = 2,10 \text{ cm}$, Fläche der Anreicherungs wand (A) = $36,09 \text{ cm}^2$.

Die Dicken der Spacer betragen: 100, 190 und 350 μm . Daraus resultieren nominelle Kanalvolumina von 0,36; 0,68 bzw. 1,26 ml. Aus der Kombination der 100- und der 350- μm -Folie resultiert entsprechend eine Dicke von 450 μm (nominelles Kanalvolumen: 1,62 ml), aus der Kombination der 190- und der 350- μm -Folie eine Dicke von 540 μm (nominelles Kanalvolumen: 1,94 ml). Die tatsächliche Kanaldicke w muß aufgrund der in der Einleitung erwähnten Kompressibilität und Quelleffekte der Membran bei Anwendung verschiedener Eluenten experimentell bestimmt werden. Es wurden verschiedene Methoden angewandt, um t_0 und V^0 zu ermitteln:

- 1) anhand der Durchbruchzeit eines nicht retardierten Analyten mit kleiner Molmasse in Abwesenheit eines Querflusses,
- 2) anhand der Retentionszeit eines hochmolekularen Standards mit bekanntem Diffusionskoeffizienten in Anwesenheit eines Querflusses.

Aus der unter Punkt 1) genannten Methode wird die Totzeit des Kanals direkt erhalten. Diese kann in Abwesenheit eines Querflusses mit der Detektorflußrate in das Kanalvolumen und damit – bei gegebener Oberfläche - in die Kanaldicke umgerechnet werden. Bei der unter 2) genannten Methode muß zur Bestimmung der Kanaldicke w die folgende Formel angewendet werden [LITZEN 1993]; dabei wurde die Vereinfachung $R^F = 6\lambda$ getroffen:

$$\text{Gl. 3-2} \quad w = \sqrt{\frac{6 \cdot D \cdot t_r}{\ln \left(1 + \frac{\dot{V}_x}{\dot{V}_{\text{out}}} \left[1 - \frac{\left(b_0 \cdot z' - \frac{(b_0 - b_L)}{2 \cdot L} z'^2 - y \right)}{A} \right] \right)}}$$

Nach Einsetzen der Maße aus Abb. 3-2 ergibt sich für den ConSensus-Kanal die folgende vereinfachte Gleichung:

$$\text{Gl. 3-3} \quad w = \sqrt{\frac{6 \cdot D \cdot t_r}{\ln \left(1 + \frac{\dot{V}_x}{\dot{V}_{\text{out}}} [0,9425] \right)}}$$

Als hochmolekularer Standard zur Bestimmung von w kann z. B. das Protein Ferritin verwendet werden. Dieses besitzt eine Molmasse von 440 kDa und einen für Wasser bei 25 °C extrapolierten Diffusionskoeffizienten D von $4,1 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Dabei muß auf die Temperaturabhängigkeit von D geachtet werden. Diese ergibt sich vor allem aus der Temperaturabhängigkeit der Viskosität des Eluenten.

Zur Kanaldickebestimmung nach Punkt 1) wurde eine $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Lösung von NaN_3 in Eluent über eine $20\text{-}\mu\text{l}$ -Probenschleife aufgegeben, fokussiert und mit einem Kanal- bzw. Detektorfluß von $0,7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ eluiert. Das Volumen zwischen dem Kanalausgang und dem UV-Detektor betrug $0,632 \text{ ml}$. Dieses wurde von der Retentionszeit des NaN_3 -Peaks subtrahiert.

Als (geträgerte) UF-Membranen mit einem kleinen Cut-off waren zur Zeit der Durchführung der AF^4 -Experimente lediglich Polyethersulfon-Membranen (PES) mit einem Cut-off von 1 kDa (ConSensus) und 4 kDa (PostNova) verfügbar.

Verwendetes AF^4 -Gradientenprogramm:

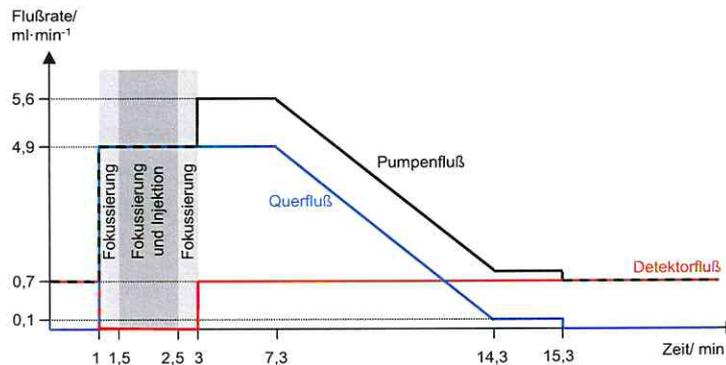


Abb. 3-3: Schematische Darstellung des verwendeten AF^4 -Gradientenprogramms.

Der Start der Datenaufnahme mittels ASTRA erfolgte jeweils 1 min vor Beginn des AF^4 -Programms, um zu Anfang der Datenaufnahme ein ungestörtes Detektorsignal zu erhalten.

In Abwesenheit eines Querflusses (Querflußrate = 0 ml·min⁻¹) wurde dazu die Detektorflußrate auf 0,7 ml·min⁻¹ eingestellt. Nachfolgend werden die beiden Flußraten - jeweils in ml·min⁻¹ - in der Kurznotation (Quer-/Detektorflußrate) angegeben. Zur Einstellung konstanter Flußraten wurde eine Zeit von 30 s zur (Vor-)Fokussierung (4,9/0,0) gewählt. Als Injektionszeit wurde bei einer Injektionsflußrate von 0,1 ml·min⁻¹ eine Dauer von 60 s verwendet. Dadurch sollte sichergestellt werden, daß die Probelösung vollständig in den AF⁴-Kanal aufgegeben wird. Das Volumen der Verbindungskapillare zwischen Injektionsventil und Kanal beträgt ca. 4 µl. Analog der Empfehlungen von SCHIMPF und WAHLUND wurde eine kurze Nachfokussierungszeit von 30 s (4,9/0,0) zur Refokussierung der Probe angewandt [SCHIMPF 1997]. Die Elution erfolgte zwischen der Programmlaufzeit von 120 bis 380 s zunächst mit einem konstanten Kraftfeld (4,9/0,7). Zwischen 381 und 799 s nahm die Querflußrate linear von (4,9/0,7) auf (0,1/0,7) ab. Zwischen 800 und 860 s betrug das Flußverhältnis konstant (0,1/0,7). Von 861 bis 2000 s wurde zur Ausspülung des Trennkanals ein Verhältnis von (0,0/0,7) etabliert.

3.4 Durchführung der Experimente in Anlehnung an PICCOLO et al. zur Huminsäure-Struktur

Das Aldrich-HA-Na-Salz wurde entsprechend der vorbeschriebenen Prozedur (vgl. Kap. 3.2) durch Einstellen eines basischen pH-Wertes > 10 und Schütteln über Nacht in Lösung gebracht. Abweichend wurde hier eine 0,5 M KOH-Lösung (analog [PICCOLO 1996A]) verwendet. Mit dieser wurde anschließend auch der pH-Wert von 11,8 für ein größeres Lösungsvolumen eingestellt.

Anteile dieser Lösungen wurden mit 1 M HCl auf pH 2,0 bzw. durch Zusatz von Essigsäure (Eisessig, p.a.; Merck) auf pH-Werte von 6,0; 4,5; 3,5 und 2,0 gebracht und Aliquote einer SEC- bzw. AF⁴-Analyse unterworfen.

Die HA-Lösung mit einem pH-Wert von 2,0 (Essigsäure) wurde durch Zusatz unterschiedlicher Volumina einer 5 M KOH-Lösung wieder auf höhere pH-Werte von 3,5; 4,5; 6,0 und 8,5 eingestellt und ebenfalls mit beiden Methoden analysiert.

Der experimentelle Aufbau wurde bereits im Kap. 3.2 bzw. 3.3 beschrieben. Für die SEC- und AF⁴-Analysen wurde hier eine 50-µl-Probenschleife und als Eluent ein 0,1 M Borat-Puffer (pH 9,2) verwendet. Dieser wurde durch Einwaage von 38,14 g Na₂B₄O₇·1⁻¹ hergestellt. Die SEC-Flußrate betrug 1 ml·min⁻¹. Für die AF⁴-Analysen wurde das im Kap. 3.3 beschriebene Feldgradientenprogramm verwendet. Die Injektionszeit wurde hierbei aufgrund des höheren Probenvolumens von 50 µl auf 90 s erhöht.

3.5 DOC-Detektor

Der Quarzglasreaktor wird durch einen 2-Zonenofen (Horst) beheizt. Die Steuerung des Ofens erfolgt durch zwei Thermostate (Horst), die die Temperatur der Verbrennungszone bei typischerweise 780 °C und die der katalytischen Nachverbrennungszone bei 700 °C konstant halten. Als Katalysator wird hier auf Al_2O_3 (Korngröße 1,6 – 2 mm) geträgertes Platin (0,5 Ma% Pt) verwendet (Platinkatalysator 0,5, Instrument Development Company, IDC). Die Katalysatorschüttung wird vor frühzeitiger Verstopfung infolge auskristallisierender Salze eines salzhaltigen Eluenten durch eine vorgelagerte Schüttung aus Quarzglasbruch (Höhe ca. 5 cm) geschützt. Getrocknet wird der Meßgasstrom durch einen handelsüblichen Intensivkühler aus Glas und einen nachfolgenden Membrantrockner (PermaPure Inc.). Der Membrantrockner besteht aus einer Nafion[®]-Membran, die Wassermoleküle durch Absorption an Sulfonsäure-Gruppen bindet. Dabei kann eine Sulfonsäuregruppe bis zu 13 Wassermoleküle als Hydratwasser binden; dies entspricht einem Absorptionsvermögen der Membran von 22 Ma% Wasser. Auf der Membranaußenseite wird im Gegenstrom ein durch Blaugel getrockneter Luftstrom entlang geführt. Dieser bewirkt einen Konzentrationsgradienten des Wassers innerhalb der Membran und so den Transport des Wasser von innen nach außen durch Ionenkanäle. Dieser Prozeß wird Pervaporation genannt. Da die Membran frei von Poren ist, können keine Gasmoleküle entweichen.

Zur Messung der CO_2 -Konzentration im trockenen Gasstrom wird die NDIR-Methode (NDIR Optik-Bank Serie 5000 Typ 34364, Saxon Junkalor) eingesetzt. Zwei der drei IR-Pyrodetektoren detektieren durch vorgelagerte Schmalbandinterferenzfilter nur die Absorption bei einer für CO_2 spezifischen Wellenlänge. Andere Gase - ausgenommen Wasserdampf - stören die Detektion des CO_2 nicht. Druckschwankungen z. B. führen jedoch zu einer Beeinträchtigung des Signals. Um derartige Einflüsse zu minimieren, wird ein dritter Sensor eingesetzt, der bei einer Wellenlänge von 4 μm alle breitbandigen, also nicht gasspezifischen Störeinflüsse durch Messung und Kompensation herausfiltern soll. Dazu wird das jeweilige CO_2 -Rohsignal auf das (breitbandige) Referenzsignal bezogen (Quotientenbildung), bevor als es CO_2 -Meßsignal an eine externe Datenaufnahmeeinrichtung abgegeben wird. Die Thermostatisierung des Detektorblocks dient ebenfalls dem Zweck der Signalstabilisierung. Die beiden CO_2 -Detektoren sind baugleich, aber für unterschiedliche Konzentrationsbereiche kalibriert (0-200 ppm CO_2 bzw. 0-1000 ppm CO_2). Die Aluminiumküvette wurde gegenüber der handelsüblichen Standardmeßzelle um die Hälfte auf 140 mm Länge verkürzt. Damit wird die Verweilzeit des CO_2 innerhalb der Meßküvette reduziert, was zu einer Verringerung der Peakbreite führt. Die Nachweisgrenze (NWG) wird dabei nur wenig berührt, da mit größerer Küvettenlänge auch das Rauschen zunimmt. Durch Verwendung von sensitiveren Pyrodetektoren gegenüber der Standardausführung können die Detektoren auch bei verkürzter Küvettenlänge im optimalen Detektionsbereich arbeiten, so daß auch die Empfindlichkeit des Detektors nicht verringert wird.

Nachfolgend ist schematisch der Aufbau des DOC-Detektors dargestellt. Die Gasstromführung am Ausgang des Intensivkühlers ist so ausgelegt, daß das Volumen des Wassersammelgefäßes nicht durchströmt wird und so nicht zur Peakverbreiterung beiträgt.

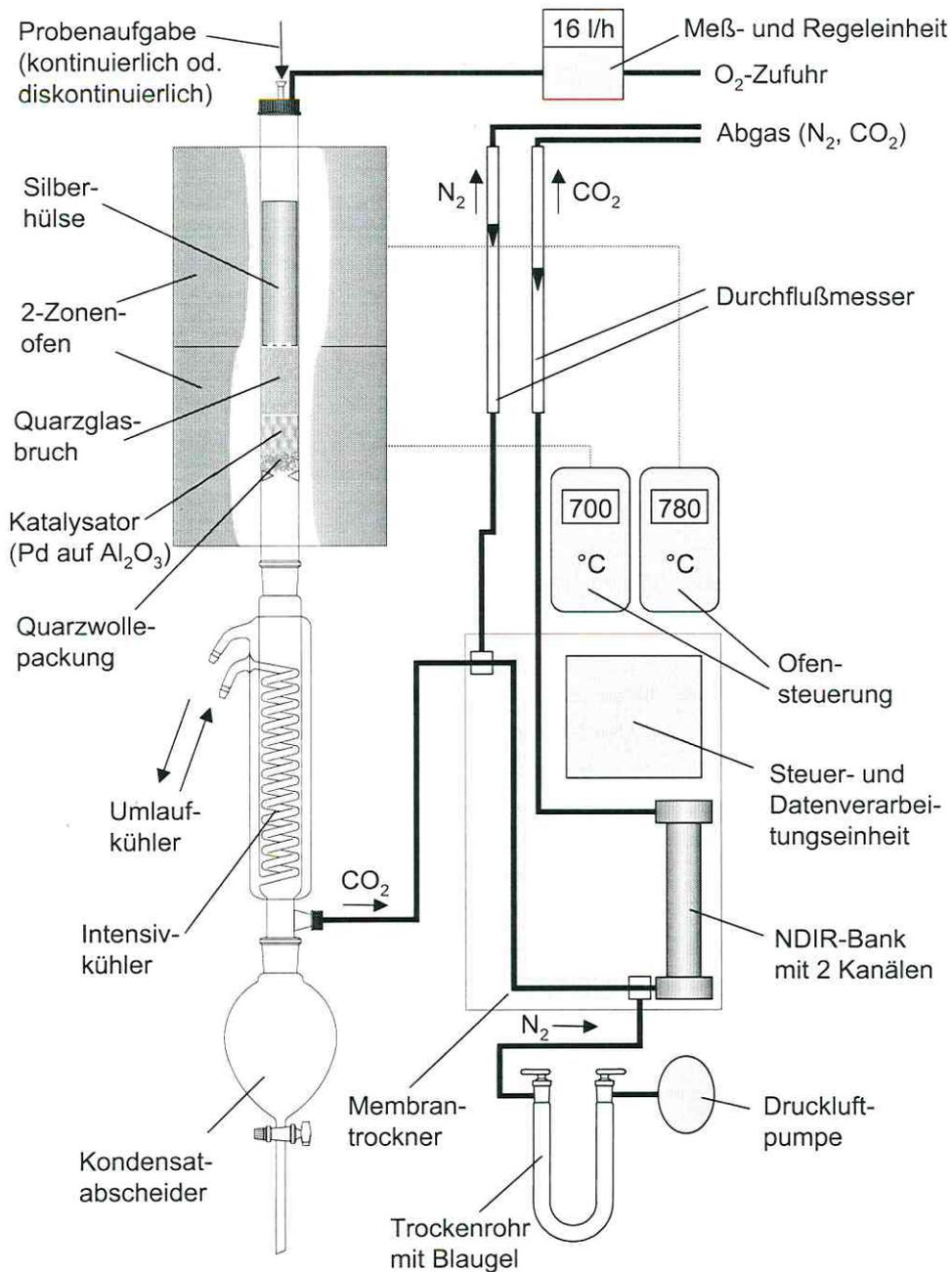


Abb. 3-4: Schematischer Aufbau des verwendeten DOC-Detektors. Die Probenaufnahme kann wahlweise durch Injektion mittels einer Mikroliterspritze über eine Septumdichtung (diskontinuierlich) oder durch Anschluß einer HPLC-Kapillare an einen Wechselprobenkopf (kontinuierlich) erfolgen.

Die permanente Beaufschlagung des Reaktors mit Flüssigkeit führt im Fall des Online-Betriebs zu einer gegenüber dem Batchbetrieb niedrigeren Temperatur innerhalb der Verbrennungszone. Besonders betroffen ist

dabei der Bereich, an dem der Flüssigkeitsstrahl auf die Reaktoreinbauten auftrifft und verdampft. Zur Erhöhung der Temperatur wurde deshalb ein hohler Metallzylinder oberhalb der Schüttung aus Quarzglasbruch installiert, so daß der Flüssigkeitsstrahl nicht mehr auf die Oberfläche kleiner Quarzglasstückchen auftrifft, sondern auf den (Sieb-)Boden des Metallzylinders. Dabei soll der Wärmeverlust an dieser Stelle durch die bessere Wärmeleitung des Metallzylinders im Vergleich zu Quarzbruch teilweise kompensiert werden.

Um auch bei längeren Analysenzeiten (z. B. einer SEC-Analyse von 30 min) einen ungestörten Detektorbetrieb zu gewährleisten, muß für das auskondensierte Wasser ein Auffangbehälter mit großem Volumen vorgesehen werden. Ein Lösen von CO₂ in diesem großen Wasservolumen innerhalb des Behälters ist jedoch zu vermeiden. Deshalb wurde der Ausgang des Intensivkühlers so modifiziert, daß dieses Volumen gegenüber dem restlichen System durch das nachfließende Kondensat permanent abgetrennt wird. Die Menge an CO₂, die sich physikalisch und chemisch in dem auskondensierten Wasservolumen lösen kann, wurde für eine Flußrate von 1 ml·min⁻¹ Wasser bei pH 7 berechnet. Unter der Voraussetzung, daß sich das System im Massen- bzw. Volumengleichgewicht befindet, d. h. pro Minute 1 ml Wasser auskondensiert wird, liegt der prozentuale Anteil von so aus dem Meßgasstrom entferntem CO₂ unter 1 %.

3.5.1 Vorarbeiten zum Einsatz des DOC-Detektors

Der Temperaturverlauf innerhalb des Reaktorrohres sowie die Aufheiz- und Abkühlcharakteristik des gewählten Reaktoraufbaus wurden mit einem Ni-CrNi-Thermoelement ermittelt. Um betriebsnahe Bedingungen einstellen zu können (O₂-Strom und Flüssigkeitsstrom im Online-Betrieb), wurden ein T-Stück am Kopfaufsatz des Reaktors montiert und das Thermoelement über ein Septum in das Reaktorrohr eingeführt. Der Flüssigkeitsstrom wurde von einer HPLC-Pumpe (110b, Beckman) geliefert.

Eine Edeldstahlhülse (Länge: 13,5 cm; Außendurchmesser: 2 cm; Innendurchmesser: 1,65 cm; Gewicht: 89 g) mit einem siebartigen Boden wurde mit dem DOC-Detektor geliefert. Sie wurde im Laufe der experimentellen Arbeiten durch einen Silberstab (Länge und Außendurchmesser wie Edeldstahlhülse, Gewicht: 307 g) (99,9 % Reinheit, Goodfellows) ersetzt. Dieser wurde so aufgebohrt, daß sich der Durchmesser der Bohrung konisch nach unten hin verjüngt. Im Boden dienten mehrere Löcher dazu, den im Inneren des Stabes erzeugten Wasserdampfstrom auf die nachfolgende Katalysatorschüttung zu leiten (vgl. Abb. 7-4 und Abb. 7-5).

3.5.2 Kalibrierung und Bestimmung der Nachweisgrenze des DOC-Detektors

Alle Lösungen wurden mit Wasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage (Simplicity 102, Millipore) hergestellt. Das Wasser aus dieser Quelle soll im folgenden als Millipore-Wasser bezeichnet werden.²³

²³ Das Millipore-Wasser besaß von verschiedenen getesteten Wasserquellen den geringsten DOC-Gehalt. Ein Begasen des Millipore-Wassers mit N₂ von über einer Stunde Dauer - um gelöstes CO₂ auszutreiben - erbrachte keine Verringerung des CO₂-Blindwertes dieser Wasserquelle. Wichtig ist jedoch, daß das Wasser nicht längere Zeit vor seiner Entnahme in dem Kunststoff-Vorratsbehälter dieser Anlage gelagert wird, da sonst in höherem Maße organische Substanzen (Weichmacher, etc.) aus dem Material gelöst werden können.

Zur Injektion von CO₂-gesättigtem Wasser wurde Millipore-Wasser mindestens eine Stunde lang über eine dünne Glaskapillare mit CO₂ begast. Davon wurden anschließend 20 µl mittels einer gasdichten HPLC-Spritze im Batchbetrieb bzw. mittels eines Systems aus 20-µl-Probenschleife, Injektionsventil (Knauer) und HPLC-Pumpe (110b, Beckman) bei einer Flußrate von 1 ml·min⁻¹ im Online-Betrieb aufgegeben. Als Eluent wurde Millipore-Wasser bei pH 7 verwendet. Die Datenaufnahme erfolgte mittels der NDIR-Software (Saxon Junkalor). Die Auswertung der Peakhöhen und Peakflächen erfolgte nach Export, Konvertierung und Import der ASCII-Daten in die Software CGrams for Chromatography (Galactic Industries Corporation).

Die Nachweisgrenze (NWG) wurde durch die Injektion von Kaliumhydrogenphthalat (KHP)-Lösungen ($V_{inj} = 20 \mu\text{l}$) mit den folgenden Konzentrationen ermittelt: 0, 2, 4, 8 und 10 mg KHP·l⁻¹. Diese entsprechen Kohlenstoffkonzentrationen von 0; 0,9; 1,9; 3,8 und 4,7 mg C·l⁻¹. Im Batchmodus wurde eine 50-µl-HPLC-Spritze bzw. im Online-Modus ein Injektionsventil mit Probenschleife (Knauer) bei einer Flußrate von 1 ml·min⁻¹ Millipore-Wasser verwendet. Die Ofentemperatur bzw. die Temperatur der katalytischen Nachverbrennungszone betragen 780 °C bzw. 700 °C (Sollwerte).

Für die substanzspezifischen Kalibrierungen wurden jeweils Lösungen mit einer Kohlenstoffkonzentration von 1 g·l⁻¹ verwendet. Dazu wurden Lösungen mit Konzentrationen von 2,125 g KHP·l⁻¹; 1,54 g *tert*-Butanol·l⁻¹ (*tert*-BuOH) bzw. 2,65 g luftfeuchte Aldrich-HA·l⁻¹ hergestellt. Die Aufgabe von jeweils 20 µl Lösung erfolgte hier mittels einer HPLC-Spritze im Batchbetrieb bzw. über das Injektionssystem (Knauer) mit einer 20-µl-Probenschleife im Online-Betrieb. Eluent, Flußrate und Datenverarbeitung entsprechen den vorgenannten Bedingungen.

3.5.3 Online-Kopplung des DOC-Detektors

Eine Optimierung der Geräteparameter des DOC-Detektors für den Online-Betrieb erfolgte durch die Fließinjektion von 20 µl einer Lösung von *tert*-BuOH, KHP bzw. Aldrich-HA mit einer Kohlenstoffkonzentration von jeweils 1 g·l⁻¹. Um den Einfluß der Verbrennungstemperatur auf die Peakfläche und -höhe zu untersuchen, wurden bei einer Flußrate von 1 ml·min⁻¹ unterschiedliche Ofentemperaturen (780, 800, 850 und 900 °C) eingestellt bzw. die Flußrate bei einer konstanten Ofentemperatur von 800 °C zwischen 0,6 und 1,0 ml·min⁻¹ variiert. Die Temperatur der katalytischen Nachverbrennung wurde konstant bei 700 °C gehalten. Als Lösemittel und Eluent wurde Millipore-Wasser mit einem pH-Wert von 7 verwendet.

Zur Bestimmung der spezifischen UV-Absorptionen (SUVA) verschiedener Substanzen wurde ein UV-Detektor (UV150, tsp) mit dem DOC-Detektor über eine Teflonkapillare verbunden. Bedingt durch den räumlichen Aufbau des DOC-Detektors mußte diese eine Länge von ca. 180 cm besitzen. Bei einem Innendurchmesser von 0,8 mm ergibt sich daraus ein Interdetektorvolumen von ca. 0,9 ml. Dieses wurde bei der Auswertung der Signale berücksichtigt. Das Signal des UV-Detektors bei einer Wellenlänge von 254 nm und das des 1000-ppm-CO₂-Kanals des DOC-Detektors wurden mit der ASTRA-Software aufgezeichnet. Die Elution der Proben

erfolgte über die im Kap. 3.1 beschriebene SEC-Apparatur. Als Lösemittel und Eluent wurde eine 0,1 M NaNO_3 -Lösung (+ 200 ppm NaN_3) bei pH 7 verwendet. Die Flußrate betrug $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.6 Online-FQT-Untersuchungen

Der experimentelle Aufbau für die Online-FQT-Experimente ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Wahlweise kann die SEC- und die AF^4 -Methode zur Größentrennung der HA-Proben eingesetzt und mit der nachfolgenden Online-FQT-Untersuchung kombiniert werden.

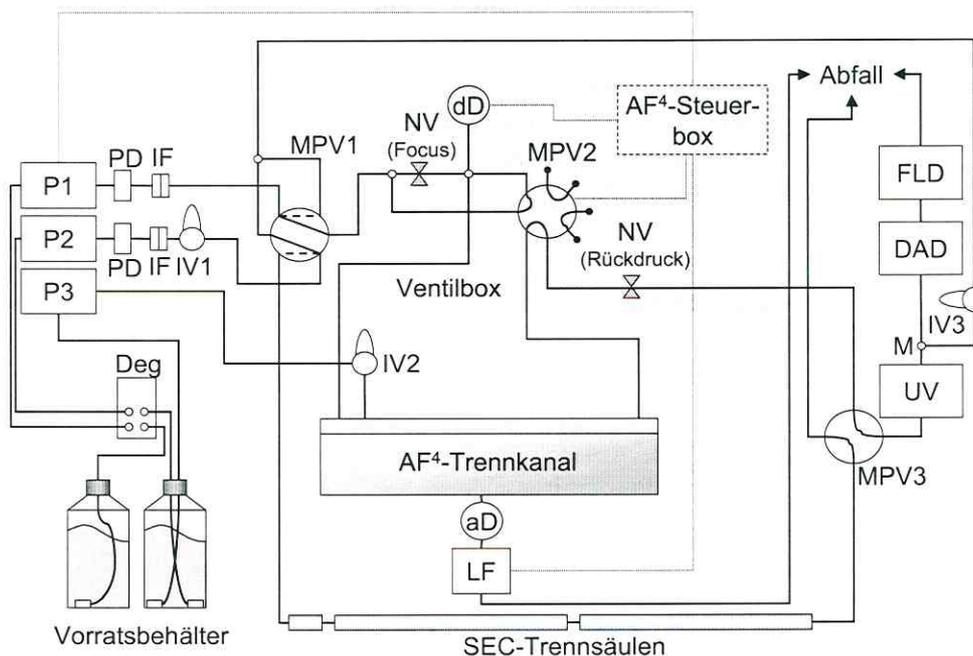


Abb. 3-5: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus der kombinierten SEC/ AF^4 -Apparatur mit gekoppelter Online-FQT-Methode (dargestellt hier für AF^4 -Anwendung). Die jeweils nicht für die Größentrennung genutzte HPLC-Pumpe (hier P2) wurde zur Förderung der Analytlösung vom IV3 zum Intensivmischer verwendet. Dazu besaß die Probenschleife des IV3 ein Volumen von ca. 11 ml. Deg: Online-Entgaser; P: Pumpe; PD: Pulsationsdämpfer; IF: Inline-Filter; IV: Injektionsventil; MPV: Multipositionsventil; NV: Nadelventil; dD bzw. aD: digitale bzw. analoge Druckanzeige; LF: LiquiFlow; M: Intensivmischer; UV, DAD bzw. FLD: UV-, Diodenarray- bzw. Fluoreszenzdetektor.

Dabei wurde der Ausgangsfluß (je $0,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) aus der SEC bzw. AF^4 über ein manuelles Mehrwegeventil (Vici) auf einen Intensivmischer (Alltech) geleitet. Dieser besitzt ein sehr geringes Totvolumen und eine eingebaute Fritte, die zum intensiven Durchmischen zweier Flüssigkeitsströme führt. Der zweite Flüssigkeitsstrom bestand aus einer wäßrigen Lösung von Pyren (100 ppb) bzw. Naphthalin (Naphthalin) (10 ppm) in Eluent. Da besonders Pyren zu starker Sorption an hydrophoben Materialien, wie z. B. den

Dichtungsmaterialien innerhalb der Pumpe, neigt, würde dies zu einer langfristigen Kontamination der Pumpe führen. Deshalb wurde der Analytstrom für die Online-FQT-Experimente nicht durch die Pumpe direkt, sondern als wässrige Lösung über eine Probenschleife (HPLC-Injektionsventil 7001, Rheodyne) in den Intensivmischer geliefert. Zu diesem Zweck betrug das Volumen der Edelstahl-Kapillarschleife (Länge: 15 m, Innendurchmesser: 1 mm) 11,8 ml. Zum Befüllen der Kapillare wurde eine 25-ml-Glasspritze verwendet, deren innere Oberfläche zuvor durch dreimaliges Aufziehen mit der jeweiligen Analytlösung gesättigt wurde. Die Flußrate, mit der die wässrige Sorptivlösung dosiert wurde, wurde variiert. Ein optimaler Wert in Bezug auf die Signalhöhe und die maximale Zeitspanne eines konstanten Sorptivstroms (bedingt durch das Volumen der zuvor beschriebenen Probenschleife) wurde für $0,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ erhalten. Die Ausspülcharakteristik der Schleife, im besonderen die Zeit bis zum Erreichen eines konstanten FLD-Signals (Plateau), sowie die Breite dieses Plateaus bei der gewählten Flußrate der Sorptivlösung wurden vor den eigentlichen Online-FQT-Experimenten bestimmt.

Sowohl für PSS-Standard- als auch für HA-Proben konnte in Vorversuchen gezeigt werden, daß die Kopplung für die FQT-Experimente zu keiner visuell erkennbaren Veränderung zwischen der Peakform im UV-Detektor und dem (über den Intensivmischer sowie eine lange Teflonkapillare verbundenen) DAD führt.

Für die Online-FQT-Experimente müssen allerdings die verschiedenen Weglängen des Lichts in den Meßzellen des DAD (0,6 cm) und des FLD ($d = 0,1 \text{ cm}$ und $s = 0,2 \text{ cm}$) bei der Anwendung des IFE-Korrekturterms berücksichtigt werden.

Zur Überprüfung der erhaltenen Ergebnisse der Online-FQT-Experimente wurde ein SemiBatchexperiment mit dem Online-Aufbau durchgeführt. Dazu wurden 20 ml einer Aldrich-HA-Lösung ($c_{\text{HA}} = 0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) bzw. 20 ml Eluent mit je 4 ml einer wässrigen Pyren-Lösung versetzt. Daraus resultiert eine Konzentration von 17 ppb für Pyren und 30 ppm für den DOC.

Die Lösungen wurden mindestens 1 Stunde äquilibriert und anschließend per Hand mittels einer Glasspritze in die Meßzellen des DAD und FLD injiziert. Die Glasspritze wurde zuvor dreimal gespült. Zur Bestimmung der UV-Absorption und der Eigenfluoreszenz wurde ebenfalls eine entsprechende HA-Lösung ohne Pyren injiziert.

3.7 Offline-FQT-Experimente

Die Fluoreszenzspektren wurden mit einem Fluoreszenzspektrometer (LS50B, Perkin Elmer), die Absorptionsspektren mit einem Zweistrahl-UV/VIS-Spektrometer (Cary3, Varian) aufgenommen.

In beiden Spektrometern wurde die in Abb. 3-6 dargestellte, volumenreduzierte Quarzglas-Küvette verwendet.

Zur Aufnahme der Fluoreszenzspektren wurde im allgemeinen wie folgt verfahren: Die Küvette wurde zweimal mit den voräquilibrierten Lösungen gespült und nach dem dritten Befüllen für 1,5 min über eine dünne Glaskapillare intensiv mit N_2 begast, um die Lösungen von gelöstem O_2 zu befreien. Gelöstes O_2 als dynamischer Quencher kann eine (statische) Fluoreszenzlöschung des Analyten durch HA überlagern. Anschließend wurde die Küvette mit einem Deckel aus Aluminiumfolie verschlossen und die Probe sofort vermessen.

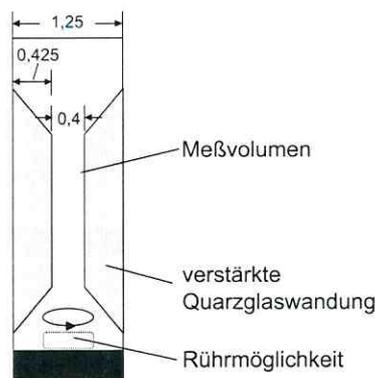


Abb. 3-6: Darstellung der volumenreduzierten Quarzglasküvette für FQT-Messungen mit quadratischer Grundfläche. Der Anregungslichtstrahl tritt nur im Bereich der verstärkten Glaswandung ein (Meßvolumen). Die Abmessungen beziehen sich auf Herstellerangaben in cm. Die Küvetteninnenbreite beträgt 0,4 cm.

Voruntersuchungen zeigten, daß ein Begasen über einen Zeitraum von 1,5 min ausreichend ist, da bei längerem Begasen keine Steigerung der Signalintensität im Fluoreszenzspektrum beobachtet werden konnte. Aufgrund des niedrigen Henrykoeffizienten von Pyren und dem geringen Spülgasvolumen kann die Abreicherung des Pyren vernachlässigt werden. In einem anderen Vorversuch konnte eine Stabilität des Meßsignals der so präparierten Probe von mindestens einer Stunde nachgewiesen werden.

Für Pyren wurde die Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlängen von 333 nm und einer Emissionswellenlänge von 393 nm bestimmt. Die verwendeten Spaltbreiten betragen jeweils 2,5 nm. Die Spannung des Photomultipliers (Photo Multiplier Tube, PMT) wurde auf 775 Volt eingestellt.

Anschließend wurde die UV-Absorption der Probe durch Umsetzen der Küvette in das UV/VIS-Spektrometer gemessen. Dazu wurden der Wellenlängenbereich von 260 bis 400 nm mit einer Scanrate von $10 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$ analysiert und die Werte bei der Anregungs- und der Emissionswellenlänge ermittelt. In dem Zweistrahlgerät wurde dabei stets gegen Luft gemessen. Die Absorption der Küvette selbst sowie der 0,1 M NaNO_3 -Lösung wurden später von den ermittelten Absorptionen der HA-haltigen Lösungen als Blindwert subtrahiert.

Zur Frage der Molmassenabhängigkeit des Sorptionskoeffizienten wurden ebenfalls Offline-FQT-Experimente durchgeführt. Hierzu wurde über eine 200- μl -Injektionsschleife eine Aldrich-HA-Probe mit der Konzentration von $c_{\text{HA}} = 1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ über die beschriebene SEC-Säulenkombination aufgegeben. Der resultierende Peak wurde nach Durchgang durch den UV-Detektor (UV150, tsp) (254 nm) in drei Fraktionen getrennt aufgefangen. Die Fraktionen wurden zwischen den folgenden Retentionszeiten erhalten:

Tab. 3-1: Retentionszeitgrenzen und daraus resultierende Molmassenbereiche der Fraktionierung einer Aldrich-HA-Probe in drei SEC-Fractionen.

Fraktion	Retentionszeit von - bis /min	Molmassenbereich* /kDa
1	12,5 - 14,0	33,7 - 16,9
2	14,0 - 15,5	16,9 - 8,5
3	15,5 - 17,0	8,5 - 4,3

* Der Molmassenbereich wurde aus den angegebenen Retentionszeitgrenzen und der in Kap. 4.2 angegebenen Gleichung für die Kalibriergerade von PSS-Standards und 0,1 M NaNO₃-Lösung als Eluent ermittelt.

Diese Fraktionierung wurde 20-fach wiederholt, um ein ausreichendes Lösungsvolumen für die anschließenden Offline-FQT-Experimente und die Bestimmung der DOC-Konzentration mittels des DOC-Detektors zu erhalten. Die Stabilität der einzelnen Fraktionen hinsichtlich ihrer Molekülgrößenverteilung wurde in vorangegangenen Experimenten ermittelt. Dazu wurden die drei oben beschriebenen Fraktionen erneut in das SEC-System injiziert und eluiert. In allen Fällen wurde eine 0,1 M NaNO₃-Lösung (+ 200 ppm NaN₃) bei pH 7,0 als Eluent verwendet.

Durch tägliche SEC-Analysen über einen Zeitraum von sieben Tagen wurde die Molmassenverteilung der bei Raumtemperatur gelagerten Lösungen und damit ihre (Lager-)Stabilität untersucht. Darüber hinaus wurde jeweils ein Aliquot der Lösung der drei Fraktionen mit 1 M HCl auf pH 4 bzw. mit 1 M NaOH auf pH 10 eingestellt und über Nacht gelagert. Anschließend wurden diese Lösungen mit 1 M NaOH bzw. 1 M HCl auf pH 7,0 zurücktitriert und erneut eine SEC-Analyse durchgeführt. Diese Fraktionen werden im Folgenden als „gestreßte Fraktionen“ bezeichnet.

3.8 SPME

Für die SPME-Analysen wurden Polydimethylsiloxan (PDMS)-Fasern mit einer Schichtdicke von 7 µm (Supelco) verwendet. Diese wurden unmittelbar vor ihrer Verwendung durch Thermodesorption in einem GC-Injektor bei 280 °C konditioniert. Jeweils 75 ml der entsprechenden Lösung wurden in einem 100-ml-Erlenmeyerkolben, der mit einem teflonbeschichteten Silikonseptum verschlossen wurde, über Nacht in einem Temperierbad (25 °C) unter ständigem Rühren äquilibriert. Die SPME-Fasern wurden durch das Septum in den Gasraum über der jeweiligen Lösung eingeführt und nach einer Verweilzeit von 18 Stunden von dort in den Injektor eines GC/MS-Gerätes (QP5000, Shimadzu) überführt. Dabei wurde das sorbierte Pyren bei 280 °C über einen Zeitraum von 3 min (splitlos) desorbiert. Für die anschließende Analyse im SIM-Modus bei m/z = 202 wurde ein Temperaturprogramm verwendet: 120 °C (3 min) – 10 K/min – 250 °C (5 min).

Die Versuche mit Aldrich-HA in Millipore-Wasser (200 mg·l⁻¹) wurden als Doppelerperiment ausgeführt. Die Ionenstärke wurde durch Zugabe von NaCl auf 0,01 M eingestellt. Der pH-Wert betrug 7,0. Es wurden jeweils 4 SPME-Fasern pro Aldrich-HA-Ansatz verwendet. Daneben wurde eine Pyren-Standardlösung mit gleicher IS und gleichem pH-Wert hergestellt. Verglichen wurden jeweils die Peakflächen, die aus der Analyse der Pyren-Standard- und einer Aldrich-HA/Pyren-Lösung für eine SPME-Faser erhalten worden waren.

3.9 Experimente zur Isotopenfraktionierung von HOS

3.9.1 Einstufiger Sorptionsversuch (Batchexperiment)

Zu einer Suspension aus 60 g Roth-Huminsäure in 600 ml Millipore-Wasser und einer rein wäßrigen Lösung (ohne Huminsäure) wurde eine methanolische Stammlösung von Cyclohexan und Toluol gegeben. Beide Ansätze besaßen durch Zugabe von NaCl (0,02 M) und NaN_3 (0,003 M) die gleiche Ionenstärke. Der pH-Wert wurde auf 7 eingestellt. Der Wasseransatz wurde in dreifacher Weise, der Huminsäureansatz in doppelter Weise ausgeführt. In der HA-Suspension werden infolge der Sorption die Konzentration der frei gelösten Sorptive und damit auch deren Konzentration in der Gasphase drastisch verringert. Um den analytischen Nachweis ausreichend genau ausführen zu können, wurde deshalb in diesem Fall ein größeres Volumen der Stammlösung zugegeben ($c_{\text{Methanol}} \leq 1 \text{ Vol}\%$). Die nachfolgende Tab. 3-2 zeigt die resultierenden Konzentrationen.

Tab. 3-2: Konzentrationen der organischen Substanzen in der rein wäßrigen Lösung und in der Huminsäuresuspension.

Substanz	Konzentration in Wasser /ppm	Konzentration in Huminsäuresuspension (100 g·l ⁻¹ Roth-Huminsäure) /ppm
Cyclohexan	20	900
Toluol	50	750

Nach Schütteln der Proben über einen Zeitraum von 24 Stunden wurden 20 µl Headspacevolumen zur Bestimmung der Sorptionsrate mit einem GC-MS-Gerät (QP5000, Shimadzu) im SIM-Modus analysiert (GC-MS-Bedingungen: $T_{\text{Ofen}} = 40 \text{ °C}$ isotherm, $T_{\text{Injektor}} = 100 \text{ °C}$, Splitverhältnis = 1:50, $T_{\text{Detektor}} = 150 \text{ °C}$).

Des Weiteren wurden die Isotopenverhältnisse in 20 bis 100 µl Headspaceprobe mittels eines GC-C-irMS-Gerätes (MAT 252, Finnigan) bestimmt.

GC-C-irMS-Bedingungen: $T_{\text{Ofen}}: 40 \text{ °C}$ (4 min) – 6 K/min – 150°C – 15 K/min – 200°C, $T_{\text{Injektor}}: 250 \text{ °C}$ (splitlos), $T_{\text{Verbrennungseinheit}}: 980 \text{ °C}$.

3.9.2 Isotopenfraktionierungsexperimente mit einer RP-HPLC-Säule

In Analogie zu den Experimenten von CAIMI et al. wurde der Peak einer organischen Verbindung nach Elution über eine RP-C₁₈-HPLC-Säule in Fraktionen getrennt und diese wurden anschließend einer GC-C-irMS-Analyse unterworfen [CAIMI 1997].

Dazu wurden 100 mg Naphthalin in 20 ml eines ACN/Wasser-Gemisches (50:50 Vol/Vol) gelöst. 200 µl dieser 5 g·l⁻¹ enthaltenden Lösung wurden in ein HPLC-System (Series 1100, Hewlett Packard) bestehend aus Entgaser, binärer Pumpe, manuellem Injektionsventil mit 200-µl-Probenschleife (Knauer), thermostatisierbarem Säulenraum (25 °C) und Diodenarraydetektor (DAD) (254 nm (Spaltbreite: 10 nm), Referenzsignal bei 360 nm (100 nm)) injiziert. Die Flußrate des Eluenten aus ACN/Wasser (50:50 Vol/Vol) betrug 1 ml·min⁻¹. Als Säule

wurde eine RP-HPLC-Säule mit chemisch gebundenen C₁₈-Gruppen verwendet (Alltech Adsorbosphere XL C18 5U (250 mm · 4,6 mm) mit einer Vorsäule aus gleichem Material (7,5 mm · 4,6 mm)). Die Kohlenstoffbeladung des Säulenfüllmaterials mit C₁₈-Gruppen wird vom Hersteller mit 11 Ma% OC angegeben. Die Partikelgröße beträgt 5 µm.

Die eluierende Probe wurde nach Passage des DAD aufgefangen und in gleichen Intervallen manuell in 40 Fraktionen aufgetrennt. Eine Fraktion bestand aus 10 Tropfen. Diese eluierten in 8,6 s. Bei der verwendeten Flußrate folgt daraus ein Fraktionsvolumen von ca. 143 µl.

Die so erhaltenen Fraktionen wurden mit je 100 µl n-Hexan, das 3 g·l⁻¹ Fluoren als internen Standard enthielt, extrahiert. Der Gehalt an Naphthalin in den Fraktionen wurde durch GC-MS-Analyse (QP5000, Shimadzu), das Isotopenverhältnis mittels der GC-C-irMS-Analyse (MAT 252, Finnigan) des hexanischen Extraktes bestimmt. GC-C-irMS-Bedingungen: T_{Ofen}: 70 °C (2 min) - 8 K/min - 250 °C (1 min), T_{Injektor}: 250 °C (splitlos), V_{Inj}: 0,5 - 5 µl, T_{Verbrennungseinheit}: 940 °C.

3.9.3 Präparation einer huminsäurehaltigen Säule

3.9.3.1 Partikuläre Huminsäure als Füllmaterial

Aldrich-Huminsäure-Na-Salz wurde mittels Prüfsieben in verschiedene Siebfraktionen aufgetrennt. 2 g der Fraktion mit einem Korndurchmesser von 63 - 400 µm wurden in 20 ml HCl-saurem Millipore-Wasser (pH 2) suspendiert und in eine leere HPLC-Säule überführt. Dazu wurde an das untere Ende eine Teflonkapillare angeschraubt, an die mittels einer Kunststoffspritze ein leichter Unterdruck angelegt werden konnte, und die Säule senkrecht in ein Ultraschallbad gehängt. Die leere Säule wurde vollständig mit dem sauren Wasser befüllt und die Huminsäuresuspension portionsweise am oberen Ende der HPLC-Säule aufgegeben. Auf diese Weise sollte eine kompakte, gleichmäßige und blasenfreie Packung der Partikel erreicht und somit eine Kanalbildung vermieden werden.

In einem zweiten Ansatz wurde analog - wie oben beschrieben - verfahren, jedoch wurde in diesem Fall 1 g der H-Form der Roth-Huminsäure (63 - 400 µm Korngröße) verwendet und diese auf beiden Seiten der Säule durch eine Schicht aus ca. 2,7 g SiO₂ (63 - 400 µm Korngröße, Merck) begrenzt. Nach dem Verschließen des oberen Säulenendes wurde die so präparierte Säule an die Pumpe des HPLC-Systems angeschlossen und mit Millipore-Wasser, welches mit 0,1 M HCl auf einen pH-Wert von 2 eingestellt worden war, gespült. Nachdem das Eluat farblos war, erfolgte die Verbindung mit dem Detektor.

3.9.3.2 In einer Quarzsandsuspension ausgefällte Huminsäure als Füllmaterial

Zu 400 ml einer Lösung von Roth-Huminsäure mit der Konzentration von 500 mg·l⁻¹ wurden 25 ml einer 0,1 M Fe(NO₃)₃-Lösung und 20 g Quarzsand (63 - 400 µm Korngröße, Merck) gegeben. Der pH-Wert wurde von 2,4 durch Zugabe von NaOH unter Rühren auf einen pH-Wert von ca. 5 angehoben. Bei diesem pH-Wert erfolgte

eine vollständige Flockung der gelösten Huminsäure. Das so erhaltene Flockulat wurde als Suspension in eine leere HPLC-Säule, wie im Kap. 3.9.3.1 beschrieben, gefüllt.

Zuvor wurde die gleiche Säule mit dem Ausgangsmaterial SiO_2 befüllt, um die Charakteristik (Totvolumen, Peakverbreiterung, etc.) einer so gepackten Säule zu bestimmen.

3.9.3.3 Huminsäurebeschichtung von α - und γ - Al_2O_3 als Füllmaterial

Zur Aktivierung der Oberfläche des α - Al_2O_3 wurden analog der von BOILY [2000] beschriebenen Methode die folgenden beiden Prozeduren eingesetzt. Dabei wurde sowohl Material mit einer Korngröße von 74 - 149 μm als auch von 10 - 44 μm verwendet.

- Aktivieren mit 10 %iger HNO_3 und anschließend mehrfaches Waschen mit H_2O bzw.
- Aktivieren mit 10 %iger HNO_3 , mehrfaches Waschen mit H_2O , Aktivieren mit 10 %iger NaOH und mehrfaches Waschen mit H_2O .

Zwischen 0,5 und 3 g des so behandelten Materials wurden zu 100 ml einer Lösung, die zwischen 0,2 und 2 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Roth-Huminsäure enthielt, gegeben. Der pH-Wert wurde im Bereich von 4,5 bis 8 variiert. Die Ionenstärke wurde mit NaCl auf 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ eingestellt. Nach Überkopfschütteln des Reaktionsgefäßes über Nacht wurde der Feststoff durch Zentrifugieren abgetrennt und im Trockenschrank bei 80 °C getrocknet. Der Gehalt an organischem Kohlenstoff des trockenen Produktes wurde mit Hilfe eines Kohlenstoffanalysators (C-Mat 5500, Ströhlein Instruments) bestimmt.

Zur Beschichtung (Coating) des stärker porösen γ - Al_2O_3 ²⁴ wurden 0,5 g Sorbens zu 100 ml einer Lösung von 200 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Roth-Huminsäure bei pH 6 gegeben. Nach Überkopfschütteln des Reaktionsgefäßes über Nacht wurde der Feststoff durch Zentrifugieren abgetrennt und im Trockenschrank bei 80 °C getrocknet. Dieses Material wurde wie im Kap. 3.9.3.1 beschrieben in eine HPLC-Säule eingefüllt.

Ein Teil des so mit Roth-Huminsäure beschichteten γ - Al_2O_3 wurde auch in einem Batchansatz bezüglich seines Sorptions- und Isotopenfraktionierungsverhaltens gegenüber Naphthalin getestet:

Aus einer methanolischen Stammlösung wurde eine wäßrige Naphthalin-Lösung mit einer Konzentration von 19 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ hergestellt (Methanol-Gehalt ca. 0,5 %). Jeweils 3,5 ml dieser Naphthalin-Lösung wurden in 4 ml Vials gegeben. Einem Vial wurden zusätzlich 324 mg des mit Roth-Huminsäure beschichteten γ - Al_2O_3 zugesetzt. Nach Schütteln über Nacht und Abtrennen des Feststoffes durch Zentrifugation wurden je 2,5 ml der Probelösungen mit 250 μl n-Hexan, welches zuvor mit Naphthalin- D_8 ($c = 0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) als internem Standard versetzt wurde, extrahiert. Die Analyse des hexanischen Extraktes erfolgte analog der Beschreibung in Kap. 3.9.2.

²⁴ Korngröße: < 0,063 mm ($\leq 28\%$); 0,063 – 0,2 mm ($\geq 72\%$), spezifische Oberfläche (BET) = 133,1 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$

3.9.3.4 Kovalent an eine anorganische Matrix gebundene Huminsäure als Füllmaterial

Zur Präparation eines Säulenfüllmaterials, an das die Huminsäure kovalent gebunden ist, wurde auf eine Quelle aus der Literatur zurückgegriffen [YANG 1999] und das Füllmaterial in Anlehnung an die dortige Vorschrift - wie nachfolgend beschrieben - hergestellt²⁵:

- Die Oberfläche von 10 g Nucleosil 50-10 (10 µm Korngröße, Macherey-Nagel) wurde in zwei Schritten gereinigt:
 - i) 5-minütiges Schütteln mit einer Lösung bestehend aus NH₄OH, H₂O₂ und H₂O im Verhältnis 1:1:5, danach Dekantieren und Waschen mit H₂O, anschließend
 - ii) 5-minütiges Schütteln mit einer Lösung von HCl:H₂O₂:H₂O im Verhältnis 1:1:5, gefolgt von erneutem Dekantieren und Waschen.

Das so vorbehandelte SiO₂ wurde im Vakuum (0,1 kPa) bei 120 °C 4 Stunden lang getrocknet.

- Das getrocknete SiO₂ wurde unter Luftausschluß zu 170 ml einer 2 %igen Lösung von 3-Aminopropyl-dimethyl-ethoxysilan in Toluol gegeben und 1 Stunde lang gerührt. Nach Filtration unter Luftausschluß wurde der Feststoff im Vakuum (0,1 kPa) bei 160 °C für 6 Stunden getrocknet. 9 g des mit Aminopropyl-dimethyl-ethoxysilan beladenen SiO₂ wurden isoliert.
- 1,7 g Roth-Huminsäure wurden zu 50 ml Wasser gegeben und es wurde mit 1 M NaOH ein pH-Wert von 10 eingestellt. In dieser Lösung wurde der erhaltene Feststoff aufgeschlämmt und 2 Stunden lang geschüttelt. Die Suspension wurde abzentrifugiert und der Rückstand so lange mit Wasser gespült, bis der Überstand farblos blieb.
- Das feuchte, huminsäurebeladene SiO₂ wurde in 50 ml einer Lösung von 840 mg Na-Acetat und 330 mg N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC) suspendiert, die Lösung mit 1 M NaOH auf pH 10 eingestellt und 4 Stunden lang geschüttelt. Die Suspension wurde zentrifugiert. Der Überstand war nur schwach gefärbt und wurde abdekantiert.
- Der feuchte Feststoff wurde erneut in einer Lösung (pH 10) von Na-Acetat (330 mg) und EDC (70 mg) suspendiert und 4 Stunden lang geschüttelt, anschließend abfiltriert, gründlich mit H₂O gewaschen und nach jedem Waschschriff abzentrifugiert. Es waren mehrere Waschschriffe nötig, bis der Überstand nahezu farblos war. Das Endprodukt wurde gefriergetrocknet.

Für das nach obiger Vorschrift erhaltene Material wurde eine Beladung von 5,0 Ma% OC (C-Mat 5500, Ströhlein Instruments) ermittelt. Es wurde durch die Firma MZ Analystechnik (Mainz) nach der Methode von NIELSEN et al. [1997] in Methanol bei 350 bar in eine HPLC-Säule mit 250 mm Länge und 4,6 mm Durchmesser gepackt.

²⁵ Eine schematische Darstellung der nachfolgend beschriebenen chemischen Reaktionen findet sich in Abb. 4-40.

3.9.4 Isotopenfraktionierungsexperimente mit dem HPLC-Säulenfüllmaterial, an das die Huminsäure kovalent gebunden ist

Alle Versuche wurden mit dem in Kap. 3.9.2 beschriebenen HPLC-System (Series 1100, Hewlett Packard) durchgeführt. Zur Injektion wurde hier jedoch ein variabler, automatischer Probengeber eingesetzt. Als Eluent wurde Millipore-Wasser verwendet, welches zuvor durch Zugabe von 0,1 M HCl auf einen pH-Wert von 5 eingestellt worden war. Des Weiteren wurde die Ionenstärke des Eluenten durch Zugabe von 0,58 g·l⁻¹ NaCl auf 0,01 M angehoben. Die Flußrate betrug 1 ml·min⁻¹. Von den Analytsubstanzen wurde jeweils eine Stammlösung hergestellt. Die Lösemittel, die Konzentrationen, sowie die Injektionsvolumina der um den Faktor 100 verdünnten wäßrigen Lösungen sind bei den Einzelversuchen angegeben.

Durch den ersten Analysenlauf wurden die Retentionszeit der jeweiligen Verbindung und die Peakbreite bestimmt. Bei einer zweiten Messung wurden dann die Fraktionen nach Durchgang durch den Diodenarraydetektor (Detektion bei 205 nm mit dem Referenzsignal bei 360 nm und den Spaltbreiten von 16 bzw. 100 nm) über eine Edelstahlkapillare in 4 ml Schraubdeckelgefäße mit federgelagerten Glaseinsätzen (V = 0,3 ml) (Supelco) dosiert. Diese enthielten bereits 100 µl des jeweiligen Extraktionsmittels inklusive des internen Standards. Ein Aliquot der Extrakte wurde zunächst mittels eines GC-MS-Gerätes (QP5000, Shimadzu) im SIM-Modus analysiert, um die (nicht isotopenaufgelöste) Gesamtkonzentration des Analyten zu bestimmen. Eine Auswahl der so untersuchten Proben wurde mittels eines GC-C-irMS-Gerätes (MAT 252, Finnigan) analysiert.

Für **Benzol** wurde eine Stammlösung in Aceton mit einer Konzentration von 100 g·l⁻¹ hergestellt. 25 µl der wäßrigen Lösung mit 1 g·l⁻¹ Benzol (\approx 25 µg Benzol) wurden auf die Säule aufgegeben. Die Substanz eluierte bei 4,618 min als Peak von der Säule. Dieser wurde in Intervallen von 6 s zwischen 4,2 und 6,2 min in 20 Fraktionen getrennt. Dabei wurde darauf geachtet, daß der Ausgang der Edelstahlkapillare in die 100 µl der n-Pentan-Extraktionslösung eintaucht, um eine Abreicherung des leicht flüchtigen Benzols durch Verdampfung auszuschließen. Der Extraktionslösung wurde vorher Toluol mit einer resultierenden Konzentration von 25 mg·l⁻¹ als interner Standard zugesetzt.

GC-C-irMS-Bedingungen: T_{Ofen}: 40 °C (4 min) – 4 K/min – 85 °C – 20 K/min – 150 °C, T_{Injektor}: 250 °C (Splitverhältnis = 1:5), T_{Verbrennungseinheit}: 940 °C.

Für **o-Xylol** wurde ebenfalls eine acetonische Stammlösung hergestellt. Es wurden 50 µl der daraus verdünnten, wäßrigen Lösung (c = 150 mg·l⁻¹) injiziert. Bei 10,077 min eluierte ein Peak, der zwischen 9,4 und 10,4 min in zehn 6 s-Intervalle und zwischen 10,4 bis 20,4 min in 30 weitere Fraktionen unterteilt wurde. Bei letzteren wurde jeweils abwechselnd 10 s lang eine Fraktion aufgefangen, die folgenden 10 s dann keine Fraktion genommen. Dies diente zur Reduzierung der Probenanzahl. Zur Extraktion des o-Xylols aus dem wäßrigen Eluenten wurden jeweils 100 µl n-Pentan mit Toluol als internem Standard (c = 5 mg·l⁻¹) in den Auffanggefäßen vorgelegt.

GC-C-irMS-Bedingungen: T_{Ofen}: 60 °C (4 min) – 4 K/min – 105 °C – 20 K/min – 150 °C, T_{Injektor}: 250 °C (splitlos), T_{Verbrennungseinheit}: 940 °C.

Eine ethanolische Stammlösung von **2,4-Dimethylphenol (2,4-DMP)** wurde in Wasser verdünnt und mit einer Endkonzentration von 1 g·l⁻¹ injiziert. Aus dem Volumen von 25 µl resultiert eine injizierte Masse an 2,4-DMP

von 25 µg. Das Peakmaximum lag bei 5,948 min. Zwischen 5,5 und 7,0 min wurde alle 6 s eine Fraktionen genommen, zwischen 7,0 und 8,0 min alle 12 s. Daraus resultieren 15 bzw. 5 Fraktionen. Diese wurden mit 100 µl Benzol mit *o*-Cresol als internem Standard ($c = 25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) extrahiert.

GC-C-irMS-Bedingungen: $T_{\text{Ofen}}: 85 \text{ }^\circ\text{C}$ (12 min) – 8 K/min – $190 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_{\text{Injektor}}: 250 \text{ }^\circ\text{C}$ (splitlos), $T_{\text{Verbrennungseinheit}}: 940 \text{ }^\circ\text{C}$.

KNO_3 diente als inerte Tracer zur Bestimmung des Totvolumens der Säule. Von der wässrigen Lösung mit einer Konzentration von $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ wurden 25 µl injiziert. KNO_3 eluierte bei 2,020 min als Peak.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Allgemeine Charakterisierung der verwendeten Huminsäuren

Die Kohlenstoff- und Aschegehalte der HAs wurden für luftfeuchte Proben bestimmt. Der Feuchtegehalt der Roth-HA betrug 10,0 Ma%. Das Natrium-Salz der Aldrich-HA ist offensichtlich hygroskopischer, da hier ein Feuchtegehalt von 18,5 Ma% bestimmt wurde.

Tab. 4-1: Kohlenstoff- und Aschegehalte der eingesetzten HAs. Die Angaben beziehen sich auf luftfeuchte Proben.

	<i>Aldrich-HA-Natriumsalz</i>	<i>entaschte Aldrich-HA</i>	<i>Roth-HA</i>	<i>entaschte Roth-HA</i>
Kohlenstoffgehalt /Ma%	37,8	58,3	49,8 ± 0,5	50,7 ± 1,1
Aschegehalt /Ma%	9,7	0,8	7,3 ± 1,4	0,5 ± 0,4

Die Reinigung der HAs nach der im experimentellen Teil beschriebenen Prozedur führte zu einer deutlichen Reduzierung des Aschegehalts. Der höhere Kohlenstoffgehalt der entaschten Aldrich-HA ist darauf zurückzuführen, daß diese HA nach der Reinigung in protonierter Form vorliegt.

Als problematisch erwies sich die Bestimmung des Kohlenstoffgehalts des Aldrich-HA-Natriumsalzes mit dem Kohlenstoffanalysator C-MAT 5500 (Ströhlein Instruments). Hier wurde nach der Verbrennung ein schwarzgefärbter Rückstand erhalten. Der ermittelte Kohlenstoffgehalt war deutlich niedriger als der im Analysenzertifikat des Herstellers angegebene Wert (39,03 Ma%). Diese HA-Probe wurde deshalb in einem Elementaranalysator (RC-412, LECO) auf ihren Kohlenstoffgehalt hin untersucht. Möglicherweise werden im hier verwendeten Elementaranalysator höhere Temperaturen als im C-MAT erreicht. Die nachfolgenden Diagramme zeigen die Freisetzung von Kohlenstoff (gemessen als CO₂) und Wasser als Funktion der Temperatur im Verbrennungsofen des Elementaranalysators.

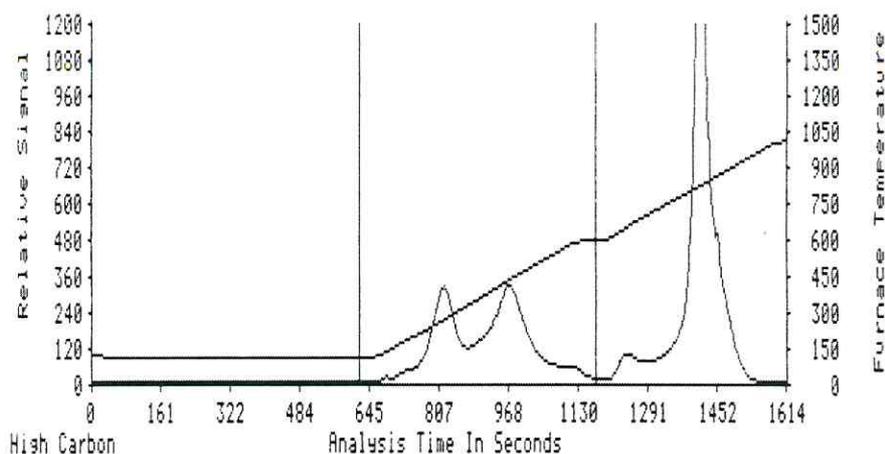


Abb. 4-1: Verlauf der Freisetzung von Kohlenstoff (gemessen als CO_2) als Funktion der Temperatur des Verbrennungsofens bei der Bestimmung des Kohlenstoffgehalts einer luftfeuchten Aldrich-HA-Natriumsalz-Probe mittels eines Elementaranalysators (RC-412, LECO).

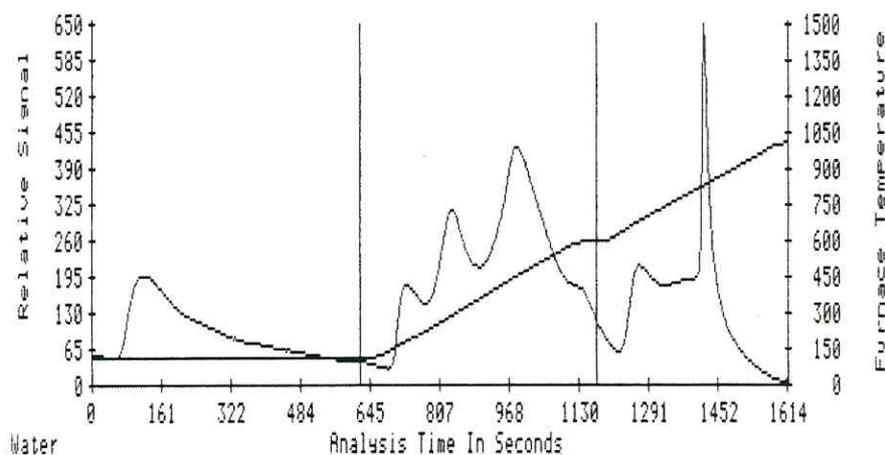


Abb. 4-2: Verlauf der Freisetzung von Wasser als Funktion der Temperatur des Verbrennungsofens bei der Bestimmung des Kohlenstoffgehalts einer luftfeuchten Aldrich-HA-Natriumsalz-Probe mittels eines Elementaranalysators (RC-412, LECO).

Nach der maximal am Gerät einstellbaren Trocknungszeit von 600 s und dem daraus resultierenden Wasserpeak erscheint ab 645 s ein weiterer Wasserpeak von fester gebundenem Wasser im vorderen Abschnitt der ersten Temperaturrampe. Die beiden nachfolgenden Wasserpeaks stimmen zeitlich mit dem Auftreten zweier Kohlenstoffpeaks überein und lassen sich auf die Verbrennung von organischen Verbindungen zu CO_2 und H_2O zurückführen. Ein großer Teil des Kohlenstoffs wird aber erst bei einer Temperatur oberhalb 750°C freigesetzt. Dieser Temperaturbereich wird vor allem der Zersetzung von anorganischen Kohlenstoffverbindungen

zugeschrieben. Dabei entspricht die Summe beider Kohlenstoffquellen einem Wert, der für kohlestämmige HAs dem organischen Kohlenstoffgehalt zugeordnet wird. Diese Anomalie der Kohlenstoffbestimmung wurde nur beim Natriumsalz der Aldrich-HA beobachtet und lässt sich auf die Anwesenheit des Natriums zurückführen. Durch Oxidationsvorgänge können Na-Oxide entstehen, die bei niedrigen Temperaturen CO_2 , das aus der Oxidation von organischem Kohlenstoff gebildet wurde, als Na_2CO_3 binden können. Das CO_2 wird dann erst bei der sehr viel höheren (Zersetzungs-)Temperatur dieser anorganischen Verbindung wieder freigesetzt. Darauf soll an späterer Stelle in Kapitel 4.5.1.2 noch einmal eingegangen werden.

4.2 Ergebnisse der SEC-Analysen

Wie bereits im Theorieteil der SEC-Methode erwähnt (Kap. 2.3.1), handelt es sich bei der SEC um eine relative Größencharakterisierungsmethode. Eine Kalibrierung der SEC-Säulen zur Ermittlung der Molmassenverteilung von HA erfolgte daher unter Berücksichtigung von Literaturempfehlungen [z. B. BERDEN 1990] durch die Analyse von Polystyrolsulfonat (PSS)-Standards und Aceton als niedermolekularem Standard in einer 0,1 M NaNO_3 -Lösung (pH 7) als Eluent. Auf einen Zusatz von Puffersubstanzen konnte verzichtet werden, da ausschließlich bei einem pH-Wert von 7 voräquilibrierte Probenlösungen (teilweise nach Verdünnen mit Eluent) untersucht wurden. Nachfolgend sind die überlagerten Einzelchromatogramme der SEC-Analysen der verwendeten Kalibrierstandards dargestellt.

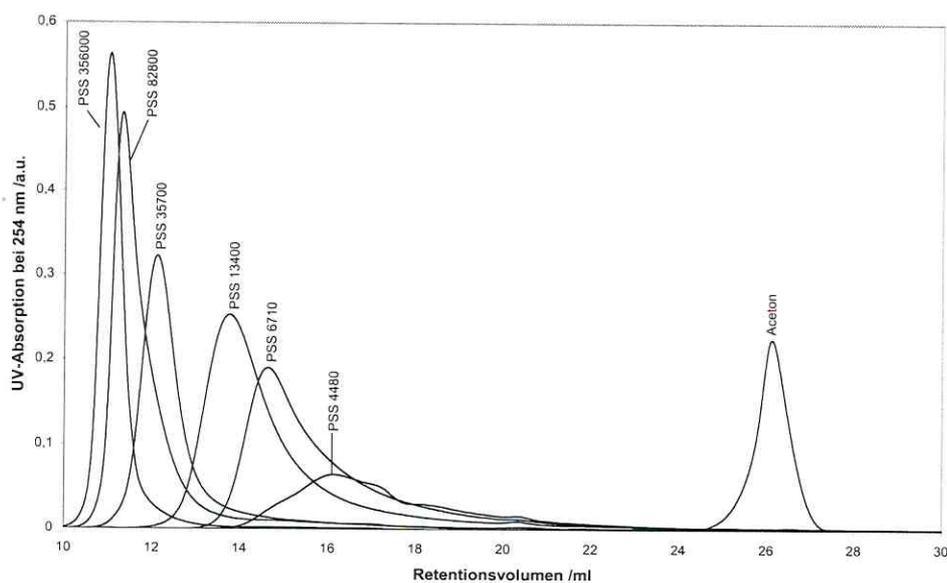


Abb. 4-3: Überlagerung der Einzelchromatogramme, die zur Kalibrierung der SEC-Säulen mit PSS-Standards verschiedener Molmasse und Aceton verwendet wurden. Angegeben sind die vom PSS-Hersteller zertifizierten Molmassenwerte im Peakmaximum (M_p) in Da. Eluent: 0,1 M NaNO_3 (pH 7).

Der PSS-Standard 1120 Da eluierte als breiter Peak mit mehreren Nebenmaxima und einem langen Tailing auch über das totale Permeationsvolumen von ca. 26 ml hinaus und wurde deshalb bei der Kalibrierung nicht berücksichtigt. Eine ähnliche Beobachtung machten auch ZHOU et al. für den PSS-Standard mit der geringsten Molmasse ihrer Kalibrierreihe ($M_p = 1,8$ kDa) [ZHOU 2000]. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß aufgrund der hohen IS von $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ eine verstärkte Adsorption von Probenanteilen an die Gelmatrix des SEC-Säulenmaterials stattfindet. Davon können niedermolekulare Standards in erhöhtem Maße betroffen sein, da ihnen aufgrund ihrer Molekülgröße eine größere (Poren-)Oberfläche für derartige Wechselwirkungen zur Verfügung steht (vgl. [MORI 1999]). Durch (irreversible) Sorption von niedermolekularen PSS-Standards an die Gelmatrix ließen sich auch deren geringen Wiederfindungsraten erklären:

Tab. 4-2: Wiederfindungsraten der PSS-Standards, sowie von Aceton und Aldrich-HA als Verhältnis der Peakflächen der SEC-Peaks und der Peaks bei Umgehung der SEC-Säulen (Eluent: $0,1 \text{ M NaNO}_3$, $\text{pH} = 7$).

Probe	PSS 356000	PSS 82800	PSS 35700	PSS 13400	PSS 6710	PSS 4480	PSS 1120	Aceton	Aldrich -HA
Wiederfindungsrate /%	105	99	100	104	110	55	40	115	81

Üblicherweise werden dem Eluenten zur Vermeidung solcher Adsorptionseffekte von PSS bis zu 20 Vol% eines organischen Lösemittels (Acetonitril oder Methanol) zugesetzt. Dies konnte im Hinblick auf die Auswirkungen auf die HA in dieser Arbeit nicht geschehen. In Gegenwart derart hoher Konzentrationen an organischem Lösemittel würden die HAs mit hoher Wahrscheinlichkeit eine andere Konformation als in rein wäßriger Lösung annehmen. Nachfolgende FQT-Messungen ergäben so keine praxisrelevanten Aussagen. Darüber hinaus wäre eine der SEC-Analyse nachfolgende DOC-Detektion der HA bei einem hohem Gehalt an organischem Lösemittel nicht möglich. Die hohe IS des Eluenten soll unter dem Gesichtspunkt der Praxisrelevanz als ein notwendiges Zugeständnis gesehen werden, um polare Wechselwirkungen zwischen Analyt und stationärer Phase bei der verwendeten Analysenmethode zu unterdrücken. Die hier erhaltene Wiederfindungsrate von 81 % für Aldrich-HA stimmt gut mit Literaturbefunden für vergleichbare Proben unter Anwendung der SEC überein [WU 1995].

Die aus den Analysen erhaltene Kalibrierfunktion ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

Der PSS-Standard 356 kDa diente zur Bestimmung des Ausschlußvolumens V_0 , für das ein Wert von 11,05 ml ermittelt wurde. Das totale Permeationsvolumen von $V_i = 26,17$ ml wurde mittels Aceton ermittelt.

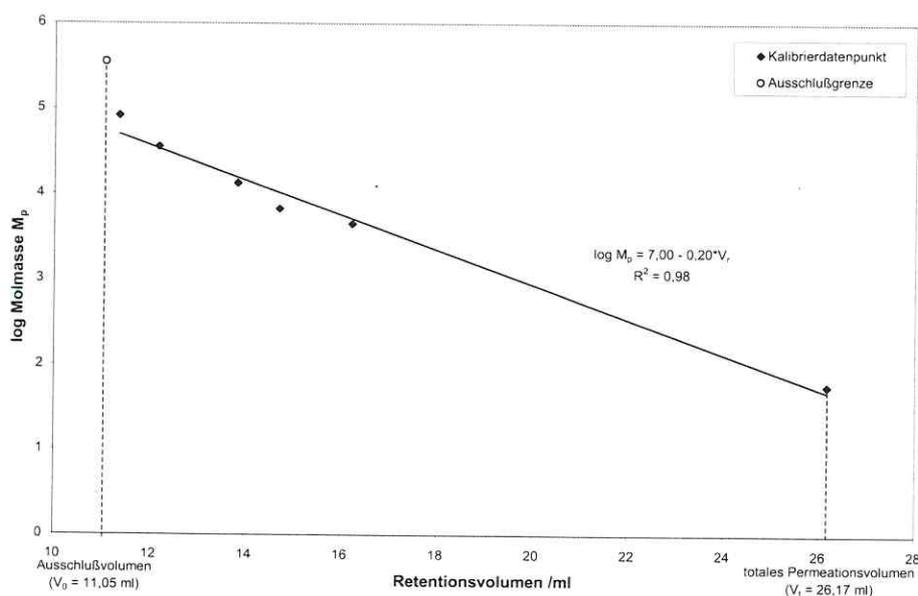


Abb. 4-4: Kalibrierung der verwendeten SEC-Säulen mit PSS-Standards und Aceton unter Verwendung von 0,1 M NaNO_3 (pH 7) als Eluent. Das Ausschlußvolumen (bei PSS 356 kDa) beträgt 11,05 ml, das totale Permeationsvolumen (bei Aceton) 26,17 ml.

In der Literatur wird für die Analyse von DOM mittels der SEC-Methode auch die Verwendung von Phosphatpuffern mit einem Zusatz von NaCl zur Einstellung einer IS von $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ als Eluent beschrieben [z. B. JOHNSON 2002]. Die Verwendung eines 0,025 M Phosphat-Puffers mit pH 6,8 und entsprechendem Zusatz von NaCl zu einer resultierenden IS des Eluenten von 0,1 M führte zu einer - der oben dargestellten - nahezu identischen Kalibrierfunktion bei Anwendung der PSS-Standards und Aceton von $\log M = 7,10 - 0,20 \cdot V_r$ ($R^2 = 0,996$). Für das Ausschluß- und das totale Permeationsvolumen wurden innerhalb der Fehlergrenzen identische Werte bei Einsatz dieses Eluenten gefunden. Ebenso wurden gleiche Peaklagen und -formen für die untersuchten HA-Proben erhalten. Die Art der eingesetzten ein- bzw. mehrwertigen Anionen wirkt sich in diesem Fall offenbar nicht auf die Konformation der PSS-Standards und der HA-Proben aus. Des weiteren beeinflussen sie das Ausmaß der adsorptiven Effekte nicht. Auch hier zeigte der PSS-Standard 1,12 kDa einen breiten Peak mit mehreren Nebenmaxima und konnte deshalb nicht zur Bestimmung der Kalibriergeraden verwendet werden. Nachfolgend sind die Molmassenverteilungen für die HA-Proben unter Verwendung einer 0,1 M NaNO_3 -Lösung (pH 7) als Eluent dargestellt. Dazu ist anzumerken, daß die Peakbreite, die einer Molmassenverteilung der HA-Probe zugeordnet wird, durch chromatographische Effekte erhöht wird. Für die Auswertung wurde jedoch vereinfachend angenommen, daß das Ausmaß der chromatographischen Peakverbreiterung gegenüber der molekülgrößen-bedingten Peakbreite vernachlässigbar klein ist. Diese Annahme sollte durch den sehr breiten SEC-Peak, d. h. die sehr breite Molmassenverteilung der HA-Proben, gerechtfertigt sein. Die Umrechnung des Retentionsvolumens in eine Molmasse erfolgte durch die in Abb. 4-4 angegebene Geradengleichung. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Signalmaxima auf 1 normiert; damit kann die UV-Signalhöhe - welche hier als eine konzentrationsproportionale Größe angesehen wird (vgl. Kap. 4.5.2) - in eine relative Häufigkeit umgerechnet werden.

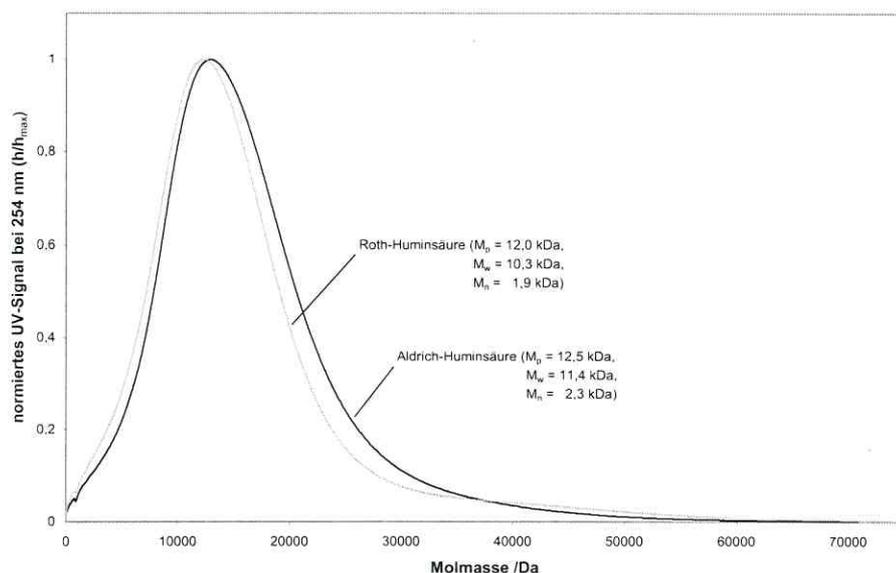


Abb. 4-5: Resultierende Molmassenverteilung von Roth-HA und Aldrich-HA ($c_{HA} = 0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) bei Verwendung der SEC-Kalibrierung aus Abb. 4-4.

Die vergleichsweise geringen Werte für M_n resultieren aus dem langen Tailing der beiden HA-Peaks. Diese Signalhöhen bei geringen Molmassen beeinflussen den M_n -Wert stark. Für eine analog der IHSS-Prozedur gereinigte Aldrich-HA-Probe fanden JOHNSON et al. unter Verwendung eines Phosphat-Puffers in einer NaCl-Lösung ($IS = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; pH 6,8) als Eluent und Kalibrierung der SEC-Säulen mit PSS-Standards einen Wert von $M_p = 5$ kDa und für $M_w = 13,2$ kDa [JOHNSON 2002]. Unter sehr ähnlichen SEC-Bedingungen (Phosphat-Puffer (pH 6,9), NaCl-Zusatz ($IS = 0,03 \text{ M}$), sowie Kalibrierung mit PSS-Standards) erhielten CHIN et al. mittlere Molmassenwerte von $M_n = 3$ kDa und $M_w = 4,3$ kDa für eine gereinigte Aldrich-HA. NGO verwendete einen $0,005 \text{ M}$ Tris(hydroxymethyl)amino-methan (TRIS)-Puffer in $0,01 \text{ M}$ NaCl-Lösung (pH 9,1) als Eluent. Mit Hilfe der Kalibrierung der beiden parallel verwendeten SEC-Säulen durch PSS-Standards erhielt er - je nach Säule - einen Wert von $M_p < 3,8$ kDa bzw. $6,6$ kDa für die Aldrich-HA-Probe [NGO 2000].

Hier zeigt sich der oftmals beschriebene Einfluß der IS, des pH-Wertes und nicht zuletzt des verwendeten Säulenfüllmaterials auf die Ergebnisse der Molmassenbestimmung der mittels SEC untersuchten HA-Probe (z. B. [BECHER 1985]). Ein direkter Vergleich der Molmassenwerte bei Anwendung unterschiedlicher Eluenten (und SEC-Säulenmaterialien) wird dadurch erschwert.

Die SEC diente in dieser Arbeit aber vor allem dem Zweck, eine Trennung der HA-Proben nach ihrer Molekülgröße (und Molmasse) vorzunehmen, um durch eine nachfolgende Analyse der Wechselwirkungen mit HOS zu einer Aussage über die Abhängigkeit des Sorptionskoeffizienten von der Molmasse einzelner HA-Fractionen zu gelangen. Daher wurden hier keine weiteren Untersuchungen zum Einfluß der IS und des pH-Wertes des Eluenten auf die scheinbare oder ‚wahre‘ Molekülgröße der HA-Probe durchgeführt.

4.3 Ergebnisse der AF⁴-Analysen von Huminsäure-Proben

In einer Reihe von Vorexperimenten wurden die Parameter der AF⁴-Analyse optimiert. Dazu gehörte u.a. die Kanaldicke *w*. Bei Einsatz der vom Hersteller des AF⁴-Systems gelieferten Abstandhalter (Spacer) (100, 190 und 350 μm) konnte keine ausreichende Auftrennung der PSS-Standards und der HA-Proben erzielt werden. Der Bereich der anwendbaren Querflußraten wurde dadurch begrenzt, daß der Kanal eine relativ geringe Druckstabilität aufwies. Dabei ist die Trennung nicht nur von den absoluten Flußraten von Quer- und Kanalfluß abhängig. Sie wird auch durch das Verhältnis von Quer- zu Längsflußgeschwindigkeit beeinflusst. Erst durch den gleichzeitigen Einsatz von zwei Spacern mit einer Gesamtstärke von 450 bzw. 540 μm konnten ausreichend hohe Verhältnisse dieser Flüsse bei einer Kanalflußrate von 0,7 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ innerhalb der Druckgrenzen des Kanals realisiert und auf diese Weise eine Auftrennung der untersuchten Proben erzielt werden. Ein ähnliches Resultat wird auch von SCHIMPF [2000] beschrieben. Bei der Auswahl geeigneter UF-Membranen konnte - aufgrund von langanhaltenden Lieferschwierigkeiten von Membranen aus regenerierter Cellulose mit einem kleinem Cut-off - lediglich auf Polyethersulfon (PES)-Membranen zurückgegriffen werden. Von einer Eigenanfertigung von Membranen, wie sie in der Literatur von BECKETT et al. beschrieben worden ist, wurde in dieser Arbeit abgesehen [BECKETT 1992]. In den Voruntersuchungen wurden deshalb PES-Membranen zweier verschiedener Lieferanten auf ihre Verwendbarkeit hin untersucht. Dabei zeigte sich, daß für die PES-Membran mit einem - vom Hersteller angegebenen - Cut-off von 1 kDa eine geringere Wiederfindungsrate für eine HA-Probe erhalten wurde als für eine andere Membran aus gleichem Material mit einem nominellen Cut-off von 4 kDa. Auch ein PSS-Standard mit einer Molmasse (M_p) deutlich oberhalb des angegebenen Cut-off-Wertes wies eine geringere Wiederfindungsrate auf (Tab. 4-3). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von NGO [2000] und verdeutlicht die Notwendigkeit von Voruntersuchungen zur Auswahl einer geeigneten Membran.

Tab. 4-3: Vergleich der Wiederfindungsraten durch die Bypass-Methode sowie in Ab- und Anwesenheit eines Querflusses zweier unterschiedlicher Membranen.

Membran (Lieferant)	Probe	Wiederfindungsrate /%	
		ohne Querfluß	mit Querfluß
1 kDa PES (ConSensus)	Roth-HA	57 \pm 2	22 \pm 2
1 kDa PES (ConSensus)	PSS 13,4 kDa	78 \pm 3	32 \pm 3
4 kDa PES (PostNova)	Roth-HA	95 \pm 4	50 \pm 3

Bedingungen: Eluent: 0,1 M NaNO₃ (pH 7); 20- μl -Probenschleife; Detektorfluß = 0,7 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, Querfluß = 3,3 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

In der vorstehenden Tabelle sind die mittels der Bypass-Methode bestimmten Wiederfindungsraten dargestellt. Dabei wurde die Peakfläche bei Umgehung des AF⁴-Kanals mit jenen Flächen verglichen, die ohne und mit Querfluß innerhalb des AF⁴-Kanals erhalten wurden. Der hohe Wert der Wiederfindungsrate von 95 \pm 4 % in Abwesenheit eines Querflusses deutet auf eine geringe Sorptionsneigung der (Roth-)HA an die 4 kDa PES-Membran (PostNova) hin und steht der Annahme entgegen, daß die hydrophoben Eigenschaften des Membranmaterials zu einer erhöhten Sorption führen sollten [NGO 2000]. Ein deutlicher Probenverlust tritt bei Anwendung der zur Trennung verwendeten Querflußrate auf. Der Wert liegt allerdings in einer ähnlichen Größenordnung wie er von BECKETT et al. für eine Polysulfon-Membran (Millipore) mit einem Cut-off von 10 kDa und einem TRIS-Puffer (pH 8) als Eluent gefunden wurde. Für eine HA mit einem M_w von 4,39 kDa wurde

hier eine Wiederfindungsrate von 65 % erhalten [BECKETT 2000]. Ebenfalls unter Verwendung eines TRIS-Puffers (pH 9,1) konnte NGO für eine Membran aus regenerierter Cellulose (5 kDa, Schleicher & Schüll) eine Wiederfindung von Aldrich-HA von $83,5 \pm 3,2\%$ erhalten [NGO 2000]. Diese Membran stand als geträgerte UF-Membran für diese Arbeit nicht zur Verfügung. Insgesamt können jedoch Wiederfindungsraten von $\leq 50\%$ für HA nicht als befriedigende Lösung in der AF⁴ angesehen werden.

Um die Ergebnisse der Molmassenverteilung und zur Frage einer molmassenabhängigen Sorption von HOS an HA vergleichen zu können, wurde hier der gleiche Eluent wie zur SEC-Analyse verwendet. Daher zielten die weiteren Voruntersuchungen auf eine Optimierung der AF⁴-Bedingungen mit diesem Eluenten unter ausschließlicher Verwendung der 4 kDa PES-Membran (PostNova) ab.

Im Vergleich zu einer SEC-Säule erfolgt in einem AF⁴-Kanal eine Überladung des Trennsystems bereits bei deutlich geringeren Probenmengen. Die nachfolgende Abbildung zeigt, daß bei einer AF⁴-Analyse die für die SEC-Analyse empfohlene Analytkonzentration von ca. 0,1 % in der Probenlösung eines Polymerstandards mit $M_p = 6710$ Da (PSS-Standard) [WU 1995] eine deutlich kleinere Elutionszeit erhalten wird. Die Konzentration des PSS-Standards 6710 Da von $2,06 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ entspricht bei einem Injektionsvolumen von $20 \mu\text{l}$ dabei einer injizierten Masse von 41200 ng . Für injizierte PSS-Massen zwischen 260 und 4120 ng werden hingegen annähernd identische Elutionszeiten erhalten.

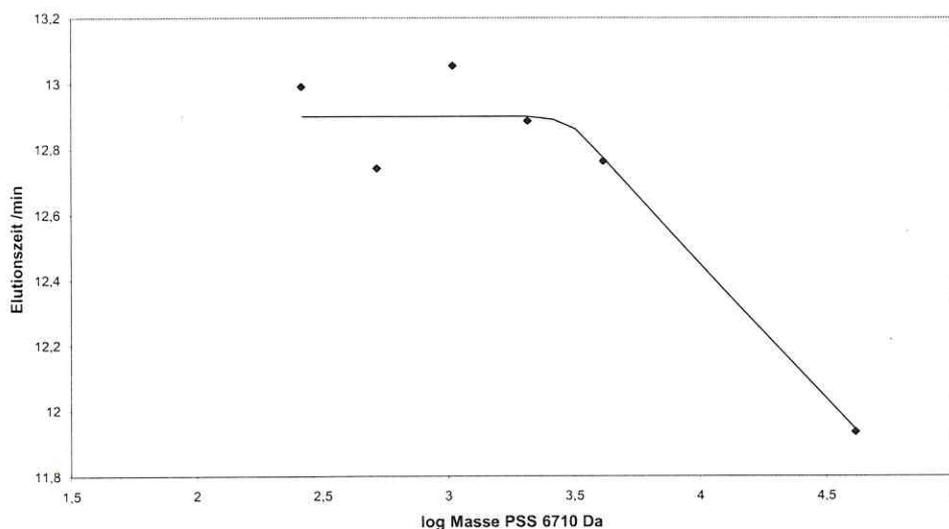


Abb. 4-6: Einfluß der injizierten Masse des PSS-Standards mit $M_p = 6710$ Da auf die Elutionszeit des Peakmaximums. Die injizierten Massen betragen: 260, 520, 1040, 2060, 4120 und 41200 ng . AF⁴-Bedingungen: $0,1 \text{ M NaNO}_3$ (pH 7); AF⁴-Gradientenprogramm, Probenschleife = $20 \mu\text{l}$.

Ein derartiger Effekt ist möglicherweise auf die enge Molmassenverteilung der Polymerstandards zurückzuführen. Sehr große Populationen innerhalb der „(Strömungs-)Schichten“ eines AF⁴-Kanals können zu verstärkten (abstoßenden) Wechselwirkungen zwischen den Molekülen in der entsprechenden Höhe λ führen, so daß ein Teil der Moleküle in Schichten gezwungen wird, die nicht ihrem hydrodynamischen Radius entsprechen.

Die Verdrängung dürfte - aufgrund der exponentiellen Masseverteilung (vgl. Abb. 2-11) - besonders in Richtung gering populierter Schichten erfolgen. Diese Schichten besitzen aber eine höhere Fließgeschwindigkeit, was zu der beobachteten geringeren Elutionszeit für das Maximum des Gesamtpeaks führt. NGO fand eine Zunahme des Einflusses der Konzentration von PSS-Standards mit steigender Molmasse auf die Elutionszeit bei Anwendung eines TRIS-Puffers (pH 9,1) als Eluent [NGO 2000]. BENINCASA und GIDDINGS erhielten je nach eingesetztem Eluent unterschiedliche Abhängigkeiten der Elutionszeit für einen hochmolekularen PSS-Standard (690 kDa) von der aufgegebenen Probenmenge: Bei Verwendung eines 0,05 M TRIS-Puffers (pH 8,6) stieg die Elutionszeit mit abnehmender Probenmenge an, wohingegen bei Einsatz einer 1 M NaCl-Lösung ein geringes Absinken der Elutionszeit mit abnehmender Probenmenge gefunden wurde. Die Autoren führen dies auf ein unterschiedliches Verhalten des Polyelektrolyten in Abhängigkeit von der IS zurück [BENINCASA 1992].

Im Fall der untersuchten HAs konnte bei injizierten Massen zwischen 1 und 20 μg HA unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen keine Änderung der Elutionszeit des Peakmaximums beobachtet werden.

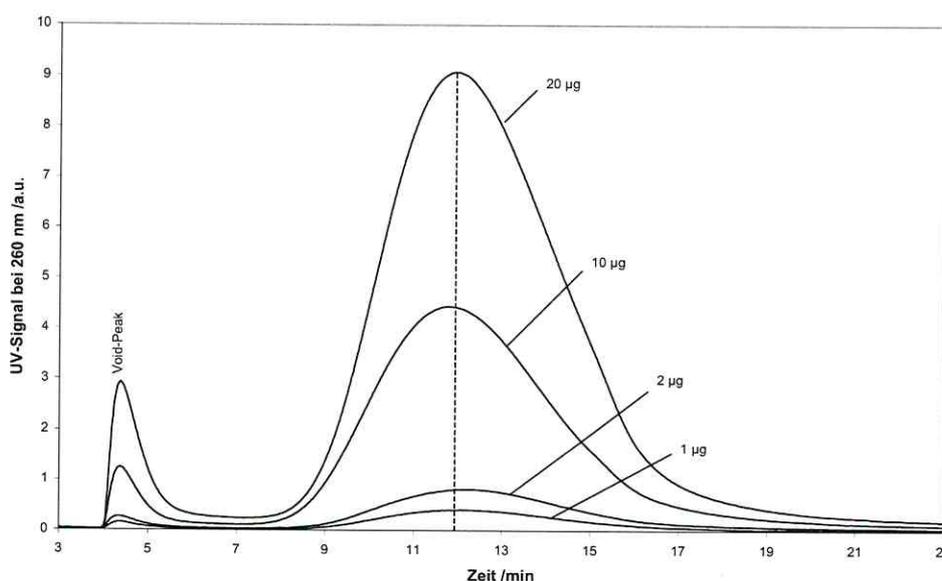


Abb. 4-7: Abhängigkeit der Signallage von der aufgegebenen HA-Masse (Roth-HA). Die gestrichelte Linie markiert das Peakmaximum bei einer Masse von 20 μg HA. Bedingungen: 0,1 M NaNO_3 (pH 7); 20- μl -Probenschleife; AF^4 -Gradientenprogramm.

Dies liegt wahrscheinlich an der breiteren Molmassenverteilung der untersuchten HA-Proben. So ist anzunehmen, daß in einer definierten Höhe λ_i weniger Teilchen mit einem identischen hydrodynamischen Radius vorhanden sind als im Fall der engverteilten Polymerstandards. Dadurch ist die Gefahr von Verdrängungseffekten geringer. Um zu vermeiden, daß die oben beschriebenen Masseneffekte eine Größenanalyse der HA-Proben überlagern, wurden entsprechend gering konzentrierte Probenlösungen zur Molmassenbestimmung der HA-Proben eingesetzt.

Eine Größenanalyse mittels der AF^4 kann im niedermolekularen Bereich auch durch die Überlagerung des eigentlichen Substanzpeaks mit dem sog. Voidpeak gestört werden.

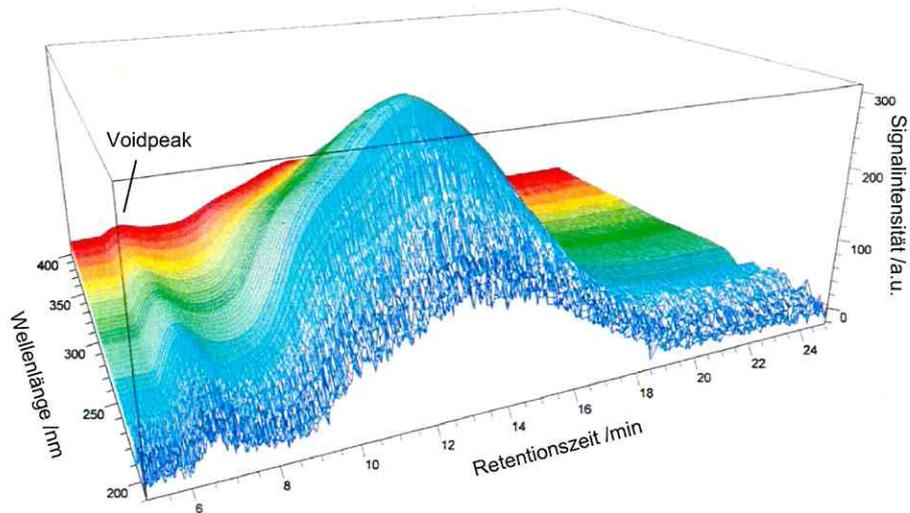


Abb. 4-8: Fraktogramm der unbehandelten Aldrich-HA bei AF^4 -Trennung und Detektion mittels DAD zur Aufnahme von UV-Spektren. Bedingungen: 0,1 M $NaNO_3$ (pH 7); 20- μ l-Probenschleife; AF^4 -Gradientenprogramm. Retentionszeit nicht mit den anderen Abbildungen dieses Kapitels vergleichbar.

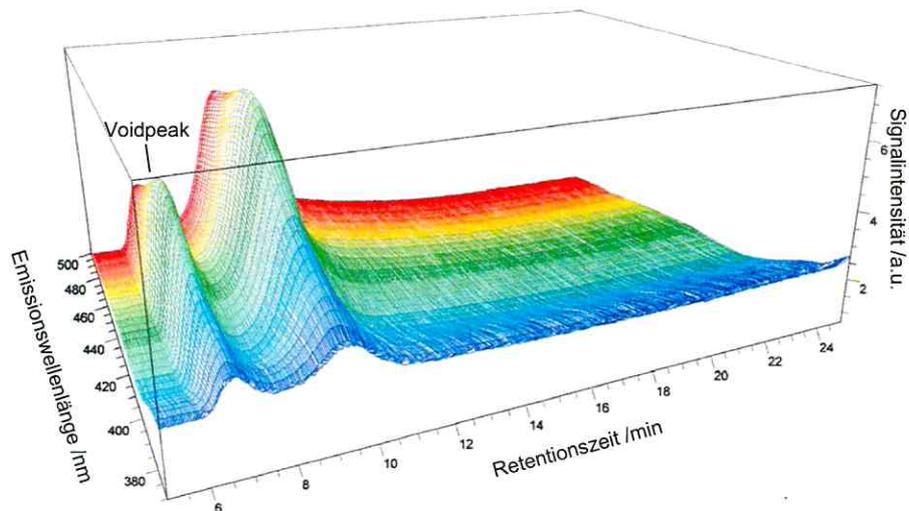


Abb. 4-9: Fraktogramm der unbehandelten Aldrich-HA bei AF^4 -Trennung und Fluoreszenzdetektion zur Aufnahme von Emissions-Spektren ($\lambda_{ex} = 335$ nm). Bedingungen: 0,1 M $NaNO_3$ (pH 7); 20- μ l-Probenschleife; AF^4 -Gradientenprogramm. Retentionszeit nicht mit den anderen Abbildungen dieses Kapitels vergleichbar.

Die Gründe für das Auftreten eines solchen (System-)Peaks sind bisher nicht vollständig geklärt. Zu einem geringeren Teil wird er durch einen Druckunterschied verursacht, der durch den Umschaltvorgang des Multipositionsventils auf den Elutionsmodus erzeugt wird, wie man aus der Injektion einer Blindprobe (reiner Eluent) sehen kann. Dieser (immer auftretende) Druckpeak wird aber im Fall einer Probenaufgabe von einem größeren Substanzpeak überlagert, bei dem wahrscheinlich nicht vollständig relaxierte Probenanteile vorzeitig aus dem Kanal eluiert werden. Flußschwankungen unmittelbar nach dem Umschalten des Multipositionsventils leisten möglicherweise einen weiteren Beitrag zum Ausmaß des Voidpeaks. Offensichtlich nimmt seine Intensität mit geringerer Probenmenge und größerem Abstand des Substanzpeaks vom Voidpeak ab. Das Auftreten eines im Vergleich zum UV-Signal relativ großen Fluoreszenzsignals mit Wellenlängen, die im allgemeinen niedermolekularen HA-Bestandteilen bzw. FA-Anteilen zugeordnet werden ($\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em, max.}} \approx 450 \text{ nm}$) [MIANO 1988], deutet daraufhin, daß vor allem eben diese niedermolekularen Probenanteile mit einem hohen Diffusionskoeffizienten innerhalb des Voidpeaks eluieren, wie die vorstehenden Abbildungen zeigen.

Um stark polydisperse Proben wie HA-Lösungen zunächst vom Voidpeak des Systems abzutrennen und anschließend vollständig, in angemessener Zeit und vor allem in detektierbaren Konzentrationen aus dem AF⁴-Kanal eluieren zu können, müssen neben den anfänglich hohen Querflußraten im Verlauf der Elution geringere Querflußraten angewendet werden. Dies geschieht durch Verwendung eines programmierten linearen Gradienten, bei dem die Querflußrate unter Beibehaltung einer konstanten Kanalauslaß- bzw. Detektorflußrate (hier $0,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) reduziert wird. Damit wird das Retentionsverhältnis R^F zu einer zeitabhängigen Funktion und die im Theorieteil dargestellten Gleichungen für ein konstantes Kraftfeld können hier nicht zur Auswertung benutzt werden.

Bei konstanter mittlerer axialer Fließgeschwindigkeit $\langle v \rangle$ ist die Totzeit des AF⁴-Kanals t^0 gegeben durch $L/\langle v \rangle$, wobei L die Länge des AF⁴-Kanals ist:

$$\text{Gl. 4-1} \quad t^0 = \int_0^{t_r} R^F \cdot dt$$

Eine analytische Lösung dieser Gleichung ist nur durch die Einführung von Vereinfachungen möglich [WILLIAMS 2001]. An dieser Stelle soll daher auf die Berechnung von Diffusionskoeffizienten verzichtet werden. Da aus den experimentellen Daten einer AF⁴-Analyse ohnehin nur der Diffusionskoeffizient D (bzw. der hydrodynamische Durchmesser d_{hyd}) als absolute Größe berechnet werden kann, ist die Darstellung der Molmassenverteilung einer Probe nur durch die Anwendung von Standards mit bekannten Molmassen möglich. Unter der Voraussetzung, daß die für die AF⁴-Bedingungen ermittelte Beziehung zwischen den Diffusionskoeffizienten und den Molmassen der PSS-Kalibrierstandards auf die HA-Probe übertragbar ist, kann aus den experimentell zugänglichen Diffusionskoeffizienten einer HA-Probe ihre Molmassenverteilung bestimmt werden [BECKETT 1987]. Damit ist die Bestimmung der Molmassenverteilung einer HA-Probe auch bei einer AF⁴-Analyse auf eine relative Kalibrierung angewiesen. Vereinfachend wurde deshalb hier eine der SEC-Kalibrierung analoge Verfahrensweise zur Ermittlung der Molmassenverteilung einer HA-Probe durchgeführt, wie sie in der Literatur beschrieben ist [SCHIMPF 1997, BECKETT 2000]. Eine Bestimmung der Kanalparameter w und t_0 ist bei dieser Vorgehensweise nicht notwendig. Auch bei Anwendung eines Feldgradienten kann aus der Auftragung des Logarithmus der Molmasse M_p der PSS-Standards gegen den

Logarithmus der Elutionszeit der Zusammenhang zwischen den beiden Parametern erhalten werden. Innerhalb der Molmassengrenzen der verwendeten PSS-Kalibrierstandards kann so die Molmassenverteilung der HA-Probe durch Interpolation bestimmt werden. Auf eine Extrapolation der Werte weit über die Molmassengrenzen der PSS-Standards hinaus sollte verzichtet werden, da bei Anwendung eines Feldgradienten der weitere Verlauf der Kalibrierfunktion nicht sicher prognostiziert werden kann. Bei einem hinreichend großen Molmassenbereich der Kalibrierstandards sollte die Gefahr einer Beeinflussung der M_n - und M_w -Werte gering sein. Die untere Molmassengrenze und somit die Werte, die den M_n -Wert stark beeinflussen, werden bei der AF^4 durch den realen Cut-off der Membran bestimmt. Bei Anwendung eines konstanten Querflusses muß im Fall von HA-Proben die obere Grenze häufig durch eine annähernd willkürliche Festlegung bestimmt werden [NGO 2000]: Aufgrund der breiten Molmassenverteilung besitzen viele HA-Proben bei Anwendung eines konstanten Querflusses ein langes Tailing und das Detektorsignal erreicht auch nach sehr langer Elutionszeit nicht wieder das Basislinienniveau. Der hier verwendete PSS-Standard 356 kDa hingegen besitzt ein Peakmaximum, welches bei Anwendung eines Feldgradienten mit einer deutlich höheren Elutionszeit als der Tailingbereich des HA-Peaks eluiert.

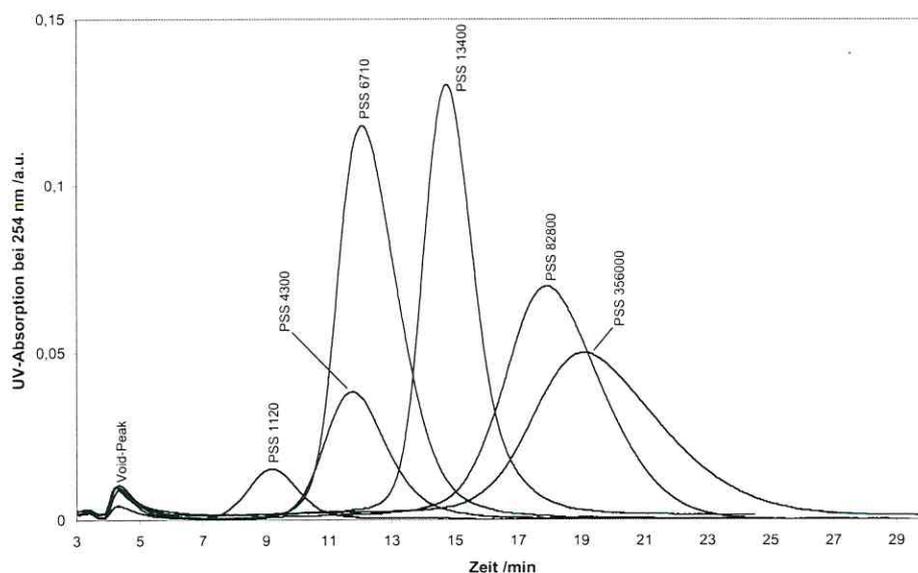


Abb. 4-10: Überlagerung der Einzelfraktogramme der zur Kalibrierung des AF^4 -Systems verwendeten PSS - Standards; Eluent: 0,1 M $NaNO_3$ (pH 7); AF^4 -Gradientenprogramm, 20- μ l-Probenschleife, $c_{PSS} \approx 100$ ppm.

Nachfolgend ist die Wiederfindungsrate in Abhängigkeit von der Molmasse der PSS-Standards dargestellt. Für die Aldrich-HA-Probe wurde ein ähnlich niedriger Wert wie für die Roth-HA gefunden (vgl. Tab. 4-3). Da in Voruntersuchungen durch Anwendung der Bypass-Methode bereits gezeigt werden konnte, daß ohne Querfluß für die verwendete 4 kDa PES-Membran (PostNova) eine nahezu vollständige Wiederfindung erzielt werden konnte, wurde hier lediglich der Einfluß der realen Trennbedingungen (mit Querfluß) auf die

Wiederfindungsrate bestimmt. Dazu wurden die Peakflächen, die mit bzw. ohne Querfluß erhalten worden sind, zueinander in Beziehung gesetzt.

Tab. 4-4: Abhängigkeit der Wiederfindungsrate von der Molmasse am Beispiel der PSS-Standards und einer 4 kDa PES-Membran (PostNova). Dazu im Vergleich die Wiederfindungsrate von Aldrich-Huminsäure. Die Angaben in Prozent beziehen sich auf die Peakflächen in Ab- und Anwesenheit eines Querflusses.

Probe	PSS 1120	PSS 4300	PSS 6710	PSS 13400	PSS 82800	PSS 356000	Aldrich-HA
Wiederfindungsrate /%	11	74	73	89	83	94	56

Bedingungen: Eluent: 0,1 M NaNO₃ (pH 7); 20-µl-Probenschleife; Detektorfluß = 0,7 ml·min⁻¹, Querfluß = 0 ml·min⁻¹ bzw. Gradientenprogramm.

Mit der oben beschriebenen Auswertemethode wurde unter Verwendung der PSS-Standards die folgende Kalibriergerade erhalten.

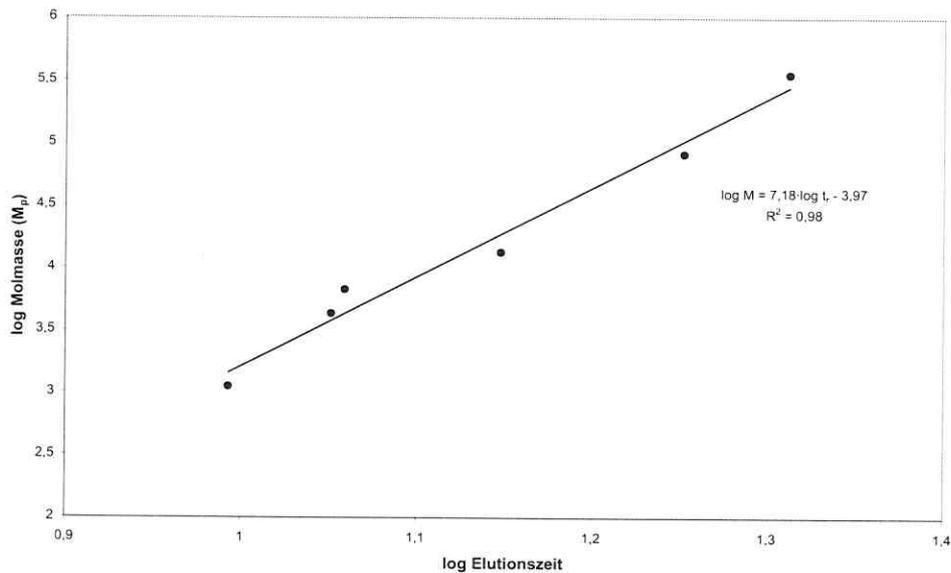


Abb. 4-11: Kalibrierfunktion für die AF^I aus der Auftragung des Logarithmus der Elutionszeit des Peakmaximums gegen den Logarithmus der Molmasse der PSS-Standards ($\log M_p$) mit 0,1 M NaNO₃-Lösung als Eluent.

Mit Hilfe dieser Kalibrierfunktion und unter Vernachlässigung einer chromatographischen Peakverbreiterung (vgl. Kap. 4.1) können die nachfolgend dargestellten Fraktogramme der Aldrich-HA bzw. Roth-HA in die in Abb. 4-13 dargestellten Molmassenverteilungen umgerechnet werden. Die aus den dargestellten Molmassenverteilungen erhaltenen Werte M_p , M_n und M_w für die HA-Proben sind im Diagramm mit dargestellt.

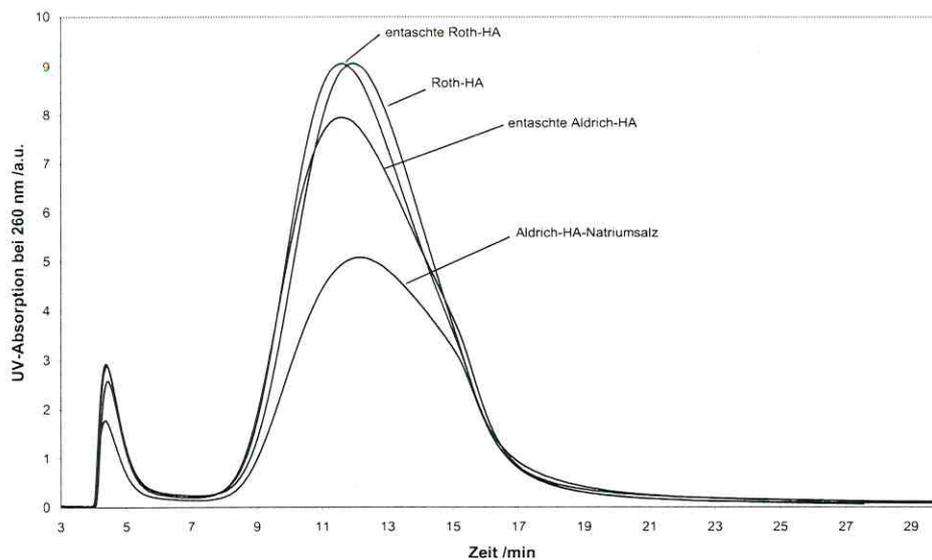


Abb. 4-12: Fraktogramme der Roth- und Aldrich-HA als unbehandelte und entaschte Huminsäure-Proben (c_{HA} jeweils ca. $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$). Eluent: $0,1 \text{ M NaNO}_3$ (pH 7); AF^4 -Gradientenprogramm; $20\text{-}\mu\text{l}$ -Probenschleife.

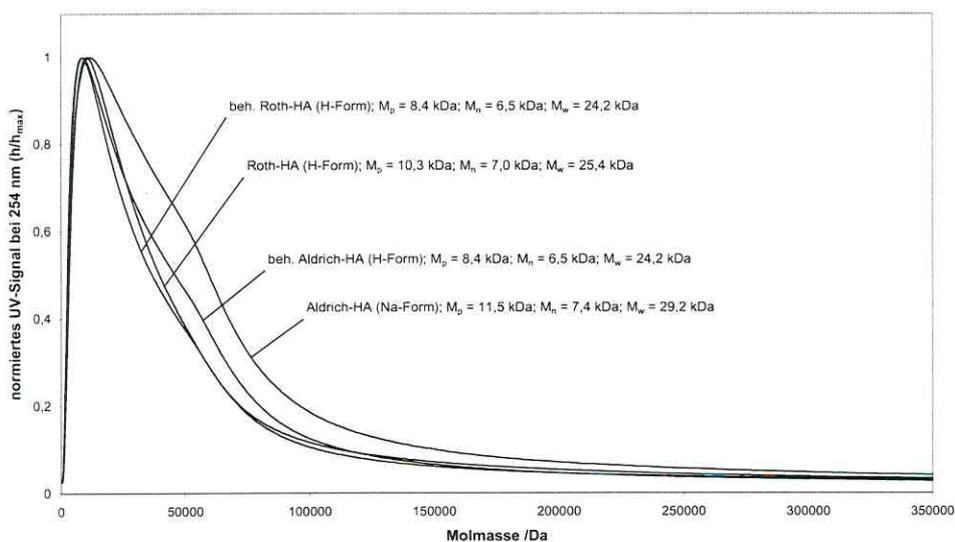


Abb. 4-13: Darstellung der Molmassenverteilung von unbehaltener und entaschter (behandelter) Roth- bzw. Aldrich-Huminsäure in den Grenzen von 7,5 bis 21 min (vgl. Abb. 4-12) unter Anwendung der in Abb. 4-11 dargestellten AF^4 -Kalibrierfunktion. Die Werte für M_n und M_w wurden in den oben genannten Grenzen berechnet.

Aus der Betrachtung der vorstehenden Abbildung läßt sich erkennen, daß für die entaschten Proben vergleichbare Daten erhalten werden wie für die unbehandelten HA-Proben. Die ermittelten Molmassen für das Peakmaximum besitzen vergleichbare Werte, wie sie aus den SEC-Analysen der HA-Proben erhalten worden sind. Deutliche Unterschiede findet man für die M_n - und M_w -Werte bei Vergleich mit den SEC-Experimenten.

Tab. 4-5: Zusammenstellung der Ergebnisse der Molmassenbestimmung von verschiedenen HA-Proben mittels der SEC- und der AF⁴-Methode nach Kalibrierung mit PSS-Standards.

Probe	Roth-HA		entaschte Roth-HA		Aldrich-HA		entaschte Aldrich-HA	
	SEC	AF ⁴	SEC	AF ⁴	SEC	AF ⁴	SEC	AF ⁴
M_p /kDa	12,0	10,3	n. b.	8,4	12,5	11,5	n. b.	8,4
M_n /kDa	1,9	7,0	n. b.	6,5	2,3	7,4	n. b.	6,5
M_w /kDa	10,3	25,4	n. b.	24,2	11,4	29,2	n. b.	24,2

n.b. = nicht bestimmt

Die bei Anwendung der AF⁴-Methode erhaltenen höheren M_w -Werte dürften darauf zurückzuführen sein, daß auch hochmolekulare Anteile der HA-Proben mittels einer AF⁴-Analyse auftrennbar sind und durch die Anwendung eines Feldgradienten den Kanal noch in nachweisbarer Konzentration verlassen können. Der M_w -Wert aus den AF⁴-Analysen wird daher besonders durch diesen hochmolekularen Anteil der HA-Proben beeinflusst. Bei einer SEC-Trennung hingegen eluieren alle Moleküle oberhalb des Cut-offs der Trennsäule bei V_0 , so daß ihnen nur die diesem Retentionsvolumen entsprechende Molmasse zugeordnet wird. Allerdings kann ein Beitrag von sorptiven Wechselwirkungen zwischen HA und Membran als Ursache für das beobachtete Peaktailing der AF⁴-Analyse nicht ausgeschlossen werden.

Der M_n -Wert hingegen wird besonders durch die niedermolekularen Anteile einer (HA-)Probe bestimmt. Aufgrund des notwendigen Einsatzes einer UF-Membran bei der AF⁴-Methode und der relativ niedrigen Wiederfindungsraten ist anzunehmen, daß vor allem niedermolekulare Anteile der HA-Proben durch den Boden des AF⁴-Kanals verloren gehen und daher ein höherer M_n -Wert bei Anwendung dieser Methode im Vergleich zur SEC resultiert.

Beide Befunde zusammenfassend läßt sich schlußfolgern, daß beide angewandten Methoden - SEC und AF⁴ - eine methodisch bedingte Verfälschung der ‚wahren‘ Molekülgrößenverteilung von HA-Proben verursachen. Die tatsächliche Breite der Molmassenverteilung (M_w/M_n) wird wahrscheinlich erst durch die Kombination der Befunde aus beiden Methoden annähernd richtig wiedergegeben.

Für die Molmasse von Aldrich-HA mittels der Fluß-Feldflußfraktionierungsmethode (F-F³) werden in der Literatur unterschiedliche Werte gefunden. Eine enge Molmassenverteilung der Aldrich-HA fanden DYCUS et al. bei Anwendung der SF⁴-Methode und einer FL-70 (Tensid)-Lösung (0,05 %) mit einem Zusatz von NaN₃ (0,03 %) bei pH 7. Die aus der Kalibrierung mit PSS-Standards ermittelten Werte für M_n und M_w betragen 2,3 kDa bzw. 3,2 kDa. Einen TRIS-Puffer als Eluent befanden sie als ungeeignet, da hier deutlich größere Verluste an niedermolekularen PSS-Standards auftraten [DYCUS 1995]. NGO erhielt unter Verwendung eines derartigen TRIS-Puffers (pH 9,1) aus der SF⁴-Analyse und Kalibrierung mit PSS-Standards Werte für die Aldrich-HA von $M_n = 1,7$ kDa und $M_w = 3,3$ kDa [NGO 2000]. Der M_w -Wert könnte hier allerdings durch die Wahl der hochmolekularen Peakgrenze unter Abschneiden eines großen Teils des langen Tailings zu niedrigen Werten hin beeinflusst sein.

Ebenfalls unter Verwendung eines TRIS-Puffers (pH 7,9) und Kalibrierung des SF⁴-Kanals mit PSS-Standards ermittelten BECKETT und HART Molmassenwerte der Aldrich-HA von $M_n = 3,07$ kDa und $M_w = 14,5$ kDa [BECKETT 1993].

SCHIMPF und WAHLUND verglichen eine verdünnte NaOH-Lösung (pH 8,5) und einen Phosphat-Puffer (pH 6,8) als Eluenten miteinander und erhielten bei gleichem Retentionsvolumen der PSS-Standards deutlich verschiedene Retentionsvolumina der drei untersuchten HA-Proben. Die daraus resultierenden Molmassen für die HA unterschieden sich um den Faktor drei [SCHIMPF 1997].

Auch für die Molmassenbestimmung von HA mittels der AF⁴ gelten offensichtlich die gleichen Einschränkungen wie bei der SEC: Ein Vergleich zwischen den Molmassenwerten, die unter verschiedenen Umgebungsparametern wie IS und pH-Wert der Lösung erhalten worden sind, ist nur schwer möglich. Mit Variation der Umgebungsparameter kann sich sowohl die Konformation der Kalibrierstandards als auch der HA (oder beides gleichzeitig) ändern, was zu unterschiedlichen Elutionszeiten der Proben führt. Eigene Experimente mit unterschiedlichen Eluenten wie Milipore-Wasser (pH 7); 0,01 bzw. 0,1 M NaNO₃-Lösungen (pH 7); 0,005 M TRIS-Puffer (pH 9) und 0,1 M Borat-Puffer (pH 9,2) zeigten sowohl für den untersuchten PSS-Standard 1120 Da als auch für die Aldrich-HA mitunter deutlich variierende Elutionszeiten (Fraktogramme nicht dargestellt). BECKETT et al. empfehlen daher den aus F-F³-Experimenten direkt bestimmbaren Diffusionskoeffizienten von HA zur Beschreibung der Molekülgröße von HA heranzuziehen [BECKETT 2000]. Zwar ist auch der Diffusionskoeffizient einer HA eine von der Konformation und damit von der IS und dem pH-Wert des Eluenten abhängige Größe, aber eine weitere Unsicherheit durch die Anwendung von (polymeren) Kalibrierstandards wird dadurch vermieden.

Möglicherweise erlaubt die Anwendung der F-F³-Methode einen größeren Freiraum in der Wahl der IS und des pH-Wertes des Eluenten bei gleichzeitig ungestörtem Elutionsverhalten. Der Einfluß des Eluenten (vor allem seiner IS und des pH-Werts) auf Adsorptions- oder Abstoßungseffekte ist trotz der geringeren Oberfläche der UF-Membran im Vergleich zur Oberfläche des SEC-Füllmaterials nicht auszuschließen. Sorptions- und Abstoßungseffekte werden durch die vom pH-Wert und der IS des Eluenten abhängigen Ladungen des Analyten und der Oberfläche der UF-Membran beeinflusst und können (teilweise) durch die IS des Eluenten verstärkt oder kompensiert werden. Davon werden besonders die Analytmoleküle in Membrannähe beeinflusst. Ebenso kann der größen selektive Verlust von Probenanteilen durch die UF-Membran die ursprüngliche Größenverteilung der Probe verändern.

Da eine „korrekte“ Bestimmung der Molmasse von HAs in dieser Arbeit nicht im Vordergrund steht, wurde auf detaillierte Untersuchungen zum Einfluß des Eluenten, seiner IS und des pH-Wertes in Abhängigkeit vom Membranmaterial verzichtet. Es konnte gezeigt werden, daß eine reproduzierbare Größenauftrennung der HA unter Verwendung einer 0,1 M NaNO₃-Lösung (pH 7) als Eluent sowohl bei Anwendung der SEC als auch der AF⁴-Methode erzielt werden kann. Die aus den PSS-Kalibriergeraden bestimmten Molmassen der Peakmaxima (M_p) für Aldrich-HA und Roth-HA stimmen in ihrer Größenordnung überein. Die deutlichen Unterschiede in den M_n - und M_w -Werten sind wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Ausschlußgrenzen der beiden verwendeten Methoden zurückzuführen. Aufgrund der Größenausschlußgrenze (keine Auflösung) der SEC-Säulen ist eine Beeinflussung des M_w -Wertes bei der SEC-Analyse zu erwarten. Darüber hinaus können besonders diese hochmolekularen Anteile durch die innerhalb der SEC-Säule auftretenden Scherkräfte deutlich reduziert worden sein. In beiden Fällen resultiert daraus ein geringerer M_w -Wert aus den SEC-Analysen. Ein

höherer M_n -Wert aus den AF^4 -Analysen sollte hingegen auf den Verlust von niedermolekularen Probenanteilen infolge des Cut-offs der zu verwendenden UF-Membran zurückzuführen sein.

4.4 Experimente in Analogie zu den Untersuchungen von PICCOLO et al. zur Frage der Huminsäure-Struktur

Wenn auch eine absolute Bestimmung der MW-Verteilung von HA mit der AF^4 ebenso von den Lösungsbedingungen abhängig ist wie bei der SEC-Methode und auch Artefakte nicht vollständig ausgeschlossen werden können, lassen sich doch Veränderungen der Molekülgröße oder Konformation von HA-Proben durch einen direkten Vergleich der Fraktogramme gut bestimmen. Da die AF^4 einen anderen Trennmechanismus als die SEC verwendet und auch die Oberfläche, welche für sorptive Wechselwirkungen zur Verfügung steht, bei einem AF^4 -Kanal deutlich kleiner als bei einer SEC-Säule ist, eignet sich diese Methode gut, um SEC-Ergebnisse zu überprüfen. Die AF^4 -Methode wurde hier angewandt, um die im Einleitungsteil dargestellten Ergebnisse der SEC-Experimente von PICCOLO et al. [1996A, 1996B] durch eine andere Größentrennmethode zu überprüfen.

Da die von PICCOLO et al. verwendeten HA-Proben nicht zur Verfügung standen, wurde zunächst geprüft und bestätigt, daß die von Piccolo et al. beschriebene charakteristische Veränderung der SEC-Chromatogramme von HA in Abhängigkeit vom Zusatz organischer Säuren auch für die hier verwendete SEC-Säulenkombination und Aldrich-HA reproduziert werden kann.

Dies gilt sowohl für HA-Proben, deren pH-Wert durch die Zugabe von 1 M HCl von 11,8 auf 2,0 abgesenkt wurde, als auch für HA-Proben, denen unterschiedliche Mengen an Zitronensäure zugesetzt wurden, um einen pH-Wert der Lösung von 2,2; 2,0 bzw. 1,3 einzustellen (Chromatogramme nicht dargestellt). Durch die Zugabe von Essigsäure zu einer HA-Lösung mit einem pH-Wert von 11,8 wurden Proben mit pH-Werten von 6,0; 4,5; 3,5 und 2,0 präpariert und Aliquote dieser Lösungen injiziert (vgl. Abb. 4-14). In der Reihe abnehmender pH-Werte wurde eine erkennbare Änderung der Peakform für die Probe mit einem pH-Wert von 3,5 gefunden. Sie weist eine größere Peakbreite gegenüber den Proben mit einem höheren pH-Wert auf. Darüber hinaus besitzt sie eine zusätzliche Schulter im niedermolekularen Bereich. Bei einem pH-Wert der Probe von 2,0 ist nur noch ein kleiner Peak bei der Retentionszeit von ca. 15 min erkennbar. Gleichzeitig wird ein neuer Peak oberhalb der Retentionszeit von ca. 26 min, die dem totalen Permeationsvolumen der SEC-Säulen entspricht, gefunden. Schon allein dieser Befund ist ein Hinweis darauf, daß die SEC-Analyse durch starke adsorptive Wechselwirkungen zwischen HA-Probenanteilen und der Säulenmatrix überlagert wird. Es ist bemerkenswert, daß sich eine Absenkung des pH-Wertes der aufgegebenen HA-Lösung von 11,8 auf 4,5 offensichtlich nicht auf die Form und Fläche des SEC-Peaks auswirkt, obwohl in diesem pH-Bereich eine Reihe von Protonierungsgleichgewichten, z. B. für phenolische OH-Gruppen liegen.

PICCOLO et al. hingegen deuteten ihre analogen SEC-Resultate so, daß sich die der HA-Probe zugesetzten organischen Säuren im Randbereich einer postulierten HA-Mizelle so positionieren, daß der hydrophobe Molekülteil in das Innere und der hydrophile Teil mit der polaren Carboxylgruppe zur äußeren Grenzfläche weist. Die Carboxyl-Gruppen sind bei niedrigen pH-Werten protoniert. Wird anschließend die saure Probelösung in den basischen Eluenten injiziert, so erfolgt eine augenblickliche Deprotonierung der Carboxyl-Gruppen. Dies

betrifft neben den im Randbereich des HA-Agglomerats eingelagerten organischen Säuremolekülen auch die HA-Moleküle. Die so entstandenen negativen Ladungen stoßen sich gegenseitig ab, so daß das HA-Agglomerat aufgesprengt wird. Die Anwesenheit des SEC-Säulenmaterials verhindert dabei eine Re-Agglomeration der niedermolekularen HA-Bestandteile, indem diese in die Poren des Füllmaterials diffundieren können. Durch den pH-Sprung wird daher nach PICCOLO et al. ein SEC-Peak dieser niedermolekularen HA-Bestandteile erhalten [PICCOLO 1999].

PERMINOVA wies darauf hin, daß PICCOLO et al. [1996a] neben dem Zusatz von Essigsäure auch bei Verwendung von Ameisensäure (ohne Alkylkette) sowie Di- und Tricarbonsäuren einen entsprechenden Effekt beobachteten, obwohl diese Substanzen deutlich der Definition von oberflächenaktiven Substanzen, mit einem klar definierten hydrophoben (beginnend ab C₈-Ketten) und hydrophilen Molekülteil widersprechen [PERMINOVA 1999].

Bei (Rück-)Titration der essigsäuren HA-Lösung (pH 2,0) mit 5 M KOH auf höhere pH-Werte - bis hin zu einem Wert von 8,5 - veränderten sich die Peakflächen der beiden bei der nachfolgenden SEC-Analyse erhaltenen Peaks derart, daß mit steigendem pH-Wert die Höhe des Peaks bei ca. 15 ml kontinuierlich anstieg, wohingegen die Höhe und das Retentionsvolumen des zweiten Peaks bei anfänglich > 26,9 ml kontinuierlich abnahm. Bei einem pH-Wert von 8,5 waren die Breite und die Form dieses Peaks mit denen des für die nicht angesäuerte Ausgangslösung (pH 11,8) erhaltenen Peaks identisch. Durch das sich mit steigendem pH-Wert ändernde Retentionsvolumen des zweiten Peaks ist dieser bei pH 6,0 und 8,5 nicht mehr durch eine Basislinientrennung vom ersten separiert, sondern erscheint als Nebenmaximum des (ersten) Hauptpeaks. Eine ähnliche Beobachtung bei ihren SEC-Analysen führen PICCOLO et al. darauf zurück, daß eine vollständige Wiederherstellung der ursprünglichen Agglomerate nicht erzielt werden kann und einige niedermolekulare HA-Moleküle erhalten bleiben [PICCOLO 1996A]. Dieser Unterschied zum Chromatogramm bei pH 11,8 kann aber auch durch den eingangs dargestellten „salt boundary effect“ begründet werden, da durch den Zusatz von KOH hier die IS der Probelösung höher ist als die des Eluenten. Dies wurde in diesem Zusammenhang auch noch einmal von VARGA et al. für Aldrich-HA bestätigt [VARGA 2000].

Insgesamt entsprechen die hier erhaltenen SEC-Ergebnisse den von PICCOLO et al. publizierten Resultaten [PICCOLO 1996A, PICCOLO 1996B].

Eine von PICCOLO et al. genannte Voraussetzung, um die durch einen pH-Sprung in den basischen Bereich freigesetzten niedermolekularen Bestandteile der HA nachweisen zu können, ist deren schnelle Separierung, wie sie z. B. durch den Porenraum einer SEC-Säule gewährleistet wird. Diese würde eine Re-Agglomeration der niedermolekularen Bestandteile verhindern. Ein ähnlicher Effekt sollte auch durch die UF-Membran des AF⁴-Trennkans hervorgerufen werden. Bei Injektion der sauren HA-Lösungen in den basischen Eluenten (pH = 9,2), der sich während der Fokussierphase innerhalb des AF⁴-Kanals mit der Probe vermischt, würde analog dem von PICCOLO et al. postulierten Mechanismus eine schnelle Aufspaltung der HA-Agglomerate in kleinere Bestandteile erfolgen. Diese müßten den Trennkans aufgrund des Cut-offs der UF-Membran bereits während der Fokussierphase verlassen. Eine deutlich geringere Peakfläche aufgrund des Probenverlustes wäre die Folge. Eine Änderung der Peakform wäre nur dann zu erwarten, wenn einzelne Größenfraktionen in unterschiedlichem Maße von der Aufspaltung in niedermolekulare Bestandteile betroffen wären. Dies wäre für hochmolekulare, d. h. stark agglomerierte Fraktionen eher als für niedermolekulare, d. h. wenig agglomerierte Fraktionen zu erwarten. Eine deutliche Reduzierung der Peakfläche insgesamt, noch des Anteils einzelner Probenbestandteile kann aus den Fraktogrammen in Abb. 4-16 nicht abgelesen werden.

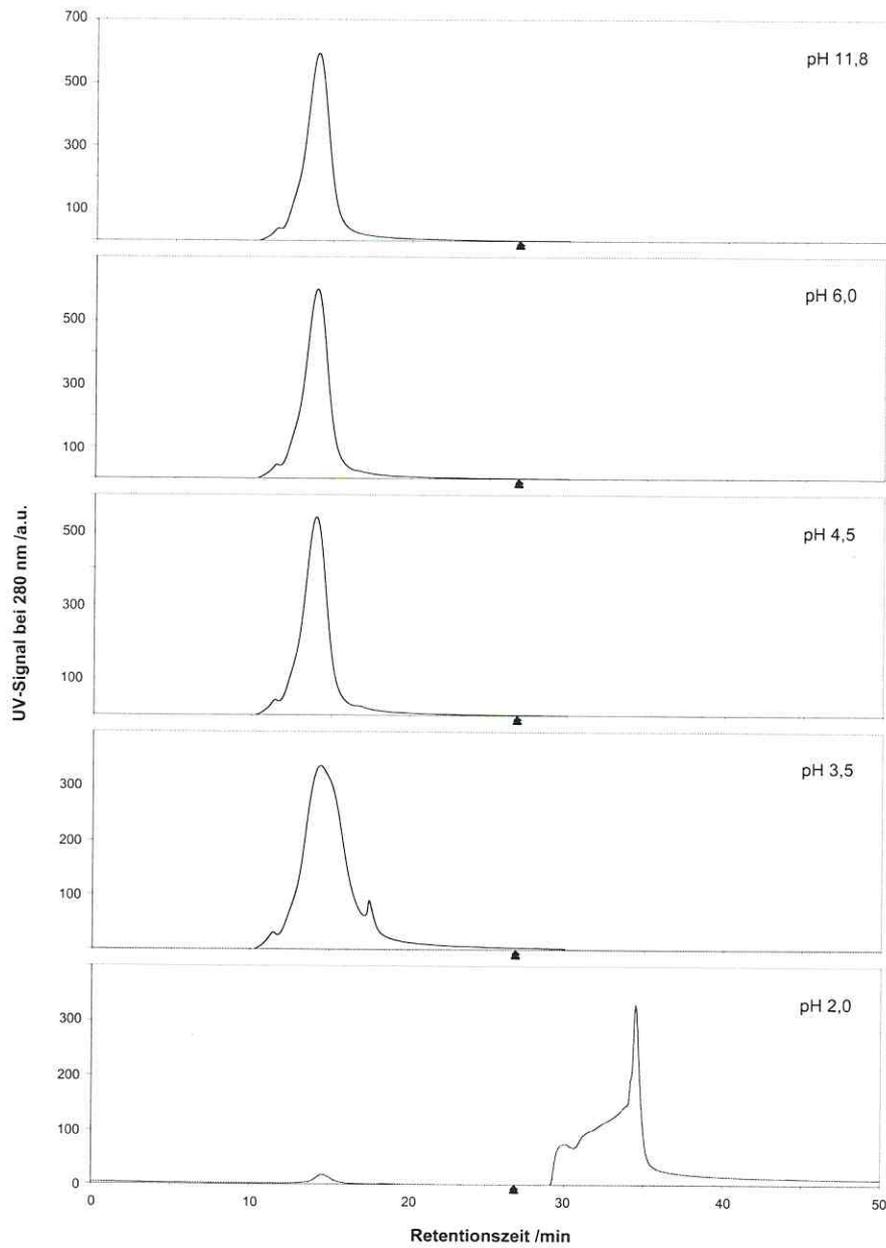


Abb. 4-14: Chromatogramme der SEC-Analysen einer Aldrich-HA-Probe bei pH 11,8 und nach Zusatz von Essigsäure zur Einstellung des entsprechenden pH-Wertes. Die schwarzen Dreiecke markieren die Retentionszeit von Aceton (26,9 min) als inertem Tracer zur Bestimmung der Retentionszeit, die dem totalen Permeationsvolumen entspricht. Es wurde ein 0,1 M Boratpuffer (pH 9,2) als Eluent verwendet.

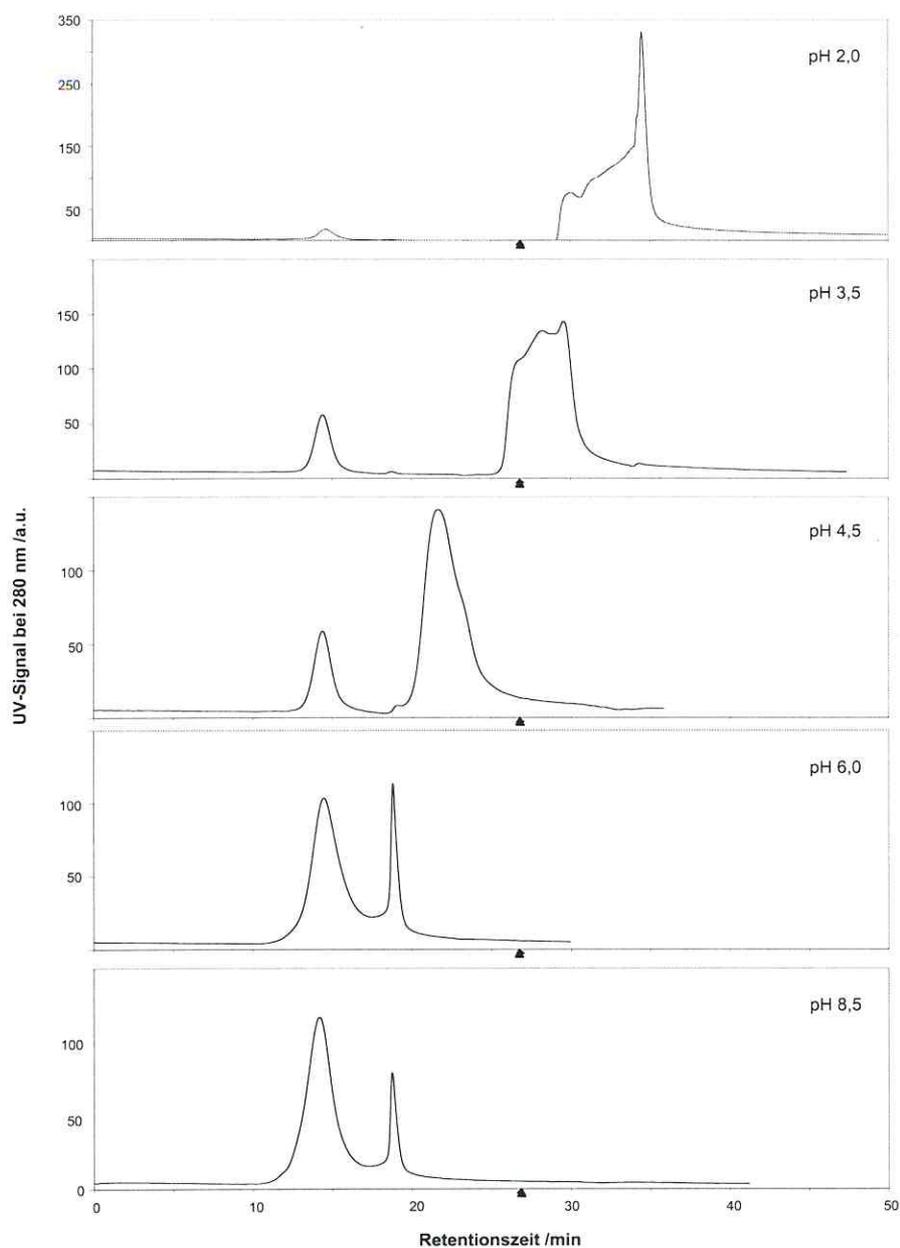


Abb. 4-15: Chromatogramme der SEC-Analysen der Aldrich-Huminsäureprobe (pH-Wert der Probelösung = 2,0) und nach Zusatz von 5 M KOH-Lösung zur Einstellung des entsprechenden pH-Wertes. Die schwarzen Dreiecke markieren die Retentionszeit von Aceton (26,9 min) als inertem Tracer zur Bestimmung der Retentionszeit, die dem totalen Permeationsvolumen entspricht. Es wurde ein 0,1 M Boratpuffer (pH 9,2) als Eluent verwendet.

Die in Abb. 4-16 erkennbare geringe Abnahme der Peakfläche kann eher mit dem Verdünnungseffekt aufgrund des Zusatzes von Essigsäure begründet werden. Besonders sollte dies auf die AF⁴-Analyse der Lösung mit einem pH-Wert von 2,0 zutreffen, da hier bei der SEC-Analyse eine sehr niedrige Signalintensität im hochmolekularen Bereich gefunden wurde (vgl. Abb. 4-14). Die Befunde aus den AF⁴-Experimenten stehen also nicht im Einklang mit der Interpretation von SEC-Ergebnissen und den Vorstellungen von PICCOLO et al. über den Aufbau von löslichen HSs.

Die in diesen AF⁴-Experimenten beobachtete Abnahme der Höhe des Voidpeaks tritt z. B. auch bei der Analyse von HA-Proben mit abnehmender Konzentration auf (vgl. Abb. 4-7). Da die Ursache für das Auftreten des Voidpeaks nicht genau bekannt ist, lassen sich Faktoren, die dessen Höhe beeinflussen, nur schwer interpretieren.

Eine Erhöhung des pH-Wertes einer zuvor mit Essigsäure angesäuerten HA-Lösung durch Zugabe von 5 M KOH-Lösung führt ebenfalls nicht zu einer deutlichen Änderung der Peakform. Die Abnahme der Peakfläche ist - besonders bei dem Fraktogramm der HA-Lösung mit einem pH-Wert von 8,5 - jedoch hier nur teilweise auf den Verdünnungseffekt infolge des notwendigen Zusatzes an KOH-Lösung zurückführbar. Da bei den SEC-Analysen eine derart starke Verringerung der Peakfläche zwischen der Ausgangslösung (pH 11,8) und der in den basischen Bereich zurücktitrierten Lösung von pH 8,5 nicht beobachtet werden konnte, liegt der Schluß nahe, daß es sich um einen auf die AF⁴-Methode zurückzuführenden Effekt handeln muß. Obwohl der genaue Grund nicht angegeben werden kann, mindert dies nicht die deutlich Aussagekraft der erhaltenen AF⁴-Ergebnisse für die HA-Lösungen mit absteigendem pH-Wert (Abb. 4-16).

Ein wesentlicher Vorteil der AF⁴-Methode gegenüber der SEC-Methode bei der Analyse dieser HA-Lösungen besteht darin, daß die zugesetzte Essigsäure während der Probenaufgabe und Fokussierung durch die UF-Membran hindurchtritt und so vor dem Elutionsschritt von der Probe abgetrennt wird. Eine Störung des Elutionsverhaltens der HA-Probe durch die Anwesenheit von größeren Mengen an organischer Säure ist dadurch ausgeschlossen. Entsprechend wird auch keine aussagekräftige Veränderung der Peakform der eluierten HA-Probe gefunden, wenn vor der Injektion durch den Zusatz von Essigsäure unterschiedliche pH-Werte in der Probelösung eingestellt worden sind.

Möglicherweise könnte die Aussagekraft der AF⁴-Experimente durch eine exakte Bilanzierung erhöht werden. Dies gestaltet sich aufgrund der teilweise hohen Querflußraten und der damit verbundenen niedrigen Konzentrationen im Permeat der UF-Membran schwierig. Sieht man von der deutlich geringeren Peakfläche im Fraktogramm der Lösung mit pH 8,5 (Abb. 4-17) einmal ab, so läßt ein Vergleich der nach den verschiedenen Vorbehandlungen erhaltenen Peakflächen nicht auf eine dramatische Änderungen der Wiederfindung (größer einem Faktor von zwei) schließen. Zusammenfassend lassen sich die dargestellten AF⁴-Analysen in der Weise bewerten, daß sie keine Hinweise auf eine HA-Struktur beinhalten, die auf eine Agglomeration von kleineren Bestandteilen zurückzuführen ist.

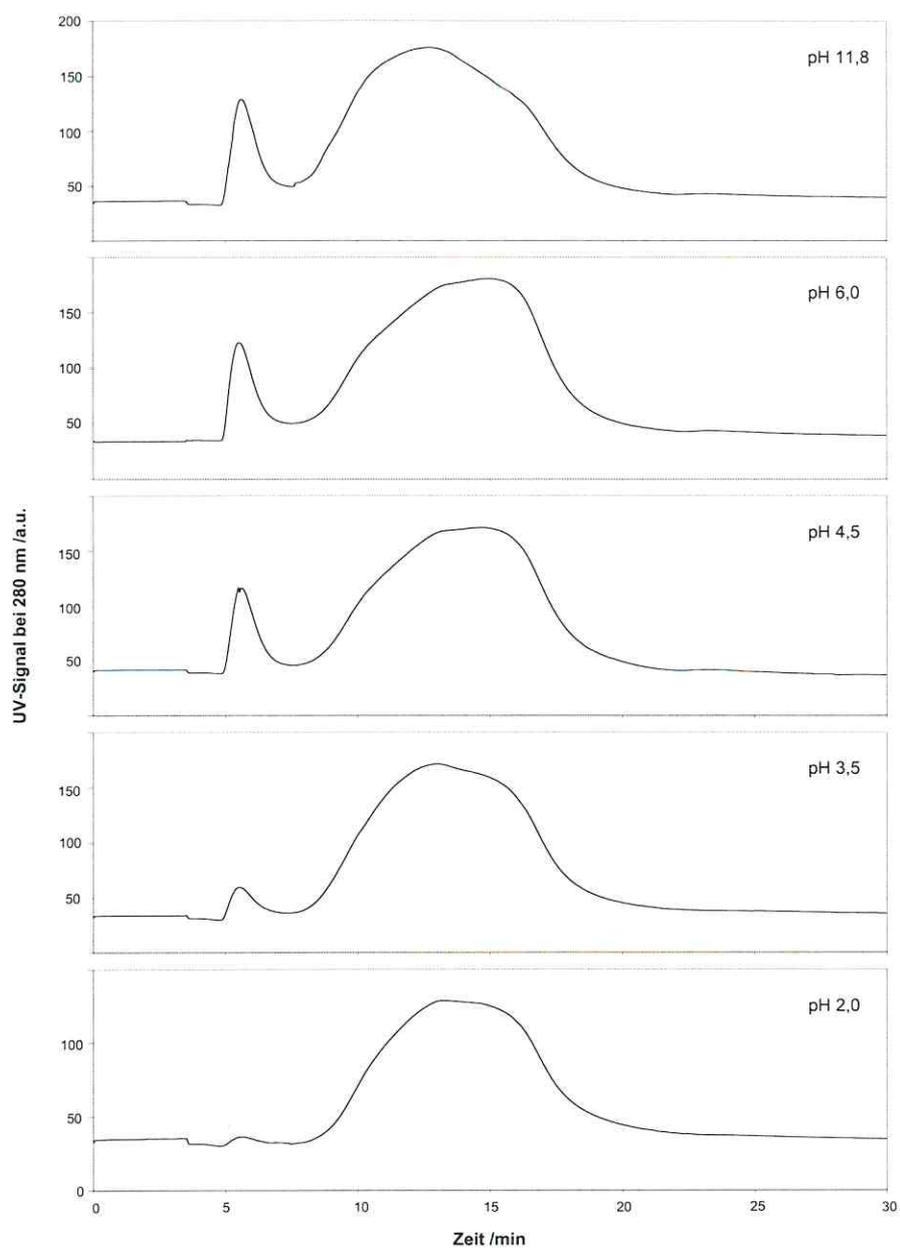


Abb. 4-16: Fraktogramme der AF^I -Analyse einer Aldrich-HA-Probe bei pH 11,8 und nach Zusatz von Essigsäure, um die angegebenen pH-Werte in der Startprobe einzustellen; der pH-Wert des Eluenten (0,1 M Borat-Puffer) betrug 9,2.

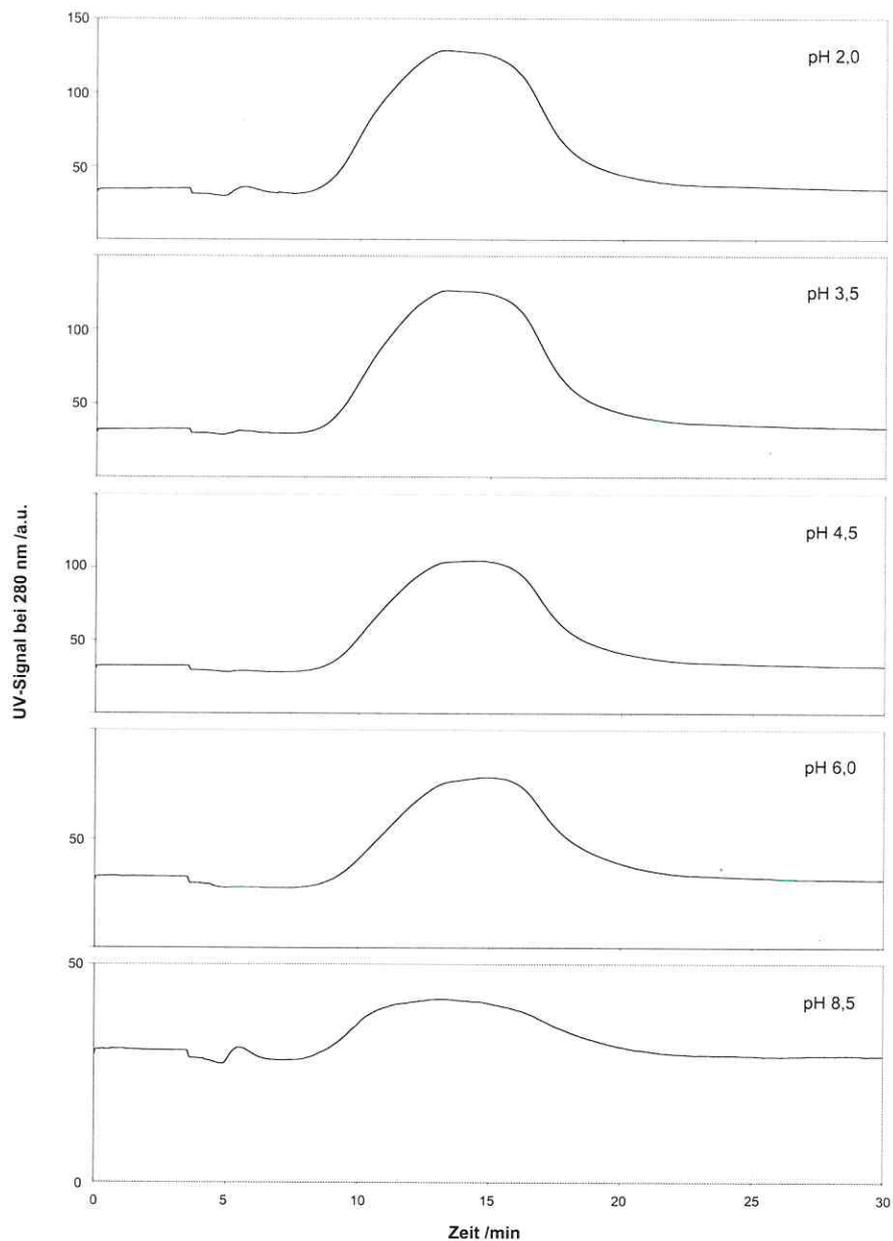


Abb. 4-17: Fraktogramme der AF^d -Analyse einer Aldrich-HA-Probe bei pH 2,0 und nach Zusatz von 5 M KOH, um die angegebenen pH-Werte einzustellen; der pH-Wert des Eluenten (0,1 M Borat-Puffer) betrug 9,2.

In einer neueren Publikation kombinieren PICCOLO et al. die SEC-Analysen von HA-Proben mit weiteren Methoden, um die von ihnen aufgestellte HA-Strukturhypothese weiter zu untersuchen. So zeigte die Analyse von Größenfraktionen einer braunkohlestämmigen HA mittels Pyrolyse-GC/MS (Pyr-GC/MS) und $^1\text{H-NMR}$ -

Spektroskopie eine reduzierte Heterogenität, wenn der HA-Probe vor der Größenfraktionierung mit Hilfe der präparativen SEC Essigsäure zugesetzt wurde. Aus den Pyr-GC/MS-Ergebnissen leiten PICCOLO et al. eine Verschiebung – im besonderen von ungesättigten alkyllischen und aromatischen Verbindungen - vom hochmolekularen in den niedermolekularen Anteil der HA durch die Vorbehandlung ab. Darüber hinaus konnten erst durch den Zusatz von Essigsäure Kohlenhydrate in den Spektren der niedermolekularen Fraktionen nachgewiesen werden. Die ^1H -NMR-Spektren liefern teilweise den Pyrolyse-Gaschromatogrammen widersprechende Ergebnisse. Ihre reduzierte Signalanzahl und die größere Strukturiertheit führen PICCOLO et al. auf eine weniger komplexe Molekülassoziation und eine höhere Löslichkeit der (niedermolekularen) HA-Bestandteile im NMR-Lösemittel (DMSO) durch den Essigsäure-Zusatz zurück. Sie sehen so die Hypothese einer supramolekularen HA-Struktur als weiter untermauert an [PICCOLO 2002].

Unter Anwendung multidimensionaler NMR-Experimente erhielten SIMPSON et al. einen nach ihrer Aussage eindeutigen Hinweis auf eine Struktur für eine gelöste, bodenstämmige HA, die auf die Zusammenlagerung von einfachen, niedermolekularen Bestandteilen - möglicherweise aufgrund der Komplexierung durch Metallkationen - zurückzuführen ist. Aus den DOSY-Experimenten konnten sie verschiedene Diffusionskoeffizienten für Probenbestandteile ermitteln, denen sie aufgrund der chemischen Verschiebung im ^1H -NMR-Spektrum Strukturen von Aromaten, Zuckern, Aminosäuren und Aliphaten zuweisen konnten. Aus den Ergebnissen der NOE-, DOSY- und LC-NMR-Experimente kann auf eine Molmasse von < 2 kDa für die untersuchte HA geschlossen werden [SIMPSON 2002]. Derart niedrige Molmassenwerte widersprechen allerdings der allgemeinen Darstellung über die typischen Molmassen von bodenstämmigen HAS.

Diese jüngeren Untersuchungen zeigen erneut, wie vielfältig die Meinungen sind, wenn es um die Frage der Struktur und der Molmasse von HSs geht.

4.5 DOC-Detektor

4.5.1 Voruntersuchungen zur Online-Kopplung des DOC-Detektors

Die Dimensionen des Quarzglasreaktors wurden - wie bereits im Kap. 2.4 erwähnt - bezüglich der Ausspülcharakteristik und der Verweilzeit bereits durch das INC optimiert. Bei der diskontinuierlichen Aufgabe (Batchinjektion) wird das Probenvolumen (typischerweise 20 μl) in einem dünnen Strahl stoßartig in die Verbrennungszone injiziert und verdampft dort schlagartig. Das aus der Flüssigkeitsmenge erzeugte Gas besitzt ein um etwa den Faktor 1000 höheres Volumen. Unter der Annahme einer Verdampfungszeit von 1 s resultiert aus diesem Vorgang ein zusätzlicher Volumenstrom von ca. 20 $\text{ml}\cdot\text{s}^{-1}$, der zu dem konstanten O_2 -Volumenstrom von 4,45 $\text{ml}\cdot\text{s}^{-1}$ hinzugefügt wird. Der daraus resultierende Druckstoß ist am kräftigen Ausschlag des Meßgas-Flußmessers ersichtlich. Die CO_2 -Bestimmung wird hierdurch jedoch nicht gestört, da der Druckstoß dem CO_2 -Peak voranläuft und entscheidend für die Richtigkeit des Meßergebnisses ist, daß das Trägergas zum Zeitpunkt des Peakdurchgangs durch die NDIR-Zelle wieder seinen stationären, ungestörten Fluß erreicht hat. Gleichzeitig sorgt der Druckanstieg für ein gutes Ausspülen des erzeugten CO_2 aus dem Reaktorrohr.

Der hier entwickelte DOC-Detektor soll hauptsächlich im Online-Betrieb eingesetzt werden. Dazu kann er als letzter Detektor einer Detektorreihe an ein HPLC-, SEC- oder AF⁴-System angekoppelt werden. In diesem Fall sollte eine zusätzliche Metallhülse in den Reaktor eingesetzt werden. Die Funktion der Hülse wurde bereits unter 3.5 beschrieben. Die hydrothermalen Belastungen führten bei der Edelhülse jedoch zu einer Freisetzung von Kohlenoxiden aus dem kohlenstoffhaltigen Material. Gelegentlich konnte so - auch ohne vorherige Injektion von DOC - ein CO₂-Signal beobachtet werden²⁶. Die Edelhülse wurde deshalb durch eine Hülse aus Silber ersetzt. Silber besitzt eine noch höhere Wärmeleitfähigkeit als Edelstahl. Aufgrund der hohen Reinheit des Materials (> 99,99 %) zeigte die Silberhülse keinerlei spontane Freisetzung von Kohlenstoff.

Die Temperaturprofile innerhalb des Reaktorrohres bei Ab- und Anwesenheit eines permanenten Wasserflusses sind für die beiden verschiedenen Metallhülsen in Abb. 7-4 und Abb. 7-5 (siehe Kap. 7) dargestellt. In Abwesenheit eines Wasserflusses zeigen beide Systeme ein identisches Temperaturprofil. Die am Ofenregler eingestellte Temperatur von 780 °C wird dabei erreicht und liegt teilweise innerhalb des Quarzglasreaktors etwas darüber.

Bei einem Wasserfluß von 1 ml·min⁻¹ ergaben sich für die beiden Werkstücke unterschiedliche Auswirkungen auf den Temperaturverlauf innerhalb der Verbrennungszone: Die Edelhülse weist am Boden eine Temperatur von ca. 600 °C auf. Mit zunehmender Höhe über dem Boden steigt die Wandtemperatur innerhalb der Hülse schnell an und besitzt über einen weiten Bereich eine konstante Temperatur von ca. 750 °C. Die Silberhülse besitzt vom Boden bis in ca. 8 cm Höhe eine nahezu konstante Temperatur von 700 °C. Bis zum oberen Ende der Silberhülse hin sinkt die Temperatur aber auf ca. 600 °C ab. Die gegenüber der Edelhülse ($m_{\text{Edelstahlhülse}} = 89,1 \text{ g}$) höhere Masse der Silberhülse ($m_{\text{Ag-Hülse}} = 307,5 \text{ g}$) macht sich besonders im Abkühlverhalten bemerkbar. Dieser Effekt ist aber bei der permanenten Beaufschlagung mit Wasser im Falle der Fließinjektion nicht relevant, da sich nach der entsprechenden Zeit ein thermisches Gleichgewicht einstellt. Entscheidend ist hier vor allem die erzielbare Endtemperatur am Boden der Hülse. Aufgrund der höheren erzielbaren Temperatur am Boden der Silberhülse (bei gleicher Ofentemperatur) (vgl. Abb. 7-5) und der ausbleibenden Kohlenstoffblindsignale wurden alle weiteren Untersuchungen unter Verwendung der Silberhülse durchgeführt.

Ein Vergleich der Peakformen bei Batch- und Fließinjektion infolge der unterschiedlichen Ausspülcharakteristiken dieser beiden Injektionsarten kann durch die Injektion von CO₂-gesättigtem Wasser vorgenommen werden. CO₂ wurde gewählt, um den möglichen Einfluß der Oxidationskinetik auf die Peakform auszublenden. Bei 25 °C und 100 kPa lösen sich $6,15 \cdot 10^{-4} \text{ mol CO}_2 \text{ pro mol H}_2\text{O}$ [LIDE 1992] (entsprechend 1,5 g CO₂ pro l H₂O). Bei einem Injektionsvolumen von 20 µl werden so 8,2 µg Kohlenstoff in Form von gelöstem CO₂ aufgegeben.

²⁶ Ein Reaktor aus Edelstahl wies die gleichen Probleme auf. Deshalb wurde schon in den Vorarbeiten des INC auf einen Reaktor aus Quarzglas zurückgegriffen.

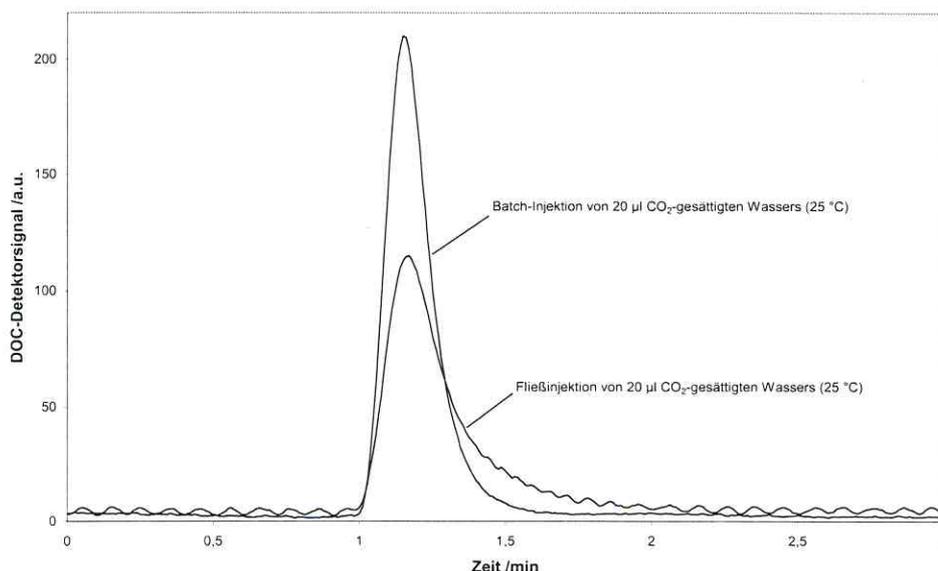


Abb. 4-18: Vergleich der Peakformen und -flächen bei der Injektion von je 20 µl CO₂-gesättigten Millipore-Wassers (25 °C) (8,2 µg C) mittels Batch- und Fließinjektion bei einer Flußrate von 1 ml·min⁻¹. Der Quotient aus Peakfläche_{flow}/Peakfläche_{batch} beträgt 0,8.

Die Basispeakbreite bei Batchinjektion von CO₂-gesättigtem Wasser beträgt ca. 0,75 min mit einer Peaksymmetrie²⁷ von 1,8. Bei Batchinjektion von CO₂-gesättigtem Wasser (d. h. mit einem Druckpeak bei der Verdampfung des Wassers) erhält man einen vergleichsweise symmetrischen Peak mit einer geringeren Peakbreite. Die gleiche Menge Kohlenstoff, über ein Injektionsventil (20-µl-Probenschleife) bei einer Flußrate von 1 ml·min⁻¹ Millipore-Wasser aufgegeben, erzeugt einen Peak mit einer deutlichen Asymmetrie; der Wert der Peaksymmetrie von 2,9 zeigt ein deutliches Tailing des Peaks an. Die Basispeakbreite erhöht sich bei Fließinjektion aufgrund des fehlenden Druckstoßes auf ca. 1,5 min. Die Schwankungen der Grundlinie sind wahrscheinlich auf geringe Druckschwankungen innerhalb des Systems zurückzuführen, da auch die Meßgasanzeige sichtbare Schwankungen der Durchflußrate im Fließbetrieb aufweist. Aufgrund der schwierigen Handhabung von CO₂-gesättigtem Wasser soll für CO₂ an dieser Stelle kein quantitativer Vergleich zwischen Batch- und Fließbetrieb durchgeführt werden. Dies wird im Folgenden für andere Substanzen beschrieben.

²⁷ Die Symmetrie eines Peaks wird üblicherweise durch den Quotienten aus dem horizontalen Abstand zwischen dem im Peakmaximum senkrecht gefällten Lot und der rechten Peakflanke in einer Höhe von 10 % der Gesamtpeakhöhe über der Basislinie und dem Abstand der linken Peakflanke zum Lot (ebenfalls in einer Höhe von 10 % der Gesamtpeakhöhe) als dimensionslose Größe beschrieben. Ein Wert von 1 wird für einen symmetrischen Peak erhalten; Peaks mit einem Tailing besitzen Werte > 1.

4.5.1.1 Bestimmung der Nachweisgrenze des DOC-Detektors

Die Bestimmung der Nachweisgrenze (NWG) erfolgt häufig nach der Definition von DOERFFEL [1987]. Danach ist ein beliebiger Meßwert y nur dann mit einer Wahrscheinlichkeit von $\bar{P} = 0,998$ vom Blindwert y_B zu unterscheiden, wenn er die Summe aus dem Blindwertmittel (\bar{y}_B) und dem Dreifachen der Standardabweichung des Blindwertes (σ_B) übersteigt. Diese Summe wird mit y_{\min} bezeichnet.

$$\text{Gl. 4-2} \quad y > \bar{y}_B + 3\sigma_B = y_{\min}$$

Der Wert der NWG (x_{\min}) kann aus y_{\min} mit Hilfe einer Kalibrierfunktion der folgenden Form ermittelt werden.

$$\text{Gl. 4-3} \quad y = \bar{y}_B + b \cdot x$$

In obiger Gleichung ist x die Konzentration des zu bestimmenden Analyten. Die Steigung b der Kalibrierfunktion entspricht der Empfindlichkeit der Meßmethode. Durch Umstellen von Gl. 4-3 und Einsetzen von Gl. 4-2 erhält man den folgenden Ausdruck für den Wert der NWG:

$$\text{Gl. 4-4} \quad x_{\min} = \frac{y_{\min} - \bar{y}_B}{b} = \frac{3\sigma_B}{b}$$

Da bei der Online-Kopplung des DOC-Detektors aus der Aufgabe einer Blindprobe (Eluent) über die Probenschleife kein diskretes Signal (mit einer Standardabweichung) erkennbar war, läßt sich die Bestimmung der NWG nach DOERFFEL [1987] nicht anwenden. In einem solchen Fall wird im allgemeinen die Bestimmung der NWG aus dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S:N-Verhältnis) durchgeführt. Hier wurde ein S:N-Verhältnis von 3:1 als Kriterium für die NWG gewählt. Die Bestimmung der Höhe des Basislinienrauschens erfolgte nach der üblichen Festlegung der Grenzen, bei der Extremwerte nicht berücksichtigt werden. Nach diesem Kriterium kann auch in Abwesenheit eines diskreten Blindwertes eine NWG für die Online-DOC-Bestimmung erhalten werden.

Zur Ermittlung der NWG wurden verschieden konzentrierte KHP-Lösungen sowohl im Batch- als auch im Fließbetrieb des Detektors injiziert. Für die Bestimmung der NWG nach DOERFFEL [1987] wurden die Peakflächen als ein Maß für den Kohlenstoffgehalt, aber auch die Peakhöhen ausgewertet. Die Peakhöhen wurden berücksichtigt, da sie das Maß bei Anwendung des S:N-Kriteriums im Online-Betrieb sind und so die beiden unterschiedlich definierten NWG annähernd zueinander in Beziehung gesetzt werden können.

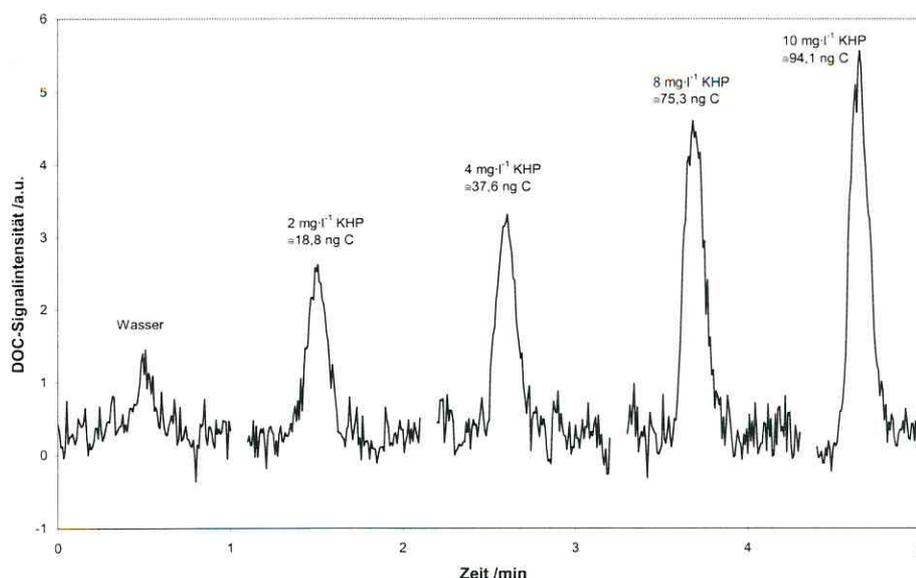


Abb. 4-19: Bestimmung der Nachweisgrenze mittels verschieden konzentrierter KHP-Lösungen bei Batchinjektion von je 20 μl . Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Peak aus einer Reihe von jeweils 10 Injektionen pro Konzentration. Zur Blindwertbestimmung wurde das Millipore-Wasser injiziert, welches zur Herstellung der KHP-Lösungen verwendet wurde.

Aus der Standardabweichung der Blindwerte σ_B und der Geradengleichung der Kalibrierfunktion für KHP wurde die NWG für Batchinjektionen entsprechend Gl. 4-4 aus den Peakflächen bzw. -höhen berechnet. Beispielhaft sind repräsentative Peaks der Batchinjektion von KHP-Lösungen verschiedener Konzentrationen bis hinunter zu 2 mg KHP·l⁻¹ (dies entspricht einer Kohlenstoffkonzentration von 0,94 mg·l⁻¹) in Abb. 4-19 dargestellt. Die NWG bei Anwendung des S:N-Verhältnisses wurde aus der graphischen Darstellung der Meßdaten für das Basislinienrauschen und der Signalthöhe bei geringen Kohlenstoffmassen ermittelt (keine graphische Darstellung der Daten). Die Festlegungen der Grenzen des Rauschens, sowie der Basislinie und damit der Signalthöhe unterliegen einer gewissen Subjektivität. Daher kann der Wert der NWG für das S:N-Kriterium hier nur weniger präzise angegeben werden. Gleichzeitig ist die unten angegebene NWG von der Peakbreite abhängig. Ein z. B. durch eine chromatographische Vortrennung verbreedeter Peak führt bei gleicher injizierter Kohlenstoffmasse zwangsläufig zu einer geringeren Peakhöhe, so daß es sich bei den genannten Werten für die NWG nur um Richtwerte handeln kann.

Tab. 4-6: Nachweisgrenzen ermittelt für den Batchbetrieb nach DOERFFEL [1987] entsprechend Gl. 4-2 bzw. Gl. 4-4 und für den Flußbetrieb aus der graphischen Darstellung der Meßdaten bei einem Signal:Rausch-Verhältnis von 3:1 bei Injektion von 20 µl KHP-Lösungen bei 1 ml·min⁻¹ Millipore-Wasser (DOC-Reaktortemperaturen: 780 °C/700 °C).

Nachweisgrenze nach DOERFFEL [1987] [ng Kohlenstoff]		Nachweisgrenze bei einem Signal:Rausch-Verhältnis von 3:1 [ng Kohlenstoff]
Batchinjektion		Fließinjektion
34 (Peakfläche)	15 (Peakhöhe)	ca. 100

Für den eingangs beschriebenen Grätzel-DOC-Detektor wird eine NWG im Bypass-Modus (Fließinjektion unter Umgehung einer SEC-Trennung) von $< 1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ bei einem Injektionsvolumen von 3000 µl angegeben (entsprechend einer Kohlenstoffmasse von $< 3 \text{ ng}$). Im chromatographischen Modus wird eine NWG von ca. $3 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ erreicht (bei einem Injektionsvolumen von 3000 µl entspricht dies 9 ng Kohlenstoff) [HUBER 2001]. Die NWG des modifizierten Sievers 800 TOC-Analysators beträgt im Online-Betrieb $100 \mu\text{g}\cdot\text{C}\cdot\text{l}^{-1}$ [HER 2002]. Die Autoren haben dabei eine höhere Empfindlichkeit des DOC-Detektors beim Übergang von einer 150-µl- auf eine 500-µl-Probenschleife (bei identischen Kohlenstoffkonzentrationen der Proben) gefunden. Da es sich bei einem DOC-Detektor aber um einen masseproportionalen Detektor handelt, sollte man besser die injizierte Kohlenstoffmasse gegen das DOC-Signal auftragen. Führt man dies für die in der oben genannten Literaturstelle publizierten Daten durch, so zeigt sich, daß die resultierende Kalibriergerade im Bereich hoher Kohlenstoffmassen (bei Aufgabe der Proben über die 500-µl-Probenschleife) flacher als im unteren Bereich verläuft. Eine proportionale Zunahme des DOC-Signals mit größerer injizierter Kohlenstoffmasse ist also nicht gegeben; ein Grund für diese Nichtlinearität kann eine für höhere Kohlenstoffmassen nicht ausreichende Menge an Oxidationsmittel sein. Die angegebene NWG selbst wurde durch Injektion von 2 ml einer $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ C enthaltenden HA-Probe nach SEC-Auftrennung ermittelt (entsprechend 200 ng Kohlenstoff). Trotz aller einschränkenden Bemerkungen liegt die NWG damit - auch bei einer durch die SEC-Analyse verursachten Peakverbreiterung - in der gleichen Größenordnung wie die NWG des in dieser Arbeit verwendeten DOC-Detektors. Hierbei wirkt sich die Tatsache, daß beim Sievers DOC-Detektor nur das durch die gasdurchlässige Membran permeierende Gas (fast ausschließlich CO_2) detektiert wird, sehr positiv auf die NWG aus. Im Falle des in dieser Arbeit verwendeten DOC-Detektors hingegen wird das CO_2 selektiv in einem großen Volumenstrom von O_2 gemessen.

4.5.1.2 Bestimmung des Oxidationsvermögens des DOC-Detektors

Neben der NWG ist das Oxidationsvermögen des DOC-Detektors von entscheidender Bedeutung für seine praktische Anwendbarkeit. Nur wenn auch schwer oxidierbare Substanzen mit einer Ausbeute von $> 95 \%$ zu CO_2 oxidiert werden, ist der Detektor als ein universelles, kohlenstoffsensitives Meßinstrument verwendbar. Nur in diesem Fall kann eine Kalibrierung mittels eines leicht einwägbaren, nicht hygroskopischen Standards (z. B. KHP) erfolgen.

Zur Ermittlung des Oxidationsvermögens des Detektors wurden Stammlösungen von drei organischen Substanzen (*tert*-BuOH, KHP und Aldrich-Huminsäure-Na-Salz) mit unterschiedlicher Verdampfbarkeit und Oxidierbarkeit mit jeweils 1 g C^{-1} hergestellt und eine Verdünnungsreihe zur Bestimmung der jeweiligen Kalibrierfunktion verwendet. Die Aldrich-Huminsäure-Lösung wurde nach Auflösen bei $\text{pH} > 10$ und Rücktitration auf $\text{pH} 7$ unfiltriert verwendet, um keine Verluste an Kohlenstoff infolge der Filtration zu erleiden. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-20 und Abb. 4-21 graphisch dargestellt. Aus den Kalibrierfunktionen der Batchinjektionen ergeben sich die unten genannten Kohlenstoffgehalte der Stammlösungen. Parallel dazu wurden die Kohlenstoffgehalte der jeweiligen Stammlösung mittels eines kommerziellen DOC-Analysators (Shimadzu TOC 5050) bestimmt. Dieses kommerzielle Gerät arbeitet nach dem gleichen Oxidationsprinzip wie der in dieser Arbeit beschriebene DOC-Detektor.

Tab. 4-7: Kohlenstoffgehalte (\pm Standardabweichung) der KHP-, *tert*-BuOH- und Aldrich-Huminsäure-Stammlösung laut Einwaage, Online-DOC-Detektor (Batch- und Fließinjektion bezogen auf die KHP-Kalibriergerade) und Shimadzu TOC-5050-Detektor.

Substanz	laut Einwaage ^a [g Kohlenstoff \cdot l ⁻¹]	Online-DOC-Detektor		Shimadzu TOC-5050
		Batchinjektion	Fließinjektion	Batchinjektion
KHP	1,00	$\equiv 1$	$\equiv 1$	$1,00 \pm 0,02$
<i>tert</i> -BuOH	1,00	$1,01 \pm 0,02$	$1,22 \pm 0,02$	$0,97 \pm 0,03$
Aldrich-HA	1,00	$1,03 \pm 0,02$	$0,78 \pm 0,02$	$1,13 \pm 0,03$

^a Anteil der Kohlenstoffmasse an Gesamtmasse: KHP = 1/2,125; *tert*-BuOH = 1/1,54 bzw. bei einem Kohlenstoffgehalt von 37,8 % für luftfeuchte Aldrich-HA.

Die Konzentrationen der Stammlösung von *tert*-BuOH und Aldrich-HA (vgl. Tab. 4-7), die aus der Batch- und Fließinjektion des in dieser Arbeit untersuchten Detektors ermittelt wurden, wurden durch Bezug der Geradensteigung auf den Wert der jeweiligen KHP-Kalibriergerade erhalten; der Shimadzu TOC-Detektor wurde ebenfalls (unabhängig) mit KHP kalibriert. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der Fließinjektion wurde jeweils der Millipore-Wasser-Blindwert vor der Auftragung der Datenpunkte subtrahiert. Die Kalibriergeraden der Batchinjektionen der drei untersuchten Substanzen weisen nur geringfügige, nicht-signifikante Abweichungen voneinander auf. Dieses Ergebnis entspricht dem im Fall einer vollständigen Verbrennung der organischen Substanzen zu CO_2 zu erwartenden Verhalten. Die aus den drei Geradengleichungen gemittelte Empfindlichkeit - ausgedrückt als Flächeneinheit (a.u.) pro μg Kohlenstoff - beträgt $(433 \pm 10) \text{ a.u.} \cdot (\mu\text{g C})^{-1}$.

Die deutlich unterschiedlichen Werte für die Konzentrationen der Stammlösungen, die bei der Fließinjektion der drei Lösungen (vgl. Tab. 4-7) erhalten wurden, deuten darauf hin, daß unter den gewählten Bedingungen KHP als Kalibrierstandard für die Fließinjektion nicht geeignet sein könnte. So wurden bei der Fließinjektion derselben Lösungen (bei identischen Ofentemperaturen von $780 \text{ }^\circ\text{C}/700 \text{ }^\circ\text{C}$) und einer Flußrate von $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ Millipore-Wasser aus der Aufgabe von $20 \mu\text{l}$ Probe deutliche Unterschiede in den Steigungen der Kalibrierfunktionen erhalten (vgl. Abb. 4-21).

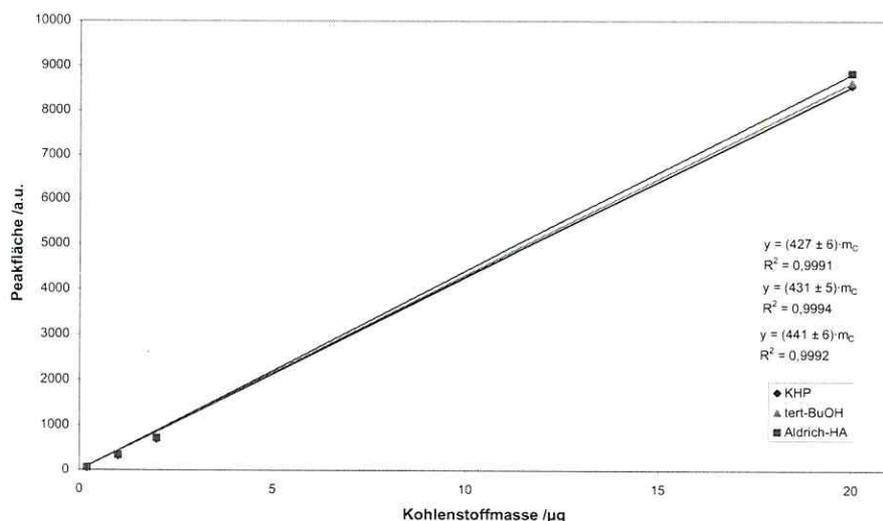


Abb. 4-20: Aufgabe von je 20 μl KHP-, tert-BuOH- und Aldrich-HA-Lösungen im Batchbetrieb des DOC-Detektors. Die zugehörigen Geradengleichungen der Ausgleichsgeraden $y = (b \pm \sigma) \cdot m_C$ sind in der Reihenfolge der Legende geordnet. Der Wasserblindwert wurde vor der Auftragung der Datenpunkte subtrahiert.

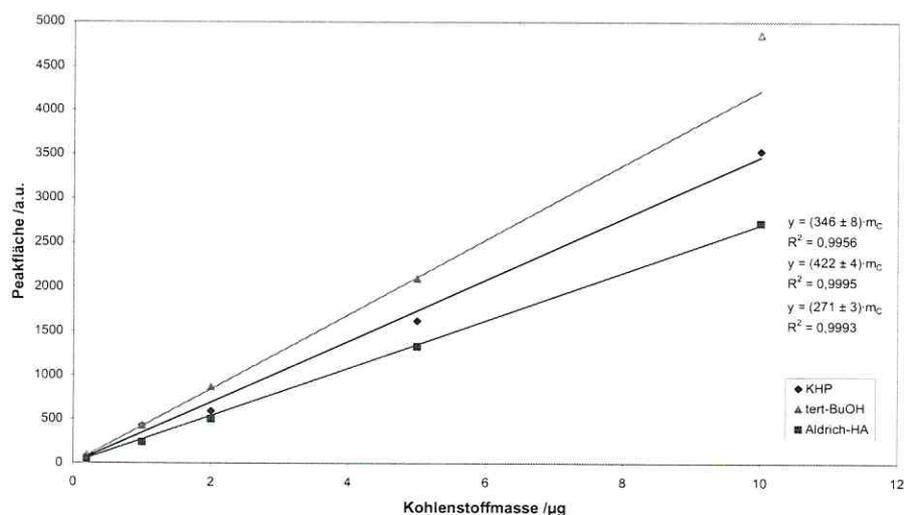


Abb. 4-21: Aufgabe von je 20 μl KHP-, tert-BuOH- und Aldrich-HA-Lösungen im Flußbetrieb des DOC-Detektors ($1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ Millipore-Wasser). Die zugehörigen Geradengleichungen sind in der Reihenfolge der Legende geordnet. Der Datenpunkt bei 10 μg Kohlenstoff der tert-BuOH-Lösung wurde nicht berücksichtigt. Die Ofentemperatur betrug 780 $^{\circ}\text{C}$, die Temperatur der katalytischen Nachverbrennung 700 $^{\circ}\text{C}$.

Der Wert der Geradensteigung für *tert*-BuOH liegt bei der Fließinjektion in einer Größenordnung, wie sie auch für die Batchinjektion erhalten wurde. Die Werte von KHP und Aldrich-HA sind deutlich kleiner, so daß die Steigungen der Ausgleichsgeraden entsprechend der Oxidierbarkeit der Substanzen von

$$\textit{tert}\text{-BuOH} > \text{KHP} > \text{Aldrich-Huminsäure} \quad \text{abnehmen.}$$

Unter den gegebenen Reaktortemperaturen erfolgt im Fall des *tert*-BuOH eine Dehydratation zu Isobuten. Die reaktive Doppelbindung des Isobutens führt zu einer schnellen Oxidationsreaktion zu CO₂. Im Falle des KHP hingegen muß nach schneller Decarboxylierungsreaktion der beiden Carboxyl-Gruppen des Phthalats das verbleibende aromatische Ringsystem oxidiert werden. Huminsäuren enthalten neben einer Fülle von funktionellen Gruppen und aromatischen Zentren auch gesättigte Kohlenwasserstoffanteile, die nur vergleichsweise schwer oxidiert werden können. Neben der chemischen Oxidierbarkeit einzelner Strukturelemente könnte auch die Flüchtigkeit der Analyten eine wesentliche Rolle für die CO₂-Ausbeute spielen. Vollständig verdampfbare Analyten (wie Butanol) oder deren Primärprodukte (wie Benzol aus KHP) gelangen verlustfrei in die Katalysatorzone, während nicht verdampfbare Analyten (wie HA) auch in kältere Bereiche „verspritzt“ werden können, in denen eine langsame oder unvollständige Verbrennung abläuft.

Der Unterschied zwischen der Batch- und der Fließinjektion besteht vor allem in der Temperatur innerhalb der Verbrennungszone. Durch den permanenten Eintrag von Flüssigkeit ist hier die Temperatur im Fall der Fließinjektion geringer (siehe Abb. 7-5). Um zu überprüfen, ob die Oxidationsausbeute durch eine Anhebung der Ofentemperatur erhöht werden kann, wurde bei einer Flußrate von 1 ml·min⁻¹ Millipore-Wasser die Ofentemperatur von 780 über 800 und 850 stufenweise bis auf 900 °C erhöht. Die erhaltenen Mittelwerte nach der Mehrfachinjektion von KHP- und Aldrich-HA-Lösungen mit jeweils 50 mg·l⁻¹ Kohlenstoff sind in Abb. 4-22 dargestellt.

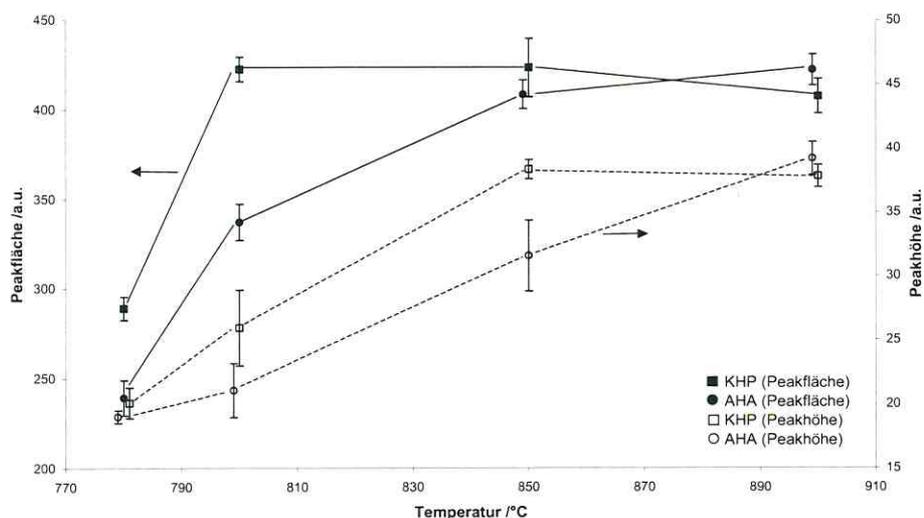


Abb. 4-22: Einfluß der Ofentemperatur auf die Peakfläche und -höhe bei der Fließinjektion (20-µl-Probenschleife, 1 ml·min⁻¹ Millipore-Wasser) von KHP- bzw. Aldrich-HA-Lösungen bei konstanter Temperatur der katalytischen Verbrennung von 700 °C.

Beim Übergang von 780 °C auf 800 °C steigen für beide Substanzen die Peakflächen und -höhen deutlich an. Bei 800, 850 und 900 °C sind dann die Peakflächen für KHP innerhalb einer geringen Schwankungsbreite konstant. Für die Aldrich-HA-Lösung nehmen sie mit zunehmender Temperatur - wie erwartet - zu. Die Peakflächen beider organischen Substanzen bei 900 °C sind innerhalb der Schwankungsbreite der Meßdaten identisch.

Die Peakhöhen stellen hier ein Maß für die Oxidationsgeschwindigkeit dar. Bei gleicher Peakfläche deutet eine größere Peakhöhe auf eine raschere Oxidation hin. Bei einer Ofentemperaturerhöhung von 780 über 800 auf 850 °C nimmt die Peakhöhe der KHP-Lösung zu und bleibt bei Erhöhung der Temperatur auf 900 °C konstant. Für die Aldrich-HA-Lösung nehmen die Peakhöhen mit steigender Temperatur stetig zu. Dabei besitzt die gemessene Peakhöhe bei 900 °C im Vergleich zu 780 °C mehr als den doppelten Betrag.

Eine Kalibrierung des DOC-Detektors mit KHP bei einer Verbrennungstemperatur von 900 °C und einer Temperatur von 700 °C für die katalytische Nachverbrennung liefert einen Wert der Steigung der linearen Regressionsanalyse von $416 \text{ a.u.} \cdot (\mu\text{g C})^{-1}$. Im Vergleich dazu lag der Wert der Steigung bei einer Verbrennungstemperatur von 780 °C unter sonst identischen Bedingungen bei $346 \pm 8 \text{ a.u.} \cdot (\mu\text{g C})^{-1}$ (vgl. Abb. 4-21). Der Wert der Geradensteigung für das leichter oxidierbare *tert*-BuOH lag bereits bei 780 °C bei $422 \pm 4 \text{ a.u.} \cdot (\mu\text{g C})^{-1}$ und damit in der gleichen Größenordnung wie die Steigungen der Kalibriergeraden für die drei untersuchten organischen Substanzen bei Batchinjektion ($433 \pm 10 \text{ a.u.} \cdot (\mu\text{g C}^{-1})$). Setzt man im Fall der Batchinjektion eine vollständige Oxidation und Detektion des injizierten Kohlenstoffs voraus, so resultiert bei einer Ofentemperatur von 900 °C aufgrund der vorliegenden Daten auch im Falle der Fließinjektion eine vollständige Umsetzung der getesteten Substanzen. Eine Ofentemperatur von 900 °C führt allerdings zu einer starken thermischen Belastung des Quarzglasreaktorrohres. Hinzu kommt, daß es durch die Verwendung von natriumionhaltigen Eluenten, sowie in geringerem Maße durch die Injektion von natrium- bzw. kaliumhaltigen Proben (KHP, Aldrich-HA-Natriumsalz), bei den hohen Temperaturen und der Anwesenheit von Wasserdampf bzw. Sauerstoff zur Bildung von Natriumoxid/-hydroxid-Mischoxiden kommt. Diese werden bei den hohen Temperaturen in die Struktur des Quarzglases eingebaut. Die auftretende Volumenzunahme führt dann zu einem Bruch des Quarzglasrohres und verkürzt so die Standzeit des Reaktors²⁸.

Eine weitere Möglichkeit, die Temperatur in der Verbrennungszone - unter Umgehung der extremen thermischen Belastung des Reaktorrohres - zu erhöhen, ist die Absenkung der Flußrate bei der Fließinjektion der Proben. Da in der Praxis bei SEC-Experimenten Flußraten von $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ und bei AF⁴-Experimenten von $0,7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ üblich sind, wurden hier die Auswirkungen von Flußraten von 1 bis hinunter zu $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ untersucht. Da pro Zeiteinheit weniger Wasservolumen verdampft werden muß, sollte bei einer Reduzierung der Flußrate die Temperatur in der Verbrennungszone ansteigen. Bei niedrigen Flußraten sollte sich so die Temperatur in der Verbrennungszone dem Wert der Temperatur bei Batchinjektionen annähern. Die Temperatur innerhalb des Reaktorrohres selbst konnte in diesem Experiment nicht bestimmt werden. Aber eine steigende Oxidationsausbeute kann anhand der ermittelten Peakflächen als ein indirektes Maß für die Temperaturerhöhung angesehen werden. Die Ergebnisse zeigt die folgende Abbildung:

²⁸ Aus diesem Grund wurde in Vorarbeiten des INC auch ein Reaktorrohr aus Edelstahl mit identischen Maßen getestet. Aber hier traten die gleichen Probleme wie bei der Verwendung einer Edelstahlhülse im Inneren des Reaktors auf: Es kam zu spontanen Freisetzungen von Kohlenstoff aus dem Edelstahl und entsprechenden CO₂-Signalen im Detektor.

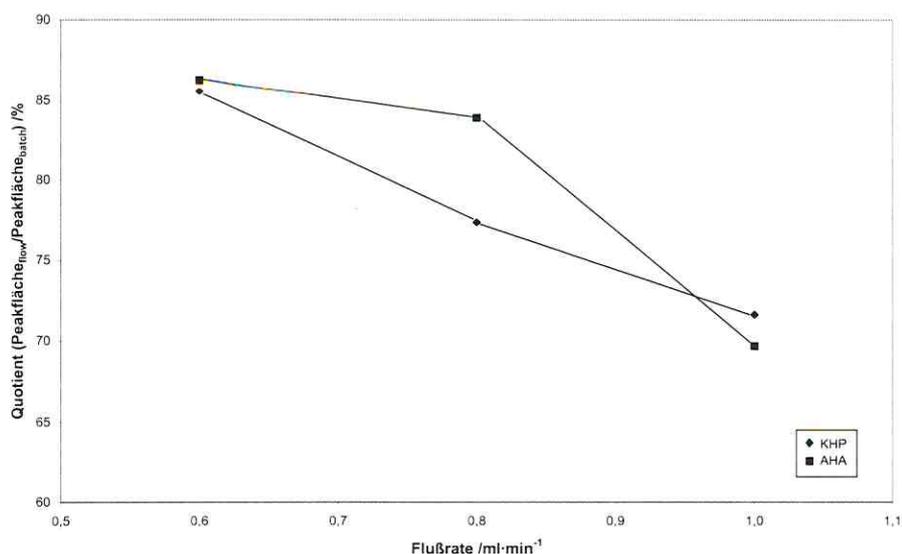


Abb. 4-23: Darstellung der Peakflächen aus der Injektion von KHP bzw. Aldrich-HA (jeweils $50 \text{ mg C}\cdot\text{l}^{-1}$) bei verschiedenen Flußraten als Prozentwert des Quotienten aus Peakfläche_{flow} und Peakfläche_{batch}. Ofentemperaturen: $780 \text{ }^\circ\text{C}$ / $700 \text{ }^\circ\text{C}$.

Für KHP und Aldrich-HA nähern sich bei einer Reduzierung der Flußrate von 1 auf $0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ die bei der Fließinjektion erhaltenen Peakflächen den Werten bei Batchinjektion an. Eine Reduzierung der Flußrate führt hier zu höheren Temperaturen und somit einer erhöhten Oxidationsausbeute. Das Absenken der Flußrate auf $0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ist aber offensichtlich nicht ausreichend, um annähernd identische Peakflächen wie bei der Batchinjektion zu erreichen. Bei Flußraten unter $0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ müssen im Injektionssystem Quarzglas Kapillaren mit kleineren Innendurchmessern eingebaut werden, um eine strahlförmige Aufgabe der Probelösung zu gewährleisten. Diese erzeugen - trotz geringerer Flußrate - zum einen einen deutlich höheren Gegendruck, zum anderen wurde eine Abnahme der Peakflächen von KHP und Aldrich-HA gegenüber dem Wert bei $0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ gefunden. Dabei wurde eine zunehmende Verkürzung des aus der Kapillare austretenden Flüssigkeitsstrahls beobachtet, die damit erklärt werden kann, daß mit steigender Druckdifferenz eine zunehmend schnellere Zerwellung des Flüssigkeitsstrahls unter Aerosolbildung erfolgt [GMEHLING 1996]. Wahrscheinlich kann dadurch die Probe nicht mehr in eine ausreichende Tiefe innerhalb des Reaktors „eingestrahlt“ werden, so daß für den DOC-Peak geringere Peakflächen resultieren.

Wie voranstehend beschrieben, wurden teilweise deutlich geringere Kohlenstoffgehalte bei der Fließanalyse im Vergleich zur Batchanalyse gefunden. Erst bei höheren Temperaturen in der Verbrennungszone konnte auch für die Fließanalyse eine vollständige Detektion der aufgegebenen Kohlenstoffmasse in Form von CO_2 erreicht werden. So bleibt hier die Frage zu untersuchen, wohin bei niedrigeren Temperaturen ein Teil der Kohlenstoffmasse „verschwindet“. Während aller Meßreihen wurde kein Anstieg der Basislinie beobachtet. Dies wäre aber bei einer unvollständigen bzw. verzögerten Oxidation der DOC-Proben zu erwarten. Ein Niederschlag von festem Material an der Reaktorwand außerhalb des Ofens wurde ebenfalls nicht beobachtet. Nur hier wären

die Temperaturen niedrig genug, um eine dauerhafte Senke für kohlenstoffhaltige Restprobenbestandteile darzustellen.

Der Einsatz von natrium- bzw. kaliumhaltigen Proben und Eluenten hingegen führt nicht nur zu einer Belastung des Quarzglasmaterials, wie bereits weiter oben beschrieben, sondern auch zur Ausbildung von basischen Zentren innerhalb des Reaktorrohres. Natriummonooxid (Na_2O) reagiert mit Wasser zu NaOH und ist ein Zwischenprodukt bei der Entstehung von Natriumperoxid (Na_2O_2), das eine Zersetzungstemperatur von $750\text{ }^\circ\text{C}$ aufweist. Dieses reagiert mit CO_2 nach:



Natriumperoxid gilt als das am stärksten oxidierende Aufschlußmittel und greift alle Materialien, wie z. B. Labortiegel, an. Für Na_2CO_3 wird eine Schmelztemperatur (unter Zersetzung) von $851\text{ }^\circ\text{C}$ angegeben. Für NaHCO_3 beträgt die Schmelztemperatur (unter Zersetzung) $270\text{ }^\circ\text{C}$. Gerade in Form von Na_2CO_3 kann das aus dem organischen Kohlenstoff erzeugte CO_2 innerhalb des Reaktors als anorganischer Kohlenstoff mit hoher Zersetzungstemperatur festgelegt werden. Dies scheint aber damit ein allgemeines Problem bei der Anwendung der Hochtemperaturverbrennung besonders von natriumhaltigen Proben zu sein, da ein ähnlicher Effekt bei der Elementaranalyse (vgl. Kap. 4.1) einer Aldrich-HA-Natriumsalz-Probe gefunden wurde.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß eine Variation der Flußrate innerhalb relevanter Bereiche ($0,6 - 1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) nicht zu ausreichend hohen, den Batchinjektionen vergleichbaren Peakflächen führt. Lediglich die Anhebung der Temperatur in der Verbrennungszone führt zu einer annähernd vollständigen Umsetzung der organischen Proben zu CO_2 und ggf. einer Freisetzung aus anorganischen CO_2 -Senken innerhalb des Reaktors im Flußbetrieb. Auf eine erhöhte Konzentration an Natrium-Ionen im Eluenten sollte in zukünftigen Arbeiten möglichst verzichtet werden.

Eine ähnlich detaillierte Untersuchung des Oxidationsvermögens eines Online-DOC-Detektors wurde von SPECHT et al. beschrieben [SPECHT 2000]. Sie verwendeten einen Online-TOC-Detektor, der nach dem von HUBER und FRIMMEL beschriebenen Oxidations- und Detektionsprinzip arbeitet [HUBER 1996]. Dabei wurde an Stelle eines Dünnfilmreaktors ein Quarzglaskapillarreaktor verwendet, so daß auch (SEC-)Eluenten mit höherem Salzgehalt eingesetzt werden können. Für die von ihnen untersuchten organischen Verbindungen fanden sie verschiedene Oxidationsausbeuten bei Einsatz des Kapillardetektors, die sie mit denen zweier anderer DOC-Detektoren verglichen. Während der eine Referenzdetektor mit dem Dünnfilmreaktor nach HUBER [1996] ausgerüstet ist und gleichfalls auf Basis der UV-Oxidation unter Zusatz der Peroxidkomponente arbeitet, verwendet der zweite Referenzdetektor das Prinzip der thermischen Oxidation (Shimadzu TOC 5000). Für Oxalsäure, Glutaminsäure, Glucose, Harnstoff und EDTA erhielten sie bei allen drei - mit KHP kalibrierten - Detektoren Ausbeuten von $> 90\%$. Tannine, Dextrane, Thioharnstoff und Cyansäure konnten mit den beiden Detektoren, die UV-Licht und $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ zur Oxidation verwenden, nicht ausreichend oxidiert werden. Dies gelang nur durch den Detektor auf Basis der thermischen Oxidation. Für ihre HA-Probe erhielten sie innerhalb des gewählten Konzentrationsbereichs eine lineare Korrelation zwischen Kohlenstoffmasse und Detektorsignalintensität [SPECHT 2000].

Für den modifizierten Sievers TOC-Analysator werden in der Literatur [ULLMANN 2000, HER 2002] keine Angaben zu Oxidationsausbeuten, die aus einem direkten Vergleich von Batch- und Fließinjektion herrühren, gemacht. Dies ist verwunderlich, da Oxidationsausbeuten ein entscheidender Qualitätsparameter für TOC-Detektoren und relativ einfach mit Hilfe von CO_2 -Referenzproben zu ermitteln sind. ULLMANN bestimmte die Oxidationseffizienz des Detektors für verschiedene organische Kohlenstoffquellen durch Vergleich der Kohlenstoffgehalte nach Elution aus einem SF_6 -Kanal in Abwesenheit eines Querflusses (kein Kraftfeld) und der Batchanalyse der gleichen Probe mit der Offline-Variante des TOC-Analysators. Beide Geräte (Online- wie Offline-Detektor) wurden vorher mit KHP kalibriert. Je nach Kohlenstoffgehalt der Kalibriertlösung mußte dazu die Flußrate des Oxidationsmittels bei beiden Detektoren angepaßt werden [ULLMANN 2000].

Obwohl die gewählte Vorgehensweise eine große Praxisrelevanz für die Online-Kopplung des Detektors besitzt, führt sie zur Überlagerung von zwei Effekten, die die Aussagekraft der Analysen in Bezug auf die Oxidationsausbeute mindern: Es kann so nicht zwischen der Wiederfindungsrate der SF_6 -Analyse und der Oxidationsausbeute des DOC-Detektors unterschieden werden. „Wiederfindungsraten“ unterhalb 100 % wurden dabei ausschließlich auf den Verlust von Probenanteilen innerhalb des SF_6 -Systems zurückgeführt (Sorption, etc.). Die untersuchten PSS-Standards zeigten dabei kein einheitliches Bild. Die nieder- und hochmolekularen Standards wiesen eine höhere Wiederfindungsrate auf, als die Standards mit einem mittleren Molgewicht. Für bodenstämmige HAs wurden Raten von ca. 80 % bestimmt. Unterschiedliche Oxidationseigenschaften der organischen Substanzen und die Auswirkung einer direkten Fließinjektion ohne SF_6 -Kanal wurden nicht einzeln untersucht [ULLMANN 2000].

HER et al. zeigten, bei Verwendung des modifizierten Sievers TOC-Analysators, daß für Saccharose neben der UV-Bestrahlung kein Zusatz der Peroxidkomponente zur vollständigen Umsetzung zu CO_2 notwendig ist [HER 2002]. Der Saccharosepeak besaß nach Durchlauf durch eine SEC-Säule und DOC-Detektion bei allen Flußraten des Oxidationsmittels die gleiche Peakfläche. Für KHP wurde ein Optimum in der Flußrate des zudosierten Oxidationsmittels gefunden, bei der die resultierende Peakfläche einen maximalen Wert besaß. Bei weiterer Erhöhung der Flußrate des Oxidationsmittels soll der Überschuss an der Peroxidkomponente im Eluentenstrom aufgrund der Bildung von O_2 zu dem beobachteten geringeren Detektorsignal geführt haben [HER 2002] (vgl. Kap. 2.4). Zur Bestimmung der Kohlenstoffgehalte der FA- und HA-Proben wurde eine Kalibriergerade für KHP bei Online-Aufgabe über eine SEC-Säule verwendet. Dabei wurden weder Verluste an KHP durch Sorption an das Säulenmaterial noch unterschiedliche Oxidationsausbeuten für KHP und die FAs bzw. HAs durch experimentelle Vorarbeiten ausgeschlossen [HER 2002].

4.5.2 DOC-Detektor als Online-Detektor in Kopplung mit UV-Detektion

Für die nachfolgend dargestellte Kopplung eines UV-Detektors mit dem DOC-Detektor (und später mit einer SEC-Vortrennung) wurde aufgrund der im vorigen Kapitel erhaltenen Ergebnisse eine Ofentemperatur von 900 °C gewählt, während die katalytische Nachverbrennung weiterhin bei 700 °C erfolgte.

Zunächst sollen die Resultate der Kopplung eines UV- mit dem DOC-Detektor und der Injektion von KHP-Lösungen dargestellt werden. Die Lösungen wurden ohne vorherige chromatographische Trennung durch die Detektoren geleitet. Die Parallelinjektion von je 3 Proben derselben Kohlenstoffkonzentration einer KHP-Verdünnungsreihe zeigte eine sehr gute Reproduzierbarkeit der einzelnen UV- und DOC-Signale (Abbildungen nicht dargestellt). Zur Veranschaulichung der resultierenden Peakbreiten sind in der folgenden Abbildung exemplarisch die Signale der beiden Detektoren gegenübergestellt.

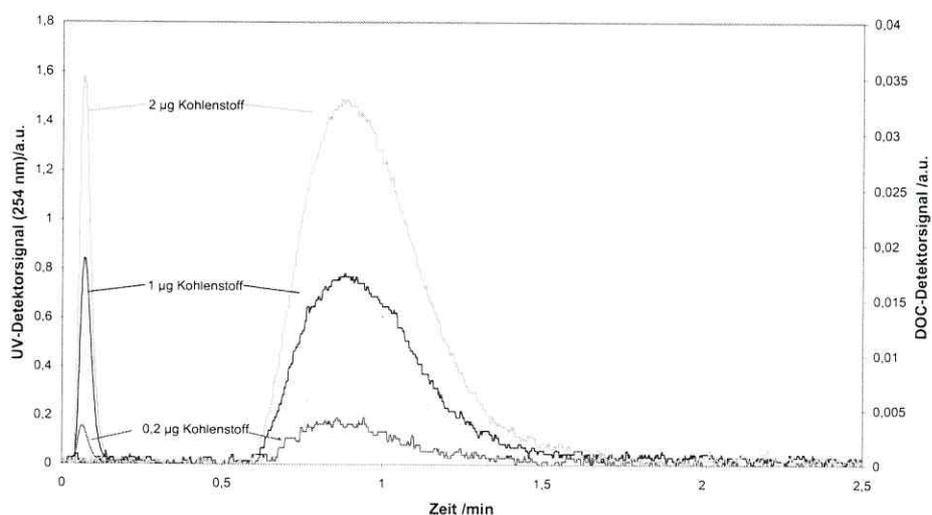


Abb. 4-24: Vergleich der UV- (links) und der DOC-Signale (rechts) bei Detektion mittels UV- und nachfolgendem DOC-Detektor bei Injektion von Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen an KHP über ein Injektionsventil mit 20- μ l-Probenschleife bei einer Flußrate von 1 ml·min⁻¹ Millipore-Wasser.

Die DOC-Signale sind gegenüber den UV-Signalen deutlich verbreitert. Die zeitliche Differenz zwischen den Peakmaxima von UV- und DOC-Signal entspricht dem Interdetektorvolumen. Dieses resultiert aus dem Volumen der Verbindungskapillaren, dem Volumen des Verbrennungsrohres sowie der Zuleitungen zur NDIR-Meßküvette im DOC-Detektor.

Tab. 4-8: Peakbreite und -symmetrie bei der Kopplung des UV- mit dem DOC-Detektor am Beispiel des oben abgebildeten Peaks aus der Injektion von 2 μ g Kohlenstoff.

Detektor	Peakbreite in 10 % Höhe /min	Peaksymmetrie
UV	0,073	2,02
DOC (mit UV gekoppelt)	0,752	2,06

Aus Tab. 4-8 ist ersichtlich, daß die Peakbreite nach Durchlaufen des DOC-Detektors um ca. den Faktor 10 im Vergleich zur UV-Peakbreite ansteigt. Dieses Problem wurde auch von ULLMANN [2000] beobachtet. Hier wurde der in 2.4 beschriebene Sievers Detektor mit einem SF₄-System mit UV-Detektion gekoppelt. Die

unspezifische Peakverbreiterung durch den DOC-Detektor konnte erst durch Anwendung eines zweiten UV-Detektors, der dem DOC-Detektor nachgeschaltet war, kompensiert werden. Ein Vorteil des Sievers-DOC-Detektors ist, daß er ein Membranelement enthält, welches laut Angabe des Herstellers nur den zu CO_2 oxidierten Anteil des Analyten im Eluentenstrom durch die Membran passieren läßt. Bei ausgeschalteter UV-Lampe erfolgt für die untersuchten Substanzen - trotz Zusatzes des Oxidationsmittels - keine Umsetzung zu CO_2 . Die so unzersetzten organischen Verbindungen können durch den zweiten, dem DOC-Detektor nachgeschalteten UV-Detektor detektiert werden. Die Übereinstimmung der Peakbreite zwischen DOC- und zweitem UV-Detektor für PSS-Standards war in diesem Fall gut [ULLMANN 2000]. Bei der Kopplung dieses Detektors mit einer SEC-Vortrennung [HER 2002] wurde auf das Problem der Peakverbreiterung nicht eingegangen. Man kann aber aus den Abbildungen in der genannten Publikation erkennen, daß die Peakverbreiterung auch hier zu beobachten ist. Besonders fällt die Peakverbreiterung beim totalen Permeationsvolumen der verwendeten SEC-Säulen auf: Ein schmaler UV-Peak wird als deutlich breiterer DOC-Peak erhalten.

Da jedoch die Peaksymmetrie bei Detektion mittels UV- und DOC-Detektor erhalten bleibt (vgl. Tab. 4-8), kann durch eine einfache „mathematische“ Anpassung (Stauchung) des DOC-Signals auf der Zeitskala eine gute Übereinstimmung des DOC-Peaks mit dem UV-Peak erhalten werden. Eine derartige mathematische Bearbeitung zweier unterschiedlich breiter Signale von gleicher Symmetrie wird häufig bei kommerziellen Detektorkombinationen angewendet, wenn es z. B. aufgrund unterschiedlich großer Meßzellvolumina zu unspezifischen Peakverbreiterungen kommt. Das Ergebnis zeigt die nachfolgende Abbildung. Die Stauchung des DOC-Signals wurde gewählt, da hier im Gegensatz zur „Spreizung“ des UV-Signals die Datenpunktdichte nicht reduziert wird.

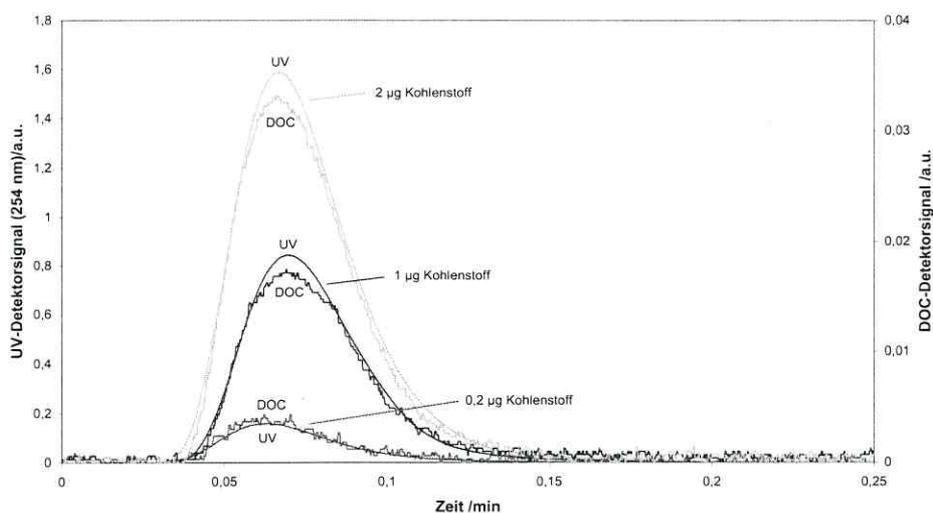


Abb. 4-25: Graphische Darstellung der bearbeiteten DOC-Signale. Die DOC-Spuren wurden um den Faktor 10,3 (entsprechend des Quotienten aus der Peakbreite von UV- und DOC-Peak bei 10 % Höhe) auf der Zeitachse komprimiert und die Peakmaxima der UV- und DOC-Peaks übereinandergelegt.

Das in der vorstehenden Abbildung graphisch dargestellte Verhältnis von UV-Absorption bei 254 nm und dem DOC-Gehalt wird als spezifische UV-Absorption (SUVA) bezeichnet:

$$\text{Gl. 4-6} \quad \text{SUVA} = \frac{\text{UV-Absorption bei 254 nm} \left[\frac{\text{cm}^{-1}}{\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}} \right]}{\text{DOC-Gehalt}}$$

Da der Schwerpunkt hier auf der Untersuchung der Anwendbarkeit des DOC-Detektors als Online-Detektor lag, wurden vereinfacht relative SUVA-Werte betrachtet. Zur Bestimmung der relativen SUVA wurden die Signalintensitäten der UV- und DOC-Peakmaxima auf 1 normiert. Aufgrund der Normierung muß der Wert des Quotienten aus UV- und DOC-Signal im Peakmaximum einen Wert von 1 annehmen. Für eine einheitliche Substanz wie z. B. KHP muß darüber hinaus über den gesamten Peak ein konstanter Wert der relativen oder absoluten SUVA erhalten werden (gestrichelte Linie in Abb. 4-26). Wie die beispielhafte Bearbeitung des Peaks mit einer Kohlenstoffmasse von 2 µg (vgl. Abb. 4-25) in der nachfolgenden Abbildung zeigt, ist dies - nach der oben beschriebenen notwendigen mathematischen Bearbeitung des DOC-Peaks - der Fall.

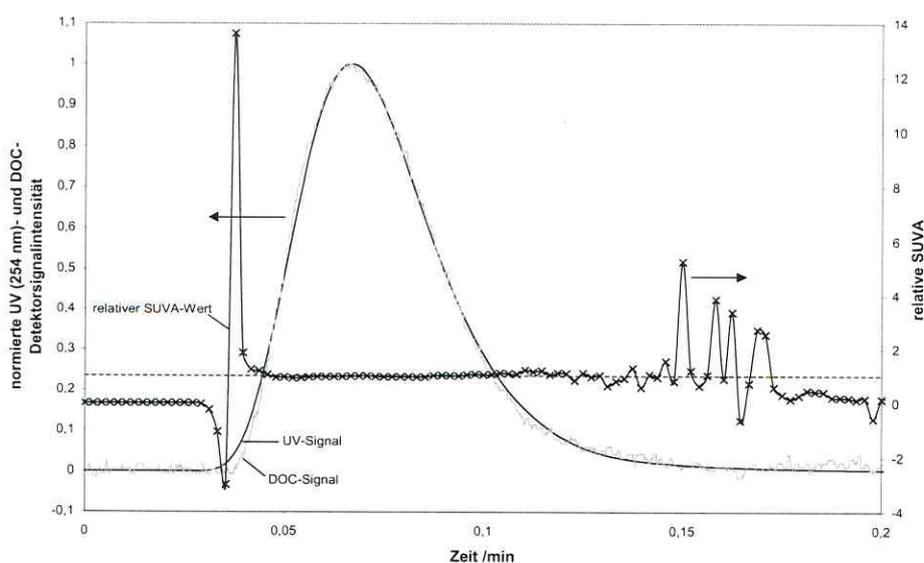


Abb. 4-26: Graphische Darstellung der (relativen) spezifischen UV-Absorption (SUVA) als Verhältnis der normierten Peakhöhen von UV- (254 nm) und DOC-Detektorsignal bei Injektion einer KHP-Lösung über eine 20-µl-Probenschleife (injizierte Kohlenstoffmasse = 2 µg) bei einer Flußrate von 1 ml·min⁻¹ Millipore-Wasser. Die Peakbreite des DOC-Peaks wurde zuvor um den Faktor 10,3 reduziert (vgl. Abb. 4-25). Daher wurde zur Berechnung und Darstellung der SUVA-Werte nur eine verminderte Anzahl von DOC-Datenpunkten verwendet (SUVA-Datenpunkte durch „x“ markiert).

Lediglich in den Bereichen mit sehr geringem UV- und DOC-Signal sind stärkere Abweichungen erkennbar. Die vergleichsweise geringe Fluktuationsfrequenz der SUVA-Werte gegenüber dem DOC-Signal in der obigen

Abbildung rühren daher, daß zur graphischen Darstellung des DOC-Signals die Zeitachse lediglich gestaucht wurde, während zur Berechnung der SUVA-Werte nur eine reduzierte Anzahl an Datenpunkten zur Verfügung stand. Inwieweit bei einer Elution von Analyten wie z. B. KHP oder HA aufgrund der chromatographischen Peakverbreiterung eine zusätzliche Peakverbreiterung durch den DOC-Detektor relevant ist, soll im Folgenden dargestellt werden.

Betrachtet werden soll zunächst die Auswirkung der Peakverbreiterung auf eine monodisperse Probe (KHP), die über die SEC-Säulen eluiert wurde.

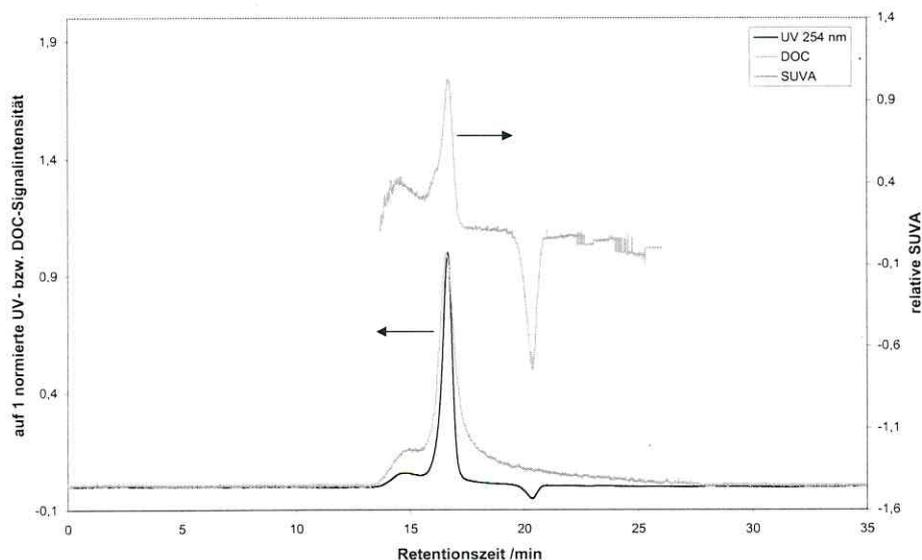


Abb. 4-27: UV- und DOC-Signalintensitäten einer Probe KHP ($c = 0,05 \text{ g C}\cdot\text{l}^{-1}$ und 200- μl -Probenschleife ($m = 10 \text{ }\mu\text{g C}$)) bei Elution über die SEC-Säulen mit 0,1 M NaNO_3 -Lösung bei pH 7,0 als Eluent. Die DOC- und UV-Signale (254 nm) wurden auf 1 normiert. Die SUVA-Werte wurden als relative Größe aus den normierten Detektorsignalen berechnet.

Die in Abb. 4-27 dargestellten Chromatogramme enthalten neben dem Hauptpeak des KHP bei 16,5 min noch eine vorgelagerte Schulter bei ca. 15 min, deren Auftreten wahrscheinlich auf SEC-Artefakte zurückzuführen ist. Der Vergleich zwischen dem UV- und dem DOC-Peak zeigt, daß auch bei der Detektion eines durch die SEC-Analyse verbreiterten Substanzpeaks eine erkennbare, zusätzliche Peakverbreiterung durch den DOC-Detektor auftritt. Der aus den beiden normierten Signalintensitäten berechnete relative SUVA-Wert weist dadurch eine Abhängigkeit von der Retentionszeit auf, die in ihrer Gestalt mit den zugrunde liegenden Ausgangspeaks übereinstimmt. Die aus der SEC-Analyse erhaltene Abhängigkeit des SUVA-Wertes von der Retentionszeit der KHP-Probe kann nur als analytischer Artefakt betrachtet werden. Die Peakbreite wird für diese Probe nur durch die Peakverbreiterung infolge chromatographischer Bandenverbreiterung und der nachfolgenden DOC-Detektion bestimmt. Wenn man also die unterschiedliche Peakbreite der beiden Detektoren nicht korrigiert, ergibt sich eine Abhängigkeit des SUVA-Wertes von der Retentionszeit, die bei Substanzen mit einer Molmassenverteilung fälschlicherweise als Abhängigkeit des SUVA-Wertes von der Molmasse interpretiert werden kann. Wie man

aus der obigen Abbildung erkennt, besitzt der DOC- gegenüber dem UV-Peak ein Tailing. Eine mögliche Erklärung für das Tailing des DOC-Peaks für KHP kann in der Verwendung einer 0,1 M NaNO₃-Lösung als Eluent liegen. Während bei Verwendung von Millipore-Wasser ohne chromatographisches Trennsystem UV- und DOC-Peaks mit identischer Symmetrie erhalten worden sind (vgl. Tab. 4-8), kann der permanente Eintrag von Na-Ionen eine temporäre CO₂-Senke in Form von anorganischen Kohlenstoffverbindungen darstellen, wie dies bereits in Kap. 4.5.1.2 diskutiert worden ist. Die vollständige Detektion des aus dem DOC erzeugten CO₂ erfolgt dann zeitverzögert. Obwohl hier die DOC-Peakverbreiterung - infolge des vergleichsweise breiten SEC-Ausgangspeaks des UV-Signals - deutlich geringer ausfällt als in Abwesenheit der chromatographischen Säulen, führt die unsymmetrische Peakverbreiterung dazu, daß die beiden Detektorsignale nicht einer Weise, wie in Abb. 4-26 gezeigt, zur Deckung gebracht werden können. Infolgedessen können keine über den Peakverlauf einheitlichen SUVA-Werten erhalten werden, wie dies für einen reinen KHP-Peak zu erwarten wäre.

Nachfolgend soll der Einfluß der Peakverbreiterung auf Substanzen mit einer Molmassenverteilung untersucht werden. Die SEC-Analyse eines PSS-Standards (356 kDa) mit einer (schmalen) Molmassenverteilung konnte nicht herangezogen werden: Für dieses aus einem definierten Monomer synthetisierte Polymer wurde ein DOC-Peak mit einer sehr stark schwankenden Signalintensität und langem Tailing gefunden. Diese ungewöhnliche und gegenüber dem schmalen UV-Peak stark abweichende Peakform rührt sehr wahrscheinlich daher, daß die NDIR-Optik des DOC-Detektors eine Wellenlänge als Referenzsignal verwendet, bei der hohe SO₂-Konzentrationen im Meßgas ebenfalls zu einer Absorption führen. Der gegenüber den meisten HA-Proben vergleichsweise hohe Gehalt an Schwefel (bezogen auf den Kohlenstoffanteil) des PSS-Standards kann - unter den oxidierenden Bedingungen im Reaktor - zu einem hohen Gehalt an Schwefeloxiden im Meßgasstrom führen. Aus diesem Grund konnten keine Untersuchungen der SUVA von PSS-Standards als polymere Substanzen, für die ein konstanter (relativer) SUVA-Wert über die gesamte Peakbreite zu erwarten gewesen wäre, durchgeführt werden. Nachfolgend sollen deshalb die Ergebnisse für eine Aldrich-HA-Probe nach SEC-Trennung mit anschließender UV- und DOC-Detektion betrachtet werden (siehe Abbildung auf der nächsten Seite).

Obwohl der breite SEC-Peak der Aldrich-HA bei UV-Detektion dazu führt, daß die zusätzliche Verbreiterung des DOC-Peaks gegenüber dem UV-Peak noch geringer ausgeprägt ist, als dies für KHP als niedermolekulare Verbindung mit einer definierten Molmasse der Fall ist, kann die Peakverbreiterung zwischen den beiden Detektoren nicht vernachlässigt werden. Auch hier findet sich neben der geringen symmetrischen (unspezifischen), eine unsymmetrische Peakverbreiterung in Form eines Tailings des DOC-Peaks gegenüber dem UV-Peak.

Es bleibt festzuhalten, daß das Ausmaß der unspezifischen Peakverbreiterung mit zunehmender Breite des SEC-Ausgangspeaks im UV-Detektor geringer wird, jedoch bei Anwendung der analytischen SEC-Säulen auch im Fall der Aldrich-HA-Probe nicht zu vernachlässigen ist. Gleichzeitig führt die hier auftretende spezifische (unsymmetrische) Peakverbreiterung und mögliche Unterschiede der SUVA-Werte über den Peakverlauf dazu, daß eine mathematische Anpassung der beiden Detektorsignale und eine exakte Bestimmung der SUVA als Funktion der Molmasse hier nicht möglich sind.

Wird die Peakverbreiterung infolge des DOC-Detektors nicht korrigiert, so impliziert der Verlauf der in Abb. 4-28 dargestellten relativen SUVA als Funktion der Retentionszeit (und somit der Molmasse) der Aldrich-HA, daß es ein Maximum der SUVA gibt. Ähnlich wie es für KHP in Abb. 4-27 dargestellt ist.

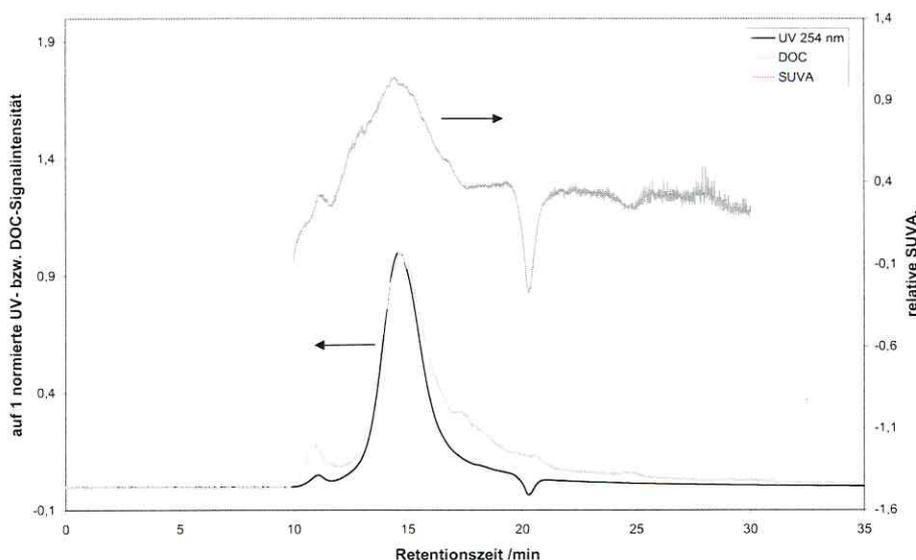


Abb. 4-28: Aldrich-HA nach SEC-Trennung mit einer 0,1 M NaNO₃-Lösung bei pH 7,0 als Eluent. Das Maximum des DOC- und des UV-Signals (254 nm) wurden auf 1 normiert. Die unkorrigierte Überlagerung der beiden Detektorsignale impliziert ein Maximum der (relativen) SUVA.

Aufgrund der Kalibrierung der SEC-Säulen mit PSS-Standards unter Verwendung des UV-Detektors würde der Retentionszeit des SUVA-Maximums eine Molmasse von $M_p = 12,5$ kDa (vgl. Kap. 4.2) zugeordnet werden. Ein derartiges Maximum der SUVA fanden JOHNSON et al. durch die Fraktionierung eines SEC-Peaks einer Aldrich-HA-Probe in 8 Fraktionen und anschließender Offline-Bestimmung der UV-Absorption und der DOC-Konzentration. Die Spreizung der SUVA-Werte der einzelnen Fraktionen für den gesamten untersuchten Molmassenbereich von $<0,1$ bis 100 kDa besaß einen maximalen Faktor von 6. Das Maximum des SUVA-Wertes erhielten sie für die Fraktion um das Peakmaximum des SEC-Peaks bei ca. 10 kDa²⁹. Für UF-Fractionen derselben Aldrich-HA-Probe beobachteten sie ebenfalls einen Abfall der SUVA-Werte mit zunehmender Molmasse der Aldrich-HA-Fractionen (im Bereich von 10 bis 100 kDa). Die Lage des maximalen SUVA-Wertes der UF-Fractionen bei ca. 10 kDa war identisch mit dem der SEC-Fractionen. Ob ein Abfall des SUVA-Wertes – wie im Fall der SEC-Fractionen – hin zu kleineren Molmassen erhalten wird, konnte aufgrund fehlender UF-Membranen mit entsprechend kleinem Cut-off nicht untersucht werden [JOHNSON 2002].

Andere Autoren untersuchten ebenfalls die Abhängigkeit der SUVA-Werte als Funktion der Molmasse von Huminstoffen [BUTLER 1969, LADD 1969, BUFFLE 1978, STEWART 1981, CHIN 1994, KILDUFF 1996]. Ein Vergleich mit diesen Literaturbefunden ist jedoch schwierig, da neben unterschiedlichen Huminstoffen auch andere Größenbestimmungsmethoden in den Arbeiten verwendet worden sind. Insbesondere wurden in den Arbeiten, bei denen die SUVA-Werte verschiedener HAs (und FAs) mit den MW dieser Proben korreliert worden sind, von den Autoren stets ein Trend, d. h. mit der mittleren Molmasse variierende SUVA-Werte erhalten.

²⁹ Bei Kalibrierung der SEC-Säulen mit PSS-Standards unter Verwendung eines Phosphatpuffers in einer 0,1 M NaCl-Lösung (pH 6,8).

ULLMANN untersuchte hingegen ebenfalls mit einem Online-Aufbau den Verlauf der SUVA-Werte über die Molmassenverteilung jeweils eines Huminstoffes und erhielt andere Ergebnisse [ULLMANN 2000]. Er kombinierte einen modifizierten Sievers Online-Detektor mit einem SF⁴-Kanal. Die Peakverbreiterung durch den DOC-Detektor konnte er durch die Einführung eines weiteren UV-Detektors, der dem DOC-Detektor nachgeschaltet war, korrigieren. Erst durch die Einführung dieses weiteren Detektors konnte er für die zuvor untersuchten PSS-Standards einen über weite Bereiche des SF⁴-Peaks konstanten SUVA-Wert nachweisen, wie dies zu erwarten ist. Aus der Anwendung dieses experimentellen Aufbaus auf Suwanee River FA und HA, sowie einer bodenstämmigen HA erhielt er über weite Bereiche des jeweiligen SF⁴-Peaks einen nahezu konstanten SUVA-Wert, der zu hohen Molmassen hin leicht abfiel [ULLMANN 2000].

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch SUMMERS et al. [1987]. Sie untersuchten UF-Fractionen einer Aldrich-HA-Probe. Dabei erhielten sie für alle UF-Fractionen einen nahezu identischen Wert für den Quotienten aus DOC-Gehalt und UV-Absorption bei 254 nm (also dem reziproken SUVA-Wert). Der Wert für eine unfractionierte Aldrich-HA bei pH 7,0 betrug 0,115 g DOC·m⁻². Die Werte der Größenfraktionen lagen zwischen 0,11 und 0,12. Lediglich die UF-Fraktion < 1 kDa wies einen signifikant erhöhten Wert von 0,18 auf. Der hohe Wert wird auf einen möglicherweise erhöhten Anteil von nicht-UV-absorbierenden, aliphatischen Komponenten in dieser Fraktion zurückgeführt. Aus diesen Untersuchungen und der gefundenen strengen Korrelation der beiden Parameter mit einem Korrelationskoeffizienten von R² > 0,99 schlußfolgerten die Autoren, daß die UV-Detektion bei 254 nm ein geeigneter Parameter ist, die DOC-Konzentration aller von ihnen untersuchten HSs einschließlich der Aldrich-HA zu beschreiben [SUMMERS 1987].

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der DOC-Detektor für Batchinjektionen ohne weitere Modifikationen einsetzbar und als universeller, der Kohlenstoffmenge proportionaler Detektor verwendbar ist. Bei Fließinjektion können durch die Anhebung der Ofentemperatur auf 900 °C Peakflächen erhalten werden, die einer vollständigen Verbrennung der Probe nahekommen.

Für den Einsatz als chromatographischer Detektor in Verbindung mit analytischen SEC-Säulen zur Untersuchung von HA-Proben ist sowohl die symmetrische als auch die unsymmetrische Peakverbreiterung des DOC- im Vergleich zum UV-Peak problematisch. Deshalb konnte mit der hier angewandten Detektorkombination keine Online-Bestimmung von SUVA-Werten durchgeführt werden. Auf alkalimetallhaltige Eluenten sollte in Zukunft verzichtet werden. Dies würde die Standzeit des Quarzglasreaktorrohres im DOC-Detektor erhöhen und möglicherweise zu einem geringeren Tailing des DOC-Signals führen. Eventuell könnten Ammonium-Salze verwendet werden. Ihre Eignung als Zusatz zu einem SEC-Eluenten wäre noch zu prüfen.

4.6 Kopplung der Größencharakterisierungsmethode SEC mit der FQT zur Online-Bestimmung eines molmassenaufgelösten Sorptionskoeffizienten

Die Online-Kopplung von Größentrenntechniken wie der SEC bzw. der AF⁴ mit Methoden zur Bestimmung des Sorptionskoeffizienten (z. B. FQT) stellt einen eleganten und vor allem schnellen Ansatz zur Ermittlung von nach der Molekülgröße aufgelösten Sorptionskoeffizienten dar. Nach einigen Voruntersuchungen zur Optimierung der für die Analyse einzusetzenden Konzentrationen von Sorbens und Sorptiv sowie der Flußraten kann in maximal drei notwendigen Analyseläufen ein kompletter Datensatz zur Auswertung erhalten werden. Der Substanzbedarf ist bei einer derart niedrigen Zahl von Analysenläufen und der eingesetzten Analytmassen gering.

Prinzipiell kann man das gleiche Ziel auch durch Fraktionierung der Huminstoffe im präparativen Maßstab und Offline-Messung von Sorptionskoeffizienten erreichen. Dieses Vorgehen birgt jedoch das Risiko, daß - einem Hinweis aus der Literatur folgend - die mittels der UF-Methode separierten Molekülgrößenfraktionen von HAS nach relativ kurzer Zeit (in der Größenordnung von Stunden) wieder zur Einstellung einer breiten Molekülgrößenverteilung neigen [ASTER 1996]. Somit könnte die Aussagefähigkeit von Offline-Analysen für diese spezielle Fragestellung eingeschränkt sein.

Geeignet zur Online-Kopplung sind aber nur solche Methoden zur Bestimmung des Sorptionskoeffizienten, bei denen sich die das Gleichgewicht kennzeichnende Meßgröße schnell einstellt. Hier bietet sich vor allem die FQT als schnelle Methode an. Die praktische Umsetzung der Online-Kopplung soll im Folgenden dargestellt werden.

In Abb. 4-29 sind die Chromatogramme unter Verwendung des Fluoreszenzdetektors (FLD) dargestellt. Die Flußrate der SEC wurde im SEC/FQT-Experiment von üblicherweise 1 ml·min⁻¹ auf 0,7 ml·min⁻¹ reduziert. Für die AF⁴-Methode war durch Vorversuche eine optimale Kanalausgangsflußrate von 0,7 ml·min⁻¹ gefunden worden. Die Flußrate der Größentrennmethode ist entscheidend für die Kontaktzeit von Fluorophor und Löscher im (Reaktions-)Volumen des Intensivmischers und der nachfolgenden Kapillare. Um die Vergleichbarkeit der Resultate aus den SEC/FQT- mit den später beschriebenen AF⁴/FQT-Experimenten zu verbessern, wurden deshalb hier bei beiden Größentrennmethoden die gleichen Flußraten gewählt.

Zur Bestimmung der optimalen Flußrate des zudosierten Sorptivstroms wurden einige Vorversuche mit verschiedenen Raten durchgeführt. Ein gut auswertbares Fluoreszenzsignal (und eine gleichzeitig geringe Reduzierung der HA-Konzentration) wurde bei einem Eluentenfluß von 0,7 ml·min⁻¹ und einer Flußrate der Sorptivlösung von 0,2 ml·min⁻¹ gefunden. Durch das Vermischen des Sorptivvolumenstroms (0,2 ml·min⁻¹) mit dem Volumenstrom aus der SEC (bzw. AF⁴) (0,7 ml·min⁻¹) resultierte eine Lösung mit einer Pyren-Konzentration von ca. 22 ppb, die die Meßzelle des FLD durchströmte.

Bei der gewählten Flußrate für den Sorptivstrom von 0,2 ml·min⁻¹ war das Volumen der Probenschleife groß genug, so daß - nachdem ein Plateau des Pyren-Fluoreszenzsignals nach kurzer Zeit erreicht worden war - ein kontinuierliches Fluoreszenzsignal für die gesamte Dauer der SEC-Analyse der HA-Probe erhalten wurde. Der Wert für F₀ wurde deshalb in den folgenden Versuchen mit der SEC/FQT-Kopplung nicht über die gesamte Dauer der Analysenläufe als Funktion der Retentionszeit aufgenommen. Er ist in der folgenden Abbildung als gestrichelte Linie eingetragen.

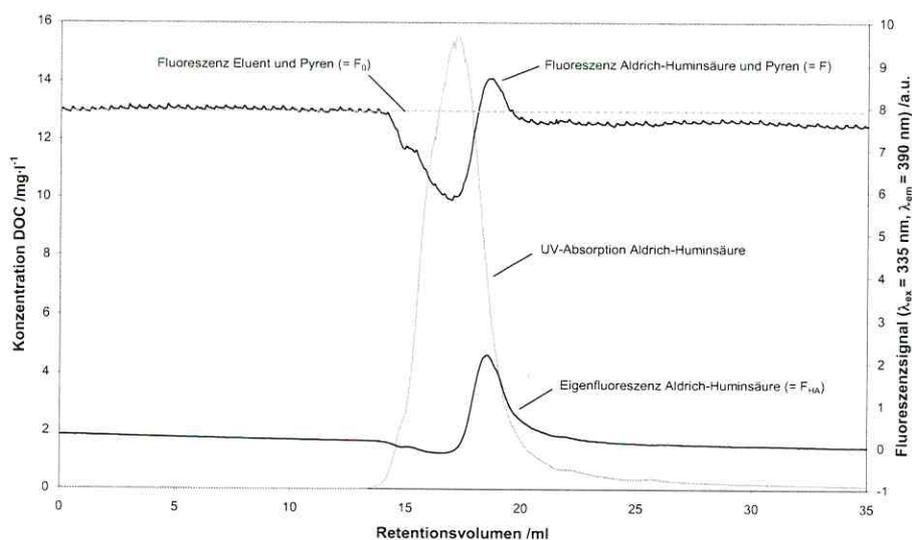


Abb. 4-29: Rohdaten des SEC/FQT-Versuches; Bedingungen: 0,1 M NaNO₃ (+ 200 ppm NaN₃) bei pH 7,0; 0,7 ml/min Flußrate SEC; 0,2 ml/min Flußrate Pyren-Lösung (c = 100 ppb); DAD bei 260 nm (Ref. 360 nm) und FLD bei λ_{exc} = 335 nm und λ_{em} = 390 nm; 20-µl-Probenschleife; Konzentration der Aldrich-HA ca. 10 g·l⁻¹.

Das Fluoreszenzsignal der vereinigten Lösungen von SEC- und Pyren-Volumenstrom (Pyren-HA-Lösung) zeigt eine deutliche Abhängigkeit vom Retentionsvolumen. Das starke Rauschen des Fluoreszenzsignals ist wahrscheinlich auf - durch die HPLC-Pumpe verursachte - Pulsationen zurückzuführen, da die Schwingungen eine konstante Periodizität aufweisen. Der Pumpe war zwar ein Pulsationsdämpfer nachgeschaltet, dieser konnte aber offensichtlich durch die Pumpe hervorgerufenen Pulsationen im Fluß des Pyren-Stroms nicht vollständig beseitigen. Die Schwingungen der Signallinie wirken sich aber aufgrund ihrer geringen Höhe nicht auf die Auswertbarkeit des FQT-Experimentes aus. Bis auf diese periodischen Pulsationen weist das Fluoreszenzsignal zwischen einem Retentionsvolumen von 0 und ca. 14 ml einen konstanten Wert auf. Die Signalhöhe wird hier ausschließlich von der Fluoreszenzintensität des Pyren bestimmt. Eine deutliche Abnahme des Signals tritt bei einem Retentionsvolumen von ca. 14 ml ein. Bei diesem Retentionsvolumen ist gleichzeitig ein deutlicher Anstieg des durch die Aldrich-HA hervorgerufene Absorptionssignals bei 260 nm im DAD zu erkennen. Die Anwesenheit von Teilen der Aldrich-HA-Probe führt zum Auslöschung der Pyren-Fluoreszenz. Eine Umkehr des beschriebenen Verlaufs des Fluoreszenzsignals ist ab ca. 17,5 ml zu beobachten. Bei diesem Retentionsvolumen besitzt das Fluoreszenzsignal ein Minimum und fällt nahezu mit dem Maximum des Absorptionssignals im DAD zusammen. Bei einem Retentionsvolumen von ca. 18 ml übersteigt das Signal den Wert, welcher für die alleinige Anwesenheit von Pyren im Flüssigkeitsstrom erhalten wurde. Das Signalmaximum der Fluoreszenzintensität wird bei ca. 19 ml erreicht. Bei höheren Retentionsvolumina sinkt das Signal auf einen Wert ab, der nahezu dem Wert für die reine Pyren-Eluent-Lösung entspricht. Die geringe negative Abweichung von der Signalhöhe des (reinen) Eluent-Pyren-Signals an dieser Stelle läßt sich mit der Anwesenheit von geringen Konzentrationen an Aldrich-HA im SEC-Ausgangsfluß erklären. Die Aldrich-HA zeigt bei der Elution über die SEC-Säulen ein

ausgeprägtes Peak tailing. Möglicherweise eluieren hier noch Anteile der Aldrich-HA-Probe, die aus anderen Wechselwirkungen als den reinen Größenausschlußwechselwirkungen (Adsorption an die Säulenmatrix) resultieren. Eine hohe Konzentration an HA in der Probe ist aber notwendig, um eine ausreichend starke Fluoreszenzlöschung im Experiment zu erhalten.

Notwendig für die Auswertung des FQT-Experiments ist auch die Aufnahme des Verlaufs der Fluoreszenzintensität bei Elution der Aldrich-HA-Probe unter Zusatz eines Pyren-freien Eluentenstroms über das T-Mischerstück. Die Aldrich-HA zeigt hier bei den gewählten Wellenlängen ein ausgeprägtes Eigenfluoreszenzsignal mit einem Maximum der Signalintensität bei ca. 19 ml. Das Fluoreszenzmaximum fällt nicht mit dem Konzentrationsmaximum (UV-Signal) der HA-Probe zusammen, sondern ist zu einem höheren Retentionsvolumen hin verschoben. Eine starke Fluoreszenz des niedermolekularen Anteils von HA wird auch bei den nachfolgend dargestellten AF⁴-Experimenten gefunden.

Die Auswertung der oben beschriebenen Chromatogramme, d. h. die Berechnung des $\log K_{\text{DOC}}$ -Wertes, erfolgte unter Verwendung der im Theorieteil beschriebenen notwendigen Korrekturen. Besonders die Subtraktion der Eigenfluoreszenz der Aldrich-HA im niedermolekularen Bereich leistet hier einen erheblichen Beitrag zum Ausmaß der Korrektur. Aufgrund der in Kap. 4.5.2 erhaltenen Ergebnisse zur Molmassenabhängigkeit der spezifischen UV-Absorption (SUVA), sowie des ungelösten Problems der Peakverbreiterung im DOC-Detektor wurde zur Auswertung der Online-FQT-Analysen die nachfolgend beschriebene, vereinfachte Vorgehensweise gewählt. Die Auswirkungen einer möglichen Molmassenabhängigkeit des SUVA auf Ergebnisse der Online-FQT-Analysen werden anschließend auf qualitativer Basis diskutiert.

Unter der Annahme eines molmassenunabhängigen Extinktionskoeffizienten der HA wurde der Verlauf des DAD-Signals bei 260 nm als Funktion des Retentionsvolumens aufgezeichnet und in eine DOC-Konzentration umgerechnet. Dazu wurde der Detektor vorher bei dieser Wellenlänge mit einer Verdünnungsreihe der Aldrich-HA kalibriert. Der DOC-Gehalt der HA-Lösungen wurde aus dem elementaranalytisch bestimmten Kohlenstoffgehalt und der Aldrich-HA-Einwaage bestimmt. Der Verlauf des so berechneten $\log K_{\text{DOC}}$ -Wertes als Funktion des Retentionsvolumens ist nachfolgend zusammen mit dem Verlauf der DOC-Konzentration dargestellt.

Eine nur geringe Abnahme der Fluoreszenzintensität ist stark fehlerbehaftet. Deshalb soll hier nur der Bereich betrachtet werden, in dem das Fluoreszenzsignal um mehr als 10 % gegenüber dem F_0 -Wert (in Abwesenheit von HA) abnimmt; erst eine derartige Abnahme um mehr als 10 % wurde als signifikant angesehen. Dieser Bereich ist in der nachfolgenden Darstellung durch die dickere schwarze Linie gekennzeichnet.

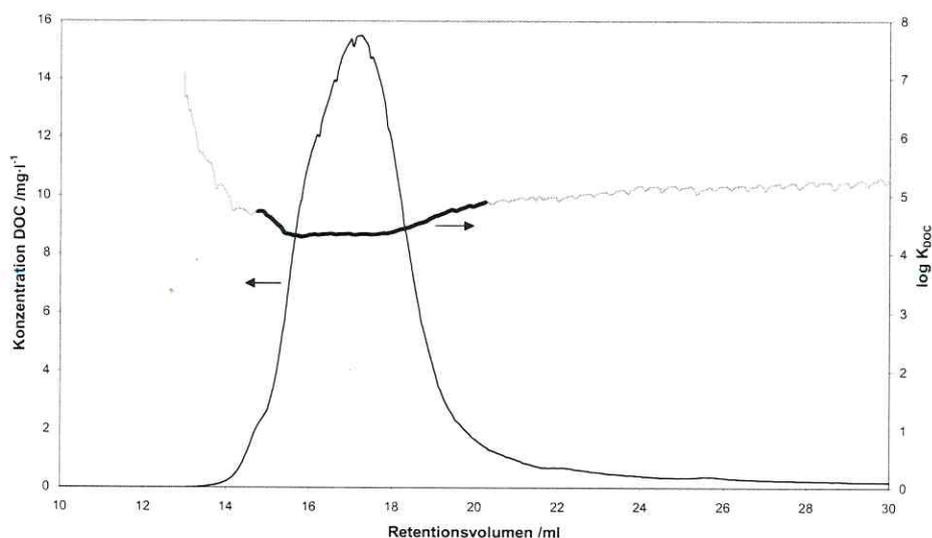


Abb. 4-30: Auftragung der DOC-Konzentration und des berechneten $\log K_{\text{DOC}}$ für das System Aldrich-HA/Pyren in 0,1 M NaNO_3 (pH 7,0) als Funktion des Retentionsvolumens einer SEC-FQT-Analyse. Der Bereich, in dem eine Abnahme des Fluoreszenzsignals um mehr als 10 % gegenüber dem Wert von F_0 erhalten wurde, ist graphisch hervorgehoben.

Beginnend mit der hochmolekularen DOC-Fraktion sinkt der $\log K_{\text{DOC}}$ -Wert von 4,7 auf 4,3 ab. Nachfolgend wird ein nahezu konstanter Wert zwischen 4,3 und 4,4 über einen breiten Retentionsvolumenbereich von ca. 3 ml erhalten. In diesem Bereich eluiert auch ein Großteil der Masse der Aldrich-HA mit einem Peakmaximum der DOC-Konzentration bei 17,3 ml. Mit abfallender DOC-Konzentration steigt $\log K_{\text{DOC}}$ erneut an auf Werte bis 4,9. Auch für einen Elutionsbereich von > 20 ml wird ein nahezu konstanter $\log K_{\text{DOC}}$ -Wert gefunden. Das gemessene Fluoreszenzsignal liegt in diesem Bereich unter dem F_0 -Wert (vgl. Abb. 4-29). Dies könnte, wie bereits erwähnt, auf die in diesem Bereich beobachtete niedrige DOC-Konzentration im Peaktailing zurückzuführen sein. Die Abnahme der Fluoreszenzsignalintensität liegt aber unterhalb der als signifikant angesehenen Schwelle von 10 %. Es ist bemerkenswert, daß der Bereich mit einer verstärkten Eigenfluoreszenz der HA keine Auffälligkeiten im Verlauf des $\log K_{\text{DOC}}$ -Wertes über dem Retentionsvolumen zeigt. Dies spricht für eine richtige Korrekturprozedur.

Sieht man von diesen $\log K_{\text{DOC}}$ -Werten der Randbereiche ab, so läßt sich folgendes Ergebnis festhalten: Der $\log K_{\text{DOC}}$ wurde als Funktion des Retentionsvolumens einer durch SEC nach Molekülgröße aufgetrennten Aldrich-HA-Probe erhalten. Die $\log K_{\text{DOC}}$ -Werte nehmen dabei im vorderen Teil des Aldrich-HA-Peaks von 4,7 auf 4,3 ab. Im hinteren Bereich des Peaks steigen sie von 4,4 auf 4,9 an. Diese Randbereiche werden den höher- bzw. den niedermolekularen Anteilen einer (HA-)Probe bei einer SEC-Trennung zugeschrieben. Für das Peakmaximum und den überwiegenden Masseanteil der Aldrich-HA-Probe, der den Molmassenbereich von ca.

2 bis 28 kDa³⁰ überdeckt, werden nahezu konstante Werte zwischen 4,3 und 4,4 für den $\log K_{\text{DOC}}$ des Systems Pyren/Aldrich-HA (0,1 M NaNO₃, pH = 7,0) erhalten.

4.7 Kopplung der Größentrennmethode AF⁴ mit Online-FQT-Analysen

Analog den Experimenten mit der SEC/FQT-Kopplung wurden Experimente mit einer Kopplung von AF⁴ und FQT durchgeführt. Diese sollten die vorstehend beschriebenen Ergebnisse der SEC/FQT-Analysen validieren, da die AF⁴ einen anderen Mechanismus zur Molekülgrößentrennung verwendet. Somit sollten eventuelle SEC-Artefakte, die sich auf die molekülgrößenaufgelöste Beschreibung des K_{DOC} -Wertes auswirken, erkannt werden. Die Rohdaten der AF⁴-Experimente sind (analog Abb. 4-29) in der untenstehenden Abbildung graphisch dargestellt.

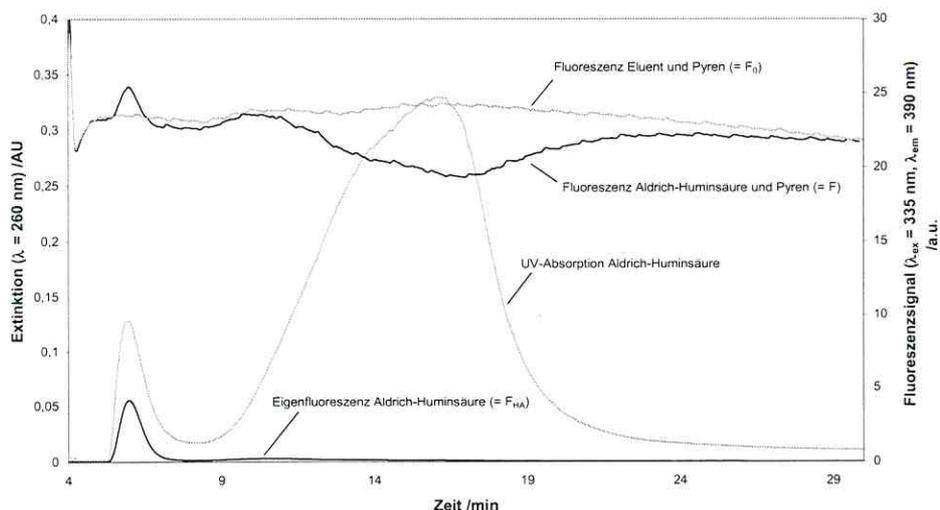


Abb. 4-31: Rohdaten des Online-FQT-Versuchs von Pyren (ca. 18 ppb) und Aldrich-HA (ca. 10 g/l) bei Größentrennung mittels AF⁴. Eluent: 0,1 M NaNO₃ (pH 7); programmierter Feldgradient.

Die in dieser Arbeit verwendete AF⁴-Anlage (ConSensus) besaß nicht die Möglichkeit, während der Probenaufgabe- und Fokussierungsphase einen Volumenstrom an Eluent durch die Detektoren zu leiten, wie es bei einigen anderen Systemen möglich ist. Da während dieser Phase der Pyren-Strom unverdünnt in den Detektor fließen würde, wurde die Analytpumpe für diesen Zeitraum gestoppt und mit Umschalten des AF⁴-Systems auf den Elutionsmodus wieder gestartet. Dabei zeigte sich durch diese Verfahrensweise bei der Elution einer Blindprobe (Eluent) über die AF⁴ keine erkennbare Änderung des Fluoreszenzsignals des Pyren nach

³⁰ Diese Molmassen wurden aus der für diese SEC-Säulen erhaltenen Kalibrierung mit PSS-Standards unter Berücksichtigung des Volumensatzes zwischen UV-Detektor und DAD berechnet.

Neustart der Pumpe gegenüber dem Verlauf bei einem konstanten (nicht unterbrochenen) Kanalfluß von $0,7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ der AF^4 (Rinsemodus).

Im Verlauf einer AF^4 -Analyse wird, bedingt durch den programmierten Kraftfeldgradienten, die Flußrate der Kanal-Pumpe verändert. Während die Pumpe nahezu augenblicklich auf das veränderte Steuersignal anspricht, benötigt die Regeleinheit für den Querfluß am Kanalboden (LiquiFlow) eine längere Einregelzeit. Daraus resultiert eine (reproduzierbare) Schwankung der Kanalausgangsflußrate und somit des Mischungsverhältnisses von Sorbens- und Sorptivvolumenstrom. Um die Auswirkungen derartiger systembedingter Effekte auf die nachfolgende FQT-Analyse zu berücksichtigen, wurde hier (entgegen den SEC-Experimenten) ein zusätzlicher Blindlauf (Injektion und Elution von Eluent) unter Zumischung von Pyren durchgeführt. Hieraus wurde der von der Elutionszeit abhängige Wert für F_0 erhalten. Alle anderen Korrekturen erfolgten analog zu den im Kap. 4.6 beschriebenen SEC/FQT-Experimenten.

Die vorstehende Abbildung zeigt, daß bei der Analyse der Aldrich-HA mit der AF^4 ebenfalls eine Eigenfluoreszenz der niedermolekularen HA-Probenbestandteile (hier bei ca. 11 min) gefunden wird. Dies stimmt gut mit den aus der SEC-Analyse erhaltenen Ergebnissen überein. Ausgeprägter aber ist die Fluoreszenzintensität in dem als Voidpeak des Systems bezeichneten ersten Peak bei ca. 6 min. Auf das Phänomen des Voidpeaks wurde bereits eingegangen (vgl. Kap. 4.3). Hier scheint die hohe Intensität des Fluoreszenzsignals die These zu bestätigen, daß der Voidpeak vor allem durch die Elution von niedermolekularen Anteilen der HA-Probe verursacht wird.

Nach den bereits beschriebenen Korrekturen der Eigenfluoreszenz der Aldrich-HA und des IFE wurde das folgende Ergebnis für den Wert des $\log K_{\text{DOC}}$ als Funktion der (Elutions-)Zeit erhalten.

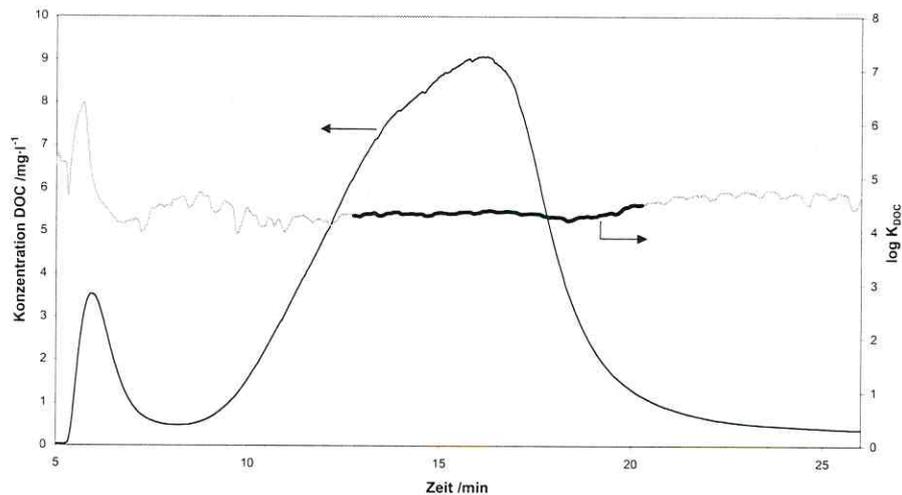


Abb. 4-32: Berechneter $\log K_{\text{DOC}}$ -Wert als Funktion der Elutionszeit bei Molekülgrößentrennung einer Aldrich-HA Probe durch AF^4 und anschließende Online-FQT-Analyse für Pyren. Bedingungen: siehe vorige Abbildung. Der Bereich, in dem eine Abnahme des Fluoreszenzsignals um mehr als 10 % gegenüber dem Wert von F_0 erhalten wurde, ist graphisch durch eine dickere Linie hervorgehoben.

In der vorstehenden Abbildung ist der Bereich, in dem eine Abnahme des Fluoreszenzsignals in Anwesenheit von HA von mehr als 10 % gegenüber dem F_0 -Signal erhalten wurde, durch eine dickere schwarze Linie gekennzeichnet. Über nahezu dem gesamten Bereich, in dem die Verringerung der Fluoreszenzintensität als signifikant betrachtet wurde, werden Werte für den $\log K_{\text{DOC}}$ zwischen 4,3 und 4,4 gefunden. Dieser entspricht – ähnlich wie im Fall der SEC/FQT-Analyse – einem großen Massenanteil der eluierenden Aldrich-HA-Probe mit einer nominellen Molmasse von 4 kDa bis 120 kDa³¹. Der im Plateau um das Peakmaximum des SEC-Peaks berechnete Wert beträgt $\log K_{\text{DOC}} = 4,35$ und stimmt damit sehr gut mit dem hier berechneten Wert überein. Ein leichter Anstieg des $\log K_{\text{DOC}}$ -Wertes auf 4,5 wird nur im höhermolekularen Bereich oberhalb von 19,8 min (entsprechend einer nominellen Molmasse von > 120 kDa) gefunden. Der UV-Peak zeigt hier eine deutliche Abnahme der DOC-Konzentration.

Eine deutliche Zunahme des K_{DOC} -Wertes für diese Fraktion kann innerhalb des Bereichs, bei dem eine als signifikant betrachtete Abnahme der Fluoreszenzintensität bestimmt wurde, nicht gefunden werden. Die aus der SEC/FQT-Analyse erhaltenen Ergebnisse können hier also insgesamt bestätigt werden. Eine deutliche Molmassenabhängigkeit des Verteilungskoeffizienten für die Sorption von Pyren an Aldrich-HA kann durch die erhaltenen Ergebnisse nicht nachgewiesen werden.

Die Berechnung der (\log) K_{DOC} -Werte beruht - wie eingangs erwähnt - auf der Annahme, daß die gleiche Beziehung zwischen der UV-Absorption und der DOC-Konzentration über den gesamten Molmassenbereich gültig ist. Aufgrund der Peakverbreiterung, die im Kap. 4.5.2 ausführlich dargestellt wurde, kann der in dieser Arbeit beschriebene Online-DOC-Detektor nicht direkt zur Bestimmung der DOC-Konzentration der HA-Proben herangezogen werden. Wenn also eine Abhängigkeit des SUVA-Wertes von der Molmasse nicht ausgeschlossen werden kann, so weist Abb. 4-28 eher auf geringere SUVA-Werte der nieder- und hochmolekularen Anteile der Aldrich-HA-Probe gegenüber dem mittleren Molmassenbereich hin. D. h., das UV-Signal liefert hier möglicherweise niedrigere DOC-Konzentrationen als es dem wahren DOC-Gehalt entspricht. Zu geringe DOC-Konzentrationen in den Randbereichen des UV-Peaks der HA-Probe führen aber zu zu hohen K_{DOC} -Werten in diesen Bereichen. Folglich würde der Unterschied der $\log K_{\text{DOC}}$ -Werte in den Randbereichen im Vergleich zu dem breiten Bereich mit konstantem $\log K_{\text{DOC}}$ -Wert (vgl. Abb. 4-30 und Abb. 4-32) weiter verringert oder sogar völlig nivelliert.

Damit bestätigen die oben dargestellten Ergebnisse nicht die Schlußfolgerungen von JOTA und HASSETT, daß besonders hochmolekulare Bestandteile von Aldrich-HA einen erhöhten Beitrag zur Gesamtsorption von HOS leisten [JOTA 1991]. Dieses Ergebnis erhielten sie aus Experimenten zur Sorption von [¹⁴C]2,2',5,5'-Tetrachlorbiphenyl (TCB) an Aldrich-HA. Die Aldrich-HA-Probe fraktionierten sie mittels der UF-Methode und erhielten durch die gewählten Ausschlußgrenzen der UF-Membran die folgenden Größenfraktionen: 0 - 1, 1 - 10, 10 - 50, 50 - 100, 100 - 300 und > 300 kDa. Anschließend bestimmten sie mit Hilfe der Gaspurging-Methode die Sorptionskoeffizienten der einzelnen UF-Fractionen. Die Fraktion > 300 kDa wies dabei mit einem $\log K_{\text{DOC}}$ von 5,02 den größten Sorptionskoeffizienten auf. Die Werte nahmen zu den kleineren Molekülgrößenfraktionen hin beinahe kontinuierlich ab. Fraktionen < 300 kDa besaßen einen durchschnittlichen Wert von 4,47. Den Masseanteil der durch die UF erhaltenen Fraktion mit einem Molekulargewicht von > 300 kDa bezifferten sie mit > 50 % an der Gesamtmasse der Aldrich-HA-Probe. Das erhaltene Resultat sei konform mit der Tatsache,

³¹ Der Molmassenbereich wurde für die Grenzen (12,8 und 19,8 min) mittels der Kalibriergeraden für das AF²-System (vgl. Kap. 4.3) unter Berücksichtigung des Volumen- bzw. Zeitversatzes zwischen UV- und DA-Detektor berechnet.

daß für die (unfraktionierte) Aldrich-HA-Gesamtprobe Werte für den $\log K_{\text{DOC}}$ von 5,02 gefunden wurden; aufgrund seiner relativen Häufigkeit dominiert der hochmolekulare Anteil somit das Sorptionsverhalten der unfraktionierten Aldrich-HA-Probe [JOTA 1991]. Derart große Anteile dieser hochmolekularen Fraktion konnten aber weder in dieser Arbeit mittels SEC- und AF⁴-Analyse, noch in anderen in der Literatur beschriebenen Untersuchungen für die Aldrich-HA nachgewiesen werden [z. B. CHIN 1994]. Es liegt also nahe zu vermuten, daß derart hohe Anteile an hochmolekularen HA-Molekülen auf Einflüsse der UF-Methode zurückzuführen sind. Da bei Anwendung der UF die HA-Moleküle zu einer Anreicherung unmittelbar oberhalb der UF-Membranoberfläche gezwungen werden, kann es aufgrund der hohen HA-Konzentration in diesem Bereich zur Agglomeration von eigentlich kleineren HA-Molekülen kommen. Diese können dann aufgrund ihrer Größe als Agglomerate nicht mehr durch die Membran permeieren und verbleiben so in der größten UF-Fraktion. Nach Aufhebung des Kraftfeldes (und einem dadurch fehlenden Konzentrationsgradienten) dissoziieren diese lose gebundenen Agglomerate dann wieder zu niedermolekularen Strukturen. Dies erklärt auch das eingangs erwähnte Ergebnis, daß HA-Molekülgrößenfraktionen, welche durch die Anwendung der UF-Methode erhalten worden waren, wieder zur Einstellung einer breiten Molekülgrößenverteilung neigen [ASTER 1996].

In dieser Arbeit führen die geringen DOC-Konzentrationen in den Flanken des Aldrich-HA-Peaks und die damit verbundenen geringen Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten von F_0 und F_{gem} aber auch zu unsicheren Werten für $\log K_{\text{DOC}}$, so daß sich eine Abhängigkeit des Sorptionskoeffizienten von besonders hochmolekularen Bestandteilen der Aldrich-HA-Probe nicht vollständig ausschließen läßt. Gleiches gilt unter diesem Gesichtspunkt auch für die besonders niedermolekularen Anteile der Aldrich-HA-Probe. Die Annahme, daß auch niedermolekulare Bestandteile (< 1 kDa) der Aldrich-HA einen deutlichen Beitrag zur Gesamtsorption der HA leisten, konnten JOTA und HASSETT mit ihrer Methode nicht verifizieren, da die kleinste Ausschlußgrenze der von ihnen verwendeten UF-Membranen bei 1 kDa lag [JOTA 1991].

Insgesamt liegt der ermittelte $\log K_{\text{DOC}}$ -Wert des größten Probenanteils mit 4,3 bis 4,4 unter den in der Literatur angegebenen - mittels der Offline-FQT bestimmten - Werten für das System Pyren/Aldrich-HA. Darauf soll aber in der Diskussion der Ergebnisse der Offline-FQT-Analysen genauer eingegangen werden.

Ein durch den apparativen Aufbau bedingter Faktor, der unmittelbar Einfluß auf die Höhe des ermittelten K_{DOC} -Wertes nimmt, ist die Reaktionszeit zwischen der nach Molekülgröße aufgetrennten HA-Probe und der Sorptivlösung. Diese wird durch die Gesamtflußrate beider Volumenströme und die Volumina des Intensivmischers sowie der nachfolgenden Kapillaren und der DAD-Meßzelle bestimmt. Aus dem Volumen der Verbindungskapillare zwischen dem Intensivmischer und den nachfolgenden Detektoren, sowie der Flußrate von $0,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ergibt sich eine Reaktionszeit von ca. 25 s. Um eine deutliche Erhöhung der Kontaktzeit zu erreichen, müßten beträchtlich längere Verbindungskapillaren eingesetzt werden; bis hin zu einem Kapillarovolumen, in der der gesamte Peak ohne signifikante axiale Vermischung „geparkt“ werden kann. Zeitaufgelöste Offline-FQT-Experimente haben gezeigt, daß sich die Sorptionsgleichgewichte zwischen PAK und gelösten HAs sehr schnell einstellen [SCHLAUTMANN 1993]. Für Pyren und Anthracen in Wechselwirkung mit Suwanee River HA in 0,1 M NaCl (pH 5) fanden sie Werte für die vollständige Einstellung des Gleichgewichtes von 15 - 20 s. Einen geringfügigen Abfall des Fluoreszenzsignals von Pyren in Gegenwart einer Fulvinsäure in den ersten 5 min beobachtete Zimmermann durch eine zeitaufgelöste Fluoreszenzanalyse. Der erste Datenpunkt konnte dabei nach 10 s aufgezeichnet werden. Die Fluoreszenzintensität der luftgesättigten

Probe blieb dabei über einen Zeitraum von ca. 500 Tagen stabil [ZIMMERMANN 1996B]. Eine verzögerte Einstellung des Gleichgewichts bei FQT-Analysen beobachteten dagegen KOPINKE et al. Während sie für einen großen Anteil des Pyren eine schnelle Sorption im Bereich von Sekunden fanden, benötigte ein kleiner Anteil (15 - 25 % der Gesamtmenge an sorbiertem Pyren) einen deutlich längeren Zeitraum (in einer Größenordnung von 30 min) zur Sorption an gelöster Roth-HA. Dies läßt sich mit einem einfachen Verteilungsmodell, analog der Verteilung zwischen zwei flüssigen Phasen oder der Verteilung zwischen Wasser und einem Mizellenverband, nicht mehr hinreichend erklären. Deshalb wird auch für gelöste HAS - ähnlich wie für partikuläre oder feste HAS - ein zweistufiges Sorptionsmodell postuliert, in dem es durch die Diffusion des Sorbats in tiefer gelegene Schichten des Sorbens zu der beobachteten (formalen) Unterteilung in zwei verschiedene Sorptionsgeschwindigkeitskonstanten kommt [KOPINKE 2001B].

Um den Einfluß einer deutlich erhöhten Kontaktzeit auf den $\log K_{\text{DOC}}$ -Wert zu untersuchen, wurde eine unfraktionierte Aldrich-HA-Lösung (IS = 0,1 M, pH = 7) mit einer Pyren-Lösung vermischt. Nach einer Äquilibrierungszeit von 1 h wurde die Lösung über Kapillaren direkt in die Meßzellen des DAD und des nachfolgenden FLD mittels einer Glasspritze injiziert. Des weiteren wurden Lösungen aus Aldrich-HA/Eluent und Eluent/Pyren auf diese Weise in beiden Detektoren untersucht. Aus den jeweils im Signal-Plateau erhaltenen Werten, den notwendigen Korrekturen (Eigenfluoreszenz und IFE der HA-Lösung), sowie der DOC-Konzentration der Lösung wurde ein Wert für die unfraktionierte Aldrich-HA-Probe von $\log K_{\text{DOC}} = 4,45$ berechnet. Damit ist dieser $\log K_{\text{DOC}}$ -Wert zwar (geringfügig) höher als die in den Online-Experimenten berechneten molmassen-aufgelösten $\log K_{\text{DOC}}$ -Werte (4,3 bis 4,4), weicht aber dennoch deutlich von dem oben zitierten Literaturwert ab. Dieses einfache Experiment zeigt, daß eine Erhöhung der Kontaktzeit zwischen Sorptiv und Sorbens von mehreren Sekunden auf eine Stunde in diesem Fall nicht zu einer drastischen Erhöhung des $\log K_{\text{DOC}}$ -Wertes führt. Durch die Kontaktzeit von einer Stunde sollte jedoch eine (nahezu) vollständige Gleichgewichtseinstellung erhalten werden.

Bei Verwendung von Pyren als Sorptiv besteht – aufgrund seiner starken Hydrophobie ($\log K_{\text{ow}} = 5,2$) – eine starke Neigung zu hydrophoben Wechselwirkungen mit unpolaren Sorbentien (Dichtungsmaterial usw.). Aber auch eine Sorption an Glaswände wird häufig beobachtet. So könnte eine Sorption von Pyren an den Glasfenstern der Meßzellen die Messung der Fluoreszenzlöschung beeinflussen: Bei Online-Experimenten ändert sich die Konzentration des frei gelösten Pyren je nach HA-Gehalt. So könnte z. B. zu Beginn der Analyse (also in Abwesenheit von HA im Ausgangsfluß der Größentrennmethode) Pyren an die Glaswandungen der Meßzellen sorbieren. In Gegenwart von HA kann dieses sorbierte Pyren verstärkt rückgelöst werden und somit die gemessene Fluoreszenzintensität F_{gem} erhöhen. Damit würde der K_{DOC} -Wert zu niedrig bestimmt. Von einer Oberflächenpassivierung der Meßzellen (z. B. durch Silanisierung) wurde jedoch abgesehen, da eine derartige Prozedur die teuren optischen Fenster unbrauchbar machen könnte. Gegen einen großen Einfluß der Pyren-Sorption an die Zellwandungen auf den Sorptionskoeffizienten spricht jedoch das Ergebnis des oben dargestellten Semi-Batchexperiments. Hier wurden die Fluoreszenzintensitäten und UV-Absorptionen mit dem gleichen experimentellen Aufbau der Online-Detektion bestimmt und daraus der Sorptionskoeffizient berechnet. Abweichend von den Online-Experimenten wurden jedoch Lösungen mit konstanten Konzentrationen an Pyren und HA jeweils getrennt voneinander analysiert, was somit der Durchführungsweise der Batchexperimente entspricht. Der so ermittelte Wert für den Sorptionskoeffizienten ist jedoch nur geringfügig höher im Vergleich zu den Online-Experimenten.

Im Gegensatz zu Pyren neigt Naphthalin weniger zu derartigen (unerwünschten) sorptiven Wechselwirkungen mit dem Glasmaterial. Deshalb wurde die Sorption von Naphthalin an Aldrich-HA ebenfalls mittels der Online-FQT-Methode untersucht. Die verschiedenen FLD- bzw. DAD-Signale sind in der nachfolgenden Abbildung zusammengefaßt.

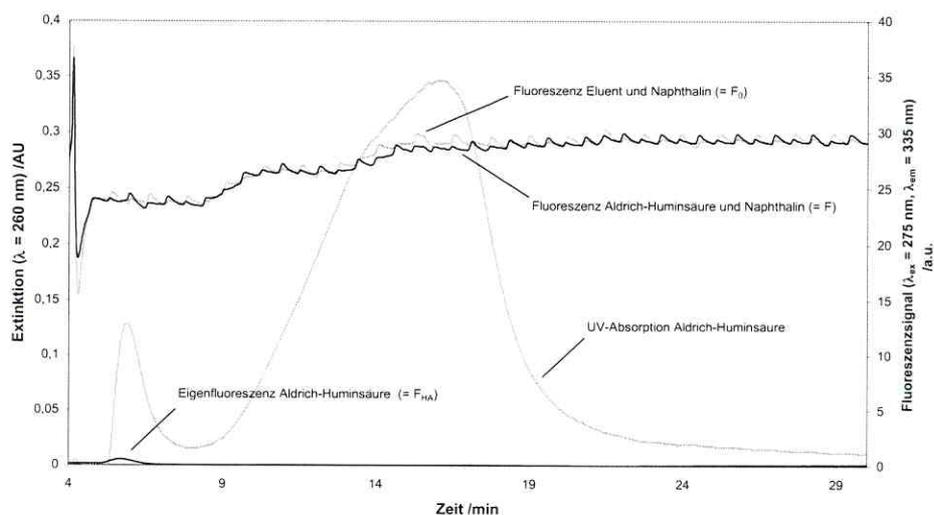


Abb. 4-33: Zusammenstellung der Detektorspuren des Online-FQT-Versuchs mit Naphthalin (2 ppm) und Aldrich-HA ($c_{0,HA} = 10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) nach Größentrennung mittels AF^4 und anschließender Online-FQT-Analyse.

Die Eigenfluoreszenz der Aldrich-HA bei den entsprechenden Anregungs- und Emissionswellenlängen (λ_{ex} : 275 nm, λ_{em} : 335 nm) ist deutlich geringer als bei den Wellenlängen, die für die Analyse von Pyren verwendet wurden (λ_{ex} : 335 nm, λ_{em} : 390 nm). Lediglich im Voidpeak der Aldrich-HA-Probe wird bei den zuvor genannten Wellenlängen eine nennenswerte Signalintensität gefunden. Das Fluoreszenzsignal des AF^4 -Blindlaufes (Eluent) mit Naphthalin zeigt bei dem gewählten experimentellen Vorgehen eine deutliche, aber reproduzierbare Abhängigkeit von der (Elutions-)Zeit. Die Abnahme der Fluoreszenzsignalintensität in Anwesenheit von Aldrich-HA ist sehr gering und von periodischen Schwingungen (bedingt durch die das Sorptiv transportierende HPLC-Pumpe) überlagert.

Nach der erforderlichen Korrektur der oben abgebildeten Chromatogramme (Eigenfluoreszenz und IFE) wurde der Verlauf des Quotienten F_0/F_{kor} als Funktion der (Elutions-)Zeit erhalten.

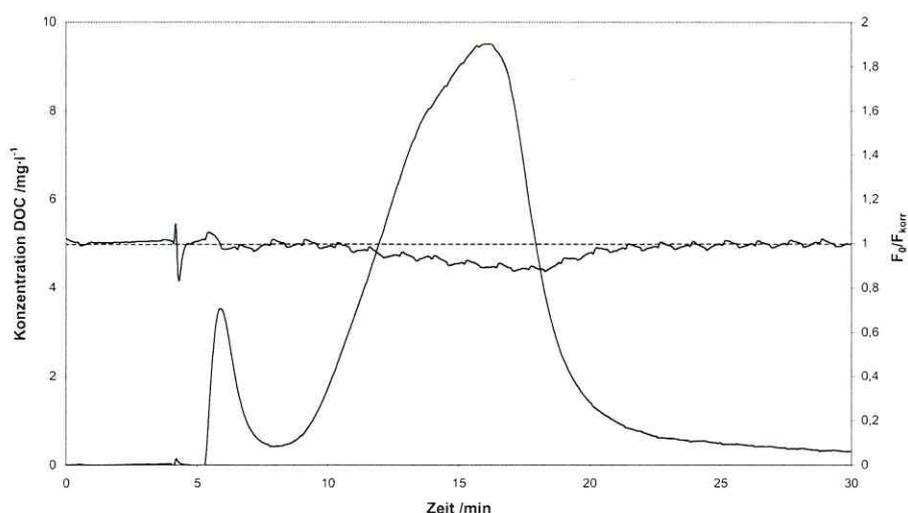


Abb. 4-34: Auswertung des Online-FQT-Experiments von Naphthalin (ca. 2 ppm) und Aldrich-HA ($c_{0,HA} = 10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) nach Größentrennung mittels AF^t. Neben der Auftragung des Verlaufs der DOC-Konzentration als Funktion der Zeit ist der Quotient der Fluoreszenzintensitäten von Pyren bei Ab- und Anwesenheit von Aldrich-HA (unter Berücksichtigung der IFE-Korrektur entsprechend Gl. 2-53) dargestellt.

Der Verlauf des berechneten Quotienten zeigt, daß dieser während der Elution von Aldrich-HA größtenteils unter einen Wert von 1 absinkt, während in den Flanken des Aldrich-HA-Peaks Werte nahe um 1 erhalten werden. Wie schon in Abb. 4-33 ersichtlich, ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität von Naphthalin in Anwesenheit von Aldrich-HA gering. Unter der Annahme eines $\log K_{DOC}$ -Wertes für Naphthalin an entaschter Aldrich-HA von 3,4 [REIMER 2002] bewirkt eine DOC-Konzentration von $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ eine Abnahme der freigelösten Naphthalin-Konzentration von 1,3 %. Eine derart geringe Abnahme ist mit dem hier verwendeten experimentellen Aufbau nicht meßbar. Die Schwelle der hier als signifikant angesehenen Abnahme der freien Sorptiv-Konzentration liegt bei 10 %. Bei vollständiger Abwesenheit einer Fluoreszenzlöschung würde für den Quotienten F_0/F_{korr} ein Wert von 1 erwartet werden. Werte für F_0/F_{korr} unter 1 deuten auf einen geringen systematischen Fehler der Korrekturen hin. Dieser wird durch den Korrekturterm f_{korr} und die damit getroffenen Näherungen der IFE-Korrektur der HA verursacht. Dieser Korrekturterm besitzt immer Werte größer 1 und führt dazu, daß für den $\log K_{DOC}$ -Wert bei Anwendung der Korrektur kleinere Werte erhalten werden (gegenüber den unkorrigierten Werten). Ein K_{DOC} -Wert für einen Betrag des Quotienten $F_0/F_{korr} < 1$ kann nicht berechnet werden.

Eine sichere Bestimmung des K_{DOC} -Wertes kann dann erfolgen, wenn einerseits die Abnahme der Fluoreszenzintensität (ausgedrückt durch $K_{DOC} \cdot c_{DOC}$) groß ist und andererseits die Fehler der Bestimmung der Fluoreszenzintensität bzw. der DOC-Konzentration klein sind. Letztere sind durch die verwendeten Detektionsmethoden bestimmt und können kaum beeinflußt werden. Eine Optimierung der Sorptivkonzentrationen und der FLD-Einstellungen wurde bereits vorgenommen. Eine deutliche Erhöhung der DOC-Konzentration ist nicht möglich,

weil dadurch eine Überladung der verwendeten analytischen Größentrenntechnik stattfindet. Dies würde zu einer drastischen Abnahme bis hin zum Verlust der Größenauftrennung der HA-Probe führen.

Bei einer maximalen DOC-Konzentration von $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ im Peakmaximum würde sich so erst bei einem $\log K_{\text{DOC}}$ -Wert von 4 eine Abnahme der Fluoreszenzintensität gegenüber dem Ausgangswert (in Abwesenheit von HA) von 10 % ergeben, die als signifikant angesehen wird. Für die Analyse von Systemen mit einem Sorptionskoeffizienten von $\log K_{\text{DOC}} \leq 4$ ist die Methode nicht geeignet. Die vorstehend beschriebenen Online-Experimente mit Naphthalin haben nicht zur Bestimmung von Sorptionskoeffizienten geführt, wohl aber einen Beitrag zur Validierung der experimentellen Methode geleistet.

4.8 Offline-FQT-Experimente

4.8.1 Ermittlung des Sorptionskoeffizienten K_{DOC} bei verschiedenen Ionenstärken

Viele der oben angegebenen K_{DOC} -Werte aus der Literatur wurden bei niedriger IS ($< 0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) ermittelt und lassen sich daher nur eingeschränkt auf die hier ermittelten Online- K_{DOC} -Werte übertragen. Um die Online-Werte direkt mit FQT-Werten, die mit der etablierten Offline-Messung bestimmt worden sind, vergleichen zu können, wurde das System Pyren/Aldrich-HA in einer $0,1 \text{ M NaNO}_3$ -Lösung (pH 7) zunächst als eine nicht nach Molekülgröße aufgetrennten Gesamtprobe mittels der Offline-FQT untersucht. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe der Aldrich-HA-Stammlösung hergestellt. Die Ergebnisse der FQT-Analysen sind nachfolgend in der üblichen Stern-Volmer-Auftragung dargestellt. Der Sorptionskoeffizient $K_{\text{DOC}}^{\text{FQT}}$ wird darin als Steigung der Geraden einer linearen Regressionsanalyse erhalten.

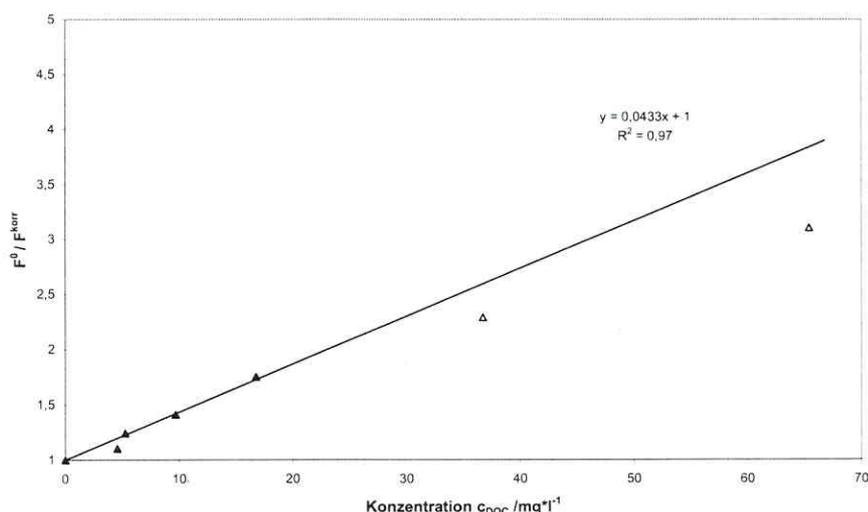


Abb. 4-35: Auftragung des Quotienten aus Fluoreszenzintensität in Abwesenheit und der nach LAKOWICZ et al. korrigierten Fluoreszenzintensität in Anwesenheit von un behandelter Aldrich-HA gegen die Konzentration an DOC (Stern-Volmer-Darstellung) für das System Pyren/Aldrich-HA in 0,1 M NaNO_3 -Lösung (pH 7,0). Die Datenpunkte bei hohen DOC-Konzentrationen ($36,7$ und $65,4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) wurden nicht berücksichtigt. Aus der Geradensteigung wurde ein K_{DOC} -Wert von $4,3 \cdot 10^4 \text{ l} \cdot \text{kg}^{-1}$ erhalten.

Das hier untersuchte System von Pyren/Aldrich-HA in 0,1 M NaNO_3 -Lösung unterscheidet sich von den Systemen in der zitierten Literatur vor allem durch die hohe IS. Diese resultiert aus der Anpassung des Lösemittels/Eluenten an die Notwendigkeiten der den FQT-Experimenten vorgeschalteten AF^{I} , vor allem aber der SEC-Molekülgrößentrennung. Dies stellt einen deutlichen Nachteil der Online-Kopplung von Größentrennmethode und FQT dar, da die Freiheitsgrade bei der Auswahl der Lösungsparameter für die FQT-Untersuchungen deutlich eingeschränkt werden.

Der Einfluß der IS auf den K_{DOC} -Wert ist in der Literatur konträr beschrieben. So fanden z. B. CARTER und SUFFETT einen geringeren K_{DOC} -Wert für die Sorption von DDT an HA mit steigender IS der Lösung [CARTER 1982]. Ebenfalls einen geringeren K_{DOC} -Wert mit steigender IS konnten SCHLAUTMAN und MORGAN für die Sorption von Pyren an einer aquatischen HA bei pH 7 beobachten. Dabei sank der K_{DOC} -Wert beim Übergang von einer 0,001 M auf eine 0,1 M NaCl -Lösung um ca. 40 % [SCHLAUTMAN 1993].

Für eine HA, die aus Kompost extrahiert wurde, und Naphthalin als Sorptiv konnten TRAINA et al. [1989] keine Abhängigkeit von der Ionenstärke (0,05 bis 0,5 M) nachweisen. Desgleichen fanden CHEN et al. [1992] keinen signifikanten Effekt der Konzentration von KCl zwischen 0,001 und 0,5 M auf den K_{DOC} -Wert von 1-Naphthol für eine IHSS-HA.

Die verringerte Flüchtigkeit von Pyren in einer wäßrigen Lösung, die mit N_2 -Gas durchspült wird, bei gleichzeitiger Anwesenheit von HA, nutzten YATES III et al. zur Untersuchung des Einflusses der IS und der

Ionenart auf das Ausmaß der Rückhaltung im Vergleich zur rein wäßrigen Lösung aus. Der Grad der Rückhaltung (und somit das Ausmaß der Sorption von Pyren an HA) nahm bei Erhöhung der IS zu. Der Zusatz von MgCl_2 bewirkte einen größeren Einfluß auf den Rückhaltegrad als die Zugabe von KCl . Insgesamt wurde in diesen Experimenten die IS allerdings nur auf einem sehr niedrigen Niveau variiert, (resultierende Konzentrationen von 10^{-8} bis 10^{-4} M) [YATES III 1997]. Ebenfalls durch Anwendung der Gaspurging-Methode fanden JOTA und HASSETT für die Sorption von 2,2',5,5'-Tetrachlorbiphenyl (TCB) an Aldrich-HA zunächst einen Anstieg des gemessenen K_{DOC} -Wertes mit zunehmender IS der Lösung (0,006 bis 0,5 M NaCl). Da ein mittels der Gaspurging-Methode bestimmter K_{DOC} -Wert (im Gegensatz zur FQT) von der Aktivität des Analyten bestimmt wird, führten sie eine Korrektur der aus den Meßdaten berechneten K_{DOC} -Werte durch Division durch den Aktivitätskoeffizienten des Analyten durch. Die so korrigierten K_{DOC} -Werte zeigten keine signifikante Abhängigkeit von der IS der Lösung. Daher führten sie die beobachteten Effekte der IS auf die Wechselwirkungen von TCB mit der wäßrigen Phase selbst und weniger auf Wechselwirkungen zwischen TCB und der HA zurück [JOTA 1991].

Allgemein müssen also zwei sich überlagernde Effekte berücksichtigt werden. Die IS wirkt sich auf die Aktivität des Analyten und die Konformation der HA aus. Beide Auswirkungen sollen hier kurz getrennt betrachtet werden.

Eine Erhöhung der IS erhöht die Aktivität von hydrophoben Verbindungen in wäßriger Lösung. Dadurch verringert sich ihre Löslichkeit. Dieser Zusammenhang wird üblicherweise als „Aussalzeffekt“ bezeichnet. Eine Quantifizierung dieses Effektes ist durch Anwendung der empirisch gefundenen Setschenow-Gleichung und weiterer tabellierter Parameter möglich. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der Effekt auf den K_{DOC} -Wert (z. B. von PAKs) durch die Erhöhung des Aktivitätskoeffizienten infolge der Gegenwart von Salzen wie NaCl oder NaNO_3 bei einer Salzkonzentration von ≤ 1 M als gering angesehen werden kann [SCHWARZENBACH 1993].

Während eine Änderung der IS der Lösung den Aktivitätskoeffizienten der eingesetzten Sorptive nur geringfügig beeinflusst, kann sie die Konformation der HA - des Sorbens - stark verändern. So fanden REN et al. durch Anwendung der dynamischen Lichtstreuung (DLS) eine deutliche Auswirkung der IS der Lösung auf die Konformation, d. h. die Molekülgröße der HA [REN 1996]. Hierbei sank der z-gemittelte Radius R_z einer aus Boden extrahierten HA bei Erhöhung des NaCl -Gehaltes der HA-Lösung von über 90 nm (ohne Zusatz von NaCl) auf unter 50 nm (bei 0,1 M NaCl). Für die Durchführung der DLS-Experimente war allerdings eine Größenfraktionierung der extrahierten HA notwendig und es wurde nur die UF-Fraktion > 50 kDa verwendet [REN 1996].

Aus den konträren Literaturergebnissen kann keine eindeutige Schlußfolgerung für die Auswirkungen der IS auf das hier untersuchte System erhalten werden. Deshalb wurden zwei Ansätze einer Aldrich-HA/Pyren-Lösung mit unterschiedlicher IS miteinander verglichen. Dabei wurde jeweils nur eine Konzentration an HA (Einwaage: $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) untersucht. In den vorstehend beschriebenen Ergebnissen des Stern-Volmer-Plots konnte bereits gezeigt werden, daß diese Konzentration in einem Bereich liegt, für den ein linearer Zusammenhang zwischen dem Quotienten F_0/F_{korr} und c_{DOC} gilt.

Um eine niedrige IS von 0,01 M in der Lösung sicherzustellen, wurde auf eine gereinigte Aldrich-HA-Probe zurückgegriffen. Die IS wurde hier durch die Zugabe von NaCl eingestellt. Aus den FQT-Analysen wurden die nachfolgend tabellierten Ergebnisse erhalten.

Tab. 4-9: Einfluß der Ionenstärke der Lösung auf den $\log K_{DOC}$ -Wert von Pyren und Aldrich-HA bei pH 7, bestimmt mit Hilfe der FQT. Die Einwaage an Aldrich-HA betrug jeweils $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Die DOC-Konzentrationen wurden mittels des in dieser Arbeit beschriebenen DOC-Detektors bestimmt.

Probe	$\log K_{DOC}$
Entaschte Aldrich-HA (H-Form) in 0,01 M NaCl	$4,97 \pm 0,16$
Aldrich-HA (Na-Form) in 0,1 M NaNO_3	$4,66 \pm 0,20$

Im Mittel wird ein höherer Wert für den $\log K_{DOC}$ der Lösung bei niedrigerer IS gefunden. Aufgrund des berechneten Gesamtfehlers ($\pm \sigma$) läßt sich aber ein signifikanter Einfluß der IS auf den ermittelten $\log K_{DOC}$ -Wert nicht ableiten. Mit der um Faktor 10 reduzierten IS liegt der $\log K_{DOC}$ -Wert aber in einer Größenordnung, wie er in der zitierten Literatur für das System Pyren/Aldrich-HA beschrieben wird. Der mittels der Einpunktbestimmung erhaltene Wert für eine IS von 0,1 M entspricht dem aus der Stern-Volmer-Auftragung erhaltenen Wert von $\log K_{DOC} = 4,64$ und verdeutlicht, daß auch eine Einpunktbestimmung - bei Gültigkeit der Linearitätsbedingung der Stern-Volmer-Auswertung - einen belastbaren Wert für den $\log K_{DOC}$ liefern kann.

Da sich aus dem Vergleich der obigen $\log K_{DOC}$ -Werte eine tendenzielle Abhängigkeit des Sorptionskoeffizienten von der Anwesenheit einer größeren Menge an NaNO_3 erkennen läßt, wurde der Einfluß der Nitrat-Ionen auf die Fluoreszenz von Pyren gesondert untersucht. Darüber hinaus wurde in der Literatur ein Hinweis gefunden, daß Nitrat als ein Quencher der Pyren-Fluoreszenz fungieren kann [GOODPASTER 2001]. Als Grundelektrolyt wurde deshalb eine 0,2 M NaCl-Lösung verwendet, so daß ein weiterer Zusatz von NaNO_3 -Ionen zu der Lösung (resultierende Konzentration = 0,1 M) zu einer nur geringfügigen Änderung der Gesamt-IS der Lösung führt. Zur Bestimmung des Sorptionskoeffizienten wurden zwei verschiedene Pyren-Lösungen (jeweils 50 ppb) vermessen. Die eine enthielt neben dem Leitelektrolyt NaCl lediglich 200 ppm NaN_3 , während der anderen zusätzlich unbehandelte Aldrich-HA mit einer resultierenden Konzentration von $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ zugesetzt wurde. Beiden Lösungen wurde nach der ersten Fluoreszenzanalyse eine NaNO_3 -Lösung zugesetzt. Nachfolgend wurden die Lösungen intensiv geschüttelt und wiederum auf ihre Fluoreszenzintensität hin untersucht³². Dabei erwies sich eine erneute Begasung mit N_2 als notwendig, da hierdurch höhere Werte der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Lösungen erhalten wurden, die direkt nach dem Schütteln vermessen wurden. Wahrscheinlich wird infolge des intensiven Schüttelns wieder Sauerstoff in die Lösungen eingetragen. Dieser führt infolge der dynamischen Fluoreszenzlöschung zu den beobachteten, niedrigeren Fluoreszenzsignalen. Die zugesetzte NaNO_3 -Lösung besaß eine hohe Konzentration (10 M), um die Pyren- und HA-Konzentration durch die Zugabe von wenigen μl Nitrat-Lösung nur vernachlässigbar zu verringern und somit vergleichbare Konzentrationen beizubehalten.

Durch den Zusatz von Nitrat-Lösung zu den Pyren-haltigen Lösungen wurde sowohl für die Aldrich-HA-freie als auch Aldrich-HA-haltige Lösung eine Abnahme der Fluoreszenzintensität des Pyren beobachtet. Die Mittelwerte der gemessenen Fluoreszenzintensitäten sind zusammen mit den Standardabweichungen in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt.

³² Des Weiteren wurden ebenfalls analoge, aber Pyren-freie HA-Lösungen zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz analysiert.

Tab. 4-10: Mittelwerte der gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei verschiedenen Salzgehalten der Lösungen in Ab- (F_0) und Anwesenheit von unbehandelter Aldrich-HA (F_{gem}), sowie der korrigierten Fluoreszenzintensität (F_{korr}). Mit angegeben sind die Standardabweichungen der Mittelwerte bzw. die Gesamtfehler der Quotienten.

Lösung	Fluoreszenzintensität /a.u.			Quotient F_0 / F_{korr}
	Pyren (F_0)	Pyren + Aldrich-HA (F_{gem})	Pyren + Aldrich-HA (F_{korr})	
0,2 M NaCl (pH 7)	78 ± 8	21 ± 2	40 ± 6	1,95 ± 0,34
0,2 M NaCl + 0,1 M NaNO ₃ (pH 7)	57 ± 8	18 ± 1	32 ± 3	1,80 ± 0,29

Eine Analyse der Mittelwerte der Fluoreszenzintensität des Pyren in Ab- und Anwesenheit von NaNO₃ ergab, daß die Differenz der Werte für die Lösungen ohne Aldrich-HA mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % signifikant ist, d. h., daß ein Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten besteht. Für die Lösungen mit Aldrich-HA konnte bei gleicher Wahrscheinlichkeit kein signifikanter Unterschied der beiden Mittelwerte gefunden werden. Ein Vergleich des Quotienten aus F_0 und F_{korr} für die jeweiligen Salzgehalte ist ebenfalls in der obigen Tabelle dargestellt. Die dort angegebenen Gesamtfehler lassen keine Aussage über eine Abhängigkeit der beobachteten Fluoreszenzintensitätsverhältnisse von der Anwesenheit des NaNO₃ ($c = 0,1$ M) zu. Da in diesem Experiment eine identische HA-Lösung verwendet wurde, kann der Fehler bei der Bestimmung der DOC-Konzentration hier vollständig vernachlässigt werden; die Absolutwerte der so ermittelten $\log K_{DOC}$ -Werte mögen mit einem systematischen Fehler behaftet sein, für den Vergleich der beiden Quotientenwerte resultieren dadurch jedoch geringere Werte für den Gesamtfehler.

Tab. 4-11: Einfluß der Zugabe von NaNO₃ auf den $\log K_{DOC}$ -Wert des Systems Pyren/Aldrich-HA. Um den Einfluß der IS auf den K_{DOC} -Wert zu minimieren enthielt die Lösung bereits 0,2 M NaCl als Grundlektrolyt.

Probe	$\log K_{DOC}$
Aldrich-HA in 0,2 M NaCl (pH 7)	4,70 ± 0,17
Aldrich-HA in 0,2 M NaCl + 0,1 M NaNO ₃ (pH 7)	4,63 ± 0,18

Ein Unterschied in den $\log K_{DOC}$ -Werten, die durch eine Einpunktbestimmung ermittelt worden sind, kann innerhalb der angegebenen Fehlergrenzen nicht sicher beschrieben werden. Ein Vergleich der Werte aus Tab. 4-11 mit den Ergebnissen in Tab. 4-9 zeigt aber, daß eine gute Übereinstimmung der $\log K_{DOC}$ -Werte bei hohen IS (0,1 bis 0,3 M) gefunden wurde. Der Einsatz verschiedener einwertiger Salze (NaCl und/oder NaNO₃) führte dabei zu keinem signifikanten Unterschied in den $\log K_{DOC}$ -Werten. Bei geringer IS resultierte ein deutlich höherer - den angegebenen Literaturwerten vergleichbarer - Wert ($\log K_{DOC} = 4,97$).

Eine Erklärung für die Auswirkungen der IS auf die HA-Konformation und deren Auswirkung wiederum auf die Ergebnisse von FQT-Experimenten haben SCHLAUTMANN et al. [1993] anhand des von SCHNITZER und KHAN [SCHNITZER 1972] vorgeschlagenen HA-Modells qualitativ gedeutet: Eine Erhöhung der IS eines einwertigen Salzes reduziert die inter- und intramolekulare Abstoßung der polaren Gruppen einer HA. Dadurch können sich die funktionellen Gruppen der HA enger zusammenfinden, was zu einer Reduzierung des äußeren Radius der HA führt (vgl. [REN 1996]). Gleichzeitig mit dem äußeren Radius nimmt auch die Größe der inneren Hohlräume

und hydrophoben Domänen in der HA-Struktur ab. Der Zutritt für Sorptive wird mit zunehmender IS immer weiter eingeschränkt. Daraus resultiert ein kleinerer Wert für den Sorptionskoeffizienten bei steigender IS. Die Restriktion ist gleichfalls von der Größe des Sorptivs abhängig. Dies erklärt die erhaltenen Ergebnisse für Perylen, Pyren und Anthracen [SCHLAUTMANN 1993] sowie Naphthalin [TRAINA 1989]. Je kleiner das Sorptivmolekül ist, desto geringer ist der Einfluß der IS auf den K_{DOC} -Wert der Substanz. Für Naphthalin - als das kleinste Molekül in der obigen Aufzählung - wurde keine Auswirkung der IS auf den Sorptionskoeffizienten gefunden.

Das einfache Phasenverteilungsmodell versagt - wie von SCHLAUTMANN und MORGAN beschrieben - bei der Erklärung der experimentellen Ergebnisse zur Auswirkung der IS auf den Sorptionskoeffizienten [SCHLAUTMANN 1993].

Detaillierte Untersuchungen zur Auswirkung der IS auf Sorbenseigenschaften, die den K_{DOC} -Wert von HOS an HAS beeinflussen, konnten aber im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

Aus diesen Offline-Untersuchungen läßt sich jedoch keine Erklärung für die geringeren $\log K_{DOC}$ -Werte der Online- gegenüber dem Semi-Batchexperiment bei vergleichbarer, hoher IS ableiten.

4.8.2 Offline-FQT-Experimente zur Abhängigkeit des Sorptionskoeffizienten von der HA-Molmasse

Um die Ergebnisse der Online-FQT-Experimente durch eine weitere experimentelle Herangehensweise zu überprüfen, wurden Offline-FQT-Experimente zur Untersuchung der Abhängigkeit des K_{DOC} -Wertes von der Molekülgröße durchgeführt. Dazu wurde ein SEC-Peak nach Durchströmen des UV-Detektors in drei (Molekülgrößen-)Fraktionen unterteilt. Die Grenzen der jeweiligen Fraktionen sind im experimentellen Teil genannt.

Entgegen der oben erwähnten Instabilität von HA-Größenfraktionen, die durch UF erhalten worden waren [ASTER 1996], fanden MÜLLER et al. [2000] für Fraktionen aus einer SEC-Trennung keine derartige Instabilität. Die Gültigkeit dieses Ergebnisses wurde für die hier verwendete Aldrich-HA noch einmal überprüft. Dazu wurden die erhaltenen drei Fraktionen nacheinander erneut über die SEC-Säule eluiert. Die UV-Peaks der drei Fraktionen weisen dabei deutlich voneinander verschiedene Retentionszeiten auf. Die Peakmaxima der einzelnen getrennten Fraktionen entsprechen dabei gut den Konzentrationsschwerpunkten und den Mittelwerten der Fraktionsgrenzen des ursprünglichen Aldrich-HA-Peaks, aus dem sie erhalten wurden. Die beobachtete Peakverbreiterung über beide Seiten der eigentlichen Retentionszeitgrenzen der Fraktion deuten eher auf einen chromatographischen Verbreiterungseffekt, als auf eine reale Änderung der Molekülgrößenverteilung der HA-Fraktionen hin. Die Addition der einzelnen UV-Spuren der drei Fraktionen führt zu einem „Gesamtpeak“, welcher in seiner Lage leicht von dem Signal des Ausgangspeaks der drei Fraktionen abweicht. Das zu einem höheren Retentionsvolumen hin verschobene Peakmaximum des aufsummierten „Gesamtpeaks“ deutet auf einen Verlust an höhermolekularen HA-Bestandteilen bei der SEC-Analyse zur Fraktionierung und/oder der nachfolgenden Re-Injektion der Fraktionen hin. Die deutlich geringere Masse des aufsummierten „Gesamtpeaks“ erklärt sich aus der jeweiligen Injektion eines Aliquots des ursprünglichen Fraktionsvolumens.

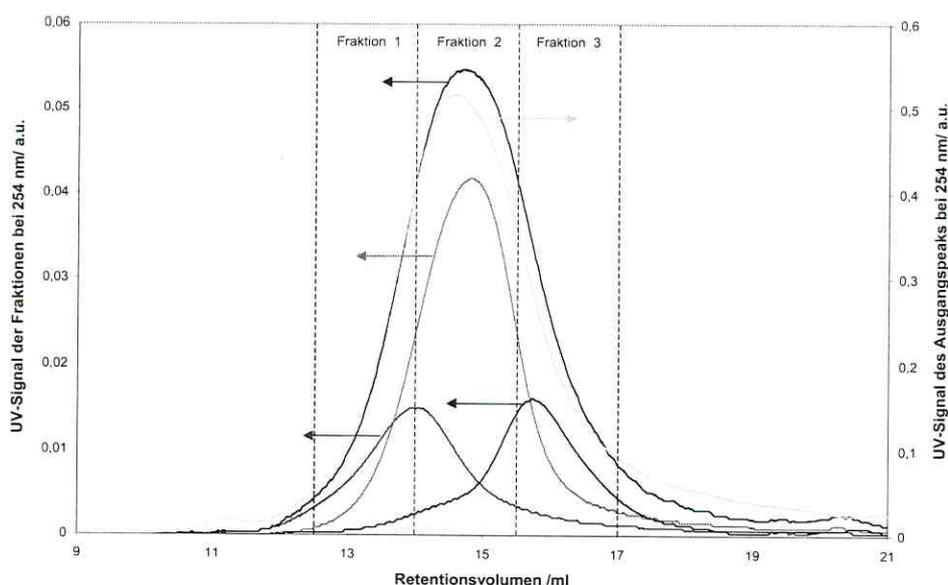


Abb. 4-36: SEC-Chromatogramme einer Aldrich-HA-Probe ($c_{HA} = 1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$). Der Peak der gesamten Aldrich-HA-Probe wurde in drei Fraktionen unterteilt. Ein Aliquot des Fraktionsvolumens wurde anschließend unter gleichen Bedingungen als Einzelprobe re-injiziert. Mit dargestellt ist die Addition der UV-Spuren der drei Einzelpeaks. SEC-Bedingungen: $0,1 \text{ M NaNO}_3$ (pH 7); Flußrate: $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; $200\text{-}\mu\text{l}$ -Probenschleife.

Eine tägliche Injektion eines Teilvolumens der drei Fraktionen über einen Zeitraum von einer Woche zeigte keine erkennbare Veränderung der Molekülgrößenverteilung der jeweiligen Fraktionen. Selbst eine „Stressung“ der Fraktionen durch das Anheben bzw. Senken des pH-Wertes auf pH 10 bzw. 4, Stehen über Nacht und anschließende Rücktitration der Proben mit 1 M HCl bzw. NaOH auf pH 7 vor der erneuten Injektion in das SEC-System zeigte keine erkennbare Auswirkung auf die Molekülgrößenverteilung (Chromatogramme nicht dargestellt). Daher kann auch für die verwendete Aldrich-HA davon ausgegangen werden, daß die durch SEC erhaltenen Molekülgrößenfraktionen über einen längeren Zeitraum stabil sind. Prinzipiell können die Fraktionen somit einer Offline-FQT-Analyse unterzogen werden. Damit läßt sich - mit deutlich geringerer Größenauflösung als durch Online-FQT - die Abhängigkeit des K_{DOC} -Wertes von der Molekülgröße bzw. Molmasse der HA untersuchen.

Problematisch ist hierbei jedoch, daß für die Offline-FQT-Experimente, trotz Verwendung einer volumenreduzierten Küvette, ein größeres Lösungsvolumen benötigt wird. Eine Erhöhung der aufgegebenen HA-Konzentration oder die Verwendung einer größeren Probenschleife waren nicht möglich, da sonst die Gefahr der Überladung der analytischen SEC-Säulen bestand. Das Sammeln der Eluatfraktionen von bis zu 20 Analysenläufen ergab so ausreichende Volumina der Fraktionen für die Offline-Analysen (FQT- und DOC-Experimente).

Tab. 4-12: Resultierende $\log K_{\text{DOC}}$ -Werte (\pm Gesamtfehler) für Pyren bei Offline-FQT-Messung von drei durch SEC-Analysen erzeugte Aldrich-HA-Fractionen (0,1 M NaNO_3 , pH 7). IFE-Korrektur nach LAKOWICZ. Anregungs-/Emissionswellenlänge: 333 nm / 393 nm. Bestimmung der DOC-Konzentration in den einzelnen Fraktionen mittels DOC-Detektor. Fehlerangaben als $\pm \sigma$

Probe	$c_{\text{DOC}} / \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$	$\log K_{\text{DOC}}$
SEC-Fraktion 1 (33,7 – 16,9 kDa) ³³	6,1 \pm 1,1	5,19 \pm 0,20
SEC-Fraktion 2 (16,9 – 8,5 kDa)	15,2 \pm 0,8	4,77 \pm 0,19
SEC-Fraktion 3 (8,5 – 4,3 kDa)	12,7 \pm 3,7	4,98 \pm 0,24

Die erhaltenen Ergebnisse weisen den gleichen Trend wie die Online-FQT-Experimente auf: Die beiden Fraktionen der Randbereiche des SEC-Peaks besitzen höhere $\log K_{\text{DOC}}$ -Werte als Fraktion 2, die einer mittleren Molekülgröße entspricht und den größten Teil der Masse der aufgegebenen Aldrich-HA-Probe repräsentiert. Der Wert für diese Fraktion liegt mit $4,77 \pm 0,19$ über dem Wert, der für den Plateaubereich bei vergleichbarem Retentionszeitbereich der Online-SEC/FQT-Analyse erhalten wurde (4,3 bis 4,4); er stimmt allerdings innerhalb der Fehlergrenzen mit dem Wert, der für die unfraktionierte Aldrich-HA-Probe in 0,1 M NaNO_3 erhalten wurde, überein. Die Werte für die DOC-Konzentration der Fraktion 1 und 3 sind aufgrund der geringen Konzentration in diesen Fraktionen und durch deren Bestimmung mittels des DOC-Detektors mit einer größeren Unsicherheit belastet (relative Standardabweichung der Mittelwerte σ von 17,5 % für Fraktion 1 bzw. 29,1 % für Fraktion 3 gegenüber 5,4 % für Fraktion 2). Dies spiegelt sich besonders im höheren Gesamtfehler des $\log K_{\text{DOC}}$ -Wertes der Fraktion 3 wieder.

Aus den obigen Werten für die K_{DOC} -Wert der drei getrennten Molekülgrößenfraktionen läßt sich somit - wie auch aus den Online-Experimenten - kein sicherer Nachweis für einen deutlich erhöhten Sorptionskoeffizienten eines bestimmten Molekülgrößenanteils der Aldrich-HA ableiten.

Als Mittelwert des $\log K_{\text{DOC}}$ aller drei SEC-Fractionen ergibt sich ein Wert von 4,92. Hierbei wurden die einzelnen $\log K_{\text{DOC}}$ -Werte entsprechend ihrer Konzentrationsverhältnisse (als einer ihres Massenanteils vergleichbaren Größe) gewichtet. Der so gemittelte K_{DOC} -Wert liegt also in einer Größenordnung, wie er für das System Pyren/Aldrich-HA in einer 0,01 M NaNO_3 -Lösung erhalten wurde, obwohl hier - durch die SEC-Fraktionierung bedingt - eine 0,1 M NaNO_3 -Lösung vorlag. Eine Erklärung dafür kann nicht gegeben werden, es sei aber nochmals auf die relativ großen Fehlerbereiche hingewiesen, die einen absoluten Vergleich zwischen verschiedenen experimentellen Herangehensweisen fragwürdig erscheinen lassen.

Die stets niedrigeren $\log K_{\text{DOC}}$ -Werte der Online-Analysen lassen sich durch die obigen Ergebnisse nicht ohne weiteres erklären. Die Tatsache, daß alle Offline-FQT-Experimente nach vorheriger Begasung der Lösungen mit N_2 durchgeführt wurden, liefert möglicherweise eine Begründung abseits von Ionenstärke-Effekten. Die Anwesenheit von O_2 kann in den Online-Experimenten nicht ausgeschlossen werden. Zwar wurde der Eluent vor und während seiner Verwendung durch Anlegen von Unterdruck entgast, wie effektiv O_2 entfernt oder ob es durch das nachträgliche Zudosieren der Pyren-Lösung erneut eingetragen wurde, kann nicht beantwortet werden. Gleiches gilt für die Durchführung des Semi-Batchversuches mit dem Online-Aufbau. Da O_2 als dynamischer Quencher gilt, wäre das Ergebnis eine schwer zu interpretierende Überlagerung von statischen und dynamischen

³³ Die Molmassenbereiche wurden aus den jeweiligen Fraktionsgrenzen und der Funktion zur Kalibrierung der SEC-Säulen mit PSS-Standards berechnet.

Quenchprozessen.

Die in dieser Arbeit gemessenen Datensätze - Online- und Offlinedaten - stehen im Einklang mit der Aussage, daß nur relativ geringe Unterschiede im Sorptionsvermögen von HA-Fraktionen gleicher Provenienz, aber unterschiedlicher Molekülgröße bestehen ($<$ Faktor 3 in den K_{DOC} -Werten). Neben dieser zentralen Aussage gibt es Hinweise darauf, daß mittlere Molekülgrößen-Fraktionen etwas geringere Sorptionskoeffizienten aufweisen als kleinere und größere Fraktionen (ca. Faktor 2).

Eine (gedankliche) Extrapolation der Größe von gelösten Huminstoffmolekülen über den hier untersuchten Bereich hinaus führt zu partikulären HSs. Deren Sorptionsvermögen für HOS ist in der wissenschaftlichen Literatur ausführlich dokumentiert [SABLJIC 1995, BAKER 1997, SETH 1999]. Aus dem vorliegenden, umfangreichen Datenmaterial kann man entnehmen, daß gelöste und partikuläre HSs gleicher Provenienz ähnliche Sorptionskoeffizienten besitzen. Obwohl eine Reihe von Gründen die Aussagekraft eines solchen Vergleiches mit Bezug auf die Molekülgröße abschwächen (z. B. unterschiedliche ‚Porenstruktur‘ in kolloidal-gelösten und partikulären Sorbentien), unterstützt er doch die prinzipielle Aussage dieser Arbeit, wonach bereits relativ kleine HA-Moleküle oder -Aggregate ($\leq 5 - 10$ kDa) über das voll ausgeprägte Sorptionsvermögen dieser Stoffklasse für HOS verfügen. BALCKE [2000] konnte z. B. für eine kommerzielle HA (Roth) zeigen, daß der Einfluß der HA-Speziation auf deren Sorptionspotenzial für PAKs gering ist. Für Pyren erhielt er mit Hilfe der SPME-Methode folgende Sorptionskoeffizienten: $\log K_{\text{gelöste HA}} = 5,39$; $\log K_{\text{HA-Flockulat}} = 5,62$; $\log K_{\text{HA-Coating}} = 5,70$.

Trotzdem ist es vernünftig anzunehmen, daß gelöste Sorbentien eine Mindestgröße besitzen müssen, um mit HOS von der Größe eines PAK-Moleküls hinreichend beständige Wechselwirkungen einzugehen, die als ‚Sorption‘ (z. B. als statische Fluoreszenzlöschung bei der FQT oder als Aktivitätsabsenkung bei der SPME-Methode oder als Löslichkeitserhöhung bei der Solubility-Enhancement-Methode) detektiert werden können. Gleiche DOC-Konzentrationen in Form von gelösten niedermolekularen HOS, z. B. 100 ppm Toluol in Wasser, bewirken keine solche Wechselwirkungen [KOPINKE 1997]. Das Sorbens HA geht also eine individuelle Wechselwirkung mit dem Sorptiv Pyren ein, statt über einen ‚anonymen‘ Cosolvens-Effekt die Eigenschaften der wäßrigen Lösung zu modifizieren. Für diese individuelle Wechselwirkung ist offenbar eine Mindestgröße der hydrophoben Domäne im Sorbens erforderlich. Für Pyren ($\text{MW} = 202 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 16 C-Atome) als Sorptivmolekül wäre eine Domäne mit mindestens ebenso vielen C-Atomen plausibel. Die tatsächlich notwendige untere Grenze für HA-Moleküle kann aus den Daten der vorliegenden Arbeit nicht abgeleitet werden. Abb. 4-30 läßt eine solche Untergrenze bis zu einer Molekülgröße von ca. 0,8 kDa nicht erkennen.

4.9 SPME

Nachfolgend seien die Ergebnisse der Headspace-SPME-Analysen kurz dargestellt. Der Verteilungskoeffizient wurde mit Hilfe von Gl. 2-57 berechnet. In diesem Fall betrug $a = 1$ (gleiche Pyren-Konzentration in HA- und Referenzlösung). Die DOC-Konzentration wurde aus der eingewogenen Masse an entaschter Aldrich-HA und deren Kohlenstoffgehalt (58,3 Ma%) berechnet und mit der Größeneinheit [$\text{kg}\cdot\text{l}^{-1}$] in die Gleichung eingesetzt.

Tab. 4-13: *Ergebnisse der SPME-Analysen. Es wurden zwei Ansätze hergestellt und eine vierfache Bestimmung der Peakflächen (GC-MS) bei Anwesenheit von 200 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ entaschter Aldrich-HA (DOC-Konzentration = 116,6 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) (0,01 M NaCl) im Vergleich zur Peakfläche von Pyren derselben Konzentration (50 ppm) in Wasser durchgeführt.*

Ansatz/Analyse	1/1	1/2	1/3	1/4	2/1	2/2	2/3	2/4	Mittelwert $\pm \sigma$
$\log K_{\text{DOC}}$	4,85	4,77	5,04	5,10	4,99	5,01	4,86	5,20	4,98 \pm 0,14

Der mittels der SPME für das System Pyren/Aldrich-HA bei pH 7 bestimmte $\log K_{\text{DOC}}$ beträgt $4,98 \pm 0,14$ und stimmt damit gut mit dem Offline-FQT Wert von $4,97 \pm 0,16$ (Tab. 4-9) überein. GEORGI [1998] hat für eine Vielzahl von FA und HA deren Sorptionsvermögen für HOS mittels SPME bestimmt. Dabei erhielt sie $\log K_{\text{DOC}}$ -Werte für die Sorption von Pyren im Bereich von $4,01 \pm 0,18$ für eine FA aus einem Braunwassersee (HO10-FA) bis $5,02 \pm 0,07$ für eine HA aus einer Schwelwasserdeponie (SV-TW-HA). Die kommerziell erhältliche, braunkohlestämmige Roth-Huminsäure besitzt einen $\log K_{\text{DOC}}$ -Wert für Pyren von $4,95 \pm 0,07$. Dieses Ergebnis für die Roth-HA ist gut mit dem der Sorptionsexperimente an Aldrich-HA vergleichbar, da letztere ebenfalls braunkohlestämmig ist.

Einen Vergleich zwischen den mittels der SPME-Methode und der FQT ermittelten K_{DOC} -Werte führten DOLL et al. [1999] und MACKENZIE et al. [2002] durch. Übereinstimmend erhielten die Autoren höhere Werte für den $K_{\text{DOC}}^{\text{FQT}}$ -Wert als für den $K_{\text{DOC}}^{\text{SPME}}$ -Wert des gleichen Systems. Sie begründeten dies damit, daß die beiden Sorptionskoeffizienten unterschiedliche Wechselwirkungszustände des Analyten mit dem Sorbens beschreiben. Der durch die SPME gemessene Sorptionskoeffizient stellt einen aktivitätsbasierten Verteilungskoeffizienten dar, während der mit FQT gemessene ein konzentrationsbasierter Sorptionskoeffizient ist. Derartige Unterschiede in den Sorptionskoeffizienten von SPME und FQT konnten in dieser Arbeit jedoch nicht festgestellt werden.

4.10 Ergebnisse und Diskussion der Isotopenfraktionierungsexperimente

4.10.1 Einstufiger Sorptionsversuch (Batchexperiment)

Das Ziel dieses Versuches war die Untersuchung des Ausmaßes der Isotopenfraktionierung, das durch einen Sorptionsschritt hervorgerufen wird. Die Sorptionsrate, die dem Quotient aus der sorbierter Stoffmenge Analyt (n_{sorbiert}) dividiert durch die gesamte Stoffmenge Analyt (n_{gesamt}) entspricht, wurde aus den experimentellen Daten unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Konzentrationen der Analyten in der wäßrigen und der huminstoffhaltigen Lösung ermittelt. Mittels GC-MS-Analysen wurde so in Anwesenheit von $100 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Huminsäure eine Sorptionsrate von 97 % für Cyclohexan bzw. von 80 % für Toluol bestimmt.

Aus den GC-C-irMS-Analysen der Headspacephase³⁴ wurden für Cyclohexan und Toluol die folgenden Mittelwerte und deren Vertrauensintervalle ($P = 95 \%$) der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte erhalten:

Tab. 4-14: Mittelwerte und Vertrauensintervalle ($P = 95 \%$) aus den GC-C-irMS-Analysen der Headspacephase.

Substanz	Mittelwert $\delta^{13}\text{C}$ Wasser ‰	Mittelwert $\delta^{13}\text{C}$ Huminsäure-Suspension ‰
Cyclohexan	$-30,3 \pm 0,5$	$-30,1 \pm 0,5$
Toluol	$-28,0 \pm 0,3$	$-27,7 \pm 0,2$

Ein Vergleich der beiden Mittelwerte für Wasser und die Huminstoff-Lösung mittels eines t-Tests [DOERFFEL 1987] ergab, daß für die beiden Mittelwerte sowohl beim Cyclohexan, als auch beim Toluol mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % kein signifikanter Unterschied besteht.

In Analogie zu den Ergebnissen von SLATER et al. zur einstufigen Sorption an Graphit bzw. Aktivkohle [SLATER 2000] bewirkt offenbar auch die Sorption an Huminsäure im Verlauf einer Gleichgewichtseinstellung keinen meßbaren Isotopenfraktionierungseffekt.

Zur quantitativen Beschreibung der Sorption an OC und bei isotopenaufgelösten Vergleichen der Sorptionseigenschaften wird in der Literatur üblicherweise der K_{OC} -Wert verwendet. Dieser Verteilungs- oder Sorptionskoeffizient stellt das Verhältnis zwischen der Konzentration des sorbierten Anteils (bezogen auf die Masse des Sorbens, c^*_{sorbiert}) und der Konzentration des frei in der wäßrigen Phase gelösten Anteils des Analyten (bezogen auf das Volumen der wäßrigen Lösung, c_{frei}) dar. Gleichwertig dazu kann die Konzentration des sorbierten Anteils ebenfalls auf das Lösungsvolumen bezogen werden: $c_{\text{sorbiert}} = c^*_{\text{sorbiert}} \cdot c_{\text{OC}}$. Die Summe beider Analytkonzentrationen ($c_{\text{sorbiert}} + c_{\text{frei}}$) entspricht der Gesamtkonzentration (c_{ges}) des Analyten in der Lösung.

³⁴ Bei Anwendung der GC-C-irMS-Analytik zur Bestimmung der Isotopenverteilung unpolarer Substanzen beim Übergang aus reiner Phase bzw. wäßriger Lösung in die Gasphase konnten SLATER et al. zeigen, daß innerhalb der Meßgenauigkeit der Methode kein Isotopenfraktionierungseffekt nachweisbar ist [SLATER 1999].

$$\text{Gl. 4-7} \quad K_{\text{OC}} = \frac{c_{\text{sorbiert}}}{c_{\text{frei}}} \cdot \frac{1}{c_{\text{OC}}} = \frac{c_{\text{ges}} - c_{\text{frei}}}{c_{\text{frei}}} \cdot \frac{1}{c_{\text{OC}}} = \left(\frac{c_{\text{ges}}}{c_{\text{frei}}} - 1 \right) \cdot \frac{1}{c_{\text{OC}}}$$

Aus den experimentellen Daten wurden die $\log K_{\text{OC}}$ -Werte für Cyclohexan und Toluol bei Sorption an Roth-Huminsäure berechnet³⁵ und sind in Tab. 4-15 Literaturwerten gegenübergestellt. Die Literaturwerte stellen bewertete Ergebnisse aus verschiedenen Bestimmungsmethoden und Huminsäuren unterschiedlicher Abstammung von mehreren Arbeitsgruppen dar. Die Abweichungen der eigenen experimentellen Ergebnisse von den Literaturwerten können also zum Teil auf die verwendete Methode und die Herkunft der Huminsäure zurückgeführt werden. Darüber hinaus erschwert sicherlich die hohe Flüchtigkeit des Cyclohexans bei der angewandten Methode eine exakte Bestimmung des $\log K_{\text{OC}}$ -Wertes für diese Substanz. Die genaue Bestimmung der K_{OC} -Werte war für die Auswertung nicht notwendig, es sollte hier lediglich die Größenordnung des Sorptionsgrades ermittelt werden.

Im Gegensatz zu einigen in der Literatur beschriebenen Versuchen wurden in den hier durchgeführten Experimenten keine vollständig ¹³C-markierten Substanzen verwendet. Die zitierten Autoren haben so von diesen vollständig markierten Substanzen lediglich die unmarkierten Substanzen als zweite Molekülarart unterschieden. A priori müssen aber neben Stellungsisotopomeren noch Moleküle mit einem, zwei, drei usw. ¹³C-Isotopen im Molekül unterschieden werden. Aufgrund der geringeren relativen Häufigkeit des ¹³C-Isotops sollten aber für niedermolekulare Verbindungen von den möglichen Isotopomeren die rein ¹²C-haltigen und solche mit einem ¹³C-Atom weit überwiegen³⁶. Deshalb wurden in dieser Arbeit in erster Näherung nur zwei in ihrem Sorptionsverhalten unterschiedliche Arten von Molekülen betrachtet: solche ohne und solche mit einem ¹³C-Atom (Isotopomere). Weiterhin wurde angenommen, daß sich bei letzteren Stellungsisotopomere nicht in ihrem Sorptionsverhalten unterscheiden. Diese Annahme ist jedoch weder theoretisch begründet noch experimentell bewiesen. Für das Verhältnis der K_{OC} -Werte der beiden Kohlenstoffisotopomere ergibt sich so:

$$\text{Gl. 4-8} \quad \frac{K_{\text{OC}}^{12\text{C}}}{K_{\text{OC}}^{13\text{C}}} = \frac{\left(\frac{c_{\text{ges}}^{12\text{C}}}{c_{\text{frei}}^{12\text{C}}} - 1 \right) \cdot \frac{1}{c_{\text{OC}}}}{\left(\frac{c_{\text{ges}}^{13\text{C}}}{c_{\text{frei}}^{13\text{C}}} - 1 \right) \cdot \frac{1}{c_{\text{OC}}}}$$

Nach Umstellen der vorstehenden Gleichung erhält man den folgenden Ausdruck:

$$\text{Gl. 4-9} \quad \frac{K_{\text{OC}}^{12\text{C}} \cdot c_{\text{OC}} + 1}{K_{\text{OC}}^{13\text{C}} \cdot c_{\text{OC}} + 1} = \frac{\left(\frac{c_{\text{ges}}^{12\text{C}}}{c_{\text{frei}}^{12\text{C}}} \right)}{\left(\frac{c_{\text{ges}}^{13\text{C}}}{c_{\text{frei}}^{13\text{C}}} \right)} = \left(\frac{c_{\text{frei}}^{13\text{C}}}{c_{\text{frei}}^{12\text{C}}} \right) \cdot \left(\frac{c_{\text{ges}}^{12\text{C}}}{c_{\text{ges}}^{13\text{C}}} \right)$$

³⁵ Dabei wurde vereinfachend angenommen, daß für die verwendete Roth-Huminsäure gilt: $c_{\text{OC}} = 0,5 c_{\text{OM}}$.

³⁶ Denkbar ist auch der Fall, daß ein Molekül zwei (oder sogar mehr) ¹³C-Isotope besitzt. Der Anteil derartiger Moleküle an der Gesamtheit ist aufgrund der geringen natürlichen Häufigkeit des ¹³C-Isotops von 1,1 % jedoch vernachlässigbar gering.

Hierin sind die Quotienten der frei gelösten Konzentrationen ($c_{\text{frei}}^{13\text{C}}$) und der Gesamtkonzentrationen ($c_{\text{ges}}^{13\text{C}}$) der Isotopomeren in Lösung als Terme erhalten. Diese lassen sich entsprechend der Definition für R (vgl. Gl. 2-58) dem Wert von R_{HS} bzw. $R_{\text{H}_2\text{O}}$ wie folgt zuordnen:

$$\text{Gl. 4-10} \quad \left(\frac{c^{13\text{C}}}{c^{12\text{C}}} \right)_{\text{frei}} = R_{\text{HS}} \quad \text{bzw.} \quad \left(\frac{c^{13\text{C}}}{c^{12\text{C}}} \right)_{\text{ges}} = R_{\text{H}_2\text{O}}$$

Da die R-Werte nicht für die flüssige Phase, sondern mittels der Headspaceanalyse für die Gasphase (R') bestimmt wurden, weichen ihre Absolutwerte aufgrund des durch den Verdampfungsvorgang verursachten Isotopenfraktionierungseffektes (vgl. Kap. 2.6) geringfügig und systematisch von den Werten der flüssigen Phase ab. Bei der Bildung des Quotienten heben sich diese systematischen Abweichungen aber gegenseitig auf: Der Quotient ($R'_{\text{HS}}/R'_{\text{H}_2\text{O}}$) besitzt den gleichen Zahlenwert wie der Quotient ($R_{\text{HS}}/R_{\text{H}_2\text{O}}$). Somit lassen sich die durch die Headspaceanalyse gewonnenen R' -Werte hier einsetzen. Aus der in Gl. 4-10 genannten Zuordnung folgt:

$$\text{Gl. 4-11} \quad \frac{K_{\text{OC}}^{12\text{C}} \cdot c_{\text{OC}} + 1}{K_{\text{OC}}^{13\text{C}} \cdot c_{\text{OC}} + 1} = \frac{R_{\text{HS}}}{R_{\text{H}_2\text{O}}}$$

Unter der Voraussetzung, daß $K_{\text{OC}} \cdot c_{\text{OC}} \gg 1$ ist, läßt sich die Gleichung vereinfachen zu:

$$\text{Gl. 4-12} \quad \frac{K_{\text{OC}}^{12\text{C}}}{K_{\text{OC}}^{13\text{C}}} = \frac{R_{\text{HS}}}{R_{\text{H}_2\text{O}}} = \alpha'$$

Aus den experimentell ermittelten Verhältnissen der Kohlenstoffisotope ($R_{\text{H}_2\text{O}}$ bzw. R_{HS}) kann somit das *Verhältnis der K_{OC} -Werte der beiden stabilen Kohlenstoffisotope* erhalten werden. Dieses soll mit α' bezeichnet werden.

Beziehen sich die gemessenen $\delta^{13\text{C}}$ -Werte auf den gleichen Standard (R_{S}), so kann anhand der folgenden Gleichung [CLARK 1997]

$$\text{Gl. 4-13} \quad \frac{R_{\text{HS}}}{R_{\text{H}_2\text{O}}} = \frac{(\delta^{13\text{C}})_{\text{HS}} + 1000}{(\delta^{13\text{C}})_{\text{H}_2\text{O}} + 1000}$$

der α' -Wert direkt aus den $\delta^{13\text{C}}$ -Werten berechnet werden.

Der Wert von α' ist das Maß für einen *thermodynamischen Isotopenfraktionierungseffekt*. α' ist nicht mit dem *biologischen (kinetischen) Isotopenfraktionierungsfaktor* (α) identisch, da letzterer ein Maß für den Unterschied in den Abbaugeschwindigkeiten von zwei Isotopomeren ist (z. B. $\alpha = k_{12\text{C}}/k_{13\text{C}}$).

Wie bereits oben gezeigt wurde, sind die Unterschiede in den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten der Analyten über der wäßrigen Lösung bzw. Huminsäuresuspension nicht signifikant und damit mit der angewandten Methode nicht nachweisbar. Trotzdem läßt sich aus den obigen Daten ein maximal möglicher - mit der Methode gerade nicht mehr nachweisbarer - Unterschied in den Verteilungskoeffizienten abschätzen. Der Fehlerbereich für die α' -Werte ergibt sich aus den Vertrauensintervallen der gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte.

Tab. 4-15: Experimentell ermittelte Werte und Literaturwerte für $\log K_{OC}$ und thermodynamische Isotopenfraktionierungsfaktoren (α') bei der Sorption an gelöster (suspendierter) Huminsäure.

Substanz	$\log K_{OC}$ (Exp.)	$\log K_{OC}$ (Lit.)	α'
Cyclohexan	2,81	3,44 ³⁷	$0,9998 \pm 0,0010$
Toluol	1,90	2,26 ³⁸	$0,9997 \pm 0,0006$

Aus dem einstufigen Sorptionsexperiment kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß der Unterschied in den Sorptionskoeffizienten der Kohlenstoffisotopomere für Cyclohexan bei $0,9988 \leq \alpha' \leq 1,0098$ und für Toluol bei $0,9991 \leq \alpha' \leq 1,0003$ liegt. Ein Vergleich mit den maximal zu erwartenden α' -Werten, die HARRINGTON et al. mit ihrer Methode aus den Untersuchungen mittels mehrstufiger Sorption auf einer RP-HPLC-Säule für vollständig ^{13}C -markiertes Benzol ($0,986 \leq \alpha' < 1,014$) bzw. Toluol ($0,988 \leq \alpha' < 1,012$) berechnet haben (vgl. Kap. 2.6), zeigt, daß die Werte in Tab. 4-15 einen um mindestens eine Größenordnung kleineren Fraktionierungseffekt ($\alpha' - 1$) belegen [HARRINGTON 1999]. Der hier angewandte methodische Ansatz ist also deutlich empfindlicher als der von HARRINGTON et al. verwandte.

4.10.2 Isotopenfraktionierungsexperimente mit einer RP-HPLC-Säule

Das einstufige Sorptionsexperiment (vgl. Kap. 4.10.1) zeigte keinen nachweisbaren Isotopenfraktionierungseffekt. Um die Empfindlichkeit der Methode weiter zu steigern, wurde die Elution von Analyten über eine RP-HPLC-Säule als ein vielstufiger Sorptions-Desorptions-Prozeß durchgeführt. Dadurch wird das Ausmaß eines Isotopenfraktionierungseffektes verstärkt. Der Verlauf der Naphthalinkonzentration, die aus den GC-MS-Analysen der 40 einzelnen Fraktionen erhalten wurde, stimmt sehr gut mit dem Verlauf des UV-Signals während der Fraktionierung überein.

In der nachfolgenden Abbildung sind der Verlauf der Gesamtkonzentration unabhängig vom Isotopenmuster, sowie das Isotopenverhältnis der einzelnen Fraktionen für Naphthalin dargestellt.

³⁷ aus [EPA 1996]

³⁸ aus [SANGSTER 1989]

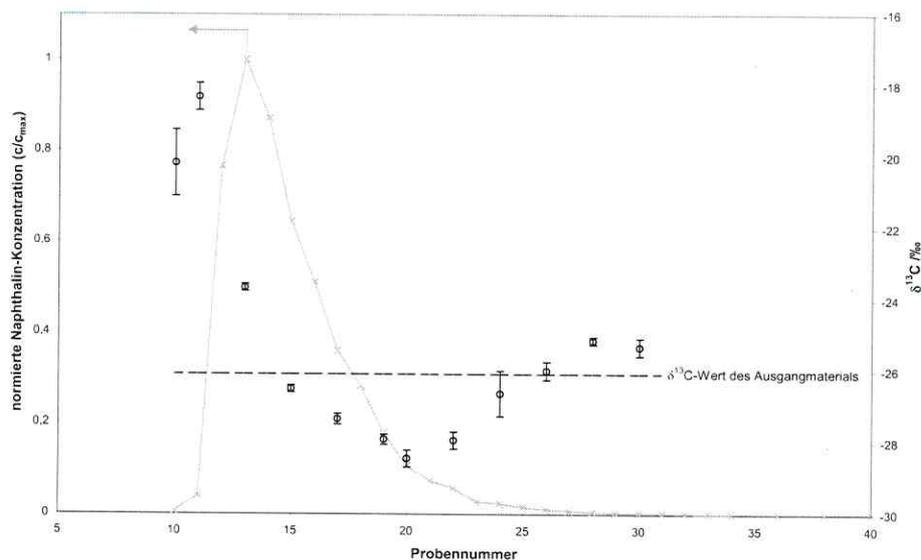


Abb. 4-37: Verlauf der Naphthalin-Konzentration in den 40 Fraktionen (ermittelt durch GC-MS-Analyse) und der Isotopenverhältnisse – dargestellt als Mittelwert \pm Vertrauensintervall ($P = 95\%$) der δ -Werte (ermittelt durch GC-C-irMS-Analyse), sowie Isotopenverteilung des Ausgangsmaterials ($\delta^{13}\text{C} = -26,1 \pm 0,7\%$).

Bei zweimaliger Versuchsdurchführung mit identischen Resultaten wurde für Naphthalin qualitativ der gleiche Verlauf der Isotopenfraktionierung wie von [CAIMI 1997] (vgl. Kap. 2.6) auf einer präparativen RP- C_8 -Säule für Hexadecansäuremethylester gefunden: Gegenüber dem Ausgangsmaterial mit einem $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von $-26,1\%$ wird für den Beginn des eluierenden Peaks eine starke Anreicherung des ^{13}C -Isotops gefunden ($-18,2$ bzw. $-20,5\%$). Der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert nimmt dann drastisch ab. Die Fraktion mit der höchsten Naphthalinkonzentration besitzt noch einen Wert von $-23,7\%$. Im weiteren Verlauf sinkt das Verhältnis unter den δ -Wert des Ausgangsmaterials auf einen minimalen Wert von $-28,5\%$ ab und steigt im hinteren Bereich des Peaktaillings wieder bis in den Bereich des δ -Wertes des Ausgangsmaterials an. Eine mögliche Erklärung für den Wiederanstieg der δ -Werte im hinteren Teil des Peaks ist darin zu sehen, daß hier Naphthalin-Moleküle aus der Säule eluieren, die einem nicht-idealen chromatographischen Prozeß unterlagen. Das Peaktailling könnte beispielsweise auf das Vorliegen von Totvolumina zurückzuführen sein.

Wie Abb. 4-37 zeigt, konnte ein Isotopenfraktionierungseffekt auf der HPLC-Säule nachgewiesen werden. D. h., es muß ein Unterschied in den Verteilungskoeffizienten der Kohlenstoffisotopomere vorliegen. Dieser Unterschied soll anhand eines Modells im Folgenden berechnet werden.

Als Konzentrationsverlauf für das ^{12}C - und das ^{13}C -Isotopomer sollte - bei idealer chromatographischer Trennung - jeweils ein gaußförmiger Peak erwartet werden. Die Maxima der beiden Peaks des ^{12}C - und des ^{13}C -Isotopomers sollten sehr eng beieinander liegen, d. h. im Bereich des Maximums für den Gesamtkohlenstoffpeak (GC-MS- bzw. UV-Peak). In diesem Bereich besitzt der Gesamtkohlenstoffpeak annähernd eine Gaußform. Der Verlauf der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte als Funktion der Retentionszeit kann hier näherungsweise als Gerade beschrieben

werden. Zur Bestimmung der Retentionszeiten der Peakmaxima der ^{12}C - und ^{13}C -Isotopomere wurde nur der Bereich um das Peakmaximum des Gesamtkohlenstoffpeaks berücksichtigt. Es wurde davon ausgegangen, daß in diesem Bereich die Substanz am ehesten unter idealen chromatographischen Bedingungen eluiert. Der Verlauf der Änderung der Isotopenverhältnisse wurde als Ergebnis einer linearen Regressionsanalyse der drei Datenpunkte um das Peakmaximum erhalten. Die Datenpunkte (dargestellt als gefüllte Kreise), sowie die Gerade mit der dazugehörigen Geradengleichung sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

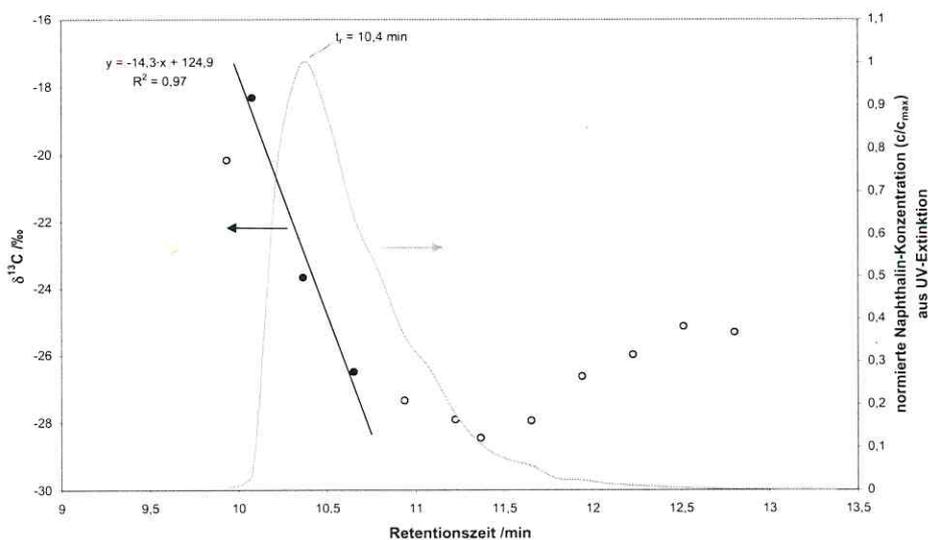


Abb. 4-38: Verlauf der Naphthalin-Konzentration bei Elution über die HPLC-Säule (vgl. Abb. 4-37) und Auftragung der Isotopenverhältnisse von ^{12}C und ^{13}C als $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der einzelnen Fraktionen. Die drei ausgefüllten Symbole repräsentieren die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte um das Peakmaximum ($t_{\text{max}} = 10,4$ min). Das Ergebnis der linearen Regressionsanalyse für diese drei Werte ist im Diagramm dargestellt.

Der Konzentrationsverlauf einer eluierenden Substanz in Form eines idealen Peaks läßt sich in der Chromatographie durch eine Gleichung auf der Basis einer Gauß-Verteilung beschreiben [LEIPNITZ 1970]. Der Verlauf der Analytkonzentration, ausgedrückt als *Konzentration an Analytkohlenstoff im Eluenten* ($[\text{C}_{\text{ges}}]$) mit $[\text{C}_{\text{ges}}] = [^{12}\text{C}] + [^{13}\text{C}]$, wurde in Abhängigkeit von der *Bruttoretentionszeit* (t_r) daher wie folgt modelliert:

$$\text{Gl. 4-14} \quad [\text{C}_{\text{ges}}] = \frac{n_0}{\dot{V}} \cdot \frac{1}{\sqrt{2\pi} \cdot \sigma} \cdot e^{-\frac{(t_r - t_{\text{max}})^2}{2\sigma^2}}$$

Hierbei entspricht n_0 der in den *Volumenstrom* des Eluenten (\dot{V}) injizierten *Kohlenstoffmenge des Analyten*. Der Wert für die Standardvarianz der Gauß-Verteilung σ errechnet sich aus der *Breite in halber Peakhöhe* ($b_{0,5}$) dividiert durch den Wert 2,35. t_{max} ist die *Retentionszeit des Maximums* des UV-Peaks.

Durch Umstellung der δ -Wert-Definition (Gl. 2-60) und Einbeziehung der durch lineare Regression ermittelten Geradengleichung für $\delta^{13}\text{C} = f(t_r) = a \cdot t_r + b$ (siehe oben) kann die Gesamtkonzentration an Kohlenstoff in die Anteile für ^{12}C und ^{13}C aufgeteilt werden:

$$\text{Gl. 4-15} \quad \left(\frac{[^{13}\text{C}]}{[^{12}\text{C}]} \right)_{\text{Probe}} = \left(\frac{\delta^{13}\text{C}}{1000} + 1 \right) \cdot R_{\text{St}}$$

$$\text{Gl. 4-16} \quad \frac{[^{13}\text{C}]}{[\text{C}_{\text{ges}}] - [^{13}\text{C}]} = \left(\frac{\delta^{13}\text{C}}{1000} + 1 \right) \cdot R_{\text{St}}$$

$$\text{Gl. 4-17} \quad \frac{[^{13}\text{C}]}{[\text{C}_{\text{ges}}]} = \frac{\left(\frac{\delta^{13}\text{C}}{1000} + 1 \right) \cdot R_{\text{St}}}{\left(1 + \frac{\delta^{13}\text{C}}{1000} \right) \cdot R_{\text{St}} + 1} = \frac{1}{1 + \frac{1}{\left(\frac{\delta^{13}\text{C}}{1000} + 1 \right) \cdot R_{\text{St}}}}$$

$$\text{Gl. 4-18} \quad \frac{[^{12}\text{C}]}{[\text{C}_{\text{ges}}]} = 1 - \frac{[^{13}\text{C}]}{[\text{C}_{\text{ges}}]}$$

Durch Einsetzen von Gl. 4-17 bzw. Gl. 4-17 und Gl. 4-18 in Gl. 4-14 erhält man den Verlauf der (idealisierten) ^{12}C - bzw. ^{13}C -Peaks als $f(t)$, wobei für den Wert von $\delta^{13}\text{C}$ hier der Term der Geradengleichung der linearen Regressionsanalyse der drei Datenpunkte um das Peakmaximum des jeweiligen Substanzpeaks eingesetzt wurde.

$$\text{Gl. 4-19} \quad [^{13}\text{C}] = \frac{n_0}{\dot{V}} \cdot \frac{1}{\sqrt{2\pi} \cdot \sigma} \cdot e^{-\frac{(t_r - t_{\text{max}}^{13\text{C}})^2}{2\sigma^2}} \cdot \frac{1}{1 + \frac{1}{\frac{a}{1000} \cdot R_{\text{St}} \cdot t_r + \left(\frac{b}{1000} + 1 \right) \cdot R_{\text{St}}}}$$

$$\text{Gl. 4-20} \quad [^{12}\text{C}] = \frac{n_0}{\dot{V}} \cdot \frac{1}{\sqrt{2\pi} \cdot \sigma} \cdot e^{-\frac{(t_r - t_{\text{max}}^{12\text{C}})^2}{2\sigma^2}} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + \frac{1}{\frac{a}{1000} \cdot R_{\text{St}} \cdot t_r + \left(\frac{b}{1000} + 1 \right) \cdot R_{\text{St}}}} \right)$$

Durch Differenzieren der Gl. 4-19 bzw. Gl. 4-20 nach t_r erhält man:

$$\frac{d[{}^{13}C]}{dt_r} = \frac{n_0}{V} \cdot \frac{1}{\sqrt{2\pi} \cdot \sigma} \cdot e^{-\frac{(t_r - t_{\max}^{13C})^2}{2\sigma^2}} \cdot \left[\frac{t_r - t_{\max}^{13C}}{\sigma^2} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{a \cdot R_{St} \cdot t_r + \left(\frac{b}{1000} + 1\right) \cdot R_{St}}{1000}} \right) - \frac{a \cdot R_{St}}{1000} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{a \cdot R_{St} \cdot t_r + \left(\frac{b}{1000} + 1\right) \cdot R_{St}}{1000}} \right)^2 \cdot \left(\frac{a \cdot R_{St} \cdot t_r + \left(\frac{b}{1000} + 1\right) \cdot R_{St}}{1000} \right)^2 \right]$$

$$\frac{d[{}^{12}C]}{dt_r} = \frac{n_0}{V} \cdot \frac{1}{\sqrt{2\pi} \cdot \sigma} \cdot e^{-\frac{(t_r - t_{\max}^{12C})^2}{2\sigma^2}} \cdot \left[\frac{t_r - t_{\max}^{12C}}{\sigma^2} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{a \cdot R_{St} \cdot t_r + \left(\frac{b}{1000} + 1\right) \cdot R_{St}}{1000}} \right) + \frac{a \cdot R_{St}}{1000} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{a \cdot R_{St} \cdot t_r + \left(\frac{b}{1000} + 1\right) \cdot R_{St}}{1000}} \right)^2 \cdot \left(\frac{a \cdot R_{St} \cdot t_r + \left(\frac{b}{1000} + 1\right) \cdot R_{St}}{1000} \right)^2 \right]$$

Die Lage der Peakmaxima konnte durch numerische Ermittlung der jeweiligen Nullstelle der ersten Ableitung dieser beiden Gleichungen für den Verlauf des ^{12}C - bzw. ^{13}C -Peaks unter Zuhilfenahme von Microsoft Excel mit einer Genauigkeit von $\pm 0,0001$ min bestimmt werden. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Berechnungen.

Tab. 4-16: Ergebnis der Modellierung der Retentionszeiten der Maxima der ^{12}C - und ^{13}C -Isotopomerenpeaks.

Substanz	Retentionszeit Maximum ^{12}C /min	Retentionszeit Maximum ^{13}C /min
Naphthalin	10,4000	10,3990

Verwendet man als Normierungsfaktor (f) die relativen Atom-Häufigkeiten von ^{12}C und ^{13}C des eingesetzten, nicht-chromatographierten Naphthalins mit $f_{\text{ges}} = f_{^{12}\text{C}} + f_{^{13}\text{C}} = 1$ und

$$\text{Gl. 4-21} \quad [^{12}\text{C}] = f_{^{12}\text{C}} \cdot [C_{\text{ges}}] \text{ bzw.}$$

$$\text{Gl. 4-22} \quad [^{13}\text{C}] = f_{^{13}\text{C}} \cdot [C_{\text{ges}}]$$

so führen diese Terme in Gl. 4-14 eingesetzt zu:

$$\text{Gl. 4-23} \quad [^{12}\text{C}] = f_{^{12}\text{C}} \cdot \frac{n_0}{\dot{V}} \cdot \frac{1}{\sqrt{2\pi} \cdot \sigma} \cdot e^{-\frac{(t_r - t_{\text{max}}^{^{12}\text{C}})^2}{2\sigma^2}}$$

$$\text{Gl. 4-24} \quad [^{13}\text{C}] = f_{^{13}\text{C}} \cdot \frac{n_0}{\dot{V}} \cdot \frac{1}{\sqrt{2\pi} \cdot \sigma} \cdot e^{-\frac{(t_r - t_{\text{max}}^{^{13}\text{C}})^2}{2\sigma^2}}$$

Setzt man die oben berechneten Retentionszeiten für die Kohlenstoffisotopomeren und die Werte für f (mit $f_{^{12}\text{C}} = 0,98917$ und $f_{^{13}\text{C}} = 0,01083$) in Gl. 4-23 bzw. Gl. 4-24 ein, so erhält man den nachfolgend dargestellten Konzentrationsverlauf für ^{12}C bzw. ^{13}C (zur besseren Darstellung mit dem Faktor 100 multipliziert). Der $\delta^{13}\text{C}$ -Verlauf, der sich aus dem Verhältnis der ^{12}C - und ^{13}C -Konzentrationen berechnen läßt, ist als Datenpunktreihe mit der Ausgleichsgeraden einer linearen Regressionsanalyse dargestellt. Man erkennt, daß die Überlagerung dieser beiden gaußförmigen Peaks tatsächlich in sehr guter Näherung durch eine Gerade beschrieben werden kann. Dies wurde für das Modell als Näherung vorausgesetzt und wird hier bestätigt. Eine theoretische Begründung für diese (zunächst empirische Approximation) liefert folgende Ableitung. Aus Gl. 4-14 ergibt sich mit $\delta^{13}\text{C}_i = 1000 \cdot (R_i / R_{\text{St}} - 1)$ bzw. $R_i = (\delta^{13}\text{C}_i / 1000 + 1) \cdot R_{\text{St}}$.³⁹

³⁹ Unter der Näherung, daß σ für beide Isotopomeren identisch ist.

$$\text{Gl. 4-25} \quad \ln \left(\frac{[^{13}\text{C}]}{[^{12}\text{C}]} \right) = \ln R_i = \ln \left\{ \left(\frac{\delta^{13}\text{C}_i}{1000} + 1 \right) \cdot R_{St} \right\} = \frac{\left\{ \left(t_r - t_{\max}^{12\text{C}} \right)^2 - \left(t_r - t_{\max}^{13\text{C}} \right)^2 \right\}}{2\sigma^2}$$

Unter Anwendung der bekannten Näherung $\lim_{x \rightarrow 0} \ln(1+x) = x$ folgt daraus

$$\text{Gl. 4-26} \quad \delta^{13}\text{C}_i = \frac{1000}{\sigma^2} \cdot \left(t_{\max}^{13\text{C}} - t_{\max}^{12\text{C}} \right) \cdot t_r + \frac{1000}{2\sigma^2} \cdot \left(\left[t_{\max}^{12\text{C}} \right]^2 - \left[t_{\max}^{13\text{C}} \right]^2 - 2\sigma^2 \cdot \ln R_{St} \right).$$

Dies ist die oben postulierte lineare Funktion $\delta^{13}\text{C}_i = f(t_r)$. Ihre Steigung ist proportional zur Differenz der Peakretentionszeiten der beiden Isotopomeren.

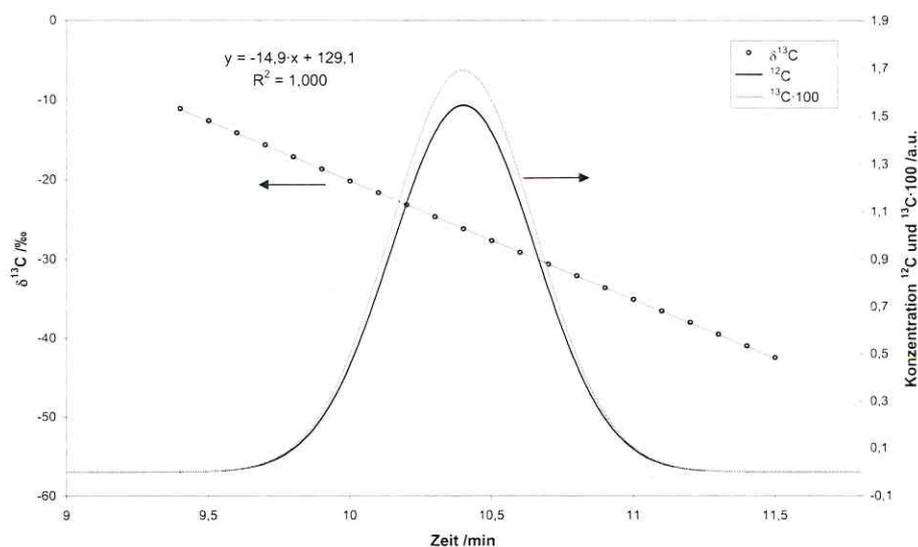


Abb. 4-39: Naphthalin-Peak aus Modellierung mit Gaußfunktion und Berechnen der Retentionszeiten der Peakmaxima für ^{12}C (10,4000 min) und ^{13}C (10,3990 min), sowie resultierende $\delta^{13}\text{C}$ -Werte.

Eine Verknüpfung von apparativen, den Säulentyp kennzeichnenden Größen mit dem Verteilungskoeffizienten zwischen stationärer und mobiler Phase findet sich bei [DOERFFEL 1990]:

$$\text{Gl. 4-27} \quad k' = K \cdot \frac{V_s}{V_m} = \frac{K}{\beta}$$

Der dimensionslose *Retentionsfaktor*⁴⁰ (k') ist danach dem *Verteilungskoeffizienten* (K) direkt proportional. Der Kehrwert der Proportionalitätskonstante wird als *Phasenverhältnis* (β) bezeichnet. Es ist der Quotient der *Volumina der mobilen und stationären Phase* in der Trennsäule (V_m / V_s). Der Wert von β ist hier für alle Isotopomeren gleich.

Mit Hilfe von k' kann das Elutionsverhalten von Substanzen bei unterschiedlichen Säulenparametern (Länge, Durchmesser, Fließgeschwindigkeiten, usw.) verglichen werden. Er wird aus der *Peakretentionszeit* (t_{\max}) und der *Totzeit* (t_d) wie folgt berechnet [UNGER 1989]:

$$\text{Gl. 4-28} \quad k' = \frac{t_{\max} - t_d}{t_d}$$

Der Wert für α' als Verhältnis zweier Verteilungskoeffizienten K wie auch die K_{OC} -Werte des Säulenmaterials (Gl. 4-12) für beide Isotopomere lassen sich also unter Kürzen der für die Isotopomeren identischen Werte von β und t_d als *Verhältnis der Nettoretentionszeiten* ($t_{n,\max}$; mit $t_{n,\max} = t_{\max} - t_d$) der Peakmaxima für ^{12}C und ^{13}C wie folgt berechnen:

$$\text{Gl. 4-29} \quad \alpha' = \frac{K^{12\text{C}}}{K^{13\text{C}}} = \frac{t_{n,\max}^{12\text{C}}}{t_{n,\max}^{13\text{C}}}$$

Im Fall des Naphthalins errechnet sich bei einer Totzeit für die HPLC-Säule von $t_d = 1,85$ min ein Wert von

$$\alpha' = \frac{10,400 \text{ min} - 1,85 \text{ min}}{10,399 \text{ min} - 1,85 \text{ min}} = 1,00012$$

Dieser Fraktionierungseffekt ($\alpha' - 1$) ist um zwei Größenordnungen geringer als der von HARRINGTON et al. angegebene Unschärfbereich für die Fraktionierung von unmarkiertem und vollständig ^{13}C -markiertem Toluol ($\alpha' = 1 \pm 0,012$) bzw. Benzol ($\alpha' = 1 \pm 0,014$) (vgl. Kap. 2.6) [HARRINGTON 1999].

Der Vergleich mit dem in 4.10.1 abgeschätzten, maximal möglichen α' -Wert für Cyclohexan ($0,9988 \leq \alpha' \leq 1,0098$) bzw. für Toluol ($0,9991 \leq \alpha' \leq 1,0003$) bei einstufiger Sorption verdeutlicht, warum erst durch Verstärkung des Isotopenfraktionierungseffektes mit Hilfe einer HPLC-Trennsäule ein signifikanter Meßeffect mit der GC-C-irMS-Methode nachgewiesen werden konnte.

⁴⁰ Der Retentionsfaktor (k') wird auch als Kapazitätsfaktor oder –verhältnis bezeichnet.

4.10.3 Präparation einer huminsäurehaltigen Säule

Um aquifernahe Bedingungen einzustellen, sollten als stationäre Phase Huminsäure und als mobile Phase Wasser verwendet werden. Um für die beabsichtigte GC-C-irMS-Analyse eine ausreichend hohe Konzentration an Analyt in den Fraktionen zu erreichen, wurde bei Verwendung von Wasser als Eluent auf Toluol an Stelle von Naphthalin als Analyt ausgewichen. Dies besitzt mit $S_{\text{Toluol}} = 520 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ eine deutlich höhere Wasserlöslichkeit als Naphthalin ($33 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

4.10.3.1 Partikuläre Huminsäure als Säulenfüllmaterial

Die Basizität des Aldrich-Huminsäure-Na-Salzes (63 - 400 μm Fraktion) führte wahrscheinlich zu einer Anhebung des pH-Wertes des auf pH 2 eingestellten, HCl-sauren Wassers, infolge derer verstärkt partikuläres Material in Lösung ging. Dies führte bereits während des Packens der leeren HPLC-Säule zur Verstopfung der Säule. Die H-Form der Roth-Huminsäure (63 - 400 μm Fraktion) hingegen ist unter den Bedingungen deutlich schlechter löslich und es ließ sich eine befüllte Säule herstellen. Unter Variation der Flußrate des Millipore-Wassers (pH 2) von 0,5 bzw. 1,0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ wurden für die Analyte Toluol und Naphthalin keine diskreten Peaks gefunden. Lediglich für die Lösemittel der Analyt-Stammlösungen (Toluol in Ethanol bzw. Naphthalin in Methanol) wurden Peaks mit Retentionszeiten gefunden, die etwas über der des inerten Tracers KNO_3 lagen.

Es wurde vermutet, daß es aufgrund der relativ großen Huminsäurepartikel (es wurde die Größenfraktion 63 - 400 μm verwendet) und der daraus resultierenden langen intrapartikulären Diffusionswege für die Analytmoleküle zu einer extremen Verbreiterung der Peaks kommt. Somit sind sie aufgrund der geringen Konzentration am Säulenausgang nicht mehr detektierbar.

4.10.3.2 In einer Quarzsandsuspension ausgefällte Huminsäure

Um den Durchmesser der Huminsäurepartikel als stationäre Phase zu verringern und damit die Diffusionswege der organischen Analyten in tiefere Schichten eines Huminsäurepartikels zu verkürzen, wurde die gelöste Huminsäure als Flockulat, durchmischt mit einem inerten Säulenfüllmaterial, ausgefällt.

Experimente mit diesem Säulenfüllmaterial führten zu detektierbaren, jedoch extrem breiten Peaks. Aufgrund der sehr niedrigen Trennstufenzahl wurde dieser Ansatz nicht weiter für Versuche zur Isotopenfraktionierung verfolgt.

4.10.3.3 Huminsäure als Coating auf α - und γ - Al_2O_3

Da auch bei Verwendung von Huminsäureflockulat als Säulenfüllmaterial kein zufriedenstellendes Elutionsverhalten beobachtet werden konnte, sollte durch eine weitere Verkürzung der Diffusionswege des Analyten in der stationären Phase eine höhere Trennstufenzahl erzielt werden. Dazu wurde die Huminsäure als dünner Film auf der Oberfläche sowohl von α - als auch γ - Al_2O_3 als Trägermaterial aufgebracht. Das γ - Al_2O_3 besitzt dabei aufgrund seiner Porosität eine wesentlich größere spezifische Oberfläche.

Trotz Aktivierung der Oberfläche des α - Al_2O_3 -Trägermaterials mit HNO_3 bzw. durch eine kombinierte sauer-alkalische Vorbehandlung, konnte für zwei Korngrößenfraktionen (74 - 149 und 10 - 44 μm) nur eine maximale Beladung mit organischem Kohlenstoff von 0,08 Ma% erzielt werden. Bei derart niedrigen OC-Gehalten ist nur eine sehr geringe Retardierung von mäßig hydrophoben organischen Verbindungen zu erwarten. Aus diesem Grund wurde das Material nicht für Säulenversuche zur Isotopenfraktionierung eingesetzt.

Für γ - Al_2O_3 wurde aus einer Reihe von Ansätzen als bestes Ergebnis eine Kohlenstoffbeladung von 2,3 Ma% erreicht.

Ein einstufiges Sorptionsexperiment (Batchexperiment) mit Naphthalin als Sorptiv und dem mit Roth-Huminsäure beschichteten γ - Al_2O_3 ergab einen Sorptionskoeffizienten von $\log K_{\text{OC}} = 2,47$. Dieser Wert liegt in der Größenordnung eines Literaturwertes für Naphthalin von $\log K_{\text{OC}} = 3,0$ [EPA 1996].

Aus einer mit diesem Säulenfüllmaterial (vgl. Kap. 1.2.3.1) gepackten Säule eluierten sowohl Naphthalin als auch Toluol mit schmalen Peaks, jedoch mit Retentionszeiten nahe der eines konservativen Tracers (Aceton). In einem weiteren Versuch wurde die Säule lediglich mit dem inerten Trägermaterial γ - Al_2O_3 (ohne Huminsäurebeschichtung) gefüllt und es wurden die gleichen Analytlösungen unter identischen Bedingungen eluiert. Für alle drei Substanzen wurden nahezu identische Retentionszeiten gefunden, wie für die Säule, die Huminsäure auf γ - Al_2O_3 enthielt. Die Aceton-Peaks besaßen eine identische Form (Peakhöhe und -breite), die Peaks des Naphthalins und Toluols zeigten aber im Vergleich zur huminsäurehaltigen Säule höhere Signalintensitäten. Hieraus läßt sich vermuten, daß ein Teil des aufgegebenen Naphthalins bzw. Toluols an dem organischen Anteil des Säulenfüllmaterials sorbiert. Der größere Anteil des Analyten eluiert jedoch weitgehend ohne Wechselwirkungen mit dem Säulenfüllmaterial z. B. über bevorzugte Fließwege, wie sie durch eine ungleichmäßige Packung des Füllmaterials in der Säule entstehen können. Möglicherweise ist für ein Material in diesem Korngrößenbereich ein Packen unter Druck unerläßlich. Die hier verwendete Säule wurde jedoch nur unter Anwendung von Ultraschall gepackt.

4.10.4 Isotopenfraktionierungsexperimente mit dem HPLC-Säulenmaterial, an das die Huminsäure kovalent gebunden ist

Nach mehreren Fehlversuchen mit Trennsäulen, die

- Huminsäurepartikel der Größe 63 - 400 μm enthielten,
- Huminsäure enthielt, welche zusammen mit SiO_2 und Eisennitrat aus einer Lösung gefällt wurde,

- Huminsäure enthält, die als Beschichtung auf α - bzw. γ - Al_2O_3 aufgebracht wurde, wurde eine kovalent an das Trägermaterial gebundene Huminsäurephase präpariert (vgl. Kap. 3.9.3.4).

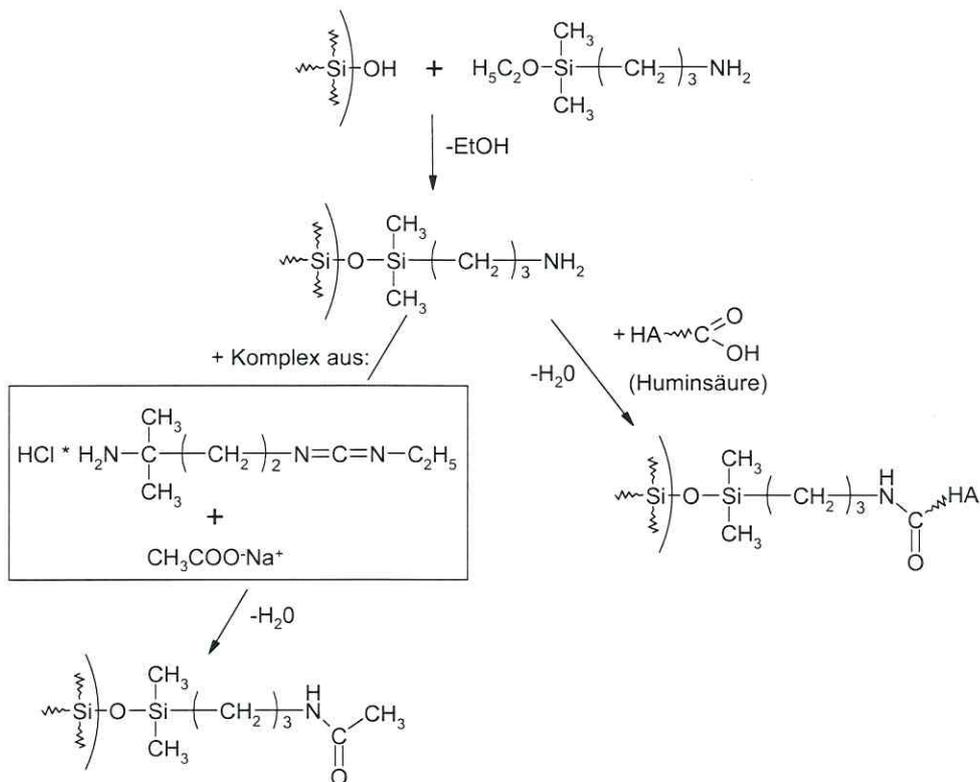


Abb. 4-40: Schematische Darstellung der Reaktionen auf einer mit 3-Aminopropyl-dimethyl-ethoxysilan modifizierten SiO_2 -Oberfläche: Kovalente Verankerung von Huminsäure (rechter Pfad) und Abdecken von nicht mit Huminsäure umgesetzten, freien Amino-Gruppen (linker Pfad).

Die obige Abbildung zeigt dabei die Reaktionen, die zur Verankerung der (Roth-)Huminsäure auf der modifizierten SiO_2 -Oberfläche notwendig waren. Nach Waschen der Oberfläche wurden die Silanol-Gruppen mit 3-Aminopropyl-dimethyl-ethoxysilan unter Freisetzung von Ethanol in einer Veretherungsreaktion umgesetzt. Das so modifizierte SiO_2 wurde zu einer Huminsäure-Lösung gegeben. Dabei reagieren die Carboxyl-Gruppen der Huminsäure mit den Amino-Gruppen des modifizierten SiO_2 unter Wasserabspaltung zu einer Amid-Bindung. Diese Bindung ist nach [YANG 1999] in einem pH-Bereich von 2,5 bis 7,5 stabil. Daneben sind jedoch weitere Verknüpfungsreaktionen denkbar (z. B. 1,4-Addition an chinoide Strukturen). Durch die sterischen Anforderungen der Huminsäure können nicht alle oberflächlich gebundenen Amino-Gruppen umgesetzt werden. Die freien Amino-Gruppen tragen eine positive Ladung (NH_3^+). Sie würden so zu einer Nettooberflächenladung des Säulenmaterials führen, die für Huminstoffe ungewöhnlich ist und somit nicht das „normale“ Verhalten von Huminsäurecoatings oder der partikulären organischen Substanz in einem Aquifer widerspiegeln. Die freien Amino-Gruppen wurden deshalb in einem weiteren Reaktionsschritt abgedeckt.

Während in der Arbeit von [KOOPAL 1998] N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (EDC) noch als Verankerungsreagenz für die Huminsäure verwendet worden war, wurde es hier als Kondensationsreagenz zusammen mit Na-Acetat zur Umsetzung der freien Amino-Gruppen verwendet. Der Komplex aus EDC und Na-Acetat reagiert dabei ebenfalls unter Wasserabspaltung und Ausbildung einer Amid-Bindung.

Nachfolgend sind typische Chromatogramme abgebildet, die unter Verwendung einer HPLC-Säule mit dem oben beschriebenen Füllmaterial erhalten wurden:

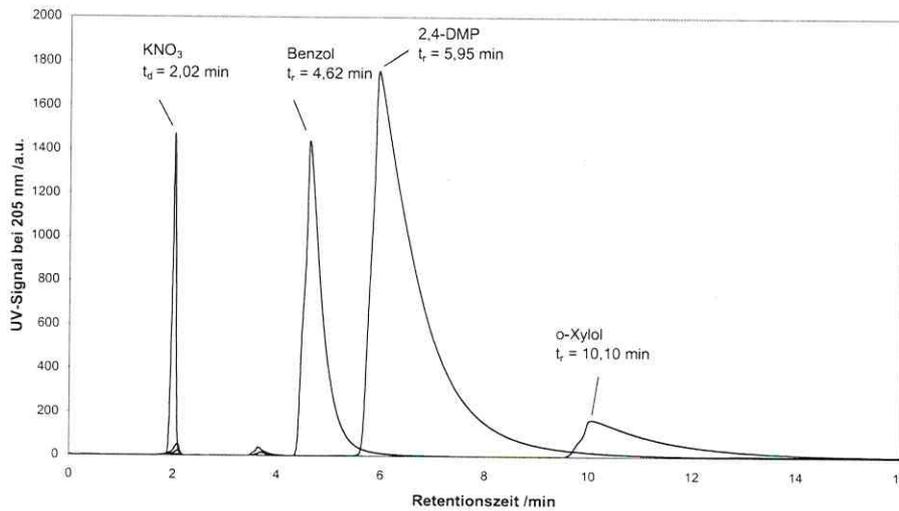


Abb. 4-41: Zusammenstellung von Einzelchromatogrammen für die Elution von KNO₃, Benzol, 2,4-Dimethylphenol (2,4-DMP) und o-Xylol über eine Trennsäule mit kovalent gebundener Huminsäure (Eluent: Millipore-Wasser (pH 5, IS = 0,01 M) mit einer Flußrate von 1 ml·min⁻¹).

Die Güte einer Trennsäule wird in der Chromatographie üblicherweise durch die *Zahl der theoretischen Böden* (N)⁴¹ beschrieben. Sie ist der Quotient aus der *Länge der Trennsäule* und der *Höhe eines theoretischen Bodens* (HETP). Die Zahl der theoretischen Trennstufen errechnet sich für gaußförmige Peaks aus der *Bruttoretentionszeit* des Peakmaximums (t_{max}) und der *Peakbreite bei halber Peakhöhe* (b_{0,5}) nach:

$$\text{Gl. 4-30} \quad N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_{\max}}{b_{0,5}} \right)^2$$

⁴¹ Aus der modellhaften Vorstellung einer Anzahl an (theoretischen) Trennböden kann nicht direkt auf die Zahl der Sorptions-Desorptions-Schritte als Multiplikator für einstufige Sorptionsergebnisse geschlossen werden.

N ist dabei säulen- und in erster Näherung nicht substanzspezifisch. Unter idealen chromatographischen Bedingungen sollte N für viele Substanzen auf einer Säule gleich sein. Nicht-ideales⁴² chromatographisches Verhalten, wie es z. B. durch das lange Tailing der Peaks von 2,4-DMP und *o*-Xylol angezeigt wird, führt zu einer Abweichung von dieser Gesetzmäßigkeit. Die N-Werte für Benzol und KNO₃, das als inerter Tracer gilt, lagen für die Huminsäure-Säule in dem Bereich, der für Naphthalin auf der kommerziellen RP-HPLC-Säule gefunden wurde. Die Werte für t_{\max} , $b_{0,5}$ und N sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.

Tab. 4-17: Retentionszeit des Peakmaximums und Peakbreite bei halber Peakhöhe der einzelnen Substanzen (Naphthalin: RP-HPLC-Säule bzw. KNO₃, Benzol, 2,4-DMP und *o*-Xylol: kovalent gebundene Huminsäure-Säule) und resultierende Zahl der theoretischen Böden.

Substanz	t_{\max} / min	$b_{0,5} / \text{min}$	N
Naphthalin	10,4	0,6	1660
KNO ₃	2,020	0,08	3530
Benzol	4,618	0,34	1020
2,4-DMP	5,948	0,83	285
<i>o</i> -Xylol	10,077	1,33	320

Die Auswertung dieser Isotopenfraktionierungsexperimente erfolgte analog der in Kap. 4.10.2 beschriebenen Vorgehensweise. Sie soll hier verkürzt noch einmal dargestellt werden:

Unter der Annahme, daß die Elution der Substanzen unter idealen chromatographischen Bedingungen erfolgt, wurde der Verlauf der Gesamtkonzentration (UV-Signal) durch die Funktion einer Gauß-Verteilung beschrieben (Gl. 4-14). Das Tailing des Originalpeaks wurde dabei nicht berücksichtigt, da lediglich der Bereich um das Peakmaximum des UV-Peaks für die Bestimmung der Retentionszeiten der Peakmaxima der ¹²C- und ¹³C-Isotopomeren interessant ist.

Die Änderung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes über den modellierten Peaksektor wurde mit Hilfe einer Geradengleichung beschrieben, die anhand des $\delta^{13}\text{C}$ -Verlaufs im Bereich des Peakmaximums der Substanz ermittelt wurde.

Die Verknüpfung von $\delta^{13}\text{C} = f(t_r)$ und der Gauß-Funktion für den Verlauf der Gesamtkonzentration ergab die Konzentrationsverläufe für ¹²C und ¹³C (Gl. 4-23 bzw. Gl. 4-24). Von diesen wurde die Lage der Maxima ermittelt.

Tab. 4-18: Ergebnisse der Modellierung der Retentionszeiten der Maxima der ¹²C- und ¹³C-Isotopomerenpeaks.

Substanz	$t_{\max}^{12}\text{C} / \text{min}$	$t_{\max}^{13}\text{C} / \text{min}$
Benzol	4,61800	4,61771
2,4-DMP	5,94801	5,94663
<i>o</i> -Xylol	10,07708	10,06967

⁴² Aufgrund der hohen Wanderungsgeschwindigkeit des Analyten innerhalb der chromatographischen Säule kann davon ausgegangen werden, daß ein vollständiges Verteilungsgleichgewicht zwischen mobiler und stationärer Phase nicht erreicht werden kann. Diese chromatographische Bedingung wird als nicht-ideal bezeichnet. Darüber hinaus sollen aber auch Effekte, die z. B. durch eine Überladung der Säule, Totvolumina oder starke Adsorptionsplätze hervorgerufen werden, unter der Bezeichnung „nicht-ideale chromatographische Bedingungen“ zusammengefaßt werden.

Nach Gl. 4-29 und mit einer Totzeit für den inerten Tracer KNO_3 auf der Huminsäure-Säule von $t_d = 2,02$ min konnte aus dem Verhältnis der Nettoretentionszeiten der ^{12}C - und ^{13}C -Isotopmeren das Verhältnis der Sorptionskoeffizienten (α') berechnet werden.

Tab. 4-19: Zusammenstellung der $\log K_{OC}$ -Werte und der mit Gl. 4-29 aus den Nettoretentionszeiten berechneten Verhältnisse der Sorptionskoeffizienten α' .

Substanz	$\log K_{OC}$ ⁴³	α'
Benzol	1,77	1,00011
<i>o</i> -Xylol	2,56	1,00092
2,4-DMP	2,32	1,00035

Der α' -Wert für Benzol an HA mit Wasser als Eluent liegt in der gleichen Größenordnung, wie er für Naphthalin mit Acetonitril / Wasser als mobile Phase auf der RP-HPLC-Säule gefunden wurde. Für *o*-Xylol und 2,4-DMP sind die Werte deutlich höher. Da beide Verbindungen Substituenten am aromatischen Ring tragen, liegt die These nahe, daß die Substituenten einen deutlichen Beitrag zum sorptionsbedingten Isotopenfraktionierungseffekt einer Substanz leisten. Diese These konnte aber im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft werden.

Eine andere Erklärung für das Ansteigen des berechneten α' -Wertes mit zunehmend hydrophoben Eigenschaften des Analyten ist die ebenfalls zunehmende Abweichung der gemessenen Peakform von der einer idealen Gaußkurve. Je schlechter das Modell die Realität widerspiegelt, um so geringer ist die Relevanz der ermittelten Modellparameter zu bewerten. Danach wäre der Anstieg des α' -Wertes vom Benzol zum *o*-Xylol zumindest teilweise ein Modellartefakt.

4.10.5 Übertragung der experimentellen Ergebnisse auf ein Aquifermodell

4.10.5.1 Modell der (eindimensionalen) instationären Schadstoffahne

Die in Laborexperimenten an einer huminsäurehaltigen Säule gewonnenen Daten sollten auf die Situation eines realen Aquifers übertragen werden. Dadurch sollte dargestellt werden, in welchem Maße sich - unter aquiferrelevanten Parametern - der durch die Sorption an organische Substanz resultierende Isotopenfraktionierungseffekt auswirkt. Zur Übertragung der Säulenergebnisse auf einen Aquifer wurde zunächst der *Retardationsfaktor* (\mathfrak{R}) verwendet. Er beschreibt das Verhältnis der mittleren Fließgeschwindigkeit eines konservativen Tracers zur mittleren Fließgeschwindigkeit eines Analyten. \mathfrak{R} kann bei Kenntnis von Parametern der stationären Phase und des K_{OC} -Wertes des Analyten nach folgender Gleichung berechnet werden:

⁴³ aus [EPA 1996]

$$\text{Gl. 4-31} \quad \mathcal{R} = 1 + \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \cdot K_{\text{OC}} \cdot f_{\text{OC}} \cdot \rho_{\text{Feststoff}}$$

Hierbei ist die Porosität (ε) als Quotient aus Poren- und Gesamtvolumen ein Parameter der Säulenpackung. Als Parameter der stationären Phase enthält die Gleichung den auf ein organisches Sorbens (hier Huminsäure) bezogenen Sorptionskoeffizienten eines Analyten (K_{OC}) und den Anteil von organischem Kohlenstoff an der Masse des Feststoffs (f_{OC}), sowie die Dichte des Packungsmaterials der Säule ($\rho_{\text{Feststoff}}$). Dabei entspricht die Dichte des Packungsmaterials mit der kovalent gebundenen Huminsäure ungefähr der des unbehandelten Packungsmaterials (ρ_{SiO_2}).

Zur vereinfachten Schreibweise wurden die Parameter $(1-\varepsilon) / \varepsilon$ und $\rho_{\text{Feststoff}}$ zu f_e [$\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$] zusammengefaßt. Die Retardationsfaktoren für ^{12}C und ^{13}C lassen sich dann wie folgt bestimmen:

$$\text{Gl. 4-32} \quad {}^{12}\text{C} \mathcal{R} = 1 + K_{\text{OC}}^{12\text{C}} \cdot f_{\text{OC}} \cdot f_e$$

$$\text{Gl. 4-33} \quad {}^{13}\text{C} \mathcal{R} = 1 + K_{\text{OC}}^{13\text{C}} \cdot f_{\text{OC}} \cdot f_e$$

Zur vollständigen Übertragung der Ergebnisse auf einen Aquifer mußte der chromatographische Parameter Elutionszeit (t_r) in aquiferrelevante Parameter umgewandelt werden. Dazu wurde vereinfachend ein eindimensionaler Transport angenommen. Dadurch konnte Gl. 4-14 auch zur Beschreibung der im Aquifer wandernden Substanz verwendet werden. Aus der zeitaufgelösten Beobachtung eines Chromatogramms am Ende einer Trennsäule mit konstanter Länge wird beim Übergang von einer Trennsäule zu einem Aquifer eine orts aufgelöste Beobachtung zu einem bestimmten Zeitpunkt. Zeit und Ortskoordinaten werden ineinander umgerechnet mit $t_r = x / u$. Da die Wanderungsgeschwindigkeit u für jede Komponente i aber unterschiedlich ist, muß die Koordinatentransformation komponentenspezifisch durchgeführt werden mit $t_r = x_i / u_i = x_i / (u / \mathcal{R}_i)$. Die chromatographische Elutionszeit des Peakmaximums (t_{max}) wurde durch einen Term, der den *Abstand der maximalen Konzentration der Substanz von der Quelle* (L), die *Abstandsgeschwindigkeit des Grundwassers im Aquifer* (u , mit einem typischen Wert von $1 \text{ m}\cdot\text{d}^{-1}$) und \mathcal{R} enthält, ersetzt:

$$\text{Gl. 4-34} \quad t_{\text{max}} = \frac{L}{u} \cdot \mathcal{R}$$

Der *variable Laufzeitparameter* (t_r) in Gl. 4-14 wurde entsprechend durch den *variablen Abstandsparameter* des Analyten (x , mit $x = 0$ als Ort der Quelle) substituiert:

$$\text{Gl. 4-35} \quad t_r = \frac{x_i}{u} \cdot \mathcal{R}_i$$

Zusammenfassend wurde der in Gl. 4-14 verwendete Term ($t_r - t_{\text{max}}$) somit durch den folgenden Ausdruck ersetzt:

$$\text{Gl. 4-36} \quad t_r - t_{\max} = \frac{\mathcal{R}}{u} \cdot (x - L)$$

Der Wert von N wird als Produkt aus der *Bodenzahl pro Meter* (N') und der betrachteten *Länge des Fließweges* (L) im Aquifer erhalten:

$$\text{Gl. 4-37} \quad N = N' \cdot L$$

In einem Tracerversuch mit ungestörtem, sandigen Aquifermaterial wurde im eigenen Labor ein Wert von $N' = 3 \text{ m}^{-1}$ bzw. in einem Feldversuch an einem Aquifer von $0,5 \text{ m}^{-1}$ [SCHÜTH 2002] ermittelt. Diese Werte dienen zur Orientierung für die Größenordnung des Parameters N' .

N steht mit dem Parameter σ zur Beschreibung der Peakbreite in Gl. 4-14 nach folgender Gleichung in Beziehung⁴⁴:

$$\text{Gl. 4-38} \quad N = 4 \cdot \left(\frac{t_{\max}}{2\sigma} \right)^2 = \left(\frac{t_{\max}}{\sigma} \right)^2$$

Nach Umstellen der Gleichung und Einsetzen von Gl. 4-34 sowie Gl. 4-37 wurde folgende Gleichung erhalten:

$$\text{Gl. 4-39} \quad \sigma^2 = \frac{t_{\max}^2}{N} = \frac{\left(\frac{L}{u} \cdot \mathcal{R} \right)^2}{N' \cdot L} = \frac{L}{N'} \cdot \left(\frac{\mathcal{R}}{u} \right)^2$$

Die aus Gl. 4-39 resultierenden Ausdrücke für die beiden Kohlenstoffisotopomeren können in guter Näherung gleichgesetzt werden. Dadurch lassen sich bei der Berechnung des Verhältnisses der beiden Kohlenstoffisotopomere an der Stelle x (R_x) die jeweiligen präexponentiellen Faktoren in Gl. 4-14 kürzen. Der Wert für $L^{13\text{C}}$ wurde aus $L^{13\text{C}} = \left(\frac{^{12\text{C}}\mathcal{R}}{^{13\text{C}}\mathcal{R}} \right) \cdot L^{12\text{C}}$ erhalten. In dem Fall, in dem das Verhältnis der beiden Retardationsfaktoren ($\frac{^{12\text{C}}\mathcal{R}}{^{13\text{C}}\mathcal{R}}$) als Faktor in der beschriebenen Gleichung auftritt, kann dieser in guter Näherung eins gesetzt werden. Die Differenzen müssen hingegen berücksichtigt werden. Unter Berücksichtigung der oben genannten Vereinfachungen und Anwendung von Gl. 4-36 resultiert für R_x die folgende Gleichung:

$$\text{Gl. 4-40} \quad R_x = \frac{\left[\frac{^{13\text{C}}}{^{12\text{C}}} \right]_x}{\left[\frac{^{13\text{C}}}{^{12\text{C}}} \right]_0} \approx \frac{f_{^{13\text{C}}}^x}{f_{^{12\text{C}}}^x} \cdot \exp \left[\frac{N'}{2 \cdot L^{12\text{C}}} \cdot \left(\frac{1 + K_{\text{OC}}^{12\text{C}} \cdot f_{\text{OC}} \cdot f_{\text{E}}}{1 + K_{\text{OC}}^{13\text{C}} \cdot f_{\text{OC}} \cdot f_{\text{E}}} - 1 \right) \cdot \left(x^2 - \left(L^{12\text{C}} \right)^2 \right) \right]$$

⁴⁴ Der Abstand der beiden Wendepunkte der gaußschen Glockenkurve wird mit 2σ bezeichnet. Er entspricht der Peakbreite in 60,7 % der Gesamthöhe.

Die Normierung der Konzentrationsverhältnisse von ^{12}C und ^{13}C der eingesetzten Verbindung erfolgte durch die Häufigkeitsfaktoren $f_{^{12}\text{C}}$ bzw. $f_{^{13}\text{C}}$. Diese wurden aus dem $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des hier verwendeten Benzols berechnet.

Tab. 4-20: Relative Häufigkeit der Kohlenstoffisotope ^{12}C bzw. ^{13}C für das hier verwendete Benzol.

Substanz	$\delta^{13}\text{C}$ -Wert ‰	$f_{^{12}\text{C}}$ /Atom% · 100 % ⁻¹	$f_{^{13}\text{C}}$ /Atom% · 100 % ⁻¹
Benzol	-26,0	0,98917	0,01083

Durch Einsetzen der relativen Häufigkeiten der Kohlenstoffisotope, der Werte für die Parameter N' , $L^{12}\text{C}$, f_{OC} und f_e und der K_{OC} -Werte aus Tab. 4-19 in Gl. 4-40 kann der jeweilige Quotient R_x entlang der Laufstrecke (x) bestimmt werden. Die entsprechenden $\delta^{13}\text{C}$ -Werte können mit Gl. 2-60 berechnet werden.

Für **Benzol** wurden die Auswirkungen der Variation der Werte für die Aquiferparameter f_{OC} , N' und L (die Werte für u und f_e wurden konstant gehalten) auf die Änderung des resultierenden $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes ($\Delta\delta^{13}\text{C}$) untersucht. Die Werte der Parameter wurden dabei wie folgt variiert:

Tab. 4-21: Zusammenstellung der im Modell für Benzol variierten Werte der Aquiferparameter f_{OC} , N' und L .

Aquiferparameter	Werte
f_{OC}	0,0005 und 0,005 (entspricht einem Gehalt an organischem Kohlenstoff von 0,05 bzw. 0,5 Ma%)
N'	0,5; 2,5 und 5,0 m ⁻¹
L	100 und 500 m

Konstant gehaltene Parameter: $u = 1 \text{ m} \cdot \text{d}^{-1}$ und $f_e = 4 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Unter der Voraussetzung, daß der berechnete Isotopenfraktionierungseffekt allein eine Funktion des *Gehalts an OC in der stationären Phase eines Aquifers* (f_{OC}), der *Zahl der theoretischen Böden pro Meter* (N') und der *Laufstrecke des Analyten im Aquifer* (als Position des Peakmaximums, L) ist und eine gaußförmige Peakform vorliegt, wurden unter Anwendung von Gl. 4-40 und Gl. 4-42 die in Tab. 4-22 zusammengefaßten Resultate erhalten.

Die Konzentration von $c = 0,1 c_{\text{max}}$ für das ^{12}C -Isotopomere und der damit verknüpfte Abstand von dessen Peakmaximum ($L_{10}^{12}\text{C}$) wurden willkürlich gewählt. An dieser Stelle sollte die Konzentration des Analyten noch ausreichend hoch sein, um eine Isotopenverhältnisanalyse durchführen zu können. Dadurch sollte ermittelt werden, welcher Isotopenfraktionierungseffekt an der dem Maximum vorauslaufenden Flanke gefunden wird.

Die Werte für $x = L_{10}^{12}\text{C}$ können durch die folgende Gleichung bestimmt werden:

$$\text{Gl. 4-41} \quad L_{10}^{12}\text{C} = L^{12}\text{C} \pm \sqrt{-\ln 0,1 \cdot 2 \cdot \frac{1}{N'} \cdot L^{12}\text{C}}$$

Dabei entspricht das Ergebnis mit $L_{10}^{12}\text{C} > L^{12}\text{C}$ dem Wert der vorauslaufenden Flanke.

Durch Einsetzen von L_{10}^{12C} für x in Gl. 4-40 kann der Wert für R an dieser Stelle erhalten werden (R_{10}). Die Differenz der δ^{13C} -Werte bei $x = L_{10}^{12C}$ und im Peakmaximum bei $x = L^{12C}$ ($\Delta\delta^{13C}$) zeigt an, wie groß der durch Sorption an OC in einem Aquifer hervorgerufene Effekt ist, wenn man bei L_{10}^{12C} eine Probe im Aquifer genommen hätte.

Die Abb. 4-42 verdeutlicht die entsprechenden Parameter.

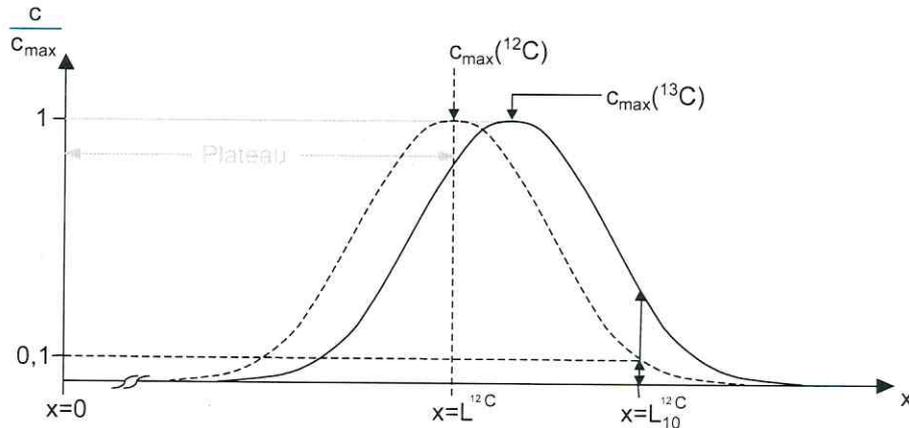


Abb. 4-42: Schematische Darstellung des Peakverlaufs der Konzentration der 12C - bzw. 13C -Isotopomeren entlang der Ausbreitungsrichtung x (13C überhöht dargestellt). Bei einer stationären Fahne bzw. einer instationären Fahne ohne biologischen Abbau ist im Plateau der Wert für R konstant und entspricht der (Ausgangs-)Zusammensetzung in der Quelle bei $x = 0$.

Bei der graphischen Darstellung des Konzentrationsverlaufs entlang der Ausbreitungsrichtung L ist zu beachten, daß hier das 13C - dem 12C - Isotopomer vorausläuft, der Gaußpeak der 13C -Konzentration also gegenüber dem 12C -Peak nach rechts verschoben ist. Bei der Auftragung von c gegen t_r ist es umgekehrt.

Bei den bisherigen Ausführungen wurde – analog zu den chromatographischen Bedingungen – eine diskontinuierliche (punktuelle) Aufgabe des Analyten bzw. Schadstoffes betrachtet. Dies ist für eine reale Aquiferkontamination aber selten der Fall. Zumeist handelt es sich um eine Quelle mit großem Inhalt, die langsam – aber kontinuierlich – ausgelaugt wird. Ist ihr Inhalt ausreichend groß, kommt es nicht zu einer Veränderung der Isotopenzusammensetzung durch das Abströmen des Schadstoffes. Im weiteren wurde von einer homogenen singulären Quelle ausgegangen. Weiterhin wurde angenommen, daß es weder zur Verdünnung noch zum biologischen Abbau entlang der (eindimensionalen) Ausbreitungsrichtung des Schadstoffes (x) kommt. Für diesen Fall können die folgenden Aussagen getroffen werden:

- Es handelt sich um eine instationäre Fahne, deren Konzentrationsverlauf weitgehend dem einer Durchbruchkurve bei Frontalelution einer chromatographischen Säule entspricht (vgl. Abb. 4-42).

- Das weniger stark sorbierende ^{13}C -Isotopomer läuft dem ^{12}C -Isotopomer voraus. Bei gleicher Lauflänge der beiden Isotopomere in der auslaufenden Flanke der Fahne (rechter Ast der Gaußfunktion ⁴⁵ in Abb. 4-42) besitzt das ^{13}C -Isotopomere eine höhere Konzentration als im Plateaubereich. Damit wirkt der Sorptionseffekt in die gleiche Richtung wie ein biologischer Abbau.
- Die gesamte Fahnenlänge (einschließlich der Plateaustrecke) wirkt als Trennstrecke und trägt zum Isotopenfraktionierungseffekt durch Sorption bei.

Aus der modellhaften Vorstellung, daß die Flanke der Durchbruchskurve einer instationären Fahne annähernd durch den rechten Ast einer Gaußverteilung beschrieben werden kann, leiten sich die folgenden Beziehungen ab: Im Plateaubereich ist die Konzentration konstant, gleich der Ausgangskonzentration nahe der Quelle (c_0) und entspricht c_{max} der Gaußkurve. Der Wert für R ist entlang des in Abb. 4-42 als Plateau bezeichneten Bereichs ebenfalls konstant und entspricht dem Wert der Quelle bei $x = 0$ (R_0). Im Falle einer instationären Schadstofffahne kann eine Isotopenfraktionierung - in Abwesenheit eines biologischen Abbaus - nur in der Flanke des Konzentrationsabfalls gemessen werden. Aus dieser Modellvorstellung leitete sich der Vergleich der Isotopenverhältnisse bei $L_{10}^{12}\text{C}$ (R_{10}) und bei $L^{12}\text{C}$ (R_0) in Form des $\Delta\delta^{13}\text{C}$ -Wertes ab. Der Wert für $\Delta\delta^{13}\text{C}$ wird nach der folgenden Gleichung erhalten:

$$\text{Gl. 4-42} \quad \Delta\delta^{13}\text{C} = \frac{(R_{10} - R_0)}{R_{\text{St}}} \cdot 1000 \text{ ‰}$$

Tab. 4-22: Resultierende $\Delta\delta^{13}\text{C}$ -Werte für Benzol aus dem Vergleich von R_{10} bei $L_{10}^{12}\text{C}$ und R_0 bei $L^{12}\text{C}$ bei Variation der Werte für die Aquiferparameter f_{OC} , N' bzw. $L^{12}\text{C}$ und einem Wert von $\alpha' = 1,00017$ (berechnet nach Gl. 4-40, Gl. 4-41 und Gl. 4-42).

f_{OC}	N' / m^3	$L^{12}\text{C} / \text{m}$	$\Delta\delta^{13}\text{C} / \text{‰}$
0,0005	0,5	100	0,23
0,0005	0,5	500	0,45
0,0005	2,5	100	0,45
0,0005	2,5	500	0,94
0,0005	5,0	100	0,61
0,0005	5,0	500	1,30
0,005	0,5	100	1,06
0,005	0,5	500	2,17
0,005	2,5	100	2,17
0,005	2,5	500	4,67
0,005	5,0	100	3,01
0,005	5,0	500	6,53

⁴⁵ Streng mathematisch gesehen sind der Verlauf des rechten Astes einer gaußschen Glockenkurve und der Verlauf einer symmetrischen s-förmigen Durchbruchskurve nicht gleich. Dies sollte aber wegen der Modellhaftigkeit des Ansatzes unberücksichtigt bleiben.

Wie zu erwarten, nimmt bei einem höheren Gehalt an organischem Kohlenstoff der Aquifermatrix (f_{OC}), einer größeren Zahl von theoretischen Böden pro Meter (N') und/oder bei zunehmender Fahnenlänge (L^{12C}) der Wert für $\Delta\delta^{13C}$ zu.

Setzt man einen kleinsten meßbaren Unterschied von $\pm 0,5$ δ -Einheiten bei Anwendung der GC-C-irMS-Methode voraus [HOEFS 1997], so führt erst eine hohe Fahnenlänge und eine hohe Anzahl von theoretischen Böden pro Meter bei dem geringen Gehalt an organischem Kohlenstoff von 0,05 Ma% zu einem $\Delta\delta^{13C}$ -Wert für Benzol größer 1,0 ‰. Kleinere Unterschiede in den δ^{13C} -Werten könnten nicht mit ausreichender Sicherheit ($P = 95\%$) nachgewiesen werden.

Betrachtet man die $\Delta\delta^{13C}$ -Werte für einen Gehalt an organischem Kohlenstoff von 0,5 Ma% im Aquifer, so liegen sie alle oberhalb der 1 ‰-Grenze, können also als signifikanter Unterschied durch die Meßmethode erfaßt werden.

Die oben dargestellten Berechnungen gingen vom Isotopenfraktionierungseffekt aus, welcher für Benzol als Unterschied in den K_{OC} -Werten auf der Huminstoff-Säule gemessen wurde. Dieser Effekt war im Vergleich zu 2,4-DMP und *o*-Xylol klein. Es wurde also eher ein konservativer Fall betrachtet. Das Ausmaß der Überbewertung des biologischen Abbaus aufgrund eines durch Sorption verursachten Isotopenfraktionierungseffektes sollten also für 2,4-DMP und *o*-Xylol noch größer sein als im Fall des Benzols.

Aus diesem Grund wurden anhand eines Satzes an Aquiferparametern die δ^{13C} -Werte für L_{10}^{12C} der drei Substanzen berechnet. Unter der Annahme, daß diese $\Delta\delta^{13C}$ -Werte ausschließlich einem biologischen Abbau zuzuschreiben sind, wurde hieraus ermittelt, welcher Abbaugrad für die Substanzen unter Anwendung der Rayleigh-Gleichung fälschlicherweise bestimmt würde. Es wurden die folgenden Werte für die Aquiferparameter verwendet: $u = 1 \text{ m} \cdot \text{d}^{-1}$; $L^{12C} = 100 \text{ m}$; $f_{OC} = 0,0005$; $N' = 2,5 \text{ m}^{-1}$; $f_e = 4 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$

Aus dem δ^{13C} -Wert für R_{10} und dem δ^{13C} -Wert der (nicht-chromatographierten) Ausgangsverbindung mit R_0 ($\hat{=} f_{13C} / f_{12C}$) kann bei Kenntnis des biologischen Fraktionierungsfaktors α der vermeintliche biologische Umsatz in Prozent ermittelt werden. Vereinfachend wurde hier ein mittlerer Fraktionierungsfaktor von $\alpha = 1,002$ für den aeroben biologischen Abbau sowohl von BTEX-Aromaten als auch von 2,4-DMP angenommen.

Nach Gl. 2-59 berechnen sich daraus die nachfolgenden Werte c_{L10} / c_0 für einen vermeintlichen biologischen Abbau.

Tab. 4-23: Zusammenstellung der nach dem Sorptionsmodell berechneten δ^{13C} -Werte bei L_{10}^{12C} im Vergleich zum δ^{13C} -Wert der Ausgangssubstanz (bulk), der Isotopenverhältnisse R_{10} bzw. R_0 und des daraus resultierenden Verhältnisses c_{L10} / c_0 unter Annahme eines biologischen Abbaus mit $\alpha = 1,002$, sowie dem entsprechenden Abbaugrad in %.

Substanz	$\delta^{13C}_{L10} / \text{‰}$	$\delta^{13C} \text{ bulk} / \text{‰}$	R_{10}	R_0	c_{L10} / c_0	Abbau / %
Benzol	-25,518	-25,985	0,010950	0,010945	0,7867	21
<i>o</i> -Xylol	-14,994	-29,106	0,011069	0,010910	0,0007	99,93
2,4-DMP	-19,342	-23,112	0,011020	0,010977	0,1452	85

Das bedeutet, bei einer Wegstrecke von $L_{10}^{12C} \approx 114 \text{ m}$ ($L^{12C} = 100 \text{ m}$) würde das gemessene Isotopenverhältnis des Benzols auf einen biologischen Abbau von ca. 21 % hindeuten. Im Falle des 2,4-DMP würde man auf einen Abbaugrad von ca. 85 % und beim *o*-Xylol sogar auf über 99 % schließen. Für die gewählten Aquiferparameter würden die Sorptionsvorgänge während der Wanderung durch einen Aquifer bei einer Probenahme an der Spitze einer Schadstofffahne gerade für das *o*-Xylol und das 2,4-DMP eine deutliche Überschätzung des Abbaus durch Mikroorganismen zur Folge haben.

Diese Betrachtungen sind qualitativ gesichert. Der quantitative Aspekt steht jedoch unter dem Vorbehalt, daß das Fraktionierungsverhalten insbesondere der stärker hydrophoben Substanzen (2,4-DMP und *o*-Xylol) noch hinreichend durch die angewandten Modellvorstellungen beschrieben werden kann (siehe auch Diskussion zu Tab. 4-19).

4.10.5.2 Modell einer stationären Schadstofffahne

In 4.10.5.1 wurde nur eine instationäre (sich ausbreitende) Fahne betrachtet, in der die durch Sorption verursachte Isotopenfraktionierung unter Ausschluß eines biologischen Abbaus modelliert wurde.

In der Praxis findet man aber häufig stationäre Schadstofffahnen. Sie sind dadurch gekennzeichnet, daß die Ausbreitung des Schadstoffes durch Nachlieferung aus der Quelle und sein biologischer Abbau an der Front mit gleicher Geschwindigkeit erfolgen. Ein biologischer Abbau erfolgt dabei vor allem an der auslaufenden Flanke der (eindimensionalen) Schadstofffahne und führt hier zu einer Senkung der Schadstoffkonzentration. Im Plateaubereich hingegen kann die Schadstoffkonzentration als konstant angenommen werden, da hier z. B. aufgrund des Mangels an Elektronenakzeptoren ein biologischer Abbau nur schwer erfolgen kann. An der Front der Schadstofffahne überlagern sich jedoch die durch Sorption und durch biologischen Abbau verursachten Isotopenfraktionierungseffekte. Im Folgenden soll für diesen (in der Praxis häufigen) Fall die qualitative Auswirkung dieser Überlagerung der Isotopenfraktionierung durch Sorption und durch den biologischen Abbau betrachtet werden.

Zusammengefaßt sollen für die modellhafte Betrachtung einer stationären Fahne folgende Annahmen gelten:

- Der Abbau und die Nachlieferung des Schadstoffes erfolgen mit gleicher Geschwindigkeit, d. h. die Entstehungsgeschichte der Fahne (Zeit) bzw. die Lauflänge (L) spielen keine Rolle mehr.
- Im Plateau sind die Konzentration und das Isotopenverhältnis der Schadstoffe konstant und mit den Werten in der Quelle identisch.
- Als Trennstrecke, die zu einem sorptionsbedingten Isotopeneffekt beiträgt, steht nur noch die Abbaustrecke jenseits des Plateaus zur Verfügung, wodurch das Ausmaß der Fraktionierung gegenüber dem instationären Fall verringert wird.

Für den Fall einer (Abbau-)Kinetik 1. Ordnung bezüglich des Schadstoffes ist die Änderung der Konzentration an Kohlenstoff für den betrachteten Schadstoff pro Zeiteinheit gleich dem negativen Betrag aus der Geschwindigkeitskonstante (k) multipliziert mit der Konzentration an Kohlenstoff [C]:

$$\text{Gl. 4-43} \quad \frac{d[C]}{dt} = -k \cdot [C]$$

In der integrierten Form mit den Integralgrenzen L_1 und L_2 lautet das Geschwindigkeitsgesetz:

$$\text{Gl. 4-44} \quad \ln \left(\frac{[C_{L_1}]}{[C_{L_2}]} \right) = k \cdot \Delta t$$

Der Term Δt entspricht der Zeit, die zum Transport der Schadstoffmoleküle zwischen den beiden Meßpunkten L_1 und L_2 notwendig ist und die für einen Abbau zur Verfügung steht. Nimmt man zunächst den einfachen Fall an, daß der Abbau keinen Isotopenfraktionierungseffekt hervorruft, so ist $k = k_{12} = k_{13}$. Für diesen Fall gilt, daß dem weniger stark retardierten (schnelleren) ^{13}C -Isotopomer zwischen L_1 und L_2 weniger Reaktionszeit für einen Abbau zur Verfügung steht als dem ^{12}C -Isotopomer ($\Delta t_{12\text{C}} > \Delta t_{13\text{C}}$). Sein Umsatz ist geringer, es reichert sich dadurch an. Das Verhältnis der unterschiedlichen Transportzeiten entspricht dem Verhältnis der Retardationsfaktoren (vgl. Gl. 4-31):

$$\text{Gl. 4-45} \quad \frac{\left(\ln \frac{[C_{L_1}]}{[C_{L_2}]} \right)_{12\text{C}}}{\left(\ln \frac{[C_{L_1}]}{[C_{L_2}]} \right)_{13\text{C}}} = \frac{\Delta t_{12\text{C}}}{\Delta t_{13\text{C}}} = \frac{\mathfrak{R}_{12\text{C}}}{\mathfrak{R}_{13\text{C}}} = \frac{\left(1 + K_{\text{OC}}^{12\text{C}} \cdot f_{\text{OC}} \cdot f_e \right)}{\left(1 + K_{\text{OC}}^{13\text{C}} \cdot f_{\text{OC}} \cdot f_e \right)} \approx \frac{K_{\text{OC}}^{12\text{C}}}{K_{\text{OC}}^{13\text{C}}}$$

Die Vereinfachung gilt nur unter der Voraussetzung, daß $K_{\text{OC}}^i \cdot f_{\text{OC}} \cdot f_e \gg 1$ ist. Die Werte für f_{OC} und f_e sind für beide Kohlenstoffisotomere gleich und lassen sich somit bei Anwendung der oben genannten Vereinfachung kürzen.

Im Folgenden soll der Fall betrachtet werden, daß auch der durch den biologischen Abbau verursachte Isotopenfraktionierungseffekt mit in die qualitativen Betrachtungen einbezogen wird. Dabei gilt neben $\Delta t_{12\text{C}} > \Delta t_{13\text{C}}$ (siehe oben) auch $k_{12\text{C}} > k_{13\text{C}}$. Somit ergibt sich unter Anwendung von Gl. 4-44 und Gl. 4-45 als Quotient aus den Parametern der Transport- und Abbauvorgänge der beiden Isotomeren:

$$\text{Gl. 4-46} \quad \frac{\ln \left(\frac{[C_{L_1}]}{[C_{L_2}]} \right)_{12\text{C}}}{\ln \left(\frac{[C_{L_1}]}{[C_{L_2}]} \right)_{13\text{C}}} = \frac{k_{12\text{C}}}{k_{13\text{C}}} \cdot \frac{\Delta t_{12\text{C}}}{\Delta t_{13\text{C}}} = \frac{k_{12\text{C}}}{k_{13\text{C}}} \cdot \frac{1 + K_{\text{OC}}^{12\text{C}} \cdot f_{\text{OC}} \cdot f_e}{1 + K_{\text{OC}}^{13\text{C}} \cdot f_{\text{OC}} \cdot f_e} \approx \frac{k_{12\text{C}}}{k_{13\text{C}}} \cdot \frac{K_{\text{OC}}^{12\text{C}}}{K_{\text{OC}}^{13\text{C}}}$$

Die Randbedingung, für die die Näherung gültig ist, wurde bereits für die Gl. 4-45 genannt.

Die relative An- oder Abreicherung eines Isotopomers zwischen den Probenahmepunkten L_1 und L_2 wird nach Gl. 4-46 durch zwei Terme bestimmt. Der erste Term resultiert aus dem kinetischen Isotopeneffekt der Abbaureaktion, der zweite Term aus den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der beiden Isotomeren, näherungsweise ausgedrückt als das Verhältnis ihrer Sorptionskoeffizienten.

Für den untersuchten Fall der Kohlenstoffisotopomere verstärken sich beide Effekte, da die ^{12}C -Isotopomere schneller reagieren ($k_{^{12}\text{C}} / k_{^{13}\text{C}} > 1$) und die ^{13}C -Isotopomere schneller wandern ($K_{\text{OC}}^{^{12}\text{C}} / K_{\text{OC}}^{^{13}\text{C}} > 1$). Die ^{13}C -Isotopomere werden dadurch im Vorlauf der Schadstofffahne angereichert.

Ein Vergleich von typischen α -Werten für den Abbauisotopeneffekt (vgl. Kap. 2.6) mit den α' -Werten für den Sorptionsisotopeneffekt (Tab. 4-19) zeigt für Benzol und 2,4-DMP, daß der kinetische Isotopenfraktionierungseffekt deutlich größer ist. Für das *o*-Xylol besitzen beide Effekte die gleiche Größenordnung, so daß der Sorptionsisotopeneffekt hier nicht vernachlässigt werden kann. Die in Gl. 4-46 aufgestellte Beziehung gilt für eine stationäre Fahne. Gegenüber dem Fall der instationären Fahne bzw. der chromatographischen Trennung ist die Kombination von Abbau- und Sorptionsisotopeneffekt hier *unabhängig von der effektiven Trennstufenzahl* des Aquifers und der Fahnenlänge. Dies könnte die Bedeutung für Studien im Feld erhöhen.

Bislang wurde nur die Gesamtkonzentration des Schadstoffes in die Überlegungen einbezogen. Die K_{OC} -Werte der beiden Isotopomeren dienen dabei lediglich zur Beschreibung der verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten. Ihr Zahlenwert bestimmt aber auch das Verhältnis der Konzentrationen des sorbierten zum frei gelösten Anteil des Analyten (vgl. Gl. 2-2). Eine weit verbreitete Annahme geht davon aus, daß nur der frei gelöste Anteil bioverfügbar ist, d. h. einem biologischen Abbau unterliegt [HAITZER 1998 und darin zitierte Literatur]. Für die These, daß nur frei gelöste Moleküle zu einer Reaktion befähigt sind, gibt es auch einige Gegenbeispiele (z. B. Redoxreaktionen mit Huminstoffen oder die heterogen katalysierte Hydrolyse an Tonmineralien [LAOR 1996, PERLINGER 1996, PERLINGER 1998, O'REILLY 2001]). Unterstellt man einen direkten Abbau in den Zellen von Mikroorganismen, sollte die Annahme aber gerechtfertigt sein.

Die Konzentration des gelösten Kohlenstoffs läßt sich, wie oben erwähnt, durch den K_{OC} -Wert und die Gesamtkohlenstoffkonzentration $[C_{\text{gesamt},0}]$ ausdrücken. Damit ändert sich die Gleichung für das Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung (Gl. 4-43) zu:

$$\text{Gl. 4-47} \quad \frac{d[C_{\text{gesamt}}]}{dt} = -k \cdot [C_{\text{gelöst}}] = -k \cdot \frac{[C_{\text{gesamt}}]}{1 + K_{\text{OC}} \cdot f_{\text{OC}} \cdot f_{\text{e}}}$$

In der integrierten Form der Geschwindigkeitsgleichung folgt aus Gl. 4-47:

$$\text{Gl. 4-48} \quad \ln \frac{[C_{\text{gesamt}}]}{[C_{\text{gesamt},0}]} = \frac{-k}{1 + K_{\text{OC}} \cdot f_{\text{OC}} \cdot f_{\text{e}}} \cdot \Delta t$$

In Analogie zur Gl. 4-46 mit $C_{L_1} = C_{\text{gesamt},0}$ und $C_{L_2} = C_{\text{gesamt}}$ geschrieben:

$$\text{Gl. 4-49} \quad \frac{\ln \left(\frac{[C_{L_1}]}{[C_{L_2}]} \right)_{^{13}\text{C}}}{\ln \left(\frac{[C_{L_1}]}{[C_{L_2}]} \right)_{^{12}\text{C}}} = \frac{k_{^{13}\text{C}} \cdot \frac{1 + K_{\text{OC}}^{^{13}\text{C}} \cdot f_{\text{OC}} \cdot f_g}{1 + K_{\text{OC}}^{^{12}\text{C}} \cdot f_{\text{OC}} \cdot f_g} \cdot \Delta t_{^{12}\text{C}}}{k_{^{12}\text{C}} \cdot \Delta t_{^{13}\text{C}}} = \frac{k_{^{12}\text{C}}}{k_{^{13}\text{C}}}$$

Bei Vergleich von Gl. 4-46 und Gl. 4-49 erkennt man, daß in den Quotienten der Sorptionskoeffizienten in Gl. 4-46 der Koeffizient für ^{13}C und in Gl. 4-49 der Koeffizient für ^{12}C im Nenner steht. Die durch Sorption hervorgerufenen Unterschiede in den Reaktionszeiten bzw. in den frei gelösten Anteilen für ^{12}C - und ^{13}C -Isotopomere heben sich also gegenseitig auf, so daß nur der kinetische Isotopeneffekt übrig bleibt.

Die Überlagerung der Isotopeneffekte im Falle einer stationären Fahne führt - unter der Annahme, daß nur der frei gelöste Anteil des Schadstoffes bioverfügbar ist - also dazu, daß nur der kinetische Isotopeneffekt des biologischen Abbaus zu dem beobachteten Isotopenshift einen Beitrag leistet. Dies läßt sich in Worten wie folgt erklären:

Das ^{13}C -Isotopomere wandert aufgrund seines niedrigeren K_{OC} -Wertes schneller als das ^{12}C -Isotopomer. Wegen der kürzeren Reaktionszeit zwischen L_1 und L_2 ist sein Umsatz geringer als im Fall des ^{12}C -Isotopomeren. Gleichzeitig liegt es aufgrund des geringeren K_{OC} -Wertes aber auch in höherem Maß als das ^{12}C -Isotopomere in frei gelöster, für einen biologischen Abbau verfügbarer, Form vor.

Bei Gültigkeit der oben genannten Randbedingungen für den biologischen Abbau läßt sich sogar schlußfolgern, daß sich die Sorptionseffekte auch quantitativ gegenseitig aufheben.

4.11 Theoretische Betrachtungen zum homogenen und heterogenen Aquifermodell

Bislang wurde vereinfachend nur ein gleichmäßiger Fluß des Schadstoffes durch einen homogenen Aquifer angenommen. D. h., von der Schadstoffquelle nimmt die Startkonzentration c_0 mit dem Isotopenverhältnis R_0 durch einen biologischen Abbau mit einem einheitlichen Fraktionierungsfaktor α bis zum Meßpunkt t auf eine Konzentration c_t mit einem Isotopenverhältnis R_t ab. Dabei ist die mikroskopische Vermischung von etwaigen Teilströmen schneller als die Geschwindigkeit des biologischen Abbaus. Dies bedeutet, daß in einem Teilstrom oder einem segregierten Volumenelement des Aquifers der Umsatzgrad vor deren Rückvermischung im Vergleich zum Gesamtumsatzgrad zwischen den Meßpunkten 0 und t klein sein muß. Diese Homogenität ist für einen realen Aquifer nicht ohne weiteres zu erwarten. Auch bei einem makroskopisch einheitlichen Aquifer kann der Schadstoff Mikrobereiche (z. B. Porenräume) mit unterschiedlichen Abbaubedingungen (z. B. Redoxbedingungen) durchfließen. Dabei könnte im Extremfall in einem Teilstrom auch eine vollständige Umsetzung des Schadstoffes erfolgen ($c_t = 0$), während ein anderer Teilstrom keinen Umsatz aufweist ($c_t = c_0$). Als Resultat beobachtet man in diesem Fall keine Isotopenfraktionierung ($R_t = R_0$), obwohl dabei ein beliebig hoher mittlerer Abbaugrad erreicht wird.

Der Einfluß dieser Heterogenität auf die Anwendbarkeit der Methode der Isotopenfraktionierung zur Berechnung von Abbaugraden soll beispielhaft an dem folgenden Modell untersucht werden.

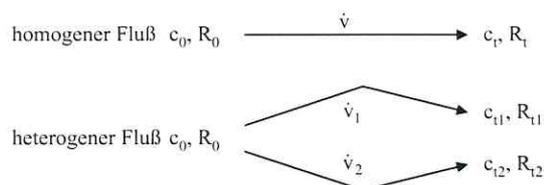


Abb. 4-43: Schematische Darstellung der Parameter bei homogenem bzw. heterogenem Fluß in einem Aquifer.

Ein einheitlicher, vollständig mikrovermischter Fluß \dot{v} soll mit einem gemischten Fluß $\dot{v}_1 + \dot{v}_2$ verglichen werden. Beim heterogenen Fluß sinkt dabei die Konzentration von c_0 auf c_{t1} und c_{t2} in den beiden separierten Teilströmen ab. Der ^{13}C -Gehalt steigt auf R_{t1} und R_{t2} an. Der Grad der Heterogenität wird dabei durch die unabhängigen Parameter x und y beschrieben, die wie folgt definiert werden sollen:

$$x = \frac{c_{t1}}{c_{t2}} \quad \text{und} \quad y = \frac{\dot{v}_1}{\dot{v}_2} \quad \text{mit} \quad \dot{v}_1 + \dot{v}_2 = \dot{v}.$$

Die Rayleigh-Gleichung (Gl. 2-59) beschreibt für geschlossene Systeme die Anreicherung (bei $\alpha > 1$) des schwereren ^{13}C -Isotops mit dem Fraktionierungsfaktor α als Funktion der verbleibenden relativen Restkonzentration c_t / c_0 . Anstelle der relativen Isotopenverhältnisse R_t / R_0 kann man auch die Verschiebung des δ -Wertes ($\Delta\delta^{13}\text{C}$) des Analyten betrachten. Um die Formeln zu vereinfachen und da nur die relative Änderung betrachtet werden soll, wird hierbei vereinfachend $R_{st} = R_0$ gesetzt; daraus folgt $\delta_0 = 0$.

Somit ergibt sich aus Gl. 2-60 für $\Delta\delta_t$:

$$\text{Gl. 4-50} \quad \Delta\delta_t = 1000 \cdot \left[\frac{R_t}{R_0} - 1 \right] = 1000 \cdot \left[\left(\frac{c_t}{c_0} \right)^{\frac{1}{\alpha} - 1} - 1 \right]$$

Der Verlauf des Wertes für $\Delta\delta_t$ in Abhängigkeit von der relativen Restkonzentration (c_t / c_0) ist für einen Fraktionierungsfaktor α von 1,002 in der folgenden Abbildung dargestellt. Man erkennt, daß mit steigendem Umsatzgrad die Anreicherung des ^{13}C -Isotops exponentiell zunimmt (durchgezogene Linie). Die Konzentration des Analyten in diesem Teilstrom nimmt parallel dazu ab. Der Beitrag jeder Teilfraktion i zum gesamten $\Delta\delta_t$ -Wert eines Stoffes ist gegeben aus dem Produkt der relativen (Rest-)konzentration des Teilstromes (c_t / c_0) _{i} und dem entsprechenden $\Delta\delta_{t,i}$ -Wert. Dieser Wert ist in Abhängigkeit von der relativen Restkonzentration als durchbrochene Kurve in der untenstehenden Abbildung dargestellt.

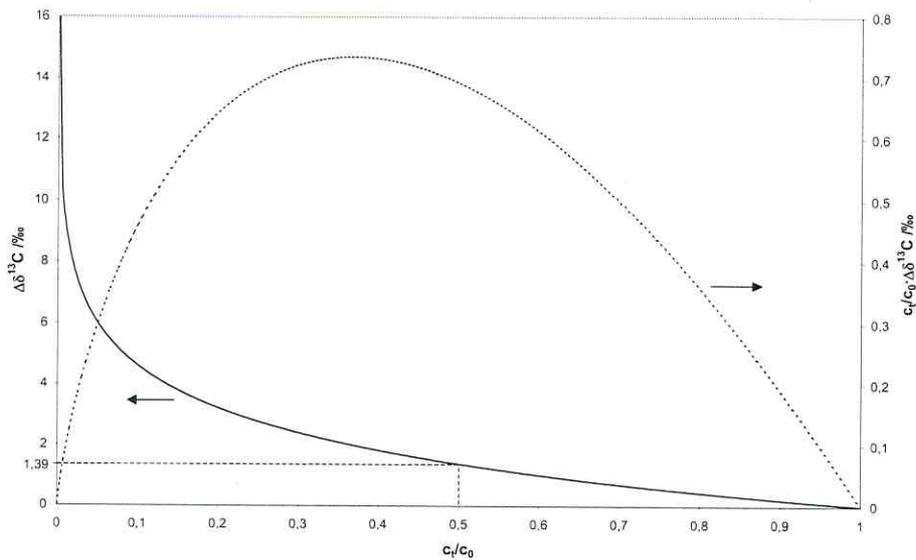


Abb. 4-44: Isotopenfraktionierung berechnet als Funktion der relativen Restkonzentration c_t/c_0 des Analyten mit einem Fraktionierungsfaktor $\alpha = 1,002$.

Diese Kurve besitzt ein breites Maximum und fällt zu hohen Umsatzgraden hin steil ab. Der Abszissenwert des Maximums läßt sich aus der ersten Ableitung der Funktion $(c_t/c_0) \cdot \Delta\delta_t$ bestimmen:

$$\text{Gl. 4-51} \quad \frac{d\left(\left(\frac{c_t}{c_0}\right) \cdot \Delta\delta_t\right)}{d\left(\frac{c_t}{c_0}\right)} = 1000 \cdot \frac{d\left(\left(\frac{c_t}{c_0}\right)^{\frac{1}{\alpha}} - \left(\frac{c_t}{c_0}\right)\right)}{d\left(\frac{c_t}{c_0}\right)} = (c_t/c_0)^{\frac{1-\alpha}{\alpha}} / \alpha - 1 = 0$$

Bei $\alpha = 1,002$ ergibt sich daraus ein Wert für $(c_t/c_0)_{\max}$ von:

$$\text{Gl. 4-52} \quad \left(\frac{c_t}{c_0}\right)_{\max} = \alpha^{\frac{\alpha}{1-\alpha}} = 0,37$$

Dieser Wert ist für α -Werte im relevanten Bereich von 1,001 bis 1,05 nahezu konstant.

Der Verlauf der durchbrochenen Kurve zeigt auch, daß geringe und hohe Umsatzgrade nur einen geringen Beitrag zum $\Delta\delta_t$ -Wert eines Gemisches im Vergleich zu mittleren Umsatzgraden liefern. Der δ -Wert des Gemisches wird von den Fraktionen mit einem hohen Analytanteil bestimmt.

Konsequenzen dieser Zusammenhänge sollen an einem Beispiel verdeutlicht werden:

Für den homogenen Fall läßt sich bei einem Umsatzgrad von 50 % aus Abb. 4-44 eine Anreicherung des ^{13}C -Isotops im verbleibenden Anteil von $\Delta\delta_t = 1,39$ ‰ entnehmen. Setzt man im heterogenen Fall die Mischung aus zwei gleich großen Teilströmen ($\dot{v}_1 = \dot{v}_2$) zusammen, wobei deren Umsätze 10 % bzw. 90 % betragen sollen, so ergibt sich ebenfalls ein mittlerer Umsatzgrad von 50 %. Der $\Delta\delta_t$ -Wert der Mischung beträgt jedoch mit $(0,9 \cdot 0,21 + 0,1 \cdot 4,6) / (0,9 + 0,1) = 0,65$ ‰ nur ungefähr halb so viel wie im homogenen Fall.

Berechnet man aus diesem $\Delta\delta_t$ -Wert den Umsatz für den homogenen Fall, so erhält man $c_t / c_0 = 0,72$, entsprechend einem Wert für den Umsatz von nur 28 %. Der Umsatz wird also im Vergleich zum tatsächlichen Abbau von 50 % erheblich unterschätzt.

Im Folgenden soll die Isotopenanreicherung im allgemeinen Fall - bei Annahme eines heterogenen bzw. homogenen Szenarios - als Quotient $(R_t / R_0)_{\text{het}} / (R_t / R_0)_{\text{hom}}$ für gleiche mittlere Umsätze, d. h. gleiche Werte von c_t / c_0 , betrachtet werden.

Unter den Voraussetzungen

$$\text{Gl. 4-53} \quad \left(\frac{c_t}{c_0} \right)_{\text{het}} = \frac{\sum_i \dot{v}_i \cdot \left(\frac{c_t}{c_0} \right)_i}{\sum_i \dot{v}_i} \quad \text{und}$$

$$\text{Gl. 4-54} \quad \left(\frac{R_t}{R_0} \right)_{\text{het}} = \frac{\sum_i \dot{v}_i \cdot \left(\frac{c_t}{c_0} \right)_i \cdot R_{t,i}}{R_0 \cdot \sum_i \dot{v}_i \cdot \left(\frac{c_t}{c_0} \right)_i} \quad \text{folgt für}$$

$$\text{Gl. 4-55} \quad \frac{\left(\frac{R_t}{R_0} \right)_{\text{het}}}{\left(\frac{R_t}{R_0} \right)_{\text{hom}}} = \frac{\sum_i \dot{v}_i \cdot \left(\frac{c_t}{c_0} \right)_i \cdot R_{t,i}}{\dot{v} \cdot \left(\frac{c_t}{c_0} \right) \cdot R_t} = \left(1 + y \cdot x^{\frac{1}{\alpha}} \right) \cdot (1 + y)^{\frac{1}{\alpha} - 1} \cdot (1 + xy)^{-\frac{1}{\alpha}} = f(x, y)$$

ist der Quotient der beiden Isotopenverhältnisse $(R_t / R_0)_{\text{het}} / (R_t / R_0)_{\text{hom}}$ unabhängig vom mittleren Umsatzgrad des Analyten, ausgedrückt als c_t / c_0 und nur noch von den beiden Heterogenitätsparametern x und y abhängig. Für die Grenzfälle, daß $\alpha = 1$ oder $x = 1$ oder $y = 0$ ist, folgt in jedem Einzelfall aus Gl. 4-55 $f(x, y) = 1$. In Worten ausgedrückt: Es gibt dann keinen Unterschied zwischen den beiden Szenarien.

Aus Gl. 4-55 errechnet sich mit $\alpha = 1,002$, $x = 9$ und $y = 1$ ein Wert für $(R_t / R_0)_{\text{het}} / (R_t / R_0)_{\text{hom}}$ von 0,999265.

Für das obige, konkrete Beispiel wurde auf direktem Rechenweg (Bilanz der einzelnen Teilströme) $(R_t / R_0)_{\text{het}} / (R_t / R_0)_{\text{hom}} = 1,000649 / 1,001385 = 0,999265$ erhalten; also ein identischer Wert.

Schreibt man das Verhältnis der Isotopenverhältnisse der beiden Szenarien als Quotient der δ -Werte, so enthält der Ausdruck den Umsetzungsgrad des Analyten - ausgedrückt als (c_t / c_0) - als expliziten Term:

$$\text{Gl. 4-56} \quad \frac{\delta_{t,\text{het}}}{\delta_{t,\text{hom}}} = \frac{\left(\frac{R_t}{R_0}\right)_{\text{het}} - 1}{\left(\frac{R_t}{R_0}\right)_{\text{hom}} - 1} = \frac{\left(\frac{c_t}{c_0}\right)^{\frac{1}{\alpha} - 1} \cdot f(x, y) - 1}{\left(\frac{c_t}{c_0}\right)^{\frac{1}{\alpha} - 1} - 1}$$

wobei $f(x, y)$ Gl. 4-55 entspricht.

Ziel der ‚quantitativen‘ Isotopenfraktionierungsmethode ist es, aus den gemessenen Isotopenverhältnissen (R_t / R_0) auf einen Umsatz durch biologischen (oder allgemeiner chemischen) Abbau zu schließen. So soll im Folgenden nun die Auswirkung der beiden Szenarien auf den scheinbaren Umsatz untersucht werden. Für den Umsatz folgt:

$$\text{Gl. 4-57} \quad U_t = 1 - \left(\frac{R_t}{R_0}\right)^{\frac{\alpha}{1 - \alpha}}$$

Unter Zuhilfenahme von Gl. 4-56 ergibt sich daraus für den heterogenen Fall:

$$\text{Gl. 4-58} \quad U_{t,\text{het}} = 1 + f(x, y)^{\frac{\alpha}{1 - \alpha}} \cdot (U_{t,\text{hom}} - 1)$$

Könnte durch einen mathematischen Beweis gezeigt werden, daß $f(x, y) \leq 1$ ist, so folgt daraus, daß die Isotopenfraktionierungsmethode stets einen zu kleinen, nie aber einen zu großen Umsatz im heterogenen – als dem realistischeren – Fall liefert. Dies kann gezeigt werden, da die Extremwertbestimmung der Funktion $f(x, y)$ durch die erste Ableitung mit der Bedingung $df/dx = 0$ nur einen einzigen Extremwert bei $x_c = 1$ liefert. Mit $f(x_c) = 1$ ergibt sich daraus, daß an dieser Stelle ein (lokales) Maximum vorliegt. Die Isotopenfraktionierungsmethode liefert deshalb für reale Aquifers unter dem Aspekt der Mikroheterogenität stets zu niedrige mittlere Abbaugrade des Schadstoffs. Sein Abbaugrad wird unterschätzt, nicht überschätzt. Dies ist eine wichtige Verallgemeinerung der modellhaft abgeleiteten Aussagen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Sorption von nicht-ionischen, hydrophoben organischen Substanzen (HOS) an Huminstoffe (Humic Substances, HSs) untersucht. Dabei wurden im ersten Teil Wechselwirkungen mit gelösten HSs und im zweiten Teil der Arbeit Wechselwirkungen von HOS mit immobilisierten HSs betrachtet.

Um den Zusammenhang zwischen dem Sorptionspotential von HSs und deren Molekülgröße unter realitätsnahen Bedingungen untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine schnelle Methode entwickelt, die eine Bestimmung des Sorptionskoeffizienten von HOS online gekoppelt an eine Molekülgrößentrennmethode ermöglicht.

Als Größentrennmethoden wurden die Größenausschlußchromatographie (Size Exclusion Chromatographie, SEC) bzw. die Asymmetrische Fluß-Feldflußfraktionierung (AF^4) eingesetzt. Um Molmassenverteilungen berechnen zu können, bedürfen beide Methoden der Kalibrierung mit Standardpolymeren mit einer dem Analyten vergleichbaren Molekülform. Die Auswahl der Kalibriersubstanzen und der Fließmittelzusammensetzung (Ionenart und -stärke, pH-Wert der Lösung) kann deshalb die Ergebnisse der Molmassenbestimmung maßgeblich beeinflussen, wie es in der Literatur beschrieben ist und auch in dieser Arbeit gezeigt wurde. Aus der SEC-Analyse unter Anwendung einer wäßrigen 0,1 M $NaNO_3$ -Lösung bei pH 7 als Eluent wurden zahlengewichtete bzw. massengewichtete Molmassenmittelwerte (M_n bzw. M_w) von 2,3 kDa bzw. 11,4 kDa für die Huminsäure (Humic Acid, HA) der Fa. Aldrich (Aldrich-HA) und 1,9 kDa bzw. 10,3 kDa für die Huminsäure der Fa. Roth (Roth-HA) bestimmt. Die erhaltenen Werte für Aldrich-HA liegen in Bereichen, wie sie unter Verwendung des gleichen Eluenten und von Polystyrolsulfonaten (PSS) und Aceton als Kalibrierstandards auch in der Literatur bestimmt worden sind. Da der gleiche Eluent und die gleichen Kalibrierstandards aus den SEC-Untersuchungen auch für die AF^4 -Analysen verwendet wurden, lassen sich die ermittelten mittleren Molmassenwerte direkt vergleichen. Für Aldrich-HA wurden ein M_n -Wert von 7,4 kDa und ein M_w -Wert von 29,2 kDa sowie für Roth-HA von 7,0 kDa und 25,4 kDa erhalten. Die deutlich höheren M_w -Werte aus der AF^4 -Analyse lassen sich auf die Ausschlußgrenze der eingesetzten SEC-Säulenkombination zurückführen, da der M_w -Wert besonders durch die hochmolekularen Probenanteile beeinflusst wird. Diese hochmolekularen Anteile können mit der SEC-Analyse (im Gegensatz zur AF^4 -Analyse mit einem programmierten linear abnehmenden Kraftfeld) nicht mehr aufgetrennt werden und eluieren beim Ausschlußvolumen der verwendeten SEC-Säulen. Die ebenfalls höheren M_n -Werte bei Anwendung der AF^4 -Methode werden durch den Verlust von niedermolekularen Anteilen der HA-Proben infolge der bei dieser Technik zu verwendenden Ultrafiltrationsmembran (UF-Membran) und ihrer Ausschlußgrenze (Cut-off) verursacht. Bei den AF^4 -Analysen wurde eine vergleichsweise geringe Wiederfindungsrate von 56 % unter Trennbedingungen erhalten, was auf den relativ hohen nominellen Cut-off von 4 kDa der (zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit verfügbaren) UF-Membranen zurückzuführen ist. Für die SEC wurde eine Wiederfindungsrate von 81 % erzielt. Insgesamt läßt sich sagen, daß beide experimentellen Methoden mit praktisch nicht vermeidbaren, systematischen Fehlern behaftet sind, sich jedoch vorteilhaft ergänzen.

Auch wenn eine exakte Bestimmung der mittleren Molmasse von HA mittels der SEC und der AF^4 kaum realisierbar zu sein scheint, können relative Änderungen im allgemeinen mit beiden Methoden sehr gut untersucht werden. Aus der Änderung der Peakgestalt (Höhe, Elutionsvolumen und Modalität) von HS-Proben

bei der SEC-Analyse unter Verwendung eines im basischen pH-Bereich puffernden Eluenten (0,1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 9,2) wurden in der Literatur Rückschlüsse auf den Aufbau von HSs gezogen und als ‚Piccolo-These‘ [PICCOLO 1996A, PICCOLO 1996B, PICCOLO 1999] bekannt. Auch in dieser Arbeit konnte für Aldrich-HA und die verwendete SEC-Säulenkombination eine Änderung der Peakgestalt bei Zugabe von Essigsäure, nicht aber bei Zusatz von HCl, zu den huminsäurehaltigen Proben in den SEC-Chromatogrammen beobachtet werden. Durch die parallele Anwendung der auf einem anderen Trennprinzip beruhenden AF^4 -Methode konnte jedoch gezeigt werden, daß es sich dabei um SEC-Artefakte handeln muß: Eine vergleichbar signifikante Änderung der Gestalt der Molekülgrößenverteilung unter Einwirkung der organischen Säuren, wie sie bei den SEC-Analysen erhalten worden ist, konnte bei Anwendung der AF^4 -Methode hier nicht beobachtet werden, obwohl die experimentellen Bedingungen bei Zutreffen der Piccolo-These eine solche erwarten ließen. Es wurde aus diesen Experimenten also kein Hinweis darauf gefunden, daß die höher- und hochmolekularen Huminstoffmoleküle lediglich aus Agglomeraten von eher niedermolekularen Bausteinen bestehen.

Zur molekülgrößenaufgelösten Bestimmung von (auf gelösten Kohlenstoff normierten) Sorptionskoeffizienten (K_{DOC}) online im Anschluss an eine Größentrennung von Huminstoffen bietet sich der Einsatz eines Detektors zur simultanen Erfassung des gelösten organischen Kohlenstoffs (Dissolved Organic Carbon, DOC) an. Für diesen Zweck wurde im Rahmen dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit dem Institut für Nichtklassische Chemie (INC) an der Universität Leipzig ein einfacher und damit preiswerter Online-Detektor zur selektiven DOC-Detektion entwickelt und seine Leistungsfähigkeit charakterisiert. Als Nachweisgrenzen für den DOC-Detektor wurden im Offline-Modus ein Wert von 34 ng Kohlenstoff und im Online-Betrieb von ca. 100 ng Kohlenstoff erhalten. Die Bestimmung erfolgte bei einem injizierten Probenvolumen von jeweils 20 μl . Die universelle Verwendbarkeit als weitgehend diskriminierungsfreien, kohlenstoffsensitiven Detektor konnte anhand der Analyse von drei unterschiedlich leicht oxidierbaren Kohlenstoffquellen wie Kaliumhydrogenphthalat (KHP), *tert.*-Butanol und Aldrich-HA demonstriert werden. Beim Einsatz des Gerätes wurden jedoch zwei Probleme offensichtlich: Zum einen führt das große Volumen des Oxidationsreaktors sowie der nachfolgenden Meßzelle zu einer unspezifischen Peakverbreiterung des DOC-Signals im Vergleich zum zuvor aufgezeichneten UV-Peak. Eine derartige symmetrische Peakverbreiterung wäre mathematisch korrigierbar oder bei breiten Ausgangspeaks eventuell vernachlässigbar. Bei der Kopplung der SEC mit dem UV- und dem nachfolgenden DOC-Detektor wurde für Aldrich-HA darüber hinaus eine unsymmetrische Peakverbreiterung erhalten. Eine einfache mathematische Korrektur ist dadurch nicht möglich, da hier nicht einfach zwischen der volumenbedingten (symmetrischen) Peakverbreiterung und anderen Effekten unterschieden werden kann.

Aus den dargestellten methodischen Gründen war ein direkter Einsatz des Online-DOC-Detektors zur Ermittlung der Kohlenstoffkonzentration für die Auswertung der Online-FQT-Analysen nicht möglich. Die nur geringen Unterschiede in den spezifischen UV-Absorptionen über den gesamten Elutionsbereich der verwendeten Aldrich-HA sowie weitere Literaturbefunde rechtfertigten jedoch die Verwendung eines UV-Detektors zur näherungsweisen Bestimmung der Kohlenstoffkonzentration.

Für die hier verwendete Aldrich-HA konnte gezeigt werden, daß durch eine SEC-Trennung erhaltene Größenfraktionen über einen Zeitraum von sieben Tagen in ihrer Molekülgrößenverteilung stabil blieben. Somit war ein Vergleich der mittels der Online-Kopplung der beiden Größentrennmethoden SEC bzw. AF^4 mit der Fluoreszenzlöschtechnik (Fluorescence Quench Technique, FQT) bestimmten molekülgrößenaufgelösten

Sorptionskoeffizienten mit den offline - ebenfalls durch FQT - bestimmten Sorptionskoeffizienten der verschiedenen Molekülgrößenfraktionen möglich.

Für die online ermittelten Sorptionskoeffizienten von Pyren an Aldrich-HA wurde ein nahezu konstanter Wert von $\log K_{\text{DOC}} = 4,3 - 4,4$ über einen sehr breiten Bereich der Molmassenverteilung der HA erhalten. Dies gilt sowohl für die Größentrennung mittels der SEC als auch mittels der AF⁺. Lediglich an den äußeren Flanken der Peaks wurden etwas höhere Werte für den Sorptionskoeffizienten gefunden. Die berechneten molekülgrößenaufgelösten Sorptionskoeffizienten besaßen jedoch insgesamt geringere Werte, als sie für das System der unfraktionierten Aldrich-HA und Pyren ermittelt worden sind. Verantwortlich hierfür könnte der hohe Gehalt an Nitrat-Ionen im Eluenten (0,1 molare Lösung) der SEC bzw. AF⁺ sein. Nitrat kann u. U. als Löschermolekül ebenfalls zu einem Auslöschern der Fluoreszenz des Pyrens führen und die Berechnung von Absolutwerten für die Sorptionskoeffizienten auf der Basis der Quenchwirkung von HSs verfälschen. Ein eindeutiger Beweis für diese These konnte aus den durchgeführten Experimenten jedoch nicht erhalten werden. Aus den Offline-Untersuchungen der drei SEC-Größenfraktionen wurde der aus den Online-Experimenten beobachtete Trend noch etwas deutlicher. Auch hier besitzt die mittlere Fraktion einen etwas niedrigeren Sorptionskoeffizienten ($\log K_{\text{DOC}} = 4,8 \pm 0,2$) als die hoch- bzw. niedermolekulare Fraktion ($\log K_{\text{DOC}} = 5,2 \pm 0,2$ bzw. $5,0 \pm 0,2$). Die Effekte sind jedoch gering. Zusammenfassend läßt sich sowohl aus den Online- als auch aus den Offline-Experimenten schlußfolgern, daß die Molekülgröße keinen deutlichen Einfluß auf das Sorptionspotential der HA hat. Dies gilt zumindest für den auswertbaren Meßbereich der angewandten Methoden von einigen 100 bis zu mehreren 100.000 Da. Offensichtlich verfügen bereits relativ kleine HA-Moleküleinheiten über das gleiche Sorptionspotential bezüglich HOS, wie es der Gesamtheit der HA-Probe zugeschrieben wird. Es ist jedoch vernünftig anzunehmen, daß gelöste Sorbentien eine Mindestgröße besitzen müssen, um mit HOS in der Größe eines PAK-Moleküls hinreichend beständige Wechselwirkungen einzugehen, die als ‚Sorption‘ (z. B. als statische Fluoreszenzlöschung bei der FQT) detektiert werden können. Für Pyren (MW = 202 g·mol⁻¹, 16 C-Atome) als Sorptivmolekül wäre eine (hydrophobe) Domäne mit mindestens ebenso vielen C-Atomen plausibel. Aus den Daten der vorliegenden Arbeit kann die Schlussfolgerung gezogen werden, daß die notwendige untere Grenze im Fall der Aldrich-HA unterhalb von 0,8 kDa liegt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte anhand von Isotopenfraktionierungsexperimenten sowohl für eine RP-C₁₈-HPLC-Säule, als auch für eine Trennsäule, bei der Huminsäure kovalent an ein anorganisches Trägermaterial gebunden wurde, gezeigt werden, daß die Sorption von organischen Substanzen an diese stationären Phasen zu einer Fraktionierung der Kohlenstoffisotope führt. Dabei bewirkt die Sorption an diese stationären Phasen einen Isotopenfraktionierungseffekt, der in seiner Richtung mit dem des biologischen Abbaus identisch ist: Durch beide Prozesse reichern sich die ¹³C-haltigen Isotopomere in der mobilen Phase an.

Durch Überführung der experimentellen Ergebnisse in ein Aquifermodell konnten die substanzspezifischen Isotopenfraktionierungseffekte in Abhängigkeit von den gewählten Aquiferparametern dargestellt werden.

Für den Fall einer instationären Schadstofffahne konnte - unter Annahme eines ausschließlich biologischen Abbaus mit einem biologischen Fraktionierungsfaktor (α) - aus dem sorptionsbedingten Fraktionierungseffekt ein scheinbarer biologischer Abbaugrad in der vorauslaufenden Flanke berechnet werden. Die aus dem Modellansatz erhaltenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für 2,4-Dimethylphenol (2,4-DMP) und *o*-Xylol führen zu einem signifikanten scheinbaren Abbaugrad. Wird der sorptionsbedingte Isotopenfraktionierungseffekt nicht berücksichtigt, so kann dies zu einer Überschätzung des biologischen Abbauvermögens des Aquifers führen. Die

Messung eines Isotopenmusters (und seiner Änderung im Vergleich zur Ausgangszusammensetzung) in der auslaufenden Flanke einer instationären Schadstofffahne allein reicht demzufolge als Nachweis für einen biologischen Schadstoffabbau nicht aus.

Im Fall einer stationären Schadstofffahne, d. h. wenn die Nachlieferung und der biologische Abbau des Schadstoffes mit gleicher Geschwindigkeit ablaufen, ist die Länge der Fließstrecke der Schadstofffahne für den sorptionsbedingten Isotopenfraktionierungseffekt irrelevant. In diesem Fall wird nicht mehr der chromatographische Effekt der Isotopenfraktionierung wirksam, sondern der Effekt, daß für beide Isotopomeren aufgrund ihrer unterschiedlichen Retardation verschiedene Reaktions-/Abbauzeiten zwischen zwei Meßpunkten zur Verfügung stehen. Zusätzlich kann die unterschiedliche Verteilung zwischen sorbiertem und frei gelöstem Zustand zu einer Isotopenfraktionierung führen, wenn beide Zustände einem biologischen Abbau unterschiedlich gut zugänglich sind. Die letztgenannten Effekte haben gegenüber einem biologischen Isotopenfraktionierungseffekt dann eine Relevanz, wenn die α - und α' -Werte in einer vergleichbaren Größenordnung liegen. Es wurde gezeigt, daß sich die sorptionsbedingten Isotopenfraktionierungseffekte unter bestimmten Bedingungen aufheben und nur der kinetische Isotopenfraktionierungseffekt des biologischen Abbaus einen Beitrag leistet.

Ein weiterer Aspekt, der sich erschwerend für die Anwendung der Isotopenverhältnisanalyse zur Charakterisierung des mikrobiellen Abbaus in Aquiferen auswirkt, ist die Tatsache, daß in Aquiferen häufig Teilströme vorhanden sind. Verwendet man den vereinfachten reaktionstechnischen Ansatz eines Strömungsrohres zur Beschreibung eines homogenen Aquifersystems sowie das Modell einer Reaktorkaskade mit unterschiedlichen Reaktionsbedingungen für ein heterogenes Aquifersystem, so gelangt man über den Vergleich beider Systeme zu einer bemerkenswerten Aussage: Besteht der Grundwasserstrom eines makroskopisch homogenen Aquifers aus Teilströmen mit unterschiedlichen Abbaukapazitäten, so resultiert für den aus diesen Teilströmen zusammengesetzten Gesamtstrom gegenüber einem einheitlichen Strom bei gleichen mittleren Umsätzen (c_i/c_0) stets ein geringerer Isotopenfraktionierungseffekt. Dies führt dazu, daß das biologische Abbauvermögen eines solchen – realistischen – Aquifers auf Basis der Ergebnisse der Isotopenmessungen niemals überschätzt, sondern stets unterschätzt wird.

6 Literaturverzeichnis

ASTER 1996

B. Aster, P. Burba, J. A. C. Broekaert;
Analytical Fractionation of Aquatic Humic Substances and their Metal Species by means of Multistage Ultrafiltration;
Fresenius J. Anal. Chem., **1996**, 354, 722 – 728.

BAKER 1997

J. R. Baker, J. R. Mihelcic, D. C. Lührs, J. P. Hickey;
Evaluation of Estimation Methods for Organic Carbon normalized Sorption Coefficients;
Water Environment Res. **1997**, 69, 136 – 145.

BALCKE 2000

G. U. Balcke;
Anthropogene Huminstoffe als Sorbentien und Reagenzien zur Immobilisierung von organischen Schadstoffen in Grundwasserem;
Dissertation, Universität Leipzig, 2000.

BAUMANN 1992

P. Q. Baumann, D. B. Ebenstein, B. D. O'Rourke, K. S. Nair;
High-performance liquid chromatographic technique for non-derivatized leucine purification: evidence for carbon isotope fractionation;
J. Chromatogr., **1992**, 573, 11 – 16.

BECHER 1985

G. Becher, G. E. Carlberg, E. T. Giessing, J. K. Hongslo, S. Monarca;
High-Performance Size Exclusion Chromatography of Chlorinated Natural Humic Water and Mutagenicity Studies Using the Microscale Fluctuation Assay;
Environ. Sci. Technol., **1985**, 19, 422 – 426.

BECKETT 1987

R. Beckett, J. Zhang, J. C. Giddings;
Determination of Molecular Weight Distributions of Fulvic and Humic Acids using Flow Field-Flow Fractionation;
Environ. Sci. Technol., **1987**, 21, 289 – 295.

BECKETT 1992

R. Beckett, F. J. Wood, D. R. Dixon;
Size and Chemical Characterization of Pulp and Paper Mill Effluents by Flow Field-Flow Fractionation and Resin Adsorption Techniques;
Environmental Technol., **1992**, 13, 1129 – 1140.

BECKETT 1993

R. Beckett, B. T. Hart;
Use of Field Flow Fractionation Techniques to Characterize Aquatic Particles, Colloids, and Macromolecules;
In: J. Buffle, H.P. van Leeuwen (Eds.): *Environmental Particles*, Vol. 2;
Lewis Publishers, Boca Raton, 1993.

BECKETT 2000

R. Beckett, M. E. Schimpf;
Characterization of Humic Substances;
In: M.E Schimpf, K. Caldwell, J.C. Giddings (Eds.): *Field-Flow Fractionation Handbook*;
Wiley Interscience, New York, 2000.

BENINCASA 1992

M. A. Benincasa, J. C. Giddings;
Separation and Molecular Weight Distribution of Anionic and Cationic Water-Soluble Polymers by Flow Field-Flow Fractionation;
Anal. Chem., **1992**, *64*, 790 – 798.

BIDIGARE 1991

R. R. Bidigare, M. C. Kennicut, W. L. Keeney-Kennicutt, S. A. Macko;
Isolation and purification of chlorophylls a and b for the determination of stable carbon and nitrogen isotope compositions;
Anal. Chem., **1991**, *63*, 130 – 133.

BOILY 2000

J.-F. Boily, J. B. Fein;
Proton binding to humic acids and sorption of Pb(II) and humic acid to the corundum surface;
Chemical Geology, **2000**, *168*, 239 – 253.

BRANNON 1995

J. M. Brannon, J. C. Pennington, W. M. Davis, C. Hayes;
Fluoranthene K_{DOC} in Sediment Pore Waters;
Chemosphere, **1995**, *30*, S. 419 – 428.

BUFFLE 1978

J. Buffle, P. Deladoey, W. Haerdi;
The use of ultrafiltration for the separation and fractionation of organic ligands in fresh waters;
Anal. Chim. Acta, **1978**, *101*, 339 – 357.

BURBA 1995

P. Burba, V. Shkinev, B. Y. Spivakov;
On-line Fractionation and Characterization of Aquatic Humic Substances by means of Sequential Stage Ultrafiltration;
Fresenius J. Anal. Chem., **1995**, *351*, 74 – 82.

BURKHARD 2000

L. P. Burkhard;
Estimating dissolved organic carbon partition coefficients for non-ionic organic chemicals;
Environ. Sci. Technol., **2000**, *22*, 4663 – 4668.

BUTLER 1969

J. H. A. Butler, J. N. Ladd;
Effect of extractant and molecular size on the optical and chemical properties of soil humic acids;
Aust. J. Soil. Res., **1969**, *7*, 229 – 239.

CAIMI 1997

R. J. Caimi, J. T. Brenna;
Quantitative evaluation of carbon isotopic fractionation during reversed-phase high-performance liquid chromatography;
J. Chromatogr. A, **1997**, *757*, 307 – 310.

CARTER 1982

C. W. Carter, I. H. Suffett;
Binding of DDT to Dissolved Humic Materials;
Environ. Sci. Technol., **1982**, *16*, 735 – 740.

CHEFETZ 2000

B. Chefetz, A. P. Deshmukh, P. G. Hatcher, E. A. Guthrie;
Pyrene Sorption by Natural Organic Matter;
Environ. Sci. Technol., **2000**, *34*, 2925 – 2930.

CHEN 1992

S. Chen, W. P. Inskeep, S. A. Williams, P. R. Callis;
Complexation of 1-Naphthol by Humic and Fulvic Acids;
Soil Sci. Am., **1992**, *56*, 67 – 73.

CHIN 1989

Y.-P. Chin, W. J. Weber;
Estimating the Effects of Dispersed Organic Polymers on the Sorption of Contaminants by Natural Solids, I. A Predictive Thermodynamic Humic Substance-Organic Solute Interaction Model;
Environ. Sci. Technol., **1989**, *23*, 978 – 984.

CHIN 1991

Y.-P. Chin, P. M. Geschwend;
The Abundance, Distribution, and Configuration of Porewater Organic Colloids in Recent Sediments;
Geochim. Cosmochim. Acta, **1991**, *55*, 1309 – 1317.

CHIN 1994

Y.-P. Chin, G. Aiken, E. O'Loughlin;
Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances;
Environ. Sci. Technol., **1994**, *28*, 1853 – 1858.

CHIN 1997

Y.-P. Chin, G. Aiken, K. M. Danielsen;
Binding of Pyrene to Aquatic and Commercial Humic Substances: The Role of Molecular Weight and Aromaticity;
Environ. Sci. Technol., **1997**, *31*, 1630 – 1635.

CHIOU 1979

C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed;
A physical concept of soil-water equilibria for nonionic organic compounds;
Science, **1979**, *206*, 831 – 832.

CHIOU 1983

C. T. Chiou, P. E. Porter, D. W. Schmedding;
Partition Equilibria of Nonionic Organic Compounds between Soil Organic Matter and Water;
Environ. Sci. Technol., **1983**, *17*, 227 – 231.

CHIOU 1986

C. T. Chiou, R. C. Malcolm, T. I. Brinton, D. E. Kile;
Water Solubility Enhancement of Some Organic Pollutants and Pesticides by Dissolved Humic and Fulvic Acids;
Environ. Sci. Technol., **1986**, *20*, 502 – 508.

CHIOU 1987

C. T. Chiou, D. E. Kile, T. I. Brinton, R. L. Malcolm, J. A. Leenheer;
A Comparison of Water Solubility Enhancement of Organic Solutes by Aquatic Humic Materials and Commercial Humic Acids;
Environ. Sci. Technol., **1987**, *21*, 1231 – 1234.

CLARK 1997

I. Clark, P. Fritz;
Environmental Isotopes in Hydrogeology;
Lewis-Publishers, Boca Raton/ New York, 1997.

CONTE 1999

P. Conte, A. Piccolo;
Conformational arrangement of dissolved humic substances. Influence of solution composition on association of humic molecules;
Environ. Sci. Technol., **1999**, *33*, 1682 – 1690.

CRAIG 1957

H. Craig;

Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide;

Geochim. Cosmochim. Acta, **1957**, *12*, 133 – 149.

DE NOBILI 1999

M. De Nobili, Y. Chen;

Size Exclusion Chromatography of Humic Substances: Limits, Perspectives and Prospectives;

Soil Science, **1999**, *164*, 825 – 833.

DE PAOLIS 1997

F. De Paolis, J. Kukkonen;

Binding of Organic Pollutants to Humic and Fulvic Acids: Influence of pH and the Structure of Humic Material;

Chemosphere, **1997**, *34*, 1693 – 1704.

DEMPSTER 1997

H. S. Dempster, B. Sherwood-Lollar, S. Feenstra;

Tracing Organic Contaminants in Groundwater: A New Methodology using Compound-Specific Isotopic Analysis;

Environ. Sci. Technol., **1997**, *31*, 3193 – 3197.

DIAS 1997

R. F. Dias, K. H. Freeman;

Carbon isotope analyses of semi-volatile organic compounds in aqueous media using solid-phase microextraction and isotope ratio monitoring GC/MS;

Anal. Chem., **1997**, *69*, 944 – 950.

DI TORO 1991

D. M. Di Toro, C. S. Zarba, D. J. Hansen, W. J. Berry, R. C. Swartz, C. E. Cowan, S. P. Pavlou, H. E. Allen, N. E. Thomas, P. R. Paquin;

Technical Basis for Establishing Sediment Quality Criteria for Nonionic Organic Chemicals using Equilibrium Partitioning;

Environ. Toxicol. Chem., **1991**, *10*, 1541 – 1583.

DOERFFEL 1987

K. Doerffel;

Statistik in der analytischen Chemie;

VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1987.

DOERFFEL 1990

Autorenkollektiv, federführende Autoren: K. Doerffel, R. Geyer;

Analytikum: Methoden der analytischen Chemie und ihre theoretischen Grundlagen;

VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1990.

DOLL 1999

T. E. Doll, F. H. Frimmel, M. U. Kumke, G. Ohlenbusch;

Interaction between natural organic matter (NOM) and polycyclic aromatic compounds (PAC) - comparison of fluorescence quenching and solid phase micro extraction (SPME);

Fresenius J. Anal. Chem., **1999**, *362*, 313 – 319.

DYCUS 1995

P. J. M. Dycus, K. D. Healy, G. K. Stearman, M. J. M. Wells;

Diffusion Coefficients and Molecular Weight Distributions of Humic and Fulvic Acids determined by Flow Filed-Flow Fractionation;

Sep. Sci. Technol., **1995**, *30*, 1435 – 1453.

EADIE 1990

B. J. Eadie, N. R. Morehead, P. F. Landrum;

Three-Phase Partitioning of Hydrophobic Organic Compounds in Great Lakes Waters;

Chemosphere, **1990**, *20*, 161 – 178.

EPA 1996

United States Environmental Protection Agency, Office of Emergency and Remedial Response;
Soil screening guidance: User's Guide (2nd edition), Attachment C: Chemical properties for SSL development;
EPA document number EPA/540/R-96/018, July 1996.
<http://www.epa.gov/superfund/resources/soil/attachc.pdf>

GAUTHIER 1986

T. D. Gauthier, E. C. Shane, W. F. Guerin, W. R. Seitz, C. L. Grant;
Fluorescence Quenching Method for Determining Equilibrium Constants for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Binding to Dissolved Humic Materials;
Environ. Sci. Technol., **1986**, *20*, 1162 – 1166.

GAUTHIER 1987

T. D. Gauthier, W. R. Seitz, C. L. Grant;
Effects of Structural and Compositional Variations of Dissolved Humic Materials on Pyren K_{OC} Values;
Environ. Sci. Technol., **1987**, *21*, 243 – 248.

GENSLER 1994

M. Gensler, H.-L. Schmidt;
Isolation of the main organic acids from fruit juices and nectars for carbon isotope ratio measurements;
Anal. Chim. Acta, **1994**, *299*, 231 – 237.

GEORGI 1998

A. Georgi;
Sorption von hydrophoben organischen Verbindungen an gelösten Huminstoffen;
Dissertation, Universität Leipzig, 1998.

GEORGI 2002

A. Georgi, F.-D. Kopinke;
Validation of a modified Flory-Huggins concept for description of hydrophobic organic compound sorption on dissolved humic substances;
Environ. Toxicol. Chem., **2002**, *21*, 1766 – 1774.

GIDDINGS 1986A

J. C. Giddings, M. R. Schure, M. N. Myers, G. R. Velez;
End effects in field-flow fractionation channels: theory and means for reducing incremental zone broadening;
Anal. Chem., **1986**, *58*, 2099 – 2104.

GIDDINGS 1986B

J. C. Giddings;
Simplified nonequilibrium theory of secondary relaxation effects in programmed field-flow fractionation;
Anal. Chem., **1986**, *58*, 735 – 740.

GMEHLING 1996

J. Gmehling, A. Brehm;
Grundoperationen, Lehrbuch der Technischen Chemie - Band 2;
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1996.

GOODPASTER 2001

J. V. Goodpaster, V. L. McGuffin;
Fluorescence Quenching as an Indirect Detection Method for Nitrated Explosives;
Anal. Chem., **2001**, *73*, 2004 – 2011.

GOSH 1980

K. Gosh, M. Schnitzer;
Macromoleculare Structure of Humic Substances;
Soil Sci., **1980**, *129*, 266 – 276.

GRATHWOHL 1990

P. Grathwohl;

Influence of organic matter from soils and sediments from various origins on the sorption of some chlorinated aliphatic hydrocarbons;

Environ. Sci. Technol., **1990**, *24*, 1687 – 1639.

HAITZER 1998

M. Haitzer, S. Höss, W. Traunspurger, C. Steinberg;

Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms - a review -;

Chemosphere, **1998**, *37*, 1335 – 1362.

HARRINGTON 1999

R. R. Harrington, S. R. Poulson, J. I. Drever, P. J. S. Colberg, E. F. Kelly;

Carbon isotope systematics of monoaromatic hydrocarbons: vaporization and adsorption experiments;

Org. Geochem., **1999**, *30*, 765 – 775.

HAYASE 1983

K. Hayase, H. Tsubota;

Sedimentary Humic Acid and Fulvic Acid as Surface Active Substances;

Geochim. et Cosmochim. Acta, **1983**, *47*, 947 – 952.

HER 2002

N. Her, G. Amy, D. Foss, J. Cho, Y. Yoon, P. Kosenka;

Optimization of a Method for Detecting and Characterizing NOM by HPLC-Size Exclusion Chromatography with UV and On-line DOC Detection;

Environ. Sci. Technol., **2002**, *36*, 1069 – 1076.

HOEFS 1997

J. Hoefs;

Stable isotope chemistry;

Springer-Verlag, Berlin, 1997.

HOLMAN 2002

H.-Y. N. Holman, K. Nieman, D. L. Sorensen, C. D. Miller, M. C. Martin, Th. Borch, W. R. McKinney, R. C. Sims;

Catalysis of PAH Biodegradation by Humic Acid Shown in Synchrotron Infrared Studies;

Environ. Sci. Technol., **2002**, *36*, 1276 – 1280.

HUBER 1996

S. A. Huber, F. H. Frimmel;

Size-exclusion chromatography with organic carbon detection (LC-OCD): a fast and reliable method for the characterization of hydrophilic organic carbon;

Vom Wasser, **1996**, *86*, 277 – 290.

HUBER 2001

S. A. Huber;

<http://www.doc-labor.de>, 2001.

HUNCHAK-KARIOUK 1997

K. Hunchak-Kariouk, L. Schweitzer, I. H. Suffet;

Partitioning of 2,2',4,4'-Tetrachlorobiphenyl by the Dissolved Organic Matter in Oxidic and Anoxic Porewaters;

Environ. Sci. Technol., **1997**, *31*, 639 – 645.

JANCA 1987

J. Janca;

Field-Flow Fractionation Analysis of Macromolecules and Particles;

Chromatographic Science Series, Vol. 39;

Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 1987.

JOHNSON 2002

W. P. Johnson, G. Bao, W. W. John;
Specific UV Absorbance of Aldrich Humic Acid: Changes during Transport in Aquifer Sediment;
Environ. Sci. Technol., **2002**, *36*, 608 – 616.

JOTA 1991

M. A. Jota, J. P. Hassett;
Effects of Binding of a PCB Congener by Dissolved Humic Substances;
Environ. Toxicol. Chem., **1991**, *10*, 483 – 491.

KARICKHOFF 1984

S. W. Karickhoff;
Organic Pollutant Sorption in Aquatic Systems;
J. Hydraulic Engineering, **1984**, *110*, 707 – 734.

KILDUFF 1996

J. E. Kilduff, T. Karanfil, Y. P. Chin, W. J. Weber;
Adsorption of Natural Organic Polyelectrolytes by Activated Carbon: A Size-Exclusion Chromatography Study;
Environ. Sci. Technol., **1996**, *30*, 1336 – 1343.

KLAUS 2000

U. Klaus, Th. Pfeifer, M. Spiteller;
APCI-MS/MS: A Powerful Tool for the Analysis of Bound Residues Resulting from the Interaction of Pesticides with DOM and Humic Substances;
Environ. Sci. Technol., **2000**, *34*, 3514 – 3520.

KOOPAL 1998

L. K. Koopal, Y. Yang, A. J. Minnaard, P. L. M. Theunissen, W. H. Van Riemsdijk;
Chemical immobilisation of humic acid on silica;
Colloids and Surfaces A: Physicochem. Engineering Aspects, **1998**, *141*, 385 – 395.

KOPINKE 1995

F.-D. Kopinke, J. Pörschmann, U. Stottmeister;
Sorption of Organic Pollutants on Anthropogenic Humic Matter;
Environ. Sci. Technol., **1995**, *29*, 941 – 950.

KOPINKE 1997

F.-D. Kopinke, A. Georgi, K. Mackenzie;
Comments on: Water solubility enhancement of pyrene in the presence of humic substances (by Tanaka et al.);
Analytica Chimica Acta, **1997**, *355*, 101 – 103.

KOPINKE 1999

F.-D. Kopinke, J. Pörschmann, A. Georgi;
Application of SPME to Study Sorption Phenomena on Dissolved Humic Organic Matter (Chapter 8);
In: J. Pawliszyn (Ed.): Application of Solid Phase Microextraction;
RSC Chromatography Monographs, 1999.

KOPINKE 2001A

F.-D. Kopinke, A. Georgi, K. Mackenzie;
Sorption of Pyrene to Dissolved Humic Substances and Related Model Polymers. 1. Structure-Property Correlation;
Environ. Sci. Technol., **2001**, *35*, 2536 – 2542.

KOPINKE 2001B

F.-D. Kopinke, A. Georgi, K. Mackenzie, M. Kumke;
Sorption and Chemical Reactions of PAHs with Dissolved Humic Substances and Related Model Polymers Chapter 4.6);
In: F. H. Frimmel, G. Abbt-Braun, K.-G. Heumann, B. Hock, H.-D. Lüdemann, M. Spiteller (Eds.): Refractory Organic Substances (ROS) in the Environment,
Wiley-VCH, Weinheim, 2001.

KUDELIN 1993

B. L. Kudelin, L. V. Gavrilina, Y. L. Kaminski;
Isotope effects in liquid chromatography of imipramine and desmethylimipramine;
J. Chromatogr., **1993**, *636*, 243 – 247.

KUKKONEN 1990

J. Kukkonen, J. F. McCarthy, A. Oikari;
Effects of XAD-8 Fractions of Dissolved Organic Carbon on the Sorption and Bioavailability of Organic Micropollutants;
Arch. Environ. Contam. Toxicol., **1990**, *19*, 551 – 557.

KUKKONEN 1994

J. Kukkonen, J. Pellinen;
Binding of Organic Macromolecules: Comparison of Analytical Methods;
Sci. Tot. Environ., **1994**, *152*, 19 – 29.

LADD 1969

J. N. Ladd;
Extinction coefficients of soil humic acids fractionated by Sephadex gel filtration;
Soil Sci., **1969**, *107*, S. 303 – 306.

LAKOWICZ 1999

J. R. Lakowicz;
Principles of fluorescence spectroscopy (2nd edition);
Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, 1999.

LANDRUM 1984

P. F. Landrum, S. R. Nihart, B. J. Eadle, W. S. Gardner;
Reverse-Phase Separation Method for Determining Pollutant Binding to Aldrich Humic Acid and Dissolved Organic Carbon of Natural Waters;
Environ. Sci. Technol., **1984**, *18*, 187 – 192.

LAOR 1996

Y. Laor, P. F. Strom, W. J. Farmer;
The effect of sorption on phenanthrene bioavailability;
J. Biotechnol., **1996**, *51*, 227 – 234.

LEIBNITZ 1970

E. Leibnitz, H. G. Struppe;
Handbuch der Gas-Chromatographie;
Geest & Portig-Verlag, Leipzig, 1970.

LIDE 1992

D. R. Lide (Ed. in Chief);
CRC-Handbook of chemistry and physics, 73. Ed. (1992-1993);
CRC Press, Boca Raton, 1992.

LITZÉN 1991

A. Litzén, K.-G. Wahlund;
Effects of temperature, carrier composition and sample load in asymmetrical flow field-flow fractionation;
J. Chromatogr., **1991**, *548*, 393 – 406.

LITZÉN 1993

A. Litzén;
Separation Speed, Retention, and Dispersion in Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation as Functions of Channel Dimensions and Flow Rates;
Anal. Chem., **1993**, *65*, 461 – 470.

LÜERS 1996

F. Lüers, Th. E. M. Ten Hulscher;
Temperature Effect on the Partitioning of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons between Natural Organic Carbon and Water;
Chemosphere, **1996**, *4*, 643 – 657.

MACKENZIE 2002

K. Mackenzie, A. Georgi, M. Kumke, F.-D. Kopinke;
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., **2002**, *36*, 4403 – 4409.

MAXIN 1995

C. R. Maxin, I. Kögel-Knabner;
Partitioning of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) to Water-Soluble Soil Organic Matter;
Europ. J. Soil. Sci., **1995**, *46*, 193 – 204.

MCCARTHY 1985

J. F. McCarthy, B. D. Jimenez;
Interactions between Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Dissolved Humic Material: Binding and Dissociation;
Environ. Sci. Technol., **1985**, *19*, 1072 – 1076.

MCCARTHY 1989

J. F. McCarthy, L. E. Roberson, L. Burrus;
Association of Benzo(a)pyrene with Dissolved Organic Matter: Prediction of K_{DOM} from Structural and Chemical Properties of the Organic Matter;
Chemosphere, **1989**, *19*, 1911 – 1920.

MEANS 1982

J. C. Means, R. Wijayaratne;
Role of natural colloids in the transport of hydrophobic pollutants.;
Science, **1982**, *215*, 968 – 970.

MECKENSTOCK 1999

R. U. Meckenstock, B. Morasch, R. Warthmann, B. Schink, E. Annweiler, W. Michaelis, H. H. Richnow;
 $^{13}C/^{12}C$ isotope fractionation of aromatic hydrocarbons during microbial degradation;
Environ. Microbiol., **1999**, *1*, 409 – 414.

MECKENSTOCK 2002

R. U. Meckenstock, B. Morasch, M. Kästner, A. Vieth, H. H. Richnow;
Assesment of bacterial degradation of aromatic hydrocarbons in the environment by analysis of stable carbon isotope fractionation;
Water, Air, and Soil Pollution: Focus, **2002**, *2*, 141 – 152.

MIANO 1988

T. M. Miano, G. Sposito, J. P. Martin;
Fluorescence Spectroscopy of Humic Substances;
Soil Sci. Soc. Am. J., **1988**, *52*, 1016 – 1019.

MORI 1989

S. Mori;
Secondary effects in aqueous size exclusion chromatography of sodium poly(styrenesulfonate) compounds;
Anal. Chem., **1989**, *61*, 530 – 534.

MORI 1999

S. Mori, H. G. Barth;
Size exclusion chromatography;
Springer-Verlag, Berlin, 1999.

MÜLLER 2000

M. B. Müller, D. Schmitt, F. H. Frimmel;
Fractionation of Natural Organic Matter by Size Exclusion Chromatography – Properties and Stability of Fractions;
Environ. Sci. Technol., **2000**, *34*, 4867 – 4872.

MÜLLER 2002

M. B. Müller, F. H. Frimmel;
A New Concept for the Fractionation of DOM as a Basis for Its Combined Chemical and Biological Characterization;
Wat. Res., **2002**, *36*, 2643 – 2655.

NIELSEN 1997

T. Nielsen, K. Siigur, Ch. Helweg, O. Jørgensen, P. E. Hansen, U. Kirso;
Sorption of Polycyclic Aromatic Compounds to Humic Acid as studied by High-Performance Liquid Chromatography;
Environ. Sci. Technol., **1997**, *31*, 1102 – 1108.

NYER 1997

E. K. Nyer, M. E. Duffin;
The state of art of bioremediation;
Ground water monitoring and Remediation, **1995**, *17*, 64 – 69.

O'REILLY 2001

K. T. O'Reilly, M. E. Moir, C. D. Taylor, C. A. Smith, M. R. Hyman;
Hydrolysis of tert-Butyl Methyl Ether (MTBE) in Dilute Aqueous Acid;
Environ. Sci. Technol., **2001**, *35*, 3954 – 3961.

OHLENBUSCH 2001

G. Ohlenbusch, F. H. Frimmel;
Investigation on the Sorption of Phenols to Dissolved Organic Matter by a QSAR Study;
Chemosphere, **2001**, *45*, 323 – 327.

PARKER 1968

C. A. Parker;
Photoluminescence of Solutions;
Elsevier, Amsterdam, 1968.

PERLINGER 1996

J. A. Perlinger, W. Angst, R. P. Schwarzenbach;
Kinetics of the Reduction of Hexachloroethane by Juglone in Solutions Containing Hydrogen Sulfide;
Environ. Sci. Technol., **1996**, *30*, 3408 – 3417.

PERLINGER 1998

J. A. Perlinger, J. Buschmann, W. Angst, R. P. Schwarzenbach;
Iron Porphyrin and Mercaptojuglone Mediated Reduction of Polyhalogenated Methanes and Ethanes in Homogeneous Aqueous Solution;
Environ. Sci. Technol., **1998**, *32*, 2431 – 2437.

PERMINOVA 2001

I. V. Perminova, N. Y. Grechishcheva, D. V. Kovalevskii, A. V. Kudryavtsev, V. S. Petrosyan, D. N. Matorin;
Quantification and Prediction of the Detoxifying Properties of Humic Substances Related to Their Chemical Binding to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons;
Environ. Sci. Technol., **2001**, *35*, 3841 – 3848.

PERMINOVA 1998

I. V. Perminova, F. H. Frimmel, D. V. Kovalevskii, G. Abbt-Braun, A. V. Kudryavtsev, Hesse;
Development of a predictive model for calculation of molecular weight of humic substances;
Wat. Res., **1998**, *32*, 872 – 881.

PERMINOVA 1999

I. V. Perminova, N. Y. Grechishcheva, V. S. Petrosyan;
Relationships between Structure and Binding Affinity of Humic Substances for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relevance of Molecular Descriptors;
Environ. Sci. Technol., **1999**, *33*, 3781 – 3787.

PEURAVIOURI 1997

J. Peuraviouri, K. Pihlaja;
Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances;
Anal. Chim. Acta, **1997**, *337*, 133 – 149.

PICCOLO 1996A

A. Piccolo, S. Nardi, G. Concheri;
Macromolecular Changes of Humic Substances induced by Interaction with Organic Acids;
Eur. J. Soil Sci., **1996**, *47*, 319 – 328.

PICCOLO 1996B

A. Piccolo, S. Nardi, G. Concheri;
Micelle-like Conformation of Humic Substances as revealed by Size Exclusion Chromatography;
Chemosphere, **1996**, *33*, 595 – 602.

PICCOLO 1999

A. Piccolo, P. Conte, A. Cozzolino;
Effects of Mineral and Monocarboxylic Acids on the Molecular Association of Dissolved Humic Substances;
Eur. J. Soil Sci., **1999**, *50*, 687 – 694.

PICCOLO 2000

A. Piccolo, A. Cozzolino, P. Conte, R. Spaccini;
Polymerization of humic substances by an enzyme catalyzed oxidative coupling;
Naturwissenschaften, **2000**, *87*, 391 – 394.

PICCOLO 2001

A. Piccolo;
The Supramolecular Structure of Humic Substances;
Soil Science, **2001**, *166*, 810 – 832.

PICCOLO 2002

A. Piccolo, P. Conte, E. Trivellone, B. van Lagen, P. Buurman;
Reduced Heterogeneity of a Lignite Humic Acid by Preparative HPSEC Following Interaction with an Organic Acid. Characterization of Size-Separates by Pyr-GC-MS and ¹H-NMR Spectroscopy;
Environ. Sci. Technol., **2002**, *36*, 76 – 84.

PLECHANOV 1983

N. Plechanov;
Studies of molecular weight distributions of fulvic and humic acids by gel permeation chromatography. Examination of the solute molecular composition using RI, UV, fluorescence and weight measurement as detection techniques;
Org. Geochem., **1983**, *5*, 143 – 149.

POOLE 1999

S. K. Poole, C. E. Poole;
Chromatographic models for the sorption of neutral organic compounds by soil from water and air;
J. Chromatogr. A, **1999**, *845*, 381 – 400.

PÖRSCHMANN 1997

J. Pörschmann, Z. Zhang, F.-D. Kopinke, J. Pawliszyn;
Solid Phase Microextraction for Determining the Distribution of Chemicals in Aqueous Matrices;
Anal. Chem., **1997**, *69*, 597 – 600.

POULSON 1997

S. R. Poulson, J. I. Drever, P. J. S. Colberg;
Estimation of K_{OC} Values for Deuterated Benzene, Toluene, and Ethylbenzene, and Application to Groundwater Contamination Studies;
Chemosphere, **1997**, *35*, 2215 – 2224.

PÜSCHEL 1996

R. Püschel;
Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe in Gewässern: Untersuchungen zum Sorptionsverhalten und zur abiotischen Oxidation;
Dissertation, Technische Universität Hamburg-Harburg, 1996.

RABER 1997

B. Raber, I. Kögel-Knabner;
Influence of origin and properties of dissolved organic matter on the partition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs);
European Journal of Soil Science, **1997**, *48*, 443 – 455.

REBHUHN 1996

M. Rebhuhn, F. De Smedt, J. Rwetabula;
Dissolved Humic Substances for Remediation of Sites Contaminated by Organic Pollutants. Binding-Desorption Model Predictions;
Water Res., **1996**, *30*, 2027 – 2038.

REIMER 2002

A. Reimer;
Reaktivität von organischen Verbindungen in Gegenwart gelöster Huminstoffe;
Diplomarbeit, Technische Universität Dresden, 2002.

REMLER 1995

M. Remmler, A. Georgi, F.-D. Kopinke;
Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time-of-flight (TOF) mass spectrometry as a method for the determination of the molecular mass distributions of humic acids;
Eur. Mass Spectrom., **1995**, *1*, 403 – 407.

REN 1996

S. Z. Ren, E. Tombacz, J. A. Rice;
Dynamic Light Scattering from Power-Law Polydisperse Fractals: Application of Dynamic Scaling to Humic Acid;
Phys. Rev. E, **1996**, *53*, 2980 – 2983.

RICHNOW 2003A

H. H. Richnow, R. U. Meckenstock, L. A. Reitzel, A. Baun, A. Ledin, T. H. Christensen;
In Situ Biodegradation determined by Carbon Isotope Fractionation of Aromatic Hydrocarbons in an Anaerobic Landfill Leachate Plume (Vejen, Denmark);
J. Contam. Hydrol., **2003**, *64*, 59 – 72.

RICHNOW 2003B

H. H. Richnow, E. Annweiler, W. Michaelis, R. U. Meckenstock;
Microbial in situ degradation of aromatic hydrocarbons in a contaminated aquifer monitored by carbon isotope fractionation;
J. Contam. Hydrol., **2003**, *65*, 101 – 120.

RIFAI 1995

H. S. Rifai, R. C. Borden, J. T. Wilson, C. H. Ward;
Intrinsic Bioattenuation For Subsurface Restoration, Intrinsic Bioremediation;
In: R. E. Hinchee, J.T. Wilson, D.C. Downey (Eds.), Battelle Memorial Institute, Columbus (OH), 1995.

ROESSNER 1994

D. Roessner, W.-M. Kulicke;
On-Line coupling of flow field-flow fractionating and multi-angle laser light scattering;
J. Chromatogr. A, **1994**, *687*, 249 – 258.

RUTHERFORD 1992

D. W. Rutherford, C. T. Chiou, D. E. Kile;
Influence of Soil Organic Matter Composition on the Partition of Organic Compounds;
Environ. Sci. Technol., **1992**, *26*, 336 – 340.

SABLJIC 1995

A. Sabljic, H. Güsten, H. Verhaar, J. Hermens;
QSAR Modelling of Soil Sorption. Improvements and Systematics of log K_{OC} vs. log K_{OW} Correlations;
Chemosphere, **1995**, *31*, 4489 – 4514.

SANGSTER 1989

J. Sangster;
Octanol-water partition coefficients of simple organic compounds;
J. Phys. Chem. Ref. Data, **1989**, *18*, 1111 – 1229.

SCHACHTSCHABEL 1992

P. Schachtschabel, H.-P. Blume, G. Brümmer, K.-H. Hartge, U. Schwertmann;
Lehrbuch der Bodenkunde;
Bernhard Enke Verlag, Stuttgart, 1992.

SCHIMPF 1997

M. E. Schimpf, K.-G. Wahlund;
Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation as a Method to Study the Behaviour of Humic Acids in Solution;
J. Microcol. Sep., **1997**, *9*, 535 – 543.

SCHLAUTMANN 1993

M. A. Schlautmann, J. J. Morgan;
Effects of Aqueous Chemistry on the Binding of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Dissolved Humic Materials;
Environ. Sci. Technol., **1993**, *27*, 961 – 969.

SCHMITT-KOPPLIN 1998

Ph. Schmitt-Kopplin, N. Hertkorn, A. W. Garrison, D. Freitag, A. Kettrup;
Influence of Borate Buffers on the Electrophoretic Behavior of Humic Substances in Capillary Zone Electrophoreses;
Anal. Chem., **1998**, *70*, 3798 – 3808.

SCHNITZER 1972

M. Schnitzer, S. U. Khan;
Humic Substances in the Environment;
Marcel Dekker; New York, 1972.

SCHULTEN 1993

H.-R. Schulten, M. Schnitzer;
A state of the art structural concept for humic substances;
Naturwissenschaften, **1993**, *80*, 29 – 30.

SCHURE 2000

M. Schure, M. E. Schimpf, P. D. Schettler;
Retention - Normal Mode;
In: M. Schimpf, K. Caldwell, J.C. Giddings (Eds.), Field-Flow Fractionation Handbook;
Wiley-Interscience, New York, 2000.

SCHÜTH 2002

C. Schüth;
Persönliche Mitteilung an Prof. Dr. F.-D. Kopinke;
Universität Tübingen, 2002.

SCHWARZENBACH 1993

R. P. Schwarzenbach, P. M. Gschwend, D. M. Imboden;
Environmental organic chemistry;
John Wiley & Sons, New York, 1993.

SETH 1999

R. Seth, D. Mackay, J. Muncke;
Estimating the Organic Carbon Partition Coefficient and its Variability for Hydrophobic Chemicals;
Environ. Sci. Technol., **1999**, *33*, 2390 – 2394.

SIEVERS 1999

Total Organic Carbon Analyzer Modell 820: Operation and Maintenance Manual;
Ionics-Sievers Instruments, 1999.

SIMPSON 2002

A. J. Simpson, W. L. Kingery, M. H. B. Hayes, M. Spraul, E. Humpfer, P. Dvortsak, R. Kerssebaum, M. Godejohann, M. Hofmann;
Molecular structures and association of humic substances in the terrestrial environment;
Naturwissenschaften, **2002**, *89*, 84 – 88.

SLATER 1999

G. F. Slater, H. S. Dempster, B. Sherwood-Lollar, J. Ahad;
Headspace Analysis: A new application for isotopic characterization of dissolved organic contaminants;
Environ. Sci. Technol., **1999**, *33*, 190–194.

SLATER 2000

G. F. Slater, J. M. E. Ahad, B. Sherwood-Lollar, R. Allen-King, B. Sleep;
Carbon isotope effects resulting from equilibrium sorption of dissolved VOCs;
Anal. Chem., **2000**, *72*, S 5669 – 5672.

SPECHT 2000

C. H. Specht, F. H. Frimmel;
Specific Interactions of Organic Substances in Size-Exclusion Chromatography;
Environ. Sci. Technol., **2000**, *34*, 2361 – 2366.

STEWART 1981

A. J. Stewart, R. G. Wetzel;
Asymmetrical Relationships between Absorbance, Fluorescence and Dissolved Organic Carbon;
Limnol. Oceanogr., **1981**, *26*, 590 – 597.

SUMMERS 1987

R. S. Summers, P. K. Cornel, P. V. Roberts;
Molecular size distribution and spectroscopic characterization of humic substances;
Sci. Tot. Environ., **1987**, *62*, 27 – 37.

SWIFT 1989

R. Swift;
Molecular weight, size, shape and charge characteristics of humic substances: Some basic considerations;
In: M. H. B. Hayes, P. MacCarthy, R. L. Malcolm, R. S. Swift (Eds.), *Humic Substances II. In Search of Structure*;
John Wiley & Sons, Chichester, 1989.

SWIFT 1999

R. Swift;
Macromolecular properties of soil humic substances: Fact, fiction, and opinion;
Soil Science, **1999**, *164*, 790 – 802.

TADANIER 2000

C. J. Tadanier, D. F. Berry, W. R. Knocke;
Dissolved Organic Matter Apparent Molecular Weight Distribution and Number-Average Apparent Molecular Weight by Batch Ultrafiltration;
Environ. Sci. Technol., **2000**, *34*, 2348 – 2353.

TANAKA 1997

S. Tanaka, K. Oba, M. Fukushima, K. Nakayasu, K. Hasebe;
Water Solubility Enhancement of Pyrene in the Presence of Humic Substances;
Anal. Chim. Acta, **1997**, *337*, 351 – 357.

TANK 1995

C. Tank;

Trennung und Charakterisierung komplexer Polymere und Kolloide durch Feld-Fluß Fraktionierung;
Dissertation, Technische Universität Berlin, 1995.

NGO 2000

M.-Th. Ngo;

Charakterisierung aquatischer Kolloide mittels der Größenausschlußchromatografie (GPC) und der Fluß-
Feldflußfraktionierung (FFFF);
Dissertation, Universität Saarbrücken, 2000.

Thielking 1995

H. Thielking, D. Roessner, W.-M. Kulicke;

On-Line Coupling of Flow Field-Flow Fractionation and Multiangle Laser Light Scattering for the
Characterization of Polystyrene Particles;
Anal. Chem., **1995**, *67*, 3229 – 3233.

TRAINA 1989

S. J. Traina, D. A. Spontak, T. J. Logan;

Effects of cations on complexation of naphthalene by water-soluble organic carbon;
J. Environ. Qual., **1989**, *18*, 221 – 227.

ULLMANN 2000

L. Ullmann;

Development of flow field flow fractionation with UV-/DOC-detection for the characterization of dissolved
organic carbon;
Diplomarbeit, Universität Karlsruhe, 2000.

UNGER 1989

K. K. Unger (Hrsg.);

Handbuch der HPLC; Teil 1 – Leitfaden für Anfänger und Praktiker;
GIT Verlag, Darmstadt, 1989.

VARGA 2000

B. Varga, G. Kiss, I. Galambos, A. Gelencsér, J. Hlavay, Z. Krivácsy;

Secondary Structure of Humic Acids. Can Micelle-like Conformation Be Proved by Aqueous Size Exclusion
Chromatography?;
Environ. Sci. Technol., **2000**, *34*, 3303 – 3306.

VON WANDRUSZKA 1999

R. von Wandruszka, M. Schimpf, M. Hill, R. Engebretson;

Characterization of Humic Acid Size Fractions by SEC and MALLS;
Org. Geochem., **1999**, *30*, 229 – 235.

WAGONER 1997

D. B. Wagoner, R. F. Christman, G. Cauchon, R. Paulson;

Molar Mass and Size of Suwanee River Natural Organic Matter using Multi-angle Laser Light Scattering;
Environ. Sci. Technol., **1997**, *31*, 937 – 941.

WAGONER 1998

D. B. Wagoner, R. F. Christman;

Molar Masses and Radii of Humic Substances measured by Light Scattering;
Acta hydrochim. hydrobiol., **1998**, *26*, 191 – 195.

WAGONER 1999

D. B. Wagoner, R. F. Christman;

Molar Mass and Size of Norwegian Aquatic NOM by Light Scattering;
Environment International, **1999**, *25*, 275 – 284.

WAHLUND 1987

K.-G. Wahlund, J. C. Giddings;
Properties of an Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation Channel having one Permeable Wall;
Anal. Chem., **1987**, *59*, 1332 – 1339.

WERSHAW 1969

R. L. Wershaw, P. J. Burcar, M. C. Goldberg;
Interaction of pesticides with natural organic material;
Environ. Sci. Technol., **1969**, *3*, 271 – 273.

WERSHAW 1986

R. L. Wershaw;
A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic chemicals in soil-water or sediment-water systems;
J. Contam. Hydrol., **1986**, *1*, 29 – 45.

WERSHAW 1989

R. L. Wershaw;
Application of a Membran Model to the Sorptive Interactions of Humic Substances;
Environmental Health Perspectives, **1989**, *83*, 191 – 203.

WERSHAW 1999

R. L. Wershaw;
Molecular Aggregation of Humic Substances;
Soil Science, **1999**, *164*, 803 – 813.

WILLIAMS 1986

P. S. Williams, S. B. Giddings, J. C. Giddings;
Calculation of flow properties and end effects in field-flow fractionation channels by a conformal mapping procedure;
Anal. Chem., **1986**, *58*, 2397 – 2403.

WILLIAMS 2001

P. S. Williams, M. C. Giddings, J. C. Giddings;
A Data Analysis Algorithm for Programmed Field-Flow Fractionation;
Anal. Chem., **2001**, *73*, 4202 – 4211.

WITTGREN 1997

B. Wittgren, K.-G. Wahlund;
Fast molecular mass and size characterization of polysaccharides using asymmetrical flow field-flow fractionation-multiangle light scattering;
Journal of Chromatography, A, **1997**, *760*, 205 – 218.

WU 1995

C.-S. Wu (Ed.);
Handbook of Size Exclusion Chromatography;
Chromatographic Science Series, Vol. 69;
Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, 1995.

WYATT 1998

Kopplung von SEC und MALLS, Seminarunterlagen, Wyatt Deutschland, 1998.

XING 1994A

B. Xing, W. B. McGill, M. J. Dudas;
Cross-Correlation of Polarity Curves to Predict Partition Coefficients of Nonionic Organic Contaminants;
Environ. Sci. Technol., **1994**, *28*, 1929 – 1933.

YANG 1999

Y.-H. Yang, L. K. Koopal;
Immobilisation of Humic Acids and Binding of Nitrophenol to immobilised humics;
Colloids and Surfaces, A: Physicochem. Engineering Aspects, **1999**, *151*, 201 – 212.

YATES III 1997

L. M. Yates III, R. R. Engebretson, T. J. Haakenson, R. v. Wandruszka;
Immobilization of Aqueous Pyrene by Dissolved Humic Acid;
Anal. Chim. Acta, **1997**, *356*, 295 – 300.

ZHOU 2000

Q. Zhou, S. E. Cabaniss, O. A. Maurice;
Considerations in the Use of High-Pressure Size Exclusion Chromatography (HPSEC) for Determining
Molecular Weights of Aquatic Humic Substances;
Wat. Res., **2000**, *14*, 3505 – 3514.

ZIMMERMANN 1999A

U. Zimmermann;
Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Struktur-/Wechselwirkungseigenschaften von Huminstoffen und
polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen;
Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg, 1999.

ZIMMERMANN 1999B

U. Zimmermann, T. Skrivanek, H.-G. Löhmannsröben;
Fluorescence quenching of polycyclic aromatic compounds by humic substances, Part 1: Methodology for the
determination of sorption coefficients;
J. Environ. Monit., **1999**, *1*, 525 – 532.

7 Anhang

Teil A: Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1:	Schematische Darstellung der makromolekularen HA-Struktur nach Schulten und Schnitzer	5
Abb. 2-2:	Schematische Darstellung der Definition des Trägheitsradius einer statistisch geknäuelten Polymerkette	12
Abb. 2-3:	Geometrisches Porenmodell einer konischen Porenöffnung.	15
Abb. 2-4:	Thermodynamisches Modell der SEC-Trennung.....	17
Abb. 2-5:	Darstellung einer typischen SEC-Kalibriergeraden	18
Abb. 2-6:	Schematischer Verlauf der SEC-Kalibrierkurven von verschieden geformten Molekülen.....	19
Abb. 2-7:	Darstellung der unterschiedlichen Größentrennbereiche verschiedener Chromatographie- und Fraktionierungstechniken.....	23
Abb. 2-8:	Schematische Darstellung des AF ⁴ -Trennkanals von ConSensus	24
Abb. 2-9:	Darstellung der beiden Schritte einer AF ⁴ -Trennung.....	25
Abb. 2-10:	Schematische Darstellung des exponentiellen Konzentrations- und des parabolischen Flußprofils im AF ⁴ -Trennkanal.....	27
Abb. 2-11:	Darstellung der exponentiellen Konzentrationsverläufe zweier Analytfraktionen im AF ⁴ -Kanal....	29
Abb. 2-12:	Darstellung von Fluoreszenzlöschmechanismen	37
Abb. 2-13:	Schematische Darstellung des Aufbaus eines FQT-Experiments	38
Abb. 2-14:	Schematische Darstellung der geometrischen Parameter, die für die Ableitung der Korrektur des IFE nach PARKER et al. und LAKOWICZ et al. verwendet werden.....	38
Abb. 2-15:	Schematische Darstellung der experimentellen Anordnung für Sorptionsuntersuchungen mittels SPME-Fasern	41
Abb. 2-16:	Schematische Darstellung des biologischen in-situ Abbaus von organischen Schadstoffen im Aquifer.....	43
Abb. 3-1:	Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus der kombinierten SEC/AF ⁴ -Anlage.....	50
Abb. 3-2:	Schematische Darstellung der Abmessungen des ConSensus-AF ⁴ -Kanals.....	52
Abb. 3-3:	Schematische Darstellung des verwendeten AF ⁴ -Gradientenprogramms.....	53
Abb. 3-4:	Schematischer Aufbau des verwendeten DOC-Detektors	56
Abb. 3-5:	Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus der kombinierten SEC/AF ⁴ -Apparatur mit gekoppelter Online-FQT-Methode	59
Abb. 3-6:	Darstellung der volumenreduzierten Quarzglasküvette für FQT-Messungen.....	61
Abb. 4-1:	Verlauf der Freisetzung von Kohlenstoff als Funktion der Temperatur des Verbrennungsofens bei der Bestimmung des Kohlenstoffgehalts einer luftfeuchten Aldrich-HA-Natriumsalz-Probe....	70
Abb. 4-2:	Verlauf der Freisetzung von Wasser als Funktion der Temperatur des Verbrennungsofens bei der Bestimmung des Kohlenstoffgehalts einer luftfeuchten Aldrich-HA-Natriumsalz-Probe.....	70
Abb. 4-3:	Einzelchromatogramme, die zur Kalibrierung der SEC-Säulen mit PSS-Standards verschiedener Molmasse und Aceton verwendet wurden	71

Abb. 4-4:	Kalibrierung der verwendeten SEC-Säulen mit PSS-Standards und Aceton.....	73
Abb. 4-5:	Resultierende Molmassenverteilung von Roth-HA und Aldrich-HA bei Verwendung der SEC-Kalibriergleichung.....	74
Abb. 4-6:	Einfluß der injizierten Masse des PSS-Standards mit $M_p = 6710$ Da auf die Elutionszeit des Peakmaximums bei der AF^4 -Analyse.....	76
Abb. 4-7:	Abhängigkeit der Signallage von der aufgegebenen HA-Masse (Roth-HA) bei der AF^4 -Analyse ..	77
Abb. 4-8:	Fraktogramm der unbehandelten Aldrich-HA bei AF^4 -Trennung und Detektion mittels DAD zur Aufnahme von UV-Spektren.....	78
Abb. 4-9:	Fraktogramm der unbehandelten Aldrich-HA bei AF^4 -Trennung und Fluoreszenzdetektion zur Aufnahme von Emmissions-Spektren.....	78
Abb. 4-10:	Einzelfraktogramme der zur Kalibrierung des AF^4 -Systems verwendeten PSS -Standards.....	80
Abb. 4-11:	Kalibrierfunktion für die AF^4	81
Abb. 4-12:	Fraktogramme der Roth- und Aldrich-HA.....	82
Abb. 4-13:	Resultierende Molmassenverteilung von Roth-HA und Aldrich-HA bei Verwendung der AF^4 -Kalibriergleichung.....	82
Abb. 4-14:	Chromatogramme der SEC-Analysen einer Aldrich-HA-Probe bei pH 11,8 und nach Zusatz von Essigsäure.....	87
Abb. 4-15:	Chromatogramme der SEC-Analysen der Aldrich-HA-Probe bei pH 2,0 und nach Zusatz von 5 M KOH-Lösung.....	88
Abb. 4-16:	Fraktogramme der AF^4 -Analyse einer Aldrich-HA-Probe bei pH 11,8 und nach Zusatz von Essigsäure.....	90
Abb. 4-17:	Fraktogramme der AF^4 -Analyse einer Aldrich-HA-Probe bei pH 2,0 und nach Zusatz von 5 M KOH-Lösung.....	91
Abb. 4-18:	Peakformen und -flächen bei Batch- und Fließinjektionen in den DOC-Detektor.....	94
Abb. 4-19:	Bestimmung der Nachweisgrenze des DOC-Detektors mittels verschieden konzentrierter KHP-Lösungen bei Batchinjektion.....	96
Abb. 4-20:	Analyse von KHP-, tert-BuOH- und Aldrich-HA-Lösungen im Batchbetrieb des DOC-Detektors.	99
Abb. 4-21:	Analyse von KHP-, tert-BuOH- und Aldrich-HA-Lösungen im Flußbetrieb des DOC-Detektors...	99
Abb. 4-22:	Einfluß der Ofentemperatur auf die Peakfläche und -höhe bei der Fließinjektion.....	100
Abb. 4-23:	Einfluß der Flußrate auf die Peakflächen für KHP bzw. Aldrich-HA.....	102
Abb. 4-24:	Vergleich der UV- und der DOC-Signale bei der Online-Kopplung.....	105
Abb. 4-25:	Graphische Darstellung der bearbeiteten DOC-Signale.....	106
Abb. 4-26:	Graphische Darstellung der (relativen) spezifischen UV-Absorption (SUVA).....	107
Abb. 4-27:	UV- und DOC-Signalintensitäten einer Probe KHP bei Elution über die SEC-Säulen.....	108
Abb. 4-28:	Aldrich-HA nach SEC-Trennung und Detektion mittels UV- und DOC-Detektor.....	110
Abb. 4-29:	Rohdaten des SEC/FQT-Versuches für Pyren.....	113
Abb. 4-30:	$\log K_{DOC}$ -Wert für das System Aldrich-HA/Pyren in 0,1 M $NaNO_3$ als Funktion des Retentionsvolumens einer SEC/FQT-Analyse.....	115
Abb. 4-31:	Rohdaten des AF^4 /FQT-Versuchs für Pyren.....	116
Abb. 4-32:	$\log K_{DOC}$ -Wert für das System Aldrich-HA/Pyren in 0,1 M $NaNO_3$ als Funktion des Retentionsvolumens einer AF^4 /FQT-Analyse.....	117

Abb. 4-33: Detektorspuren des Online-FQT-Versuchs mit Naphthalin und Aldrich-HA nach Größentrennung mittels AF ⁴ und anschließender Online-FQT-Analyse.	121
Abb. 4-34: Auswertung des Online-FQT-Experiments von Naphthalin und Aldrich-HA.....	122
Abb. 4-35: Stern-Volmer-Darstellung für das System Pyren/Aldrich-HA in 0,1 M NaNO ₃ -Lösung	124
Abb. 4-36: SEC-Chromatogramme einer Aldrich-HA-Probe, sowie UV-Spuren der einzelnen Proben dreier Größfraktionen.....	129
Abb. 4-37: Verlauf der Naphthalin-Konzentration in 40 Fraktionen und deren Isotopenverhältnisse.....	137
Abb. 4-38: Verlauf der Naphthalin-Konzentration bei Elution über die HPLC-Säule und Auftragung der Isotopenverhältnisse von ¹² C und ¹³ C als δ ¹³ C-Werte der einzelnen Fraktionen	138
Abb. 4-39: Naphthalin-Peak aus Modellierung mit Gaußfunktion und Berechnen der Retentionszeiten der Peakmaxima für ¹² C und ¹³ C, sowie resultierende δ ¹³ C-Werte.....	142
Abb. 4-40: Schematische Darstellung der Reaktionen auf einer mit 3-Aminopropyl-dimethyl-ethoxysilan modifizierte SiO ₂ -Oberfläche.....	146
Abb. 4-41: Einzelchromatogrammen der Elution von KNO ₃ , Benzol, 2,4-Dimethylphenol (2,4-DMP) und o-Xylol über eine Trennsäule mit kovalent gebundener Huminsäure.....	147
Abb. 4-42: Schematische Darstellung des Peakverlaufs der Konzentration der ¹² C- bzw. ¹³ C-Isotopomeren entlang der Ausbreitungsrichtung x	153
Abb. 4-43: Schematische Darstellung der Parameter bei homogenem bzw. heterogenem Fluß in einem Aquifer	160
Abb. 4-44: Isotopenfraktionierung berechnet als Funktion der relativen Restkonzentration c_t / c_0 des Analyten mit einem Fraktionierungsfaktor $\alpha = 1,002$	161
Abb. 7-1: Chromatogramme der SEC-Analysen einer Roth-HA-Probe bei pH 11,8 und nach Zusatz von Essigsäure	196
Abb. 7-2: Chromatogramme der SEC-Analysen einer Roth-HA-Probe bei pH 2,0 und nach Zusatz von 0,5 M KOH-Lösung	197
Abb. 7-3: Chromatogramme der SEC-Analysen einer Roth-HA-Probe bei pH 11,8 und nach Zugabe von verschiedenen Reagenzien	198
Abb. 7-4: Temperaturprofil des Reaktors bei Verwendung der Edstahlhülse	199
Abb. 7-5: Temperaturprofil des Reaktors bei Verwendung der Silberhülse	199
Abb. 7-6: Aufheiz- und Abkühlverhalten des Reaktors in Abhängigkeit von der verwendeten Metallhülse	199

Teil B: Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ACN	Acetonitril
AF ⁴	Asymmetrische Fluß-Feldflußfraktionierung
Aldrich-HA	Huminsäure der Firma Aldrich
APCI	chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
AU	Absorptionseinheit (Absorbance Unit)
a.u.	willkürliche Einheit (arbitrary unit)
BTEX	Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylole
CMC	kritische Mizell-Bildungskonzentration (Critical Micellization Concentration)
CPMAS	Kreuzpolarisation mit Rotation um den magischen Winkel von 54,7° (Cross Polarization Magic Angle Spinning)
Da	Dalton (entspricht g·mol ⁻¹)
DAD	Diodenarray-Detektor
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DLS	Methode der dynamischen Lichtstreuung
DMP	Dimethylphenol
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff (Dissolved Organic Carbon)
DOM	gelöste organische Substanzen (Dissolved Organic Matter)
DOSY	diffusionsaufgelöste NMR-Spektroskopie (Diffusion Ordered Spectroscopy)
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (EthyleneDiamineTetraacetic Acid)
EPA	Umweltschutzbehörde (der USA) (Environmental Protection Agency)
ESI	Elektrosprayionisierung (ElectroSpray chemical Ionization)
FA	Fulvinsäure (Fulvic Acid)
FAs	Fulvinsäuren (Fulvic Acids)
F-F ³	Fluß-Feldflußfraktionierung
FID	Flammenionisationsdetektor
FLD	Fluoreszenzdetektor
FQT	Fluoreszenzlöschtechnik (Fluorescence Quench Technique)
GC	Gaschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
HA	Huminsäure (Humic Acid)
HAs	Huminsäuren (Humic Acids)
HOS	hydrophobe organische Substanzen
HPLC	Hochleistungs- bzw. Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (High Performance bzw. High Pressure Liquid Chromatography)
HPSEC	Hochdruck-Größenausschlußchromatographie (High Pressure Size Exclusion Chromatography)

HSS	Huminstoffe (Humic Substances)
IFE	Innerer Filter-Effekt
INC	Institut für nicht-klassische Chemie, An-Institut der Universität Leipzig
irMS	Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (isotope ratio Mass Spectrometry)
IS	Ionenstärke
kDa	Kilo-Dalton (entspricht $1000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
KHP	Kaliumhydrogenphthalat
L	Löschermolekül
LSER	lineare Solvatationsergie-Beziehung (Linear Solvation Energy Relationship)
MALDI	matrixunterstützte Laser-Desorptionsionisierung (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)
MALLS	Methode der Vielwinkellaserlichtstreuung (multi angle laser light scattering)
MS	Massenspektrometrie (Mass Spectrometry)
MW	Molekulargewicht (Molecular Weight)
NA	natürlicher Rückhalt und Abbau (eines Schadstoffes) (Natural Attenuation)
Naphthalin	Naphthalin
NDIR	Nicht-dispersive Infrarot-Spektrometrie
NMR	magnetische Kernresonanz(-Spektroskopie) (Nuclear Magnetic Resonance (spectroscopy))
NOE	Kern-Overhauser-Effekt (Nuclear Overhauser Effect)
NOM	natürliche organische Substanzen (Natural Organic Matter)
NWG	Nachweisgrenze
OC	organischer Kohlenstoff (Organic Carbon)
OM	organische Substanzen (Organic Matter)
PAA	Polyacrylsäure (PolyAcrylic Acid)
PAKs	polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCB	polychlorierte Biphenyle
PCE	Perchlorethen
PDB	PeeDee Belemniten (Kopffüßer-Fossil aus der Jura- und Kreidezeit)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PES	Polyethersulfon
pIFE	primärer innerer Filter-Effekt
PMT	Sekundärelektronenvervielfacher mit Detektor (Photo Multiplier Tube)
POM	partikuläre organische Substanzen (Particular Organic Matter)
ppm	parts-per-million (hier $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
PSS	Polystyrolsulfonat
Pyren	Pyren
Roth-HA	Huminsäure der Firma Roth
S:N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis (Signal-to-Noise ratio)
$^1\text{S}_0$	Singulett-Grundzustand
$^1\text{S}_1^*$	angeregter Singulett-Zustand
SEC	Größenausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatography)

SF ⁺	symmetrische Fluß-Feldflußfraktionierung
sIFE	sekundärer innerer Filter-Effekt
SL	Fluorophor-Löcher-Grundzustandskomplex
SLS	Methode der statischen Lichtstreuung
SOM	bodenstämmige organische Substanzen (Soil Organic Matter)
SPME	Festphasenmikroextraktion (Solid Phase Micro Extraction)
SUVA	spezifische UV-Absorption
TCB	Tetrachlorbiphenyl
TCE	Trichlorethen
TOC	gesamter organischer Kohlenstoff (Total Organic Carbon)
TOF-MS	Flugzeitmassenspektrometrie (Time-Of-Flight Mass Spectrometry)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)amino-methan
UF	Ultrafiltration
UV	Ultraviolett
VPO	Dampfdruckosmometrie (Vapor Pressure Osmometry)

Teil C: Verzeichnis der verwendeten Variablen

a	Faktor zur Korrektur unterschiedlicher Analytkonzentrationen bei SPME-Analysen
a_{em}	Extinktion bei der Emissionswellenlänge [cm^{-1}]
a_{ex}	Extinktion bei der Anregungswellenlänge [cm^{-1}]
A	Oberfläche der Anreicherungswand [cm^2]
A^{DOC}	Peakfläche des Analyten bei SPME-Analysen einer in Anwesenheit von DOC
A_{em}	gemessene Extinktion bei der Emissionswellenlänge [AU]
A_{ex}	gemessene Extinktion bei der Anregungswellenlänge [AU]
A^{St}	Peakfläche des Analyten bei SPME-Analyse einer Lösung in Abwesenheit von DOC
α	kinetischer Isotopenfraktionierungsfaktor einer chemischen oder mikrobiellen Umsetzung
α'	Isotopenfraktionierungsfaktor für die Sorption an organische Substanzen
b	Kanalbreite [cm]
$b_{0,5}$	Peakbreite bei halber Peakhöhe [min]
β	Phasenverhältnis, Quotient der Volumina der mobilen und stationären Phase
c	Konzentration [$mol \cdot l^{-1}$] oder [$g \cdot l^{-1}$] oder [$mol \cdot kg^{-1}$]
c_0	Startkonzentration einer Komponente [$mol \cdot l^{-1}$]
c_{DOC}	Konzentration an gelöstem organischen Kohlenstoff [$g \cdot l^{-1}$]
c_{frei}	Konzentration des frei gelösten Anteils des Sorptivs in Wasser [$mol \cdot l^{-1}$] oder [$g \cdot l^{-1}$]
$c_{frei}^{12C}, c_{frei}^{13C}$	frei gelöste Konzentration von ^{12}C bzw. ^{13}C [$mol \cdot mol^{-1}$] oder [$mol \cdot l^{-1}$] oder [Atom% C]
c_{ges}	eingesetzte Gesamtkonzentration des Analyten in Wassers [$mol \cdot l^{-1}$] oder [$g \cdot l^{-1}$]
$c_{ges}^{12C}, c_{ges}^{13C}$	Gesamtkonzentration von ^{12}C bzw. ^{13}C [$mol \cdot mol^{-1}$] oder [$mol \cdot l^{-1}$] oder [Atom% C]
c_{OC}	Konzentration des gelösten oder partikulären Kohlenstoffs in Wasser [$g \cdot l^{-1}$]
$c_{sorbirt}$	Konzentration des sorbierten Anteils des Sorptivs in Wassers [$mol \cdot l^{-1}$] oder [$g \cdot l^{-1}$]
$c_{sorbirt}^*$	Konzentration des sorbierten Anteils des Sorptivs im Sorbens [$mol \cdot kg^{-1}$] oder [$g \cdot kg^{-1}$]
c_t	verbleibende Konzentration einer Komponent nach der Reaktionszeit t [$mol \cdot l^{-1}$] oder [$g \cdot l^{-1}$]
$c_{t1}; c_{t2}$	Konzentration zur Zeit t im Teilstrom 1 bzw. 2 eines heterogenen Aquifers
c_x	Konzentration der Substanz x [$mol \cdot l^{-1}$] oder [$g \cdot l^{-1}$]
$c_{x,y}$	Konzentration des Substanz x in der Phase y [$mol \cdot l^{-1}$] oder [$g \cdot l^{-1}$]
$C_{gelöst}$	(Konzentration an) gelöstem Kohlenstoff
C_{ges}	Summe der stabilen Kohlenstoffisotope ^{12}C und ^{13}C
$C_{gesamt}, C_{gesamt, 0}$	(Gesamtkonzentration an) Kohlenstoff bzw. (Ausgangsgesamtkonzentration an Kohlenstoff) [$mol \cdot l^{-1}$] oder [$g \cdot l^{-1}$]
$C_{L_1}; C_{L_2}$	(Konzentration an) Kohlenstoff an der Meßstelle L_1 bzw. L_2
$d; d_1; d_2$	geometrische Parameter [cm]
d_{hyd}	hydrodynamischer Durchmesser [m]
D	Diffusionskoeffizient [$cm^2 \cdot s^{-1}$]
D_M	Dispersivität

$\delta^{13}\text{C}$	Kohlenstoff-Isotopenverhältnis einer Komponente in Delta-Notation [‰]
$\delta^{13}\text{C}_{\text{H}_2\text{O}}$	Kohlenstoff-Isotopenverhältnis einer Komponente in rein wäßriger Lösung in Delta-Notation [‰]
$\delta^{13}\text{C}_{\text{HS}}$	Kohlenstoff-Isotopenverhältnis des frei gelösten Anteils einer Komponente in huminsäurehaltiger Lösung in Delta-Notation [‰]
$\Delta t; \Delta t^{12}\text{C}; \Delta t^{13}\text{C}$	Wanderungszeit (zwischen zwei Meßstellen in einem Aquifer) einer Komponente, des ^{12}C - bzw. des ^{13}C -Isotomers [min]
ε	Porosität
f	Reibungskoeffizient
$f_{12}\text{C}, f_{13}\text{C}$	Normierungsfaktoren zur Anpassung der relativen Atomhäufigkeiten von ^{12}C bzw. ^{13}C
f_{OC}	Masseanteil des organischen Kohlenstoffs an der Masse eines Feststoffs
f_{kor}	Term zur Korrektur des inneren Filter-Effektes
f_e	Parameter zur zusammengefaßten Beschreibung des Einflusses von ε und $\rho_{\text{Feststoff}}$ [$\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]
F	Kraft
F_{gem}	gemessene Fluoreszenzintensität [a.u.]
F_{HA}	Intensität der Eigenfluoreszenz einer Huminsäurelösung [a.u.]
F_{kor}	um dem Term f_{kor} korrigierte Fluoreszenzintensität F_{Sorptiv} [a.u.]
F_{Sorptiv}	Fluoreszenzintensität des frei gelösten Sorptivs [a.u.]
H_i	Signalhöhe der Fraktion i
η	dynamische Viskosität [$\text{Pa}\cdot\text{s}$]
J_x	Nettofluß der Molekülgesamtheit in x -Richtung [$\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]
k	Boltzmann-Konstante ($k = 1,380658\cdot 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$)
k'	Retentionsfaktor, Kapazitätsfaktor oder -verhältnis
$k^{12}\text{C}, k^{13}\text{C}$	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante des ^{12}C - bzw. ^{13}C -Isotomers [s^{-1}]
k_q^F	Geschwindigkeitskonstante der Desaktivierung eines angeregten Fluorophors
K_c	Komplexbildungskonstante
K_d	Verteilungskoeffizient einer Komponente
$K_d^{12}\text{C}; K_d^{13}\text{C}$	Verteilungskoeffizient des ^{12}C - bzw. des ^{13}C -Isotomers [$\text{l}\cdot\text{kg}^{-1}$]
K_{DOC}	Verteilungskoeffizient eines Sorptivs zwischen der gelösten organischen Substanz und der Lösungsphase, bezogen auf den Gehalt an gelöstem organischen Kohlenstoff [$\text{l}\cdot\text{kg}^{-1}$]
K_{FH}	Verteilungskoeffizient einer Substanz im System SPME-Faser/Umgebung
K_{H}	Verteilungskoeffizient einer Substanz im System wäßrige Phase/Gasraum
K_{OC}	Verteilungskoeffizient eines Sorptivs zwischen der partikulären organischen Substanz und der Lösungsphase, bezogen auf den Gehalt an organischem Kohlenstoff [$\text{l}\cdot\text{kg}^{-1}$]
$K_{\text{OC}}^{12}\text{C}; K_{\text{OC}}^{13}\text{C}$	auf den organischen Kohlenstoffgehalt bezogener Sorptionskoeffizient des ^{12}C - bzw. des ^{13}C -Isotomers [$\text{l}\cdot\text{kg}^{-1}$]
K_{OW}	Verteilungskoeffizient einer Substanz im System n-Octanol/Wasser
l_x	mittlerer Abstand der Zone des Analyten x zur Anreicherungswand [μm]
L	Länge des Fließweges im Aquifer [m]

$L_i; L^{12C}; L^{13C}$	zurückgelegte Weglänge einer Komponente i , des ^{12}C - bzw. des ^{13}C -Isotopomers [m]
L_{10}^{12C}	Weglänge auf der Frontseite einer Fahne oder eines Peaks [m], bei der die Konzentration von ^{12}C 1/10 der maximalen Konzentration annimmt
λ_i	Retentionsparameter der Komponente i
λ	Wellenlänge [nm]
λ_{em}	Emissionswellenlänge [nm]
λ_{ex}	Anregungswellenlänge [nm]
m	Masse [g]
m_i	Masse der Fraktion i [g]
M	Molmasse [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$] oder [Da]
M_i	Molmasse der Fraktion i [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$] oder [Da]
M_n	zahlgewichtete Molmasse [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$] oder [Da]
M_p	Molmasse im Peakmaximum einer Molmassenverteilung [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$] oder [Da]
M_w	gewichtsgemittelte Molmasse [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$] oder [Da]
M_z	z-gemittelte Molmasse [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$] oder [Da]
n	Analytmenge [mol]
n_0	in den Volumenstrom des Eluenten injizierte Kohlenstoffmenge des Analyten [mol]
N	Zahl der theoretischen (Trenn-)Böden
N^*	Zahl der theoretischen (Trenn-)Böden pro Meter [m^{-1}]
N_i	Zahl der Moleküle der Fraktion i [mol]
r_G	Trägheitsradius [m]
R	Kohlenstoffisotopenverhältnis (der stabilen Kohlenstoffisotope)
R_0	Kohlenstoffisotopenverhältnis der Ausgangskomponente vor einem Fraktionierungsprozeß
R_{10}	Kohlenstoffisotopenverhältnis an der Stelle L_{10}^{12C}
R^F	Retentionsverhältnis
R_{HS}	Kohlenstoffisotopenverhältnis des frei gelösten Anteils einer Komponente in einer Lösung, die gelöste oder partikuläre Huminsäure enthält
R_{H_2O}	Kohlenstoffisotopenverhältnis einer Komponente in rein wäßriger Lösung
R_{St}	Kohlenstoffisotopenverhältnis des Referenzmaterials (Vienna Pee Dee Belemnit)
R_t	Kohlenstoffisotopenverhältnis der Ausgangskomponente nach der Reaktionszeit t
$R_{t1}; R_{t2}$	Isotopenverhältnis zur Zeit t im Teilstrom 1 bzw. 2 eines heterogenen Aquifers
R_x	Kohlenstoffisotopenverhältnis einer Komponente bei der in einem Aquifer zurückgelegten Wegstrecke x
$\mathcal{R}; {}^{12}\text{C}\mathcal{R}; {}^{13}\text{C}\mathcal{R}$	Retardationsfaktor einer Komponente, des ^{12}C - bzw. des ^{13}C -Isotopomers
$\rho_{\text{Feststoff}}$	Dichte eines Feststoffs [$\text{kg}\cdot\text{l}^{-1}$]
$s; s_1; s_2$	geometrische Parameter [cm]
σ	Varianz der Gauß-Verteilung [min] oder [m]
t	Zeitvariable [min]
t_d	Totzeit bzw. Retentionszeit eines konservativen Tracers [min]

$t_{\max}^{12\text{C}}; t_{\max}^{13\text{C}}$	Retentionszeit des Peakmaximums einer Komponente, des ^{12}C -Peaks bzw. des ^{13}C -Peaks [min]
t_n	Nettoretentionszeit [min]
$t_{n,\max}^{12\text{C}}; t_{n,\max}^{13\text{C}}$	Nettoretentionszeit des ^{12}C - bzw. ^{13}C -Peakmaximums [min]
t_r	(Brutto-)Retentionszeit [min]
T	Temperatur [K]
u	Grundwasserfließ- bzw. Abstandsgeschwindigkeit [$\text{m}\cdot\text{d}^{-1}$]
u_i	mittlere Wanderungsgeschwindigkeit der Komponente i [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]
U_t	Umsatz zur Zeit t
U_x	Querflußgeschwindigkeit in (transversaler) x -Richtung [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]
v_{zone}	Geschwindigkeit der Analytzone [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]
$v(x)$	Geschwindigkeit in x -Richtung [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]
$\langle v \rangle$	mittlere (makroskopische) Geschwindigkeit einer laminaren Strömung [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]
$\dot{v}; \dot{v}_1; \dot{v}_2$	Fluß in einem homogenen Aquifer bzw. Teilfluß 1 und 2 in einem heterogenen Aquifer
V_0	Zwischenkorn-, Ausschluß- oder Totvolumen [ml]
V_{iP}	inneres Porenvolumen [ml]
V_i	Retentions-/Elutionsvolumen der Komponente i [ml]
V_m	Volumen der mobilen Phase [ml]
V_r	Retentions-/Elutionsvolumen [ml]
V_s	Volumen der stationären Phase [ml]
V_i	(totales) Permeationsvolumen [ml]
\dot{V}	Flußrate des Eluenten [$\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$]
\dot{V}_{in}	(Pumpen-)flußrate des Eingangsflusses [$\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$]
\dot{V}_{out}	Kanalausgangs- bzw. Detektorflußrate [$\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$]
\dot{V}_x	Querflußrate [$\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$]
w	Kanaldicke [μm]
x	Entfernungsparameter [m] mit $x = 0$ als Position der Schadstoffquelle

Teil D: Molmassen und Dispersivitäten der verwendeten PSS-Standards

Tab. 7-1: Molmassen (M), Dispersivität (D_M) und Grad der Sulfonierung der Poly(styrol)-Ausgangspolymere der verwendeten Poly(styrolsulfonat)-Natriumsalz-Standards (PSS) laut Hersteller-Zertifikat (ermittelt durch SEC-Analyse).

Bezeichnung	M_p /Da	M_n /Da	M_w /Da	D_M	Grad der Sulfonierung
PSS 1120	1120	k.A.	1100	< 1,2	> 90%
PSS 4480	4480				
PSS 6710	6710	k.A.	6780	< 1,2	> 90%
PSS 13400	13400	k.A.	13200	< 1,2	> 90%
PSS 35700	35700				
PSS 82800	82800	k.A.	77400	< 1,1	> 90%
PSS 356000	356000	k.A.	350000	< 1,1	> 90%

Teil E: SEC-Vorversuche in Analogie zu den Experimenten von PICCOLO et al. zur Frage der Huminsäure-Struktur mit Roth-HA

siehe Abbildungen auf den folgenden Seiten

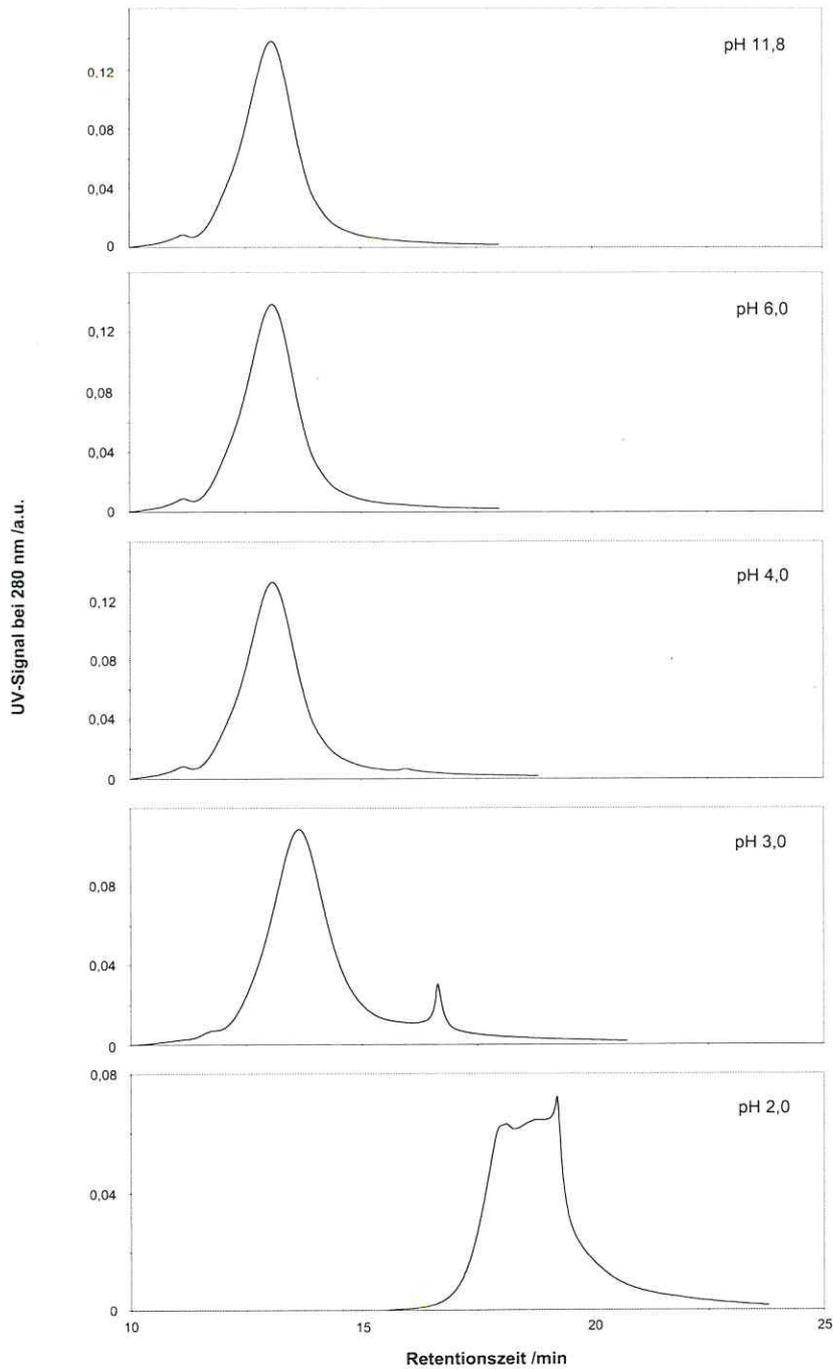


Abb. 7-1: Chromatogramme der SEC-Analysen einer Roth-Huminsäureprobe (ca. 1 g l^{-1}) bei pH 11,8 und nach Zusatz von Essigsäure (50 % bzw. 100 % für pH 2,0) zur Einstellung des entsprechenden pH-Wertes. Bedingungen: 0,02 M Borat-Puffer (pH 9,2), 1 ml min^{-1} , 20- μl -Probenschleife.

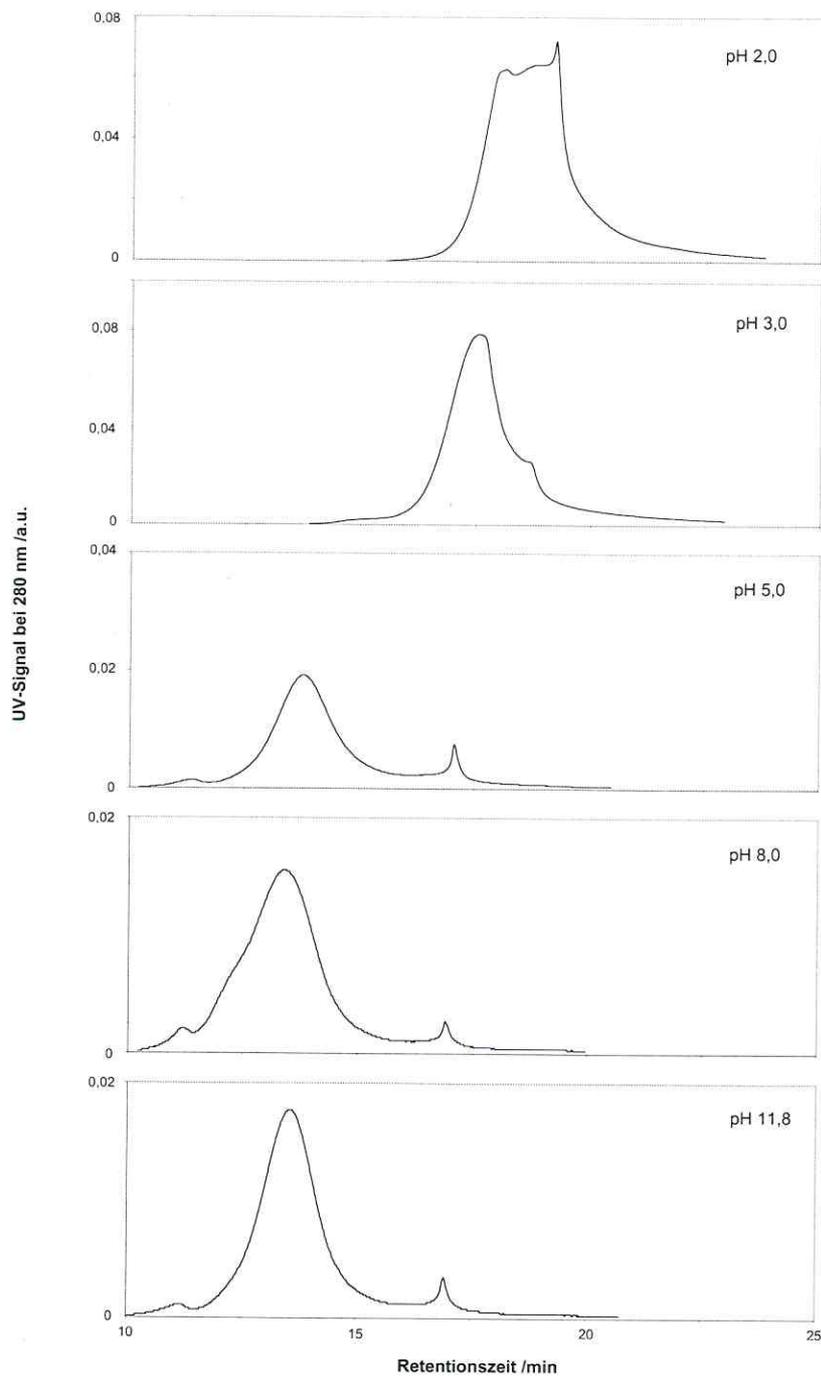


Abb. 7-2: Chromatogramme der SEC-Analysen einer Roth-Huminsäureprobe bei pH 2,0 und nach (Rück-)Titration mit 0,5 M KOH zur Einstellung des entsprechenden pH-Wertes. Bedingungen: 0,02 M Borat-Puffer (pH 9,2), 1 ml·min⁻¹, 20- μ l-Probenschleife.

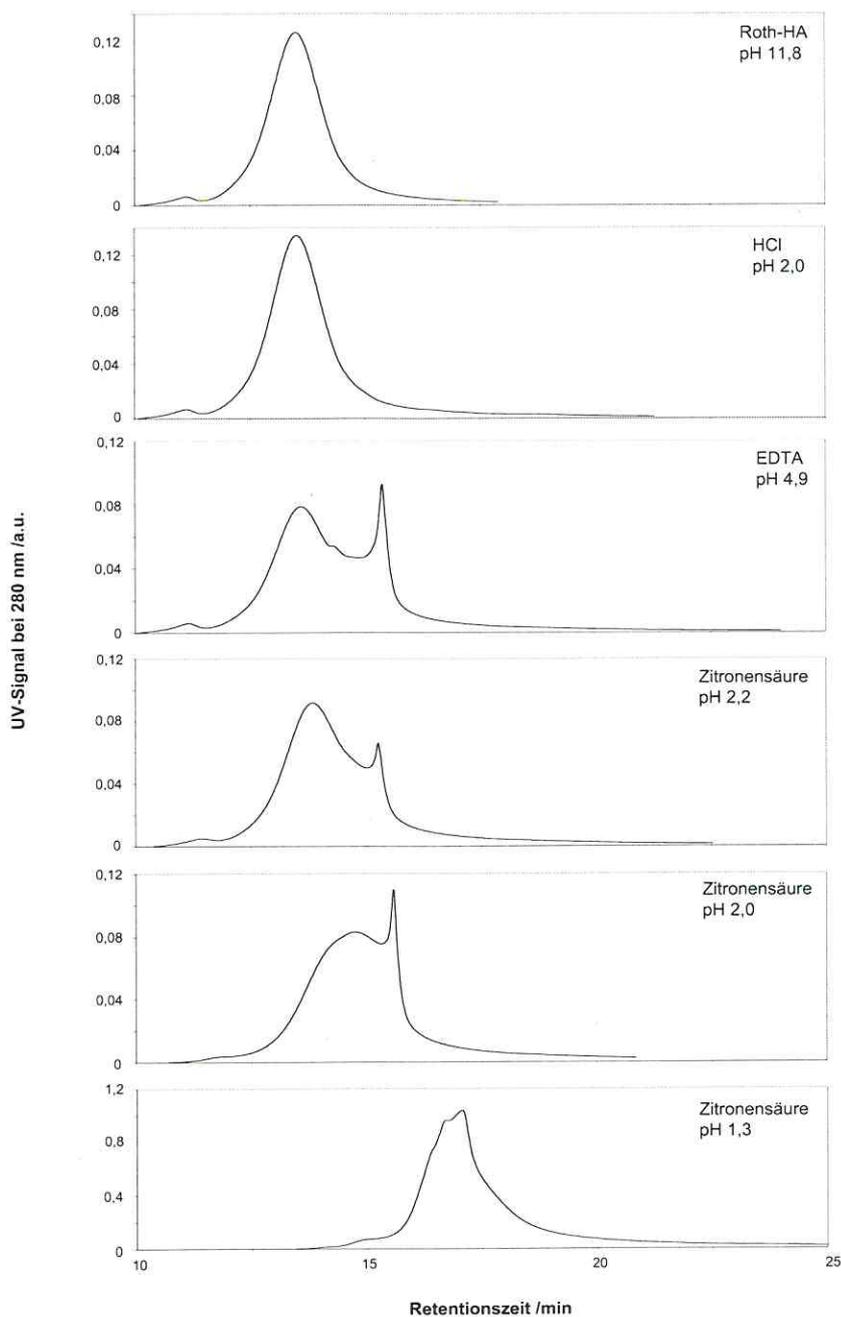


Abb. 7-3: Chromatogramme der SEC-Analysen einer Roth-Huminsäureprobe bei pH 11,8 und nach Zugabe von a) 1 M HCl auf pH 2,0; b) von ca. $75 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ EDTA als Komplexbildner auf pH 4,9; c) von unterschiedlichen Mengen Zitronensäure auf pH 2,2; 2,0 bzw. 1,3. Bedingungen: 0,02 M Borat-Puffer (pH 9,2), $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, 20- μl -Probenschleife.

Teil F: Einfluß des Eluenten und der verwendeten Metallhülse auf die Temperatur innerhalb des Reaktorrohres des DOC-Detektors

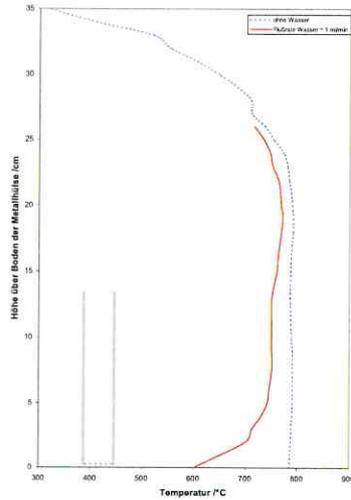


Abb. 7-4: Temperaturprofil des Reaktors bei Verwendung der Edelhülse (schematisch im linken Teil der Abbildung grau dargestellt) mit und ohne Wasserfluß von $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

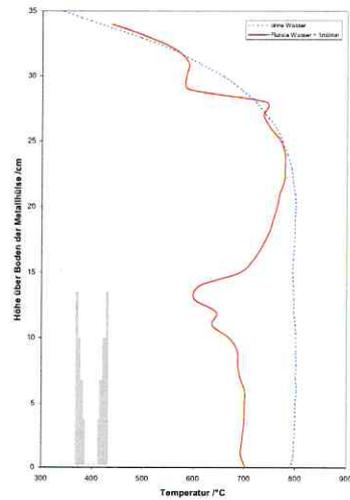


Abb. 7-5: Temperaturprofil des Reaktors bei Verwendung der Silberhülse (schematisch im linken Teil der Abbildung grau dargestellt) mit und ohne Wasserfluß von $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

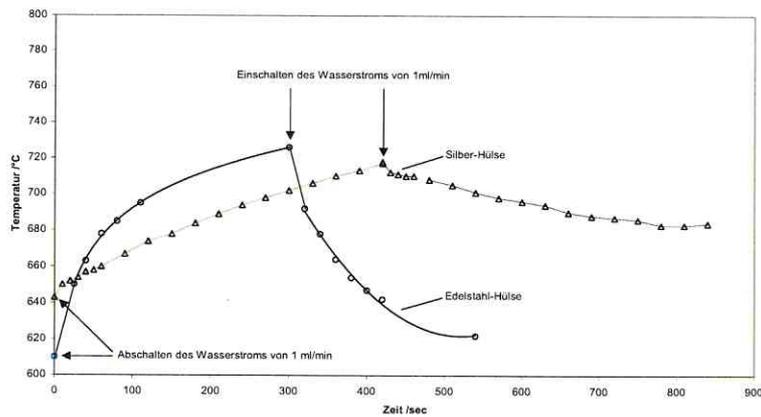


Abb. 7-6: Aufheiz- und Abkühlverhalten des Reaktors in Abhängigkeit von der verwendeten Metallhülse. Im stationären Zustand wurde der Wasserfluß abgeschaltet und der Temperaturanstieg am Boden der Metallhülse über die Zeit aufgezeichnet. Nach 300 bzw. 420 Sekunden wurde eine Flußrate von $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ eingestellt und der Temperaturabfall gemessen.

Teil G: Formeln zur Berechnung des Gesamtfehlers der Fluoreszenzquen-
 Untersuchungen von Pyren und Aldrich-HA bei Anwendung der Gleichung nach
 LAKOWICZ zur IFE-Korrektur

$$\text{Gl. 7-1} \quad \Delta F_{\text{korr}} = \left| 10^{\left(\frac{1}{2}A_{\text{ex}} + \frac{1}{2}A_{\text{em}}\right)} \cdot \Delta F_{\text{gem}} \right| + \left| -10^{\left(\frac{1}{2}A_{\text{ex}} + \frac{1}{2}A_{\text{em}}\right)} \cdot \Delta F_{\text{HA}} \right| + \left| \frac{1}{2} \cdot (F_{\text{gem}} - F_{\text{HA}}) \cdot 10^{\left(\frac{1}{2}A_{\text{ex}} + \frac{1}{2}A_{\text{em}}\right)} \cdot \ln(10) \right| \cdot \Delta A_{\text{ex}} \\ + \left| \frac{1}{2} \cdot (F_{\text{gem}} - F_{\text{HA}}) \cdot 10^{\left(\frac{1}{2}A_{\text{ex}} + \frac{1}{2}A_{\text{em}}\right)} \cdot \ln(10) \right| \cdot \Delta A_{\text{em}}$$

$$\text{Gl. 7-2} \quad \Delta K_{\text{DOC}} = \left| \frac{1}{(F_{\text{korr}} \cdot c_{\text{DOC}})} \cdot \Delta F_0 \right| + \left| \frac{-F_0}{(F_{\text{korr}}^2 \cdot c_{\text{DOC}})} \cdot \Delta F_{\text{korr}} \right| + \left| \left[\left(\frac{F_0}{F_{\text{korr}}} - 1 \right) \cdot \frac{1}{c_{\text{DOC}}^2} \right] \cdot \Delta c_{\text{DOC}} \right|$$

Zusammenfassung der wissenschaftlichen Ergebnisse
zur Dissertation

**Untersuchungen zur Sorption an Huminstoffen: Molekulargewicht und
Kohlenstoff-Isotopenfraktionierung**

Der Fakultät für Chemie und Mineralogie der Universität Leipzig
eingereicht von

Diplom-Chemiker **Michael Voskamp**

im Februar 2004

Angefertigt in der Sektion Sanierungsforschung des UFZ-Umweltforschungszentrum
Leipzig-Halle GmbH

Einleitung und Problemstellung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Sorption von nicht-ionischen, hydrophoben, organischen Substanzen (HOS) an Huminstoffe (Humic Substances, HS). Dabei werden im ersten Teil die Wechselwirkungen mit gelösten HS und im zweiten Teil der Arbeit die Wechselwirkungen von HOS mit immobilisierten HS betrachtet.

Die Wechselwirkungen mit gelösten HS führen zu einer (scheinbar) höheren Wasserlöslichkeit der sonst gering löslichen HOS und somit zu einer verstärkten Ausbreitung der Substanzen in der Umwelt. Die Aufklärung der Bindungsmechanismen von HOS an gelöste HS war in der Vergangenheit bereits Ziel von zahlreichen Untersuchungen. Der Einfluß der Molekülgröße der HS auf deren Sorptionspotential bezüglich HOS wurde dabei jedoch bislang nur unzureichend differenziert untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die eine Bestimmung des Sorptionskoeffizienten K_{DOC} von HOS online gekoppelt an eine Molekülgrößentrennmethode ermöglicht.

Die Sorption von HOS an in der Bodenmatrix immobilisierte HS bewirkt hingegen eine Retardierung der Ausbreitung dieser Substanzen. Ein eventuell gleichzeitig stattfindender mikrobieller Abbau der HOS führt aufgrund der bevorzugten Verstoffwechslung von ^{12}C -haltigen Substraten zu einer Änderung der Kohlenstoffisotopenzusammensetzung in Richtung zunehmender ^{13}C -Gehalte in der verbleibenden Fraktion. Dieser Effekt der mikrobiell bedingten Isotopenfraktionierung wird in jüngster Zeit als ein Werkzeug zur Einschätzung des Selbstreinigungsvermögens eines Grundwasserleiters (Aquifer) eingesetzt. Die Isotopenfraktionierung läßt sich aber nur dann quantitativ dem mikrobiellen Abbau zuschreiben, wenn andere physikalisch-chemische Vorgänge keine Änderung des Isotopenverhältnisses

bewirken. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden deshalb grundlegende Untersuchungen zum Einfluß der Sorption von HOS an eine huminstoffhaltige stationäre Phase auf die Isotopensignatur der HOS durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

1. Molekülgrößenanalyse von Huminsäureproben mittels der

Größenausschlußchromatographie und der Asymmetrischen Fluß-Feldflußfraktionierung

Zur Größenauftrennung der Huminsäure (Humic Acid, HA)-Proben wurden die Größenausschlußchromatographie (Size Exclusion Chromatography, SEC) und die Asymmetrische Fluß-Feldflußfraktionierung (AF⁴) eingesetzt. Um Molmassenverteilungen berechnen zu können, bedürfen beide Methoden einer externen Kalibrierung mit Standardsubstanzen mit einer dem Analyten vergleichbaren Molekülform. Dabei zeigte sich auch in dieser Arbeit, daß die Zusammensetzung des Eluenten die Ergebnisse der Größenbestimmung entscheidend beeinflussen kann. Unter den gewählten Bedingungen wurden aus der SEC-Analyse zahlengewichtete bzw. massengewichtete Molmassenmittelwerte (M_n bzw. M_w) von 2,3 kDa bzw. 11,4 kDa für Aldrich-HA und 1,9 kDa bzw. 10,3 kDa für Roth-HA erhalten. Aus der Anwendung der AF⁴-Technik wurden M_n - und M_w -Werte für Aldrich-HA von 7,4 kDa und 29,2 kDa sowie für Roth-HA von 7,0 kDa und 25,4 kDa erhalten. Die deutlich höheren M_w -Werte aus der AF⁴-Analyse lassen sich auf die Ausschlußgrenze der eingesetzten SEC-Säulenkombination zurückführen, da der M_w -Wert besonders durch die hochmolekularen Probenanteile beeinflusst wird. Im Gegensatz zur AF⁴-Analyse mit einem programmierten linear abnehmenden Kraftfeld können diese hochmolekularen Anteile bei der SEC-Analyse nicht mehr aufgetrennt werden und eluieren beim Ausschlußvolumen der verwendeten SEC-Säulen. Die ebenfalls höheren M_n -Werte bei Anwendung der AF⁴-Methode werden durch den Verlust von niedermolekularen Anteilen der HA-Proben infolge der bei dieser Technik zu verwendenden Ultrafiltrationsmembran (UF-Membran) und ihrer Ausschlußgrenze (Cut-off) verursacht. Insgesamt läßt sich sagen, daß beide experimentellen Methoden hinsichtlich der Bestimmung von Absolutwerten für die Molekulargewichtsverteilung von HS mit praktisch nicht vermeidbaren, systematischen Fehlern behaftet sind. Auf Grund der unterschiedlichen Trennprinzipien können sich beide Methoden jedoch vorteilhaft ergänzen.

2. Untersuchungen zum Aufbau von Huminsäureproben mittels der Größenausschlußchromatographie und der Asymmetrischen Fluß-Feldflußfraktionierung

Auch wenn eine exakte Bestimmung der mittleren Molmasse von HS mittels der SEC und der AF⁴ kaum realisierbar zu sein scheint, können relative Änderungen im allgemeinen mit beiden Methoden sehr gut untersucht werden. Aus der Änderung der Peakgestalt (Höhe, Elutionsvolumen und Modalität) von HS-Proben bei der SEC-Analyse wurden in der Literatur Rückschlüsse auf den Aufbau von HS gezogen und als ‚Piccolo-These‘ [1, 2, 3] bekannt. Die von Piccolo et al. beschriebene Änderung der Peakgestalt konnte auch in dieser Arbeit für Aldrich-HA und die verwendete SEC-Säulenkombination beobachtet werden. Durch die erstmalige parallele Anwendung der auf einem anderen Trennprinzip beruhenden AF⁴-Methode konnte jedoch gezeigt werden, daß es sich dabei um SEC-Artefakte handeln muß: Eine vergleichbar signifikante Änderung der Gestalt der Molekülgrößenverteilung unter Einwirkung von organischen Säuren, wie sie bei den SEC-Analysen erhalten worden ist, konnte bei Anwendung der AF⁴-Methode hier nicht beobachtet werden, obwohl die experimentellen Bedingungen bei Zutreffen der Piccolo-These eine solche erwarten ließen. Es wurde aus diesen Experimenten also kein Hinweis darauf gefunden, daß die höher- und hochmolekularen Huminstoffmoleküle - wie von Piccolo et al. postuliert - lediglich aus Agglomeraten von niedermolekularen Bausteinen bestehen.

3. Entwicklung eines Online-Detektors zur Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs

Zur Online-Bestimmung von (auf gelösten Kohlenstoff normierten) Sorptionskoeffizienten (K_{DOC}) nachfolgend zu einer Molekülgrößentrennung ist die simultane Bestimmung der Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs (Dissolved Organic Carbon, DOC) notwendig. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Nichtklassische Chemie (INC) an der Universität Leipzig wurde im Rahmen dieser Arbeit ein einfacher, robuster und preisgünstiger Online-DOC-Detektor entwickelt. Als Nachweisgrenzen wurden im Offline-Modus ein Wert von 34 ng Kohlenstoff und im Online-Betrieb von ca. 100 ng Kohlenstoff erhalten. Seine universelle Verwendbarkeit als weitgehend diskriminierungsfreier, kohlenstoffsensitiver Detektor konnte anhand der Analyse von drei unterschiedlich leicht oxidierbaren Kohlenstoffquellen wie Kaliumhydrogenphthalat, *tert.*-Butanol und Aldrich-HA demonstriert werden. Neben einer symmetrischen Peakverbreiterung - bedingt durch das notwendige große Volumen des Oxidationsreaktors - führte eine durch den DOC-Detektor verursachte

unsymmetrische Peakverbreiterung bei der Online-Kopplung dazu, daß ein direkter Einsatz des DOC-Detektors zur Ermittlung der Kohlenstoffkonzentration bei der Online-Kopplung von Molekülgrößentrennung und K_{DOC} -Bestimmung nicht möglich war.

Die nur geringen Unterschiede in den spezifischen UV-Absorptionen zwischen den verschiedenen Molekülgrößenfraktionen der verwendeten Aldrich-HA sowie weitere Literaturbefunde rechtfertigten jedoch die Verwendung eines UV-Detektors zur näherungsweisen Bestimmung der Kohlenstoffkonzentration.

4. Kombination von Größentrennmethode und der Fluoreszenzlöschtechnik zur Ermittlung von molekülgrößen aufgelösten Sorptionskoeffizienten von HOS an gelöster HA

Die in dieser Arbeit entwickelte Online-Kopplung von Größentrennmethode wie der SEC bzw. der AF⁴ mit der Fluoreszenzlöschtechnik (Fluorescence Quench Technique, FQT) stellt eine schnelle Methode zur Bestimmung von molekülgrößen aufgelösten Sorptionskoeffizienten dar. Für die online ermittelten Sorptionskoeffizienten von Pyren an Aldrich-HA wurde ein nahezu konstanter Wert von $\log K_{\text{DOC}} = 4,3 - 4,4$ über einen sehr breiten Bereich der Molmassenverteilung der HA erhalten. Dies gilt sowohl für die Größentrennung mittels der SEC als auch mittels der AF⁴. Lediglich an den äußeren Flanken der HA-Peaks wurden etwas höhere Werte für den Sorptionskoeffizienten gefunden.

Mit Hilfe von Offline-Untersuchungen der drei SEC-Größenfraktionen wurde der aus den Online-Experimenten beobachtete Trend bestätigt. Auch hier besitzt die mittlere Fraktion einen etwas niedrigeren Sorptionskoeffizienten ($\log K_{\text{DOC}} = 4,8 \pm 0,2$) als die hoch- und niedermolekulare Fraktion ($\log K_{\text{DOC}} = 5,2 \pm 0,2$ bzw. $5,0 \pm 0,2$). Die Effekte sind jedoch gering. Zusammenfassend läßt sich sowohl aus den Online- als auch aus den Offline-Experimenten schlußfolgern, daß die Molekülgröße innerhalb des auswertbaren Bereichs der angewandten Methoden von einigen 100 bis zu mehreren 100.000 Da keinen deutlichen Einfluß auf das Sorptionspotential der HA hat. Offensichtlich verfügen bereits relativ kleine HA-Moleküleinheiten über das gleiche Sorptionspotential bezüglich HOS, wie es der Gesamtheit der HA-Probe zugeschrieben wird. Es ist jedoch vernünftig anzunehmen, daß gelöste Sorbenzien eine Mindestgröße besitzen müssen, um mit HOS in der Größe eines PAK-Moleküls hinreichend beständige Wechselwirkungen einzugehen. Aus den Daten der vorliegenden Arbeit kann die Schlussfolgerung gezogen werden, daß die notwendige untere Grenze im Fall der Aldrich-HA unterhalb von 0,8 kDa liegt.

5. Ergebnisse der Säulenexperimente zur Isotopenfraktionierung

Anhand von Fraktionierungsexperimenten konnte sowohl für eine RP-C₁₈-HPLC-Säule als auch für eine Trennsäule, bei der HA kovalent an ein anorganisches Trägermaterial gebunden wurde, gezeigt werden, daß die Sorption von organischen Substanzen an diese stationären Phasen zu einer signifikanten Fraktionierung der Kohlenstoffisotope führt. Dabei bewirkt die hydrophobe Sorption einen Isotopenfraktionierungseffekt, der in seiner Richtung mit dem des biologischen Abbaus identisch ist: Durch beide Prozesse reichern sich die ¹³C-haltigen Isotopomere in der mobilen Phase an. In Analogie zum biologischen Fraktionierungsfaktor α konnten für Benzol, *o*-Xylol und 2,4-Dimethylphenol (2,4-DMP) auf der HA-Säule sorptionsbedingte Fraktionierungsfaktoren $\alpha' = K_{OC}^{12C} / K_{OC}^{13C}$ von 1,00011; 1,00092 bzw. 1,00035 berechnet werden.

6. Anwendung eines einfachen Aquifermodells auf die Ergebnisse der Säulenexperimente zur Isotopenfraktionierung

Durch Überführung der experimentellen Ergebnisse in ein Aquifermodell konnten die substanzspezifischen Isotopenfraktionierungseffekte unter Berücksichtigung der relevanten Aquifereigenschaften, wie Fahnenlänge und -zustand (stationär oder instationär), Gehalt an organischem Kohlenstoff und Trenneffizienz, abgeschätzt werden.

a) Fall der instationären Schadstofffahne

Bei instationären Schadstofffahnen wirkt die gesamte Fahnenlänge als Trennstrecke. Der aus der Sorption resultierende Isotopenfraktionierungseffekt ist an der vorauslaufenden Flanke der Fahne zu erwarten. Für den Fall, daß dieser sorptionsbedingte Fraktionierungseffekt fälschlicherweise ausschließlich einem mikrobiellen Abbau (mit einem entsprechenden Fraktionierungsfaktor) zugeschrieben wird, wurden für verschiedene Szenarien der scheinbare biologische Abbaugrad in der vorauslaufenden Flanke berechnet und für *o*-Xylol und 2,4-DMP signifikante, scheinbare Abbaugrade ermittelt. Somit konnte gezeigt werden, daß bei Vernachlässigung des durch Sorption an die stationäre Phase bedingten Isotopenfraktionierungseffektes das biologische Abbauvermögen des Aquifers überschätzt werden kann. Die Messung eines Isotopenmusters (und seiner Änderung im Vergleich zur Ausgangszusammensetzung) in der auslaufenden Flanke einer instationären Schadstofffahne allein reicht nach diesen Modellrechnungen als Nachweis für einen biologischen Schadstoffabbau nicht aus.

b) Fall der stationären Schadstoffahne

Für den in der Praxis häufig anzutreffenden Fall einer stationären Schadstoffahne ist die Länge der Fließstrecke der Schadstoffahne für den sorptionsbedingten Isotopenfraktionierungseffekt irrelevant. In diesem Fall wird nicht mehr der chromatographische Effekt der Isotopenfraktionierung wirksam, sondern der Effekt, daß für beide Isotopomeren aufgrund ihrer unterschiedlichen Retardation verschiedene Reaktions-/Abbauzeiten zwischen zwei Meßpunkten zur Verfügung stehen. Zusätzlich kann die unterschiedliche Verteilung zwischen sorbiertem und frei gelöstem Zustand zu einer Isotopenfraktionierung führen, wenn beide Zustände für einen biologischen Abbau unterschiedlich gut zugänglich sind. Die letztgenannten Effekte haben gegenüber einem biologischen Isotopenfraktionierungseffekt dann eine Relevanz, wenn die α - und α' -Werte in einer vergleichbaren Größenordnung liegen. Es wurde gezeigt, daß sich die sorptionsbedingten Isotopenfraktionierungseffekte unter bestimmten Bedingungen aufheben und dann nur der kinetische Isotopenfraktionierungseffekt des biologischen Abbaus einen Beitrag leistet.

7. Einfluß von Heterogenitäten im Aquifer auf die Anwendung der Isotopenverhältnisanalytik

Ein weiterer Aspekt, der sich erschwerend auf die Anwendung der Isotopenverhältnisanalyse zur Charakterisierung des mikrobiellen Abbaus in Aquiferen auswirkt, ist die Tatsache, daß in Aquiferen häufig Teilströme vorhanden sind. Indem der vereinfachte reaktionstechnische Ansatz eines Strömungsrohres zur Beschreibung eines homogenen Aquifersystems sowie das Modell einer Reaktorkaskade mit unterschiedlichen Reaktionsbedingungen für ein heterogenes Aquifersystem angewandt und beide Systeme verglichen wurden, konnte eine bemerkenswerte Aussage abgeleitet werden: Besteht der Grundwasserstrom eines makroskopisch homogenen Aquifers aus Teilströmen mit unterschiedlichen Abbaukapazitäten, so resultiert für den aus diesen Teilströmen zusammengesetzten Gesamtstrom gegenüber einem einheitlichen Strom bei gleichen mittleren Umsätzen (c_t/c_0) stets ein geringerer Isotopenfraktionierungseffekt. Dies führt dazu, daß das biologische Abbauvermögen eines solchen - realen - Aquifers auf Basis der Ergebnisse der Isotopenmessungen niemals überschätzt, sondern stets unterschätzt wird.

Zitierte Literatur:

- [1] Piccolo, A.; Nardi, S.; Concheri, G. *Eur. J. Soil Sci.*, **1996**, *47*, 319-328.
- [2] Piccolo, A.; Nardi, S.; Concheri, G. *Chemosphere*, **1996**, *33*, 595-602.
- [3] Piccolo, A.; Conte, P.; Cozzolino, A. *Eur. J. Soil Sci.*, **1999**, *50*, 687-694.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit konnte nicht ohne die Mithilfe einer Vielzahl von Menschen erstellt werden, denen ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen möchte.

Frau **Dr. Anett Georgi** danke ich für die intensive Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit, der kritischen Durchsicht des Manuskriptes und für die vielen, geduligen und fruchtbaren Diskussionen.

Herrn **Prof. Stefan Berger** (Universität Leipzig) möchte ich für seine Bereitschaft danken, zunächst die Betreuung dieser Arbeit an der Universität Leipzig zu übernehmen. An dieser Stelle möchte ich ihm für die Möglichkeit und Herrn **Dr. Mathias Findeisen** (Universität Leipzig) für die Hilfe bei der praktischen Durchführung der ^{19}F -NMR-Untersuchungen zur Sorption von fluormarkierten PAKs an gelösten Huminstoffen recht herzlich danken. Leider konnte aufgrund der Unempfindlichkeit der NMR-Methode dieser Ansatz nicht weiter verfolgt werden.

Frau **Dr. Katrin Mackenzie** danke ich für die Präparation des huminsäurebeschichteten HPLC-Säulenfüllmaterials. Frau **Dr. Andrea Vieth** und Herrn **Dr. Hans Hermann Richnow** sei an dieser Stelle noch einmal für die Durchführung der Kohlenstoffisotopenverhältnisbestimmung gedankt. Frau **Kerstin Lehmann** und Frau **Dipl.-Ing. Silke Woszidlow** danke ich für die Hilfe bei der Durchführung einiger Experimente und die überaus freundschaftliche Laboratmosphäre. Herrn **Dr. Wolfgang Geyer** (UFZ, Sektion Analytik) danke ich für die Möglichkeit das Fluoreszenz- und UV-Spektrometer zu benutzen. Die Elementaranalyse des Aldrich-HA-Natriumsalzes wurde freundlicherweise von **Frau Sonntag** (UFZ, Sektion Analytik) durchgeführt. Den Herren **Dr. Dirk Roessner** und **Dr. Christoph Johann** (beide Wyatt Deutschland) danke ich für die hilfreichen Diskussionen bei der Inbetriebnahme der AF^4 -Anlage von ConSensus. Ein großes Dankeschön geht auch an Herrn **Dr. Mahn-Thang Ngo**, ehemaliger Doktorand im INE des FZK, für unsere überaus fruchtbaren Diskussionen zu den Problemen der Trennung von Huminstoffen mittels der FFF-Technik.

Den Herren **Hans-Günter Militsch**, **Peter Borbonus** und **Axel Portius** danke ich für die schnelle Anfertigung der natürlich immer sofort benötigten Metall- und Glasgegenstände. Herrn **Dr. Robert Köhler** danke ich sehr herzlich für seine freundschaftliche Aufnahme des „Wessis“ in das Leipziger Leben. Frau **Nicole Seyring** und Frau **Dr. Andrea Vieth** erwiesen sich mit ihren offenen Ohren für alle Probleme als die besten „Raumteilerinnen“, die man sich wünschen kann und machten somit unser gemeinsames Büro häufig zu einem Ort der Entspannung. Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der **Arbeitsgruppe von Prof. Frank-Dieter Kopinke** und der Sektion Sanierungsforschung, die bisher unerwähnt geblieben sind, sei an dieser Stelle für die von ihnen geleistete Hilfe gedankt.

Meiner Freundin **Susan Abert** sei an dieser Stelle vielmals für ihre liebevolle Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit und gleichfalls für die notwendige Zerstreuung vom Labor- und Wissenschaftsalltag gedankt. Sie und viele Mitglieder des Chores der Evangelischen Studentengemeinde haben mit zu einem ausgleichenden Freizeitleben beigetragen.

Nicht zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern **Inge** und **Walter Voskamp** bedanken, die mich während des Studiums und meiner Doktorarbeit zu jeder Zeit unterstützt haben.

Alle oben genannten Menschen haben ihren ganz persönlichen Teil dazu beigetragen, daß die Leipziger Zeit für mich unvergeßlich bleiben wird.

Lebenslauf

Name Michael Voskamp
Geburtsdatum 02. Mai 1971
Geburtsort Nordenham
Familienstand ledig



Schulbildung

09.77 - 08.81 Grundschule Nord/Nordenham
09.81 - 08.83 Orientierungsstufe Mitte/Nordenham
09.83 - 05.90 Gymnasium Nordenham - Abitur

Wehrdienst

10.90 - 09.91 Grundwehrdienst

Studium

10.91 Beginn des Chemiestudiums an der Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg
04.95 Diplom-Vorprüfung
01.96 - 04.96 Forschungsaufenthalt an der School of Environmental and Applied Science (SEAS)/
University of Derby (England)
04.97 - 06.97 Praktikum bei der EPEA Internationale Umweltforschung GmbH/Hamburg
10.97 - 12.97 Praktikum bei der BAYER AG, Abteilung: Kunststoffe - Forschung & Entwicklung
(Styrenics)/Dormagen
04.98 Diplom-Hauptprüfung
05.98 - 03.99 Anfertigung der Diplomarbeit zum Thema: *Heterogen-katalysierte Epoxidierung von
cyclischen Olefinen* unter der Leitung von Prof. Dr. F. Rößner
04.99 - 02.04 Anfertigung der vorliegenden Dissertation

Postgradualstudium

10.00 - 07.02 Toxikologie und Umweltschutz/Universität Leipzig

Karlsruhe, den 25. Februar 2004

Michael Voskamp

