Strukturelle Charakterisierung von Fulvinsäure-Molekülen mittels LC-MS/MS: Hinweise zu Quellen, Bildung und Reaktivität

vorgelegt von
Diplom-Lebensmittelchemikerin
Anja These

An der Fakultät III – Prozesswissenschaften –
der Technischen Universität Berlin

zur Erlangung des Akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:
Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Rotard
Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Martin Jekel
Gutachter: Prof. Dr. Christian Steinberg
Gutachter: Priv. Dozent Dr.-Ing. Thorsten Reemtsma

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 19. April 2005

Berlin 2005
D 83

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Dezember 2000 bis Mai 2004 am Fachgebiet Wasserreinhaltung im Institut für Technischen Umweltschutz der TU-Berlin durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. M. Jekel für seine vorbehaltlose Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und speziell für die, trotz Termindruck, schnelle Begutachtung der Arbeit.

Priv. Doz. Dr. T. Reemtsma danke ich besonders für seine Motivationsgabe und das große Engagement, mit dem er diese Arbeit unterstützt hat. Diese Jahre bleiben sicherlich immer eine der schönsten Abschnitte meines Lebens.

Prof. C.E.W. Steinberg danke ich für die Begutachtung der Arbeit.

Ich bin froh, dass ich an dieser Stelle die Möglichkeit habe, meiner Familie Danke zu sagen. Sie haben nicht nur dafür gesorgt, dass ich frei und unbeschwert ins Leben starten konnte, sondern mir auch immer wieder Kraft in schwierigen Situationen gegeben.

Danke vor allem an Kirsten, dass sie während des Studiums immer für mich da war und es auch geschafft hat, mein Interesse für die Analytik zu wecken.

Meiner „kleinen Familie“ möchte ich einfach nur dafür danken, dass es sie gibt. Das Gleiche gilt auch für meine Freunde. Schön, dass das Leben uns zusammengeführt hat!

Natürlich danke ich auch dem gesamten Arbeitskreis der Wasserreinhaltung für die stetige Hilfe. Dass ich keine Namen nenne, liegt natürlich daran, dass ich Angst habe jemanden zu vergessen.
Eine Ausnahme möchte ich aber trotzdem machen. Ich danke speziell meinem studentischen Mitarbeiter Thomas Meyn für die zuverlässig und gut durchdacht Arbeit. Es war eine sehr angenehme Zusammenarbeit mit Dir!

Des Weiteren danke ich der Firma Waters (Micromass) für die Möglichkeit, das Q-TOF Ultima in ihrem Applikationslabor in Almere zu nutzen und speziell Dr. Marcus Winkler und Dr. Christoph Thomas für die gute Betreuung während der Messungen.

Zum Schluss danke ich Dr. W. Herdering (TU-Hamburg) und Dr. M. Wolf (GSF-Neuherberg) für die interessanten Proben, die diese Arbeit sehr bereichert haben.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Analyse und genaueren Charakterisierung einzelner Fulvinsäure-Moleküle mittels SEC-ESI-MS. Die Ergebnisse zeigen die hohe Systematik im Aufbau der Fulvinsäuren, geben Hinweisen auf deren Struktur, Quellen sowie Bildungsprozesse und erlauben erstmals Aussagen über Reaktivitäten einzelner Moleküle bei chemischen Prozessen, wie z. B. der Ozonung zu treffen.

Durch die Größenausschlusschromatographie (SEC) konnten Fulvinsäure-Isolate in drei Fraktionen getrennt werden. Die Auswertung der zugehörigen Spektren weist auf einen polymerartigen Aufbau der Fulvinsäuren hin. Dabei werden hochmolekulare Fulvinsäuren aus kleineren, identischen Untereinheiten gebildet.

Mittels hochauflösender Massenspektrometrie können im Massenbereich m/z 150-340 ca. 300 Summenformeln für niedermolekulare Fulvinsäuren bestimmt werden. Diese Summenformeln lassen sich in homologen Reihen anordnen. Durch eine Überlagerung dieser Homologien treten im Massen-Spektrum der Fulvinsäuren 3-5 isobare Moleküle auf, die eine hohe Regelmäßigkeit in ihrer elementaren Zusammensetzung aufweisen.

Der weitere Einsatz der Tandem-Massenspektrometrie erlaubt, strukturelle Aussagen über den Aufbau jedes einzelnen Fulvinsäure-Moleküls zu treffen. Alle untersuchten Ionen zeigen das gleiche Fragmentationsverhalten. Dieses Fragmentationsmuster zeigt, dass Fulvinsäure-Moleküle die gleichen funktionellen Gruppen besitzen. Die hohe Systematik im Aufbau der Fulvinsäuren erlaubt es, Strukturvorschläge für jede der detektierten Summenformel zu machen.

Die Untersuchung von Fulvinsäuren unterschiedlicher Herkunft mit LC-MS zeigte, dass zumindest der niedermolekulare Fulvinsäure-Anteil aus einem Satz identischer Moleküle besteht. Unterschiede zwischen den einzelnen Isolaten sind in der relativen Häufigkeit der in der Mischung enthaltenen Moleküle zu finden. Das Vorkommen identischer Molekülsätze in Isolaten unterschiedlicher Herkunft und verschiedener Kompartimente weist darauf hin, dass für die Bildung von Fulvinsäuren weder die gleichen Vorgängersubstanzen zur Verfügung stehen noch die gleichen Transformationsprozesse stattfinden müssen. Vielmehr können verschiedene Ausgangsstoffe auf unterschiedlichen Wegen zu Fulvinsäuren reagieren. Diese These ließ sich durch Befunde zu synthetisch hergestellten Fulvinsäuren unterstützen.

Auch chemische Reaktionen von Fulvosäure-Molekülen lassen sich mittels SEC-MS verfolgen. Dabei konnte während der Ozonung eine bevorzugte Entfernung von Fulvinsäure-Moleküle mit doppelbindungsreichem Kohlenstoffgrundgerüst beobachtet werden. Des Weiteren werden nach der Ozonung auch neu gebildete Molekül-Ionen detektiert. Diese Transformationsprodukte besitzen eine hohe Anzahl an Carbonsäuren und ihr Kohlenstoffgrundgerüst ist hoch gesättigt.

Die Kopplung der SEC mit der Massenspektrometrie gibt neue Einblicke in den Aufbau einzelner Fulvinsäure-Moleküle und erlaubt es, chemische Reaktionen auf molekularer Ebene nachzuvollziehen.

Abstract

Presented work deals with the analysis and detailed characterization of single fulvic acid molecules by SEC-ESI-MS. The results show high systematic in structure of fulvic acids and give hints concerning their sources and building processes. Further, for the first time it's possible to give an estimation of reactivity of single molecules during chemical processes like ozonation.

Size exclusion chromatography separates fulvic acid mixtures into three fractions. Interpretation of respective spectra suggests a polymeric structure of fulvic acids, whereas high molecular weight molecules consist of smaller but identical subunits.

Using high resolution mass spectrometry approx. 300 sum formulas could be determined in the mass range of m/z 150-340. These sum formulas could be arranged in homologues series. By superimposition of these homologies spectra of fulvic acids consist of 3-5 isobaric molecules per m/z value that further exhibit high regularities in their elemental composition.

The following use of tandem mass spectrometry offers structural aspects of single fulvic acid molecules. All investigated ions exhibit the same fragmentation pattern. This pattern brings out that all fulvic acid molecules posses the same functional groups. The high regularity in composition and fragmentation allows suggesting of structure proposals for every detected fulvic acid molecule.

Investigations of low molecular weight fulvic acids of different origin by LC-MS evidence an identical set of molecules in every sample. Differences can be found in relative frequentcies of single molecules within respective isolates. Identical sets of molecules in fulvic acid mixtures of different origin and different compartments suggest that neither the same precursor have to be available nor the same transformation processes have to take part. Rather, several precursors are able to react in different ways to fulvic acid molecules. This assumption could be supported by findings with respect to synthetic produced fulvic acids.

Coupling SEC with MS observation regarding chemical reactions of fulvic acids can be made. During ozonation a preferred removal could be noticed for fulvic acids molecules possessing a double bond rich "carbon-skeleton". Furthermore, after ozonation new build molecules can be detected. That transformation products consist of a high saturated "carbon skeleton" and have a high number of carboxylic acids.

Coupling size exclusion chromatography with mass spectrometry offers new insight into structure of single fulvic acid molecules and permits to follow chemical reaction on molecular level.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung

Zusammenfassung

Summary

Abkürzungsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

1.1 EINTEILUNG UND BILDUNGSWEGE 1
1.1.1 Indirekte und direkte Effekte von Huminstoffen 3
1.1.2 Verringerung der Bioverfügbarkeit von Xenobiotika und Schwermetallen 4
1.1.3 Bildung und Abbau von Huminstoffen 6
1.2 ÜBERBLICK ZUR ANALYTIK VOM HUMINSTOFFEN 6
1.2.1 Einsatz der Kernresonanzspektroskopie (NMR) 7
1.2.2 Analytik von Fulvinsäuren mittels Massenspektrometrie 8

2 ZIELSETZUNG 10

3 ANGEWANDTE TECHNIKEN 11

1.1. CHROMATOGRAPHIE 11
3.1.1 Size Exclusion Chromatography (SEC) 12
3.2 MASSENSPEKTROMETRIE 13
3.2.1 Elektrospray Ionisation (ESI) 14
3.2.2 Funktionsweise des Quadrupol-Massenspektrometers 15
3.2.3 Funktionsweise des Time-of-flight-Massenspektrometers 17

4 ANALYTIK VON FULVINSÄUREN 18

4.1 SEC-MS VON FULVINSÄUREN 18
4.2 BESTIMMUNG VON GRENZEN BEI DER MASSENSPEKTROMETRISCHEN DETEKTION VON FULVINSÄUREN 20
4.2.1 Online Kopplung der SEC mit der Kohlenstoffdetektion 21
4.2.1.1 Einfluss der Konus-Spannung auf das Chromatogramm 24
4.2.1.2 Einfluss der Konus-Spannung auf die Spektren 25
4.2.1.3 Konsequenzen für die Bestimmung mittlerer Molekulargewichte 27
4.3 GENAUERE CHARAKTERISIERUNG DES AUFBAUS VON FULVINSÄUREN 29
4.3.1 Bestimmung von Summenformeln niedermolekularer Fulvinsäuren 29
4.3.2 Bestimmung von Strukturmerkmalen mittels MS/MS 34
4.3.3 Systematik der Summenformeln 38
4.3.3.1 Isobare Ionen in Fulvosäure-Isolaten 38
4.3.3.2 Homologe Reihen im Fulvinsäure-Isolat 39
4.3.3.3 Darstellung von Fulvinsäuren im van Krevelen-Diagramm 42
4.3.4 Strukturvorschläge für Fulvinsäure-Moleküle 47
4.3.4.1 Strukturelle Aspekte einzelner Moleküle 47
4.3.4.2 Strukturelle Aspekte zum Polymeraufbau 49

5 CHARAKTERISIERUNG VON FULVINSÄUREN UNTERSCHIEDLICHER HERKUNFT 54

5.1 SEC-OCD MESSUNGEN 55
5.1.1 Absorptionsmessung 57
5.1.2 SEC-Q-TOF-MS Messungen 60
5.1.3 Dreidimensionales van Krevelen-Diagramm 64
5.1.4 Hinweise zur Transformation bzw. Genese von Fulvinsäuren 67
5.2 UNTERSUCHUNGEN VON SYNTHETISCHEN FULVINSÄUREN 72

6 OXIDATIONSVERFAHREN – OZONUNG 78

6.1 OZON 78
6.1.1 Mechanismen der Ozonung 79
6.1.2 Analyse der Summenparameter 79
6.1.3 Analytik ozonierter Fulvinsäuren mittels SEC-MS/MS 80
6.1.3.1 Detektion von Transformationsprodukten 86

7 ABSCHLUSSDISKUSSION 91

7.1 MÖGLICHE VORAUSSAGEN VON SUMMENFORMELN, STRUKTUREN UND REAKTIVITÄTEN NIEDERMOLEKULARER FULVINSÄUREN ANHAND DER MOLEKÜLMASSE 95
7.2 AUSBLICKE 99

A ANHANG 101

B MATERIAL UND METHODEN 103

B.1. MATERIALIEN 103
B.1.1. Lösungsmittel 103
B.2. REFERENZSUBSTANZEN 103
B.2.1. Synthetische Fulvinsäuren 103
B.3. INSTRUMENTELLE PARAMETER 104
B.3.1. Size Exclusion Chromatography (SEC) 104
B.3.1.1. Massenspektrometrie 104
B.3.1.2. Quadrupol-MS: 104
B.3.1.3. Bestimmung der mittleren Ionen-Intensitäten: 105
B.3.1.4. Q-TOF-MS: 105
B.3.2. LC-OCD 106
B.3.2.1. Kopplung der SEC-MS und SEC-OCD 106
B.3.2.2. SEC-OCD von Fulvinsäuren 107
B.3.3. UV/VIS Spektrometrie 108
B.4. OZONUNG 108

C LITERATURVERZEICHNIS 109

1 Einleitung

1.1 Einteilung und Bildungswege

Humus ist das lateinische Wort für Boden oder Erde. Schon im 18. Jh. wurde der Term „Huminstoffe“ benutzt und man beschrieb damit das dunkel gefärbte organische Material des Bodens.

Huminstoffe (HS) machen mit 60-80 % mengenmäßig den größten Anteil des gelösten organischen Kohlenstoffs in natürlichen Gewässern aus (Steinberg und Münster 1985; Thurman 1985). Grundsätzlich unterscheidet man zwischen Huminstoffen, die im Boden gebildet worden sind (paedogen) und Huminstoffen, die in Gewässern gebildet wurden (aquagen). Eine weitere Klassifizierung wird über die Herkunft der Huminstoffe vorgenommen. Aquatische Huminstoffe, die innerhalb des Systems gebildet werden, also ausschließlich aus dem Abbau von Phytoplankton stammen, sind autochthone Huminstoffe. Es ist aber auch eine Bildung aquatischer Huminstoffe durch den Eintrag pflanzlicher Reste oder terrestrischer, organischer Zersetzungsprodukte denkbar. In diesem Fall wird von allochthonen Huminstoffen gesprochen (Steinberg und Münster 1985). Während die verbale Einteilung recht genau vorgenommen werden kann, wird der Weg der Genese sehr vielfältig diskutiert. In diesem Zusammenhang gibt es zwei unterschiedliche Ansätze (Hatcher und Spiker 1988). In einem Fall werden HS auf aufbauendem Wege (Polymerisation) aus kleineren Molekülen wie Phenolen gebildet. Im zweiten Fall werden HS auf degradativem Wege (Hydrolyse, Oxidation) aus pflanzlichen Makromolekülen wie Lignin gebildet.
Die vier bekanntesten Bildungswege :

1. Nach der Theorie von Waksman (1938) gelten Huminstoffe als modifizierte Lignine. Danach wird Lignin von Mikroorganismen nur unvollständig abgebaut und der Rückstand wird ein Teil der Bodenhuminstoffe. Eine der wichtigsten Modifikationen sind dabei der Verlust von Methoxygruppen, die Bildung von o-Hydroxyphenolen und die Oxidation von aliphatischen Seitenketten bis zu Carboxylgruppen. Diese modifizierten Lignine gehen dann weitere Kondensationen ein und werden zu Huminstoffmakromolekülen. Dieser Bildungsweg soll vor allem in feuchten Mooren dominieren.
2. Bei dem zweiten Bildungsweg, dem aufbauenden Weg, spielt auch wieder Lignin eine bedeutende Rolle. Hier werden aber die durch Mikroorganismen freigesetzten Ligninabbauprodukte, wie phenolische Aldehyde und Säuren, unter enzymatischem Einfluss in Chinone umgewandelt. Diese polymerisieren besonders durch den Einfluss von Aminoverbindungen zu huminstoffähnlichen Makromolekülen. Der Bildungsweg wird besonders bei der Entstehung von autochthonen HS in Betracht gezogen („Polyphenoltheorie“).

3. Für die Bildung mariner Huminstoffe wird u. a. die „Melanoidinhypothese“ diskutiert. Hierbei kommt es, wie bei der Maillard-Reaktion, zu einer Reaktion zwischen dem Stickstoff einer Aminogruppe und der Aldehyd- oder Ketofunktion eines Zuckers. Daran schließen sich Umlagerungen, Cyclisierungen, Decarboxylierungen und Polymerisierungen an, die in der Bildung braun gefärbter Makromoleküle (Melanoidine) enden.
4. Eine etwas abweichende Theorie ist die „Hypothese der selektiven Erhaltung“ von Hatcher. Danach wird das Grundgerüst der Huminstoffe durch makromolekulare aliphatische Strukturen aufgebaut, die bereits in lebenden Algen und Bakterien enthalten sind und während der frühen Diagenese erhalten bleiben. Diese makromolekularen Strukturen reichern sich im Sediment an und bilden die unlöslichen Humine. Über den oxidativen Abbau der Humine entstehen Huminsäuren, welche durch den Einbau bakteriell erzeugter Polysaccharide zu Fulvinsäuren werden (Hatcher et al. 1983; Hatcher und Spiker 1988).

So vielfältig wie die möglichen Vorschläge zur Genese, so vielfältig sind auch die Strukturvorschläge, die für Huminstoffe gemacht werden. Abbildung 1 zeigt beispielhaft das Strukturmodell eines Huminstoffmoleküls. Abbildung 2 stellt ein Strukturmodell von Fulvinsäuren dar.

Die bei der Genese von Humin- und Fulvinsäuren entstehenden Verbindungen sind sehr vielfältig. Beide Stoffgruppen setzen sich jeweils aus mehreren tausend Einzelsubstanzen

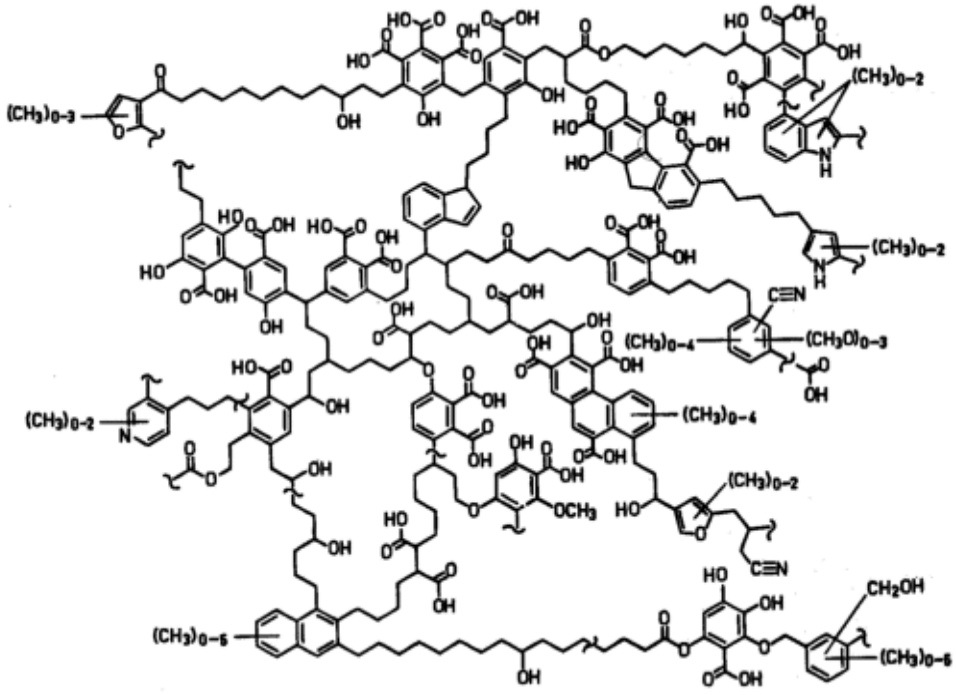

Abbildung 1: Modell einer Huminsäure nach Schulten & Schnitzer (1997)

zusammen. Die vorgeschlagenen Strukturen stehen dabei stellvertretend für beide Stoffgruppen und sollen nur als Modell dienen, denn bisher konnte noch kein einziges Molekül in seiner Strukturen aufgeklärt werden.

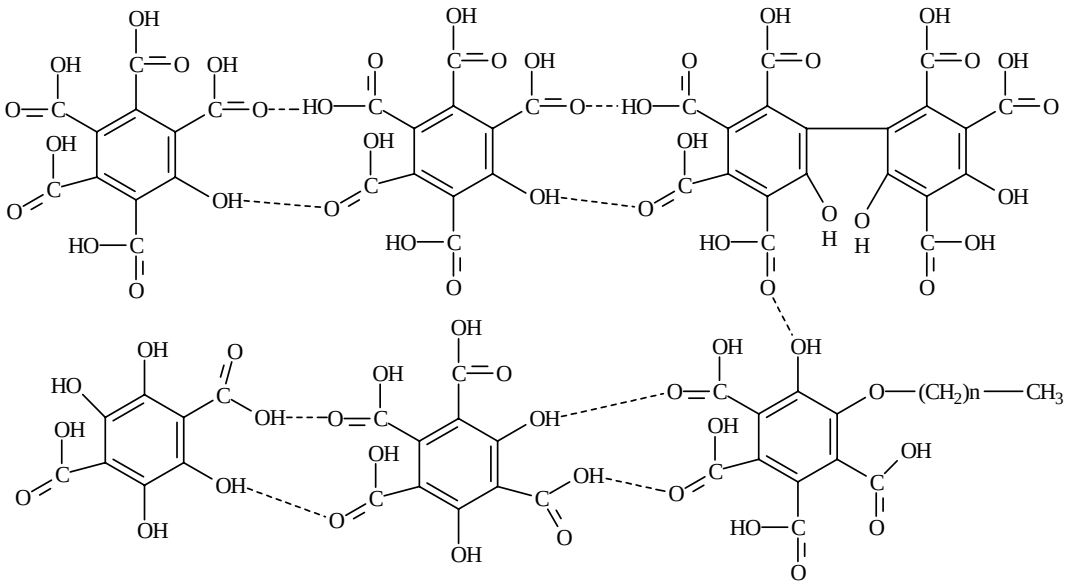

Abbildung 2: Fulvinsäuremodell nach Morill (1982)

Aufgrund der stofflichen Vielfalt werden Huminstoffe nicht nach ihrer molekularen Struktur oder ihren Struktureinheiten eingeteilt, sondern nach ihrem Löslichkeitsverhalten. Der in Wasser nicht lösbare Anteil wird als Humine bezeichnet. Stoffe, die oberhalb eines pH-Wertes von 2-3 löslich sind, sind Huminsäuren. Die bei jedem pH-Wert löslichen Stoffe werden als Fulvinsäuren bezeichnet.

Im Allgemeinen wird der Übergang von Fulvinsäuren über Huminsäuren zu Huminen wie folgt beschrieben:

- Der Grad der Kondensation nimmt zu.
- Das Molekulargewicht nimmt zu.
- Der Kohlenstoffgehalt steigt von ca. 45 % auf über 62 %, wobei der Sauerstoffanteil von ca. 48 % auf unter 30 % sinkt.

1.1.1 Indirekte und direkte Effekte von Huminstoffen

Wenn man von Effekten spricht, die Fulvinsäuren auf Organismen haben, muss zwischen direkten und indirekten Effekten unterschieden werden. Der Unterschied zwischen beiden Effekten ist darin begründet, dass bei:

direkten Effekten Huminstoffe direkt reagieren und biochemische Reaktionen beeinflussen. Aquatische Pflanzen und Tiere können Huminstoffe aufnehmen was

sowohl eine positive als auch negative Wirkung haben kann. Z. B. zeigten Karpfen bei Huminstoffkonzentrationen von 5 mg/L eine erhöhte Produktion von Hitze-Schock-Proteinen (Steinberg et al. 2003).

indirekten Effekten Huminstoffe aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften mit Substanzen reagieren und dadurch Pflanzen oder Mikroorganismen beeinflussen. So kann z. B. durch die Bindung von Schadstoffen deren Wirkung verändert werden (Haitzer et al. 1998).

Die indirekten Effekte sind weitaus besser untersucht. Zu den indirekten Effekten zählen u. a. die Verringerung der Bioverfügbarkeit bzw. Toxizität von Xenobiotika und Schwermetallen. Diese Stoffe können chemischen Stress auf Organismen ausüben. Somit ist die Verringerung der Bioverfügbarkeit von Xenobiotika und Metallen ein häufig untersuchtes Thema (Steinberg 2003).

1.1.2 Verringerung der Bioverfügbarkeit von Xenobiotika und Schwermetallen

Gerade hydrophobe organische Xenobiotika neigen dazu, sich im Fettgewebe von Organismen anzulagern. Egal, ob ein Stoff toxisch wirkt oder nicht, eine Anlagerung körperfremder Stoffe ist grundsätzlich unerwünscht. Grundvoraussetzung für eine Akkumulation von Stoffen ist in jedem Fall das Eindringen in die Zelle. Die Größe eines Moleküls darf dabei einen bestimmten Wert nicht übersteigen, denn sonst ist ein Durchdringen biologischer Zellmembranen nicht möglich.

Mehrfach konnte gezeigt werden, dass Huminstoffe in der Lage sind, organische Kontaminanten (Wershaw et al. 1969; Hassett und Anderson 1979; Carter und Suffet 1982; Lubal et al. 1998) und Metalle zu binden. Die hierbei entstandenen Komplexe oder HS-Xenobiotika- bzw. HS-Metall-Verbindungen besitzen ein viel größeres Volumen. Dadurch wird ein Eindringen in die Zelle des jeweiligen Organismus erschwert.

Die entstandenen Assoziate sind aber nicht nur größer, sondern besitzen zudem eine höhere Wasserlöslichkeit (Wershaw et al. 1969). Es wird angenommen, dass Huminstoffe Eigenschaften oberflächenaktiver Substanzen besitzen. Dabei binden hydrophobe Regionen der Huminstoffe die jeweilige organische Substanz, während die hydrophilen Seiten (-COOH, -OH) für die hohe Löslichkeit der Assoziate sorgen (Hassett und Anderson 1979). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der hochmolekulare Anteil der Huminstoffe eher zur Assoziatbildung befähigt ist (Hassett und Anderson 1979).

Bei Untersuchungen zur Bindung von DDT mit Huminstoffen wurde gezeigt, dass mehr als 75 % des eingesetzten DDTs in gebundener Form vorliegen können. Dabei war der Gehalt an gebundenem DDT sowohl vom pH-Wert, der Ionenstärke als auch von der Konzentration des Huminstoffes abhängig (Carter und Suffet 1982). Weiterhin betonten die

Autoren, dass auch die Quellen aus denen die eingesetzten Huminstoffe stammten, die Bindung des DDTs beeinflussten. In anderen Arbeiten, die die Bindung zwischen Huminstoffen und organischen bzw. anorganischen Xenobiotika untersuchten, wurde eine Unabhängigkeit des Bindungsverhaltens von der Quelle bzw. der Herkunft der Huminstoffe festgestellt (Pacheco et al. 2003).

Die Fähigkeit der Huminstoffmoleküle, Metalle zu komplexieren, wird durch sauerstoff- und stickstoffhaltige, funktionelle Gruppen realisiert (Alberts und Filip 1998). Die Untersuchung von Stabilitätskonstanten zwischen verschiedenen Metallen und Huminstoffen ergab folgende Reihenfolge: $Cu^{2+} > Ba^{2+} > Pb^{2+} > Cd^{2+} > Ca^{2+}$. Die höchste Affinität zu Huminstoffen zeigte Cu^{2+}. Auch bei niedrigen pH-Werten (<3) waren noch bis zu 50 % des Kupfers an Huminstoffe gebunden (Lubal et al. 1998). Durch die Komplexierung der Metalle wird deren Toxizität herabgesetzt. So erhöhte sich die Überlebensdauer von Regenbogenforellen, die einer Kupferkonzentration von 2 mg/L ausgesetzt waren, in Gegenwart von 0-1 mg HA/L um 50 % (Brown et al. 1974).

Bei anderen Untersuchungen wurden die Huminstoffe in vier verschiedene Molekulargewichtsbereiche eingeteilt. Danach wurde die Cd-Toxizität auf Daphnien geprüft. Es wurde festgestellt, dass die drei hochmolekularen Fraktionen der Huminstoffe die Toxizität des Cadmiums herabsetzten, während die kleinste Fraktion die Toxizität erhöhte (Giesy et al. 1977).

In manchen Fällen ergaben die Beobachtungen widersprüchliche Resultate. Viele gegensätzliche Ergebnisse wurden von Winner zusammengefasst (Winner 1984). Die Schwierigkeiten bei der Untersuchung von direkten und indirekten Effekten liegen sicherlich an der kaum überprüfbaren Reinheit der Huminstoffe. Viele Isolate sind nur hinsichtlich der elementaren Zusammensetzung bekannt. Eine Kontamination der Isolate mit anderen Materialien kann sicherlich nicht immer ausgeschlossen werden. In solchen Fällen können beobachtete Effekte nicht ausschließlich auf Huminstoffe zurückgeführt werden. Viele der Untersuchungen sind außerdem nicht mit Isolaten sondern mit käuflichen Präparaten (Fluka- oder Aldrich-Humic Acid) durchgeführt worden. In vergleichenden Untersuchungen wiesen natürliche Isolate zur z. B. Fluka- oder Aldrich-Humic Acid erhebliche Unterschiede auf (Chiou et al. 1987).

1.1.3 Bildung und Abbau von Huminstoffen

Huminstoffe machen durchschnittlich 50 % des organischen Kohlenstoffs in Gewässern aus. Sie gehören zum stabilsten Anteil des zirkulierenden Kohlenstoffs (Thurman 1985). Die durchschnittliche Aufenthaltszeit von Humus im Boden wird auf 250-1 900 Jahre geschätzt (Stevenson 1982). In diesem Sinne spielen Huminstoffe eine sehr wichtige Rolle im Kohlenstoffkreislauf. Huminstoffe sind zwar sehr stabile Stoffe, müssen aber auch einer stetigen Bildung bzw. einem stetigen Zerfall unterworfen sein.

Bei der Untersuchung zur Freisetzung von Huminstoffen (Filip und Smedhildmann 1992) bzw. dem Abbau von Huminstoffen durch Bodenmikroorganismen (Dari et al. 1995) wurde nachgewiesen, dass ein solches Gleichgewicht zwischen Bildung und Abbau besteht.

In zahlreichen Versuchen konnten Huminstoffe als alleinige Kohlenstoff-Quelle oder durch den Zusatz von Glukose durch Bodenmikroorganismen verwertet werden (Swift et al. 1987; Tranvik und Hofle 1987; Haider und Martin 1988; Filip et al. 1998).

Versuche, auf mikrobiellem Wege Huminstoffe oder huminstoffartige Substanzen herzustellen, wurden mit unterschiedlichen Kohlenstoff-Quellen unternommen. Aus Pflanzenmaterialien wurde die Freisetzung von Huminstoffen beobachtet (Filip und Alberts 1988; Filip und Smedhildmann 1992). Die Humifizierung von Pepton oder Stärke führte zu einer dunklen Verfärbung der Ansätze und huminstoffartige Substanzen konnten isoliert werden (Claus et al. 1999; Filip und Claus 2002). Der überwiegende Teil des Substrates wurde mineralisiert, aber bis zu 3 % des eingesetzten Kohlenstoffs konnten zu Huminstoffen umgesetzt werden. Die Gesamtausbeuten waren vom eingesetztem Substrat (Pepton > Hefe > Stärke) und dem eingesetzten Innokulum (Flusswasser > Seewasser > Grundwasser) abhängig (Claus et al. 1999; Filip und Claus 2002).

1.2 Überblick zur Analytik vom Huminstoffen

Die Analytik von Huminstoffen begann schon im 18. Jh. durch den aus Berlin stammenden Chemiker Franz Karl Achard. Er entwickelte 1786 die ersten Isolations- und Klassifikationsschemen für Huminstoffe. Die ersten bedeutenden analytischen Beiträge lieferte der schwedische Chemiker Berzelius (1839). Er erkannte, dass Huminstoffe aus einem Satz von Molekülen bestehen, die zwar nicht identisch sind, sich aber sehr ähnlich sein müssen!

Die ersten Elementaranalysen stammen aus dem Jahr 1908. Aschan isolierte präparativ Huminstoffanteile, die er zuvor mit Metallsalzen gefällt hatte. Die dabei erhaltenen Ergebnisse der elementaren Zusammensetzung stimmen erstaunlich gut mit heutigen Erkenntnissen überein (Steinberg und Münster 1985).

1.2.1 Einsatz der Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Der Einsatz der Nuclear Magnetic Resonance (NMR) -Spektroskopie ermöglicht, die quantitative Zusammensetzung der jeweiligen funktionellen Gruppen in einem Stoffgemisch zu erfassen.

Die am häufigsten angewendete NMR Methode zur Charakterisierung von Huminstoffen und natürlichem organischen Material (NOM) ist die Solid-state NMR (Preston 1996). Die Vorteile der Solid-state NMR gegenüber der Liquid-state NMR sind vor allem: A) keine Limitationen hinsichtlich der Konzentration der Analyten, B) keine Lösungsmitteleffekte und C) einfaches Probenhandling und die Stabilität einer festen Probe (Cook 2004).

Als analytische Methode ist die Liquid-state NMR gegenüber der Solid-state NMR weiter verbreitet. Ihre Vorteile liegen in erster Linie in der verbesserten Auflösung der Spektren. Bei der Analyse von NOM heben sich diese Vorteile aber durch die Löslichkeitsprobleme der Probe auf. Gebräuchliche Konzentrationen sind z. B. bei der ^{13}C NMR 5 g/L (Hesse et al. 1995). Diese Konzentration ist für NOM selbst bei sehr polaren deuterierten Lösungsmitteln wie D_2O nur schwer zu erreichen.

Bei der Analyse organischer Verbindungen wie Huminstoffe bieten sich in erster Linie die ^{1}H NMR und die ^{13}C NMR an. Die ^{1}H NMR ist aufgrund der Häufigkeitsverteilung von Protonen in organischen Stoffen zwar sehr empfindlich, es treten aber Probleme durch starke Lösungsmittelsignale auf (Lankes und Lüdemann 2002a). Dadurch ist die Auflösung der Spektren für die ^{13}C NMR grundsätzlich besser und ^{13}C bei der Analyse von NOM der „Kern der Wahl“ (Preston 1996; Cook 2004).

Schon früh wurde das Potential dieser Technik zur Charakterisierung der Kohlenstoffverteilung bzw. der Verteilung von funktionellen Gruppen in Huminstoffen genutzt (Preston und Ripmeester 1982). Die Abschätzung der funktionellen Gruppen der Suwannee River Fulvinsäure wird von der IHSS mit 24 % aromatischen Kohlenstoff, 33 % aliphatische Gruppen, 11 % heteroaliphatische Gruppen, 24 % Carboxylgruppen und 7 % Carbonylgruppen angegeben [www.ihss.gatech.edu].

Im ROSIG Projekt wurde mittels NMR sehr intensiv die Zusammensetzung von Fulvinsäuren vier verschiedener Wasserkörper untersucht. Auch hier fiel den Autoren auf, dass trotz unterschiedlicher Herkunft, die qualitative Zusammensetzung der Proben sehr ähnlich war (Lankes und Lüdemann 2002b).

Die Ähnlichkeiten der Proben sind zwar sehr hoch, es konnten aber auch qualitative Unterschiede in der Zusammensetzung von Proben beobachtet werden. Es wurde mittels NMR gezeigt, dass marine Fulvinsäuren einen höheren Sättigungsgrad haben als terrestrische Fulvinsäuren (Stuermer und Payne 1976). Weiterhin konnten Unterschiede im Oxidationsgrad zwischen natürlich vorkommenden FS und aus Klärschlamm extrahierten FS festgestellt werden (Sposito et al. 1978).

1.2.2 Analytik von Fulvinsäuren mittels Massenspektrometrie

Alle herkömmlich verwendeten analytischen Methoden erfassten mittlere Eigenschaften des gesamten Stoffgemisches bzw. einzelner Fraktionen dieser Mischung. Alle bisher beschriebenen Unterschiede in der Elementaranalyse oder in der quantitativen Zusammensetzung der funktionellen Gruppen (wie zuvor im 1.2.1 beschrieben), waren aber sehr gering. Aus diesen Gründen sind z. B. Differenzen zwischen Fulvinsäuren unterschiedlicher Herkunft auf molekularer Ebene zu erwarten und die Analytik von Einzelstoffen notwendig.

Für die Analytik von einzelnen unbekannten Molekülen ist die Massenspektrometrie eine geeignete Methode. Der Einsatz der Massenspektrometrie sollte somit auch für die Analyse von Huminstoffen sehr viel versprechende Ergebnisse liefern.

Bevor aber Moleküle im Massenspektrometer detektiert werden können, müssen sie ionisiert werden. Mittels Gaschromatographie (GC) und Elektronenstoß-Ionisation (EI) werden nur unpolare Analyten erfasst. Huminstoffe besitzen, ähnlich wie z. B. Fettsäuren oder Zucker, viele polare Stoffgruppen. Diese können aber ohne Derivatisierung oder Fragmentation mittels GC gar nicht nachgewiesen werden (Clifford et al. 1995; del Rio et al. 1998). Eine direkte Detektion von Huminstoffen mittels GC-MS ist also nicht möglich.

Eine Möglichkeit, Huminstoffe ohne Derivatisierung erfassbar zu machen und genauer zu charakterisieren, bietet die Pyrolyse GC-MS (Schulten und Schnitzer 1992; Sihombing et al. 1996; Gobbels und Puttmann 1997; Schulten und Gleixner 1999; Kracht und Gleixner 2000; Piccolo et al. 2002). In diesem Fall werden feste Proben, unter Anwendung sehr hoher Temperaturen, durch thermische Spaltung der Moleküle in flüchtige Fragmente überführt und in die Gasphase gebracht. Die Pyrolyse GC-MS kann aber auch mit einer Derivatisierung durchgeführt werden (Clifford et al. 1995; delRio und Hatcher 1996; van den Berg et al. 2000). In beiden Fällen ist die Methode aber zerstörend, so dass nicht intakte Moleküle sondern nur Fragmente von ihnen detektiert werden (Chiavari et al. 1994).

Für die Untersuchung von Huminstoffen hat sich in letzter Zeit hauptsächlich die Ionisation mittels Elektrospray (ESI) bei Atmosphärendruck (API) durchgesetzt. ESI ionisiert polare, hydrophile Komponenten, die in polaren Lösungsmitteln gelöst sind (Kujawinski 2002). Das bedeutet, dass polare Stoffe direkt und ohne Aufarbeitung analysiert werden können! Bedenkt man die hohe Wasserlöslichkeit von Huminstoffen, muss diese Stoffgruppe zwangsläufig reich an funktionellen Gruppen wie Carbonsäuren oder Hydroxygruppen sein. Diese Gruppen werden bevorzugt mittels ESI erfasst. Aus diesem Grund sollte ESI für die Analytik von Huminstoffen die Ionisationsmethode der Wahl sein. Des Weiteren ist die ESI-MS eine sehr sanfte Ionisationsmethode, die die Detektion von Molekül-Ionen begünstigen sollte (Reemtsma 2001). Die ESI-MS bietet also das Potential, einzelne, intakte Huminstoff-

moleküle zu detektieren und Veränderungen in der Mischung auf molekularer Ebene zu beobachten.

Die ersten viel versprechenden Arbeiten zur Analytik von Fulvinsäuren kamen aus dem Jahre 1997 (McIntyre et al. 1997). McIntyre zeigte Spektren und Tochter-Ionen-Spektren von Grundwasserfulvinsäuren. Generell zeigen die Spektren der Fulvinsäuren eine breite Massenverteilung, wobei jede Masse im Spektrum besetzt ist. Innerhalb der Spektren der Fulvinsäuren treten zwei auffallende Merkmale auf: A) Die Intensitätsverteilung ist wellenartig, wobei die Intensitätsmaxima 14 Da voneinander entfernt sind. B) Es kann ein Übergewicht an ungeraden Ionen, die im 2 Da Abstand auftreten, beobachtet werden (Ikeda et al. 2000; Leenheer et al. 2001; Moulin et al. 2001; Plancque et al. 2001; Kujawinski et al. 2002a; Kujawinski et al. 2002b; Stenson et al. 2002; Leenheer et al. 2003b; Reemtsma und These 2003).

Auch die bisher veröffentlichten Tochter-Ionen-Spektren zeigen auffallende Regelmäßigkeiten. Alle untersuchten Molekül-Ionen zeigen sukzessive Abspaltungen von CO_2 (-44 amu) mit parallelen Wasserabspaltungen (-18 amu). Weiterhin sind CO Abspaltungen (-28 amu) mit geringerer Intensität zu beobachten (McIntyre et al. 1997; Leenheer et al. 2001; Moulin et al. 2001; Plancque et al. 2001; Reemtsma und These 2003). Dieses systematische Fragmentationsverhalten führte zu Strukturvorschlägen, die als Gemeinsamkeit einen aromatischen Grundkörper mit aliphatischen Seitenketten hatten (Leenheer et al. 2001; Plancque et al. 2001). Weiterhin trugen die Moleküle Hydroxygruppen und Carbonsäuren. Der Nachteil dieser Strukturvorschläge war, dass die Fragmentationen nicht auf exakte Massen und somit nicht auf vorliegende Summenformeln bezogen werden konnten.

Der Einsatz der hochauflösenden Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Spektrometrie (FTICR) erlaubte es erstmals einzelne Huminstoff-Moleküle nachzuweisen. Durch das hohe Auflösungsvermögen dieser Geräte konnten in Huminsäuren als auch Fulvinsäuren des Suwannee River mehrere Tausend Summenformeln bestimmt werden (Stenson et al. 2003). Die über 4 600 Summenformeln konnten in 266 homologen Alkyl-Reihen angeordnet werden. Das Vorhandensein weiterer Homologien schlussfolgerten die Autoren aus regelmäßig auftretenden Massenabständen zwischen den detektierten Ionen. Außerdem wiesen Cooper et al. darauf hin, dass die in Humin- bzw. Fulvinsäuren des Suwannee Rivers detektierten Summenformeln zu einem hohen Anteil übereinstimmen (Stenson et al. 2002). Basierend auf den ermittelten Summenformeln wurde auch ein Strukturvorschlag unterbreitet. Der mittels Hochauflösung gezeigte Strukturvorschlag enthält sowohl funktionelle Gruppen, als auch Strukturelemente, die zumindest in niedermoleklaren Fulvinsäuren nicht auftreten.

Weitere Tausend Summenformeln wurden mittels FTICR in zwei DOC-Fraktionen organischer Materialien bestimmt (Kujawinski et al. 2002b; Kim et al. 2003; Kramer et al.

2004). Diese Summenformel wurden aber entweder gar nicht oder nur für einzelne Massen publiziert.

2 Zielsetzung

Einer der wichtigsten Parameter zur Beurteilung einer Wasserprobe ist der Gehalt an gelöstem organischem Kohlenstoff. In natürlichen Wasserproben besteht der organische Kohlenstoff zu einem hohen Anteil aus Huminstoffen, wobei in wässrigen Proben der Anteil der Fulvinsäuren gegenüber dem Anteil an Huminsäuren überwiegt. Fulvinsäuren setzen sich aus einer Vielzahl an Einzelstoffen zusammen.

Die Analytik einzelner Fulvinsäure-Moleküle war bisher nicht möglich. Deshalb erfolgte die Erfassung von Huminstoffen bzw. Fulvinsäuren bislang über die Bestimmung von Summenparameter, wie z. B. DOC. Durch diese Detektion wird zwar die gesamte Probe erfasst, aber qualitative Änderungen, die durch natürliche Prozesse oder durch Aufbereitungsschritte, wie z. B. Ozonung oder Chlorung hervorgerufen werden, können nur für das gesamte Stoffgemisch bestimmt werden.

Setzt sich ein Stoffgemisch aus vielen Einzelsubstanzen zusammen, können sich Eigenschaften der Einzelstoffe ändern, ohne dass dies auch zwangsläufig zu merklichen Veränderungen der gesamten Mischung führt. Wie später noch gezeigt wird, kann z. B. bei Fulvinsäuremischungen unterschiedlicher Herkunft bei gleicher elementarer Zusammensetzung ein unterschiedliches Absorptionsvermögen beobachtet werden.

In der Literatur wird beschrieben, dass bei der Ozonung eine deutliche Änderung in den qualitativen Eigenschaften der Fulvinsäuremischung hervorgerufen wird. So kann z. B. eine eindeutige Abnahme im UV-Absorptionsvermögen (Galapate et al. 2001), eine Verringerung des mittleren Molekulargewichts (Owen et al. 1995) oder eine Abnahme des adsorbierbaren Anteils des organischen Kohlenstoffs beobachtet werden. Diese qualitativen Änderungen treten auf, obwohl sich der DOC-Gehalt kaum ändert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bestimmung von Summenparametern eine qualitativ sehr wertvolle Analytik ist, aber über eine grobe Charakterisierung eines komplexen Stoffgemisches nicht hinausgeht.

In dieser Arbeit soll eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, Huminstoffe sowohl genauer zu charakterisieren als auch die Veränderung der Stoffe bei chemischen Prozessen auf molekularer Ebene zu erfassen.

Dazu müssen:

- Potentiale der LC-MS für die Analytik der Fulvinsäuren ausgelotet werden.
- eine Methode entwickelt werden, die es erlaubt Fulvinsäuren genauer zu charakterisieren.

- Informationen zum molekularen Aufbau gesammelt werden, die Strukturvorschläge von Fulvinsäuren ermöglichen.
- vergleichende Untersuchungen an Fulvinsäuren unterschiedlicher Herkunft durchgeführt werden.
- über eine Auswertung der Ergebnisse mögliche Rückschlüsse gezogen werden, die neue Vorstellungen zur Genese der Fulvinsäuren liefern.
- Veränderungen bei chemischen Umsetzungen auf molekularer Ebene verfolgt werden.

Diese Ergebnisse sollen ein neues Verständnis hinsichtlich des Aufbaus und der Struktur von Fulvinsäuren liefern. Die Methoden sollen weiterhin die Möglichkeit geben, Reaktionen bzw. Veränderungen einzelner Moleküle innerhalb des Isolates zu verfolgen.

3 Angewandte Techniken

Die hier vorliegende Arbeit konzentriert sich in erster Linie auf die Untersuchung der Fulvinsäuren. Einerseits kommen Fulvinsäuren in Gewässern häufiger vor als Huminsäuren, andererseits scheinen sie durch ihr geringeres Molekulargewicht und den höheren Sauerstoffgehalt (polarer) mittels ESI-MS besser erfassbar zu sein.

Fulvinsäuren sind sehr hydrophile Stoffe, die im Durchschnitt aus 40-50 % Kohlenstoff, 40-50 % Sauerstoff, 4-7 % Wasserstoff, 0.9-3.3 % Stickstoff und 0.1-3.6 % Schwefel bestehen. Für die meisten in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden die Suwannee River Fulvinsäuren der IHSS verwendet. Hier wird eine Elementarzusammensetzung (in Gewichtsprozent) von C (52,4 %), H (4,3 %), O (42,2 %), N (0,7 %), S (0,4 %) angegeben (www.ihss.gatech.edu).

Die in Fulvinsäure-Isolaten enthaltenen Einzelstoffe sind nicht nur sehr zahlreich, sondern weisen auch untereinander eine hohe chemische Verwandtschaft auf. Aus diesen Gründen ist es auf allein chromatographischem Wege nicht möglich, einzelne Analyten aus dem Isolat zu isolieren. Es soll eine Chromatographie gefunden werden, die dieses Gemisch so gut wie möglich trennt.

1.1. Chromatographie

Eine gute chromatographische Trennung der Fulvinsäuren in Einzelstoffe ist bisher nicht möglich. Mit der herkömmlichen reversed phase Flüssig-Chromatographie (HPLC) kann keine zufriedenstellende Retention erreicht werden (Hirose und Ishii 1986; Fievre et al. 1997; Janos 2003), da Fulvinsäuren sehr hydrophil und durch eine hohe Anzahl an Säuregruppen im Molekül auch von ionischer Natur sind. Bei der reversed phase HPLC kann die

Einstellung des Eluenten auf niedrige pH-Werte, und die somit bedingte Protonierung saurer Analyten eine Möglichkeit bieten, die Retention hydrophiler Stoffe zu verbessern. Die pKa Werte für Suwannee River Fulvinsäuren wurden mit 3.0 oder geringer bestimmt (Leenheer et al. 1995a; Leenheer et al. 1995b). Analyten mit pKa Werten zwischen 0.7 und 2.9 zeigten auch mit sehr sauren Eluenten keine Retention (Reemtsma 2003). Der Einsatz acider Eluenten brachte auch für die Trennung von Fulvinsäuren mittels HPLC nicht den gewünschten Erfolg. Des Weiteren ist die Sensitivität der ESI-MS für ionische Stoffe in der dissoziierten Form am höchsten und eine Protonierung der Analyten deshalb nicht von Vorteil (de Hoffmann und Stroobant 2001).

3.1.1 Size Exclusion Chromatography (SEC)

Eine flüssigchromatographische Trennmethode, die sich bei der Analytik von Huminstoffen bewährt hat, ist die Größenausschluss-Chromatographie (SEC) (Miles und Brezonik 1983,Trubetskoj, 1997; Chin et al. 1994; Conte und Piccolo 1999). Hierbei wird die Probe durch eine Säule mit Poren unterschiedlicher Größe geführt. Große Moleküle können nicht in diese Poren eindringen und eluieren zuerst. Kleine Moleküle durchwandern jede Pore, haben deshalb einen größeren Weg zurückzulegen und eluieren zum Schluss. Auf diesem Weg erfolgt die Separation der Analyten nach dem hydrodynamischen Volumen.

Um eine ionische Wechselwirkung der Analyten mit dem Säulenmaterial zu verhindern, muss dem Eluenten Salz zugesetzt werden. Viele der angewandten Methoden koppeln die SEC mit einer UV- oder Kohlenstoffdetektion (Gloor et al. 1981; Huber und Frimmel 1994; Cech und Enke 2001). Dabei werden meist wässrige Eluenten mit einem Na_2HPO_4 oder NaH_2PO_4 Zusatz verwendet. Die in dieser Arbeit zu entwickelnde Methode sollte eine Kopplung mit einem Massenspektrometer ermöglichen. Dafür wird ein flüchtiger Eluent benötigt, der für eine gute Ionisierung der Analyten im Massenspektrometer einen Anteil organischen Lösungsmittels besitzen muss (de Hoffmann und Stroobant 2001).

3.2 Massenspektrometrie

Der Einsatz der Electrospray-Ionisation-mass spectrometry (ESI-MS) zeigt, dass diese Methode eine sehr weiche Ionisationsmethode ist. Sie ermöglicht eine Detektion unfragmentierter Molekül-Ionen. Somit sollte der Einsatz der API-ESI-MS auch die Möglichkeit bieten sowohl einzelne als auch intakte Huminstoffmoleküle zu erfassen (Reemtsma 2001).

Für die Detektion mittels Massenspektrometrie müssen Ionen in der Gasphase erzeugt werden, die im Massenspektrometer nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) aufgetrennt werden. In Abhängigkeit von der gewählten Ionisation und dem verwendeten Massenspektrometer sind der massenspektrometrischen Bestimmung der Analyten Grenzen gesetzt.

Für unpolare und thermisch stabile Stoffe empfiehlt sich die Analytik mittels GC-MS. Ionische und thermisch labile Stoffe werden bevorzugt mittels LC-ESI-MS ionisiert. Alle Massenspektrometer haben eine geräteabhängige Grenze oberhalb derer Ionen nicht mehr erfasst werden können (Hesse et al. 1995). Da die Ionen im Massenspektrometer nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) erfasst werden, lässt sich der erfassbare Massenbereich über Erzeugung von Mehrfachladungen ausdehnen (Marshall und Guan 1996; de Hoffmann und Stroobant 2001). Dieser Vorteil wird besonders in der Proteinanalytik genutzt, wodurch bei Verwendung eines FTICRs noch Eiweiße über 20 kDa analysiert werden konnten (Wu et al. 2004).

Ein Potential der Massenspektrometrie liegt in der Identifizierung von unbekannten Substanzen. Die Identifizierung erfolgt über die Kombination verschiedener Informationen aus z. B. chemischen und spektroskopischen Untersuchungen der jeweiligen Stoffe. Durch Kombination der Ergebnisse erfolgt dann über das Ausschlussverfahren die Eingrenzung der vorgeschlagenen Positivbefunde. Aus der Molekülmasse einer unbekannten Substanz kann auf die elementare Zusammensetzung geschlussfolgert werden. Je genauer die Masse des Analyten bestimmt werden kann, desto geringer ist die Anzahl der vorgeschlagenen Summenformeln und desto eindeutiger ist deren Identifikation. Über das Fragmentationsverhalten der Analyten, d. h. deren Zerfall in kleinere Bausteine, können wichtige Aussagen über ihre Struktur getroffen werden.

Das Auflösungsvermögen der eingesetzten Massenspektrometer ist geräteabhängig. Für die Identifikation unbekannter Analyten wurden Massenspektrometer wie z. B. Quadrupol (Tyler et al. 1996; Storm et al. 2001), Time-of-flight (TOF) (Glasius et al. 1999; Colombo et al. 2004) bzw. FTICR (Burton et al. 1999; Kujawinski et al. 2002a; Stenson et al. 2003) Massenspektrometer verwendet.

Die höchste Auflösung bieten derzeit FTICR Massenspektrometer. Ihr Auflösungsvermögen ist, verglichen mit jeder anderen massenanalytischen Technik, 10 bis 100-mal größer. Im Falle der FTICR erlaubt die Massenspektrometrie z. B. die Masse eines Ions mit Fehlerwerten kleiner als 1 ppm zu bestimmen (Marshall und Guan 1996; Aaserud et al. 1999; Kramer et al. 2004). Selbst für organische Moleküle mit relativ hohen Massen (um 500 Da) bleibt bei der Bestimmung der Summenformel oft nur eine Möglichkeit (Stenson et al. 2003; Kramer et al. 2004). So konnten mittels FTICR in Fulvinsäure-Isolaten ca. 4 600 Summenformeln bestimmt werden (Stenson et al. 2003). Weitere Summenformeln ließen sich in natürlichem organischen Material ermitteln, die aber nicht veröffentlicht wurden (Kramer et al. 2004).

Fulvinsäuren besitzen eine hohe Wasserlöslichkeit. Diese Eigenschaft können organische Stoffe, die aus Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff bestehen, in erster Linie durch funktionelle Gruppen wie z. B. Carbonsäuren oder Hydroxygruppen erreichen.

Die Detektion mittels ESI-MS ist besonders sensitiv für ionische Stoffe, die eine negative oder positive Ladung stabilisieren können. Stoffgruppen, wie Fulvinsäuren, die reich an funktionellen Gruppen, wie Carbonsäuren oder Hydroxylgruppen sind, sollten mittels ESI-MS bevorzugt erfasst werden.

3.2.1 Elektrospray Ionisation (ESI)

ESI ist eine Technik, Stoffe bei Atmosphärendruck zu ionisieren. Dabei werden durch die ESI nicht extra Ionen erzeugt, sondern vielmehr ionische Stoffe aus wässrigen Lösungen in die Gasphase gebracht (Gaskell 1997). Nachdem die Ionen in die Gasphase gebracht wurden, müssen sie ins Massenspektrometer abgelenkt werden.

Das Problem bei der Kopplung von Quelle und Massenspektrometer ist der hohe Druckunterschied. Die Quelle arbeitet bei Atmosphärendruck und das Massenspektrometer bei Vakuum (z. B. Quadrupol-Geräte bei 10-5-10-6 bar). Dieses Problem wird durch „differentiell gepumpte Systeme“ behoben. Dabei wird die Öffnung am Konus möglichst klein gehalten. Durch den Einsatz leistungsstarker Pumpen, die hinter dem Konus platziert sind, wird schrittweise das Vakuum erzeugt.

Das Elektrospray wird durch Anlegen einer Hochspannung zwischen der Kapillare und einer Gegenelektrode gebildet. Dadurch werden im Eluenten geladene Tropfen erzeugt. Die Tropfen werden nach dem Austritt aus der Kapillare versprüht. Durch das Desolvatationsgas und hohe Temperaturen wird der Radius der Tropfen immer mehr verkleinert. Die gleich geladenen Ionen im sich verkleinernden Tropfen stoßen sich immer stärker ab. Schließlich wird die Abstoßung größer als die Oberflächenspannung und die Tropfen explodieren (Coulomb Explosion).

Der eben beschriebene Prozess wiederholt sich so oft, bis Ionen in die Gasphase übergehen. Diese Ionen werden dann durch Potentialdifferenzen und das zunehmende Vakuum zum Detektor befördert (Gaskell 1997; Kebarle 2000; Kebarle und Peschke 2000; de Hoffmann und Stroobant 2001).

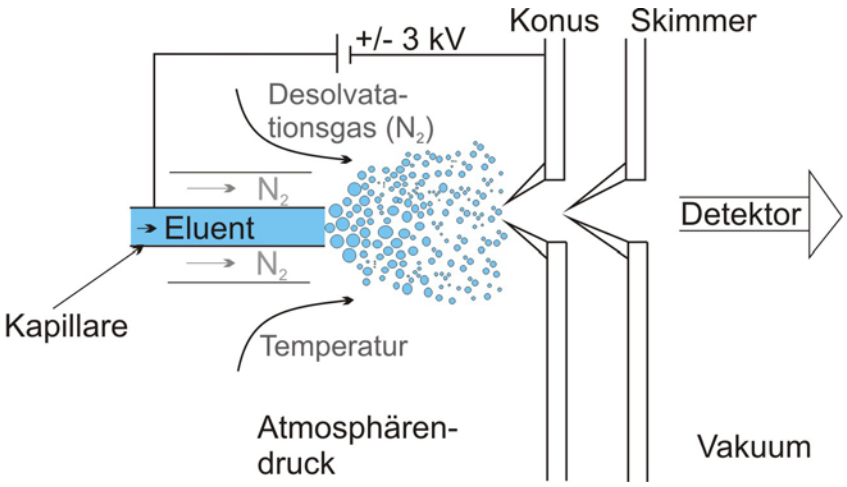

Abbildung 3: Darstellung einer ESI-Quelle

3.2.2 Funktionsweise des Quadrupol-Massenspektrometers

Quadrupol Massenspektrometer sind die am weitesten verbreiteten Massenspektrometer. Das liegt einerseits daran, dass die Anforderungen, die an das Vakuum im Analysator-Bereich gestellt werden, nicht sehr hoch sind. Somit lassen sich die Geräte gut mit einer vorangehenden Chromatographie koppeln. Weiterhin bieten diese Detektoren einen weiten dynamischen Konzentrationsbereich, was sie besonders für die Quantifizierung sehr attraktiv macht (de Hoffmann und Stroobant 2001).

Ein Quadrupol besteht aus vier parallel angeordneten Stäben, an denen eine Gleichspannung mit überlagerter Wechselspannung angelegt ist. Diese Spannungen können zeitlich so variiert werden, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt nur Ionen mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnis die Stäbe passieren kann. Alle anderen Ionen werden an den Stäben entladen. So kann in einer bestimmten Zeit ein Massenbereich gescannt werden. Diese Form der Detektion bringt aber mit sich, dass immer nur ein kleiner Teil der in der Quelle erzeugten Ionen detektiert wird, wodurch die Empfindlichkeit stark verringert wird.

Im Besonderen haben sich Triple Quad Geräte durchgesetzt. Sie bestehen aus zwei Quadrupolen und einer Kollisionszelle. Durch die Verwendung zweier Quadrupole in Reihe können verschiedene Detektionsmodi, wie z.B. Multiple-Reaction-Monitoring (MRM), Produkt-Ionen-scans (auch Daughter-Ion-scan) oder Precursor-Ion-scans (auch Parent-Ion-scan) durchgeführt werden.

- Die zuvor beschriebenen Empfindlichkeitsprobleme können deutlich verbessert werden, wenn die zur Verfügung stehende Scan-Zeit des Quadrupols auf wenige Massen konzentriert wird. Die höchste Empfindlichkeit und das beste Signal/Rausch Verhältnis wird im MRM Modus erreicht. In diesem Modus sind beide Quadrupole statisch und es werden nur ausgewählte Fragment-Ionen des Zielanalyten detektiert.
- Der Daughter-Ion-scan erlaubt mit dem ersten Quadrupol eine Masse herauszufiltern, die dann in der Kollisionszelle fragmentiert wird. Mit dem zweiten, scannenden Quadrupol werden die entstandenen Fragmente analysiert. Auf diesem Weg können Fragmente des ausgewählten Moleküls bestimmt werden, die zur Strukturaufklärung von großem Nutzen sind.
- Im Precursor-Ion-scan ist der zweite Quadrupol statisch und detektiert nur eine Masse oder genauer gesagt die Masse des interessierenden Fragments. Über den ersten Quadrupol, der scannt, werden alle Ionen detektiert bzw. zugeordnet, die das ausgewählte Fragment abspalten. Dieser Messmodus steht aus technischen Gründen bei der Detektion mittels TOF-MS nicht zur Verfügung.
- Mittels Neutral-loss-scan können Abspaltungen von funktionellen Gruppen erfasst werden, die keine Ladung stabilisieren können und deshalb vom Molekül-Ion als Neutralteilchen abgespalten werden (z. B. die Abspaltung von CO_2, das einem Verlust von 44 Da entspricht). In diesem Fall scannen beide Quadrupole mit einem Massenversatz von 44 Da.

Die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der einzelnen Messmodi sind in Abbildung 4 dargestellt.

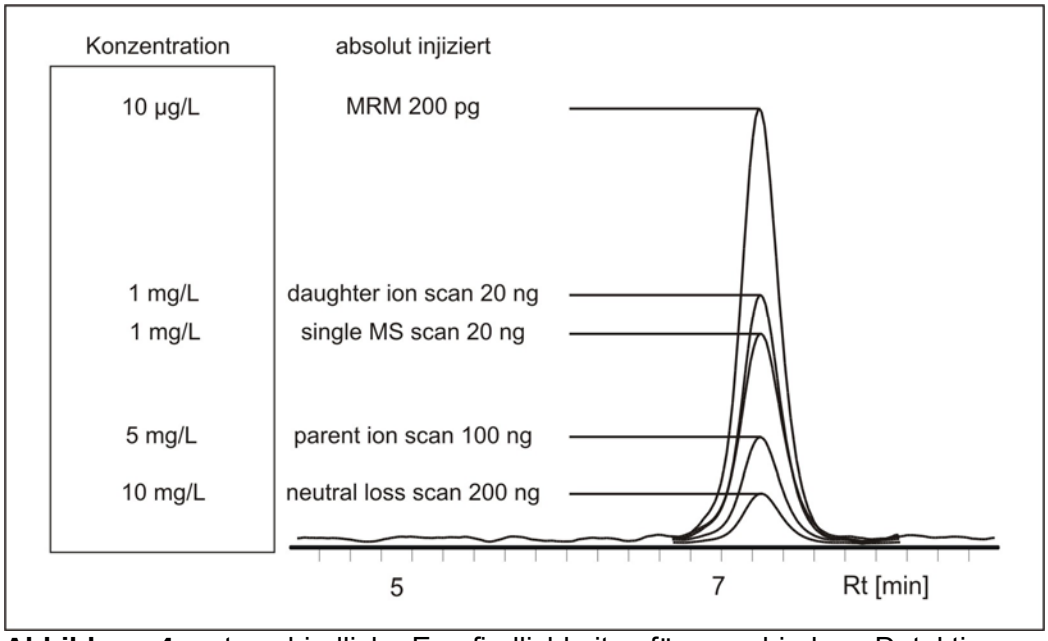

Abbildung 4: unterschiedliche Empfindlichkeiten für verschiedene Detektionsmodi eines Triple-Quad-Gerätes. Es wurde mit 1,5-Naphthalindisulfonsäure eine Substanz gewählt, die in jedem Modus detektiert werden kann.

3.2.3 Funktionsweise des Time-of-flight-Massenspektrometers

Geht es bei einer Analyse um die Identifizierung unbekannter Substanzen, ist die Bestimmung exakter Massen notwendig. Für die Bestimmung exakter Massen, muss das verwendete Massenspektrometer eine hohe Auflösung besitzen. Die Auflösung ist definiert als: $A = M / \Delta M$

Wobei M die Masse des Analyten und □M die kleinste auflösbare Massendifferenz zwischen den Peaks ist. Bestimmt werden kann die Auflösung als Peakbreite bei der Hälfte des Peakmaximums (Full Width at Half-Maximum [FWHM]). Neuere TOF-Geräte erreichen Auflösungen von 16 000.

Das Funktionsprinzip dieser Geräte kann vereinfacht wie folgt beschrieben werden. Die in der Quelle generierten Ionen werden bei einer definierten Startzeit durch eine Beschleunigungsspannung in Richtung des Detektors beschleunigt. Die Flugzeit ist dabei eine Funktion von Masse und Ladung. Kleinere Massen haben eine höhere Geschwindigkeit als größere Massen und erreichen den Detektor zuerst. Dadurch kommt es zu einer Auftrennung der einzelnen Massen. Da alle Ionen, die in Richtung des Detektors beschleunigt wurden, auch detektiert werden, können im Scan-Modus viel höhere Empfindlichkeiten als beim Quadrupol erreicht werden. Man nennt TOF-Geräte deshalb auch integrierende Detektoren (de Hoffmann und Stroobant 2001).

Der Einsatz von Reflektoren bringt zwei Verbesserungen: Erstens wird die Flugphase der Ionen durch mehrfaches Ablenken verlängert. Dadurch erhöht sich das Auflösungsvermögen des TOF-MS. Zweitens können die Reflektoren die statistische Verteilung der kinetischen Energie von Ionen gleichen m/z-Wertes korrigieren.

Die hohe Massengenauigkeit dieser Geräte wird durch den Einsatz des so genannten Lock Sprays erreicht. Durch thermische Effekte kann es zu absoluten Verschiebungen der Massenachse kommen. Mit dem Lock Spray wird zu jeder Analyse parallel ein Standard mitvermessen, über den ein Abgleich der Spektren vorgenommen werden kann (Jiang und Moini 2000; Colombo et al. 2004).

4 Analytik von Fulvinsäuren

Um die Chromatographie und deren anschließende Kopplung mit der Massenspektrometrie zu optimieren, werden verschiedene Eluenten getestet (siehe Abbildung 5). Sowohl eine gute Trennung, als auch eine hohe Sensitivität im Massenspektrometer, wird durch eine Mischung von 80/20 v/v Wasser/Methanol mit einem 10 mM Zusatz von NH_4HCO_3 erreicht.

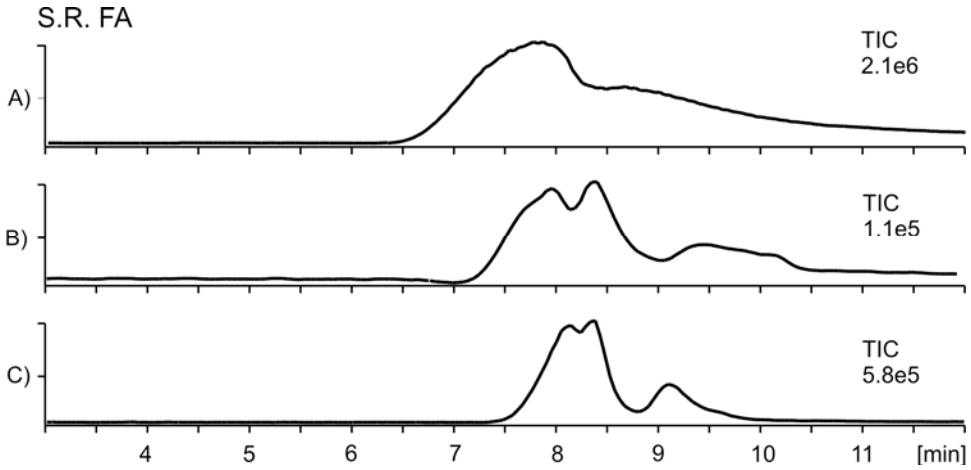

Abbildung 5: SEC-MS von Fulvinsäuren mit verschiedenen Eluenten

Wasser
80/20 v/v Wasser/Methanol + 10 mM NH_4COO
80/20 v/v Wasser/Methanol + 10 mM NH_4HCO_3

4.1 SEC-MS von Fulvinsäuren

Die Kopplung der SEC mit der Massenspektrometrie bringt, besonders angesichts der Komplexität der Probe, mehrere Vorteile mit sich:

1. Die Trennung der Probe nach der Molekülgröße schafft eine zusätzliche Dimension zur Massenspektrometrie. Sie erhöht deren Informationsgehalt und erleichtert eine Unterscheidung zwischen Fragment-Ionen und Molekül-Ionen (Hunt und Sheil 1998; Reemtsma und These 2003).
2. Durch die zeitliche Auftrennung der Analyten wird die Konkurrenz um die Ladung im Ionisationsprozess verringert. Vor allem hochmolekulare Stoffe, die schwer zu ionisieren sind, sollten somit effizienter ionisiert werden (Stenson et al. 2002).
3. Anorganische Verunreinigungen wie Salze können teilweise von den organischen Analyten getrennt werden.

4. Der Zusatz von NH4HCO3 unterdrückt die Bildung von Mehrfachladungen und Na-Addukten, wodurch die Komplexität des Spektrums verringert (Kujawinski 2002).

Abbildung 6 A) zeigt ein typisches SEC-MS Chromatogramm eines Fulvinsäure-Isolates und Abbildung 6 B) das dazugehörige UV Chromatogramm.

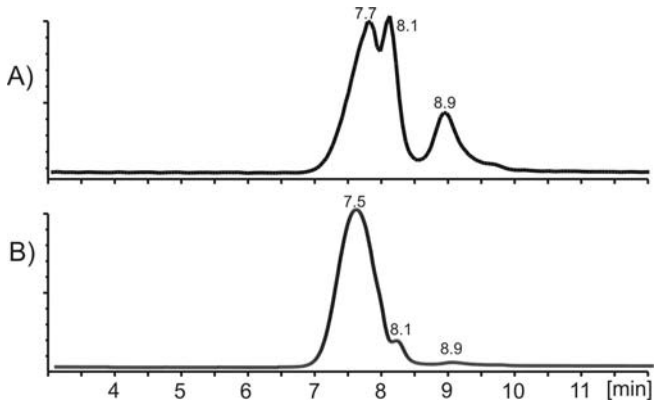

Abbildung 6: A) SEC-MS scan von m/z 150-750
B) SEC-UV scan von 200-600 nm

Durch die SEC wird das Fulvinsäure-Isolat in drei Fraktionen getrennt, deren Intensitätsmaxima im SEC-MS scan (Abbildung 6 A) bei Rt = 7.7, 8.1 und 8.9 min liegen. Betrachtet man die zu den jeweiligen Fraktionen gehörigen Spektren (Abbildung 7), werden unterschiedliche wellenartige Intensitätsverteilungen sichtbar. Die früh eluierende Fraktion bei Rt = 7.7 min, in der sich der hochmolekulare Anteil der Fulvinsäuren befindet, zeigt drei ausgeprägte Intensitätsmaxima bei etwa m/z 250, 550 und 950. Die mittlere Fraktion bei Rt = 8.1 min zeigt nur zwei dieser Intensitätsmaxima, bei 250 und bei 550 Da. Die spät eluierende Fraktion bei Rt = 8.9 min hat nur noch ein ausgeprägtes Maximum bei m/z 250. Bedenkt man, dass die SEC nach Molekülgröße trennt, müssen die Signale bei kleinen m/z Werten im Spektrum der hochmolekularen Fraktion (Rt = 7.7 min bzw. 8.1 min) als Fragmentationen interpretiert werden. Diese werden durch „in-source“ Fragmentation der hochmolekularen Stoffe beim Ionisationsprozess gebildet.

Die durch den Zerfall der hochmoleklaren Stoffe entstehenden Untereinheiten zeigen die gleiche Intensitätsverteilung und die gleichen Intensitätsmaxima wie die Spektren der niedermolekularen Fraktion. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass Fulvinsäuren polymerartige Strukturen besitzen. Die hochmolekularen Stoffe der Fulvinsäuren werden mutmaßlich aus kleineren Untereinheiten der niedermolekularen Fulvinsäuren geformt (Reemtsma und These 2003).

Diese These kann später durch den Einsatz der hochauflösenden Massenspektrometrie unterstützt werden. Mit deren Hilfe wird gezeigt, dass es sich bei gleichen m/z Werten in

unterschiedlichen Fraktionen um identische exakte Massen handelt (Abbildung 29), die weiterhin das gleiche Fragmentationsverhalten aufzeigen (nicht gezeigt).

In den UV-Spektren kann ein unterschiedliches Absorptionsverhalten der drei Fraktionen beobachtet werden. Die niedermolekulare Fraktion (Rt = 8.9 min) absorbiert bis 300 nm, die mittlere Fraktion (Rt = 8.1 min) bis 400 nm und die hochmolekulare Fraktion (Rt = 7.7 min) absorbiert bis 550 nm. Dies macht deutlich, dass die bei hohen Huminstoffkonzentrationen beobachtete Gelbfärbung durch die hochmolekulare Fraktion hervorgerufen wird.

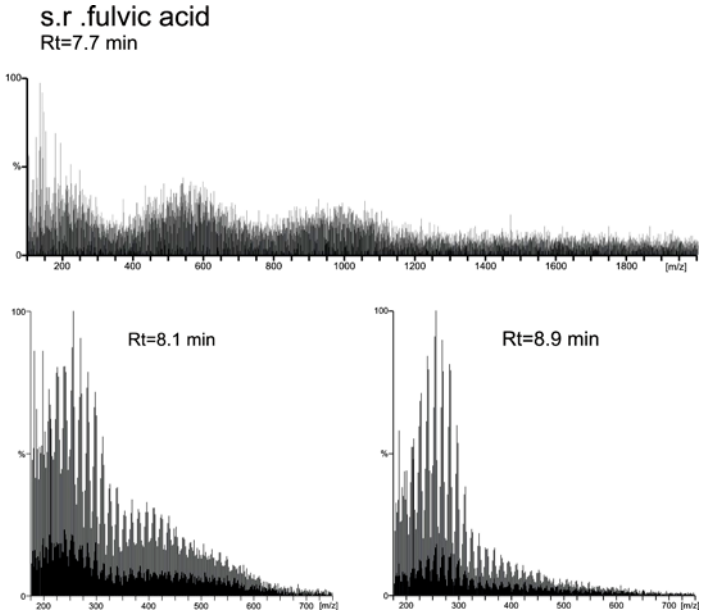

Abbildung 7: Spektren der drei SEC-MS Fraktionen aus Abbildung 6.

Betrachtet man das UV-Chromatogramm und das MS-Chromatogramm (Abbildung 6), werden signifikante Unterschiede ersichtlich. Die MS Detektion erfasst bevorzugt den niedermolekularen Anteil der Fulvinsäuren. Außerdem ist zu beobachten, dass das UV-Chromatogramm bei früheren Retentionszeiten beginnt.

4.2 Bestimmung von Grenzen bei der massenspektrometrischen Detektion von Fulvinsäuren

Um abzuschätzen, wie groß der Anteil der Probe ist, der bei den gewählten Detektionsbedingungen mit der Massenspektrometrie nicht erfasst wird, ist der Vergleich mit der UV-Messung nicht geeignet. Zum einen muss nicht jeder Stoff im Fulvinsäure-Isolat UV aktiv sein, zum anderen kann sich der UV Response innerhalb einer Probe stark unterscheiden. Ein absolutes Maß für die Menge an organischem Material, das von der Säule eluiert, bietet

die Kohlenstoffdetektion (Huber und Frimmel 1994). Aus diesem Grund musste eine Methode entwickelt werden, die es erlaubt, Chromatogramme der Massenspektrometrie mit Chromatogrammen der organischen Kohlenstoffdetektion zu vergleichen.

4.2.1 Online Kopplung der SEC mit der Kohlenstoffdetektion

Werden in einem chromatographischen System zwei Detektoren benötigt, so werden diese entweder parallel oder in Reihe gekoppelt. Keine der beiden Möglichkeiten konnte in diesem Fall genutzt werden. Eine gute chromatographische Trennung mittels SEC ist nur bei Zusatz von Salzen möglich. Für die Detektion mittels Massenspektrometrie muss ein flüchtiges Salz gewählt werden. Die Kohlenstoffdetektion verlangt einen kohlenstofffreien Eluenten. Ein flüchtiges Salz, das keinen Kohlenstoff enthält, gibt es aber nicht. Eine parallele Kopplung der Massenspektrometrie mit der Kohlenstoffmessung war deshalb nicht möglich, und die SEC musste mit zwei verschiedenen Eluenten durchgeführt werden. Zwei unterschiedliche chromatographische Systeme sollten aber Unterschiede bei der Trennung hervorrufen, was die Vergleichbarkeit des MS- mit dem OCD-Chromatogramm beeinträchtigt. Somit musste eine Methode gefunden werden, die es erlaubt, die beiden Systeme aufeinander abzugleichen.

Hierfür wurde sowohl vor die MS-Messung als auch vor die Kohlenstoffdetektion ein UV-Detektor gekoppelt. Über die erhaltenen UV-Chromatogramme wurde ein Abgleich der beiden Messsysteme vorgenommen. Somit gab es zwei unterschiedliche Messsysteme mit vier unterschiedlichen Detektoren: SEC-UV_{MS}-MS und SEC-UV_{OCD}-OCD. Abbildung 8 zeigt einen schematischen Aufbau der beiden Systeme.

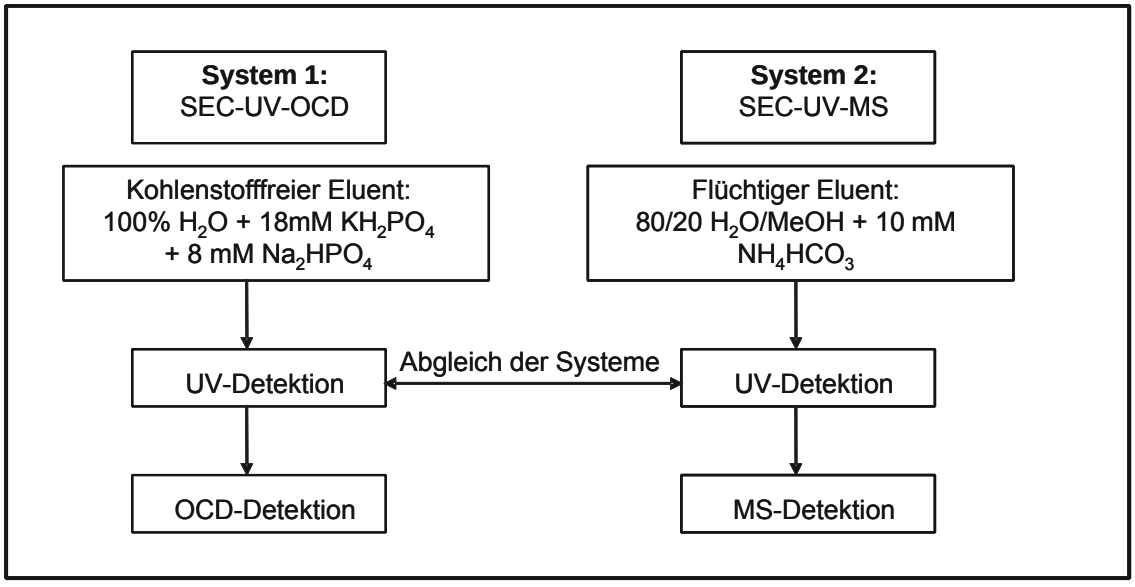

Abbildung 8: Indirekte Kombination der organic carbon detection (OCD) mit der Massenspektrometrie (MS)

Um einen korrekten Abgleich der beiden Systeme vornehmen zu können, wurden verschiedene Standardsubstanzen (Polystyrolsulfonsäuren (PSS), aromatische Carbonsäuren, Fulvinsäuren (SRFA), Huminsäuren (SRHA) und Ligninsulfonsäuren (LSS)) mit beiden Systemen vermessen.

Die Grundvoraussetzung für die Kopplung beider Systeme ist die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen chromatographischen Trennungen. Abbildung 9 zeigt, dass diese zwar nicht identisch ist, aber ein linearer Zusammenhang in der Retentionszeit (Korrelationskoeffizient: 0.9959, n = 9) beider Systeme besteht.

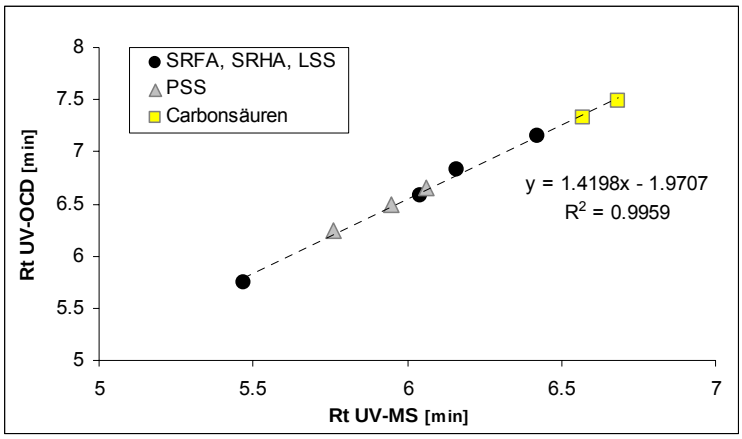

Abbildung 9: Trennung von Standardsubstanzen mit unterschiedlichen chromatographischen Systemen.

Dieser kann mit der folgenden Gleichung beschrieben und zur Transformation der UV_{MS}-Zeiten in UV_{OCD}-Zeiten genutzt werden.

$$R_{t,UV}[OCD] = R'_{tUV}[MS] = R_{tUV}[MS] \times 1.4198 - 1.9707 \quad \text{(Schritt 1b in Abbildung 10)}$$

Die Totvolumina zwischen den UV-Detektoren und den jeweils folgenden Detektoren (MS bzw. OCD) bewirken einen jeweils konstanten Zeitversatz und können mit den folgenden Gleichungen beschrieben werden:

Für die MS Messung:

$$R_{t,UV}[MS] = R'_{t,MS} = R_{t,MS} - 0.13\,(\min) \quad \text{(Schritt 1a in Abbildung 10)}$$

Für die OCD Messung:

$$R'_{t,OCD} = R_{t,OCD} - 2.08\,(\min) \quad \text{(Schritt 2a in Abbildung 10)}$$

Abbildung 10 illustriert, dass ein weiterer Faktor die Vergleichbarkeit der Daten erschwerte. Die Messung des organischen Kohlenstoffs erfordert chemische Reaktionen und physikochemische Prozesse, die in einem Reaktor stattfinden, der ein vergleichsweise großes Volumen besitzt. Dies führt zu einer Peakverbreiterung des OCD Signals, welche für die abfallende Flanke des Peaks viel stärker ist, als für die ansteigende Flanke. Die durchschnittliche Peakverbreiterung des OCD-Signals, verglichen mit dem UV-Signal, wurde für die ansteigende und die abfallende Flanke für sieben Standardsubstanzen bestimmt. Daraus

wurde je ein Durchschnittsfaktor ermittelt, der diese Peakverbreiterung kompensieren sollte (Schritt 2b in Abbildung 10).

Für die ansteigende Flanke:

$$R_{t,UV}[_{OCD}] = R''_{t,OCD} = R'_{t,OCD,\max} - \left(R'_{t,OCD,\max} - R'_{t,OCD}\right) \times 0.62\,(\min)$$

Für die abfallende Flanke:

$$R_{t,UV}[_{OCD}] = R''_{t,OCD} = R'_{t,OCD,\max} - \left(R'_{t,OCD,\max} - R'_{t,OCD}\right) \times 0.13\,(\min)$$

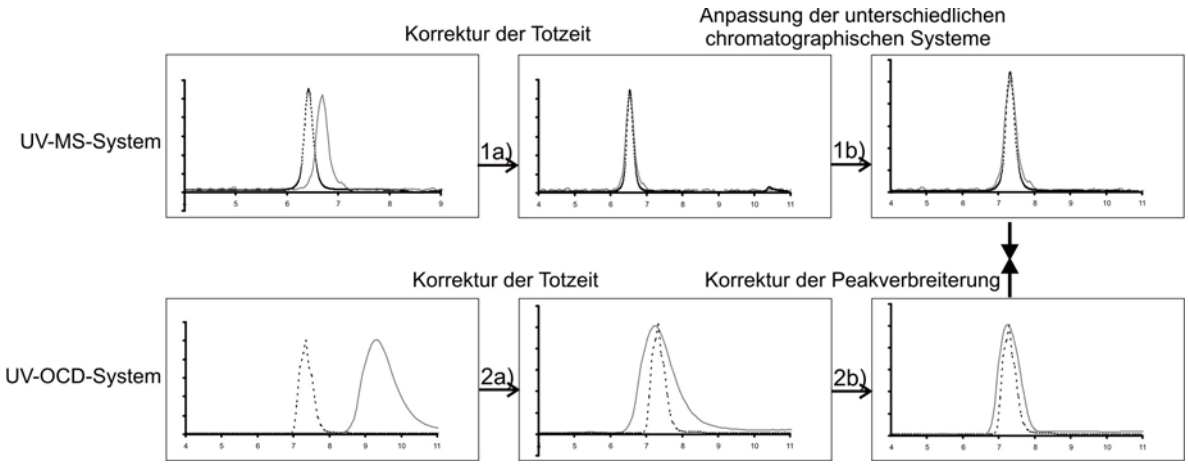

Abbildung 10: Abgleich der unterschiedlichen chromatographischen Systeme.

Auf diesem Wege ist es möglich, die beiden Messsysteme zu kombinieren und SEC-OCD-Chromatogramme von Proben mit deren SEC-MS-Chromatogrammen zu vergleichen (Abbildung 10).

Derselbe Abgleichprozess wurde mit den MS- bzw. OCD-Chromatogrammen der Fulvinsäure-Probe durchgeführt (Abbildung 11). Betrachtet man die UV-Spuren des OCD- und des MS-Systems nach der Korrektur, wird ersichtlich, dass diese aufeinander liegen, so dass von einem erfolgreichen Abgleich der Systeme ausgegangen werden kann (These und Reemtsma 2003). Die zugehörigen MS- bzw. OCD-Spuren zeigen aber Intensitätsmaxima bei unterschiedlichen Retentionszeiten (Abbildung 11).

Das Intensitätsmaximum des MS-Chromatogramms liegt bei späteren Elutionszeiten. Die früh eluierenden Stoffe werden mit dem Massenspektrometer überhaupt nicht erfasst. Diese Beobachtungen zeigen, dass mittels ESI-MS Substanzen mit kleinem Molekulargewicht effektiver erfasst werden. Ein

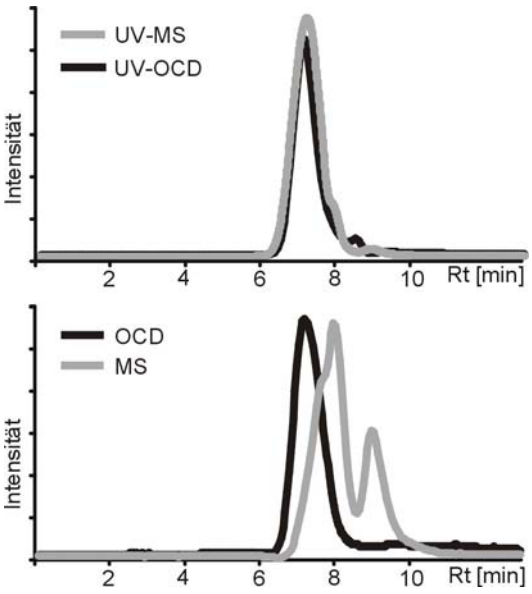

Abbildung 11: Chromatogramme des SRFA Standards gemessen mit SEC-UV_{OCD}-OCD (schwarz) und SEC-UV_{MS}-MS (grau). Der Scan erfolgte im Massenbereich m/z 150-750 mit CV 20 V.

Grund könnte sein, dass die einfach geladenen Anionen der hochmolekularen Fraktion den erfassbaren Massenbereich des Detektors überschreiten und somit nicht mehr detektiert werden können. Die obere Massengrenze des Quadrupol-Detektors liegt bei 4 000 Da. Deshalb wurde unter variierenden massenspektrometrischen Bedingungen selektiv der hohe Massenbereich zwischen 1 500-4 000 Da vermessen. Es konnte jedoch unter keinen Bedingungen signifikante Signalintensitäten für diesen Massenbereich detektiert werden. Somit scheint der begrenzte Massenbereich des Detektors nicht für die schlechte Erfassung der früh eluierenden Fulvinsäuren verantwortlich zu sein.

4.2.1.1 Einfluss der Konus-Spannung auf das Chromatogramm

Ein wichtiger Parameter, der die Detektion von Stoffen mittels ESI-MS beeinflusst, ist die Konus-Spannung (CV). Nach der Ionisierung der Stoffe muss die Flugbahn der Analyten orthogonal in Richtung Detektor abgelenkt werden (3.2.1). Dies wird durch die Konus-Spannung realisiert. Dabei benötigen höhermolekulare Stoffe tendenziell eine höhere Konus-Spannung als niedermolekulare Stoffe. Bei der Analytik von Polymeren, wie z.B. Polyethylenglykolen (PEG), konnte gezeigt werden, dass höhere Homologe bei höheren Konus-Spannungen erfolgreicher detektiert werden konnten (Hunt et al. 1998). Die Autoren betonten, dass dieser Effekt nicht durch eine verbesserte Ionisierung, sondern durch verbesserte Ablenkung in Richtung des Massenspektrometers bewirkt wurde.

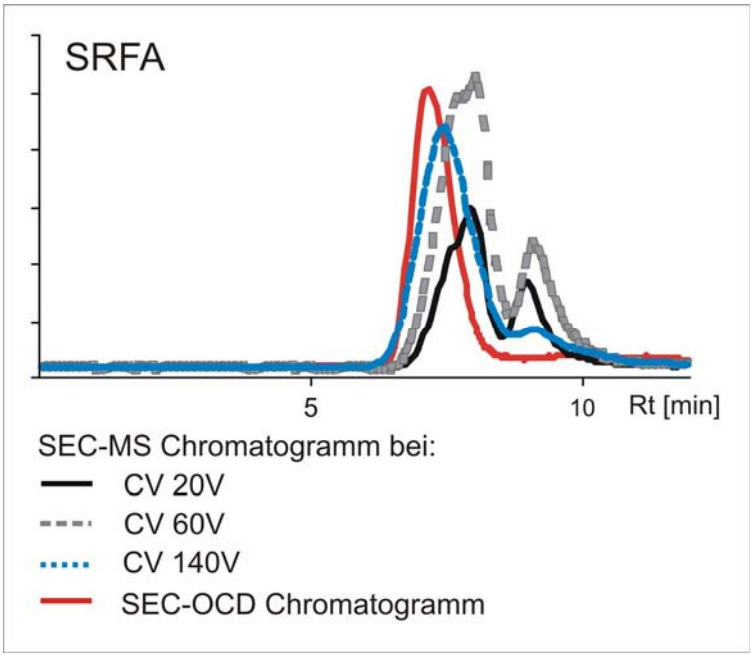

Abbildung 12: Abgeglichene SEC-OCD- und SEC-MS-Chromatogramme. Die MS-Chromatogramme wurden für einen Massenbereich von m/z 150-750 bei steigender CV 20, 60 und 140 V aufgenommen.

Dieser Effekt sollte sich auch auf die Analyse von Fulvinsäuren übertragen lassen. Somit wurde die Konus-Spannung für verschiedene Messungen schrittweise von 20 V auf 140 V erhöht. Dies führte zu einer Verschiebung des Peakmaximums bzw. des Peakbeginns in Richtung kürzerer Retentionszeiten (Abbildung 12). Bei Konus-Spannungen von 140 V überlappen das SEC-OCD und das SEC-MS Chromatogramm fast vollständig. Das zeigt, dass Substanzen der hochmolekularen Fraktion zuvor zwar hinreichend ionisiert werden, aber erst durch die nun gewählte hohe Konus-Spannung erfolgreich in Richtung Massenspektrometer abgelenkt werden.

Weiterhin ist zu beobachten, dass die Signalintensität der Chromatogramme mit zunehmender Konus-Spannung größer wird. Die höchste Intensität wird bei einer Spannung von 60 V erreicht. Eine weitere Erhöhung der Spannung auf z. B. 140 V lässt die Intensität des Totalionenstroms (TIC), also die Signalintensität des Chromatogramms wieder abnehmen. Ab einer bestimmten Konus-Spannung überwiegen Effekte wie Fragmentationen den positiven Effekt der verbesserten Ablenkung. Verglichen zur Signalintensität des Chromatogramms die bei 20 V erreicht wird, ist bei 140 V immer noch von einer verbesserten Ablenkung der Fulvinsäuren in Richtung des Massenspektrometers und somit von einer effektiveren Detektion der Fulvinsäuren auszugehen.

4.2.1.2 Einfluss der Konus-Spannung auf die Spektren

Die Ergebnisse des vorigen Abschnitts zeigten, dass eine Erhöhung der Konus-Spannung zu einer verbesserten Ablenkung der hochmolekularen Fulvinsäure-Moleküle in Richtung Detektor führt und diese dadurch der MS-Detektion zugänglich gemacht werden. Außerdem ist eine höhere Signalintensität der Analyten zu erwarten.

Diese Ansicht kann aber durch die Spektren, die bei den verschiedenen Konus-Spannungen aufgenommen werden, nicht bestätigt werden.

Mit der Erhöhung der Konus-Spannung wird auch die Energie des Hintergrundgases erhöht. Dies führt zu verstärkter „in source“ Fragmentation, die sich besonders auf labile Stoffe auswirkt (Hunt et al. 1998).

In den Fulvinsäure-Spektren der hochmolekularen Fraktion (Kapitel 4.1, Abbildung 7, S.20) wurde eine wellenartige Intensitätsverteilung der Ionen mit Maxima bei 250, 500 und 950 Da beobachtet. Diese Verteilung wurde als Summe der Anionen der hochmolekularen Stoffe und der von ihnen gebildeten Fragment-Ionen interpretiert. Da diese Fragmentationen bereits in der Quelle bei moderaten Konus-Spannungen auftreten, scheint es sich bei Fulvinsäuren um labile Verbindungen zu handeln, die zu Fragmentationen neigen. Diese Annahme wird durch die Spektren der Fulvinsäure, die bei den unterschiedlichen Konus-Spannungen

vermessen wurde, bestätigt. Abbildung 13 zeigt ein Spektrum der HMW-Fraktion bei 20 V und bei 140 V.

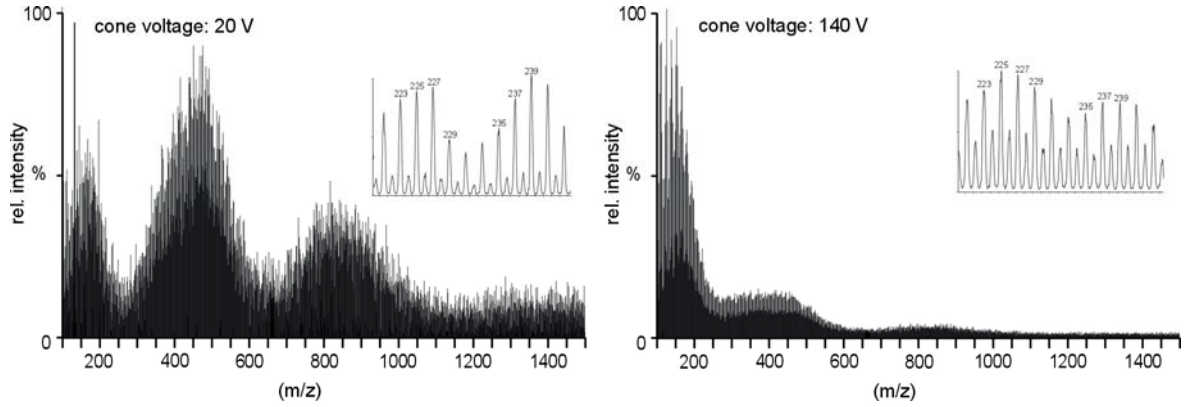

Abbildung 13: ESI-MS Spektren der hochmolekularen Fulvinsäure Fraktion bei einer Konus-Spannung von 20 V und 140 V. Die im Hintergrund eingefügten Spektren zeigen den vergrößerten Massenbereich von m/z 220-240. Sie verdeutlichen, dass die beobachtete Verschiebung der Spektren nicht durch eine Unterdrückung von Mehrfachladungen bei Erhöhung der Konus-Spannung hervorgerufen wird.

Eine sukzessive Erhöhung der Konus-Spannung führt nicht zu einer Zunahme der Intensitäten im hohen Massenbereich, sondern zu einer Zumnahme der Intensitäten im kleineren Massenbereich, da hochmolekularere Einheiten in ihre kleineren Untereinheiten zerfallen.

Abbildung 12 zeigt, dass eine Erhöhung der Konus-Spannung nicht nur zu einer optimierten Ablenkung der hochmolekularen Stoffe in Richtung Massenspektrometer führt, sondern sich auch die Signalintensität des Chromatogramms erhöht. Die höchste Intensität trat bei einer Konus-Spannung von 60 V auf. Durch eine separate Detektion bzw. Auswertung unterschiedlicher Massenbereiche wird sichtbar, dass die Zunahme der Intensität des Chromatogramms mit steigender Konus-Spannung hauptsächlich durch Ionen niedriger Masse bedingt ist (Abbildung 14).

Eine Erhöhung der Konus-Spannung führt zwar zu einer effektiveren Ablenkung hochmolekularer Stoffe ins Massenspektrometer, gleichzeitig wird aber eine verstärkte „in-source“ Fragmentation beobachtet. Das führt zur Detektion intensiver Ionen kleinen Molekulargewichts.

Mit den gewählten Bedingungen bzw. mit dieser Methode ist es somit kaum möglich intakte Molekül-Ionen hochmolekularer Fulvinsäuren zu detektieren. Allerdings geben auch Fragmente Auskünfte über Strukturen der Ausgangsverbindung. Die Informationen sind umso wertvoller, je einheitlicher das Fragmentationsmuster der Substanzen ist. Fragmentiert eine Substanzklasse in bekannten bzw. einheitlichen Mustern, kann allein über die Fragmente Rückschlüsse auf das Molekül-Ion gezogen werden. Dies trifft besonders im Fall der Fulvinsäuren zu (siehe 4.3.2).

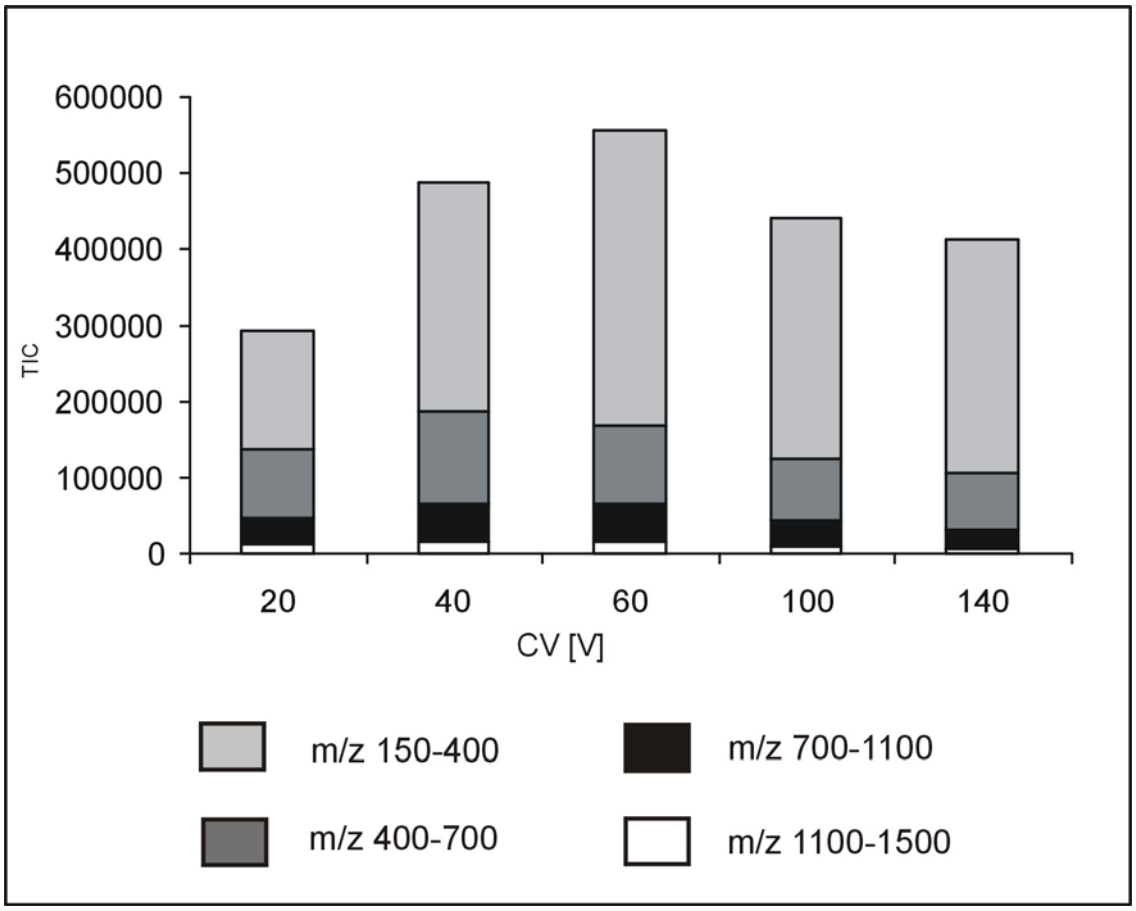

Abbildung 14: Intensitäten der Total Ionen Chromatogramme für Massenbereiche von 150-400 Da, 400-700 Da, 700-1100 Da und 1100-1500 Da bei einer Konus-Spannung, die sukzessiv von 20 V auf 140 V erhöht wurde.

4.2.1.3 Konsequenzen für die Bestimmung mittlerer Molekulargewichte

Sollen Molekulargewichte direkt mit der SEC bestimmt werden, muss die Säule extern kalibriert werden. Dabei treten aber bekannte Probleme auf, denn die SEC trennt nicht nach Molekulargewicht sondern nach dem hydrodynamischen Volumen. Das bedeutet, dass zwei Substanzen zwar das gleiche Molekulargewicht haben können, aber dabei verzweigte oder kettenartige Strukturen aufweisen können. Dadurch besitzen sie unterschiedliche hydrodynamische Volumina und eluieren somit zu verschiedenen Retentionszeiten von der Säule. Dies führt notgedrungen zu falschen Molekulargewichtsbestimmungen. Für die direkte Bestimmung des mittleren Molekulargewichts von Fulvinsäuren mittels SEC, kommt für deren Analytik erschwerend hinzu, dass es für Fulvinsäuren keine anerkannten Standards mit bekanntem Molekulargewicht gibt.

Hinsichtlich der mittleren Molekulargewichtsbestimmung von Fulvinsäuren scheint die Kopplung von SEC und Massenspektrometrie somit die optimale Methode zu sein, da mit der Massenspektrometrie die Masse des Analyten direkt detektiert wird. Die Kopplung von SEC und Massenspektrometrie wurde schon erfolgreich bei der Charakterisierung von Polymerge-

mischen genutzt (Nielen 1996; Nielen und Malucha 1997; Hunt und Sheil 1998; Aaserud et al. 1999; Nielen und Buijtenhuijs 1999).

Soll die Massenspektrometrie zur Bestimmung mittlerer Molekulargewichte eingesetzt werden, müssen folgende Punkte erfüllt sein:

a) Die Molekül-Ionen zeigen keine Fragmentationen in der Quelle.

b) Es werden nur einfach geladene Moleküle erzeugt oder mehrfach geladene Moleküle können verlässlich zugeordnet werden.

c) Der Signal-Response der einfach geladenen Moleküle ist massenunabhängig oder er ist eine bekannte Funktion der Masse (McEwen et al. 1995).

In dem vorliegenden Kapitel wurden für alle angewandten Konus-Spannungen eine Berechnung der mittleren Massenverteilung (*Mn*) und der mittleren Molekulargewichtsverteilung (*Mw*) nach:

$$Mn = \frac{\sum ni \times Mi}{\sum ni} \quad \text{und}$$

$$Mw = \frac{\sum ni \times Mi \times Mi}{\sum ni \times Mi}$$

durchgeführt, wobei *n* die Intensität und *M* die Masse des jeweiligen Ions ist.

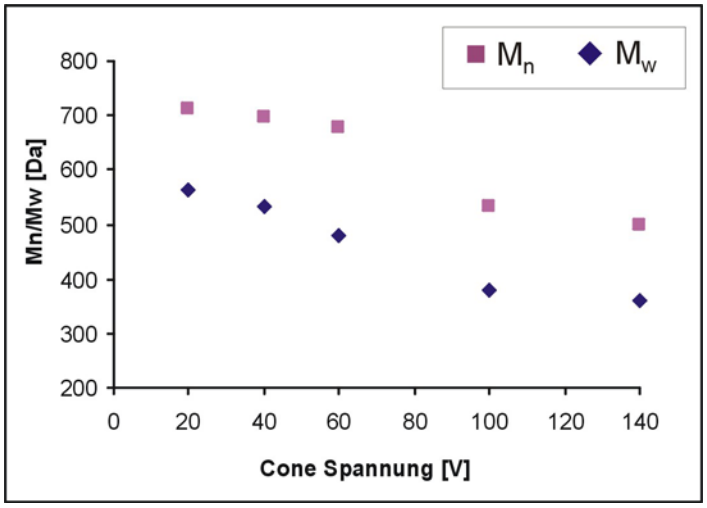

Abbildung 15: Berechnete mittlere Molekulargewichte (Mw) und mittlere Massenverteilungen (Mn) der HMW-Fraktion eines Fulvinsäurestandards bei unterschiedlichen Konus-Spannungen.

Abbildung 15 zeigt, dass beide Werte mit der Erhöhung der Konus-Spannung abnehmen. Dies spiegelt die zunehmende Fragmentation der Molekül-Ionen wider, so dass paradoxerweise das höchste durchschnittliche Molekulargewicht für Fulvinsäuren bei den Einstellungen im Massenspektrometer gefunden wird, die die geringsten Ionen-Intensitäten für die hochmolekulare Fraktion ergeben. Hiermit ist bewiesen, dass mindestens zwei Forde-

rungen für die Bestimmung von Molekulargewichten in Fulvinsäure-Isolaten nicht erfüllt sind, denn: 1) Die Molekül-Ionen zeigen Fragmentationen in der Quelle und 2) der Signal-Response ist eine Funktion der Masse und diese Funktion ist nicht bekannt.

Das bedeutet, dass die Intensitätsverteilung der Ionen im Spektrum der Fulvinsäuren für eine absolute Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung nicht genutzt werden kann. Werden aber in den Analysen gleiche Messbedingungen gewählt, kann diese Intensitätsverteilung der Ionen genutzt werden, um Veränderungen der Probe in ihrer Molekulargewichtsverteilung bei chemischen Prozessen zu verfolgen. Der Term „mittleres Molekulargewicht“ sollte daher bei einer Berechnung, der massenspektrometrischen Daten zugrunde liegen, eher in „mittlere Ionenintensität“ (In) umbenannt werden (siehe Kapitel 6.1.3).

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass es Schwierigkeiten hinsichtlich der Detektion von Fulvinsäuren mittels ESI-MS gibt. Diese sind für den hochmolekularen Anteil der Substanzklasse stärker ausgeprägt. Darum können Fulvinsäure-Moleküle hohen Molekulargewichts mittels ESI-MS entweder nur mit geringer Intensitäten erfasst oder Fragmente von ihnen detektiert werden.

4.3 Genauere Charakterisierung des Aufbaus von Fulvinsäuren

4.3.1 Bestimmung von Summenformeln niedermolekularer Fulvinsäuren

Um Aussagen über die Feinstruktur im Spektrum von Fulvinsäuren machen zu können, muss ein kleiner Massenbereich genauer betrachtet werden (Abbildung 16). Hier werden zwei Muster deutlich.

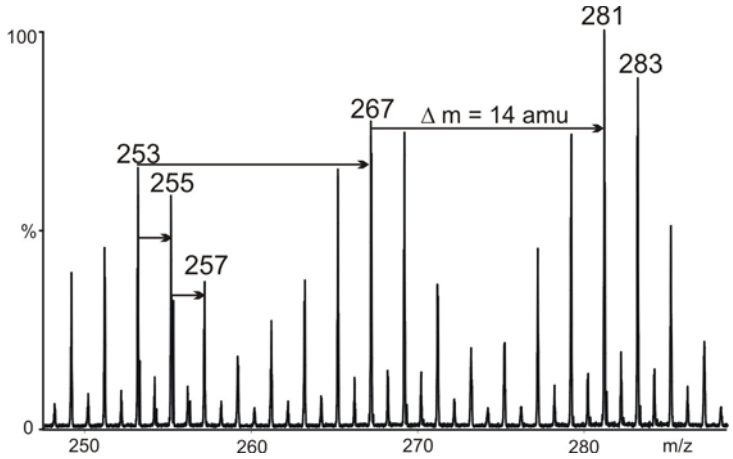

Abbildung 16: vergrößerter Massenbereich eines SEC-Q-TOF-MS Spektrums von m/z 249-287.

Erstens sind im 2 Da Abstand die intensivsten Signale zu finden. Das liegt daran, dass der Hauptanteil der Fulvinsäuren nur aus Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff besteht.

Alle organischen Moleküle dieser Zusammensetzung haben gerade nominelle Molekülmassen. Das im Elektrospray gebildete Molekül-Anion $[M-H]^-$ bzw. –Kation $[M+H]^+$ erscheint demzufolge bei ungeraden m/z Werten. Gerade m/z Werte werden nur durch Moleküle mit einer ungeraden Anzahl an Stickstoff im Molekül besetzt bzw. durch den ^{13}C Isotopenpeak der organischen Moleküle erzeugt. Da der elementare Stickstoffanteil im Fulvinsäuregemisch nur 0.7 % beträgt und das ^{13}C Isotop nur ca. 1 % des ^{12}C Kohlenstoffs ausmacht, ist die Intensität der geradzahligen m/z Werte natürlich deutlich geringer.

Zweitens findet man eine wellenartige Intensitätsverteilung, die ein ausgeprägtes Maximum bei jeder 14ten Masse hat. Dieses Maximum ist über einen weiten Massenbereich reproduzierbar und immer auf denselben Massen lokalisiert, wie in diesem Fall m/z 253, 267 bzw. 281. Die gezeigten Muster in den Spektren von Fulvinsäuren wurden bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (McIntyre et al. 1997; Leenheer et al. 2001; Plancque et al. 2001).

Um die Strukturen der Fulvinsäuren genauer zu charakterisieren, ist es wichtig, die Summenformeln der niedermolekularen Fulvinsäure-Monomere zu bestimmen.

Durch den Einsatz von Fourier Transformation Ion Cyclotron Resonanz Spektroskopie (FTICR) wurde gezeigt, dass jede nominelle Masse (Masse ohne Nachkommastelle) im Fulvinsäure-Spektrum mit mehreren isobaren Molekül-Ionen (Moleküle, die die gleiche ganzzahlige Masse besitzen) besetzt ist (Kujawinski et al. 2002a; Kujawinski et al. 2002b; Stenson et al. 2002; Stenson et al. 2003). Um isobare Ionen voneinander zu trennen und ihre Masse zu bestimmen, muss das verwendete Massenspektrometer sowohl eine hohe Massenauflösung als auch eine hohe Massenpräzision besitzen.

Für die Bestimmung der exakten Massen wurde ein Q-TOF-MS verwendet, das in zwei verschiedenen Modi benutzt werden konnte (These et al. 2004). Im so genannten V-Modus wurde eine Auflösung von 9 000 erreicht. Durch das Umschalten in den W-Modus wird die Flugstrecke der Ionen verlängert und die Auflösung auf 12 000 erhöht. Die höhere Auflösung hat den Nachteil, dass die Empfindlichkeit der Messung um etwa ein Drittel zurückgeht.

Die erreichte Auflösung erlaubte, bis zu fünf isobare Ionen voneinander zu unterscheiden und exakte Massen zu bestimmen.

Die exakte Masse kann dann dazu benutzt werden, Summenformeln zu bestimmen. Problematisch bei den Messungen war die geringe und noch dazu unterschiedliche Empfindlichkeit der Analyten. Für eine exakte Massenbestimmung sollte das Signal eine Intensität von mindestens 100 counts haben und 500 counts nicht übersteigen (Wolff et al. 2003). Hierbei kann eine gute Peakform erreicht werden und eine Sättigung des Detektors vermieden werden. Durch die wellenartige Intensitätsverteilung der Analyten im Spektrum können die Signalintensitäten zwischen Minimum und Maximum um mehr als eine Größenordnung schwanken (siehe Abbildung 16). Auch die Signalintensitäten der isobaren Ionen

sind unterschiedlich. Somit ist die Massenbestimmung mit einem Fehler verbunden, der sicherlich für Moleküle in den Intensitätsminima größer ist.

Aus den genannten Gründen war es notwendig, potentielle Fehler der Massendetektion zu bestimmen. Da alle Analyten innerhalb des Fulvinsäuregemisches unbekannt sind, kann die Genauigkeit der detektierten Massen nicht experimentell ermittelt werden.

Leichte Temperaturschwankungen können zu einer Verschiebung der Massenkalibration des TOF-Massenspektometers führen. Für die durchgeführten Messungen bestand die Möglichkeit, zur Korrektur die „Lock-Spray“ Technologie zu benutzen. In diesem Fall werden pro Messung zwei separate Chromatogramme erzeugt. Ein geringer Teil der Messzeit wird verwendet um parallel das Chromatogramm einer Referenz-Substanz bekannter Masse aufzunehmen. Dann kann dieses Referenz-Chromatogramm bzw. -Spektrum genutzt werden, eventuelle Verschiebungen der Massenachse auszugleichen und jedes einzelne Spektrum zu rekalibrieren (Eckers et al. 2000; Jiang und Moini 2000; Colombo et al. 2004).

Um den Einfluss anderer Messparameter auf die Genauigkeit der Messung abzuschätzen, werden folgende Parameter variiert und die dadurch erhaltenen exakten Massen miteinander verglichen: a) es werden verschiedene Lock-Massen für die Rekalibration des

Tabelle 1: Bestimmung der exakten Massen für einen SRFA Standard mittels Q-TOF-MS; angegeben sind absolute Fehler und die relative Standardabweichung für den Massenbereich m/z 293-305 (n = 5)

Mittlere bestimmte Masse	Standardabweichung [mDa]	Standardabweichung [ppm]	Theoretische Masse	Differenz von der mittleren bestimmten Masse [mDa]	Differenz von der mittleren bestimmten Masse [ppm]
293.0665	2.6	8.8	293.0661	0.3	1.2
293.1046	2.7	9.2	293.1025	2.1	7.2
293.1381	3.5	12.1	293.1389	-0.9	-2.9
295.0480	2.9	9.7	295.0454	2.6	8.8
295.0800	2.3	7.7	295.0818	-1.8	-6.2
295.1184	1.8	6.1	295.1182	0.2	0.6
295.1517	2.0	6.7	295.1545	-2.8	-9.5
297.0597	2.9	9.6	297.0610	-1.3	-4.3
297.0993	1.5	5.2	297.0974	1.9	6.4
297.1329	2.0	6.7	297.1338	-0.9	-3.0
299.0780	2.5	8.5	299.0767	1.3	4.2
299.1111	1.9	6.3	299.1131	-2.0	-6.7
299.1503	2.9	9.7	299.1495	0.8	2.6
301.0946	3.4	11.3	301.0927	1.9	6.2
301.1293	2.9	9.6	301.1287	0.6	2.1
303.0553	2.7	8.8	303.0505	4.8	15.9
303.0894	4.3	14.3	303.0869	2.5	8.1
303.1233	1.9	6.4	303.1232	0.1	0.4
303.1679	1.8	6.0	303.1596	7.8	25.6
305.0665	2.3	7.7	305.0661	0.3	1.1
305.1017	1.7	5.5	305.1025	-0.8	-2.5
305.1395	2.6	8.4	305.1389	0.6	2.1

Spektrums benutzt, b) die Anzahl der Einzelscans zur Erzeugung eines Spektrums wird variiert, c) wiederholt durchgeführte SEC-MS Messungen werden miteinander verglichen.

Aus diesen Variationen ergeben sich fünf verschiedene Experimente. In dem gewählten Massenbereich (m/z 293-305) werden pro Experiment jeweils die exakten Massen von 50 Ionen bestimmt. Die absoluten Fehler und die relative Standardabweichung zur theoretischen Masse (aus Tabelle 2) und zur mittleren bestimmten Masse sind in Tabelle 1 aufgeführt. Trotz Variation verschiedener Parameter weisen die erhaltenen Ergebnisse eine gute Übereinstimmung auf und der Fehler ist auch in den Regionen geringer Signalintensität nie größer als 8 mDa (25 ppm).

Die bestimmten exakten Massen können dann zur Bestimmung von Summenformeln genutzt werden. Als Sicherheit wird für die Berechnung der Summenformeln ein Massenfehler von 25 mDa zugelassen. Weitere Einschränkungen für die Kalkulation sind, dass mindestens vier Kohlenstoffatome und zwei Sauerstoffatome im Molekül sein sollten. Für die gewählten Bedingungen werden durch die Software zwischen vier und sechs mögliche Summenformeln vorgeschlagen. Davon ist nicht jede Formel chemisch sinnvoll. Einige stellen rechnerische Kombinationen dar, aber es wäre niemals möglich, Strukturen solcher Verbindungen zu zeichnen.

Kürzlich wurden Suwannee River Fulvinsäuren mittels FTICR untersucht. Bei diesen Messungen konnten 4 600 Summenformeln in einem Massenbereich zwischen 320 und 1 100 Da bestimmt werden. Dabei war es möglich, diese 4 600 Summenformeln 266 homologen Reihen zuzuordnen (Stenson et al. 2003). Die Autoren erkannten, dass es sinnvoll ist, die detektierten nominellen Massen in z*-Werte einzuteilen. Dieser z*-Wert war ursprünglich für die Bestimmung homologer Reihen in Kohlenwasserstoffgemischen angewandt worden (Hsu et al. 1992) und wird wie folgt berechnet:

$$z^* = \left(\text{Rest} \frac{\text{NM}}{14} \right) - 14$$

Dabei ist NM die nominelle Masse der jeweiligen Moleküle.

Des Weiteren fanden Stenson et al., dass gibt es für jede Summenformel der Fulvinsäuren mit einem zugehörigen z*-Wert nur zwei mögliche Differenzen zwischen der Anzahl der Doppelbindungsäquivalente und der Anzahl der Sauerstoffatome im Molekül gibt:

$$DBE - O = -0.5 \times z^* + 1$$

$$DBE - O = -0.5 \times z^* - 6$$

wobei DBE die Anzahl der Doppelbindungsäquivalente und O die Anzahl der Sauerstoffatome im Molekül ist (Stenson et al. 2003).

Da organische Moleküle, die aus Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff bestehen, immer geradzahlige Molmassen haben, kann z* nur geradzahlige Werte annehmen, die

zwischen -14 und -2 variieren. Weiterhin bedeutet dies, dass jede 14te Masse den gleichen z*-Wert besitzt (Abbildung 17).

Die „DBE-O“-Regel scheint aber nicht nur für Fulvinsäure-Moleküle zuzutreffen. Vielmehr scheint sie sich aus den Bindungsprinzipien organischer Moleküle zu ergeben. Vorausgesetzt, ihre Summenformeln enthalten nur Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff und bewegen sich innerhalb eines bestimmten O/C- bzw. H/C-Verhältnisses.

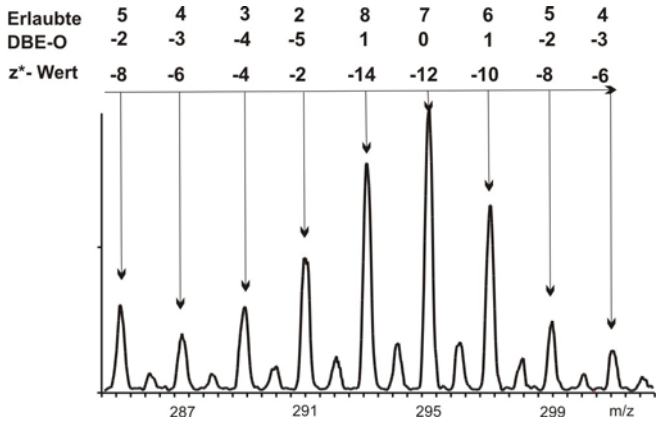

Abbildung 17: z* und korrespondierende DBE-O Differenzen für einen Massenbereich von m/z 265-301

Durch die Anwendung dieser Regel ist es möglich, die Summenformeln, die sich rein rechnerisch ergeben, chemisch aber nicht sinnvoll sind, von der vorgeschlagenen Liste zu streichen [Tabelle 2].

Tabelle 2: Mittels Masslynx Software vorgeschlagene Summenformeln $[M-H]^-$ am Beispiel von m/z 255.1221

Masse	Kalk. Masse	mDa	ppm	DBE	Formel	DBE-O	möglich
255.1221	255.1232	-1.1	-4.5	4.5	C13 H19 O5	-1	+
	255.1080	14.1	55.3	0.5	C9 H19 O8	-8	- [a]
	255.1385	-16.1	-64.3	8.5	C17 H19 O2	+6	- [b]
	255.1021	20.0	78.3	9.5	C16 H15 O3	+6	- [b]

[a] nicht erlaubt aufgrund falscher DBE-O Differenzen
[b] erlaubte DBE-O Differenzen, aber ausgeschlossen durch MS/MS Daten

Bis auf einen Vorschlag haben die verbleibenden möglichen Vorschläge an Summenformeln einerseits einen sehr großen Massenfehler und können andererseits durch MS/MS Experimente ausgeschlossen werden. Aus der Anzahl an Decarboxylierungsschritten (siehe 4.3.2) wird ersichtlich, dass die Anzahl der Sauerstoffatome in einigen Summenformeln zu gering ist [Tabelle 3]. Nach diesen Auswahlkriterien werden die Summenformeln für alle exakten Massen der niedermolekularen Fulvinsäurefraktion bestimmt.

Dadurch ist es möglich, 300 Summenformeln in einem Massenbereich zwischen 150 und 340 Da zu bestimmen (siehe Abbildung 54 und Abbildung 55 im Anhang S.101) (These et al. 2004).

Eine unabhängige Absicherung der bestimmten Summenformeln kann über einen Vergleich der Ergebnisse aus den FTICR-Messungen vorgenommen werden (Stenson et al. 2003). Im Massenbereich zwischen m/z 320 und m/z 345 tritt eine Überlappung von 16 Summenformeln auf. Diese wurden in beiden Untersuchungen unabhängig voneinander ermittelt und stimmen überein.

4.3.2 Bestimmung von Strukturmerkmalen mittels MS/MS

Die Bestimmung der Strukturmerkmale erfolgt mittels Q-TOF-MS. Dabei wird das Quadrupol-Massenspektrometer zur Selektion der zu fragmentierenden Masse genutzt. Die Auflösung des Quadrupol Massenfilters ist nicht hoch genug, um isobare Moleküle aufzulösen. Das bedeutet, dass die Fragmente aller isobaren Moleküle gleichzeitig im Produkt-Ionen-Spektrum detektiert werden. Wird bei der Messung eine Kollisionsenergie angewendet, die sowohl eine hohe Intensität der Molekül-Ionen als auch der Produkt-Ionen garantiert, dann können die exakten Massen der Molekül- und der Produkt-Ionen bestimmt werden (Abbildung 18). Die Massengenauigkeit des TOF-Gerätes ist hoch genug, um über die Differenz dieser exakten Massen das Fragmentationsmuster jeder einzelnen Fulvinsäure nachzuvollziehen. In Tabelle 3 ist das Fragmentationsmuster der Anionen mit m/z 297 abgebildet. Alle untersuchten Moleküle zeigen das gleiche Fragmentationsverhalten. Es erfolgt eine sukzessive Abspaltung von Wasser (-18.0106 Da) und Kohlenstoffdioxid (-43.9898 Da) (Abbildung 18).

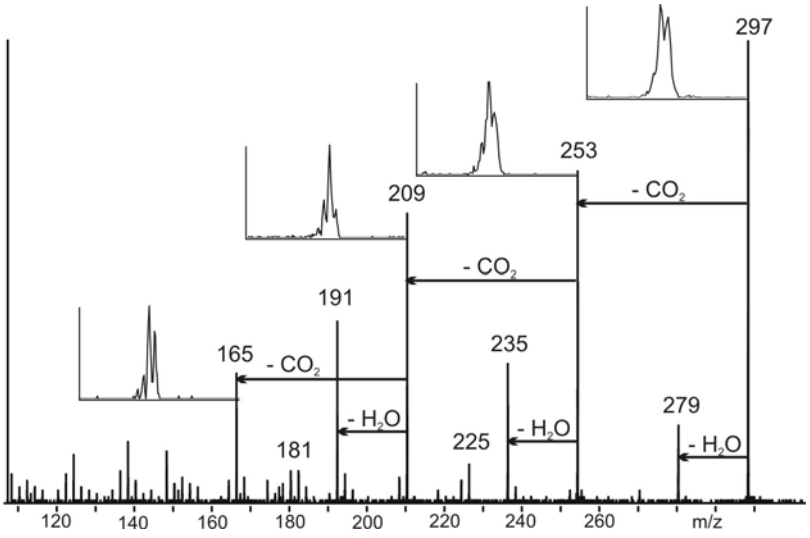

Abbildung 18: Mittels Q-TOF-MS bestimmtes Produkt-Ionen-Spektrum der $[M-H]^-$ Ionen mit m/z 297. Eingefügt sind die vergrößerten Spektren der Molekül-Ionen und ausgewählter Produkt-Ionen

Die Fragmentationen enden bei Produkt-Ionen, die ein oder maximal zwei Sauerstoffatome enthalten. Diese Sauerstoffatome sind notwendig, um die negative Ladung zu stabilisieren. Wäre eine eventuelle weitere Fragmentation mit dem Verlust von Sauerstoff verbunden, ist dieser mittels ESI-MS kaum detektierbar. Der nach der Fragmentation verbleibende defunktionalisierte Kern stellt das „Kohlenstoffgrundgerüst" der Fulvinsäuren dar.

Das beobachtete einheitliche Fragmentationsverhalten dieser drei isobaren Ionen macht deutlich, dass die strukturellen Unterschiede der einzelnen Moleküle hauptsächlich in diesem „Kohlenstoffgrundgerüst" zu finden sind.

Tabelle 3: Mittels Q-TOF-MS bestimmte Produkt-Ionen der isobaren Anionen mit m/z 297. Der angegebene Massen-Fehler ist der Fehler zur exakten Masse des abgespaltenen Fragments.

Summenformel (DBE)	Kalk. Masse	Massen Differenz	Massen-Fehler (mDa)	Abgespaltenes Fragment	Summenformel des Produkt-Ions (DBE)
C13 H13 O8 (7)	297.0610				
		-87.9691	10.6	$[M-H-2xCO_2]^-$	C11H13O4 (5)
		-131.9653	4.2	$[M-H-3xCO_2]^-$	C10H13O2 (4)
C14 H17 O7 (6)	297.0974				
		-43.9902	-0.4	$[M-H-CO_2]^-$	C13H17O5 (5)
		-62.0056	-5.2	$[M-H-CO_2-H_2O]^-$	C13H15O4 (6)
		-87.9859	-6.2	$[M-H-2xCO_2]^-$	C12H17O3 (4)
		-106.0008	-10.5	$[M-H-2xCO_2-H_2O]^-$	C12H15O2 (5)
		-131.9808	-11.3	$[M-H-3xCO_2]^-$	C11H17O (3)
C15 H21 O6 (5)	297.1338				
		-18.0113	-0.7	$[M-H-H_2O]^-$	C15H19O5 (6)
		-43.9853	4.5	$[M-H-CO_2]^-$	C14H21O4 (4)
		-61.9962	4.2	$[M-H-CO_2-H_2O]^-$	C14H19O3 (5)
		-87.9787	1.0	$[M-H-2xCO_2]^-$	C13H21O2 (3)
		-105.9895	0.8	$[M-H-2xCO_2-H_2O]^-$	C13H19O (4)

Die mehrfachen Verluste von CO2 zeigen, dass der Hauptteil der Sauerstoffatome in Carbonsäuregruppen lokalisiert ist. Polycarbonsäuren tendieren zur Abspaltung von Wasser durch die Bildung von Anhydriden (Leenheer et al. 2003a). Das ist möglicherweise die Erklärung für die ersten Wasserabspaltungen, kann aber nicht für alle gelten. Denn für die Bildung eines Anhydrids muss das Ausgangsmolekül mindestens vier Sauerstoffatome und das Produkt-Ion mindestens drei Sauerstoffatome beinhalten. Diese Forderung ist nicht für alle in Tabelle 3 beschriebenen Wasserabspaltungen erfüllt. Somit kann z. B. der Wasserverlust von C12H17O3 zu C12H15O2 nur durch die Abspaltung einer aliphatischen Hydroxygruppe erklärt werden [mittleres Molekül-Ion in Tabelle 3]. Durch die beobachteten Fragmentationen ist es möglich, fast alle Elemente der Summenformel dem Kohlenstoffgrundgerüst oder den funktionellen Gruppen zuzuordnen. Für das Molekül-Ion C14H17O7 bedeutet das, dass von den 7 Sauerstoffatomen 6 in Carboxylgruppen gebunden sind und ein Sauerstoffatom in einer OH-Gruppe lokalisiert ist. Das Kohlenstoffgrundgerüst besitzt 11 Kohlenstoff-

atome und enthält weiterhin drei Doppelbindungsäquivalente. Die drei verbleibenden Doppelbindungsäquivalente schließen das Vorhandensein eines Benzolrings (benötigt vier Doppelbindungsäquivalente) im Molekül aus. Dies gilt auch für das Molekül-Ion C15H21O6.

Das zuvor beschriebene Fragmentationsverhalten wurde für drei isobare Molekül-Ionen beobachtet. Um weitere Einblicke in den Aufbau der Moleküle zu erhalten und zu prüfen, ob dieses Fragmentationsverhalten für Fulvinsäuren verallgemeinert werden kann, wurden auch die „Nachbarn im Spektrum“ mit 2 Da Abstand untersucht (m/z 293 und m/z 297). Bezogen auf ihre Summenformel unterscheiden sich diese durch +/- zwei Wasserstoffatome und den Verlust (im Falle +H2) bzw. der Addition (im Falle -H2) eines Doppelbindungsäquivalents. Für diesen Ersatz gibt es zwei mögliche Erklärungen: A) kann es sich hierbei um die Abspaltung zweier Wasserstoffe und die damit verbundene Einführung einer Doppelbindung in das Grundgerüst handeln oder B) ist ein Einbau von Wasserstoff in funktionelle Gruppen möglich. Denkbar wäre dabei z. B. die Reduktion einer chinoiden in die hydrochinoide Struktur. In diesem Fall würden sich die „Nachbarn“ nicht im Grundgerüst, sondern in ihren Funktionalitäten unterscheiden. Dieser Unterschied sollte sich in einem anderen Fragmentationsverhalten ausdrücken.

Auch die „+/- 2 Da Nachbarn“ zeigen die bekannten CO2- und H2O-Eliminationen und enden bei einem defunktionalisierten Grundgerüst, das sich um jeweils zwei Wasserstoffatome und ein Doppelbindungsäquivalent unterscheidet. Gleiche Fragmentationen bedeuten unveränderte funktionelle Gruppen. Aus diesem Grund können für die vermessenen Verbindungen Redoxpaare wie Quinone/Hydrochinone ausgeschlossen werden.

Die eben beschriebenen Untersuchungen wurden auch für die +/- 14 Da Nachbarn vorgenommen (m/z 283 und m/z 301). Bezogen auf die Summenformeln unterschieden diese sich um eine -CH_2- Einheit. Auch hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen: A) ist ein weiterer Einbau einer -CH_2-Gruppe (+ 14 Da) in das Grundgerüst vorstellbar. Die rechnerische Addition einer CH_2-Gruppe wäre aber auch durch die Überführung einer -COOH Gruppe in den zugehörigen Methylester denkbar. Aber auch in diesem Fall wären die Moleküle entweder im Grundgerüst der „Nachbarn“ oder in ihren Funktionalitäten verschieden. Dieser Unterschied sollte sich erneut durch ein unterschiedliches Fragmentationsverhalten äußern. Es konnte aber auch hier in den untersuchten Fällen kein abweichendes Fragmentationsverhalten festgestellt werden.

Daraus ergibt sich für alle untersuchten Moleküle folgende Regel:

- Besitzt die Verbindung eine gerade Anzahl an Sauerstoffatomen, dann enden die Fragmentationen bei einem Grundgerüst, das ein oder zwei Sauerstoffatome

besitzt. Alle anderen Sauerstoffatome konnten durch die Verluste von CO2 Carboxylgruppen zugeordnet werden.

- Bei einer ungeraden Anzahl an Sauerstoffatomen im Molekül-Ion kann die Verbindung so oft decarboxylieren, bis nur noch ein Sauerstoffatom im Restfragment verbleibt.

Daraus folgt, dass Fulvinsäure-Moleküle maximal zwei Hydroxygruppen enthalten.

Produkt-Ionen-Spektren einer solchen Qualität, dass genaue Aussagen über das Fragmentationsverhalten jedes einzelnen isobaren Ions möglich sind, können nur von den Ionen im Intensitätsmaximum der scan-Spektren (z. B. Abbildung 16, S.29) erhalten werden. Es kann dadurch nicht ausgeschlossen werden, dass Moleküle, die in den Intensitätsminima liegen, andere Fragmentationen aufweisen. Die bisher vermessenen Produkt-Ionen-Spektren aus diesen Regionen sind zwar viel geringerer Intensität, geben aber keinen Hinweis auf ein solches anderes Fragmentationsverhalten.

Für die Struktur der Fulvinsäuren ergibt sich daraus die Schlussfolgerung: Die Mehrzahl der Sauerstoffatome ist in Carboxylgruppen lokalisiert und maximal zwei Hydroxygruppen können im Molekül enthalten sein. Der nach den Fragmentationen verbleibende defunktionalisierte Kern stellt das Grundgerüst der Fulvinsäuren dar. Dieses Grundgerüst kann durch einen Einbau von -CH2 Gruppen vergrößert werden und variiert in seinem Sättigungsgrad. In den niedermolekularen Bausteinen der Fulvinsäuren gibt es einen großen Anteil an Verbindungen, die keinen Benzolring besitzen (siehe Kapitel 4.3.3.3).

Die beobachtete Armut an Fragmentationen erbringt aber trotzdem viele Informationen hinsichtlich der Struktur. Das gilt besonders für die funktionellen Gruppen, die nicht im Molekül enthalten sein können, da diese spezifische Fragmentationen hervorrufen würden. Ausgeschlossen werden können z. B. sowohl Ether- als auch Estergruppen. Weiterhin können Fulvinsäuren keine Polyphenole sein, sodass auch flavanoide Strukturelemente für den Aufbau von Fulvosäuren ausgeschlossen werden können.

Im Massenspektrometer bzw. in der Kollisionszelle wurden auch keine Fragmentationen erzeugt, die auf einen Zerfall des Kohlenstoffgrundgerüstes hinweisen. Deshalb muss das Grundgerüst entsprechend kompakt aufgebaut sein, um solche Fragmentationen zu vermeiden. Um eine gewisse mikrobielle Stabilität zu erhalten, sollten aliphatische Ketten hoch verzweigt sein.

In Abbildung 19 werden Strukturvorschläge für die drei untersuchten isobaren Moleküle mit m/z 297 gegeben (Tabelle 3). Diese Strukturen sollten in massenspektrometrischer Hinsicht zu keinen weiteren Fragmentationen als H_2O und CO_2-Abspaltungen in der Lage

sein und durch ihren hohen Verzweigungsgrad auch eine gewisse mikrobielle Stabilität aufweisen.

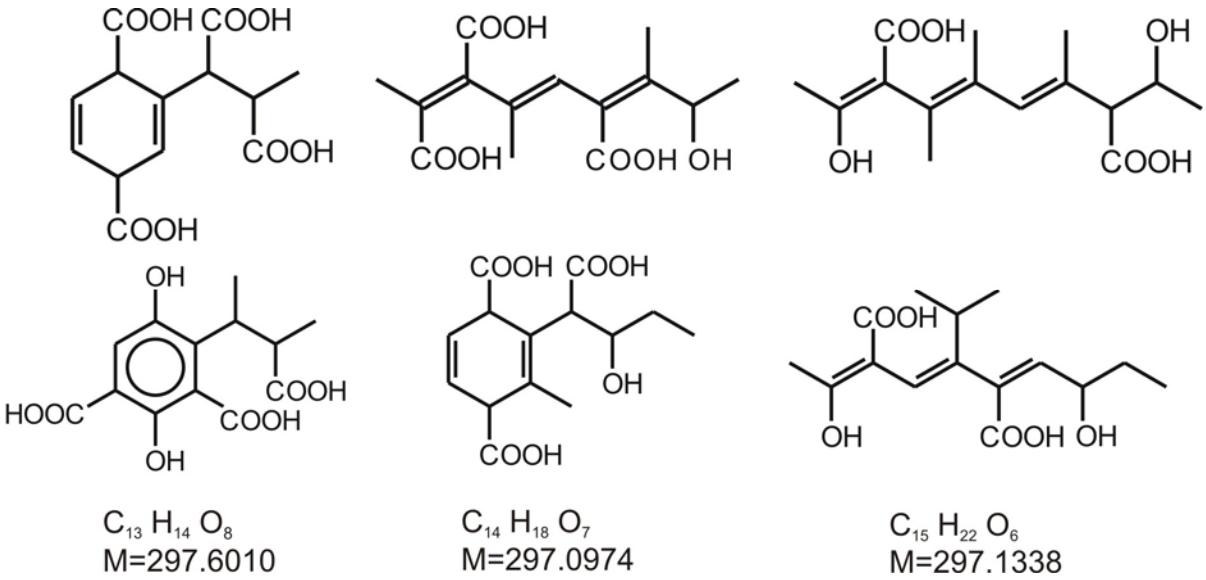

Abbildung 19: : zwei jeweilige Strukturvorschläge für isobare Moleküle mit m/z 297

Aus massenspektrometrischer Sicht kann festgestellt werden, dass die Stoffgruppe der Fulvinsäuren eine ganz eigene Substanzklasse darstellt. Es ist keine Stoffgruppe bekannt, die eine so große Anzahl an Mitgliedern besitzt und trotzdem so einheitlich fragmentiert.

4.3.3 Systematik der Summenformeln

4.3.3.1 Isobare Ionen in Fulvosäure-Isolaten

Die Auflösung des TOF-MS ist hinreichend groß, um 3-5 isobare Ionen aufzulösen. Isobare Ionen besitzen die gleiche nominelle Masse (ganzzahlige Masse) und unterscheiden sich untereinander nur in der Nachkommastelle. Durch die Vergrößerung des Spektrums auf eine einzelne Masse, wird für die Isobaren ein gleichmäßiger Abstand von 36 mDa sichtbar (Abbildung 20). Im Spektrum der Suwannee River Fulvinsäuren besitzt in den meisten Fällen das mittlere Molekül die höchste Signalintensität.

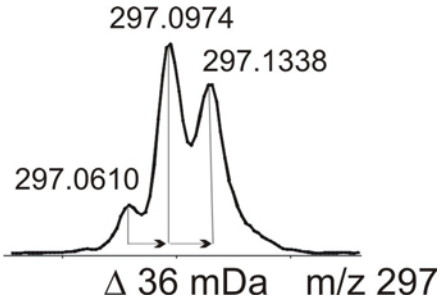

Abbildung 20: Konstanter Massenabstand von 36 mDa zwischen isobaren Ionen am Beispiel von m/z 297.

Der gleichmäßige Massenabstand zwischen zwei isobaren Molekülen wird durch einen regelmäßigen Ersatz eines Sauerstoffatoms durch ein Kohlenstoffatom und vier Wasserstoffatome hervorgerufen (- 15.9949 Da + 16.0313 Da = 0.0364 Da). Weiterhin ist dieser Ersatz mit dem Verlust eines Doppelbindungsäquivalentes verbunden.

Das bedeutet, dass für das Anion m/z 297 folgende Summenformeln ermittelt werden können:

1. $C_{13}\,H_{13}\,O_8$ (7 DBE)
2. $C_{14}\,H_{17}\,O_7$ (6 DBE)
3. $C_{15}\,H_{21}\,O_6$ (5 DBE)

Aus den in Kapitel 4.3.2 beschriebenen MS/MS Daten wurde ersichtlich, dass die meisten Sauerstoffatome in Carboxylgruppen gebunden sind. Bringt man die im Molekül vorhandenen Sauerstoffatome in der maximalen Anzahl an CO_2-Gruppen unter und zieht diese rechnerisch von der Summenformel ab, erhält man das Kohlenstoffgrundgerüst der niedermolekularen Fulvinsäuren. Für die oben genannten Ausgangsmoleküle bedeutet das:

Tabelle 4: Summenformeln und strukturelle Merkmale der Anionen mit m/z 297.

	Summenformel	DBE	max. Anzahl an CO_2-Gruppen	Kohlenstoff-grundgerüst	DBE
1.	$C_{13}\,H_{13}\,O_8$	7	-4 x CO_2	$C_9\,H_{13}$	3
2.	$C_{14}\,H_{17}\,O_7$	6	-3 x CO_2	$C_{11}\,H_{17}\,O$	3
3.	$C_{15}\,H_{21}\,O_6$	5	-3 x CO_2	$C_{12}\,H_{21}$	2

Daraus wird ersichtlich, dass mit zunehmendem Sauerstoffgehalt der Moleküle, die Größe des Kohlenstoffgrundgerüstes abnimmt. Des Weiteren wird dabei der Sättigungsgrad des Kohlenstoffgrundgerüsts geringer. Während für das sauerstoffärmste Molekül für 12 Kohlenstoffatome nur zwei Doppelbindungsäquivalente zur Verfügung stehen, kommen im sauerstoffreichsten Molekül auf 9 Kohlenstoffatome schon drei Doppelbindungsäquivalente.

4.3.3.2 Homologe Reihen im Fulvinsäure-Isolat

Alle Summenformeln, die in der niedermolekularen Fraktion der Fulvinsäuren bestimmt wurden, lassen sich in homologe CH_2- oder H_2-Reihen einordnen.

Zur besseren Visualisierung der H_2-Reihen wird der Massenbereich von m/z 217-257 in Abbildung 21 dargestellt. Ausgehend von einem Fulvinsäuregrundgerüst einer bestimmten Kohlenstoffanzahl, kann dieses rechnerisch bis zu sechs Doppelbindungen aufnehmen. Die Addition zweier Wasserstoffatome ist mit dem Verlust eines Doppelbindungsäquivalentes verbunden. Die Molekülmasse erhöht sich um 2 Da und das „folgende Homologe“ erscheint im Spektrum unter dem nächsten z*-Wert bzw. DBE-O Differenz (siehe Abbildung 17).

Jede H_2-Reihe wird durch die nächste H_2-Reihe überlagert (eine Zeile tiefer), die vom isobaren Nachbarmolekül gebildet wird. Im Spektrum der Isobaren wird in den meisten Fällen die mittlere Masse mit der größten Intensität detektiert (fett gedruckte Summenformeln in Abbildung 21). Damit geht einher, dass das Intensitätsmaximum innerhalb der jeweiligen H_2-Reihe meistens in der Mitte der Reihe lokalisiert wird.

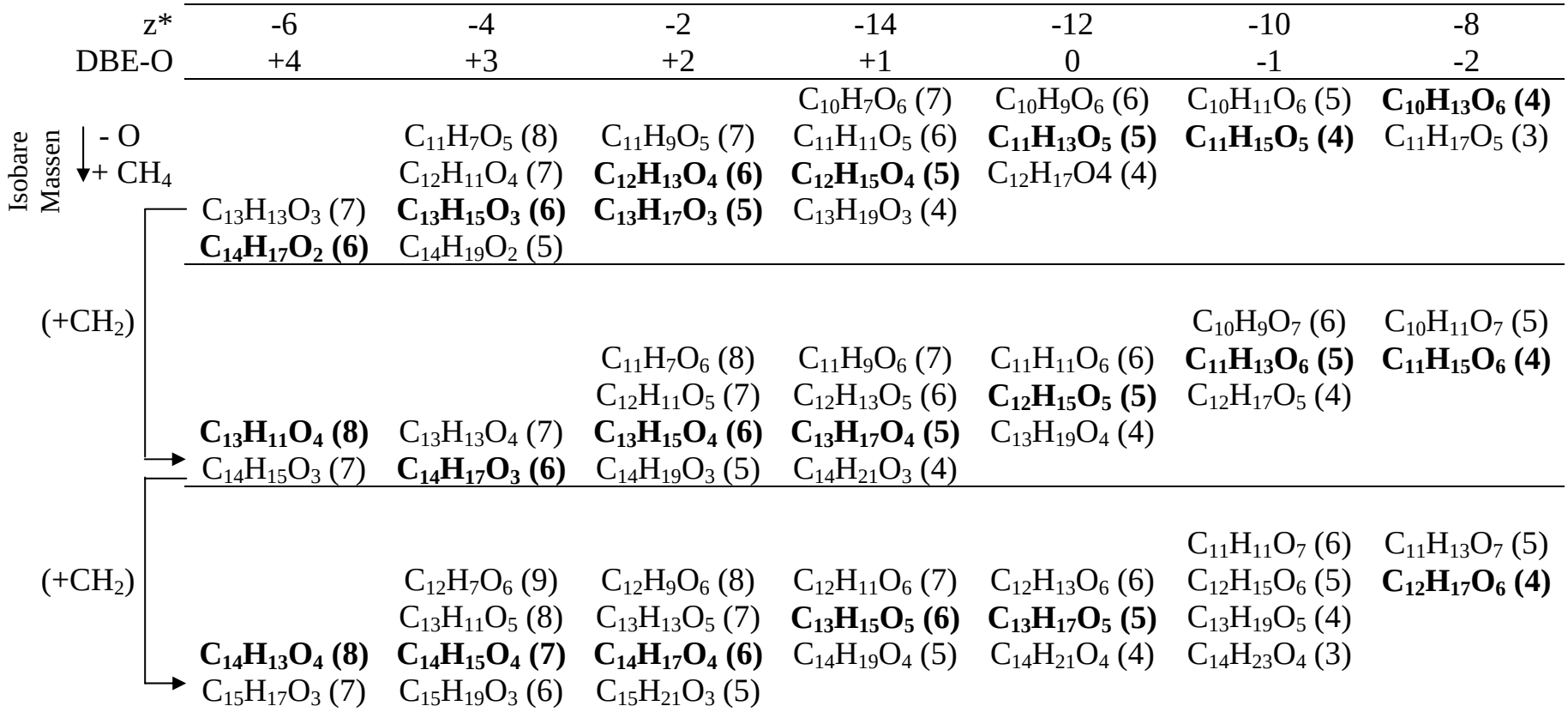

Abbildung 21: Darstellung mehrerer isobarer Ionen mit ihren H_2-Reihen (Block). Links ist die am wenigsten gesättigte Form des jeweiligen Kohlenstoffgrundgerüstes zu finden. In der gleichen Spalte, aber ein Block tiefer, ordnen sich die zugehörigen Alkyl-Homologen ein. Die Moleküle mit den größten Signalintensitäten innerhalb der Isobaren sind fett gedruckt (SRFA).

Ein weiteres Bildungsprinzip ist der aufeinanderfolgende Einbau von CH_2-Gruppen in das Kohlenstoffgrundgerüst (Abbildung 21). Für fast alle der aufgeführten Summenformeln ist in der jeweils eine Zeile tiefer gelegenen Reihe sein $+CH_2$ Homologes zu finden. Da sich die Molekülmasse um 14 Da erhöht und sich die Anzahl der Doppelbindungsäquivalente nicht ändert, haben alle CH_2-Homologen den gleichen z*-Wert (und die gleiche DBE-O Differenz). Ist über einen weiten Massenbereich jede Summenformel vertreten, können sich auch rechnerische Homologien ergeben. Da das Kohlenstoffgrundgerüst den in Abschnitt 4.3.2 beschriebenen Kriterien folgen und sehr kompakt sein muss, ist der Einbau von H_2 bzw. CH_2 nicht zwingend als x-fache Sättigung bzw. Verlängerung einer Kette zu verstehen. Aus diesem Grund sind auch z. B. Benzol und Toluol als CH_2-Homolge zu sehen oder nach einer mehrfachen Einführung von CH_2-Gruppen sind auch Ringschlüsse möglich.

Weiterhin treten die Kohlenstoffgrundgerüste in verschiedenen Oxidationsstufen auf. Die Bestimmung der Summenformeln und das beobachtete Fragmentationsverhalten der Moleküle lassen sich durch eine wiederholte Oxidation von Methylgruppen über Alkohole zur Carbonsäure erklären (siehe Abbildung 26).

Die Überlagerung der drei beobachteten Homologien von a) Sättigungshomologen, b) Alkylhomologen und c) Oxidationshomologen erklärt das Auftreten von mehreren isobaren Molekülen mit einem konstanten Massenabstand von 36 mDa.

4.3.3.3 Darstellung von Fulvinsäuren im van Krevelen-Diagramm

Eine Möglichkeit, die hohe Systematik im Aufbau der Fulvinsäuren zu zeigen, bietet das van Krevelen-Diagramm. Das van Krevelen-Diagramm wurde dazu benutzt, komplexe Stoffgemische genauer zu charakterisieren und homologe Reihen innerhalb eines Gemisches zu erkennen (van Krevelen 1950; Kim et al. 2003). Auf der x-Achse wird das O/C- und auf der y-Achse das H/C-Verhältnis dargestellt. Die Verhältnisse können aus den jeweiligen Summenformeln bestimmt werden. In Abbildung 22 ist das van Krevelen-Diagramm für alle Summenformeln dargestellt, die in der LMW-Fraktion detektiert wurden.

Abbildung 26 zeigt die Anordnung von H2- bzw. CH2-Homolgen im van Krevelen-Diagramm.

In Abbildung 22 ist deutlich ein teilweise sternförmiges Muster zu erkennen, das sich aus „leeren Stellen“ oder „Fehlstellen“ ergibt. Diese entstehen rein rechnerisch, aus der Kombination von Kohlenstoff, Sauerstoff und Wasserstoff zu den jeweiligen Summenformeln der Fulvinsäuren im niedermolekularen Massenbereich (Kim et al. 2003). So kann ein O/C-Verhältnis von 0.5 sehr häufig gebildet werden (z. B. C12H16O6; C14H16O7; C16H18O8). Versucht man jetzt dem O/C-Verhältnis von 0.5 möglichst nahe zu kommen, kann man z. B. die Kohlenstoffanzahl vermindern. Daraus ergeben sich Formeln wie C11H16O6 (O/C=0.54),

C13H16O7 (O/C=0.54) oder C15H18O8 (O/C=0.53). Es gibt aber in diesem Massenbereich keine O/C-Kombination, die den Wert 0.51 oder 0.52 einnehmen kann. Dadurch entstehen z. B. die „Fehlstellen“ um O/C=0.5. Die Kombinationsmöglichkeiten von H/C sind schon allein dadurch begrenzt, dass die Anzahl der Wasserstoffatome in einer Summenformel immer geradzahlig ist.

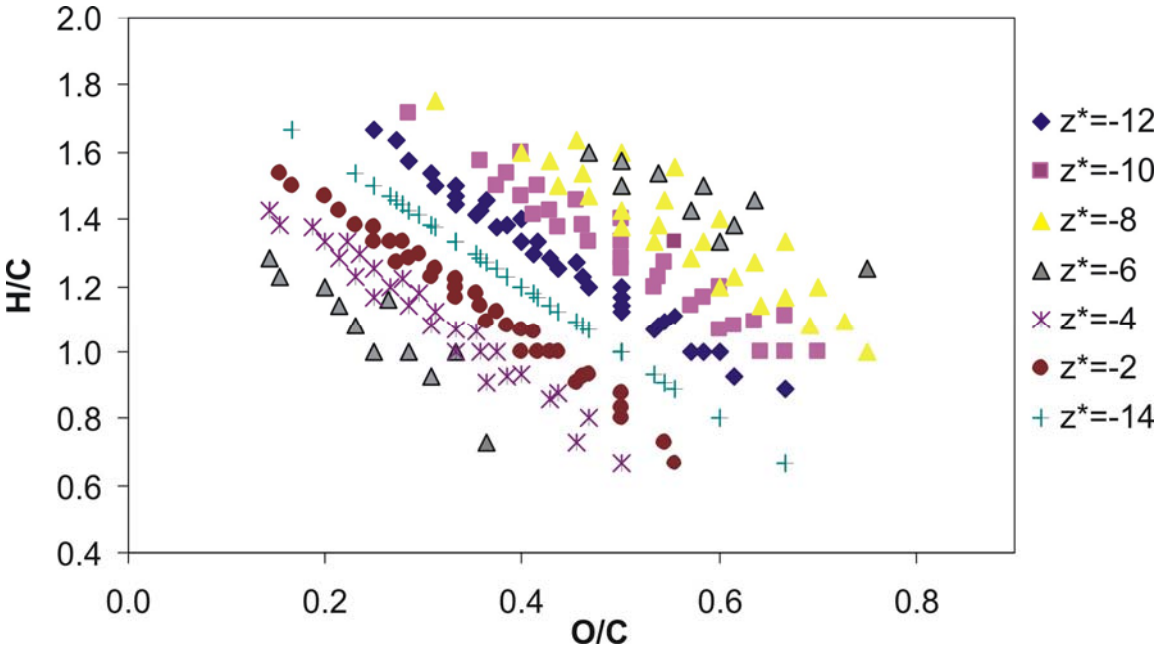

Abbildung 22: Darstellung der Summenformeln niedermolekularer Fulvinsäuren im van Krevelen-Diagramm. Alle Summenformeln mit dem gleichen z*-Wert sind in einer Farbe abgebildet.

Auf der x-Achse ist das Verhältnis der Anzahl an Sauerstoffatomen zu Kohlenstoffatomen im Molekül dargestellt. Für die niedermolekularen Fulvinsäuren bewegen sich die Werte zwischen 0.15 und 0.75. Dadurch haben die am höchsten oxidierten Moleküle, ausgehend von 20 Kohlenstoffatomen, 15 Sauerstoffatome im Molekülverband, während im „reduzierten Bereich“ auf 20 Kohlenstoffatome nur drei Sauerstoffatome kommen. Zueinander gehörige H_2-Homologe haben des gleiche O/C-Verhältnis und liegen dadurch im van Krevelen-Diagramm auf einer Senkrechten, wobei die am stärksten gesättigten Mitglieder der H_2-Reihe oben stehen. Zueinander gehörige Alkyl-Homologe (+/-CH_2) liegen auf einer Geraden. Jede Gerade einer homologen Alkyl-Reihe besitzt den Achsenabschnitt 2 (van Krevelen 1950; Kim et al. 2003).

Auf der y-Achse ist das Verhältnis der Anzahl an Wasserstoffatomen zu Kohlenstoffatomen dargestellt. Das H/C Verhältnis spiegelt den Sättigungsgrad der Moleküle wider.

Auf einer Waagerechten liegen alle Moleküle, die den gleichen H/C Wert haben. Das bedeutet, dass sie die gleiche Kohlenstoffanzahl, Wasserstoffanzahl und die gleiche Anzahl an Doppelbindungsäquivalenten besitzen, dabei aber in ihrem Sauerstoffgehalt variieren.

Den größten Sauerstoffgehalt besitzen die Moleküle, die ganz rechts auf der Waagerechten lokalisiert sind. Eine steigende Anzahl an Sauerstoffatomen im Molekül ist gemäß dem Aufbauprinzip von Fulvinsäuren mit einer steigenden Anzahl an Carboxylgruppen verbunden (siehe 4.3.2). Somit werden dem Kohlenstoffgrundkörper sowohl Kohlenstoffatome als auch Doppelbindungsäquivalente entzogen und in funktionelle Gruppen eingebaut. Durchwandert man demzufolge eine Waagerechte vom kleinsten zum größten O/C-Verhältnis, findet man zuerst die am wenigsten funktionalisierten Moleküle, die den größten und am höchsten gesättigten Kohlenstoffgrundkörper besitzen. Weiter rechts wird der Kohlenstoffgrundkörper kleiner und ungesättigter, das Molekül aber wird reicher an Carboxylgruppen.

Verallgemeinert kann gesagt werden, dass Fulvinsäuren, die hohe H/C- und kleine O/C-Werte besitzen (oben links im van Krevelen-Diagramm) große, gesättigte Kohlenstoffgrundgerüste besitzen und nur wenige Carbonsäuren im Molekül haben. Kleine H/C- und große O/C-Verhältnisse (unten rechts im van Krevelen-Diagramm) bedeuten für den Aufbau von Fulvinsäuren, dass sie kleine, kompakte und ungesättigte Kohlenstoffgrundgerüste besitzen und durch viele Carbonsäuren hoch funktionalisiert sind.

Trägt man die Summenformeln der niedermolekularen Fraktion der Fulvinsäuren für unterschiedliche Massenbereiche auf (Abbildung 23), ist für den kleinen Massenbereich (150-190 Da) eine sehr weite Aufspreizung an O/C- und H/C-Werten erkennbar. Auch im kleinen Massenbereich können bis zu vier isobare Ionen bestimmt werden. Die dabei bestimmten Summenformeln besitzen natürlich weniger Kohlenstoff-, Sauerstoff- und

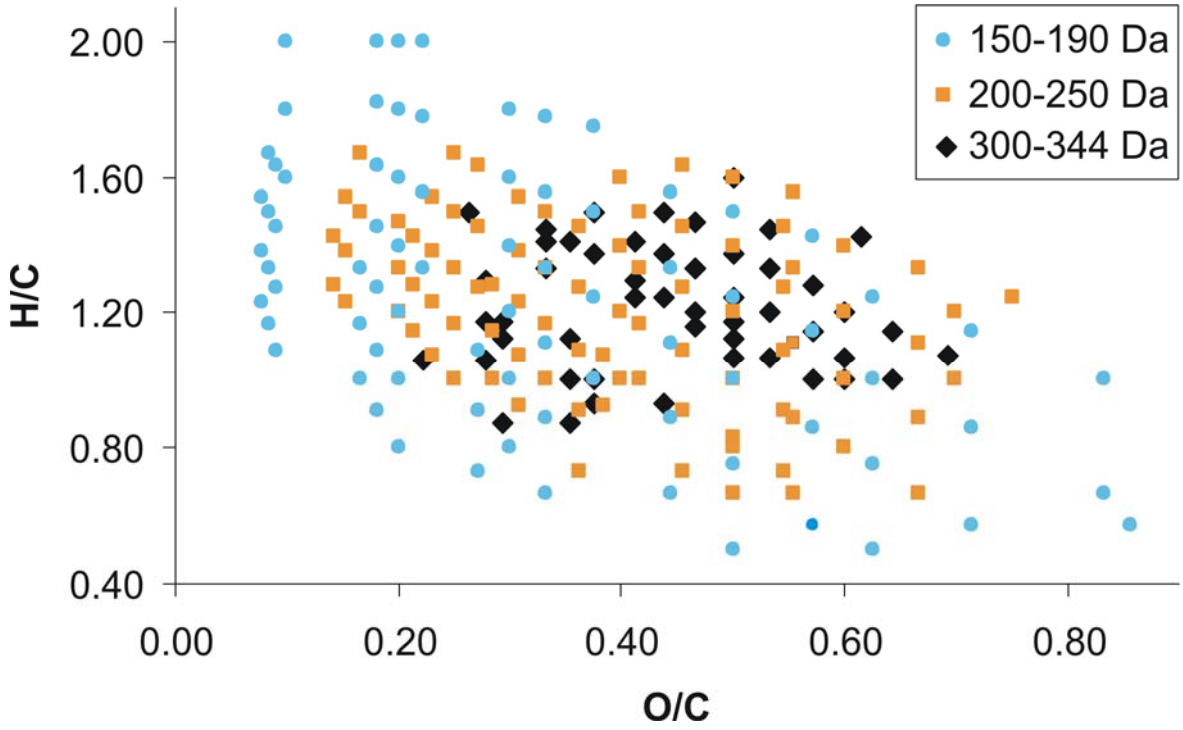

Abbildung 23: Darstellung von Summenformeln der niedermolekularen Fraktion für verschiedene Massenbereiche.

Wasserstoffatome als die Summenformeln im Massenbereich zwischen 300-344 Da. Für die Bestimmung von O/C- bzw. H/C-Werten im Massenbereich 150-190 Da sind sowohl der Zähler, als auch der Nenner klein. Die dabei gebildeten Quotienten verändern sich also vergleichsweise viel stärker als bei größeren m/z Werten. Trotzdem kann, ausgehend vom kleineren zum größeren Massenbereich, eine Verschiebung von hohen H/C- und kleinen O/C-Verhältnissen zu kleinen H/C- und großen O/C-Verhältnissen beobachtet werden (von links oben nach rechts unten). Diese Verschiebung wurde auch schon in anderen Arbeiten beschrieben (Plancque et al. 2001; Kujawinski et al. 2002b). Je größer demzufolge ein Fulvinsäure-Molekül wird, desto sauerstoffreicher und ungesättigter ist es. Es ist von sehr kompakten, hoch ungesättigten Kohlenstoffgrundgerüsten auszugehen, deren hohe Wasserlöslichkeit von einer hohen Anzahl an Carbonsäuren realisiert wird. Weiterhin bedeutet es, dass diese Moleküle nur wenig primären Kohlenstoff enthalten und die Carbonsäuren für einen hohen Verzweigungsgrad sorgen.

Die Anzahl an Doppelbindungsäquivalente (DBE) im Molekül ist die Summe aus Carboxyldoppelbindungen, Kohlenstoffdoppelbindungen und der Anzahl der im Molekül enthaltenen Ringsysteme.

$$DBE = DBE\left(CO_2\right) + DBE\left(C\right) + DBE\left(Ring\right)$$

Aus diesem Grund kann aus der Anzahl der DBE nicht zwangsläufig Rückschluss auf den Sättigungsgrad des Kohlenstoffgrundgerüstes der Fulvinsäuren gezogen werden. In Abschnitt 4.3.2 wurde gezeigt, dass der meiste Sauerstoff in Carboxylgruppen gebunden ist. Bringt man die maximale Anzahl an Sauerstoffatomen in Carboxylgruppen unter, ergibt sich daraus die maximale Anzahl an Carboxyldoppelbindungen (DBE (CO_2)) pro Molekül. Über die Differenz zwischen DBE und Carboxyldoppelbindungen kann dann die Anzahl an Kohlenstoffdoppelbindungen (DBE (C)) abgeschätzt werden. Mittels MS/MS konnte gezeigt werden, dass Moleküle mit einer ungerade Sauerstoffanzahl so oft decarboxylieren bis ein Sauerstoffatom in dem Fragment verbleibt. Für die Berechnung der Kohlenstoffdoppelbindungen ergibt sich daraus folgende Regel.

$$DBE\left(C\right) = DBE - \left(\left(O_x - 1\right)/2\right)$$

Dabei ist O_x die Anzahl der Sauerstoffatome. Moleküle mit einer geradzahligen Sauerstoffanzahl decarboxylieren so oft bis zwei Sauerstoffatome in dem Fragment verbleiben. Für die nachfolgenden Berechnungen wird aber angenommen, dass mindestens eins der beiden verbleibenden Sauerstoffatome durch eine Doppelbindung gebunden ist. Somit stellt die nachfolgende Formel DBE $(C)_{min}$ dar.

$$DBE\left(C\right) = DBE - O_x/2$$

Die Kohlenstoffatome, die in CO_2 Gruppen gebunden sind $C(CO_2)$, müssen von der Anzahl der Gesamtkohlenstoffatome C(ges) abgezogen werden. Dadurch erhält man die Anzahl der C-Atome des Grundgerüstes der Fulvinsäuren C(Kern).

$$C\left(Kern\right) = C\left(ges\right) - C\left(CO_2\right)$$

Dividiert man die Kohlenstoffdoppelbindungen (DBE(C)) durch die Kohlenstoffanzahl C(Kern), dann stellt dieser Wert die Anzahl der Doppelbindungen pro Kohlenstoff im Grundgerüst DBE (C/C_{Kern}) dar. Das erlaubt z. B. Aussagen darüber zu treffen, ob das Molekül noch aliphatisch sein kann oder nicht.

$$DBE\left(C_{Kern}\right) = \frac{DBE\left(C\right)}{C\left(Kern\right)}$$

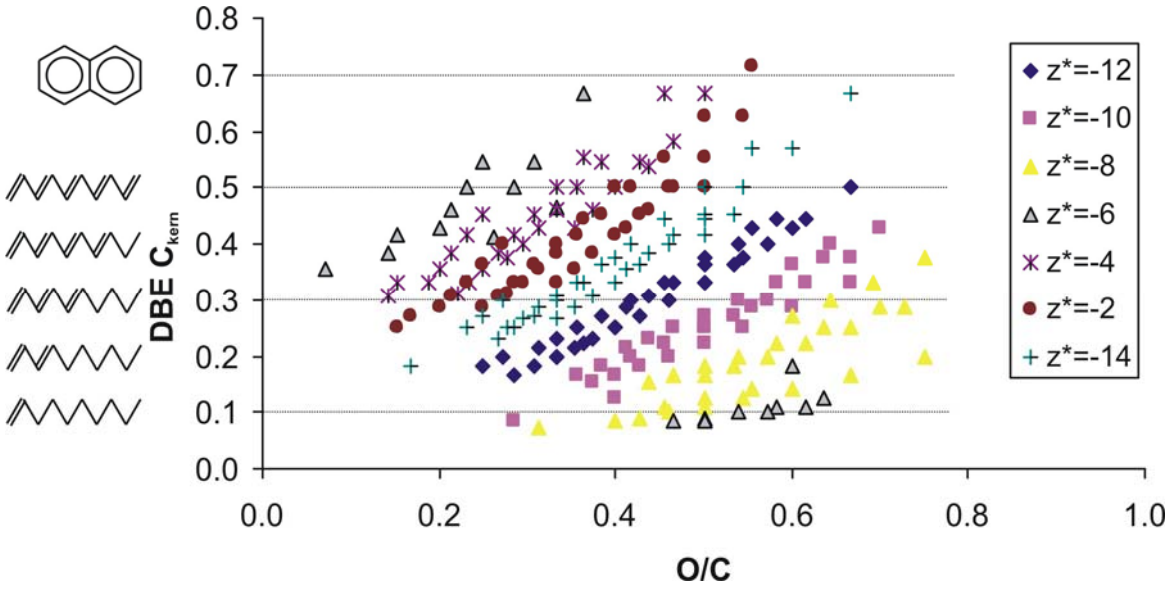

Abbildung 24: Darstellung der Kohlenstoffdoppelbindungen pro Kohlenstoffatom im Grundgerüst der Fulvinsäuren.

Die Darstellung der Kohlenstoffdoppelbindungen pro Kohlenstoff im Grundgerüst DBE (C) / C (Kern) anstelle des H/C-Verhältnisses wird in Abbildung 24 gezeigt. Weiterhin ist in dieser Abbildung die DBE-Anzahl pro C einiger typischer Kohlenwasserstoffe dargestellt. Dieses verdeutlicht, dass alle Verbindungen mit einem DBE C_{kern}, der größer als 0.5 ist, definitiv nicht mehr aliphatisch sein können.

Da sich jetzt auch Aussagen über den Sättigungsgrad des Kohlenstoffgrundgerüstes der Moleküle treffen lassen, kann nun durch die Einteilung der Fulvinsäure-Moleküle in z*-Gruppen auf den Sättigungsgrad gewisser Spektrenbereiche geschlussfolgert werden. Sicherlich ist die Aufspreizung des Sättigungsgrades einer z*-Gruppe relativ hoch (z* = -2 nimmt in Abbildung 24 y-Werte zwischen 0.25 und 0.7 ein). Diese große „Streuung“ ist aber

viel eher durch die Formation isobarer Moleküle bedingt. Grundsätzlich ändert das nicht den Fakt, dass Moleküle mit z* = -4 ein weniger gesättigtes Kohlenstoffgrundgerüst haben als Moleküle mit z* = -8 (vergleiche Abbildung 24).

Die Bereiche, die von den Fulvinsäuren im van Krevelen-Diagramm eingenommen werden, spiegeln aber auch klar den Einfluss der Löslichkeit wider, über die ihre Definition vorgenommen wird. Kleinere O/C-Verhältnisse treten nicht auf, da in diesem Fall keine Löslichkeit mehr gegeben wäre. Größere O/C-Werte werden nicht detektiert, da weitere Oxidationen zur Instabilität bzw. Spaltung der Moleküle führen würden. In diesem Fall wären typische Endprodukte, wie z. B. Oxalsäure zu erwarten. Aufgrund der hohen Hydrophilie, aber den gleichzeitig fehlenden Doppelbindungen, würden die Oxidations-Endprodukte z. B. nicht mehr an XAD-Harzen sorbieren. Definitionsgemäß fallen diese Stoffe nicht mehr in die Gruppe der Fulvinsäuren (hydrophobe Säuren), sondern zählen dann zur Gruppe der hydrophilen Säuren.

4.3.4 Strukturvorschläge für Fulvinsäure-Moleküle

Durch die Verwendung der hochauflösenden Massenspektrometrie in Kopplung mit der Tandem-Massenspektrometrie lassen sich sehr genaue Strukturinformationen sammeln. Dadurch können die zuvor schon mit niedrigauflösender Massenspektrometrie beobachteten Fragmentationen nun erstmals direkt auf Summenformeln bezogen werden. Weiterhin zeigt die hohe Systematik der Fulvinsäuren, dass der Aufbau der niedermolekularen Fulvinsäuren klaren Regeln folgt. Diese Ergebnisse erlauben es, Strukturvorschläge für jedes im Fulvinsäure-Isolat enthaltene Molekül aufzuzeigen!

4.3.4.1 Strukturelle Aspekte einzelner Moleküle

Durch die Auswertung der MS/MS Daten lassen sich zu den bestimmten Summenformeln Strukturen zuordnen. Die Fragmentationsarmut im Massenspektrometer macht deutlich, dass die Moleküle so kompakt strukturiert sein müssen, dass andere Fragmentationen als der mehrfache Verlust von CO_2 und einer parallelen Wasserabspaltung nicht möglich sind. Wie wichtig diese Information ist, verdeutlicht Abbildung 25. Die dargestellte Chlorogensäure, ein Ester der Kaffeesäure und der Chinasäure, ist die in Früchten am weitesten verbreitete Hydroxyzimtsäure-Verbindung. Sie besitzt zwar, wie für Fulvinsäuren gefordert, nur Carbonsäuren und Hydroxygruppen, doch durch die Vorgaben der MS/MS Untersuchungen (Kapitel 4.3.2) bleibt festzustellen, dass die Anzahl der Hydroxygruppen generell zu hoch ist. Die entscheidende Schwäche in diesem Fall ist aber die Esterbindung innerhalb des Kohlenstoffgrundgerüstes (diese werden im Massenspektrometer leicht ge-

spalten). Das bedeutet, dass nicht nur die im Molekül vorkommenden funktionellen Gruppen auf Carbonsäuren, Carbonyl- und Hydroxy-Gruppen beschränkt werden können, sondern sich auch die möglichen Strukturen des Kohlenstoffgrundgerüstes wesentlich reduzieren.

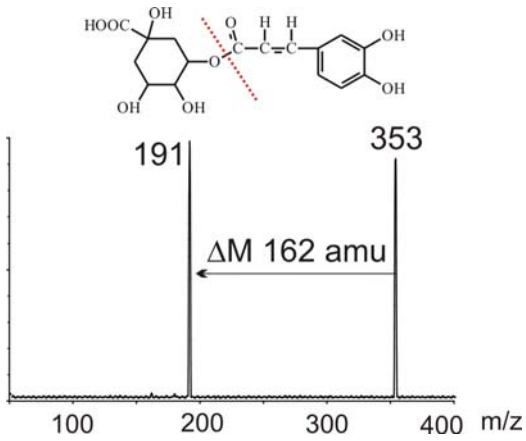

Abbildung 25: Struktur und Tochter-Ionen-Spektrum der Chlorogensäure (rote Linie zeigt das Fragmentationsverhalten im Massenspektrometer an).

Innerhalb der Naturstoffe ist keine Stoffgruppe bekannt, die ähnliche Vorgaben erfüllt. Dies zeigt, dass die Fulvinsäuren sich deutlich von allen anderen, unter „natural organic matter" erfassten Stoffgruppen, abgrenzen.

Alle im Fulvinsäure-Isolat detektierten Summenformeln lassen sich in homologen Reihen anordnen, in denen wiederum bis zu sechs rechnerisch zueinander gehörende H_2-Homologe auftreten (Abbildung 21, S.41). Um die Kompaktheit der Moleküle zu gewährleisten, können zwangsläufig nicht alle rechnerischen Homologe in direkter Homologie stehen. In Abbildung 26 sind deshalb maximal drei H_2-, CH_2- bzw. Oxidations-Homologe dargestellt. Weiterhin wird gezeigt, wie „indirekten Homologien" im Falle der Fulvinsäuren vorstellbar wären. Des Weiteren sind mögliche Strukturen dreier isobarer Massen dargestellt.

Als Ausgangsmolekül wurde C_{15} H_{20} O_3 (6) gewählt. Dieses Molekül besitzt z* = -4 und eine DBE-O Differenz von +3. Innerhalb des Isolates gehört C_{15} H_{20} O_3 dadurch zu den doppelbindungsreichen Fulvinsäuren (Abbildung 24). Alle in Abbildung 26 aufgezeigten Moleküle wurden in der LMW-Fraktion der Fulvinsäuren über die exakte Masse nachgewiesen.

Generell bleibt festzustellen, dass Fulvosäuren komplex zusammengesetzt sind. Die Mischung setzt sich aus vielen einzelnen Molekülen zusammen, die aber in ihrem Aufbau eine hohe Systematik zeigen. Kein anderes Stoffgemisch weist ein so einheitliches und typisches Fragmentationsmuster auf. Das zeigt, dass alle im Isolat enthaltenen Stoffe sehr ähnlich, aber auch sehr einfach strukturiert sein müssen. Fast der gesamte Sauerstoff ist in

Carbonsäuren fixiert. Die Kargheit an funktionellen Gruppen beruht auf der weit fortgeschrittenen oxidativen Überarbeitung der Vorläufer-Substanzen. Die, wenn auch spärlich vorhandenen, Hydroxy- und Carbonylgruppen weisen darauf hin, dass keine vollständige Oxidation zu Carbonsäuregruppen erfolgte. So eine „unvollständige Oxidation“ ist durch eine Einführung von Sauerstoff an sekundären bzw. tertiären Kohlenstoffen denkbar. Aufgrund der Struktur wäre keine weitere Oxidation der Hydroxy- bzw. Carbonylgruppe möglich.

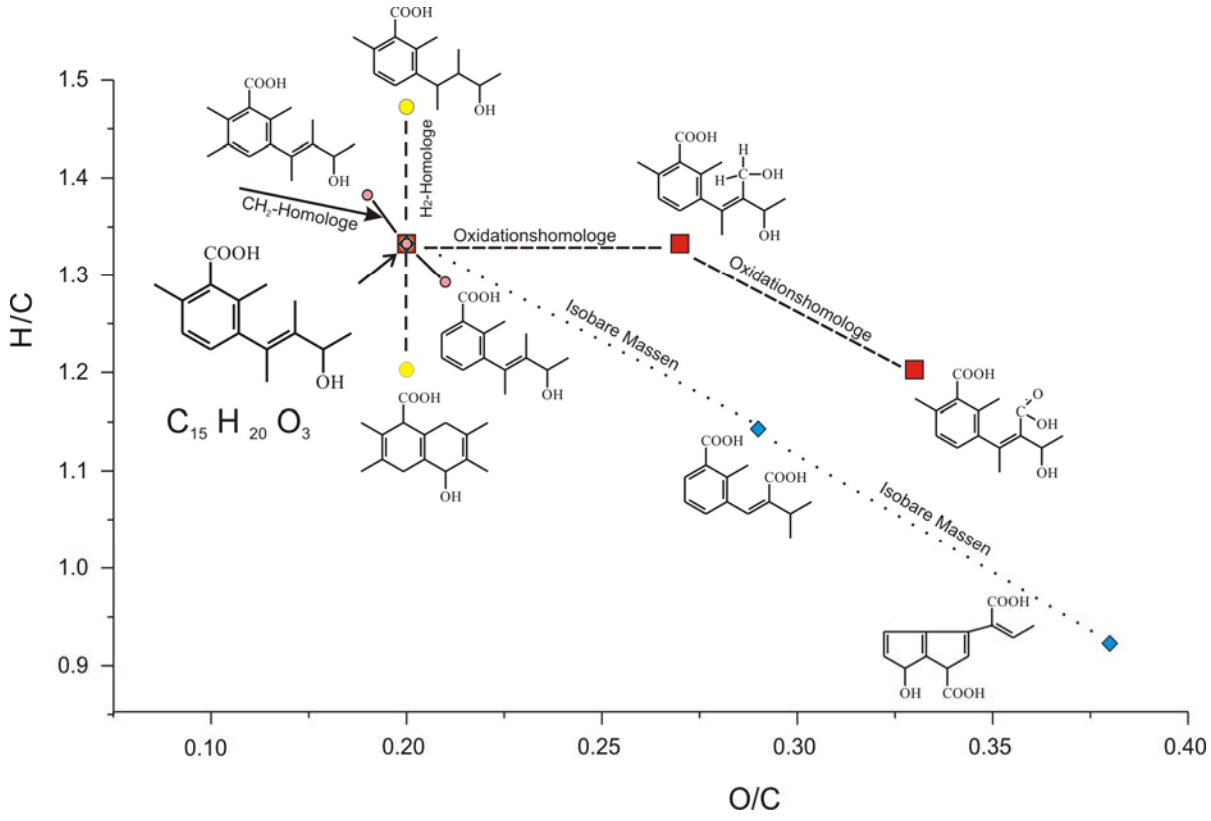

Abbildung 26: Darstellung von H_2-, CH_2- und Oxidationshomologen sowie isobaren Molekülen im van Krevelen-Diagramm. Das Ausgangsmolekül ist C_{15} H_{20} O_3.

4.3.4.2 Strukturelle Aspekte zum Polymeraufbau

An dieser Stelle soll noch einmal die wellenartige Intensitätsverteilung des Spektrums angesprochen werden (siehe Abbildung 17, S. 33). Diese wellenartige Intensitätsverteilung kann mehrere Ursachen haben.

A) Substanzen werden mittels Elektrospray besser oder schlechter ionisiert und dadurch mit unterschiedlicher Empfindlichkeit erfasst. Dabei hängt der Response stark von der Fähigkeit der jeweiligen funktionellen Gruppe ab, die negative bzw. positive Ladung zu stabilisieren. Aus diesem Grund kann die wellenartige Intensitätsverteilung ein Ionisierungseffekt sein. Gegen diese Erklärung spricht jedoch der Fakt, dass sowohl im

positiven als auch im negativen Ionisationsmodus die Intensitätsmaxima bei den gleichen m/z Werten lokalisiert sind.

B) Eine weitere Ursache könnte sein, dass im Fulvinsäure-Isolat nicht jede Substanz in gleicher Menge vorliegt und unterschiedliche Signalintensitäten durch eine quantitativ unterschiedliche Zusammensetzung hervorgerufen werden. Möglicherweise werden bestimmte Verbindungen häufiger in der Natur gebildet oder unterliegen einem bevorzugten Abbau. Auch könnte eine unterschiedliche Anzahl an möglichen Strukturisomeren für mengenmäßige Unterschiede im Fulvinsäure-Isolat sorgen.

C) Wäre ein polymerartiger Aufbau aus identischen kleineren Untereinheiten denkbar, dann muss nicht jede Untereinheit gleich gut geeignet sein, zu größeren Verbänden zu polymerisieren. Je besser eine Einheit zum Clustern fähig ist, desto eher muss die Monomerfraktion an diesen Einheiten verarmen.

Die nachfolgenden genaueren Erläuterungen unterstützen sowohl die Theorie B) als auch Theorie C). Da die beiden Theorien einander nicht ausschließen, ist es auch möglich, dass eine Mischung der beiden Effekte für die wellenartige Intensitätsverteilung verantwortlich ist.

Zu B) Jeder Summenformel bzw. deren zugehöriger Molmasse kann ein z*- und ein damit verbundener DBE-O-Wert zugeordnet werden (Abbildung 17, S.33) (Kapitel 4.3.1). Gemäß der Berechnung von z* besitzt jede 14te Masse den gleichen z*-Wert. Summenformeln mit dem gleichen z*-Wert sind in Abbildung 22 (S.43) mit der gleichen Farbe aufgetragen. Für alle Verbindungen mit gleichen z*-Werten wurden mittlere O/C- und H/C-Verhältnisse berechnet (Tabelle 5). Die kleinsten H/C- und O/C- bzw. die höchsten H/C- und O/C-Bereiche werden von z* = -4, -6 und -8 eingenommen. Die mittleren H/C- und O/C-Bereiche gehören zu Massen mit z* = -12 und z* = -14.

Tabelle 5: Durchschnittliche O/C- und H/C-Verhältnisse sowie O/C- bzw. H/C-Bereiche der jeweiligen z*-Werte für den Massenbereich 198-344 Da. Massen mit z* = -6 treten mit zwei DBE-O Differenzen auf.

z*	DBE-O	durchschnitt-liches O/C	Auftretende O/C Bereiche	durchschnitt-liches H/C	Auftretende H/C Bereiche
-6	*+4*	*0.25*	*0.14-0.36*	*1.07*	*0.73-1.29*
-4	+3	0.31	0.14-0.50	1.10	0.67-1.43
-2	+2	0.36	0.15-0.56	1.14	0.67-1.54
-14	+1	0.40	0.17-0.67	1.19	0.67-1.67
-12	0	0.44	0.25-0.67	1.28	0.89-1.67
-10	-1	0.51	0.29-0.70	1.30	1.0-1.71
-8	-2	0.56	0.31-0.75	1.37	1.0-1.75
-6	*-3*	*0.56*	*0.31-0.64*	*1.48*	*0.92-1.6*

Die im van Krevelen-Diagramm (Abbildung 22, S.43) dargestellten O/C- und H/C-Werte zeigen die Polaritäts- bzw. die Sättigungsbereiche auf, in denen niedermolekulare Fulvinsäuren auftreten. Wenn sich Fulvinsäure-Moleküle in homologen Reihen anordnen lassen, dann wäre zu erwarten, dass die Mitglieder der homologen Reihen in einer Häufigkeitsverteilung auftreten, die einer Gauß-Kurve folgt. Dabei sollten Moleküle, die extreme O/C- bzw. H/C-Verhältnisse besitzen, seltener auftreten, als die Moleküle im mittleren Bereich. Im Fulvinsäure-Spektrum treten die Intensitätsmaxima bei Massen mit z*-Werten von -12 und -14 auf. Diese Werte befinden sich im Zentrum des van Krevelen-Diagramms. Die Randgebiete des Diagramms, in denen die Moleküle statistisch gesehen seltener sind, werden von z* = -4 und -6 eingenommen. Diese z*-Werte sind in den Intensitätsminima des Fulvinsäure-Spektrums lokalisiert.

Z*	-6	-4	-2	-14	-12	-10	-8	-6
DBE-O	+4	+3	+2	+1	0	-1	-2	-3
						$C_{11}H_{11}O_7$	$C_{11}H_{13}O_7$	$C_{11}H_{15}O_7$
		$C_{12}H_7O_6$	$C_{12}H_9O_6$	$C_{12}H_{11}O_6$	$C_{12}H_{13}O_6$	$C_{12}H_{15}O_6$	$C_{12}H_{17}O_6$	$C_{12}H_{19}O_6$
		$C_{13}H_{11}O_5$	$C_{13}H_{13}O_5$	$C_{13}H_{15}O_5$	$C_{13}H_{17}O_5$	$C_{13}H_{19}O_5$		
	$C_{14}H_{13}O_4$	$C_{14}H_{15}O_4$	$C_{14}H_{17}O_4$	$C_{14}H_{19}O_4$	$C_{14}H_{21}O_4$	$C_{14}H_{23}O_4$		
	$C_{15}H_{17}O_3$	$C_{15}H_{19}O_3$	$C_{15}H_{21}O_3$					

Abbildung 27: Summenformeln der detektierten Anionen für m/z 245-259. Summenformeln für die Anionen bei m/z 245 mit z* = -6 (DBE-O = +4) bestimmen den Beginn und Summenformeln für die Anionen bei m/z 259 mit z* = -6 (DBE-O = -3) das Ende von H_2-Reihen (rot).

Stellt man sich die H_2-Reihen als homologe Reihen vor, dann wären die Randgebiete des Diagramms dadurch zu erklären, dass sowohl komplett gesättigte (z* = -8 und z* = - 6), als auch komplett ungesättigte (z* = -4 und z* = -6) Strukturen die seltensten Vertreter einer solchen Reihe sind (Abbildung 27). Aus Abbildung 22, S.43 wird weiterhin ersichtlich, dass Moleküle mit z* = -6 in zwei Bereichen des van Krevelen-Diagramms erscheinen. Das liegt daran, dass im ausgewählten Massenbereich für z* = -6 sowohl Verbindungen mit einem DBE-O = +4 als auch DBE-O = -3 detektiert wurden. Offensichtlich beinhaltet z* = -6 Mitglieder, die das Ende der einen und den Beginn einer nächsten homologen Serie anzeigen (Abbildung 27). Aus den mittleren O/C- und H/C-Verhältnissen in Tabelle 5 wird ersichtlich, dass Moleküle mit z* = -6 sowohl die kleinsten (DBE-O = +4) als auch die größten DBE-O = -3) O/C- bzw. H/C-Verhältnisse einnehmen. Dadurch stellen sie Extremwerte im Gemisch der LMW-Fulvinsäuren dar und treten, statistisch gesehen, seltener in der Mischung auf. Demzufolge werden alle Massen mit z* = -6 mittels ESI-MS nur mit sehr geringer Intensität detektiert (siehe scan-Spektren in Abbildung 17, S.33).

Zu C) In den Spektren der niedermolekularen Fraktion sind nominelle Massen mit z* = -12 die intensivsten Signale. Massen mit einem z* von -6 sind in den Minima lokalisiert (Abbildung 17, S.33). Vergleicht man die Spektren der HMW- bzw. LMW-Fraktion (Rt = 7.7 min bzw. Rt = 8.9 min aus Abbildung 6 A), wird eine Verschiebung in den Intensitätsmaxima deutlich (Abbildung 28). In der LMW-Fraktion sind die Intensitätsmaxima bei z* = -12 (DBE-O = 0) und in der HMW-Fraktion bei z* = -8 (DBE-O = -2) lokalisiert. In Abschnitt 4.1 wurde erläutert, dass „kleine“ m/z Werte in den hochmolekularen Fraktionen durch Fragmentation hochmolekularer Fulvinsäuren hervorgerufen werden.

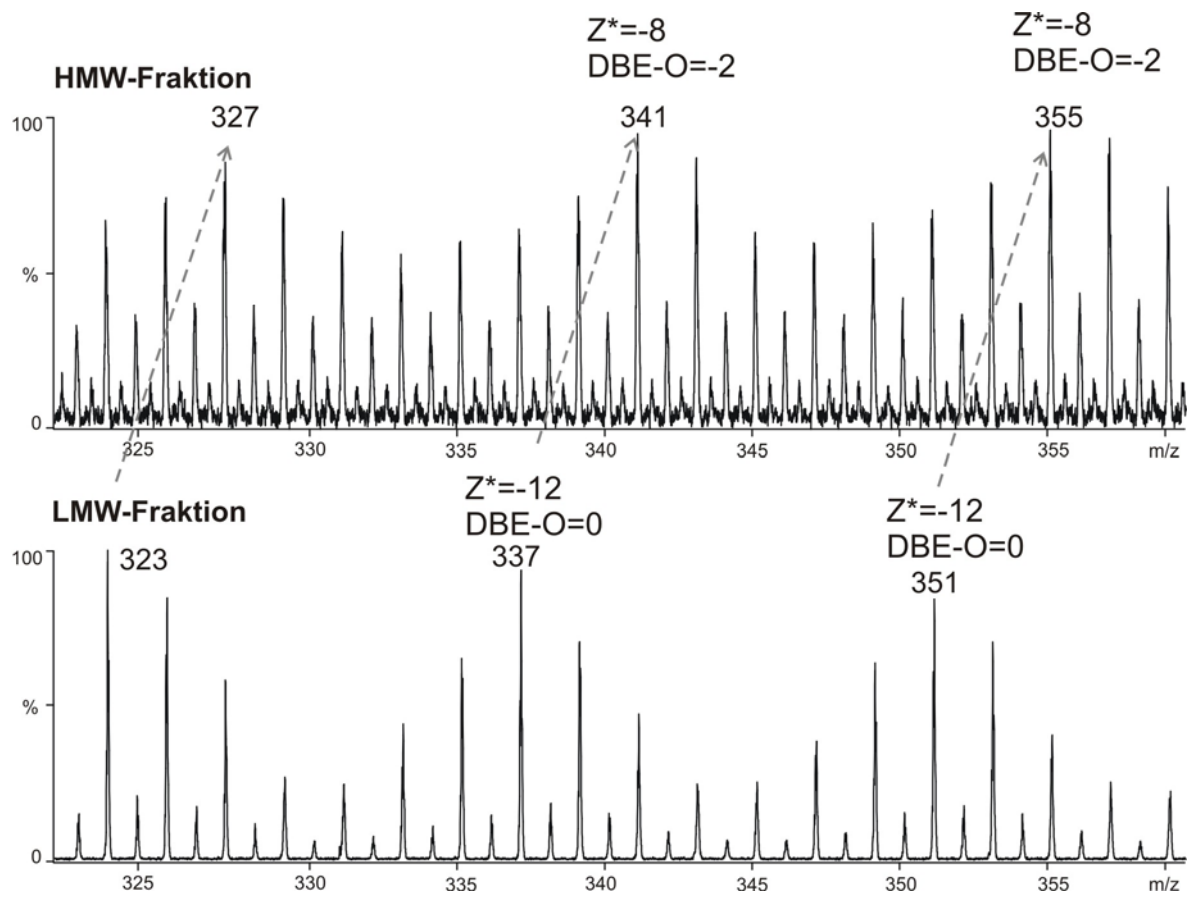

Abbildung 28: Spektrenauszug für m/z 324-359 aus der hochmolekularen Fraktion (oben) und der niedermolekularen Fraktion (unten). Die gestrichelten Pfeile verdeutlichen die Verschiebung der Intensitätsmaxima.

Moleküle mit z* = -8 gehören zu den sauerstoffreichsten im Fulvinsäure-Isolat (Tabelle 5, S.50). Ein hoher Sauerstoffgehalt im Molekül geht mit einer hohen Anzahl an Carbonsäuren einher. Carbonsäurereiche Moleküle sollten im hier verwendeten negativen Elektrospray Modus empfindlich detektiert werden. Somit kann nicht angenommen werden, dass Moleküle mit z* = -8 besonders unempfindlich detektiert würden und deshalb in den Intensitätsminima der niedermolekularen Fraktion liegen. Eine Erklärung für den beobachteten Intensitätsverschiebung zwischen der hoch- und der niedermolekularen Fraktion wäre, dass Moleküle, die vergleichsweise viele Carbonsäuren besitzen, eher zum Bau von größeren

Polymeren geeignet scheinen. Deshalb verarmt die Monomerfraktion an Molekülen mit z* = -8. In der Dimer- bzw. Trimerfraktion werden sie dann durch „in source“ Fragmentation frei.

Auch in Bezug auf die Isobaren ist ein Unterschied zwischen LMW- und HMW-Fraktion zu erkennen. In der hochmolekularen Fraktion werden fast ausschließlich die Moleküle mit geringerem Massendefekt detektiert (Abbildung 29). Das bedeutet auch hier, dass die Verbindung mit mehr Sauerstoffatomen im Molekül, also die oxidierteren Formen, in den hochmolekularen Fulvinsäure-Molekülen bevorzugt auftreten.

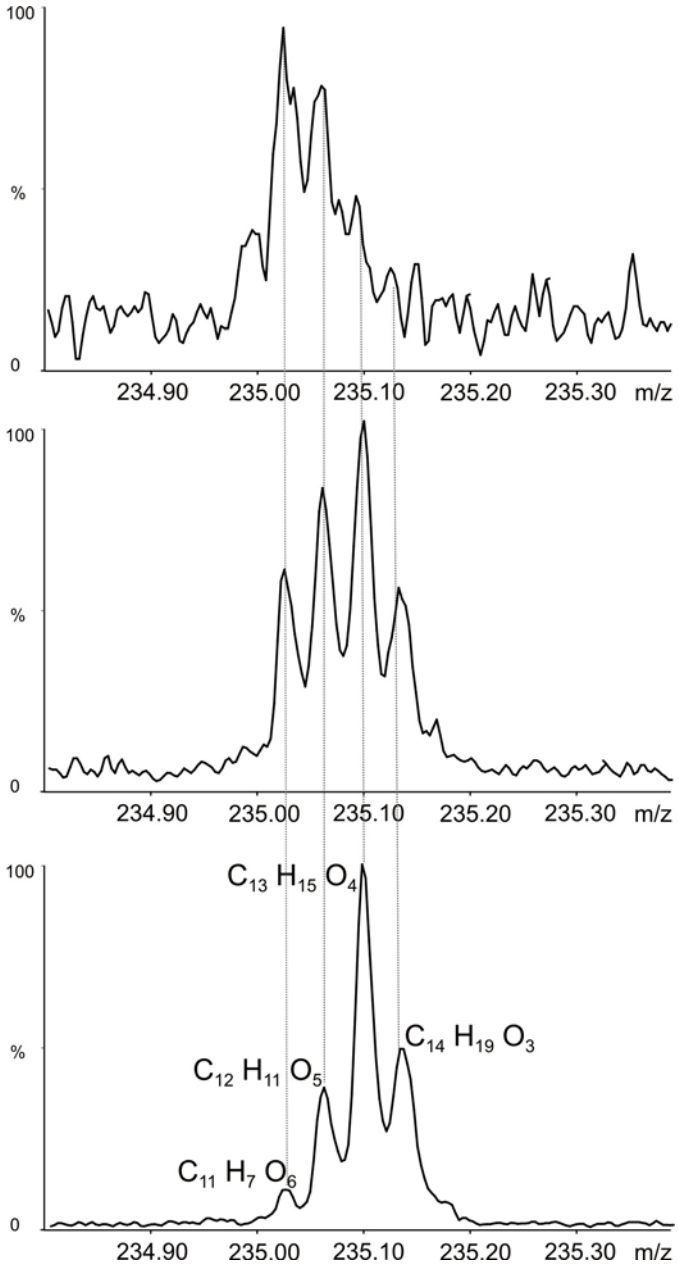

Abbildung 29: Detektion von isobaren Ionen mit m/z 235 in der hochmolekularen (oben), der mittleren (mittig) und der niedermolekularen (unten) Fulvinsäure-Fraktion.

Beim Vergleich der Summenformeln isobarer Moleküle, besitzt das Molekül mit dem geringsten Massendefekt (in den Isobaren links) die höchste Anzahl an Sauerstoffatomen und die geringste Anzahl an Wasserstoffatomen (4.3.3.1). Somit hat es die vergleichsweise höchste Anzahl an Carbonsäuren, dabei aber den kleinsten und am wenigsten gesättigten Kohlenstoffgrundkörper. Dadurch besitzt das Molekül mit dem geringsten Massendefekt (in den Isobaren links) die Eigenschaften für die Bildung hochmolekularer Fulvinsäuren. Bestimmt man die exakten Massen für kleine m/z Werte in den hochmolekularen Fraktionen, dann können in erster Linie nur Ionen mit geringem Massendefekt nachgewiesen werden. Diese haben Summenformeln mit hohen Sauerstoff- und niedrigen Wasserstoffgehalten (Abbildung 29).

Wenn hauptsächlich die sauerstoffreichen Moleküle zur Bildung von höhermolekularen Clustern befähigt sind, dann muss deren Intensität in der Monomerfraktion vergleichsweise gering sein, da sie für die Bildung von Polymeren höheren Grades verbraucht werden. Bei

Retentionszeiten hochmolekularer Stoffe sind sie dann durch „in source“ Fragmentation verstärkt als Monomer detektierbar.

5 Charakterisierung von Fulvinsäuren unterschiedlicher Herkunft

Durch die Kopplung der SEC mit der hochauflösenden Massenspektrometrie können einzelne Fulvinsäure-Moleküle der Suwannee River Fulvinsäuren genauer charakterisiert und strukturelle Eigenschaften aufgezeigt werden. Mit den neu gewonnen Erkenntnissen und durch den Einsatz der SEC-MS sollte es möglich sein, Fulvinsäuren unterschiedlicher Herkunft miteinander zu vergleichen. Von besonderem Interesse ist die Frage, ob die gezeigten Regelmäßigkeiten spezifisch für Suwannee River Fulvinsäuren sind oder ob sie generelle Prinzipien des Aufbaus von Fulvinsäuren darstellen.

Unterschiedliche Herkunft bzw. Quellen sollten auch mit einer unterschiedlichen Genese verbunden sein, die, zumindest teilweise, zu einer unterschiedlichen strukturellen Zusammensetzung in den Fulvinsäure-Isolaten führen sollte. Die mittels Q-TOF-MS erhaltenen Daten werden mit weiteren analytischen Ergebnissen verknüpft. Dies gibt die Möglichkeit, einzelne Strukturen aus dem Fulvinsäure-Isolat bestimmten Eigenschaften zuzuordnen, die im Gesamtgemisch beobachtet werden. Dabei war z. B von großem Interesse, ob durch die TOF-MS Daten Moleküle identifiziert werden können, die besonderen Anteil an der Farbe bzw. der UV Absorption der Mischung haben und ob bestimmte Moleküle dafür entscheidend sind, welches mittlere Molekulargewicht in der Mischung erreicht wird.

Als Vergleichssubstanzen zu Suwannee River (SRFA) wurden Waskish Peat (WPFA), Nordic Aquatic (NAFA) und aus einem Grundwasserleiter in der Nähe von Gorleben (GOFA) gewonnene Fulvinsäuren untersucht. Die Proben stammen aus unterschiedlichen Quellen bzw. Kompartimenten, die in der Literatur wie folgt beschrieben sind:

Der Suwannee River ist ein Schwarzwasserfluss, der in einem Sumpfgebiet in Georgia entspringt und in den Golf von Mexiko fließt. Die Konzentration an gelöstem organischen Kohlenstoff (DOC) liegt zwischen 25-75 mg/L. Es wird angenommen, dass die Fulvinsäuren des Suwannee Rivers aus relativ frisch zersetztem Vegetationsmaterial gebildet werden. Der Okefenokee Sumpf besitzt zwar viele Torfeinlagerungen, es findet aber aufgrund hydrogeologischer Gegebenheiten kaum ein Wasseraustausch zwischen dem Grundwasser des Torfes und dem Oberflächenwasser statt. Des Weiteren wurde das mittlere Alter des Torfkohlenstoffs auf mehrere tausend Jahre geschätzt. Untersuchungen zum durchschnittlichen Alter der Suwannee River Fulvinsäuren ergaben, dass dieses 0-25 Jahren beträgt, es sich also um sehr junges Material handelt (Averett et al. 1989).

Die Nordic Aquatic Fulvinsäuren stammen aus einem 500 m2 großen Teich (Hellerudmyra) im Südosten Norwegens, dessen Volumen auf 2 000 m3 geschätzt wurde. Die Aufenthaltszeit des DOC in diesem See ist mutmaßlich 10 Tage. Die Konzentration des DOC wurde mit 19.2 mg/L bestimmt (Gjessing et al. 1999). Weiteren Untersuchungen ergaben, dass der im See enthaltene DOC extrem stark von anliegenden Moorgebieten beeinflusst ist (Egeberg et al. 1999; Gjessing et al. 1999).

Waskish Peat Fulvinsäuren werden aus festem Probenmaterial isoliert, welches aus einem Torfmoor in Minnesota stammt. Das extrahierte Bodenmaterial hatte eine hohe Feuchtigkeit, sodass von sehr geringer Sauerstoffzufuhr ausgegangen wird. Weiterhin wird angenommen, dass das Fulvinsäure-Isolat zu großen Teilen aus nur leicht zersetztem Torfmoos gebildet wurde. Die durchschnittliche Jahrestemperatur wird mit 4° C angegeben. Dadurch ist die mikrobielle Aktivität sicherlich gering.

Die Fulvinsäuren aus Gorleben (Niedersachsen) wurden aus einem Grundwasser angereichert. Das Grundwasser war tief braun gefärbt und hatte eine DOC Konzentration von 97.2 mg C/L. Der zugehörige Grundwasserleiter liegt in ca. 130 m Tiefe über einem Salzbergwerk. Es wird davon ausgegangen, dass das organische Material zu einem großen Anteil aus sedimentärem Kohlenstoff (Braunkohle) stammt (Artinger et al. 2000; Buckau et al. 2000b; Buckau et al. 2000a).

Die Isolation von Fulvinsäuren aus wässrigen Proben bzw. festem Probenmaterial sowie chemischen Analysen sind unter (www.ihss.gatech.edu) beschrieben. Ausgewählte Ergebnisse chemischer Untersuchungen der Isolate sind in Tabelle 6 beschrieben.

Tabelle 6: Elementare Zusammensetzung der untersuchten Fulvinsäuren. Die Werte für C, H, O und N sind in Gewichtsprozenten angegeben. Alle weiteren Angaben sind Abschätzungen für die Kohlenstoffverteilung basierend auf ^{13}C NMR.

Probe	C	H	O	N	Carbonyl	Carboxyl	Aromatisch	Aliphatisch
SRFA*	53.04	4.36	43.91	0.75	7	20	24	33
NAFA*	52.31	3.98	45.12	0.68	10	24	31	18
WPFA*	53.63	4.24	41.81	1.07	7	19	36	20
GOFA**	54.10	4.23	38.94	1.38	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

* Angaben der IHSS (www.ihss.gatech.edu)
** Angaben der GSF (Artinger et al. 2000)

5.1 SEC-OCD Messungen

Um die Molekulargewichtsverteilungen der verschiedenen Fulvinsäuren zu vergleichen, wurden die Proben mittels SEC-OCD vermessen. Über die Detektion des DOC-Gehaltes ohne vorangegangene Chromatographie (Bypassmessung) wurden alle Chromatogramme auf den gleichen Kohlenstoffgehalt normiert.

Betrachtet man die SEC-OCD Chromatogramme der verschiedenen Fulvinsäure-Standards (Abbildung 30), wird deutlich, dass ein merklicher Unterschied in der Molekulargewichtsverteilung der einzelnen Proben besteht. Z. B. beginnt der Anstieg des Chromatogramms der Waskish Peat-Probe zwei Minuten früher, als der Suwannee River-Probe. Bei einer Kalibration der verwendeten Säule mit Polyethylenglukol (PEG) Standards machten 2 min in diesem Retentionszeitenbereich einen Unterschied im mittleren Molekulargewicht von ca. 20 000 Da aus (siehe Abbildung 31). Dieser Wert soll keinen absoluten Unterschied im mittleren Molekulargewicht zwischen den jeweiligen Fulvinsäuren darstellen. Es soll ausschließlich zum Ausdruck gebracht werden, dass der Zeitversatz von 2 min in diesem Retentionszeitenbereich einen erheblichen Unterschied im Molekulargewicht bedeutet.

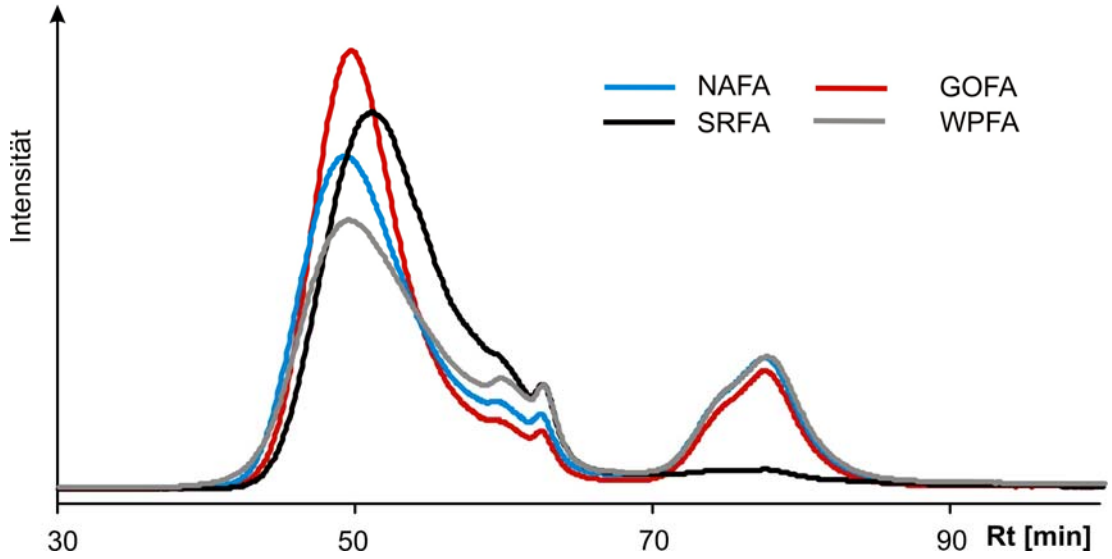

Abbildung 30: SEC-OCD Chromatogramme der vier Fulvinsäuren. Die Chromatographie wurde mit der HW 50 Säule durchgeführt. Über die Bypass-Messung wurden alle Proben auf den gleichen Kohlenstoffgehalt normiert.

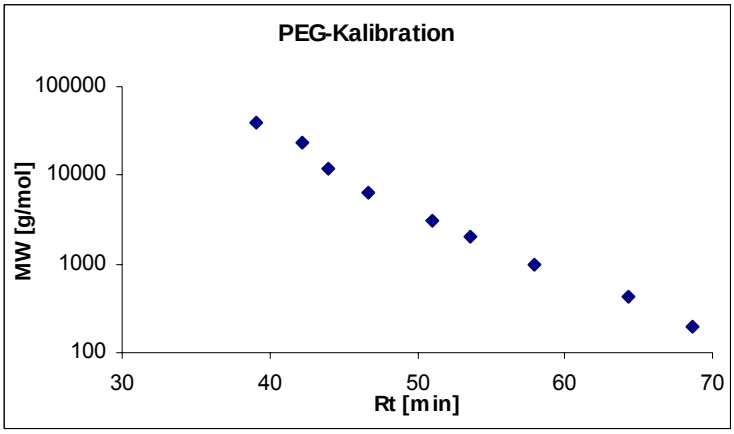

Abbildung 31. Kalbration der HW 50 Säule mit PEG-Standards in einem Molekulargewichtsbereich von 40 000-100 Da.

Der gleiche Zeitversatz von 2 min gilt auch für das Intensitätsmaximum. Dies lässt darauf schließen, dass die WPFA-Probe ein größeres mittleres Molekulargewicht besitzt als der SRFA-Standard. Vergleicht man den WPFA- mit dem NAFA-Standard, wird sichtbar, dass die Molekulargewichtsverteilung in der NAFA-Probe wesentlich enger ist, sodass trotz späteren Elutionsbeginns das Intensitätsmaximum bei ähnlichen Zeiten wie in der WPFA Probe zu detektieren ist. Im niedermolekularen Bereich (Rt = 58-67 min) ist der Kohlenstoffgehalt des Suwannee River Standards deutlich höher.

Auffällig bei den WPFA-, GOFA- und NAFA-Proben ist der spät eluierende Peak (Rt = 72-82 min). Es ist anzunehmen, dass für diese Analyten Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial stattfinden (Chromatographieeffekt). Zu diesem Zeitpunkt eluieren nur noch hydrophobe Stoffe. Die Substanzen zeigten keine UV-Aktivität. Somit können Aromaten bzw. konjugierte □-Systeme ausgeschlossen werden. Wahrscheinlich handelt es sich bei dieser Fraktion (Rt = 72-82 min) um eine Verunreinigung der Proben, die bei der Aufarbeitung nicht von den Fulvinsäuren abgetrennt werden konnte.

5.1.1 Absorptionsmessung

Als weiterer Parameter wurde die UV- und vis-Absorption der Proben untersucht. Da die Absorption im UV-Bereich viel höher ist als im vis-Bereich, wurden für die Untersuchung zwei unterschiedliche Konzentrationen verwendet. Der pH-Wert war in allen vier Proben gleich und die Absorptionswerte waren, über den zuvor bestimmten C-Gehalt, auf den gleichen Kohlenstoffgehalt normiert worden.

Die Absorptionskurven der Fulvinsäuren zeigen keine ausgeprägten Absorptionsmaxima (Abbildung 32). Vielmehr wird eine gleichmäßige Abnahme des Absorptionsvermögens mit zunehmender Wellenlänge deutlich.

Aus Abbildung 32 (oben) wird ersichtlich, dass der Verlauf der jeweiligen Absorptionskurven im Bereich zwischen 200 nm und 400 nm sehr ähnlich ist. Grundsätzlich besitzt die Suwannee River Probe ein geringeres Absorptionsvermögen. Das wird im sichtbaren Bereich noch deutlicher (Abbildung 32 unten). Bei gleichen Kohlenstoffkonzentrationen zeigt das Waskish Peat Fulvinsäure-Isolat, verglichen zu SRFA, grundsätzlich eine höhere Absorption. Im Wellenlängenbereich um 400 nm ist das Absorptionsvermögen um den Faktor 2 höher, während bei 600 nm beide Fulvinsäure-Isolate schon der Faktor 4 trennt.

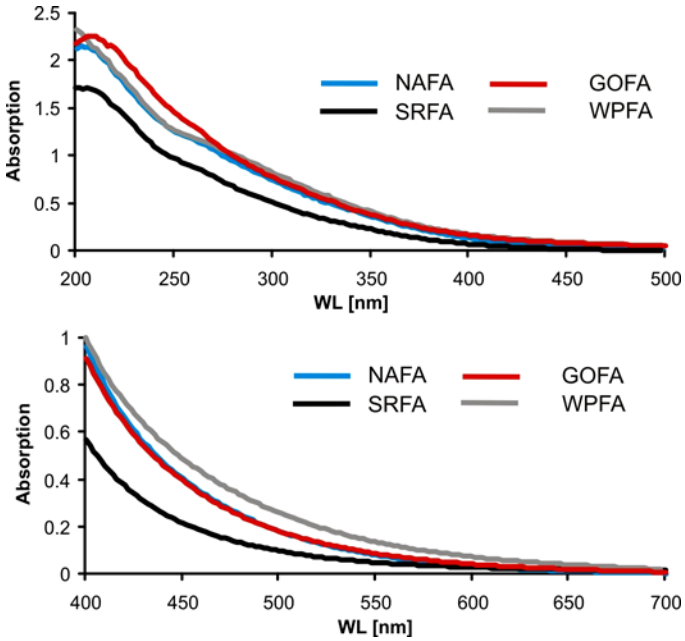

Abbildung 32: UV-vis-Spektrum der vier untersuchten Fulvinsäuren bei pH 3.5. Die Absorptionswerte wurden auf den gleichen Kohlenstoffgehalt normiert. Für das UV-vis-Spektrum von 200-500 nm wurde eine Konzentration von 50 mg/L (Fulvinsäure) und für den Wellenlängenscan 400-700 nm eine Konzentration von 330 mg/L (Fulvinsäure) verwendet.

Durch Bestimmung des Verhältnisses der Absorption bei 465 nm und 665 nm (E4/E6) ist eine weitere Möglichkeit gegeben, gelöstes organisches Material zu charakterisieren und verschiedene Fulvinsäuren miteinander zu vergleichen. Die absolute Absorption bei 465 nm bzw. 665 nm zwar von der Konzentration der Huminstoffe abhängig ist, nicht aber deren Quotient E4/E6 (Chen et al. 1977). Dabei wird die Absorption bei höheren Wellenlängen (E6) eher durch größere Moleküle hervorgerufen. Die Größenordnung dieses Quotienten reflektiert den Grad der Kondensation des aromatischen „Netzwerkes“. Fraktionen mit kleinem Molekulargewicht besitzen demzufolge einen großen Quotienten und Fraktionen mit großem Molekulargewicht einen kleinen (negative Korrelation) (Chen et al. 1977; Trubetskoj et al. 1992; You et al. 1999). Es spielen aber weitere Faktoren, wie z. B. die Anzahl an CO_2-Gruppen, eine Rolle. In diesem Fall liegt aber eine positive Korrelation vor. Je höher die Anzahl der CO_2-Gruppen, desto größer ist auch der E4/E6 Quotient (Chen et al. 1977). Da der pH-Wert der Lösung deutlich das mittlere Molekulargewicht (und darüber die UV-Absorption) einer Fulvinsäurelösung beeinflusst, ist es wichtig, vergleichende Messungen bei konstantem pH-Wert durchzuführen. Der absolute Wert des E4/E6 Verhältnisses ist somit auch vom gewählten pH-Wert abhängig (Chen et al. 1977).

Tabelle 7: E4/E6 (Absorption bei 465 nm/665 nm) und E2/E4 (Absorption bei 254 nm/465 nm) Verhältnisse der vier Fulvinsäureproben. Der pH-Wert der Lösungen betrug bei der Messung 3,5.

Probe	E4/E6	E2/E4
WPFA	12.6	18.9
GOFA	14.9	27.8
NAFA	21.6	24.4
SRFA	20.5	39.4

Folgt man den vorherigen Ausführungen über die Aussagekraft des E4/E6 Verhältnisses, so implizieren die in Tabelle 7 aufgeführten Quotienten, dass die Waskish Peat Fulvinsäure (WPFA) das größte mittlere Molekulargewicht und die höchste Absorption im farbigen Wellenlängenbereich besitzt. Bezogen auf die Absorptionsdaten ist die Gorleben-Fulvinsäure (GOFA) der WPFA-Probe im E4/E6 Verhältnis ähnlich. Die Gorleben-Fulvinsäure zeigt aber eine deutlich höhere Absorption im UV-Bereich (vergleiche Abbildung 32), was auf eine hohe Anzahl isolierter aromatischer Systeme schließen lässt (E2/E4 in Tabelle 7). Das hohe E4/E6-Verhältnis der NAFA und SRFA lässt vermuten, dass es sich bei diesen Proben sowohl um die Proben mit dem kleinsten Molekulargewichts als auch mit dem geringsten Absorptionsvermögen im sichtbaren Wellenlängenbereich handelt. Diese Annahme trifft zwar auf die Suwannee River Probe, nicht aber auf Nordic Aquatic Probe zu (siehe Abbildung 30 und Abbildung 32). Der Quotient der NAFA-Probe wird sicher auch durch den prozentual größeren Carboxyl-Anteil der Probe erhöht (siehe Tabelle 6). Weiterhin sind die Absorptionswerte bei 665 nm für SRFA sehr niedrig, sodass kleine Messfehler relativ große Änderungen des Quotienten hervorrufen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das E4/E6-Verhältnis für SRFA zu niedrig bestimmt wurde.

Aus den Daten der IHSS (Tabelle 6), den Absorptionsmessungen und den SEC-OCD Chromatogrammen geht hervor, dass die größten Unterschiede zwischen der Suwannee River und der Waskish Peat Probe zu finden sein sollten. Viele Vergleiche der MS-Daten beschränken sich deshalb im Folgenden auf diese beiden Proben.

Durch die chemischen Analysen der IHSS (Tabelle 6) sowie durch die in den beiden vorigen Kapiteln beschriebenen Untersuchungen können folgende Unterschiede in den chemischen Eigenschaften der Standards festgestellt werden. Der Suwannee River Standard besitzt das niedrigste mittlere Molekulargewicht, das geringste Absorptionsvermögen, den größten Anteil an aliphatischen Gruppen sowie den geringsten Anteil an aromatischem Kohlenstoff.

5.1.2 SEC-Q-TOF-MS Messungen

Die vier unterschiedlichen Fulvinsäure-Isolate wurden auch mittels SEC-Q-TOF-MS untersucht. Wie schon zuvor für Suwannee River Fulvinsäuren gezeigt, trennt die SEC die Probe in drei Fraktionen. In Abbildung 33 sind nur die Chromatogramme der Waskish Peat und der Suwannee River Fulvinsäure dargestellt. Die Chromatogramme der anderen beiden Proben zeigen einen ähnlichen Verlauf. In Bezug auf die Retentionszeiten der hochmolekularen Fraktionen (HMW) können GOFA und NAFA zwischen den beiden in Abbildung 33 dargestellten Fulvinsäuren eingeordnet werden. Die niedermolekulare Fraktion eluiert bei allen vier Proben bei Rt = 7.49 min.

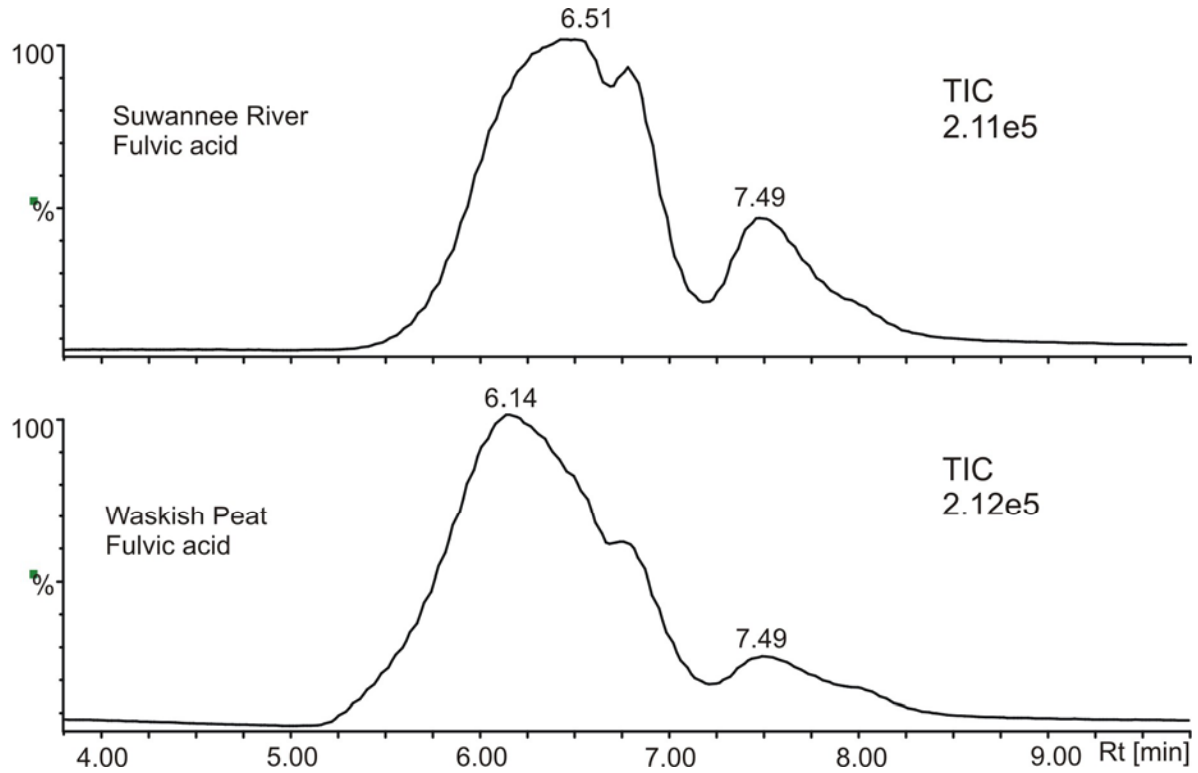

Abbildung 33: SEC-Q-TOF Chromatogramm für m/z 150-1000.

Vergleicht man die beiden Chromatogramme in Abbildung 33, ist für die Waskish Peat (WPFA) Probe sowohl ein früherer Elutionsbeginn, als auch eine Verschiebung des Intensitätsmaximums der HMW-Fraktion zu früheren Retentionszeiten zu beobachten. Die Trennung mittels SEC-MS entspricht somit der LC-OCD und bestätigt dadurch deren Ergebnisse.

Für den Vergleich der Spektren wird hauptsächlich das Spektrum der niedermolekularen Fraktion (Rt = 7.49 min) verwendet. Im Vergleich zur HMW-Fraktion (Rt = 6.51 min) besitzt diese Fraktion im Chromatogramm eine geringere Intensität. Die Qualität der Spektren ist aber wesentlich höher, da die Signale hoher Intensität auf einen geringeren Massenbereich beschränkt sind und dadurch detektiert werden.

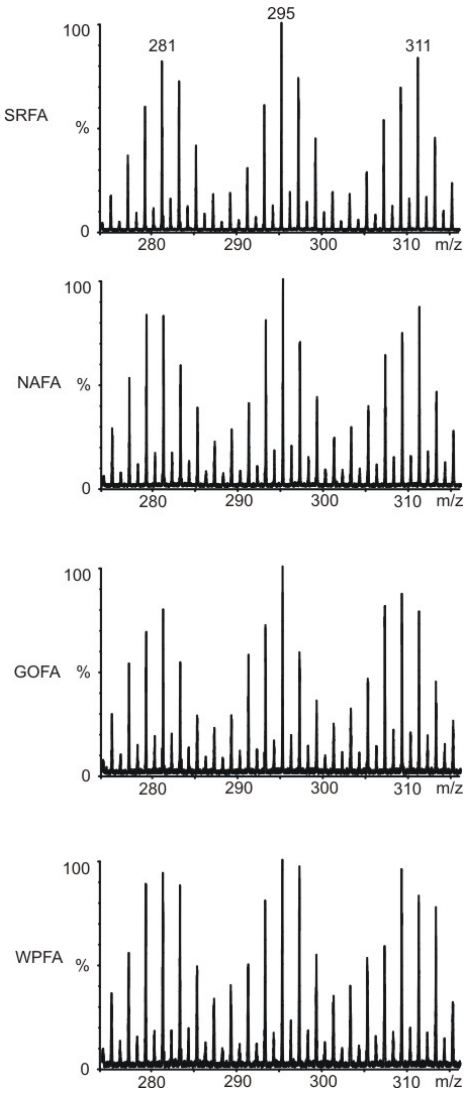

Abbildung 34: Spektrum des Massenbereiches m/z 275-315 für vier unterschiedliche Fulvinsäuren.

Ein Ausschnitt aus den Massen-Spektren der LMW-Fraktion aller vier Fulvinsäure-Isolate ist in Abbildung 34 gezeigt.

Wie bereits für die Spektren der Suwannee River Fulvinsäuren beschrieben, zeigen auch die Spektren der anderen untersuchten Proben eine wellenartige Intensitätsverteilung, deren Maxima periodisch alle 14 Massen auftreten. Im Spektrum ist jede nominelle Masse mehrfach von isobaren Ionen besetzt (Abbildung 37).

Eine Auswertung der exakten Massen nach den in Abschnitt 4.3.1 beschriebenen Kriterien wurde für die Massenbereiche von m/z 150-200 und m/z 275-303 vorgenommen (wird nicht gezeigt). Dabei konnten für den kleineren Massenbereich jedes untersuchten Fulvinsäure-Isolates 80 Summenformeln bestimmt werden. Die Summenformeln von NAFA, WPFA und GOFA sind zu 98 % mit denen der Suwannee River Probe identisch. Für den größeren Massenbereich (m/z 275-303) wurden für alle Fulvinsäuren durchschnittlich 32 Summenformeln bestimmt. Diese zeigen jeweils ca. 85 % Übereinstimmung mit den Summenformeln des Suwannee River Isolates (Abbildung 36). Die etwas geringere Übereinstimmung im höheren Massenbereich ist durch messtechnische Schwierigkeiten zu erklären, da die Auflösung des TOF-MS mit zunehmender Masse abnimmt. Alle Summenformeln, die nicht mit denen der Suwannee River Probe übereinstimmen, können aber trotzdem in die zuvor beschriebenen H_2- und CH_2-Reihen eingeordnet werden und gliedern sich in die Formation der Summenformeln isobarer Moleküle ein. Geringere Übereinstimmungen treten nur an den Rändern der von Fulvinsäuren eingenommenen H/C- bzw. O/C-Bereiche auf (siehe Abbildung 36). Diese stellen Extremwerte hinsichtlich des Oxidations- bzw. Sättigungsgrades der einzelnen Moleküle im Isolat dar. In diesen Grenzbereichen wird die Häufigkeit einiger Moleküle zwangsläufig geringer. Die Intensität dieser Signale kann dann unter die Nachweisgrenze der massenspektrometrischen Detektion fallen.

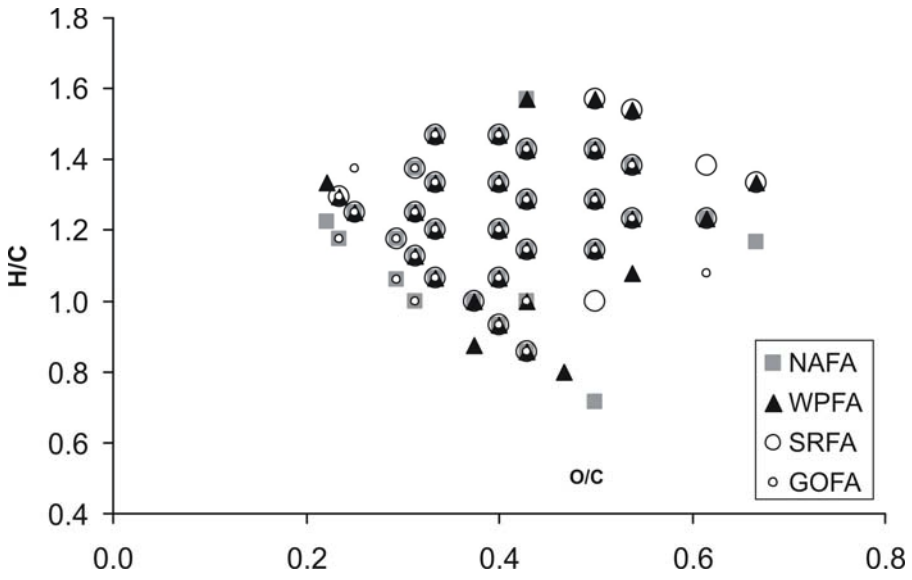

Abbildung 36: Detektierte Summenformeln der vier Fulvinsäuren im Massenbereich mit m/z 275-303 der niedermolekularen Fraktion (Rt = 7.5 min in Abbildung 30, S.60).

Um Aussagen darüber zu treffen, ob identische Summenformeln auch identischen Strukturen gleichgesetzt werden können, wurden für ca. 10 Moleküle Tochter-Ionen-Spektren aufgenommen (Abbildung 35). Die dabei erhaltenen MS/MS Spektren sind in allen

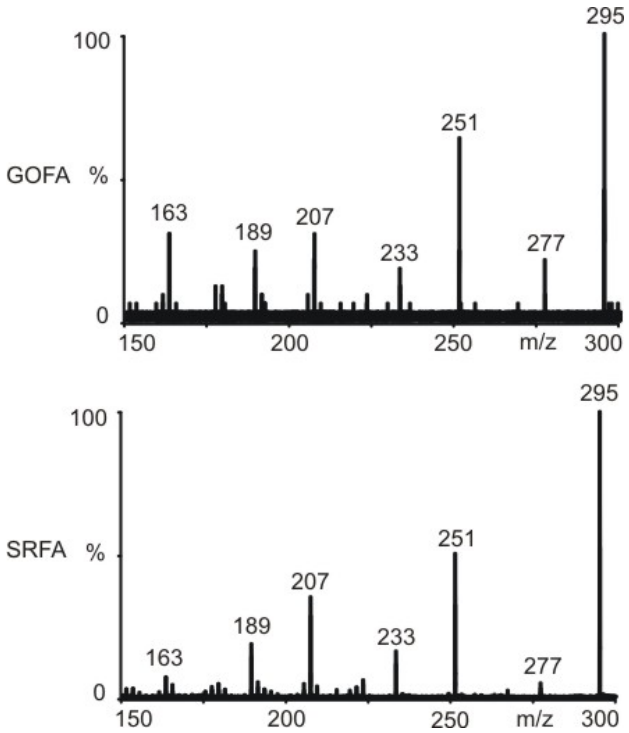

Abbildung 35: Produkt-Ionen-Spektrum für m/z 295, dargestellt für Fulvinsäuren aus Gorleben (oben) und des Suwannee Rivers (unten).

untersuchten Fulvinsäureproben identisch. Es ist also davon auszugehen, dass es sich nicht nur um identische Summenformeln, sondern auch um identische Moleküle handelt. Dies bedeutet weiterhin für die untersuchten Fulvinsäuren, dass sie, so komplex sie auch zusammengesetzt sind, die gleiche qualitative Zusammensetzung aufweisen, obwohl sie unterschiedlicher Herkunft sind und auch aus unterschiedlichen Kompartimenten stammen.

Erst im Detail, im Vergleich der Intensitäts-Verhältnisse der isobaren Ionen zueinander, ist ein Unterschied in den Proben zu finden (Abbildung 37).

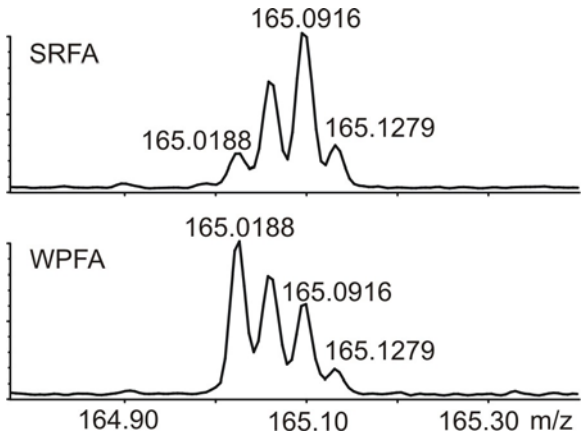

Abbildung 37: Ausschnitt der LMW-Spektren, der die nominelle Masse m/z 165 zeigt.

Das heißt, dass die relative Konzentration, bzw. die Verteilung einzelner Moleküle, in den jeweiligen Isolaten offensichtlich anders ist. Dieser Unterschied in der Verteilung wird durch die Vergrößerung der einzelnen nominellen Massen sichtbar (Abbildung 37). Das Auflösungsvermögen (A = □M/M) eines Massenspektrometers ist für den gleichen aufzulösenden Massenabstand im kleineren Massenbereich größer. Deshalb ist es möglich, isobare Ionen für den m/z Bereich 150-200 teilweise bis auf die Basislinie voneinander zu trennen.

Um die unterschiedlichen Intensitätsverhältnisse der einzelnen isobaren Ionen zu erkennen, ist es wichtig, dass sich die jeweiligen Signale nicht oder nur wenig überlagern. Anderenfalls würde es zu Verfälschungen in den Intensitäten kommen. Aus diesem Grund wird nur der Bereich zwischen 150-200 Da für die nachfolgende Auswertung genutzt.

In Abbildung 37 wird deutlich, dass in der Waskish Peat Fulvinsäure die Massen mit einem kleinen Massendefekt eine viel höhere Intensität haben. In der Suwannee River Probe ist die Masse 165.0916 (C_{10} H $_{13}$ O_2) das intensivste Signal der Isobaren. Dieselbe Masse zeigt in der Waskish Peat Probe nur noch die drittgrößte Intensität, wobei die Masse 165.0188 (C_8 H_5 O_4) am intensivsten vertreten ist. In den Untersuchungen der Isobaren in Abschnitt 4.3.3.1 wurde gezeigt, dass dieser geringere Massendefekt den Molekülen mit einem höheren Sauerstoffanteil und einem kleineren, doppelbindungsreicherem Kohlenstoffgrundgerüst zuzuordnen ist.

Der in Abbildung 37 für WPFA aufgezeigte Trend, einer Verschiebung innerhalb der Isobaren zu Molekülen mit kleinerem Massendefekt, kann in fast allen nominellen Massen dieser Isolate beobachtet werden (siehe Abbildung 38).

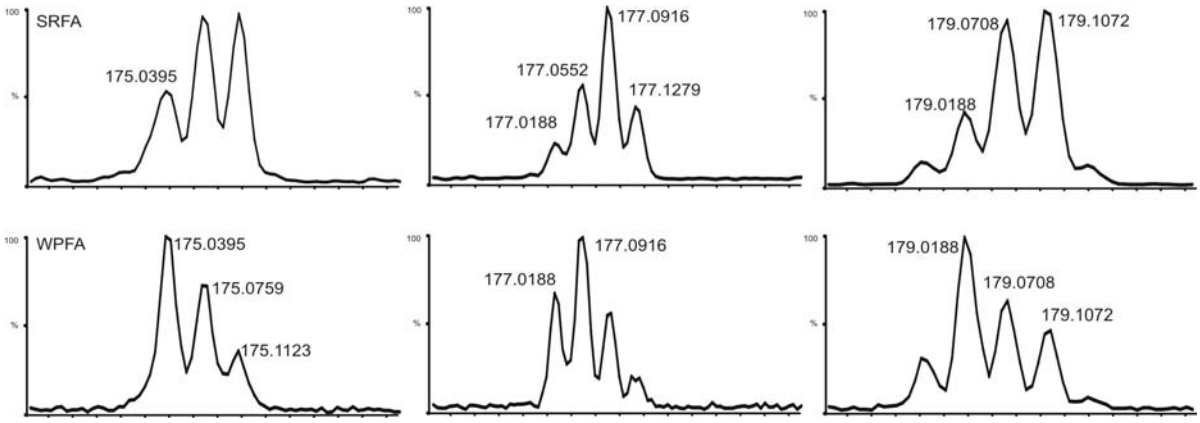

Abbildung 38: Vergrößerung des Spektrums für die isobaren Massen mit m/z 175, 177 und 179 für den Suwannee River (oben) und den Waskish Peat (unten) Standard.

5.1.3 Dreidimensionales van Krevelen-Diagramm

Da die vier Fulvinsäure-Isolate kaum Unterschiede in der qualitativen Zusammensetzung zeigen, ist die Berücksichtigung der relativen Häufigkeit der einzelnen Moleküle von großer Wichtigkeit. Abbildung 39 stellt eine Kombination der im van Krevelen-Diagramm aufgetragenen Summenformeln und deren jeweilige Intensität im Spektrum dar. Zur Erstellung eines solchen dreidimensionalen van Krevelen-Diagramms (3 D-van Krevelen-Diagramm) wurden die Intensitäten aller detektierten Summenformeln des Massenbereichs 152-178 Da gemäß ihrer O/C- bzw. H/C-Werte aufgetragen. Damit die Intensitäten der jeweiligen Summenformeln untereinander vergleichbar sind, wurde für alle vier Proben im Chromatogramm der gleiche Retentionszeitenbereich summiert. Für diese Summation des Spektrums wurde weiterhin die gleiche Anzahl an Scans gewählt. Es soll noch einmal ausdrücklich daran erinnert werden, dass die detektierten Summenformeln des gewählten Massenbereichs in allen vier Proben zu fast 100 % übereinstimmten (d. h., dass in jedem Diagramm in Abbildung 39 die gleichen x und y Werte vorliegen). Die Unterschiede werden nur durch unterschiedliche relative Intensitäten erzeugt.

Carbonsäuren sind funktionelle Gruppen, die im Massenspektrometer leicht abgespalten werden. Fulvinsäure sind Substanzen, die viele Carbonsäuren tragen und somit zu Fragmentationen neigen. Der ausgewertete Massenbereich von 152-178 Da ist der niedrigste Bereich, der für die massenspektrometrische Detektion ausgewählt wurde. Es kann nicht

ausgeschlossen werden, dass in diesem Massenbereich auch Fragmente größerer Fulvinsäure-Moleküle detektiert wurden. Der Verlust von CO2 verschiebt ein Molekül im van Krevelen-Diagramm zu höheren H/C- und kleineren O/C-Werten. Es muss davon ausgegangen werden, dass der gesamte Plot aller Proben nach links oben verschoben ist (vergleiche SRFA in Abbildung 40 und Abbildung 22, S.43). Da aber alle Proben gleich vermessen und ausgewertet wurden, sollten die Resultate trotzdem vergleichbar sein.

Auffällig im 3 D-van Krevelen-Diagramm der WPFA Probe sind die zwei Maxima, wobei ein Maximum bei sehr niedrigen O/C-Werten (0.2) und sehr niedrigen H/C-Werten (0.8) lokalisiert ist. Ein solches Maximum wird in keiner anderen Probe gefunden. Dieser Bereich des van Krevelen-Diagramms, der auf einen hohen Anteil an aromatischen Molekülen hinweist, die relativ wenige Carbonsäuren besitzen (in Übereinstimmung mit ^{13}C NMR des

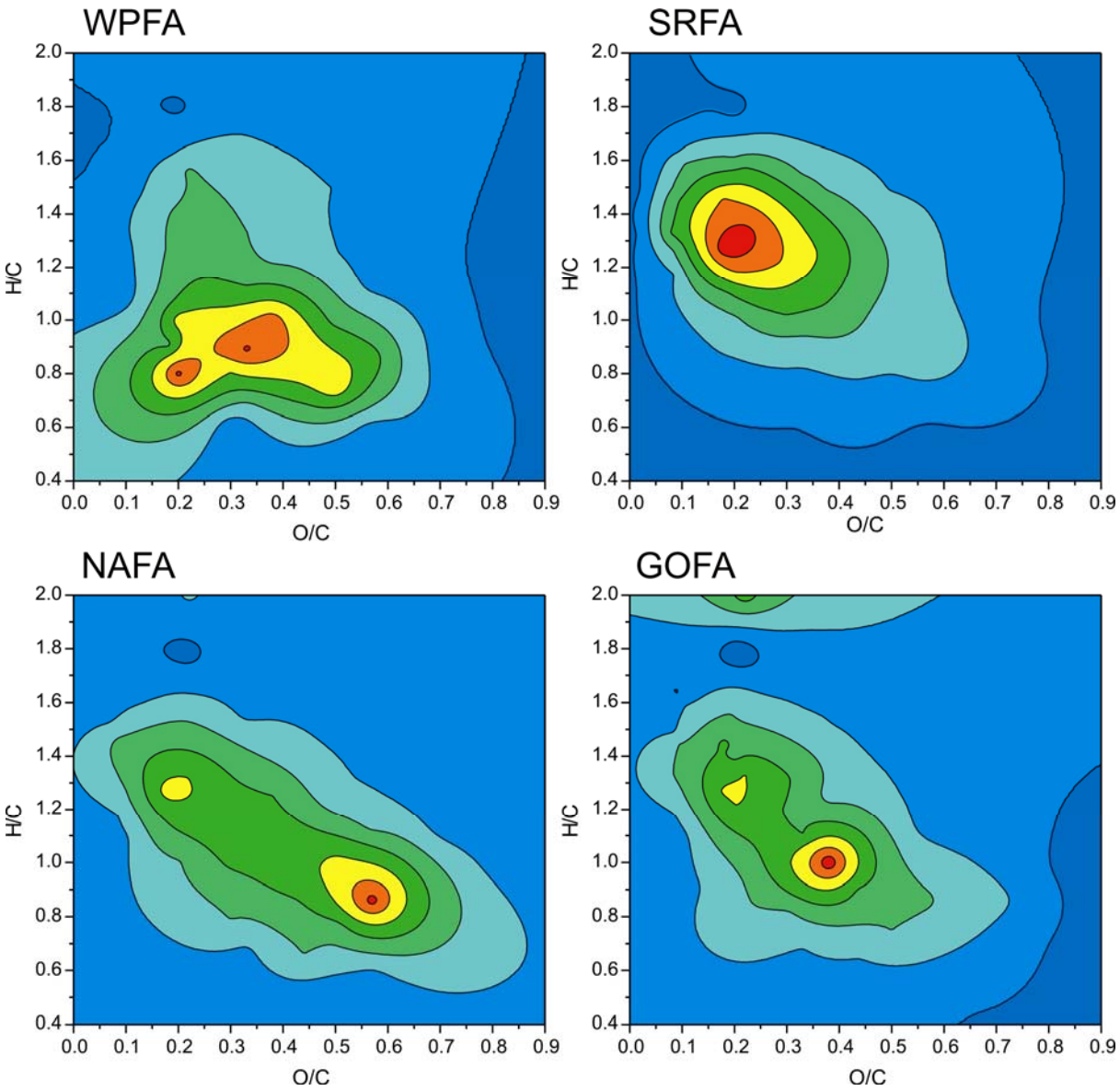

Abbildung 39: 3 D-van Krevelen-Diagramm: Darstellung der Intensitäten detektierter Summenformeln des Massenbereichs 152-178 Da im van Krevelen-Diagramm. In diesem Massenbereich wurden durchschnittlich 45 Summenformeln bestimmt.

gesamten Isolates in Tabelle 6). Analyten hoher Aromatizität bei gleichzeitig geringer Anzahl an Carbonsäuren sind vergleichsweise schwer wasserlöslich und neigen tendenziell eher zur Sorption. Aus diesem Grund erscheint es logisch, dass diese Moleküle auch häufiger in Fulvinsäure-Isolaten auftreten, die aus einem Bodeneluat stammen (WPFA). Das zweite Maximum in der WPFA Probe (O/C: 0.35; H/C: 0.9) spiegelt die typischen aquatischen Fulvinsäure-Moleküle wider. Diese Bereiche sind weniger aromatisch und besitzen einen höheren Carboxylanteil.

Die SRFA Probe zeigt eine gleichmäßige Intensitätsverteilung und weist nur ein Maximum auf (O/C: 0.2; H/C:1.3). Ein Maximum in diesem Bereich des van Krevelen-Diagramms ist durch einen hohen Anteil an Molekülen aliphatischer Struktur zu erklären (in Übereinstimmung mit 13C NMR des gesamten Isolates in Tabelle 6).

Auch das NAFA Isolat zeigt zwei Maxima. Neben dem Maximum (O/C: 0.35; H/C: 0.9), das auch in der SRFA und GOFA Probe auftritt, ist ein weiteres Maximum (O/C: 0.55 und H/C: 0.85), das in keiner weiteren Probe gefunden wird. Dieser Bereich im van Krevelen-Diagramm ist stark oxidierten Molekülen mit einem hohen Anteil an Carboxylgruppen zuzuordnen (in Übereinstimmung mit 13C NMR des gesamten Isolates in Tabelle 6).

Das 3 D-van Krevelen-Diagramm der Grundwasser-Fulvinsäure GOFA besitzt ein Maximum der WPFA-Probe (O/C:0.35; H/C: 0.95) und ein Maximum der NAFA-Probe (O/C: 0.2; H/C: 1.3). Die Gemeinsamkeit dieser drei Isolate liegt darin, dass Moorboden bzw. sedimentären Kohlenstoff starken Einfluss auf die Bildung der Fulvinsäuren hatten (Gjessing et al. 1999; Artinger et al. 2000). Die Waskish Peat Fulvinsäuren sind direkt aus einem Moorboden isoliert worden. Die NAFA und GOFA Proben sind Isolate aus wässrigen Proben. Demzufolge fehlt diesen beiden Proben das Maximum des stark aromatischen/sauerstoff-armen Bereichs im van Krevelen-Diagramm der WPFA Probe. Ein Unterschied zwischen NAFA und den anderen beiden Fulvinsäuren ist, dass NAFA aus einem Oberflächenwasser isoliert wurde. Das bedeutet, dass die Fulvinsäuren dieser Probe bereits dem Licht ausgesetzt waren und das Material einer gewissen Überarbeitung unterworfen war. Möglicherweise ist das Maximum (O/C: 0.35; H/C: 0.9) in der NAFA Probe mit dem hohen Anteil an Carboxylgruppen durch den Einfluss von UV-Strahlung zu erklären (5.1.4).

Das 3 dimensionale van Krevelen-Diagramm stellt eine Kombination aus qualitativen Daten (chemische Zusammensetzung) und quantitativen (relative Häufigkeit) Daten dar. Diese Kombination zeigt, dass ausgehend von den massenspektrometrisch gewonnenen Informationen einzelner Moleküle auch die unterschiedlichen Eigenschaften des Fulvinsäure-Isolates (UV-Absorption, mittleres Molekulargewicht) erklärt werden können. Für die beiden unterschiedlichsten Fulvinsäuren (WPFA und SRFA) kann festgestellt werden, dass in der WPFA Probe, verglichen zur SRFA Probe, Moleküle mit höheren O/C- und kleinere H/C-Werten häufiger sind. Das bedeutet, dass im Waskish Peat Fulvinsäure-Isolat ein höherer

Anteil an Molekülen mit einem doppelbindungsreicheren Kohlenstoffgrundgerüst vorliegt. Die Zunahme an Kohlenstoffdoppelbindungen ist mit einem Überwiegen von aromatischen zu aliphatischen Strukturen gleichzusetzen. Das erklärt das größere UV Absorptionsvermögen der Waskish Peat Probe.

Der Trend, dass Fulvinsäure-Moleküle mit höheren O/C- und kleineren H/C-Verhältnissen auch ein größeres Molekulargewicht besitzen, wurde in Abschnitt 4.3.3.3 gezeigt und auch in der Literatur (Rashid und King 1971; Visser 1983a; Kujawinski et al. 2002b) beschrieben. Er erklärt das höhere Molekulargewicht der Waskish Peat Fulvinsäure.

5.1.4 Hinweise zur Transformation bzw. Genese von Fulvinsäuren

Da die Huminstoffe sowohl einen großen prozentualen Anteil am natürlichen organischen Kohlenstoff ausmachen als auch durch ihre Mobilität im Kohlenstoffkreislauf eine wichtige Rolle spielen, sind ihre Herkunft und die Prozesse ihrer Bildung bzw. ihres Abbaus von großer Bedeutung. Um Transformationen erkennen zu können, muss man abwägen, welche Strukturen für diese Stoffe überhaupt erwartet werden können.

Hinsichtlich des Abbaus organischer Stoffe durch Mikroorganismen bei aeroben Bedingungen sind die klassischen Wege der β-Oxidation von Aliphaten bzw. des Aromatenabbaus zu erwähnen. Der Abbau von Aromaten erfolgt durch die Oxidation des Rings zu polaren Zwischenprodukten, wie z. B. Brenzcatechin. Daraus entstehen durch Ringspaltung offenkettige Carbonsäuren, die über die β-Oxidation weiter abgebaut werden können. Bei der β-Oxidation (z. B. n-Alkane) wird eine Kohlenstoffkette mit Sauerstoff, über einen Alkohol als Zwischenprodukt, unter Bildung einer Fettsäure oxidiert und um zwei Kohlenstoffatome verkürzt. Diese Abspaltung wiederholt sich so oft, bis die Kohlenstoffkette entweder komplett abgebaut ist oder eine weitere Abspaltung verhindert wird. Doppelbindungen und Verzweigungen sind wesentlich schlechter abbaubar. In einem Kohlenwasserstoffgemisch werden sie z. B. erst angegriffen, wenn besser abbaubare Stoffe weitestgehend eliminiert sind. Das bedeutet, je höher die Anzahl der Verzweigungen im Molekül sind, desto persistenter sind diese Verbindungen in der Umwelt. Ein verschlechterter Abbau wird auch bei hoch substituierten Aromaten beobachtet. Da Huminstoffe eine große Stabilität in der Umwelt aufweisen, ist davon auszugehen, dass auch diese Stoffe eine hohe Anzahl an Verzweigungen besitzen bzw. hoch substituiert sind.

Beim Umbau organischen Materials spielen sowohl biotische als auch abiotische Prozesse eine wichtige Rolle spielen. Im Bereich Boden/Wasser sind Bakterien, Pilze und Sonnenlicht beim Abbau bzw. der Transformation organischen Materials von entscheidender

Bedeutung. Die Richtung der Reaktion, ihre Geschwindigkeit und welche Prozesse dabei überwiegen, hängen in erster Linie von den chemischen Verhältnissen der jeweiligen Umgebung und dem Substrat ab. So ist z. B. bei der anaeroben Umwandlungen organischen Materials zu Kohle, eine deutliche Abnahme des H/C- sowie O/C-Gehalts zu beobachten (Behar und Hatcher 1995; Hatcher und Clifford 1997). Entgegengesetzt findet unter Einfluss von Sauerstoff eine Oxidation der Kohle unter Einbau funktioneller Gruppen statt. Dabei erhöht sich sowohl der O/C- als auch der H/C-Gehalt deutlich (Calemma et al. 1994).

- Chemische Veränderungen, die bei der Humifizierung organischen Material beobachtet wurden, fasste Visser (1983) wie folgt zusammen:
- Erhöhung der Aromatizität
- Kondensation ungesättigter Aliphaten
- dadurch bedingte Abnahme des Wasserstoffgehalts bei gleichzeitiger Abnahme des H/C Verhältnisses
- Erhöhung des Carboxyl- und Methoxylgehalts (der Carbonylgehalt erhöht sich nur in geringem Ausmaß)
- Verringerung des Hydroxylgehalts

Die Ergebnisse der mikrobiellen Transformation bzw. saisonalen Veränderung von Huminstoffen sind oft sehr widersprüchlich, da z. B. in den Sommermonaten sowohl eine Zunahme (Visser 1983a; Visser 1984) als auch eine Abnahme (Vodacek et al. 1997; Waiser und Robarts 2004) in der spezifischen UV-Absorption des DOC beobachtet wurde. Der Kohlenstoffgehalt stieg in beiden untersuchten Gewässern in den Sommermonaten an. Im Falle der Abnahme der spezifischen UV-Absorption war trotz der Erhöhung des DOC und der damit verbundenen Zufuhr frischen, chromophoren Kohlenstoffs, eine Verringerung der spezifischen UV Absorption festzustellen (Waiser und Robarts 2004). Die Photobleiche durch Licht war in diesem Fall als Prozess maßgeblicher als die Humifizierung organischen Materials. Es gibt aber auch Studien, die zeigen, dass die Sommermonate zu einer Verringerung des E4/E6 Verhältnisses führten (Visser 1983a; Visser 1984). Diese Zunahme an Farbe wurde als Humifizierung des organischen Materials bewertet. In diesem Fall waren die Zufuhr an frischem organischem Material und die Humifizierung durch Mikroorganismen größer als der Abbau durch UV-Strahlung.

Generell kann zur Abbaubarkeit gelösten organischen Materials gesagt werden, dass je jünger bzw. frischer das organische Material ist, desto besser ist dessen Abbaubarkeit. Untersuchungen zur Abbaubarkeit organischen Materials eines Flusses ergaben, dass der Kohlenstoff flussabwärts einer deutlichen Transformation unterworfen war und dabei für die Bakterien immer weniger verwertbar wurde (Sun et al. 1997). Ein Auftragen der elementaren Zusammensetzung der jeweiligen Probe im van Krevelen-Diagramm zeigte, dass sich der

DOC deutlich veränderte. Flussabwärts stiegen die O/C-Werte während die H/C-Werte abnahmen. Die Abbaubarkeit des DOC hing dabei stark vom aliphatischen Anteil in der Probe ab. Die sich verschlechternde mikrobielle Verfügbarkeit des Kohlenstoffs flussabwärts wurde in erster Linie auf den selektiven Abbau aliphatischer Gruppen zurückgeführt (Sun et al. 1997). Eine vermehrte Abnahme der aliphatischen Bereiche wurde auch aus den Veränderungen der 13C Spektren von Huminstoffen in Abbauversuchen geschlussfolgert (Hertkorn et al. 2002).

Eine Möglichkeit Quellen und Transformationen organischer Materialien darzustellen, bietet das van Krevelen-Diagramm (van Krevelen 1950; Visser 1983a; Rice und MacCarthy 1991; Behar und Hatcher 1995; Sun et al. 1997; Kim et al. 2003). Abbildung 40 zeigt das van Krevelen-Diagramm der in dieser Arbeit detektierten niedermolekularen Fulvinsäuren (vergleiche Abbildung 22, S.43) und verschiedener Stoffe bzw. Stoffklassen, die als Vorgängersubstanzen in Betracht gezogen werden könnten. In der Literatur werden für Fulvinsäuren oft höhere O/C- und kleinere H/C-Werte als in Abbildung 40 angegeben. Das liegt daran, dass in der vorliegenden Arbeit nur die niedermolekularen Fulvinsäuren untersucht und aufgetragen wurden. In Abschnitt 4.3.3.3 wurde gezeigt, dass mit zunehmendem Molekulargewicht höhere O/C- und kleinere H/C-Werte eingenommen werden. Der höhermolekulare Bereich der untersuchten Fulvinsäuren ist im van Krevelen-Diagramm sicherlich tendenziell nach rechts unten verschoben.

Geht man davon aus, dass Fulvinsäuren unter aeroben Bedingungen auf oxidativem Weg entstehen oder mögliche Transformationen durch Oxidationsreaktionen bedingt sind, so kann die Oxidation des organischen Materials auf zwei unterschiedlichen Wegen verlaufen. Einerseits können Alkylgruppen durch die Einführung von Sauerstoff über Alkohole in Carbonsäuren überführt werden, anderseits können über die Abspaltungen zweier Wasserstoffatome Doppelbindungen entstehen. Unter dem Begriff „Humifizierung“ werden in der folgenden Diskussion diese Oxidationsprozesse verstanden. Das bedeutet, dass organisches Material durch Prozesse der Humifizierung im van Krevelen-Diagramm nach rechts und/oder nach unten wandert. Abiotische Prozesse, zu denen z. B. die Spaltung von Doppelbindungen durch Licht zählt, würden durch die Einfuhr von Sauerstoff auch zu höheren O/C-Werten führen. Erfolgt bei dem Angriff der Doppelbindung deren Spaltung unter dem Einbau zweier Carbonsäuren, dann bleibt das H/C-Verhältnis gleich. Dieser Prozess wird hier als Photobleiche bezeichnet. Es besteht auch die Möglichkeit, dass durch die Photobleiche das H/C-Verhältnis der Mischung steigt. Dies kann geschehen, wenn nach dem Angriff der Doppelbindung keine vollständige Oxidation zur Carbonsäure stattfindet oder wenn die Oxidation durch den Singulett-Sauerstoff so erschöpfend erfolgt, dass die Reaktionsprodukte aus der Gruppe der Fulvinsäuren herausfallen (d. h. sie wären definitionsgemäß keine

Fulvinsäuren mehr). In der Mischung verblieben die höher gesättigten Mitglieder und das H/C-Verhältnis würde ansteigen.

Aus Abbildung 40 wird ersichtlich, dass unter aeroben Bedingungen fast alle der eingezeichneten Stoffgruppen als potentielle Vorläufersubstanzen dienen könnten. Einzig Zellulose kann als möglicher Precursor ausgeschlossen werden. Aufgrund der in Abbildung 40 vorgegebenen Reaktionsrichtungen, ist eine direkte Transformation von Zellulose zu Fulvinsäuren nicht vorstellbar.

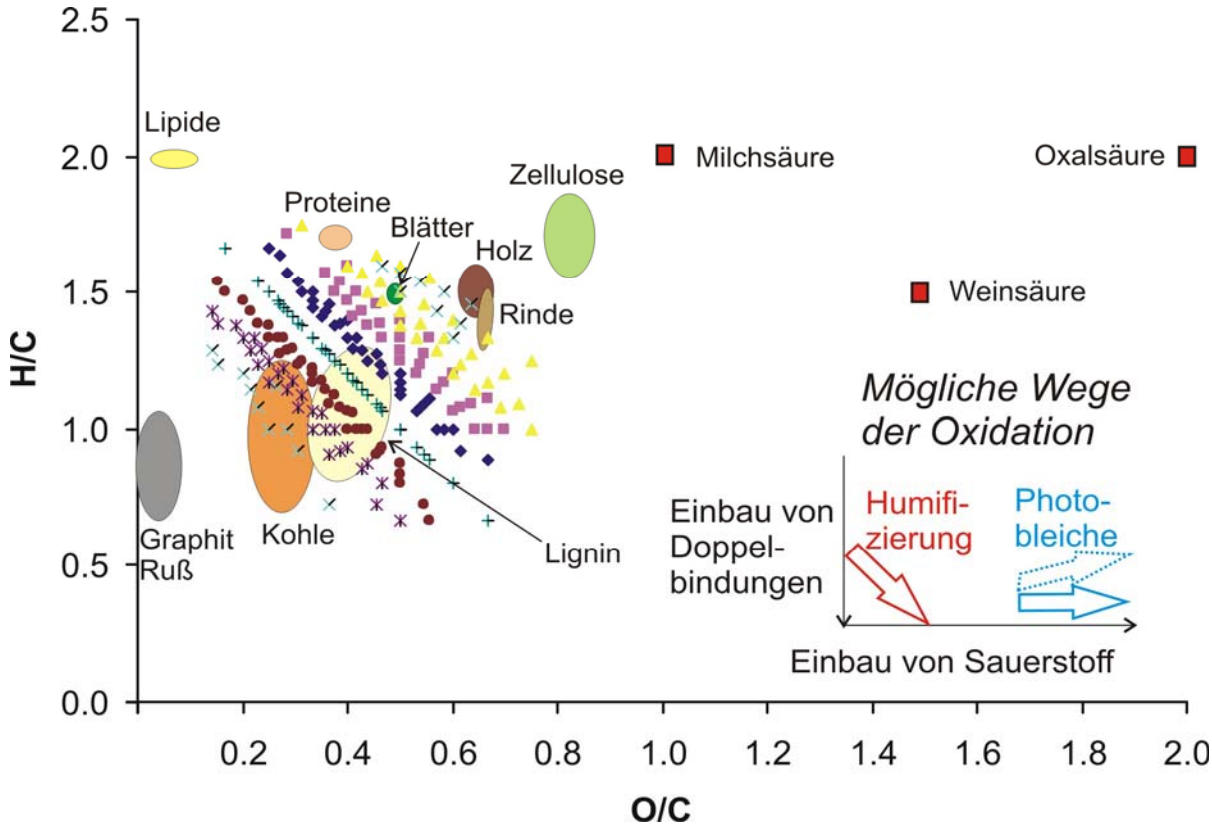

Abbildung 40: Van Krevelen-Diagramm niedermolekularer Suwannee River Fulvinsäuren, möglicher Vorläufersubstanzen (Kuwatsuka et al. 1978; Visser 1983b; Kim et al. 2003) und oxidierter niedermolekularer organischer Säuren. Weiterhin ist die Verschiebung einer Stoffklasse im van Krevlen-Diagramm eingezeichnet, wie sie durch Humifizierung bzw. Photobleiche hervorgerufen werden würde.

Um Rückschlüsse hinsichtlich der Herkunft oder der Transformation der vier untersuchten Fulvinsäuren ziehen zu können, müssen Abbildung 39 (S.65) und Abbildung 40 miteinander kombiniert werden. Das 3 D-van Krevelen-Diagramm der Suwannee River Fulvinsäure in Abbildung 39 zeigt nur ein Maximum. Der gelöste organische Kohlenstoff dieser Probe wurde aus abgestorbenem Vegetationsmaterial gebildet und ist relativ jung (Averett et al. 1989). Aus diesem Grund wird dieses Maximum im 3 D-van Krevelen-Diagramm von SRFA, das im Vergleich zu den anderen untersuchten Proben relativ niedrige O/C- bzw. hohe H/C-

Werten besitzt, als signifikant für Fulvinsäuren jungen Alters, die aus zersetztem Vegetationsmaterial gebildet wurden, angesehen.

Das 3 D-van-Krevelen-Diagramm der Waskish Peat Probe (Abbildung 39), zeigt ein Intensitätsmaximum bei sehr niedrigen O/C- (0.2) und H/C-Werten (0.8). Diese Region im van Krevelen-Diagramm wird von Braunkohle eingenommen (Abbildung 40). Torfböden sind fossile Brennstoffe und Vorläufer von Braunkohle. Eine der wichtigsten Stoffgruppen im Torf ist Bitumen. Bitumen enthält hauptsächlich zyklische aromatische und kondensierte Kohlenwasserstoffe. Durch mikrobielle Oxidation der Aromaten oder Aliphaten zu Carbonsäuren wird das Material transformiert und dadurch wasserlöslich gemacht. In der Literatur wurde bereits berichtet, dass durch Oxidation von Kohle huminstoffähnliche Substanzen entstehen können (Calemma et al. 1994; Chang und Berner 1998). Der hochungesättigte Kohlenstoffgrundkörper bleibt trotzdem erhalten, so dass die Oxidationsprodukte zur Sorption im Boden neigen. Der hohe Anteil an ungesättigten Strukturen in der WPFA-Probe erklärt deren hohe UV- und vis-Absorption. Es ist anzunehmen, dass Torf-Fulvinsäuren über den sukzessiven Einbau von Carbonsäuren in hoch ungesättigte Moleküle gebildet werden und dadurch die Intensitätsmaxima im van Krevelen-Diagramm dieser Proben generell niedrige H/C Werte besitzen. Diese werden dann durch weitergehende Oxidation zu höheren O/C-Werten verschoben. Der verbleibende Kohlenstoffgrundkörper der Torf-Fulvinsäuren ist deshalb vergleichsweise reich an stark ungesättigten Strukturen, die aber eine relativ hohe Anzahl an Carbonsäuren tragen. Dadurch besitzen sie gewisse Ähnlichkeiten mit Strukturvorschlägen für den so genannten „black carbon“. Unter „black carbon“ versteht man durch Feuer bzw. hohen Temperaturen umgewandelten Kohlenstoff. Charakteristisch sind ein niedriger O/C-Gehalt und ein hoher Aromatenanteil. Solche Strukturen wurden bereits in Huminstoffgemischen nachgewiesen (Kramer et al. 2004).

Die Grundwasser- (GOFA) und die Oberflächenwasser-Fulvinsäure (NAFA) zeigen im 3 D-van Krevelen-Diagramm zwei Maxima, wobei das gemeinsame Maximum bei O/C (0.2) und H/C (1.3) mit dem Maximum in der Suwannee River (SRFA) Probe übereinstimmt. Dieses Maximum wurde in der SRFA Probe dadurch erklärt, dass der DOC aus relativ jungem, zersetztem Vegetationsmaterial gebildet wurde. Dadurch ist anzunehmen, dass die Fulvinsäuren sowohl in der NAFA als auch in der GOFA Probe auch zu einem gewissen Anteil aus frischem Vegetationsmaterial gebildet wurden. Während dies bei Oberflächenwasser-Fulvinsäuren (NAFA) nicht verwundert, kann diese Erklärung für eine Grundwasserprobe (GOFA) aus 140 m Tiefe kaum zutreffen. Es ist nicht auszuschließen, dass ein entsprechender DOC-Anteil aufgrund starker Zerklüftung oberer Erdschichten als Sickerwasser eingetragen wurde. Viel wahrscheinlicher ist aber, dass bei der Bildung bzw. Transformation von Grundwasser-Fulvinsäuren auch reduktive Prozesse von Bedeutung sind. In diesem Fall kann die „Alterung“ des organischen Materials im van Krevelen-Diagramm auch in Richtung

kleinerer O/C- bzw. höherer H/C-Werte verlaufen. Aus diesem Grund können Grundwasser-Fulvinsäuren auch sicherlich einen gewissen Anteil an Molekülen besitzen, die von der Signatur her „jung“ sind.

In ihrem zweiten Maximum unterscheiden sich GOFA und NAFA geringfügig. Dieses ist in der NAFA Probe zu höheren O/C- (0.55) und kleineren H/C-Werten (0.85) verschoben. So hohe O/C-Werte werden im van Krevelen-Diagramm nur von den Fulvinsäuren mit der höchsten Anzahl an Carbonsäuren im Molekül eingenommen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Nordic Aquatic Fulvinsäuren älter sind, als die Gorleben Fulvinsäuren (Grundwasser) und dadurch in ihrem Oxidationsgrad weiter fortgeschritten. Wahrscheinlicher ist aber, dass die ungesättigten Strukturen der Torf-Fulvinsäure (NAFA) relativ empfindlich für photochemische Reaktionen sind. Vorstellbar wären dabei Reaktionen, die einen bevorzugten Angriff einer Doppelbindung beinhalten. Die Spaltung wäre mit einem Einbau zweier Alkohole verbunden, die unter aeroben Bedingungen zu einer Oxidation zu Carbonsäuren führen würde. So besitzt dieses Isolat einen hohen Carboxyl- und einen hohen Aromatenanteil und das Intensitätsmaximum im van Krevelen-Diagramm wird nach rechts unten verschoben. Ein gewisser Anteil der Nordic Aquatic Fulvinsäuren ist dadurch oxidativ stärker überarbeitet und besitzt dadurch Moleküle, die von der Signatur her „alt“ sind.

5.2 Untersuchungen von synthetischen Fulvinsäuren

Das Auftreten identischer Sätze an Molekülen in Fulvosäure-Isolaten verschiedener Herkunft lassen die Frage nach der Genese bzw. den Quellen in einem neuen Licht erscheinen. Ist es überhaupt möglich, dass in allen Fällen dieselben Quellen zur Verfügung standen und die gleichen Transformationsprozesse zur Bildung identischer Molekülsätze in Fulvinsäuren führten? Das erscheint höchst unwahrscheinlich.

Eine Erklärung könnte sein, dass viele Quellen und unterschiedliche Transformationsprozesse zu Produkten führen, die dann eine thermodynamische und eine gewisse mikrobielle Stabilität aufweisen.

Um die Eignung verschiedener Kohlenstoffquellen als mögliche Vorläufer-Substanzen von Fulvinsäuren zu prüfen, wurden Abietinsäure, Hydrochinon und Caroten auf unterschiedlichen Wegen oxidiert und anschließend massenspektrometrisch untersucht.

Abietinsäure ist eine in Pflanzen vorkommende Harzsäure und zählt zu der Gruppe der Diterpene. Diese wurden bereits in der Literatur als Vorläufer von Fulvosäuren propagiert (Leenheer et al. 2003b). Als Reaktionspfade wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche

Ansätze verfolgt. Zum einen wurden Lösungen von Abietinsäure und Caroten direkt mit Ozon oxidiert. Weiterhin wurde eine Abietinsäurelösung für 6 Monate auf einer Fensterbank gelagert. Dabei war die Lösung Sonnenlicht und Luft ausgesetzt.

Ein völlig anderer Ansatzpunkt stellt die so genannte „de-novo“ Synthese dar (siehe in Kapitel 1.1 unter „Polyphenoltheorie“). In diesem Fall kondensieren kleinere Precursor wie Hydrochinon unter basischen Bedingungen zu huminstoffartigen Materialen (Eller und Koch 1920; Hanninen et al. 1987). Um diesen Reaktionsweg zu überprüfen, wurde eine von Dr. W. Herdering (Universität Hamburg) hergestellte Modell-Fulvinsäurelösung (MOFA) untersucht.

Alle synthetisch hergestellten Fulvinsäuren wurden mittels Q-TOF-MS vermessen.

In Abbildung 41 sind die Massenspektren der untersuchten Lösungen dargestellt. In allen Spektren tritt eine wellenartige Intensitätsverteilung auf und gewisse Ähnlichkeiten mit den Spektren von Fulvosäure-Isolaten sind erkennbar. Allerdings treten zusätzlich Signale hoher Intensität auf, die nicht in das Muster der Fulvosäurespektren passen. Es wurde eine Auswertung der Summenformeln für den Massenbereich m/z 275-303 vorgenommen (Tabelle 8). Dabei kann für die Reaktionsprodukte in der Abietinsäure eine 65 %ige (n = 20) und für die Modell-Fulvinsäurelösung eine 35 %ige (n = 8) Übereinstimmung mit den Summenformeln der Suwannee River Fulvinsäure festgestellt werden (im Massenbereich m/z 275-303). Auch in der Caroten-Lösung können Summenformeln bestimmt werden, die identisch mit denen des SRFA Standards sind. Die detektierten Produkt-Ionen-Spektren zeigen aber, dass im Fall der ozonierten Caroten-Lösung, den gleichen Summenformeln nicht die gleichen Strukturen unterliegen (Abbildung 43).

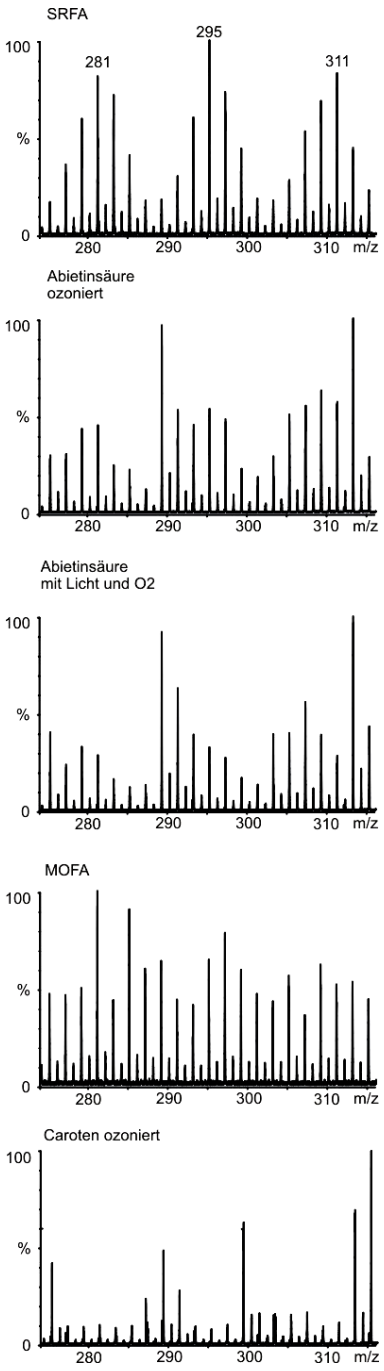

Abbildung 41: Q-TOF-MS Spektren synthetischer Fulvinsäuren des Massenbereiches m/z 275-315.

Tabelle 8: Auswertung der detektierten Ionen in den synthetisch hergestellten Fulvinsäure-Isolaten für den Massenbereich m/z 275-303. Die Q-TOF Messung wurde im V-Mode vorgenommen und die bestimmten Summenformeln mit denen des SRFA-Standards verglichen. Von Übereinstimmung wurde ausgegangen, wenn neben den gleichen Summenformeln auch gleiche Produkt-Ionen-Spektren vorlagen.

Probe	Anzahl der detektierten Ionen	Anzahl der Übereinstimmungen mit SRFA	Prozentuale Übereinstimmung bezogen auf die jeweilige Probe	Prozentuale Übereinstimmung bezogen auf SRFA
SRFA	46	/	/	/
Caroten ozoniert	23	0	0	0
Abietinsäure ozoniert	29	20	65	43
Abietinsäure Licht und O_2	31	20	65	43
MOFA	32	8	35	17

Die identischen Summenformeln der Reaktionsprodukte der oxidierten Abietinsäure sowie der Modell-Fulvinsäure wurden zusammen mit den Summenformeln des Suwannee River Standards im van Krevelen-Diagramm aufgetragen (Abbildung 42). Hierbei wird deutlich, dass die synthetischen Gemische nicht den gesamten O/C- und H/C-Bereich der natürlichen SRFA abdecken. So ist z. B. der Oxidationsgrad der Moleküle in den behandelten Abietinsäurelösungen im Vergleich zur Suwannee River Fulvinsäure noch nicht

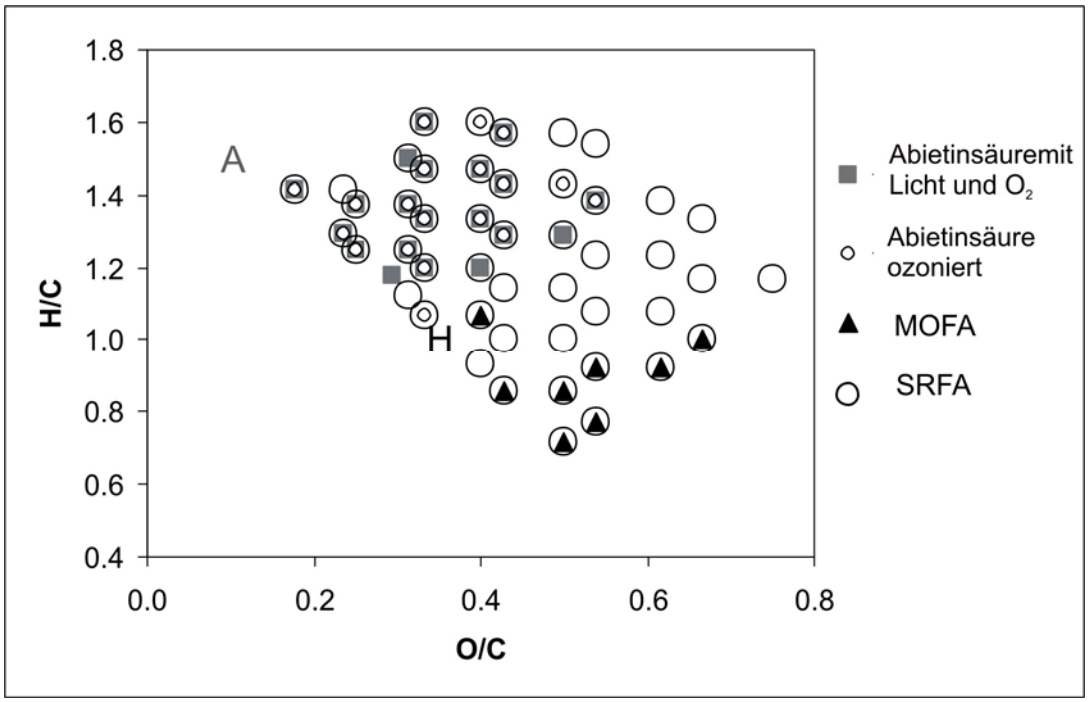

Abbildung 42: Darstellung aller Summenformeln synthetisch hergestellter Fulvinsäuren, die mit natürlichen Fulvinsäuren (SRFA) übereinstimmen. Außerdem sind die O/C- und H/C-Verhältnisse der Edukte Abietinsäure (A) und Hydrochinon (H) eingezeichnet.

weit genug fortgeschritten. Die in den Mischungen enthaltenen Moleküle decken sich nur im Bereich hoher H/C- und niedriger O/C-Verhältnisse. Dabei machte es offensichtlich keinen Unterschied, ob die Probe direkt mit Ozon oxidiert wurde oder die Oxidation der Abietinsäure über einen langen Zeitraum unter Zufuhr von Sonnenlicht und Sauerstoff erfolgte.

Hingegen stimmen die Produkte des Hydrochinon-Ansatzes (MOFA) nur im Bereich hoher O/C- und niedriger H/C-Werte mit Suwannee River Fulvinsäuren überein.

Für ausgewählte Ionen wurden Produkt-Ionen-Spektren aufgenommen. Auf diesem Wege kann abgesichert werden, dass nicht fälschlicherweise gleiche Summenformeln mit identischen Strukturen gleichgesetzt werden. In Abbildung 43 sind beispielhaft die Produkt-Ionen-Spektren von m/z 295 der behandelten Abietinsäurelösungen und der Modell-Fulvinsäure (MOFA) dargestellt. Die detektierten Spektren ähneln denen der Fulvinsäure-Isolate, zeigen aber Unterschiede in den Intensitäten der Fragmente. Es soll hier erinnert werden, dass die Produkt-Ionen-Spektren von mehreren isobaren Ionen erzeugt werden. Wasserabspaltungen werden in den Fulvosäure-Isolaten hauptsächlich von den Ionen mit niedrigeren O/C-Verhältnissen hervorgerufen, während die Moleküle mit hohen O/C-Werten bevorzugt CO_2 abspalten (siehe Tabelle 3,S. 35).

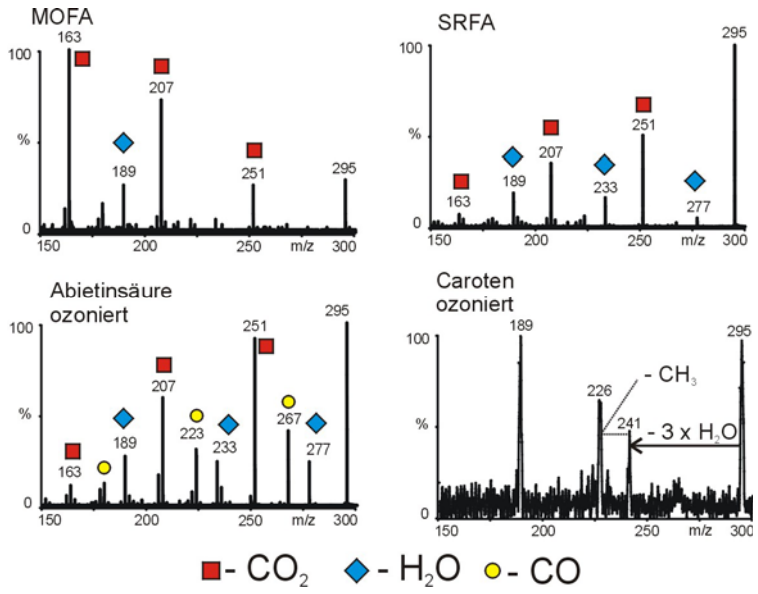

Abbildung 43: Produkt-Ionen-Spektren von m/z 295 für oxidativ hergestellte synthetische Fulvinsäuren. Zum Vergleich ist das Spektrum der Suwannee River Fulvinsäure eingefügt (oben rechts).

Mit der Oxidation der Abietinsäurelösung konnten nur Moleküle hergestellt werden, die den Bereich geringer O/C-Werte abdecken. In Bezug auf die Gruppe isobarer Ionen, die in natürlichen Isolaten auftreten, fehlen also die Moleküle mit hohem Sauerstoffgehalt. Deshalb werden im Produkt-Ionen-Spektrum der oxidierten Abietinsäure Wasserabspaltungen intensiver detektiert als im SRFA-Spektrum. Umgekehrt zeigen die hoch oxidierten Moleküle der

Modell-Fulvinsäure (MOFA) hauptsächlich CO_2 Abspaltungen, denn in diesem Reaktionsansatz fehlen die isobaren Ionen mit geringem Sauerstoffgehalt. Deshalb wird trotz unterschiedlicher Intensitätsverhältnisse der Fragmente im Produkt-Ionen-Spektrum davon ausgegangen, dass Moleküle identischer Struktur vorliegen.

Im Gegensatz dazu zeigt das in Abbildung 43 dargestellte Produkt-Ionen-Spektrum der ozonierten Caroten-Lösung deutlich, dass bei diesem Versuchsansatz andere Moleküle erzeugt wurden (das Produkt-Ionen-Spektrum von m/z 295 der ozonierten Caroten-Lösung stimmt überein mit den Spektren aller weiteren untersuchten Massen dieser Lösung). Grundsätzlich besitzen die Reaktionsprodukte des Carotens zu wenig Carboxylgruppen. Die wiederholten Abspaltungen von H_2O zeigen, dass der im Molekül eingeführte Sauerstoff zu einem großen Anteil in Hydroxygruppen gebunden ist. Grund für das Fehlen von CO_2 Gruppen kann sein, dass im Ausgangsmolekül zu viele sekundäre oder tertiäre Kohlenstoffe oxidiert wurden, die nicht weiter zu Carbonsäuren oxidiert werden können. Auch fehlen der Ausgangsverbindung im Vergleich zur Abietinsäure Ringsysteme, die Doppelbindungen enthalten. Diese Molekülstrukturen werden unter Ringspaltung und Einführung von Carbonsäuren, bevorzugt durch Ozon angegriffen.

Die Ergebnisse zeigen, dass unter oxidativen Bedingungen sowohl aus Abietinsäure, als auch aus Hydrochinon ein gewisser Satz an Molekülen hergestellt werden kann, der identisch ist mit Molekülen, die auch in natürlichen Fulvinsäuren vorkommen. Dies zeigt, dass verschiedene organische Verbindungen als Precursor für niedermolekulare Fulvinsäuren dienen können. Außerdem können diese Precursor durch unterschiedliche Transformationsprozesse in Fulvinsäure-Moleküle umgewandelt werden.

Wie die Ozonung der Caroten-Lösung zeigt, kann aber offensichtlich nicht jede Kohlenstoffquelle zu Fulvinsäure-Molekülen transformiert werden. Sowohl im Fall der Abietinsäure, als auch beim Caroten-Ansatz wurde die Reaktion mit sehr unpolaren Materialen durchgeführt. Demzufolge muss die Reaktion bzw. Transformation mit der Einfuhr von Sauerstoff verbunden sein. In den untersuchten Fällen scheint das ausschlaggebende Kriterium für die synthetische Herstellung von Fulvinsäure-Molekülen die Spaltung von Ringsystemen mit Doppelbindungen bzw. die Oxidation primärer Kohlenstoffatome zu Carbonsäuren zu sein.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Vorläufer-Substanzen zwar gewisse Kriterien erfüllen müssen, aber weder identische Ausgangsmaterialien noch gleiche Transformationsprozesse die entscheidenden Kriterien für die Bildung von Fulvinsäuren sind. Vielmehr scheint die thermodynamische Stabilität der Produkte der bestimmende Parameter für die Reaktion zu sein. Weiterhin führt eine gewisse Persistenz der Produkte dazu, dass der niedermolekulare Anteil von Fulvinsäuren unterschiedlichster Herkunft aus identischen Molekülen besteht. Die dabei entstehende Produktpalette ist zwar sehr reichhaltig, aber die Strukturen der Moleküle sind äußerst charakteristisch und weisen eine hohe Systematik auf.

Diese Systematik zeigt deutlich, dass Aussagen wie: „Huminstoffe sind ein Gemisch aus willkürlich zusammengesetzten Molekülen undefinierbarer Struktur“, zumindest für die Gruppe der Fulvinsäuren nicht zutrifft.

6 Oxidationsverfahren – Ozonung

Durch ein hohes positives Redoxpotential ist Ozon ein starkes Oxidationsmittel, das aufgrund der hohen Reaktivität auch desinfizierende Eigenschaften besitzt. Die desinfizierende Wirkung wird durch die hohe Oxidationskraft hervorgerufen. Dabei erfolgt eine Schädigung biologischer Strukturen in Organismen, die zu deren Zerstörung führen (z. B. Angriff auf Doppelbindungen von Lipiden oder Reaktion mit SH-Gruppen von Enzymen (Marquardt und Schäfer 1994)). Für viele Bakterien oder Viren wird eine schnellere Abtötungszeit als bei Chlor beobachtet (Höll 2002; von Gunten 2003). Eine wesentliche Bedeutung der Ozonung liegt aber in der Teiloxidation von organischen Stoffen. Werden Verfahren, wie z. B. die Ozonung im Wasserwerk, bei der Aufbereitung eingesetzt, ist ein wichtiges Ziel die Erhöhung der Abbaubarkeit des gelösten organischen Kohlenstoffs. In der Regel führt dieser Schritt dazu, dass refraktärer DOC biologisch verfügbar gemacht wird (Goel et al. 1995). Die verbesserte Bioverfügbarkeit des DOC würde ohne eine Nachbehandlung zur Wiederverkeimung des Wassers im Trinkwassernetz führen. Aus diesem Grund sind der Ozonung Aufbereitungsstufen wie biologisch aktive Schnell/Langsam-Sandfilter oder Aktivkohlefilter nachgeschaltet (Jekel 2004). Ein weiterer positiver Effekt der Ozonung ist die verbesserte Mikroflockung (Jekel 1998).

Da Fulvinsäuren in allen Gewässern einen wichtigen Anteil am gelösten organischen Kohlenstoff ausmachen, ist es von Interesse zu verstehen, wie sich diese Stoffgruppe bei der Ozonung verhält. Alle Veränderungen, die bei der Ozonung von Huminstoffen eintreten, konnten bisher nur durch Summenparameter charakterisiert werden. So konnte eine deutliche Verkleinerung der Molekülgröße, eine Verminderung der Farbe sowie der UV-Absorption festgestellt werden (Takahashi et al. 1995). Weiterhin nahm die Adsorbierbarkeit der Stoffe deutlich ab (Owen et al. 1995).

Mit Hilfe der SEC, in Kombination mit der hochauflösenden Massenspektrometrie, sollte es möglich sein, Veränderungen der Fulvinsäuremischung, die durch die Ozonung hervorgerufen werden, nunmehr auch auf molekularer Ebene zu verfolgen.

6.1 Ozon

Ozon ist ein instabiles Gas und wird bei der Wasseraufbereitung in Mengen von 1-2 mg O_3/mg Kohlenstoff eingesetzt (Gilbert 2004). Bei diesen Einsatzmengen ist nur zu einem sehr geringen Teil von einer Totaloxidation der Stoffe auszugehen. Typische Endprodukte bei der Reaktion mit organischen Inhaltsstoffen sind neben CO_2 (bei Totaloxidation) Formiat, Acetat oder Oxalat. Grundsätzlich sind die Produkte der Ozonung sauer-

stoffreicher und somit polarer als die Edukte, was sich besonders in einer Abnahme des an Aktivkohle adsorbierbaren Kohlenstoffs ausdrückt (Gilbert 2004).

6.1.1 Mechanismen der Ozonung

Bei der Oxidation organischer Stoffe durch Ozon sind in Abhängigkeit vom pH-Wert zwei Reaktionswege bekannt:

- Bei der Direktreaktion, die bei pH-Werten kleiner 7 stattfindet, geht man von einem spezifischen Angriff des Ozons auf olefinische oder aromatische Systeme aus. Dabei entsteht das so genannte Primärozonid, das zur Spaltung der Doppelbindung und zur Entstehung von Dicarbonsäuren führt.

- Bei pH-Werten oberhalb von 7 dominiert die radikalische Oxidation. Diese geschieht durch OH-Radikale, die durch die Reaktion von Ozon mit z. B. Hydroxyl-Ionen gebildet werden, hochreaktiv sind und unselektiv agieren (Gottschalk et al. 2000; Gilbert 2004).

6.1.2 Analyse der Summenparameter

In natürlichen Gewässern bewegt sich der gelöste organische Kohlenstoff in Konzentrationsbereichen zwischen ca. 1 und 15 mg/L. Dabei besitzt z. B. das Berliner Grundwasser DOC-Konzentrationen von 1-4 mg/L und Oberflächengewässer Konzentrationen zwischen 5-10 mg/L. In nicht gefärbten Süßwässern wird der Huminstoffanteil, bezogen auf den gelösten organischen Kohlenstoff, auf 50-55 % geschätzt. In Grundwässern verringert sich der Huminstoffanteil und variiert zwischen 15-55 %. Im Allgemeinen treten in Gewässern Fulvinsäuren im Vergleich zu Huminsäuren im Verhältnis 9:1 auf (Steinberg 2003).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Ozonungsversuche wurden Fulvinsäurekonzentrationen von 1.5 g/L eingesetzt. Dies entspricht bei einem Kohlenstoffanteil von 45-50 % in Fulvinsäure-Isolaten einem eingesetzten DOC-Gehalt von ca. 750 mg/L. Hierbei ist klar, dass die eingesetzten Mengen die in der Natur vorkommenden Mengen an DOC um ein Vielfaches überschreiten. Bei den durchgeführten Experimenten ging es aber darum, erzeugte Veränderungen nicht nur für das gesamte Isolat zu erfassen, sondern auf molekularer Ebene nachzuvollziehen. Die Detektion mittels Massenspektrometrie ist eine Einzelstoffanalyse. Hohe Sensitivitäten werden mittels LC-MS in erster Linie im MRM Modus erreicht (Abbildung 4). Dieser ist aber nur für bereits bekannte Analyten anwendbar. Bei der

Erfassung von Transformationen muss das Massenspektrometer im scan Modus genutzt werden, so dass ein Einsatz hoher Konzentrationen unumgänglich war.

Bei den durchgeführten Experimenten wurden Fulvinsäure-Lösungen mit einer Konzentration von 1.5 g/L mit unterschiedlichen Ozonmengen behandelt. Dabei wurde der pH-Wert zwischen 8 und 10 eingestellt.

Für jede Probe wurden der Ozonverbrauch, der gelöste organische Kohlenstoff und der SAK bestimmt. Abbildung 44 zeigt, dass dabei ein für die Ozonung typischer Verlauf beobachtet werden konnte. Zu verzeichnen war eine relativ schnelle Abnahme der UV-Absorption. Schon bei Ozonmengen von 1.5 mg O_3/mg C ist eine 40 %ige Abnahme der vis- und UV-Absorption zu beobachten. Bei Konzentrationen von ca. 4 mg O_3/mg C ist die Probe fast komplett entfärbt. Eine beginnende Oxidation zu CO_2 und eine damit verbundene DOC-Abnahme kann erst bei Ozonmengen um 2 mg O_3/mg C beobachten werden.

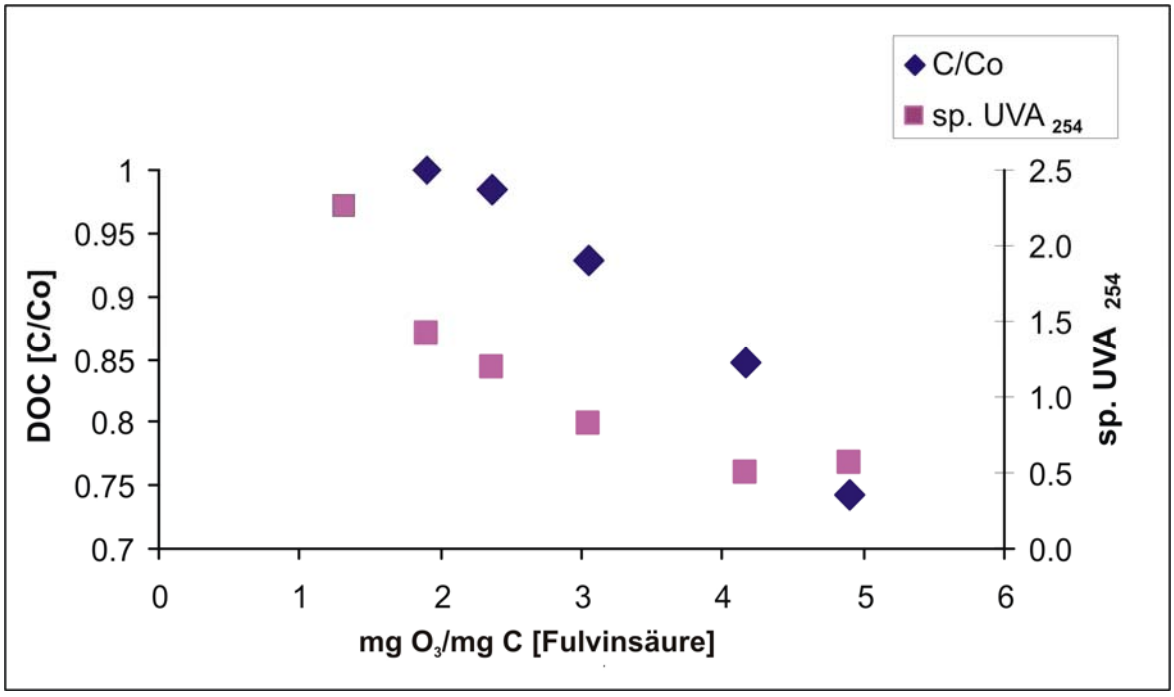

Abbildung 44: Darstellung der Kohlenstoffzehrung und der Abnahme der spezifischen UV Absorption bei 254 nm einer Fulvinsäure bei sich erhöhendem Ozongehalt.

6.1.3 Analytik ozonierter Fulvinsäuren mittels SEC-MS/MS

In Abbildung 45 ist sowohl ein UV- als auch ein MS-Chromatogramm eines Fulvinsäure-standards und einer ozonierten Fulvinsäure dargestellt. Bei Betrachtung des UV-Chromatogramms der ozonierten Probe wird eine deutliche Verschiebung des Chromatogramms zu längeren Retentionszeiten sichtbar. Diese Verschiebung wird durch eine Verringerung des mittleren Molekulargewichts hervorgerufen. Der Effekt wird durch die alleinige Betrachtung der MS-Chromatogramme nicht offensichtlich. Dies kann mit den in Kapitel 4.2

besprochenen Schwierigkeiten bei der Detektion der hochmolekularen Fulvinsäuren erklärt werden. Bei geringen Konus-Spannungen wurde der früh eluierende, hochmolekulare Teil

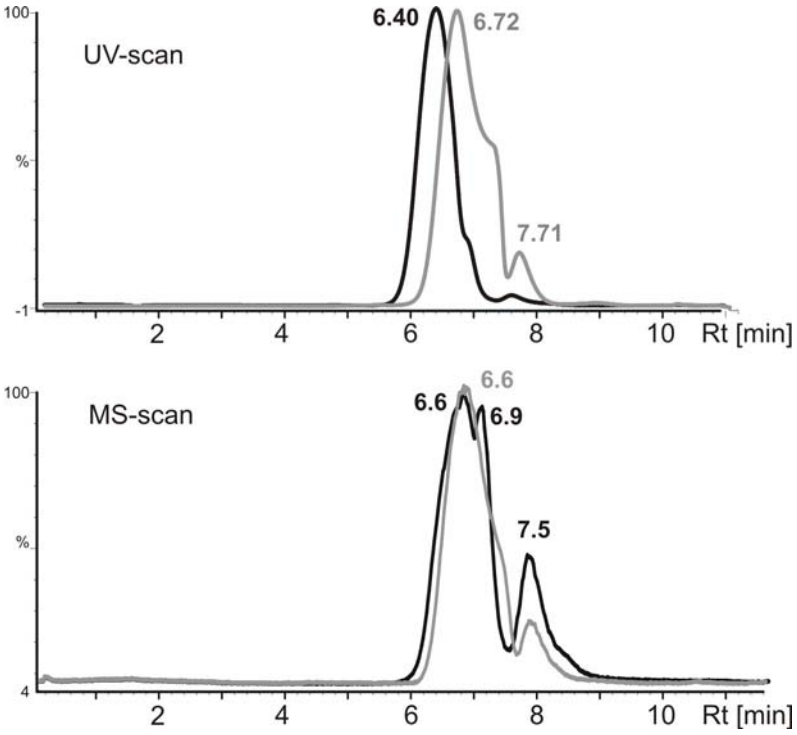

Abbildung 45: UV- und MS-Chromatogramm eines Fulvinsäurestandards (schwarze Linie) und eines mit 2.5 mg O_3/mg C ozonierten Fulvinsäure (graue Linie).

der unbehandelten Probe kaum erfasst.

Des Weiteren wurde in Abschnitt 4.2.1.3 erläutert, dass die Berechnung absoluter Molekulargewichtsverteilungen nicht möglich ist. Die Berechnung von Mn spiegelt vielmehr die Ionenverteilung (In) wider. Werden aber für eine Probe die gleichen Messbedingungen angewendet, dann können über die Berechnung der mittleren Ionenverteilung (In), Veränderungen in der mittleren Molekulargewichtsverteilung erfasst werden, die durch chemische Prozesse hervorgerufen wurden:

$$Mn = In = \frac{\sum ni \times Mi}{\sum ni}$$

Dabei ist *n* die Intensität und *M* die Masse des detektierten Ions.

In Tabelle 9 sind die berechneten Ionenverteilungen für die einzelnen Fulvinsäurefraktionen vor der Ozonung und bei unterschiedlichen Ozonmengen aufgeführt. Zu beobachten ist einerseits eine sukzessive Abnahme der mittleren Ionenverteilung im hochmolekularen Bereich (Rt = 5.80-6.80 min). Dies gilt für die beiden angewandten Ozonmengen. Offensichtlich wird bei geringeren Mengen wie 0.9 mg O_3/mg C hochmolekulares Material angegriffen und in kleinere Moleküle umgewandelt, die dann in der mittleren bzw.

niedermolekularen Fraktion eluieren. Dies führt zu einer, wenn auch geringfügigen, Erhöhung der mittleren Ionenverteilung im späteren Retentionszeitenbereich.

Tabelle 9: Verringerung der mittleren Ionenverteilung (I_n) in den Fulvinsäurefraktionen aus Abbildung 45 bei zunehmendem Ozonverbrauch. Dabei wurde die hochmolekulare Fraktion in zwei Retentionszeitenbereiche aufgeteilt (Rt = 5.80-6.30 und 6.30-6.80 min). Die mittlere Fraktion wurde im Retentionszeitenbereich 6.80-7.30 min und die niedermolekulare Fraktion zwischen Rt = 7.50-8.00 min aus Abbildung 45 erfasst.

Ozonverbrauch [mg O_3/mg C]	Rt [min]	5.80-6.30	6.30-6.80	6.80-7.30	7.50-8.00
		I_n	I_n	I_n	I_n
0		720	480	320	250
0.9		670	450	330	280
2.0		420	350	270	220

Die Verschiebung des mittleren Molekulargewichts zu kleineren Werten in der ozonierten Probe spiegelt sich auch bei der Betrachtung der Spektren wider.

In Abbildung 46 sind die Spektren der hochmolekularen Fraktion einer unbehandelten und einer mit 2.5 mg O_3/mg C ozonierten Probe dargestellt. Verglichen mit der unbehandelten Probe wird deutlich, dass nach der Ozonung das dritte Intensitätsmaximum, das bei m/z 950 auftrat, nicht mehr vorhanden ist. Die Fragment-Ionen, die bei m/z 200 detektiert werden, treten dafür in viel höheren Intensitäten auf. Nach der Ozonung bleibt zwar eine wellenartige Intensitätsverteilung erhalten, aber das Spektrum der hochmolekularen Fraktion einer ozonierten Fulvinsäure ähnelt dem Spektrum der mittleren Fraktion einer unbe-

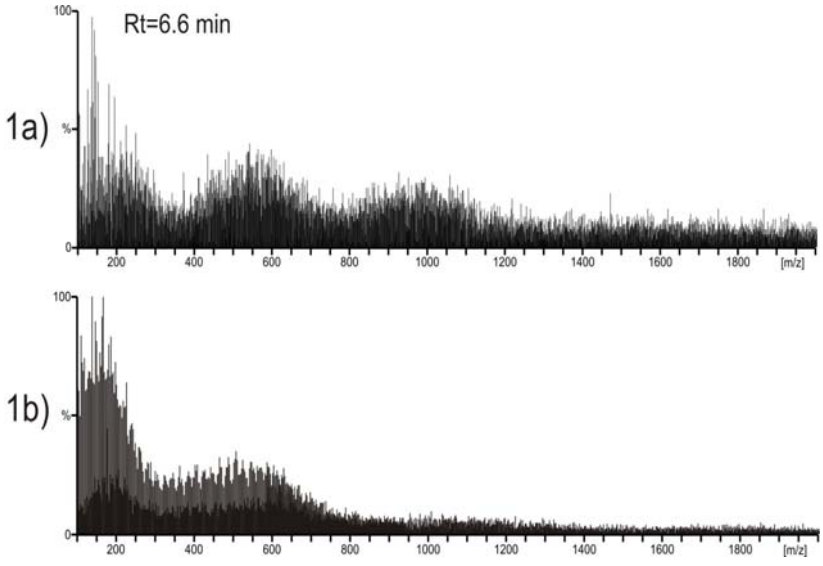

Abbildung 46: Spektren der hochmolekularen Fraktion bei Rt = 6.6 min (Abbildung 45).

1a) ein unbehandelter Fulvinsäurestandard
1b) ein mit 2.5 mg O_3/mg C ozonierter Fulvinsäurestandard

handelten Probe (vergleiche Abbildung 47). Geht man von einem polymerartigen Aufbau der Fulvinsäuren aus, dann muss im Zuge der Ozonung von einer Abspaltung definierter Untereinheiten aus hochmolekularen Fulvinsäuren ausgegangen werden. Der polymerartige Aufbau geht dabei aber nicht grundsätzlich verloren. Ein ähnliches Bild wie in der hochmolekularen Fraktion, zeigen die Spektren der mittleren Fraktion (siehe Abbildung 47). Vor der Ozonung zeigte diese Fraktion zwei ausgeprägte Intensitätsmaxima bei m/z 250 und m/z 550. Nach der Ozonung tritt in der mittleren Fraktion nur noch ein Intensitätsmaximum auf und das Spektrum der mittleren Fraktion einer ozonierten Probe ähnelt dem Spektrum der niedermolekularen Fraktion eines unbehandelten Fulvinsäurestandards. Bei Betrachtung des Spektrums der niedermolekularen Fraktion der ozonierten Probe wird deutlich, dass keine Übereinstimmung mit dem Spektrum der unbehandelten Probe vorliegt (Abbildung 47).

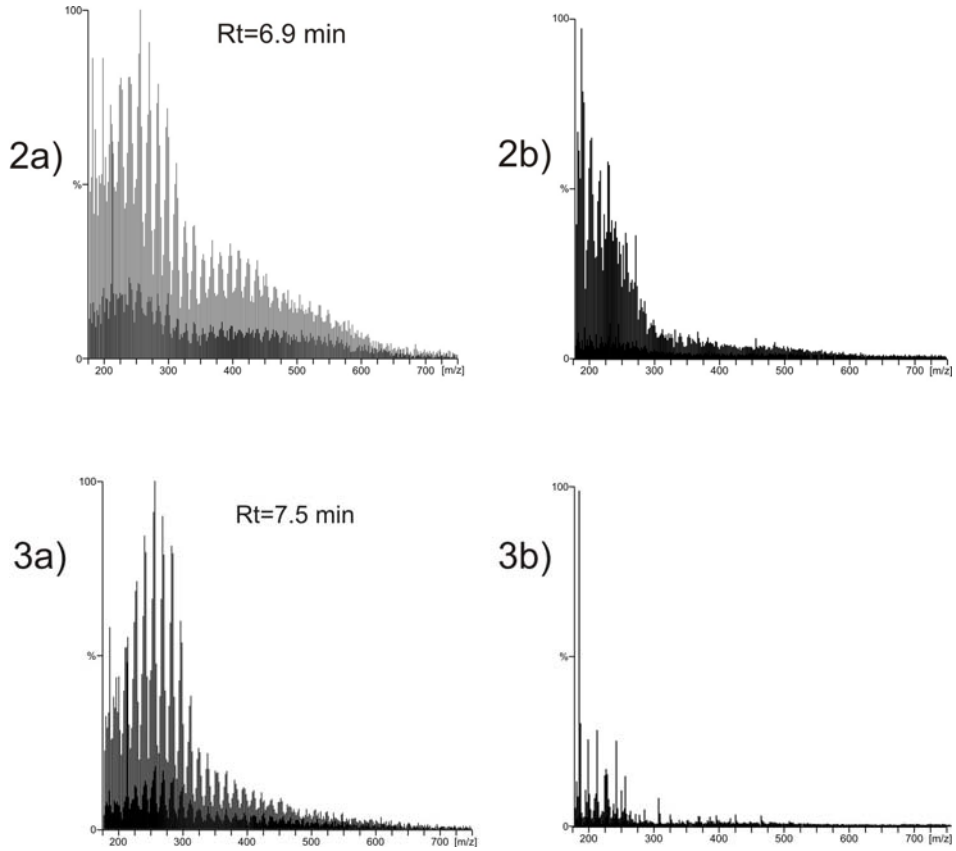

Abbildung 47: Spektren der mittleren Fraktion [2a) und 2b)] und niedermolekularen Fraktion [3a) und 3b)], wobei 2a) und 3a) die Spektren der unbehandelten Probe und 2b) und 3b) die Spektren der mit 2.5 mg O_3/mg C ozonierten Probe sind.

Betrachtet man einen kleineren Massenbereich des Massenspektrums niedermolekularer Fraktion (siehe Abbildung 48), wird sichtbar, dass die früheren Intensitätsmaxima unbehandelter Fulvinsäuren nach der Ozonung zu Intensitätsminima werden. In den Intensitätsminima unbehandelter Standards werden Massen mit z* = -4 (DBE-O = +3) oder z* = -6

(DBE-O = -3) detektiert. Nach der Ozonung sind in diesen Massenbereichen die intensivsten Signale zu finden.

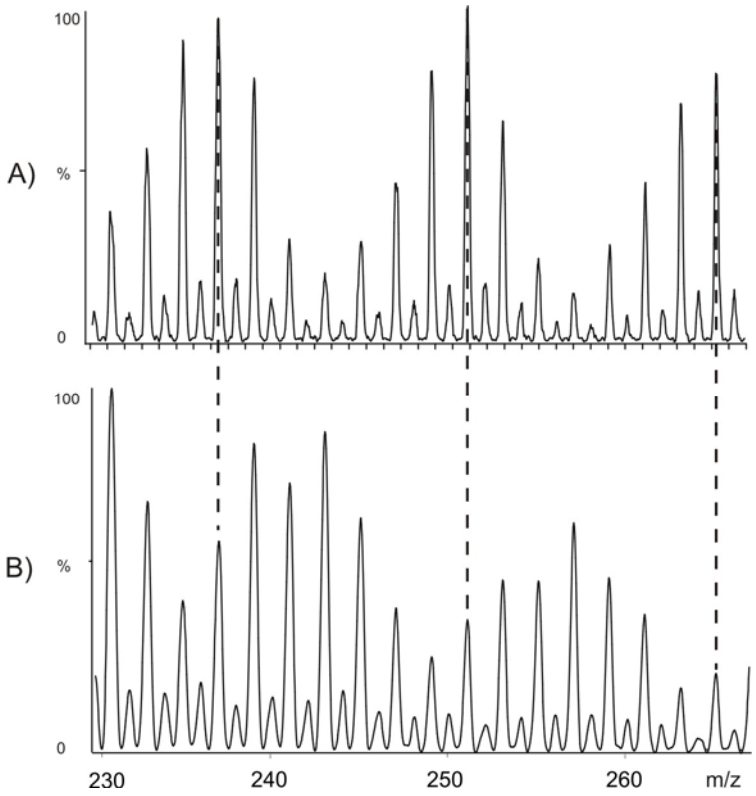

Abbildung 48: Ausschnitt aus dem Massenspektrum m/z 230-266 der niedermolekularen Fraktion (Rt = 7.5 min) der

A) unbehandelten Fulvinsäureprobe und

B) der mit 2.5 mg O_3/mg C ozonierten Probe.
Die eingezeichneten gestrichelten Linien verdeutlichen die Verschiebung der Intensitätsmaxima durch die Ozonung.

Durch die Darstellung der Summenformeln mit ihren zugehörigen z*-Werten bzw. DBE-O Werten im van Krevelen-Diagramm (Abbildung 22, S. 43 bzw. Tabelle 5, S. 50) wurde deutlich, dass jeder z*-Wert bestimmten Polaritäts- bzw. Sättigungsbereichen im Isolat der Fulvinsäuren zugeordnet werden kann. Bereiche mit größeren O/C- und H/C-Werten, also sauerstoffreichere bzw. höher oxidierte und höher gesättigte Moleküle, wurden vor der Ozonung mit der geringsten Intensität detektiert. Nach der Ozonung liegen diese Massen mit z* = -4 oder z* = -6 in Bereichen der Intensitätsmaxima. Es ist aber kaum eine Zunahme absoluter Intensitäten in diesem höher oxidierten Spektrenbereichen zu beobachten. Die Verschiebung der Intensitätsmaxima erklärt sich vielmehr durch eine stärkere Abnahme der Intensitäten von Massen im weniger oxidierten Spektrenbereich (z* = -12, z* = -14). Das bedeutet, dass durch die Ozonung weniger oxidierte und weniger gesättigte Moleküle bevorzugt aus dem Isolat entfernt werden. Aus diesen Beobachtungen scheinen zwei

Kriterien für die selektive Entfernung von Fulvinsäure-Molekülen von Bedeutung zu sein: A) wie hoch ist der Oxidationsgrad und B) wie doppelbindungsreich ist das Molekül.

In Abbildung 24 (S. 46) konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Kohlenstoffdoppelbindungen pro Fulvinsäuregrundgerüst in Abhängigkeit von z* erheblich variieren kann. Je doppelbindungsreicher das Kohlenstoffgrundgerüst der jeweiligen z*-Gruppe Werte ist, desto eher wird die Intensität des Spektrenbereichs durch die Ozonung abnehmen. Innerhalb der homologen Reihen, wie z. B. der H2-Homologen, ist demzufolge eine bevorzugte Entfernung des Homologen mit der geringsten Sättigung zu beobachten.

Die bevorzugte Entfernung bestimmter Fulvinsäure-Moleküle aus dem Spektrum (Abbildung 48), kann auch in der Gruppe der isobaren Ionen beobachtet werden. Für die Masse m/z 295 können vier isobare Moleküle detektiert werden. Wie in Abschnitt 4.3.3.1 beschrieben, unterscheiden sich die Summenformeln isobarer Ionen durch den regelmäßigen formalen Ersatz eines Sauerstoffatoms durch eine CH_4 Gruppe (weiterhin ist dieser Ersatz mit dem Verlust einer Doppelbindung verbunden). Für m/z 295 wurde $C_{13}H_{11}O_8$ (8) als Summenformel mit dem höchsten Oxidationsgrad und $C_{16}H_{23}O_5$ (5) als Summenformel mit dem niedrigsten Oxidationsgrad bestimmt. Dazwischen werden außerdem $C_{14}H_{15}O_7$ mit 7 Doppelbindungseinheiten und $C_{15}H_{19}O_6$ mit 6 Doppelbindungseinheiten detektiert. Abbildung 49 zeigt die Intensitätsabnahme dieser vier isobaren Moleküle während der Ozonung bei sich erhöhender Ozonmenge. Während die Intensität des Fulvinsäure-Moleküls mit dem höchsten Oxidationsgrad [$C_{13}H_{11}O_8$] kaum abnimmt, kann die Fulvinsäure mit dem geringsten Oxidationsgrad [$C_{16}H_{23}O_5$] nach einer eingesetzten Ozonmenge von 2.5 mg O_3/mg C nicht mehr detektiert werden.

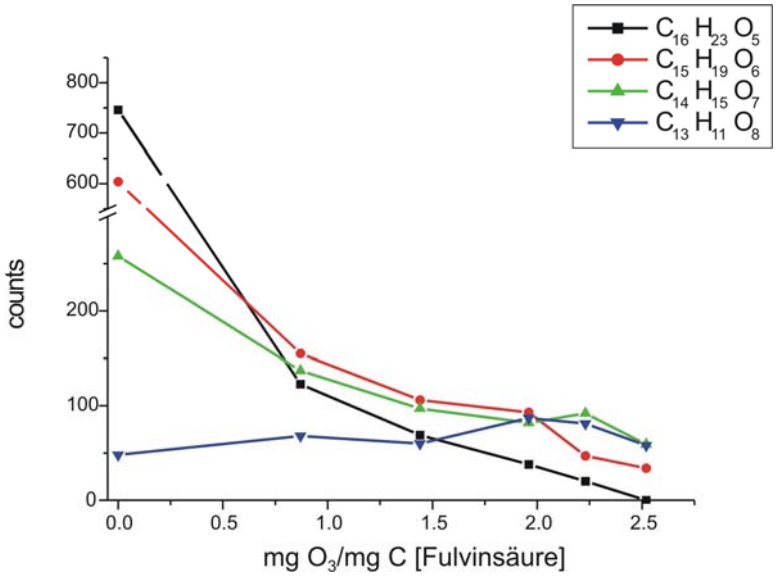

Abbildung 49: Abnahme der Intensitäten isobarer Massen mit m/z 295 mit zunehmender Ozonmenge. Die y-Achse ist im Bereich 300-550 counts unterbrochen.

Isobare Massen unterscheiden sich neben ihren unterschiedlichen O/C- bzw. H/C-Werten aber auch in ihren strukturellen Merkmalen. Das Molekül mit dem höchsten Sauerstoffgehalt besitzt auch den doppelbindungsreichsten Kohlenstoffgrundkörper (Abschnitt 4.3.3.1). Bei der Ozonung sollten, wie auch bei den einzelnen Mitgliedern der H_2-Homologen beobachtet, doppelbindungsreiche Moleküle bevorzugt angegriffen werden. Somit erscheint die Tatsache, dass das Molekül mit dem doppelbindungsreichsten Kohlenstoffgrundkörper auch nach einer Ozonung mit mehr als 2 mg O_3/mg C noch mit den gleichen Intensitäten detektiert werden kann, überraschend. Wie aber in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, ist deren Kohlenstoffgrundkörper kleiner und das Molekül kompakter gebaut bzw. weist viele Verzweigungen auf. Die vergleichsweise hohe Anzahl an Sauerstoffatomen ist gleichzusetzen mit einer hohen Anzahl an Carbonsäuren im Molekül. Das heißt, dass das Fulvinsäure-Molekül stark oxidiert ist und primärer Kohlenstoff somit kaum noch vorhanden ist. Für so strukturierte Moleküle bedeutet das, dass der von Ozon angreifbare Kohlenstoff bereits als Carbonsäure vorliegt. Im Molekül enthaltene Doppelbindungen sind durch hoch verzweigten Kohlenstoff oder Carbonsäuren mutmaßlich sterisch geschützt.

6.1.3.1 Detektion von Transformationsprodukten

Im Spektrum ozonierter Fulvinsäuren treten aber auch Bereiche auf, die, wenn auch schwach, an Intensität zunehmen (Abbildung 50). Werden die exakten Massen der auftretenden Massen bestimmt, können Moleküle nachgewiesen werden, die erst durch die Ozonung entstanden sind. Die Summenformeln dieser Produkte besitzen z*-Werte von -4 und -2. Vor der Ozonung wurden in diesen Spektrenbereichen Moleküle mit DBE-O Differenzen von +3 und +2 detektiert. Moleküle mit diesen DBE-O Differenzen besitzen die kleinsten mittleren H/C- und die kleinsten O/C-Werte (Tabelle 5 auf S. 50). Damit sind diese Moleküle die am geringsten gesättigten Mitglieder der H_2-Reihen. Solche Moleküle werden offensichtlich bei der Ozonung nicht nur bevorzugt angegriffen, sondern können nach der Ozonung nicht einmal mehr detektiert werden (siehe Abbildung 50). Diese Beobachtungen treten auch schon bei relativ geringen Ozonmengen auf (0.8 mg O_3/mg C). Bei dieser Ozonmenge ist noch keine Abnahme des Gesamtkohlenstoffs aufzuzeigen (siehe **Abbildung 44**), so dass von einer kompletten Entfernung der Edukte nicht auszugehen ist. Vielmehr ist eine Transformation der Ausgangsmoleküle vorstellbar. Neu entstandene Produkte werden dann bei anderen z*-Werten detektiert.

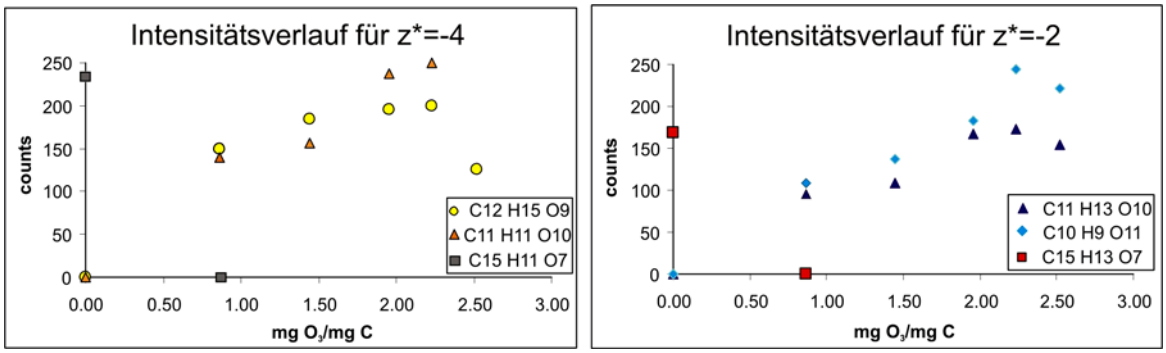

Abbildung 50: Intensitätsverlauf für Moleküle mit z* = -4 (m/z 303) und z* = -2 (m/z 305). Vor der Ozonung werden bei m/z 303 (z*= -4) Molekül-Ionen wie z. B. $C_{15}H_{11}O_7$ (z* = -4; DBE-O = +3) oder bei m/z 305 (z* = -2) $C_{15}H_{13}O_7$ (z* = -2; DBE-O = +2) detektiert. Schon bei Ozonmengen von 0.8 mg O_3/mg C kann keine dieser Summenformeln mehr nachgewiesen werden. Stattdessen werden sauerstoffreichere Moleküle deren Summenformeln DBE-O = -5 (z* = -2) bzw. DBE-O = -4 (z* = -4) entsprechen, detektiert.

Nach der Ozonung werden in den neuen Intensitätsmaxima bei z* = -4 und z* = -2 Moleküle detektiert, die DBE-O Werte von -4 und -5 besitzen (siehe Abbildung 50). Fulvinsäure-Moleküle mit so hohen negativen DBE-O Differenzen konnten vor der Ozonung nicht detektiert werden. Die Summenformeln der neu entstandenen Verbindungen sind wesentlich sauerstoffreicher. Für unbehandelte Fulvinsäuren gilt, dass fast der gesamte Sauerstoff in Carbonsäuren lokalisiert ist. Die entstanden Produkte werden im Massenspektrometer nur mit geringer Intensitäten detektiert. Aus diesem Grund sind aufgenommene Tochter-Ionen-Spektren von relativ schlechter Qualität. Alle beobachteten Fragmentationen weisen erneut nur auf Abspaltungen von CO_2 und H_2O hin. Somit ist anzunehmen, dass die entstandenen Transformationsprodukte keine neue Stoffklasse darstellen, sondern vielmehr allen strukturellen Kriterien im Aufbau von natürlichen Fulvinsäuren entsprechen. Strukturvorschläge für diese Moleküle sind in Abbildung 51 gegeben.

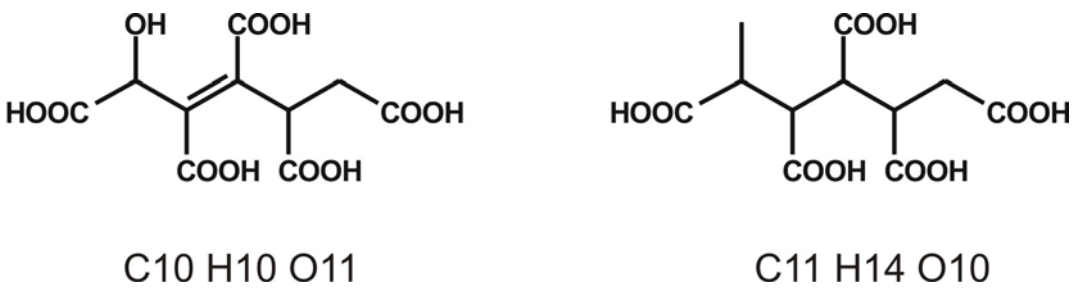

Abbildung 51: Strukturvorschläge für Moleküle mit m/z 305 (z* = -5 und DBE-O = -5) aus Abbildung 50

Für das Auftreten von Molekülen mit hohen negativen DBE-O Differenzen in nach der Ozonung gibt es zwei mögliche Erklärungen:

- Erstens kann es sich um Transformationsprodukte handeln, die durch Einbau von Sauerstoff gebildet werden.
- Zweitens ist es möglich, dass diese Moleküle im hochmolekularen Anteil des Isolates gebunden waren. Hochmolekulare Stoffe werden mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode nicht erfasst. Durch die Ozonung werden hochmolekulare Verbindungen gespalten. Die entstandenen niedermolekularen Stoffe sind nun mittels SEC-TOF-MS erfassbar.

Es soll erwähnt werden, dass Fulvinsäure-Moleküle mit DBE-O Differenzen von -4 und -5 mittels FTICR zu einem geringen Anteil in natürlichen Fulvinsäuremischungen detektiert wurden (Stenson et al. 2003). Mit dieser Technik werden hochmolekulare Stoffe bevorzugt erfasst.

Die bevorzugte Entfernung weniger stark oxidierter Moleküle und die Transformation zu Produkten, die im Vergleich zur unbehandelten Probe noch sauerstoffreicher sind, spiegelt sich auch im mittleren O/C-Verhältnis der gesamten Mischung wider (siehe Abbildung 52 A) und B)). Schon bei relativ geringen Ozonmengen (0.9 mg O_3/mg C) ist in der Mischung eine deutliche Verschiebung zu höheren O/C-Werten sichtbar (von O/C: 0.2 zu O/C: 0.6). Bei höheren Ozonmengen ändert sich die Lage des O/C-Maximums kaum noch. Es ist aber eine leichte Verschiebung zu höheren H/C-Verhältnissen zu beobachten (von H/C: 1.3 zu H/C: 1.4). Diese Verschiebung ist nicht signifikant, wäre aber dadurch zu erklären, dass eine weitergehende Ozonung zur erschöpfenden Entfernung ungesättigter Verbindungen führt. Die in der Lösung verbleibenden hoch gesättigten Fulvinsäuren erhöhen das H/C Verhältnis in der Mischung (Abbildung 52 B) zu C)).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ozonung von Fulvinsäuren zu einer Verringerung des mittleren Molekulargewichtes in der Mischung führt. Der polymerartige Aufbau innerhalb der Fulvinsäuremischung geht dabei aber nicht völlig verloren. Während der Ozonung werden doppelbindungsreichere Verbindungen und Moleküle eines geringen Oxidationsgrades bevorzugt entfernt. Bezogen auf die homologen H_2-Reihen können nach der Ozonung nur die hoch- oder komplett gesättigten Mitglieder detektiert werden. Innerhalb der Isobaren werden die geringer oxidierten Verbindungen (kleinere O/C-Werte) bevorzugt entfernt. Zwar besitzen die hoch oxidierten Moleküle der Isobaren den doppelbindungsreicheren Kohlenstoffgrundkörper, aber dieser ist entweder stark verzweigt oder durch eine hohe Anzahl an Carbonsäuren substituiert. Dadurch sind die Kohlenstoffdoppelbindungen vor der Ozonung sterisch geschützt. Weiterhin enthalten die sauerstoffreicheren Moleküle der Isobaren kaum primären Kohlenstoff, so dass sie auch bei relativ hohen Ozonmengen noch in der Mischung verbleiben. Diese beiden Selektivitäten zeigen erstens, dass Moleküle mit einem geringen O/C-Verhältnis im Fulvinsäure-Gemisch am reaktivsten sind. Dadurch erhöht sich das O/C-Verhältnis der gesamten Mischung (Abbildung 52). Zweitens verbleiben im Gemisch Moleküle mit einem geringen H/C-Verhältnis (Reaktivität innerhalb der Isobaren) und mit einem hohen H/C-Verhältnis (Reaktivität bezogen auf z*-Wert bzw. H_2-Reiihen). Dadurch ändert sich das

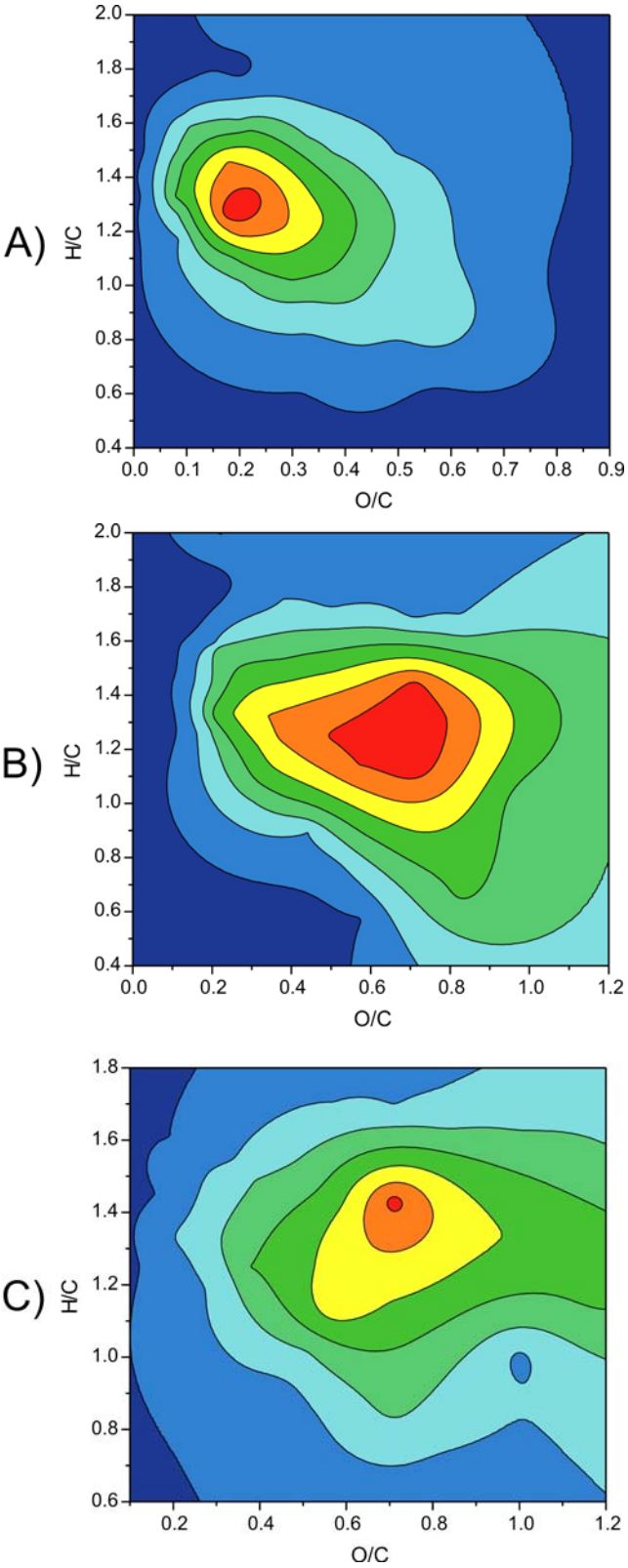

Abbildung 52: Darstellung der Intensitäten detektierter Summenformeln des Massenbereichs 154-178 Da im 3 D-van Krevelen-Diagramm.

unbehandelte Probe
mit 0.9 mg O_3/mg C ozoniert
mit 2.5 mg O_3/mg C ozoniert

H/C-Verhältnis der gesamten Mischung nur geringfügig (Abbildung 52). Es konnten nach der Ozonung aber auch Moleküle detektiert werden, die vermutlich Transformationsprodukte sind. Diese Moleküle besitzen zwar höhere O/C- und höhere H/C-Verhältnisse, entsprechen aber trotzdem den Kriterien des strukturellen Aufbaus von Fulvinsäuren. Deshalb kann der höhere Sauerstoffgehalt der Transformationsprodukte einer hohen Anzahl an Carbonsäuren gleichgesetzt werden, wobei der höhere H/C Gehalt auf einen höheren Sättigungsgrad des Kohlenstoffgrundgerüsts hinweist.

Die dargestellten Resultate decken sich mit bereits beobachteten Ergebnissen, wie z. B. der Verringerung des adsorbierbaren DOC Anteils oder der Verringerung der UV-Absorption nach der Ozonung. Doppelbindungsreiche Fulvinsäuren werden durch die Ozonung bevorzugt entfernt. Ein Verlust an Doppelbindungseinheiten kann mit Verlust an UV-Aktivität gleichgesetzt werden. Weiterhin stellen die Doppelbindungen Struktureinheiten der Fulvinsäuren dar, die bevorzugt an Festphasen adsorbieren. Nach der Ozonung verbleiben zwar Fulvinsäure-Moleküle in der Mischung, die Doppelbindungen enthalten. Diese besitzen aber zudem gleichzeitig viele Carbonsäuren. Dadurch sind diese Stoffe sehr ionisch und wiederum nur schwer an adsorbierbar.

Alle in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse weisen auf eine gewisse Selektivität bzw. unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeit der verschiedenen Fulvinsäure-Moleküle bei der Ozonung hin. Diese Resultate sind überraschend. Alle Versuche wurden bei pH-Werten zwischen 8-10 durchgeführt. Bei basischen pH-Werten werden verstärkt OH-Radikale produziert, die sehr schnell und unselektiv mit organischen Stoffen reagieren (Gottschalk et al. 2000; Gilbert 2004). Daraus muss geschlussfolgert werden, dass entweder die Oxidation nicht durch OH-Radikale bewirkt wurde oder der Angriff der OH-Radikale im Fulvinsäuregemisch mit einer gewissen Selektivität erfolgte. Welche der beiden Möglichkeiten in diesem Fall zutrifft, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden.

7 Abschlussdiskussion

Durch die Kopplung der Größenausschluss-Chromatographie (SEC) mit der Massenspektrometrie ist es möglich, einzelne Moleküle innerhalb des Fulvinsäure-Gemisches zu detektieren und so vertiefte Einblicke in die Zusammensetzung und Struktur von Fulvinsäuren zu erhalten. Die verwendete Chromatographie trennt Fulvinsäure-Isolate in drei Fraktionen. Die Auswertung der zu den Fraktionen gehörenden Spektren zeigt, dass Fulvinsäuren einen polymerartigen Aufbau besitzen. Dabei werden hochmolekulare Fulvinsäuren durch identische Untereinheiten kleinerer Moleküle gebildet (Kapitel 4.1). Von sehr hohem Interesse wäre dabei zu wissen, welcher Natur die Bindung der Oligomeren untereinander entspricht. Vorstellbar sind sowohl chemische Bindungen als auch Assoziat-Bindungen, wie z. B. die Komplexierung über Metall-Ionen. Zur Klärung dieses Aspekts scheint die SEC-MS aber nur in Kopplung mit anderen Methoden geeignet zu sein.

Im Spektrum der Fulvinsäuren ist über einen weiten Massenbereich jede Masse vertreten. Dabei zeigen die Fulvinsäure-Moleküle eine wellenartige Intensitätsverteilung, wobei periodisch alle 14 Da Maxima auftreten. Mittels hochauflösender Massenspektrometrie konnten im Massenbereich zwischen 150-340 Da ca. 300 Summenformeln bestimmt werden (Kapitel 4.3.1).

Die Anwendung der Tandem Massenspektrometrie erlaubt es, strukturelle Aussagen über den Aufbau der Moleküle zu treffen. Alle untersuchten Ionen zeigen das gleiche Fragmentationsverhalten. Es erfolgen sukzessive Abspaltungen von CO_2 und eine parallele Wasserabspaltung. Für die Struktur der Fulvinsäuren bedeutet das, dass fast alle Sauerstoffatome in Carboxylgruppen vorliegen und maximal zwei Hydroxygruppen im Molekül enthalten sein können. Bei Fulvinsäuren mit einer geraden Anzahl an Sauerstoffatomen im Molekül sind höchstens zwei und bei Fulvinsäuren mit einer ungeraden Anzahl an Sauerstoffatomen im Molekül, ist höchstens ein Sauerstoffatom nicht in Carbonsäuregruppen gebunden. Der nach der Fragmentation verbleibende defunktionalisierte Kern stellt das „Kohlenstoffgrundgerüst“ der Fulvinsäuren dar. Dieses Kohlenstoffgrundgerüst variiert in seiner Kohlenstoffanzahl und in seinem Sättigungsgrad. Strukturelle Unterschiede zwischen einzelnen Fulvinsäure-Molekülen können auf folgende Fakten beschränkt werden:

- Sie unterscheiden sich in der Anzahl der Carbonsäuregruppen.
- Sie besitzen keine, eine oder maximal zwei Hydroxygruppen.
- Sie haben keine oder maximal eine Carbonylgruppe.
- Sie unterscheiden sich in ihrem Kohlenstoffgrundgerüst, wobei der Unterschied nur im Sättigungsgrad des Gerüstes oder/und der Anzahl der Kohlenstoffatome im Gerüst liegen kann (Kapitel 4.3.2).

Weiterhin erlaubt das einheitliche Fragmentationsmuster funktionelle Gruppen wie Ether- oder Esterbindungen auszuschließen. Auch können flavanoide Strukturen in den untersuchten Fulvinsäuren nicht enthalten sein. Da das Kohlenstoffgrundgerüst keine Fragmentationen im Massenspektrometer zeigt, muss von einer kompakten Struktur ausgegangen werden. Das häufige Vorkommen und die relativ hohe Stabilität in der Umwelt weist außerdem auf einen hohen Verzweigungsgrad der Moleküle hin. Die vorliegenden Ergebnisse zum Aufbau der Fulvinsäuren erlauben es, mögliche Strukturen für jedes einzelne Moleküle zu zeichnen (Kapitel 4.3.2, 4.3.4 und 7.1). Dabei sind beispielhaft in Abbildung 26 (S.49) Strukturen mit geringem Sättigungsgrad, in Abbildung 19 (S.38) mit einer ausgeglichenen DBE-O Differenz und in Abbildung 53 (S.98) mit einem hohen Sättigungsgrad dargestellt.

Die im Fulvinsäure-Isolat bestimmten Summenformeln lassen sich in drei homologen Reihen anordnen: a) H_2-Homologe, b) Alkyl-Homologe und c) Oxidations-Homologe. Durch die Überlagerung der drei genannten Homologien ist jede einzelne Masse im Spektrum mit 3-5 isobaren Ionen besetzt. Alle isobaren Ionen weisen einen konstanten Massenabstand von 36 mDa auf. Dieser Abstand wird durch einen formalen Ersatz eines Sauerstoffatoms mit einer CH_4-Gruppe hervorgerufen. Des Weiteren ist dieser Ersatz mit dem Verlust eines Doppelbindungsäquivalents verbunden. Für die Struktur der Isobaren bedeutet dies, dass je sauerstoffreicher ein Molekül ist, desto höher ist es funktionalisiert und desto kompakter und ungesättigter ist dessen Kohlenstoffgrundgerüst (Kapitel 4.3.3.1).

Angesichts der komplexen Zusammensetzung der Fulvinsäuren ist es sinnvoll, eine methodische Einteilung der Summenformeln vorzunehmen, um die Systematik im Aufbau der Stoffe zu erfassen. Die Berechnung so genannter z*-Werte bietet die Möglichkeit, Fulvinsäuren in Abhängigkeit von ihrer Molekülmasse, in sieben Gruppen einzuteilen, wobei jede 14te Masse denselben z*-Wert besitzt. Für Fulvinsäuren eines z*-Wertes gibt es nur zwei erlaubte Differenzen zwischen der Anzahl der Doppelbindungsäquivalente und der Anzahl der Sauerstoffatome im Molekül (Kapitel 5.1.3).

Werden die detektierten Fulvinsäuren im van Krevelen-Diagramm dargestellt, wird ersichtlich, dass Fulvinsäure-Moleküle, in Abhängigkeit von ihrem z*-Wert, nur bestimmte O/C- bzw. H/C-Bereiche einnehmen. Dabei können für jeden z*-Wert mittlere O/C- bzw. H/C-Verhältnisse ermittelt werden, die es erlauben, Summenformeln niedermolekularer Fulvinsäuren allein über die Molmasse zu berechnen (Kapitel 7.1).

Die in dieser Arbeit erhaltenen Resultate zeigen Fulvinsäure-Isolate als hochsystematisches Gemisch mit Molekülen, die eine ganz eigenständige Stoffgruppe darstellen. Die aufgeführten Ergebnisse gäben die Möglichkeit, eine sehr genaue Definition für Fulvinsäuren aufzustellen. Danach dürfen nur solche Moleküle, die den hier festgestellten Regeln in der elementaren Zusammensetzung, den Periodizitäten und den geforderten Strukturen

entsprechen, zu den Fulvinsäuren gezählt werden. Diese genauere Definition könnte die bisherige, rein operationelle über das Löslichkeitsverhalten, ergänzen oder gar ganz ersetzen. Kritisch ist dabei aber immer zu sehen, dass die Ergebnisse die niedermolekulare Fraktion der Fulvinsäuren charakterisieren und diese Fraktion am gesamten organischen Kohlenstoff natürlich nur einen relativ geringen Anteil ausmacht. Weiterhin kann an dieser Stelle auch nicht eindeutig geklärt werden, ob sich im Fulvinsäure-Gemisch Verbindungen befinden, die mittels SEC-ESI-MS gar nicht erfasst werden.

Eine klarere Definition würde z. B. viele Untersuchungen zu Effekten von Fulvinsäuren erleichtern. So müsste nicht mehr mit Modellsubstanzen angenommener Ähnlichkeit gearbeitet werden. Diese könnten durch Einzelsubstanzen ersetzt werden, die nachweislich ein Teil dieser Mischung sind.

Bei Untersuchungen von Fulvinsäuren unterschiedlicher Herkunft zeigt sich, dass diese einem identischen Molekülsatz enthalten, also ihre qualitative Zusammensetzung gleich ist. Unterschiede zwischen den einzelnen Proben bestehen in der relativen Häufigkeit in der einzelne Moleküle in der Mischung auftreten. Werden die relativen Häufigkeiten mit den O/C- bzw. H/C-Verhältnissen des van Krevelen-Diagramms kombiniert (3 D-van Krevelen-Diagramm in Abbildung 39, S.65), lassen sich auch chemische Eigenschaften, die für das gesamte Fulvinsäure-Isolat bestimmt werden, erklären. Weiterhin lassen sich Schlüsse auf Vorläufersubstanzen bzw. Transformationsprozesse bei der Entstehung von Fulvinsäuren ziehen (Kapitel 5.1.3 und 5.1.4). Die MS-Daten aus denen die 3 D-van Krevelen-Diagramme generiert wurden, beziehen sich aber nur auf eine begrenzte Anzahl an Molekülen. Die Ergebnisse stimmen zwar gut mit den Daten der 13C NMR überein, sind im Vergleich zur Elementaranalyse eher überraschend. Eine unterschiedliche relative Häufigkeit von Molekülen mit verschiedener elementarer Zusammensetzung muss auch zu einer unterschiedlichen Elementarzusammensetzung der gesamten Mischung führen. Die Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Sauerstoffgehalte in den untersuchten Isolaten sind aber recht ähnlich. Die größten Unterschiede im Kohlenstoffgehalt treten z. B. zwischen NAFA mit 52.2 % und WPFA mit 53.6 % (Angaben in Gewichtsprozent) auf. Einerseits besteht bei der Elementaranalyse immer die Möglichkeit, dass auch Verunreinigungen mit erfasst werden. Andererseits ist es auch möglich, dass das Auftreten einzelner Moleküle in unterschiedlicher relativer Häufigkeit nicht für hochmolekulare Fulvinsäuren übernommen werden kann. Daten für Verbindungen größeren Molekulargewichts könnten aber nur mit einer höheren Massenauflösung erzeugt werden.

Eine mögliche Erklärung für das Auftreten gleicher Molekülsätze in Fulvinsäure-Isolaten unterschiedlicher Herkunft hätten gleiche Ausgangssubstanzen sowie gleiche Transformationsprozesse sein können. Aus diesem Grund wurden verschiedene Kohlenstoff-

quellen auf unterschiedlichen Wegen oxidiert. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass sowohl mehrere Vorläufersubstanzen als auch unterschiedliche Oxidationswege zu Produkten führen, die mit einem Anteil aus dem Molekülsatz natürlicher Fulvinsäuren identisch sind (Kapitel 5.2).

Werden Fulvosäuren ozoniert, kann sowohl eine Abnahme in der UV-Absorption als auch eine Abnahme des mittleren Molekulargewichts beobachtet werden. Die wellenartige Intensitätsverteilung der Ionen im Spektrum bleibt zwar erhalten, aber vorige Intensitätsmaxima werden nach der Ozonung zu Intensitätsminima. Diese Verschiebung der Intensitäten kann durch eine bevorzugte Entfernung der Fulvinsäure-Moleküle mit doppelbindungsreichem Kohlenstoffgrundgerüst erklärt werden. Ein selektiver Angriff während der Ozonung kann nicht nur innerhalb bestimmter Spektrenbereiche beobachtet werden, sondern tritt auch bei isobaren Ionen auf. In diesem Fall wird aber nicht das Molekül mit dem doppelbindungsreicheren Grundgerüst entfernt, sondern das sauerstoffärmere, also geringer oxidierte Fulvosäure-Molekül. Des Weiteren werden nach der Ozonung Ionen detektiert, die in natürlichen Isolaten nicht nachgewiesen werden können. Es wird angenommen, dass diese Transformationsprodukte durch Abspaltung aus hochmolekularen Fulvinsäuren entstehen. Die erhaltenen MS/MS Spektren sind nicht von hoher Qualität, aber es gibt keinen Hinweis darauf, dass die Produkte nicht den Aufbaukriterien von Fulvinsäuren entsprechen. Diese Moleküle haben hohe negative DBE-O Werte, besitzen viele Carbonsäuren und ihr Kohlenstoffgrundkörper ist hoch gesättigt. Durch die bevorzugte Entfernung bestimmter Moleküle bei der Ozonung wird sowohl das mittlere O/C- als auch H/C-Verhältnis der Fulvinsäuremischung höher. Diese Ergebnisse können z. B. beobachtete Effekte, wie die Abnahme der UV-Absorption erklären (Kapitel 6.1.3).

Problematisch für die Auswertung der durchgeführten Ozonungsversuche waren die hohen Konzentrationen, die verwendet werden mussten, um die Änderungen während des Oxidationsprozesses auf molekularer Ebene nachvollziehen zu können. Aus diesem Grund muss natürlich kritisch hinterfragt werden, ob sich die Ergebnisse vorbehaltlos auf geringer konzentrierte Lösungen übertragen lassen. Nach den nun vorliegenden Resultaten sind aber sowohl die Molmassen der Edukte, der Produkte als auch deren Fragmentationsverhalten bekannt. In nachfolgenden Arbeiten wäre es aber möglich die Ozonungsversuche mit geringeren Konzentrationen zu wiederholen und die Reaktivität ausgewählter Verbindungen mittels empfindlicherer Messmodi zu überprüfen.

7.1 Mögliche Voraussagen von Summenformeln, Strukturen und Reaktivitäten niedermolekularer Fulvinsäuren anhand der Molekülmasse

Auf der Basis der durchgeführten Untersuchungen und der hohen Systematik der niedermolekularen Fulvinsäuren ist es nun möglich, allein von der Molekülmasse ausgehend, Summenformeln zu berechnen, Strukturen aufzuweisen und Reaktivitäten bezüglich chemischer Umsetzungen, z. B. der Ozonung, für einzelne Moleküle vorherzusagen. Dies soll im folgenden Kapitel an einem Beispiel gezeigt werden.

Alle in den Fulvinsäure-Isolaten bestimmten Summenformeln wurden im van Krevelen-Diagramm aufgetragen (siehe Abbildung 22, S.43). Dabei wird sichtbar, dass in Abhängigkeit vom z*-Wert die zugehörigen Summenformeln nur in bestimmten O/C- bzw. H/C-Bereichen auftreten.

Die Berechnung der Summenformeln wird dadurch vereinfacht, dass über relativ weite Massenbereiche pro z*-Wert nur ein DBE-O Wert detektiert wird. Treten, wie für z* = -6 gezeigt (Abbildung 22), zwei DBE-O Werte auf, ist eine Berechnung von Summenformeln immer noch möglich. Die jeweiligen DBE-O Differenzen unterscheiden sich aber stark in ihren durchschnittlichen H/C- bzw. O/C-Verhältnissen. Deshalb müsste vor jeder Berechnung eine Einteilung der z*-Werte bezüglich der jeweils auftretenden DBE-O Differenz vorgenommen werden.

Die Möglichkeit Summenformeln und Strukturen über die Molmasse vorherzusagen, soll am Beispiel der Masse 300 Da vorgeführt werden:

Berechnung von z*

Masse: 300 g/mol (im ESI neg. wird m/z 299 detektiert)

Berechnung von z*: $$z^* = \left(\mathrm{Rest}\left[\frac{NM}{14} \right] \right) - 14$$

z* = 6 - 14

z* = -8

Die erlaubten Differenzen zwischen der Anzahl der Doppelbindungen und der Sauerstoffanzahl im Molekül werden nach folgender Gleichung berechnet:

mögliche DBE-O $$DBE - O = -0.5 \times (-8) + 1 = +5$$

$$DBE - O = -0.5 \times (-8) - 6 = -2$$

Betrachtet man die Einordnung der z*-Werte im van Krevelen-Diagramm (Abbildung 22, S. 43) ist ersichtlich, dass z* = -8 Randbereiche des Diagramms darstellt. Ein Vergleich mit Abbildung 17 (S. 33) zeigt, dass in den Spektren der Fulvinsäuren Massen mit z* = -8 eher mit geringer Intensität detektiert werden. Ein weiterer Vergleich mit Abbildung 24 (S. 46)

macht deutlich, dass das Kohlenstoffgrundgerüst der Moleküle gesättigt ist. Aus diesem Grund würden diese Moleküle während der Ozonung kaum aus dem Isolat entfernt werden. Weiterhin wird im Vergleich der isobaren Moleküle (der unten berechneten) untereinander das Molekül mit dem geringsten Sauerstoffgehalt bevorzugt aus der Mischung entfernt.
In welchen O/C- und H/C-Bereichen die detektierten Fulvinsäuren mit z* = -8 auftreten, ist in der folgenden Tabelle 10 dargestellt:

Tabelle 10: Auftretende O/C- bzw. H/C-Bereiche und mittlere O/C- bzw. H/C-Werte für alle detektierten Fulvinsäuren mit z* = -8

Z*	Bereiche von O/C	Mittleres bestimmtes O/C	Bereiche von H/C	Mittleres bestimmtes H/C
-8	0.4 – 0.75	0.56	1.6 – 1.0	1.37

Berechnung der Summenformeln

Das Auftreten fester O/C- bzw. H/C-Bereiche für jeden z*-Wert, erlaubt es für jeden z*-Wert mittlere O/C- bzw. H/C-Werten zu berechnen. Über die Verwendung dieser mittleren Quotienten ist es möglich, rechnerisch Summenformeln für niedermolekulare Fulvinsäuren zu generieren. Dabei können für das Ausgangsmolekül mit der Molmasse 300 Da (z* = -8) folgende Formeln aufgestellt werden:

Molmasse: $300 = 1 \times y_H + 12 \times y_C + 16 \times y_O$

O/C-Verhältnis: $\frac{y_O}{y_C} = 0.56 \quad \rightarrow y_O = 0.56 \times y_C$

H/C-Verhältnis: $\frac{y_H}{y_C} = 1.37 \quad \rightarrow y_H = 1.37 \times y_C$

Einsetzen der Variablen aus den O/C- bzw. H/C-Verhältnissen (Tabelle 10) in die Formel zur Berechnung der Molmasse:

$$300 = 1.37 y_C + 12 y_C + 8.96 y_C$$
$$300 = 22.33 \times y_C$$
$$\underline{\underline{y_C = 13.43}}$$
$$y_H = 1.37 \times y_C$$
$$\underline{\underline{y_H = 18.41}}$$
$$y_O = 0.56 \times y_C$$
$$\underline{\underline{y_O = 7.52}}$$

Die berechneten Werte für die elementare Zusammensetzung müssen jetzt auf ganze Zahlen gerundet werden, daraus ergäbe sich folgende Summenformel:

C13 H18 O8 (Molmasse = 302 Da)

Es ist zu beachten, dass die zur Berechnung verwendeten O/C- bzw. H/C-Verhältnisse Mittelwerte sind und auch nach der Berechnung stark gerundet werden muss. Die ermittelte Summenformel ist in diesem Fall 2 Da zu hoch. Um die richtige Molmasse bzw. Summenformel zu erhalten, das O/C- bzw. H/C-Verhältnis aber möglichst konstant zu halten, muss die Korrektur vorgenommenen werden, die die kleinste Abweichung von der berechneten elementaren Zusammensetzung bewirkt. Dazu ist die Anzahl der Wasserstoffatome von 18 auf 16 zu erniedrigen.

Summenformel mit Masse 300 Da: **C13 H16 O8**

Bestimmung der isobaren Moleküle

Über das Austauschen eines Sauerstoffatoms durch ein C- und vier Wasserstoffatome (Bildungsprinzip der Isobaren) können alle weiteren Summenformeln bestimmt werden:

Tabelle 11: Bestimmung der isobaren Moleküle mit m/z 299. Die *kursiv* gekennzeichneten Summenformeln besitzen O/C- bzw. H/C-Werte, die in niedermolekularen Fulvinsäuren nicht auftreten.

Summenformel	DBE	O/C	H/C
C11 H8 O10	*8*	*0.91*	*0.73*
C12 H12 O9	7	0.75	1.00
C13 H16 O8	6	0.62	1.23
C14 H20 O7	5	0.50	1.43
C15 H24 O6	4	0.40	1.60
C16 H28 O5	*3*	*0.31*	*1.75*

Die Moleküle mit Summenformeln mit C11 H8 O10 bzw. C16 H28 O5 (in Tabelle 11 kursiv markiert) besitzen O/C- bzw. H/C-Werte, die nicht in die Bereiche von Fulvinsäuren mit z* = -8 auftreten (Tabelle 10). Sollten diese Moleküle in der Natur vorkommen, können sie nicht zur Stoffgruppe der niedermolekularen Fulvinsäuren gezählt werden.

Mögliche Strukturen für Fulvinsäure-Moleküle der Masse 300 Da

Die Struktur der Fulvinsäuren wird bei einer gegebenen Anzahl an Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen über die Anzahl der Sauerstoffatome im Molekül festgelegt. Mittels MS/MS konnte gezeigt werden, dass fast der gesamte Sauerstoff im Molekül in Carbonsäuren lokalisiert ist. Als funktionelle Gruppen treten weiterhin Hydroxygruppen auf. Pro Molekül treten aber maximal zwei OH-Gruppen auf.

Tabelle 12: Kohlenstoffgrundgerüst und maximale Anzahl an CO_2 Gruppen für Fulvinsäure-Moleküle mit 300 Da

	Summenformel	DBE	max. Anzahl an CO_2-Gruppen	Kohlenstoff-grundgerüst	DBE
1.	$C_{12}H_{12}O_9$	7	-4 x CO_2	$C_8H_{12}O$	3
2.	$C_{13}H_{16}O_8$	6	-4 x CO_2	C_9H_{16}	2
3.	$C_{14}H_{20}O_7$	5	-3 x CO_2	$C_{11}H_{20}O$	2
4.	$C_{15}H_{24}O_6$	4	-3 x CO_2	$C_{12}H_{24}$	1

Folgende Moleküle würden den strukturellen Anforderungen entsprechen:

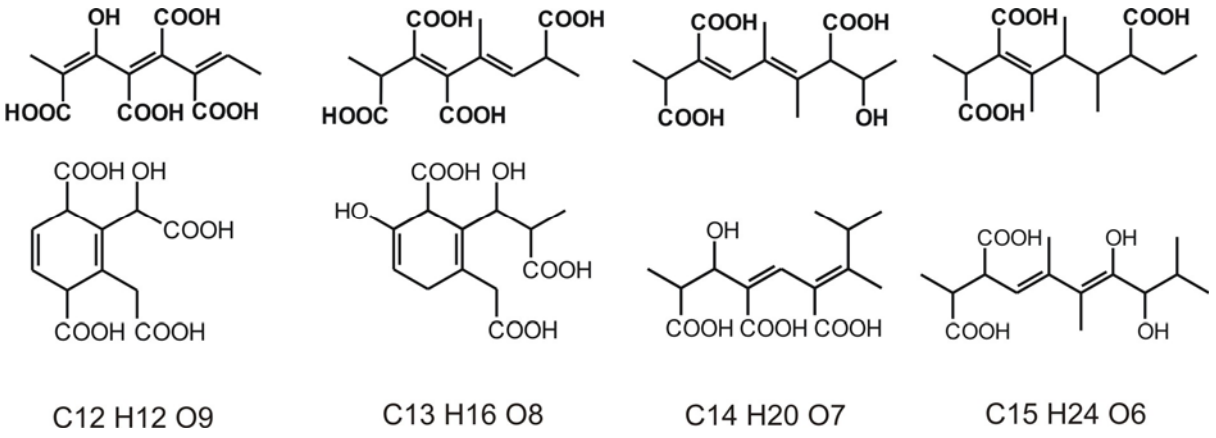

Abbildung 53: Mögliche Strukturen für Fulvinsäure-Moleküle einer Molmasse von 300 Da

Fulvinsäure-Moleküle mit z* = -8 gehören innerhalb der Mischung zu den Verbindungen mit einem vergleichsweise gesättigten „Kohlenstoffgrundgerüst“ (siehe Abbildung 24, S.46). Bezogen auf alle Moleküle die bereits vor der Ozonung detektierbar sind, werden diese Stoffe während der Ozonung nur zu einem sehr geringen Anteil aus dem Fulvinsäure-gemisch entfernt. Auch die vier aufgezeigten Moleküle in Abbildung 53 zeigen eine unterschiedliche Reaktivität. Obwohl C15 H24 O6 das am höchsten gesättigte Kohlenstoffgrundgerüst besitzt, wird dieses Molekül eher aus der Mischung entfernt werden, als z. B. C12 H12 O9. Das Kohlenstoffgrundgerüst der sauerstoffärmeren Isobaren ist weniger kompakt gebaut und weist eine geringere Anzahl an Verzweigungen auf. Diese Strukturen sind während der Ozonung offensichtlich besser angreifbar. Nach einer erschöpfenden Ozonung eines Fulvinsäure-Isolates sind Verbindungen wie C12 H12 O9 in Abbildung 53 oder die gezeigten Moleküle in Abbildung 51 (S.87) die Strukturen, die den niedermolekularen Massenbereich der Fulvinsäuren ausmachen.

Damit ist gezeigt, dass die erhaltenen Ergebnisse eine Basis liefern, über die sowohl Summenformeln, Strukturen als auch die Reaktivität einzelner Fulvinsäure-Moleküle allein über deren Molmasse vorhergesagt werden können.

7.2 Ausblicke

Bei der Detektion von Fulvinsäuren mittels Massenspektrometrie treten auch messtechnische Limitierungen auf. Diese Schwierigkeiten sind für den hohen Massenbereich stärker ausgeprägt. Aus diesem Grund können hochmolekulare Fulvinsäuren entweder nur mit geringer Intensität oder Fragmente von ihnen erfasst werden.

Die Untersuchung von Fulvosäure-Fragmenten könnte sich als sehr wertvoll erweisen, wenn davon ausgegangen wird, dass hochmolekulare Fulvinsäuren den Aufbauprinzipien der niedermolekularen Fulvinsäuren entsprechen. In diesem Fall wären alle Fragmente die detektiert werden von großer Bedeutung, da sie die decarboxylierten Kohlenstoffgrundgerüste der hochmolekularen Fulvosäuren darstellen.

Der Einblick in die Strukturen niedermolekularer Fulvinsäuren oder „der Fulvinsäure-Monomere“ wird umso interessanter, wenn sich die bisherigen Hinweise auf einen polymerartigen Aufbau der Fulvinsäuren bestätigen sollten. Ergebnisse zum Aufbau hochmolekularer Fulvinsäuren könnte der Einsatz von FTICR Massenspektrometern liefern. Die Transmission dieser Geräte ist ausgeprägt für Stoffe hohen Molekulargewichts. Zudem bieten FTICR Massenspektrometer eine sehr hohe Massenpräzision, die sich gerade bei der Analytik von Fulvinsäure-Isolaten als absolut notwendig erweist.

Die Untersuchungen von Fulvosäuren unterschiedlicher Herkunft sowie verschiedener Kompartimente zeigen, dass diese aus einem Satz identischer Moleküle bestehen. Versuche zur Herstellung synthetischer Fulvinsäuren unterstreichen, dass sowohl aus verschiedenen Vorläufersubstanzen als auch auf unterschiedlichen Wegen Moleküle erzeugt werden können, die identisch mit Molekülen sind, die auch in natürlichen Isolaten vorkommen. Diese Ergebnisse zeigen, dass keine spezifischen Quellen zur Bildung von Fulvinsäuren vorhanden sein müssen. Weiterhin führen die thermodynamische Stabilität und eine gewisse Persistenz der Produkte dazu, dass der niedermolekulare Anteil von Fulvinsäuren unterschiedlichster Herkunft aus identischen Molekülen besteht.

Neueste Untersuchungen von Luft-Isolaten zeigen, dass die organischen Anteile des Aerosols ähnliche Spektren wie Fulvinsäuren aufweisen (Cappiello et al. 2003; Kalberer et al. 2004). Die hohe Übereinstimmung von Massenspektren der Fulvinsäuren ist nicht nur auf die organischen Anteile der Luft beschränkt. Massenspektren gealterter Firnisse von Gemälden (http://e-collection.ethbib.ethz.ch/ecol-pool/bericht/bericht_190.pdf) und Spektren,

die von Untersuchungen der Harzmaterialien von Mumienumhüllungen stammen (Proefke und Rinehart 1992), zeigen große Ähnlichkeit mit Spektren der Fulvinsäuren.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen und eben genannte Veröffentlichungen geben Grund zur Annahme, dass gewisse Anteile des organischen Kohlenstoffs sowohl im Wasser, in Böden als auch in der Luft aus identischen Molekülen bestehen!

Diese Moleküle sind äußerst charakteristisch und weisen eine hohe Systematik auf. Und zumindest für niedermolekulare Fulvinsäuren sind Aussagen wie „undefinierbares Gemisch“ nicht länger zutreffend.

A Anhang

z*	z*	z*	z*	z*	z*	z*
-2	-14	-12	-10	-8	-6	-4
C7 H3 O4	C7 H5 O4	C7 H7 O4	C6 H5 O5			
C8 H7 O3	C8 H9 O3	C8 H11 O3	C7 H9 O4			
C9 H11 O2	C9 H13 O2	C9 H15 O2	C8 H13 O3			C8 H3 O4
C10 H15 O	C10 H17 O	C10 H19 O	C9 H17 O2		C9 H5 O3	C9 H7 O3
				C10 H7 O2	C10 H9 O2	C10 H11 O2
		C7 H5 O5	C7 H7 O5	C11 H11 O	C11 H13 O	C11 H15 O
C8 H5 O4	C8 H7 O4	C8 H9 O4	C8 H11 O4	C12 H15	C12 H17	
C9 H9 O3	C9 H11 O3	C9 H13 O3	C9 H15 O3			
C10 H13 O2	C10 H15 O2	C10 H17 O2	C10 H19 O2			C9 H5 O4
C11 H17 O				C11 H9 O2	C10 H7 O3	C10 H9 O3
		C7 H3 O6	C8 H9 O5	C12 H13 O	C11 H11 O2	C11 H13 O2
C9 H7 O4	C8 H5 O5	C8 H7 O5	C9 H13 O4		C12 H15 O	C12 H17 O
C10 H11 O3	C9 H9 O4	C9 H11 O4	C10 H17 O3			
C11 H15 O2	C10 H13 O3	C10 H15 O3	C11 H21 O2		C11 H9 O3	C11 H11 O3
C12 H19 O	C11 H17 O2	C11 H19 O2		C11 H7 O3	C12 H13 O2	C12 H15 O2
				C12 H11 O2	C13 H17 O	C13 H19 O
				C13 H15 O		

Abbildung 54: Summenformeln der detektierten Anionen im Massenbereich m/z 151-191.

z -12	z -10	z -8	z -6	z -4	z -2	z -14
					C9 H5 O5	C9 H7 O5
					C10 H9 O4	C10 H11 O4
					C11 H13 O3	C11 H15 O3
					C12 H17 O2	C12 H19 O2
		C8 H9 O6				
C9 H9 O5	C9 H11 O5	C9 H13 O5				C9 H5 O6
C10 H13 O4	C10 H15 O4				C10 H7 O5	C10 H9 O5
C11 H17 O3	C11 H3 O4		C11 H7 O4	C11 H9 O4	C11 H11 O4	C11 H13 O4
			C12 H11 O3	C12 H13 O3	C12 H15 O3	C12 H17 O3
			C13 H15 O2	C13 H17 O2	C13 H19 O2	
			C14 H19 O			
C9 H7 O6	C9 H9 O6	C9 H11 O6				
C10 H11 O5	C10 H13 O5	C10 H15 O5				C10 H7 O6
C11 H15 O4				C11 H7 O5	C11 H9 O5	C11 H11 O5
C12 H19 O3				C12 H11 O4	C12 H13 O4	C12 H15 O4
			C13 H13 O3	C13 H15 O3	C13 H17 O3	C13 H19 O3
			C14 H17 O2	C14 H19 O2		
C10 H9 O6	C10 H11 O6	C10 H13 O6				
C11 H13 O5	C11 H15 O5	C11 H17 O5				
C12 H17 O4					C11 H7 O6	C11 H9 O6
			C13 H11 O4	C13 H13 O4	C12 H11 O5	C12 H13 O5
			C14 H15 O3	C14 H17 O3	C13 H15 O4	C13 H17 O4
					C14 H19 O3	C14 H21 O3
	C10 H9 O7	C10 H11 O7				
C11 H11 O6	C11 H13 O6	C11 H15 O6				
C12 H15 O5	C12 H17 O5			C12 H7 O6	C12 H9 O6	C12 H11 O6
C13 H19 O4				C13 H11 O5	C13 H13 O5	C13 H15 O5
			C14 H13 O4	C14 H15 O4	C14 H17 O4	C14 H19 O4
			C15 H17 O3	C15 H19 O3	C15 H21 O3	
	C11 H11 O7	C11 H13 O7	C11 H15 O7			
C12 H13 O6	C12 H15 O6	C12 H17 O6			C13 H11 O6	C13 H13 O6
C13 H17 O5	C13 H19 O5			C14 H13 O5	C14 H15 O5	C14 H17 O5
C14 H21 O4	C14 H23 O4			C15 H17 O4	C15 H19 O4	C15 H21 O4
				C16 H21 O3		
		C11 H11 O8				
C12 H11 O7	C12 H13 O7	C12 H15 O7	C12 H17 O7			
C13 H15 O6	C13 H17 O6	C13 H19 O6		C 14 H11 O6	C14 H13 O6	C14 H15 O6
C14 H19 O5	C14 H21 O5			C15 H15 O5	C15 H17 O5	C15 H19 O5
				C16 H19 O4	C16 H21 O4	
	C12 H11 O8	C12 H13 O8				
C13 H13 O7	C13 H15 O7	C13 H17 O7	C13 H19 O7			C14 H13 O7
C14 H17 O6	C14 H19 O6	C14 H21 O6		C15 H13 O6	C15 H15 O6	C15 H17 O6
C15 H21 O5				C16 H17 O5	C16 H19 O5	C16 H21 O5
				C17 H21 O4		
		C12 H11 O9				
C13 H11 O8	C13 H13 O8	C13 H15 O8	C13 H17 O8			
C14 H15 O7	C14 H17 O7	C14 H19 O7	C14 H21 O7			
C15 H19 O6	C15 H21 O6	C15 H23 O6		C15 H 11 O7	C15 H13 O7	C15 H15 O7
C16 H23 O5		C16 H27 O5		C16 H15 O6	C16 H17 O6	C16 H19 O6
				C17 H19 O5	C17 H21 O5	C17 H23 O5
				C18 H23 O4		
		C13 H13 O9				
C14 H13 O8	C14 H15 O8	C14 H17 O8	C14 H19 O8			C15 H13 O8
C15 H17 O7	C15 H 19 O7	C15 H21 O7	C15 H23 O7	C16 H13 O7	C16 H15 O7	C16 H17 O7
C16 H21 O6	C16 H23 O6			C17 H17 O6	C17 H19 O6	C17 H21 O6
				C18 H21 O5	C18 H23 O5	C18 H25 O5
	C14 H13 O9	C14 H15 O9				
C15 H15 O8	C15 H17 O8	C15 H19 O8				
C16 H19 O7	C16 H21 O7	C16 H23 O7			C16 H13 O8	C16 H15 O8
C17 H23 O6					C17 H17 O7	C17 H19 O7
			C18 H17 O6	C18 H19 O6	C18 H21 O6	C18 H23 O6
			C19 H21 O5			
	C15 H15 O9	C15 H17 O9	C15 H19 O9			
C16 H17 O8	C16 H19 O8	C16 H21 O8	C16 H23 O8			
C17 H21 O7	C17 H23 O7			C19 H21 O6		
C18 H25 O6						

Abbildung 55: Summenformeln der detektierten Anionen im Massenbereich m/z 193-345.

B Material und Methoden

B.1. Materialien

B.1.1.Lösungsmittel

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden von den Firmen J.T. Baker (Deventer, Holland) oder Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen und besaßen HPLC Reinheit (gradient grade). Das eingesetzte Wasser war Reinstwasser (Maxima Ultra pure water, [ELGA, England]).

B.2. Referenzsubstanzen

Die verwendeten Ligninsulfonsäuren und organischen Säuren wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Verwendete Polystyrene-Sulfonate besaßen durchschnittliche Molekulargewichte (*Mw*) von 4 400, 6 620, 13 400 bzw. 20 700 amu und wurden bei der Firma Polymer Standards Service (Mainz, Deutschland) gekauft.

Die Fulvinsäureisolate Suwannee River (SRFA), Waskish Peat (WPFA), Nordic Aquatic (NAFA) sowie die Huminsäure des Suwannee River wurden als Referenzmaterialien der International Humic Substance Society (IHSS, USA) gekauft.

Die Grundwasser-Fulvinsäure (GOFA) aus Gorleben wurde von M. Wolf (GSF – Institut für Grundwasserökologie, Neuherberg, Deutschland) bereitgestellt. Die Aufarbeitung der Fulvinsäure erfolgte aus einem Grundwasserleiter (134-137 m Tiefe), der über einer Salzlagerstätte in Niedersachsen gelegen ist. Das Grundwasser besaß eine braune Farbe und DOC Konzentrationen von 97.2 mg C/L. Mittels Reversed Osmose wurde eine Aufkonzentrierung vorgenommen. Danach wurden die Fulvinsäuren über Sorption an XAD-8 Säulen isoliert. Nach basischer Desorption wurden die Fulvinsäuren über Kationen-Austauscher protoniert (Wolf et al. 2004).

B.2.1.Synthetische Fulvinsäuren

Die Modell-Fulvinsäure (MOFA) wurde von Dr. W. Herdering (Universität-Hamburg) bereitgestellt. Die Präparation erfolgte nach (Eller und Koch 1920):

5.0 g Hydrochinon und 15 g Natriumcarbonat wurden in 200 ml Wasser gelöst und für 14 Tage gerührt. Zur Trennung von Humin- und Fulvinsäuren wurde die Lösung mit HCl auf pH 2 eingestellt und anschließend zentrifugiert. Durch Sorption an XAD-8 Säulen wurden die Fulvinsäuren aus der wässrigen Phase isoliert. Nach Waschen mit 0.1 M HCl wurden die Fulvinsäuren mit 0.2 M NaOH eluiert. Die Entfernung der Natrium-Kationen erfolgte mittels Kationen-Austausch.

Die Abietinsäure-Lösungen wurden auf zwei unterschiedlichen Wegen oxidiert. Die verwendete Abietinsäure wurde bei Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) als technisches Gemisch mit 70 % Reinheit gekauft.
In einem Wasser/Methanol-Gemisch (50/50 v/v) wurde eine Abietinsäure-Lösung von 120 mg/L hergestellt. Diese Lösung wurde über einen Zeitraum von 6 Monaten (Dez. 2003 bis Jun 2004) in einer Schraubflasche (250 ml Duran; Schott, Mainz, Deutschland) auf einem Fensterbrett gelagert und gelegentlich gerührt. In dieser Zeit war die Probe sowohl Sonnenlicht als auch Sauerstoff ausgesetzt.
Für die Ozonung wurde eine Abietinsäure-Lösung von 120 mg/L in einem Wasser/Methanol-Gemisch (50/50 v/v) gelöst. Diese Lösung wurde bei einer Konzentration von 0.6 mg O_3/mg C für mindestens 30 min ozoniert.

B.3. Instrumentelle Parameter

B.3.1. Size Exclusion Chromatography (SEC)

Als Säule für die Größenausschluss-Chromatographie (SEC) wurde eine PL Aquagel-OH 30; MW range 100 > 30.000 (4,6 x 250 mm; Partikelgröße 8 µm) der Firma Polymer Laboratories (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Chromatographie erfolgte isokratisch mit einem Eluenten von 80/20 (v/v) Wasser/Methanol und einem Zusatz von 10 mmol NH_4HCO_3 bei einer Flussrate von 0,3 ml/min (bei Raumtemperatur). Das Injektionsvolumen betrug 30 µl. Hinter dem Säulenausgang wurde der Eluent mittels T-Stück gesplittet, so dass der Eluent mit einer Flussrate von ca. 0.1 ml/min ins Massenspektrometer gelangte.

B.3.1.1. Massenspektrometrie

Die Messungen erfolgten auf zwei unterschiedlichen Massenspektrometern. Die verwendeten Massenspektrometer unterscheiden sich in ihrem Auflösungsvermögen.

B.3.1.2. Quadrupol-MS:

Für die Messungen mittels Quadrupol-MS wurde die SEC mit einem Massenspektrometer der Firma Micromass (Quattro-LC) gekoppelt, das mit einer ESI-Quelle (Z-spray)

kombiniert war. Die Ionisierung erfolgte im negativen Modus. Dabei arbeitete die Quelle mit einer Interface-Temperatur von 270 °C und die source block Temperatur betrug 120 °C bei einem drying gas (N_2) flow von 800 Lh^{-1} und einem nebulizer gas (N_2) flow von 90 Lh^{-1}. Die capillary-Spannung betrug –2.85 kV und die Konus-Spannung 20 V. Die scan-Zeiten betrugen durchschnittlich 100 Massen/1 s. Für scan Messungen wurden Fulvinsäure-Konzentrationen von 1.0 g/L eingesetzt. Bei MS/MS-Messungen wurde der Druck in der Kollisionszelle auf 1,3 x 10^{-3} bar eingestellt, wobei Argon als Kollisionsgas verwendet wurde und eine Kollisionsenergie von 18 eV verwendet wurde. Für MS/MS Messungen wurden Fulvinsäure-Konzentrationen von 2.0 g/L verwendet.

Bei der Kopplung der SEC (size exclusion chromatography) mit dem Quattro-LC wurde mit einer Anlage von Hewlett-Packard (HP 1100) betrieben, die mit einer Entgasungseinheit für den Eluenten, einer Hochdruckgradientenpumpe, einem Autosampler und einem Dioden Array Detektor ausgestattet war.

Datenauswertung:

Die Datenauswertung erfolgte mit Masslynx 3.3.

B.3.1.3. Bestimmung der mittleren Ionen-Intensitäten:

Zur Bestimmung der mittleren Molekulargewichte wurden zwei scan Messungen durchgeführt. Mit der ersten Messung wurde der Massenbereich zwischen m/z 100-1 000 vermessen und mit der zweiten Messungen der Massenbereich zwischen m/z 1 000-2 000. Zur Erstellung der Spektren wurde ein Massenbereich von 0.5 min summiert, wobei es wichtig war, für jede Summation die gleiche Anzahl an Spektren zu addieren. Im Chromatogramm wurde ein Bereich von 0.5 min vor dem der Beginn der Elution summiert, um die Intensität des Hintergrundrauschen, das von der Säule, dem Eluenten bzw. der Messung hervorgerufen wird, von den Spektren zu eliminieren. Aus den Untergrund-subtrahierten Daten wurden sowohl die mittlere Molekulargewichtsverteilung (*Mw*) als auch die mittlere Massenverteilung (*Mn*) bestimmt.

B.3.1.4. Q-TOF-MS:

Für die Messungen mittels Q-TOF-MS wurde die SEC mit einem Massenspektrometer der Firma Micromass (Q-TOF Ultima) gekoppelt, das mit einer ESI-Quelle (Z-spray) kombiniert war. Die Ionisierung erfolgte im negativen Modus. Dabei arbeitete die Quelle mit einer Interface-Temperatur von 270 °C und die source block Temperatur betrug 120 °C bei einem drying gas (N_2) flow von 600 Lh^{-1}, einem Konus gas flow von 50 Lh^{-1} (N_2) und einem nebulizer gas (N_2) flow von 80 Lh^{-1}. Die capillary-Spannung betrug –2.5 kV. Für alle Messungen wurden der Konus auf 35 V und die RF Lens 1 auf 35 V gesetzt. Es wurde ein Massenbereich von m/z 150-1000 detektiert. Für scan Messungen wurden Fulvinsäure-

Konzentrationen von 1.0 g/L eingesetzt. Dabei betrug die scan-Zeit 1.0 s. Bei MS/MS-Messungen wurde eine Kollisionsenergie von 18 eV verwendet. Für diese Messungen wurde der Massenbereich zwischen m/z 30-500 in 1.0 s gescannt. Alle Messungen mittels TOF-MS wurden im Continuum-mode durchgeführt. Für MS/MS Messungen und Analysen im W-mode wurden Fulvinsäure-Konzentrationen von 2.0 g/L verwendet.

Die Quelle war mit einer Lock-Spray Einheit ausgestattet. Als Lock-Masse wurden Cluster-Ionen einer 0.1 % igen H_3PO_4 verwendet. Bei den Messungen mittels Q-TOF Ultima ist es möglich mit dem V-mode und dem W-mode zu messen. Im V-mode wurde das Gerät auf eine Auflösung von 8 000 und im W-mode auf eine Auflösung von 16 000 eingestellt. Die Auflösung wurde mit Leucin Enkephalin (m/z 556) durch Bestimmung der Peakbreite bei 50 % Peakhöhe bestimmt (FWHM).

Die SEC wurde mit einem Waters Alliance 2795 HPLC System durchgeführt, das mit einer Entgasungseinheit für den Eluenten, einer Hochdruckgradientenpumpe, einem Auto-sampler und einem Dioden Array Detektor ausgestattet war.

Datenauswertung: Die Datenauswertung erfolgte mit Masslynx 4.0. Zur Erstellung der Spektren wurde in jeder Fraktion die größtmögliche Anzahl an scan-Läufen summiert. Zur Korrektur der Massenachse der einzelnen Messungen wurden weder „smooth-Funktionen“ noch „background substraction“ genutzt. Die „TOF Massen Korrektur“ erfolgte in Abhängigkeit von der Intensität der Phosphat-Ionen des Lock-Sprays über m/z 195 oder m/z 293. Dabei sollte die Spitze des Massen-Signals als Masse erkannt werden.

B.3.2.LC-OCD

B.3.2.1. Kopplung der SEC-MS und SEC-OCD

SEC-MS: Die SEC wurde mit einer PL Aquagel-OH 30; MW range 100 > 30 000 (4.6 x 250 mm; Partikelgröße 8 µm) der Firma Polymer Laboratories (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Als Eluent wurde 80/20 (v/v) Wasser/Methanol mit einem Zusatz von 10 mM NH_4HCO_3 und einer Flussrate von 0.3 ml/min verwendet (siehe B.3.1). Als HPLC Anlage wurde eine Anlage von Hewlett-Packard (HP 1100) genutzt, die mit einem Dioden Array Detektor ausgestattet war. Die Chromatographie wurde mit einem Massenspektrometer der Firma Micromass (Quattro-LC) gekoppelt. Die Einstellungen des Gerätes sind unter B.3.1.2 beschrieben.

SEC-OCD: Als SEC Säule wurde die gleiche Säule wie bei der SEC-MS verwendet, die unter B.3.1 beschriebenen wurde. Als Eluent wurde ein wässriger Puffer bei einer Flussrate von 0.3 ml/min verwendet, dem 18.4 mM KH_2PO_4 und 8.4 mM Na_2HPO_4) zugesetzt waren.

Die SEC mit anschließender „organic carbon detection“ wurde mit einem HPLC System durchgeführt, das aus einem Rheodyne 7125 Injektor und einer L6100A Gradientenpumpe (Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland) bestand. Dieses System wurde, um Totvolumina möglichst zu vermeiden, direkt in die Kohlenstoff-Detektions-Einheit eines kommerziellen SEC-OCD Messsystems der Firma DOC Labor Dr. Huber (Karlsruhe, Deutschland) eingeleitet. Das Messsystem besteht aus einem WellChrom K 200 UV Detektor (Knauer, Berlin, Deutschland) und einer Oxidationseinheit (Gränzel-Reaktor), das den organsichen Kohlenstoff zu CO_2 oxidiert, das mittels IR Detektor erfasst wird.

Datenauswertung: Die chromatographischen Daten beider Systeme, SEC-UV-MS (Masslynx 3.3; Micromass) und SEC-OCD (Simplex Numerica 5.2, Sofware), wurden in Exel (Windows) exportiert. Über die in Abschnitt 4.2.1 gegeben Gleichungen wurden unterschiedliche Totvolumina, die durch physikochemische Prozesse hervorgerufene Peakverbreiterung im OCD System und die aufgrund der unterschiedlichen chromatographischen Systeme bedingte Verschiebungen in den Retentionszeiten korrigiert.

Bestimmung der Peakflächen: Die korrigierten chromatographischen Daten (siehe Datenauswertung, oben) lagen im Exel-Format vor. Das folgende Schema wurde angewandt, um die gemeinsamen Deckungsflächen zu bestimmen, die SEC-OCD und SEC-MS Chromatogramm bei unterschiedlichen Konus-Spannungen besitzen:

Alle Total Ionen Chromatogramme, der vermessenen Serie (CV: 20 V, 40 V, 60 V, 100 V und 140 V) wurden auf das Chromatogramm normalisiert, das die höchste Intensität innerhalb dieser Serie besaß. Das Chromatogramm mit der höchsten Intensität wurde zuvor auf das SEC-OCD Chromatogramm normalisiert.

Die Retentionszeiten der sich überschneidenden Flächen (zwischen OCD- und MS-Chromatogramm) wurden in Exel abgelesen.

Mittels Simplex Numerica wurden die sich überschneiden Flächen integriert.

B.3.2.2. SEC-OCD von Fulvinsäuren

Die SEC wurde auf einer HW 50 S Säule, MW range 500 > 20 000 (300 x 22 mm; Partikelgröße 20-40 µm) der Firma Grom Chromatography (Rottenburg-Hailfingen, Deutschland) durchgeführt. Als Eluent wurde ein wässriger Puffer bei einer Flussrate von 2.0 ml/min verwendet, dem 18.4 mM KH_2PO_4 und 8.4 mM Na_2HPO_4) zugesetzt waren. Die Kohlenstoffdetektion erfolgte mit dem von der Firma DOC Labor Dr. Huber (Karlsruhe, Deutschland) kommerziell erhältlichen SEC-OCD Messsystem, welches aus einem Autosampler (Gilson, Den Haag, Niederlanden), einem WellChrom K 200 UV Detektor (Knauer, Berlin, Deutschland) und einer Oxidationseinheit (Gränzel-Reaktor) besteht.

B.3.3.UV/VIS Spektrometrie

Die UV/VIS Spektren der Fulvinsäuren wurden mit einem UV/VIS Spetrometer Lambda 12 der Firma Perkin Elmer (Rodgau-Jüdesheim, Deutschland) aufgenommen. Die Messungen wurden in Reinstwasser bei pH 3 durchgeführt.

B.4. Ozonung

Das für die Oxidation verwendete Ozon wurde mit einem Ozongenerator (Sorbios, GSG 1.2) hergestellt. Genauere Angaben zur Anlage sind in (Kornmüller 2001; Kornmüller und Wiesmann 2002) beschrieben. Die Ozonzugaskonzentration betrug 25 g/m^3 bei einem Gasvolumenstrom von 35 L/h. Die Ozonung der Fulvinsäuren erfolgte in einer 100 ml Gaswaschflasche. Es wurde ein Volumen von 30 ml gelöster Fulvinsäure zur Ozonung eingesetzt. Die Konzentrationen an Fulvinsäure variierten in den jeweiligen Versuchen zwischen 2.0 und 1.5 g/L. Es wurden ausschließlich Suwannee River Fulvinsäuren verwendet.

Vor Beginn der Ozonung wurde der pH-Wert der Lösung mit 1 M NaOH auf pH 9 eingestellt. Nach jeweils 2-5 min wurde die Ozonung unterbrochen, 1.5 ml Probe zur Analyse entnommen und der pH-Wert der verbliebenen Lösung erneut auf pH 9 eingestellt. Anschließend wurde die Ozonung fortgesetzt bis die Ozonkonzentration in der Zu- und Abluft gleiche Werte hatten, also kein Ozon mehr verbraucht wurde.

Die DOC-Gehalte wurden aufgrund der geringen Probenvolumina per Bypass-Messung auf dem LC-OCD-System der Firma DOC Labor Dr. Huber bestimmt (B.3.2.2).

C Literaturverzeichnis

Aaserud, D. J., Prokai, L. and Simonsick, W. J. (1999). Gel permeation chromatography coupled to Fourier transform mass spectrometry for polymer characterization. Anal. Chem. 71(21): 4793-4799.
Alberts, J. J. and Filip, Z. (1998). Metal binding in estuarine humic and fulvic acids: FTIR analysis of humic acid-metal complexes. Environ. Technol. 19(9): 923-931.
Artinger, R., Buckau, G., Geyer, S., Fritz, P., Wolf, M. and Kim, J. I. (2000). Characterization of groundwater humic substances: influence of sedimentary organic carbon. Appl. Geochem. 15(1): 97-116.
Averett, R. C., Leenheer, J. A., McNight, D. M. and Thorn, K. A. (1989). HUMIC SUBSTANCES IN THE SUWANNEE RIVER, GEORGIA: INTERACTIONS, PROPERTIES, AND PROPOSED STRUCTURES.
Behar, F. and Hatcher, P. G. (1995). Artificial Coalification of a Fossil Wood from Brown Coal by Confined System Pyrolysis. Energy Fuels 9(6): 984-994.
Brown, V. M., Shaw, T. L. and Shurben, D. G. (1974). Aspects of Water-Quality and Toxicity of Copper to Rainbow- Trout. Water Res. 8(10): 797-803.
Buckau, G., Artinger, R., Geyer, S., Wolf, M., Fritz, P. and Kim, J. I. (2000a). C-14 dating of Gorleben groundwater. Appl. Geochem. 15(5): 583-597.
Buckau, G., Artinger, R., Geyer, S., Wolf, M., Fritz, P. and Kim, J. I. (2000b). Groundwater in-situ generation of aquatic humic and fulvic acids and the mineralization of sedimentary organic carbon. Appl. Geochem. 15(6): 819-832.
Burton, R. D., Matuszak, K. P., Watson, C. H. and Eyler, J. R. (1999). Exact mass measurements using a 7 Tesla Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer in a good laboratory practices-regulated environment. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 10(12): 1291-1297.
Calemma, V., Iwanski, P., Rausa, R. and Girardi, E. (1994). Changes in Coal Structure Accompanying the Formation of Regenerated Humic Acids During Air Oxidation. Fuel 73(5): 700-707.
Cappiello, A., De Simoni, E., Fiorucci, C., Mangani, F., Palma, P., Trufelli, H., Decesari, S., Facchini, M. C. and Fuzzi, S. (2003). Molecular characterization of the water-soluble organic compounds in fogwater by ESIMS/MS. Environ. Sci. Technol. 37(7): 1229-1240.
Carter, C. W. and Suffet, I. H. (1982). Binding of DDT to Dissolved Humic Materials. Environ. Sci. Technol. 16(11): 735-740.
Cech, N. B. and Enke, C. G. (2001). Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. Mass Spectrom. Rev. 20(6): 362-387.
Chang, S. and Berner, R. A. (1998). Humic substance formation via the oxidative weathering of coal. Environ. Sci. Technol. 32(19): 2883-2886.
Chen, Y., Senesi, N. and Schnitzer, M. (1977). Information Provided on Humic Substances by E4-E6 Ratios. Soil Sci. Soc. Am. J. 41(2): 352-358.
Chiavari, G., Torsi, G., Fabbri, D. and Galletti, G. C. (1994). Comparative-Study of Humic Substances in Soil Using Pyrolytic Techniques and Other Conventional Chromatographic Methods. Analyst 119(6): 1141-1150.
Chin, Y. P., Aiken, G. and Oloughlin, E. (1994). Molecular-Weight, Polydispersity, and Spectroscopic Properties of Aquatic Humic Substances. Environ. Sci. Technol. 28(11): 1853-1858.
Chiou, C. T., Kile, D. E., Brinton, T. I., Malcolm, R. L., Leenheer, J. A. and Maccarthy, P. (1987). A Comparison of Water Solubility Enhancements of Organic Solutes by Aquatic Humic Materials and Commercial Humic Acids. Environ. Sci. Technol. 21(12): 1231-1234.
Claus, H., Gleixner, G. and Filip, Z. (1999). Formation of humic-like substances in mixed and pure cultures of aquatic microorganisms. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 27(4): 200-207.
Clifford, D. J., Carson, D. M., McKinney, D. E., Bortiatynski, J. M. and Hatcher, P. G. (1995). A New Rapid Technique for the Characterization of Lignin in Vascular Plants -

Thermochemolysis with Tetramethylammonium Hydroxide (Tmah). Org. Geochem. 23(2): 169-175.
Colombo, M., Sirtori, F. R. and Rizzo, V. (2004). A fully automated method for accurate mass determination using high-performance liquid chromatography with a quadrupole/orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer. Rapid Commun. Mass Spectrom. 18(4): 511-517.
Conte, P. and Piccolo, A. (1999). High pressure size exclusion chromatography (HPSEC) of humic substances: Molecular sizes, analytical parameters, and column performance. Chemosphere 38(3): 517-528.
Cook, R. L. (2004). Coupling NMR to NOM. Anal. Bioanal. Chem. 378(6): 1484-1503.
Dari, K., Bechet, M. and Blondeau, R. (1995). Isolation of Soil Streptomyces Strains Capable of Degrading Humic Acids and Analysis of Their Peroxidase-Activity. FEMS Microbiol. Ecol. 16(2): 115-121.
de Hoffmann, E. and Stroobant, V. (2001). MASS SPECROMETRY Principles and Applications. Chichester * Ney York * Weinheim, JOHN WILEY & SONS, LTD.
del Rio, J. C., McKinney, D. E., Knicker, H., Nanny, M. A., Minard, R. D. and Hatcher, P. G. (1998). Structural characterization of bio- and geo-macromolecules by off-line thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide. J. Chromatogr. A 823(1-2): 433-448.
delRio, J. C. and Hatcher, P. G. (1996). Structural characterization of humic substances using thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide. In: Humic and Fulvic Acids. Washington, AMER CHEMICAL SOC. 651: 78-95.
Eckers, C., Wolff, J. C., Haskins, N. J., Sage, A. B., Giles, K. and Bateman, R. (2000). Accurate mass liquid chromatography/mass spectrometry on orthogonal acceleration time-of-flight mass analyzers using switching between separate sample and reference sprays. 1. Proof of concept. Anal. Chem. 72(16): 3683-3688.
Egeberg, P. K., Eikenes, M. and Gjessing, E. T. (1999). Organic nitrogen distribution in NOM size classes. Environ. Int. 25(2-3): 225-236.
Eller, W. and Koch, K. (1920). Synthetische Darstellung von Huminsäuren. 53: 1469 - 1476.
Fievre, A., Solouki, T., Marshall, A. G. and Cooper, W. T. (1997). High-resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of humic and fulvic acids by laser desorption/ionization and electrospray ionization. Energy Fuels 11(3): 554-560.
Filip, Z. and Alberts, J. J. (1988). The Release of Humic Substances from Spartina-Alterniflora (Loisel) into Sea-Water as Influenced by Salt-Marsh Indigenous Microorganisms. Sci. Total Environ. 73(3): 143-157.
Filip, Z. and Claus, H. (2002). Formation, Utilization, and Transformation of Some Refractory Organic Substances by Aquatic Microorganisms. In: Refractory Organic Substances in the Environment. F. H. Frimmel, Abbt-Braun, G., Heumann, K. G., Hock, B., Lüdemann, H.-D. and Spiteller, M., WILEY-VCH: 311-320.
Filip, Z., Claus, H. and Dippell, G. (1998). Degradation of humic substances by soil microorganisms - a review. Z. Pflanzen. Bodenk. 161(6): 605-612.
Filip, Z. and Smedhildmann, R. (1992). Does Fossil Plant-Material Release Humic Substances into Groundwater. Sci. Total Environ. 118: 313-324.
Galapate, R. P., Baes, A. U. and Okada, M. (2001). Transformation of dissolved organic matter during ozonation: Effects on trihalomethane formation potential. Water Res. 35(9): 2201-2206.
Gaskell, S. J. (1997). Electrospray: Principles and practice. J. Mass Spectrom. 32(7): 677-688.
Giesy, J. P., Leversee, G. J. and Williams, D. R. (1977). Effects of Naturally Occurring Aquatic Organic Fractions on Cadmium Toxicity to "Simocephalus-Serrulatus-(Daphnidae) and Gambusia-Affinis-(Poeciliidae). Water Res. 11(11): 1013-1020.
Gilbert, E. (2004). Chemische Oxidation. In: Wasseraufbereitung - Grundlagen und Verfahren. DVGW Deutsche Vereinigung des Gas-uund Wasserfaches e.V. München Wien, Oldenbourg Industrieverlag. Bd. 6: 315-338.

Gjessing, E. T., Egeberg, P. K. and Hakedal, J. (1999). Natural organic matter in drinking water - the "NOM-typing project", background and basic characteristics of original water samples and NOM isolates. Environ. Int. 25(2-3): 145-159.
Glasius, M., Duane, M. and Larsen, B. R. (1999). Determination of polar terpene oxidation products in aerosols by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. J. Chromatogr. A 833(2): 121-135.
Gloor, R., Leidner, H., Wuhrmann, K. and Fleischmann, T. (1981). Exclusion Chromatography with Carbon Detection - a Tool for Further Characterization of Dissolved Organic-Carbon. Water Res. 15(4): 457-462.
Gobbels, F. J. and Puttmann, W. (1997). Structural investigation of isolated aquatic fulvic and humic acids in seepage water of waste deposits by pyrolysis gas chromatography mass spectrometry. Water Res. 31(7): 1609-1618.
Goel, S., Hozalski, R. M. and Bouwer, E. J. (1995). Biodegradation of NOM - Effect of Nom Source and Ozone Dose. J. Am. Water Work Assoc. 87(1): 90-105.
Gottschalk, C., Libra, J. A. and Saupe, A. (2000). Ozonation of Water and Waste Water, WILEY-VCH.
Haider, K. M. and Martin, J. P. (1988). Mineralization of C-14-Labeled Humic Acids and of Humic-Acid Bound C-14 Xenobiotics by Phanerochaete-Chrysosporium. Soil Biol. Biochem. 20(4): 425-429.
Haitzer, M., Hoss, S., Traunspurger, W. and Steinberg, C. (1998). Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms - A review. Chemosphere 37(7): 1335-1362.
Hanninen, K. I., Klocking, R. and Helbig, B. (1987). Synthesis and Characterization of Humic Acid-Like Polymers. Sci. Total Environ. 62: 201-210.
Hassett, J. P. and Anderson, M. A. (1979). Association of Hydrophobic Organic-Compounds with Dissolved Organic-Matter in Aquatic Systems. Environ. Sci. Technol. 13(12): 1526-1529.
Hatcher, P. G. and Clifford, D. J. (1997). The organic geochemistry of coal: from plant materials to coal. Org. Geochem. 27(5-6): 251-263.
Hatcher, P. G. and Spiker, E. C. (1988). Selective degradation of plant biomolecules. In: Humic substances and their role in the environment. F. H. Frimmel and Christman, R. F., Wiley, Chichester: 59-74.
Hatcher, P. G., Spiker, E. C., Szeverenyi, N. M. and Maciel, G. E. (1983). Selective Preservation and Origin of Petroleum-Forming Aquatic Kerogen. Nature 305: 498-501.
Hertkorn, N., Claus, H., Schmitt-Kopplin, P. H., Perdue, E. M. and Filip, Z. (2002). Utilization and transformation of aquatic humic substances by autochthonous microorganisms. Environ. Sci. Technol. 36(20): 4334-4345.
Hesse, M., Meyer, H. and Zeeh, B. (1995). Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Georg Thieme Verlag Stuttgart * New York.
Hirose, A. and Ishii, D. (1986). Reversed Phase Microcolumn Liquid-Chromatographic Separation of Fulvic-Acid. 9(9): 533-534.
Höll, K. (2002). Wasser - Nutzung im Kreislauf - Hygiene, Analyse und Bewertung. In: Desinfektion von Trinkwasser. A. Grohmann. Berlin * New York, Walter de Gruyter. 8. Auflage: 619-634.
Hsu, C. S., Qian, K. N. and Chen, Y. N. C. (1992). An Innovative Approach to Data-Analysis in Hydrocarbon Characterization by Online Liquid-Chromatography Mass- Spectrometry. Anal. Chim. Acta 264(1): 79-89.
Huber, S. A. and Frimmel, F. H. (1994). Direct Gel Chromatographic Characterization and Quantification of Marine Dissolved Organic-Carbon Using High-Sensitivity Doc Detection. Environ. Sci. Technol. 28(6): 1194-1197.
Hunt, S. M. and Sheil, M. M. (1998). Comparison of electrospray ionisation mass spectrometry with matrix-assisted laser desorption ionisation mass spectrometry and size exclusion chromatography for the characterisation of polyester resins. Eur. Mass Spectrom. 4(6): 475-486.
Hunt, S. M., Sheil, M. M., Belov, M. and Derrick, P. J. (1998). Probing the effects of cone potential in the electrospray ion source: Consequences for the determination of molecular weight distributions of synthetic polymers. Anal. Chem. 70(9): 1812-1822.

Ikeda, K., Arimura, R., Echigo, S., Shimizu, Y., Minear, R. A. and Matsui, S. (2000). The fractionation/concentration of aquatic humic substances by the sequential membrane system and their characterization with mass spectrometry. Water Sci. Technol. 42(7-8): 383-390.
Janos, P. (2003). Separation methods in the chemistry of humic substances. J. Chromatogr. A 983(1-2): 1-18.
Jekel, M. (2004). Kombinierte Verfahren der Oberflächenwasseraufbereitung. In: Wasseraufbereitung - Grundlagen und Verfahren. DVGW Deutsche Vereinigung des Gas- uund Wasserfaches e.V. München Wien, Oldenbourg Industrieverlag. Bd. 6: 844-856.
Jekel, M. R. (1998). Effects and mechanisms involved in preoxidation and particle separation processes. Water Sci. Technol. 37(10): 1-7.
Jiang, L. F. and Moini, M. (2000). Development of multi-ESI-sprayer, multi-atmospheric-pressure- inlet mass spectrometry and its application to accurate mass measurement using time-of-flight mass spectrometry. Anal. Chem. 72(1): 20-24.
Kalberer, M., Paulsen, D., Sax, M., Steinbacher, M., Dommen, J., Prevot, A. S. H., Fisseha, R., Weingartner, E., Frankevich, V., Zenobi, R. and Baltensperger, U. (2004). Identification of polymers as major components of atmospheric organic aerosols. Science 303: 1659-1662.
Kebarle, P. (2000). A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. J. Mass Spectrom. 35(7): 804-817.
Kebarle, P. and Peschke, M. (2000). On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. Anal. Chim. Acta 406(1): 11-35.
Kim, S., Kramer, R. W. and Hatcher, P. G. (2003). Graphical method for analysis of ultrahigh-resolution broadband mass spectra of natural organic matter, the van Krevelen diagram. Anal. Chem. 75(20): 5336-5344.
Kornmüller, A. (2001). Ozonisierung von höherkernigen polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in Öl/Wasser Emulsionen. 15(231).
Kornmüller, A. and Wiesmann, U. (2002). Ozonation of polycyclic aromatic hydrocarbons in oil/water-emulsions: mass transfer and reaction kinetics. 37(5): 1023-1032.
Kracht, O. and Gleixner, G. (2000). Isotope analysis of pyrolysis products from Sphagnum peat and dissolved organic matter from bog water. Org. Geochem. 31(7-8): 645-654.
Kramer, R. W., Kujawinski, E. B. and Hatcher, P. G. (2004). Identification of black carbon derived structures in a volcanic ash soil humic acid by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. Environ. Sci. Technol. 38(12): 3387-3395.
Kujawinski, E. B. (2002). Electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (ESI FT-ICR MS): characterization of complex environmental mixtures. Environ. Forensics 3(3-4): 207-216.
Kujawinski, E. B., Freitas, M. A., Zang, X., Hatcher, P. G., Green-Church, K. B. and Jones, R. B. (2002a). The application of electrospray ionization mass spectrometry (ESI MS) to the structural characterization of natural organic matter. Org. Geochem. 33(3): 171-180.
Kujawinski, E. B., Hatcher, P. G. and Freitas, M. A. (2002b). High-resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of humic and fulvic acids: Improvements and comparisons. Anal. Chem. 74(2): 413-419.
Kuwatsuka, S., Tsutsuki, K. and Kumada, K. (1978). Chemical Studies on Soil Humic Acids .1. Elementary Composition of Humic Acids. Soil Sci. Plant Nutr. 24(3): 337-347.
Lankes, U. and Lüdemann, H.-D. (2002a). Application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy to Structural Investigations of Refractory Organic Substances - Principles and Definitions. In: Refractory Organic Substances in the Environment. F. H. Frimmel, Abbt-Braun, G., Heumann, K. G., Hock, B., Lüdemann, H.-D. and Spiteller, M., WILEY-VCH: 89-95.
Lankes, U. and Lüdemann, H.-D. (2002b). Structural Characterization of Refractory Organic Substances by Solid-state High-resolution 13C and 15N Nuclear Magnetic Resonance. In: Refractory Organic Substances in the Environment. F. H. Frimmel, Abbt-Braun, G., Heumann, K. G., Hock, B., Lüdemann, H.-D. and Spiteller, M., WILEY-VCH: 96-114.
Leenheer, J. A., Ferrer, I., Furlong, E. T. and Rostad, C. E. (2003a). Charge characteristics and fragmentation of polycarboxylic acids by electrospray ionization-multistage tandem mass spectrometry. In: Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, Ms/Ms and Time-of- Flight Ms. Washington, AMER CHEMICAL SOC. 850: 312-324.

Leenheer, J. A., Nanny, M. A. and McIntyre, C. (2003b). Terpenoids as major precursors of dissolved organic matter in landfill leachates, surface water, and groundwater. Environ. Sci. Technol. 37(11): 2323-2331.
Leenheer, J. A., Rostad, C. E., Gates, P. M., Furlong, E. T. and Ferrer, I. (2001). Molecular resolution and fragmentation of fulvic acid by electrospray ionization/multistage tandem mass spectrometry. Anal. Chem. 73(7): 1461-1471.
Leenheer, J. A., Wershaw, R. L. and Reddy, M. M. (1995a). Strong-Acid, Carboxyl Group Structures in Fulvic-Acid from the Suwannee River, Georgia .1. Minor Structures. Environ. Sci. Technol. 29(2): 393-398.
Leenheer, J. A., Wershaw, R. L. and Reddy, M. M. (1995b). Strong-Acid, Carboxyl-Group Structures in Fulvic-Acid from the Suwannee River, Georgia .2. Major Structures. Environ. Sci. Technol. 29(2): 399-405.
Lubal, P., Siroky, D., Fetsch, D. and Havel, J. (1998). The acidobasic and complexation properties of humic acids - Study of complexation of Czech humic acids with metal ions. Talanta 47(2): 401-412.
Marquardt, H. and Schäfer, S. G. (1994). Lehrbuch der Toxikologie, Spektrum Akademischer Verlag.
Marshall, A. G. and Guan, S. H. (1996). Advantages of high magnetic field for Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 10(14): 1819-1823.
McEwen, C. N., Simonsick, W. J., Larsen, B. S., Ute, K. and Hatada, K. (1995). The Fundamentals of Applying Electrospray-Ionization Mass- Spectrometry to Low-Mass Poly(Methyl Methacrylate) Polymers. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 6(10): 906-911.
McIntyre, C., Batts, B. D. and Jardine, D. R. (1997). Electrospray mass spectrometry of groundwater organic acids. J. Mass Spectrom. 32(3): 328-330.
Miles, C. J. and Brezonik, P. L. (1983). High-Performance Size Exclusion Chromatography of Aquatic Humic Substances. 259(3): 499-503.
Moulin, V., Reiller, P., Amekraz, B. and Moulin, C. (2001). Direct characterization of iodine covalently bound to fulvic acids by electrospray mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 15(24): 2488-2496.
Nielen, M. W. F. (1996). Characterization of synthetic polymers by size-exclusion chromatography electrospray ionization mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 10(13): 1652-1660.
Nielen, M. W. F. and Buijtenhuijs, F. A. (1999). Polymer analysis by liquid chromatography electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. Anal. Chem. 71(9): 1809-1814.
Nielen, M. W. F. and Malucha, S. (1997). Characterization of polydisperse synthetic polymers by size- exclusion chromatography matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 11(11): 1194-1204.
Owen, D. M., Amy, G. L., Chowdhury, Z. K., Paode, R., McCoy, G. and Viscosil, K. (1995). Nom - Characterization and Treatability. J. Am. Water Work Assoc. 87(1): 46-63.
Pacheco, M. L., Pena-Mendez, E. M. and Havel, J. (2003). Supramolecular interactions of humic acids with organic and inorganic xenobiotics studied by capillary electrophoresis. Chemosphere 51(2): 95-108.
Piccolo, A., Conte, P., Trivellone, E. and Van Lagen, B. (2002). 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 H-1-NMR spectroscopy. Environ. Sci. Technol. 36(1): 76-84.
Plancque, G., Amekraz, B., Moulin, V., Toulhoat, P. and Moulin, C. (2001). Molecular structure of fulvic acids by electrospray with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 15(10): 827-835.
Preston, C. M. (1996). Applications of NMR to soil organic matter analysis: History and prospects. Soil Sci. 161(3): 144-166.
Preston, C. M. and Ripmeester, J. A. (1982). Application of Solution and Solid-State C-13 NMR to 4 Organic Soils, Their Humic Acids, Fulvic-Acids, Humins and Hydrolysis Residues. 27(4): 99-105.

Proefke, M. L. and Rinehart, K. L. (1992). Analysis of an Egyptian Mummy Resin by Mass-Spectrometry. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 3(5): 582-589.
Rashid, M. A. and King, L. H. (1971). Chemical Characteristics of Fractionated Humic Acids Associated with Marine Sediments. Chem. Geol. 7(1): 37-&.
Reemtsma, T. (2001). The use of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in water analysis - Part I: Achievements. Trac-Trends Anal. Chem. 20(9): 500-517.
Reemtsma, T. (2003). Liquid chromatography-mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants. J. Chromatogr. A 1000(1-2): 477-501.
Reemtsma, T. and These, A. (2003). On-line coupling of size exclusion chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry for the analysis of aquatic fulvic and humic acids. Anal. Chem. 75(6): 1500-1507.
Rice, J. A. and MacCarthy, P. (1991). Statistical Evaluation of the Elemental Composition of Humic Substances. Org. Geochem. 17(5): 635-648.
Schulten, H. R. and Gleixner, G. (1999). Analytical pyrolysis of humic substances and dissolved organic matter in aquatic systems: structure and origin. Water Res. 33(11): 2489-2498.
Schulten, H. R. and Schnitzer, M. (1992). Structural Studies on Soil Humic Acids by Curie-Point Pyrolysis-Gas Chromatography Mass-Spectrometry. Soil Sci. 153(3): 205-224.
Sihombing, R., Greenwood, P. F., Wilson, M. A. and Hanna, J. V. (1996). Composition of size exclusion fractions of swamp water humic and fulvic acids as measured by solid state NMR and pyrolysis gas chromatography mass spectrometry. Org. Geochem. 24(8-9): 859-873.
Sposito, G., Schaumberg, G. D., Perkins, T. G. and Holtzclaw, K. M. (1978). Investigation of Fulvic-Acid Extracted from Sewage Sludge Using C-13 and Proton Nmr-Spectroscopy. Environ. Sci. Technol. 12(8): 931-934.
Steinberg, C. E. W. (2003). Ecology of Humic Substances in Freshwaters. Berlin * Heidelberg * New York, Springer-Verlag.
Steinberg, C. E. W. and Münster, U. (1985). Geochemistry and ecological role of humic substances in lakewater. In: Humic substances in soil, sediment and water. G. R. Aiken, McKnight, D. M., Wershaw, R. L. and MacCarthy, P., Wiley, New York: 105-145.
Steinberg, C. E. W., Paul, A., Pflugmacher, S., Meinelt, T., Klocking, R. and Wiegand, C. (2003). Pure humic substances have the potential to act as xenobiotic chemicals - A review. Fresenius Environ. Bull. 12(5): 391-401.
Stenson, A. C., Landing, W. M., Marshall, A. G. and Cooper, W. T. (2002). Ionization and fragmentation of humic substances in electrospray ionization Fourier transform-ion cyclotron resonance mass spectrometry. Anal. Chem. 74(17): 4397-4409.
Stenson, A. C., Marshall, A. G. and Cooper, W. T. (2003). Exact masses and chemical formulas of individual Suwannee River fulvic acids from ultrahigh resolution electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectra. Anal. Chem. 75(6): 1275-1284.
Stevenson, F. J. (1982). HUMUS CHEMISTRY-GENESIS; COMPOSITION; REACTIONS-. New York * Chichester, John Wiley & Sons.
Storm, T., Hartig, C., Reemtsma, T. and Jekel, M. (2001). Exact mass measurements on-line with high-performance liquid chromatography on a quadrupole pass spectrometer. Anal. Chem. 73(3): 589-595.
Stuermer, D. H. and Payne, J. R. (1976). Investigation of Seawater and Terrestrial Humic Substances with C-13 and Proton Nuclear Magnetic-Resonance. Geochim. Cosmochim. Acta 40(9): 1109-1114.
Sun, L., Perdue, E. M., Meyer, J. L. and Weis, J. (1997). Use of elemental composition to predict bioavailability of dissolved organic matter in a Georgia river. Limnol. Oceanogr. 42(4): 714-721.
Swift, R. S., Delisle, G. and Leonard, R. L. (1987). Biodegradation of Humic Acids from New-Zealand Soils. Sci. Total Environ. 62: 423-430.
Takahashi, N., Nakai, T., Satoh, Y. and Katoh, Y. (1995). Ozonolysis of Humic-Acid and Its Effect on Decoloration and Biodegradability. Ozone-Sci. Eng. 17(5): 511-525.

These, A. and Reemtsma, T. (2003). Limitations of electrospray ionization of fulvic and humic acids as visible from size exclusion chromatography with organic carbon and mass spectrometric detection. Anal. Chem. 75(22): 6275-6281.
These, A., Winkler, M., Thomas, C. and Reemtsma, T. (2004). Determination of molecular formulas and structural regularities of low molecular weight fulvic acids by size-exclusion chromatography with electrospray ionization quadrupole time-of- flight mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 18(16): 1777-1786.
Thurman, E. M. (1985). Organic geochemistry of natural waters. Dordrecht, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk.
Tranvik, L. J. and Hofle, M. G. (1987). Bacterial-Growth in Mixed Cultures on Dissolved Organic-Carbon from Humic and Clear Waters. Appl. Environ. Microbiol. 53(3): 482-488.
Trubetskoj, O. A., Trubetskaya, O. E. and Khomutova, T. E. (1992). Isolation, Purification and Some Physicochemical Properties of Soil Humic Substances Fractions Obtained by Polyacrylamide-Gel Electrophoresis. Soil Biol. Biochem. 24(9): 893-896.
Tyler, A. N., Clayton, E. and Green, B. N. (1996). Exact mass measurement of polar organic molecules at low resolution using electrospray ionization and a quadrupole mass spectrometer. Anal. Chem. 68(20): 3561-3569.
van den Berg, K. J., Boon, J. J., Pastorova, I. and Spetter, L. F. M. (2000). Mass spectrometric methodology for the analysis of highly oxidized diterpenoid acids in Old Master paintings. J. Mass Spectrom. 35(4): 512-533.
van Krevelen, D. W. (1950). Graphical-statistical method for the study of structure and reaction processes of coal. 29: 269-284.
Visser, S. A. (1983a). Application of Vankrevelens Graphical Statistical-Method for the Study of Aquatic Humic Material. Environ. Sci. Technol. 17(7): 412-417.
Visser, S. A. (1983b). Comparative-Study on the Elementary Composition of Fulvic and Humic Acids of Aquatic Origin and from Soils and Microbial Substrates. Water Res. 17(10): 1393-1396.
Visser, S. A. (1984). Seasonal-Changes in the Concentration and Color of Humic Substances in Some Aquatic Environments. Freshw. Biol. 14(1): 79-87.
Vodacek, A., Blough, N. V., DeGrandpre, M. D., Peltzer, E. T. and Nelson, R. K. (1997). Seasonal variation of CDOM and DOC in the Middle Atlantic Bight: Terrestrial inputs and photooxidation. Limnol. Oceanogr. 42(4): 674-686.
von Gunten, U. (2003). Ozonation of drinking water: Part II. Disinfection and by- product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. Water Res. 37(7): 1469-1487.
Waiser, M. J. and Robarts, R. D. (2004). Photodegradation of DOC in a shallow prairie wetland: evidence from seasonal changes in DOC optical properties and chemical characteristics. Biogeochemistry 69(2): 263-284.
Wershaw, R. L., Burcar, P. J. and Goldberg, M. C. (1969). Interaction of Pesticides with Natural Organic Material. Environ. Sci. Technol. 3(3): 271-&.
Winner, R. W. (1984). The Toxicity and Bioaccumulation of Cadmium and Copper as Affected by Humic-Acid. Aquat. Toxicol. 5(3): 267-274.
Wolf, M., Buckau, G. and Geyer, S. (2004). Isolation and characterization of new batches of Gohy-573 humic and fulvic acids. In: Humic Substances in Performance Assesment of Nuclear Waste Disposal Sites: Actinide and Iodine Migration in the Far-Field, 2nd Technical Report. G. Buckau. Karlsruhe, Forschungszentrum Karlsruhe.
Wolff, J. C., Fuentes, T. R. and Taylor, J. (2003). Investigations into the accuracy and precision obtainable on accurate mass measurements on a quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer using liquid chromatography as sample introduction. Rapid Commun. Mass Spectrom. 17(11): 1216-1219.
Wu, S. L., Jardine, I., Hancock, W. S. and Karger, B. L. (2004). A new and sensitive on-line liquid chromatography/mass spectrometric approach for top-down protein analysis: the comprehensive analysis of human growth hormone in an E. coli lysate using a hybrid linear ion trap/Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. Rapid Commun. Mass Spectrom. 18(19): 2201-2207.
You, S. J., Yin, Y. J. and Allen, H. E. (1999). Partitioning of organic matter in soils: effects of pH and water/soil ratio. Sci. Total Environ. 227(2-3): 155-160.