

Masterarbeit

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

im Studiengang
Biotechnologie

an der
Hochschule Bremerhaven

Entwicklung einer Festphasenextraktionsmethode zur Anreicherung gelöster Lipide aus Meerwasser

vorgelegt von

Doreen Kohlbach

November 2012

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

Zweitbetreuer: **Dr. rer. nat. Martin Graeve**
Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung

Eidesstaatliche Erklärung

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

Bremerhaven, den 29.11.12

Doreen Kohlbach

Zusammenfassung

Inhalt der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung einer Methode zur Identifizierung von Lipidverbindungen des gelösten organischen Materials (engl. *Dissolved Organic Matter*- DOM) aus Meerwasser. Die Anreicherung des DOM erfolgte über *Solid Phase Extraction* (SPE) unter Verwendung verschiedener Sorbenzien. Ausgewählt wurden hierfür die unpolaren Sorbenstypen C₈, C₁₈ und PPL sowie das polare Material NH₂, um diese hinsichtlich ihrer Adsorptionseffizienzen für die genannte Problematik zu charakterisieren. Die Identifizierung und Quantifizierung erfolgte über GC (*Gas Chromatography*) und GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*).

Es konnte festgestellt werden, dass die handelsüblichen SPE-Kartuschen aus Polypropylen für eine gaschromatographische Lipidanalytik nicht geeignet sind. Aufgrund der Elution mit organischen Lösungsmitteln werden materialeigene Substanzen aus den Kartuschenelementen (vor allem aus der Kunststoffssäule) gelöst, die eine eindeutige Identifizierung der gering konzentrierten Lipidverbindungen über GC-MS erschweren. Aus diesem Grund wurden für die beschriebenen Versuche manuell gepackte Glaskartuschen verwendet.

Die Versuche zur Methodenentwicklung wurden mit einem Lipidstandardgemisch (6STD), bestehend aus verschiedenen Neutral- und Polarlipiden, durchgeführt. Die Auswahl der Standards orientierte sich an den Ergebnissen bereits publizierter Arbeiten zur Lipidzusammensetzung des DOM in Meerwasser. Dieses Lipidgemisch wurde in Reinstwasser, künstlichem Meerwasser sowie Wasser mariner Herkunft (Nordsee) in Lösung gebracht und für die Extraktionsversuche genutzt. Zur Elution der angereicherten Organik von den Kartuschen wurde die Eignung der Extraktionslösungsmittel Dichlormethan, Methanol und n-Hexan untersucht.

Alle Komponenten des Lipidstandardgemisches wurden von den ausgewählten Sorbenzien in unterschiedlichem Maße adsorbiert (vollständige Wiederfindung für einzelne Verbindungen). Vor allem beim unpolaren C₁₈-Sorben konnten durch die Ansäuerung des Probenwassers auf pH 2 hohe Wiederfindungen erzielt werden, welches deshalb für weitergehende Untersuchungen ausgewählt wurde. Zusätzlich wurde das NH₂-Sorben näher untersucht, um darüber hinaus die Leistungsfähigkeit eines polareren Sorbens charakterisieren zu können. Die Wiederfindungen der Standardlipide über Festphasenextraktion wurden mit den Ausbeuten verglichen, die durch Flüssig-Flüssig-Extraktion erhalten wurden. Es wurde festgestellt, dass die SPE durch eine vergleichbare Leistungsstärke hinsichtlich der Extraktionseffizienz von Lipidverbindungen gekennzeichnet ist.

Zur Extraktion einer Meerwasserprobe (Nordsee, Juli 2012) wurde das C₁₈-Sorben genutzt. Für die Bestimmung über die GC-MS-Messungen war die Derivatisierung der Lipide notwendig, um diese in ihre Fettsäurekomponenten zu hydrolysieren sowie Sterole zu silylieren. Die Interpretation der Lipidzusammensetzung der Meerwasserprobe bezieht sich deshalb auf die Messungen der Derivate der Lipidfettsäuren (engl. *Fatty Acid Methyl Ester*- FAME) und der durch Silylierung entstandenen Trimethylsilyl-Sterole. Hierbei konnten diverse Fettsäuren sowie Sterolverbindungen identifiziert und quantifiziert werden (21,34 µg/L quantifizierbare Verbindungen: 20,21 µg/L FAME, 1,13 µg/L Trimethylsilylsterole).

Abstract

The main objective of this master thesis was the development of a method for the enrichment of lipids that occur in seawater as a part of DOM (*Dissolved Organic Matter*) by solid phase extraction (SPE). To gain knowledge on the characteristics of 4 different sorbent types, the nonpolar materials C₈, C₁₈ and PPL as well as the polar sorbent NH₂, were selected. The identification and quantitation were carried out via GC and GC-MS.

It was observed that disposable SPE cartridges, consisting of polypropylene, are not suitable for lipid analyses with gaschromatographic identification due to the fact that contaminations dissolve out of the cartridge material in high concentrations (mainly from the plastic column). Therefore, it has been recommended to use glass cartridges for the analysis of the extremely low concentrated lipid components.

For the method development experiments, a standard mixture containing lipid substances with varying polarities was used (6STD). The chemical composition of this mixture was oriented towards the lipid composition of marine DOM. The components were dissolved in ultrapure water, artificial seawater as well as in natural seawater. The elution of the enriched substances was carried out with dichloromethane, methanol and n-hexane.

The lipid components of the standard mixture were retained to a variable extent from the chosen sorbents (complete recovery for individual components). Particularly the nonpolar sorbent C₁₈ showed reasonable recoveries of the standard mixture in combination with an acidification of the ultrapure water. Therefore, the C₁₈ cartridge was used for further analyses. To characterize the performance of a more polar sorbent type, the NH₂ sorbent was also applied. Furthermore, it appeared that the SPE and the liquid-liquid extraction exhibit comparable extraction efficiencies in regard of the issue (similar recoveries of standard lipids).

Eventually, the C₁₈ sorbent was used for the detection of lipid components of a seawater sample (North Sea, July 2012). Due to the derivatization (esterification and silylation) of the molecules, the interpretation of the results is related to the fatty acids of the lipids and the trimethylsilyl sterols of the water sample. In total, 21,34 µg/L various FAME and sterols could be identified successfully (20,21 µg/L FAME, 1,13 µg/L trimethylsilyl sterols).

Inhalt

Eidesstaatliche Erklärung	iii
Zusammenfassung	iv
Abstract	v
Inhalt	vi
Abkürzungen	viii
Einheiten	ix
Faktoren	ix
Abbildungen	x
Tabellen	xi
1 Einleitung	1
1.1 Klassifizierung der Lipide	2
1.2 Lipidkomponenten als Teil des DOM im Meerwasser.....	3
1.3 Anreicherung von Lipiden durch SPE	4
1.3.1 Wechselwirkungsmechanismen bei der SPE.....	6
1.4 Analytik angereicherter Lipidverbindungen.....	8
1.5 Zielsetzung der Arbeit	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Reinheitsprüfung zur Extraktion verwendeter Lösungsmittel.....	11
2.2 Lösungsvermögen ausgewählter Standardlipide in Reinstwasser	11
2.3 Gaschromatographische Trennung der Derivate ausgewählter Standardlipide	13
2.4 Flüssig-Flüssig-Extraktion (FFE) der wässrigen Lipidlösungen.....	17
2.5 Festphasenextraktion (SPE) der Standardlipide.....	17
2.5.1 Blindwertbestimmung der Kunststoffkartusche C ₈ (Bond Elut).....	20
2.5.2 Aufreinigung der Kartuschenbestandteile	20
2.5.3 Extraktionseffizienzen der C ₁₈ - und NH ₂ -Sorbenzien (Bondesil).....	21
2.5.4 Extraktionseffizienzen der C ₈ - und PPL-Sorbenzien (Bondesil)	22
2.6 Festphasenextraktion (SPE) natürlicher Meerwasserproben	22
2.7 Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) von Meerwasserproben.....	25
3 Ergebnisse und Diskussion	26
3.1 Kontaminationsanalyse	26
3.1.1 Blindwertbestimmung der Kunststoffkartusche C ₈ (Bond Elut).....	26
3.1.2 Blindwertbestimmung der Glaskartusche C ₁₈ (Bondesil)	28
3.1.3 Analyse der Kartuschenbestandteile	28
3.2 Lösungsvermögen ausgewählter Standardlipide in Reinstwasser	31
3.3 GS-MS-Analyse der Standardlipide	35
3.4 Flüssig-Flüssig-Extraktion (FFE) der wässrigen Lipidlösungen.....	39
3.5 Festphasenextraktion (SPE) der Standardlipide.....	40
3.5.1 Extraktionseffizienzen ohne Ansäuerung.....	42
3.5.2 Extraktionseffizienzen mit Ansäuerung	45

3.5.3	<i>Extraktionseffizienzen bei künstlichem Meerwasser</i> -----	46
3.5.4	<i>Effizienzvergleich der Sorbenzien</i> -----	47
3.5.5	<i>Effizienzvergleich Festphasenextraktion ↔ Flüssig-Flüssig-Extraktion</i> -----	48
3.6	Festphasenextraktion (SPE) natürlicher Meerwasserproben	50
3.6.1	<i>mit Standardlipiden</i> -----	51
3.6.2	<i>ohne Standardlipide</i> -----	55
4	Fazit und Ausblick	62
5	Quellen	63
	Danksagung	69
	Anhang	

Abkürzungen

AB	Arachidylbehenat (Wachsester)
Abb.	Abbildung
c	Concentration
C	Carbon
Chol	Cholesterol
DAG	Diacylglycerol
DCM	Dichlormethan
dest.	Destilliert
DOC	Dissolved Organic Carbon
DOM	Dissolved Organic Matter
DON	Dissolved Organic Nitrogen
DPG	Diphosphatidylglycerol
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
EV	Endvolumen
FAME	Fatty Acid Methyl Ester
FFAP	Free Fatty Acid Phase
FFE	Flüssig-Flüssig-Extraktion
FS	Fettsäure
GC	Gas Chromatography
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
GF	Glasfaser
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IST	Interner Standard
IUPAC-IUB	International Union of Pure and Applied Chemistry-International Union of Biochemistry
IV	Injektionsvolumen
LC	Liquid Chromatography
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LL	Lauryllaurat (Wachsester)
LM	Lösungsmittel
MAG	Monoacylglycerol
MeOH	Methanol
MSTFA	N-Methyl-N-Trimethylsilyltrifluor(o)acetamid
N	Nitrogen
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
PPL	Styrendivinylbenzen-Polymer

RT	Raumtemperatur
SPE	Solid Phase Extraction
Sq	Squalan
Tab.	Tabelle
TAG	Triacylglycerol
TAS	Triarachinsäure (Icosansäure)
TIC	Total Ion Current
TLC	Thin Layer Chromatography
TLC/FID	Thin Layer Chromatography/Flame Ionization Detector
TMS	Trimethylsilylgruppe
TOC	Total Organic Carbon
US	Ultraschall

Einheiten

Å	Ångström
°	Grad
°C	Grad Celcius
g	Gramm
L	Liter
m	Meter
min	Minute
M	Molar (mol/L)
Ω	Ohm
PSU	Practical Salinity Units
%	Prozent
rpm	Revolutions Per Minute
S	Siemens
mol	Stoffmenge
h	Stunde
W	Watt

Faktoren

G	Giga	10^9
M	Mega	10^6
m	Milli	10^{-3}
μ	Mikro	10^{-6}
n	Nano	10^{-9}

Abbildungen

Abbildung 1. Schematischer Aufbau einer Festphasenextraktionskartusche	5
Abbildung 2. Schematische Darstellung des C ₁₈ -Sorbens mit Octadecylgruppen sowie des C ₈ -Sorbens mit Octylgruppen auf Silikasubstrat.	7
Abbildung 3. Schematische Darstellung des NH ₂ -Sorbens auf Silikasubstrat	7
Abbildung 4. Fließschema der Derivatisierung der Standardlipide zu FAME.....	14
Abbildung 5. Fließschema der Silylierung der veresterten Proben	15
Abbildung 6. Konzentrationen der FAME der veresterbaren Standardlipide sowie des Cholesterols in Abhängigkeit der Derivatisierungszeit	16
Abbildung 7. GC-MS 3800 Varian und GC 6890 N Network Agilent Technologies	16
Abbildung 8. Schematischer Aufbau des Festphasenextraktionssystems.....	18
Abbildung 9. Fließschema der Festphasenextraktion mit anschließender Detektion der Analyten. ...	19
Abbildung 10. Fließschema der Beprobung auf adsorbierte Lipidverbindungen.	20
Abbildung 11. Fließschema aller Schritte des Festphasenextraktionsversuchs natürlicher Wasserproben.	24
Abbildung 12. HPLC LaChrom Elite® VWR Hitachi.....	25
Abbildung 13. Konzentrationsverteilung der gaschromatographisch bestimmten Kontaminationen in den Lösungsmittelfractionen einer konditionierten und einer unkonditionierten C ₈ -Kunststoffkartusche.	27
Abbildung 14. Konzentrationen der gaschromatographisch bestimmten Kontaminationen der losen Sorbenzien vor und nach Aufreinigung mittels Soxhlet-Extraktion.	30
Abbildung 15. Lösungsvermögen der Standardlipide in Reinstwasser über die Zeit bei unterschiedlicher Behandlung der Standardlösungen.	32
Abbildung 16. Wiederfindungen der Standardlipide in je 200 mL Probenansatz in Abhängigkeit der Inkubationsdauer.	34
Abbildung 17. Strukturformel des Derivatisierungsreagenzes MSTFA.	36
Abbildung 18. Komponenten des Lipidstandardgemisches in unsilylierter und silylierter Form.	37
Abbildung 19. Komponenten des Lipidstandardgemisches in silylierter Form bei FFE mit DCM und n-Hexan.	40
Abbildung 20. Differenzen zwischen den Wiederfindungen mit/ohne Ansäuerung der Standardlösung bei Anreicherung der Komponenten auf der C ₁₈ -Glaskartusche.	46
Abbildung 21. Verteilung der Wiederfindungen der Standardlipide in der Meerwasserprobe auf die einzelnen Lösungsmittelfractionen (Versuch 1) bei Anreicherung der Komponenten auf der C ₁₈ -Glaskartusche.....	53
Abbildung 22. Verteilung der Wiederfindungen der Standardlipide in der Meerwasserprobe auf die einzelnen Lösungsmittelfractionen (Versuch 2) bei Anreicherung der Komponenten auf der C ₁₈ -Glaskartusche.....	54
Abbildung 23. Wiederfindungen der Standardlipide in Reinstwasser mit/ohne Ansäuerung, künstlichem sowie natürlichem Meerwasser bei Anreicherung der Komponenten auf der C ₁₈ -Glaskartusche.....	55

Abbildung 24. Komponenten der veresterten und silylierten 1. Dichlormethanfraktion der Meerwasserprobe bei Anreicherung der Komponenten auf der C ₁₈ -Glaskartusche.....	56
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabellen

Tabelle 1. Kategorisierung der Lipide.....	2
Tabelle 2. Sorbensmaterialien und deren Wechselwirkungsmechanismen.....	8
Tabelle 3. Lipidverbindungen verschiedener Polaritäten zur Bestimmung des Lösungsvermögens in Reinstwasser.....	12
Tabelle 4. Behandlungsbedingungen der Standardlösungen zur Bestimmung des Lösungsvermögens in Reinstwasser.....	12
Tabelle 5. Gaschromatographisch getrennte Standardlipide.....	13
Tabelle 6. Kommerziell erhältliche Kunststoffkartuschen sowie Sorbenzien für manuell gepackte Glassäulen und deren Spezifika.....	18
Tabelle 7. DOC- und DON-Konzentrationen der Standardlösungen.....	25
Tabelle 8. Konzentrationen der gaschromatographisch bestimmten Kontaminationen der Kartuschenbestandteile der C ₈ -Kartusche.....	29
Tabelle 9. Theoretische DOC-Konzentrationen der Standardlipide zur Bestimmung des Lösungsvermögens in Reinstwasser.....	31
Tabelle 10. DOC-Konzentrationen der Standardlösungen zur Bestimmung des Lösungsvermögens in Reinstwasser über die Zeit bei unterschiedlichen Behandlungsbedingungen.....	32
Tabelle 11. Wiederfindungen der Standardlipide in je 200 mL Probenansatz nach 0-4 h Inkubationsdauer.....	34
Tabelle 12. Wiederfindungen der an der Glaswand adsorbierten Standardlipide bei Bestimmung des Lösungsvermögens in Reinstwasser.....	35
Tabelle 13. Gesamtwiederfindungen der Standardlipide bei FFE des Lipidstandardgemisches sowie Beprobung der Glasflasche.....	35
Tabelle 14. Zusammensetzung des für die Extraktionsversuche verwendeten Lipidstandardgemisches 6STD.....	36
Tabelle 15. Wiederfindungen der Standardlipide bei FFE mit DCM und n-Hexan.....	39
Tabelle 16. Wiederfindungen der Standardlipide (ohne Ansäuerung) bei Anreicherung der Komponenten auf der C ₁₈ -Glaskartusche.....	42
Tabelle 17. Wiederfindungen der Standardlipide innerhalb der einzelnen Lösungsmittelfractionen bei Anreicherung der Komponenten auf der C ₁₈ -Glaskartusche.....	43
Tabelle 18. Wiederfindungen der Standardlipide (mit Ansäuerung) bei Anreicherung der Komponenten auf der C ₁₈ -Glaskartusche.....	45
Tabelle 19. Wiederfindungen der Standardlipide (mit Ansäuerung, mit 3,5 % Salz) bei Anreicherung der Komponenten auf der C ₁₈ -Glaskartusche.....	47
Tabelle 20. Wiederfindungen der Standardlipide bei SPE und FFE.....	49
Tabelle 21. Quantitativer Vergleich der durch FFE und SPE extrahierten Lipidverbindungen der Meerwasserprobe.....	49

Tabelle 22. Theoretische DOC-Konzentrationen der Standardlipide (6STD) bei Zugabe zur Meerwasserprobe.....	50
Tabelle 23. DOC- und DON-Konzentrationen der filtrierten Meerwasserprobe mit/ohne Standardlipide vor der Festphasenextraktion.....	51
Tabelle 24. DOC- und DON-Konzentrationen der filtrierten Meerwasserprobe mit/ohne Standardlipide nach der Festphasenextraktion.....	51
Tabelle 25. Wiederfindungen der Standardlipide (mit Ansäuerung der Meerwasserprobe) bei Anreicherung der Komponenten auf der C ₁₈ -Glaskartusche.....	52
Tabelle 26. FAME und Sterole der Meerwasserprobe in der 1. Dichlormethanfraktion bei Anreicherung auf der C ₁₈ -Glaskartusche.....	57
Tabelle 27. FAME und Sterole der Meerwasserprobe in den SPE-Eluaten, dem Flüssig-Flüssig-Extrakt des Permeatwassers sowie der Proben- und Permeatflasche.....	58

1 Einleitung

Das gelöste organische Material (engl. *Dissolved Organic Matter*- DOM) in den Ozeanen stellt eines der Hauptreservoirs des globalen Kohlenstoffkreislaufes dar, zu dessen kohlenstoffhaltigen Hauptkomponenten neben Proteinen und Kohlenhydraten auch Lipide zählen (Flerus et al., 2012). Die Menge an marinem DOC (*Dissolved Organic Carbon*) wird auf 662 Gt geschätzt, was in etwa der Größenordnung an Kohlenstoff entspricht, die sich in Form von Kohlenstoffdioxid in der Atmosphäre befindet (Flerus et al., 2012). Studien haben gezeigt, dass die periodische Wiederverwertung des gelösten organischen Materials eine wichtige Rolle für die Modifikation atmosphärischen Kohlenstoffdioxids spielt, was eng mit den klimatischen Verhältnissen verbunden ist (Mühlebach et al., 1998). Nach Bourguet et al. (2009) repräsentieren Lipide einen Anteil von 3-20 % des biogenen Kohlenstoffs.

In den oberen Schichten der Meere wird organisches Material durch Phytoplankton mittels Photosynthese aus anorganischen Substanzen gebildet. Die synthetisierten Stoffe werden als gelöste Komponenten oder in Form von partikulärem Detritus, welcher in DOM überführt werden kann, ins aquatische Medium freigesetzt (Goutx et al., 2009). Häufig wird von einer Partikelgröße von 0,45 µm ausgegangen, um die gelösten Materialien (< 0,45 µm) von partikulärer Organik (> 0,45 µm, engl. *Particulate Organic Matter*- POM) abzugrenzen (Zsolnay, 2003). Die Primärproduktion stellt die weitaus größte Quelle organischen Materials dar, jedoch nimmt die lebende Biomasse lediglich einen Anteil von weniger als 1 % am gesamten organischen Kohlenstoff (engl. *Total Organic Carbon*- TOC) in den Ozeanen ein. Über 90 % des organischen Kohlenstoffs findet sich in totem DOC (Ogawa & Tanoue, 2003) und nur ein kleiner Teil des organischen Kohlenstoffs wird durch sinkende Partikel in die Tiefe transportiert. Der überwiegende Anteil des durch Phytoplankton produzierten, partikulären Materials wird im Oberflächenwasser im Zuge des Nahrungsnetzes recycelt (Christodoulou et al., 2009).

Organische Substanzen üben einen erheblichen Einfluss auf chemische und biologische, aber auch geologische und physikalische Prozesse in aquatischen Umgebungen aus. So können gelöste Materialien als Kohlenstoffquelle zur Energiegewinnung von Bakterien dienen. Weiterhin können gelöste organische Substanzen in eine partikuläre Form überführt und so als Nahrungsquelle für Zooplankton und benthische Organismen genutzt werden (Kennicutt & Jeffrey, 1981).

Lipide stellen essentielle Komponenten des Zellmetabolismus dar (Bourguet et al., 2009) und können aufgrund ihrer erhöhten Stabilität im Vergleich zu Proteinen und Kohlenhydraten als hilfreiche Biomarker dienen, um die Quellen organischer Substanzen sowie deren Verbleib in marinen Systemen zu beschreiben (Christodoulou et al., 2009; Sun et al., 2002; Wakeham, 1995).

Durch die vielfältigen Interaktionen und der daraus resultierenden engen Beziehung zwischen gelöstem organischen Material und im Meerwasser ablaufenden Prozessen ist eine qualitativ-quantitativ basierte Analyse dieser Substanzen für das Verständnis der Eigenschaften und Zusammensetzung des Meerwassers essentiell (Kennicutt & Jeffrey, 1981).

1.1 Klassifizierung der Lipide

Lipide zählen zu den wichtigsten Naturstoffen, die als Träger verschiedenster Funktionen eine essentielle Bedeutung für alle bekannten Lebewesen besitzen. Eine einfache Definition beschreibt Lipide als eine Gruppe natürlich vorkommender Substanzen, die im Allgemeinen eine gute Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln (z. B. Chloroform, Alkohole) besitzen. Des Weiteren können Lipide als Fettsäuren und deren Derivate sowie Substanzen, die eine biosynthetische oder funktionelle Verwandtschaft zu diesen aufweisen, bezeichnet werden (Christie & Han, 2010). Die Hydrophobie stellt die gemeinsame Eigenschaft der Lipide dar; diese resultiert aus der Anwesenheit langkettiger Kohlenwasserstoffreste in den Molekülen, die verzweigt oder unverzweigt bzw. cyclisch sein können (Thiele, 1979).

Bereits im Jahr 1920 wurde eine grobe Klassifizierung in 3 Gruppen vorgenommen (Bloor, 1920): die einfachen Lipide (z.B. Fette, Wachse), Komponentenlipide, zu denen Phospho- und Glykolipide zählten, sowie abgeleitete Lipide, welche u. a. Fettsäuren und Alkohole umfassten. Außerdem prägte Bloor die Unterscheidung zwischen einfachen bzw. neutralen und komplexen bzw. polaren Lipiden. 1976 wurden von der damaligen *IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN)* Empfehlungen für eine Nomenklatur der Lipide herausgegeben; diese stellten die überarbeitete Version der bereits im Jahr 1967 erschienenen '*Nomenclature of Lipids*' dar. Das System wurde 1997 um die Nomenklatur der Glykolipide ergänzt (*IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature [JCBN]*).

Eine international akzeptierte Möglichkeit der Klassifizierung von Lipiden wurde von Fahy et al. (2005) entwickelt. Hierbei werden diese in 8 Kategorien, basierend auf individuellen hydrophoben und hydrophilen Elementen der jeweiligen Verbindung, unterteilt (**Tab. 1**).

Tabelle 1. Kategorisierung der Lipide (nach Fahy et al., 2009)

Lipidkategorie	Abkürzung
Fettsäureverbindungen	FA
Glycerolipide	GL
Glycerophospholipide	GP
Polyketide	PK
Prenole	PR
Saccharolipide	SL
Sphingolipide	SP
Sterole	ST

Die Verbindungen der einzelnen Kategorien werden außerdem in diverse Klassen und Unterklassen unterschieden. Die letzte Aktualisierung wurde 2009 veröffentlicht und umfasst, neben dem Einbeziehen zusätzlicher Lipidquellen, wie Pflanzen, Pilzen und Bakterien, die Addition weiterer Klassen und Subklassen (Fahy et al., 2009). Diese Kategorisierung wurde durch ein internationales Komitee (*International Lipid Classification and Nomenclature Committee [ILCNC]*) unter der Förderung

des LIPID-MAPS-Konsortiums vorgenommen und ist kompatibel zu verschiedensten Datenbankinformationen. Im Zuge dieser Einordnung wurden Lipide als hydrophobe oder amphipathische Moleküle definiert, die teilweise oder vollständig durch carbanionen-basierte Kondensation von Thioestern (z. B. Fettsäuren, Polyketide) und/oder durch carbokationen-basierte Kondensation von Isopreneinheiten (z. B. Prenole, Sterole) entstehen.

1.2 Lipidkomponenten als Teil des DOM im Meerwasser

Obwohl Lipide bis zu 40 % der leicht identifizierbaren Kohlenstofffraktion des DOM ausmachen können, ist bisher vergleichsweise wenig über die Konzentrationen der einzelnen Lipidklassen in mariner Umgebung bekannt (Goutx et al., 2009).

Im Ozean werden Lipidmoleküle in den Zellen von Zoo- und Phytoplanktonspezies biosynthetisiert und gelangen über die Ausscheidung lebender Organismen bzw. über Zellyse in das aquatische Medium. Diese organischen Biomoleküle können anschließend durch heterotrophe Bakterien verwertet werden. Etwa 5-10 % des partikulären Materials aus der euphotischen Schicht gelangt durch verschiedene Transportmechanismen in die Tiefe der Meere (Mühlebach, 1998). Neben Phospholipiden der Zellmembran sowie Sterolen heterotropher Organismen setzt sich die Lipidfraktion des Wassers aus Lipiden der Chloroplasten (Pigmente, Glykolipide) autotropher Lebewesen und des Phytodetritus zusammen. Weiterhin können Speicherlipide, wie Wachsester und Triacylglycerole sowie Abbaumetabolite (freie Fettsäuren, Di- und Monoacylglycerole) gefunden werden, welche den Degradationszustand organischen Materials anzeigen (Goutx et al., 2009).

Bereits 1966 wurden erste Untersuchungen zur Lipidzusammensetzung des Meerwassers von Jeffrey veröffentlicht. Hierbei konnten durch eine Kombination aus Säulenchromatographie, TLC (*Thin Layer Chromatography*), GC, Infrarotanalysen und chemischer Tests verschiedene Lipidklassen separiert und identifiziert werden. Außerdem wurden Variationen in der Konzentration und Zusammensetzung der detektierten Lipidverbindungen in Abhängigkeit vom Ort, der Jahreszeit und der Tiefe festgestellt. Charakteristische Tiefenprofile gelöster Lipide in Abhängigkeit vom Phytoplanktonabbau wurden ebenso von Gérin & Goutx (1994) gefunden. Parrish (1988a) gab niedrigere Konzentrationen unterhalb der Pyknokline an; auch Jeffrey (1966) beobachtete höhere Konzentrationen im Oberflächenwasser, dem Ort der höchsten biologischen Produktivität.

Die Konzentrationen an gelösten Lipiden im Wasser sind in den Wintermonaten generell niedrig und nehmen während des Sommers Maximalwerte ein (oligotrophe Phase), während sie im Herbst wieder zu niedrigeren Werten übergehen. Nach Goutx et al. (2009) wird hierbei von einer Remineralisierung der Lipide im Spätsommer und Herbst ausgegangen. Vorstellbar sind ebenfalls eine Überführung in anderes Material sowie der Transport in die tieferen Meeresschichten durch die Prozesse der Aggregation und/oder Migration von Zooplankton. Ebenso wurden Unterschiede in der Zusammensetzung der Wassersäule von Kennicutt & Jeffrey (1981) beobachtet. Hierbei waren die gefundenen Lipidkonzentrationen im Oberflächenwasser im Februar höher als im November. Außerdem wies das Wasser im Herbst eine gute Durchmischung auf. Auch Penezić et al. (2010)

registrierten während der Phytoplanktonblüten in März und Juli eine höhere Lipidkonzentration in einem eutrophen Salzsee.

Zwischen den Konzentrationsbereichen gelöster und partikulärer Lipide gibt es teils große Diskrepanzen. Derieux et al. (1998) hoben die unterschiedliche Natur von gelöstem und partikulärem Kohlenstoff hervor; so sollen Lipide bei gelöstem Material einen deutlich kleineren Anteil ausmachen.

Gelöste Lipide kommen lediglich in sehr geringen Konzentrationen, im Bereich $\mu\text{g/L}$, im Meerwasser vor. So konnte von Kattner et al. (1983) gefunden werden, dass Lipide und Fettsäuren in der Nordsee im Frühjahr 3 % des DOM ausmachen. Kennicutt & Jeffrey (1981) publizierten Werte gelöster Lipide im Golf von Mexiko zwischen 60 und 160 $\mu\text{g/L}$ nahe der Oberfläche sowie zwischen 61 und 116 $\mu\text{g/L}$ in der Nähe des Bodens. Derieux et al. (1998) ermittelten aus Wasserproben, welche im späten Frühjahr in der Adria gezogen wurden, einen Gesamtgehalt gelöster Lipide zwischen 49 und 88 $\mu\text{g/L}$ (partikuläre Lipide: 33-140 $\mu\text{g/L}$); das Verhältnis zwischen gelösten Lipiden und DOC wurde zwischen 0,03 und 0,04 bestimmt. Während der Phytoplanktonblüte im Frühjahr wurden von Parrish (1987) hochvariable Lipidkonzentrationen zwischen 33 und 260 $\mu\text{g/L}$ (partikuläre Lipide: 75-498 $\mu\text{g/L}$) an der atlantischen Westküste detektiert. Parrish (1988 a) quantifizierte im gut durchmischten Oberflächenwasser (*surface mixed layer*) schottischer Gewässer im April Konzentrationen gelöster Lipide zwischen 49 und 190 $\mu\text{g/L}$ (partikuläre Lipide: 25-58 $\mu\text{g/L}$). Gérin & Goutx (1994) lieferten Werte zwischen 9 und 113 $\mu\text{g/L}$ für gelöste Lipide (partikuläre Lipide: 3-84 $\mu\text{g/L}$) im Frühjahr im Mittelmeer.

1.3 Anreicherung von Lipiden durch SPE

Die Festphasenextraktion (engl. *Solid Phase Extraction*- SPE) stellt eine weit verbreitete Methode zur Probenvorbereitung, Komponentenisolierung sowie zur Entfernung von Reagenzien und unerwünschten Begleitsubstanzen dar. Hierbei wird die flüssige Probe, äquivalent zur HPLC, über eine Kartusche gegeben, in welcher sich ein Sorbens befindet (Ruiz-Gutiérrez & Pérez-Camino, 2000). Die stationäre Phase wird über poröse Fritten in der Kartusche gehalten; am Ende der Säule befindet sich eine konische Spitze (Luer), die eine Verbindungsmöglichkeit für z. B. Pumpensysteme darstellt (Christie, 1992). Aufgrund der Interaktionen zwischen Analyten und stationärer Phase werden die Komponenten entsprechend ihrer molekularer Eigenschaften adsorbiert, während andere Probenkomponenten die Kartusche aufgrund fehlender Wechselwirkungen ungehindert passieren können (1.3.1). Die Elution der gebundenen Substanzen erfolgt durch Lösungsmittel verschiedener Polaritäten, welche die adsorbierten Substanzen bei geeigneter Löslichkeit bzw. kompatibler Polarität desorbieren können. Durch die Wahl eines geeigneten Sorbensmaterials können bei einer selektiven Extraktion hochreine und aufkonzentrierte Analyten erhalten werden.

Die Festphasenextraktion ist für die Analyse von Lipidverbindungen aus dem DOM eine wichtige Methode, um die gering konzentrierten Lipide aus der komplexen Matrix des Meerwassers zu isolieren, anzureichern und mittels nachfolgender Analyseverfahren eindeutig zu identifizieren und quantifizieren.

Im Handel existieren gepackte Kartuschen verschiedener Säulenvolumina sowie Sorbensmaterialien unterschiedlicher Massen. Daneben besteht die Möglichkeit, Leersäulen manuell mit Sorbenzien und Fritten zu vervollständigen (im Zuge dieser Arbeit verwendet: gepackte Kartuschen aus Polypropylen [Säulenvolumen: 3 mL, Sorbensmasse: 200 mg, Fritten aus Polypropylen], Leersäulen aus Glas [Säulenvolumen: 3 mL] in Verbindung mit je 200 mg Sorbens sowie Glasfaserfritten).

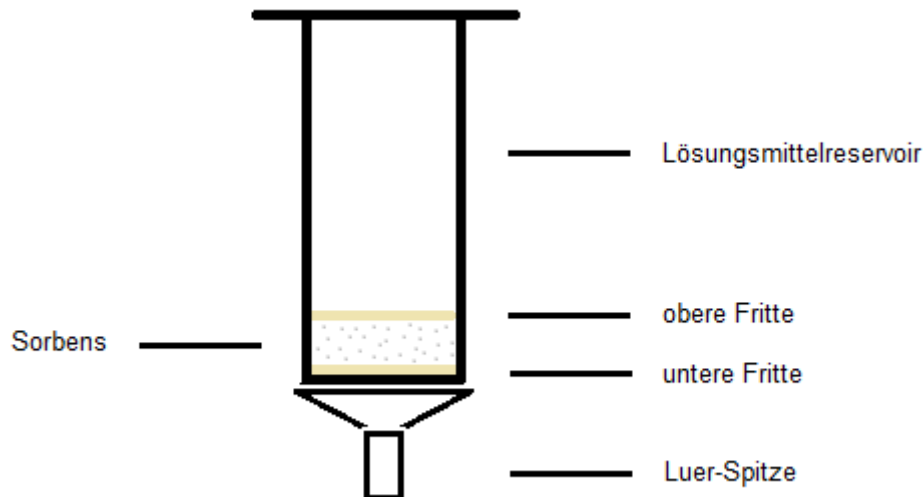


Abbildung 1. Schematischer Aufbau einer Festphasenextraktionskartusche.

Die Festphasenextraktion gilt als eine leistungsstarke Methode zur Anreicherung lipider Komponenten, die in sehr geringen Konzentrationen in den Meerwasserproben enthalten sind. Verschiedenartige Lipidverbindungen können hierbei mit hohen Wiederfindungsraten erhalten werden (Hamilton & Comai, 1988; Bateman & Jenkins, 1997). Mittlerweile existieren zahlreiche Methoden für verschiedene Trennprobleme, die eine effiziente und reproduzierbare Anwendung versprechen (z. B. polare SPE zur Fraktionierung von Lipiden im Serum oder Gewebe nach Kaluzny et al., 1985; Elutionsschemata nach Ansari & Shoeman, 1988 oder Hamilton & Comai, 1984). Außerdem bietet diese zeitsparende Extraktionstechnik den Vorteil, dass sie gegenüber der konventionellen Flüssig-Flüssig-Extraktion (z. B. nach Folch et al., 1957; Bligh & Dyer, 1959) deutlich geringere Lösungsmittelvolumina benötigt und mühelos automatisierbar ist (Giacometti et al., 2002). So soll die in den späten 1970ern erstmals eingeführte Festphasenextraktion rund 1/10 des Lösungsmittelverbrauchs der Flüssig-Flüssig-Extraktion für die Extraktion eines äquivalenten Probenvolumens beanspruchen (Thurman & Snavely, 2000). Ein weiterer Nachteil der Flüssigextraktion ist die häufig unvollständige Wiederfindung polarer Komponenten (z. B. saurer Phospholipide, unveresterter Fettsäuren) im Extrakt, welche durch die Nutzung von SPE-Kartuschen deutlich erhöht sein können (Myher & Kuksis, 1995). Die SPE zeichnet sich durch eine hohe Selektivität der Anwendung sowie Vielseitigkeit der Einsatzbereiche aus; die in den letzten Jahren entwickelten Formate und Techniken, wie z. B. 96-Well-Platten oder *Solid Phase Microextraction*, führen zu einer ständigen Weiterentwicklung und Verbesserung des Systems sowie einer Zunahme der Anwendungsbereiche (Panagiotopoulou & Tsimidou, 2002).

Eine weitere Möglichkeit zur Trennung und Anreicherung neutraler und polarer Lipide stellt die Dünnschichtchromatographie (TLC) dar. Hierbei kann es allerdings schnell zu einer Probenüberladung des Systems kommen; außerdem ist diese Art der Analyse zeitaufwendig und umständlich. Ebenfalls für die Untersuchung von Lipidverbindungen kann die Säulenchromatographie zum Einsatz kommen. Die Flüssigchromatographieverfahren sind allerdings mit einem hohen Zeit- und Lösungsmittelverbrauch verbunden (Hamilton & Comai, 1988; Kim & Salem, 1990; Ruiz-Gutiérrez & Pérez-Camino, 2000).

1.3.1 Wechselwirkungsmechanismen bei der SPE

Basierend auf den Prinzipien der Flüssigchromatographie kommt es bei der Festphasenextraktion zu starken, aber reversiblen Interaktionen zwischen den Analyten der Probe und des als stationäre Phase dienenden Sorbens. Zu den charakteristischen Wechselwirkungen zwischen den C-H-Gruppen der Analyten und jener des Sorbens gehören die Van-der-Waals-Kräfte, welche bei Verwendung unpolarer stationärer Phasen (z. B. C₁₈, C₈) vorkommen. Zu den polaren Interaktionen zählen vor allem Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, die insbesondere bei Cyano- und Aminopropylphasen sowie Silikasorbentien auftreten (Ruiz-Gutiérrez & Pérez-Camino, 2000).

Im Zuge dieser Arbeit wurden die silikabasierten Sorbentien C₈, C₁₈ (*Reversed Phase*) und NH₂ (*Normal Phase*) sowie PPL verwendet.

Silikabasierte Sorbentien werden durch die Reaktion von Organosilanen mit aktiviertem Silika erzeugt. Es entsteht ein Sorbens mit der funktionellen Gruppe der Organosilane, die mit dem Silikasubstrat über eine Silyl-Ether-Bindung verbunden ist. Durch so genanntes *Endcapping* können hierbei verbliebene, ungebundene Silanolgruppen deaktiviert werden. Auf diese Weise soll sichergestellt werden, dass die Interaktionen des Sorbens mit den Analyten lediglich über die funktionelle Gruppe stattfinden und Wechselwirkungen über das Silikasubstrat nur eine untergeordnete Rolle spielen (Varian, 2005).

Generell wird von einer Stabilität des Kartuschensorbens bei pH-Werten zwischen 2 und 7,5 ausgegangen. Oberhalb dieses Bereiches kann es zur Auflösung des Silika-Materials kommen, zu niedrige pH-Werte können die Hydrolyse von Silyl-Ether-Bindungen bedingen (Christie, 1992). Außerdem kann es zu einer Abspaltung der funktionellen Gruppen kommen, was mit einer nichtreproduzierbaren Änderung der Sorbenseigenschaften verbunden wäre (Varian, 2005).

Die Partikelgröße silikabasierter Sorbentien (z. B. C₈, C₁₈, NH₂) liegt zwischen 15 und 100 µm (hier verwendete Sorbentien: 40 µm); die Teilchen weisen eine überwiegend unregelmäßige Form auf (Ausnahme PPL: sphärische Form). Dies soll einen schnellen Probendurchfluss unter geringem Druck oder Vakuum gewährleisten. Die Sorbentien besitzen im Durchschnitt eine Porosität von 60 Å (silikabasierte Sorbentien, Ausnahme PPL: 150 Å) und sind damit für Analyten mit einem maximalen Molekulargewicht von 15.000 geeignet (Varian, 2005).

Das C₁₈-Sorbens weist die größte Hydrophobie gebundener Silikasorbentien auf und eignet sich daher für die Anreicherung unpolarer Analyten sowie zur Entsalzung wässriger Proben oder

biologischer Flüssigkeiten (**Abb. 2 a**). Da nahezu alle Analytspezies potentiell über unpolare Wechselwirkungen reagieren können (Beispiele für Ausnahmen: anorganische Salze, Kohlenhydrate), ist eine Extraktion über C_{18} relativ unselektiv. Auf der anderen Seite eignen sich unpolare Sorbenzien für die Anreicherung von Analyten mit stark unterschiedlicher Struktur (Varian, 2005).

Ebenso ist das C_8 -Sorbens zur Anreicherung unpolarer Komponenten adäquat; es zeigt jedoch ein weniger starkes Retentionsvermögen gegenüber dieser Analyten als das C_{18} -Sorbens aufgrund der geringeren Hydrophobie des Materials (**Abb. 2 b**). Empfohlen wird dieser Sorbenstyp als Ersatz für das C_{18} -Sorbens, wenn eine effektive Elution der Analyten durch zu starke unpolare Wechselwirkungen bei diesem nicht möglich ist. Aufgrund der kürzeren, silikagebundenen Kohlenstoffkette ist die Tendenz für polare Interaktionen höher als beim C_{18} -Sorbens, zählt aber nicht zu den signifikanten Eigenschaften dieses Sorbensmaterials (Agilent Technologies, 2010).

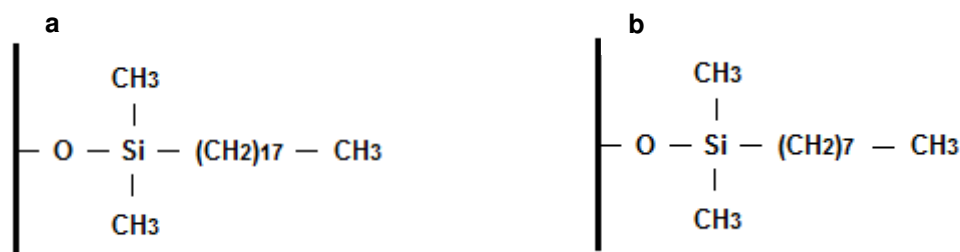


Abbildung 2. Schematische Darstellung des C_{18} -Sorbens mit Octadecylgruppen (a) sowie des C_8 -Sorbens mit Octylgruppen (b) auf Silikasubstrat (nach Agilent Technologies, 2010).

Das Aminopropylsorbens (**Abb. 3**) besitzt polare Eigenschaften und verfügt über die Fähigkeit des Anionenaustauschs. Es eignet sich vor allem zur Anreicherung starker Anionen polarer und unpolarer Natur sowie zur Trennung von Strukturisomeren aus wässrigen, biologischen Proben (Agilent Technologies, 2010). Daneben existieren ionische Interaktionsmöglichkeiten. Um diese nutzen zu können, muss die Probe einen pH-Wert aufweisen, der sicherstellt, dass sowohl die Analyten als auch das Sorbens eine Ladung tragen. Außerdem darf die Probe keine hohen Konzentrationen an Ionenspezies enthalten, die aufgrund der gleichen Ladung in Konkurrenz zu den Analyten stehen (Varian, 2005).

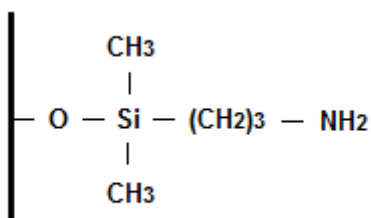


Abbildung 3. Schematische Darstellung des NH_2 -Sorbens auf Silikasubstrat (nach Agilent Technologies, 2010).

Des Weiteren kam das unpolare Sorbens PPL zum Einsatz, das aus einem Styren-Divinylbenzenpolymer aufgebaut ist, welches mit einer unpolaren Oberfläche modifiziert wurde. Die Modifikationen können hierbei der analytischen Zielgruppe angepasst werden, um für spezielle funktionelle Gruppen (z. B. Carboxyl- oder Hydroxylgruppen) optimale Adsorptionseigenschaften

bereitzustellen. Genaue Informationen sind allerdings nicht bekannt, da aus patentrechtlichen Gründen keine Herstellerangaben bezüglich der Modifikationen vorliegen (Meyer, 2005).

Durch die vergleichsweise große Partikelgröße von 125 µm (silikabasierte Sorbenzien: 40 µm) sollen hohe Extraktionsgeschwindigkeiten ermöglicht werden können, was eine Extraktion hochviskoser oder partikelreicher Wasserproben vereinfachen soll. Typische Matrices, die sich für die Anwendung dieses Sorbenstyps eignen, sind Wasser sowie biologische Fluide. Aufgrund der starken Hydrophobie des Materials kommt es zwischen den Analyten und des Sorbensmaterials vorwiegend zu unpolaren sowie elektrostatischen Wechselwirkungen (Agilent Technologies, 2010). Geeignet ist dieses Material jedoch generell für die Anreicherung hochpolarer sowie unpolarer Substanzen aus großen Probenvolumina (Dittmar et al., 2008).

Neben den eigentlichen primären Wechselwirkungen zwischen den Analyten und den funktionellen Gruppen des Sorbens kann es auch zu Interaktionen mit dem Silikasubstrat aufgrund dessen polaren Charakters sowie mit ungebundenen Silanolgruppen kommen. Bei diesen so genannten sekundären Wechselwirkungen interagieren die polaren Stellen der Silanole durch Wasserstoffbrückenbindungen mit Aminen und Hydroxylgruppen der Probenkomponenten in unpolarer Lösungsumgebung. Im wässrigen Milieu kann der saure Charakter ungebundener Silanole zu ionischen Interaktionen mit ionischen Gruppen der Analyten führen (Varian, 2005). Dies kann durch das bereits erwähnte *Endcapping* oder durch die Derivatisierung freier Silanolgruppen mit Trimethylsilanen umgangen werden (Simjouw et al., 2005).

Eine große Bedeutung bei der Trennung von Komponenten via SPE hat die Polarität des umgebenden Mediums. Durch Variieren der Solvenseigenschaften, wie pH-Wert oder Polarität oder der Eigenschaften des Sorbens, können Analyten selektiv, verbunden mit einem hohen Grad an Reinheit sowie in hoher Wiederfindung, isoliert werden (Kaluzny et al., 1985). Die unpolaren Interaktionen zwischen einem unpolaren Sorbens und unpolaren Analyten werden durch deren Aufenthalt in einem polaren Lösungsmittel ermöglicht. Für die Elution der gebundenen Analyten ist dementsprechend ein Lösungsmittel nötig, das in der Lage ist, diese Wechselwirkungen aufgrund einer hinreichenden Unpolarität zu unterbrechen (Varian, 2005).

Tabelle 2. Sorbensmaterialien und deren Wechselwirkungsmechanismen (Varian, 2005)

Sorbens	Primäre Interaktionen	Sekundäre Interaktionen	Endcapping
C ₈	unpolar	polar, Kationenaustausch	ja
C ₁₈	unpolar	polar, Kationenaustausch	ja
NH ₂	polar, Anionenaustausch	unpolar, Kationenaustausch	nein
PPL	unpolar	-	-

1.4 Analytik angereicherter Lipidverbindungen

Die mittels SPE angereicherten Lipide können nach der Elution mit geeigneten Lösungsmitteln über verschiedene chromatographische Verfahren identifiziert und quantifiziert werden. Ein wesentliches Ziel ist die vollständige Trennung der Lipidklassen und molekularen Spezies. Die gegenwärtige

Lipidanalytik vereint zumeist einen Extraktionsschritt zur Isolierung der Verbindungen mit anschließender chromatographischer Trennung (TLC, HPLC, GC) und der massenspektrometrischen Analyse der Komponenten (Myher & Kuksis, 1995).

Eine direkte gaschromatographische Analyse von Lipidverbindungen gestaltet sich aufgrund des meist hohen Molekulargewichtes sowie der polaren Eigenschaften (Carboxylgruppen, Hydroxylgruppen, Phosphatgruppen), der damit verbundenen Tendenz zur Wasserstoffbrückenbildung sowie der resultierenden geringen Flüchtigkeit der Substanzen, schwierig. Aus diesem Grund ist eine Derivatisierung der Verbindungen (bzw. der Carboxylgruppe der Fettsäuren) notwendig, die die Flüchtigkeit der Analyten erhöht und zu einer besseren Trennung sowie kürzeren Analysezeiten beiträgt (Carvalho & Malcata, 2005). Bei der hier durchgeführten Veresterungsreaktion kommt es zu einer Umesterung lipidgebundener Fettsäuren sowie einer Veresterung freier Fettsäuren, die ebenfalls in natürlichen Proben vorkommen, zu Fettsäuremethylestern (Gutnikov, 1995). Die FAME können aufgrund der niedrigeren Siedepunkte und der erhöhten Flüchtigkeit problemlos in die Gasphase überführt und gaschromatographisch analysiert werden (meist Nutzung von Kapillarsäulen in Verbindung mit FID-Detektoren [Gutnikov, 1995; Myher & Kuksis, 1995]). Wie bereits erwähnt, ist eine direkte gaschromatographische Messung aufgrund der Polarität der Verbindungen schwierig, allerdings wurden schon Analysen mit underivatisierten Fettsäuren durchgeführt (Vicanová et al., 1994). Durch die Kopplung mit einem Massenspektrometer (MS, MS-MS) können darüber hinaus weitere wertvolle Informationen zur Identifizierung molekularer Lipidspezies sowie zur Charakterisierung neu entdeckter Komponenten gewonnen werden.

Über die Hochleistungsflüssigchromatographie (engl. *High Pressure Liquid Chromatography*- HPLC) können underivatisierte Fettsäuren oder deren Methylester erfasst werden. Häufig sind zahlreiche UV-Chromophore und Fluorophore enthalten, die eine Detektion über die optischen Eigenschaften der Verbindungen ermöglichen (Gutnikov, 1995). Nicht-chromogene Verbindungen können z. B. über Flammenionisationsdetektoren oder Massenspektrometer erfasst werden. Normalphasen (engl. *Normal Phase*- NP) werden bei der HPLC meist aufgrund langer Äquilibrierungszeiten und der geringfügigen Auflösung molekularer Spezies lediglich für eine Lipidklassentrennung verwendet (Myher & Kuksis, 1995). Für die Anwendung von Umkehrphasen (engl. *Reversed Phase*- RP) im Bereich der Lipidanalytik existieren zahlreiche Veröffentlichungen. So gibt es unterschiedliche Verfahren, die eine effektive Auflösung der molekularen Spezies neutraler Glycerolipide in Verbindung mit einer UV-Detektion beschreiben (z. B. Shukla & Spener, 1985). Darüber hinaus sind Anwendungen mit modifizierten Normalphasen (z. B. Silberionenmodifikation von Silikagel) oder chiralen Phasen bekannt (Myher & Kuksis, 1995).

Die Auftrennung eines komplexen Lipidgemisches in die einzelnen Lipidklassen über TLC vor einer HPLC-Analyse kann von Vorteil sein, um potentielle Überlagerungen von Verbindungen unterschiedlicher homologer Reihen zu vermeiden. Die Kombination von Dünnschichtchromatographie und GC (TLC/FID) zählt zu den ältesten Techniken zur Verbesserung der Identifizierung und Quantifizierung in der Lipidanalytik. Hierbei können sowohl die TLC-Banden als auch die Peaks der GC-Chromatogramme zur Identifizierung beitragen (Myher & Kuksis, 1995).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Zur Charakterisierung der in Meerwasser gelösten Lipidverbindungen soll eine Festphasenextraktionsmethode entwickelt werden, die eine effiziente Anreicherung der Komponenten ermöglicht. Hierfür werden unterschiedliche Sorbensmaterialien mit verschiedenen Wechselwirkungsmechanismen getestet und verglichen, um maximale Wiederfindungen für die Extraktion zu erzielen. Die resultierende Methode soll durch eine einfache Handhabung und einen geringen Zeitverbrauch gekennzeichnet sein und somit eine einfache Anwendung zur Probenahme auf Expeditionen ermöglichen. Des Weiteren soll ein Vergleich mit dem in der Lipidanalytik parallel verwendeten Verfahren der Flüssig-Flüssig-Extraktion erstellt werden.

Im ersten Teil der Arbeit wird unter Verwendung von Standardsubstanzen die Verfügbarkeit ausgewählter Lipidverbindungen verschiedener Polaritäten in der wässrigen Phase bestimmt. Des Weiteren muss die optimale Detektionsmöglichkeit zur Identifizierung der Analyten gefunden werden, um die Voraussetzung für eine eindeutige Quantifizierung zu schaffen.

Die so erhaltenen Erkenntnisse sollen im zweiten Teil zur Ermittlung der Adsorptionseigenschaften verschiedener SPE-Kartuschen bzw. Sorbenzien genutzt werden. Diese Untersuchungen werden zunächst mit einem Lipidstandardgemisch durchgeführt und sollen für die Extraktion von Lipiden aus Meerwasser weiterentwickelt werden. Aus diesen Analysen soll das geeignetste Sorbens zur Anreicherung gefunden und eine Methode zur Bestimmung von Lipiden aus Meerwasser entworfen werden.

2 Material und Methoden

Für die Laborarbeiten wurden ausschließlich Glasmaterialien verwendet, die nach einer Grobreinigung zunächst für 24 h in Deconex[®] 11 Universal (Applichem, Darmstadt) und danach für 24 h in Reinstwasser (Milli-Q[®]) gelagert wurden. Anschließend wurden die Glasgeräte mindestens 4 h im Trockenschrank bei 120 °C getrocknet; Zentrifugen- und Probenröhrchen wurden zusätzlich für 6 h bei 550 °C gegläht (Muffelofen M110, Heraeus Instruments [Hanau]). Um Kontaminationen durch z. B. Weichmacher (Phthalsäureester) zu vermeiden, wurde darauf geachtet, ausschließlich Geräte und Verbrauchsmaterialien mit Glas-, Metall- und Teflonoberflächen zu benutzen. Ausnahmen hiervon sind im Folgenden kenntlich gemacht.

Für die Herstellung von wässrigen Lösungen und Blindproben wurde Reinstwasser verwendet (Leitfähigkeit: 18,2- 18,5 MΩ, gesamter organischer Kohlenstoff [TOC]: < 10 ppb, 25 °C; Milli-Q Plus 185[®], Millipore, Merck [Darmstadt]).

Zur Bestimmung der Wiederfindungen wurden SPE-Versuche mit einem Lipidstandardgemisch, bestehend aus 6 Verbindungen verschiedener Lipidklassen (im Folgenden abgekürzt durch 6STD [Tab. 14], Standardkonzentration 50 µg/L je Standardlipid), durchgeführt und anschließend mit den Ergebnissen der Flüssig-Flüssig-Extraktion verglichen. Diese Lipidverbindungen wurden ausgewählt, um einen möglichst großen Polaritätsbereich in Meerwasser vorkommender Lipide abzudecken.

2.1 Reinheitsprüfung zur Extraktion verwendeter Lösungsmittel

Zur Überprüfung der Reinheit wurden jeweils 50 mL Aceton, Chloroform, Dichlormethan (DCM), Ethylacetat, Methanol (MeOH) und n-Hexan in einen Spitzkolben gegeben und durch Rotationsverdampfung (**Anhang B1**) eingengt (Herstellerdaten der Lösungsmittel **Anhang A1**). Der Rückstand wurde anschließend sowohl in je 0,05 mL n-Hexan als auch in Chloroform aufgenommen (ausgenommen Aceton und n-Hexan), gaschromatographisch analysiert (Ermittlung der Gesamtpeakflächen) und mit dem internen Standard quantifiziert (23:0 [Tricosäuremethylester], Endkonzentration 500 ng; jeweils Doppelbestimmung).

Die verwendeten Glasmaterialien wurden vor Benutzung jeweils 3-fach mit Aceton und n-Hexan gespült.

Die analysierten Lösungsmittel (LM) wurden bei ausreichender Reinheit für alle nachfolgenden Festphasenextraktionsversuche eingesetzt (**Anhang C1**).

2.2 Lösungsvermögen ausgewählter Standardlipide in Reinstwasser

Zur Bestimmung der Löslichkeit der ausgewählten Standardlipide in Wasser wurden die in Chloroform vorliegenden Verbindungen (**Tab. 3**) in je 1 L Glasflaschen (Duran[®], Schott [Mainz]) überführt und nach Verdampfung des LM im Stickstoffstrom in je 1 L Reinstwasser gelöst (Endkonzentration je 0,5 mg/L).

Tabelle 3. Lipidverbindungen verschiedener Polaritäten zur Bestimmung des Lösungsvermögens in Reinstwasser.

Rot: neutrale Lipide, Blau: polare Lipide

Bezeichnung	Hersteller
Cholesterol	Larodan (Malmö, Schweden)
Lauryllaurat	Larodan
L-a-Phosphatidylcholin	Larodan
Squalan	Larodan

Es wurden 4 Ansätze unterschiedlichen Temperaturen und mechanischen Bedingungen (mit/ohne Ultraschallbehandlung) ausgesetzt, um die optimalen Konditionen für das Lösen der Lipidverbindungen zu ermitteln (**Tab. 4**). Die Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) der Lösungen, welche die Verfügbarkeit der Lipide in der wässrigen Phase widerspiegeln sollte, wurde direkt nach dem Ansetzen (0 min) sowie nach 10 min, 30 min, 1 h, 2 h und 4 h mit Hilfe eines TOC-Analyzers (**Anhang B15**) bestimmt. Des Weiteren wurden alle Ansätze anschließend für 1 h mit Ultraschall (Raumtemperatur, 82 W) behandelt und erneut vermessen. Vor den Messungen erfolgte eine starke Durchmischung der Lösungen durch kräftiges Schütteln.

Tabelle 4. Behandlungsbedingungen der Standardlösungen zur Bestimmung des Lösungsvermögens in Reinstwasser

Probenbezeichnung	Temperatur	Ultraschallbehandlung	Sonstiges
RT	Raumtemperatur	-	-
RT_US	Raumtemperatur	+	Inkubation im Ultraschallbad für 5 min bei jedem Messpunkt
65 °C	65 °C	-	Inkubation im Wasserbad
65 °C_US	65 °C	+	Inkubation im Wasserbad; Inkubation im Ultraschallbad für 5 min bei jedem Messpunkt

Um Informationen über die Dauer des Verbleibes der im Wasser gelösten Standardlipide zu erhalten, wurde eine 1 L Lösung (6STD) mit Reinstwasser hergestellt und für 30 min mit Ultraschall (82 W) behandelt. Für diesen Versuch wurde die Zusammensetzung des Lipidstandards um einen weiteren Wachsester (AB) und ein Triacylglycerol (TAS) ergänzt (=6STD), um Informationen über die Löslichkeit einer großen Bandbreite von Lipidkomponenten zu erhalten. 200 mL der Standardlösung (t=0) wurden für 10 min mit 50 mL DCM extrahiert (**2.4**). Der Extrakt wurde anschließend verestert, silyliert und über GC-MS analysiert (**Abb. 4+5**). Nach jeweils 1 h wurden über einen Zeitraum von 4 h (t= 0-4) je 200 mL des Ansatzes entnommen und wie beschrieben verfahren. Die Quantifizierung erfolgte über einen silylierten Standard (6STD).

Um die an der Glaswand der Probenflasche adsorbierten Lipide zu erfassen, wurde diese nach 24-stündiger Trocknung mit 15 mL DCM gespült. Der Extrakt wurde ebenfalls verestert, silyliert und gaschromatographisch analysiert (EV 0,1 mL, IV 1 µL).

2.3 Gaschromatographische Trennung der Derivate ausgewählter Standardlipide

Zur Identifizierung von Lipidverbindungen, die als gelöste Bestandteile des DOC im Meerwasser vorkommen, wurden die entsprechenden Lipide (**Tab. 5**) mittels Standardsubstanzen gaschromatographisch analysiert.

Um die eingesetzten Standardlipide in eine für die Gaschromatographie geeignete Form zu überführen, wurden sie zu Fettsäuremethylestern (FAME) derivatisiert, diese extrahiert und gaschromatographisch untersucht (Angaben zum GC **Anhänge B4+B5, Abb. 7**). Sterole (Cholesterol) wurden nach erfolgter Veresterung mit MSTFA silyliert und mittels GC-MS detektiert (Angaben zum GC-MS **Anhänge B6-B9, Abb. 7**).

Tabelle 5. Gaschromatographisch getrennte Standardlipide (Kategorisierung nach Fahy et al., 2009). Rot: neutrale Lipide, Blau: polare Lipide

Lipidbezeichnung	Lipidkategorie	Detektierte Derivate	Hersteller
Arachidylbehenat	Fettsäureverbindungen (Wachsester)	Behensäuremethylester Icosanol	Larodan
Cholesterol	Sterole	Trimethylsilyl-Cholesterol	Larodan
Lauryllaurat	Fettsäureverbindungen (Wachsester)	Laurinsäuremethylester Dodecanol	Larodan
L-a- Phosphatidylcholin	Glycerophospholipide	Palmitinsäuremethylester Stearinsäuremethylester Oleinsäuremethylester/Elaidinsäuremethylester Linolsäuremethylester	Larodan
Triarachinsäure	Glycerolipide (Triacylglycerol)	Icosansäuremethylester	Larodan

Um die optimale Umesterungszeit zu bestimmen, wurden die zur Festphasenextraktion eingesetzten Standardlipide (6STD, außer Squalan, da nicht derivatisierbar) in Doppelbestimmung mit unterschiedlicher Dauer verestert (zwischen 0,5 und 8 h, **Abb. 4**). und über den internen Standard quantifiziert.

5 μL Stammlösung Standardlipid (c= 20 mg/mL) + 50 μL interner Standard (23:0, c= 1 mg/mL)

Verdampfung des Lösungsmittels

Lösen des Rückstands in 250 μL n-Hexan

Zugabe von 1 mL Derivatisierungsreagenz

Derivatisierung bei 80 °C

Zugabe von 4 mL Milli-Q und 2 mL n-Hexan

Abnahme der organischen Phase

Wiederholung

Zugabe von 2 mL n-Hexan zur veresterten Probe

Abnahme der organischen Phase

Verdampfung der organischen Phase und Aufnahme in 1 mL n-Hexan

Gaschromatographische Trennung

- Endkonzentration je Standardlipid 100 μg , interner Standard 50 μg

- im Zentrifugenröhrchen im Stickstoffstrom unter Wärmezufuhr

- 3 % konz. Schwefelsäure in Methanol (säurekatalysierte Derivatisierung)

- 0,5- 8 h im Metallblockthermostat

- Flüssig-Flüssig-Extraktion der FAME

- Flüssig-Flüssig-Extraktion der FAME

- im Stickstoffstrom unter Wärmezufuhr

- EV 1 mL, IV 1 μL

Abbildung 4. Fließschema der Derivatisierung der Standardlipide zu FAME.

Cholesterol wurde zusätzlich mittels des Derivatisierungsreagenzes MSTFA (N-Methyl-N-Trimethylsilyltrifluor(o)acetamid) silyliert und über GC-MS detektiert.

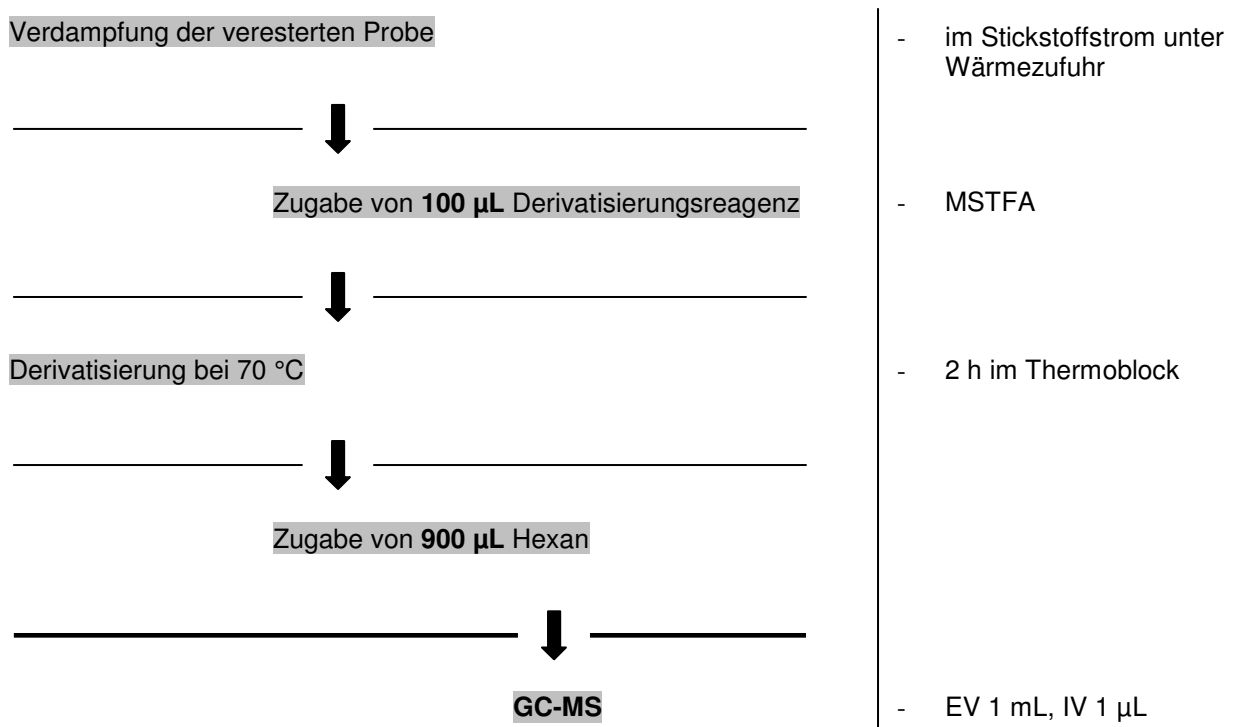


Abbildung 5. Fließschema der Silylierung der veresterten Proben.

Bei den Wachsestern, die sich aus Alkoholen und Fettsäuren zusammensetzen sowie den verschiedenen Fettsäuren des PC wurden die Konzentrationen durch Addition der einzelnen Komponenten ermittelt. Zur Quantifizierung des Phosphatidylcholins wurden die als Hauptbestandteile identifizierten Fettsäuren 16:0, 18:0, 18:1 (n-9) und 18:2 (n-6) verwendet (Anteile je über 12 %).

Daraus resultierend wurde für die weitere Fettsäureanalytik für 4 h bei 80 °C derivatisiert (**Abb. 6**).

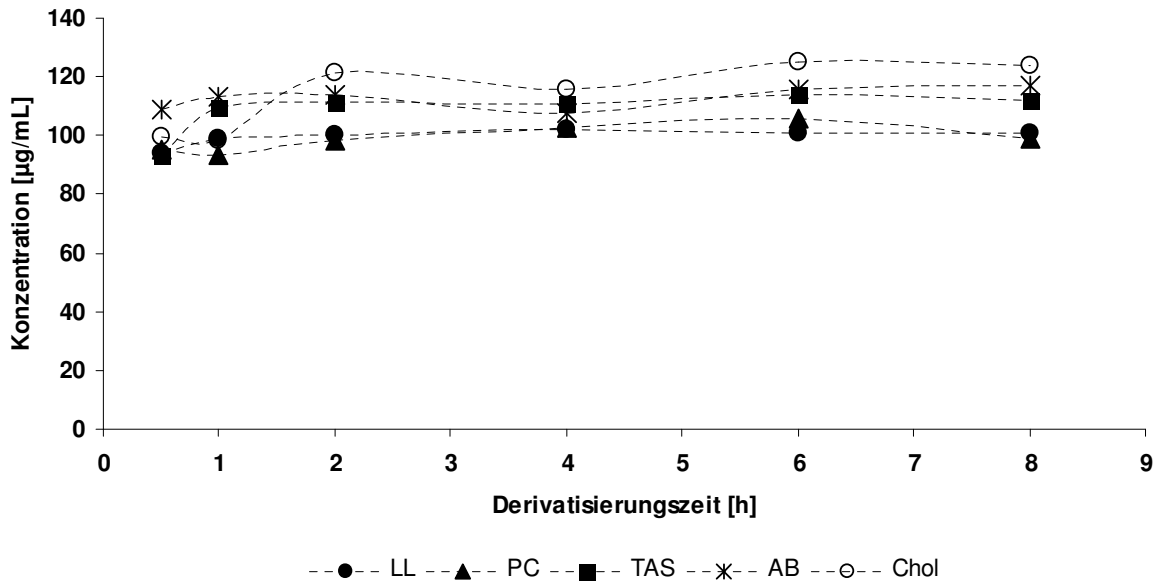


Abbildung 6. Konzentrationen der FAME der veresterbaren Standardlipide sowie des Cholesterols in Abhängigkeit der Derivatisierungszeit.

Aus den genannten Standardlipiden sowie der aliphatischen Kohlenstoffverbindung Squalan (Larodan) wurde eine Stammlösung hergestellt (Endkonzentration 0,5 mg/mL je Standardlipid). Zur Bestimmung der Retentionszeiten über GC-MS wurden 100 µL dieses Ansatzes für 4 h derivatisiert (Endkonzentration 50 µg je Standardlipid = 6STD). Um den Einfluss der Silylierung auf die FAME festzustellen, wurde ein weiterer Ansatz nach erfolgter Veresterung für 2 h silyliert und über GC-MS analysiert.

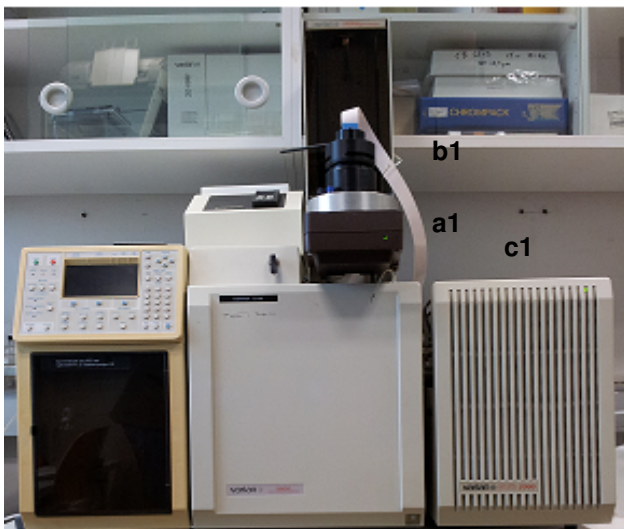


Abbildung 7. GC-MS 3800 Varian (links) und GC 6890 N Network Agilent Technologies (rechts).
 a1: Autosampler 8200 CX, b1: Probeninjektor 1079, c1: Detektor MS Saturn 2000.
 a2: Autosampler 7683 Series, b2: Probeninjektor 7638 Series.

2.4 Flüssig-Flüssig-Extraktion (FFE) der wässrigen Lipidlösungen

Die von den Sorbenzien der SPE-Kartuschen nicht adsorbierten Standardlipide wurden mittels FFE aus dem über die Kartusche geleiteten Wasser (=Permeatwasser) bestimmt. Um hierfür ein geeignetes Extraktionsmittel zu finden, wurden wässrige Lösungen (6STD in 1 L Reinstwasser) über eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit n-Hexan und DCM beprobt. Die Lösungen wurden zunächst für 30 min mit Ultraschall behandelt und schließlich für 30 min mit jeweils 50 mL n-Hexan bzw. DCM in einem 2 L Scheidetrichter (Duran[®], Schott) ausgeschüttelt. Nach Überführung der organischen Phase in einen Spitzkolben wurde ein 2. Extraktionsschritt mit ebenfalls je 50 mL Lösungsmittel für 10 min durchgeführt. Die vereinigten Extrakte wurden mittels Rotationsverdampfung eingeengt. Danach erfolgten eine 4-stündige Derivatisierung sowie eine 2-stündige Silylierung der Extrakte. Die Fettsäuremethylester und Trimethylsilylether wurden anschließend auf 1 mL eingeengt und 1 µL hiervon über GC-MS untersucht. Die Quantifizierung der Lipidkomponenten erfolgte über das gleiche Lipidstandardgemisch, das direkt methyliert sowie silyliert und über GC-MS analysiert wurde.

Des Weiteren sollte ein Vergleich der Extraktionseffizienzen der Flüssig-Flüssig-Extraktion gegenüber der Festphasenextraktion für Meerwasser durchgeführt werden.

Hierfür wurde 1 L einer natürlichen Meerwasserprobe nach Addition von 6STD mit DCM, wie beschrieben, extrahiert. Aus den Vorversuchen wurde ersichtlich, dass sich DCM zur Extraktion der Lipidverbindungen besser eignet als n-Hexan. Aus diesem Grund wurde DCM für alle durchgeführten FFE-Versuche verwendet. Der Extrakt wurde vor der Derivatisierung über HPLC (EV 0,05 mL, IV 4 µL) sowie nach Veresterung und Silylierung über GC-MS analysiert (beides EV 0,1 mL, IV 1 µL). Die Probenflasche wurde nach mind. 24 h Trocknung mit 15 mL DCM gespült, um die an der Glaswand adsorbierten Lipide zu erfassen. Der Extrakt wurde derivatisiert und über GC-MS analysiert (EV 0,1 mL, IV 1 µL).

2.5 Festphasenextraktion (SPE) der Standardlipide

Für die Bestimmung der Adsorptionscharakteristika der ausgewählten Sorbenzien wurden die zuvor beschriebenen wässrigen Lösungen der Standardlipide (6STD) eingesetzt und mit Hilfe eines speziellen Extraktionssystems über die SPE-Kartuschen geleitet. Dieses wurde ebenfalls zur Extraktion der Meerwasserproben verwendet.

Das Extraktionssystem (**Abb. 8**) bestand aus einer SPE-Halterung (Supelco Visiprep[™]) mit angeschlossener Peristaltikpumpe, über die die Proben durch die SPE-Kartuschen gesaugt wurden. Über Teflonschläuche wurde eine direkte Verbindung zwischen den in den 1 L Glasflaschen (= Probenflaschen) befindlichen Probenlösungen (Reinstwasser/Lipidstandardgemisch, natürliche Meerwasserprobe/Lipidstandardgemisch sowie natürliches Meerwasser ohne Zusatz) und den Kartuschen hergestellt. Die Teflonschläuche und -adapter wurden vor jeder Benutzung mit n-Hexan, Aceton und Reinstwasser gespült. Zur Extraktion wurde eine konstante Fließgeschwindigkeit zwischen 3 und 3,5 mL/min eingestellt. Das über die Kartuschen gelaufene Probenwasser (= Permeatwasser) wurde in 1 L Glasflaschen (= Permeatflaschen) aufgefangen. Die hierfür verwendeten

Silikonschläuche wurden vor jeder Benutzung mehrfach mit salzsäurehaltigem Reinstwasser (32 %, Suprapur[®], Merck) und Reinstwasser gespült.

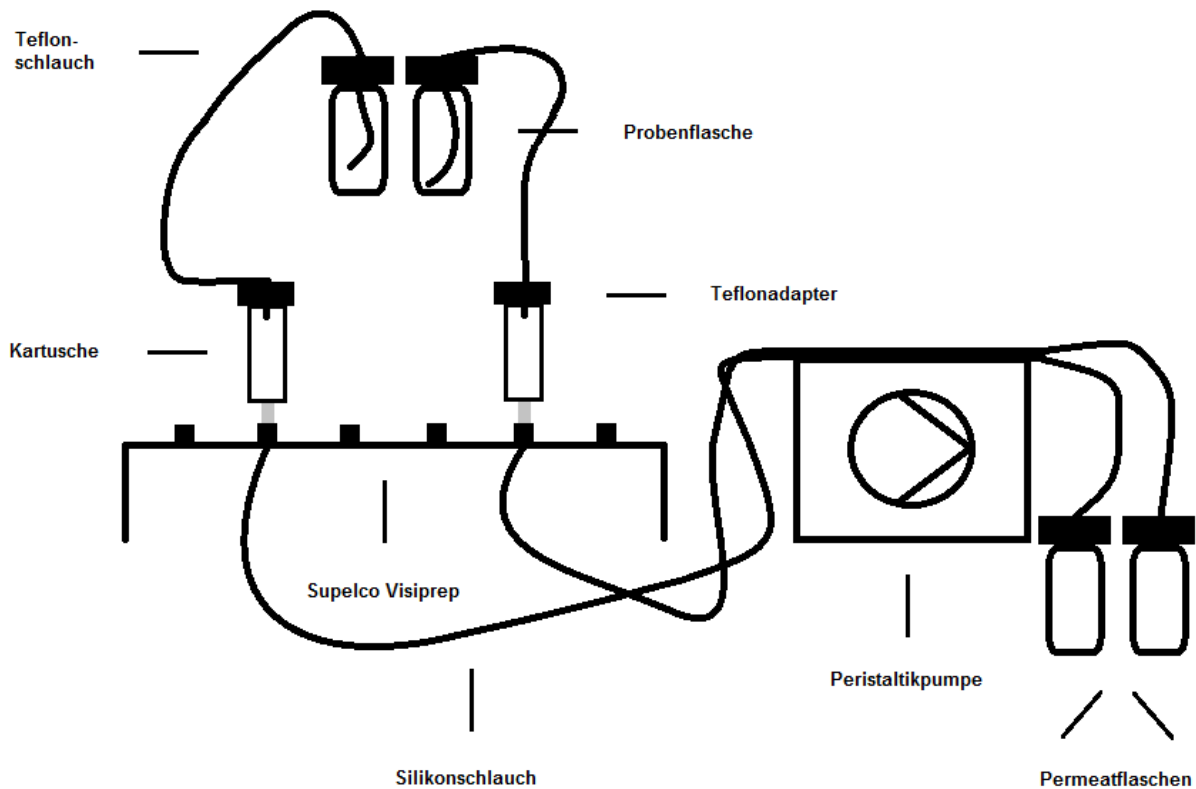


Abbildung 8. Schematischer Aufbau des Festphasenextraktionssystems.

Die folgenden kommerziell erhältlichen, gepackten SPE-Kartuschen mit Polypropylensäulen (Agilent Technologies [Santa Clara, USA]; Säulenvolumen: 3 mL, Sorbensmasse: 200 mg) sowie losen Sorbenzien (Agilent Technologies) zum Packen von Leersäulen aus Glas (Säulenvolumen: 3 mL, in Kombination mit Glasfaserfilterelementen, Chromabond [Machery-Nagel, Düren]) wurden verwendet:

Tabelle 6. Kommerziell erhältliche Kunststoffkartuschen sowie Sorbenzien für manuell gepackte Glassäulen und deren Spezifika

Bezeichnung Kartusche	Spezifische Partikeloberfläche [m ² /g]	Partikelgröße [µm]	Porengröße [Å]
Bond Elut C ₈	500	40, 120	60
Bond Elut PPL	600	125	150
Bezeichnung Sorbens			
Bondesil-C ₈	500	40, 120	60
Bondesil-C ₁₈	500	40, 120	60
Bondesil-PPL	600	125	150
Bondesil-NH ₂	500	40, 120	60

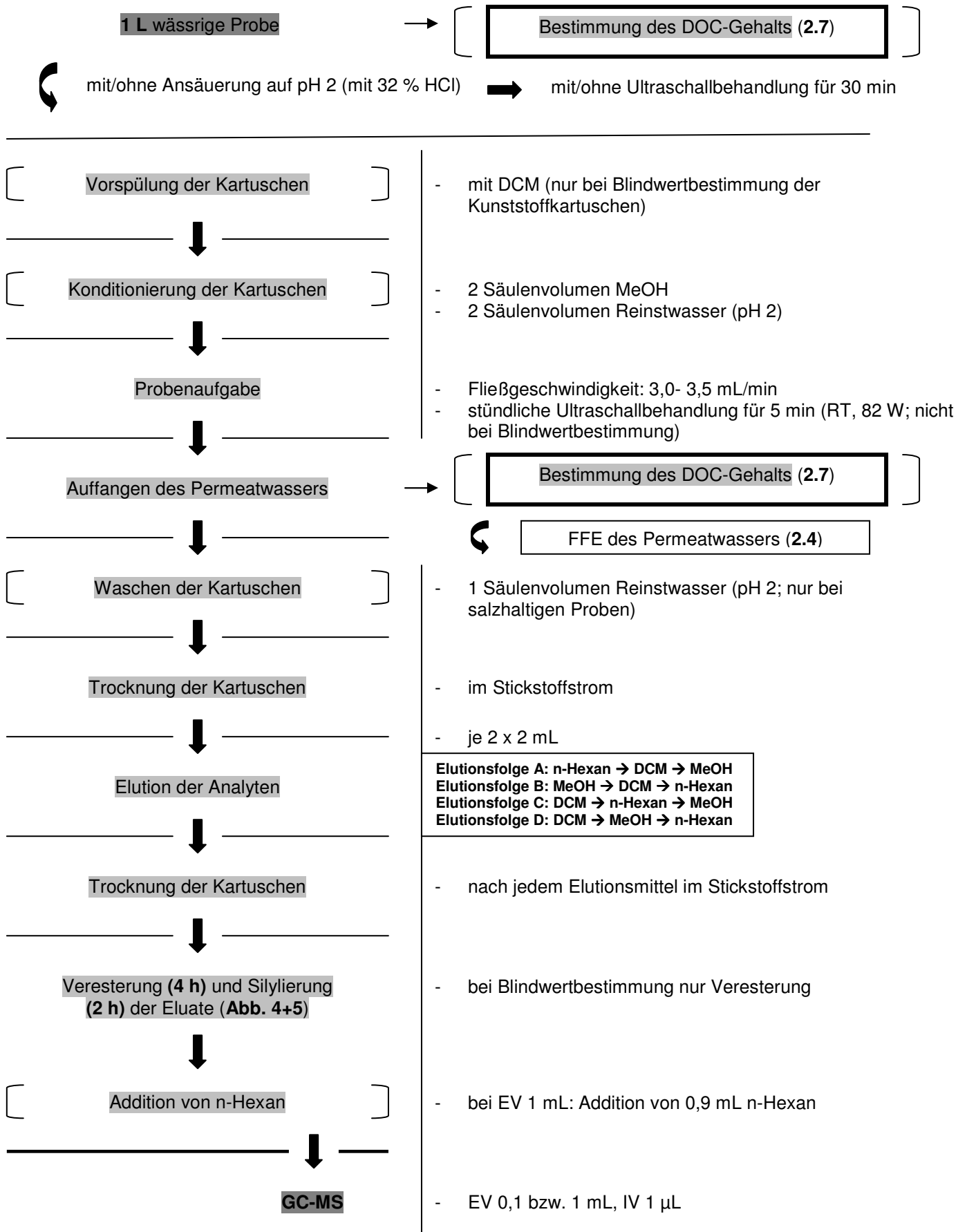


Abbildung 9. Fließschema der Festphasenextraktion mit anschließender Detektion der Analyten.

Um die an den Wänden der Probenflaschen verbliebenen Lipidkomponenten zu analysieren, wurde folgendermaßen verfahren:

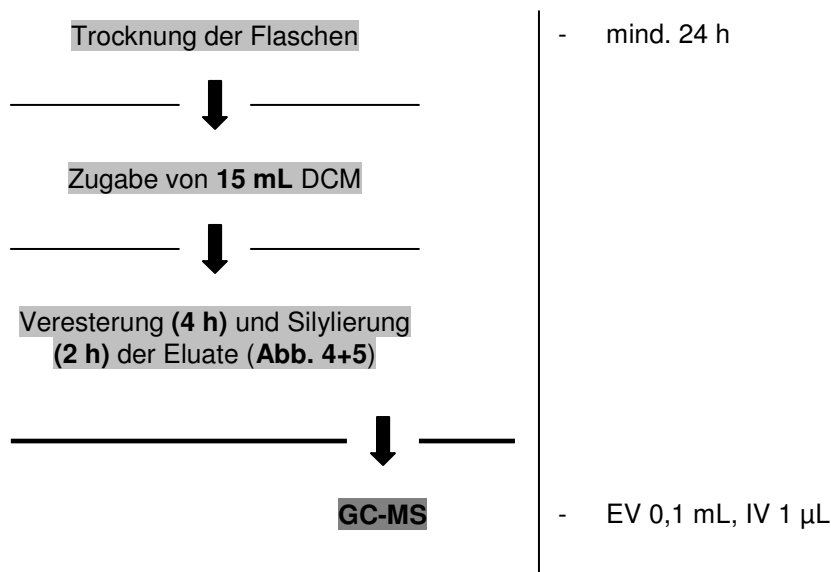


Abbildung 10. Fließschema der Beprobung auf adsorbierte Lipidverbindungen.

2.5.1 Blindwertbestimmung der Kunststoffkartusche C₈ (Bond Elut)

Zur Reinheitsprüfung der kommerziell erhältlichen Kunststoffkartusche Bond Elut C₈ wurden LM unterschiedlicher Polaritäten verwendet. Hierfür wurden die Kartuschen mit und ohne Konditionierung getestet (Konditionierung: 2 Säulenvolumen MeOH und 2 Säulenvolumen Reinstwasser, pH 2). Die Elution wurde aufeinanderfolgend mit jeweils 6 mL n-Hexan, DCM und MeOH durchgeführt (Elutionsfolge A). Die Extrakte wurden 4 h verestert und in 0,1 mL Endvolumen gaschromatographisch untersucht (IV je 1 µL). Die Quantifizierung der Gesamtverunreinigungen (Summe der Peakflächen) erfolgte über den internen Standard (Endkonzentration 500 ng).

Die Lösungsmitteleluat zeigen starke Verunreinigungen. Um die Kartuschen vorzureinigen, wurden Vorspülschritte mit 3, 6 und 9 mL DCM durchgeführt. Nach der Konditionierung der hierfür verwendeten Kartuschen erfolgte die Elution aufeinanderfolgend mit je 6 mL n-Hexan, DCM und MeOH. Die mit 3 mL vorgespülte Kartusche wurde im Anschluss erneut mit MeOH, n-Hexan und DCM eluiert (in dieser Reihenfolge). Die Eluate wurden nach der Veresterung ebenfalls gaschromatographisch untersucht und die Gesamtkontaminationen quantifiziert.

2.5.2 Aufreinigung der Kartuschenbestandteile

Aufgrund starker Kontaminationen der Eluate der Blindwertüberprüfung (2.5.1) wurden die einzelnen Komponenten der kommerziell erhältlichen SPE-Kartuschen (Polypropylensäule, SPE-Fritten [obere, untere], Sorbens [PPL, C₈, Bond Elut: je 200 mg]) sowie die losen Sorbenzien (C₈, C₁₈, PPL, NH₂ [Bondesil]: je 200 mg) und Glasfaserfritten näher untersucht. Die Säulenbestandteile wurden einzeln für mind. 12 h in n-Hexan und MeOH gelagert (Säule: 3 mL [= 1 Säulenvolumen], Fritte: 6 mL,

Sorbens: 6 mL) und anschließend gaschromatographisch analysiert (EV 0,1 mL, IV 1 μ L). Die Quantifizierung der Verunreinigungen erfolgte über den internen Standard (Endkonzentration 500 ng).

Die losen Sorbens- und Frittenmaterialien wurden über eine Soxhlet-Apparatur gereinigt. Hierfür wurden je 200 mL n-Hexan als Extraktionsmittel verwendet. Der Extraktionsvorgang wurde jeweils für mind. 6 h bzw. über Nacht betrieben.

Nach Beendigung der Extraktion wurden 20 mL des Extraktionsmittels mit 500 ng des internen Standards versetzt und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt (50 °C, 670 mbar). Der Rückstand wurde in 1 mL n-Hexan aufgenommen und 1 μ L hiervon gaschromatographisch analysiert.

Die gereinigten Materialien wurden im Trockenschrank bei 70 °C für 3 h getrocknet. Danach erfolgte die erneute Reinheitsüberprüfung von je 200 mg Sorbens (1 Kartuschenfüllung) und eines Frittenpaares durch die Lagerung in je 6 mL n-Hexan sowie in 6 mL MeOH über Nacht. Zur gaschromatographischen Quantifizierung wurden 500 ng des internen Standards addiert (EV 0,1 mL, IV 1 μ L).

Für die SPE-Experimente mit dem in Wasser gelösten Lipidstandardgemisch und der natürlichen Meerwasserprobe wurden die durch n-Hexan aufgereinigten Sorbenzien C₈, C₁₈, PPL und NH₂ (Bondesil) sowie die Glasfaserfritten verwendet. Diese Materialien wurden in Glaskartuschen gepackt, die keine Verunreinigungen aufwiesen und direkt verwendet werden konnten. Die Kunststoffkartuschen wurden aufgrund der Freisetzung hoher Konzentrationen materialeigener Verunreinigungen im Folgenden nicht benutzt.

2.5.3 Extraktionseffizienzen der C₁₈- und NH₂-Sorbenzien (Bondesil)

Die im Folgenden verwendeten Glaskartuschen wurden mit einem über Soxhlet-Extraktion gereinigten Frittenpaar (obere, untere Fritte) sowie je 200 mg gereinigtem Sorbens (Bondesil) bestückt. Alle Standardlösungen wurden vor der Festphasenextraktion für 30 min sowie während der SPE-Versuche stündlich für jeweils 5 min im Ultraschallbad behandelt (Raumtemperatur, 82 W). Die derivatisierten Lösungsmitteleluat wurden auf ein Endvolumen von 0,1 mL eingengt und je 1 μ L hiervon über GC-MS analysiert.

Zunächst wurden Blindwertbestimmungen einer konditionierten und einer unkonditionierten C₁₈-Glaskartusche mit jeweils 2 x 2 mL n-Hexan, DCM und MeOH (Elutionsfolge A) durchgeführt. Es resultierten 6 Eluate, die nach Zugabe des internen Standards (Endkonzentration 500 ng) hinsichtlich der Gesamtkontaminationen gaschromatographisch quantifiziert wurden.

Des Weiteren erfolgten Blindwertuntersuchungen nach der Extraktion von je 1 L Reinstwasser auf einer konditionierten sowie einer unkonditionierten C₁₈-Kartusche. Die Kartuschen wurden mit je 2 x 2 mL LM in der oben angegebenen Elutionsfolge A eluiert. Die Eluate wurden nach Zugabe des internen Standards (Endkonzentration 500 ng) gaschromatographisch analysiert und die Gesamtverunreinigungen quantifiziert.

Zur Charakterisierung des Adsorptionsverhaltens der Lipidverbindungen auf dem C₁₈-Sorbens wurde je 1 L Reinstwasser mit 6STD versetzt und über konditionierte C₁₈-Säulen extrahiert. Nach Trocknung der Kartuschen wurden Extraktionen mit 2 unterschiedlichen Lösungsmittelreihenfolgen durchgeführt. Hierfür wurden die Kartuschen mit je 2 x 2 mL n-Hexan, DCM und MeOH (Elutionsfolge A, zunehmende Polarität) sowie je 2 x 2 mL MeOH, DCM und n-Hexan (Elutionsfolge B, abnehmende Polarität) eluiert. Die Eluate wurden anschließend für 4 h verestert, silyliert und über GC-MS analysiert.

Das Extraktionsverhalten des NH₂-Sorbens wurde nach der Konditionierung mit gleichen Standardlösungen untersucht. Die Elutionsfolgen wurden jedoch geändert, um das geeignete LM zur Elution der angereicherten Verbindungen zu ermitteln: Elutionsfolge C beinhaltete die Elution mit je 2 x 2 mL DCM, n-Hexan und MeOH, während bei Elutionsfolge D nach DCM zunächst mit MeOH und abschließend mit n-Hexan eluiert wurde (je 2 x 2 mL).

Die SPE-Versuche der Standardlipide, wie oben beschrieben, wurden mit angesäuertem Wasser wiederholt. Hierfür wurde der pH-Wert auf ca. 2 eingestellt (32 %, Suprapur[®], Merck). Bei beiden Ansätzen wurde zunächst mit 2 x 2 mL DCM, anschließend mit 2 x 2 mL MeOH sowie mit 2 x 2 mL n-Hexan eluiert.

Um den Einfluss des Salzgehalts auf den Extraktionsvorgang zu ermitteln, wurden 35 g Natriumchlorid (Merck, 3 h geglüht bei 350 °C) in je 1 L wässriger Standardlösung (6STD) gelöst. Zur Entfernung des Salzes von der Kartusche wurde ein Waschschrift mit Reinstwasser (pH 2, 1 Säulenvolumen) vor der Elution der Analyten (Elutionsfolge D) eingefügt. Alle Ansätze wurden vor der Extraktion auf ca. pH 2 angesäuert.

2.5.4 Extraktionseffizienzen der C₈- und PPL-Sorbenzien (Bondesil)

Die manuell gepackten Glaskartuschen mit C₈- und PPL-Sorbens wurden sowohl mit als auch ohne Ansäuerung der Lipidlösungen (6STD) untersucht. Beide Kartuschentypen wurden ohne Ansäuerung der Standardlösungen mit den Elutionsfolgen C und D getestet. Außerdem wurden angesäuerte Lösungen extrahiert, deren adsorbierte Komponenten zunächst mit DCM, dann mit MeOH und schließlich mit n-Hexan (Elutionsfolge D) eluiert wurden.

2.6 Festphasenextraktion (SPE) natürlicher Meerwasserproben

Zur Extraktion von Meerwasser wurden SPE-Kartuschen mit unpolarem C₁₈-Sorbens verwendet, da dieses Material hohe Wiederfindungen bei der Anreicherung des Lipidstandardgemisches zeigte. Zur Analyse wurde je 1 L filtriertes Nordseewasser verwendet (mit Zusatz von 500 ng IST). Um den Einfluss der komplexen Matrix aus Meerwasser auf die Extraktionseffizienz zu analysieren, wurde zusätzlich mit 6STD angereichertes Meerwasser untersucht.

Die Wasserproben wurden nach der Filtration (GF-Filter: 0,7 µm) auf pH 2 angesäuert. Nach erfolgter Elution der Meerwasserfraktionen (Elutionsfolge D) wurden diese zunächst direkt über HPLC hinsichtlich ihrer Lipidklassenzusammensetzung untersucht (EV 0,1 mL, IV 4 µL). Nach Veresterung

sowie nach Silylierung der Proben wurden diese über GC-MS analysiert (beides EV 0,1 mL, IV 2 μ L). Die durch Flüssig-Flüssig-Extraktion des Permeatwassers sowie Spülen der Proben- und Permeatflaschen erhaltenen Fraktionen wurden auf gleiche Weise untersucht (HPLC underivatisierte Extrakte: EV 0,05 mL, IV 4 μ L; GC-MS: siehe oben).

Zur Bestimmung der Verunreinigungen, die durch die Derivatisierungsschritte eingetragen wurden, wurde der interne Standard (500 ng) nach erfolgter Veresterung und Silylierung über GC-MS analysiert (je EV 0,1 mL, IV 1 μ L).

Zur Identifizierung und Quantifizierung der im Meerwasser enthaltenen Lipide wurden das beschriebene Lipidstandardgemisch 6STD sowie ein kommerziell erhältlicher FAME-Standard eingesetzt (Supelco[®] 37 Component FAME Standard-Mix, **Anhang D2**). Die Sterole wurden mittels eines TMS (Trimethylsilyl)- Standards bestimmt (**Anhang D1**).

Der DOC-Gehalt der Meerwasserproben (mit/ohne Standardlipide) und des Permeatwassers wurde nach der Behandlung im Ultraschallbad (30 min) bestimmt (jeweils Doppelbestimmung).

Das folgende Fließschema stellt den kompletten Versuchsaufbau zur Festphasenextraktion einer natürlichen Meerwasserprobe dar, der die zuvor experimentell ermittelten Versuchsbedingungen berücksichtigt und integriert.

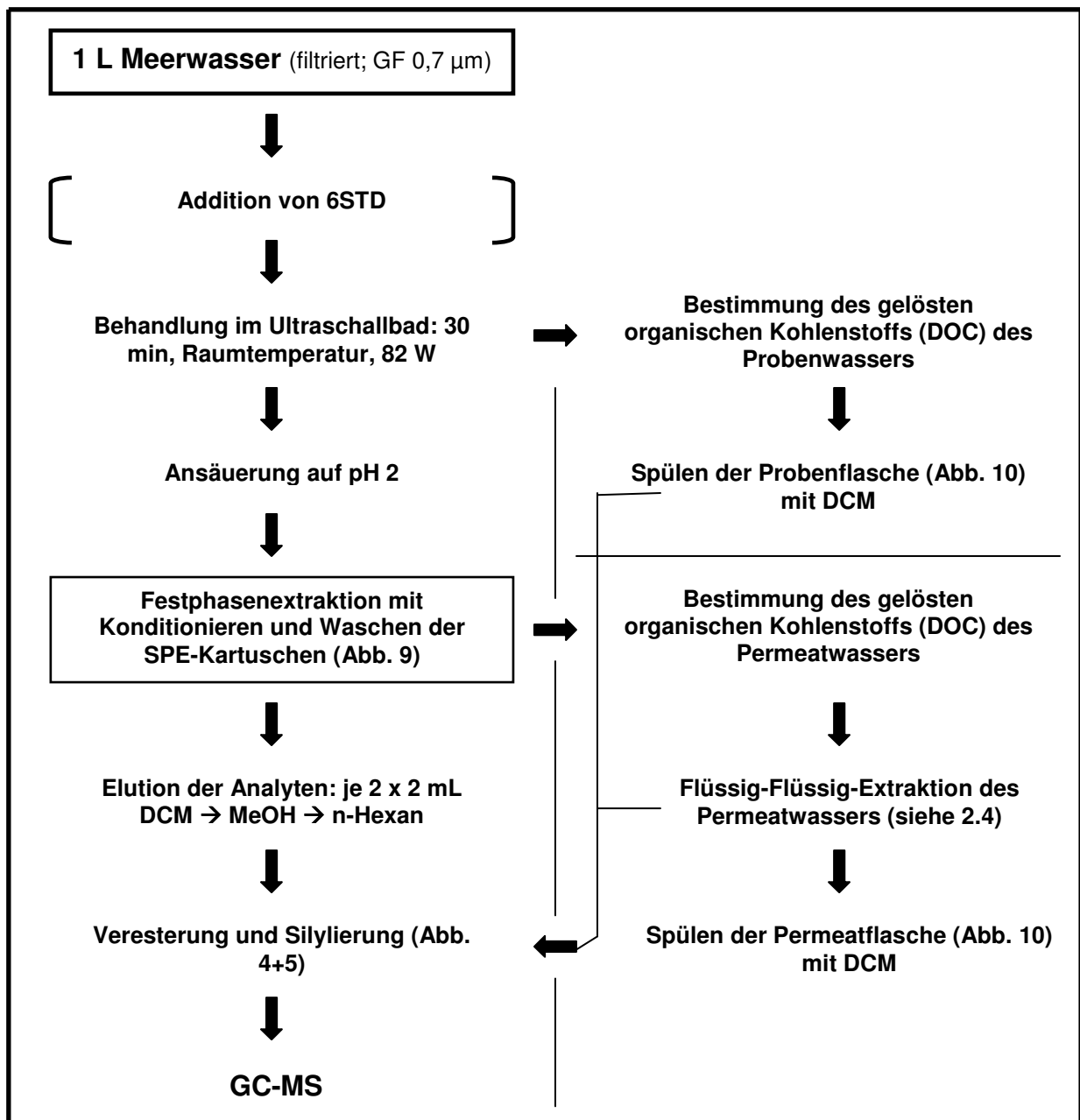


Abbildung 11. Fließschema aller Schritte des Festphasenextraktionsversuchs natürlicher Wasserproben.

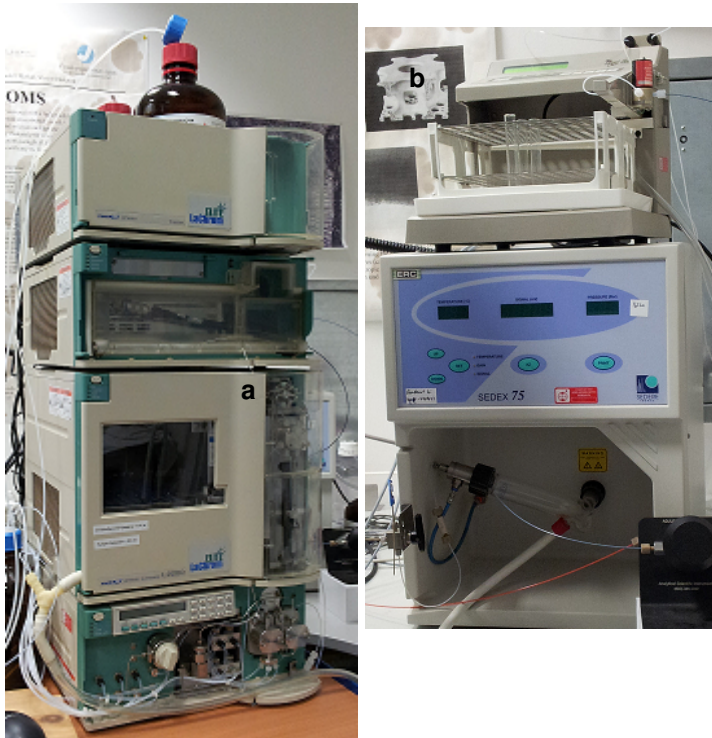


Abbildung 12. HPLC LaChrom Elite® VWR Hitachi.

a: Autosampler L-2200.

b: Detektor Sedex 75 (ELSD).

2.7 Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) von Meerwasserproben

Für die Ermittlung des in den aquatischen Proben gelösten organischen Kohlenstoffs vor und nach der SPE wurde eine Geräteeinheit der Firma Shimadzu mit einem Autosampler (93 Probenplätze) verwendet (**Anhang B15**). Hierbei werden die Kohlenstoffverbindungen in den Proben zu Kohlendioxid oxidiert (*high temperature catalytic oxidation*), welches über einen nicht-dispersiven Infrarotdetektor quantifiziert wird.

Die 9 mL Probengefäße wurden vor jeder Benutzung 5-fach mit Reinstwasser gespült.

Neben Reinstwasser kamen verschiedene Standardlösungen für eine laufende Qualitätskontrolle der Messwerte zum Einsatz. Der DSR-Standard ist kommerziell erhältlich, bei den Übrigen handelte es sich um eigens generierte Laborstandards.

Tabelle 7. DOC- und DON-Konzentrationen der Standardlösungen

Standard	Theor. DOC [$\mu\text{M C}$]	Theor. DON [$\mu\text{M N}$]
DSR (Deep Sea Reference, Batch 11)	41-44	31-33
STD	20	10
STD	160	50
STD	320	180

3 Ergebnisse und Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur Anreicherung gelöster Lipide aus Meerwasser über SPE-Kartuschen. Die Komponenten eines Lipidstandardgemisches (6STD) konnten erfolgreich in wässrige Lösung überführt und auf allen getesteten Sorbensmaterialien angereichert sowie eluiert und gaschromatographisch detektiert werden. Es gelang die Übertragung der Extraktionsparameter von dem Lipidstandardgemisch in Reinstwasser sowie künstlichem Seewasser auf eine Nordseewasserprobe. In dieser Meerwasserprobe konnten mittels GC-MS diverse Fettsäuren sowie Sterole identifiziert und größtenteils quantifiziert werden. Des Weiteren konnte eine Abschätzung der Effizienz dieses festphasenextraktionsbasierten Verfahrens gegenüber der konkurrierenden Flüssig-Flüssig-Extraktion erreicht werden.

3.1 Kontaminationsanalyse

Da für eine eindeutige Identifizierung und Quantifizierung der Analyten kontaminationsfreie Lösungsmittel sowie Arbeitsmaterialien essentiell sind, wurden diese zunächst hinsichtlich ihres Reinheitsgrades analysiert. Neben den für die Extraktionsschritte eingesetzten Lösungsmittel (**Anhang C1**) wurden die Kunststoffkartuschen (Bond Elut C₈, **3.1.1**), deren Einzelkomponenten (Bond Elut C₈, PPL; **3.1.3.1**) sowie die losen Sorbenzien und Glasfaserfritten (**3.1.3.2**) auf die Freisetzung chromatographiegängiger Substanzen und damit auf ihre Beeinflussung der Analytdetektion untersucht.

3.1.1 Blindwertbestimmung der Kunststoffkartusche C₈ (Bond Elut)

Um die Blindwerte des verwendeten SPE-Materials zu ermitteln, wurden konditionierte und unkonditionierte Kartuschen aufeinanderfolgend mit n-Hexan, DCM und MeOH eluiert (jeweils 6 mL). Die veresterten Extrakte wurden gaschromatographisch analysiert und über den internen Standard quantifiziert.

Die Gesamtkontaminationen der Lösungsmittelfractionen wurden aus der Summe der Peakflächen innerhalb des Retentionszeitfensters von der 10. bis zur 70. min berechnet. Die Summen der Verunreinigungen, die von der konditionierten und der unkonditionierten Kartusche eluiert wurden, waren annähernd gleich (**Abb. 13**). Die Konditionierung scheint eine Mobilisierung der durch die LM aus dem Kartuschenmaterial eluierbaren Substanzen hervorgerufen zu haben, die in einer früheren Elution der Verunreinigungen (in der 1. Fraktion, n-Hexan: Chromatogramm **Anhang C2**) resultierte. Bei der unkonditionierten Kartusche eluierte die größte Menge erst mit der 2. Lösungsmittelfraktion (DCM). Die Kontaminationskonzentrationen innerhalb der Methanolfractionen sind sowohl bei der konditionierten als auch bei der unkonditionierten Kartusche vergleichsweise niedrig. Dies könnte in einer geringeren Löslichkeit der von der Kartusche eluierbaren Substanzen in MeOH, im Vergleich zu den anderen LM, begründet liegen. Denkbar ist auch die Detektion von Komponenten im Methanolextrakt, die durch die vorangegangenen LM herausgelöst und lediglich in der Methanolfraction mitgetragen wurden. Eine weitere Erklärung des vergleichsweise geringen Verunreinigungsgrades der Methanoleluate kann in der vorangegangenen Elution mit n-Hexan und

DCM gefunden werden. Diese LM haben möglicherweise schon den Hauptteil der Verunreinigungen aus den Kartuschenmaterialien gelöst.

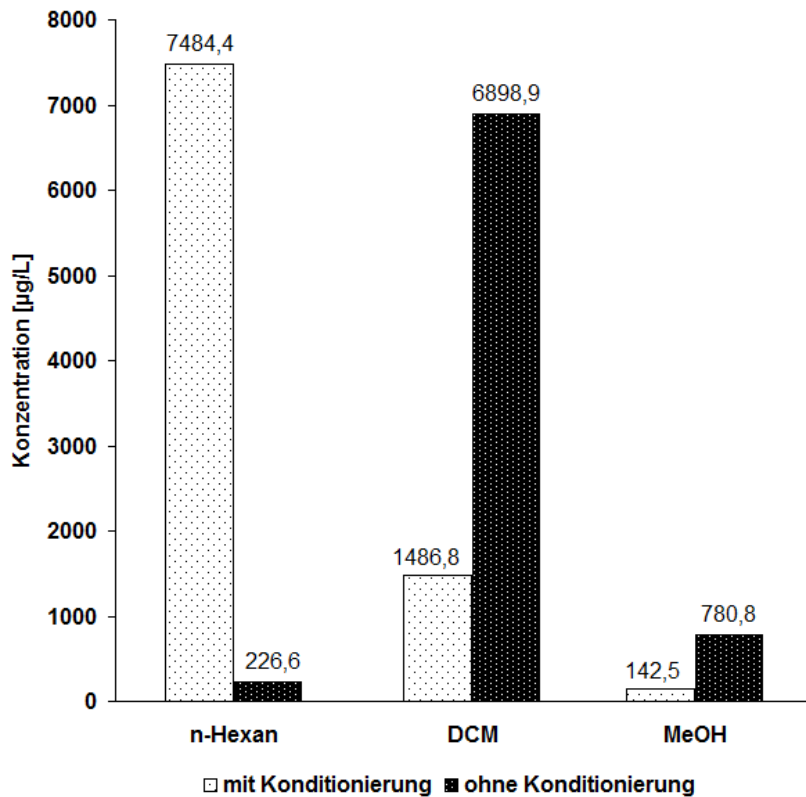


Abbildung 13. Konzentrationsverteilung der gaschromatographisch bestimmten Kontaminationen in den Lösungsmittelfractionen einer konditionierten und einer unkonditionierten C₈-Kunststoffkartusche (Bond Elut).

Aufgrund der Detektion starker Kontaminationen innerhalb der Blindwerte wurde ein als Vorreinigung gedachter Spülschritt mit DCM in den Ablauf der Festphasenextraktion integriert. Hierfür wurden 3 unkonditionierte SPE-Kartuschen zunächst mit 3, 6 und 9 mL DCM gespült.

Die ermittelten Gesamtkontaminationen in den Dichlormethanfraktionen lagen bei **1970,0 µg/L** (Vorspülen mit 3 mL DCM), **913,9 µg/L** (Vorspülen mit 6 mL DCM) und **1342,9 µg/L** (Vorspülen mit 9 mL DCM). Die Werte lagen deutlich unter jener Konzentration, die zuvor in der Dichlormethanfraktion der unkonditionierten Kartusche (ohne Vorspülung) bestimmt wurde (**Abb. 13**). Bei diesem Experiment wurde zuvor mit n-Hexan eluiert, was ein Anlösen der Verunreinigungen bedingt haben könnte, die schließlich mit DCM von der Kartusche getragen wurden.

Auf den Vorspülschritt folgte die Konditionierung der Kartuschen. Danach wurde mit jeweils 6 mL n-Hexan, DCM und MeOH eluiert (Gesamtkontaminationen **Anhang C3**). Auch hier dominierten die Verunreinigungen innerhalb der n-Hexan- und Dichlormethanfraktionen. Die dennoch niedrigeren Werte innerhalb dieser Extrakte könnten auf die Vorspülschritte zurückgeführt werden, mit denen bereits ein Großteil der eluierbaren Komponenten von den Kartuschen entfernt wurde.

Die mit 3 mL DCM gespülte Kartusche wurde zusätzlich zu den genannten Elutionsschritten (je 6 mL n-Hexan, DCM und MeOH) wiederholend mit diesen eluiert. Durch die erneute Elution mit 6 mL MeOH nach dem 1. Methanolelutionsschritt wurde ein kontaminationsfreies Eluat erhalten. Daraus kann abgeleitet werden, dass die geringen Kontaminationsgehalte in den anderen Methanolfractionen aus den vorangegangenen Lösungsmitteln stammten (n-Hexan und DCM). Die mehrfachen Elutionen zeigten, dass der hier angewendete Vorspülschritt keinen zufriedenstellenden Einfluss auf die Kontaminationsgehalte der unmittelbar nachfolgenden Eluate ausübte. Die LM n-Hexan und DCM waren auch nach mehreren Elutionsschritten in der Lage, Substanzen aus dem Kartuschensystem freizusetzen, deren Konzentrationen jedoch einen absteigenden Trend mit zunehmendem Elutionsschritt aufwiesen. Dies führt zu der Annahme, dass große Lösungsmittelmengen zum Vorreinigen der Kunststoffkartuschen nötig sind, um eine kontaminationsfreie Analytik durchführen zu können.

3.1.2 Blindwertbestimmung der Glaskartusche C₁₈ (Bondesil)

Um den Reinigungserfolg der Kartuschenelemente (Sorbenzien, Fritten; **3.1.3.2**) in der Gesamtheit des Festphasenextraktionssystems zu überprüfen, wurden die C₁₈-Glaskartuschen mit n-Hexan, DCM und MeOH mit und ohne vorangegangene Extraktion von 1 L Reinstwasser eluiert. Die LM-Eluate wurden gaschromatographisch analysiert.

Es wurden lediglich geringfügige Verunreinigungen der Lösungsmittelfractionen sowohl bei der konditionierten als auch bei der unkonditionierten Kartusche festgestellt (**Anhang C4**). Bei den LM n-Hexan und DCM waren im 2. Extraktionsschritt ausnahmslos geringere Konzentrationen vorhanden, bei MeOH war jedoch das gegenteilige Verhalten zu beobachten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist ein höherer Zeit- und Lösungsmittelbedarf für das Anlösen der durch MeOH eluierbaren Substanzen, verglichen mit den anderen LM. Ein signifikanter Unterschied der Kontaminationskonzentrationen zwischen konditionierter und unkonditionierter Kartusche konnte nicht festgestellt werden. Wie auch schon bei der Ermittlung der Lösungsmittelblindwerte der Kunststoffkartusche (**3.1.1**) beobachtet werden konnte, wurden die meisten Kontaminationen innerhalb der LM n-Hexan und DCM gefunden. Diese waren jedoch so gering, dass sie als vernachlässigbar angesehen werden konnten.

Die Lösungsmittelblindwerte nach der Extraktion von Reinstwasser auf einer konditionierten und einer unkonditionierten Kartusche zeigten insgesamt, im Vergleich zu den Blindwerten ohne Wasserextraktion, leicht erhöhte Konzentrationen. Dies könnte auf einen geringfügigen Verschmutzungseintrag über das verwendete Reinstwasser zurückgeführt werden.

3.1.3 Analyse der Kartuschenbestandteile

3.1.3.1 kommerziell erhältliche Kunststoffkartuschen

Aufgrund starker Kontaminationen innerhalb der Lösungsmittelblindwerte der kommerziell erhältlichen SPE-Kartusche mit C₈-Sorbens (**3.1.1**), sollte die Quelle der Verunreinigungen aufgeklärt werden. Hierfür wurden die einzelnen Komponenten (Säule, Fritten, Sorbens) der C₈- und PPL-Kartuschen in n-Hexan und MeOH (je 3 mL in der Kartusche, je 6 mL für Sorbenzien und Fritten) gelagert.

Es wurde festgestellt, dass im Fritten- und Sorbensmaterial im Vergleich zur Kunststoffsäule geringfügige Kontaminationen durch eine Elution mit n-Hexan herausgelöst werden. Des Weiteren wurde eine deutliche Differenz zwischen den beiden Lösungsmitteln bei den aus der Säule eluierten Verunreinigungen offensichtlich. In der n-Hexanfraktion wurde ein, verglichen mit den im MeOH ermittelten Konzentrationen, prägnant hoher Wert bestimmt (**Tab. 8**, PPL: **Anhang C5**).

Tabelle 8. Konzentrationen der gaschromatographisch bestimmten Kontaminationen der Kartuschenbestandteile der C₈- Kunststoffkartusche (Bond Elut)

Kartuschenelement	Lösungsmittel	Masse Verunreinigung [µg]	bezogen auf
Sorbens	n-Hexan	1,3	g Sorbens
Fritten	n-Hexan	1,8	Frittenpaar
Säule	n-Hexan	157,4	Säule
		160,5	
Sorbens	MeOH	2,4	g Sorbens
Fritten	MeOH	1,3	Frittenpaar
Säule	MeOH	1,6	Säule
		5,3	

Anhand der ermittelten Kontaminationskonzentrationen ließ sich darauf schließen, dass die primäre Kontaminationsquelle innerhalb der kommerziell erhältlichen Kartuschen die Kunststoffsäule darstellt (bei Elution mit n-Hexan). Da eine Aufreinigung dieser Säulen lediglich mit einem hohen Zeitaufwand und ohne genaue Kenntnis des Aufreinigungserfolges verbunden gewesen wäre, wurden die Festphasenextraktionsversuche mit manuell gepackten Glaskartuschen durchgeführt. Die Sorbenzien und Fritten wurden hierfür durch ein Soxhlet-Extraktionsverfahren aufgereinigt.

3.1.3.2 Materialien für Glaskartuschen

Die losen Sorbenzien C₈, C₁₈, PPL und NH₂ sowie die Glasfaserfritten zur Bestückung der Glaskartuschen wurden vor und nach der Aufreinigung mittels Soxhlet-Extraktion auf ihren Verunreinigungsgrad gaschromatographisch untersucht (**Anhang C6**).

Es wurde festgestellt, dass die Kontaminationen, die durch n-Hexan aus den Materialien gelöst wurden, höhere Werte zeigten als jene, die durch Methanol extrahiert wurden (sowohl vor als auch nach Aufreinigung).

Die Aufreinigung der Sorbenzien und Fritten wurde über eine Soxhlet-Apparatur mit n-Hexan durchgeführt. Hierfür wurde die Extraktionshülse mit den Materialien zu je 80 % gefüllt. Das Extraktionsmittel wurde gaschromatographisch analysiert und die Kontaminationen quantifiziert. Die Verunreinigungen, die aus den Sorbenzien und Fritten gelöst wurden, lagen zwischen **1,1 und 6,2 µg/g Sorbens** sowie bei **0,8 µg/Frittenpaar**. Die Konzentrationsdifferenzen der Sorbenzien können aus einer unterschiedlich langen Reinigungsdauer (mind. 6 h bzw. über Nacht) resultieren.

Der Reinigungserfolg wurde durch die Lagerung der Sorbenzien und Fritten in n-Hexan überprüft (**Abb. 14**). Die Soxhlet-Aufreinigung führte zu einer nahezu vollständigen Eliminierung der Verunreinigungen aus den Sorbenzien. Das Frittenmaterial zeigte nach der Aufreinigung vergleichsweise große Kontaminationsrückstände (vor Aufreinigung: **0,6 µg/Frittenpaar**, nach Aufreinigung: **0,12 µg/Frittenpaar**, jeweils Lagerung in n-Hexan). Die Porosität des Materials scheint eine Veränderung der Extraktionsparameter mit verlängerter Extraktionsdauer und/oder abweichender Extraktionsmittelzusammensetzung zu erfordern. Trotz dessen wurden die Glasfaserfritten für die SPE-Versuche verwendet; eine Beeinflussung der Identifizierung bzw. Quantifizierung der Analyten durch die verbliebenen Kontaminationsrückstände konnte nicht festgestellt werden.

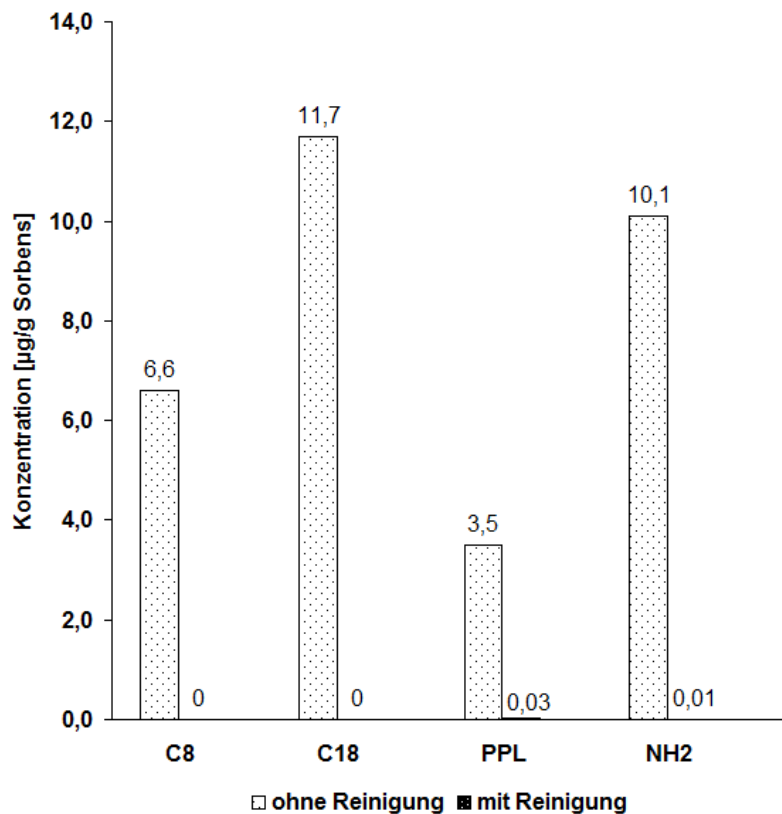


Abbildung 14. Konzentrationen der gaschromatographisch bestimmten Kontaminationen der losen Sorbenzien vor und nach Aufreinigung mittels Soxhlet-Extraktion.

Anhand der durchgeführten Kontaminationsanalysen konnte festgestellt werden, dass die kommerziell erhältlichen Kunststoff-SPE-Kartuschen für eine gaschromatographische Lipidanalytik mittels GC bzw. GC-MS nicht geeignet sind, da große Verunreinigungsmengen durch die Elution mit organischen Lösungsmitteln freigesetzt werden. Für die Festphasenextraktionsversuche des Lipidstandardgemisches in wässriger Lösung sowie der Meerwasserproben wurden aus diesem Grund manuell gepackte Glaskartuschen mit den gereinigten Materialien verwendet. Durch die Aufreinigung der Kartuschenbestandteile wurden die Matrixeinflüsse bei der Analyse auf ein Minimum reduziert. Dadurch konnte eine eindeutige Identifizierung der Analyten aufgrund der Eliminierung der Kontaminationen vorgenommen werden.

3.2 Lösungsvermögen ausgewählter Standardlipide in Reinstwasser

Voraussetzung für die Analyse von Lipidverbindungen in wässriger Matrix ist deren Löslichkeit und Aufenthalt in dieser. Um hierfür die optimale Methode zu finden, wurden die verwendeten Standardlipide (**Tab. 3**) in 4 unterschiedlichen Verfahren in Lösung gebracht (**Tab. 4**).

Für die 4 Lipidklassen unterschiedlicher Polarität wurde eine Konzentration von je 0,5 mg in 1 L Reinstwasser gewählt. Die folgende Tabelle zeigt die theoretischen Konzentrationen an gelöstem Kohlenstoff der einzelnen Lipidverbindungen sowie die zu erwartende Gesamtkonzentration C. Da sich PC aus verschiedenen Hauptfettsäuren zusammensetzt (**Abb. 18**), wurde für die Berechnung von einem gemittelten Molekulargewicht, entsprechend der vorhandenen Fettsäuren, ausgegangen.

Tabelle 9. Theoretische DOC-Konzentrationen der Standardlipide (je 0,5 mg/L) zur Bestimmung des Lösungsvermögens in Reinstwasser

Standardlipid	Konzentration [$\mu\text{M C}$]
Cholesterol	34,9
Lauryllaurat	32,6
L-a-Phosphatidylcholin	27,9
Squalan	35,5
	130,9

Alle Ansätze zeigten nach 10 min einen prägnanten Anstieg mit sich anschließendem Abfall des Lösungsverlaufes (**Abb. 15**). Die Kohlenstoffkonzentration der bei 65 °C inkubierten Lösung nach 1 h wurde als Ausreißer gewertet (in **Tab. 10** blau gekennzeichnet, in **Abb. 15** vernachlässigt). Für die Berechnung der maximalen Wiederfindungen wurden die nach 1 h im Ultraschallbad ermittelten Werte eingesetzt (Inkubationsdauer 5 h).

Durch die Behandlung mit Ultraschall, sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 65 °C, konnte eine deutlich höhere Löslichkeit der Lipide im wässrigen Medium erzielt werden (Blindwert Reinstwasser: 3,5 $\mu\text{M C}$ [n=10]). Die über Ultraschall eingetragene Energie besitzt eine dispergierende Wirkung, wobei die Schallwellen durch sich abwechselnde Hochdruck- und Niederdruckzyklen in der Flüssigkeit zur Entstehung von Flüssigkeitsstrahlen mit hoher Geschwindigkeit führen (Ultraschallkavitation), die eine Trennung der Partikel bewirken (Hielscher, 2011).

Nach 4 h wurden alle Ansätze für 1 h bei Raumtemperatur im Ultraschallbad behandelt (in **Abb. 15** und **Tab. 10** durch rote Linie gekennzeichnet). Dies führte zu einem deutlichen Anstieg der zuvor ohne Ultraschallbad inkubierten Ansätze. Die bereits mit Ultraschall behandelten Lösungen zeigten hierbei lediglich eine marginale Steigung. Hiervon kann ein größerer Einfluss der Ultraschallbehandlung verglichen mit einer Temperaturvariiierung auf die Löslichkeit der Lipide abgeleitet werden. Infolgedessen wurden die für die folgenden Versuche verwendeten Standardlipide mit Hilfe von Ultraschall bei Raumtemperatur gelöst. Die natürlichen Meerwasserproben wurden ebenfalls vor der Extraktion mit Ultraschall behandelt (30 min).

Tabelle 10. DOC-Konzentrationen der Standardlösungen zur Bestimmung des Lösungsvermögens in Reinstwasser über die Zeit bei unterschiedlichen Behandlungsbedingungen

Inkubationsdauer [h]	RT [$\mu\text{M C}$]	RT_US [$\mu\text{M C}$]	65 °C [$\mu\text{M C}$]	65 °C_US [$\mu\text{M C}$]
0	36,31	62,9	29,6	27,5
0,2	106,1	93,2	93,0	107,5
0,5	76,9	91,2	79,6	87,7
1	63,3	99,6	127,9	103,3
2	49,0	102,1	60,6	105,7
4	52,5	100,7	75,5	105,8
5	94,3	111,8	106,0	113,5
max. Wiederfindung [%]	72,0	85,4	81,0	86,7

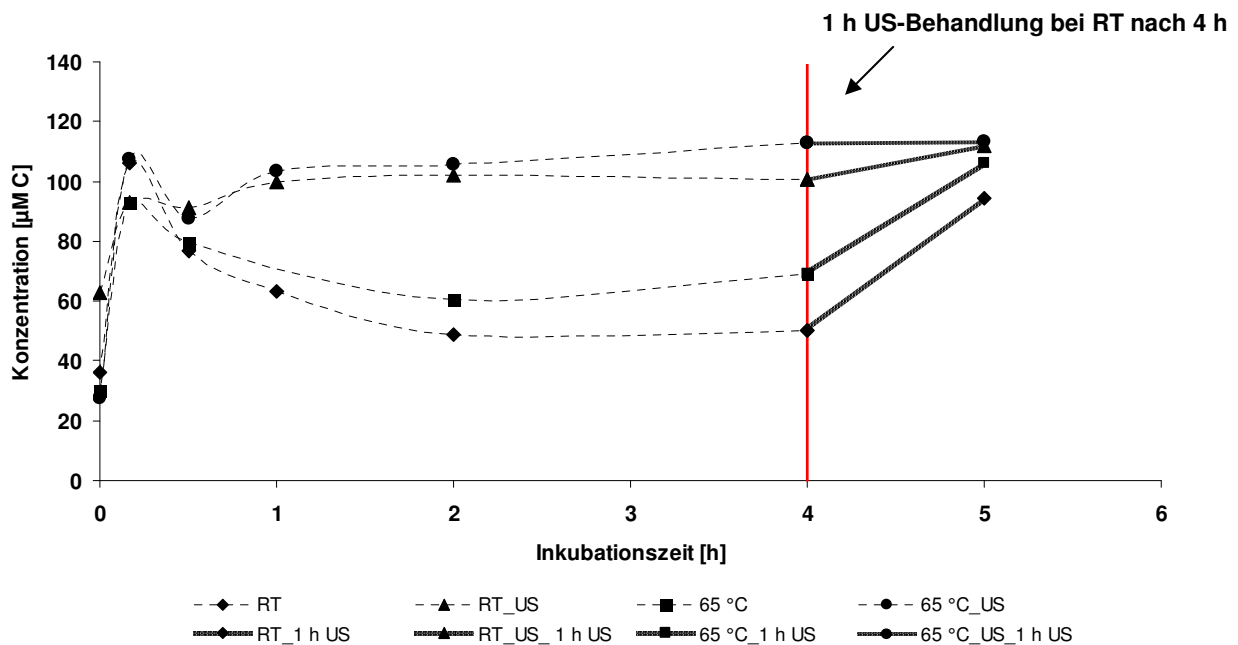


Abbildung 15. Lösungsvermögen der Standardlipide in Reinstwasser über die Zeit bei unterschiedlicher Behandlung der Standardlösungen.

Trotz ihres hydrophoben Charakters sind Lipide bis zu einem gewissen Grad wasserlöslich. Untersuchungen von Ralston & Hoerr (1942) lieferten einen Schätzwert von 100 $\mu\text{g/L}$ für individuelle Komponenten (20 °C, dest. Wasser). Ralston & Hoerr bestimmten die Löslichkeit von Fettsäuren, die mittels Schüttelkolben (2-4 Tage, konstante Temperatur) in Lösung gebracht wurden. Hierbei wurde außerdem festgestellt, dass der Salzgehalt sowie die niedrigeren Temperaturen von Meerwasser zu einer Reduktion der Löslichkeit dieser Substanzen führen. Die Löslichkeit von Lipiden in Wasser ist abhängig von der Stärke der Wechselwirkungen bzw. von der Anzahl der hydrophilen Gruppen in den Lipidmolekülen. Das Verhältnis zwischen den hydrophilen und hydrophoben Gruppen ist ausschlaggebend für das Ausmaß der Interaktionen. Amphiphile Lipide, die stark polare (überwiegend geladene) Gruppen besitzen, sind in der Lage, in Wasser echte (molekulardisperse) Lösungen zu bilden. Dies ist allerdings konzentrationsabhängig: oberhalb der so genannten Kritischen

Mizellbildungskonzentration (engl. *Critical Micelle Concentration*- CMC) kommt es zur Aggregation der Lipidmoleküle. Die dabei entstehenden Mizellen stellen sphärische Gebilde dar, bei denen die hydrophoben Kohlenstoffketten nach innen gerichtet sind und die polaren Köpfe der Lipidverbindungen in Richtung des wässrigen Mediums zeigen (Thiele, 1979).

Wie bereits erwähnt, wird die Löslichkeitsgrenze von Lipidverbindungen mit 100 µg/L bei einer Temperatur von 20 °C angenommen. Niedrige Temperaturen führen allgemein zu einer verminderten Lösungsfähigkeit der Verbindungen. Auch im durchgeführten Experiment wurde eine geringfügige Steigerung der Löslichkeit bei Inkubation der Lösungen bei 65 °C erzielt (mit/ohne Ultraschallbehandlung). Jedoch wurde hier mit einer deutlich höheren Konzentration an eingesetzten Lipidverbindungen gearbeitet (je 500 µg/L). Die starke Durchmischung der Lösungen vor Messung der Kohlenstoffkonzentration könnte einen positiven Effekt auf die Löslichkeit der Lipide ausgeübt haben. Trotz der 5-fach überhöhten Löslichkeitsgrenze konnten durch Ultraschallbehandlung über 85 % der Lipide in Wasser gelöst werden.

Bei keinem der Probenansätze konnte der theoretische Wert von 130,9 µM C gemessen werden (bestimmter Maximalwert: 113,5 µM C bei Ultraschallbehandlung, 65 °C). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Affinität einiger Lipidverbindungen zur Adsorption an der Glaswand der Probenflasche. In einer Veröffentlichung von Parrish (1988b) zu Untersuchungen von gelösten und partikulären Lipidklassen mariner Herkunft wurde die Problematik der Lipidadsorption an Glasfaserfilter diskutiert. Im Zuge dessen wurde auf Versuche von Schultz & Quinn (1972) verwiesen, die den Anteil der zur Fraktion gelöster Substanzen gehöriger Fettsäuren, die während der Filtration vom Glasfaserfiltermaterial zurückgehalten wird, auf 20 % bezifferte. Jackson et al. (1987) haben bei Experimenten mit den Phospholipiden DPPC und PI gefunden, dass die Temperatur einen entscheidenden Einfluss auf die Adsorptionsrate sowie die adsorbierte Menge der Substanzen hat. Auch die Rauigkeit der Oberfläche kann hierbei eine Rolle spielen.

Die hier verwendeten Glasflaschen, in denen die Lösungen angesetzt wurden, sind aus Borosilikatglas aufgebaut (81 % SiO₂, 13 % B₂O₃, 4 % Na₂O + K₂O, 2 % Al₂O₃; Duran Group, 2009). Bowers & Parsons (1981) haben eine Studie veröffentlicht, bei der der Substanzverlust der Komponenten eines Standards, u. a. bestehend aus Kohlenwasserstoffen, Phthalaten und Alkoholen, nach der Verdampfung mit anschließender Konzentrationseinstellung erklärt werden sollte. Die Proben befanden sich hierfür in GC-Vials aus Borosilikatglas. Dieses wird in der Spurenanalytik häufig eingesetzt und gilt als chemisch inert. Aus den hierbei erzielten Ergebnissen wurde abgeleitet, dass die vollständige Verdampfung einer Probe zu signifikanten Verlusten der Substanzen führt. Bei dem im Zuge der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experiment wurden die Analyten ebenfalls bis zur Trockne verdampft und in Reinstwasser aufgenommen. Borosilikatglas kann eine unerwünschte Aktivität gegenüber polarer Komponenten zeigen, bedingt durch das Vorhandensein von Silanolgruppen, Kalium und Bor in der Glasmatrix. Eine Möglichkeit der Deaktivierung und damit des Vermeidens dieser Adsorptionen kann durch eine Silylierung der Glasoberfläche erreicht werden. Hierbei kommt es allerdings nur zu einer Reaktion mit den Silanolgruppen, die aktiven Metallgruppen bleiben bestehen (Bowers & Parsons, 1981). Eine weitere Möglichkeit stellt der Einsatz

oberflächenaktiver Agenzien dar, die im Zuge dieser Problematik auch schon bei der Behandlung von Glaskapillarsäulen für die GC verwendet wurden (Rutten & Luyten, 1972).

In einem weiteren Experiment sollte überprüft werden, innerhalb welchen Zeitrahmens die Lipidverbindungen nach der Behandlung mit Ultraschall in Lösung verbleiben. Hierfür wurde eine 1 L Standardlösung (6STD) über Flüssig-Flüssig-Extraktion mit DCM beprobt. Stundenweise wurden nach anfänglicher Ultraschallbehandlung (30 min) je 200 mL des Ansatzes entnommen ($t = 0-4$ h). Die Lipidverbindungen wurden extrahiert, verestert, silyliert und über GC-MS analysiert (**Tab. 11**).

Tabelle 11. Wiederfindungen der Standardlipide in je 200 mL Probenansatz nach 0-4 h Inkubationsdauer

Standardlipid	Wiederfindung [%]					Gesamt
	t= 0 h	t= 1 h	t= 2 h	t= 3 h	t= 4 h	
LL	11,5	13,1	12,2	12,9	13,2	62,9
PC	10,4	3,5	5,6	4,0	4,9	28,4
TAS	15,4	16,0	13,8	14,2	14,1	73,5
AB	15,6	15,3	13,3	13,3	14,6	72,1
Sq	14,8	18,3	15,8	15,9	18,7	83,5
Chol	16,5	19,1	17,5	16,5	21,3	90,9

Bei keinem Standardlipid konnte eine 100 %ige Wiederfindung der Verbindungen ermittelt werden. Besonders deutlich war die Löslichkeitsreduktion beim PC zu beobachten; diese Standardkomponente zeigte bereits beim 2. Messpunkt nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur einen signifikanten Abfall des Anteils gelöster Komponenten (**Abb. 16**). Daraus folgte die Notwendigkeit einer erneuten Ultraschallbehandlung während des Extraktionsvorganges, um die Verbindungen für den gesamten SPE-Prozess in Lösung zu halten (Dauer SPE 5-6 h).

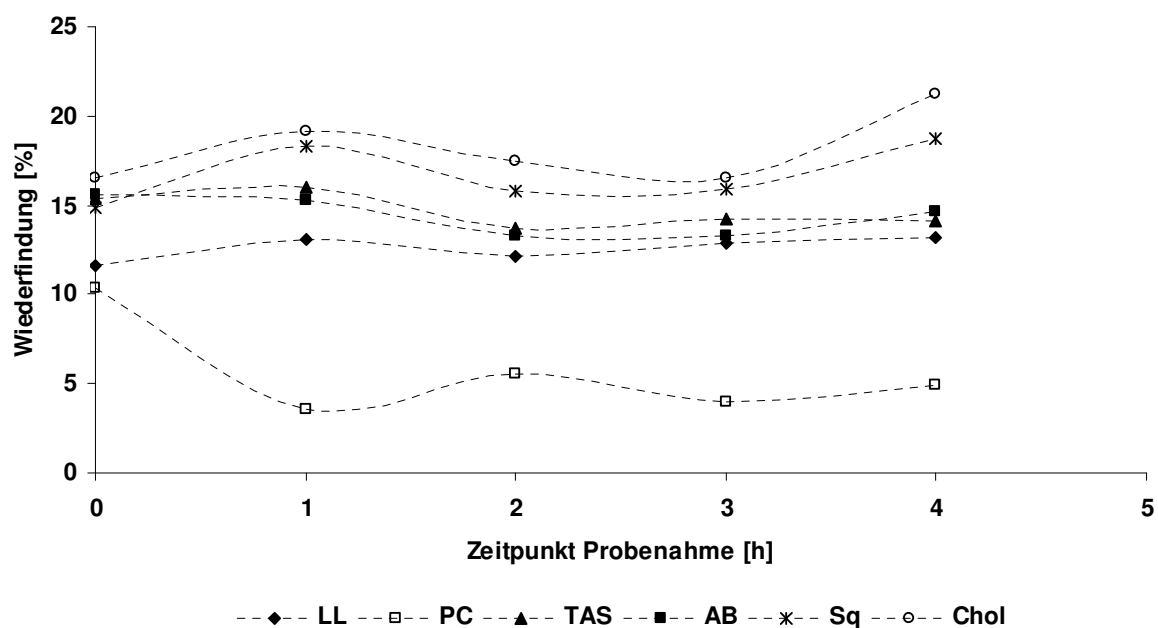


Abbildung 16. Wiederfindungen der Standardlipide in je 200 mL Probenansatz in Abhängigkeit der Inkubationsdauer.

Um die an der Glaswand der Probenflasche über Adsorptionskräfte verbliebenen Lipidkomponenten zu detektieren (**Tab. 12**), wurde die Flasche nach Trocknung mit 15 mL DCM gespült. Der Extrakt wurde ebenfalls verestert, silyliert und über GC-MS analysiert. Besonders der langkettige Wachsester (AB) sowie Triarachinsäure (TAS) konnten hierbei in hohen Konzentrationen wiedergefunden werden. Aufgrund der langkettigen Alkylgruppen besitzen diese Moleküle eine schlechte Wasserlöslichkeit. Die Sauerstoffatome der Ester bedingen allerdings eine gewisse Polarität der Verbindungen, so dass verstärkte Wechselwirkungen mit der Glaswand denkbar sind.

Tabelle 12. Wiederfindungen der an der Glaswand adsorbierten Standardlipide bei Bestimmung des Lösungsvermögens in Reinstwasser

Standardlipid	Wiederfindung [%]
LL	2,8
PC	1,8
TAS	13,3
AB	18,5
Sq	5,3
Chol	2,4

In der Bilanz der Wiederfindungen der Komponenten des Lipidstandardgemisches fällt die mit 30,2 % vergleichsweise niedrige Wiederfindung des PC auf (**Tab. 13**). Diese könnte durch eine irreversible Adsorption des Polarlipids an die Glaswand der Probenflasche erklärt werden, die aufgrund der starken Wechselwirkungen durch das Spülen der Glasflasche mit DCM nicht gestört werden konnte.

Tabelle 13. Gesamtwiederfindungen der Standardlipide bei FFE des Lipidstandardgemisches (in 5 Unterproben) sowie Beprobung der Glasflasche

Standardlipid	Wiederfindung gesamt [%]
LL	65,7
PC	30,2
TAS	86,8
AB	90,6
Sq	88,8
Chol	93,3

3.3 GS-MS-Analyse der Standardlipide

Zur Charakterisierung des Retentionsverhaltens der ausgewählten 6 Standardlipide (6STD, **Tab. 14**) wurden diese in einer Konzentration von je 50 µg nach der Veresterung in silylierter sowie unsilylierter Form über GC-MS analysiert.

Tabelle 14. Zusammensetzung des für die Extraktionsversuche verwendeten Lipidstandardgemisches 6STD

Lipidbezeichnung	Abkürzung	Fettsäure(n)	Summenformel
Lauryllaurat	LL	12:0	C ₂₄ H ₄₈ O ₂
Phosphatidylcholin	PC	16:0	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P
		18:0	C ₄₄ H ₈₈ NO ₈ P
		18:1 (n-9) cis/trans	C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P
		18:2 (n-6) cis	C ₄₄ H ₈₀ NO ₈ P
Triarachinsäure	TAS	20:0	C ₆₃ H ₄₂ O ₆
Arachidylbehenat	AB	22:0	C ₄₂ H ₈₄ O ₂
Squalan	Sq	-	C ₃₀ H ₆₂ O
Cholesterol	Chol	-	C ₂₇ H ₄₆ O

Aufgrund der Methylierung der Substanzen liegen die veresterbaren Lipide in Form ihrer Fettsäuren und Alkohole vor (**Abb. 18**). Die Silylierung ist eine weitere Derivatisierungsmethode, welche die Flüchtigkeit der Analyten erhöhen und damit eine Verdampfung ohne Zersetzung durch Steigerung der thermischen Stabilität der Substanzen ermöglichen soll. Durch die Behandlung mit MSTFA (**Abb. 17**) werden die Wasserstoffatome von Hydroxylgruppen durch Trimethylsilylgruppen ersetzt:

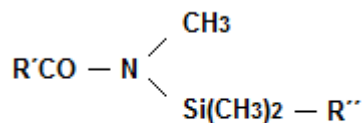


Abbildung 17. Strukturformel des Derivatisierungsreagenzes MSTFA (nach Machery-Nagel, 2012).

Cholesterol benötigt für eine gaschromatographische Trennung eine Derivatisierung, die der Abschirmung der polaren Hydroxylgruppe dient. Die Silylierung führt hierbei zu einer Verbesserung der Peakform sowie zu größeren Responsefaktoren im Vergleich zum unsilylierten Sterol (Winkler-Moser, 2011).

Die Silylierungsreaktion resultierte außerdem in der Molekülvergrößerung der Alkoholderivate der Wachsester (LL, AB), die aufgrund des höheren Molekulargewichtes durch die Derivatisierung der Hydroxylgruppen längere Retentionszeiten aufwiesen. Dies zog eine Veränderung der Elutionsfolge nach sich (Alkohol des Lauryllaurats eluierte später von der Säule als korrespondierende Fettsäure). Die Silylierung hatte keinen Einfluss auf die Fettsäuren des PC sowie auf Squalan (**Abb. 18**).

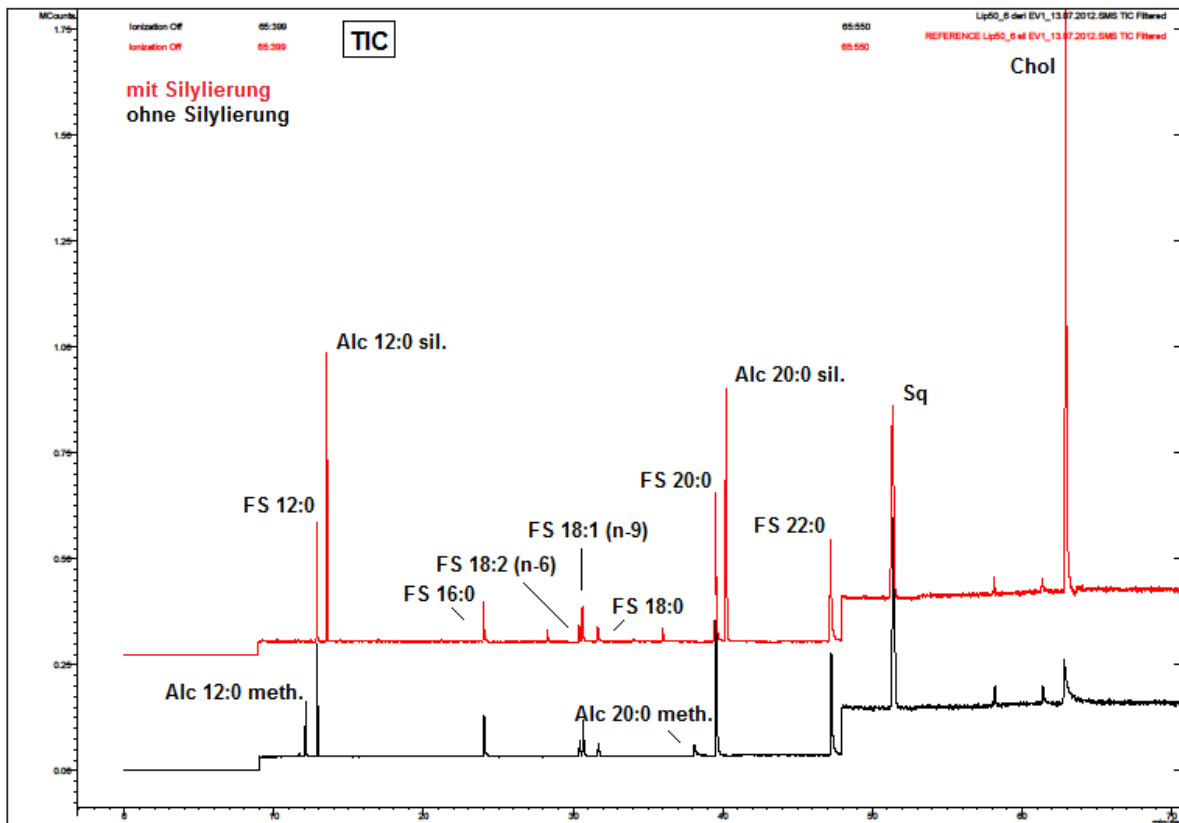


Abbildung 18. Komponenten des Lipidstandardgemisches in unsilylierter (schwarz, meth.= methyliert) und silylierter (rot, sil.= silyliert) Form.

Das gewählte Lipidstandardgemisch ist durch seine für Meerwasseruntersuchungen relevanten Lipidverbindungen charakterisiert. Es enthält Wachsester mit verschiedenen Kettenlängen der Fettsäuren und Alkohole (LL, AB). Wachsester bilden die Hauptgruppe neutraler Lipide in marinem Zooplankton. In calanoiden Copepoden machen sie 90 % der Gesamtlipide aus und stellen für polare Zooplankter eine wichtige Energiereserve dar (Parrish, 1988b). Die Fettsäuren mariner Wachsester sind hierbei meist aus 14 bis 22 Kohlenstoffatomen aufgebaut und können somit wichtige metabolische Energie speichern (Sargent et al., 1977). Wachs- und Sterolester wurden von Goutx et al. (2009) im Ligurischen Meer mit einem Gehalt von ca. 0,5 µg/L (September/Oktober) detektiert. Analysen von Derieux et al. (1998) im Juni mit Proben aus der Adria lieferten mit 0,5-0,8 µg/L ähnliche Werte.

Neben den Wachsestern bilden Triacylglyceride eine wichtige Klasse von Neutrallipiden in marinen Organismen (Parrish, 1988b). In der Oberflächenschicht des Meerwassers konnten sie neben freien Fettsäuren und Wachsestern als dominierende Lipidklasse gefunden werden (Larsson et al., 1974). Außerdem stellen sie eine der Hauptlipidklassen der in der Meeresschicht und partikulärem Material gefundenen Verbindungen dar (Parrish, 1988b). Des Weiteren zählen sie, neben Wachsestern, Diacylglycerolethern und Sterolen, zu den Hauptklassen von Neutrallipiden in marinen Zooplanktonspezies (Graeve & Janssen, 2009). Gebundene Fettsäuren in Form ihrer Mono-, Di- und Triester konnten in stark schwankenden Konzentrationen in Meerwasser ermittelt werden. So bestimmten Goutx et al. (2009) Konzentrationen der Triacylglycerole von 0,7 µg/L, Diacylglycerole

zwischen 0,01 und 0,08 $\mu\text{g/L}$ sowie der Monoacylglycerole von 2,7 $\mu\text{g/L}$, wohingegen Kattner et al. (1983) einen deutlich höheren Wert von 0,5 $\mu\text{mol C/L}$ (entspricht 6 $\mu\text{g C/L}$) für TAG im Oberflächenwasser feststellten. Ebenfalls im Frühjahr fanden Derieux et al. (1998) folgende Lipidgehalte in der Adria: 5,8-6,2 $\mu\text{g/L}$ TAG, 0 $\mu\text{g/L}$ DAG sowie 12,8-20,4 $\mu\text{g/L}$ MAG.

Phospholipide sind ein essentieller Bestandteil aller Biomembranen, außerdem können sie auch als Chloroplastenlipide dienen (Parrish, 1988b). In einer Abhandlung über Phospholipide in marinen Umgebungen stellte Suzumura (2004) aus küstennahem Meerwasser, Sedimenten sowie marinen Organismen ermittelte Phospholipidkonzentrationen zusammen. So können diese demnach einen Anteil von bis zu 96 % am Gesamtlipidgehalt einiger Bakterienspezies sowie bis zu ca. 52 % in der gelösten Fraktion von Meerwasser ($< 0,7 \mu\text{m}$) einnehmen. Die Konzentrationen polarer Lipide in Meerwasser scheinen deutlichen jahreszeitlichen Schwankungen zu unterliegen. Im Herbst aus dem Ligurischen Meer gezogene Proben lieferten Konzentrationen von 0,9 $\mu\text{g/L}$ für Phosphoglyceride, 0,1 $\mu\text{g/L}$ für PE sowie 0,01 $\mu\text{g/L}$ für PC (Goutx et al., 2009). Im Vergleich zeigen Proben, welche zeitlich mit der Phytoplanktonblüte einhergehen, teilweise höhere Werte: Derieux et al. (1998) ermittelten Konzentrationen zwischen 22,1 und 35,5 $\mu\text{g/L}$ für DPG und PG sowie zwischen 0 und 2,1 $\mu\text{g/L}$ für PC in der Adria; Kattner et al. (1983) veröffentlichten eine Maximalkonzentration von 0,5 $\mu\text{mol C/L}$ (entspricht 6 $\mu\text{g C/L}$) für polare Lipide in der Nordsee.

Squalan lässt sich zu den Neutrallipiden zählen und weist aufgrund der aliphatischen Kohlenstoffkette mit 30 C-Atomen einen stark hydrophoben Charakter auf. Im Meerwasser können Kohlenwasserstoffe sowohl als Verunreinigung in Form von n-Alkanen, Iso- oder Cycloalkanen als auch natürlicher Herkunft auftauchen. Als Quellen biogener Kohlenwasserstoffe werden hierbei von Saliot (1981) Zoo- und Phytoplanktonspezies, benthische Algen sowie Bakterien genannt; außerdem wird eine Verbreitung durch terrestrische Pflanzen erwähnt. Bei den natürlichen Kohlenwasserstoffen in Bakterien sowie prokaryotischen und eukaryotischen Phytoplanktonspezies treten vor allem n-Alkane mit einer Kettenlänge zwischen 15 und 21 Kohlenstoffatomen auf (Saliot, 1981). Untersuchungen von Saliot (1981) weisen auf Konzentrationen zwischen 1 und 50 $\mu\text{g/L}$ hin; dies kann durch den von Derieux et al. (1998) ermittelten Gehaltsbereich von 0,8-11 $\mu\text{g/L}$ bestärkt werden.

Letztlich tauchen biogene Kohlenwasserstoffe zwar in allen marinen Lebewesen auf, machen jedoch nur selten über 1 % des Totallipidgehalts aus (Sargent et al., 1976). Kohlenwasserstoffe sind durch eine große Stabilität in Wasser und Sedimenten gekennzeichnet, daher eignen sie sich als biologische oder geochemische Marker. Squalen, das ungesättigte Pendant zu Squalan, welches sich chemisch von Isopren ableitet, wurde in kleinen Mengen in Algen und Bakterien gefunden (z. B. Volkman et al., 1980: Untersuchung von Diatomeen). Außerdem bildet es in Eukaryoten das Vorläufermolekül von Sterolen und Steroiden.

Sterole stellen wichtige Bestandteile aller eukaryotischen Lebewesen dar. Hierbei sind sie u. a. für die Kontrolle der Membranfluidität und -permeabilität verantwortlich (Volkman, 2003). Bei der Lipidzusammensetzung planktonischer Organismen spielen sie ebenfalls eine wichtige Rolle. Die aus Phytoplankton stammenden Phytosterole können als Biomarker für die Algenaktivität genutzt werden (Mühlebach & Weber, 1998).

3.4 Flüssig-Flüssig-Extraktion (FFE) der wässrigen Lipidlösungen

Zur Bestimmung eines geeigneten Lösungsmittels zur FFE von Lipidverbindungen aus Wasser wurden n-Hexan und DCM getestet. Diese Lösungsmittel wurden gewählt, um die Wiederfindungen der hier eingesetzten Analyten bei Verwendung eines unpolaren (n-Hexan) und eines polareren LM (DCM) zu bestimmen.

Die FFE war notwendig, um jene Lipide im Permeatwasser zu erfassen, die nicht durch Adsorption von den Sorbensmaterialien der SPE-Kartuschen zurückgehalten werden konnten. Darüber hinaus konnte hiermit die Effizienz zweier unterschiedlicher Extraktionsmethoden zur Lipidanalytik verglichen werden (SPE Meerwasser: **3.6**, FFE Meerwasser: **3.5.5**).

Die Standardsubstanzen PC, TAS und AB wurden bei der Extraktion mit n-Hexan in auffallend geringer Menge wiedergefunden (**Tab. 15, Abb. 19**). Andere Verbindungen zeigten bei beiden Extraktionsmitteln vergleichbare Werte (LL, Sq, Chol).

Tabelle 15. Wiederfindungen der Standardlipide bei FFE mit DCM und n-Hexan

Standardlipid	Wiederfindung [%]	
	Extraktion mit DCM	Extraktion mit n-Hexan
LL	58,1	62,2
PC	68,7	11,8
TAS	39,9	5,1
AB	37,4	6,7
Sq	50,5	52,3
Chol	57,3	54,8

Der Extraktionsvorgang beruht auf dem Nernstschen Verteilungsgesetz, nach dem sich ein Verteilungsgleichgewicht der Substanzen zwischen der wässrigen und der organischen Phase einstellt. Eine wichtige Rolle spielt die Polarität des Extraktionsmittels und der zu extrahierenden Substanzen. n-Hexan besitzt im Vergleich zu DCM eine deutlich geringere Polarität (Polaritätsindex P' nach Snyder: $P'_{n\text{-Hexan}}: 0$, $P'_{\text{DCM}}: 3,4$). So weist z. B. Phosphatidylcholin aufgrund der Phosphat- und Aminogruppen einen amphiphilen Charakter auf und zählt somit zu den Polarlipiden. Daraus kann eine bessere Verteilung des PC in DCM abgeleitet werden.

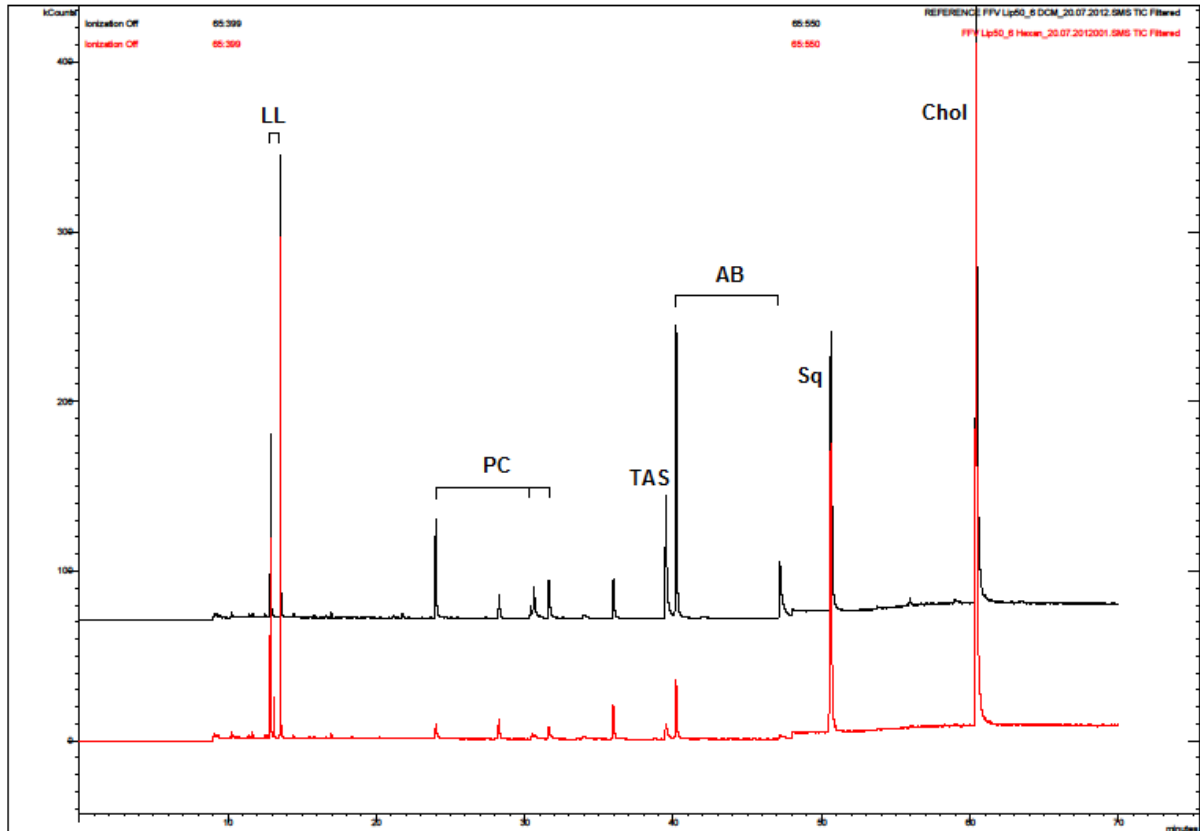


Abbildung 19. Komponenten des Lipidstandardgemisches in silylierter Form bei FFE mit DCM (schwarz) und *n*-Hexan (rot).

Der Extraktionsvorgang mit DCM führte zu einer höheren Wiederfindung der meisten Standardverbindungen und wurde folglich bei den Festphasenextraktionsversuchen für die FFE des Permeatwassers sowie zur Extraktion der Meerwasserprobe eingesetzt.

3.5 Festphasenextraktion (SPE) der Standardlipide

Für die Festphasenextraktion wurden manuell gepackte Glaskartuschen mit aufgereinigten Sorbenzien und Fritten verwendet.

Vor jeder Extraktion wurden die verwendeten Kartuschen mit je 2 Säulenvolumen Methanol konditioniert. Dies resultierte in einer Solvatisierung des Sorbensmaterials. Hierbei wird das Sorbens befeuchtet, um eine Umgebung zu schaffen, die die Adsorption der Analyten sowie maximale Wechselwirkungen ermöglicht. MeOH ist in der Lage, sowohl mit den Silanolgruppen des Silikas als auch mit den Kohlenstoffketten der gebundenen funktionellen Gruppen unpolare Sorbenzien zu interagieren (Varian, 2005). Es dient als Lösungsvermittler zur Benetzung der unpolaren Oberfläche des Sorbens, um eine Abstoßung der wässrigen Probe zu verhindern (Varian, 2009). Unsolvatisierte unpolare Gruppen würden keine Wechselwirkungen mit einer polaren Probe (z. B. Wasser) eingehen; die Analyten würden demzufolge nicht zurückgehalten werden (Varian, 2005). Hierbei wird ein langsamer Durchfluss empfohlen, damit die gesamte innere Oberfläche des porösen Materials benetzt und damit aufnahmefähig gemacht werden kann (Varian, 2009). Überschüssiges MeOH wird im Anschluss durch ein Solvens entfernt, das das Sorbens auf die Probe vorbereiten soll (hier:

Reinstwasser, pH 2). Dieses sollte mit dem Solvatisierungsreagenz mischbar sein. Nachdem das Sorbens solvatisiert wurde, ist das Trocknen des Materials zu vermeiden, um die Benetzung nicht zu unterbrechen, was in einer geringeren Kapazität des Sorbens resultieren würde; hingegen wird das Trocknen zwischen den Elutionsschritten mit LM unterschiedlicher Polarität empfohlen. Neben MeOH können auch andere LM, wie Acetonitril oder Isopropanol, für die Konditionierung verwendet werden (Varian, 2005).

Bei den unpolaren Sorbenzien C₈ und C₁₈ sowie PPL kam es vorwiegend zu hydrophoben Wechselwirkungen mit den aliphatischen Kohlenstoffketten der beiden Wachsester, des Squalans sowie des Triacylglycerols. Aufgrund des ebenfalls unpolaren Charakters des Ringsystems von Cholesterol sowie der hydrophoben Fettsäuren des Phospholipids konnten auch hier unpolare Interaktionen zu einer Adsorption der Lipidverbindungen auf dem Sorbens beitragen. Darüber hinaus können polare sekundäre Interaktionen aufgrund des polaren Silikasubstrates eine Adsorption der Substanzen (z. B. über Hydroxylgruppe des Cholesterols, Sauerstoffatome der Esterbindungen) bewirkt haben. Da die Komponenten, wie erwähnt, auch polare Moleküleigenschaften aufweisen, ist ebenso eine Anreicherung über das Aminopropylsorbens möglich. So besitzen Phospholipide eine hochpolare, anionische funktionelle Gruppe sowie 2 Estergruppen. Triacylglycerole weisen 3 Estergruppen auf, bei den Wachsestern sind Fettsäure und Alkohol über eine Esterbindung gekoppelt. Cholesterol besitzt eine polare Hydroxylgruppe. Über sekundäre Interaktionen unpolaren Charakters können hierbei auch die unpolaren Eigenschaften der Lipidverbindungen zur Adsorption führen. Die Oberfläche des Aminopropylsorbens wurde nicht durch *Endcapping* deaktiviert, so dass es ebenfalls über die freien Silanolgruppen zu polaren Interaktionen kommen kann. Liegen die Aminopropylgruppen des Sorbens sowie die Analyten geladen vor, spielen außerdem ionische Wechselwirkungen eine wichtige Rolle.

Zur Elution der adsorbierten Lipide wurden die Lösungsmittel n-Hexan, DCM und MeOH in verschiedener Reihenfolge verwendet. Ziel war es, innerhalb eines möglichst kleinen Solvensvolumens, Analyten unterschiedlicher Charakteristika in hohen Ausbeuten zu eluieren. Als Orientierung dienten hierbei u. a. Versuche von Kaluzny et al. (1985). Hier wurden für die Trennung verschiedener Lipidklassen aus Seren oder Geweben Kartuschen mit Aminopropylsorbens verwendet. Die Elution von Neutrallipiden, wie Cholesterol oder Triacylglyceriden, erfolgte mit Chloroform/Isopropanol 2:1; Fettsäuren wurden mit Diethylether/Essigsäure (98:2, v/v) und Phospholipide mit MeOH eluiert. Anschließend wurde eine Auftrennung der Neutrallipidfraktion, in deren Verlauf u. a. n-Hexan zur Elution von Cholesterolestern eingesetzt wurde, durchgeführt. Ebenfalls mit aminopropylgebundenen Phasen haben Bateman & Jenkins (1997) gearbeitet, um Lipidverbindungen aus mikrobiellen Kulturen zu extrahieren und separieren. Neutrallipide wurden hierbei mit Chloroform/2-Propanol (2:1, v/v), Polarlipide mit MeOH eluiert. Bei Experimenten von Kim & Salem (1990) wurden Phospholipide ebenfalls durch MeOH von der NH₂-Kartusche eluiert. Für die Entwicklung einer geeigneten Methode, um DOM aus Meerwasser über Festphasenkartuschen zu extrahieren, wurden von Dittmar et al. (2008) verschiedene Sorbenzien getestet. Für die Elution der organischen Substanzen wurde ebenfalls MeOH verwendet. Die höchsten Wiederfindungen konnten

hier durch das PPL-Sorbens erreicht werden; bei den silikabasierten Sorbenzien zeigte C₁₈ eine hohe Effizienz.

Durch die Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel sollte ein umfassender Polaritätsbereich abgedeckt werden. Durch die Wahl unterschiedlicher Elutionsfolgen sollte überprüft werden, ob und welches Lösungsmittel aufgrund der Ineffektivität als ungeeignet betrachtet und im Folgenden vernachlässigt werden kann.

3.5.1 Extraktionseffizienzen ohne Ansäuerung

Zur Untersuchung des Extraktionsverhaltens der Standardlipide (ohne Ansäuerung auf pH 2) wurde über C₁₈-Kartuschen verschiedenartig eluiert. Hierbei sollte die Adsorptionseffizienz der Lipidverbindungen in den verschiedenen Solvenzien anhand der Wiederfindungen in den Fraktionen der zur Elution verwendeten Lösungsmittel bestimmt werden (**Tab. 16**). Zur Anwendung kamen die Elutionsfolgen A und B.

Tabelle 16. Wiederfindungen der Standardlipide (ohne Ansäuerung) bei Anreicherung der Komponenten auf der C₁₈-Glaskartusche (Bondesil)

Elutionsfolge A	Wiederfindung C ₁₈ [%]				
	Kartusche	Permeatwasser (FFE)	Probenflasche	Permeatflasche	Gesamt
LL	19,4	21,7	14,3	0	55,4
PC	22,6	18,3	0,7	1,4	43,0
TAS	18,9	6,4	26,0	0	51,3
AB	18,4	13,4	27,6	0	59,4
Sq	27,5	24,2	12,5	0	64,2
Chol	22,4	21,3	10,0	0	53,7
Elutionsfolge B	Wiederfindung C ₁₈ [%]				
	Kartusche	Permeatwasser (FFE)	Probenflasche	Permeatflasche	Gesamt
LL	25,0	30,4	17,2	0	72,6
PC	30,6	34,5	0	0	65,1
TAS	32,3	19,6	32,4	0	84,3
AB	28,9	16,7	34,0	0	79,6
Sq	33,2	35,6	17,7	0	86,5
Chol	23,7	28,9	10,0	0	62,6

Die Analyse der einzelnen Eluate zeigte eine große Abhängigkeit der Zusammensetzung von der Elutionsfolge (**Tab. 17**). Hierbei wurde sich auf die von der Kartusche eluierten Lipide bezogen, die jeweils 100 % gesetzt wurden. Die Standardlipide LL und Squalan wiesen schon bei der Ermittlung eines geeigneten Extraktionsmittels zur Flüssig-Flüssig-Extraktion (**Tab. 15**) in n-Hexan eine

vergleichbare Verteilung in DCM auf. Dementsprechend wurde ein Großteil dieser Verbindungen bereits in der 1. n-Hexanfraktion wiedergefunden (Elutionsfolge A). Beim erwähnten Extraktionsversuch (**Tab. 15**) wurde ein geringerer Anteil von PC in n-Hexan festgestellt. Folglich wurde diese Komponente nur in Spuren in den n-Hexaneluaten nachgewiesen. Eine bessere Verteilung in DCM wurde bereits unter **3.4 (Tab. 15)** gezeigt; dies konnte durch die hier ermittelten Ergebnisse bestätigt werden. Aufgrund des amphiphilen Charakters des Polarlipides weist es ebenfalls eine gesteigerte Löslichkeit in MeOH auf, wodurch beträchtliche Mengen in den Methanolfractionen gefunden wurden ($P'_{\text{MeOH}} = 6,6$). Die Wiederfindungen des Triacylglycerols bei Anwendung von Elutionsfolge B machen deutlich, dass diese Lipidklasse eine vergleichsweise niedrige Löslichkeit in MeOH besitzt. Cholesterin hingegen scheint eine Lösungsaffinität zu allen 3 Lösungsmitteln zu besitzen. Die hydrophobe Verbindung weist aufgrund der Hydroxylgruppe eine gesteigerte Polarität auf, was die Löslichkeit in DCM und MeOH erklärt. Generell muss MeOH jedoch als geeignetes Lösungsmittel ausgeschlossen werden, da bei Elutionsfolge B bei den meisten Lipidklassen eine Aufteilung der Komponenten (teilweise zu stark ähnlichen Anteilen) auf beide Methanolfractionen ersichtlich wurde (z. B. LL, PC, Chol).

Tabelle 17. Wiederfindungen der Standardlipide innerhalb der einzelnen Lösungsmittelfractionen bei Anreicherung der Komponenten auf der C₁₈-Glaskartusche (Bondesil)

Elutionsfolge A		Wiederfindung [%]				
Lösungsmittelfraktion	LL	PC	TAS	AB	Sq	Chol
n-Hexan 1	79,6	5,8	87,8	86,5	83,6	31,8
n-Hexan 2	1,8	3,9	2,7	1,5	0,8	41,7
DCM 1	18,6	37,2	9,5	12	15,6	26,5
DCM 2	0	6,6	0	0	0	0
MeOH 1	0	30,1	0	0	0	0
MeOH 2	0	16,4	0	0	0	0
Elutionsfolge B		Wiederfindung [%]				
Lösungsmittelfraktion	LL	PC	TAS	AB	Sq	Chol
MeOH 1	39,8	41,2	2,5	1,2	5,1	47,4
MeOH 2	55,8	32,4	0	1,5	0,9	49,5
DCM 1	4,4	13,7	97,5	97,3	94	3,1
DCM 2	0	8,5	0	0	0	0
n-Hexan 1	0	0	0	0	0	0
n-Hexan 2	0	4,2	0	0	0	0

Weder mit n-Hexan noch mit Methanol konnte die Gesamtheit der Standardlipide in den jeweils ersten Lösungsmittelfractionen vereint werden (**Tab. 17**). Aus diesem Grund wurde die Elution für die folgenden Versuche mit DCM (Polarität zwischen n-Hexan und MeOH; Elutionsfolgen C und D) begonnen. Ziel war das Finden eines optimalen Elutionsmittels, dessen Einsatz in der Einsparung möglichst vieler Elutionsschritte und einer damit verbundenen Lösungsmittel- und Zeitreduzierung resultieren sollte.

Die Adsorptionseffizienz des C₈-Sorbens für die Standardlipide (ohne Probenansäuerung) war größer als jene des C₁₈-Sorbens, was in höheren Wiederfindungen der Komponenten in den SPE-Lösungsmitteluaten resultierte (**Anhang C7**).

Die Wahl von DCM als 1. Elutionsmittel veränderte das Elutionsprofil im Vergleich zur Beprobung des C₁₈-Sorbens deutlich. Der kurzkettige Wachsester LL konnte zu einem Großteil in der 1. Dichlormethanfraktion wiedergefunden werden (Elutionsfolge C: 81 %, Elutionsfolge D: 95 %; bezogen auf die Gesamtwiederfindung des von der Kartusche eluierten LL), die 2. Fraktion beinhaltete kein LL. Durch Elutionsfolge C konnte in der 1. n-Hexanfraktion ebenfalls eine beträchtliche Menge des Wachsesters detektiert werden (16 %, keine Wiederfindung in n-Hexanfraktionen bei Elutionsreihenfolge D), in den Methanolfraktionen hingegen nur Spuren. PC zeigte bei beiden Versuchen abermals eine Aufteilung auf nahezu alle Lösungsmittelfractionen. Besonders innerhalb der 1. Methanolfraktionen konnten große Mengen des Polarlipids wiedergefunden werden. Dementsprechend musste DCM als ideales Elutionsmittel für dieses Lipid ausgeschlossen werden. Die Wiederfindungen des TAS wiesen zwischen beiden Versuchen recht unterschiedliche Werte auf. Dementsprechend schwankten auch die Zusammensetzungen der einzelnen Lösungsmittelfractionen, jedoch wurde ein Großteil ebenfalls in der 1. Dichlormethanfraktion detektiert (Versuch C: 76 %, Versuch D: 98 %; bezogen auf die Gesamtwiederfindung des von der Kartusche eluierten TAS). Die Standardlipide Squalan und Cholesterol wurden nahezu vollständig in der 1. DCM-Fraktion wiedergefunden; lediglich bei Elutionsfolge D fanden sich Spuren an Cholesterol in der 2. DCM- sowie beiden Methanolfraktionen. Auch bei Arachidylbehenat stellte sich DCM als effektivstes Elutionsmittel heraus (lediglich geringe Konzentrationen in n-Hexanfraktionen bei Elutionsfolge C).

Bei den Sorbenstypen PPL und NH₂ wurden ebenfalls die Elutionsfolgen C und D getestet (**Anhänge C8+C9**).

Die vom PPL-Sorbens zurückgehaltenen Komponenten waren geringer als bei den bereits beschriebenen Kartuschentypen C₈ und C₁₈. Alle Standardlipide, mit Ausnahme von PC, zeigten die größten Wiederfindungen in der 1. Dichlormethanfraktion. PC verteilte sich auf alle Lösungsmittelfractionen.

Die vom Aminopropylsorbens eluierten Standardlipide zeigten bei den Gesamtwiederfindungen zwischen den beiden Versuchen mit Elutionsfolge C und D lediglich vernachlässigbare Unterschiede. Verglichen mit den anderen Sorbenzien wurden hier die größten Mengen an Standardlipiden zurückgehalten. Die größten Analytmengen wurden auch hier durch die 1. Dichlormethanfraktion eluiert. Lediglich PC wurde außerdem in beträchtlicher Menge in der 1. Methanolfraktion detektiert.

Die im Zuge dieser Arbeit getesteten Elutionsfolgen führten zu der Erkenntnis, dass DCM für eine Extraktion komplexer Lipidgemische das geeignete Elutionsmittel darstellt. Die hier verwendeten Standardlipide deckten einen großen Polaritäts- und damit Löslichkeitsbereich von Lipidverbindungen ab. Alle Komponenten wiesen eine Löslichkeit in diesem organischen LM auf. Da MeOH das größte Lösungsvermögen für PC zeigte, ist eine Elution mit diesem zur Erfassung von Polarlipiden ebenfalls notwendig. Der Einsatz von n-Hexan führte lediglich zur Elution geringer Mengen der Standardlipide, so dass die Elution mit diesem Lösungsmittel nicht erforderlich ist.

3.5.2 Extraktionseffizienzen mit Ansäuerung

Die wässrigen Lipidlösungen wurden vor der Extraktion auf pH 2 angesäuert und zunächst mit DCM, dann mit MeOH und letztlich mit n-Hexan eluiert (Elutionsfolge D).

Die Ansäuerung der Lipidlösungen führte bei allen 4 Sorbentstypen zu einer deutlichen Steigerung an adsorbierten Lipiden (C_{18} : **Tab. 18**, C_8 : **Anhang C10**, PPL: **Anhang C11**, NH_2 : **Anhang C12**). Bei allen Komponenten des Lipidstandardgemisches wurde offensichtlich eine Zunahme der Adsorptionsaffinität zum Sorbens erreicht.

Tabelle 18. Wiederfindungen der Standardlipide (mit Ansäuerung) bei Anreicherung der Komponenten auf der C_{18} -Glaskartusche (Bondesil)

Elutionsfolge D	Wiederfindung C_{18} [%]				
	Kartusche	Permeatwasser (FFE)	Probenflasche	Permeatflasche	Gesamt
LL	66,4	1,2	5,7	0	73,3
PC	96,1	30,9	8,9	0,9	136,8
TAS	80,8	0	11,3	0	92,1
AB	72,3	0	11,5	0	83,8
Sq	108,3	0	6,7	0	115,0
Chol	138,6	0	7,4	0	146,0

Die hydrophoben Wechselwirkungen, welche primär bei unpolaren Sorbenzien auftreten, werden durch Dipol-Dipol-Interaktionen der Umgebung gesteuert, die zu einem höheren Ordnungsgrad in der Matrix führen. Durch die molekularen Wechselwirkungen werden hydrophobe Moleküle dazu gebracht, sich aneinanderzulagern. Nach Herstellerangaben (Agilent Technologies) ist eine durch den niedrigen pH-Wert bedingte Protonierung der Matrix denkbar. Diese könnte in einer vereinfachten und somit verstärkten Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen oder Dipol-Dipol-Interaktionen resultieren. Dadurch könnten hydrophobe Ankopplungen unterstützt werden. Durch eine Modifizierung der Sorbenseigenschaften aufgrund der pH-Wert-Senkung ist das Adsorptionspotenzial der Substanzen tendenziell stärker ausgerichtet. Beim polaren NH_2 -Sorbens ist der Effekt dementsprechend geringer, da unpolare Wechselwirkungen hierbei von untergeordneter Natur sind (**Anhang C12**).

Die Steigerung der Adsorptionseffizienz der Lipidverbindungen durch die Ansäuerung der Standardlösung bei Nutzung des C_{18} -Sorbens wird durch **Abbildung 20** veranschaulicht. Die Wiederfindungen der Lipide ohne Ansäuerung der Lösung stellen die gemittelten Werte der Elutionsfolgen A und B dar (**Tab. 16**).

Einige Komponenten (Sq, Chol, **Tab. 18**) zeigten bei der Extraktion der angesäuerten Lösung Wiederfindungen über 100 %. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in einer fehlerhaften Herstellung der wässrigen Lipidlösungen liegen. Die Standardlipide wurden mittels Hamilton-Spritze der Stammlösung des Lipidstandardgemisches entnommen und in die Glasflaschen überführt. Hierbei könnte es zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Lipidkomponenten infolge einer unzureichenden

Durchmischung der Stammlösung vor der Entnahme gekommen sein, die in einer unterschiedlichen Konzentration der Verbindungen in der wässrigen Lipidlösung resultierte.

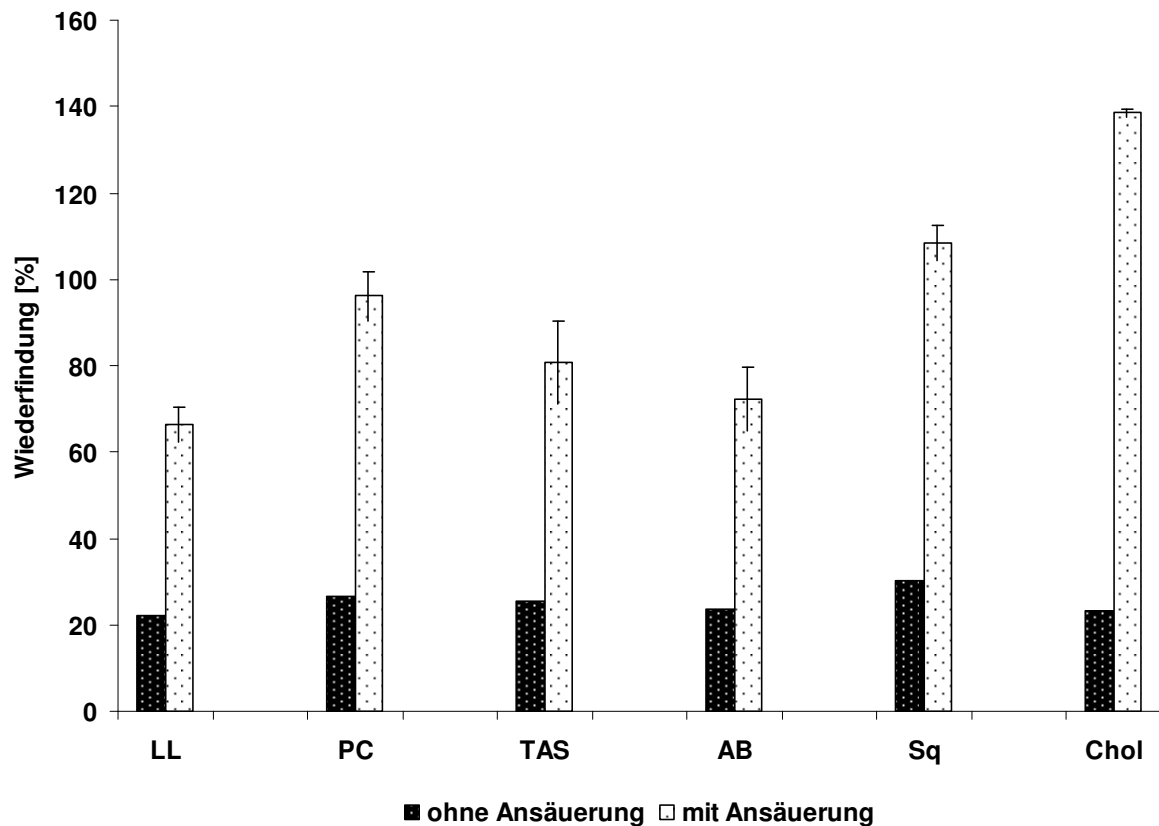


Abbildung 20. Differenzen zwischen den Wiederfindungen mit/ohne Ansäuerung der Standardlösung bei Anreicherung der Komponenten auf der C₁₈-Glaskartusche (Bondesil).

Aufgrund der signifikanten Steigerung der Wiederfindungen aller Komponenten des Lipidstandardgemisches wurden für die weiteren Versuche mit künstlichem Meerwasser sowie der natürlichen Wasserprobe die Lipidlösungen ebenfalls angesäuert.

3.5.3 Extraktionseffizienzen bei künstlichem Meerwasser

Für die Herstellung eines meerwasseräquivalenten Salzgehalts wurden die Standardlösungen mit 3,5 % NaCl angereichert. Außerdem wurden diese vor der Extraktion auf pH 2 angesäuert.

Da durch die Verwendung des C₁₈-Sorbens bei den Vorversuchen ein Großteil der Standardlipide von der Kartusche zurückgehalten werden konnte, wurde dieses Sorbensmaterial für die Beprobung mit künstlichem Meerwasser gewählt (Tab. 19). Außerdem wurde das vorwiegend über polare Wechselwirkungen agierende Aminopropylsorbens getestet (Anhang C13). Die adsorbierten Komponenten des Lipidstandards konnten in einer vergleichbaren Größenordnung bei beiden Sorbenzien wiedergefunden werden (ähnliche Werte der Doppelbestimmungen; nicht gezeigt). Die Wiederfindungen der angesäuerten Lipidlösungen ohne Salzzugabe lagen in einem ähnlichen Bereich, so dass ein Einfluss des Salzes auf das Adsorptionsverhalten der Standardlipide nicht ersichtlich wurde.

Tabelle 19. Wiederfindungen der Standardlipide (mit Ansäuerung, mit 3,5 % Salz) bei Anreicherung der Komponenten auf der C₁₈-Glaskartusche (Bondesil)

Elutionsfolge D	Wiederfindung C ₁₈ [%]				
	Kartusche	Permeatwasser (FFE)	Probenflasche	Permeatflasche	Gesamt
LL	57,1	1,9	0	0	59,0
PC	83,4	8,2	3,7	3,8	99,1
TAS	91,3	0	3,6	0	94,9
AB	68,1	0	2,7	0	70,8
Sq	93,9	0	1,9	0	95,8
Chol	137,6	0	0,8	0	138,4

Wie bereits erwähnt, besitzen organische Komponenten in wässrigen Salzlösungen im Allgemeinen eine geringere Löslichkeit als in reinem Wasser. Beschrieben wird dies durch den so genannten Aussalzeffekt (Xie et al., 1997). Davon ausgehend könnte mit einer höheren Wiederfindung der Komponenten im Permeatwasser gerechnet werden. Dies konnte allerdings beim Vergleich mit der angesäuerten Probe ohne Salzzugabe nicht festgestellt werden.

Untersuchungen des Einflusses der Salinität des Wassers auf die Isolierung von DOM über SPE-Kartuschen mit C₁₈-Sorbens von Kruger et al. (2011) zeigten eine Veränderung der Anreicherungseffektivität aufgrund des Vorhandenseins gelöster Ionen. Die Wiederfindungsraten des organischen Materials variierten stark und der Einfluss der Ionenstärke schien abhängig von der Herkunft und Zusammensetzung des DOM zu sein.

Um eine eindeutige Aussage über das Vorhandensein eines Einflusses des Salzgehalts auf die Anreicherung von Lipiden machen zu können, müssen die hier ermittelten Ergebnisse durch weitere Versuchsreihen ergänzt werden.

3.5.4 Effizienzvergleich der Sorbenzien

Keines der getesteten Sorbenzien war in der Lage, die Standardlipide ohne Ansäuerung der wässrigen Lösungen gänzlich auf dem Sorbens zurückzuhalten. Nach Herstellerangaben (Agilent Technologies) besitzen kieselgelbasierte Materialien (C₈, C₁₈) eine Kapazität zwischen 1 und 5 % der Sorbensmasse, d. h. zwischen 2 und 10 mg Analyten können adsorbiert werden. Bei Polymermaterialien, wie PPL, kann diese sogar bis zu 10 % der Sorbensmasse betragen. Die eingesetzten Mengen an Standardlipiden von je 50 µg führten demnach nicht zu einer Überlastung der Materialien. Die geringen SPE-Wiederfindungen ohne Ansäuerung der Lipidlösungen können durch unzureichende Wechselwirkungskräfte zwischen den Analyten und den Sorbensmaterialien erklärt werden. In vielen Fällen wurden die Komponenten des Lipidstandards lediglich unvollständig in den verschiedenen Stationen des Festphasenextraktionssystems (Kartusche, FFE-Extrakt des Permeatwassers, Proben- und Permeatflasche) wiedergefunden, d. h. die Gesamtwiederfindung war ungleich 100 %. Dies unterstützt die Annahme einer ungenügenden Adsorption der Verbindungen. Denkbar wäre allerdings auch ein Verbleiben der in der Bilanz fehlenden Anteile auf dem Sorbensbett, was auf eine irreversible Adsorption hinweisen würde. In Betracht gezogen werden kann ebenso die

Tatsache, dass die verwendeten Kartuschen aus Glasmaterialien aufgebaut waren; auch hier kann es zu Adsorptionsvorgängen gekommen sein (keine Untersuchung der Kartuschen).

Durch die Ansäuerung der Lipidlösungen auf pH 2 wurde bei allen Sorbenzien eine signifikante Steigerung der Interaktionen erreicht. Die Erniedrigung des pH-Wertes könnte zu einer Aufhebung der irreversiblen Adsorption der Verbindungen geführt haben.

Generell zeigten die beiden Wachsester (LL, AB) die niedrigsten SPE-Wiederfindungen. Bei PC und TAS konnte kein einheitliches Adsorptionsmuster erkannt werden. Hier variierten die Werte bei Verwendung des gleichen Sorbensmaterials teils erheblich.

In vielen Veröffentlichungen werden die Wiederfindungen von über Festphasenextraktion angereicherter Lipidverbindungen mit Werten über 90 % angegeben. Hamilton & Comai (1988) konnten die auf Silikasorbenzien adsorbierten Komponenten (Neutral- und Polarlipide) zwischen 96 und 99 % wiederfinden. Die Komponenten von Standardlipidmixturen (u. a. Cholesterol, TAG, PL) wurden ebenfalls von Kaluzny et al. (1985) nahezu vollständig in den Lösungsmitteluaten detektiert (> 95 %). Bateman & Jenkins (1997) konnten ca. 40 % der Polarlipide mikrobieller Kulturen von einer NH₂-Kartusche eluieren; Neutrallipide wurden zu ca. 95 % wiedergefunden. Ein direkter Vergleich dieser Daten mit den im Zuge dieser Arbeit produzierten ist jedoch schwer möglich, da jeweils mit verschiedenen Matrizen und Elutionsmitteln gearbeitet wurde.

Letztendlich konnte gezeigt werden, dass alle hier getesteten Sorbensmaterialien zur Anreicherung von Lipidverbindungen geeignet sind. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode sind weiterführende Versuchsreihen erforderlich.

3.5.5 Effizienzvergleich Festphasenextraktion ↔ Flüssig-Flüssig-Extraktion

Für den qualitativen und quantitativen Vergleich zwischen jenen Lipidverbindungen, die durch SPE angereichert werden können und den Komponenten, die über FFE gewonnen und detektiert werden können, wurden zu 1 L der Meerwasserprobe je 50 µg der Standardlipide addiert (6STD).

Der nach 30-minütiger FFE-Aufarbeitung mit DCM gewonnene Rohextrakt wurde zunächst underivatisiert über HPLC analysiert. Hierbei konnten lediglich die Standardlipide detektiert werden. Da die nach der Derivatisierung über GC detektierbaren Fettsäuren aus Lipidverbindungen stammen können, die auch im Lipidstandard vorhanden sind, kann es hierbei zu einer Überlagerung zwischen einer Standardkomponente und einer im Meerwasser enthaltenen äquivalenten Verbindung gekommen sein.

Der Vergleich der Wiederfindungen der Standardlipide der flüssig-flüssig-extrahierten Meerwasserprobe sowie der von den Kartuschen eluierten Standardkomponenten (Doppelbestimmung, **Tab. 25**) zeigt, dass die meisten Verbindungen durch beide Methoden in einer äquivalenten Größenordnung wiedergefunden wurden (**Tab. 20**). Daraus kann abgeleitet werden, dass die Festphasenextraktion eine mit der FFE vergleichbare Extraktionseffizienz hinsichtlich der

Lipidverbindungen aufweist. Da die SPE mit deutlich geringeren Lösungsmittelmengen auskommt, ist sie für diese Extraktionsproblematik zu bevorzugen.

Tabelle 20. Wiederfindungen der Standardlipide bei SPE und FFE. SPE: Elution der Komponenten von der C₁₈-Glaskartusche (Bondesil) mit Ansäuerung der Probe (Doppelbestimmung)

Standardlipid	Wiederfindung [%]		
	FFE	SPE 1	SPE 2
LL	50,4	81,8	63,8
PC	35,2	37,6	98,4
TAS	67,1	48,6	83,3
AB	63,5	63,9	72,5
Sq	79,8	75,7	93,9
Chol	104,3	79,4	109,8

Die Konzentrationen der durch die beiden verschiedenen Extraktionsverfahren innerhalb der Meerwasserproben detektierten Fettsäuren und Sterolverbindungen, die nicht im Lipidstandardgemisch enthalten waren, konnten direkt verglichen werden (**Tab. 21**). Dabei wurden die Gehalte aller Eluate der Festphasenextraktion addiert. Die meisten FAME konnten hierbei durch SPE in höheren Konzentrationen bestimmt werden. Durch das Spülen der FFE-Probenflasche mit DCM wurden lediglich Spuren der Fettsäure 15:0 detektiert.

Tabelle 21. Quantitativer Vergleich der durch FFE und SPE extrahierten Lipidverbindungen der Meerwasserprobe, (n. q. = nicht quantifizierbar)

Komponente	Konzentration [µg/L]	
	SPE	FFE
13:0	-	0,021
14:0	0,652	0,029
15:0	0,132	0,070
16:1 (n-7) cis	0,812	0,098
17:0	0,035	0,046
Beta-Sitosterol	0,657	0,193
Stigmastanol	n. q.	0,254

Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde lediglich ein Lösungsmittel verwendet (DCM), bei der Festphasenextraktion hingegen wurden die zuvor angereicherten Lipide mit verschiedenen Lösungsmitteln von der Kartusche eluiert. Wie in den Vorversuchen deutlich wurde, zeigen vor allem polare Lipide eine gesteigerte Löslichkeit in MeOH. Um die Extraktionseffizienz bzw. das Spektrum der extrahierten Substanzen bei der FFE zu erhöhen, wären weitere Extraktionsschritte mit anderen Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität denkbar.

3.6 Festphasenextraktion (SPE) natürlicher Meerwasserproben

Die im Juli 2012 aus der Nordsee gewonnene Meerwasserprobe (16,8 °C, Leitfähigkeit: 47,8 mS/cm, Salinität: 30,7 PSU) wurde zunächst unter der Verwendung eines Glasfaserfilters (0,7 µm) filtriert. Die Möglichkeit der Adsorption von Lipidverbindungen an das Filtermaterial wurde bereits unter **3.2** erwähnt. Da keine Untersuchung des Filterpapiers bzw. des Filterkuchens vorgenommen wurde, kann über den darin enthaltenen Lipidanteil keine Aussage getroffen werden. Dementsprechend kann die tatsächliche Lipidzusammensetzung von der hier dargestellten sowohl qualitativ als auch quantitativ abweichen.

Es wurden Versuche mit und ohne Addition des Lipidstandards zur natürlichen Meerwasserprobe durchgeführt. Die vor und nach der Ansäuerung der Proben gemessenen pH-Werte lagen bei 7,4-7,6 und 2,0-2,1. Der pH-Wert von Meerwasser nimmt laut Literaturangaben Werte zwischen 7,2 und 8,2 (Brown et al., 2005) in Abhängigkeit von der Kohlendioxidkonzentration und anderer Faktoren ein.

Die folgende Tabelle stellt die theoretischen Konzentrationen der Lipidverbindungen des Lipidstandardgemisches an gelöstem Kohlenstoff sowie die zu erwartende Gesamtkonzentration C dar. Da sich der PC-Standard aus verschiedenen Fettsäuren zusammensetzt (**Abb. 18**), wurde für die Berechnung von einem gemittelten Molekulargewicht, entsprechend der vorhandenen Fettsäuren, ausgegangen.

Tabelle 22. Theoretische DOC-Konzentrationen der Standardlipide (6STD) bei Zugabe zur Meerwasserprobe

Standardlipid	Konzentration [µM C]
Arachidylbehenat	3,4
Cholesterol	3,5
Lauryllaurat	3,3
L-α-Phosphatidylcholin	2,8
Squalan	3,6
Triarachinsäure	3,2
	19,8

Die Differenz des Kohlenstoffgehalts (16,4 µM C) zwischen den Meerwasserproben mit und ohne Standardlipiden (jeweils Mittelwert aus Doppelbestimmung) korreliert annähernd mit dem errechneten Wert von 19,8 µM C, der sich aus den Kohlenstoffgerüsten der Standardlipide zusammensetzt (**Tab. 23**). Die Abweichung kann mit der Adsorptionsaffinität der Lipidverbindungen zur Glaswand der Probenflasche bzw. Probenröhrchen erklärt werden.

Tabelle 23. DOC- und DON-Konzentrationen der filtrierten Meerwasserprobe mit/ohne Standardlipide vor der Festphasenextraktion

Meerwasserprobe	DOC [$\mu\text{M C}$]	DON [$\mu\text{M N}$]
ohne Standardlipide	102,5	28,1
mit Standardlipiden	118,9	27,8

Die Werte der Kohlenstoff- und Stickstoffkonzentrationen der Meerwasserproben nach der Festphasenextraktion (= Permeatwasser) variieren, besonders jene der Kohlenstoffkonzentrationen, sehr stark (**Tab. 24**). Hierbei sind jeweils beide Werte aus der Doppelbestimmung der Proben mit und ohne Standardlipide angegeben. Da für die Festphasenextraktion des Meerwassers ausschließlich gereinigte Materialien (Sorbens, Fritten) sowie Glassäulen eingesetzt wurden (Gesamtkontaminationen vernachlässigbar, **Anhang C4**), ist die Wahrscheinlichkeit der Herkunft der für die hohen Kohlenstoffkonzentrationen verantwortlichen Substanzen aus dem Kartuschensystem sehr gering. Allerdings kann es sich bei den gelösten Kohlenstoffverbindungen auch um solche Komponenten handeln, die aufgrund eines hohen Molekulargewichtes und/oder stark polarer Eigenschaften nicht mittels GC detektierbar sind und somit nicht als Teil des Kartuschenblindwertes identifiziert werden konnten. Das für die Konditionierung der Kartuschen eingesetzte MeOH kann einen wesentlichen Einfluss auf die Kohlenstoffzusammensetzung der Proben ausüben. Möglicherweise ist das zur Entfernung des MeOH nach der Konditionierung eingesetzte Volumen von 2 Säulenfüllungen (6 mL) Reinstwasser nicht ausreichend, um das Lösungsmittel vollständig zu entfernen. Durch die sich anschließende SPE des Probenwassers könnten die Reste des MeOH mit dem Wasser über die Kartuschen in die Glasflaschen transportiert werden, die dem Auffangen des Permeatwassers dienen. Des Weiteren ist das Schlauchsystem der Festphasenextraktionseinheit (**Abb. 8**) als potentielle Verunreinigungsquelle denkbar (keine Blindwertbestimmung). Aus diesem Grund kann anhand der Werte keine Aussage über die Menge der von der Kartusche zurückgehaltenen Kohlenstoffverbindungen aus dem Probenwasser gemacht werden.

Tabelle 24. DOC- und DON-Konzentrationen der filtrierten Meerwasserprobe mit/ohne Standardlipide nach der Festphasenextraktion

Meerwasserprobe	DOC [$\mu\text{M C}$]	DON [$\mu\text{M N}$]
ohne Standardlipide 1	252,2	22,0
ohne Standardlipide 2	806,3	38,1
mit Standardlipiden 1	146,8	27,8
mit Standardlipiden 2	281,7	30,9

3.6.1 mit Standardlipiden

Zur Analyse der Standardlipide in Umgebung der komplexen Meerwassermatrix wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem zu 1 L Meerwasser je 50 μg der 6 Standardlipide (6STD) addiert wurden. Dies entspricht in etwa der Hälfte der Kohlenstoffmenge des Tiefseewassers (40 $\mu\text{M C}$).

Die von den C₁₈-Kartuschen eluierten Komponenten des Lipidstandardgemisches aus der Meerwasserprobe wiesen bei den Doppelbestimmungen überwiegend uneinheitliche Werte auf (**Tab. 25**). Besonders bei PC und TAS differierten die Wiederfindungen erheblich.

Tabelle 25. Wiederfindungen der Standardlipide (mit Ansäuerung der Meerwasserprobe) bei Anreicherung der Komponenten auf der C₁₈-Glaskartusche (Bondesil)

Bestimmung 1	Wiederfindung C₁₈ [%]				
Standardlipid	Kartusche	Permeatwasser (FFE)	Probenflasche	Permeatflasche	Gesamt
LL	81,8	0,2	4,9	0,3	87,2
PC	37,6	10,1	7,3	2,1	57,1
TAS	48,6	0	8,0	0	56,6
AB	63,9	0,1	6,9	0	70,9
Sq	75,7	0,2	4,2	0	80,1
Chol	79,4	0,4	2,7	0	82,5
Bestimmung 2	Wiederfindung C₁₈ [%]				
Standardlipid	Kartusche	Permeatwasser (FFE)	Probenflasche	Permeatflasche	Gesamt
LL	63,8	0,2	3,8	0	67,8
PC	98,4	17,1	15,6	1,3	132,4
TAS	83,3	0	10	0	93,3
AB	72,5	0	7,5	0	80,0
Sq	93,9	0,1	4,2	0	98,2
Chol	109,8	0	1,7	0	111,5

Die Meerwasserproben wurden einem 60 L Tank entnommen. Denkbar ist eine unterschiedliche Zusammensetzung der Unterproben, was die Standardlipide verschiedenartig beeinflusst haben könnte. So kann nach Untersuchungen von Hasset & Anderson (1979) die Anwesenheit hydrophiler, organischer Substanzen in Abhängigkeit von der Konzentration im Meerwasser, Auswirkungen auf die Löslichkeit von Lipiden haben. Für deren Experimente wurden die Wiederfindungen radioaktiv markierten Cholesterols aus destilliertem Wasser sowie Flusswasser aus Flüssig-Flüssig-Extraktionen verglichen. Hierbei wurde festgestellt, dass die Wiederfindung des Sterols aus Flusswasser deutlich niedriger war als jene aus dest. Wasser. Durch die Zerstörung der organischen Verbindungen des Flusswassers mittels UV-Bestrahlung konnte eine dem dest. Wasser äquivalente Wiederfindung erreicht werden. Dies ließ darauf schließen, dass organisches Material in der Lage ist, hydrophobe Komponenten im Wasser zu binden und deren Affinität für die aquatische Phase zu steigern. So könnte eine unterschiedliche Zusammensetzung der filtrierten Meerwasserproben zur Bildung verschiedenartiger Komplexe mit den Standardlipiden geführt haben, die durch die damit einhergehenden Molekülveränderungen andersartige Adsorptionscharakteristika aufwiesen. Beim Vergleich der von der C₁₈-Kartusche eluierten Standardlipide des angesäuerten Reinstwassers und

jener der angesäuerten Meerwasserprobe konnten ähnliche Konzentrationen gemessen werden. Jedoch ist der Anteil des PC in Reinstwasser, der durch FFE des Permeatwassers bestimmt wurde, mit 30,9 % deutlich höher als jener, der in den Extrakten der Meerwasserproben ermittelt wurde (Versuch 1: 10,1 %, Versuch 2: 17,1 %). Dies könnte darauf hinweisen, dass die Anwesenheit gelöster organischer Verbindungen in der Meerwasserprobe zu einer gesteigerten Adsorption des Polarlipids an der aquatischen Matrix geführt hat. Dies könnte in einer geringeren Wiederfindung der Verbindung im für die FFE eingesetzten DCM resultiert haben.

Trotz zum Teil stark unterschiedlicher Wiederfindungswerte, vor allem bei PC und TAS, waren die Verteilungen innerhalb der Lösungsmittelfractionen vergleichbar (**Abb. 21+22**). Bei den Wiederfindungen wurde sich auf die von der Kartusche eluierten Lipide bezogen, die jeweils 100 % gesetzt wurden. Der Hauptteil der von der Kartusche adsorbierten Lipidkomponenten wurde jeweils mit der 1. Dichlormethanfraktion eluiert. Eine Ausnahme bildete hierbei bei beiden Versuchen das PC. Hierbei konnte eine Verteilung des Polarlipids auf nahezu alle Lösungsmittelfractionen beobachtet werden, was auf eine suboptimale Löslichkeit in DCM hinweist.

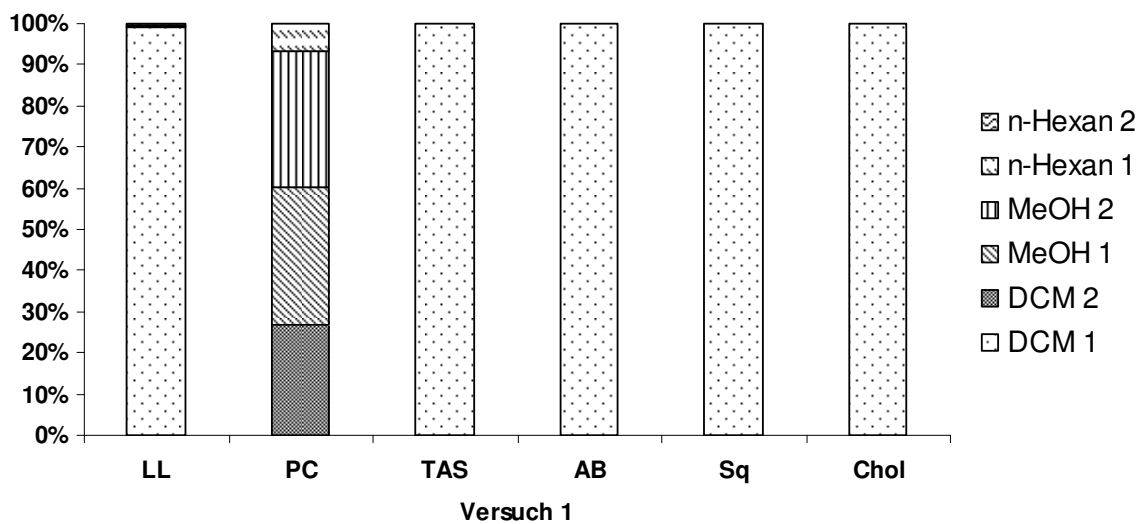


Abbildung 21. Verteilung der Wiederfindungen der Standardlipide in der Meerwasserprobe auf die einzelnen Lösungsmittelfractionen (Versuch 1) bei Anreicherung der Komponenten auf der C₁₈-Glaskartusche (Bondesil).

Im Gegensatz zur 1. Bestimmung wurde bei Versuch 2 ein Großteil des PC bereits in der 1. Dichlormethanfraktion wiedergefunden.

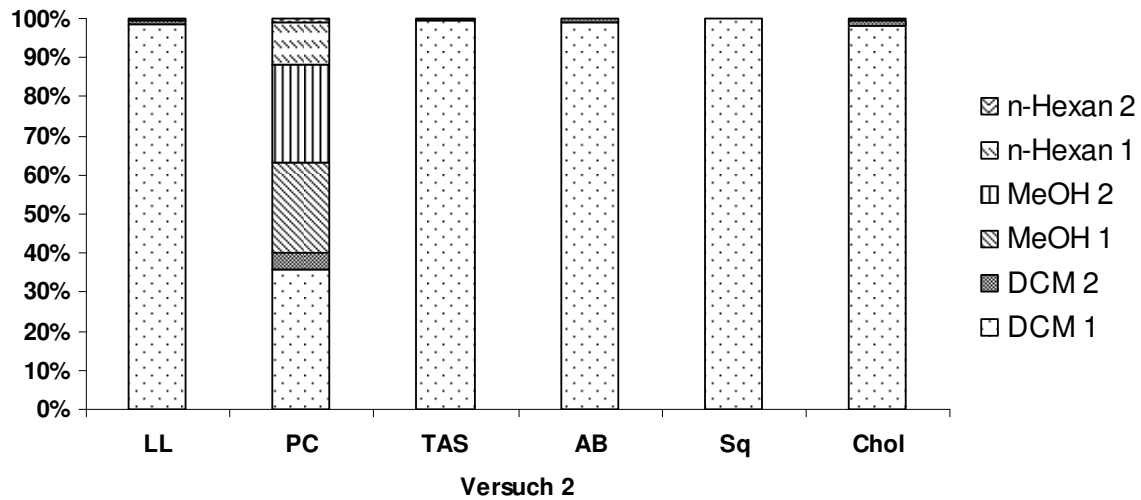


Abbildung 22. Verteilung der Wiederfindungen der Standardlipide in der Meerwasserprobe auf die einzelnen Lösungsmittelfractionen (Versuch 2) bei Anreicherung der Komponenten auf der C_{18} -Glaskartusche (Bondesil).

Beim Vergleich der Wiederfindungen der Komponenten des Lipidstandards in den wässrigen Lösungen verschiedener Eigenschaften, die über C_{18} -Kartuschen extrahiert wurden, wird ersichtlich, dass die Ansäuerung der Lösungen den größten Einfluss auf die Adsorptionseffizienzen der Verbindungen ausübte (**Abb. 23**). Die Wiederfindungen der Komponenten aus Reinstwasser mit Ansäuerung sowie aus künstlichem sowie natürlichem Meerwasser, das ebenfalls angesäuert wurde, waren signifikant höher als jene der unangesäuerten Lipidlösung. Ein eindeutiger Trend der Beeinflussung der Extraktionseffizienzen durch den Salzgehalt oder die Anwesenheit gelöster Substanzen der Meerwassermatrix ist nicht erkennbar. Da die Werte innerhalb der Doppelbestimmungen teils stark variierten (siehe Standardabweichungen, **Abb. 23**) und für die SPE mit Ansäuerung der Lösung aus Reinstwasser lediglich ein Versuch durchgeführt wurde, muss die Reproduzierbarkeit der hier erzielten Ergebnisse untersucht und durch weitere Versuchsreihen gestützt werden.

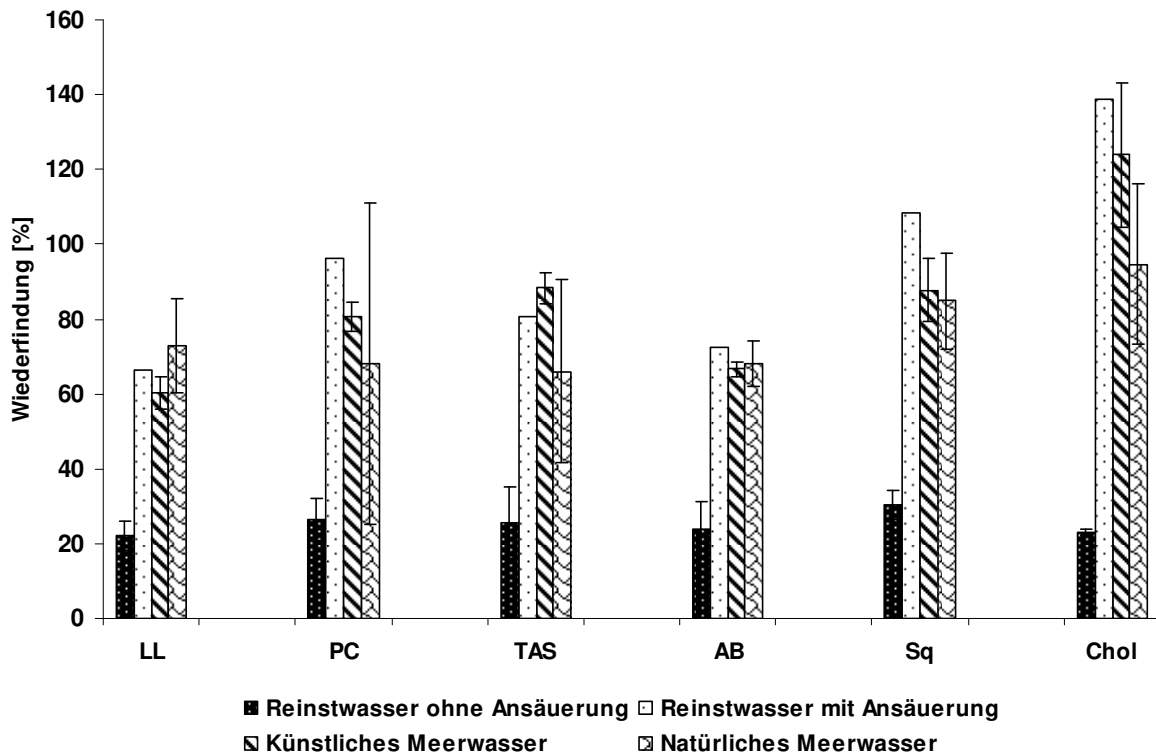


Abbildung 23. Wiederfindungen der Standardlipide in Reinstwasser mit/ohne Ansäuerung, künstlichem sowie natürlichem Meerwasser bei Anreicherung der Komponenten auf der C_{18} -Glaskartusche (Bondesil).

3.6.2 ohne Standardlipide

Die Untersuchung der Meerwasserprobe beinhaltete die Identifizierung und Quantifizierung der Fettsäuremethylester sowie Sterolverbindungen über die jeweiligen Standardmixturen (6STD, **Anhänge D1+D2**). Zur Bestimmung der Derivatisierungsprodukte aus den Veresterungs- und Silylierungsreagenzien wurde der interne Standard (500 ng) nach Veresterung sowie nach Silylierung gaschromatographisch getrennt, um eine eindeutige Zuordnung der Peaks zu den Lipidkomponenten der Probe zu gewährleisten (**Anhang C14**).

Die durch die Elution mit DCM, MeOH und n-Hexan gewonnenen Extrakte wurden zunächst underivatisiert über HPLC analysiert. Hierbei konnten keine Verbindungen detektiert werden, da die Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze des ELSD-Detektors angesiedelt waren.

Nach der Veresterung der Lösungsmittelleuate wurden diese gaschromatographisch aufgetrennt. Zur Erfassung der unveresterbaren Sterole wurden die Derivate im Anschluss silyliert und über GC-MS analysiert (**Abb. 24**: 1. Dichlormethanfraktion).

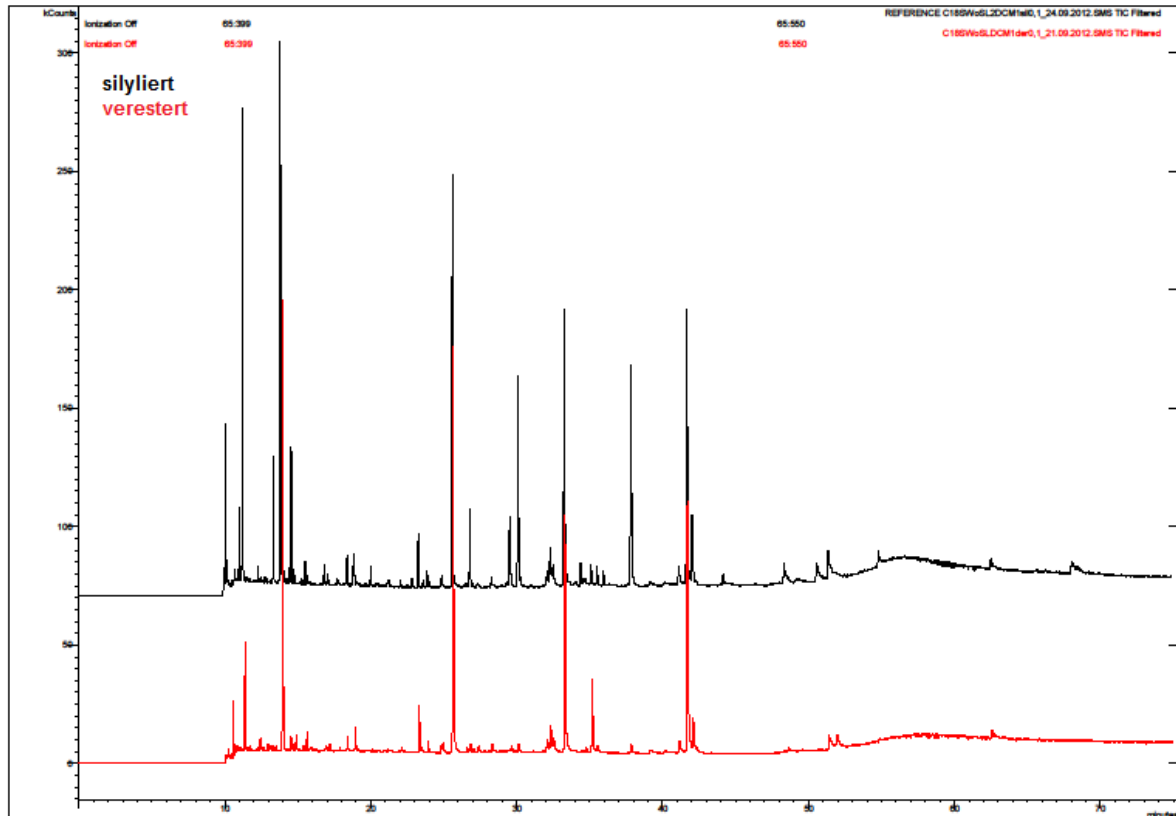


Abbildung 24. Komponenten der veresterten (rot) und silylierten (schwarz) 1. Dichlormethanfraktion der Meerwasserprobe bei Anreicherung der Komponenten auf der C_{18} -Glaskartusche (Bondesil).

Zur Quantifizierung der Fettsäuremethylester und Sterolverbindungen der 1. Dichlormethanfraktion wurden die silylierten Komponenten ausgewertet (**Tab. 26**, ebenso bei allen folgenden Auswertungen). Vergleiche mit der veresterten Probe lieferten äquivalente Ergebnisse.

Einige Komponenten konnten zwar identifiziert, aufgrund der Überlagerung mit anderen Verbindungen ähnlicher Retentionszeiten bzw. molekularer Eigenschaften oder sehr niedriger Konzentrationen jedoch nicht quantifiziert werden. Es wird ersichtlich, dass das aus den 6 Standardlipiden zusammengesetzte und für die Vorversuche verwendete Lipidstandardgemisch einen beträchtlichen Teil der im Meerwasser detektierten Verbindungen abdeckt (in Tabelle grau hinterlegt). Rot gekennzeichnet sind jene Verbindungen, die durch Peaküberlagerungen, grün gekennzeichnet jene, die aufgrund niedriger Konzentrationen nicht eindeutig quantifiziert (n. q.) werden konnten. Blau gekennzeichnet ist der interne Standard, der der Wasserprobe zugesetzt wurde (500 ng). Im oberen Teil der Tabelle finden sich die Fettsäuremethylester, im unteren die Sterole (Kennzeichnungen ebenso für folgende Tabellen).

Tabelle 26. FAME und Sterole der Meerwasserprobe in der 1. Dichlormethanfraktion bei Anreicherung auf der C₁₈-Glaskartusche (Bondesil)

Retentionszeit [min]	Komponente	c [µg/L]	c [µM C]
14,01	12:0	0,18	0,011
18,99	14:0	0,17	0,010
22,17	15:0	0,05	0,003
25,01	16:1 (n-7) cis	0,09	0,006
25,73	16:0	2,19	0,138
29,46	17:0	0,04	0,002
32,22	18:2 (n-6) cis	0,17	0,011
32,42	Σ18:1*	0,57	0,036
33,39	18:0	1,53	0,098
40,28	20:2 (n-6) cis, 20:1 (n-9) cis, 20:3 (n-6) cis	n. q.	n. q.
41,24	20:0	0,11	0,007
51,48	23:0	0,39	0,026
62,64	Cholesterol	0,06	0,004
68,20	Beta-Sitosterol	0,19	0,012
68,73	Stigmastanol	n. q.	n. q.
Gesamtkonzentration		5,74	0,364

* 18:1 (n-9) cis, 18:1 (n-7) cis

Der alle Lösungsmitteleluat umfassende, quantifizierbare Anteil der Lipidverbindungen belief sich auf insgesamt **14,66 µg/L Meerwasser (13,72 µg/L FAME, 0,94 µg/L Sterole)**. Dies entspricht einer Kohlenstoffkonzentration von insgesamt **1,0 µM**. Wie schon bei den Vorversuchen mit dem Lipidstandard beobachtet, fand sich auch hier der Großteil der identifizierten Verbindungen in der 1. Dichlormethanfraktion.

Unter Beachtung aller Lösungsmitteleluat (**Tab. 26, Anhang C15**), der durch Flüssig-Flüssig-Extraktion des Permeatwassers sowie durch Spülen der Proben- und Permeatflasche detektierten Verbindungen (**Tab. 27**), konnten insgesamt **21,34 µg** Lipidkomponenten (**20,21 µg/L FAME, 1,13 µg/L Sterole**) in 1 L Meerwasserprobe quantifiziert werden (beinhaltet 0,45 µg internen Standard).

Der interne Standard konnte sowohl in der 1. Dichlormethanfraktion zu 78 % sowie in der Probenflasche zu 12 % wiedergefunden werden.

Tabelle 27. FAME und Sterole der Meerwasserprobe in den SPE-Eluaten, dem Flüssig-Flüssig-Extrakt (FFE) des Permeatwassers sowie der Proben- und Permeatflasche

Komponente	c [µg/L] SPE-Eluate	c [µg/L] FFE Permeatwasser	c [µg/L] Probenflasche	c [µg/L] Permeatflasche
12:0	0,18	0,10	0,05	0,01
14:0	0,65	0,08	0,09	-
15:0	0,13	0,03	0,03	0,01
16:1 (n-7) cis	0,81	0,10	0,09	0,07
16:0	5,62	0,81	1,66	0,19
17:0	0,04	0,04	0,03	-
18:2 (n-6) cis	0,77	0,06	0,11	0,03
Σ18:1*	1,81	0,09	-	-
18:0	1,53	0,83	1,09	0,24
20:3 (n-6) cis	n. q.	n. q.	n. q.	n. q.
20:2 (n-6) cis	1,21	-	-	-
20:1 (n-9) cis	0,47	0,14	0,07	0,05
20:0	0,11	0,19	0,14	-
23:0	0,39	-	0,06	-
Cholesterol	0,28	-	0,03	0,02
Beta-Sitosterol	0,66	-	0,14	n. q.
Stigmastanol	n. q.	-	-	-
Gesamtkonzentration	14,66	2,47	3,59	0,62

*18:1 (n-9) cis, 18:1 (n-7) cis

Die durchgeführten Analysen erlaubten lediglich eine Quantifizierung der Fettsäuremethylester der in der Meerwasserprobe vorhandenen Lipidverbindungen. Die korrespondierenden Fettsäuren können sowohl als freie Fettsäuren, jedoch ebenso als veresterte Lipidverbindungen aus dem Probenwasser extrahiert worden sein. Über eine Herkunft der Komponenten bzw. über die Lipidklassenzusammensetzung der Meerwasserprobe kann aufgrund der Derivatisierung und der damit verbundenen Hydrolyse der Verbindungen keine Aussage getroffen werden. Des Weiteren wurden nur jene Verbindungen berücksichtigt, die mittels der verwendeten Standardmixturen identifiziert werden konnten (**Anhänge D1+D2**).

Die in den Methanolfractionen gefundenen Fettsäuren stammen möglicherweise von Polarlipiden, da die Fettsäuren des PC des Lipidstandardgemisches zu großen Teilen in den Methanolfractionen wiedergefunden wurden.

Die Menge der im Zuge dieser Arbeit quantifizierten Lipidverbindungen liegt mit 21,34 µg/L Meerwasser im unteren Bereich der von Gérin & Goutx (1994) ermittelten Konzentrationen zwischen 9 und 113 µg/L im Mittelmeer im Frühjahr. Deutlich höhere Werte wurden u. a. von Parrish (1987) mit 33-260 µg/L an der Atlantischen Westküste (Frühjahr) oder 49-190 µg/L in schottischen Gewässern (Frühjahr) gefunden (Parrish, 1988a). Derieux et al. (1998) ermittelten im späten Frühjahr

Lipidkonzentrationen zwischen 49 und 88 µg/L, Kennicutt & Jeffrey (1981) Werte zwischen 60 und 160 µg/L (nahe der Oberfläche) bzw. 61 und 116 µg/L (nahe des Bodens) im Golf von Mexiko. Wie bereits erwähnt, variieren die gemessenen Konzentrationen gelöster Lipide in Abhängigkeit vom Ort, der Tiefe und der Jahreszeit. Da die Tiefe der Probenahme der hier untersuchten Wasserprobe aus der Nordsee unbekannt ist, ist ein Vergleich mit entsprechenden Literaturdaten nicht möglich. Unterschiede zwischen den ermittelten Lipidkonzentrationen wurden auch in Abhängigkeit der Analysemethoden beobachtet. Kennicutt & Jeffrey (1981) gaben an, dass die gaschromatographisch bestimmten Konzentrationen durchschnittlich niedriger als die gravimetrisch bestimmten waren. Erklärt wird dies mit einer möglichen Salzmitführung innerhalb der Extrakte sowie der Anwesenheit nichtflüchtiger und damit mittels GC undetektierbarer Substanzen.

Lipide sind, wie bereits erwähnt, ubiquitär in der marinen Umgebung verbreitet; sie sind Teil aller Formen organischen Materials, lebendig und tot sowie partikulär und gelöst (Gérin & Goutx, 1994). Dementsprechend können die im Meerwasser gelösten Lipide verschiedener Herkunft sein.

Lipide bilden eine der 3 Hauptklassen organischen Materials in Algen und können hierbei einen Anteil zwischen 5 und 20 % ausmachen (Sun et al., 2002). Untersuchungen von Volkman (2003) zeigten, dass Sterole in Mikroalgen eine große Vielfalt hinsichtlich ihrer Struktur zeigen können. Hierbei variiert die Zusammensetzung zwischen den einzelnen Stämmen und kann durch unterschiedliche Parameter, wie Temperatur oder Lichtintensität, beeinflusst werden. Ebenfalls über GC-MS wurde von Volkman et al. (1981) die Fettsäurezusammensetzung verschiedener mariner Algen untersucht. Mit größter Häufigkeit wurden dabei Fettsäuren mit 14-22 Kohlenstoffatomen gefunden, die meist geradkettig waren. Dazu zählten hauptsächlich mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit 18 Kohlenstoffatomen sowie die Verbindungen 22:6, 14:0 und 16:0. Außerdem wurde in geringen Konzentrationen die Fettsäure 20:0 detektiert. Im Zuge dieser Arbeit konnten die mehrfach ungesättigte Fettsäure 18:2 (n-6) sowie die gesättigten Verbindungen 14:0 und vor allem 16:0 in vergleichsweise hohen Konzentrationen in den SPE-Eluaten detektiert werden.

Bei weiteren Analysen von Volkman et al. (1989) von 10 verschiedenen Mikroalgenarten variierte die Lipidzusammensetzung ebenfalls zwischen den Klassen und sogar Spezies einer Klasse. Polare Lipide (vor allem Glykolipide, Phospholipide, Chlorophylle) machten mit über 65 % den Hauptanteil der durch TLC/FID bestimmten, intakten Lipide aus. Triacylglyceride traten in verschiedenen Grünalgen lediglich als Nebenkomponenten in Erscheinung, machten jedoch in anderen Planktonklassen einen Anteil zwischen 8 und 34 % aus. Freie Fettsäuren sowie Kohlenwasserstoffe wurden zumeist in geringen Konzentrationen angetroffen. Bei Bestimmung des Gehalts der gesamten Fettsäuren in Diatomeen wurden hohe Konzentrationen von 16:0 sowie 16:1 (n-7) gefunden, die auch bei den hier quantifizierten FAME in vergleichsweise hoher Konzentration detektiert wurden. Auch die Verbindungen 14:0 und 20:5 (n-3) wurden von Volkman et al. (1989) in variablen, jedoch meist hohen Konzentrationen detektiert. Als Nebenkomponenten traten 18:0 sowie mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit 22 Kohlenstoffatomen auf. In Grünalgen wurden vor allem mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit 16 bzw. 18 Kohlenstoffatomen gefunden.

Kattner et al. (1983) fanden bei Untersuchungen der Lipidzusammensetzung von Nordseewasser während einer Phytoplanktonblüte vor allem die Verbindungen 16:0 (30,4 %), 18:1 (n-9), 14:0 und 18:0. Freie Fettsäuren machten hierbei einen Anteil von ca. 48 % aus, gefolgt von TAG (ca. 23 %) und polaren Lipiden (ca. 25 %). Gesättigte Fettsäuren dominierten, gefolgt von einfach ungesättigten.

Phytoplankter sind als Primärproduzenten des organischen Kohlenstoffs in marinen Systemen die Hauptquelle von Sterolen. Aufgrund ihrer Position auf der unteren Stufe des marinen Nahrungsnetzes stellen sie diese auch anderen marinen Organismen zur Verfügung (Ballantine et al., 1979). So sind diverse Invertebraten nicht dazu in der Lage, Sterole zu synthetisieren (Mühlebach, 1998; Kanazawa & Teshima, 1971). Nach Saliot & Barbier (1973) ist hierbei die Zufuhr dieser lebenswichtigen Substanzen über Filtrations- und Adsorptionsmechanismen denkbar.

Die Sterolzusammensetzung marinen Phytoplanktons kann stark variieren. Während einige Gruppen lediglich simple Sterolmuster aufweisen, zeigen andere Klassen eine komplexe Zusammensetzung (Ballantine et al., 1979). Die Lipidverbindungen der zellulären Membranen liegen dabei zumeist in Form freier Alkohole vor (Mühlebach, 1998).

Kanazawa & Teshima (1971) fanden Cholesterol als dominierendes Sterol sowohl in suspendierten als auch gelösten Materialien, daneben Campesterol und Beta-Sitosterol in hohen Konzentrationen. In der 1973 erschienenen Publikation von Saliot & Barbier wurde auf Analysen der Sterolzusammensetzung von Zoo- und Phytoplanktonspezies von Boutry & Baron (1967) sowie Boutry & Jacques (1970) verwiesen, die Cholesterol ebenfalls als primäres Sterol mit einem Anteil von 70 bzw. 80 % identifizieren konnten.

Saliot & Barbier publizierten 1973 die Ergebnisse zu ihren Untersuchungen von Meerwasser hinsichtlich dessen Sterolzusammensetzung. Hierfür wurden gelöste Sterole von 12 verschiedenen Positionen und Tiefen durch Gas-Chromatographie und Massenspektrometrie analysiert. Die Gesamtkonzentrationen der Sterole beliefen sich auf Werte zwischen 2 und 14 µg/L. Vor allem Verbindungen mit 29 C-Atomen (wahrscheinlich Beta-Sitosterol) sowie 27 C-Atomen (wahrscheinlich Cholesterol) wurden in den größten Konzentrationen detektiert.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnten durch Festphasenextraktion 0,33 µg Cholesterol, 0,80 µg Beta-Sitosterol sowie Spuren von Stigmastanol aus der natürlichen Wasserprobe extrahiert werden (unter Beachtung aller Lösungsmittel- und FFE des Permeatwassers und Beprobung der Glasflaschen).

Viele marine Zooplanktonspezies zeichnen sich durch die Produktion großer Mengen außergewöhnlicher Lipidverbindungen aus. Dies ist ein wichtiger Anpassungsmechanismus von Organismen, vor allem in den hohen Breitengraden, um mit den dort vorherrschenden rauen Bedingungen sowie der starken Saisonabhängigkeit des Nahrungsangebotes zurechtzukommen (Graeve & Janssen, 2009).

Die Speicherlipide spielen aber auch eine wichtige Rolle bei der Reproduktion, Ontogenese und Diapause. Während Triacylglycerole, welche die primären Speicherlipide in terrestrischen Tieren darstellen, in nahezu allen Zooplanktonspezies gefunden werden konnten, dominieren Wachsester bei vielen polaren sowie in großen Tiefen lebenden Zooplanktongruppen (Lee et al., 2006). Die Phospholipide in marinen Organismen werden vor allem von Phosphatidylcholin und

Phosphatidylethanolamin dominiert (Graeve & Janssen, 2009). Hierbei wurden die Omega-3-Fettsäuren 20:5 (n-3) und 22:6 (n-3) in den höchsten Konzentrationen detektiert (Graeve & Janssen, 2009; Lee et al., 2006).

Lipide sind bei höheren Organismen u. a. essentiell für das Neurotransmissionssystem sowie das sensorische Wahrnehmungsvermögen (z. B. in der Retina von Fischaugen). Hierbei kommt die ungesättigte Verbindung 22:6 (n-3) ebenfalls in großen Mengen vor.

Innerhalb der Gruppe der Sterole macht Cholesterol ebenso den größten Anteil (bis 95 %) in höheren Organismen aus. Dabei zirkuliert es bei Invertebraten im Blut oder in der Hämolymphe (Ackman, 1999).

4 Fazit und Ausblick

Die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Experimente konzentrierten sich auf die Entwicklung einer effizienten Methode zur Anreicherung der in Meerwasser gelösten Lipidverbindungen über SPE. Ein von der natürlichen Lipidzusammensetzung des Meerwassers abgeleitetes Lipidstandardgemisch, bestehend aus 6 Standardlipiden unterschiedlicher Polaritäten, wurde für die Methodenentwicklung zusammengestellt. Wegen der zu erwartenden geringen Lipidkonzentrationen im Meerwasser war es notwendig, die Kontaminationsfreiheit des SPE-Systems zu überprüfen. Aufgrund des hohen Kontaminationsgrades der kommerziell erhältlichen SPE-Kartuschen wurden lose Sorbenzien vorgereinigt und manuell in Glaskartuschen gefüllt. Mit diesem System war es möglich, Lipide aus 1 L Nordseewasser qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Zusätzlich wurde die entwickelte SPE-Methode mit einer FFE-Methode verglichen. Für diese Überprüfung wurde das Lipidstandardgemisch, gelöst in natürlichem Meerwasser, eingesetzt. Hierbei konnten äquivalente Wiederfindungen der Standardlipide für beide Extraktionsverfahren ermittelt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Anreicherung sowie Elution von Lipidverbindungen durch verschiedene Lösungsmittel über unterschiedliche Kartuschentypen (C_8 , C_{18} , PPL, NH_2) möglich ist. Die Festphasenextraktion ist im Vergleich zur Flüssig-Flüssig-Extraktion durch einen deutlich geringeren Lösungsmittelverbrauch gekennzeichnet und damit zu bevorzugen.

Der Schwerpunkt fortführender Untersuchungen sollte auf die Reproduzierbarkeit sowie Automatisierung der entwickelten Methode gelegt werden. So sollten die im Zuge dieser Arbeit realisierten Versuche zur Ermittlung der Wiederfindungen der Standardlipide durch weitere Versuchsreihen gestützt werden. Darüber hinaus ist es notwendig, die Eignung der Methode zur Analyse größerer Probenmengen zu überprüfen. Es wurde festgestellt, dass die Lipidverbindungen eine Affinität zur Adsorption an den Glaswänden der Probengefäße besitzen. Um diese zu minimieren und so zeitintensive Arbeitsschritte (z. B. Spülen der Glasflaschen) einsparen zu können, müssen weitergehende Untersuchungen vorgenommen werden (z. B. anderes Probengefäßmaterial, Oberflächenbehandlung [Silylierung]).

Die einzelnen Lipidklassen der Meerwasserprobe konnten nicht direkt detektiert werden, da keine Möglichkeiten für LC-MS-Messungen zur Verfügung standen. Diese bieten den Vorteil der Analyse underivatisierter Lipide, was mit einer beträchtlichen Zeiteinsparung verbunden ist. Durch die Detektion der Verbindungen im Ursprungszustand können hierbei außerdem wertvolle Informationen über die natürliche Zusammensetzung der Lipide des Meerwassers gewonnen werden.

5 Quellen

ACKMAN, R. G. 1999. Comparison of lipids in marine and freshwater organisms. In: ARTS, M. T., WAINMAN, B. (Hrsg.). *Lipids in freshwater ecosystems*. New York: Springer Verlag.

AGILENT TECHNOLOGIES. 2011. *Leitfaden für SPE*.

ANSARI, K. A., SHOEMAN, D. 1988. Rapid separation of free fatty acids from neutral lipids in brain extracts. *Journal of Chromatography*, 439, 453-458.

BALLANTINE, J. A., LAVIS, A., MORRIS, R. J. 1979. Sterols of the phytoplankton- Effects of illumination and growth stage. *Phytochemistry*, 18, 1459-1466.

BATEMAN, H. G., JENKINS, T. C. 1997. Method for extraction and separation by solid phase extraction of neutral lipid, free fatty acids and polar lipid from mixed microbial cultures. *Journal of Agricultur and Food Chemistry*, 45, 132-134.

BLIGH, E. G., DYER, W. J. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.

BLOOR, W. R. 1920. Outline of a classification of the lipids. *Proceedings of the Society for experimental Biology and Medicine*, 17, 138-140.

BOURGUET, N. et al. 2009. Lipid biomarkers and bacterial lipase activities as indicators of organic matter and bacterial dynamics in contrasting regimes at the Dyfamed site, NW Mediterranean. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 56, 1454-1469.

BOWERS, W. D., PARSONS, M. L. 1981. Component loss during evaporation-reconstitution of organic environmental samples for gas chromatographic analysis. *Journal of Chromatography*, 207, 203-211.

BROWN, E. et al. 2005. *Marine Biogeochemical Cycles*. 2. Auflage. Amsterdam: The Open University.

CARVALHO, A. P., MALCATA, F. X. 2005. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of marine lipids: Insight studies. *Journal of Agricultur and Food Chemistry*, 53, 5049-5059.

CHRISTIE, W. W. 1992. Solid phase extraction columns in the analysis of lipids. *Advances in Lipid Methodology I*, 1-17.

CHRISTIE, W. W., HAN, X. 2010. *Lipid Analysis: Isolation, separation, identification and lipidomic analysis*. 4. Auflage. Bridgwater, Somerset: The Oily Press.

- CHRISTODOULOU, S., MARTY, J.-C., MIQUEL J.-C, VOLKMAN, J. K., RONTAI, J.-F. 2009. Use of lipids and their degradation products as biomarkers for carbon cycling in the northwestern Mediterranean Sea. *Marine Chemistry*, 113, 25-40.
- DERIEUX, S., FILLAUX, J., SALIOT, A. 1998. Lipid class and fatty acid distribution in particulate and dissolved fractions in the north Adriatic Sea. *Organic Geochemistry*, 29, 1609-1621.
- DITTMAR, T., KOCH, B., HERTKORN, N., KATTNER, G. 2008. A simple and efficient method for the solid phase extraction of dissolved organic matter (SPE-DOM) from seawater. *Limnology and Oceanography: Methods*, 6, 230-235.
- DURAN GROUP: Eigenschaften von Laborglas. 2009 [online]. Verfügbar unter: <http://www.duran-group.com/de/ueber-duran/duran-eigenschaften.html> [03.10.12].
- EDER, K. 1995. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 671, 113-131.
- FAHY, E. et al. 2005. A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, 46, 839-861.
- FAHY, E. et al. 2009. Update of the lipid maps comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, 50, 9-14.
- FLERUS, R. et al. 2012. A molecular perspective on the ageing of marine dissolved organic matter. *Biogeosciences*, 9, 1-20.
- FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G. H. S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- GÈRIN, C., GOUTX, M. 1994. In situ measured particulate and dissolved lipids in the Almeria-Oran frontal system (Almofront-1, May 1991). *Journal of Marine Systems*, 5, 343-360.
- GIACOMETTI, J., MILOŠEVIĆ, A., MILIN, C. 2002. Gas chromatographic determination of fatty acids contained in different lipid classes after their separation by solid phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 976, 47-54.
- GOUTX, M. et al. 2009. Short term summer to autumn variability of dissolved lipid classes in the Ligurian Sea (NW Mediterranean). *Biogeosciences*, 6, 1229-1246.
- GOUTX, M., SALIOT, A, 1980. Relationship between dissolved and particulate fatty acids and hydrocarbons, chlorophyll a and zooplankton biomass in Villefranche Bay, Mediterranean Sea. *Marine Chemistry*, 8, 299-318.

- GRAEVE, M., JANSSEN, D., 2009. Improved separation and quantification of neutral and polar lipid classes by HPLC-ELSD using a monolithic silica phase: Application to exceptional marine lipids. *Journal of Chromatography B*, 877, 1815-1819.
- GUTNIKOV, G. 1995. Fatty acid profiles of lipid samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 671, 71-89.
- HAMILTON, J. G., COMAI, K. 1984. Separation of neutral lipids and free fatty acids by high performance liquid chromatography using low wavelength ultraviolet detection. *Journal of Lipid Research*, 25, 1142-1148.
- HAMILTON, J. G., COMAI, K. 1988. Rapid separation of neutral lipids, free fatty acids and polar lipids using prepacked silica Sep-Pak columns. *Lipids*, 23, 1146-1149.
- HASSET, J. P., ANDERSON, M. 1979. Association of hydrophobic organic compounds with dissolved organic matter in aquatic systems. *Environmental Science and Technology*, 13, 1526-1529.
- HIELSCHER: Ultraschallkavitation. 2011 [online]. Verfügbar unter: www.hielscher.com/ultraschall/nano_01.htm [26.11.12].
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. 1978. The Nomenclature of Lipids (Recommendations 1976). *Journal of Lipid Research*, 19, 114-128.
- JACKSON, S. M., REBOIRAS, M. D., LYLE, I. G., JONES, M. N. 1987. The mechanism of phospholipid adsorption from vesicle dispersions onto glass surfaces. *Colloids and Surfaces*, 27, 325-340.
- JEFFREY, L. M. 1966. Lipids in sea water. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 43, 211-214.
- KALUZNY, M. A., DUNCAN, L. A., MERRITT, M. V., EPPS, D. E. 1985. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *Journal of Lipid Research*, 26, 135-140.
- KANAZAWA, A., TESHIMA, S. 1971. Sterols of the suspended matters in the sea water. *Journal of the Oceanographical Society of Japan*, 27, 207-212.
- KATTNER, G., GERCKEN, G., HAMMER, K. D. 1983. Development of lipids during a spring plankton bloom in the northern North Sea. II. Dissolved lipids and fatty acids. *Marine Chemistry*, 14, 163-173.
- KENNICUTT, M. C., JEFFREY, L. M. 1981. Chemical and GC-MS characterization of marine dissolved lipids. *Marine Chemistry*, 10, 367-387.
- KIM, H.-Y., SALEM, N. 1990. Separation of lipid classes by solid phase extraction. *Journal of Lipid Research*, 31, 2285-2289.

- KRUGER, B. R., DALZELL, B. J., MINOR, E. C. 2011. Effect of organic matter source and salinity on dissolved organic matter isolation via ultrafiltration and solid phase extraction. *Aquatic Sciences*, 73, 405-417.
- LARSSON, K., ODHAM, G., ANDERS, S. 1974. On lipid surface films on the sea. I. A simple method for sampling and studies of composition. *Marine Chemistry*, 2, 49-57.
- LEE, R. F., HAGEN, W., KATTNER, G. 2006. Lipid storage in marine zooplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 307, 273-306.
- MACHERY-NAGEL: Silylierungsmittel. 2012 [online]. Verfügbar unter: <http://mn-net.com/tabid/5728/default.aspx> [02.09.12].
- MANNINO, A., HARVEY, H. R. 1999. Lipid composition in particulate and dissolved organic matter in the Delaware Estuary: Sources and diagenetic patterns. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63, 2219-2235.
- MEYER, D. P. 2005. Untersuchung zum Ausbreitungsverhalten polyzyklischer aromatischer Verbindungen an teerkontaminierten Standorten. Universität Lüneburg.
- MÜHLEBACH, A. 1998. Sterole im herbstlichen Weddellmeer (Antarktis). Universität Bremen.
- MÜHLEBACH, A., WEBER, K. 1998. Origins and fate of dissolved sterols in the Weddell Sea, Antarctica. *Organic Geochemistry*, 29, 1595-1607.
- MYHER, J. J., KUKSIS, A. 1995. General strategies in chromatographic analysis of lipids. *Journal of Chromatography B*, 671, 3-33.
- OGAWA, H., TANOUE, E. 2003. Dissolved organic matter in oceanic waters. *Journal of Oceanography*, 59, 129-147.
- PANAGIOTOPOULOU, P. M., TSIMIDOU, M. 2002. Solid phase extraction: Applications to the chromatographic analysis of vegetable oils and fats. *Grasas y Aceites*, 53, 84-95.
- PARRISH, C. 1987. Time series of particulate and dissolved lipid classes during spring phytoplankton blooms in Bedford Basin, a marine inlet. *Marine Ecology Progress Series*, 35, 129-139.
- PARRISH, C. 1988a. Latroscan-measured profiles of dissolved and particulate marine lipid classes over the Scotian Slope and in the Bedford Basin. *Marine Chemistry*, 23, 1-15.
- PARRISH, C. 1988b. Dissolved and particulate marine lipid classes: A review. *Marine Chemistry*, 23, 17-40.
- PENEZIĆ A., GAŠPAROVIĆ, B., BURIĆ, Z., FRKA, S. 2010. Distribution of marine lipid classes in salty Rogoznica lake (Croatia). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 86, 625-636.

- RALSTON, A. W., HOERR C., W. 1942. The solubilities of the normal saturated fatty acids. *Journal of Organic Chemistry*, 7, 546-555.
- RUIZ-GUTIÉRREZ, V., PÉREZ-CAMINO, M. C. 2000. Update on solid phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *Journal of Chromatography A*, 885, 321-341.
- RUTTEN, G. A. F. M., LUYTEN, J. A. 1972. Analysis of steroids by high resolution gas liquid chromatography. I. Preparation of apolar columns. *Journal of Chromatography*, 74, 177-193.
- SALIOT, A. 1981. Natural hydrocarbons in seawater. In: DUURSMA, E. K., DAWSON, R. (Hrsg.). *Marine Organic Chemistry*. Amsterdam: Elsevier, 327-374.
- SALIOT, A., BARBIER, M. 1973. Sterols from sea water. *Deep Sea Research*, 20, 1077-1082.
- SARGENT, J. R., GATTEN, R. R., McINTOSH, R. 1977. Wax esters in the marine environment- their occurrence, formation, transformation and ultimate fates. *Marine Chemistry*, 5, 573-584.
- SARGENT, J. R., LEE, R. F., NEVENZEL, J. C. 1976. Marine waxes. In: KOLATTUKUDY, P. E. (Hrsg.). *Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes*. Amsterdam: Elsevier, 49-91.
- SCHULTZ, D. M., QUINN, J. G. 1972. Fatty acids in surface particulate matter from the North Atlantic. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 29, 1482-1486.
- SHUKLA, V. K. S., SPENER, F. 1985. High performance liquid chromatography of triglycerides of Flacourtiaceae seed oils containing cyclopentenyl fatty acids (chaulmoogric oils). *Journal of Chromatography A*, 348, 441-446.
- SIMJOUW, J.-P., MINOR, E. C., MOPPER, K. 2005. Isolation and characterization of estuarine dissolved organic matter: Comparison of ultrafiltration and C₁₈ solid phase extraction techniques. *Marine Chemistry*, 96, 219-235.
- SUN, M.-Y., CAI, W.-J., JOYE, S. B., DING, H., DAI, J., HOLLIBAUGH, J. T. 2002. Degradation of algal lipids in microcosm sediments with different mixing regimes. *Organic Geochemistry*, 33, 445-459.
- SUZUMURA, M. 2005. Phospholipids in marine environments: a review. *Talanta*, 66, 422-434.
- THIELE, O. W. 1979. *Lipide, Isoprenoide mit Steroiden*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- THURMAN, E. M., SNAVELY, K. 2000. Advances in solid phase extraction disks for environmental chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, 19, 18-26.
- VARIAN. 2005. *Handbook of sorbent extraction technology*.
- VARIAN: ABC der Probenvorbereitung (4), unpolare SPE: Konditionierung. 2009 [online]. Verfügbar unter: http://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/ABC_Probenvorbereitung_4.pdf [23.11.12].

- VICANOVÁ, J., TRVZICKÁ, E., STULÍK, K. 1994. Capillary gas chromatography of underivatized fatty acids with a free fatty acid phase column and a programmed temperature vaporizer injector. *Journal of Chromatography B*, 656, 45-50.
- VOLKMAN, J. K. 2003. Sterols in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 495-506.
- VOLKMAN, J. K., EGLINTON G., CORNER, E. D. S. 1980. Sterols and fatty acids of the marine diatom *Biddulphia sinensis*. *Phytochemistry*, 19, 1809-1813.
- VOLKMAN, J. K., JEFFREY, S. W., NICHOLS, P. D., ROGERS, G. I., GARLAND, C. D. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 128, 219-240.
- VOLKMAN, J. K., SMITH, D. J., EGLINTON, G., FORSBERG, T. E. V., CORNER, E. D. S. 1981. Sterol and fatty acid composition of four marine haptophycean algae. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 61, 509-527.
- WAKEHAM, S. G. 1995. Lipid biomarkers for heterotrophic alteration of suspended particulate organic matter in oxygenated and anoxic water columns of the ocean. *Deep-Sea Research I*, 42, 1749-1771.
- WINKLER-MOSER, J. K. 2011. Gas chromatographic analysis of plant sterols [online]. Verfügbar unter: <http://lipidlibrary.aocs.org/topics/phytosterols/index.htm> [15.09.2012].
- XIE, W.-H., SHIU, W.-Y., MACKAY, D. 1997. A review of the effect of salts on the solubility of organic compounds in seawater. *Marine Environmental Research*, 44, 429-444.
- ZSOLNAY, Á. 2003. Dissolved organic matter: artefacts, definitions and functions. *Geoderma*, 113, 187-209.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Boris Koch für die Annahme und Betreuung meiner Masterarbeit sowie Herrn Dr. Martin Graeve für die Übernahme der Zweitbetreuung. Dadurch wurde mir der Einblick in ein interessantes Themengebiet sowie die Nutzung modernster Labortechnik gewährt, wodurch meine Laborkompetenzen erheblich gesteigert und meine beruflichen Perspektiven ausgebaut werden konnten.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Herrn Dipl.- Ing. Dieter Janssen, welcher mir während meiner Labortätigkeit stets unermüdlich mit größter Hilfsbereitschaft und Kompetenz zur Seite stand. Durch seine Kreativität und Denkanstöße konnte der experimentelle Teil dieser Arbeit entworfen und nahezu reibungslos verwirklicht werden.

Allen Mitarbeitern der AG Ökologische Chemie möchte ich für die überaus angenehme Arbeitsatmosphäre sowie für deren mentale Unterstützung und Lösungsansätze bei aufgetretenen Problemen danken.

Großen Dank schulde ich des Weiteren meinem Studienfreund Thomas Jendrossek, der mich mit seiner geduldigen Art sowohl während meiner praktischen Tätigkeit als auch beim Anfertigen dieser Arbeit in erheblichem Maße unterstützt hat.

Abschließend möchte ich meiner Mutter danken, die mir während meiner gesamten Studienzzeit bedingungslos Beistand geleistet und zu keiner Zeit den Glauben an mich verloren hat.

Anhang

A: Chemikalienverzeichnis

Anhang A1. Herstellerdaten der auf Reinheit geprüften Lösungsmittel

Lösungsmittel	Spezifika/Hersteller	Chargennr./LOT
Aceton	LiChrosolv [®] /Merck (Darmstadt)	K41424120
Chloroform	Applichem (Darmstadt)	11004325
Dichlormethan	Rotisol [®] /Roth (Karlsruhe)	836641
Ethylacetat	LiChrosolv [®] /Merck	I554068038
Methanol	LiChrosolv [®] hypergrade/Merck	I596635129
n-Hexan	LiChrosolv [®] /Merck Pestnorm [®] /Merck	K41313391 037 12Z0246

Anhang A2. Chemikalien und deren Spezifika zur gaschromatographischen Trennung der FAME

Chemikalien	Spezifika/Hersteller
Konzentrierte Schwefelsäure	95-97 %/Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck
MSTFA	Macherey-Nagel (Düren)
n-Hexan	LiChrosolv [®] /Merck

B: Geräteverzeichnis

Anhang B1. Geräte und deren Spezifika zur Reinheitsprüfung der LM

Geräte	Spezifika/Hersteller
GC	siehe Anhang B4
Rotationsverdampfer	Laborota 4011 digital/Heidolph (Schwabach) Wärmebad HB digital/Heidolph Vakuumsystem Vac control automatic/Heidolph Kühlsystem Rotacool mini/Heidolph Pumpensystem Rotavac valve control/Heidolph

Anhang B2. Geräte und deren Spezifika zur Bestimmung des Lösungsvermögens der Standardlipide in Reinstwasser

Geräte	Spezifika/Hersteller
GC-MS	siehe Anhang B6
TOC-Analyzer	siehe Anhang B15
Ultraschallbad	Sonorex digital 10 P/ Bandelin (Berlin)

Anhang B3. Geräte und deren Spezifika zur gaschromatographischen Trennung der FAME

Geräte	Spezifika/Hersteller
GC	siehe Anhang B4
Metallblockthermostat	Type CH 20, 500 W/Liebisch Labortechnik (Bielefeld)
Thermoblock	VWR (Darmstadt)
Trockentemperiersystem	Labor Technik Barkey (Leopoldshöhe)

Anhang B4. Aufbau der GC-Anlage Agilent 6890 N Network, Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

Komponente	Spezifika/Hersteller
Autosampler	7683 Series/Agilent Technologies
Probeninjektor	7683 Series/Agilent Technologies konstante Temperatur: 260 °C Split: nach 3 min 25:1
Trennkapillare	Länge: 55 m, Innendurchmesser: 0,25 mm, Filmdicke: 0,25 µm Stationäre Phase: FFAP Mobile Phase: Helium (1 mL/min)
Detektor	FID, konstante Temperatur: 280 °C H ₂ : 40 mL/min O ₂ : 450 mL/min N ₂ : 45 mL/min
Säulenofen	Temperaturprogramm siehe Anhang B5

Anhang B5: Temperaturprogramm des Säulenofens des GC

Temperatur [°C]	Aufheizrate [°C/min]	Dauer [min]
80	Initial	2
160	20	0
240	2	20

Anhang B6. Aufbau der GC-MS-Anlage 3800, Varian

Komponente	Spezifika/Hersteller
Autosampler	8200 CX/Varian
Probeninjektor	1079/Varian Temperaturprogramm siehe Anhang B7 Split: nach 2,5 min 1:100
Trennkapillare	Länge: 60 m, Innendurchmesser: 0,25 mm, Filmdicke: 0,25 µm Stationäre Phase: Crossbond® (5 % Diphenyl, 95 % Dimethylpolysiloxan)/Restek (Bad Homburg) Mobile Phase: Helium (1 mL/min)
Detektor	MS Saturn 2000/Varian siehe Anhang B9
Säulenofen	siehe Anhang B8

Anhang B7: Temperaturprogramm des Probeninjektors des GC-MS

Temperatur [°C]	Aufheizrate [°C/min]	Dauer [min]
65	Initial	0,2
300	200	15

Anhang B8: Temperaturprogramm des Säulenofens des GC-MS

Temperatur [°C]	Aufheizrate [°C/min]	Dauer [min]
65	Initial	2
170	20	0
250	2	0
300	6	20

Anhang B9: Parameter des Massenspektrometers

Start [min]	Ende [min]	min. Masse [m/z]	max. Masse [m/z]
10	43	65	399
43	55	65	550
55	76	65	650

Anhang B10. Geräte und deren Spezifika zur Kartuschenaufreinigung

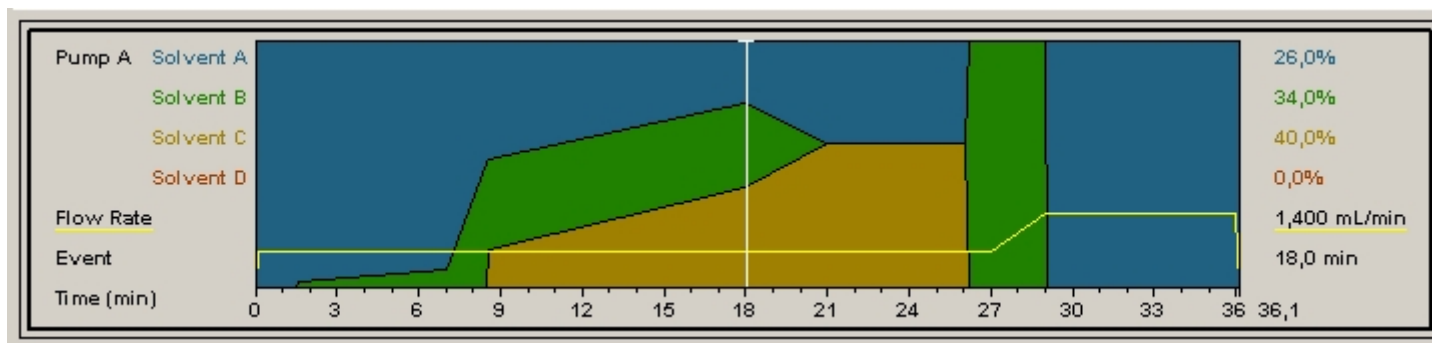
Geräte	Spezifika/Hersteller
Soxhlet-Extraktionseinheit	Extraktionshülse aus Celluloseacetat Rundkolben 250 mL/Schott (Mainz) Heizpilz/Prolabo
Trockenschrank	Memmert (Schwabach)

Anhang B11. Geräte und deren Spezifika zur Festphasenextraktion

Geräte	Spezifika/Hersteller
Kartuschenvorrichtung	Supelco Visiprep™, 12 Kartuschenplätze/Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Peristaltikpumpe	IPC High Precision Multichannel Dispenser/Ismatec (Glattbrugg, Schweiz)
pH Meter	PT-10/Sartorius (Göttingen)

Anhang B12. Aufbau der HPLC-Anlage LaChrom Elite®, VWR Hitachi (Darmstadt)

Komponente	Spezifika/Hersteller
Autosampler	L-2200/VWR
Pumpe	L-2130/VWR
Säule	Chromolith® Performance-Si/Merck Länge: 100 m, Innendurchmesser: 4,6 mm Gradientenprogramm siehe Anhang B13 und B14
Detektor	Sedex 75/Sedere (Orléans, Frankreich) ELSD konstante Temperatur: 40 °C
Säulenofen	L-2300/VWR konstante Temperatur: 40 °C

Anhang B13: Lösungsmittelgradient des verwendeten HPLC-Programms

Anhang B14: Lösungsmittelgradientenprogramm der HPLC-Anlage

Zeit	Solvens A [%]	Solvens B [%]	Solvens C [%]	Fließgeschwindigkeit [mL/min]
0	100	0	0	1,4
0,1	100	0	0	1,4
1,5	100	0	0	1,4
1,6	98	2	0	1,4
7,0	93	7	0	1,4
8,5	50	50	0	1,4
8,6	48	37	15	1,4
18,0	26	34	40	1,4
21,0	42	0	58	1,4
26,1	42	0	58	1,4
26,2	0	100	0	1,4
27,0	0	100	0	1,4
29,0	0	100	0	3,0
29,1	100	0	0	3,0
36,0	100	0	0	3,0
36,1	100	0	0	0
Solvens A	2,2,4- Trimethylpentan (HiPerSolv [®] Chromanorm, VWR)			
Solvens B	Aceton/Ethylacetat (2:1, v/v; LiChrosolv [®] , Merck), 7,5 mM Essigsäure (Merck)			
Solvens C	2-Propanol/Wasser (85:15, v/v; LiChrosolv [®] , Merck), 7,5 mM Essigsäure (Merck), 7,5 mM Triethylamin (Merck)			

Anhang B15. Aufbau der TOC/TON-Geräteeinheit, Shimadzu (Kyoto, Japan).

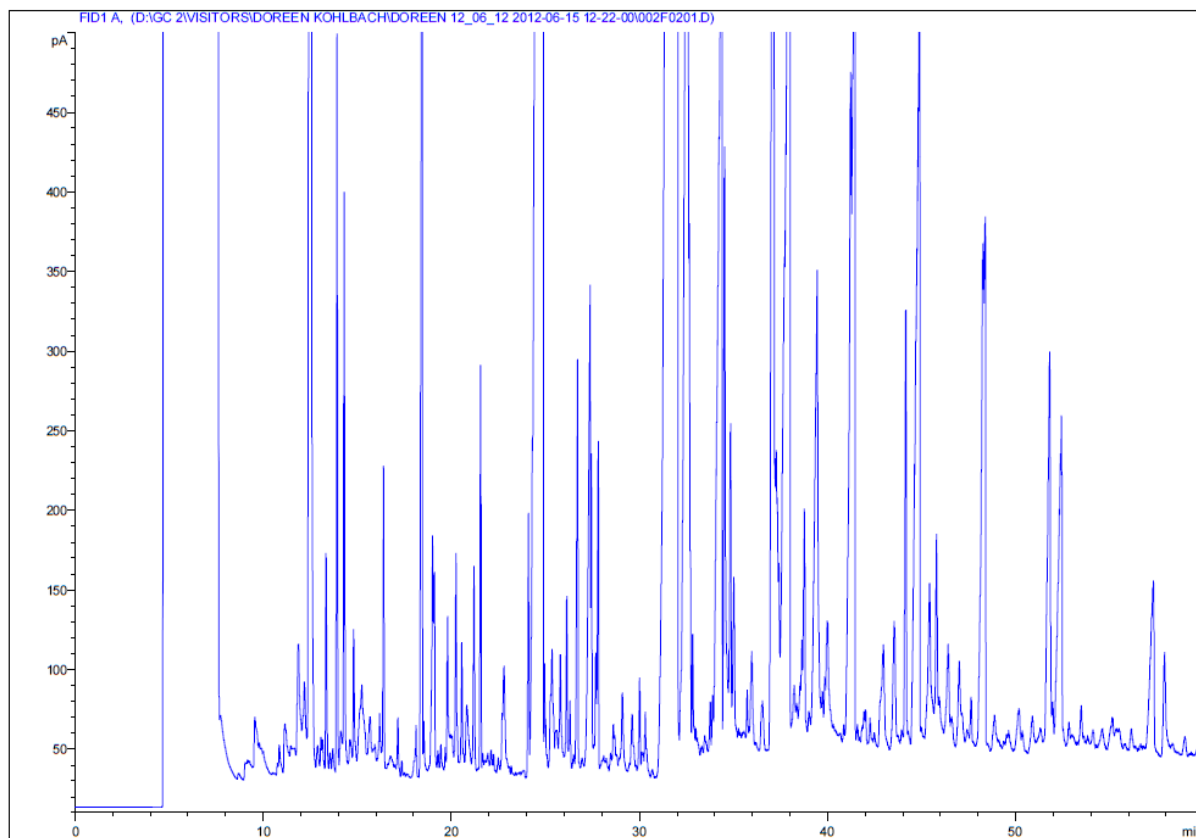
Komponente	Spezifika/Hersteller
TOC-Analyzer	TOC-V _{CPN} /Shimadzu
TON-Analyzer	TNM-1/Shimadzu
Autosampler	ASI-V/Shimadzu

C: Ergebnisse

Anhang C1. Konzentrationen der gaschromatographisch bestimmten Kontaminationen in den LM innerhalb des relevanten Retentionsbereiches (10.-70. min). Chloroform, Dichlormethan, Ethylacetat und Methanol wurden sowohl in n-Hexan als auch Chloroform chromatographiert. Rot gekennzeichnete LM wurden für nachfolgende Analysen aufgrund eines vergleichsweise hohen Verunreinigungsgrades nicht verwendet

Lösungsmittel	Konzentration [$\mu\text{g/L}$]		
Aceton	28,7		
n-Hexan	3,2		
Lösungsmittel	Konzentration in n-Hexan [$\mu\text{g/L}$]	Konzentration in Chloroform [$\mu\text{g/L}$]	
Chloroform	47,3	41,5	
Dichlormethan	1,2	1,5	
Ethylacetat	1,2	0,3	
Methanol	2,8	2,1	

Anhang C2. GC-Chromatogramm der n-Hexanfraktion bei Blindwertbestimmung der konditionierten C₃-Kunststoffkartusche (Bond Elut)



Anhang C3. Konzentrationen der gaschromatographisch bestimmten Kontaminationen in den Lösungsmittelfractionen nach Vorspülung der C₈-Kunststoffkartusche (Bond Elut) mit 3, 6 bzw. 9 mL DCM

Lösungsmittelfraktion	Konzentration [$\mu\text{g/L}$]
n-Hexan 3 mL	1894,2
n-Hexan 6 mL	1270,8
n-Hexan 9 mL	2849
DCM 3 mL	1888,5
DCM 6 mL	1624,6
DCM 9 mL	1352,5
MeOH 3 mL	166,8
MeOH 6 mL	153,3
MeOH 9 mL	61,4

Anhang C4. Konzentrationen der gaschromatographisch bestimmten Kontaminationen der C₁₈-Glaskartusche (Bondesil) mit aufgereinigten Sorbenzien und Fritten (mit/ohne Konditionierung)

Elutionsfolge A	Konzentration [$\mu\text{g/L}$]	
	ohne Konditionierung	mit Konditionierung
n-Hexan 1	12,6	10
n-Hexan 2	0	8,6
DCM 1	10,7	6,9
DCM 2	0	0
MeOH 1	0	0
MeOH 2	6,9	0

Anhang C5. Konzentrationen der gaschromatographisch bestimmten Kontaminationen der Kartuschenbestandteile der PPL-Kunststoffkartusche (Bond Elut)

Kartuschenelement	Lösungsmittel	Masse Verunreinigung [μg]	bezogen auf
Sorbens	n-Hexan	7,4	g Sorbens
Fritten	n-Hexan	5,4	Frittenpaar
Säule	n-Hexan	112,3	Säule
		125,1	
Sorbens	MeOH	2,3	g Sorbens
Fritten	MeOH	4,7	Frittenpaar
Säule	MeOH	0,5	Säule
		7,5	

Anhang C6. Konzentrationen der gaschromatographisch bestimmten Kontaminationen der 4 verschiedenen losen Sorbenzien (Bondesil; bezogen auf je 1 g Sorbens) und Glasfaserfritten (Chromabond; bezogen auf je 1 Frittenpaar) vor und nach Aufreinigung mittels Soxhlet-Extraktion

Kartuschenelement	Lösungsmittel	Masse Verunreinigung [µg]	Masse Verunreinigung [µg]
		vor Aufreinigung	nach Aufreinigung
C ₈ -Sorbens	n-Hexan	6,6	0
C ₁₈ -Sorbens	n-Hexan	11,7	0
PPL-Sorbens	n-Hexan	3,5	0,03
NH ₂ -Sorbens	n-Hexan	10,1	0,01
Glasfaserfritten	n-Hexan	0,3	0,06
C ₈ -Sorbens	MeOH	1,3	0
C ₁₈ -Sorbens	MeOH	4,0	0
PPL-Sorbens	MeOH	0,4	0
NH ₂ -Sorbens	MeOH	3,6	0
Glasfaserfritten	MeOH	0	0

Anhang C7. Wiederfindungen der Standardlipide (ohne Ansäuerung) bei Anreicherung der Komponenten auf der C₈-Glaskartusche (Bondesil)

Elutionsfolge C	Wiederfindung C ₈ [%]				
	Kartusche	Permeatwasser (FFE)	Probenflasche	Permeatflasche	Gesamt
LL	34,4	55,6	2,9	0	92,9
PC	66,9	77,9	7,7	1,7	154,2
TAS	60,6	31,3	8,2	0	100,1
AB	50,1	25,0	9,3	0	84,4
Sq	35,8	55,3	3,3	0,2	94,6
Chol	45,5	29,5	6,3	0	81,3
Elutionsfolge D	Wiederfindung C ₈ [%]				
	Kartusche	Permeatwasser (FFE)	Probenflasche	Permeatflasche	Gesamt
LL	26,1	44,7	0	0	70,8
PC	66,4	44,0	1,6	1,8	113,8
TAS	44,2	21,4	0,9	0	66,5
AB	35,1	19,3	0,6	0	55,0
Sq	36,4	58,7	0,2	0	95,3
Chol	42,8	37,4	0,9	0	81,1

Anhang C8. Wiederfindungen der Standardlipide (ohne Ansäuerung) bei Anreicherung der Komponenten auf der PPL-Glaskartusche (Bondesil)

Elutionsfolge C	Wiederfindung PPL [%]				
Standardlipid	Kartusche	Permeatwasser (FFE)	Probenflasche	Permeatflasche	Gesamt
LL	17,6	23,9	2,6	0	44,1
PC	34,7	43,6	2,3	8,1	88,7
TAS	20,5	28,7	8,2	0	57,4
AB	15,1	29,5	5,5	0	50,1
Sq	17,9	44,1	2,9	0	64,9
Chol	16,5	41,9	2,3	2,0	62,7
Elutionsfolge D	Wiederfindung PPL [%]				
Standardlipid	Kartusche	Permeatwasser (FFE)	Probenflasche	Permeatflasche	Gesamt
LL	14,5	11,7	22,2	0	48,4
PC	16,4	21,5	7,8	0,7	46,4
TAS	34,8	8,7	30,2	0	73,7
AB	24,2	6,3	28,0	0	58,5
Sq	16,0	15,8	29,2	0	61,0
Chol	11,7	15,0	28,6	0	55,3

Anhang C9. Wiederfindungen der Standardlipide (ohne Ansäuerung) bei Anreicherung der Komponenten auf der NH₂-Glaskartusche (Bondesil)

Elutionsfolge C		Wiederfindung NH ₂ [%]			
Standardlipid	Kartusche	Permeatwasser (FFE)	Probenflasche	Permeatflasche	Gesamt
LL	43,2	23,8	8,5	0	75,5
PC	77,1	35,8	10,4	2,4	125,7
TAS	53,6	9,4	15,3	0	78,3
AB	50,8	9,0	14,8	0	74,6
Sq	58,4	20,5	8,2	0	87,1
Chol	78,1	19,3	10,7	0	108,1

Elutionsfolge D		Wiederfindung NH ₂ [%]			
Standardlipid	Kartusche	Permeatwasser (FFE)	Probenflasche	Permeatflasche	Gesamt
LL	39,8	19,8	7,9	0	67,5
PC	74,0	64,2	11,8	38,7	188,7
TAS	47,2	13,7	22,1	1,3	84,3
AB	44,0	13,4	23,1	0	80,5
Sq	55,1	23,7	8,9	0,8	88,5
Chol	74,7	23,3	9,3	4,1	111,4

Anhang C10. Wiederfindungen der Standardlipide (mit Ansäuerung) bei Anreicherung der Komponenten auf der C₈-Glaskartusche (Bondesil)

Elutionsfolge D		Wiederfindung C ₈ [%]			
Standardlipid	Kartusche	Permeatwasser (FFE)	Probenflasche	Permeatflasche	Gesamt
LL	55,1	4,1	2,2	0	61,4
PC	82,5	7,7	1,3	12,9	104,4
TAS	54,2	0	5,6	0	59,8
AB	50,1	0	6,0	0	56,1
Sq	93,5	0	2,2	0	95,7
Chol	88,2	0	3,9	0	92,1

Anhang C11. Wiederfindungen der Standardlipide (mit Ansäuerung) bei Anreicherung der Komponenten auf der PPL-Glaskartusche (Bondesil)

Elutionsfolge D	Wiederfindung PPL [%]				
	Kartusche	Permeatwasser (FFE)	Probenflasche	Permeatflasche	Gesamt
LL	53,7	1,0	2,2	6,9	63,8
PC	20,4	30,9	5,2	6,5	63,0
TAS	90,8	0	4,2	0	95,0
AB	73,4	0	2,7	0	76,1
Sq	94,6	0	2,0	0	96,6
Chol	110,0	0	1,1	0	111,1

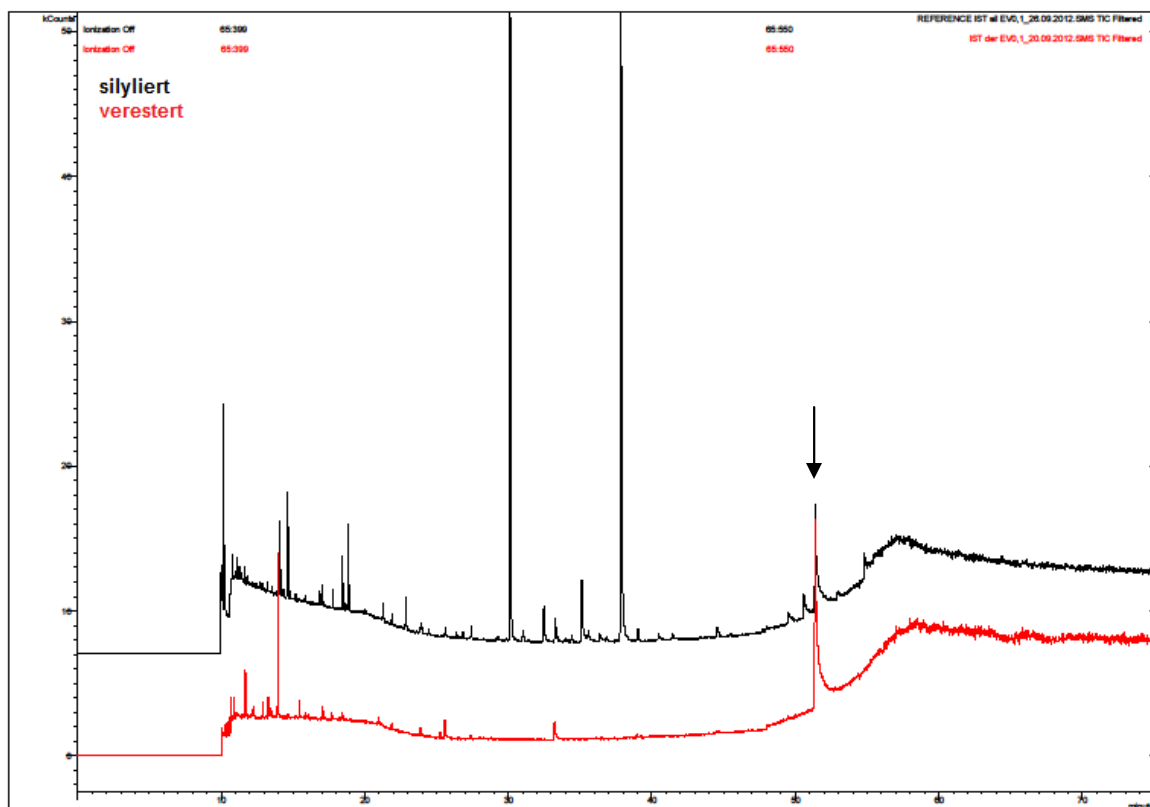
Anhang C12. Wiederfindungen der Standardlipide (mit Ansäuerung) bei Anreicherung der Komponenten auf der NH₂-Glaskartusche (Bondesil)

Elutionsfolge D	Wiederfindung NH ₂ [%]				
	Kartusche	Permeatwasser (FFE)	Probenflasche	Permeatflasche	Gesamt
LL	57,4	3,2	1,3	0	61,9
PC	62,4	16,0	1,5	9,2	89,1
TAS	64,8	0	4,1	0	68,9
AB	59,7	0,3	4,1	0	64,1
Sq	87,8	4,7	1,7	0	94,2
Chol	103,4	3,4	2,5	0	109,3

Anhang C13. Wiederfindungen der Standardlipide (mit Ansäuerung, mit 3,5 % Salz) bei Anreicherung der Komponenten auf der NH₂-Glaskartusche (Bondesil)

Elutionsfolge D	Wiederfindung NH ₂ [%]				
	Kartusche	Permeatwasser (FFE)	Probenflasche	Permeatflasche	Gesamt
LL	67,2	0	2,8	0	70,0
PC	60,8	8,9	5,6	1,7	77,0
TAS	97,6	0	4,3	0	101,9
AB	78,5	0	1,0	0	79,5
Sq	113,0	0	2,7	0	115,7
Chol	90,7	0	1,5	0	92,2

Anhang C14. Veresterungs- und Silylierungsderivate. Durch einen Pfeil gekennzeichnet ist der interne Standard (500 ng, GC-MS-Analyse)



Anhang C15. Übersicht über die in den Lösungsmittelfractionen detektierten Fettsäurekomponenten der Meerwasserprobe bei Anreicherung auf der C₁₈-Glaskartusche (Bondesil)

Retentionszeit [min]	Komponente	c [µg/L]	c [µM C]
DCM 2			
18,93	14:0	0,08	0,005
22,17	15:0	0,01	0,001
25,01	16:1 (n-7) cis	0,13	0,008
25,70	16:0	0,53	0,034
32,21	18:2 (n-6) cis	0,07	0,004
32,41	Σ18:1*	0,28	0,018
40,27	20:2 (n-6) cis, 20:1 (n-9) cis, 20:3 (n-6) cis	n. q.	n. q.
Gesamtkonzentration		1,10	0,070
MeOH 1			
18,99	14:0	0,15	0,009
22,17	15:0	0,04	0,002
25,02	16:1 (n-7) cis	0,32	0,020
25,71	16:0	0,85	0,054
32,23	18:2 (n-6) cis	0,32	0,020
32,43	Σ18:1*	0,29	0,018
40,07	20:2 (n-6) cis	1,21	0,079
40,31	20:1 (n-9) cis	0,21	0,014
63,47	Cholesterol	0,22	0,014
68,21	Beta-Sitosterol	0,21	0,014
Gesamtkonzentration		3,82	0,244
MeOH 2			
19,01	14:0	0,12	0,007
22,18	15:0	0,03	0,002
25,03	16:1 (n-7) cis	0,27	0,017
25,72	16:0	0,52	0,033
32,43	18:2 (n-6) cis	0,06	0,004
32,65	Σ18:1*	0,38	0,024
40,30	20:1 (n-9) cis	0,26	0,017
68,19	Beta-Sitosterol	0,04	0,003
Gesamtkonzentration		1,68	0,147
n-Hexan 1			
25,70	16:0	0,31	0,020
32,38	18:2 (n-6) cis	0,04	0,030
32,53	Σ18:1*	0,12	0,008
68,13	Beta-Sitosterol	0,22	0,014
Gesamtwiederfindung		0,69	0,072

Fortsetzung Anhang C15

Retentionszeit [min]	Komponente	c [$\mu\text{g/L}$]	c [$\mu\text{M C}$]
n-Hexan 2			
18,91	14:0	0,13	0,008
25,70	16:0	1,22	0,077
32,19	18:2 (n-6) cis	0,11	0,007
32,39	$\Sigma 18:1^*$	0,17	0,011
Gesamtwiederfindung		1,63	0,103

*18:1 (n-9) cis, 18:1 (n-7) cis

D: Sonstiges

Anhang D1. Zusammensetzung des Sterolstandards. Die in der Meerwasserprobe identifizierten Sterole sind rot gekennzeichnet

Bezeichnung	Konzentration [ng/μL]
Androstan	20
5-Alpha-Cholestan	10
Coprostanol	20
Cholesterol	40
Cholestanol	40
Brassicasterol	30
Lathosterol	40
Ergosterol	40
Stigmasterol	40
Beta-Sitosterol	40
Stigmastanol	40

Anhang D2. Zusammensetzung des FAME-Standards. Die in der Meerwasserprobe identifizierten Fettsäuremethylester sind rot gekennzeichnet

Bezeichnung	Formelbezeichnung	Konzentration [ng/μL]
Methylbutyrat	4:0	16
Methylhexanoat	6:0	16
Methyloctanoat	8:0	16
Methyldecanoat	10:0	16
Methylundecanoat	11:0	8
Methylaurat	12:0	16
Methyltridecanoat	13:0	8
Methylmyristat	14:0	16
Methylmyristoleat	14:1 (n-5) cis	8
Methylpentadecanoat	15:0	8
Methylpentadecenoat	15:1 (n-5) cis	8
Methylpalmitat	16:0	24
Methylpalmitoleat	16:1 (n-7) cis	8
Methylheptadecanoat	17:0	8
Methylheptadecenoat	17:1 (n-7) cis	8
Methylstearat	18:0	16
Methylelaidat	18:1 (n-9) trans	8
Methyloleat	18:1 (n-9) cis	16
Methylinoelaidat	18:2 (n-6) trans	8
Methylinooleat	18:2 (n-6) cis	8
Methyl-Gamma-Linolenat	18:3 (n-6) cis	8
Methyl-Alpha-Linolenat	18:3 (n-3) cis	8

Fortsetzung Anhang D2

Methylarachidat	20:0	16
Methyleicosenoat	20:1 (n-9) cis	8
Methyleicosadienoat	20:2 (n-6) cis	8
Methyleicosatrienoat	20:3 (n-6) cis	8
Methyleicosatrienoat	20:3 (n-3) cis	8
Methylarachidonat	20:4 (n-6) cis	8
Methyleicosapentaenoat	20:5 (n-3) cis	8
Methylheneicosanoat	21:0	8
Methylbehenat	22:0	16
Methylerueat	22:1 (n-9) cis	8
Methyldocosadienoat	22:2 (n-6) cis	8
Methyldocosahexaenoat	22:6 (n-3) cis	8
Methyltricosanoat	23:0	8
Methylignocerat	24:0	16
Methylnervonat	24:1 (n-9) cis	8