

Copyright ©

Es gilt deutsches Urheberrecht.

Die Schrift darf zum eigenen Gebrauch kostenfrei heruntergeladen, konsumiert, gespeichert oder ausgedruckt, aber nicht im Internet bereitgestellt oder an Außenstehende weitergegeben werden ohne die schriftliche Einwilligung des Urheberrechtinhabers. Es ist nicht gestattet, Kopien oder gedruckte Fassungen der freien Onlineversion zu veräußern.

German copyright law applies.

The work or content may be downloaded, consumed, stored or printed for your own use but it may not be distributed via the internet or passed on to external parties without the formal permission of the copyright holders. It is prohibited to take money for copies or printed versions of the free online version.

Probleme der Isolierung und Anreicherung organischer Substanz aus dem Meerwasser

Von CHRISTOPH OSTERROHT

Zusammenfassung: Im Zeitraum eines Jahres wurde Meerwasser in der Kieler Außenförde gesammelt und die darin enthaltene organische Substanz zu ca. 20% an Amberlite XAD-2 adsorbiert. Die vom Adsorbtionsmaterial mit organischen Lösungsmitteln eluierten Substanzen wurden gewichtsmäßig auf jahreszeitliche Schwankung untersucht und mit chromatographischen und anderen Methoden aufgetrennt. Die hauptsächlich vorhandenen Substanzen wurden mit Hilfe spektroskopischer und anderer Methoden identifiziert. Es wurden Kohlenwasserstoffe mit 12 C-Atomen und mehr sowie Phthalsäureester bestimmt. Die Brauchbarkeit der Methode und die Beständigkeit herkömmlicher Plastikmaterialien (PVC, Silikon) gegen Seewasser im Hinblick auf Verunreinigung mit organischen Substanzen wird diskutiert.

Problems in the extraction and concentration of organic material in sea water (Summary): Over a period of one year sea-water was collected from the outer regions of the Kiel Fjord. The amount of organic material that was adsorbed on Amberlite XAD-2 was about 20% of the total amount of organic material in the water. This material was eluated with organic solvents and separated by chromatography. The main components were identified with support of spectroscopy and other methods. Hydrocarbons with more than 12 C-atoms and esters of phthalic acid were determined. The usefulness of this method and the amount of contamination resulting in the study of organic materials in sea-water, when the most common plastic materials (PVC, silicon) are used, is discussed.

Einleitung

Betrachtet man die durchschnittliche Zusammensetzung des Meerwassers mit seinen darin gelösten Bestandteilen, so erhält man schon einen Eindruck von der Hauptschwierigkeit, wenn man sich mit gelösten organischen Verbindungen im Meerwasser befassen will. Ein kg Meerwasser, welches durch Membranfilter filtriert wurde, (durchschnittliche Porengröße 0,45 μm) enthält neben gelösten Gasen an chemischen Bestandteilen ca. 35 g anorganische Ionen, bzw. Salze, und etwa 0,6—3 mg gelöste organische Substanz (WANGERSKY 1965). In Estuarien und Randmeeren (ausgenommen direkte Einflußgebiete von Abwässern, Häfen etc.) sieht das Verhältnis zwischen anorganischen Salzen und organischer Substanz etwas besser aus: hier erniedrigt sich meist der Salzgehalt, während der Gehalt an gelöster organischer Substanz bis auf etwa maximal 20 mg/kg ansteigt. In der Ostsee werden ca. 2—3 mg/l gelöste organische Substanz gefunden (EHRHARDT 1969). Ebenso können örtlich und zeitlich begrenzte Anhäufungen organischer gelöster Substanz auftreten, so z. B. während der bekannten „red-tide“, wo durch vermehrtes plötzliches Wachstum bestimmter Dinoflagellaten auch die gelösten organischen Substanzen (Ausscheidungs- und Abbauprodukte) stark zunehmen (RYTHER 1955). In neuerer Zeit treten in vermehrtem Umfang Verunreinigungen organischer Natur (Pestizid-, Herbizid-, Insektizidrückstände usw.) auf. Die oben erwähnte Hauptschwierigkeit besteht nun darin, die normalerweise im ppm-Bereich vorliegenden Mengen gelöster organischer Substanzen aus dem Meerwasser anzureichern, von den anorganischen Salzen zu trennen und zu identifizieren.

Als erstes Problem stellte sich für uns dabei die Frage nach der Methodik für Isolierung und Anreicherung.

Tabelle 1
Methoden der Isolierung

1. Adsorption und anschließende Desorption organischer Substanzen aus Meerwasser an
 - a) anorganische Polymerisate wie SiO_2 , Al_2O_3 , Aktivkohle
 - b) organische Polymerisate wie Poly-Styrol, Polystyroldivinylbenzol, Teflon, Polysaccharide
 - c) Ionenaustauscher anorganischer wie organischer Natur
2. Flüssig-flüssig-Extraktion
4. Eindampfen, ggf. Entsalzen und Aufarbeiten des Extraktes durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln oder anderen Methoden
5. Gefriertrocknen, ggf. Entsalzen und Aufarbeiten des Extraktes durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln oder anderen Methoden
6. Komplexartige Bildung spezieller chemischer Verbindungen an geeignete Komplexbildner
7. Dialyse von Seewasser und anschließende Anreicherung aus der entsalzten Lösung.

Von den in Tabelle 1 aufgeführten Methoden ist die unter Nr. 6 angeführte nicht allgemein brauchbar und bisher nur für Aminosäurebestimmungen angewandt worden (SIEGEL, DEGENS 1966). Gefriertrocknen bzw. Eindampfen von Seewasser erlaubten es uns aus apparativen- und Zeitgründen nur, geringe Mengen Seewasser zu untersuchen. Obwohl während der Anreicherung keine Verunreinigung durch Säulenfüllmaterialien u. ä. zu befürchten ist, bleibt das Problem der Trennung von den anorganischen Bestandteilen, so daß die Methoden nicht so vorteilhaft sind, wie es auf den ersten Blick scheint. Die Kopräcipitation mit Eisen(III)hydroxid (HOOD et al. 1961) fällt ungefähr 95% der organischen Substanz mit (JEFFREY, HOOD 1958), andere Autoren (WILLIAMS, ZIRINO 1964) behaupten, daß nur 40% der organischen Substanz bei pH 4—6 ausgefällt werden. Abgesehen von der unterschiedlichen Beurteilung der Methode kann man außerdem sagen, daß sie zwar kolloidal gelöste Stoffe recht gut und quantitativ ausfällt, aber echt gelöste Stoffe nicht quantitativ; da wir aber gerade auch Rückstände von Pestiziden und Erdöl bestimmen wollten, schien uns die Methode nicht sehr geeignet. Die flüssig-flüssig Extraktion ist apparativ noch nicht gelöst. Deshalb entschieden wir uns für die Adsorption von organischen Substanzen aus Seewasser an organische Polymerisate. Da über Amberlite XAD relativ viel Untersuchungsergebnisse vorlagen, wählten wir dieses Material. Amberlite XAD 2 ist ein in Wasser unlösliches, vernetztes Polystyrol-Polymerisat. Es adsorbiert vor allem hydrophobe Moleküle wie Kohlenwasserstoffe, chlorierte Kohlenwasserstoffe oder Moleküle mit hydrophoben Resten, wie längerkettige Fettsäuren, Alkohole, Phenole usw. Die Adsorption der Moleküle erfolgt dabei mit ihrem hydrophoben Teil auf Grund Van der Waal'schen Kräfte in den Poren der Harzkügelchen, ohne in die Feststoffphase einzudringen, so daß die Elution und Regenerierung sehr einfach und schnell ist. Hinzu kommt, daß die selektive Adsorption von hydrophoben, organischen Verbindungen wächst, sobald Elektrolyte in der Lösung sind, was im Meerwasser der Fall ist. Es ist in späteren Arbeiten vorgesehen, auch andere Adsorbentmaterialien wie Aktivkohle, Kieselgel oder Teflonkügelchen zu testen.

Experimentelles

Das Seewasser wurde in der Kieler Außenförde (Tonne 1) aus 8—10 m Tiefe genommen. Es wurde an Bord des Schiffes filtriert (Glasfaserfilter, durchschnittliche Porengröße $1 \mu\text{m}$) und in 20 l, bzw. 30 l Plastikbehältern unter Zusatz von 15 mg HgCl_2/l Wasser aufbewahrt. Anschließend wurde das Seewasser über eine Säule gegeben (Durchmesser 30 mm, 280 mm Betthöhe, gefüllt mit Amberlite XAD 2, Durchflußgeschwin-

digkeit: ca. 1 Liter pro Stunde). Nach Durchfluß des Seewassers wurde die Säule mit destilliertem Wasser chloridfrei gewaschen und mit je 150 ml Äthanol/Chloroform die adsorbierte organische Substanz eluiert und mit 250 ml Äthanol und destilliertem Wasser nachgespült, wodurch das Säulenmaterial regeneriert war und für den nächsten Versuch zur Verfügung stand. Die vereinigten Chloroform- und Äthanol-Extrakte wurden im Rotationsverdampfer (15 mm Hg, ca. 35° Wasserbadtemperatur) eingedampft, der Rückstand in ca. 50 ml Chloroform aufgenommen und 5 mal nach dem Craig'schen Gegenstromverfahren mit destilliertem Wasser ausgeschüttelt. Der chloroformlösliche Anteil wurde anschließend säulenchromatographisch und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt.

Säulenchromatographie: Es wurden 2 hintereinandergeschaltete Säulen benutzt:

Durchmesser 17 mm, 280 mm Betthöhe, gefüllt mit Kieselgel Merck, 0,05—0,2 mm.

| | | |
|------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| Elutionsmittel: 1. ca. | 25 Säulenfüllungen (ca. 1625 ml.) | Benzol : Chloroform 9 + 1 |
| 2. ca. | 37 Säulenfüllungen (ca. 2400 ml) | Benzol : Chloroform 1 + 1 |
| 3. ca. | 7 Säulenfüllungen (ca. 450 ml) | Äthanol |

Waschen der Säule mit Wasser.

Präparative Dünnschichtchromatographie: Kieselgel, GF₂₅₄ für DC, Merck, Schichtdicke 1 mm.

Laufmittel: Cyclohexan, Benzol, Chloroform, oder Mischungen der drei Lösungsmittel.

Alle Fraktionen, die man von der Säulen- oder präparativen Dünnschicht erhielt, wurden dünnschichtchromatographisch und gaschromatographisch untersucht auf Einheitlichkeit und gaschromatisches Verhalten.

Geräte: Alle Säulenchromatographien wurden mit einem Fraktionsammler Ultrac von LKB mit UV-Photometer als Detektor durchgeführt. Die Gaschromatogramme wurden mit einem Perkin-Elmer-Gaschromatographen, Typ F 6, durchgeführt, Säulendurchmesser 3 mm, Länge 2 m.

Ergebnisse

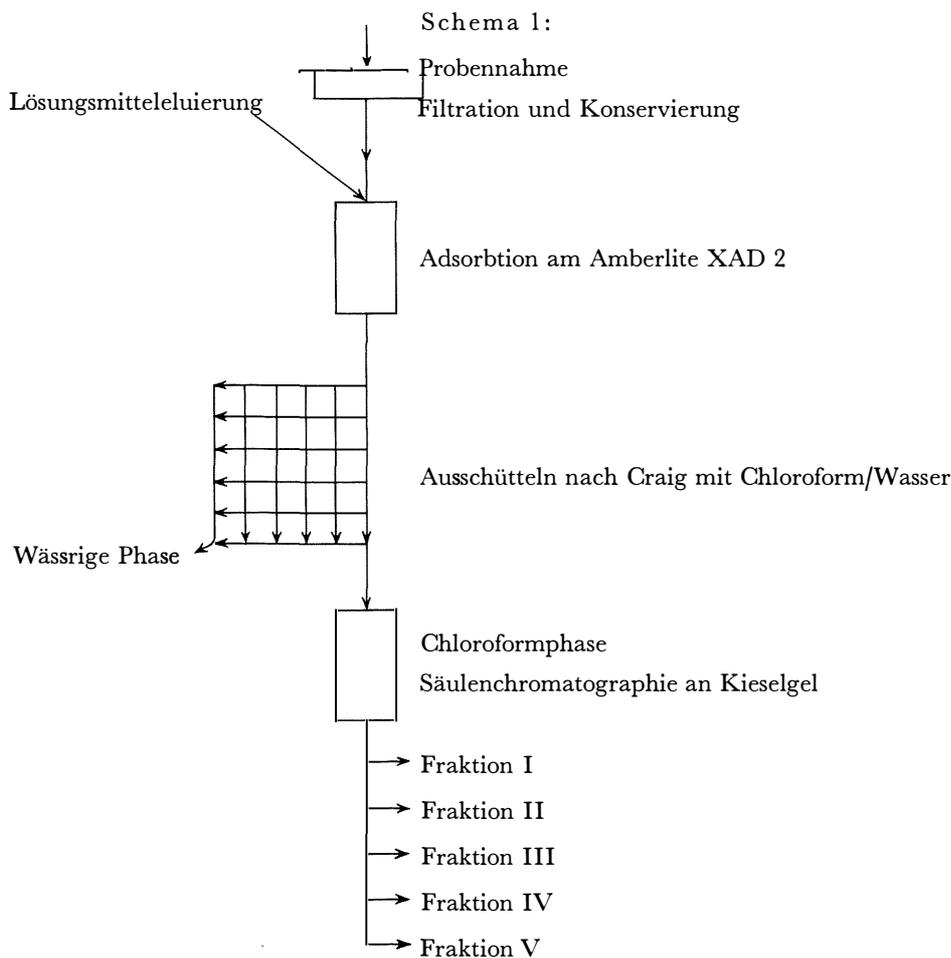
Es wurden insgesamt 1900 l Seewasser in der Zeit eines Jahres untersucht, und es wurden ungefähr 1 mg organische Substanz/l Seewasser als Extrakt gewonnen. Das entspricht etwa 20% der insgesamt gelösten organischen Substanz, bestimmt als gelöster organischer Kohlenstoff und multipliziert mit dem Faktor 1,8 (M. EHRHARDT, unveröffentlicht). (Hierbei liegt die Annahme zu Grunde, daß alle im Meerwasser vorkommenden organischen Verbindungen einen durchschnittlichen Kohlenstoffgehalt von 55% haben.)

Tabelle 2

| Extrahierte Wassermenge (l) | Jahreszeit | Gesamt-extrakt (mg) | mg/l | Chloroform löslich (mg) | Wasser löslich (mg) |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|------|-------------------------|---------------------|
| 320 | Dez. 69/ Jan. 70 | 345 | 1,08 | 103 (30,0%) | 242 |
| 320 | März 70 | 372 | 1,16 | 143 (38,5%) | 229 |
| 150 | April 70 | 153 | 1,08 | 52 (35,0%) | 101 |
| 150 | Mai 70 | 141 | 0,94 | 34 (24,1%) | 107 |
| 240 | Aug. 70 | 234 | 0,97 | 71 (30,3%) | 163 |
| 240 | Sept. 70 | 238 | 0,99 | 64 (26,9%) | 174 |
| 240 | Okt. 70 | 254 | 1,06 | 82 (32,3%) | 172 |
| 240 | Nov. 70 | 247 | 1,03 | 68 (27,5%) | 179 |

Aus den bestimmten Werten (vgl. Tabelle 2) geht hervor, daß in den Wintermonaten November bis März eine größere Menge an gelöst organischem Material vorliegt als in den Sommermonaten. Dies stimmt annähernd mit den Werten die von RILEY und SEGAR über gelöste Aminosäuren in der Irischen See (RILEY, SEGAR 1970) in der Zeit des Jahres 1970 gefunden wurden, überein. Das Minimum liegt bei ihnen auch im April und Mai, das eine Maximum im Januar, ein zweites, geringeres, im Juli. Da im März normalerweise die Phytoplanktonblüte stattfindet, ist es nicht verwunderlich, daß der Spitzenwert für die gelöste organische Substanz auch in diesem Monat zu finden ist. Außerdem geht aus der Tabelle hervor, das Amberlite XAD-2 chloroformlösliche, d. h. unpolare Substanzen bevorzugt anreichert (s. Einleitung), denn ca. $\frac{1}{3}$ des Gesamtextraktes ist chloroformlöslich.

Nach den unter „Experimentelles“ beschriebenen Operationen ergaben sich 5 Fraktionen:



Fraktion I nach ca. 120 cm³ Elutionsmittel
 Fraktion II nach ca. 180 cm³ Elutionsmittel
 Fraktion III nach ca. 650 cm³ Elutionsmittel
 Fraktion IV nach ca. 2100 cm³ Elutionsmittel
 Fraktion V mit Äthanol, bzw. Wasser

Die einzelnen Fraktionen wurden dann dünn-schichtchromatographisch und gaschromatographisch untersucht. Dabei ergab sich, daß die säulenchromatische Trennung nur unvollständig war. Die Fraktion I bestand in der Hauptsache aus Kohlenwasserstoffen. Sie ließen sich durch präparative Dünn-schichtchromatographie mit den unpolaren Lösungsmitteln n-Hexan, Cyclohexan, evtl. unter 10%igen Benzolzusatz, abtrennen und durch IR-Spektroskopie und Gaschromatographie identifizieren. (CH-Valenzschwingungen bei 2940 cm^{-1} , 2980 cm^{-1} ; CH aromatisch, Valenzschwingungen bei 3020 cm^{-1} , Fehlen jeglicher -CO-, -CN- oder COC-Banden.)

Das Gaschromatogramm hatte, mit der für Kohlenwasserstofftrennung häufig gebrauchten Säulenfüllung Phenylsiliconöl DC 550, die typische Form derartiger Gemische: ein breiter Peak für die nicht getrennten aromatischen und höher verzweigten Kohlenwasserstoffe und gut ausgebildete Peaks in äquidistanten Linien (im linear programmierten Bereich) für die gradkettigen Alkane, wobei zwei benachbarte Peaks zwei normal-Alkane bedeuten, die sich um ein C-Atom unterscheiden. Mit Testsubstanzen kann man feststellen, daß auf diese Art normal-Alkane mit 12 C-Atomen aufwärts im Ostseewasser zu finden sind, sowie die entsprechenden iso-Verbindungen und die nicht näher untersuchten aromatischen Kohlenwasserstoffe.

Fraktion II, die nach dem Säulenchromatogramm nur sehr unscharf von Fraktion I getrennt ist, besteht nach dem IR-Spektrum ebenfalls in der Hauptsache aus Kohlenwasserstoffen. Da hier aber die aromatischen CH, bzw. CC-Schwingungen intensiver sind, nehmen wir an, daß es sich in der Hauptsache um aromatische Kohlenwasserstoffe handelt.

Fraktion III enthält als Hauptbestandteil Di-2-äthylhexyl-phthalat. Die Substanz konnte eindeutig durch ihr IR-Spektrum (CO-Valenzschwingungen 1740 cm^{-1} , COC-Ätherbande bei 1285 cm^{-1}) und durch das NMR-Spektrum (aromatische Protonen bei $\tau = 5,5$ Hz, Esterprotonendublett bei $\tau = 7,5$ Hz und aliphatische Protonen (tertiäre, sekundäre und primäre) bei $\tau = 9,0-9,5$ Hz im Verhältnis 4 : 4 : 30) identifiziert werden. Auch das Testgaschromatogramm zeigte den gleichen Rf-Wert.

In Fraktion IV konnten wir durch gekoppelte Gaschromatographie-Massenspektrometrie drei weitere Phthalsäureester identifizieren: Di-n-butyl —, n-butyl-isobutyl — und Di-iso-butylphthalat. (IR-Spektrum: CO-Valenzschwingung 1740 cm^{-1} , COC-Ätherbande bei 1285 cm^{-1} , charakteristische Massen $\frac{m}{e} = 149, 167, 57, 104$.)

In Fraktion V ließen sich gaschromatographisch alle vier Phthalsäureester nachweisen, neben 2 anderen unbekanntem Phthalaten (nach IR-Spektrum) und höhermolekularen, nicht weiteruntersuchten Substanzen.

In allen Fraktionen fand man gaschromatographisch noch eine Reihe von anderen Substanzen, deren Menge aber so gering war, daß eine Auftrennung und Struktur-aufklärung mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln nicht möglich war. Nach den Gaschromatogrammen machten die erwähnten Substanzen (Kohlenwasserstoffe, Phthalsäureester) ca. 72% des Gesamtextraktes aus.

Um die „Natürlichkeit“ der von uns gefundenen Substanzen zu prüfen, haben wir in einem Blindversuch 200 l künstliches Seewasser nach den unter Experimentelles, bzw. in Schema 1 gestellten Bedingungen verarbeitet.

Dabei stellte sich heraus, daß alle Phthalsäureester während der Probenvorbereitung oder während des Analysengangs in die Proben hineingekommen sind, da man sie in dem Blindversuch alle gaschromatographisch nachweisen konnte. Ob sie auch im Seewasser vorhanden sind, konnten wir dadurch nicht mehr feststellen. Rein mengenmäßig stellten sie den Hauptanteil dar. Dies Ergebnis ist insofern nicht allzu überraschend, als Phthalsäureester als Weichmacher in Plastikmaterialien verwendet werden und offensichtlich gut durch Seewasser herausgelöst werden.

Gaschromatogramme:

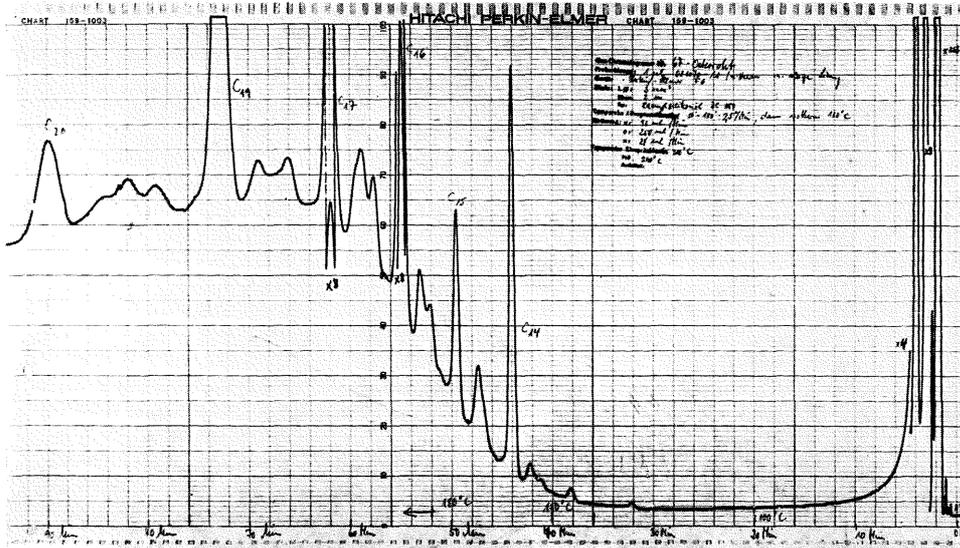


Abb. 1: Kohlenwasserstoffe. Säule: Phenylsilikonöl DC 550

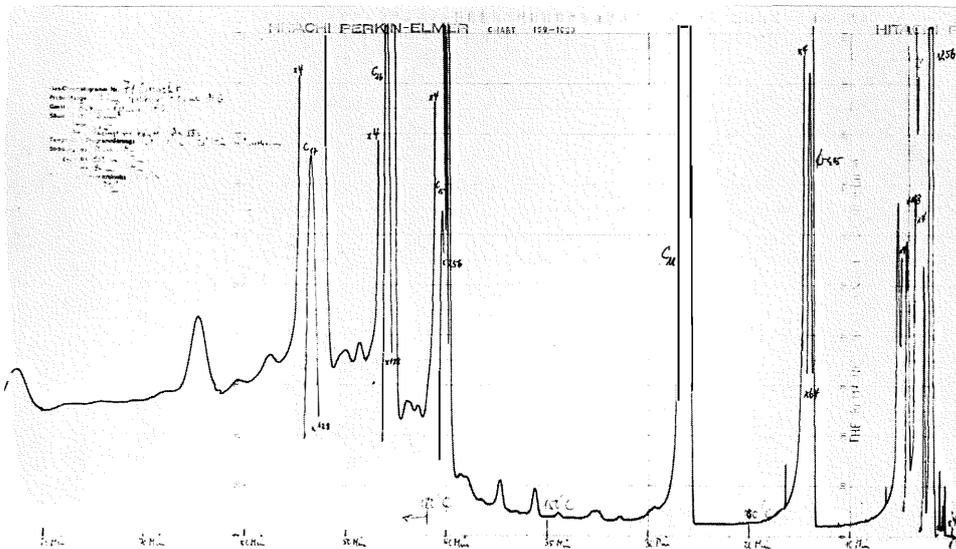


Abb. 2: Das gleiche mit Eichsubstanzen

Tafel 2 (zu C. Osterroht)

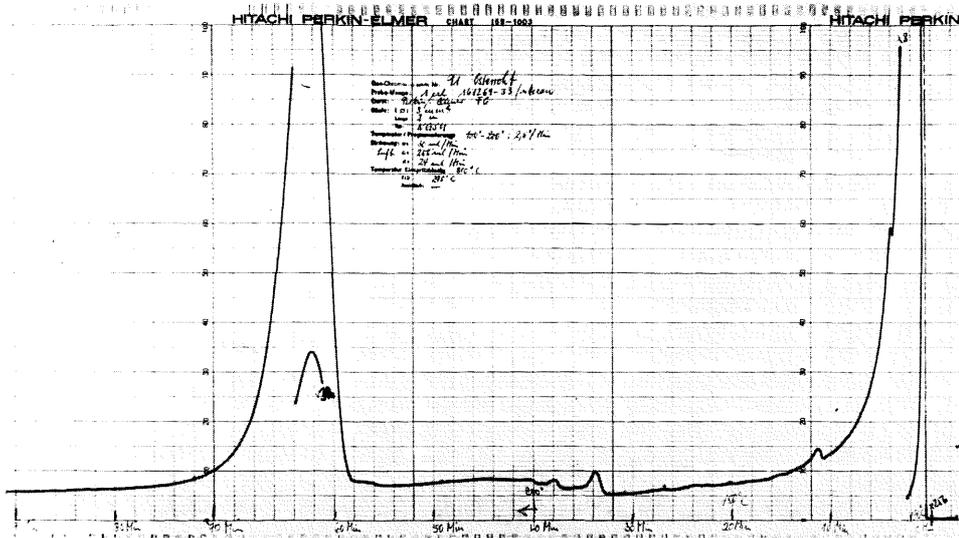


Abb. 3: Di-2-äthylhexylphthalat. Säule: Neopentylglykolsuccinat

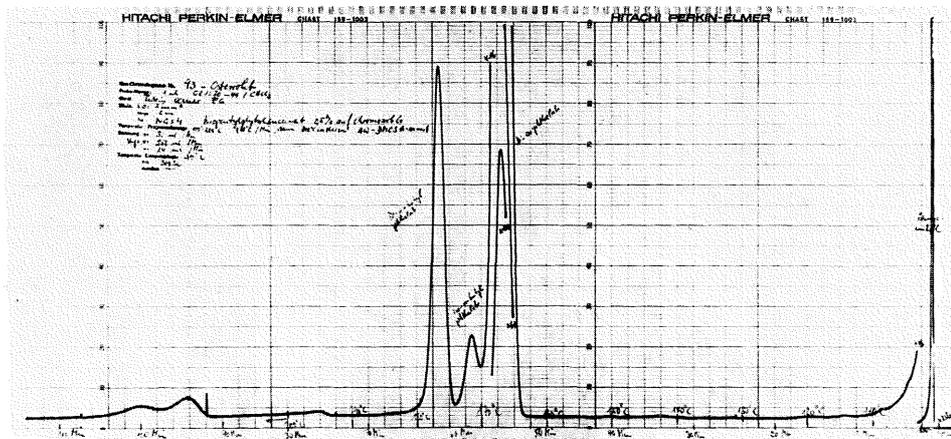


Abb. 4: Butylphthalate. Säule: Neopentylglykolsuccinat

Diskussion

Amberlite XAD 2 (Polystrol-Polymersat) ist gut geeignet, um Kohlenwasserstoffe und chemisch verwandte Stoffe aus Meerwasser anzureichern. Auch die Abtrennung von den anderen im Meerwasser vorhandenen organischen Substanzen während des Anreicherungs Vorganges ist relativ gut, so daß die Kohlenwasserstoffe durch einfache nachgeschaltete chromatographische Operationen als reine Substanzklasse erhalten werden können. Kohlenwasserstoffe mit weniger als 12 C-Atomen kommen nicht im Ostseewasser in der Kieler Förde in nachweisbaren Konzentrationen vor, sie verdunsten durch Wind- und Wärmeeinwirkung. Dies steht mit den bisher veröffentlichten Befunden im Einklang.

Bearbeitet man das Problem der gelösten organischen Einzel-Substanzen im Meerwasser, um diese soweit anzureichern, daß man sie im μg -Bereich als reine Substanz erhält, so muß man unbedingt die Beständigkeit der verwendeten Materialien gegenüber Seewasser in Betracht ziehen. Unsere Ergebnisse zeigen sehr deutlich, daß in den herkömmlichen Plastikmaterialien (PVC, Silikon) mit Ausnahme von Teflon, organische Substanzen sind (in der Hauptsache Weichmacher) die gut von Seewasser herausgelöst werden und deren Gehalt dann im untersuchten Wasser den der natürlichen organischen Substanz übersteigt.

Wir haben daraus die Konsequenz gezogen und zwei neue Systeme in Entwicklung genommen, um die Schwierigkeiten zu umgehen. Einmal wollen wir Meerwasser einer kontinuierlichen flüssig-flüssig Extraktion unterwerfen, die den Vorteil hätte, daß Probleme der Lagerung oder der Verunreinigung mit Säulenmaterialien ausgeschlossen sind. Zum anderen bauen wir an einem schiffsunabhängigen System, das Meerwasser direkt filtriert und über Adsorbtionssäulen pumpt, so daß man nur noch das Verunreinigungsproblem durch das Säulenmaterial hat, das man entweder durch geeignete Wahl des Adsorbtionsmaterials umgeht oder durch Blindproben weitgehend eliminiert, aber nicht das der Lagerung von Seewasserproben.

Literaturverzeichnis

- EHRHARDT, M. (1969): The particulate organic carbon and nitrogen, and the dissolved organic carbon in the Gotland Deep in May 1968. *Kieler Meeresforschung* XXV, 71—80.
- EHRHARDT, M.: unveröffentlicht.
- HOOD, D. W., M. TATSUMOTO, W. T. WILLIAMS und J. M. PRESCOTT (1961): Amino acids in samples of surface sea-water
- JEFFREY, L. M. und D. W. HOOD (1958): *J. Mar. Res.* 17 247.
- RILEY, J. P., und D. A. SEGAR (1970): The seasonal variation of the free and combined dissolved amino acids in the Irish Sea. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 50, 713—720.
- RILEY, J. P. und G. SKIRROW (1965): *Chemical Oceanography* Vol. I 433—473, Academic Press, London, New York.
- RYTHER, I. H. (1955): Ecology of autotrophic marine dinoflagellates with reference to red water conditions. In: "Luminescence of Biological System". AAAS Publication, Washington, D. C.
- SIEGEL, A und E. T. DEGENS (1966): Concentration of dissolved amino acids from saline waters by ligand-exchange chromatography. *Science* 151, 1098.
- WANGERSKY, PETER J. (1965): The organic chemistry of Sea water. *American Scientist* 53.
- WILLIAMS, P. M. und ZIRINO, A. (1964): *Nature* (London).