

**Methodenentwicklung zur Spurenanalyse  
organischer Biomarker in Speläothemen und  
Tropfwasser mittels Flüssigchromatographie-  
(HR-)Massenspektrometrie**

Dissertation zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
(Dr. rer. nat.)

im Promotionsfach Chemie  
am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von  
**Janine M. Bosle**

Geboren in Landstuhl

Mainz, 2014

---

---

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

D77 Dissertation der Johannes-Gutenberg Universität Mainz

---

---

Für Werner

*“You want weapons? We're in a library!  
Books! The best weapons in the world.  
This room's the greatest arsenal we could have  
- arm yourselves!”*

The Doctor

---

---

## Zusammenfassung

Speläotheme und Tropfwasser spielen eine wichtige Rolle bei der Erforschung von globalen und regionalen Naturerscheinungen. Stalagmiten kommen zunehmend als Klima- und Umweltarchive zum Einsatz, da sie ein chemisch geschlossenes System bilden, kontinuierlich wachsen und mittels  $^{230}\text{Th}/\text{U}$ -Altersdatierung zeitlich präzise eingeordnet werden können. Somit sind sie in der Lage, Informationen über Paläoumwelt- und paläoklimatische Veränderungen zu liefern. Während sich bisherige Studien größtenteils auf anorganische *Proxies* konzentrieren, wächst das Interesse an organischen Biomarkern. Hierbei spielen Lipidbiomarker eine besondere Rolle, da sie verschiedene biologische Quellen besitzen und damit genaue Erkenntnisse über Vegetationsveränderungen liefern können. Vorangegangene Studien von Lipiden in Stalagmitproben unterschieden zwischen LMW (*low molecular weight*) Komponenten mit einer Kohlenstoffkette  $\leq \text{C}_{20}$  und HMW (*high molecular weight*) Komponenten ab  $\text{C}_{21}$ . Es besteht die Annahme, dass HMW Verbindungen von Gefäßpflanzen stammen, während LMW Verbindungen von Mikroorganismen sowohl im Boden, im Tropfwasser als auch in der Höhle gebildet werden können. Somit wird deutlich, dass die unterschiedlichen Quellen der LMW Lipide weitaus komplexer sind und weiter untersucht werden müssen. Aufgrund dessen wurden gesättigte, unverzweigte LMW Fettsäuren mit einer geradzahligem Kettenlänge als Analyten für diese Arbeit ausgewählt.

Um die Fettsäuren in Speläothem- und Tropfwasserproben bestimmen zu können, wurde eine neue Methode entwickelt, bei welcher die Festphasenextraktion (SPE) und anschließend eine HPLC-MS Messung zum Einsatz kommt. Dabei wurde durch Verwendung eines Gradientenprogramms und eines Säulenofens eine Trennung der fünf Analyten  $\text{C}_{12}\text{-C}_{20}$  ohne vorherige Derivatisierung ermöglicht. Somit war im Vergleich zu den vorherrschenden GC-MS Methoden dieser zeitintensive Arbeitsschritt, welcher ebenso zu Kontaminierungen führen kann, nicht notwendig. Generell stellen mögliche Kontaminierungen ein großes Problem bei der Analyse von Fettsäuren dar. Es konnte gezeigt werden, dass durch Ausheizen aller verwendeten Glasgefäße bei  $450\text{ °C}$  für mehrere Stunden und der dreifachen Destillation des verwendeten Lösungsmittels Dichlormethan eine drastische Reduzierung der Blindwerte erzielt wurde. Zur Optimierung der Extraktionsmethode wurden mit Standards versetzte Wasserproben verwendet, um verschiedene Parameter, z. B. Lösungsmittelzusammensetzungen zu untersuchen. Prinzipiell hat sich die SPE im Gegensatz zu der Flüssig/Flüssig-Extraktion (LLE) durchgesetzt, da Letztere mögliche Störkomponenten der Matrix weniger gut entfernt hat. Des Weiteren zeigte ein Vergleich von externer Kalibrierung und Standardaddition, dass die Matrix bei der Quantifizierung berücksichtigt werden muss und somit die

---

Standardaddition bessere Ergebnisse liefert. Als *Proof-of-Principle* wurden verschiedene Tropfwasserproben zweier unterschiedlicher Höhlensysteme, Bunkerhöhle und Herbstlabyrinth-Adventhöhle, mit der neu entwickelten Methode analysiert. Dabei konnten alle Analyten nachgewiesen werden und die ermittelten Konzentrationen spiegelten die natürliche Verteilung der Fettsäuren, mit höheren Konzentrationen von C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub>, wider. Die Gesamtfettsäurekonzentration verdeutlichte, dass die gefundenen Konzentrationen sich ebenso zwischen den beiden Standorten unterscheiden. Damit wurde gezeigt, dass die neu entwickelte Methode eine quantitative Analyse der gesuchten Fettsäuren in diesem Probenmaterial ermöglicht. Im Vergleich zu früheren Studien wurde die benötigte Probenmenge von etwa 4 L auf 60-100 mL drastisch reduziert. Zudem konnte durch Verwendung der SPE ebenfalls der Verbrauch organischer Lösungsmittel im Vergleich zu den bisherigen Extraktionsmethoden, Soxhlet und LLE, maßgeblich reduziert werden.

Bei einer ausführlichen Analyse der monatlichen Tropfwasserproben aus der Herbstlabyrinth-Adventhöhle konnten saisonale Variationen der Fettsäuren festgestellt werden. Zusätzlich traten ebenso Unterschiede bei schnellen und langsamen Tropfstellen auf. Des Weiteren wurden die Fettsäuren einer schnellen Tropfstelle T1 untereinander korreliert, um eine Aussage über ihren Ursprung treffen zu können. Dabei wiesen C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> teilweise signifikante positive Korrelationen auf. Dies deutet darauf hin, dass diese LMW Fettsäuren die gleichen Quellen besitzen. Eine negative Korrelation dagegen wurde mit C<sub>20</sub> ermittelt, was die Vermutung zulässt, dass diese Fettsäure aus einer anderen Quelle stammt. Da C<sub>20</sub> die Grenze zwischen LMW und HMW Verbindungen darstellt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie nicht ebenso von höheren Gefäßpflanzen statt von Mikroorganismen kommen kann. Darüber hinaus wurden die ermittelten Fettsäureergebnisse mit Daten des Höhlenmonitorings verglichen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass verschiedene Faktoren, wie die Ionenkonzentration im Tropfwasser, den Transport der Fettsäuren beeinflussen. Vergleiche mit der Tropfrate und der Mg Konzentration deuteten darauf hin, dass erhöhte Niederschlagsmengen zu einem verbesserten Transport von C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>, jedoch zu einem schlechteren Transport von C<sub>20</sub> führen. Zuletzt wurde durch signifikante Korrelationen mit dem stabilen Isotopenverhältnis  $\delta^{13}\text{C}$  eine Verbindung zwischen der Vegetationsdichte und dem Vorkommen der LMW Fettsäuren hergestellt.

Durch eine Erweiterung der Probenvorbereitung wurde die neu entwickelte Methode auch auf Stalagmitproben anwendbar. Hierbei konnte das benötigte Probenmaterial (ca. 0,5-3,5 g) im Vergleich zu den meisten bisherigen Studien (10-100 g) ebenfalls reduziert werden. Die untersuchte Speläothemprobe NG01 aus dem Herbstlabyrinth-Adventhöhlen System wies zwei Hiatus auf und konnte somit in drei Wachstums-

---

phasen aufgeteilt werden, welche teilweise starke Unterschiede aufweisen. Während der beiden jüngsten Wachstumsphasen zeigten alle Fettsäuren ein ähnliches Verhalten, allerdings wies C<sub>20</sub> in dem ältesten Abschnitt einen gegensätzlichen Trend auf als die kürzerkettigen Fettsäuren. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die LMW Fettsäuren nicht über alle Wachstumsphasen hinweg die gleichen Quellen besitzen. Sie können sowohl von unterschiedlichen Mikroorganismen als auch von der Vegetation selbst stammen. Durch die Entwicklung des Bodens kam es zur Entstehung neuer Mikroorganismen und höherer mikrobiologischer Aktivität. Daraus resultierte bei C<sub>20</sub> ein Wechsel von pflanzlichen Quellen zu vermehrt mikrobiologischen Quellen während dem ersten Hiatus. Korrelationen mit dem stabilen Isotopenverhältnis  $\delta^{13}\text{C}$  und den Spurenelementen P und U verdeutlichten, dass es einen Zusammenhang zwischen der Vegetationsdichte und dem Vorkommen der Fettsäuren in dem Stalagmiten gibt. Zusätzlich konnte auch durch Ähnlichkeiten zu dem Verlauf des  $\delta^{18}\text{O}$  festgestellt werden, dass die LMW Fettsäuren regionale Temperaturveränderungen teilweise widerspiegeln können. Im Gegensatz dazu konnte durch den Vergleich mit Mg kein direkter Zusammenhang zwischen den Fettsäuren in dem Stalagmiten und der Niederschlagsmenge nachgewiesen werden. Die Analyse der LMW Fettsäuren in Tropfwasser- und Stalagmitproben machte deutlich, dass sie, aufgrund ihrer komplexen Quellen, keine optimalen Vegetations-*Proxies* sind. Daher müssen eindeutigere Vegetationsmarker gefunden werden, um die Fettsäuredaten zu ergänzen.

Zuletzt wurde erstmalig ein sog. *non-target screening* einer Speläothemprobe NG01 mittels UHPLC(-)ESI-HRMS durchgeführt. Im Rahmen dessen konnten 79 Verbindungen mit zugehörigen Summenformeln bestimmt werden. Um neue Biomolekülgruppen, welche als mögliche Vegetations-*Proxies* eingesetzt werden können, zu bestimmen, wurde aus den ermittelten Ergebnissen ein van Krevelen-Diagramm erstellt. Dabei wurde vermutet, dass die ermittelten CHNO-Verbindungen den Peptiden angehören, während CHO-Verbindungen den Ligninen und Tanninen zugeordnet wurden. Eine Auftragung des *m/z*-Verhältnisses gegen die Doppelbindungsäquivalente unterstützte diese Behauptung, da die CHO-Verbindungen viele Doppelbindungen und somit vermutlich aromatische Strukturen aufweisen. Lignine und Tannine sind charakteristische Biomarker, die lediglich in Pflanzenzellen vorkommen und können daher in zukünftigen Studien als Vegetations-*Proxies* analysiert werden.

---

## Abstract

Speleothems, cave drip water and the proxies preserved within them have significant potential to record paleoclimatic and paleoenvironmental changes. The use of stalagmites provides valuable information because they form a chemically closed system, they grow continuously and are amenable to precise  $^{230}\text{Th}/\text{U}$ -dating. The most common proxies measured in speleothems are inorganic proxies, but more recently the importance of organic matter analyses in this field is examined. Particularly lipid biomarkers play an important role. Due to their different biological sources, different compositions of lipids may provide records of environmental changes. Previous studies of lipids in speleothems differentiated between low molecular weight (LMW) compounds with chain lengths  $\leq \text{C}_{20}$  and high molecular weight (HMW) compounds with  $\text{C}_{21}$  and above. Whereas HMW compounds are derived from vascular plants, LMW compounds can be produced by microorganisms in the overlying soil, the drip water or the cave. Consequently, the different sources of the LMW lipids are much more complex and need further investigation. Therefore, this study focuses on the analysis of saturated, unbranched, even chained LMW fatty acids.

In order to measure fatty acids in speleothems and cave drip water a new method including solid phase extraction (SPE) and HPLC-MS was developed. Using a gradient program and a column oven, five analytes  $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{20}$  were separated without the need of prior derivatization. Derivatization is a time-consuming step, which can lead to contamination and it is necessary for the existing GC-MS methods. Generally, contamination is a big challenge for the analysis of fatty acids. However, blank values were drastically reduced by heating all glassware at  $450\text{ }^{\circ}\text{C}$  for several hours and a threefold distillation of the used solvent dichloromethane. In order to optimize the extraction method, spiked water samples were used to analyze different parameters such as solvent compositions for example. Thereby, SPE showed better results than Liquid/Liquid extraction (LLE), because matrix compounds were removed more efficiently. Furthermore, matrix effects have to be further considered and therefore a standard addition method was used for quantification instead of an external calibration. As proof-of-principle different drip water samples from Bunker Cave and Herbstlabyrinth-Adventhöhle cave system were measured using the new method. All five analytes were detected in these samples and their concentrations agreed with their natural distribution displaying higher concentrations of  $\text{C}_{16}$  and  $\text{C}_{18}$ . The total fatty acid concentrations showed different concentration ranges for the different sampling sites. These findings clarified that the developed method enables a quantitative analysis of the targeted analytes in this sample material. Furthermore, the required sample size was reduced in

---

comparison to previous studies from about 4 L to 60-100 mL. Used solvent volumes were also reduced in comparison to previous extraction methods, soxhlet and LLE.

The further analysis of monthly drip water samples from the Herbstlabyrinth-Adventhöhle cave system showed seasonal variations of the fatty acids. Additionally, differences between fast and slow drip sites were observed. Significant positive correlations of the fatty acids C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> were obtained. Consequently, these LMW fatty acids are derived from the same source. C<sub>20</sub> on the contrary is negatively correlated and is therefore derived from a different source than the shorter chained acids. As a borderline case between LMW and HMW, C<sub>20</sub> may also originate from plants instead of microbial sources. In addition, a comparison of the fatty acid results with data of the cave monitoring program showed that different parameters, such as ion concentrations in the drip water, have an effect on the transportation of the fatty acids. The comparison with drip rates and Mg concentrations demonstrated a connection between precipitation and occurrence of fatty acids in drip water. Higher amounts of precipitation lead to better transportation of C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>, whereas concentrations of C<sub>20</sub> were reduced. Finally, significant correlations with stable isotope ratios  $\delta^{13}\text{C}$  showed a relation of the LMW fatty acids to vegetation density.

Due to an extension of the sample preparation, the new method was also applicable to stalagmite samples and the sample material (about 0.5-3.5 g) was reduced in comparison to previous studies (10-100 g). The analyzed speleothem sample NG01 from Herbstlabyrinth-Adventhöhle had two hiatuses and was therefore divided in three growth phases. During the two youngest phases all five analytes showed a similar pattern. However, during the oldest phase C<sub>20</sub> exhibited an opposite trend as the shorter chained acids. Consequently, the LMW fatty acids do not share the same sources throughout the whole record. They can originate from microorganisms as well as higher plants. Due to a soil development during the first hiatus, amount of microorganisms and microbial activity was increased. Therefore, the main source of C<sub>20</sub> altered from vascular plants to these microorganisms. Correlations with  $\delta^{13}\text{C}$  and trace elements P and U showed a connection between vegetation density and the occurrence of LMW fatty acids in the stalagmite. Additionally, agreements with the record of  $\delta^{18}\text{O}$  showed that paleoclimatic changes are also reflected in the fatty acid record. On the contrary, a comparison with Mg demonstrated no direct relation to infiltration and precipitation. The analysis of LMW fatty acids in drip water and stalagmite samples made clear, that their use as vegetation proxies might be difficult, due to their complex sources. Characteristic biomarkers for vegetation need to be found in order to complement the fatty acid data.

---

Finally, a first non-target screening of a speleothem sample NG01 was performed using UHPLC-(−)ESI-HRMS. 79 compounds and corresponding elemental formulas were determined. In order to identify new biomarkers, which can be used as vegetation proxies, a van Krevelen diagram of the data was generated. This led to the assumption, that CHNO containing compounds are mainly peptides, whereas CHO compounds belong to the group of lignins and tannins. Plotting the  $m/z$  ratio against double bond equivalents supports this statement, because CHO compounds seem to contain aromatic structures. Lignins and tannins occur only in plant cells and can consequently be used as characteristic vegetation proxies in following studies.

---

# Inhalt

Zusammenfassung.....	7
Abstract.....	10
1. Einleitung .....	17
1.1 Speläotheme.....	17
1.1.1 Speläothembildung .....	18
1.1.2 <sup>230</sup> Th/U-Altersdatierung .....	20
1.1.3 Speläotheme als Klimaarchive .....	21
1.1.4 Allgemeiner Kenntnisstand der Speläothemforschung .....	22
1.2 Klima des Holozäns .....	23
1.3 Vegetationsentwicklung des Holozäns .....	24
1.4 Lipidbiomarker .....	26
1.4.1 Fettsäuren.....	28
1.4.2 Bisherige Studien zu Lipiden in Speläothemen und Tropfwasserproben	30
2. Analytische Grundlagen .....	33
2.1 Extraktionsverfahren .....	33
2.1.1 Flüssig/Flüssig-Extraktion .....	33
2.1.2 Festphasenextraktion.....	34
2.2 Chromatographie .....	35
2.2.1 Hochleistungsflüssigchromatographie.....	35
2.2.2 Gaschromatographie.....	37
2.3 Massenspektrometrie.....	38
2.3.1 Ionenquellen .....	39
Elektronenstoßionisation (EI).....	39
Elektrosprayionisation (ESI).....	40
2.3.2 Massenanalytoren.....	42
Linearer Quadrupol.....	42
Dreidimensionale Quadrupol-Ionenfalle .....	43
Orbitrap / Q-Exactive MS.....	45
3. Motivation.....	49
4. Experimentelles.....	51
4.1 Verwendete Chemikalien .....	51
4.2 Allgemeine Vorkehrungen zur Blindwertreduktion .....	52
4.3 Untersuchungsgebiete .....	52
4.3.1 Bunkerhöhle.....	52

---

4.3.2	Herbstlabyrinth-Adventhöhle .....	53
4.4	Probennahme.....	54
4.4.1	Bunkerhöhle.....	54
4.4.2	Herbstlabyrinth-Adventhöhle .....	56
4.5	<sup>230</sup> Th/U-Datierung der Stalagmitproben .....	57
4.6	Probenvorbereitung zur Fettsäureanalyse.....	59
4.6.1	Tropfwasserproben .....	59
4.6.2	Stalagmitproben.....	59
4.7	Herstellung der Fettsäurestandards .....	60
4.8	Herstellung der Wasser <i>Spikes</i> .....	60
4.9	Extraktionsmethoden zur Fettsäureanalyse.....	61
4.9.1	LLE .....	61
4.9.2	SPE.....	61
4.10	HPLC(-)ESI-IT/MS Parameter .....	62
4.11	GC-MS Vergleichsmessungen der Fettsäuremethode.....	63
4.11.1	Herstellung der CaCO <sub>3</sub> <i>Spikes</i> .....	63
4.11.2	Derivatisierung .....	63
4.11.3	Messparameter .....	64
4.12	<i>Non-target Screening</i> .....	65
4.12.1	Probenvorbereitung zur <i>non-target</i> Analyse .....	65
4.12.2	UHPLC(-)ESI-HRMS Parameter .....	65
5.	Ergebnisse und Diskussion .....	67
5.1	Methodenentwicklung der Fettsäureanalyse .....	67
5.1.1	Trennung mittels HPLC und MS Detektion .....	67
5.1.2	Blindwertoptimierung.....	68
5.1.3	Extraktion mittels LLE.....	69
	Abdampftemperatur .....	70
	Ultraschallbadbedingungen .....	71
	Lösungsmittel zur Wiederaufnahme.....	72
	Anwendung der LLE auf Realproben .....	73
5.1.4	Optimierung SPE .....	75
	Reproduzierbarkeit .....	75
	Mehrfachverwendung der Kartuschen .....	76
	Anwendung der SPE auf eine Poolwasserprobe.....	77
5.1.5	Quantifizierung .....	78
	Externe Kalibrierung .....	78

---

---

Standardaddition .....	80
5.1.6    Wiederfindungsrate .....	81
5.1.7    Vergleich mit GC-MS .....	81
5.2 <i>Proof-of-Principle</i> der Fettsäuremethode .....	84
5.2.1    Tropfwasser Bunkerhöhle .....	84
5.2.2    Vergleich der Gesamtfettsäurekonzentration mit Tropfwasserproben des Herbstlabyrinth-Adventhöhle Systems .....	85
5.2.3    Zusammenfassung Methodenentwicklung und <i>Proof-of-Principle</i> .....	86
5.3    Tropfwasserverlauf Herbstlabyrinth-Adventhöhle .....	88
5.3.1    Vergleich schnelle und langsame Tropfstellen .....	88
5.3.2    Korrelation der Fettsäuren .....	93
5.3.3    Vergleich mit Daten des Höhlenmonitorings .....	95
Leitfähigkeit und Ionenkonzentration .....	95
Tropfrate .....	98
Magnesium .....	99
Stabile Isotopenverhältnisse .....	101
5.3.4    Zusammenfassung der Tropfwasserergebnisse .....	103
5.4    Fettsäureanalyse der Stalagmitproben NG01 .....	105
5.4.1    Fettsäureverlauf .....	105
5.4.2    Korrelation der Fettsäuren .....	107
5.4.3    Vergleich mit stabilen Isotopenverhältnissen .....	110
5.4.4    Korrelation mit Spurenelementen .....	113
5.4.5    Zusammenfassung der Stalagmitergebnisse .....	116
5.5 <i>Non-target</i> Analyse der Stalagmitproben NG01 mittels UHPLC-(-)ESI-HRMS. ....	118
5.5.1    Datenauswertung der ermittelten <i>m/z</i> -Verhältnisse .....	118
5.5.2    Van-Krevelen-Diagramm der CHO-/ CHNO-Verbindungen .....	121
5.5.3    Zusammenfassung der <i>non-target</i> Analyse .....	125
6.    Ausblick .....	127
7.    Anhang .....	129
7.1    Zusatzmaterial .....	129
7.1.1    Probennahme .....	129
7.1.2    Massenspektrum GC-MS .....	134
7.1.3    Ergebnisse der <sup>230</sup> Th/U-Datierung .....	135
7.1.4    Ergebnisse des Altersmodells .....	136
7.1.5    Chromatogramm <i>non-target screening</i> .....	137
7.2    Abkürzungsverzeichnis .....	138

---

---

7.3	Abbildungsverzeichnis.....	140
7.4	Tabellenverzeichnis.....	143
7.5	Literaturverzeichnis .....	144
8.	Tagungsbeiträge und Publikationen .....	155
8.1	Posterbeiträge.....	155
8.2	Vorträge .....	156
8.3	Publikationen.....	157
	Danksagung .....	185
	Lebenslauf.....	186

# 1. Einleitung

## 1.1 Speläotheme

Der Begriff Speläothem setzt sich aus dem griechischen σπηλαίων (*spelaiion*, Höhle) und θέμα (*thema*, Ablagerung) zusammen. Daher werden sekundäre Mineralablagerungen, die in Höhlensystemen vorkommen, allgemein als Speläotheme bezeichnet [Fairchild & Baker, 2012]. Ihre Entstehung kann in Karstgebieten erfolgen, in welchen sich durch Lösungsvorgänge Hohlräume im Gestein ausbilden. Zu verkarstungsfähigen Gesteinen gehören vor allem Carbonatgesteine (Kalk ( $\text{CaCO}_3$ ), Dolomit ( $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ )) und Evaporite (z. B. Gips ( $\text{CaSO}_4$ )), aber auch Quarzit (hauptsächlich  $\text{SiO}_2$ ) kann unter stark humiden Bedingungen Karsterscheinungen ausbilden [Bögli, 1978]. Diese Gesteinsarten ermöglichen den Durchfluss von Wasser und werden daher als Aquifer oder Grundwasserleiter bezeichnet.

Zu den bekanntesten Speläothemen gehören Bodensinter (*Flowstones*), Sinterröhrchen und Tropfsteine, Stalaktiten und Stalagmiten [Hill & Forti, 1997], welche aus Calciumcarbonat bestehen. Sie kommen in fast allen terrestrischen Regionen vor, in denen verkarstetes Muttergestein und entsprechende Wasservorkommen vorhanden sind. Die folgende Abbildung 1 zeigt typische Speläothemformationen aus dem Herbstlabyrinth-Adventhöhle System im Westerwald.



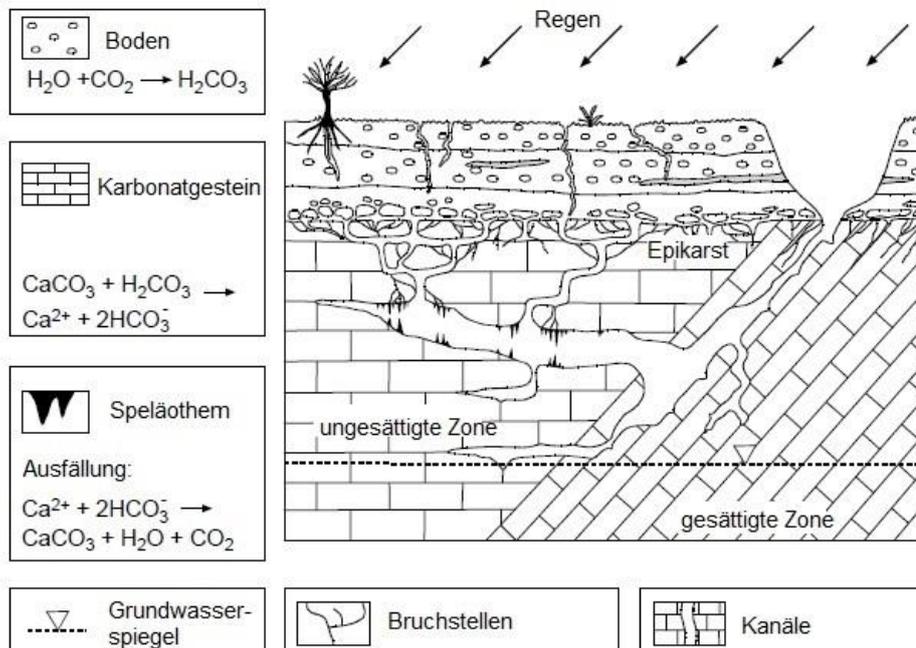
**Abbildung 1:** Charakteristische Speläothemformationen, Herbstlabyrinth-Adventhöhle.

Das  $\text{CaCO}_3$  der Speläotheme weist zahlreiche, verschiedene Kristallformen auf. Jedoch liegt es hauptsächlich als Calcit vor, welches unterschiedliche Mineralstrukturi-

ren (z. B. Palisade, Columnar) ausbildet. Des Weiteren ist das zweithäufigste Mineral, aus welchem  $\text{CaCO}_3$ -haltige Speläotheme bestehen, Aragonit. Dieses bildet vermehrt stark verlängerte Kristalle aus. Besonders bei höheren Temperaturen, schnellerem Ausfällen des  $\text{CaCO}_3$  und bei höheren Mg/Ca-Verhältnissen wird eine aragonitische Ausbildungsform begünstigt. Da Aragonit jedoch thermodynamisch weniger stabil ist als Calcit, wird es teilweise zu diesem umkristallisiert [Railsback, 2000].

### 1.1.1 Speläothembildung

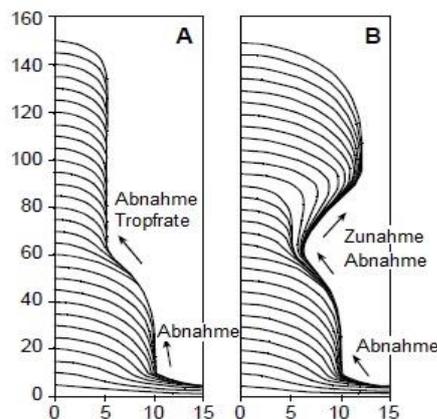
Das Grundprinzip der Speläothementstehung wird anhand der folgenden Abbildung 2 erläutert. Dabei ist der erste Schritt die Diffusion von  $\text{CO}_2$  aus der Luft in das Niederschlagswasser. Das  $\text{CO}_2$  kann entweder direkt aus der Atmosphäre stammen, oder aber von Pflanzen über die Wurzeln oder von Mikroorganismen im Boden abgegeben werden [Scheffer *et al.*, 2002]. Dies führt zur Bildung von Kohlensäure, welche wiederum das  $\text{CaCO}_3$  des Carbonatgesteins löst. Hierbei besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Acidität des Wassers und der Menge an  $\text{CaCO}_3$ , das gelöst werden kann.



**Abbildung 2:** Modell eines Karstsystems mit den einzelnen chemischen Prozessen, die zur Speläothembildung führen; modifiziert nach [Fairchild *et al.*, 2007].

Die Lösung erreicht letztlich einen Hohlraum, in welchem ein niedrigerer  $\text{CO}_2$  Partialdruck ( $p\text{CO}_2$ ) herrscht, als im Boden vorliegt. Dies führt zu einem Ausgasen von  $\text{CO}_2$  aus der Lösung [Holland *et al.*, 1964] bis diese in einem Gleichgewicht mit der

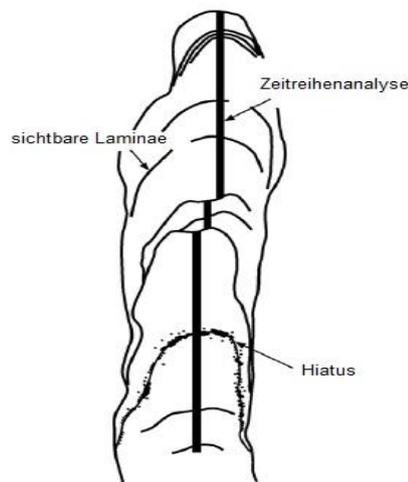
Höhlenatmosphäre steht. Diese Differenz des  $p\text{CO}_2$  zwischen der Höhle und dem darüberliegenden Boden ist das entscheidende Kriterium der Ausbildung von Speläothemen. Wenn dem Tropfwasser das  $\text{CO}_2$  entzogen ist, führt dies zu einer erneuten Gleichgewichtseinstellung der Lösung, wodurch sich der pH-Wert erhöht und es zu einer Übersättigung an  $\text{CaCO}_3$  kommt [Dreybrodt, 2011]. Dies hat dessen Ausfällung zur Folge, sodass unterschiedliche Speläothemformationen entstehen können [Fairchild & Baker, 2012]. Trifft ein Wassertropfen auf dem Höhlenboden auf, bildet sich zunächst ein runder Wasserfilm. Dabei wird eine dünne Kalkschicht abgeschieden, wodurch ein neuer Stalagmit senkrecht zur Oberfläche des Höhlenbodens zu wachsen beginnt. Die Wachstumsrate des Stalagmiten ist dabei direkt proportional zu der Calciumionenkonzentration im Tropfwasser [Genty *et al.*, 2001]. Bei diesem Prozess spielt die Tropfrate eine ausschlaggebende Rolle in Bezug auf die äußere Form des Stalagmiten. Somit führt eine Abnahme der Tropfrate zu einer Verringerung des Durchmessers und umgekehrt (Abbildung 3). Aufgrund dieser relativ einfachen Wachstumsgeometrie werden Stalagmiten für paläoklimatische Untersuchungen bevorzugt verwendet.



**Abbildung 3:** Abhängigkeit des Stalagmitwachstums von der Tropfrate; modifiziert nach [Fairchild *et al.*, 2007].

Im Laufe eines Jahres verändern sich mehrere Parameter, die die Speläothembildung beeinflussen [Fairchild *et al.*, 2006]. Obwohl die Temperatur innerhalb der Höhle annähernd konstant ist, kommt es aufgrund von variierenden Tropfwassermengen und  $\text{CO}_2$  Konzentrationen zu saisonalen Unterschieden bei der Calcitausfällung. Dadurch können sich sichtbare Wachstumsschichten, sog. Laminae ausbilden ([Boch *et al.*, 2011], [Baker *et al.*, 2008]). Die folgende Abbildung 4 zeigt schematisch den Querschnitt eines Stalagmits mit veranschaulichter Lamination. Die meisten Stalagmiten weisen ebenso Wachstumsunterbrechungen, sog. Hiatus auf. Diese deuten darauf

hin, dass sich der Ort der Tropfstelle über einen gewissen Zeitraum verschoben hat, sodass keine weitere Calcit ausfällung an dieser Stelle mehr gegeben war. Oder aber es kam zu langfristigen klimatischen Veränderungen, welche das weitere Wachstum des Stalagmiten verhindert haben. Zudem veranschaulicht Abbildung 4, dass die Wachstumsachse eines Stalagmiten unregelmäßig sein kann. Daher spielt die exakte Probenahme eine große Rolle.



**Abbildung 4:** Schematischer Querschnitt eines Stalagmiten; modifiziert nach [Fairchild *et al.*, 2006].

### 1.1.2 $^{230}\text{Th}/\text{U}$ -Altersdatierung

Die Analyse eines Stalagmiten ergibt nur dann verwertbare Ergebnisse, wenn akkurate Alter zugeordnet werden können. Um dies zu gewährleisten, können verschiedene Methoden Anwendung finden, z. B. das Zählen der jährlichen Laminae. Da dieses Verfahren jedoch einen möglichen Hiatus übersehen kann, ist seine Verwendung nicht verlässlich genug. Daher kommen unterschiedliche radiometrische Altersdatierungen zum Einsatz, um die genauen Alter zuverlässig zu ermitteln.

Die am häufigsten verwendete Datierungsmethode stellt die  $^{230}\text{Th}/\text{U}$ -Methode dar, welche eine präzise Datierung bis zu einem Alter von ca. 600.000 Jahren ermöglicht [Scholz & Hoffmann, 2008]. Sie basiert darauf, dass in einem natürlichen, ungestörten System ein Gleichgewicht der Uran Isotope herrscht. Dieses kann durch natürliche Fraktionierungsprozesse zwischen Uran und Thorium, oder zwischen  $^{234}\text{U}$  und  $^{238}\text{U}$  gestört werden. Die damit im Ungleichgewicht stehenden Isotope streben den Zustand des Gleichgewichts an und erreichen diesen letztlich durch radioaktiven Zerfall. Dem Prinzip der Datierung liegt infolgedessen zu Grunde, dass Uran, welches als wasserlösliches Uranylion ( $\text{UO}_2^{2+}$ ) vorliegt, in den Stalagmiten eingebaut wird. Thorium hingegen ist größtenteils an Partikel gebunden und unlöslich in Wasser, wodurch es

nicht in die Höhle transportiert werden kann. Des Weiteren wird angenommen, dass das Calcitgerüst des Stalagmiten als geschlossenes System anzusehen ist und somit nachträglich weder Uran noch Thorium in das System eingebracht oder aus diesem entfernt werden kann. Demzufolge ist kein anfängliches Thorium in dem neu gebildeten Speläothem vorhanden. Im Laufe der Zeit kommt es jedoch durch den  $\alpha$ -Zerfall von  $^{234}\text{U}$  zu einer Anreicherung von  $^{230}\text{Th}$ . Darum ist es durch Messung der Aktivitätsverhältnisse von  $^{230}\text{Th}/^{238}\text{U}$  und  $^{234}\text{U}/^{238}\text{U}$  möglich, das Bildungsalter zu berechnen [Richards & Dorale, 2003]. Dabei müssen die bestimmten Alter in stratigraphischer Abfolge, ohne eine sog. Altersumkehr, auftreten. Falls dennoch eine Altersumkehr aufgrund von ursprünglich vorhandenem  $^{230}\text{Th}$  bestimmt wird, kann zusätzlich  $^{232}\text{Th}$  gemessen werden. Dieses ist ein sehr langlebiges und das am häufigsten vorkommende Thorium Isotop und es steht mit  $^{230}\text{Th}$  in einem definierten Verhältnis. Dadurch kann es als Korrekturfaktor verwendet und somit Kontaminierungen ausgeschlossen werden. Um zuletzt jeder Tiefe der Probe ein Alter zuzuordnen, wird aus den gemessenen Altern ein Alter-Distanz Modell berechnet [Scholz & Hoffmann, 2011].

### 1.1.3 Speläotheme als Klimaarchive

Um globale Veränderungen hervorgerufen von anthropogenen Quellen und natürlichen Vorkommnissen zu bestimmen, ist es wichtig die Klima- und Umweltbedingungen der Vergangenheit zu kennen. Dies wird durch Untersuchungen von sog. Klimaarchiven bewerkstelligt. Die daraus resultierenden Erkenntnisse führen sowohl zu einem verbesserten Verständnis des vorherrschenden Klimawandels als auch zur besseren Voraussage zukünftiger Klimaveränderungen durch Klimamodelle.

Die Eigenschaften verschiedener Klimaarchive sind bereits umfassend untersucht worden [Bradley, 1999]. Daher werden an dieser Stelle lediglich die Vor- und Nachteile der Speläotheme [Fairchild & Baker, 2012] gegenüber bekannten Archiven, wie Eisbohrkernen, Baumringen und Sedimenten betrachtet. Ein großer Vorteil der Speläotheme ist das Auftreten von kontinuierlichen Wachstumsphasen über mehrere tausend Jahre. Bezüglich dessen sind sie mit Eisbohrkernen vergleichbar. Sie übertreffen diese jedoch mit ihrer weiten Verbreitung in allen terrestrischen Regionen, wohingegen Eisbohrkerne auf wenige Gebiete limitiert sind. Hierdurch können Stalagmiten ausschlaggebende Informationen über regionales Klima und Umweltveränderungen liefern, oder sogar für archäologische Untersuchungen herangezogen werden. Des Weiteren sind sie physikalisch und chemisch robust und bilden ein geschlossenes System. Entsprechend sind sie im Gegensatz zu anderen terrestrischen Archiven, welche meist keine Zeitreihen vor dem Holozän liefern, nicht anfällig für Erosion oder diagenetische

Veränderungen [Sasowsky & Mylroie, 2007]. Aus diesem Grund enthalten sie eine Vielzahl von *Proxies* („Stellvertreter“-Komponenten), wie stabile Isotope und Spurenelemente, welche verschiedenste Erkenntnisse bezüglich Klima- und Umweltveränderungen übermitteln [Lauritzen & Lundberg, 1999]. Obwohl diese *Proxies* in anderen Klimaarchiven, z. B. Baumringen und marinen Korallen, ebenfalls erhalten bleiben, weisen sie jedoch eine schlechtere Auflösung auf als in Speläothemen. Ein weiterer maßgeblicher Vorteil stellt die genaue Datierungsmöglichkeit mit Hilfe der  $^{230}\text{Th}/\text{U}$ -Methode dar, obwohl diese Altersdatierung auch bei Korallen anwendbar ist. Als Nachteile der Speläotheme ist zum einen das mangelnde Verständnis der Bedeutung verschiedener *Proxies* zu nennen. Zum anderen gibt es zu wenige Vergleichsstudien mit anderen Klimaarchiven, um die Robustheit der Interpretation der Ergebnisse zu überprüfen. Diese genannten Vor- und Nachteile machen deutlich, aus welchem Grund das Interesse an der Speläothemforschung in den letzten Jahren stetig wächst.

### 1.1.4 Allgemeiner Kenntnisstand der Speläothemforschung

Früher wurde angenommen, dass Speläotheme zu komplex sind, um zuverlässige Zeitreihen zu entwickeln. Es dauerte etwa 40 Jahre, um zu beweisen, dass die verschiedenen Prozesse verstanden werden können und Speläotheme in der Lage sind, globale und regionale Naturerscheinungen widerzuspiegeln [Fairchild *et al.*, 2006]. Ein wichtiges Kriterium der Speläothemforschung ist daher nach wie vor die Datierung. Da Stalagmiten aufgrund von schwankenden Tropfraten unterschiedlich schnell wachsen, ergibt sich bei jedem Tropfstein eine individuell variable Tiefenskala [Henderson, 2006]. Zu dieser muss anhand der präzise gemessenen Alter mathematisch eine Zeitskala zugeordnet werden. Diese Umwandlung erfolgt über die bereits erwähnten Alter-Distanz Modelle. Dazu werden unablässig neue Methoden entwickelt, z. B. der StalAge Algorithmus [Scholz & Hoffmann, 2011].

Als Ergänzungen zur Datierung können petrographische Analysen von Dünnschliffen durchgeführt werden ([Frisia *et al.*, 2000], [Frisia *et al.*, 2002]). Diese weisen auf einen Hiatus oder Veränderungen der Tropfwasserverfügbarkeit und dessen Chemismus hin. Zusätzlich werden vermehrt und in großem Umfang sog. Höhlenmonitoring-Programme bewerkstelligt ([McDonald *et al.*, 2007], [Verheyden *et al.*, 2008], [Genty, 2008], [Riechelmann *et al.*, 2011]). Diese ermöglichen kontinuierliche geochemische und hydrochemische Analysen der Höhlenluft und des Tropfwassers über Zeiträume von mehreren Jahren. Dadurch werden neue Einsichten in die rezenten Prozesse in der Höhle gewonnen und deren Verständnis gefördert, wodurch die Interpretation der Speläothemdaten erleichtert wird.

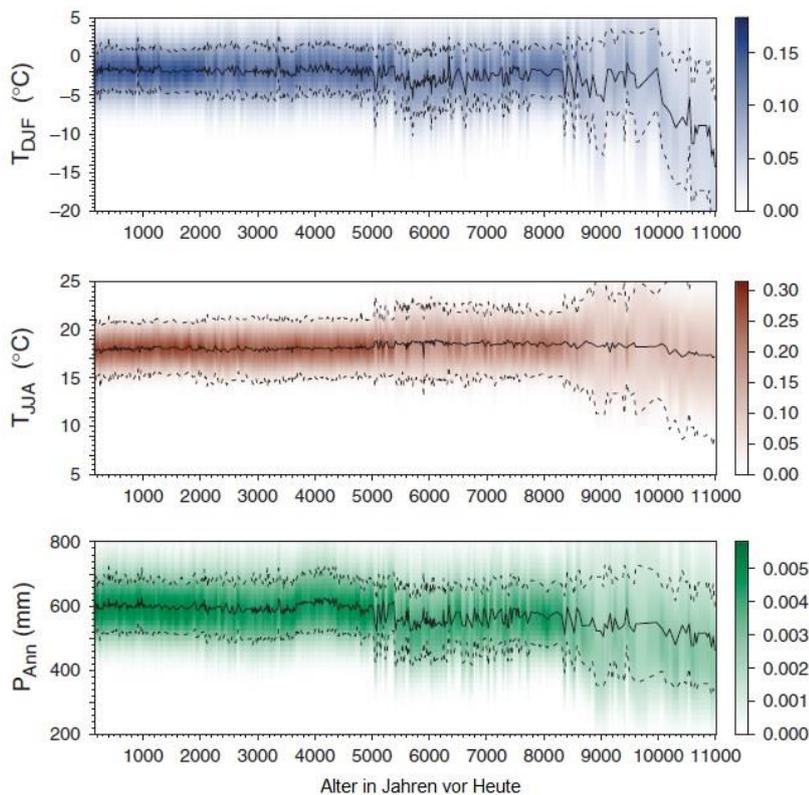
Des Weiteren konzentriert sich ein Großteil der Forschung auf viele verschiedene *Proxies*, um deren Interpretation zu festigen und infolgedessen neue Erkenntnisse zu erlangen. Somit können Sauerstoffisotope Paläoklimainformationen liefern (z. B. [McDermott *et al.*, 1999], [McDermott, 2004], [Spötl & Mangini, 2007], [Spötl *et al.*, 2008], [Wassenburg *et al.*, 2013]), während Kohlenstoffisotope und Spurenelementanalysen Vegetationsveränderungen ([Huang *et al.*, 2001], [Fohlmeister *et al.*, 2011]), Hydrologie- und Niederschlagsveränderungen ([Roberts *et al.*, 1999], [Treble *et al.*, 2003]) und sogar anthropogene Einflüsse in der direkten Umgebung der Höhle widerspiegeln [Fairchild & Treble, 2009]. Jedoch beschränken sich die meisten dieser früheren Studien auf anorganische *Proxies*. In Bezug auf organische Verbindungen in Speläothemen gibt es vergleichsweise wenige Studien. Hierbei spielen die Lipidbiomarker eine besondere Rolle, auf welche in Kapitel 1.4 noch ausführlich eingegangen wird.

## 1.2 Klima des Holozäns

Die nördlichen Gletscher begannen nach dem letzten glazialen Maximum ab ca. 20.000 Jahre BP (*before present*; Bezug: 1950) rapide abzuschmelzen. Das für diese Arbeit relevante Untersuchungsgebiet gehörte zu dieser Zeit dem Periglazial an. Dieses unvergletscherte Gebiet war von Frost geprägt und es herrschten durchschnittliche Jahrestemperaturen unter  $-1\text{ °C}$  [Huijzer & Vandenberghe, 1998]. Das Ende des letzten Glazials markierte den Beginn des gegenwärtigen Interglazials, des Holozäns.

Abbildung 5 zeigt die rekonstruierten Sommer- und Wintertemperaturen im Gebiet des Meerfelder Maars aus der Eifelregion (ca. 100 km vom Untersuchungsgebiet Herbstlabyrinth-Adventhöhle entfernt) von vor ca. 11.000 Jahren BP [Litt *et al.*, 2009]. Diese Zeitspanne entspricht ungefähr dem Holozän, welches ca. 11.700 Jahre BP begann. Zu Beginn des Holozäns, im Präboreal, herrschten bereits ähnliche Sommertemperaturen wie heute vor. Nichtsdestotrotz waren die Wintertemperaturen noch weitaus kälter [Schönwiese, 1995], was in Abbildung 5 anhand der durchschnittlichen Januar-temperatur deutlich zu erkennen ist. Der Verlauf des Präboreals ist allerdings von einem markanten Temperaturanstieg gekennzeichnet. Im darauffolgenden Boreal (ca. 9.000-8.000 Jahre BP) waren daher sowohl die Sommertemperaturen als auch die Wintertemperaturen bereits erhöht, wobei die Niederschlagsmengen eher gering waren. Das Temperaturmaximum wurde allerdings im Atlantikum (ca. 8.000-5.700 Jahre BP) erreicht. Es war mit Temperaturen etwa  $2\text{ °C}$  wärmer als heute und mit hohen Niederschlagsmengen gekennzeichnet. Zu Beginn des Subboreals (ca. 5.660-2.750 Jahre BP) kam es erneut zu einer Abkühlung der Jahresdurchschnittstemperatur. Dennoch

beschreibt Schönwiese diesen Zeitraum als warme Klimaepoche, die allerdings Schwankungen aufweist und weitaus trockener ist, als das Atlantikum. Zuletzt folgt das Subatlantikum, welches den aktuellen Zeitabschnitt des Holozäns darstellt. Es wird generell als weitaus feuchtere und kühlere Epoche als das Subboreal beschrieben. Dennoch war es geprägt von mehreren Temperaturschwankungen deren unmittelbare Auswirkungen die Vegetation und somit auch die Entwicklung des Menschen beeinflusst haben, wie die Kleine Eiszeit (ca. AD 1500 bis 1860).



**Abbildung 5:** Rekonstruierte Durchschnittstemperaturen ( $T_{DJF}$ : Januar,  $T_{JJA}$ : Juli) und Niederschlagsmengen des Meerfelder Maares nach [Litt *et al.*, 2009]; Farbintensität: Wahrscheinlichkeitsdichte, durchgezogene Linie: Mittelwert, gestrichelte Linie: Standardabweichung.

### 1.3 Vegetationsentwicklung des Holozäns

Zur Betrachtung der Vegetationsentwicklung wird die Palynologie (Pollenanalyse) herangezogen. Dabei wird ein Pollendiagramm der letzten 11.000 Jahre BP von Litt *et al.* verwendet [Litt *et al.*, 2009], welches ebenfalls aus dem Gebiet des Meerfelder Maares stammt (Abbildung 6). Anhand der Pollenkonzentrationen von Birke (*Betula*) und Kiefer (*Pinus*) wird deutlich, dass zu Beginn des Holozäns bereits eine dicht bewaldete Landschaft vorherrschte. Im Boreal kamen vermehrt Eichen (*Quercus*), Ulmen (*Ulmus*) und vor allem Haseln (*Corylus*) hinzu.

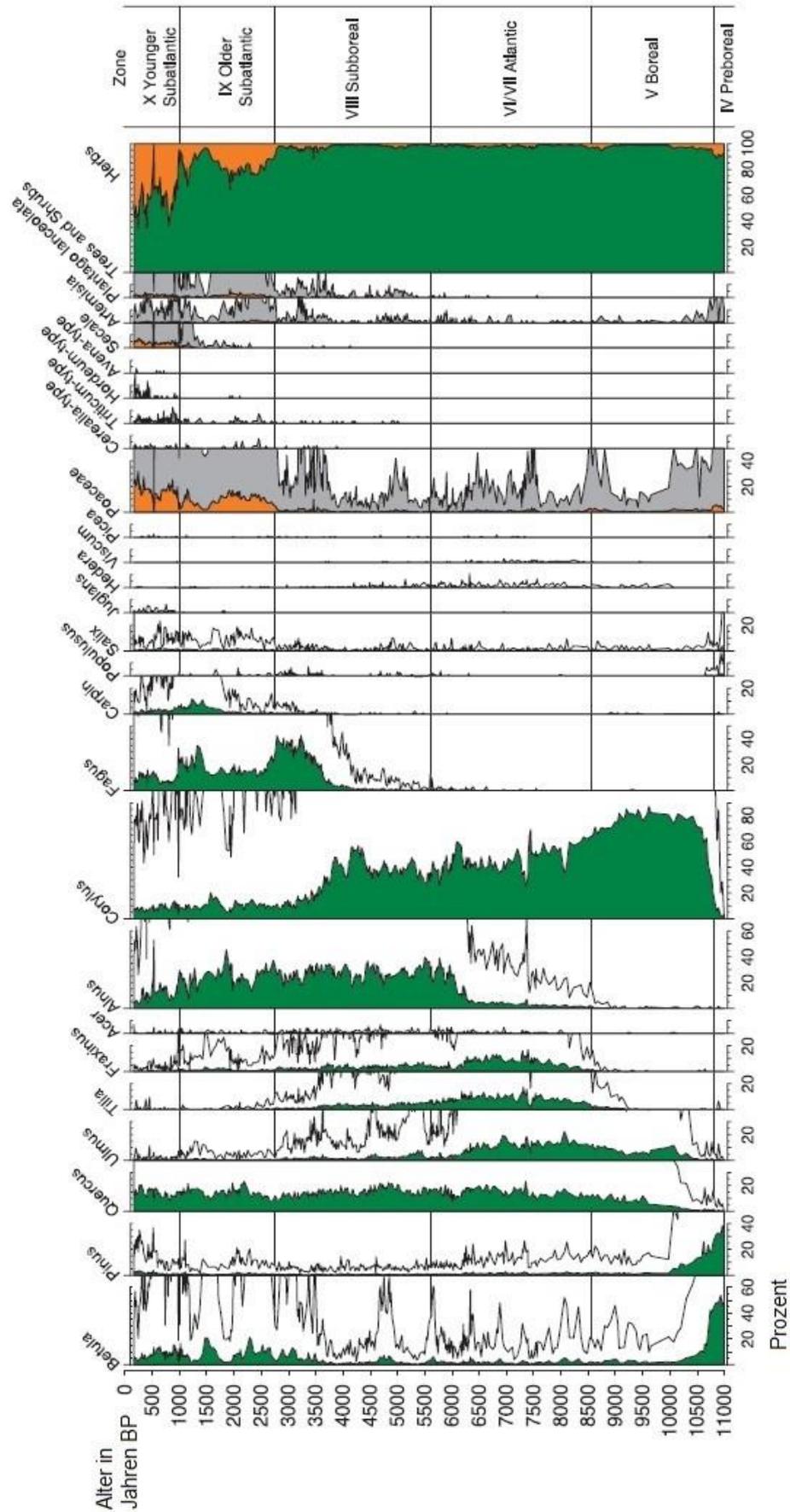


Abbildung 6: Pollendiagramm des Meerfelder Maars [Litt et al., 2009].

Am Ende des Boreals folgte daraufhin ein Rückgang der *Betula* und *Pinus* Pollen, sodass das Atlantikum von typischen Eichenmischwäldern aus *Quercus*, *Ulmus*, *Corylus*, Linde (*Tilia*) und Esche (*Fraxinus*) dominiert wurde. Wie bereits in Kapitel 1.2 erwähnt, stellte das Atlantikum ein Temperaturoptimum dar. Dadurch wird das Auftauchen von Mistel (*Viscum*) und Efeu (*Hedera*) in lediglich dieser Epoche erklärt. Die ersten Anzeichen von anthropogenen Einflüssen auf die Flora traten etwa 6.000 Jahre BP auf. Davor beherrschten noch das Klima, die Bodenverhältnisse und die Konkurrenzfähigkeit der Arten die Vegetationsentwicklung.

So traten danach erste Pollen von Kulturgräsern (*Cerealia*) und Spitzwegerich (*Plantago lanceolata*) auf, welche in direktem Zusammenhang zu der menschlichen Einflussnahme stehen. Eine weitere starke Vegetationsveränderung trat mit Beginn des Subatlantikums auf. In dieser Epoche wichen viele Baumpollen den Gräserpollen, z. B. den Süßgräsern (*Poacea*). Das deutet darauf hin, dass vermehrt offene Landschaften auftraten und der Waldbestand abnahm. Dennoch gibt es seit Mitte des Subboreals stets eine hohe Konzentration an Buchenpollen (*Fagus*) und im Subatlantikum einen Anstieg der Hainbuchen (*Carpinus*), sodass Buchenwälder bis heute die bewaldeten Landschaften dominieren. Ebenso haben die Weidenpollen (*Salix*) speziell im Subatlantikum zugenommen.

## 1.4 Lipidbiomarker

„Lipid“ ist ein Überbegriff für hydrophobe Naturstoffe, welche aufgrund ihrer langen Kohlenwasserstoffketten größtenteils wasserunlöslich sind. Sie werden als Biomarker bezeichnet, weil ihr Vorkommen Rückschlüsse auf ihren biologischen Ursprung ermöglicht. Oft werden sie fälschlicherweise als „Fette“ betitelt, allerdings stellen diese nur eine Untergruppe der Lipide, die Triacylglyceride, dar. Eine Übersicht der Komplexität der verschiedenen Lipidklassen ist in der folgenden Abbildung 7 gezeigt.

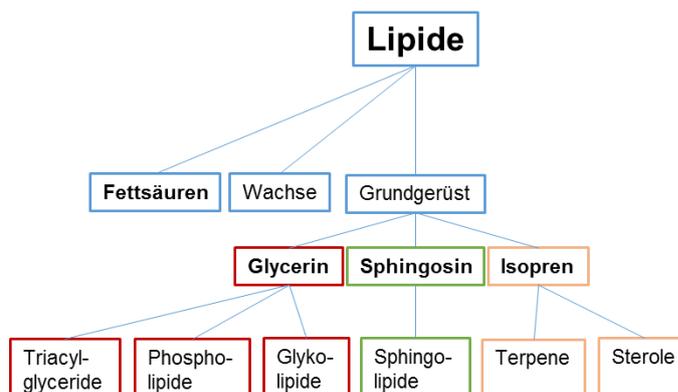
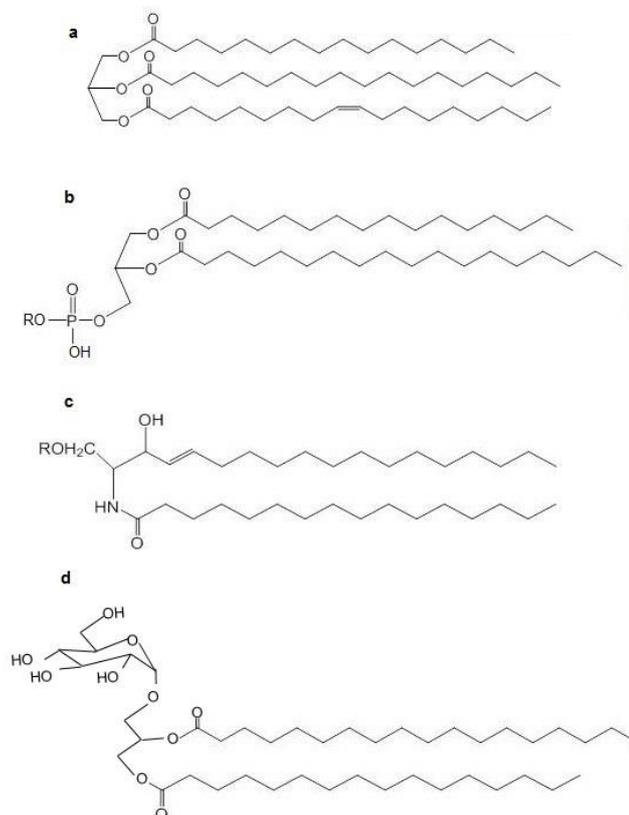


Abbildung 7: Übersicht der Lipidklassen.

Zunächst werden Lipide in verseifbare und nicht verseifbare Lipide unterschieden. Zu den nicht verseifbaren Lipiden gehören alle Isoprenederivate, wie Terpene und Sterole. Im Gegensatz dazu gehören die Fettsäuren, Wachse und alle auf Glycerin und Sphingosin basierenden Lipide zu den verseifbaren Komponenten. Hierbei sind die Fettsäuren die kleinsten Lipide, welche ebenso die Hauptbestandteile vieler komplexer Lipidstrukturen darstellen [Alberts, 1999]. Sie sind Monocarbonsäuren, die aus einer lipophilen Kohlenwasserstoffkette und einer hydrophilen Carboxylgruppe bestehen. Auf die Fettsäuren wird im folgenden Kapitel 1.4.1 noch ausführlich eingegangen. Alle komplexeren Strukturen der verseifbaren Lipide werden durch Veresterungen verschiedener Alkohole mit den Fettsäuren gebildet. Die einfachste Variante stellen hierbei die Wachse dar, welche langkettige, primäre Alkohole als Ausgangsstoffe besitzen.

Überdies kann ebenso Glycerin als Grundgerüst dienen, wobei zum einen drei Hydroxylgruppen verestert werden können, sodass Triacylglyceride entstehen. Zum anderen gibt es ebenfalls Glycerinderivate, bei welchen lediglich zwei Veresterungen mit Fettsäuren möglich sind. Hierzu gehören Phospholipide und Glykolipide. Eine weitere Lipidklasse, die auf der Veresterung mit Fettsäuren basiert, sind die Sphingolipide, welche Sphingosin als Ausgangsstoff besitzen [Allen & Good, 1965]. Strukturbeispiele dieser Lipidklassen sind in der folgenden Abbildung 8 gegeben.



**Abbildung 8:** Strukturbeispiele der a: Triacylglyceride, b: Phospholipide, c: Sphingolipide, d: Glykolipide.

Die biologischen Funktionen der verseifbaren Lipide sind ebenso vielfältig wie ihre chemischen Strukturen. So liefern sie durch die  $\beta$ -Oxidation (biochemischer Abbau) der Fettsäuren effizient Energie für die Zellen in Form von Adenosintriphosphat (ATP). Hierbei ergibt z. B. ein Palmitinsäuremolekül 106 Moleküle ATP, was im Vergleich dem Abbau von mehr als drei Molekülen Glucose entspricht. Zusätzlich liefert die  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren noch weitere Produkte, welche in andere Abbaumechanismen, z. B. die Atmungskette und den Citratzyklus, eingespeist werden [Stumpf & Bradbeer, 1959]. Folglich führt dies zu einer weiteren ATP Produktion. Somit sind die Fettsäuren weitaus energiereicher als verschiedene Kohlenhydrate. Daher fungieren Triacylglyceride mit ihren veresterten Fettsäuren als Energie-Langzeitspeicher. Wachse hingegen nutzen hauptsächlich dem Schutz von Oberflächen, z. B. Pflanzenblättern.

Eine weitere Funktion der Lipide stellt der Aufbau biologischer Membranen dar. Hierzu kommen vermehrt Phospholipide zum Einsatz, welche in fast allen Biomembranen eine sog. Lipiddoppelschicht ausbilden. Diese Doppelschicht stellt eine Trennschicht verschiedener Zellkompartimente und dem Inneren und Äußeren der Zelle selbst dar. Zusätzlich kommen ebenso Glykolipide auf der Außenseite der Membranen vor, welche eine Rolle in der Kommunikation der Zellen untereinander spielen. Ähnlich verhält es sich mit den Sphingolipiden, die ebenfalls als Membranbestandteile dienen. Sie sind relevant bei der Signalübertragung und Interaktion einzelner Zellen und werden daher auch als Botenstoffe bezeichnet. Des Weiteren können einzelne Fettsäurereste ebenso als Lipid-Anker für Proteine in Biomembranen verwendet werden ([Heldt *et al.*, 2011], [Berg *et al.*, 2007]).

### 1.4.1 Fettsäuren

Biogene Carbonsäuren ab einer Kohlenstoffkettenlänge von vier C-Atomen werden als Fettsäuren bezeichnet. Ihre Eigenschaften sind von ihrer polaren Kopfgruppe, der Carboxylgruppe, und dem unpolaren Rest geprägt. Dieser Aufbau ist in Abbildung 9 exemplarisch an Myristinsäure veranschaulicht.



**Abbildung 9:** Fettsäurestruktur mit polarer Kopfgruppe und unpolarem Kohlenwasserstoff-Rest.

Sie weisen aufgrund ihres Mechanismus der Fettsäurebiosynthese meist eine gerade Anzahl an C-Atomen auf. Die Fettsäuren können sowohl gesättigt als auch ungesättigt vorkommen, allerdings überwiegen hierbei Fettsäuren mit cis-Doppelbindungen. Des Weiteren liegen sie in Eukaryoten unverzweigt vor, wobei Prokaryoten/Bakterien auch verzweigte Fettsäuren produzieren können [Alberts, 1999].

Die Fettsäurebiosynthese erfolgt in Tieren im Cytosol nahezu aller Zellen und in Pflanzen größtenteils in den Plastiden. Bei Säugetieren und Pilzen ist hierzu ein dimerer Multienzymkomplex, die Fettsäuresynthase (FAS), notwendig, wobei jedes Monomer dieses Komplexes im Zentrum das Acyl-Carrier-Protein (ACP) enthält. Bei Pflanzen und Bakterien übernehmen einzelne Enzyme die Aufgabe der FAS. Ausgangsstoff für die Fettsäuresynthese ist Acetyl-Coenzym A (CoA) [Murphy, 2005]. Dieses dient zum einen durch Verknüpfung mit der Thiolgruppe des ACPs als Starter-Molekül als auch zum anderen als Edukt zur Synthese von Malonyl-CoA. Malonyl-CoA wiederum wird für eine Kettenverlängerung um eine C<sub>2</sub>-Einheit benötigt. Eine Übersicht der einzelnen Reaktionsschritte der Kettenverlängerung ist in der folgenden Abbildung 10 dargestellt.

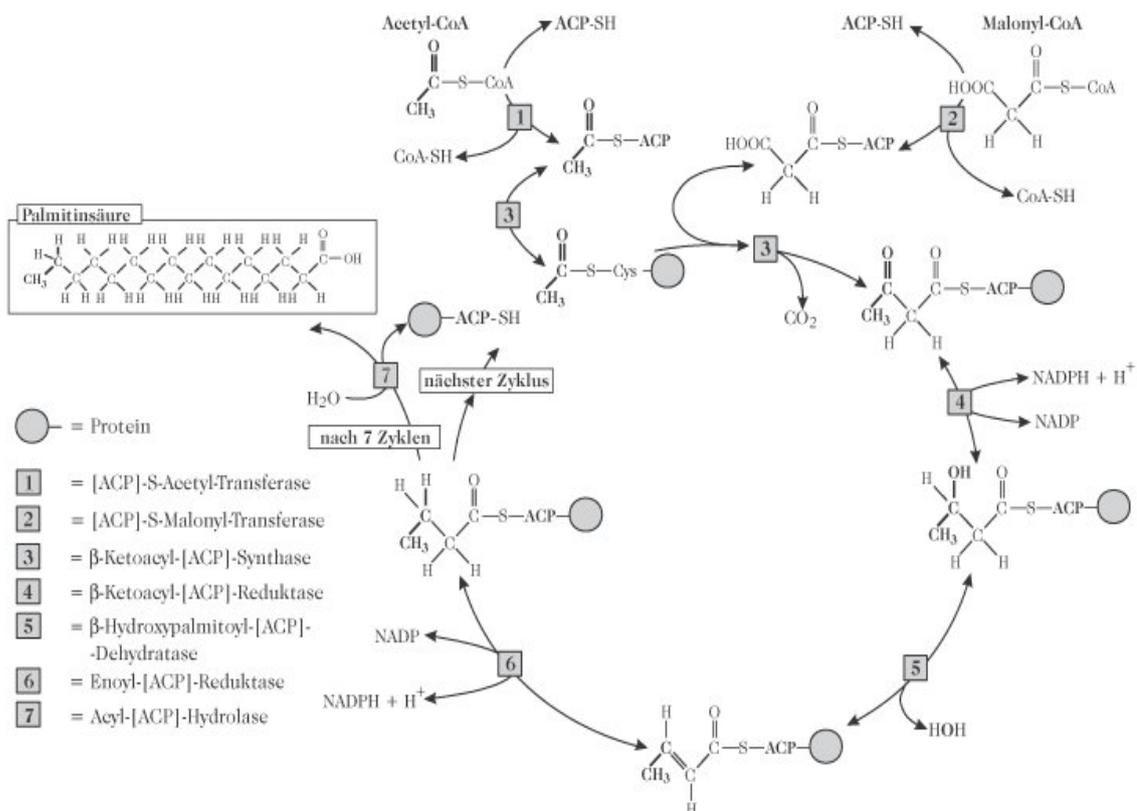


Abbildung 10: Schema der Fettsäurebiosynthese bis zur Palmitinsäure [Rehner & Daniel, 2010].

Der Zyklus der Kettenverlängerung wird mehrfach wiederholt bis die benötigte Kettenlänge erreicht ist. Das häufigste Produkt stellt hierbei die Palmitinsäure dar. Im

Anschluss wird die synthetisierte gesättigte Fettsäure von dem ACP abgespalten. Die weitere Reaktion zu komplexeren Lipiden findet in anderen Zellorganellen, z. B. dem endoplasmatischen Retikulum (ER) statt. Ebenso erfolgt die Einführung von Doppelbindungen nachträglich enzymatisch im ER [Berg *et al.*, 2007]. Somit sind in eukaryotischen Zellen zunächst gesättigte, unverzweigte Fettsäuren mit geradzahliger Kettenlänge die häufigsten Produkte der Fettsäurebiosynthese.

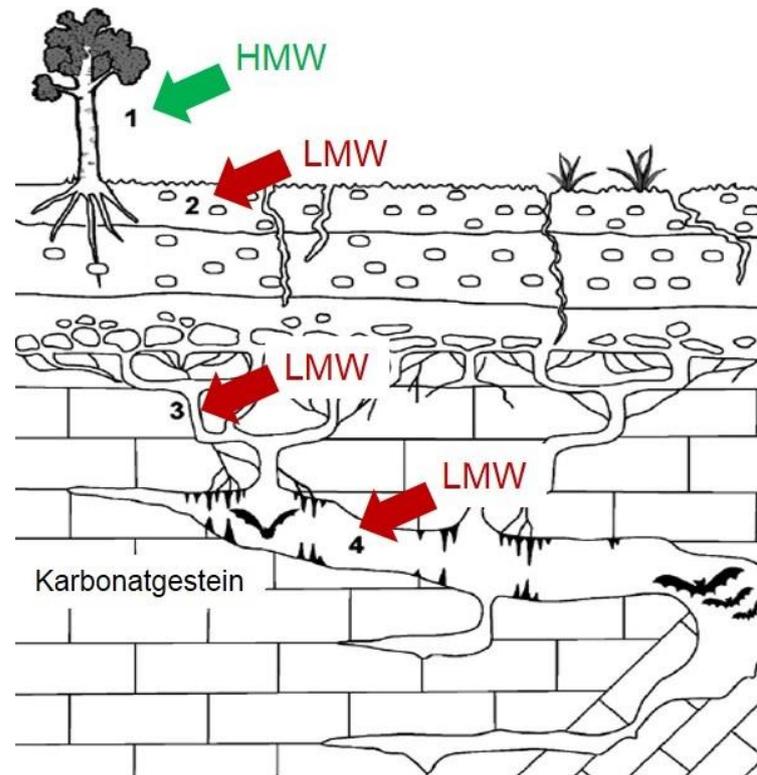
### 1.4.2 Bisherige Studien zu Lipiden in Speläothemen und Tropfwasserproben

In Bezug auf organische Biomarker in Speläothemen und Tropfwasser gibt es im Vergleich zu anorganischen *Proxies* wenige Studien. Erste Studien beschränkten sich lediglich auf die Fluoreszenz in Speläothemen hervorgerufen von der Gesamtheit des gelösten organischen Materials (*Dissolved organic matter*, DOM), wie Huminsäuren und Fulvosäuren ([Baker *et al.*, 1993], [Baker *et al.*, 1996], [McGarry & Baker, 2000]). Dadurch konnten jedoch keine Einzelverbindungen, welche als organische *Proxies* dienen könnten, oder deren exakte Quellen identifiziert werden.

Bereits eine Vielzahl an früheren Studien von Sediment- und Bodenproben legen besonderen Wert auf Lipidbiomarker ([Brassel *et al.*, 1986], [Ficken *et al.*, 1998], [Nott *et al.*, 2000], [Bull *et al.*, 2000], [van Dongen *et al.*, 2000], [Kögel-Knabner, 2002], [Zocatelli *et al.*, 2012]). Dabei wurde erkannt, dass Lipide verschiedene biologische Quellen besitzen und damit genaue Erkenntnisse über Vegetationsveränderungen liefern können [Meyers, 1997]. Daraus ergibt sich ein besonderes Interesse Lipidbiomarker ebenso in Speläothem- und Tropfwasserproben zu untersuchen. Das Ziel dabei ist, durch die Analyse der genauen Lipidzusammensetzung unterschiedliche Organismen als deren Quelle zu identifizieren und damit Paläoumweltveränderungen bzw. rezente Umweltveränderungen sichtbar zu machen. Frühe Studien von Lipidbiomarkern zeigten, dass diese auf einer Zeitskala bis zu 100.000 Jahre unverändert in Speläothemen präserviert werden [Rousseau *et al.*, 1995] und infolgedessen als *Proxy* eingesetzt werden können.

Darauffolgende Studien von Lipiden in Stalagmitproben konzentrierten sich vor allem auf Alkane, Alkohole und Fettsäuren ([Xie *et al.*, 2003], [Xie *et al.*, 2005], [Blyth *et al.*, 2010], [Rushdi *et al.*, 2011], [Blyth *et al.*, 2011]). Hierbei wird zwischen LMW (*low molecular weight*) Komponenten mit einer Kohlenstoffkette  $\leq C_{20}$  und HMW (*high molecular weight*) Komponenten ab  $C_{21}$  unterschieden [Blyth *et al.*, 2008]. Die verschiedenen potentiellen Quellen sind in der folgenden Abbildung 11 dargestellt. Dabei können die Lipide generell sowohl aus der Vegetation und dem Boden oberhalb der Höhle stammen als auch aus dem Aquifer oder der Höhle selbst. Es besteht die

Annahme, dass HMW Verbindungen von Gefäßpflanzen stammen ([Matsuda & Koyama, 1977], [Colombo *et al.*, 1996], [Xie *et al.*, 2005]), während LMW Verbindungen hauptsächlich von Mikroorganismen sowohl im Boden, im Tropfwasser als auch in der Höhle gebildet werden ([Carrie *et al.*, 1998], [Xie *et al.*, 2005]). Nichtsdestotrotz könnten LMW Verbindungen ebenfalls als *Proxies* für Paläoumweltveränderungen dienen, da ein direkter Zusammenhang zwischen mikrobieller Aktivität im Boden und der Dichte und Zusammensetzung der Vegetation besteht [Ohtonen & Väre, 1998].



**Abbildung 11:** Potentielle Quellen organischer Biomarker 1: Vegetation, 2: Bodenökosystem, 3: Aquifer, 4: Höhlensystem; modifiziert nach [Blyth *et al.*, 2008].

Die analytischen Methoden zur Bestimmung dieser Lipide in Stalagmitproben beruhen hauptsächlich auf Messungen mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS). Zur Extraktion der Analyten wird sowohl die Soxhlet Extraktion [Xie *et al.*, 2003] als auch ein Säureaufschluss gekoppelt an eine Flüssig/Flüssig-Extraktion verwendet ([Blyth *et al.*, 2006], [Wang *et al.*, 2012]). Letzteres ermöglicht, dass sowohl ungebundene als auch in die Calcit Matrix eingebundene Lipide extrahiert werden können [Huang *et al.*, 2008]. Dadurch kommt es einerseits zu der simultanen Extraktion und Analyse einer Vielzahl von Komponenten; andererseits führt die unspezifische Extraktion dieser Methoden dazu, dass große Probenmengen (ca. 10-100 g) benötigt werden. Somit kann keine hohe Zeitauflösung erzielt werden. Des Weiteren geht der Messung mittels GC-MS eine zeitintensive Derivatisierung mittels

*N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) voraus, wodurch es zu Analytverlusten und Kontaminierungen kommen kann.

Zusätzlich zu der Betrachtung dieser Lipide als Paläoumwelt-*Proxies* in Stalagmitproben, muss ebenso untersucht werden, wie die Lipidbiomarker transportiert und letztlich präserviert werden. Daher nimmt ihre Analyse in Tropfwasserproben an Bedeutung zu. Dennoch gibt es zu dieser Probenmatrix nur vereinzelte Studien. Diese beschränkten sich zunächst ebenso auf DOM ([Baker *et al.*, 1997], [van Beynen *et al.*, 2002], [Ban *et al.*, 2008], [Hartland *et al.*, 2010]), wodurch die Identifizierung und Untersuchung von Einzelverbindungen nicht möglich war. Allerdings gibt es eine Studie von Li *et al.* [Li *et al.*, 2011], welche sich mit Fettsäuren in Tropfwasser beschäftigt. Diese beruht auf einer Festphasenextraktion und einer GC-MS Methode ähnlich zu Blyth *et al.* [Blyth *et al.*, 2006]. Für die Analysen wurden Proben über einen Zeitraum von zwei Jahren und einem Probenvolumen von jeweils bis zu 4 L gesammelt. Somit besteht der Bedarf, durch die Verwendung selektiver Methoden, die Nachweisgrenzen und folglich die benötigten Probenmengen sowohl von Speläothemen als auch von Tropfwasserproben zu reduzieren.

Eine weitere Gruppe der Lipidbiomarker, die seit Kurzem im Fokus der Speläothem- und Tropfwasserforschung stehen, sind die Glycerinether (*glycerol dialkyl glycerol tetraethers*; GDGT), welche ähnlich der LMW Verbindungen ebenfalls vermutlich von mikrobiellen Quellen stammen ([Yang *et al.*, 2011], [Blyth & Schouten, 2013], [Blyth *et al.*, 2014]). Bei diesen Analyten kommt auch die Flüssig/Flüssig-Extraktion, allerdings in Kombination mit Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)-MS, zum Einsatz. Hierbei werden ebenso große Probenmengen von 5-20 g benötigt. Diese Studien weisen darauf hin, dass die GDGTs vielmehr von Mikroorganismen in der Höhle selbst oder im Wasserfilm auf dem Stalagmiten gebildet werden, als im darüber liegenden Boden und somit keine direkte Verbindung zu der Vegetation besteht. Dies könnte daher ebenfalls für die LMW Verbindungen der Fall sein. Folglich wird deutlich, dass die unterschiedlichen Quellen der LMW Lipide, die in Stalagmiten gefunden werden, sehr komplex sind und weiterhin untersucht werden müssen.

## 2. Analytische Grundlagen

### 2.1 Extraktionsverfahren

Zur Bestimmung geringer Analytkonzentrationen organischer Substanzen in flüssigen Umweltproben sind Extraktionsverfahren erforderlich, die die Analyten sowohl von Störkomponenten abtrennen als auch anreichern. Hierbei sind die beiden Methoden am weitesten verbreitet, welche im Folgenden genauer erläutert werden.

#### 2.1.1 Flüssig/Flüssig-Extraktion

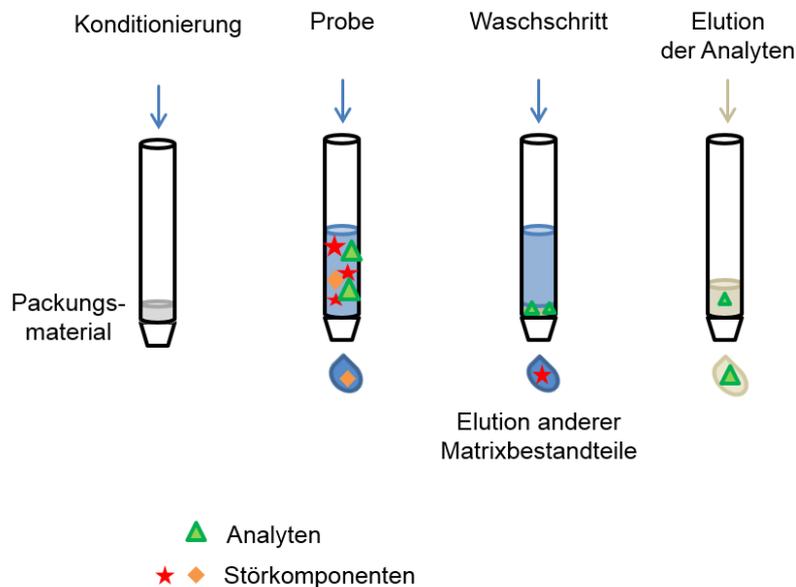
Bei der Flüssig/Flüssig-Extraktion (*Liquid/Liquid extraction*, LLE) werden wässrige Proben mit organischen Lösungsmitteln ausgeschüttelt, um die organischen Analyten zu extrahieren und aufzukonzentrieren [Cammann, 2010]. Die beiden nicht mischbaren Phasen können im simpelsten Fall mit einem Scheidetrichter ausgeschüttelt werden, allerdings ist ebenso die Extraktion in einem Ultraschallbad möglich. Hierbei kommt es zu einer Verteilung der Analyten zwischen den beiden Phasen. Dieser Prozess beruht für Analyten, welche in beiden Phasen in gleicher chemischer Form vorliegen, auf dem Nernst'schen Verteilungsgesetz (II.1.), wobei  $c_1$ ,  $c_2$  den Konzentrationen des Analyten in Phase 1 oder 2 und  $\alpha$  dem jeweiligen Verteilungskoeffizienten entspricht:

$$\frac{c_1}{c_2} = \alpha \quad (\text{II.1.})$$

Bei dieser Extraktionsmethode ist es von Vorteil die Probe öfter mit kleineren Volumina auszuschütteln, als weniger Extraktionsschritte mit höheren Volumina zu wählen. Des Weiteren muss darauf geachtet werden, dass die verwendeten Lösungsmittel eine hohe Reinheit besitzen, um Kontaminierungen, welche die Bestimmung der Analyten stören können, zu vermeiden. Zudem muss das optimale Lösungsmittel zur Extraktion des Analyten gefunden werden, welches nicht mit der wässrigen Phase mischbar ist [Hampe, 1985]. Ein Nachteil dieser Extraktionsmethode ist der hohe Arbeitsaufwand, da bei Emulsionsbildung die Phasentrennung sehr lange dauern kann.

### 2.1.2 Festphasenextraktion

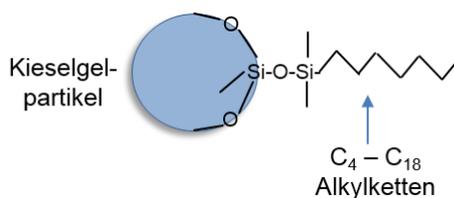
Ein weiteres Verfahren zur Extraktion flüssiger Proben ist die Festphasenextraktion (SPE). Bei dieser Methode werden die Analyten auf Kartuschen, die zwischen zwei Fritten ein spezifisches Adsorbens enthalten, zurückgehalten. Die folgende Abbildung zeigt schematisch den Ablauf eines solchen Extraktionsprozesses.



**Abbildung 12:** Schematischer Prozess der Festphasenextraktion.

Im ersten Schritt werden die Kartuschen mit geeigneten Lösungsmitteln konditioniert. Dabei werden mögliche Kontaminierungen beseitigt und das Packungsmaterial „aktiviert“. Danach wird die Probe langsam aufgegeben, wobei erste Störkomponenten, die nicht von dem Adsorbens zurückgehalten werden, bereits entfernt werden. Die Analyten hingegen werden in diesem Schritt durch Wechselwirkungen mit dem Adsorbens auf der Kartusche angereichert. Anschließend kann ein Waschschrift folgen, wodurch weitere Störkomponenten eluiert werden. Zuletzt folgt die Elution der Analyten mit Hilfe eines geringen Volumens eines geeigneten Lösungsmittels mit hoher Elutionskraft. Eine weitere Vorgehensweise der SPE beinhaltet die Retention der Störkomponenten, während die Analyten zuerst eluiert werden [Cammann, 2010].

Als feste Phasen kommen häufig chemisch modifizierte Kieselgelpartikel (Abbildung 13) zum Einsatz, welche unpolare Reste enthalten (Umkehrphasen). Zusätzlich sind auch Normalphasen mit polaren Substituenten am Trägermaterial oder Ionenaustauscher möglich.



**Abbildung 13:** Modifizierte Kieselgelpartikel als SPE Packungsmaterial.

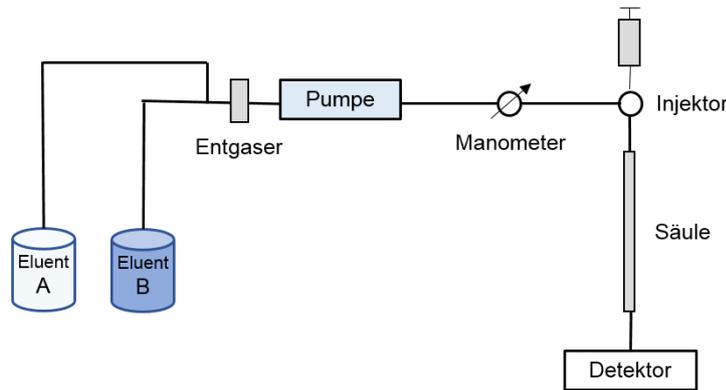
Ein Vorteil der SPE gegenüber der LLE ist der geringere Verbrauch an organischen Lösungsmitteln. Außerdem können bei der SPE zur Elution ebenso Lösungsmittel verwendet werden, die mit Wasser mischbar sind. Dies ist bei der LLE nicht möglich. Des Weiteren beinhaltet die SPE bereits die Aufkonzentrierung der Analyten, während diese bei der LLE nachträglich separat durchgeführt werden muss. Ein Nachteil der SPE ist ebenfalls der hohe Zeitaufwand für die Extraktion von sehr großen Proben volumina [Liška *et al.*, 1989]. Dennoch gibt es vielfältige Anwendungsgebiete der SPE, die in der Literatur bereits ausführlich beschrieben sind ([Liška, 2000], [Poole, 2003]).

## 2.2 Chromatographie

Die Chromatographie ist ein physikalisch-chemisches Trennverfahren, bei welchem die Trennung der zu untersuchenden Analyten auf unterschiedlichen Verteilungsgleichgewichten zwischen einer stationären Phase und einer mobilen Phase beruht [Skoog & Leary, 1996]. Dabei wird die Probe von der mobilen Phase durch eine Trennsäule, die die stationäre Phase enthält, transportiert. Je nachdem wie effizient die Analyten von der stationären Phase zurückgehalten werden, besitzen sie eine unterschiedliche Verweildauer in der Trennsäule. Die mobile Phase kann sowohl gasförmig (Gaschromatographie) als auch flüssig (Flüssigchromatographie) sein. Diese beiden Varianten werden im Folgenden genauer erläutert.

### 2.2.1 Hochleistungsflüssigchromatographie

Seit der Entwicklung der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) wurde die Flüssigchromatographie zu einer Standardmethode in der instrumentellen Analytik. Vor allem für Analyten, die der Gaschromatographie unzugänglich sind, ist die HPLC gut geeignet. Dies gilt insbesondere für thermisch labile oder schwerflüchtige Substanzen, wie im Bereich der Bioanalytik. Die folgende Abbildung 14 zeigt den schematischen Aufbau eines HPLC-Systems [Cammann, 2010].



**Abbildung 14:** Schematischer Aufbau eines HPLC-Systems.

Als mobile Phase wird ein Lösungsmittelgemisch (Eluent A/B) verwendet, welches von einer Pumpe transportiert wird. Es folgt eine Entgasung der Lösungsmittel, um gelöste Gase (Sauerstoff, Stickstoff) zu entfernen. Deren Kompression könnte in verschiedenen Bereichen der HPLC-Anlage zu Ausgasungen führen, die in Flusschwankungen und somit verminderter Reproduzierbarkeit resultieren können. Die Mischkammer regelt die Eluentenzusammensetzung, welche einen ausschlaggebenden Einfluss auf die Trennung der Analyten hat. So ist es möglich, eine isokratische Trennung mit gleichbleibender Lösungsmittelzusammensetzung zu wählen, oder es wird ein Gradientenprogramm verwendet. Bei diesem ändert sich die Eluentenzusammensetzung über die Messdauer, sodass eine optimale chromatographische Auflösung der Analyten und eine verbesserte Analysenzeit erzielt werden kann [Meyer, 2009].

Mit Hilfe des Injektors wird die Probenlösung in den Eluentenfluss gebracht und zur Säule weitertransportiert. Diese kann bei Bedarf auch durch einen Säulenofen beheizt werden, um die chromatographische Trennung und die Reproduzierbarkeit zu verbessern. Die gebräuchlichen HPLC Säulen beinhalten Partikel mit 3-5  $\mu\text{m}$  Durchmesser und können einen Druck bis zu 250 bar aufbauen. Der Trennvorgang ist bei der HPLC sowohl von der stationären Phase als auch von der Beschaffenheit der mobilen Phase abhängig. Am weitesten verbreitet ist die Umkehrphasenchromatographie, bei welcher unpolare stationäre Phasen zum Einsatz kommen, wie zum Beispiel  $\text{C}_4$ ,  $\text{C}_8$  und  $\text{C}_{18}$  Alkylketten, die an Kieselgelpartikel gebunden sind. Als mobile Phasen werden hauptsächlich Wasser, Methanol und Acetonitril verwendet, sodass die Elution der Analyten mit abnehmender Polarität erfolgt. Mögliche Alternativen für polarere, hydrophile Analyten, welche von den Umkehrphasen unzureichend retardiert werden, stellen die HILIC-Säulen dar (Hydrophile Interaktionschromatographie). Diese besitzen eine polare stationäre Phase (z. B. Zwitterionen), allerdings kommen ähnliche mobile Phasen zum Einsatz wie bei der Umkehrphasenchromatographie ([Hemström & Irgum, 2006], [Harris *et al.*, 2014]). Im Gegensatz dazu wird bei der Normalphasenchromato-

graphie eine polare stationäre Phase mit einer unpolaren mobilen Phase genutzt. Zuletzt gelangen die getrennten Substanzen auf einen geeigneten Detektor, von welchem sie nachgewiesen werden. Hierzu können in der HPLC sowohl der UV/Vis-Detektor, der Diodenarraydetektor, der Fluoreszenzdetektor als auch das Massenspektrometer verwendet werden.

In den letzten Jahren geht der Trend zur sog. UHPLC (*Ultra high performance liquid chromatography*), einer HPLC mit stark gesteigerter Leistung. Dabei werden kürzere Säulen (z. B. 5 cm) und für das Säulenmaterial kleinere Partikeldurchmesser (1,5-2  $\mu\text{m}$ ) verwendet [Harris *et al.*, 2014], um ein geringeres Probenvolumen und kürzere Analysezeiten unter zehn Minuten zu erreichen. Selbst Trennzeiten unter einer Minute können mit der UHPLC erzielt werden. Die Verwendung dieses Säulenmaterials führt allerdings zu weitaus höheren Drücken, als bei der gewöhnlichen HPLC vorherrschen. Demnach müssen alle Komponenten einer UHPLC Anlage diesen Arbeitsdrücken von bis zu 1.000 bar standhalten können [Jorgenson, 2010].

## 2.2.2 Gaschromatographie

Im Gegensatz zu der Flüssigchromatographie wird bei der Gaschromatographie (GC) ein inertes Trägergas als mobile Phase verwendet, welches nicht mit den Analyten wechselwirkt, sondern lediglich dem Transport dient. Die meist benutzten Gase hierbei sind Stickstoff, Helium und Wasserstoff [Skoog *et al.*, 2007]. Die Auswahl des Gases hängt vor allem von den Diffusionseigenschaften ab, die durch die van-Deemter Gleichung beschrieben werden. Der allgemeine Aufbau eines GC-Systems ist in der folgenden Abbildung veranschaulicht.

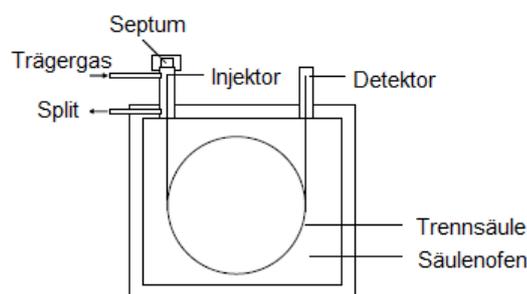


Abbildung 15: Schematischer Aufbau eines Gaschromatographen.

Die GC eignet sich besonders zur Trennung flüchtiger Analyten oder Substanzen, die sich bis 400 °C unzersetzt verdampfen lassen. Um dies zu bewerkstelligen, müssen gewisse Analyten, z. B. Carbonsäuren, vor der Messung derivatisiert werden,

um sie der GC zugänglich zu machen [Drozd, 1975]. Dabei kann durch chemische Modifizierung, wie Silylierung der Carbonsäuren, ihre Flüchtigkeit erhöht werden. Über einen beheizten Injektor, welcher eine augenblickliche und vollständige Verdampfung gewährleistet, wird die Probe auf die Trennsäule gebracht. Dazwischen befindet sich das Splitventil, das die Probenaufgabe und den Trägergasfluss reguliert. Sowohl gepackte Säulen als auch Dünnschicht- oder Dünnschichtkapillarsäulen kommen bei der GC zum Einsatz [Grant, 1976]. Hierbei dienen hauptsächlich Polymere, Molekularsiebe oder modifizierte Polysiloxangerüste als stationäre Phasen. Des Weiteren wird der Trennprozess der Analyten durch den Säulenofen unterstützt. Somit kann die Trennung sowohl isotherm verlaufen als auch mit Hilfe eines geeigneten Temperaturprogramms in Hinsicht auf chromatographische Auflösung und Analysendauer optimiert werden. Im Anschluss erfolgt die Detektion, wobei die GC hauptsächlich mit dem Wärmeleitfähigkeitsdetektor, dem Flammenionisationsdetektor, dem Elektroneneinfangdetektor oder dem Massenspektrometer gekoppelt wird [Cammann, 2010].

### 2.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) gilt heute als unverzichtbares analytisches Hilfsmittel in den Naturwissenschaften und verwandten Fachbereichen. Prinzipiell werden in der MS aus anorganischen oder organischen Verbindungen gasförmige Ionen erzeugt und diese nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) aufgetrennt [Gross, 2013]. Demnach besteht ein Massenspektrometer aus einem Einlasssystem, einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor. Hierbei werden die meisten dieser Bauteile unter Hochvakuum betrieben, wie in der folgenden Abbildung 16 dargestellt. Dieses Hochvakuum ist notwendig, um eine ausreichende mittlere freie Weglänge zu gewährleisten.

Über das Probeneinlasssystem werden die Analyten in die Ionenquelle eingebracht, in welcher diese ionisiert werden. Dabei können je nach Art der Ionisierung sowohl Molekül- als auch Fragmentionen entstehen. Im Anschluss daran werden die Ionen entsprechend ihres  $m/z$ -Verhältnisses im Massenanalysator getrennt, wobei die Massenanalysatoren in gepulste und kontinuierlich arbeitende Analysatoren unterteilt werden. Mit Hilfe eines Detektors, häufig eines Elektronenmultipliers, werden die nach ihrem  $m/z$ -Verhältnis getrennten Ionen qualitativ und quantitativ nachgewiesen. Es gibt eine Vielzahl an verschiedenen Ionenquellen und Massenanalysatoren, welche bei der MS zum Einsatz kommen. In den beiden folgenden Kapiteln wird lediglich auf die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Komponenten eingegangen.

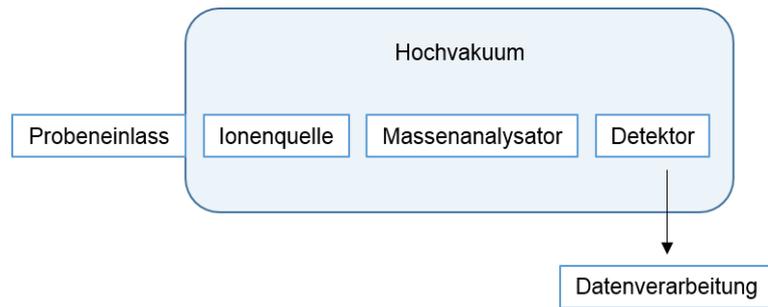


Abbildung 16: Allgemeines Schema eines Massenspektrometers.

### 2.3.1 Ionenquellen

#### *Elektronenstoßionisation (EI)*

Bei der EI werden Elektronen von einem beheizten Filament freigesetzt und in einem elektrischen Feld beschleunigt, wie in Abbildung 17 veranschaulicht.

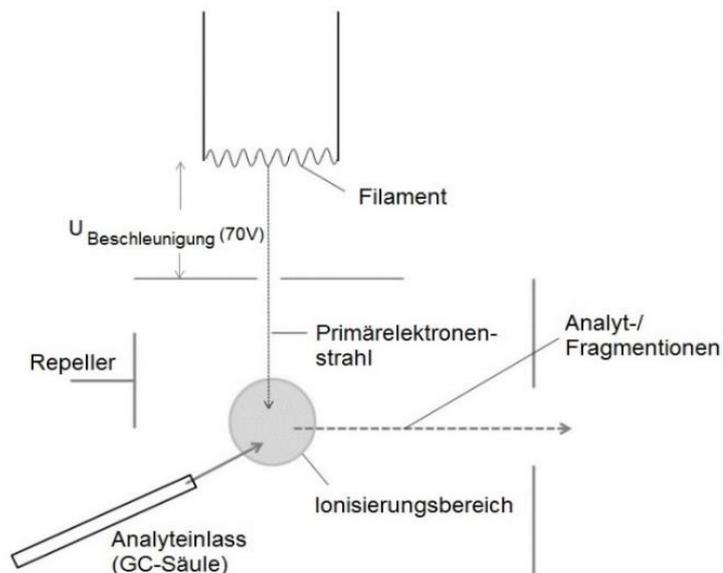


Abbildung 17: Schematischer Aufbau einer Elektronenstoßionisation.

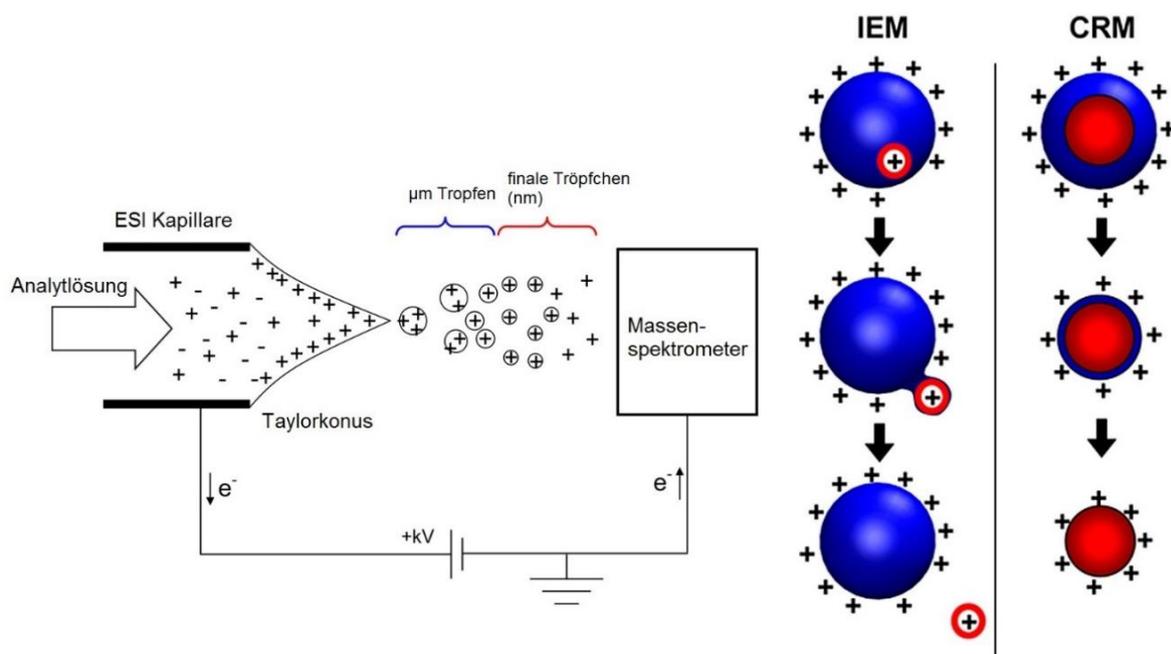
Kommt es dabei zu einer Kollision dieses Primärelektronenstrahls mit einem neutralen Analytmolekül so wird dessen kinetische Energie übertragen. Falls diese Energie die Ionisierungsenergie des Analytmoleküls übersteigt, wird ein Elektron aus dem Molekül (M) herausgeschlagen und es bildet sich ein Radikalkation ( $M^+$ ) [Mark, 1982].



Die Bildung negativer Radikationen durch Elektroneneinfang ist hierbei deutlich unwahrscheinlicher (1:1.000). Eine maximale Ionenausbeute wird bei einer Primärelektronenenergie von 70 eV erhalten. Dies lässt sich damit begründen, dass nach de Broglie 70 eV einer Wellenlänge von etwa 140 pm entspricht und das im Bereich der C-C-Einfachbindung (154 pm), der C=C-Doppelbindung (133 pm) und der C-H-Einfachbindung (110 pm) liegt. Des Weiteren tritt bei 70 eV ein Plateau in der Ionisierungseffizienz auf, wodurch Spektren bei geringfügigen Schwankungen der Primärelektronenenergien aufgrund der besseren Reproduzierbarkeit immer noch vergleichbar sind. Die überschüssige übertragene Energie führt zudem zur Fragmentierung der Radikalkationen, sodass verschiedene Bruchstücke entstehen. Daher wird die EI als hartes Ionisierungsverfahren bezeichnet. Aufgrund dessen und der Vergleichbarkeit der Ionisierung können sog. Fragment-Bibliotheken angelegt werden. Somit kommt die EI mit Hilfe dieser Datenbanken zur Identifizierung unbekannter Substanzen zum Einsatz [Gross, 2013].

### Elektrosprayionisation (ESI)

Die ESI ist das bekannteste Verfahren unter den Atmosphärendruck-Ionisierungsmethoden. Für die Kopplung der LC mit dem MS stellt sie die bevorzugte Ionenquelle dar [Ar-drey, 2006]. Die folgende Abbildung 18 zeigt ihren schematischen Aufbau und den Mechanismus der Ionenbildung beispielhaft im positiven Ionenmodus.



**Abbildung 18:** Schematischer Mechanismus einer ESI Quelle im positiven Ionenmodus mit Veranschaulichung der beiden Modelle zur Ionenbildung IEM und CRM; modifiziert nach [Koneremann *et al.*, 2013].

Bei dieser Ionisierungsmethode werden die Analyten samt Eluent über eine Kapillare in ein starkes elektrisches Feld (2-6 kV) eingebracht. Dabei kommt es mit Hilfe eines konzentrisch um die Kapillare angeordneten Inertgasstroms ( $N_2$ ) zur Ausbildung eines stabilen Sprays. Der darauffolgende Mechanismus der Ionenbildung kann in drei Abschnitte eingeteilt werden [Kearle & Verkerk, 2009]. Im positiven Ionenmodus reichern sich zunächst die positiven Ladungsträger an der Flüssigkeitsoberfläche an und werden in Richtung der negativ geladenen Gegenelektrode gezogen. Dadurch bildet sich, aufgrund des Gleichgewichts zwischen der Oberflächenspannung und des elektrischen Feldes, ein Flüssigkeitskonus, der sog. Taylorkonus, aus [Taylor, 1964]. Wenn die Oberflächenspannung überwunden ist, beginnt von der Spitze des Taylorkonus ein feiner Flüssigkeitsstrahl (*liquid filament*) zu emittieren. Dieser ist nicht stabil und zerfällt in viele kleine Primärtröpfchen, welche einen Überschuss an positiven Ladungsträgern enthalten. Im folgenden Schritt werden diese durch Verdampfen des Lösungsmittels immer kleiner, sodass die Ladungsdichte an der Oberfläche kontinuierlich zunimmt. Sobald das *Rayleigh*-Limit erreicht ist und die elektrostatische Abstoßung die Oberflächenspannung übersteigt, werden kleinere Mikrotröpfchen freigesetzt. Im letzten Schritt kommt es zur Entstehung von freien Ionen in der Gasphase. Hierzu gibt es zwei Modelle die die Erzeugung der gasförmigen Ionen erklären. Das ältere Modell des geladenen Rückstandes (*charged residue model*, CRM) postuliert, dass letztlich ein Tröpfchen mit einem Radius von 1 nm nur noch ein Analyt ion enthält und durch Verdampfung des restlichen Lösungsmittels ein gasförmiges Analyt ion entsteht. Das zweite Modell, das Ionenemissionsmodell (IEM) geht davon aus, dass ein hochgeladenes Tröpfchen mit einem Radius von etwa 8 nm die gasförmigen Analyt ionen emittiert [Kearle & Tang, 1993]. Heutzutage wird angenommen, dass das CRM eher für sehr große Moleküle zutrifft, während das IEM die Bildung kleinerer Ionen besser beschreibt.

Die ESI ist ein sanftes Ionisierungsverfahren bei welchem Quasi-Molekülionen ( $[M+H]^+$  bei positiver Spannung;  $[M-H]^-$  bei negativer Spannung) entstehen. Daher ist sie sowohl für große als auch kleine, nichtflüchtige, leicht ladungsannahmende Analyten geeignet. Ihre Besonderheit ist die Bildung von mehrfach geladenen Ionen, sodass die  $m/z$ -Verhältnisse hochmolekularer Analyten komprimiert werden. Damit kommen diese in einen  $m/z$  Bereich, der für die meisten Massenanalysatoren zugänglich ist. Des Weiteren können auch Addukt-Ionen mit Bestandteilen des Eluenten oder der Probenmatrix, wie  $[M+Na]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ ,  $[M+Cl]^-$  oder Cluster-Ionen, z. B.  $[2M+H]^+$  auf-tauchen [Gross, 2013].

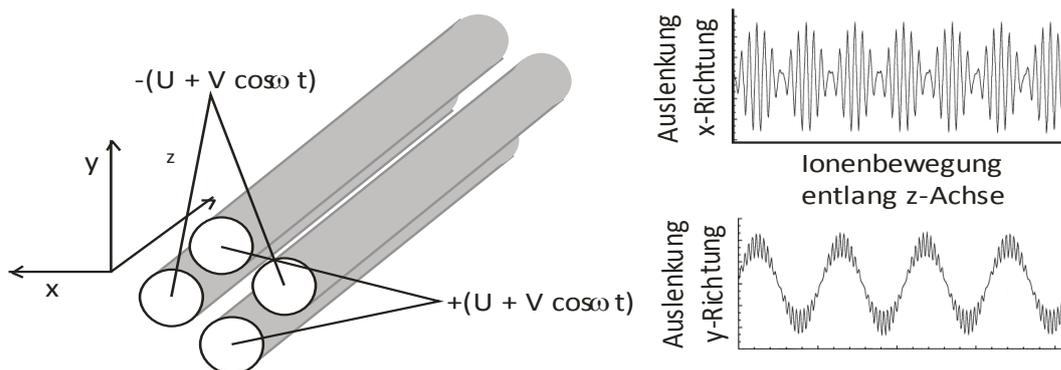
Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich eine neue Art der ESI, die sog. HESI (geheizte ESI), verwendet, welche von Thermo Fisher Scientific entwickelt wurde. Bei dieser wird der Fluss aus der HPLC durch eine beheizte Kapillare geleitet, bevor es zu

der Ausbildung des Sprays kommt. Dadurch wird die Verdampfung des Lösungsmittels begünstigt, was besonders bei wässrigen Eluentenzusammensetzungen von Vorteil ist.

### 2.3.2 Massenanalysatoren

#### Linearer Quadrupol

Der lineare Quadrupol besteht aus vier zylindrisch oder hyperbolisch geformten Stabelektroden, die quadratisch angeordnet und in z-Richtung gerichtet sind. Die gegenüberliegenden Elektroden werden dabei auf gleicher Spannung gehalten, welche sich aus einem Gleich- und einem Wechselstrompotential zusammensetzt. Somit resultiert ein hyperbolisches elektrisches Wechselfeld, welches auf eintreffende Ionen wechselnd anziehende und abstoßende Kräfte in der xy-Ebene ausübt. Dieser Aufbau ist schematisch in Abbildung 19 dargestellt.



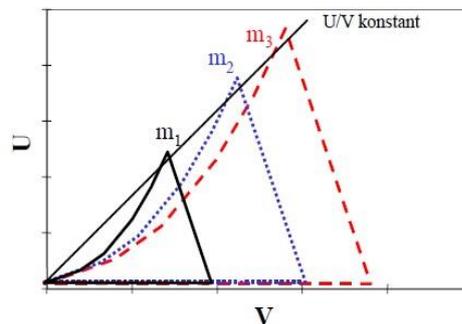
**Abbildung 19:** Schematischer Aufbau eines Quadrupols mit entsprechender Ionenbewegung [Blaum *et al.*, 1998].

Da das hyperbolische Feld inhomogen ist, wirkt auf das Ion eine schwache Kraft in z-Richtung, sodass dieses in Richtung Detektor wandert. Wenn sich das Ion auf einer stabilen Flugbahn bewegt, kann es den Quadrupol passieren, ohne mit den Elektroden zu kollidieren. Die Bedingungen dafür können aus den sog. Mathieu-Gleichungen abgeleitet werden, wobei die Mathieu-Parameter wie folgt beschrieben werden [Dawson, 1986]:

$$a_x = -a_y = \frac{8zeU}{mr_0^2\omega^2}, \quad q_x = -q_y = \frac{4zeV}{mr_0^2\omega^2} \quad (\text{II.III.})$$

U = Gleichspannung, V = Wechselspannung,  $\omega$  = Frequenz von V,  
 $r_0$  = Abstand zwischen den Elektroden

Für einen Quadrupol-Analysator sind  $r_0$  und  $z$  konstant, wodurch  $U$  und  $V$  die Variablen darstellen. Werden  $U$  und  $V$  bei konstantem  $U/V$ -Verhältnis variiert, so können nacheinander Ionen mit steigendem  $m/z$ -Verhältnis den Analysator durchqueren [Douglas, 2009]. Die entsprechenden Stabilitätsregionen sind in der folgenden Abbildung 20 gezeigt. Dieses stabile Passieren einzelner  $m/z$ -Verhältnisse wird als Massenscan bezeichnet. Es entspricht einem Entlangfahren an der Arbeitsgeraden, welche ebenfalls in Abbildung 20 dargestellt ist. Aufgrund dieser Eigenschaft fungiert der Quadrupol als Massenfilter [Gross, 2013].



**Abbildung 20:** Stabilitätsregionen als Funktion von  $U$  und  $V$  für Ionen unterschiedlicher Massen mit  $m_1 < m_2 < m_3$ .

### Dreidimensionale Quadrupol-Ionenfalle

Die Quadrupol-Ionenfalle (QIT) ist aus zwei hyperbolisch geformten Elektroden, welche als Endkappen dienen, und einer Ringelektrode aufgebaut [Dawson, 1986]. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 21 dargestellt. Hierbei sind die Endkappen elektrisch miteinander verbunden und an der Ringelektrode liegt ein Potential  $\phi_0$  an, welches aus einer Gleichspannung und einem Radiofrequenz (RF) -Potential  $V \cos \Omega t$  besteht:

$$\phi_0 = U + V \cos \Omega t \quad (\text{II.IV.})$$

$$\Omega = 2\pi f, \quad f = \text{konstante Frequenz (ca. 1,1 MHz)}$$

Diese überlagern sich, sodass ein dreidimensionales Hochfrequenzfeld entsteht [de Hoffmann & Stroobant, 2013]. Hierdurch können Ionen eines bestimmten  $m/z$ -Verhältnisses oder  $m/z$  Bereichs in der Ionenfalle gespeichert werden, da sie sich auf stabilen Trajektorien bewegen. Die unerwünschten Ionen kollidieren mit den Elektrodenwänden oder werden axial aus der QIT ausgeworfen. Um die gesammelten Ionen im Zentrum der Ionenfalle zu fokussieren und somit die Auflösung zu verbessern, wird

Helium als Puffergas zugesetzt. Dieses verringert durch Stöße mit den Analytationen deren kinetische Energie.

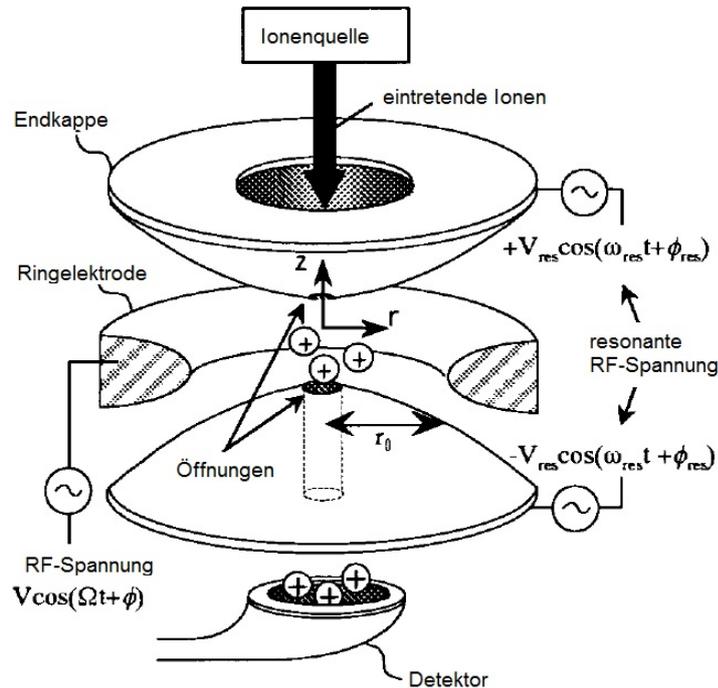


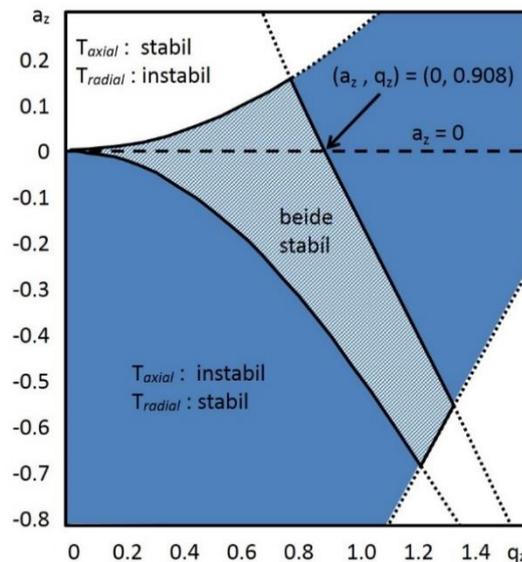
Abbildung 21: Aufbau einer dreidimensionalen Ionenfalle; modifiziert nach [Yoshinari, 2000].

Die Beschreibung der Ionenbewegung auf diesen stabilen Trajektorien erfolgt ebenfalls über die Mathieu-Gleichungen. Daraus resultieren die Mathieu-Parameter wie folgt:

$$a_z = -2a_r = \frac{-16eU}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2}, \quad q_z = -2q_r = \frac{8eV}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2} \quad (\text{II.V.})$$

Dabei müssen die Ionen sowohl in radiale als auch in axiale Richtung stabile Trajektorien ausbilden. Bei den meisten kommerziellen Ionenfallen wird  $U=0$  gesetzt, sodass  $a_z=0$  und die Stabilität nur von  $q_z$  bestimmt wird. Das Stabilitätsdiagramm in Abbildung 22 zeigt, dass dabei die Arbeitslinie bei  $q_z=0,908$  begrenzt ist. Moderne Ionenfallen werden hauptsächlich in zwei Betriebsmodi eingesetzt, um Ionen über den gesamten interessierenden  $m/z$  Bereich zu messen. Zum einen gibt es den Modus der massenselektiven Instabilität. Hierbei werden zunächst alle Ionen in der Ionenfalle gespeichert. Bei geerdeten Endkappen kommt es anschließend zu einem kontinuierlichen Anstieg der Wechselfrequenz an der Ringelektrode bis  $q_z=0,908$  überschritten wird. Somit verlassen die Ionen in der Reihenfolge ihrer ansteigenden  $m/z$ -Verhältnisse die Ionenfalle und ein Massenscan erfolgt [Stafford *et al.*, 1984]. Zum anderen ist ein reso-

nanter Ionenauswurf möglich. Bei dieser Methode wird eine zusätzliche Wechselspannung an die Endkappen angelegt, welche mit der axialen Resonanzfrequenz des jeweiligen Ions übereinstimmt [Splendore *et al.*, 1997]. Dadurch können die Analytationen entsprechend ihres  $m/z$ -Verhältnisses zum Detektor überführt werden, wobei der Auswurf von niedriger zu hoher Masse oder umgekehrt erfolgen kann.



**Abbildung 22:** Stabilitätsdiagramm der Trajektorien in der QIT; modifiziert nach [Müller-Tautges, 2014].

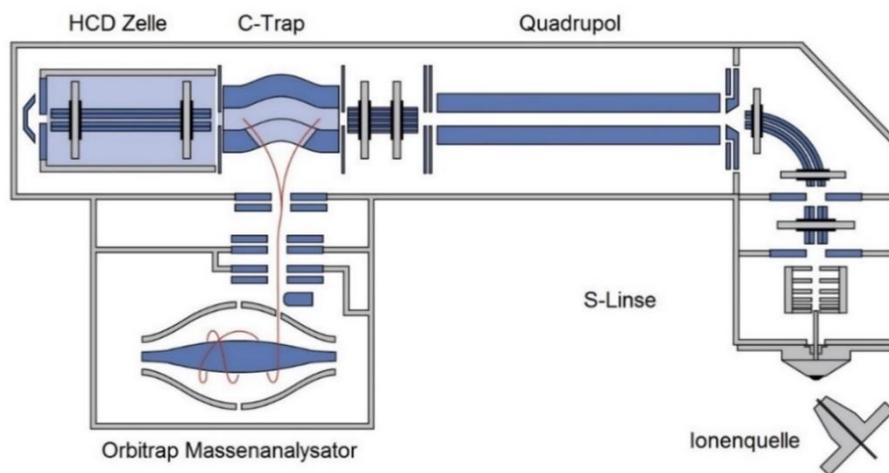
Des Weiteren sind mit der QIT ebenso Tandem-MS Experimente (*tandem-in-time*) möglich. Hierbei werden zunächst die Ionen eines einzelnen  $m/z$ -Verhältnisses bei  $q_z=0,25$  isoliert und diese durch stoßinduzierte Dissoziation (CID) mit Hilfe der vorhandenen Heliumatome fragmentiert. Die erhaltenen Fragmente werden nacheinander zum Detektor überführt, sodass erneut ein Massenspektrum ( $MS^2$ ) aufgenommen wird. Dieser Vorgang kann mehrfach wiederholt werden und die erhaltenen  $MS^n$ -Spektren zur Strukturaufklärung herangezogen werden [Gross, 2013].

### Orbitrap / Q-Exactive MS

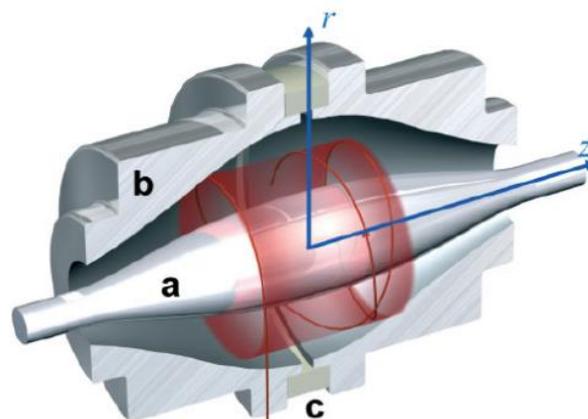
Die Orbitrap Technik stellt eine neue Art von Massenanalysator dar und sie wurde 2005 von Thermo Fisher Scientific kommerziell zugänglich gemacht. Sie garantiert ein hohes Auflösungsvermögen und eine exakte Massenbestimmung [Hu *et al.*, 2005], wodurch eine Aufklärung der Summenformeln der Komponenten ermöglicht wird. Da diese massenspektrometrische Methode eine Massenauflösung bis zu  $R=140.000$  gewährleistet, wird sie auch als Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS) [Nizkorodov *et al.*, 2011], [Hernández *et al.*, 2012] bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde

das Q-Exactive Orbitrap MS-System verwendet, dessen Aufbau in der folgenden Abbildung 23 schematisch veranschaulicht ist.

Das Funktionsprinzip des Orbitrap-Massenanalysators beruht darauf, dass die Analytione in einem axialen Feldgradienten um eine spindelförmige Elektrode im Zentrum der Orbitrap gespeichert werden, wie in Abbildung 24 dargestellt. Hierzu werden die Ionen zunächst in der C-Trap (gebogene Quadrupol-Ionenfalle) angereichert, von wo aus sie anschließend orthogonal zu der Zentralelektrode in die Orbitrap eingebracht werden. Aufgrund des durch die Spindelform beeinflussten elektrostatischen Feldgradienten und der peripheren Injektion beginnen sie entlang der z-Achse harmonisch zu oszillieren [Perry *et al.*, 2008].



**Abbildung 23:** Schematischer Aufbau des Q-Exactive Orbitrap MS; modifiziert nach [Thermo Fisher Scientific, 2014].



**Abbildung 24:** Schnitt durch die Thermo Fisher Orbitrap; modifiziert nach [Scigelova & Makarov, 2006]; a: spindelförmige Elektrode, die axialen Feldgradienten erzeugt; b: fassförmige äußere Elektrode ist mit einem isolierenden Keramikern in zwei Hälften geteilt; c: der erzeugte Bildstrom wird verstärkt und aufgezeichnet.

Hierbei ist die Frequenz der axialen Schwingung  $\omega$  nach Formel (II.VI.) abhängig von dem  $m/z$ -Verhältnis des jeweiligen Ions, allerdings unabhängig von dessen ursprünglicher kinetischer Energie [Makarov, 2000].

$$\omega = \sqrt{k \left( \frac{z}{m} \right)} \quad (\text{II.VI.})$$

k = Feldkrümmung

Die Frequenz  $\omega$  wird mit Hilfe eines Differenzverstärkers bestimmt, welcher mit beiden Hälften der äußeren Elektrode verbunden ist. Dabei wird der sog. *image current* (Bildstrom) gemessen und anschließend durch schnelle Fourier-Transformation (FT) in ein HR Massenspektrum umgewandelt. Somit ergibt sich ein exakter Messwert für das entsprechende  $m/z$ -Verhältnis [Olsen *et al.*, 2005].



### 3. Motivation

Wie bereits in Kapitel 1 erläutert, ist das Interesse an organischen Biomarkern in Speläothemen und Tropfwasser in den letzten Jahren stark gestiegen. Besonders die Lipidbiomarker sind in der Lage Paläoumweltveränderungen widerzuspiegeln. Allerdings ist die Zahl der bisherigen Studien begrenzt und die verwendeten analytischen Methoden benötigen große Probenmengen ([Xie *et al.*, 2003], [Blyth *et al.*, 2006], [Li *et al.*, 2011]). Daher sollte im Rahmen dieser Forschungsarbeit eine neue Methode zur Messung von gesättigten Fettsäuren mittels HPLC-MS in diesem Probenmaterial entwickelt werden. Durch eine selektivere Extraktionsmethode sollte dabei das benötigte Probenmaterial reduziert werden. Des Weiteren werden bei den bisherigen Extraktionsmethoden zusätzlich große Mengen an organischen Lösungsmitteln verbraucht, welche bei der neuen Methode ebenfalls verringert werden sollten.

Fettsäuren wurden als Analyten für diese Methodenentwicklung gewählt, da sie die fundamentalen Bausteine vieler verschiedener Lipidstrukturen darstellen und in der Natur weit verbreitet sind ([Alberts, 1999], [Berg, et al., 2007]). Außerdem wurden sie bereits mehrfach in Boden- und Sedimentproben analysiert ([van Dongen *et al.*, 2000], [Zocatelli *et al.*, 2012]). Sie tendieren zwar im Vergleich zu z. B. Alkanen eher zu einer Zersetzung im Boden, allerdings sind dabei die ungesättigten Fettsäuren wesentlich anfälliger als die gesättigten Säuren gleicher Kettenlänge [Meyers & Ishiwatari, 1993]. Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Studie lediglich LMW Fettsäuren mit einer geradzahligen Kettenlänge von C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub> analysiert. In früheren Studien wurden teilweise ebenso Fettsäuren mit ungeradzahligen Kettenlängen oder Verzweigungen untersucht, allerdings treten diese Analyten in weitaus geringeren Konzentrationen auf ([Xie *et al.*, 2005], [Huang *et al.*, 2008], [Blyth *et al.*, 2011]). In Kapitel 1.4.2 wurde bereits verdeutlicht, dass die potentiellen Quellen der LMW Fettsäuren wesentlich komplexer und weniger verstanden sind, als die der HMW Komponenten. Demnach müssen sie weiterhin ausgiebig untersucht werden.

Da die entwickelte Methode sowohl auf Stalagmit- als auch auf Tropfwasserproben anwendbar sein sollte, wurde ihre Tauglichkeit bei beiden Proben getestet. Durch Korrelationen der ermittelten Fettsäuredaten mit stabilen Isotopen  $\delta^{13}\text{C}$  und  $\delta^{18}\text{O}$  und verschiedenen Spurenelementen sollte ihre mögliche Verwendung als *Proxies* für Klima- und Vegetationsveränderungen untersucht werden.

Überdies wurden bisher lediglich sog. *target* Analysen der Speläotheme durchgeführt. Dabei sind die Zielsubstanzen bekannt und es werden Referenzstandards verwendet, um die bekannten Analyten zu identifizieren und zu quantifizieren. Im Ge-

gensatz dazu werden beim sog. *non-target screening* keine Referenzstandards verwendet, da die Zielsubstanzen zunächst völlig unbekannt sind. Die HPLC gekoppelt mit HRMS ermöglicht es, eine Vielzahl von Komponenten in einem einzigen *Full-Scan* Durchlauf zu analysieren und aufgrund der hohen Auflösung und Massengenauigkeit zu unterscheiden. Das Interesse an dieser Art der *non-target* Analyse ist in verschiedenen Bereichen der Umweltanalytik in den letzten Jahren rapide gestiegen (z. B. [Reinhardt *et al.*, 2007], [Krauss *et al.*, 2010], [Hernández *et al.*, 2012], [Croley *et al.*, 2012]). Dennoch wurde sie noch nicht an Speläothemen durchgeführt. An dieser Stelle setzt die vorliegende Forschungsarbeit an. Um weitere organische Biomarker zu identifizieren, sollte ein *non-target screening* dieses Probenmaterials durchgeführt und die exakten *m/z*-Verhältnisse mit entsprechenden Summenformeln unbekannter Substanzen ermittelt werden. Somit sollte der Grundstein für folgende Forschungsprojekte und weitere Methodenentwicklungen für *target* Analysen gelegt werden.

## 4. Experimentelles

### 4.1 Verwendete Chemikalien

**Tabelle 1:** Verwendete Chemikalien und entsprechende Reinheiten.

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
Acetonitril (ACN)	HPLC grade, $\geq 99,9\%$	Sigma Aldrich
Ameisensäure	Eluent additive for LC-MS, 98 %	Fluka Analytical
Arachidinsäure	Analytical standard, $\geq 99,5\%$	Fluka Analytical
<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA)	-	Supelco
Calciumcarbonat	$\geq 99\%$	Merck KGaA
Dichlormethan (DCM)	HPLC grade, $\geq 99,9\%$	Sigma Aldrich
Helium	5.0	Westfalen
2-Hydroxyisobutansäure	99 %	Alfa Aesar
Laurinsäure (Dodecansäure)	Analytical standard, $\geq 99,5\%$	Fluka Analytical
Methanol	HPLC grade, $\geq 99,9\%$	Sigma Aldrich
Myristinsäure	Analytical standard, $\geq 99,5\%$	Fluka Analytical
Palmitinsäure	Analytical standard, $\geq 99,5\%$	Fluka Analytical
Pyridin	99,9 %	Sigma Aldrich
Reinstwasser	18,2 M $\Omega$	Millipore Inc. (Hausanlage)
Salzsäure 30 %ig	suprapure	Merck KGaA
Stearinsäure	Analytical standard, $\geq 99,5\%$	Fluka Analytical
Stickstoff	5.0	Westfalen

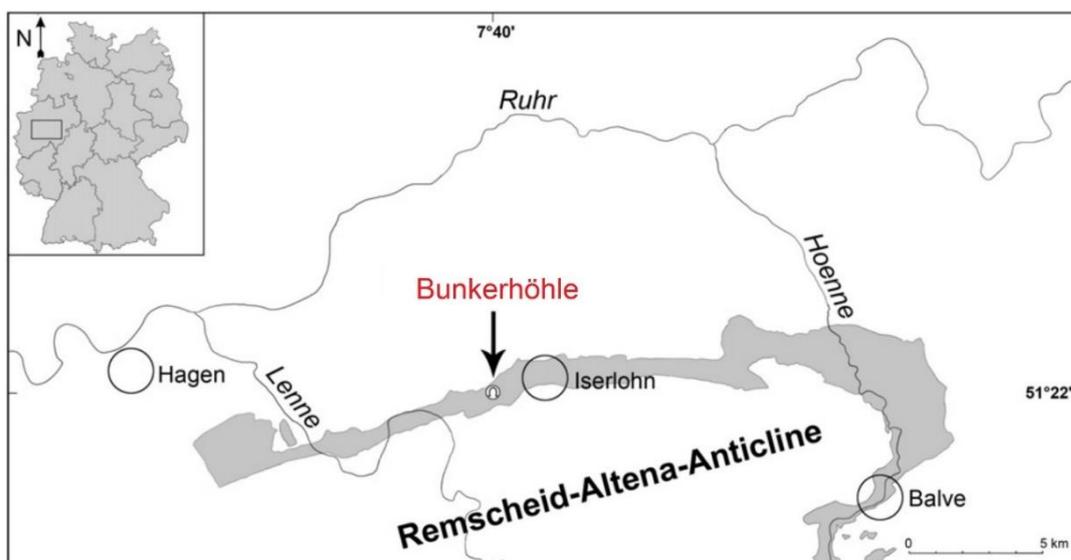
## 4.2 Allgemeine Vorkehrungen zur Blindwertreduktion

Um mögliche Kontaminierungen zu minimieren, wurden mehrere Vorkehrungen zur Blindwertreduktion getroffen. Alle verwendeten Glasgefäße wurden zunächst mit Acetonitril (ACN) und Reinstwasser gespült und danach für mindestens acht Stunden bei 450 °C in einem Muffelofen ausgeheizt. Da Dichlormethan (DCM) eine Hauptquelle für Kontaminierungen darstellte, wurde das Lösungsmittel vor der Verwendung zusätzlich dreimal destilliert, um die Blindwerte noch weiter zu erniedrigen. Außerdem wurden alle HCl Lösungen mit Reinstwasser frisch angesetzt und anschließend zur Reinigung fünfmal mit DCM ausgeschüttelt. Überdies wurde die verwendete Ameisensäure in 1 mL Aliquoten gelagert, sodass eine Kreuzkontaminierung vermieden wurde.

## 4.3 Untersuchungsgebiete

### 4.3.1 Bunkerhöhle

Die Bunkerhöhle ist Teil eines großen Höhlensystems in der Region von Iserlohn (Abbildung 25) und sie befindet sich im Grüner Bach Tal des Rheinischen Schiefergebirges (Eingang der Höhle: 51°22'03" N / 7°39'53" O; 184 m ü. NN).



**Abbildung 25:** Lage der Bunkerhöhle am Nordrand des rechtsrheinischen Schiefergebirges. Die graue Schattierung zeigt das mittel- bis oberdevonische Kalkgestein; modifiziert nach [Riechelmann *et al.*, 2011].

Entstanden ist die Höhle in ca. 700 m mächtigem mittel- bis oberdevonischen Kalkgestein, welches auf dem nördlichen Faltenschenkel des Remscheid-Altenaer-Sattels des Rheinischen Schiefergebirges zu finden ist. Infolge der Verkarstung ist die

Oberfläche dieses Kalkgesteins unregelmäßig, was zu Schwankungen in der Mächtigkeit der Bodenüberdeckung führt. Über der Bunkerhöhle besteht die Überdeckung aus bis zu einem Meter mächtigen Böden, die sich aus Braunerden und Parabraunerden zusammensetzen. Löss- und Lösslehmlagerungen bilden das Ausgangsmaterial für diese Böden. Die vorliegende Vegetation wird von Laubwald mit hauptsächlich Buchen und Eschen bestimmt, wobei auch Büsche vorkommen.

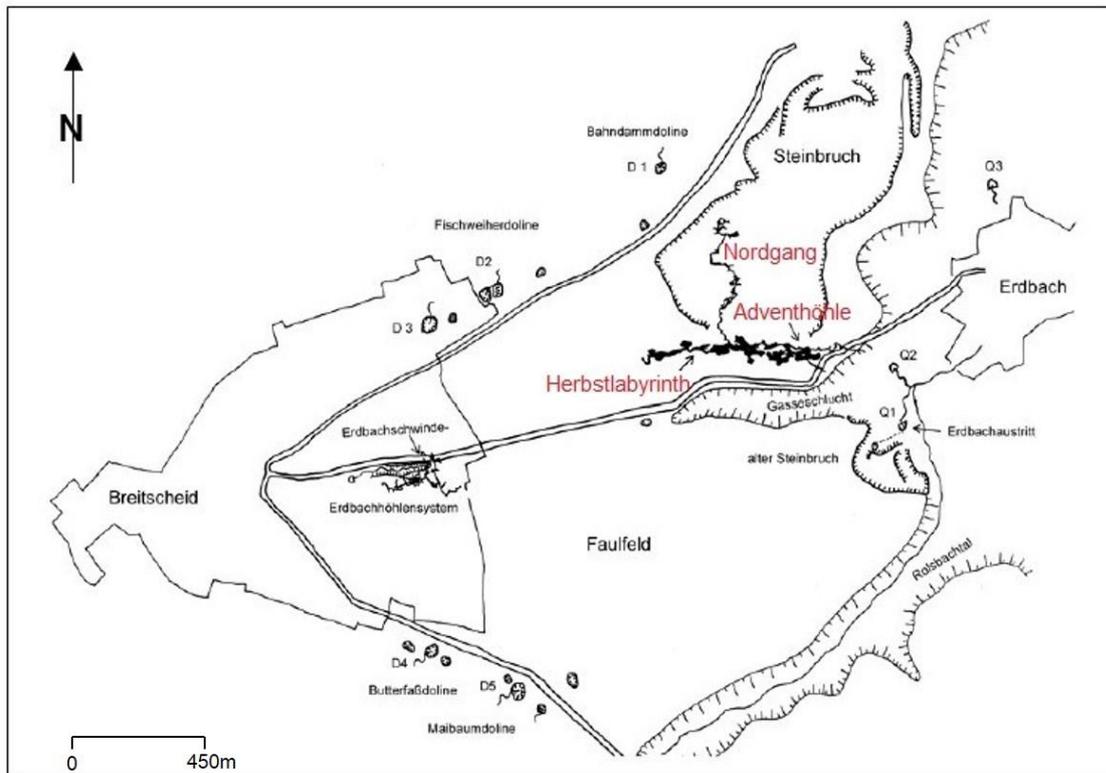
1926 wurde die Bunkerhöhle im Rahmen von Straßenarbeiten entdeckt. Während des 2. Weltkrieges wurde der Eingang der Höhle künstlich vergrößert, sodass er als Luftschutzbunker verwendet werden konnte. Darin findet die Benennung als „Bunkerhöhle“ ihren Ursprung. Aus diesem Grund ist eine anthropogene Beeinflussung des Höhlensystems stets zu beachten. Der Eingang der Bunkerhöhle befindet sich auf einem kleinen Karstplateau am Südhang der Dröscheder Emst. Daher gehört sie zu dem 3,5 km langen Bunker-Emst-Höhlensystem. Hierbei macht der untersuchte Teil der Bunkerhöhle einen fast horizontalen Höhlenabschnitt mit engen Passagen und kleinen Kammern aus, welcher aktiv wachsende Stalagmiten enthält [Riechelmann, 2010], [Riechelmann *et al.*, 2011].

#### **4.3.2 Herbstlabyrinth-Adventhöhle**

Das Herbstlabyrinth-Adventhöhle System ( $\delta$  50°41'15,7" N / 8°12'21,7" O; 417 m ü NN) befindet sich bei Breitscheid-Erdbach im Westerwald, welcher auch einem Teil des rechtsrheinischen Schiefergebirges angehört (Abbildung 26). Ähnlich zu der Bunkerhöhle herrschen im Westerwald ca. 60 cm mächtige Parabraunerden, die als Ackerböden genutzt werden können, vor. Ebenso sind Braunerden vertreten, die allerdings auf größeren Substraten ausgebildet werden und daher weniger zur landwirtschaftlichen Nutzung geeignet sind. Zudem treten aufgrund der Niederschläge und des tonhaltigen Untergrunds auch Pseudogleye auf, auf welchen Grünland oder Wälder zu finden sind [Sabel & Fischer, 1992]. Somit bestimmen in diesem Untersuchungsgebiet ebenfalls Buchenwälder die Vegetation. Dennoch sind auch hier die anthropogenen Einflüsse nicht zu unterschätzen. So herrschten früher über der Höhle Weidengebiete vor, die danach von einem Steinbruch ersetzt wurden. Außerdem kam es auch vermehrt zu Waldrodungen aufgrund des großen Holzverbrauchs des vorliegenden Hafnerhandwerks in der Region.

Die Adventhöhle wurde im Dezember 1993 am Rande des Abbaubereiches des Kalksteinwerkes entdeckt. Das Öffnen einer Spalte ermöglichte 1994 den Zustieg zu einem weiteren Höhlenabschnitt, dem Herbstlabyrinth. Dieses Höhlensystem ist die längste Höhle in Hessen und die zwölft-längste in Deutschland. Das Herbstlabyrinth

setzt sich aus mehreren kleinen Bereichen zusammen, in denen sich unterschiedlich alte Versinterungen befinden. Des Weiteren sind auch mehrere aktive Speläotheme vorhanden, welche hauptsächlich aus transparentem oder weißem Calcit bestehen [Mischel, 2010].



**Abbildung 26:** Lage des Herbstlabyrinth-Adventhöhle Systems zwischen Breitscheid und Erdbach; modifiziert nach [Mischel, 2010].

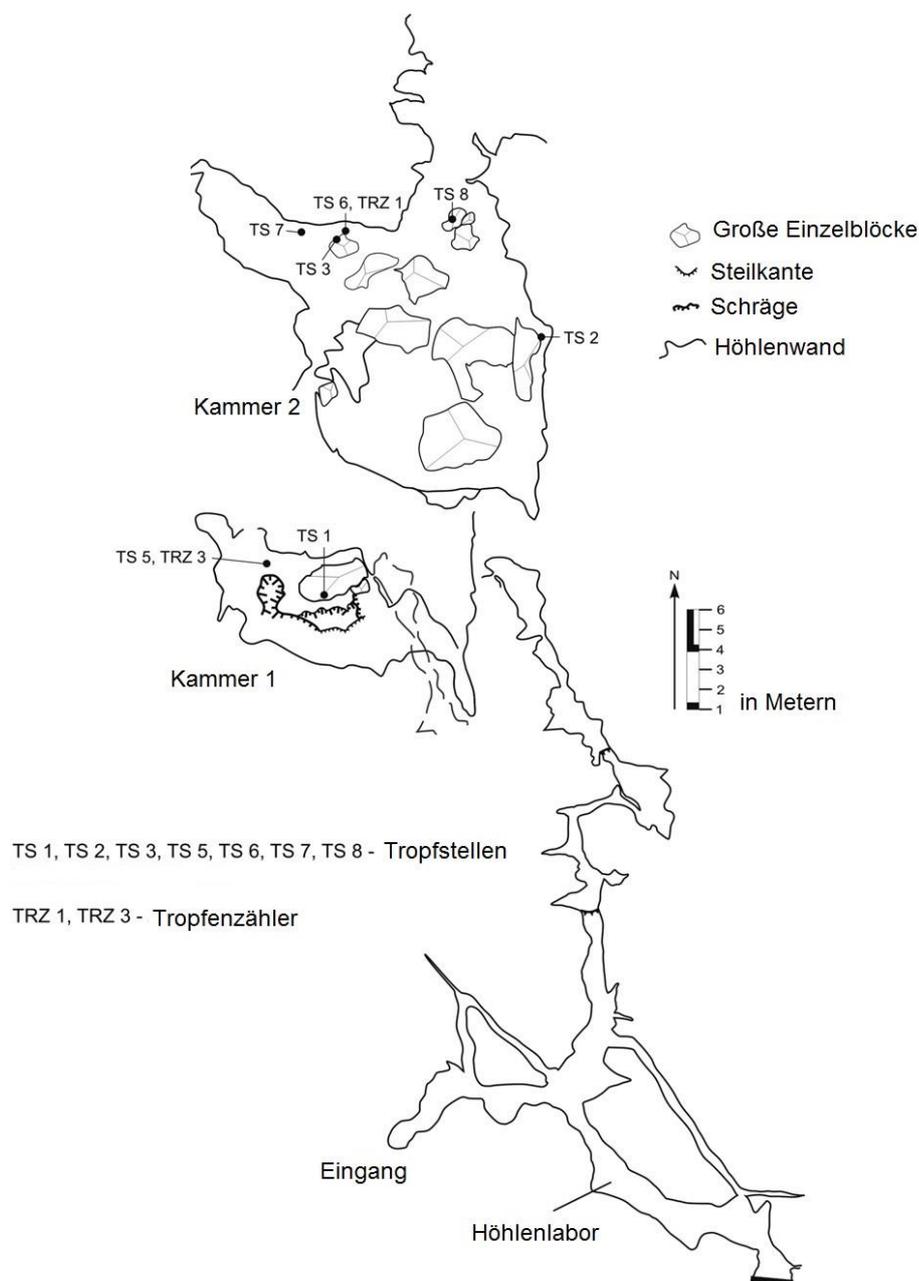
## 4.4 Probennahme

### 4.4.1 Bunkerhöhle

Die Tropfwasserproben aus der Bunkerhöhle wurden von einem Kooperationspartner im Rahmen eines zweimonatlichen Höhlenmonitoring Programms gesammelt, das bereits seit Mai 2006 durchgeführt wird. Ein Plan des Höhlenabschnitts, in welchem das Monitoring stattfand, ist in Abbildung 27 dargelegt. Die für diese Arbeit relevanten Tropfwassersammelstellen sind sowohl die schnelle Tropfstelle T1 (Abb.: TS1) als auch die langsame Tropfstelle T8 (Abb.: TS8). Die Probennahmedauer schwankte je nach Tropfrate für die schnellen Tropfstellen zwischen mehreren Minuten und Stunden, während die Probennahme der langsamen Tropfstelle über zwei ganze Monate statt-

fund. Die genauen Probennahmepläne von Oktober 2012 bis August 2013 sind im Anhang unter Kapitel 7.1.1 aufgelistet.

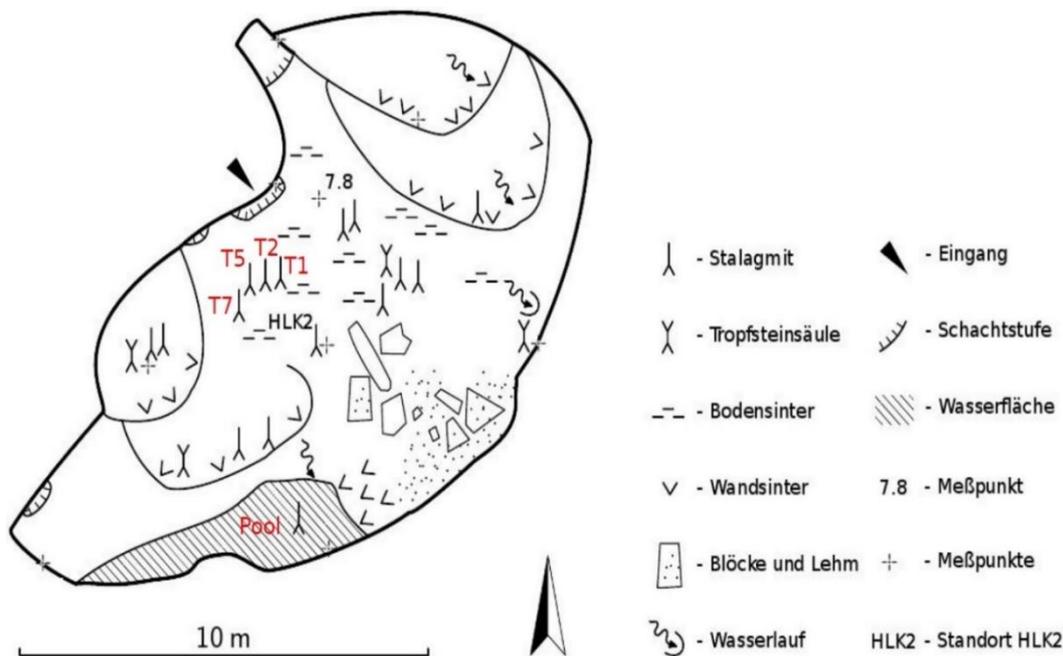
Die Probennahme erfolgte in vorgereinigten Glasgefäßen und das Probenvolumen betrug ca. 70-100 mL. Die Probennahme in der Bunkerhöhle beschränkte sich lediglich auf Tropfwasserproben. Da das Monitoring Programm im August 2013 beendet wurde, konnten anschließend keine weiteren Proben mehr gesammelt werden. Überdies wurden keine Speläothempuben aus diesem Untersuchungsgebiet zur Verfügung gestellt und analysiert.



**Abbildung 27:** Plan des Bunkerhöhlenabschnittes, in welchem das Höhlenmonitoring stattfand; mit Markierungen der Probennahmestellen; modifiziert nach [Riechelmann *et al.*, 2011].

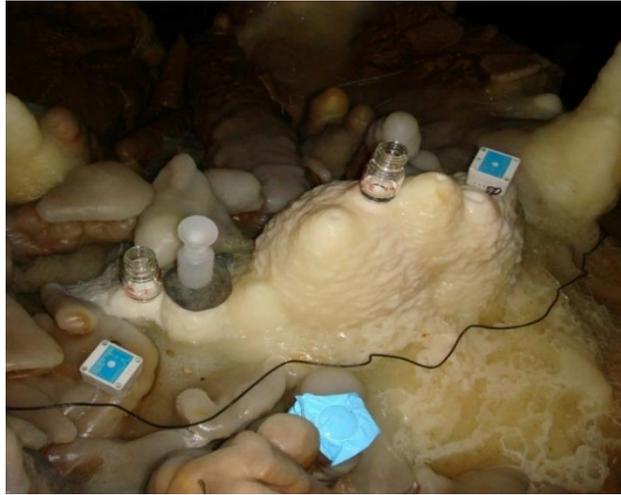
#### 4.4.2 Herbstlabyrinth-Adventhöhle

Die Tropfwasserproben aus der Herbstlabyrinth-Adventhöhle wurden ebenfalls von einem Kooperationspartner im Rahmen eines monatlichen Höhlenmonitoring Programms gesammelt, das allerdings erst seit September 2010 durchgeführt wird. Das Höhlenmonitoring ist in einer kleinen Höhlenkammer aufgebaut, welche für Besucher der Schauhöhle nicht zugänglich ist. Der entsprechende Höhlenplan ist in der folgenden Abbildung 28 dargestellt.



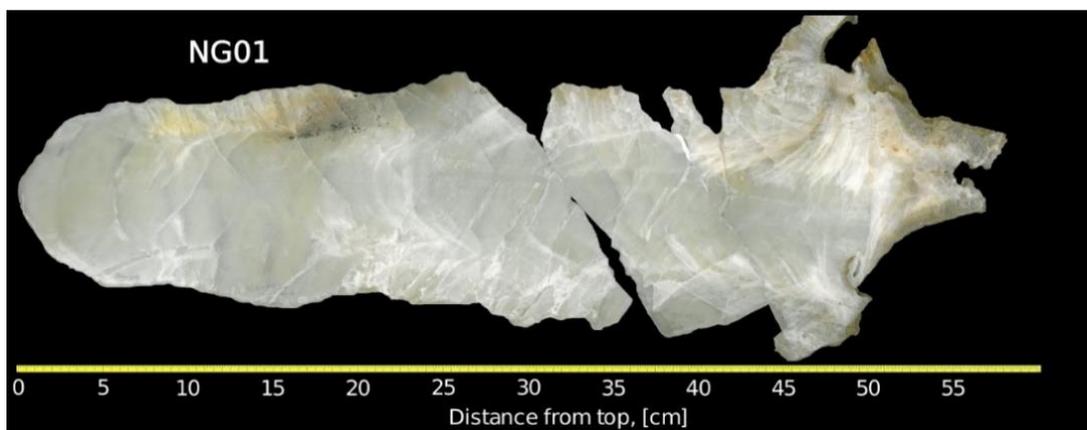
**Abbildung 28:** Höhlenplan des Abschnittes, in welchem das Höhlenmonitoring des Herbstlabyrinths stattfindet; mit Markierung der Probennahmestellen [Mischel, 2010].

Die für diese Arbeit relevanten Proben wurden von zwei schnellen Tropfstellen T1 und T5 (durchschnittliche Tropfrate 21,6 L pro Monat), einer langsamen Tropfstelle T2 (60-150 mL pro Monat) und von dem sog. Poolwasser (PW) genommen. Im Anhang unter Kapitel 7.1.1 sind erneut die exakten Probennahmepläne aufgelistet. Äquivalent zu der Probennahme in der Bunkerhöhle schwankte auch hier die Probennahmedauer je nach Tropfrate. Die schnellen Tropfstellen konnten innerhalb eines Tages beprobt werden, während die Probennahme der langsamen Tropfstelle einen ganzen Monat dauerte. Lediglich das Poolwasser konnte direkt entnommen werden. Ebenso erfolgte die Probennahme erneut in vorgereinigten Glasgefäßen, wie in Abbildung 29 veranschaulicht, und das Probenvolumen betrug ungefähr 60-100 mL.



**Abbildung 29:** Probennahme der Tropfwasserproben im Rahmen des monatlichen Höhlenmonitoring-Programms, Herbstlabyrinth-Adventhöhle.

Der Stalagmit NG01 wurde in der Nordgangpassage der Herbstlabyrinth-Adventhöhle entnommen. Diese Passage wurde nach der Probennahme aufgrund von nahegelegenen Steinbrucharbeiten zerstört. Die Nordgangpassage war etwa 1 km lang und sie enthielt viele Speläotheme unterschiedlicher Art. Der Stalagmit NG01 wurde mit Hilfe einer Diamantsäge in zwei Hälften gesägt. Von einer dieser Hälften wurde daraufhin eine etwa 1 cm dicke Scheibe entlang der Wachstumsachse des Speläothems abgeschnitten. Diese Scheibe ist in Abbildung 30 zu sehen.



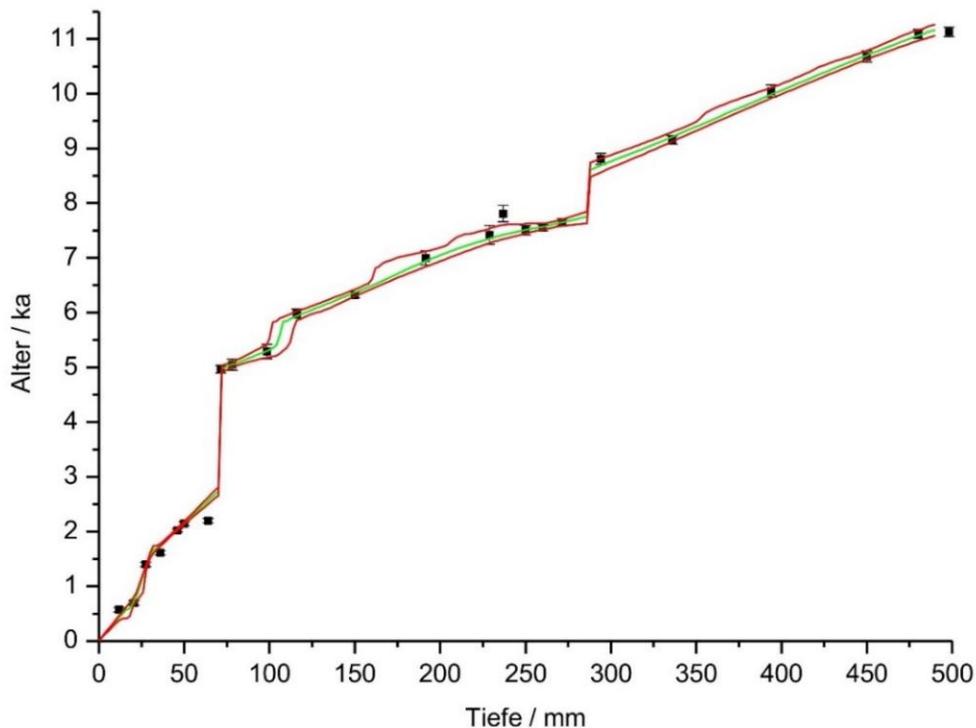
**Abbildung 30:** Querschnitt der NG01-Probe entlang der Wachstumsachse und die zugehörige Tiefe ausgehend von der Spitze des Stalagmiten.

#### 4.5 $^{230}\text{Th}/\text{U}$ -Datierung der Stalagmitproben

Die  $^{230}\text{Th}/\text{U}$ -Datierung wurde von einem Kooperationspartner durchgeführt und die Daten für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Dabei wurden die Stalagmitproben von einer Hälfte der erhaltenen NG01 Scheibe entnommen und hatten ein durchschnittliches Gewicht von 250 mg. Die Probenvorbereitung erfolgte ähnlich wie bereits von Hoff-

mann et al. [Hoffmann *et al.*, 2007] beschrieben und sie wurden mittels Multicollector-induktiv gekoppeltes Plasma Massenspektrometrie (MC-ICP-MS) am Max-Planck Institut für Chemie in Mainz gemessen. Details der Kalibrierung des  $^{233}\text{U}$ - $^{236}\text{U}$ - $^{229}\text{Th}$  Spikes wurden von Zak et al. [Žák *et al.*, 2012] beschrieben. Die verwendeten MC-ICP-MS Techniken sind in [Hoffmann *et al.*, 2007] und [Jochum *et al.*, 2011] erklärt. Alle Aktivitätsverhältnisse wurden mit der Zerfallskonstante von Cheng et al. [Cheng, 2000] berechnet.

Die letztlich gemessenen Alter (siehe Anhang Kapitel 7.1.3) ergaben mit Hilfe des StalAge-Algorithmus [Scholz & Hoffmann, 2011] ein Alter-Distanz Modell, sodass jeder Tiefe ausgehend von der Spitze des Stalagmiten ein Alter in ka zugeordnet werden konnte. Das erhaltene Modell sowie die originalen Alter sind in der folgenden Abbildung 31 veranschaulicht.



**Abbildung 31:** Ermittelte Alter mit resultierendem Altersmodell (grün) und dessen +/- Fehlern (rot).

Demnach wurden die entsprechenden Alter den gemessenen Tiefen der Stalagmitproben für die Fettsäureanalyse zugeordnet, wodurch eine Auftragung der Fettsäureergebnisse gegen das Alter (siehe Anhang Kapitel 7.1.4) ermöglicht wurde.

## 4.6 Probenvorbereitung zur Fettsäureanalyse

### 4.6.1 Tropfwasserproben

Fünf Prozent (v/v) ACN wurde zu der gesamten Tropfwasserprobe (60-100 mL) zugegeben, um mögliche mikrobielle Aktivitäten während der Lagerung zu verhindern. Die Proben wurden für mehrere Tage bis Monate im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Vor der Extraktion wurde jede Probe fünf Minuten lang bei 35 °C im Ultraschallbad behandelt.

### 4.6.2 Stalagmitproben

Die Stalagmitproben wurden als kleine Stücke aus der Mitte entlang der Längsachse der Scheibe des Stalagmiten NG01 gesägt. Das Probengewicht schwankte, aufgrund der auftretenden Ungenauigkeiten beim Sägen und Herausbrechen, zwischen etwa 0,5 g und 3,5 g. Das genaue Gewicht und die Tiefe der einzelnen Proben ausgehend von der Spitze des Stalagmiten sind im Anhang unter Kapitel 7.1.1 zu finden. In der folgenden Abbildung sind die Bruchstücke des Stalagmiten NG01 nach der Probenahme und ein heraus gesägtes Stalagmitstück dargestellt.



**Abbildung 32:** Links: Scheibe des Stalagmiten NG01 nach der Probenahme; rechts: Eine gesägte Probe ca. 0,6 x 0,7 cm.

Um mögliche Oberflächenkontaminierungen zu entfernen, wurden die Stalagmitstücke in einem DCM/Methanol Gemisch (9:1, v/v) bei 35 °C zweimal fünf Minuten lang im Ultraschallbad gereinigt. Sie trockneten einige Minuten bei Raumtemperatur im Abzug, bevor ihr Gewicht bestimmt wurde. Anschließend wurde 4 M HCl zugegeben, um das Calcit der Stalagmitproben aufzulösen. Nach mehreren Stunden bei Raumtemperatur waren die Proben vollständig aufgelöst und konnten extrahiert werden.

#### 4.7 Herstellung der Fettsäurestandards

Es wurden Stammlösungen der Fettsäurestandards (Tabelle 2) mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  hergestellt, indem 50 mg des festen analytischen Standards in 50 mL DCM gelöst und anschließend fünf Minuten lang im Ultraschallbad behandelt wurden.

**Tabelle 2:** Verwendete Fettsäurestandards und die  $m/z$ -Verhältnisse der entsprechenden Quasimolekülonen.

Name	Struktur	$[M-H]^-$ $m/z$ -Verhältnis	Abkürzung
Laurinsäure	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	199	$\text{C}_{12}$
Myristinsäure	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	227	$\text{C}_{14}$
Palmitinsäure	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	255	$\text{C}_{16}$
Stearinsäure	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	283	$\text{C}_{18}$
Arachidinsäure	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	311	$\text{C}_{20}$

Diese Stammlösungen wurden erneut mit DCM verdünnt (1:1.000, v/v) und bei Raumtemperatur gelagert. Verschiedene Volumina dieser Standardlösungen wurden in 1,5 mL Braunglasgefäßen vorgelegt und bei 30 °C unter einem leichten Stickstoffstrom mit Hilfe einer Abdampfstation eingedampft. Anschließend wurden 0,5 mL eines ACN/DCM Gemisches (3:1, v/v) zugegeben und bei 35 °C zehn Minuten lang im Ultraschallbad behandelt, sodass die Analyten in Lösung gebracht wurden. Diese Standards wurden verwendet, um die LC Parameter zu optimieren.

#### 4.8 Herstellung der Wasser Spikes

Während der Methodenentwicklung wurden verschiedene Experimente mit Reinstwasserproben, die mit Standards versetzt waren (Wasser *Spikes*), durchgeführt, sodass der Extraktionsprozess aus dem Tropfwasser und den Stalagmiten simuliert werden konnte. Dabei wurden Standardlösungen, wie in Kapitel 4.7 beschrieben, hergestellt. Allerdings erfolgte die Wiederaufnahme der Analyten in 0,5 mL ACN, statt des ACN/DCM Gemisches. Diese Lösung wurde zu 9,5 mL Reinstwasser zugegeben, um die Wasser *Spikes* zu generieren, die zur Optimierung der Extraktionsverfahren und zur Durchführung von externen Kalibrierungen verwendet wurden. Die externe Kalibrierung war eine Mehrpunktkalibrierung mit Wasserproben, welche 12,5; 25; 50 und 75 ng jedes Analyten enthielten. Zusätzlich wurde eine Blindprobe mit Reinstwasser verwen-

det, um Kontaminierungen der Gefäße oder der Lösungsmittel auszuschließen und die entsprechenden Nachweisgrenzen (LOD) zu berechnen.

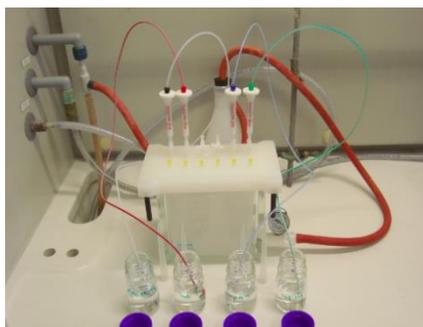
## 4.9 Extraktionsmethoden zur Fettsäureanalyse

### 4.9.1 LLE

Als erste Extraktionsvariante wurde basierend auf früheren Studien von Blyth et al. [Blyth et al., 2006] die LLE getestet. Die Wasser *Spikes* wurden viermal mit 1,75 mL DCM fünf Minuten lang im Ultraschallbad (35 °C) extrahiert. Die erhaltenen Extrakte wurden in einem vorgereinigten 20 mL Gefäß gesammelt und anschließend wurde das Lösungsmittel unter einem leichten Stickstoffstrom bei 30 °C abgedampft. Zuletzt wurden die Analyten in 1 mL ACN/DCM (3:1, v/v) wieder aufgenommen und erneut fünf Minuten lang bei 35 °C im Ultraschallbad behandelt. Die daraufhin gelösten Proben wurden zur Messung mittels HPLC-MS in ein 1,5 mL Braunglasgefäß überführt.

### 4.9.2 SPE

Die mit Standards versetzten Wasserproben, das Tropfwasser und die aufgelösten Stalagmitproben wurden mittels SPE extrahiert. Dabei kam ein Visiprep SPE Vacuum Manifold (Supelco, Deutschland) zum Einsatz. Vor dem eigentlichen Extraktionsprozess wurde 30 % (v/v) ACN als organischer Modifier zugegeben. Des Weiteren wurde ein pH-Wert  $\leq 4$  mit Hilfe einer 0,4 M HCl Lösung eingestellt. Die verwendete C<sub>18</sub>-SPE Kartusche (Supelco, Deutschland) wurde mit jeweils 3 mL DCM, ACN und Reinstwasser konditioniert. Daraufhin wurde die Probe mit Hilfe eines Visiprep *Large Volume Sampler* (Supelco, Deutschland) auf die Kartusche gegeben, wie in Abbildung 33 dargestellt.



**Abbildung 33:** Experimenteller Aufbau der Festphasenextraktion mittels *Large Volume Sampler*.

Im Anschluss folgte ein Waschschriff mit 1 mL Methanol/Reinstwasser (2:1, v/v). Vor der Elution wurde die Kartusche zehn Minuten lang in der Apparatur trocken gesaugt und danach erneut 20 Minuten lang unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Die Elution der Analyten erfolgte sechsmal mit 1 mL DCM, welches schrittweise in einem 1,5 mL Braunglasgefäß gesammelt und von Lösungsmittel befreit wurde. Zuletzt wurden die zur Trockene eingedampften Analyten in 525 µL ACN/DCM (3:1, v/v) aufgenommen und bei 35 °C im Ultraschallbad in Lösung gebracht.

Bei den Realproben wurde diese Lösung in fünf 100 µL Aliquote aufgeteilt, um eine Quantifizierung mittels Standardaddition zu ermöglichen. Diese Aliquote wurden mit jeweils 0; 12,5; 25; 50 und 75 µL der Standardlösung versetzt. Anschließend wurde erneut das Lösungsmittel abgedampft und die Analyten in 150 µL ACN/DCM (3:1, v/v) aufgenommen.

#### 4.10 HPLC(-)ESI-IT/MS Parameter

Alle HPLC(-)ESI-IT/MS Experimente wurden mit einem HPLC-System (Agilent 1100 Serie: Autosampler, Gradientenpumpe, Degasser; Agilent Technologies GmbH, Deutschland) gekoppelt an ein HCT-Plus Ionenfallen (IT)/ Massenspektrometer (Bruker-Daltonics GmbH, Bremen, Deutschland) durchgeführt. Ein Schaubild des vollständigen Messaufbaus und der verwendeten Parameter ist in der folgenden Abbildung 34 gegeben.

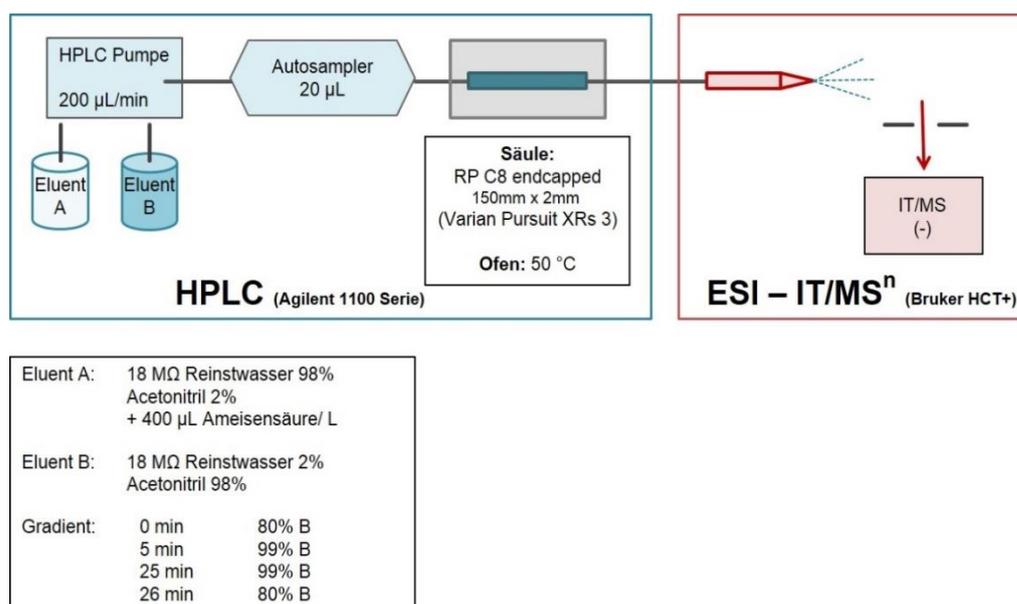


Abbildung 34: Schema der verwendeten HPLC-MS Messparameter.

Die Trennung der Analyten erfolgte mit Hilfe einer Umkehrphasensäule (Pursuit XRs 3 C8 150x2.0 mm) mit einer Partikelgröße von 3  $\mu\text{m}$  (Varian, Deutschland), welche konstant bei 50 °C durch einen CO20 HPLC Säulenofen (Torrey Pines Scientific, USA) geheizt wurde. Als Eluenten kamen zum einen Reinstwasser mit 400  $\mu\text{L L}^{-1}$  Ameisensäure und 2 % ACN (Eluent A) und zum anderen ACN mit 2 % Reinstwasser (Eluent B) zum Einsatz. Das verwendete Gradientenprogramm begann mit 80 % Eluent B und wurde innerhalb der ersten fünf Minuten auf 99 % erhöht. Diese Zusammensetzung wurde für weitere 20 Minuten gehalten und anschließend wieder auf die Anfangsbedingungen von 80 % Eluent B reduziert. Zuletzt folgte eine 10 minütige Nachlaufzeit (*post run*), bevor die nächste Messung begann. Alle Messungen kamen bei einer Flussrate von 200  $\mu\text{L min}^{-1}$  und einem Injektionsvolumen von 20  $\mu\text{L}$  zu Stande.

Die massenspektrometrische Detektion erfolgte im negativen Ionenmodus der ESI Quelle. Hierbei waren die verwendeten Bedingungen: Zerstäubedruck ( $\text{N}_2$ ) 35 psi, Trockengasfluss ( $\text{N}_2$ ) 9  $\text{L min}^{-1}$ , Trockengastemperatur 300 °C und Spannung der Kapillare -4,5 kV. Die ESI Quelle erzeugte deprotonierte Molekülonen ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) verschiedener *m/z*-Verhältnisse, welche in Tabelle 2 aufgelistet sind. Um die Selektivität der Detektion zu erhöhen, wurde zusätzlich der MRM-Modus (*multiple reaction monitoring*) eingesetzt.

## **4.11 GC-MS Vergleichsmessungen der Fettsäuremethode**

### **4.11.1 Herstellung der $\text{CaCO}_3$ Spikes**

Um Vergleichsmessungen der HPLC-MS Methode mit einem GC-MS-System durchzuführen, wurde viermal 0,5 g  $\text{CaCO}_3$  abgewogen und zwei Stunden lang bei 400 °C im Muffelofen ausgeheizt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Feststoff mit jeweils 25, 50, 100 und 300  $\mu\text{L}$  der Standardlösung versetzt. Das DCM war nach kurzer Zeit abgedampft und die Probe wurde mit 4 M HCl aufgelöst. Anschließend folgte die Extraktion mittels SPE wie in Kapitel 4.9.2 erläutert. Die Extrakte wurden hierbei ebenfalls in fünf Aliquote unterteilt, um die bereits beschriebene Standardaddition anzuwenden. Im Anschluss erfolgte zuerst die HPLC-MS Messung der  $\text{CaCO}_3$  Spikes.

### **4.11.2 Derivatisierung**

Um die Fettsäuren der Analyse mittels GC-MS zugänglich zu machen, erfolgte eine Derivatisierung mit BSTFA. Dabei wurde die Carboxylgruppe der jeweiligen Fettsäure

mit einem Trimethylsilylrest versehen. Die Derivatisierung und die nachfolgende Messung wurden ähnlich zu früheren Studien durchgeführt ([Blyth *et al.*, 2006], [Pietrogrande & Bacco, 2011]). Zunächst wurden die Proben nach der HPLC-MS Messung vom Lösungsmittel befreit und in 25  $\mu\text{L}$  ACN wieder aufgenommen. Anschließend wurde die Lösung zehn Minuten lang bei 35  $^{\circ}\text{C}$  im Ultraschallbad behandelt. Es folgte die Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  BSTFA sowie 25  $\mu\text{L}$  Pyridin und die Analyten wurden eine Stunde lang bei 70  $^{\circ}\text{C}$  derivatisiert. Zuletzt wurden die Proben zur Messung mittels GC-MS in ein 1,5 mL Braunglasgefäß überführt.

#### 4.11.3 Messparameter

Für die Vergleichsmessungen kam ein Gaschromatograph (Agilent 6850 Network GC-System) mit einem Quadrupol-Massenspektrometer (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector, Agilent Technologies GmbH, Deutschland) zum Einsatz. Die derivatisierten Analyten wurden im *Splitless* Modus mit einem Injektionsvolumen von 1  $\mu\text{L}$  injiziert. Das verwendete Trägergas war Helium. Die Trennung erfolgte mit Hilfe einer Dünnschichtkapillarsäule (Länge 30 m, Durchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25  $\mu\text{m}$ ) mit 95 % Dimethyl- und 5 % Diphenylpolysiloxan als stationäre Phase. Um die Trennung zu optimieren, wurde ein Temperaturprogramm mit einer Starttemperatur von 90  $^{\circ}\text{C}$  verwendet. Diese wurde mit 10  $^{\circ}\text{C}$  pro Minute auf 210  $^{\circ}\text{C}$  erhöht. Anschließend wurde die Endtemperatur von 245  $^{\circ}\text{C}$  mit einer Heizrate von 5  $^{\circ}\text{C}$  pro Minute erreicht und zwei Minuten lang gehalten. Für die massenspektrometrische Detektion wurde ein sog. *Solvent delay* von sechs Minuten benutzt, bei welchem die von der Säule eluierenden Komponenten noch nicht von dem MS detektiert wurden. Außerdem wurde im *Selected Ion Monitoring* (SIM) Modus gemessen, bei dem nur voreingestellte  $m/z$ -Verhältnisse detektiert werden. Die folgende Tabelle listet die  $m/z$ -Verhältnisse der jeweiligen Molekülonen und Fragmentionen nach der Abspaltung einer  $\text{CH}_3$ -Gruppe, welche für den SIM-Modus verwendet wurden, auf. Des Weiteren ist ein beispielhaftes Massenspektrum mit den charakteristischen Fragmentionen im Anhang unter Kapitel 7.1.2 Abbildung 75 vorzufinden.

**Tabelle 3:** Verwendete  $m/z$ -Verhältnisse im SIM-Modus.

Fettsäure	$m/z$ der Fragmentionen ( $-\text{CH}_3$ )	$m/z$ der Molekülonen
<b>C<sub>12</sub></b>	257	272
<b>C<sub>14</sub></b>	285	300
<b>C<sub>16</sub></b>	313	328

---

<b>C<sub>18</sub></b>	341	356
<b>C<sub>20</sub></b>	369	384

## 4.12 *Non-target Screening*

### 4.12.1 Probenvorbereitung zur *non-target* Analyse

Zur Durchführung der *non-target* Analyse wurden verschiedene Stalagmitproben untersucht, welche im Anhang in Kapitel 7.1.1 aufgelistet sind. Dabei gab es jeweils zwei Stalagmitproben aus den unterschiedlichen Wachstumsabschnitten. Die Speläothemproben wurden einmal in DCM/Methanol (9:1, v:v) sieben Minuten lang im Ultraschallbad gereinigt. Als Blindprobe wurde reines CaCO<sub>3</sub> zwei Stunden lang im Muffelofen bei 400 °C ausgeheizt. Danach wurden sowohl die Realproben als auch die Blindprobe in 4 M HCl aufgelöst.

Anschließend folgte die Extraktion mittels SPE. Hierbei wurden C<sub>18</sub>-SPE Kartuschen (Macherey-Nagel, Deutschland) viermal mit 2,5 mL ACN und viermal mit 2,5 mL Reinstwasser konditioniert, bevor die Probe aufgegeben wurde. Danach wurden die Kartuschen kurz in der SPE Apparatur trocken gesaugt, bevor die Elution folgte. Diese wurde mit fünfmal 1 mL ACN durchgeführt. Die einzelnen Eluate wurden schrittweise in einem 1,5 mL Braunglasgefäß gesammelt, wobei das Lösungsmittel unter einem leichten Stickstoffstrom bei 35 °C eingedampft wurde. 0,5 mL des letzten Eluats wurden zur Messung mittels UHPLC-Orbitrap/MS eingefroren. Vor der Messung der Proben wurde zunächst das Lösungsmittel ACN vollständig abgedampft und anschließend in 0,5 mL ACN/Reinstwasser (1:9; v:v) wieder aufgenommen. Um die Analyten in Lösung zu bringen, wurde das Gemisch danach kurz mit einem Vortexer geschüttelt. Bei einigen Stalagmitproben waren danach ungelöste Partikel im Probengefäß zu erkennen. Aufgrund dessen wurden die entsprechenden Proben vor der Messung über einen Spritzenvorsatzfilter filtriert.

### 4.12.2 UHPLC(-)ESI-HRMS Parameter

Die chromatographische Trennung im Rahmen der *non-target* Analyse wurde mit einem UHPLC-System (Dionex UltiMate 3000: Degasser, Gradientenpumpe, Autosampler, Säulenkommer, Thermo Scientific, Deutschland) mit einer Hypersil Gold Säule (C18, 50x2.0 mm, 1,9 µm Partikelgröße, Thermo Scientific) durchgeführt. Dabei war die Autosamplertemperatur auf 20 °C und die Säulentemperatur auf 25 °C reguliert. Die Eluentenzusammensetzungen entsprachen denen der HPLC-MS Messungen. Das

Gradientenprogramm war wie folgt gewählt: 1 % Eluent B bei 0 min, 1 % B bei 1 min, 20 % B bei 2 min, 20 % B bei 5 min, 30 % B bei 6 min, 50 % B bei 7 min, 99 % B bei 7,5 min, 99 % B bei 8 min bei einer Flussrate von  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  und einem Injektionsvolumen von  $10 \mu\text{L}$ .

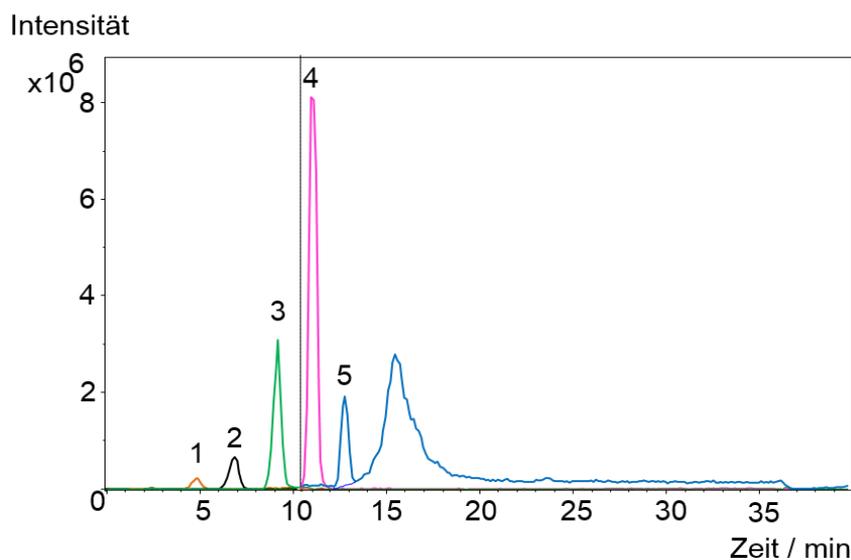
Die Hochauflösende (HR) Massenspektrometrie wurde mit einem Q-Exactive Massenspektrometer (Thermo Scientific, Deutschland) ausgestattet mit einer HESI Quelle bei  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  betrieben. Die HESI Quelle wurde mit den folgenden Einstellungen im negativen Ionen Modus verwendet: Zerstäubedruck ( $\text{N}_2$ ) 20 psi, Hilfsgasfluss ( $\text{N}_2$ ) 60 psi, Kapillartemperatur  $320 \text{ }^\circ\text{C}$  und Spannung der Kapillare  $-3,3 \text{ kV}$ . Im *Full-MS* Modus wurde ein Massenbereich von  $m/z$  80 – 500 und eine Auflösung von 70.000 bei  $m/z$  200 eingestellt. Um den Kalibrierbereich des Gerätes auf niedrigere Massen zu erweitern, wurde ein zusätzlicher Kalibrierstandard (2-Hydroxyisobutansäure) mit  $m/z$  103,04007 ( $[\text{M-H}]^-$ ) zu dem kommerziell erhältlichen Pierce ESI Negative Kalibriermix hinzugefügt.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Methodenentwicklung der Fettsäureanalyse

#### 5.1.1 Trennung mittels HPLC und MS Detektion

Um eine akkurate Trennung der Analyten zu erzielen, wurde eine angemessene HPLC Methode optimiert. Die Fettsäuren besitzen infolge ihrer langen unpolaren Kohlenwasserstoffketten eine geringe Polarität. Aufgrund dessen beginnt das Gradientenprogramm bereits mit 80 % des Eluenten B (ACN/H<sub>2</sub>O, 98:2, v/v), sodass breite Signale vermieden werden und eine kurze Analysezeit erreicht wird. Durch die Verwendung des Gradienten, wie bereits in Kapitel 4.10. beschrieben, sind alle Analyten innerhalb von 14 Minuten Basislinien getrennt. Ein Chromatogramm der fünf Fettsäuren ist in der folgenden Abbildung 35 dargestellt.



**Abbildung 35:** Chromatographische Trennung der Analyten (1: C<sub>12</sub>, 2: C<sub>14</sub>, 3: C<sub>16</sub>, 4: C<sub>18</sub>, 5: C<sub>20</sub>); EICs (extracted ion chromatogramm) der einzelnen Massenspuren, gemessen im ESI(-)-Modus.

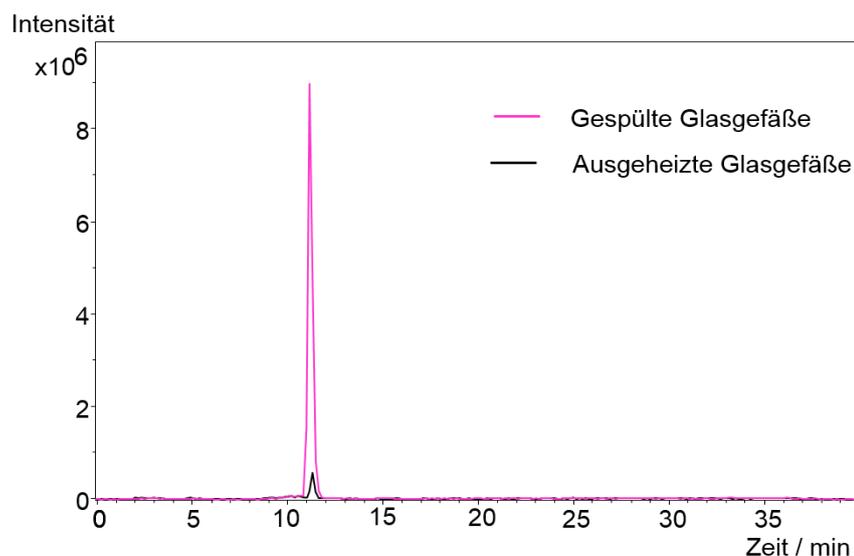
Bei der Betrachtung der einzelnen Massenspuren taucht unmittelbar nach dem Signal der C<sub>20</sub> (Nr. 5 in Abbildung 35) noch ein zusätzliches unbekanntes Signal auf. Dieses kann nicht identifiziert werden. Die Durchführung einer System-Blindmessung, bei welcher keine Probe injiziert wird, sondern lediglich die Eluentenzusammensetzung des Gradientenprogramms gemessen wird, weist das gleiche Signal auf. Somit liegt der Ursprung dieses Störsignals im ACN des Eluenten B, der zu dieser Analysezeit hauptsächlich vorliegt. Deshalb wurde als Alternative Methanol als Eluent B getestet,

wodurch dieses Signal entfernt werden konnte. Allerdings führt die Verwendung von Methanol prinzipiell zu niedrigeren Ionisierungseffizienzen in der ESI Quelle, sodass ACN bessere Ergebnisse liefert. Somit wurde versucht das C<sub>20</sub> Signal chromatographisch von dem Störsignal zu trennen. Bei ersten Messungen ohne Verwendung eines Säulenofens wurde die C<sub>20</sub> Säure teilweise von dem Störsignal überlagert, was eine Quantifizierung durch Bestimmung der Signalfäche unmöglich machte. Wie jedoch in Abbildung 35 deutlich zu erkennen ist, sind die beiden Signale durch den Einsatz eines Säulenofens, welcher die Säule konstant bei 50 °C beheizt, hinreichend voneinander getrennt, um die Signalfäche des C<sub>20</sub> Signals bestimmen zu können.

Die Detektion der Fettsäuren erfolgt als deprotonierte Quasimolekülonen ( $[M-H]^-$ ) im ESI(-)-Modus. Demnach ist keine zeitintensive Derivatisierung der Analyten vor der Messung notwendig. Dieser zusätzliche Vorbereitungsschritt kann zu Analytverlusten und infolgedessen zu einer Beeinträchtigung der Reproduzierbarkeit führen. Zudem können die Derivatisierungsreagenzien weitere Kontaminierungen herbeiführen.

### 5.1.2 Blindwertoptimierung

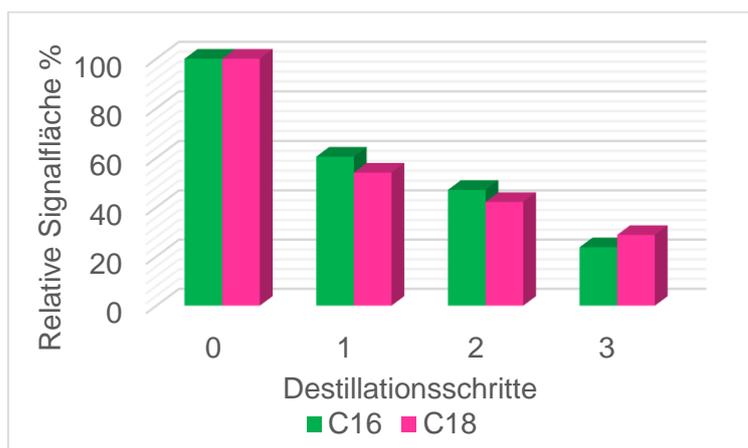
Hohe Blindwerte von C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub> deuten auf Kontaminierungen der Glasgefäße oder der verwendeten Lösungsmittel hin. Die folgende Abbildung 36 veranschaulicht die EICs von C<sub>18</sub> aus Blindproben, welche sowohl in gespülten als auch in ausgeheizten Glasgefäßen vorbereitet wurden.



**Abbildung 36:** Untergrundsignal von C<sub>18</sub> aus gespülten und ausgeheizten Glasgefäßen; EIC von  $m/z$  283 im ESI(-)-Modus.

Die Signalintensitäten machen deutlich, dass ausgeheizte Glasgefäße, im Gegensatz zu lediglich gespülten Gefäßen, eine drastische Reduzierung der C<sub>18</sub> Blindwerte mit sich bringen. Die beiden gezeigten Blindwerte wurden mit Hilfe einer externen Kalibrierung quantifiziert und das Ausheizen bewerkstelligt eine Abnahme von ursprünglich ca. 350 ng C<sub>18</sub> in den gespülten Gefäßen auf ca. 10 ng. Ein ähnliches Resultat wird ebenfalls für C<sub>16</sub> erzielt, was verdeutlicht, dass diese Vorkehrung für alle verwendeten Glasgefäße dringend erforderlich ist, um niedrige Untergrundwerte und eine gute Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Die Blindwerte der anderen drei Analyten dagegen sind prinzipiell weitaus geringer.

Zusätzlich zu den Gefäßen können auch die verwendeten Lösungsmittel eine mögliche Quelle für Kontaminierung darstellen. Daher wird DCM, welches die größte Kontaminierung aufweist, durch mehrere Destillationsschritte vorgereinigt. In der nächsten Abbildung sind die Ergebnisse von drei aufeinander folgenden Destillationsschritten dargelegt.



**Abbildung 37:** Reduktion der Signalfächen der Blindwerte durch dreifache Destillation von DCM.

Die relativen Signalfächen wurden dahingehend normiert, dass das ermittelte Untergrundsignal in DCM vor dem ersten Destillationsschritt 100 % entspricht. Somit ist zu erkennen, dass die Destillation des Lösungsmittels eine weitere Reduktion des Untergrunds bewirkt. Nach dreifacher Destillation können die Blindwerte für C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub> erneut um 70-75 % verringert werden. Daher wurden die beschriebenen Vorkehrungen bei allen weiteren Laborarbeiten getroffen.

### 5.1.3 Extraktion mittels LLE

Als erstes Extraktionsverfahren, um die Fettsäuren aus der wässrigen Probe zu extrahieren, wurde die LLE getestet. Hierzu wurden Wasser *Spikes* verwendet, die wie in

Kapitel 4.8 erläutert hergestellt wurden, um verschiedene Durchführungsschritte zu optimieren.

### Abdampftemperatur

In Anbetracht dessen wurde zunächst der Abdampfprozess der Standardlösungen bezüglich der Temperatur der Abdampfstation untersucht. Dabei wurden vier verschiedene Temperaturen verwendet, deren Ergebnisse in der folgenden Abbildung veranschaulicht sind.

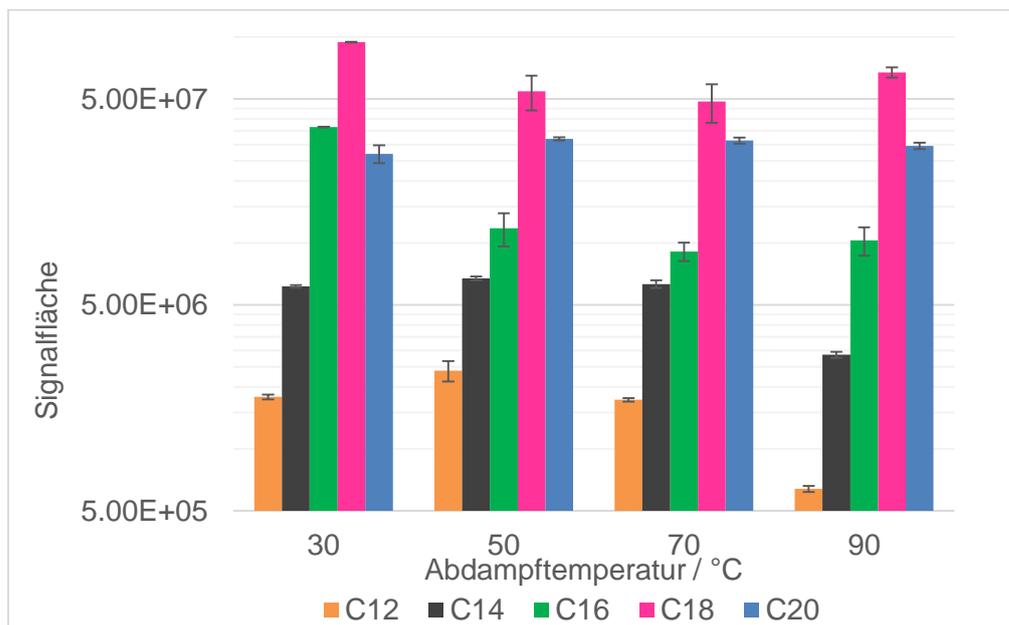


Abbildung 38: Ermittelte Signalflächen bei Variation der verwendeten Abdampftemperatur.

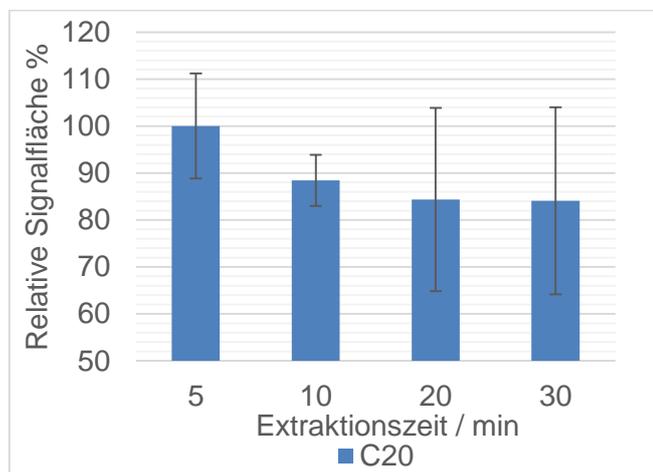
Bei Betrachtung der logarithmischen Skalierung der Abbildung fällt auf, dass der größte Einfluss der Abdampftemperatur auf die erhaltene Signalfäche bei C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub> auftritt. Bei beiden Analyten ist eine starke Verringerung der Signalfäche bereits bei einer Temperaturerhöhung von 30 °C auf 50 °C zu erkennen. Außerdem sind die ermittelten Signalfächen bei noch höheren Temperaturen bis zu 90 °C weitaus weniger ausgeprägt, als bei der niedrigsten Temperatur. Selbst bei Berücksichtigung der vorliegenden Fehlerbalken führt die Abdampftemperatur von 30 °C zu den besten Ergebnissen. Daher wurde diese Abdampfbedingung für alle folgenden Experimente beibehalten.

Bei den kleineren Fettsäuren, C<sub>12</sub> und C<sub>14</sub>, tauchen erst bei der höchsten Temperatur von 90 °C deutliche Analytverluste auf, obwohl bei diesen kurzkettigen Analyten ein größerer Einfluss der Abdampftemperatur erwartet wurde. Im Gegensatz dazu

entspricht die längste Säure C<sub>20</sub> den Erwartungen und weist keine signifikanten Veränderungen bei den verschiedenen Abdampftemperaturen auf.

### *Ultraschallbadbedingungen*

Des Weiteren ist im Rahmen der LLE Optimierung die Reproduzierbarkeit des Extraktionsverfahrens untersucht worden. Hierbei zeigt die Extraktion im Ultraschallbad mit viermal 1,75 mL DCM, wie in Kapitel 4.9.1 erläutert, die beste Reproduzierbarkeit mit relativen Standardabweichungen (RSD) unter 10 %. Um dies zu gewährleisten, wurden die Bedingungen des Ultraschallbads optimiert. Dazu wurden verschiedene Extraktionszeiten untersucht, da die Extraktionsdauer eine entscheidende Rolle spielt, um ein vollständiges Lösen der Analyten in der organischen Phase zu gewährleisten.

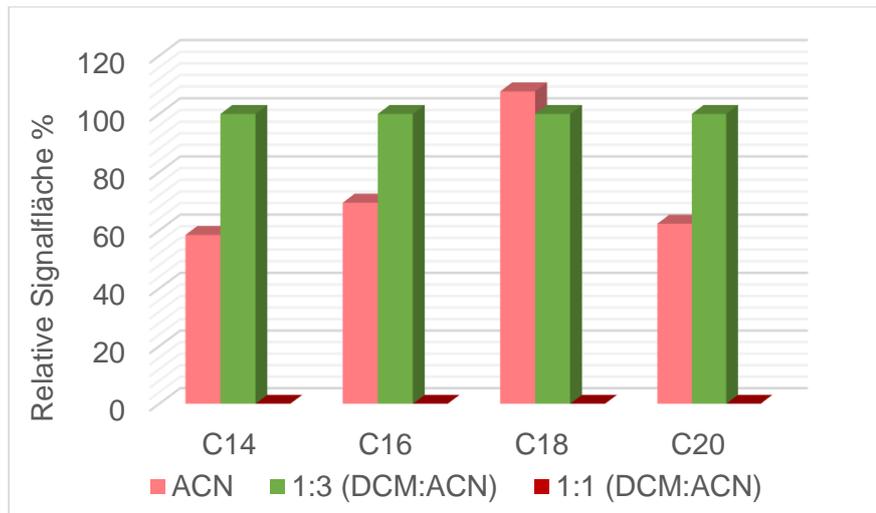


**Abbildung 39:** Relative Signalfächen in % von C<sub>20</sub> bei unterschiedlichen Extraktionszeiten.

Die vier kürzeren Fettsäuren C<sub>12</sub> bis C<sub>18</sub> weisen keine signifikanten Unterschiede bei unterschiedlichen Extraktionszeiten auf. Dennoch wird in Abbildung 39 gezeigt, dass eine längere Behandlungszeit im Ultraschallbad bei C<sub>20</sub> zu niedrigeren Signalfächen führt. Bereits eine Erhöhung von fünf auf zehn Minuten bewirkt eine Verschlechterung um ca. 12 %. Die großen Fehlerbalken bei noch höheren Extraktionszeiten deuten darauf hin, dass es bei zu langer Behandlung im Ultraschallbad zu einer Abnahme der Reproduzierbarkeit kommen kann. Daher wird die Zeit im Ultraschallbad sowohl in allen folgenden LLE als auch SPE Verfahren auf fünf Minuten beschränkt. Zusätzlich wird die Ultraschallbadtemperatur auf 35 °C eingestellt, um die Löslichkeit der länger-kettigen Fettsäuren zu steigern.

*Lösungsmittel zur Wiederaufnahme*

Ein weiterer Schritt, der optimiert wurde, ist die Zusammensetzung der Lösungsmittel, die zur Wiederaufnahme der Analyten nach der Extraktion vor der HPLC-MS Messung verwendet wurden. Hierzu wurden zum einen reines ACN und zum anderen DCM/ACN Gemische mit verschiedenen Verhältnissen (1:3, 1:1) und reines DCM getestet. Die dabei erhaltenen Resultate sind in der folgenden Abbildung 40 dargestellt.

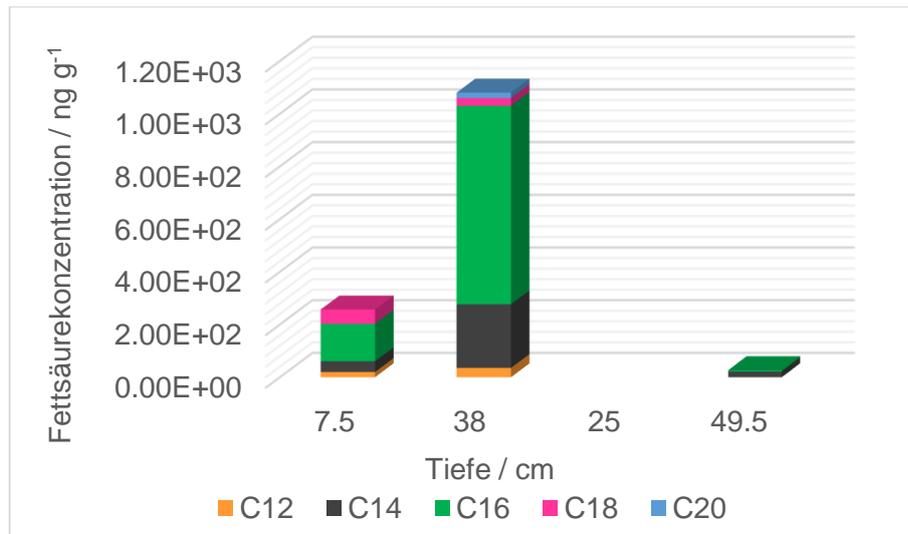


**Abbildung 40:** Relative Signalfächen in % bei unterschiedlichen Lösungsmittelzusammensetzungen zur Wiederaufnahme vor der HPLC-MS Messung.

Die Darstellung veranschaulicht die ermittelten relativen Signalfächen der Säuren C<sub>14</sub> bis C<sub>20</sub>, welche eine Variation bei den unterschiedlichen Lösungsmitteln aufweisen. C<sub>12</sub> ist mit der kürzesten Kettenlänge am besten in ACN löslich und zeigt daher kaum Unterschiede. Das Gemisch DCM/ACN (1:3) ergibt das beste Ergebnis und wurde daher als 100 % festgelegt. Die Wiederaufnahme in reinem ACN war bei C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub> und C<sub>20</sub> um mehr als 30 % geringer, als mit DCM/ACN (1:3). Nur für C<sub>18</sub> war die Signalfäche bei reinem ACN etwas erhöht. Noch höhere Anteile von DCM führen zu starkem *Fronting* der Signale, sodass diese nicht auszuwerten sind. Infolgedessen sind in der Abbildung keine Signalfächen für DCM/ACN (1:1) angegeben. Das gleiche gilt für reines DCM, bei welchem die Signale noch unförmiger sind. Da das Gradientenprogramm mit 20 % des wässrigen Eluenten beginnt, kann sich die Probe bei einem zu hohen DCM Anteil nicht vollständig in der mobilen Phase lösen, wodurch die unzureichenden Signalformen hervorgerufen werden. Infolgedessen wird das DCM/ACN (1:3) Gemisch für alle folgenden Versuche, bei denen die Probe bis zur Trockenheit eingedampft und anschließend wieder aufgenommen wird, verwendet.

*Anwendung der LLE auf Realproben*

Die optimierte LLE Methode wurde zunächst auf Stalagmitproben aus unterschiedlicher Tiefe des Stalagmits NG01 aus dem Herbstlabyrinth-Adventhöhle System angewendet. Hierbei wurden die erhaltenen Signalfächen mittels externer Kalibrierung über Wasser *Spikes* quantifiziert. Die folgende Abbildung 41 veranschaulicht die erhaltenen Ergebnisse.

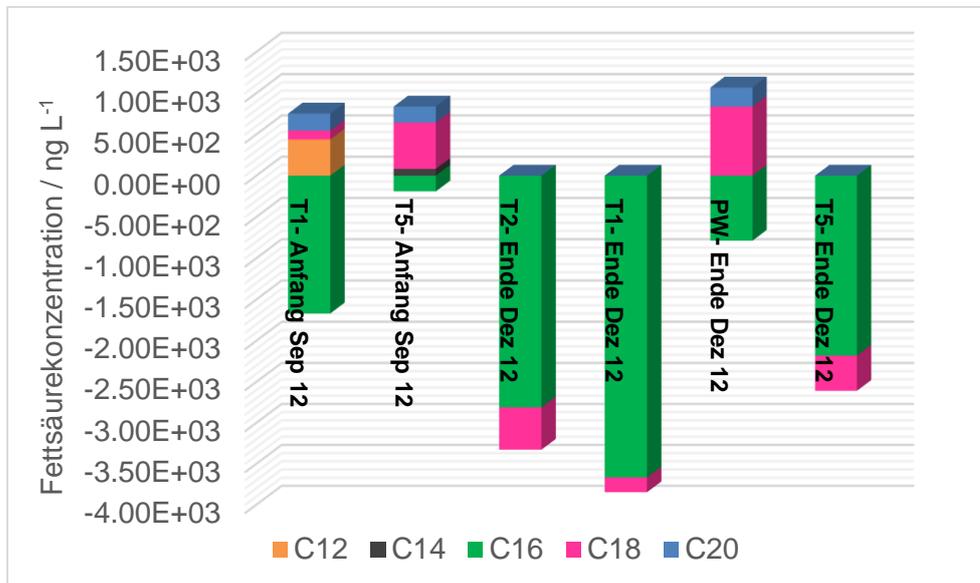


**Abbildung 41:** Fettsäurekonzentrationen in  $\text{ng g}^{-1}$  in vier Stalagmitproben des NG01 aus verschiedenen Tiefen; Extraktion mittels LLE und Quantifizierung mittels externer Kalibrierung.

Die Darstellung verdeutlicht, dass die Gesamtkonzentration an Fettsäuren bei den unterschiedlichen Proben variiert. So sind keine der gesuchten Analyten in der Probe bei einer Tiefe von 25 cm vorzufinden, während in 38 cm Tiefe alle fünf Fettsäuren vorhanden sind. Lediglich in dieser Probe kann die längste Säure  $\text{C}_{20}$  detektiert werden. In der tiefsten und somit ältesten Probe bei 49,5 cm sind ebenfalls nur geringe Mengen an  $\text{C}_{14}$  und  $\text{C}_{16}$  vorhanden. Insgesamt sind die erhaltenen Signale der Analyten, abgesehen von  $\text{C}_{16}$ , nicht stark ausgeprägt. Dabei ist unklar, ob die enthaltenen Fettsäuremengen in den Stalagmitproben zu gering, oder die Extraktion und Aufkonzentrierung der Komponenten nicht optimal sind.

Daher wurde die LLE Methode zusätzlich an sechs verschiedenen Tropfwasserproben aus dem Herbstlabyrinth-Adventhöhle System getestet. Die Quantifizierung erfolgte ebenfalls mittels externer Kalibrierung. Die erhaltenen Resultate, welche in Abbildung 42 dargestellt sind, weisen teilweise trotz ausgeprägter Signale im Chromatogramm, starke „negative“ Konzentrationen auf. So sind zum Beispiel alle ermittelten Ergebnisse der  $\text{C}_{16}$  im negativen Bereich. Vor allem die unterschiedlichen Proben im

Dezember 2012 zeigen diesen Effekt besonders ausgeprägt. Des Weiteren sind C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub> und C<sub>20</sub> in einigen Proben überhaupt nicht zu detektieren.



**Abbildung 42:** Fettsäurekonzentration in ng L<sup>-1</sup> in sechs verschiedenen Tropfwasserproben aus dem Herbstlabyrinth-Adventhöhle System; Extraktion mittels LLE und Quantifizierung mittels externer Kalibrierung.

Diese beiden Applikationen der LLE Methode verdeutlichen, dass die Methode nicht zur Messung der Realproben geeignet ist. Besonders die Ergebnisse der Tropfwasserproben machen klar, dass die externe Kalibrierung über die LLE von mit Standards versetzten Wasserproben keine optimale Quantifizierung bietet. Die erhaltenen Fettsäurekonzentrationen im negativen Bereich beweisen eine Unterschätzung der eigentlichen Konzentrationen. Dies lässt sich auf Matrixeffekte bei der Ionisierung der Analyten in der ESI-Quelle zurückführen. Diese Effekte treten bei den Reinstwasser *Spikes* der externen Kalibrierung nicht auf, sodass die erhaltenen Signalfächen weit aus höher ausfallen. Demnach ist die LLE Methode nicht in der Lage ungewünschte Matrixbestandteile der Realproben ausreichend abzutrennen. Eine Vielzahl organischer Verbindungen ist in dem verwendeten Lösungsmittel DCM löslich, wodurch sie bei der LLE ebenfalls extrahiert und anschließend aufkonzentriert werden können. Da bei den Stalagmitproben keine negativen Konzentrationen auftauchen, scheinen die Störeffekte bei dieser Matrix weniger ausgeprägt zu sein. Dennoch ist eine Unterschätzung der ermittelten Fettsäurekonzentration nicht auszuschließen. Daher muss eine spezifischere Extraktionsmethode verwendet werden, welche die Analyten zusätzlich aufkonzentriert.

#### 5.1.4 Optimierung SPE

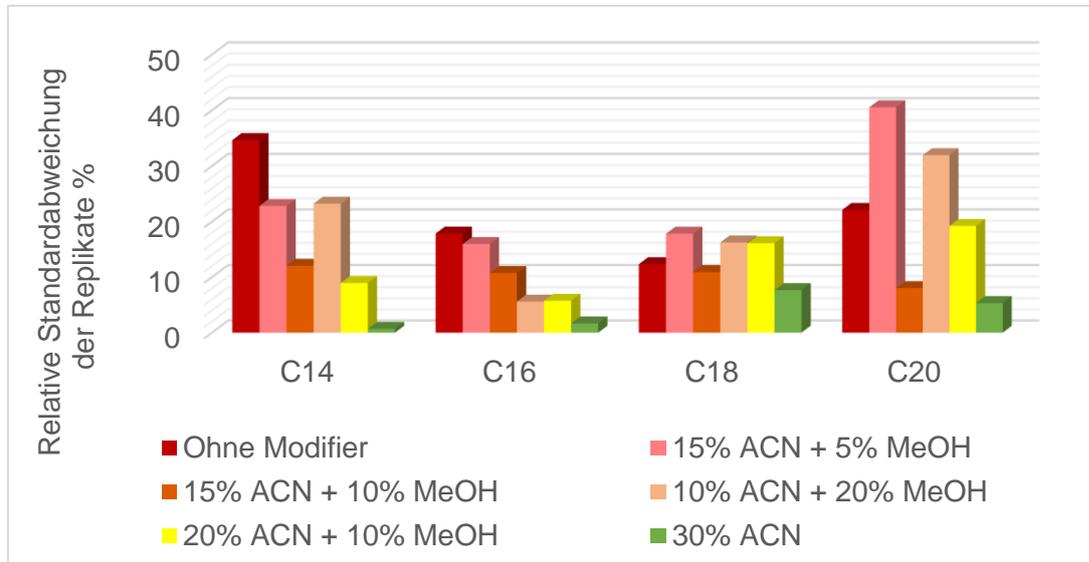
Aufgrund der unzureichenden Ergebnisse der LLE Methode wurde eine SPE Methode entwickelt, welche es ermöglicht, die Störkomponenten der Matrix effizienter abzutrennen. Durch die Verwendung der C<sub>18</sub>-SPE-Kartuschen werden die Analyten selektiver retardiert, als durch die Extraktion mittels DCM bei der LLE. Des Weiteren ist eine direkte Aufkonzentrierung im Rahmen der Elution während des SPE Prozesses möglich.

Zur Gewährleistung der ausreichenden Matrixabtrennung wurden durch Verwendung von Wasser *Spikes* (Kapitel 4.8) die Konditionierungs-, Wasch-, Trocknungs- und Elutionsbedingungen der SPE Methode optimiert. Dabei führen die in Kapitel 4.9.2 erläuterten Parameter zu den besten Resultaten. Nach der Probenaufgabe auf die SPE Kartusche folgt ein Waschschriff mit MeOH/Wasser (2:1, v/v). Dadurch werden Matrixbestandteile, welche polarer sind als die Analyten, aber prinzipiell auf der Kartusche zurückbleiben könnten, entfernt. Anschließend wird die Kartusche unter einem leichten Stickstoffstrom 20 min lang getrocknet, um restliches Wasser zu reduzieren. Dieses Wasser würde die vollständige Elution der Analyten mit DCM behindern und die darauffolgenden Eindampfschritte drastisch verlängern. Dennoch kann eine Trocknung länger als 30 min zu Analytverlusten führen, sodass dieser Schritt nicht unbegrenzt durchgeführt werden kann. Die Elution erfolgt mit sechsmal 1 mL DCM. Dies gewährleistet eine komplette Benetzung des Packungsmaterials und eine vollständige Elution der Analyten, ohne ein zu großes Volumen an Lösungsmittel zu verwenden. Wie bereits in Kapitel 5.1.2 erwähnt stellt DCM eine mögliche Quelle für Kontaminierungen dar. Aufgrund dessen ist eine sparsame Verwendung nötig, um niedrige Blindwerte zu ermöglichen. Überdies wurden die gleichen Abdampf-, Ultraschallbad- und Wiederaufnahmebedingungen verwendet, die bereits im Zuge der LLE Entwicklung optimiert wurden.

##### *Reproduzierbarkeit*

Um die Reproduzierbarkeit der SPE Methode zu untersuchen, wurden jeweils drei Replikate von Wasser *Spikes*, wie in Kapitel 4.8 erläutert, verwendet. Abbildung 43 illustriert deren RSD bei unterschiedlichen Bedingungen. Dabei wird veranschaulicht, dass die Extraktion ohne Zugabe von organischen Modifiern keine zuverlässige Reproduzierbarkeit gewährleistet. Die erhaltenen Ergebnisse schwanken bis zu etwa 35 %. Daraus lässt sich schließen, dass die Analyten nicht vollständig aus der wässrigen Probe auf die SPE Kartusche überführt werden können. Darum wurden fünf verschiedene ACN/Methanol (MeOH) Gemische vor der SPE zu den Replikaten zugege-

ben, welche als organische Modifier dienen. Diese können Analytverluste verringern, indem sie deren Löslichkeit in der wässrigen Probe erhöhen und dadurch eine Adsorption an die Glasoberfläche der Probengefäße verhindern. Somit werden die Analyten effektiver auf die SPE Kartuschen übertragen und die Reproduzierbarkeit schließlich erhöht.



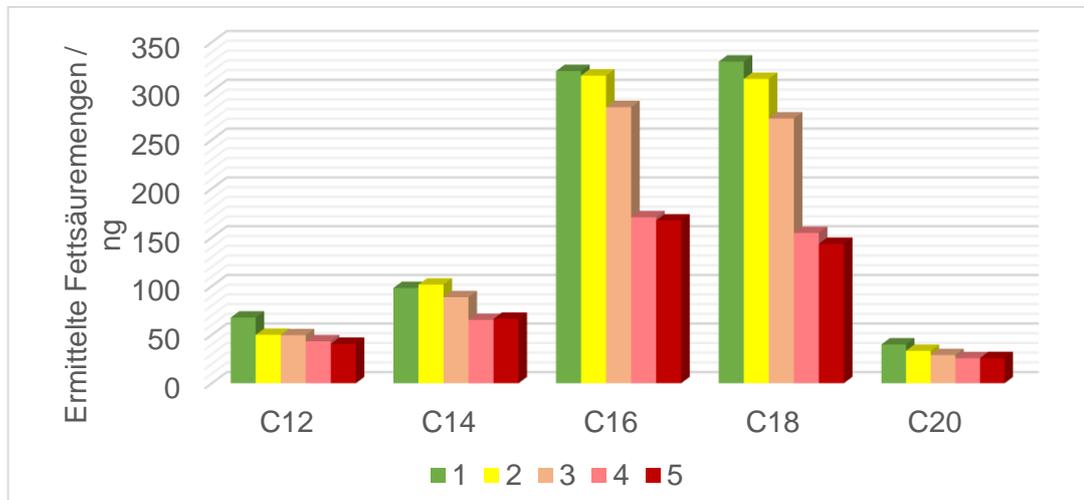
**Abbildung 43:** Relative Standardabweichung von 3 Replikaten in % bei unterschiedlichen Zugaben von organischen Modifiern.

Generell zeigen die Ergebnisse der Variation der Modifierzusammensetzung eine verbesserte Reproduzierbarkeit bei höherem ACN Anteil. Somit weist die Zugabe von 30 % ACN die niedrigsten RSD Werte auf. Diese schwanken zwischen etwa 0,7 % bei C<sub>14</sub> und 7 % bei C<sub>18</sub>. Im Gegensatz dazu führt eine Zugabe der 30 Volumen% ACN/MeOH Gemische zu weitaus höheren Abweichungen. Deshalb wurde die Verwendung von MeOH als Modifier verworfen. Eine weitere Verbesserung auf niedrigere RSD Werte ist aufgrund der Schwankungen der HPLC-MS Messung nicht möglich. Daher wurde für alle folgenden Experimente die Zugabe von 30 % ACN gewählt. Zusätzlich wird der pH-Wert der Probe durch Zugabe von 0,4M HCl unter 4 eingestellt, sodass die Säuren undissoziiert vorliegen. Somit ist eine optimale Retention der Analyten auf der SPE Kartusche gewährleistet.

#### *Mehrfachverwendung der Kartuschen*

Im Rahmen jeder Methodenentwicklung einer SPE stellt sich die Frage, ob eine Mehrfachverwendung der Kartuschen möglich ist, oder ob positive/negative Artefakte entstehen. Darum wurden Wasser *Spikes* als Replikate hergestellt und die SPE Methode

fünfmal mit der gleichen Kartusche durchgeführt. Die hierbei ermittelten Fettsäuremengen sind in der folgenden Abbildung 44 dargestellt.

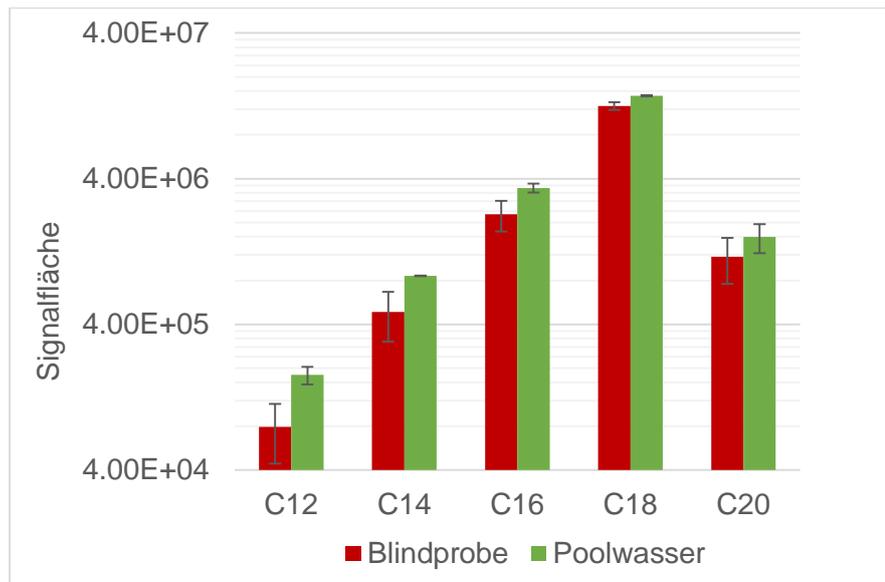


**Abbildung 44:** Ermittelte Fettsäuremengen in ng bei Mehrfachverwendung der SPE Kartusche.

Die Ergebnisse machen klar, dass bei den fünf Durchgängen die gefundenen Mengen aller Analyten stetig abnehmen. Bereits bei der zweiten Verwendung der Kartusche sind vor allem bei C<sub>12</sub>, C<sub>18</sub> und C<sub>20</sub> deutliche Verluste zu erkennen. Aufgrund dessen ist eine Mehrfachverwendung der Kartuschen keinesfalls möglich. Für alle weiteren Optimierungsversuche und alle Messungen der Realproben kamen deshalb frische Kartuschen zum Einsatz.

#### *Anwendung der SPE auf eine Poolwasserprobe*

Da bei der LLE die Tropfwasserproben größere Matrixeffekte zeigten als die Stalagmitproben, wurden eine Poolwasserprobe und eine Blindprobe aus Reinstwasser mit der optimierten SPE Methode extrahiert und gemessen. Die erhaltenen Signalfächen sollen klar machen, ob die Extraktion mittels SPE eine effizientere Matrixabtrennung gewährleistet als die LLE. Die folgende Abbildung 45 zeigt auf einer logarithmischen Skala die ermittelten Signalfächen der fünf Analyten in der Real- und der Blindprobe. Dabei wird deutlich, dass bei allen Fettsäuren die Poolwasserprobe größere Signalfächen liefert als die Blindprobe. Daraus lässt sich schließen, dass die Störkomponenten der Matrix mit der SPE Methode besser entfernt werden können und somit weniger Matrixeffekte in der ESI Quelle auftreten. Dadurch wird die Ionisierungseffizienz der Analyten weniger stark unterdrückt als bei der LLE Methode. Dieses Resultat verdeutlicht, dass die Fettsäuren mit Hilfe der SPE Methode weitaus selektiver extrahiert werden können als mittels LLE.



**Abbildung 45:** Vergleich der Signalfächen einer Blindprobe und einer Poolwasserprobe aus dem Herbst-labyrinth-Adventhöhle System, Extraktion mittels SPE.

### 5.1.5 Quantifizierung

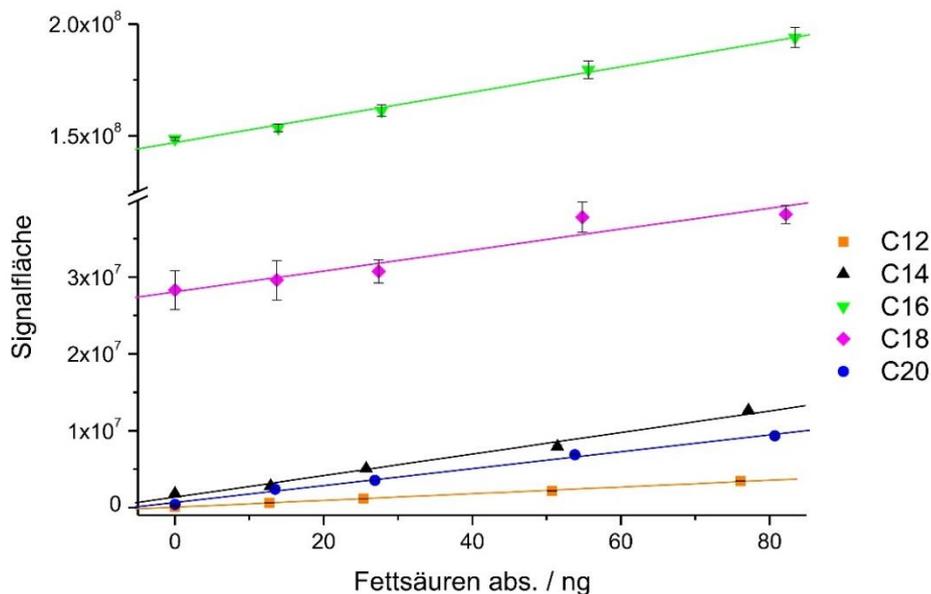
#### Externe Kalibrierung

Um die Gewährleistung der Linearität der SPE Methode zu testen, wurde zunächst eine externe Kalibrierung über Wasser *Spikes* mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Die Ergebnisse der linearen Regression sind in der folgenden Tabelle 4 aufgelistet.

**Tabelle 4:** Ergebnisse der linearen Regression der Wasser *Spikes*.

	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>20</sub>
<b>Steigung</b>	4,37E+04	1,40E+05	5,65E+05	1,36E+05	1,10E+05
<b>Ordinatenabschnitt</b>	6,36E+04	1,36E+06	1,7E+08	2,81E+07	6,63E+05
<b>R</b>	0,9989	0,9936	0,9973	0,9558	0,9974
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9979	0,9873	0,9946	0,9136	0,9948
<b>RSD / %</b>	0,9-1,4	0,1-6,0	1,1-2,0	3,0-8,6	0,1-3,4
<b>LOD / ng</b>	1,23	0,77	3,81	55,97	2,54
<b>LOQ / ng</b>	4,08	2,57	12,69	186,56	8,48

Durch das Auftragen der ermittelten Signalfächen gegen die zugesetzte Menge der jeweiligen Fettsäure in ng ergeben sich Kalibriergeraden, welche in der folgenden Abbildung 46 veranschaulicht sind.



**Abbildung 46:** Externe Kalibrierung über Reinstwasser *Spikes*; Extraktion mittels SPE.

Die Korrelationskoeffizienten ( $R$ ) der einzelnen Analyten zeigen, dass eine klare Linearität gegeben ist. Das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) weist darauf hin, dass die Regressionsgeraden gut mit den exakten Punkten der Kalibrierung übereinstimmen. Die LODs der Komponenten wurden über folgende Gleichung berechnet:

$$LOD = \frac{3\sigma}{m} \quad (\text{V.I.})$$

Hierbei entspricht  $\sigma$  der Standardabweichung des Blindwertes und  $m$  der Steigung der Kalibriergeraden.

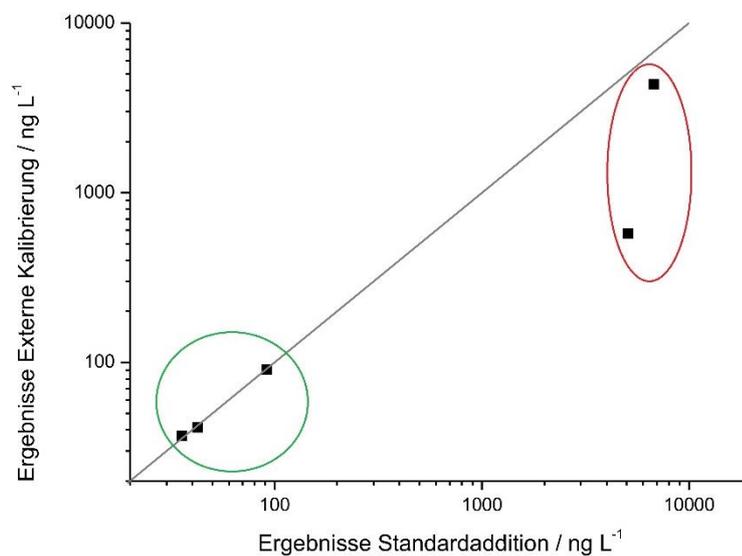
Äquivalent berechnet sich die Bestimmungsgrenze (LOQ) aus:

$$LOQ = \frac{10\sigma}{m} \quad (\text{V.II.})$$

Als Maß der Präzision wurden die RSD Werte aller Konzentrationen, außer der Blindprobe bestimmt. Bereits durch Betrachten der Fehlerbalken der abgebildeten Kalibriergeraden wird deutlich, dass  $C_{18}$  die größten Schwankungen aufweist. Der vergleichsweise hohe  $\sigma$ -Wert des Blindwertes führt daher auch zu den erhöhten Werten für die LOD und LOQ bei  $C_{18}$ .

*Standardaddition*

Bereits die externe Kalibrierung mittels LLE führte zu einer Unterschätzung der Realproben. Daher wurde eine Poolwasserprobe mittels SPE extrahiert und anschließend sowohl über externe Kalibrierung, so wie im vorherigen Kapitel beschrieben, als auch über Standardaddition quantifiziert. Prinzipiell führt die Durchführung einer Standardaddition zu einer Verlängerung der Probenvorbereitungsdauer und der Messzeiten. Dafür können Matrixeffekte effektiver bei der Quantifizierung mit einbezogen werden, als bei einer externen Kalibrierung. Ein Vergleich der erhaltenen Resultate ist in der folgenden Abbildung 47 dargelegt. Die graue Linie entspricht hierbei der 1:1-Linie.



**Abbildung 47:** Vergleich der von externer Kalibrierung und Standardaddition erhaltenen Ergebnisse einer Poolwasserprobe in ng L<sup>-1</sup>.

Die Abbildung demonstriert, dass drei der Ergebnisse, bei niedrigeren Konzentrationen, gut übereinstimmen. Die grün umrahmten Punkte liegen fast genau auf der 1:1-Linie, wodurch verdeutlicht wird, dass in diesem Konzentrationsbereich die Quantifizierung mittels externer Kalibrierung die gleichen Ergebnisse erzielt wie die Standardaddition. Die rot umrahmten Punkte, bei weitaus höheren Konzentrationen, weisen jedoch eine Abweichung von der 1:1-Linie auf. In diesem Bereich tritt erneut eine Unterschätzung durch die externe Kalibrierung auf. Dieses Resultat bestätigt die Beobachtung der Realprobenmessung mittels LLE. Somit ist nachgewiesen, dass die Matrixeffekte bei hohen Konzentrationen nicht vollständig verhindert werden können. Infolgedessen wurde trotz des resultierenden erhöhten Arbeitsaufwandes und der verlängerten Messdauer für alle weiteren Analysen der Realproben die Standardaddition als Quantifizierungsmethode verwendet.

### 5.1.6 Wiederfindungsrate

Als letzter Parameter der Methodvalidierung wurde die Wiederfindungsrate bestimmt. Hierzu wurden eine Blindprobe und drei Wasser *Spikes* mit unterschiedlichen Fettsäuremengen (25, 75 und 150  $\mu\text{L}$  der Standardlösung) mittels SPE extrahiert und anschließend gemessen. Daraufhin wurden die ermittelten Mengen mit den tatsächlich zugesetzten Mengen verglichen. Dazu wurden die Blindwertergebnisse von den Wasser *Spikes* subtrahiert. Der Mittelwert der Ergebnisse bei unterschiedlichen Konzentrationen wurde berechnet und somit die Wiederfindungsrate ( $r$ ) der einzelnen Fettsäuren bestimmt (Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Ermittelte Wiederfindungsraten der verschiedenen Fettsäuren.

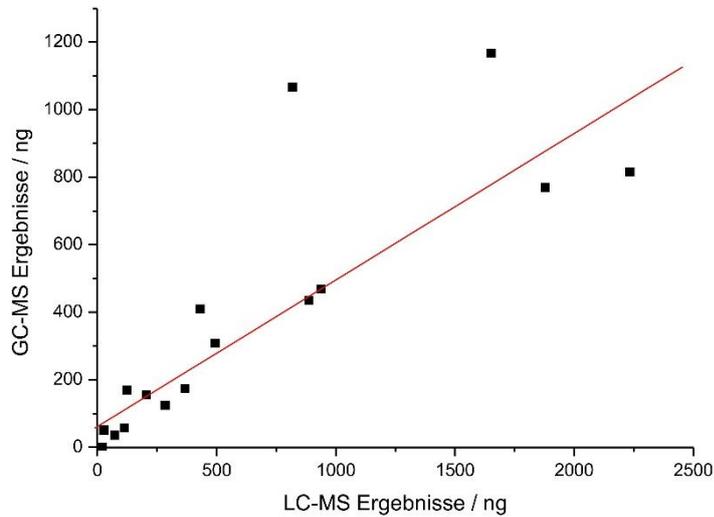
	$\text{C}_{12}$	$\text{C}_{14}$	$\text{C}_{16}$	$\text{C}_{18}$	$\text{C}_{20}$
$r / \%$	$97 \pm 4$	$103 \pm 8$	$101 \pm 8$	$68 \pm 8$	$30 \pm 7$

$\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{18}$  weisen angemessene Wiederfindungsraten auf, wohingegen das Resultat für  $\text{C}_{20}$  schlechter ausfällt. Aufgrund der langen Kohlenwasserstoffkette von  $\text{C}_{20}$  ist seine Löslichkeit in den verwendeten Lösungsmitteln am niedrigsten. Daher stellt die Wiederaufnahme der Analyten zum einen bei der Herstellung der Wasser *Spikes* und zum anderen vor der HPLC-MS Messung einen kritischen Schritt für diese Fettsäure dar. Besonders bei niedrigen Konzentrationen kann diese Wiederfindungsrate dazu führen, dass  $\text{C}_{20}$  nicht nachweisbar ist. Aufgrund dessen ist besonders die Behandlung im Ultraschallbad ausschlaggebend, um die Löslichkeit dieses Analyten zu verbessern. Nichtsdestotrotz wurden die Bedingungen optimiert, um bestmögliche Resultate zu erreichen. Alle gemessenen Tropfwasser und Stalagmit Realproben wurden daher in Bezug auf die ermittelten Wiederfindungsraten korrigiert.

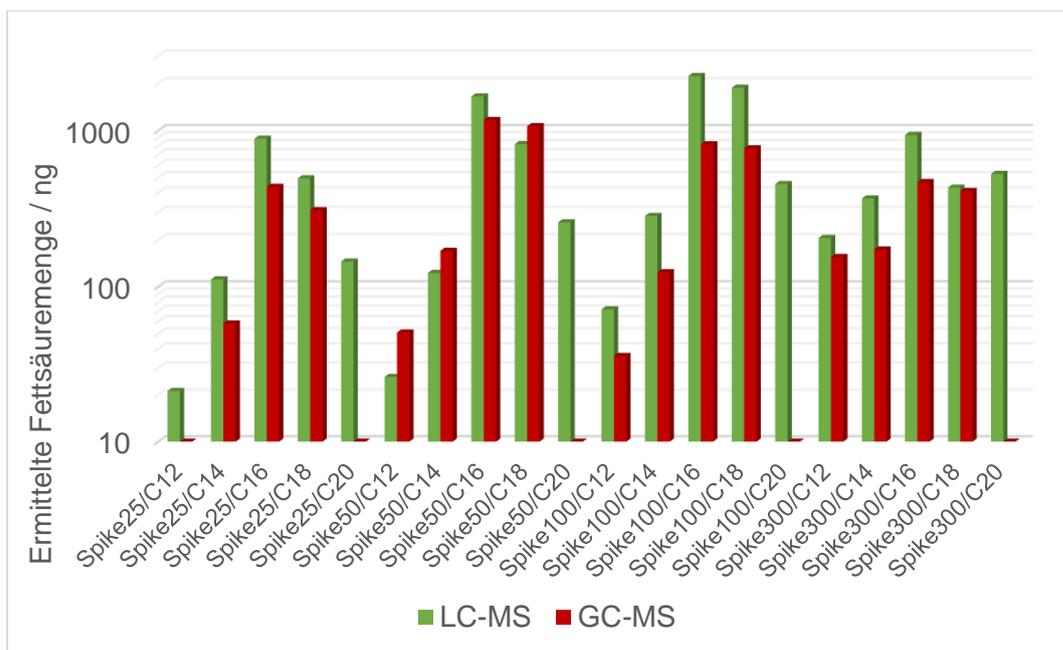
### 5.1.7 Vergleich mit GC-MS

Da in der bisherigen Literatur lediglich GC-MS Methoden zur Bestimmung von Fettsäuren in Speläothemen beschrieben sind, wurde die entwickelte HPLC-MS Methode mit einer GC-MS Methode, wie in Kapitel 4.11 erläutert, verglichen. Dies wurde über eine Quantifizierung von  $\text{CaCO}_3$  *Spikes* unterschiedlicher Konzentration bewerkstelligt. Sie sollten als Imitate der Stalagmitproben dienen. Die folgende Abbildung 48 zeigt eine Auftragung der mittels LC-MS und GC-MS erhaltenen Ergebnisse gegeneinander, um

deren Korrelation darzustellen. Ein direkter Vergleich dieser Ergebnisse ist als Säulendiagramm in Abbildung 49 veranschaulicht.



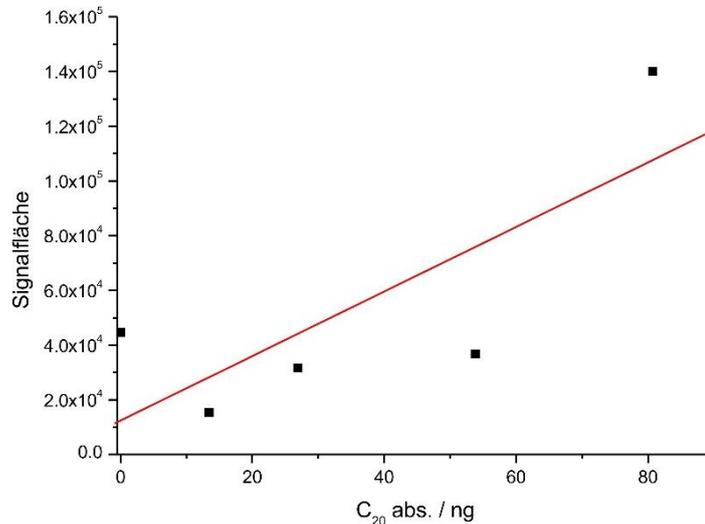
**Abbildung 48:** Streudiagramm der LC-MS und GC-MS Ergebnisse ( $R=0,83$ ;  $p<0,0001$ ).



**Abbildung 49:** Vergleich der mittels HPLC-MS und GC-MS ermittelten Fettsäuremengen in ng aus den  $\text{CaCO}_3$  Spikes.

Dabei ergibt die Analyse der Spikes bei beiden Methoden ähnliche Trends. Sie weisen eine signifikante positive Korrelation mit  $R=0,83$  ( $p<0,0001$ ) auf. Bei Betrachtung der Abbildung 49 wird jedoch ersichtlich, dass die GC-MS Methode überwiegend niedrigere Ergebnisse liefert als die LC-MS Methode. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die GC-MS zu keinen Resultaten für die längste Fettsäure  $\text{C}_{20}$  führt. Ein Grund

hierfür ist, dass die über Standardaddition erhaltenen Kalibriergeraden keine zuverlässige Quantifizierung erlauben. Abbildung 50 illustriert beispielhaft eine solche Kalibriergerade, welche nicht auswertbar ist.



**Abbildung 50:** Beispielhafte Kalibriergerade von C<sub>20</sub>; Messung mittels GC-MS und Quantifizierung mittels Standardaddition.

Die gleichen Proben wurden zuerst mittels HPLC-MS bestimmt und erst anschließend derivatisiert und mittels GC-MS gemessen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Derivatisierung hierbei die Fehlerquelle darstellt, obwohl das gleiche Derivatisierungsmittel verwendet wurde, wie bereits in der Literatur beschrieben [Blyth *et al.*, 2006]. Generell können Derivatisierungen zu Analytverlusten oder Kontaminationen durch die Derivatisierungsreagenzien führen. Sie stellen einen zusätzlichen, zeitintensiven Probenvorbereitungsschritt dar. Nichtsdestotrotz ist sie für eine GC-MS Analyse zwingend notwendig, um die Fettsäuren der GC zugänglich zu machen. Somit besitzt die entwickelte HPLC-MS Methode einen großen Vorteil gegenüber den geläufigen GC-MS Methoden, da für ihre Durchführung keine vorherige Derivatisierung der Analyten notwendig ist. Aufgrund dessen wurden alle weiteren Analysen der Realproben ausschließlich mit der HPLC-MS Methode durchgeführt.

## 5.2 Proof-of-Principle der Fettsäuremethode

Die erfolgreiche Anwendung einer neu entwickelten Methode auf erste Realproben und damit der Beweis, dass sie auf dieses Probenmaterial anwendbar ist, wird allgemein als *Proof-of-Principle* bezeichnet.

### 5.2.1 Tropfwasser Bunkerhöhle

Hierzu wurden zunächst Tropfwasserproben einer schnellen Tropfstelle T1 von Februar 2013 bis August 2013 aus der Bunkerhöhle analysiert. Die ermittelten Ergebnisse des *Proof-of-Principle* sind in der folgenden Abbildung 51 dargestellt.

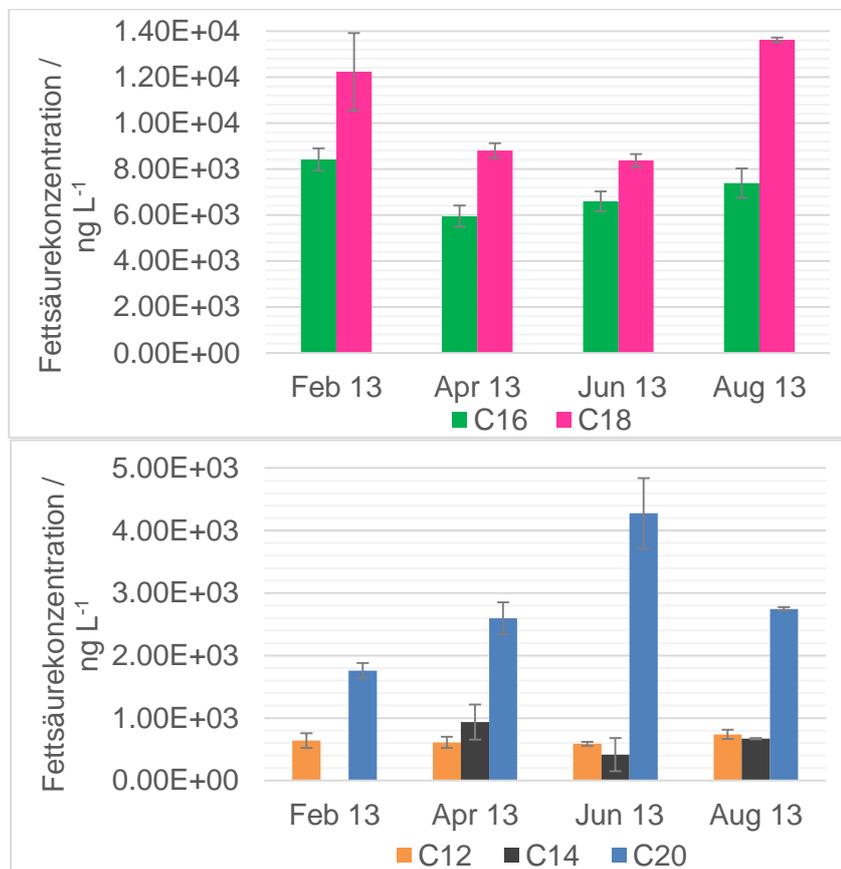


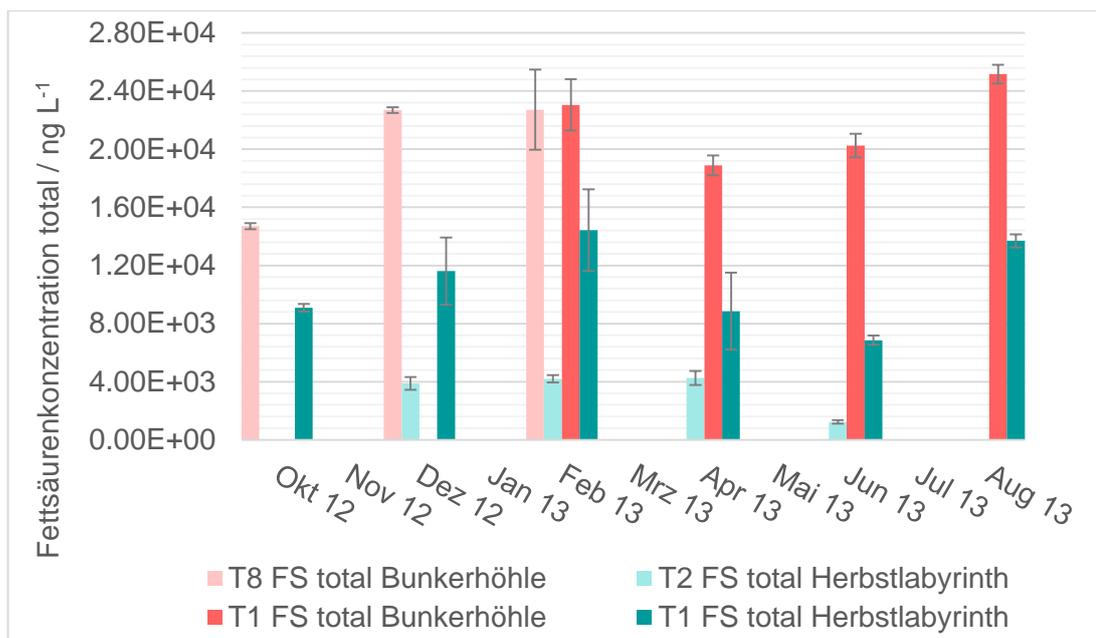
Abbildung 51: Ermittelte Fettsäurekonzentrationen in ng L<sup>-1</sup> in Tropfwasserprobe T1, Bunkerhöhle.

Alle fünf Analyten C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub> sind in den Proben nachzuweisen und es gibt eine deutliche Variation in ihren Konzentrationen. So tauchen C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub> in weitaus höheren Konzentration auf, als C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub> und C<sub>20</sub>. Diese Verteilung entspricht dem natürlichen Vorkommen der Fettsäuren und wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (z. B. [Xie *et al.*, 2005], [Blyth *et al.*, 2010]). Zusätzlich ist eine Variation der Proben von

unterschiedlichen Monaten zu erkennen. Dabei tritt jedoch kein einheitlicher Trend auf. Generell scheinen  $C_{18}$  und  $C_{20}$  einen gegensätzlichen Verlauf aufzuweisen. Allerdings ist der Datensatz zu gering, um signifikante Korrelationen zu erstellen.

### 5.2.2 Vergleich der Gesamtfettsäurekonzentration mit Tropfwasserproben des Herbstlabyrinth-Adventhöhle Systems

Darüber hinaus wurden ebenfalls Tropfwasserproben einer langsamen Tropfstelle (T8) aus der Bunkerhöhle und einer schnellen (T1) und langsamen (T2) Tropfstelle aus dem Herbstlabyrinth-Adventhöhle System analysiert. Wie in Kapitel 4.4.1 erläutert beschränken sich die untersuchten Proben auf einen Zeitraum von Oktober 2012 bis August 2013. Die erhaltenen Fettsäurekonzentrationen der einzelnen Analyten wurden aufsummiert, um somit den Gesamtgehalt der verschiedenen Tropfstellen und Standorte zu vergleichen.



**Abbildung 52:** Gesamtfettsäurekonzentration in  $\text{ng L}^{-1}$  in jeweils einer langsamen (T8, T2) und schnellen (T1) Tropfstelle aus der Bunkerhöhle und dem Herbstlabyrinth-Adventhöhle System.

Abbildung 52 verdeutlicht, dass die Proben der Bunkerhöhle in beiden Tropfstellen (T1 und T8) in einem ähnlichen Konzentrationsbereich liegen. Aufgrund der wenigen Proben, welche aus der Bunkerhöhle vorhanden waren, kann kein saisonaler Trend der unterschiedlichen Tropfstellen festgestellt werden. Im Gegensatz zu der Bunkerhöhle weisen die Herbstlabyrinth-Proben Unterschiede zwischen den Tropfstellen auf. So sind die Konzentrationen der schnellen Tropfstelle T1 generell höher als die

der langsamen Tropfstelle T2. Auf saisonale Unterschiede wird im folgenden Kapitel 5.3 ausführlich eingegangen.

Des Weiteren sind die Gesamtfettsäurekonzentrationen der Herbstlabyrinth-Adventhöhle in beiden Tropfstellen weitaus niedriger als in der Bunkerhöhle. Gründe hierfür können sein, dass eine höhere Vegetationsdichte oberhalb der Bunkerhöhle vorhanden ist. Überdies ist trotz ähnlicher Bodentypen die Mächtigkeit des Bodens ausgeprägter und der Boden ist entwickelter, als bei der Herbstlabyrinth-Adventhöhle. Somit taucht zusätzlich zu der internen Variation der verschiedenen Fettsäuren und Tropfstellen noch eine Variation verschiedener Standorte auf.

### 5.2.3 Zusammenfassung Methodenentwicklung und *Proof-of-Principle*

Bei der Methodenentwicklung wurde durch Verwendung eines Gradientenprogramms und eines Säulenofens eine Trennung der fünf Fettsäuren C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub> mittels HPLC-MS ohne vorherige Derivatisierung ermöglicht. Ein generelles Problem bei der Analyse von Fettsäuren sind mögliche Kontaminierungen. Es konnte gezeigt werden, dass durch Ausheizen aller verwendeten Glasgefäße bei 450 °C und der dreifachen Destillation von DCM eine drastische Reduzierung der Blindwerte erzielt werden kann. Zur Optimierung der Extraktionsmethode wurden Wasser *Spikes* hergestellt mit deren Hilfe verschiedene Parameter, wie Abdampftemperatur und Lösungsmittelzusammensetzungen untersucht werden konnten. Prinzipiell hat sich die SPE im Gegensatz zu der LLE bewährt, da Letzteres mögliche Störkomponenten der Matrix unzureichend entfernt hat. In Folge der Optimierung von Konditionierung, Waschschritten, Trocknungsschritten und Elution konnten die Analyten mittels SPE selektiver extrahiert werden. Die Reproduzierbarkeit der SPE wies aufgrund der Zugabe von 30 % ACN als organischen Modifier und 0,4M HCl zur pH-Wert Senkung Abweichungen unter 7 % auf. Außerdem zeigte ein Vergleich von externer Kalibrierung und Standardaddition, dass die Matrix bei der Quantifizierung berücksichtigt werden muss und somit die Standardaddition bessere Ergebnisse liefert.

Als *Proof-of-Principle* wurden verschiedene Tropfwasserproben (60-100 mL) zweier unterschiedlicher Höhlensysteme, Bunkerhöhle und Herbstlabyrinth-Adventhöhle, mit der neuen Methode analysiert. Dabei konnten alle Analyten nachgewiesen werden und die ermittelten Konzentrationen spiegelten die natürliche Verteilung der Fettsäuren, wie in der Literatur beschrieben, wider. Darüber hinaus konnten teilweise Variationen zwischen unterschiedlichen Tropfstellen festgestellt werden. Um einen saisonalen Verlauf festzustellen, waren nicht genügend Proben der Bunkerhöhle

vorhanden. Die Gesamtfettsäurekonzentration verdeutlichte zusätzlich, dass die gefundenen Mengen sich zwischen den beiden Standorten unterscheiden.

Damit wurde gezeigt, dass die neu entwickelte Methode eine quantitative Analyse der gesuchten Fettsäuren in diesem Probenmaterial ermöglicht [Bosle *et al.*, 2014]. Dabei wurde die benötigte Probenmenge im Vergleich zu früheren Studien [Li *et al.*, 2011] von etwa 4 L auf 60-100 mL drastisch reduziert. Zudem konnte durch Verwendung der SPE ebenfalls der Verbrauch organischer Lösungsmittel gegenüber bisherigen Extraktionsmethoden, Soxhlet und LLE, ausschlaggebend reduziert werden. Des Weiteren war im Vergleich zu den vorherrschenden GC-MS Methoden keine zeitintensive Derivatisierung der Analyten, welche als zusätzlicher Arbeitsschritt zu Kontaminationen führen kann, notwendig.

### 5.3 Tropfwasserverlauf Herbstlabyrinth-Adventhöhle

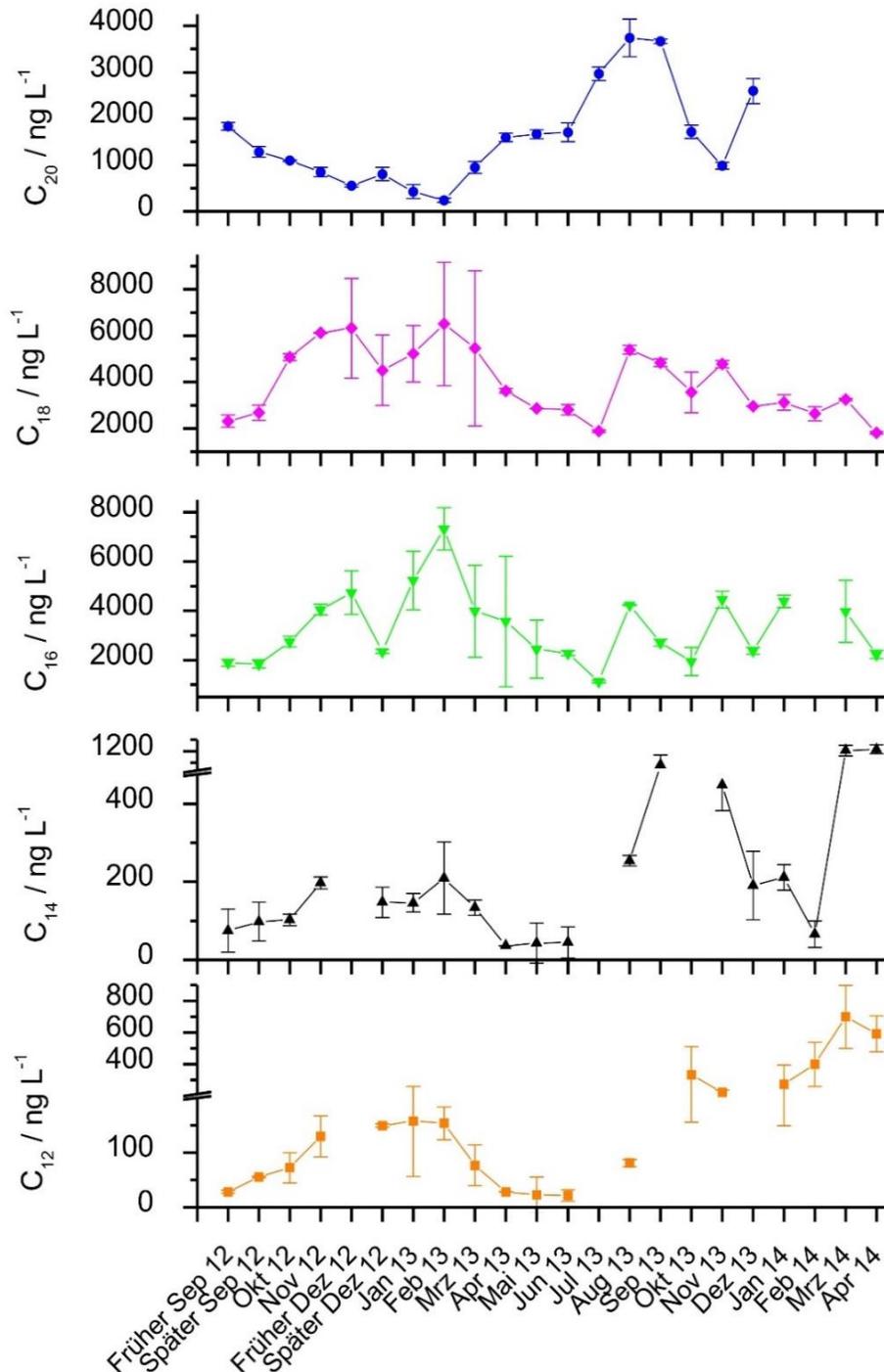
Im Rahmen dieser Arbeit wurden Tropfwasserproben des Herbstlabyrinth-Adventhöhlen Systems von September 2012 bis April 2014 untersucht. Hierbei wurden die Proben von sowohl schnellen als auch langsamen Tropfstellen gesammelt, wie in Kapitel 4.4.2 beschrieben. Allerdings waren nicht für alle Tropfstellen jeden Monat Proben vorhanden, sodass eine durchgehende Probennahme lediglich für T1 erfolgte. Die genauen Probennahmepläne der einzelnen Tropfstellen sind dem Kapitel 7.1.1 zu entnehmen.

#### 5.3.1 Vergleich schnelle und langsame Tropfstellen

Die ermittelten Fettsäurekonzentrationen der schnellen Tropfstellen T1 und T5 sind in den folgenden Abbildung 53 und Abbildung 54 als Tropfwasserverlauf dargestellt. Einige Analyten weisen hierbei Lücken im Verlauf auf, die auf Analytkonzentrationen unterhalb der LOD hindeuten. Die blau schattierten Flächen machen die Monate sichtbar, in welchen keine Proben der entsprechenden Tropfstelle analysiert wurden.

Abbildung 53 macht deutlich, dass die Fettsäurekonzentrationen der T1 keinen eindeutigen saisonalen Trend aufweisen. Im ersten Jahr bis August 2013 sind diese noch zu erkennen.  $C_{12}$ - $C_{18}$  zeigen niedrigere Konzentrationen im Sommer als im Winter mit einem Maximum im Februar 2013 und einem Abfall im darauffolgenden Frühjahr.  $C_{20}$  hingegen weist einen gegensätzlichen Verlauf auf, mit höheren Konzentrationen im Sommer und einem Minimum im Februar 2013. Dieser saisonale Verlauf setzt sich jedoch ab August 2013 nicht fort. In diesem Monat und dem darauffolgenden Herbst kommt es zu einem erneuten Anstieg aller Analyten, wobei dies bei  $C_{12}$  im August 2013 am wenigsten ausgeprägt ist. Ab diesem Zeitpunkt ist kein eindeutiger Trend mehr festzustellen.

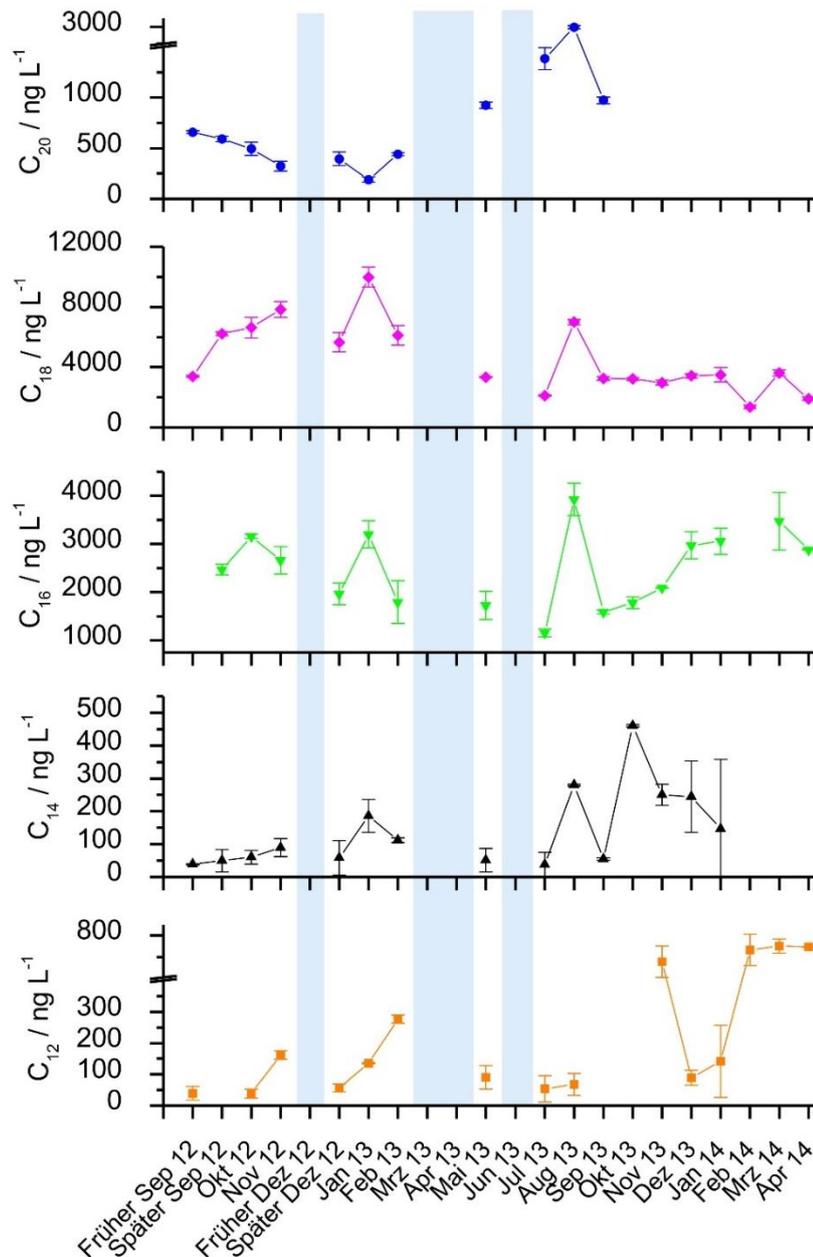
$C_{12}$  weist ab September 2013 generell höhere Konzentrationen auf, als im vorherigen Jahr. Allerdings taucht kein Maximum im Winter und nachfolgender Abfall im Frühjahr auf.  $C_{14}$  zeigt sogar ein Minimum im Februar 2014, sodass wiederkehrende maximale Konzentrationen im Winter nicht bestätigt werden können. Bei  $C_{16}$  und  $C_{18}$  scheinen die Konzentrationen kontinuierlich im selben Bereich zu bleiben. Wenn im ersten Winter 2012/2013 die Fehlerbalken dieser beiden Analyten berücksichtigt werden, dann bewegen sie sich über den gesamten Zeitraum in einem ähnlichen Konzentrationsbereich und es gibt keinen ausgeprägten saisonalen Unterschied.  $C_{20}$  zeigt im Herbst 2013 zunächst einen Konzentrationsabfall wie bereits im vorherigen Jahr, jedoch steigt die Konzentration im Dezember 2013 erneut an. Ab Januar 2014 ist diese Fettsäure nicht mehr zu detektieren.



**Abbildung 53:** Tropfwassererlauf der Fettsäuren  $C_{12}$ - $C_{20}$  von September 2012 bis April 2014 der Tropfstelle T1 in  $\text{ng L}^{-1}$ ; zu beachten sind die Achsenunterbrechungen bei  $C_{12}$  und  $C_{14}$ .

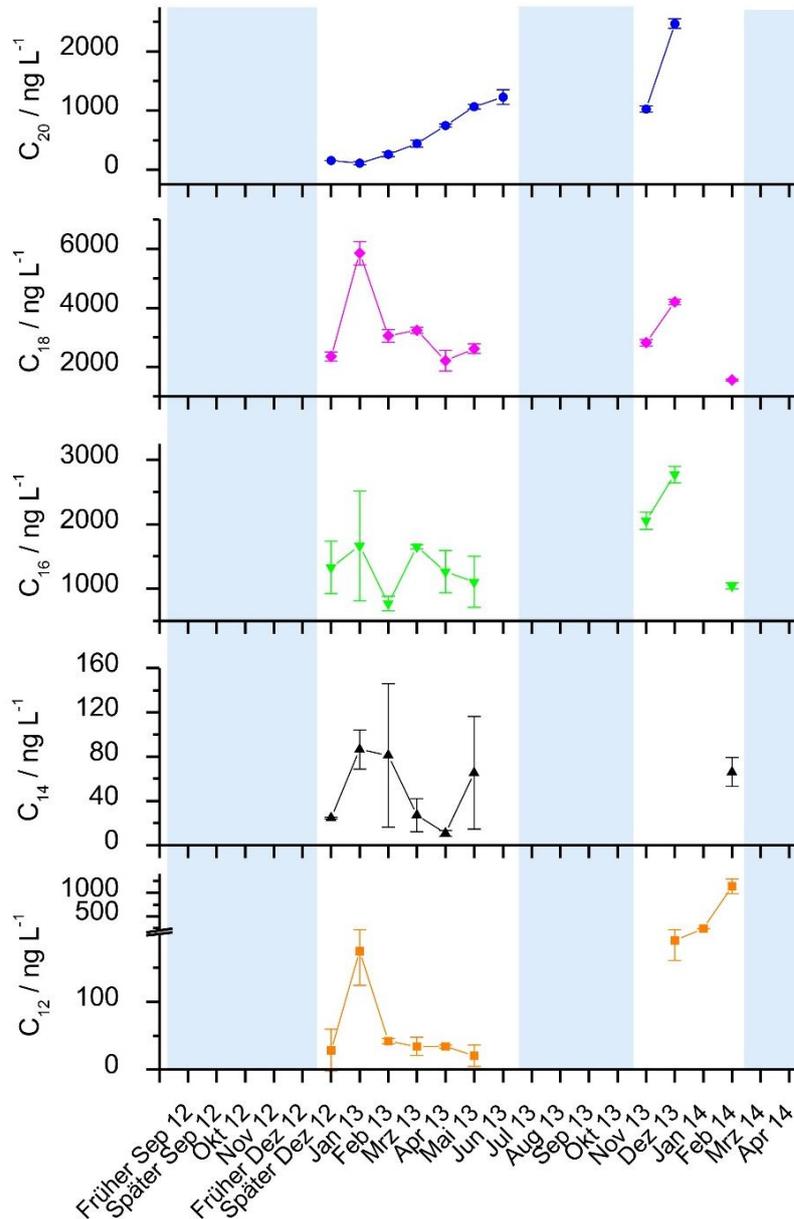
Werden die Ergebnisse der T1 mit T5 (Abbildung 54) verglichen, so fällt auf, dass die Analytkonzentrationen in beiden Tropfstellen in einem ähnlichen Konzentrationsbereich zwischen etwa 30 und  $8.000 \text{ ng L}^{-1}$  für die unterschiedlichen Fettsäuren liegen. Des Weiteren weist T5 im ersten Jahr bis August 2013 einen zu T1 vergleichbaren Trend auf.  $C_{12}$ - $C_{18}$  zeigen einen Konzentrationsanstieg im Winter 2013, während sich  $C_{20}$  gegensätzlich verhält. Anschließend kommt es im August 2013 erneut zu er-

höhten Analytkonzentrationen. Bei  $C_{12}$  ist dies nicht zu beobachten, allerdings ist ein ausgeprägter Anstieg im November 2013 zu erkennen, welcher auch in T1 vorzufinden ist. Wie bei dieser Tropfstelle ist bei T5 ebenso ab September 2013 kein saisonaler Verlauf mehr festzustellen. Ein regelmäßiger Konzentrationsanstieg in den Wintermonaten ist hier aufgrund der Ergebnisse von November 2013 bis Februar 2014 ebenso auszuschließen.  $C_{20}$  ist in dieser Tropfstelle bereits ab Oktober 2013 nicht mehr nachzuweisen.



**Abbildung 54:** Tropfwasserverlauf der Fettsäuren  $C_{12}$ - $C_{20}$  von September 2012 bis April 2014 der Tropfstelle T5 in  $\text{ng L}^{-1}$ ; zu beachten sind die Achsenunterbrechungen bei  $C_{12}$  und  $C_{20}$ . Blau schattierte Fläche: keine Probe vorhanden.

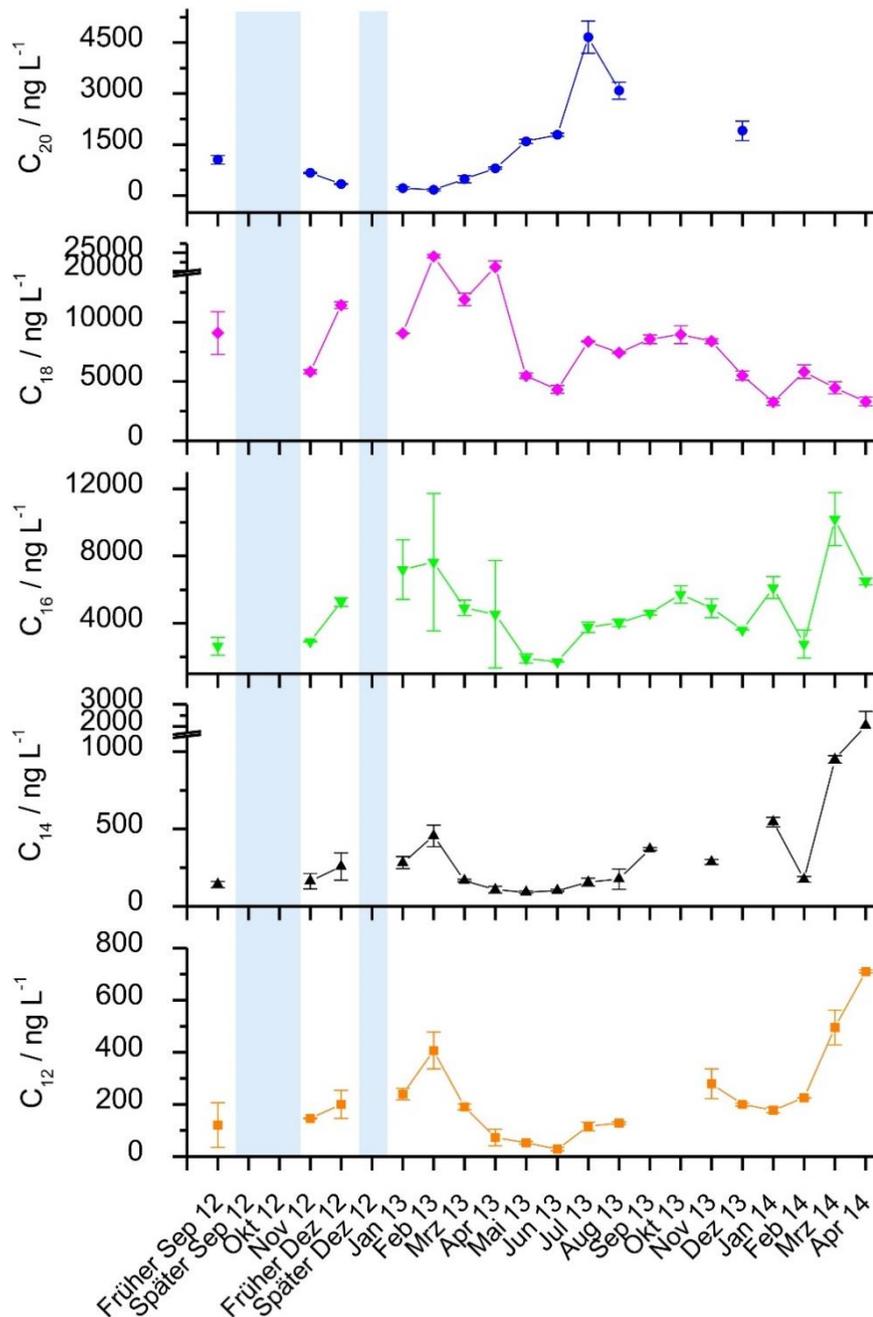
Der Verlauf der langsamen Tropfstelle T2 (Abbildung 55) weist viele Lücken auf, da die Tropfrate in diesen Monaten zu gering war und keine Probennahme stattgefunden hat. Daher können an dieser Stelle keine klaren Aussagen bezüglich saisonaler Trends getroffen werden.



**Abbildung 55:** Tropfwasserverlauf der Fettsäuren C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub> von September 2012 bis April 2014 der Tropfstelle T2 in ng L<sup>-1</sup>; zu beachten ist die Achsenunterbrechung bei C<sub>12</sub>. Blau schattierte Fläche: keine Probe vorhanden.

Lediglich bei C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub> und C<sub>18</sub> taucht ein Konzentrationsanstieg im Winter 2013 auf, während sich C<sub>16</sub> kontinuierlich im gleichen Bereich bewegt. Nichtsdestotrotz macht die Abbildung deutlich, dass C<sub>20</sub> von Dezember 2012 bis Mai 2013 erneut einen gegensätzlichen Verlauf zu den kürzerkettigen Fettsäuren aufweist. Im Vergleich zu

den schnellen Tropfstellen T1 und T5, liegen die Analytkonzentrationen bei T2 in einem niedrigeren Bereich. Daraus lässt sich vermuten, dass durch die längere Verweildauer der Probe in der Höhle die Fettsäuren durch erneutes Ausfallen des Calcits an dem Probengefäß teilweise gebunden werden und nicht mehr in der wässrigen Probe vorliegen.



**Abbildung 56:** Tropfwasseranalyse der Fettsäuren C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub> von September 2012 bis April 2014 des PWs in ng L<sup>-1</sup>; zu beachten sind die Achsenunterbrechungen bei C<sub>14</sub> und C<sub>18</sub>. Blau schattierte Fläche: keine Probe vorhanden.

Wird im Vergleich dazu der Verlauf der Poolwasserproben (Abbildung 56) betrachtet, so fällt auf, dass die Fettsäurekonzentrationen bei dieser langsamen Tropfstelle in einem teilweise weitaus höheren Konzentrationsbereich liegen, als bei den schnellen Tropfstellen T1 und T5. So weist z. B. C<sub>18</sub> Konzentrationen bis zu 24.000 ng L<sup>-1</sup> auf. In diesem Fall kommt es nicht zu Prozessen, welche die Analytkonzentration senken. Durch die lange Verweildauer des PWs in der Höhle kann es stattdessen zu einer Anreicherung der Fettsäuren kommen. Obwohl das PW einen gewissen Zu- und Abfluss besitzt, ist dieser nicht kontinuierlich und eine homogene Mischung nicht zwangsläufig gegeben. Zusätzlich können die Fettsäuren an Schwebepartikeln, die im PW vermehrt vorkommen, auf unbestimmte Zeit zurückgehalten und wieder freigesetzt werden. Daher ist ein solcher Anreicherungsprozess nicht auszuschließen.

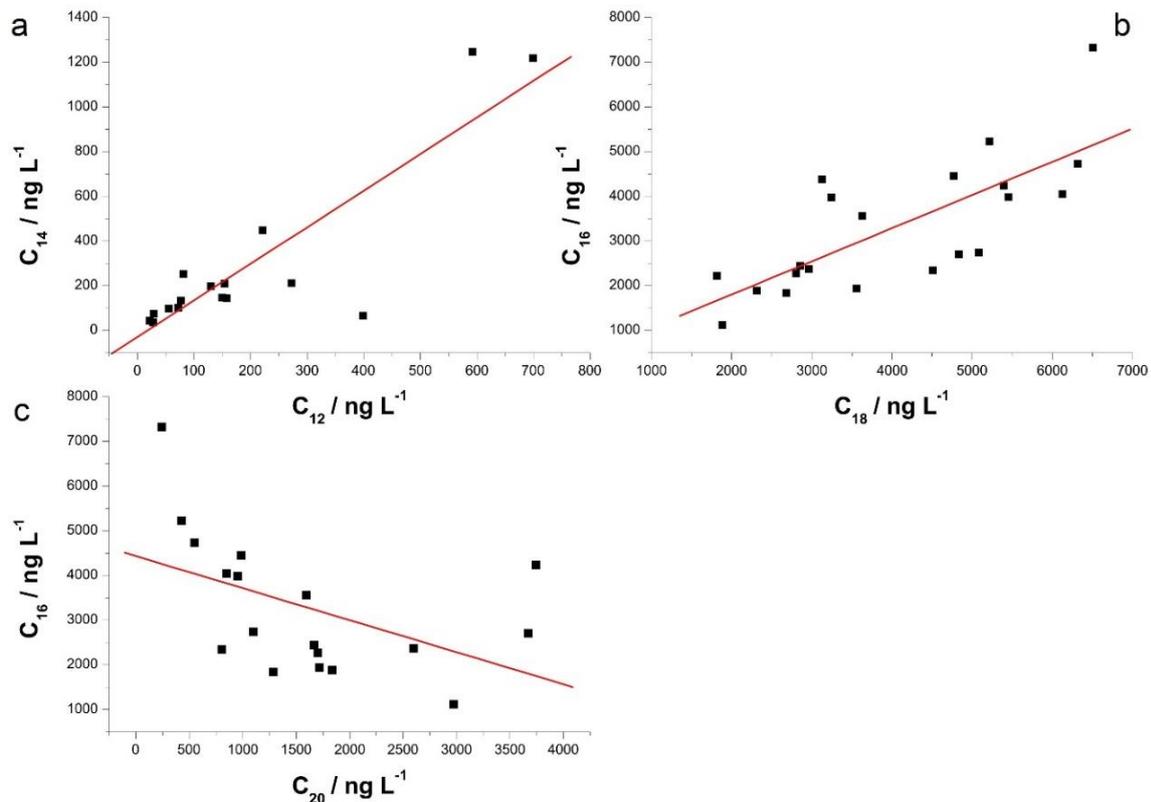
Der saisonale Verlauf des PWs stimmt erneut bis August 2013 mit den anderen Tropfstellen überein. Jedoch ist auch bei dieser Tropfstelle kein wiederkehrendes Maximum im Winter 2013 festzustellen, sodass kein einheitlicher Trend über die verschiedenen Jahreszeiten der letzten 1,5 Jahre bestimmt werden kann.

### 5.3.2 Korrelation der Fettsäuren

Da ein durchgehender Verlauf nur von T1 ermittelt wurde, werden lediglich die Fettsäureverläufe dieser Tropfstelle für Korrelationen herangezogen. Bei der Betrachtung der ermittelten Verläufe (Abbildung 53) wird deutlich, dass C<sub>12</sub> und C<sub>14</sub> über den gesamten Zeitraum die beste Übereinstimmung aufweisen. Das Streudiagramm in Abbildung 57a unterstützt diese Aussage. Hierbei ergibt sich eine positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,88 ( $p < 0,0001$ ). Zudem zeigen C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub> ebenfalls Ähnlichkeiten im Verlauf zu C<sub>12</sub> und C<sub>14</sub>, allerdings ohne signifikante Korrelationskoeffizienten. C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub> untereinander weisen eine positive Korrelation ( $R = 0,75$ ;  $p < 0,0001$ ) auf und Abbildung 57b veranschaulicht ihre Übereinstimmung. Diese analogen Verläufe verdeutlichen, dass die vier LMW Fettsäuren von derselben Quelle stammen. Dennoch werden bekanntermaßen C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub> vermehrt produziert, sodass deren Konzentrationen generell höher sind und über den gesamten Zeitraum in einem ähnlichen Bereich schwanken. Daher sind diese beiden Analyten an dieser Stelle weniger gut geeignet saisonale Trends widerzuspiegeln, als die kürzerkettigen Fettsäuren C<sub>12</sub> und C<sub>14</sub>.

Wie bereits in Kapitel 5.3.1 erwähnt, nimmt C<sub>20</sub> im Vergleich zu den kürzeren Fettsäuren eine Sonderrolle ein. Vor allem im ersten Jahr der Probennahme zeigt die längste Säure einen gegensätzlichen Verlauf zu C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>. Jedoch liegt über den gesamten Verlauf lediglich mit C<sub>16</sub> eine signifikante negative Korrelation mit einem Korrelati-

onskoeffizienten von  $-0,49$  ( $p=0,04$ ) vor. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 57c ebenfalls als Streudiagramm veranschaulicht.



**Abbildung 57:** Streudiagramme von a:  $C_{12}$  und  $C_{14}$ , b:  $C_{18}$  und  $C_{16}$  sowie c:  $C_{20}$  und  $C_{16}$  in  $\text{ng L}^{-1}$  der Tropfstelle T1.

Dieses gegensätzliche Verhalten lässt darauf schließen, dass  $C_{20}$  eine andere Quelle besitzt als die kürzerkettigen Fettsäuren. Dies können sowohl andere mikrobiologische Quellen als auch die Vegetation selbst sein. Obwohl  $C_{20}$  von früheren Studien bei den LMW Fettsäuren eingeordnet wurde und somit von Mikroorganismen produziert wird, werden Verbindungen ab  $C_{21}$  bereits als HMW Komponenten bezeichnet [Blyth *et al.*, 2008]. Diese HMW Fettsäuren stammen jedoch direkt von der Vegetation und aufgrund dessen können höhere Gefäßpflanzen nicht als potentielle Quelle für  $C_{20}$  ausgeschlossen werden.

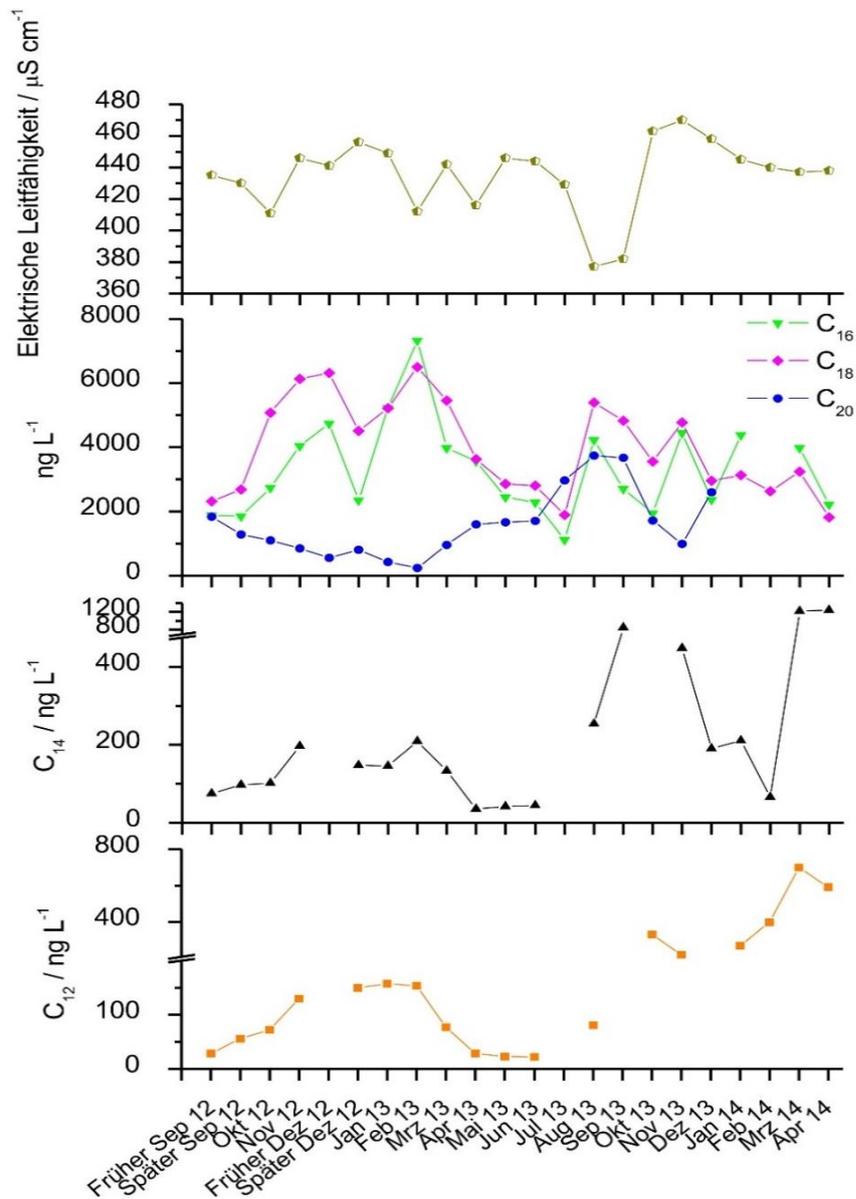
Des Weiteren besteht die Annahme, dass sich  $C_{20}$ , aufgrund der geringeren Hydrophilie im Vergleich zu  $C_{12}$ - $C_{18}$ , bei zu schnellem Durchfluss des Wassers weniger gut lösen kann und somit weniger effektiv zur Höhle transportiert wird. Daraus resultieren niedrigere Konzentrationen in den Wintermonaten, aufgrund höherer Niederschlagsraten, im Gegensatz zu den kürzerkettigen Fettsäuren. Der Vergleich der Fettsäurekonzentrationen mit den Daten des Höhlenmonitorings soll im folgenden Kapitel weitere Aufschlüsse über den Transport der LMW Fettsäuren geben.

### 5.3.3 Vergleich mit Daten des Höhlenmonitorings

Wie bereits in Kapitel 5.3.2, werden lediglich die Fettsäureverläufe der Tropfstelle T1 für den Vergleich mit den Daten des Höhlenmonitorings verwendet. Diese wurden von einem Kooperationspartner ermittelt.

#### *Leitfähigkeit und Ionenkonzentration*

Zunächst werden die ermittelten Fettsäureverläufe mit der elektrischen Leitfähigkeit des Tropfwassers verglichen, was in der folgenden Abbildung 58 dargestellt ist.



**Abbildung 58:** Elektrische Leitfähigkeit in  $\mu\text{S cm}^{-1}$  im Vergleich zu den Fettsäureverläufen C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub> der Tropfstelle T1.

Bei der Betrachtung der Graphik wird deutlich, dass sich die elektrische Leitfähigkeit über den gesamten Zeitraum in einem ähnlichen Bereich bewegt, während die LMW Fettsäuren stärkere Variationen erkennen lassen und somit keine signifikanten Korrelationen ermittelt werden können. Dennoch verhalten sich die kürzerkettigen Fettsäuren in einigen Monaten gegensätzlich zu der elektrischen Leitfähigkeit. So zeigt diese vom frühen Dezember 2012 bis März 2013 einen umgekehrten Verlauf, als  $C_{16}$  und  $C_{18}$ . Einen ähnlichen Trend weisen auch  $C_{12}$  und  $C_{14}$  auf, allerdings weniger stark ausgeprägt. Im August 2013 taucht ein starker Abfall der Leitfähigkeit auf. In diesem Monat kommt es gleichzeitig zu einem starken Konzentrationsanstieg von  $C_{12}$ - $C_{18}$ .

Da die elektrische Leitfähigkeit von der Konzentration der gelösten Ionen abhängt, sind in Abbildung 59 beispielhaft  $Na^+$ ,  $SO_4^{2-}$  und  $Cl^-$  im Vergleich zu den Fettsäureverläufen aufgetragen. Hierbei wurden ebenso Konzentrationen von  $K^+$  und  $NO_3^-$  bestimmt. Da sich deren Verläufe jedoch unwesentlich von  $Na^+$ ,  $SO_4^{2-}$  und  $Cl^-$  unterscheiden, sind diese nicht graphisch veranschaulicht. Wie bereits bei der elektrischen Leitfähigkeit beobachtet, sinkt im August 2013 die Konzentration des  $Cl^-$  ab, während die Fettsäuren  $C_{12}$ - $C_{18}$  erhöhte Konzentrationen aufweisen. Des Weiteren zeigen sowohl  $Na^+$ ,  $SO_4^{2-}$  als auch  $Cl^-$  einen ausgeprägten Anstieg im späten Dezember 2012, welcher auch bei den anderen Ionen auftaucht. Dieser ist vermutlich auf die Verwendung von Streusalzen in der näheren Umgebung der Höhle zurückzuführen, was sich im Tropfwasser widerspiegelt. Im gleichen Zeitraum kommt es zu einem Abfall der Fettsäurekonzentration bei  $C_{14}$ - $C_{18}$ . Somit tritt auch in diesem Fall ein gegensätzliches Verhalten der Fettsäuren- und der Ionenkonzentration auf.

Durch den Vergleich mit der elektrischen Leitfähigkeit und der Ionenkonzentration wird deutlich, dass ein Zusammenhang zu dem Transport der LMW Fettsäuren mit dem Tropfwasser besteht. Daraus ergibt sich die Annahme, dass die Fettsäuren bei höheren Ionenkonzentrationen des Wassers weniger gut gelöst werden und somit geringere Konzentrationen zur Höhle gelangen.

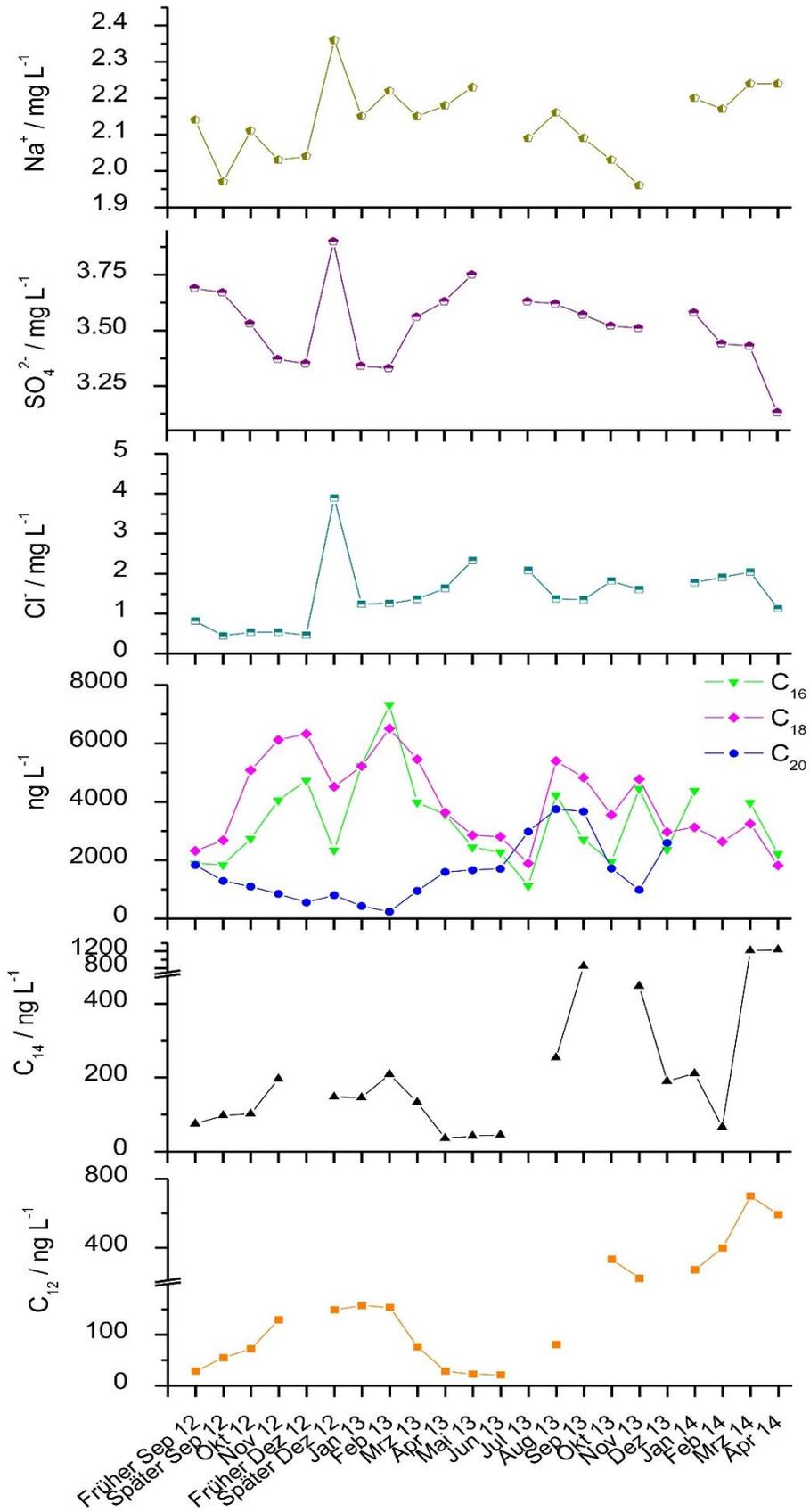
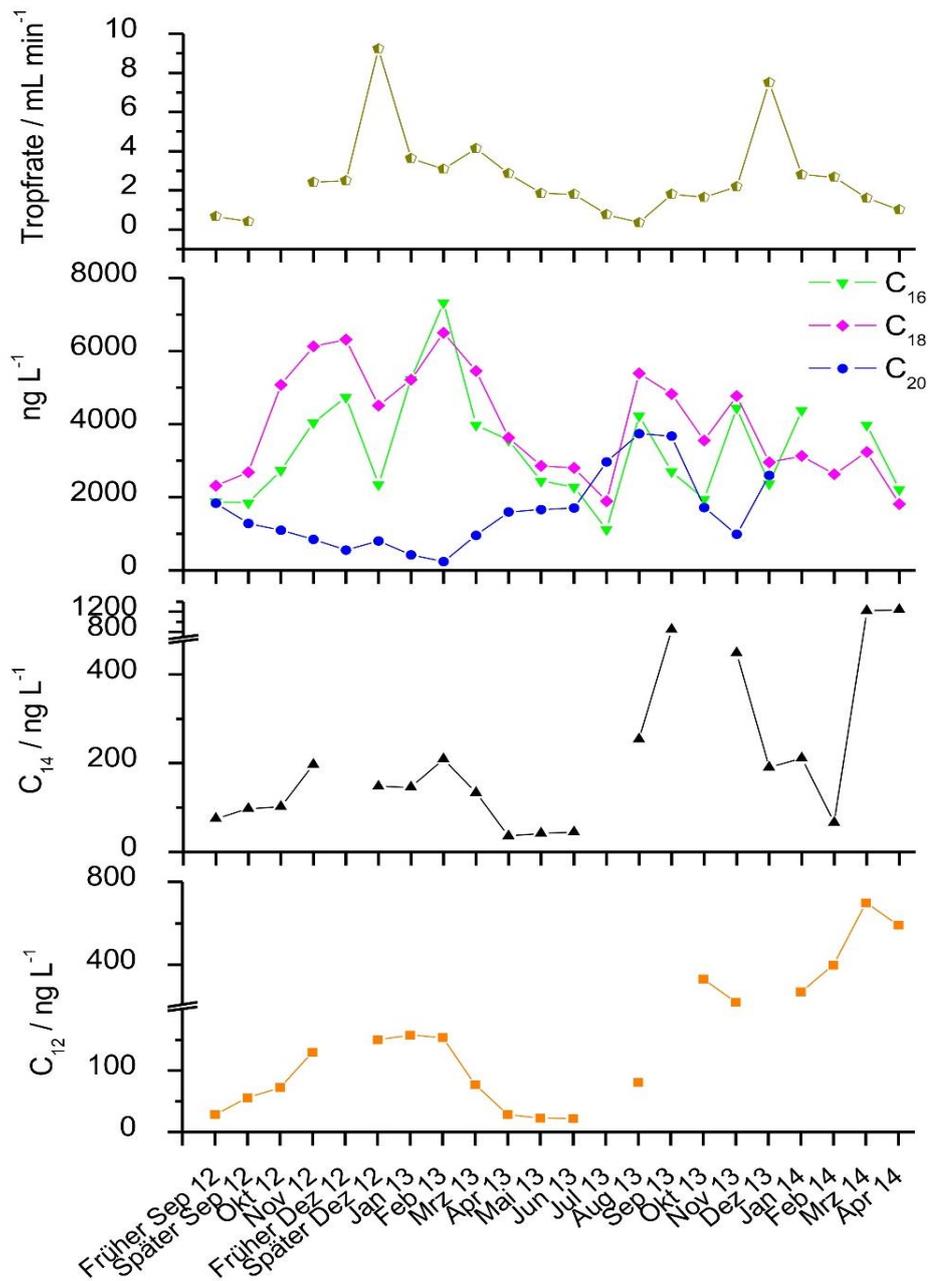


Abbildung 59: Na<sup>+</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> und Cl<sup>-</sup> in mg L<sup>-1</sup> im Vergleich zu den Fettsäureverläufen C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub> der Tropfstelle T1.

Tropfrate

Darüber hinaus werden die Tropfwasserläufe der Fettsäuren mit der gemessenen Tropfrate der Tropfstelle T1 verglichen. Dies ist graphisch in der folgenden Abbildung 60 veranschaulicht. Dadurch wurde untersucht, ob die LMW Fettsäuren bei größeren Niederschlagsmengen und somit einem größeren Volumen an Tropfwasser pro Monat besser gelöst werden und folglich in höheren Konzentrationen auftreten.



**Abbildung 60:** Tropfrate in mL min<sup>-1</sup> im Vergleich zu den Fettsäureverläufen C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub> der Tropfstelle T1.

In den Wintermonaten wird generell eine höhere Tropfrate ermittelt als im Sommer. Dabei ist diese zweimal, im späten Dezember 2012 und im Dezember 2013, besonders stark angestiegen. Zudem wird die niedrigste Tropfrate im August 2013 detektiert. Die kürzerkettigen Fettsäuren zeigen im ersten Jahr generell ein ähnliches Verhalten mit höheren Konzentrationen im Winter als im Sommer. Jedoch tauchen bei den extremeren Tropfraten vielmehr umgekehrte Trends in den Fettsäureverläufen auf. So weisen  $C_{14}$ - $C_{18}$  einen Abfall der Konzentration im späten Dezember 2012 und im Dezember 2013 auf, während im August 2013 bei  $C_{12}$ - $C_{18}$  ein Konzentrationsanstieg erfolgte.

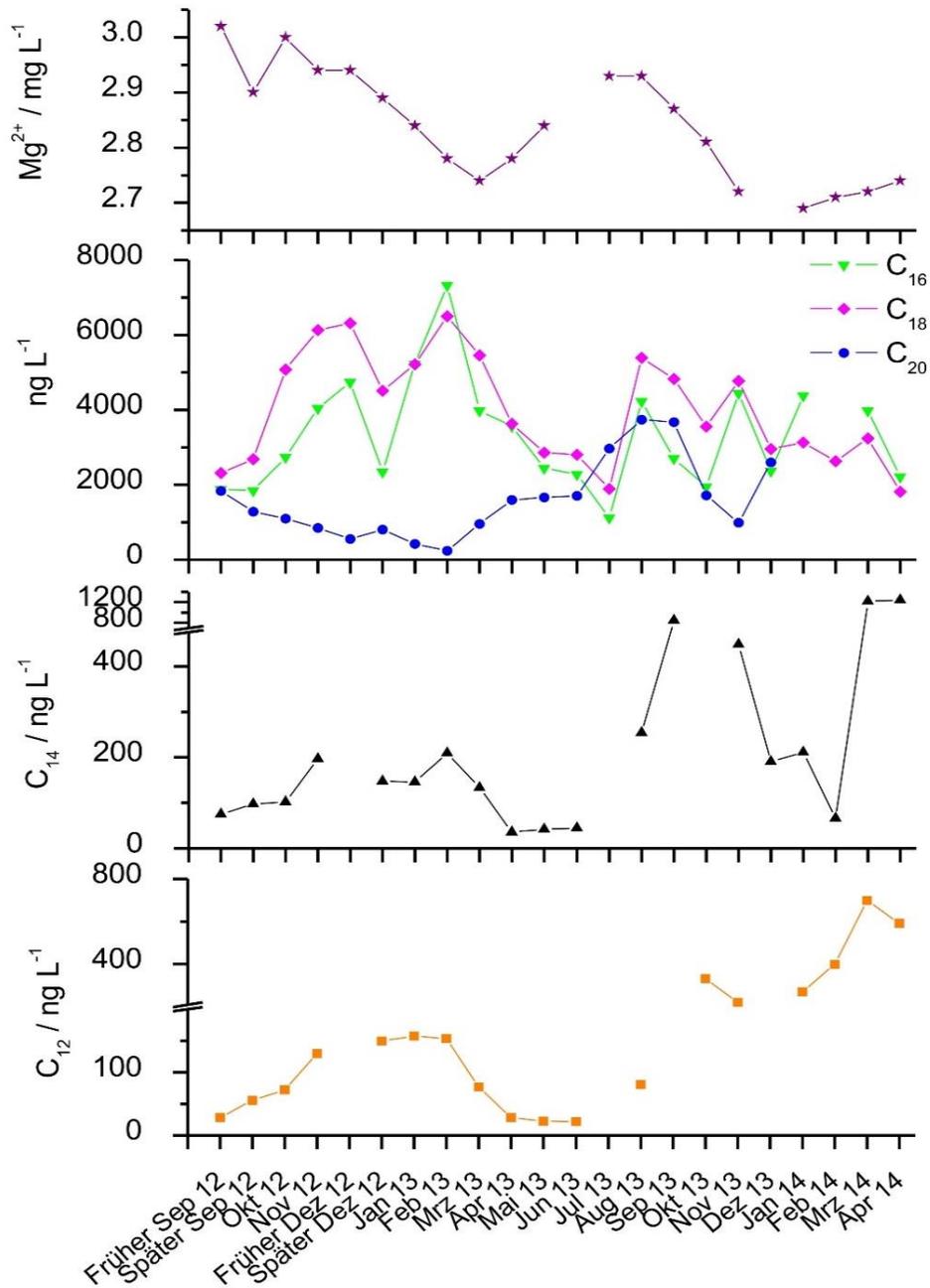
Überdies zeigt  $C_{20}$  im Gegensatz zu den kürzerkettigen Fettsäuren über die gesamte Zeit einen gegensätzlichen Verlauf zu der Tropfrate mit niedrigeren Konzentrationen im Winter als in den Sommermonaten. Dadurch wird ersichtlich, dass wie bereits in Kapitel 5.3.2 erwähnt diese Fettsäure bei höheren Niederschlagsmengen und folglich höheren Durchflussraten durch den Boden weniger gut gelöst und zur Höhle transportiert werden kann. Bei  $C_{12}$ - $C_{18}$  hingegen kann die erhöhte Niederschlagsmenge aufgrund ihrer höheren Hydrophilie zunächst zu einer verbesserten Löslichkeit in den Wintermonaten führen. Allerdings zeigen extrem hohe oder niedrige Tropfraten, dass es in diesen Fällen vielmehr zu einer Verdünnung oder entsprechend zu einer Aufkonzentrierung der LMW Fettsäuren im Tropfwasser kommt.

### *Magnesium*

Zusätzlich zu der Tropfrate ist ein Vergleich des Mg-Verlaufs mit den Fettsäuren in der folgenden Abbildung 61 dargestellt. Die Mg-Konzentration des Tropfwassers kann Informationen über die Infiltration des Niederschlages in den Boden liefern. Dabei deuten niedrigere Magnesiumkonzentrationen auf nassere Bedingungen oberhalb der Höhle ([Tooth & Fairchild, 2003], [Fairchild & Treble, 2009]) und somit einer kürzeren Verweildauer des Tropfwassers im Boden und im Aquifer hin.

Der Mg-Verlauf in Abbildung 61 zeigt zunächst sinkende Konzentrationen im Herbst 2012 und Winter 2012/2013 mit einem lokalen Minimum im März 2013. Im darauffolgenden Frühjahr steigen die Konzentrationen bis zu einem Maximalwert im August 2013 und einem erneuten Abfall im Herbst 2013. Ein ähnlicher Trend ist bei  $C_{20}$  zu beobachten, wie bereits in Kapitel 5.3.1 erläutert. Dadurch wird verdeutlicht, dass bei nasserem Bedingungen, also größeren Niederschlagsmengen, geringere  $C_{20}$  Konzentrationen vorherrschen und umgekehrt. Diese Übereinstimmung bestätigt die Aussage, welche bereits durch den Vergleich mit der Tropfrate getroffen wurde, dass  $C_{20}$  bei

einem schnelleren Durchfluss des Wassers durch den Boden weniger effektiv gelöst werden kann und daraus niedrigere Konzentrationen resultieren.

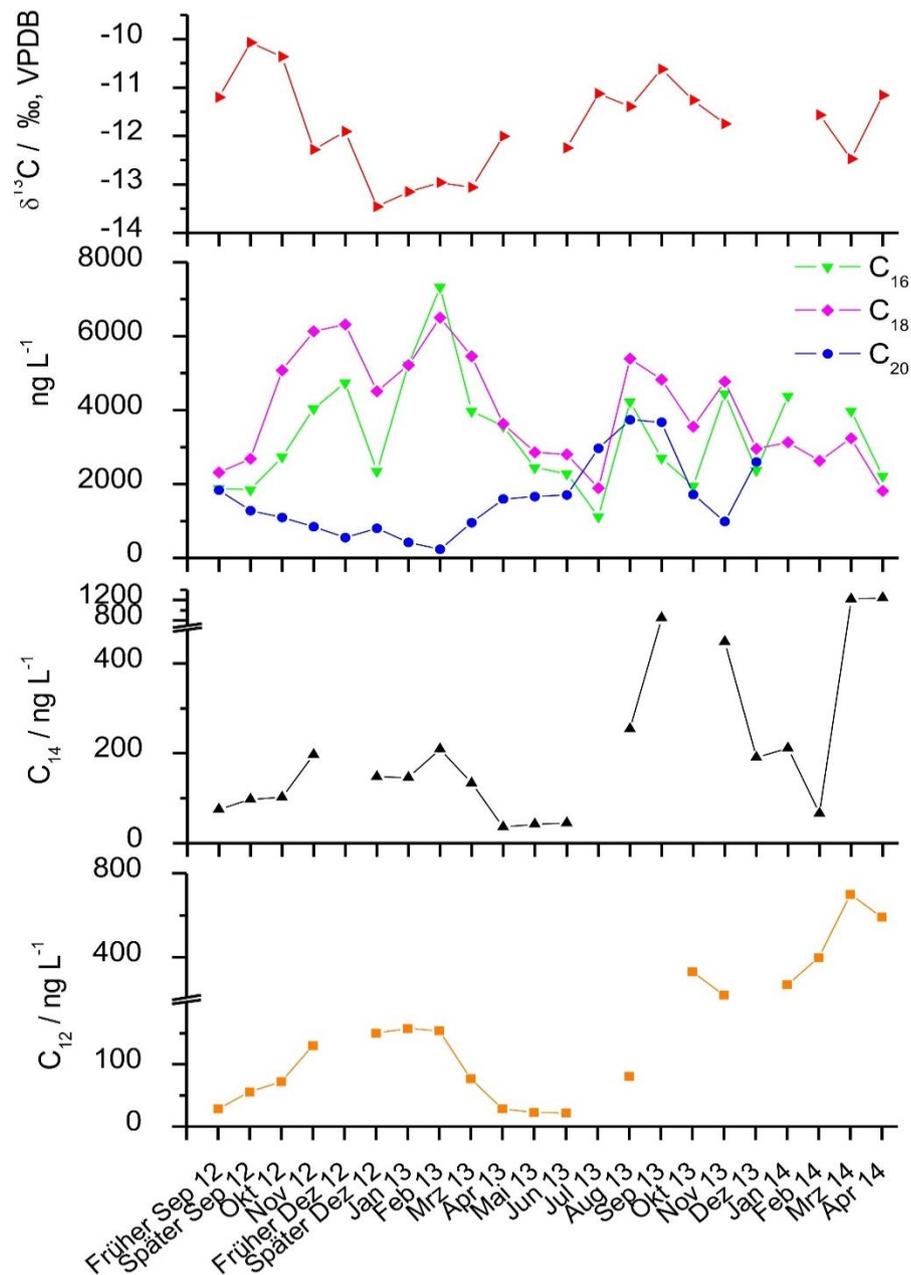


**Abbildung 61:**  $\text{Mg}^{2+}$  in  $\text{mg L}^{-1}$  im Vergleich zu den Fettsäureverläufen  $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{20}$  der Tropfstelle T1.

Im Gegensatz dazu weisen die kürzerkettigen Fettsäuren im Winter 2012/2013 und dem darauffolgenden Frühjahr einen dem Mg entgegengesetzten Verlauf auf. Dieser gegensätzliche Trend unterstützt die Annahme, dass  $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{18}$  bei größeren Niederschlagsmengen vermehrt gelöst und zur Höhle transportiert werden.

## Stabile Isotopenverhältnisse

Die ermittelten Fettsäureverläufe werden zuletzt mit dem stabilen Isotopenverhältnis  $\delta^{13}\text{C}$ , welches ebenfalls im Tropfwasser T1 gemessen wurden, verglichen. Dies ist in Abbildung 62 veranschaulicht.

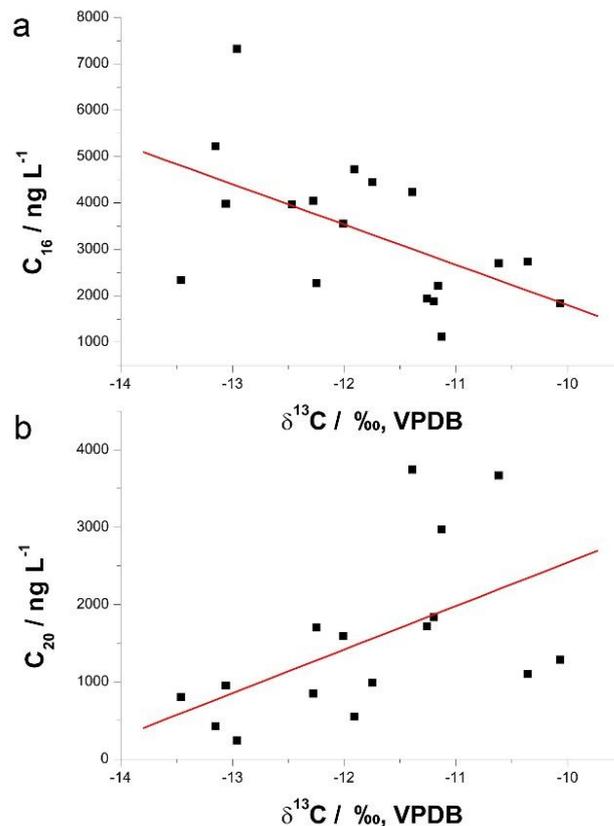


**Abbildung 62:** Stabile Isotope  $\delta^{13}\text{C}$  im Vergleich zu den Fettsäureverläufen  $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{20}$  der Tropfstelle T1.

Hierbei wird  $\delta^{13}\text{C}$  als *Proxy* für die Vegetation herangezogen, wobei negativere  $\delta^{13}\text{C}$  Werte auf einen höheren  $\text{pCO}_2$  im Boden und folglich eine höhere Vegetationsdichte hindeuten ([McDermott, 2004], [Fohlmeister *et al.*, 2011], [Fairchild & Ba-

ker, 2012], [Scholz *et al.*, 2012]). Daher soll durch den Vergleich der LMW Fettsäuren mit  $\delta^{13}\text{C}$  ein Zusammenhang zu Vegetationsveränderungen hergestellt werden.

Hierbei wird deutlich, dass die kürzerkettigen Fettsäuren teilweise einen entgegengesetzten Trend aufweisen.  $\text{C}_{12}\text{-C}_{18}$  verhalten sich im Herbst 2012, Winter 2012/2013 und im Frühjahr 2013 gegensätzlich zu  $\delta^{13}\text{C}$ . Ab August 2013 ist dieser Gegensatz nicht mehr so deutlich ausgeprägt. Dennoch ergibt sich zwischen  $\text{C}_{16}$  und  $\delta^{13}\text{C}$  eine signifikante negative Korrelation über den gesamten Zeitraum mit einem Korrelationskoeffizienten von  $-0,56$  ( $p=0,016$ ). Diese Übereinstimmung ist in Abbildung 63a als Streudiagramm dargestellt. Somit liegen bei negativeren  $\delta^{13}\text{C}$  Werten und folglich einer höheren Vegetationsdichte höhere Konzentrationen dieser LMW Fettsäuren vor.



**Abbildung 63:** Streudiagramme von a:  $\text{C}_{16}$  und b:  $\text{C}_{20}$  mit  $\delta^{13}\text{C}$  der Tropfstelle T1.

Des Weiteren gibt es im Verlauf der  $\text{C}_{20}$  große Ähnlichkeiten mit  $\delta^{13}\text{C}$ , sodass eine positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von  $0,53$  ( $p=0,032$ ) ermittelt werden kann (Abbildung 63b). Dies würde darauf hindeuten, dass der Verlauf der  $\text{C}_{20}$  demzufolge negativ mit der Vegetationsdichte korreliert. Wie jedoch bereits diskutiert wird angenommen, dass das Vorkommen dieser Fettsäure im Tropfwasser vermehrt von der Infiltration beeinflusst wird. Somit beruht die gute Übereinstimmung mit  $\delta^{13}\text{C}$

hauptsächlich auf der vorherrschenden Niederschlagsmenge und kann an dieser Stelle nicht als Zusammenhang zu der Vegetation herangezogen werden. Zusätzlich besteht die Vermutung, dass C<sub>20</sub> von anderen Quellen stammen kann als die kürzerkettigen Fettsäuren. Dadurch können diese Diskrepanzen auftreten.

Nichtsdestotrotz demonstrieren diese Analogien, dass eine Verbindung zwischen der Vegetationsdichte und dem Vorkommen der Fettsäuren im Tropfwasser besteht. Allerdings ist dies nicht zwangsläufig ein direkter Zusammenhang. Da die LMW Fettsäuren hauptsächlich von Mikroorganismen produziert werden, kann es auch eine indirekte Verbindung zu der Vegetation geben, da die Aktivität dieser mikrobiologischen Quellen im Boden von der Zusammensetzung und der Dichte der Vegetation abhängig ist [Ohtonen & Väre, 1998].

#### **5.3.4 Zusammenfassung der Tropfwasserergebnisse**

Im Rahmen dieses Kapitels wurden die Ergebnisse der Anwendung der neuen Fettsäuremethode auf monatliche Tropfwasserproben aus dem Herbstlabyrinth-Adventhöhle System ausführlich erläutert. Dabei wurde zunächst zwischen schnellen und langsamen Tropfstellen unterschieden und die jeweiligen Fettsäureverläufe betrachtet. Bei den schnellen Tropfstellen T1 und T5 waren im ersten Jahr von frühem September 2012 bis Juli 2013 deutliche saisonale Trends zu erkennen. Die Konzentrationen der kürzerkettigen Fettsäuren C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> wiesen im Winter höhere Konzentrationen auf als im Sommer, mit einem lokalen Maximum im Januar/Februar 2013. C<sub>20</sub> hingegen ist zu den anderen Fettsäuren negativ korreliert, mit höheren Konzentrationen im Sommer als in den Wintermonaten. Ab August 2013 sind diese Trends weniger gut zu erkennen.

Die langsamen Tropfstellen T2 und PW bestätigten teilweise die bei den schnellen Tropfstellen beobachteten Trends. Dennoch lagen die Fettsäuren bei T2 in einem generell niedrigeren Konzentrationsbereich als bei T1 und T5. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass bei der Probennahme über den Zeitraum eines ganzen Monats ein Teil des zuvor gelösten Calcits erneut an der Gefäßwand auskristallisiert und dabei die Fettsäuren teilweise in die Kristallstruktur einschließt. Dadurch wurden die Konzentrationen in den Tropfwasserproben verringert. Im Gegensatz dazu tauchten im PW höhere Konzentrationen als in den schnellen Tropfstellen auf. Da keine homogene Mischung und kein kontinuierlicher Abfluss des PWs gegeben sind, kann es zu einer Anreicherung der Fettsäuren im PW kommen. Dies führte zu den ermittelten, erhöhten Konzentrationen.

Des Weiteren wurden die LMW Fettsäuren der T1 untereinander korreliert, um eine Aussage über ihren Ursprung treffen zu können. Dabei wiesen C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> ähnliche Trends und teilweise signifikante positive Korrelationen auf. Daraus lässt sich schließen, dass diese LMW Fettsäuren die gleichen Quellen besitzen. Eine negative Korrelation dagegen wurde mit C<sub>20</sub> ermittelt, was die Vermutung zulässt, dass diese Fettsäure aus einer anderen Quelle stammt. Da C<sub>20</sub> die Grenze zwischen LMW und HMW Verbindungen darstellt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie von höheren Gefäßpflanzen statt von Mikroorganismen kommen kann.

Zusätzlich wurden die ermittelten Fettsäureergebnisse mit Daten des Höhlenmonitorings verglichen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte elektrische Leitfähigkeit und folglich erhöhte Ionenkonzentrationen des Tropfwassers zu einer verringerten Fettsäurekonzentration führen. Es wurde angenommen, dass durch die hohe Konzentration der Ionen der Transport der Fettsäuren über das Tropfwasser aufgrund einer verringerten Löslichkeit weniger gut funktioniert.

Vergleiche der Fettsäureverläufe mit der Tropfrate und der Mg-Konzentration konnten zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen dem Transport der Fettsäuren und der Niederschlagsmenge beziehungsweise der Durchflussgeschwindigkeit des Tropfwassers durch den Boden besteht. Es wurde festgestellt, dass C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> bei höheren Tropfraten vermehrt im Tropfwasser gelöst sind. Ausnahmen stellen hierbei extrem hohe Tropfraten dar, bei welchen es vielmehr zu einer Verdünnung der Konzentration kommt. C<sub>20</sub> hingegen kann aufgrund seiner geringeren Hydrophilie bei höheren Niederschlagsraten weniger gut gelöst werden und weist somit niedrigere Konzentrationen im Tropfwasser auf.

Zuletzt wurden Korrelationen mit dem stabilen Isotopenverhältnis  $\delta^{13}\text{C}$  durchgeführt, um eine Verbindung zwischen der Vegetationsdichte und dem Vorkommen der LMW Fettsäuren herzustellen. Dabei konnte eine negative Korrelation der kürzerkettigen Fettsäuren C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> zeigen, dass diese vermehrt bei höherem Boden-pCO<sub>2</sub> und demnach einer höheren Vegetationsdichte auftreten.

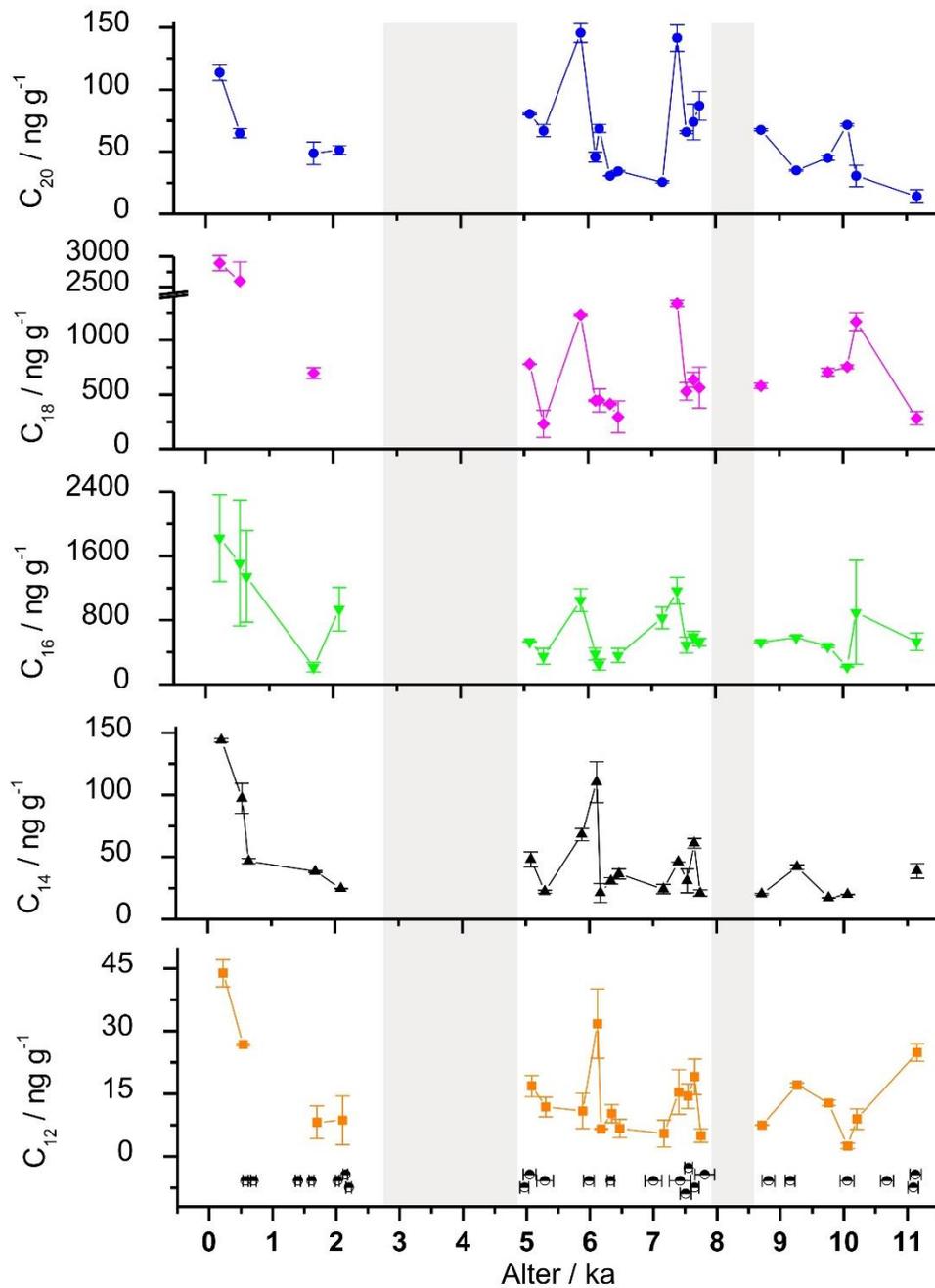
## 5.4 Fettsäureanalyse der Stalagmitproben NG01

Als weitere Anwendung der neu entwickelten Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Stalagmit aus dem Herbstlabyrinth-Adventhöhlen System untersucht. Die mittels  $^{230}\text{Th}/\text{U}$ -Datierung und StalAge erhaltenen Alter des Stalagmiten mit entsprechenden +/- Fehlern, welche für die Fettsäureanalyse relevant sind, sind im Anhang in Kapitel 7.1.3 vorzufinden. Die ermittelten Alter beziehen sich auf den Zeitpunkt der Messung (2012/2013). Generell kann der Stalagmit NG01 in drei Wachstumsphasen aufgeteilt werden. Es tritt ein Hiatus zwischen etwa 8,61 und 7,75 als auch zwischen 4,97 und 2,74 ka auf. Zudem ist der Stalagmit insgesamt auf bis zu 11,16 ka datiert.

### 5.4.1 Fettsäureverlauf

Um die Stalagmitproben der SPE-HPLC-MS Methode zugänglich zu machen, wurde die Probenvorbereitung um die Auflösung mittels HCl erweitert, sodass die Extraktion durch SPE erfolgen konnte. Das genaue Vorgehen ist in Kapitel 4.6.2 erläutert. Damit ist die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode sowohl auf Tropfwasser als auch auf Stalagmitproben anwendbar. Des Weiteren wurde die benötigte Probenmenge (ca. 0,5-3,5 g) auch von diesem Probenmaterial durch die selektivere Extraktionsmethode und die Messung mittels HPLC-MS im Vergleich zu den meisten früheren Studien reduziert ([Xie *et al.*, 2003], [Blyth *et al.*, 2006], [Blyth *et al.*, 2011]).

Die erhaltenen Fettsäureverläufe sind in Abbildung 64 dargestellt. Die gesuchten Fettsäuren  $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{20}$  sind über alle drei Wachstumsphasen hinweg vorhanden. Allerdings ist die Analytkonzentration in einigen Proben unter der LOD, sodass die verschiedenen Fettsäuren eine unterschiedliche Anzahl an Datenpunkten aufweisen. Vor allem im Verlauf der  $\text{C}_{18}$  tauchen einige Lücken auf, die keinen zusätzlichen Hiatus darstellen, sondern auf fehlende Datenpunkte zurückzuführen sind. Generell wird das Vorkommen der Fettsäuren von  $\text{C}_{16}$  und  $\text{C}_{18}$  dominiert, wie bereits in den Tropfwasserproben festgestellt wurde.  $\text{C}_{16}$  und  $\text{C}_{18}$  weisen ähnliche Trends in allen Wachstumsphasen auf und ihre Konzentrationen liegen zwischen  $200 \text{ ng g}^{-1}$  und  $3.000 \text{ ng g}^{-1}$ . Hierbei fällt auf, dass die weitaus höchsten Konzentrationen während der letzten 1.000 Jahre auftreten mit einem Konzentrationsanstieg innerhalb der jüngsten 2.000 Jahre. Vor allem der jüngste Datenpunkt weist ein deutliches Maximum auf.



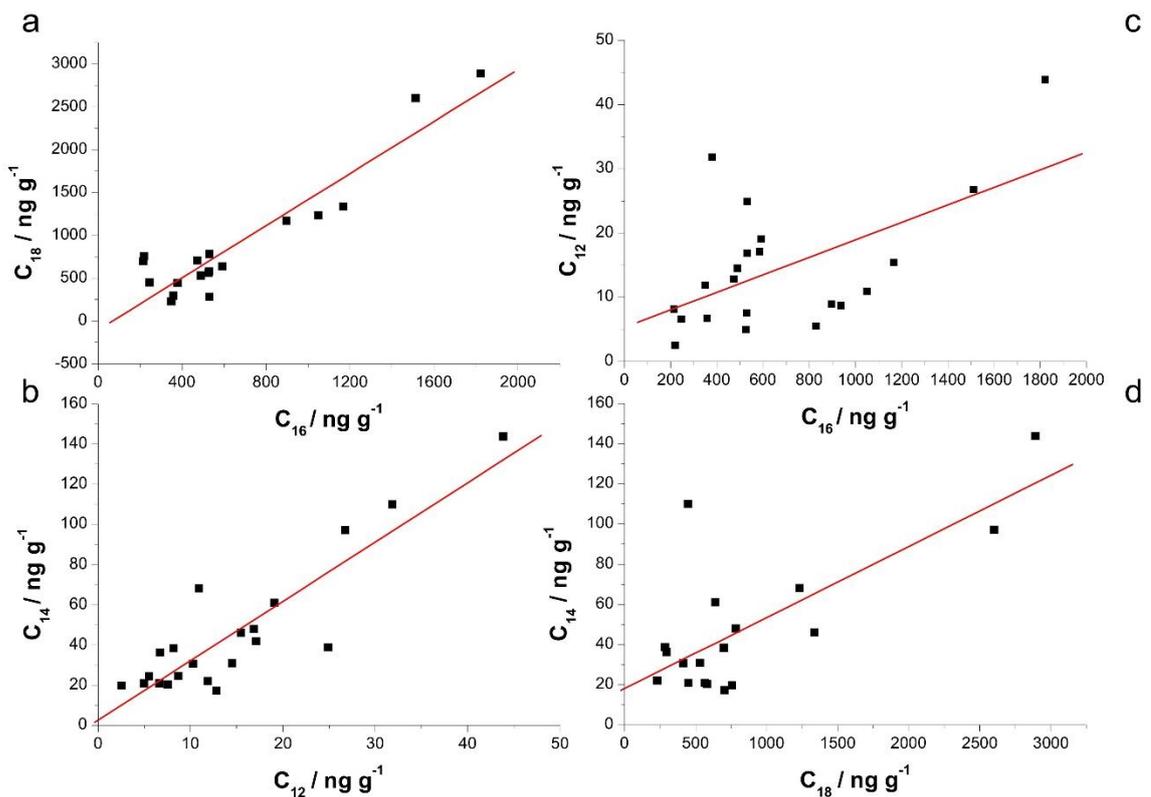
**Abbildung 64:** Fettsäureverlauf von  $C_{12}$ - $C_{20}$  in  $\text{ng g}^{-1}$  des Stalagmiten NG01, Herbstlabyrinth-Adventhöhle; zu beachten ist die Achsenunterbrechung bei  $C_{18}$ . Untenstehend: Ergebnisse der  $^{230}\text{Th}/\text{U}$ -Datierung mit entsprechenden Fehlerbalken und durch das Altersmodell ermittelte Hiatus (schattierte Fläche).

Im Vergleich dazu liegen  $C_{12}$ ,  $C_{14}$  und  $C_{20}$  in einem niedrigeren Konzentrationsbereich. Besonders die kürzeste Säure  $C_{12}$  zeigt lediglich Konzentrationen zwischen  $2 \text{ ng g}^{-1}$  und  $45 \text{ ng g}^{-1}$ , während  $C_{14}$  und  $C_{20}$  zwischen  $14 \text{ ng g}^{-1}$  und  $145 \text{ ng g}^{-1}$  variieren. Überdies wird deutlich, dass diese drei Fettsäuren auch einen Konzentrationsanstieg innerhalb der jüngsten 2.000 Jahre erkennen lassen. Allerdings liegen hierbei die Konzentrationen der  $C_{20}$  noch im selben Bereich wie in dem restlichen Zeitverlauf. Bei dieser Fettsäure treten keine weitaus höheren Konzentrationen im jüngsten Wachs-

tumsabschnitt auf, obwohl auch hier ein lokales Maximum bei dem jüngsten Datenpunkt vorliegt. Daraus lässt sich schließen, dass in den letzten ein- bis zweitausend Jahren eine zusätzliche Quelle der Fettsäuren aufgetaucht ist. Diese kann generell LMW Fettsäuren liefern, jedoch werden vermehrt  $C_{16}$  und  $C_{18}$  produziert, sodass deren Konzentrationen ausschlaggebend ansteigen im Vergleich zu den älteren Wachstumsphasen.

### 5.4.2 Korrelation der Fettsäuren

Beim Vergleich der Verläufe der Fettsäuredaten in den unterschiedlichen Wachstumsabschnitten sind übereinstimmende Trends zu erkennen. So zeigen  $C_{16}$  und  $C_{18}$  über den gesamten Verlauf ein ähnliches Verhalten. Sie sind positiv korreliert zueinander mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,93 ( $p < 0,0001$ ) und das entsprechende Streudiagramm ist in Abbildung 65a veranschaulicht.



**Abbildung 65:** Streudiagramme der Gesamtverläufe von a:  $C_{16}$  und  $C_{18}$ , b:  $C_{12}$  und  $C_{14}$ , c:  $C_{16}$  und  $C_{12}$  und d:  $C_{18}$  und  $C_{14}$  in  $\text{ng g}^{-1}$ .

Des Weiteren sind  $C_{12}$  und  $C_{14}$  über alle drei Wachstumsphasen positiv zueinander korreliert (Abbildung 65b) mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,89 ( $p < 0,0001$ ). Außerdem zeigen sie vergleichbare Trends wie die Gesamtverläufe von

C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub>. Korrelationen untereinander ergeben Korrelationskoeffizienten zwischen 0,57 (p=0,007) und 0,74 (p=0,0004). Die beiden zugehörigen Streudiagramme sind in Abbildung 65c und d dargestellt. Diese analogen Fettsäureverläufe demonstrieren erneut, wie bereits bei den Tropfwasserproben, dass C<sub>12</sub> und C<sub>14</sub> von den gleichen Quellen stammen wie C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub>. Dennoch treten bei genauer Betrachtung der einzelnen Wachstumsabschnitte geringfügige Unterschiede auf. So zeigen die ältesten Proben bei ungefähr 11,16 bis 10,06 ka einen Abfall der Konzentrationen für C<sub>12</sub> und C<sub>14</sub>, wohingegen C<sub>18</sub> einen Anstieg aufweist. Eine weitere Diskrepanz taucht in der zweiten Wachstumsphase auf. Die Verläufe von C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub> besitzen einen deutlichen positiven Ausschlag bei ca. 5,88 ka. Dieser ist ebenfalls bei C<sub>12</sub> und C<sub>14</sub> vorzufinden, allerdings bei einem früheren Alter von ca. 6,12 ka. Diese Abweichung kann ein Indiz dafür sein, dass sich die Lipidzusammensetzung der Produkte der Mikroorganismen im Boden in diesem Zeitraum verändert hat. Somit war das Vorkommen von Fettsäuren in beiden Altern erhöht, jedoch verschob sich das Maximum über die Zeit zu den länger-kettigen Säuren.

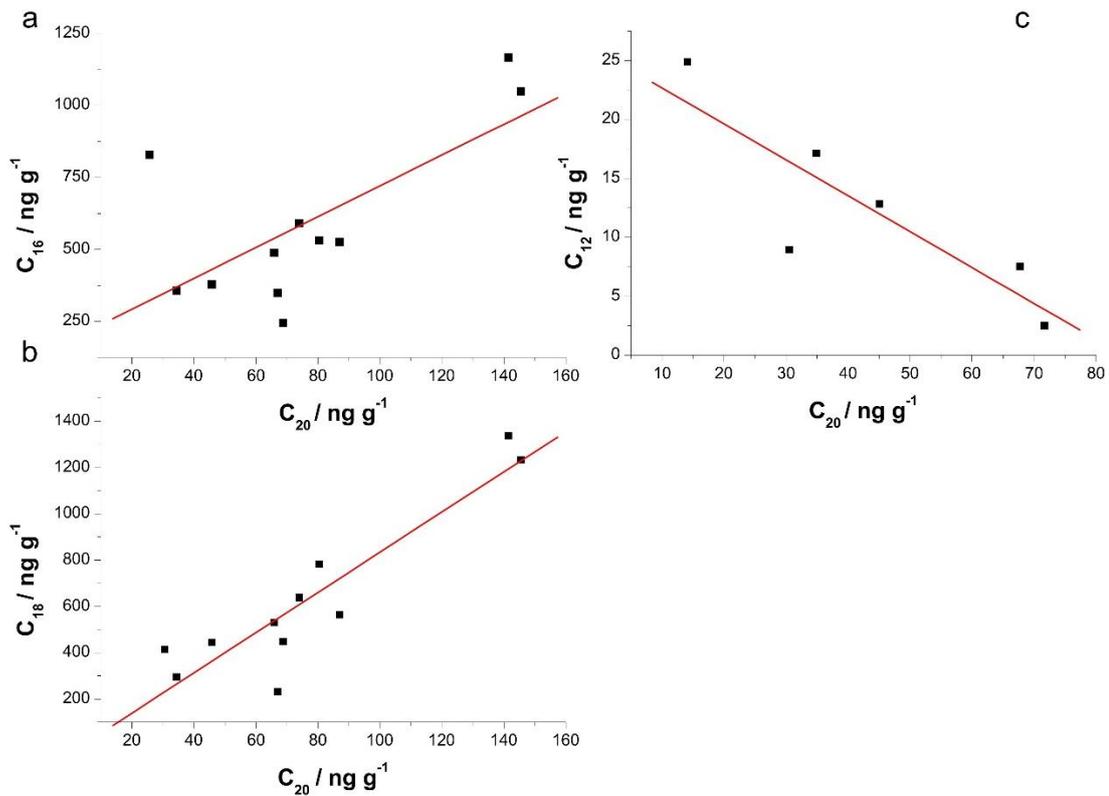
Die für C<sub>20</sub> erhaltenen Verläufe weichen teilweise von den kürzerkettigen Fettsäuren ab und nehmen daher, wie bereits bei den Tropfwasserproben beobachtet, eine besondere Rolle ein. Um dies zu verdeutlichen, müssen die einzelnen Wachstumsabschnitte getrennt betrachtet werden. Hierbei relevante Korrelationskoeffizienten mit zugehörigen p-Werten unter 0,05 in unterschiedlichen Wachstumsphasen sind in Tabelle 6 aufgelistet. Aufgrund der wenigen Datenpunkte im jüngsten Abschnitt konnten für diesen keine signifikanten Korrelationskoeffizienten berechnet werden.

**Tabelle 6:** Korrelationskoeffizienten R und zugehörige p-Werte von C<sub>20</sub> in unterschiedlichen Wachstumsphasen.

Wachstumsphase	Korrelation von C <sub>20</sub> mit	R	p-Wert
<b>7,75 bis 4,97 ka</b>	C <sub>16</sub>	0,69	0,02
	C <sub>18</sub>	0,91	<0,0001
<b>11,16 bis 8,61 ka</b>	C <sub>12</sub>	-0,86	0,03

Abbildung 64 verdeutlicht bereits, dass C<sub>20</sub> in den beiden jüngeren Wachstumsabschnitten einen gleichartigen Verlauf aufweist wie die anderen Analyten. Die entsprechenden Streudiagramme sind in Abbildung 66 veranschaulicht. Besonders gut korreliert diese Fettsäure mit C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub> und besitzt ebenso einen deutlichen Ausschlag bei 5,88 ka. Im Gegensatz dazu zeigt die C<sub>20</sub> im ältesten Abschnitt einen anderen Trend. Ihr Verlauf ist den übrigen Fettsäuren entgegengesetzt. Mit C<sub>12</sub> ergibt sich

dabei eine signifikante, negative Korrelation, wie Tabelle 6 und Abbildung 66 zu entnehmen ist.



**Abbildung 66:** Streudiagramme von a:  $C_{20}$  und  $C_{16}$ , b:  $C_{20}$  und  $C_{18}$  in  $\text{ng g}^{-1}$  während der zweiten Wachstumsphase, sowie c:  $C_{20}$  und  $C_{12}$  in  $\text{ng g}^{-1}$  während der ältesten Wachstumsphase von NG01.

Dieses gegensätzliche Verhalten lässt darauf schließen, dass während oder nach dem darauffolgenden ersten Hiatus zwischen 8,61 und 7,75 ka eine Veränderung aufgetreten sein muss, welche zu diesem Umschlag der  $C_{20}$  geführt hat. Die älteste Wachstumsphase spiegelt das Früh-Holozän wider, während die beiden jüngeren Wachstumsphasen zu dem mittleren und Spät-Holozän gehören. Daher lässt sich vermuten, dass zu diesem frühen Zeitpunkt andere Bedingungen bezüglich Vegetation und somit folglich auch mikrobiologischer Aktivität herrschten als während der beiden jüngeren Phasen. Das Pollendiagramm in Kapitel 1.3 zeigt allerdings keine drastische Vegetationsveränderung während der ältesten Wachstumsphase oder dem darauffolgenden Hiatus [Litt *et al.*, 2009]. Dadurch besteht der Verdacht, dass entweder die Produktion oder der Abbau der Fettsäuren durch Mikroorganismen in diesem Zeitabschnitt anders verlief, sodass dieses unterschiedliche Verhalten zustande kam.

Eine weitere Erklärung ist, dass  $C_{20}$  zu diesem Zeitpunkt noch eine andere Quelle besaß, als die kürzerkettigen Fettsäuren. Dies können sowohl andere mikrobiologische Quellen als auch die Vegetation direkt sein. Eine mögliche Entwicklung des

Bodens kann der Grund dafür sein. Mit der Zeit kam es zu einer Zunahme der Mächtigkeit des A-Horizonts, was eine erhöhte Anzahl und Vielfalt der enthaltenen Mikroorganismen mit sich brachte. Somit tauchten während der frühesten Wachstumsphase oder dem ersten Hiatus neue mikrobiologische Quellen für die LMW Fettsäuren im Boden auf. Diese leisteten einen ausschlaggebenden Beitrag zu der Gesamtproduktion der Fettsäuren und konnten die anderen Quellen kompensieren. Das würde erklären, warum die  $C_{20}$  bei späteren Altern das gleiche Verhalten wie die kürzeren Fettsäuren aufweist.

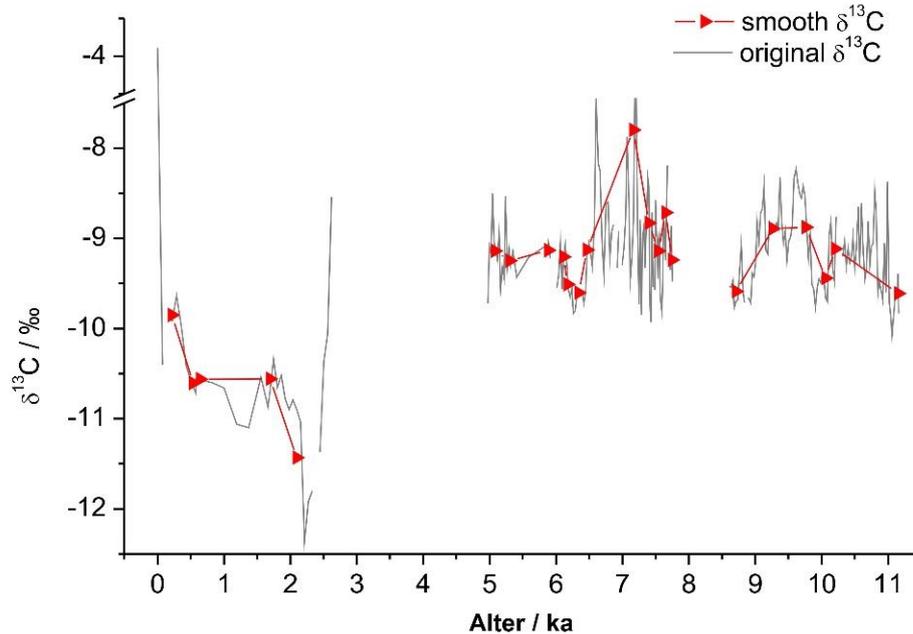
Obwohl  $C_{20}$  von früheren Studien bei den LMW Fettsäuren eingeordnet wurde, werden Verbindungen ab  $C_{21}$ , wie bereits in Kapitel 5.3.2 erwähnt, als HMW Komponenten bezeichnet [Blyth *et al.*, 2008]. Somit stellt  $C_{20}$  den Übergang von LMW zu HMW Verbindungen dar. Die HMW Fettsäuren stammen von der Vegetation und werden nicht von Mikroorganismen im Boden produziert. Aufgrund dessen können Gefäßpflanzen ebenso eine Quelle für  $C_{20}$ , als Grenzfall zwischen LMW und HMW Komponenten, darstellen. Dies verdeutlicht, dass sich  $C_{20}$  in der ältesten Wachstumsperiode wie eine HMW Verbindung und später wie eine LMW Verbindung verhält. Dennoch muss diese potentielle Quelle aufgrund der positiven Korrelation in den beiden jüngeren Wachstumsphasen verschwunden oder kompensiert worden sein, sodass danach alle fünf Analyten hauptsächlich von derselben Quelle stammen. Dies bekräftigt ebenso die Vermutung der Bodenentwicklung während dem Früh-Holozän.

### 5.4.3 Vergleich mit stabilen Isotopenverhältnissen

Die ermittelten Fettsäuredaten wurden zusätzlich mit stabilen Isotopenverhältnissen  $\delta^{13}\text{C}$  und  $\delta^{18}\text{O}$ , welche ebenfalls im Calcit des Stalagmiten gemessen wurden, verglichen. Die zeitliche Auflösung der Isotopendaten stimmt jedoch nicht mit den Fettsäuren überein. Daher wurden die Verläufe von  $\delta^{13}\text{C}$  und  $\delta^{18}\text{O}$  geglättet (*smooth*) und auf die gleichen Alter, die auch im Fettsäureverlauf auftauchen, beschränkt. Abbildung 67 zeigt beispielhaft den Vergleich des geglätteten Verlaufs von  $\delta^{13}\text{C}$  und die dazugehörigen Originaldaten.

Die Betrachtung des geglätteten Verlaufs führt dazu, dass einige ausgeprägte positive Ausschläge des hochaufgelösten Verlaufes nicht beachtet werden (z. B. bei ca. 6,50 oder 2,50 ka). Allerdings werden die Daten dadurch vergleichbarer mit den Fettsäuredaten und die originalen Verläufe sind darum für diese Arbeit nicht relevant. Wie bereits in Kapitel 5.3.3 erläutert wird  $\delta^{13}\text{C}$  als Marker für die Vegetation gemessen, wobei negativere  $\delta^{13}\text{C}$  Werte auf einen höheren  $p\text{CO}_2$  im Boden hindeuten und dieser wiederum durch eine höhere Vegetationsdichte hervorgerufen wird ([McDermott, 2004],

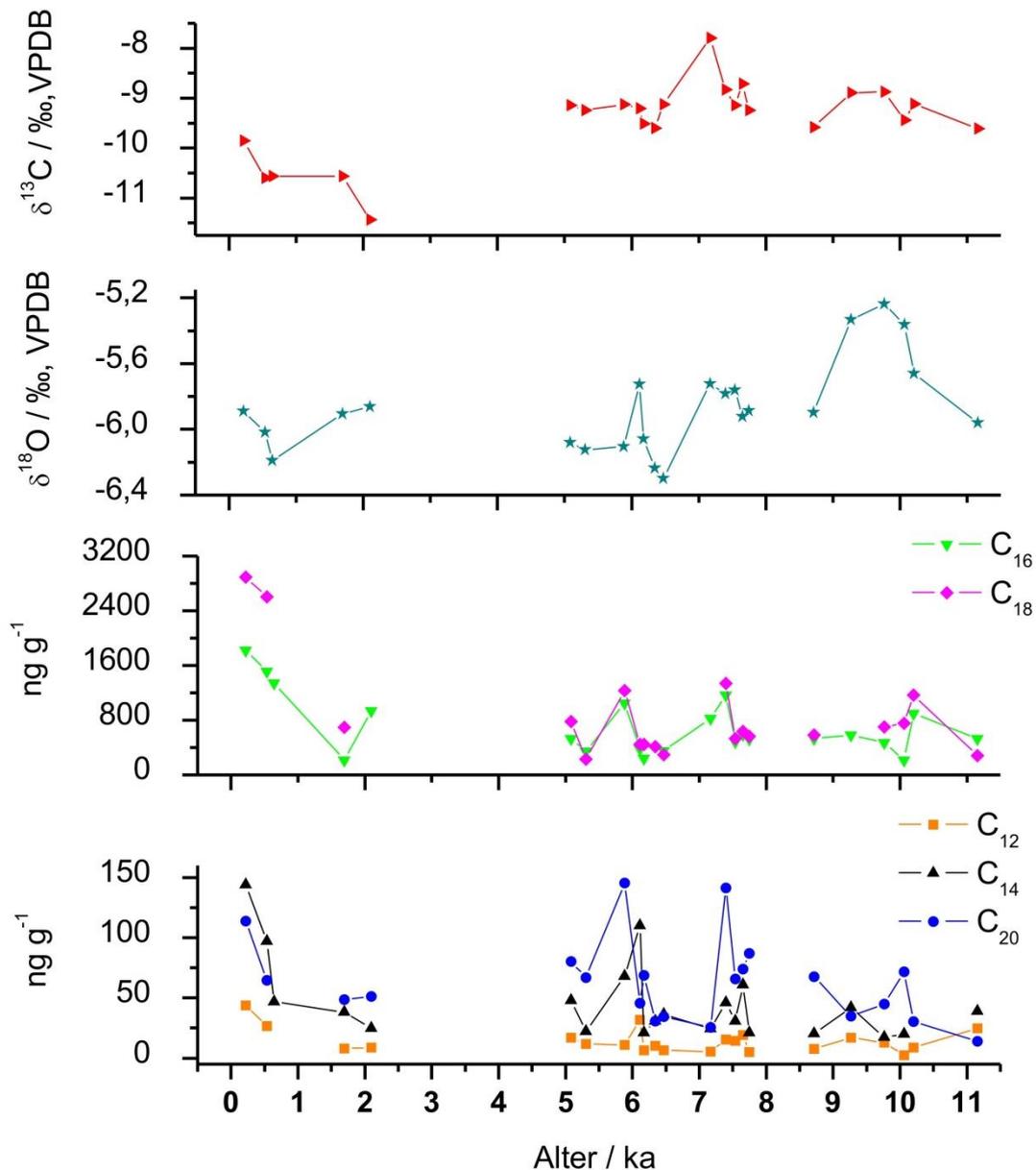
[Fohlmeister *et al.*, 2011], [Fairchild & Baker, 2012], [Scholz *et al.*, 2012]). Daher soll durch den Vergleich der Fettsäuren mit  $\delta^{13}\text{C}$  ein Zusammenhang zu Paläoumweltveränderungen hergestellt werden.



**Abbildung 67:** Vergleich des originalen und des geglätteten Verlaufs (rot) von  $\delta^{13}\text{C}$ , gemessen im Calcit des NG01.

Ein Überblick der geglätteten Isotopen Verläufe und der Fettsäureverläufe ist in Abbildung 68 gegeben. Dabei wird deutlich, dass sich Ähnlichkeiten der Trends ergeben. Dennoch sind keine signifikanten Korrelationskoeffizienten zwischen den Fettsäuren und  $\delta^{13}\text{C}$  bestimmbar. Während der jüngsten Wachstumsphase zeigen  $\text{C}_{12}$ ,  $\text{C}_{14}$  und  $\text{C}_{20}$  die beste Übereinstimmung mit  $\delta^{13}\text{C}$ . Allerdings stimmen ebenso  $\text{C}_{16}$  und  $\text{C}_{18}$  in dieser Periode gut mit  $\delta^{13}\text{C}$  überein. Alle Verläufe zeigen einen Anstieg ab ca. 2.000 Jahren. Im zweiten Wachstumsabschnitt hingegen weisen  $\text{C}_{16}$ ,  $\text{C}_{18}$  und  $\text{C}_{20}$  den passendsten Trend zu  $\delta^{13}\text{C}$  auf. Hierbei besitzen alle Fettsäuren zwar einen stärker ausgeprägten Ausschlag bei 5,88 ka als  $\delta^{13}\text{C}$ , allerdings stimmt der zweite positive Ausschlag der gleichen Wachstumsphase gut überein. Aufgrund dieser Analogie zu dem Verlauf von  $\delta^{13}\text{C}$  ist eine negative Korrelation zu der Vegetationsdichte gegeben. Somit ist es nicht wahrscheinlich, dass diese Säuren direkt von höheren Gefäßpflanzen hervorgehen. Nichtsdestotrotz zeigen die Ähnlichkeiten der Verläufe, dass ein Zusammenhang zwischen der Vegetation und den LMW Fettsäuren gegeben ist. Selbst wenn die eigentlichen Quellen Mikroorganismen im Boden oberhalb der Höhle sind, so wird deren Aktivität ebenfalls von der Zusammensetzung und der Dichte der Vegetation

beeinflusst [Ohtonen & Väre, 1998]. Daher können auch die LMW Fettsäuren neue Erkenntnisse über Paläoumweltveränderungen liefern.



**Abbildung 68:** Geglättete Verläufe von  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  im Vergleich zu den Fettsäureverläufen  $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{20}$  gemessen in NG01.

Lediglich  $\text{C}_{20}$  weist während der ältesten Wachstumsphase einen gegensätzlichen Verlauf auf und ist somit positiv zur Vegetation korreliert. Wie bereits in Kapitel 5.4.2 diskutiert besteht der Verdacht, dass sich während des ersten Hiatus die Hauptquelle dieser Säure verändert hat und sie vorher direkt von höheren Pflanzen stammte. Die negative Korrelation zu  $\delta^{13}\text{C}$  unterstützt diese Aussage, sowie die Annahme, dass eine Bodenentwicklung stattgefunden hat. Durch den mächtiger werdenden A-Horizont

entstanden neue mikrobiologische Quellen, von welchen die LMW Fettsäuren, inklusive  $C_{20}$ , ab dem zweiten Wachstumsabschnitt vermehrt produziert wurden.

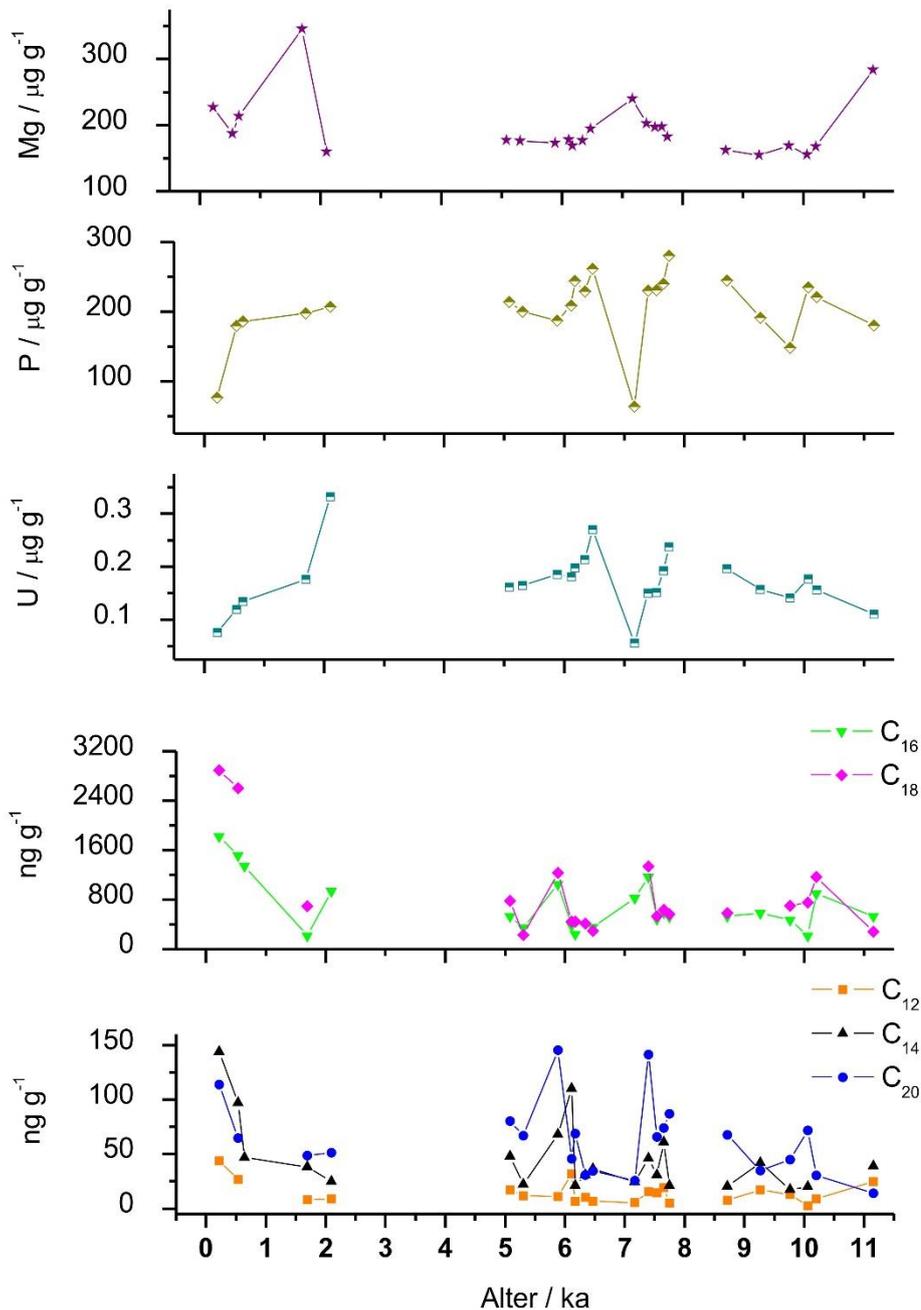
Des Weiteren werden die Fettsäuredaten mit  $\delta^{18}O$  verglichen, um einen Zusammenhang mit dem Niederschlag und der Temperatur herzustellen ([Dansgaard *et al.*, 1993], [McDermott *et al.*, 1999], [McDermott, 2004], [Lachniet, 2009]). Hierbei gilt  $\delta^{18}O$  in den mittleren Breitengraden eher als Temperatur-Proxy [Lachniet, 2009]. Der geglättete Verlauf von  $\delta^{18}O$  ist ebenfalls in Abbildung 68 dargestellt. Daraus wird ersichtlich, dass die Fettsäuren im jüngsten Wachstumsabschnitt weniger gut mit  $\delta^{18}O$  übereinstimmen wie mit  $\delta^{13}C$ . Dennoch weist  $\delta^{18}O$  in der zweiten Wachstumsphase einen ähnlichen Verlauf wie die Fettsäuren auf und es sind zwei ausgeprägte positive Ausschläge zu erkennen. Vor allem mit  $C_{12}$  und  $C_{14}$  stimmt dieser gut überein, da auch hier ein stärker ausgeprägtes lokales Maximum bei 6,12 ka vorkommt. Der älteste Wachstumsabschnitt weist ebenfalls einen ähnlichen Verlauf von  $\delta^{18}O$  wie die Fettsäuren auf, allerdings in einem insgesamt höheren Konzentrationsbereich, als während der anderen Wachstumsphasen. Dies ist bei den Fettsäuren nicht der Fall. Vor allem der Zeitraum von etwa 10,00 bis 8,60 ka zeigt einen passenden Verlauf zu  $C_{12}$ - $C_{18}$ , während  $C_{20}$  sich erneut gegensätzlich verhält. Zusätzlich konnten auch hier keine signifikanten Korrelationskoeffizienten berechnet werden. Nichtsdestotrotz hat die Temperatur einen Einfluss auf die Vielfaltigkeit und Zusammensetzung der Vegetation. Dadurch kann es zu einem sekundären oder indirekten Effekt auf die Fettsäureproduktion kommen. Die gute Übereinstimmung mit dem Verlauf von  $\delta^{18}O$  verdeutlicht, dass dieser Effekt von den LMW Fettsäuren widergespiegelt werden kann.

#### 5.4.4 Korrelation mit Spurenelementen

Ergänzend zu den Korrelationen der Isotopenverhältnisse wurden die Fettsäuredaten mit Analysen von Phosphor, Uran und Magnesium aus dem Calcit von NG01 verglichen. Dazu wurden die Originaldaten geglättet wie bereits in Kapitel 5.4.3 beschrieben und sie sind in Abbildung 69 illustriert. P und U sind zueinander positiv korreliert und negativ zu  $\delta^{13}C$ . Dadurch können sie an dieser Stelle als zusätzlicher Vegetations-Proxy herangezogen werden.

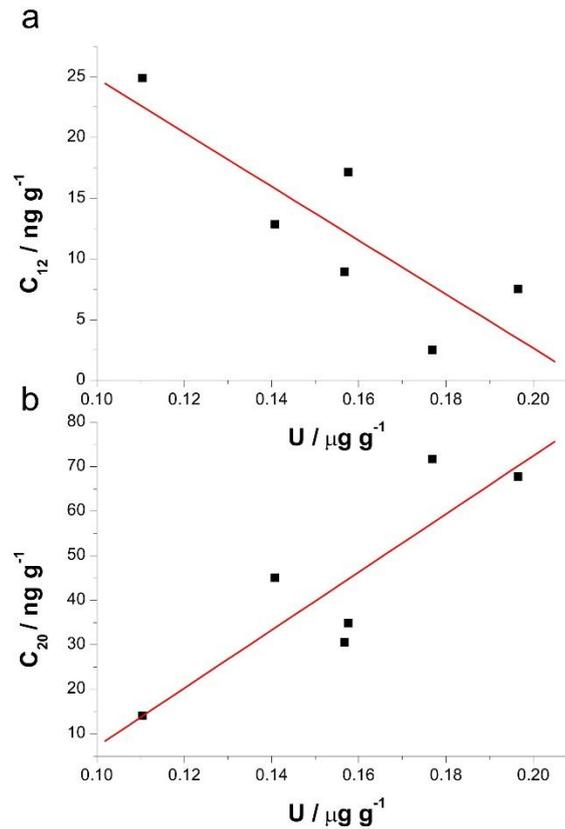
Im Vergleich zu den Fettsäuren zeigen sie hauptsächlich einen umgekehrten Verlauf. Besonders die beiden jüngsten Wachstumsphasen machen dieses gegensätzliche Verhalten deutlich. Beide Spurenelemente zeigen ab ca. 2.000 Jahre bis heute einen Abfall der Kurve, während die Fettsäuren in der jüngsten Wachstumsperiode ansteigen. Des Weiteren tritt im zweiten Wachstumsabschnitt sowohl bei P als auch bei U ein ausgeprägter, negativer Ausschlag bei ca. 7,30 ka auf. Ebenso hat P ein we-

niger stark ausgeprägtes lokales Minimum bei 5,88 ka inne, welches negativ mit  $C_{16}$ ,  $C_{18}$  und  $C_{20}$  korreliert.



**Abbildung 69:** Geglättete Verläufe von Mg, P, U im Vergleich zu den Fettsäureverläufen  $C_{12}$ - $C_{20}$  gemessen in NG01.

In der ältesten Wachstumsphase tauchen die am stärksten ausgeprägten Korrelationen auf. Während  $C_{12}$  und  $C_{14}$  in diesem Zeitraum negativ mit P und U korrelieren, weist  $C_{20}$  eine positive Korrelation mit diesen Spurenelementen auf. Dies wird anhand der Abbildung 70 veranschaulicht, in welcher  $C_{12}$  und  $C_{20}$  in einem Streudiagramm beispielhaft gegen U aufgetragen sind.



**Abbildung 70:** Streudiagramme von a: C<sub>12</sub> und b: C<sub>20</sub> mit den geglätteten Werten von U während der ältesten Wachstumsphase von NG01.

Hierbei kann für C<sub>12</sub> ein negativer Korrelationskoeffizient von -0,83 (p=0,04) und für C<sub>20</sub> ein positiver Korrelationskoeffizient von 0,86 (p=0,03) berechnet werden. Für C<sub>14</sub> dagegen ist kein signifikanter Korrelationskoeffizient bestimmbar. Diese Resultate bestätigen die Schlussfolgerung, dass C<sub>20</sub> während dieser ältesten Wachstumsphase positiv mit der Vegetationsdichte korreliert, wie bereits in Kapitel 5.4.3 diskutiert. Daher stammt diese Fettsäure in diesem Zeitraum folglich direkt von der Vegetation und verhält sich somit wie eine HMW Fettsäure. Die restlichen LMW Analyten stammen hingegen nicht von höheren Pflanzen, sondern aus mikrobiologischen Quellen, wie der Vergleich mit P und U bestätigt.

Im Gegensatz zu P und U liefert der Verlauf des Mg Informationen über die Verweildauer des Tropfwassers im Boden und Aquifer während eines bestimmten Zeitraums, wie bereits in Kapitel 5.3.3 erläutert. Dabei deuten niedrigere Magnesiumkonzentrationen auf nassere Bedingungen und folglich eine erhöhte Infiltration hin ([Tooth & Fairchild, 2003], [Fairchild & Treble, 2009]). Ein Vergleich des geglätteten Mg Verlaufs mit den ermittelten Fettsäuredaten zeigt keine zuverlässigen Ähnlichkeiten in den Trends. Selbst die besondere Rolle der C<sub>20</sub> in der ältesten Wachstumsphase erlaubt

keine Korrelation mit Mg. Des Weiteren können keine signifikanten Korrelationskoeffizienten bestimmt werden. Daraus lässt sich schließen, dass entweder die LMW Fettsäuren, welche in diesem Stalagmiten nachgewiesen wurden, keine Informationen über die regionalen Niederschlagsverhältnisse liefern. Oder aber, dass Mg in diesem Stalagmiten kein zuverlässiger Niederschlags-Proxy ist. Dieses Ergebnis stimmt nicht mit dem Vergleich der Fettsäuren mit  $\delta^{18}\text{O}$  überein, da  $\delta^{18}\text{O}$  in den mittleren Breiten vermehrt ein Proxy für Temperatur, statt Niederschlagsmenge, darstellt. Aufgrund der mangelnden Korrelation mit Mg lässt sich schlussfolgern, dass ein direkter Zusammenhang zwischen LMW Fettsäuren und dem Niederschlag ausgeschlossen werden kann. Nichtsdestotrotz hat dieser Parameter in Kombination mit der Temperatur einen entscheidenden Effekt auf die Vegetationsdichte und folglich auf die Aktivität der Mikroorganismen im Boden. Dennoch scheint dieser Einfluss nicht ausgeprägt genug zu sein, als dass er von den LMW Fettsäuren projiziert werden kann.

### 5.4.5 Zusammenfassung der Stalagmitergebnisse

Im Rahmen dieses Kapitels wurde gezeigt, dass durch eine Erweiterung der Probenvorbereitung die neu entwickelte Methode auch auf Stalagmitproben anwendbar ist. Hierbei konnte das benötigte Probenmaterial (ca. 0,5-3,5 g) im Vergleich zu den meisten bisherigen Studien ([Xie *et al.*, 2003], [Blyth *et al.*, 2006], [Blyth *et al.*, 2011]) reduziert werden. Die untersuchte Speläothemprobe war der Stalagmit NG01 aus dem Herbstlabyrinth-Adventhöhle System. Dieser ist bis zu einem Alter von etwa 11,16 ka datiert worden und weist zwei Hiatus auf. Somit konnte er in drei Wachstumsphasen aufgeteilt werden, welche teilweise starke Unterschiede aufweisen.

Die Zielkomponenten waren in allen drei Wachstumsabschnitten vorzufinden. Dabei traten entsprechend ihrem natürlichen Vorkommen in Tier- und Pflanzenlipiden vermehrt  $\text{C}_{16}$  und  $\text{C}_{18}$  auf. Des Weiteren war eine interne Variation zwischen den fünf Fettsäuren zu erkennen. Während der beiden jüngsten Wachstumsphasen zeigten sie ein ähnliches Verhalten mit einem ausgeprägten Konzentrationsanstieg in den letzten 2.000 Jahren bis heute. Daraus lässt sich schließen, dass in der jüngsten Wachstumsperiode eine zusätzliche Quelle für die LMW Fettsäuren hinzugekommen sein könnte. Allerdings wies  $\text{C}_{20}$  in dem ältesten Abschnitt einen gegensätzlichen Trend, als die kürzerkettigen Fettsäuren, auf. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Fettsäuren nicht über alle Wachstumsphasen hinweg die gleichen Quellen besitzen. Sie können sowohl unterschiedliche mikrobiologische Ursprünge als auch die Vegetation selbst als Herkunftsort besitzen. Überdies kann  $\text{C}_{20}$  als Grenzfall sowohl als LMW als auch als HMW Verbindung betrachtet werden. Durch die Entwicklung des Bodens kam es zur Entste-

hung neuer Mikroorganismen, welche einen großen Beitrag zu der Gesamtproduktion der Fettsäuren beisteuerten. Dadurch kam es entweder noch während der ersten Wachstumsphase oder dem darauffolgen Hiatus bei C<sub>20</sub> zu einem Wechsel von pflanzlichen Quellen zu vermehrt mikrobiologischen Quellen.

Korrelationen mit dem stabilen Isotopenverhältnis  $\delta^{13}\text{C}$  und den Spurenelementen P und U verdeutlichten, dass es einen Zusammenhang zwischen der Vegetationsdichte und dem Vorkommen der Fettsäuren in dem Stalagmiten gibt. Dies ist aufgrund der positiven Korrelation zu  $\delta^{13}\text{C}$  und der negativen Korrelation zu P und U vermutlich kein direkter Zusammenhang. Es besteht die Annahme, dass ein sekundärer Einfluss der Vegetation auf die Aktivität der Mikroorganismen und deren Produktion von Fettsäuren vorliegt. Dennoch sind die LMW Fettsäuren dadurch in der Lage Paläoumweltveränderungen widerzuspiegeln.

Zusätzlich konnten auch Ähnlichkeiten zu dem Verlauf des  $\delta^{18}\text{O}$  festgestellt werden. Dieser wurde in diesem Fall als Temperatur-Proxy herangezogen. Somit wurde verdeutlicht, dass die Zielkomponenten regionale Temperaturveränderungen teilweise anzeigen können. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass die Temperatur einen Einfluss auf die Dichte und Zusammensetzung der Vegetation ausübt und folglich einen indirekten Effekt auf die Produktion der LMW Fettsäuren hat. Im Gegensatz dazu konnte durch den Vergleich mit Mg kein direkter Zusammenhang zwischen den LMW Fettsäuren und der Niederschlagsmenge festgestellt werden. Die indirekte Beeinflussung der Vegetation durch diesen Parameter konnte von den Analyten nicht wiedergegeben werden.

Aus den beiden letzten Kapitel der Tropfwasser- und Stalagmitergebnisse lässt sich zusammenfassend schließen, dass die Fettsäuren das Potential besitzen Umweltveränderungen widerzuspiegeln. Aufgrund ihrer komplexen Quellen stellen sie allerdings alleine keinen optimalen Vegetations-Proxy dar. Die Kombination ihrer Analyse mit eindeutigeren Biomarkern kann jedoch wertvolle Informationen über Vegetations- und Bodenentwicklungen liefern.

## 5.5 *Non-target* Analyse der Stalagmitproben NG01 mittels UHPLC-(-)ESI-HRMS

### 5.5.1 Datenauswertung der ermittelten $m/z$ -Verhältnisse

Das *non-target screening* der Stalagmitproben NG01 wurde wie in Kapitel 0 beschrieben durchgeführt. Die resultierenden Daten wurden mit Hilfe kommerziell erhältlicher Software (SIEVE® und XCalibur®, Thermo Scientific) ausgewertet. Dabei wurde SIEVE® verwendet, um Signale zu ermitteln, die oberhalb eines Schwellenwertes von  $1e06$  *Counts* liegen und sich folglich signifikant vom Untergrundsignal unterscheiden. Das Programm liefert somit eine Liste der entsprechenden  $m/z$ -Verhältnisse mit zugehörigen Retentionszeiten (RT), welche in der Stalagmitprobe vorzufinden sind. Zudem ist die Software in der Lage Signale sowohl von Addukten oder Cluster-Ionen als auch von Isotopen zu erkennen, welche die gleiche RT, allerdings andere exakte Massen als das Molekülion aufweisen. Dadurch wird ausgeschlossen, dass diese Ionen irrtümlich als unabhängige Molekülionen ausgewertet werden.

Es wurden mehr als 400  $m/z$ -Verhältnisse von Sieve in den Stalagmitproben detektiert. Die Zuordnung der jeweiligen Summenformeln erfolgte manuell mit XCalibur®. Hierbei wurden lediglich  $m/z$ -Verhältnisse ausgewertet, die sowohl von Sieve vorgeschlagen wurden als auch ein ausgeprägtes Signal im Chromatogramm erkennen lassen. Ein solches Beispielchromatogramm des Blindwertes und der Realprobe von  $m/z$  121,0296 ist im Anhang unter Kapitel 7.1.5 veranschaulicht. Die verwendeten Elemente zur Bestimmung der Summenformel waren Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel mit einer eingeschränkten Häufigkeit von:  $^{12}\text{C}$ : 1 bis 30,  $^1\text{H}$ : 0 bis 60,  $^{16}\text{O}$ : 0 bis 15,  $^{14}\text{N}$ : 0 bis 10 und  $^{32}\text{S}$ : 0 bis 10. Des Weiteren wurden ausschließlich Summenformeln berücksichtigt, welche eine Massengenauigkeit von  $\pm 2$  ppm und positive, geradzahlige Doppelbindungsäquivalente (DBÄ) aufweisen. Ebenso wurden Summenformeln ausgeschlossen, welche zu viele Heteroatome, DBÄ oder unvernünftige H:C-/ O:C-Verhältnisse aufweisen und somit chemisch nicht sinnvoll sind. Daraus resultieren 79 Verbindungen, denen eine Summenformel zugeordnet werden kann. Diese weisen teilweise mehrere Signale bei unterschiedlicher RT auf, was darauf hindeutet, dass verschiedene Isomere vorliegen.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen aufgelistet. Hierbei beinhaltet Tabelle 7 alle Verbindungen die nur C, H und O enthalten, während in Tabelle 8 Verbindungen aufgelistet sind die noch zusätzlich N enthalten. Es sind keine Verbindungen identifiziert worden, welche ebenfalls S enthalten. Einige der gefundenen CHO-/ CHNO-Verbindungen wurden bereits in der Literatur beschrieben (z. B. [Mazzoleni *et al.*, 2010], [Lin *et al.*, 2012], [Zhao *et al.*, 2013]), was auch in der Tabelle ver-

merkt ist. Dies bestätigt die korrekte Zuordnung der Summenformel zu dem ermittelten  $m/z$ -Verhältnis.

**Tabelle 7:** CHO enthaltende organische Verbindungen bestimmt durch *non-target* Analyse der NG01-Proben mittels UHPLC-(–)ESI-HRMS.

Nr.	$m/z$ (ermittelt)	RT / min	Summenformel des Moleküliions [M–H] <sup>–</sup>	DBÄ	Massengenauigkeit / ppm	Literatur
1	121,0296	1,97, 2,15	C7 H5 O2	5	0,225	Mazzoleni 2010 (Nebel)
2	131,0351	0,89, 1,27	C5 H7 O4	2	0,748	Mazzoleni 2010 (Nebel)
3	171,0663	2,57	C8 H11 O4	3	0,163	Kourtchev 2014, Claeys 2009, Hoffmann 1998 (Aerosol), Mazzoleni 2010 (Nebel)
4	173,082	2,50, 2,82	C8 H13 O4	2	-0,133	Mazzoleni 2010 (Nebel)
5	175,0612	1,82	C7 H11 O5	2	0,21	Lin 2012 (Aerosol), Mazzoleni 2010 (Nebel)
6	183,0299	2,28	C8 H7 O5	5	-0,036	Zhao 2013 (Wolkenwasser), Lin 2012 (Aerosol), Mazzoleni 2010 (Nebel)
7	187,1341	7,20, 7,59	C10 H19 O3	1	0,333	Mazzoleni 2010 (Nebel)
8	215,1653	2,13, 7,73	C12 H23 O3	1	-0,13	Mazzoleni 2010 (Nebel)
9	229,1811	7,84	C13 H25 O3	1	0,623	Lin 2012 (Aerosol), Mazzoleni 2010 (Nebel)
10	307,0827	2,90	C15 H15 O7	8	1,226	Zhao 2013 (Wolkenwasser), Lin 2012 (Aerosol), Mazzoleni 2010 (Nebel)
11	309,0983	2,55, 7,51	C15 H17 O7	7	0,757	Zhao 2013 (Wolkenwasser), Lin 2012 (Aerosol), Mazzoleni 2010 (Nebel)
12	311,0775	2,31	C14 H15 O8	7	0,881	Zhao 2013 (Wolkenwasser), Lin 2012 (Aerosol), Mazzoleni 2010 (Nebel)
13	323,1141	6,76	C16 H19 O7	7	0,352	Zhao 2013 (Wolkenwasser), Lin 2012 (Aerosol), Mazzoleni 2010 (Nebel)
14	325,0931	3,53	C15 H17 O8	7	0,672	Lin 2012 (Aerosol), Mazzoleni 2010 (Nebel)
15	327,0724	2,07	C14 H15 O9	7	0,897	Zhao 2013 (Wolkenwasser), Lin 2012 (Aerosol)
16	335,0776	2,08	C16 H15 O8	9	1,013	Zhao 2013 (Wolkenwasser), Lin 2012 (Aerosol), Mazzoleni 2010 (Nebel)
17	335,1141	3,05	C17 H19 O7	8	1,612	Lin 2012 (Aerosol), Mazzoleni 2010 (Nebel)
18	337,0569	2,61, 2,84	C15 H13 O9	9	0,756	Zhao 2013 (Wolkenwasser), Lin 2012 (Aerosol)
19	339,0723	1,77	C15 H15 O9	8	0,415	Zhao 2013 (Wolkenwasser), Lin 2012 (Aerosol)
20	341,0879	2,00, 2,35	C15 H17 O9	7	0,161	Zhao 2013 (Wolkenwasser), Lin 2012 (Aerosol)
21	341,1245	2,33	C16 H21 O8	6	0,762	Lin 2012 (Aerosol), Mazzoleni 2010 (Nebel)
22	349,1294	3,88	C18 H21 O7	8	0,339	Lin 2012 (Aerosol), Mazzoleni 2010 (Nebel)
23	353,1245	2,58	C17 H21 O8	7	0,736	Zhao 2013 (Wolkenwasser), Lin 2012 (Aerosol), Mazzoleni 2010 (Nebel)
24	363,1089	2,32	C18 H19 O8	9	0,953	Zhao 2013 (Wolkenwasser), Lin 2012 (Aerosol), Mazzoleni 2010 (Nebel)
25	363,1452	4,51	C19 H23 O7	8	0,677	Lin 2012 (Aerosol), Mazzoleni 2010 (Nebel)
26	365,0879	2,34	C17 H17 O9	9	0,317	Zhao 2013 (Wolkenwasser), Lin 2012 (Aerosol)

## Ergebnisse und Diskussion

27	381,0829	2,10	C17 H17 O10	9	0,595	Zhao 2013 (Wolkenwasser)
28	381,1193	2,36	C18 H21 O9	8	0,493	Zhao 2013 (Wolkenwasser), Lin 2012 (Aerosol)
29	383,0986	1,94	C17 H19 O10	8	0,686	Zhao 2013 (Wolkenwasser), Lin 2012 (Aerosol)
30	391,1039	2,15	C19 H19 O9	10	1,247	Zhao 2013 (Wolkenwasser)
31	393,0831	2,55	C18 H17 O10	10	0,888	Zhao 2013 (Wolkenwasser)
32	395,0984	2,17, 2,29, 2,34	C18 H19 O10	9	0,125	Zhao 2013 (Wolkenwasser)
33	397,0777	1,85, 2,35	C17 H17 O11	9	0,236	Zhao 2013 (Wolkenwasser)
34	397,1141	2,51	C18 H21 O10	8	0,291	Zhao 2013 (Wolkenwasser)
35	401,1092	1,93	C17 H21 O11	7	0,565	Zhao 2013 (Wolkenwasser)
36	407,0986	2,25	C19 H19 O10	10	0,571	Zhao 2013 (Wolkenwasser)
37	407,1349	2,08, 4,62	C20 H23 O9	9	0,325	Zhao 2013 (Wolkenwasser)
38	411,0935	2,32	C18 H19 O11	9	0,464	Zhao 2013 (Wolkenwasser)
39	411,1299	2,50, 3,02	C19 H23 O10	8	0,666	
40	413,0731	2,11, 2,08	C17 H17 O12	9	1,308	
41	413,1092	2,08, 2,30	C18 H21 O11	8	0,697	
42	421,1143	1,86	C20 H21 O10	10	0,637	Zhao 2013 (Wolkenwasser)
43	425,1094	3,31	C19 H21 O11	9	1,108	Zhao 2013 (Wolkenwasser)
44	427,1247	2,59	C19 H23 O11	8	0,186	
45	437,1092	2,78	C20 H21 O11	10	0,519	Zhao 2013 (Wolkenwasser)
46	439,0886	2,07	C19 H19 O12	10	0,965	Zhao 2013 (Wolkenwasser)
47	439,1249	2,40	C20 H23 O11	9	0,737	Zhao 2013 (Wolkenwasser)
48	441,068	1,58	C18 H17 O13	10	1,131	
49	441,1042	2,50	C19 H21 O12	9	0,835	
50	443,1198	2,09	C19 H23 O12	8	0,568	
51	451,0887	2,42	C20 H19 O12	11	1,075	
52	453,1042	3,30, 4,60	C20 H21 O12	10	0,745	
53	453,1406	2,92	C21 H25 O11	9	0,861	Zhao 2013 (Wolkenwasser)
54	455,1198	1,96, 2,37	C20 H23 O12	9	0,687	
55	457,0993	1,79	C19 H21 O13	9	1,115	
56	465,068	2,40	C20 H17 O13	12	1,073	
57	469,0991	1,77	C20 H21 O13	10	0,697	
58	469,1356	2,49	C21 H25 O12	9	1,003	
59	471,0788	1,83	C19 H19 O14	10	1,371	
60	471,1148	1,87	C20 H23 O13	9	0,835	
61	473,0941	1,68	C19 H21 O14	9	0,925	
62	483,1148	4,03	C21 H23 O13	10	0,814	

**Tabelle 8:** CHNO enthaltende organische Verbindungen bestimmt durch non-target Analyse der NG01-Proben mittels UHPLC-(–)ESI-HRMS.

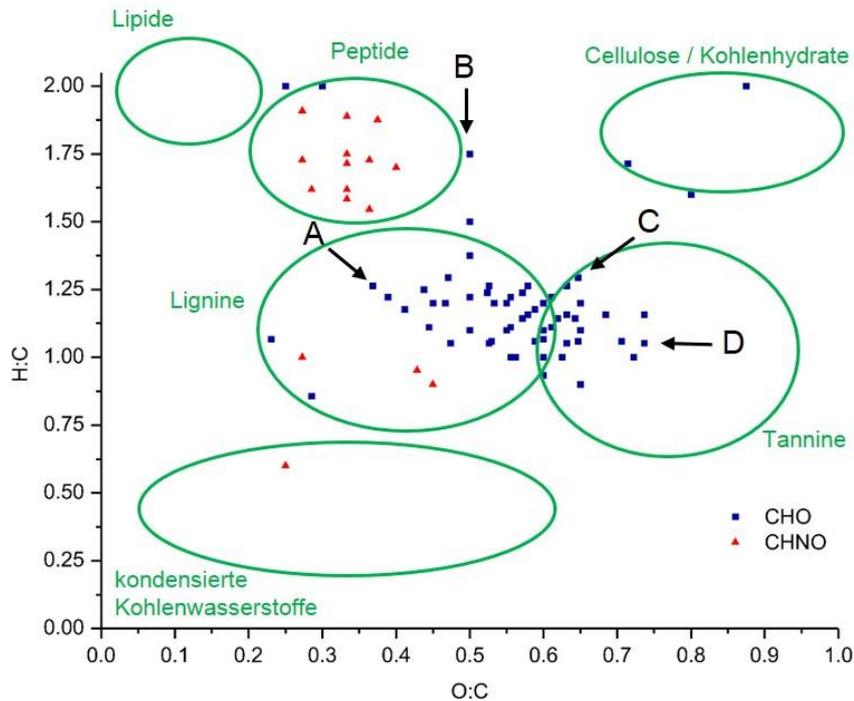
Nr.	<i>m/z</i> (ermittelt)	RT / min	Summenformel des Moleküliions [M–H] <sup>–</sup>	DBÄ	Massengenauigkeit / ppm	Literatur
1	172,098	1,91, 2,21, 2,30, 2,47	C8 H14 O3 N	2	0,26	Lin 2012 (Aerosol)
2	186,1137	2,33	C9 H16 O3 N	2	0,516	Lin 2012 (Aerosol)
3	204,0666	2,89, 2,45	C11 H10 O3 N	7	0,017	Lin 2012 (Aerosol), Mazzoleni 2010 (Nebel)
4	214,1452	3,76	C11 H20 O3 N	2	1,568	Lin 2012 (Aerosol)
5	216,1241	2,09	C10 H18 O4 N	2	-0,005	
6	226,1086	2,3	C11 H16 O4 N	4	0,376	Lin 2012 (Aerosol), Mazzoleni 2010 (Nebel)
7	228,1241	2,52	C11 H18 O4 N	3	-0,005	Lin 2012 (Aerosol), Mazzoleni 2010 (Nebel)
8	240,1243	2,73	C12 H18 O4 N	4	0,631	Lin 2012 (Aerosol), Mazzoleni 2010 (Nebel)
9	242,1399	2,42	C12 H20 O4 N	3	0,522	Lin 2012 (Aerosol), Mazzoleni 2010 (Nebel)
10	298,1301	2,32, 4,04	C14 H20 O6 N	5	0,199	Lin 2012 (Aerosol), Mazzoleni 2010 (Nebel)
11	421,1426	7,50	C11 H25 O13 N4	1	0,518	
12	429,1153	2,58	C17 H21 O11 N2	8	0,567	Zhao 2013 (Wolkenwasser)
13	465,2467	3,24	C21 H33 O6 N6	8	0,061	
14	467,2627	4,10	C21 H35 O6 N6	7	0,726	
15	481,2418	2,97	C21 H33 O7 N6	8	0,354	
16	481,2782	6,41	C22 H37 O6 N6	7	0,399	
17	483,2576	2,82	C21 H35 O7 N6	7	0,616	

### 5.5.2 Van-Krevelen-Diagramm der CHO-/ CHNO-Verbindungen

Die ermittelten CHO- und CHNO-Verbindungen können in einem Van-Krevelen-Diagramm [van Krevelen, 1950] veranschaulicht werden (Abbildung 71). In diesem Diagramm werden die O:C gegen die H:C-Verhältnisse der einzelnen Komponenten gegeneinander aufgetragen. Dabei tauchen bestimmte Gruppen von Biomolekülen in charakteristischen Regionen im Van-Krevelen-Diagramm auf ([Kim *et al.*, 2003], [Sleighter & Hatcher, 2007], [Reemtsma, 2009]). So werden z. B. die Lipide bei einem H:C-Verhältnis von etwa 2,00 und einem O:C-Verhältnis unter 0,25 eingeordnet. Allerdings ist die für diese Analyse verwendete Extraktionsmethode mit ACN/H<sub>2</sub>O zu polar, so dass keine Lipide erfasst werden können. Daher sind keine Fettsäuren, wie C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub>, bei diesem *non-target screening* identifiziert worden und somit nicht im Van-Krevelen-

Diagramm enthalten. Aus dem gleichen Grund werden auch keine kondensierten Kohlenwasserstoffe in diesem Van-Krevelen-Diagramm gefunden.

Überdies sind Abbildung 71 ausgeprägte lineare Zusammenhänge der Verbindungen zu entnehmen, welche chemische Reaktionswege darstellen. Dadurch können (in Pfeilrichtung) A: Dealkylierungen, B: Dehydrierungen, C: Kondensationen und D: Reduktionen nachvollzogen werden [Reinhardt *et al.*, 2007].

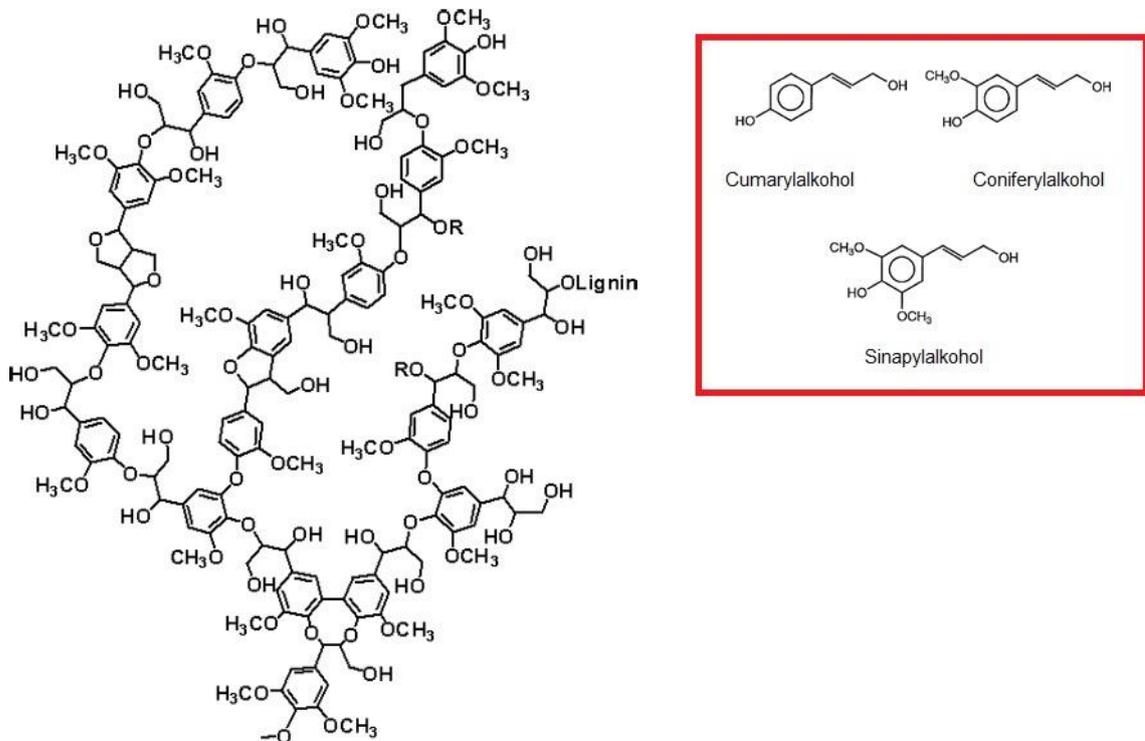


**Abbildung 71:** Van-Krevelen-Diagramm der mittels HRMS ermittelten Summenformeln der CHO- (blau) und CHNO-Verbindungen (rot) in Stalagmit NG01 mit charakteristischen Regionen verschiedener Biomolekülgruppen ([Kim *et al.*, 2003], [Sleighter & Hatcher, 2007], [Reemtsma, 2009]); Pfeile markieren Reaktionswege: A: Dealkylierung, B: Dehydrierung, C: Kondensation und D: Reduktion.

Die ermittelten CHNO-Verbindungen befinden sich mit einem mittleren H:C-Verhältnis von 1,59 und O:C-Verhältnis von 0,40 größtenteils in einer charakteristischen Region für Peptide. Aufgrund der  $m/z$ -Verhältnisse zwischen etwa 170 und 480 handelt es sich dabei eher um kurzkettinge Oligopeptide als um langkettige Proteine, oder einzelne Aminosäuren. Einzelne Aminosäuren wurden bereits in früheren Studien in Speläothemen nachgewiesen [Lauritzen *et al.*, 1994]. Allerdings können Aminosäuren und Peptide nicht als charakteristische Vegetations-*Proxies* verwendet werden, da sie neben pflanzlichen Zellen ebenso in tierischen oder prokaryotischen Zellen vorkommen. Lediglich wenn die genaue Aminosäuresequenz bekannt wäre, könnten die Peptide als eindeutige Biomarker eingesetzt werden.

Die ermittelten CHO-Verbindungen weisen ein mittleres H:C-Verhältnis von 1,21 und O:C-Verhältnis von 0,56 auf. Damit befindet sich der Großteil dieser Verbindungen

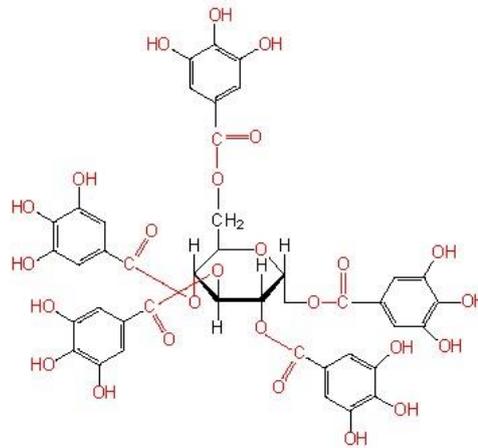
dungen im Bereich der Lignine. Lignine sind phenolische Makromoleküle, die sich aus hauptsächlich drei Monomeren (Monolignole), Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol, zusammensetzen [Simoneit *et al.*, 1993]. Ein Strukturbeispiel ist in Abbildung 72 gegeben. Sie sind ein fester Bestandteil pflanzlicher Zellwände und sie bewirken die Verholzung der Zellen, wodurch das pflanzliche Gewebe verfestigt wird. Damit stellen Lignine charakteristische Biomarker dar, welche ausschließlich von der Vegetation stammen. Des Weiteren können Lignine die Stabilität höherer Pflanzen gewährleisten, sodass ihre Bildung direkt mit der Entwicklung der Vegetation verknüpft ist. Da es sich jedoch bei Lignin selbst um ein festes Biopolymer handelt, können nur seine hydrophilen Abbauprodukte mit dem Regenwasser in die Höhle transportiert und somit in Speläothemen präserviert werden.



**Abbildung 72:** Strukturbeispiel eines Lignins mit entsprechenden Monolignolen; modifiziert nach [Simoneit *et al.*, 1993] und [Lignoworks, 2014].

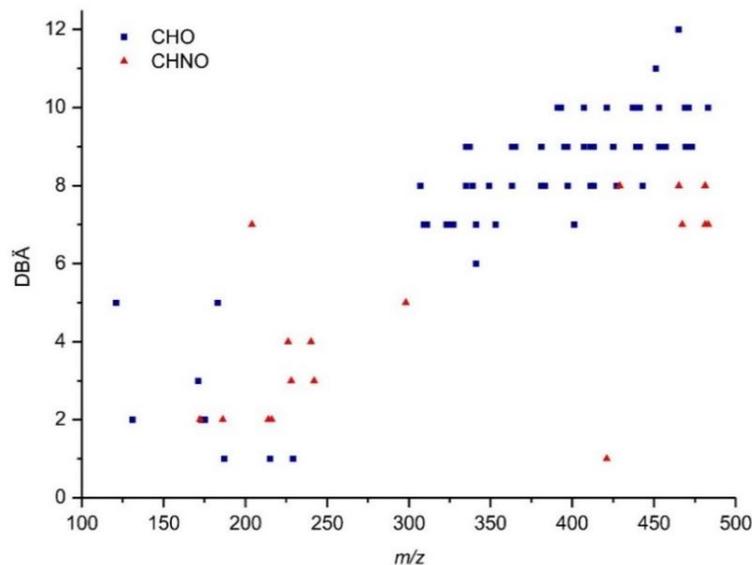
Zusätzlich dazu tauchen auch einige CHO-Verbindungen im Bereich der Tannine auf. Tannine sind Polyhydroxyphenole, welche Quervernetzungen zu Makromolekülen, z. B. Proteinen oder Cellulose, ausbilden. Ein Strukturbeispiel dieser Biomolekülgruppe, bei dem Reste der Gallussäure über Esterbindungen mit Glucose verknüpft sind, ist in Abbildung 73 dargestellt. Aufgrund ihrer vielen Hydroxyl- und Estergruppen (rot markiert in Abbildung 73) sind sie hydrophil und können über das Tropfwasser in den Stalagmiten gelangen. Da Tannine pflanzliche Gerbstoffe sind, die in verschiede-

nen Bäumen, Büschen und Sträuchern vorkommen, könnten sie wie bereits die Lignine als charakteristische Vegetations-*Proxies* verwendet werden.



**Abbildung 73:** Strukturbeispiel eines Tannins [Sengbusch, 2003].

Um die mögliche Struktur der CHO-Verbindungen weiter aufzuklären und eine Aussage über die Sättigung der Verbindungen zu treffen, wird das  $m/z$ -Verhältnis gegen die DBÄ aufgetragen (Abbildung 74).



**Abbildung 74:**  $m/z$  aufgetragen gegen DBÄ der ermittelten CHO- (blau) und CHNO-Verbindungen (rot).

Abbildung 74 macht deutlich, dass die meisten CHO-Verbindungen hauptsächlich DBÄ zwischen 7 und 12 mit einem  $m/z > 300$  innehaben. Dadurch wird deutlich, dass diese Verbindungen eine geringe Sättigung aufweisen. Laut Kourtchev et al. [Kourtchev et al., 2014] ist dieser Bereich, in welchem die CHO-Verbindungen liegen,

charakteristisch für aromatische Verbindungen. Dies unterstützt die Annahme, dass es sich bei diesen Verbindungen um Lignine und Tannine mit ihren phenolischen Strukturen handeln kann. Zudem sind bereits vereinzelt Studien bekannt, bei denen Bestandteile des Lignins in Stalagmitproben nachgewiesen wurden ([Blyth & Watson, 2009], [Blyth *et al.*, 2010]).

### 5.5.3 Zusammenfassung der *non-target* Analyse

Es wurde erstmalig ein *non-target screening* einer Speläothemprobe durchgeführt. Dies erfolgte am Stalagmiten NG01 aus dem Herbstlabyrinth-Adventhöhlen System mittels UHPLC-(–)ESI-HRMS. Im Rahmen dessen konnten 79 Verbindungen, welche C, H, O und N enthalten, mit zugehörigen Summenformeln und einer Massengenauigkeit von  $\pm 2$  ppm bestimmt werden. Um neue Biomolekülgruppen, die als mögliche Vegetations-*Proxies* eingesetzt werden können, zu bestimmen, wurde aus den ermittelten Ergebnissen ein Van-Krevelen-Diagramm erstellt. Dabei wurden allerdings keine unpolaren Substanzen; wie Lipide oder kondensierte Kohlenwasserstoffe, identifiziert, da diese Verbindungen nicht von der polaren Extraktionsmethode erfasst werden konnten.

Die Betrachtung des Van-Krevelen-Diagramms der CHNO-Verbindungen ließ vermuten, dass diese zu der Gruppe der Peptide gehören. Da Peptide allerdings, solange die genaue Aminosäuresequenz unbekannt ist, eine Vielzahl möglicher Quellen besitzen und somit keine eindeutigen Biomarker darstellen, sind sie weniger gut als Vegetations-*Proxies* geeignet. Für die CHO-Verbindungen hingegen wurde anhand des Van-Krevelen-Diagramms angenommen, dass sie teilweise den Ligninen und Tanninen angehören. Eine Auftragung des *m/z*-Verhältnisses gegen die DBÄ unterstützte diese Behauptung, da die Verbindungen viele Doppelbindungen und somit vermutlich aromatische Strukturen aufweisen. Solche sind sowohl in Ligninen als auch in Tanninen vorhanden. Zusätzlich wurden verschiedene Lignine bereits im Rahmen weniger früherer Studien nachgewiesen ([Blyth & Watson, 2009], [Blyth *et al.*, 2010]), wodurch die Vermutung bestätigt wird, dass einige der ermittelten CHO-Verbindungen den Ligninen zugeordnet werden können. Diese Biomoleküle treten ausschließlich in pflanzlichen Zellen auf und können infolgedessen als charakteristische Vegetations-*Proxies* verwendet werden.

Nichtsdestotrotz wurde bei dieser *non-target* Analyse zunächst darauf Wert gelegt festzustellen, welche Verbindungen generell in diesem Probenmaterial gefunden werden können. Im Anschluss daran muss überprüft werden, ob die ermittelten Biomolekülgruppen in verschiedenen Altern der Stalagmitproben Variationen aufweisen. Falls

ihre Konzentration über die verschiedenen Wachstumsphasen konstant ist, dann können diese Verbindungen nicht als *Vegetations-Proxies* verwendet werden.

## 6. Ausblick

Im Rahmen folgender Forschungsarbeiten soll die bestehende Fettsäuremethode [Bosle *et al.*, 2014] auf mehrere Stalagmitproben aus unterschiedlichen Gebieten angewendet werden. Hierzu bieten sich bereits verschiedene Standorte an. So gibt es zum einen mehrere Stalagmiten aus anderen deutschen Höhlensystemen, die Erkenntnisse über regionale Paläoumweltveränderungen liefern können. Zudem sollen Stalagmitproben aus anderen Klimazonen untersucht werden.

Das Höhlenmonitoring-Programm wird in der Herbstlabyrinth-Adventhöhle nach wie vor monatlich durchgeführt. Daher sollen weiterhin Tropfwasserproben bzgl. Fettsäuren analysiert werden. Ein dadurch resultierender Verlauf über einen längeren Zeitraum von mindestens drei Jahren kann saisonale Variationen deutlicher veranschaulichen als bisher möglich. Somit sollen rezente Prozesse verständlich gemacht und Zusammenhänge zu Klima- und Vegetationsveränderungen noch weiter erläutert werden.

Ergänzend soll eine *non-target* Analyse der Tropfwasserproben durchgeführt werden. Dabei können zunächst die gleichen Messparameter wie bereits bei den Stalagmitproben verwendet werden, sodass die erhaltenen Ergebnisse vergleichbar sind. Damit lassen sich organische Verbindungen oder Verbindungsklassen identifizieren, die entweder im Wasser vorhanden sind, allerdings nicht in das Calcitgerüst des Stalagmiten eingebaut werden, oder aber im Wasser zu niedrige Konzentrationen aufweisen und dafür im Stalagmiten angereichert vorliegen.

Die durch das *non-target screening* gewonnenen Erkenntnisse sollen dazu führen neue Methodenentwicklungen für *target* Analysen und folglich folgende Forschungsprojekte gezielt zu planen. Dabei sollen vor allem Biomarker untersucht werden, welche eindeutige Vegetationsmarker sind und speziellen Quellen zugeordnet werden können, z. B. Lignine. Die Analyse dieser Vegetationsmarker in Kombination mit den Fettsäureergebnissen kann die Aufklärung der möglichen Quellen der Fettsäuren verbessern.

Des Weiteren kann die Extraktionsmethode der *non-target* Analyse noch optimiert werden, um weitere organische Verbindungen zu identifizieren. Da die Analyten lediglich im Spurenbereich in den Speläothempuben vorliegen, ist die Probenanreicherung der ausschlaggebende Schritt. Daher sollen durch eine fraktionierte Extraktion sowohl polare als auch unpolare Verbindungen für die *non-target* Analyse zugänglich gemacht werden. Im Anschluss sollen organische Biomarker, welche markante Signale in der *non-target* Analyse der Stalagmit- und Tropfwasserproben erzeugen, in Proben

von verschiedenen Standorten bestimmt werden. Dadurch soll nachgewiesen werden, welche der neu identifizierten Biomarker in unterschiedlichen Regionen auftauchen. Somit kann ihr Potential zur weitverbreiteten Anwendung als *Proxy* untersucht werden.

## 7. Anhang

### 7.1 Zusatzmaterial

#### 7.1.1 Probennahme

**Tabelle 9:** Probennahmeplan der Tropfstelle T1, Bunkerhöhle.

Tropfstelle	Probennahme Monat	Füllmenge in g
T1	Okt 12	0,0
	Dez 12	0,0
	Feb 13	67,7
	Apr 13	68,4
	Jun 13	67,3
	Aug 13	72,8

**Tabelle 10:** Probennahmeplan der Tropfstelle T8, Bunkerhöhle.

Tropfstelle	Probennahme Monat	Füllmenge in g
T8	Okt 12	71,07
	Dez 12	66,84
	Feb 13	68,68
	Apr 13	0,0
	Jun 13	0,0
	Aug 13	0,0

**Tabelle 11:** Probennahmeplan der Tropfstelle T1, Herbstlabyrinth-Adventhöhle.

Tropfstelle	Probennahme Monat	Füllmenge in g
T1	Anfang Sep 12	105,9
	Ende Sep 12	123,4

	Okt 12	71,8
	Nov 12	92,0
	Anfang Dez 12	109,4
	Ende Dez 12	100,0
	Jan 13	71,5
	Feb 13	75,7
	Mar 13	71,0
	Apr 13	78,6
	Mai 13	90,4
	Jun 13	95,0
	Jul 13	113,4
	Aug 13	73,0
	Sep 13	99,3
	Okt 13	94,0
	Nov 13	66,9
	Dez 13	81,6
	Jan 14	67,4
	Feb 14	90,1
	Mar 14	53,4
	Apr 14	93,1

**Tabelle 12:** Probennahmeplan der Tropfstelle T2, Herbstlabyrinth-Adventhöhle.

Tropfstelle	Probennahme Monat	Füllmenge in g
T2	Anfang Sep 12	0,0
	Ende Sep 12	0,0
	Okt 12	0,0
	Nov 12	0,0
	Anfang Dez 12	0,0
	Ende Dez 12	225,8
	Jan 13	127,8
	Feb 13	163,1

	Mar 13	165,2
	Apr 13	178,2
	Mai 13	87,0
	Jun 13	62,7
	Jul 13	23,2
	Aug 13	18,5
	Sep 13	0,0
	Okt 13	0,0
	Nov 13	117,7
	Dez 13	106,0
	Jan 14	118,4
	Feb 14	115,4
	Mar 14	0,0
	Apr 14	0,0

**Tabelle 13:** Probennahmeplan der Tropfstelle T5, Herbstlabyrinth-Adventhöhle.

Tropfstelle	Probennahme Monat	Füllmenge in g
T5	Anfang Sep 12	113,8
	Ende Sep 12	115,6
	Okt 12	83,2
	Nov 12	85,7
	Anfang Dez 12	0,0
	Ende Dez 12	87,7
	Jan 13	75,8
	Feb 13	108,8
	Mar 13	0,0
	Apr 13	0,0
	Mai 13	97,1
	Jun 13	0,0
	Jul 13	125,0

	Aug 13	99,8
	Sep 13	100,5
	Okt 13	91,7
	Nov 13	85,7
	Dez 13	90,9
	Jan 14	79,9
	Feb 14	88,7
	Mar 14	82,3
	Apr 14	86,3

**Tabelle 14:** Probennahmeplan des Poolwassers, Herbstlabyrinth-Adventhöhle.

Tropfstelle	Probennahme Monat	Füllmenge in g
PW	Anfang Sep 12	106,7
	Ende Sep 12	0,0
	Okt 12	0,0
	Nov 12	97,0
	Anfang Dez 12	74,6
	Ende Dez 12	0,0
	Jan 13	96,5
	Feb 13	60,4
	Mar 13	108,2
	Apr 13	121,7
	Mai 13	90,7
	Jun 13	85,4
	Jul 13	78,2
	Aug 13	96,4
	Sep 13	99,9
	Okt 13	80,0
	Nov 13	77,8
	Dez 13	88,2

	Jan 14	75,0
	Feb 14	73,3
	Mar 14	93,6
	Apr 14	93,2

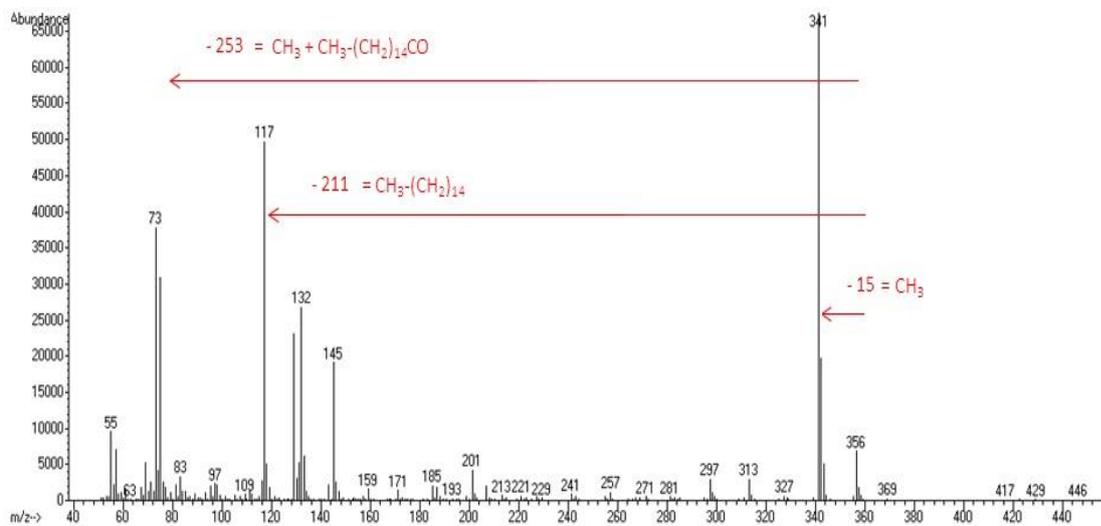
**Tabelle 15:** Probennahmeplan des Stalagmiten NG01, Herbstlabyrinth-Adventhöhle.

Stalagmit	Tiefe in cm	Gewicht in g
NG01	0,6	0,68
	1,5	0,88
	1,9	0,90
	3,4	3,17
	4,8	1,08
	8,1	1,82
	9,9	1,79
	11,2	0,88
	13,0	2,15
	13,5	1,57
	14,8	3,73
	15,8	2,77
	21,0	1,69
	23,4	0,90
	25,5	1,69
	27,2	2,45
	28,5	2,27
	29,6	2,74
	34,0	1,68
	37,7	0,88
	40,0	2,54
	41,1	1,81
	48,9	2,66

**Tabelle 16:** Probennahmeplan der *non-target* Analyse Proben, Herbstlabyrinth-Adventhöhle.

Stalagmit	Tiefe in cm	Gewicht in g
NG01	0,0-1,5	2,6
	5,0-6,0	2,9
	11,0-12,5	4,8
	19,5-20,5	2,5
	29,0-30,5	3,2
	44,5-45,5	3,6

### 7.1.2 Massenspektrum GC-MS

**Abbildung 75:** Massenspektrum von  $\text{C}_{18}$  mit charakteristischen Fragmentationen; Messung mittels GC-MS.

### 7.1.3 Ergebnisse der $^{230}\text{Th}/\text{U}$ -Datierung

Tabelle 17: Ergebnisse der  $^{230}\text{Th}/\text{U}$ -Datierung mit entsprechenden Fehlern.

Tiefe / mm	$^{238}\text{U}$ / $\mu\text{g g}^{-1}$	$2\sigma$	$^{232}\text{Th}$ / $\text{ng g}^{-1}$	$2\sigma$	$(^{234}\text{U}/^{238}\text{U})$	$2\sigma$	$(^{230}\text{Th}/^{238}\text{U})$	$2\sigma$	Alter unkorr. / ka	Alter korr. / ka	$2\sigma$
12	0,0822	0,0005	0,110	0,001	1,3176	0,0019	0,00685	0,00052	0,599	0,570	0,042
20,5	0,142	0,001	0,093	0,003	1,335	0,011	0,00849	0,00050	0,711	0,696	0,042
27,5	0,238	0,001	0,313	0,005	1,3603	0,0023	0,01730	0,00048	1,424	1,397	0,040
36	0,0953	0,0007	0,128	0,002	1,3760	0,0041	0,02018	0,00048	1,641	1,612	0,038
46	0,305	0,002	0,364	0,004	1,3802	0,0020	0,02533	0,00040	2,046	2,021	0,030
50	0,213	0,001	0,404	0,004	1,3812	0,0021	0,02689	0,00044	2,184	2,145	0,036
64	0,1507	0,0008	0,0482	0,0005	1,3707	0,0022	0,02735	0,00053	2,206	2,199	0,043
<b>Hiatus 70</b>											
71,5	0,1178	0,0007	0,077	0,001	1,4581	0,0022	0,06496	0,00093	4,978	4,966	0,072
78	0,124	0,001	0,0366	0,0005	1,472	0,014	0,0666	0,0012	5,05	5,05	0,10
98,5	0,155	0,002	0,081	0,002	1,473	0,016	0,0699	0,0014	5,30	5,29	0,13
116	0,160	0,001	0,127	0,002	1,4897	0,0099	0,07965	0,00094	5,998	5,983	0,082
150	0,178	0,001	0,077	0,001	1,5140	0,0027	0,08544	0,00074	6,332	6,324	0,057
191,5	0,186	0,002	0,0567	0,0008	1,544	0,016	0,0962	0,0014	7,00	7,00	0,13
229	0,181	0,002	0,0236	0,0005	1,548	0,018	0,1020	0,0019	7,42	7,42	0,17
237	0,144	0,002	0,0200	0,0004	1,556	0,016	0,1079	0,0017	7,82	7,81	0,15
250	0,0944	0,0006	0,0264	0,0004	1,5456	0,0036	0,1030	0,0012	7,510	7,505	0,090
260	0,194	0,001	0,0633	0,0007	1,5488	0,0023	0,10390	0,00080	7,559	7,553	0,061
271,5	0,227	0,001	0,147	0,002	1,5501	0,0022	0,10532	0,00083	7,665	7,653	0,064
<b>Hiatus 286</b>											
294	0,188	0,001	0,0208	0,0003	1,5858	0,0021	0,1234	0,0014	8,81	8,81	0,10
336	0,170	0,001	0,0338	0,0004	1,5974	0,0022	0,1291	0,0010	9,158	9,155	0,078
394	0,1508	0,0009	1,18	0,01	1,6101	0,0027	0,1423	0,0015	10,184	10,05	0,11
450	0,0598	0,0004	0,0199	0,0003	1,6211	0,0040	0,1519	0,0014	10,68	10,68	0,10
480	0,1272	0,0008	0,136	0,002	1,6539	0,0022	0,1607	0,0011	11,110	11,092	0,083
498	0,1085	0,0006	0,266	0,003	1,6639	0,0027	0,1622	0,0012	11,171	11,130	0,088

### 7.1.4 Ergebnisse des Altersmodells

**Tabelle 18:** Alter der NG01-Proben, welche für die Fettsäureanalyse verwendet wurden.

Tiefe in cm	Alter in ka
0,6	0,217
1,5	0,538
1,9	0,644
3,4	1,694
4,8	2,099
8,1	5,082
9,9	5,304
11,2	5,884
13,0	6,115
13,5	6,176
14,8	6,343
15,8	6,470
21,0	7,167
23,4	7,399
25,5	7,541
27,2	7,652
28,5	7,747
29,6	8,714
34,0	9,266
37,7	9,762
40,0	10,063
41,1	10,205
48,9	11,156

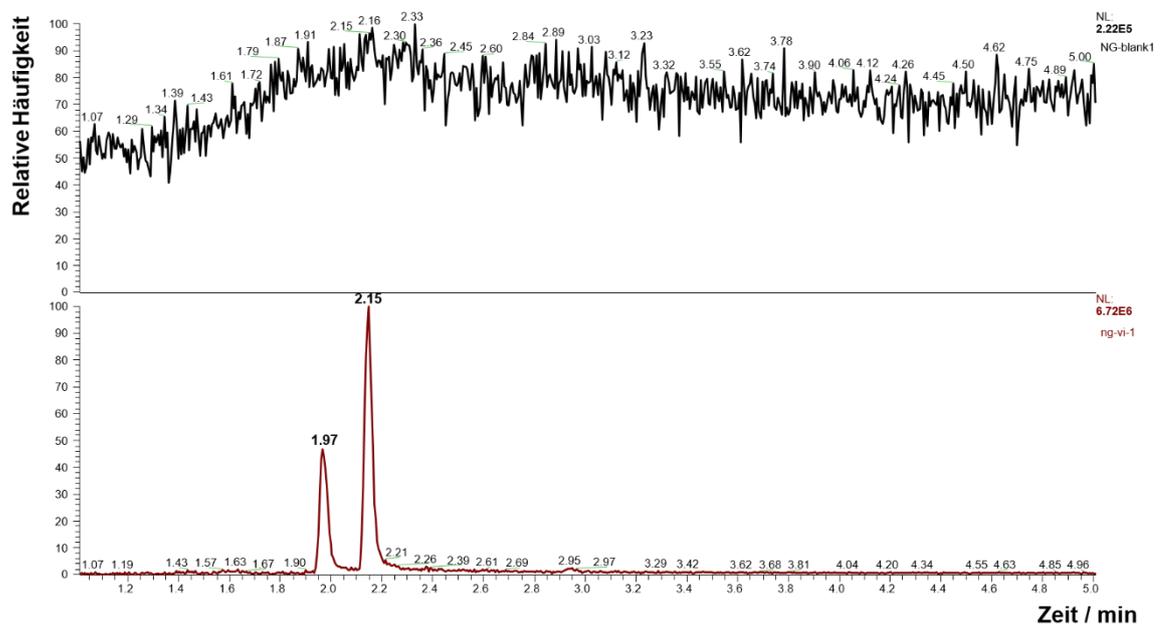
7.1.5 Chromatogramm *non-target screening*

Abbildung 76: EIC von  $m/z$  121,0296 ; oben: Blindprobe, unten: Realprobe NG01.

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ACP	Acyl-Carrier-Protein
AD	Anno Domini
ATP	Adenosintriphosphat
BP	<i>before present</i> (vor Heute: Bezugspunkt 1950)
CID	<i>collision induced dissociation</i> (stoßinduzierte Dissoziation)
CoA	Coenzym A
CRM	<i>charged residue model</i> (Modell des geladenen Rückstandes)
DBÄ	Doppelbindungsäquivalente
DCM	Dichlormethan
DOM	<i>Dissolved organic matter</i> (gelöstes organisches Material)
EI	Elektronenstoßionisation
EIC	<i>extracted ion chromatogram</i> (Massenspur)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrosprayionisation
eV	Elektronenvolt
FAS	Fettsäuresynthase
FT	Fourier-Transformation
GC	Gaschromatographie
GDGT	Glyceroldialkylglyceroltetraether
HMW	<i>high molecular weight</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigchromatographie)
HR	<i>high resolution</i> (Hochauflösung)
ICP	induktiv gekoppeltes Plasma
IEM	<i>ion emission model</i> (Ionenemissionsmodell)
LLE	Flüssig/Flüssig Extraktion
LMW	<i>low molecular weight</i>
LOD	<i>limit of detection</i> (Nachweisgrenze)
LOQ	<i>limit of quantification</i> (Bestimmungsgrenze)
m	Steigung
MC	Multicollector
MeOH	Methanol

MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse zu Ladung (-Verhältnis)
NG	Nordgang
PW	Poolwasser
QIT	<i>Quadrupol ion trap</i> (Quadrupol Ionenfalle)
<i>r</i>	<i>recovery</i> (Wiederfindungsrate)
<i>R</i>	<i>resolution</i> (Auflösung)
R	Korrelationskoeffizient
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
RF	<i>radio frequency</i> (Radiofrequenz)
RSD	<i>relative standard deviation</i> (Relative Standardabweichung)
RT	<i>retention time</i> (Retentionszeit)
$\sigma$	Standardabweichung
SIM	<i>selected ion monitoring</i> (selektiver Aufnahme-modus)
SPE	Festphasenextraktion
T	Tropfstelle
TIC	<i>total ion current</i> (Totalionenstrom)
UHPLC	<i>Ultra high performance liquid chromatography</i>

### 7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Charakteristische Speläothemformationen, Herbstlabyrinth-Adventhöhle. .....	17
Abbildung 2: Modell eines Karstsystems mit den einzelnen chemischen Prozessen, die zur Speläothembildung führen; modifiziert nach [Fairchild <i>et al.</i> , 2007]. .....	18
Abbildung 3: Abhängigkeit des Stalagmitwachstums von der Tropfrate; modifiziert nach [Fairchild <i>et al.</i> , 2007]. .....	19
Abbildung 4: Schematischer Querschnitt eines Stalagmiten; modifiziert nach [Fairchild <i>et al.</i> , 2006]. .....	20
Abbildung 5: Rekonstruierte Durchschnittstemperaturen ( $T_{DJF}$ : Januar, $T_{JJA}$ : Juli) und Niederschlagsmengen des Meerfelder Maares nach [Litt <i>et al.</i> , 2009]; Farbintensität: Wahrscheinlichkeitsdichte, durchgezogene Linie: Mittelwert, gestrichelte Linie: Standardabweichung. ....	24
Abbildung 6: Pollendiagramm des Meerfelder Maares [Litt <i>et al.</i> , 2009]. .....	25
Abbildung 7: Übersicht der Lipidklassen. ....	26
Abbildung 8: Strukturbeispiele der a: Triacylglyceride, b: Phospholipide, c: Sphingolipide, d: Glykolipide. ....	27
Abbildung 9: Fettsäurestruktur mit polarer Kopfgruppe und unpolarem Kohlenwasserstoff-Rest. ....	28
Abbildung 10: Schema der Fettsäurebiosynthese bis zur Palmitinsäure [Rehner & Daniel, 2010]. .....	29
Abbildung 11: Potentielle Quellen organischer Biomarker 1: Vegetation, 2: Bodenökoystem, 3: Aquifer, 4: Höhlensystem; modifiziert nach [Blyth <i>et al.</i> , 2008]. ...	31
Abbildung 12: Schematischer Prozess der Festphasenextraktion. ....	34
Abbildung 13: Modifizierte Kieselgelpartikel als SPE Packungsmaterial. ....	35
Abbildung 14: Schematischer Aufbau eines HPLC-Systems. ....	36
Abbildung 15: Schematischer Aufbau eines Gaschromatographen. ....	37
Abbildung 16: Allgemeines Schema eines Massenspektrometers. ....	39
Abbildung 17: Schematischer Aufbau einer Elektronenstoßionisation. ....	39
Abbildung 18: Schematischer Mechanismus einer ESI Quelle im positiven Ionenmodus mit Veranschaulichung der beiden Modelle zur Ionenbildung IEM und CRM; modifiziert nach [Koneremann <i>et al.</i> , 2013]. ....	40
Abbildung 19: Schematischer Aufbau eines Quadrupols mit entsprechender Ionenbewegung [Blaum <i>et al.</i> , 1998]. .....	42
Abbildung 20: Stabilitätsregionen als Funktion von U und V für Ionen unterschiedlicher Massen mit $m_1 < m_2 < m_3$ . ....	43
Abbildung 21: Aufbau einer dreidimensionalen Ionenfalle; modifiziert nach [Yoshinari, 2000]. ....	44
Abbildung 22: Stabilitätsdiagramm der Trajektorien in der QIT; modifiziert nach [Müller-Tautges, 2014]. .....	45
Abbildung 23: Schematischer Aufbau des Q-Exactive Orbitrap MS; modifiziert nach [Thermo Fisher Scientific, 2014]. .....	46
Abbildung 24: Schnitt durch die Thermo Fisher Orbitrap; modifiziert nach [Scigelova & Makarov, 2006]; a: spindelförmige Elektrode, die axialen Feldgradienten erzeugt; b: fassförmige äußere Elektrode ist mit einem isolierenden Keramikern in zwei Hälften geteilt; c: der erzeugte Bildstrom wird verstärkt und aufgezeichnet. ....	46
Abbildung 25: Lage der Bunkerhöhle am Nordrand des rechtsrheinischen Schiefergebirges. Die graue Schattierung zeigt das mittel- bis oberdevonische Kalkgestein; modifiziert nach [Riechelmann <i>et al.</i> , 2011]. ....	52

Abbildung 26: Lage des Herbstlabyrinth-Adventhöhle Systems zwischen Breitscheid und Erdbach; modifiziert nach [Mischel, 2010].	54
Abbildung 27: Plan des Bunkerhöhlenabschnittes, in welchem das Höhlenmonitoring stattfand; mit Markierungen der Probennahmestellen; modifiziert nach [Riechelmann <i>et al.</i> , 2011].	55
Abbildung 28: Höhlenplan des Abschnittes, in welchem das Höhlenmonitoring des Herbstlabyrinths stattfindet; mit Markierung der Probennahmestellen [Mischel, 2010].	56
Abbildung 29: Probennahme der Tropfwasserproben im Rahmen des monatlichen Höhlenmonitoring-Programms, Herbstlabyrinth-Adventhöhle.	57
Abbildung 30: Querschnitt der NG01-Probe entlang der Wachstumsachse und die zugehörige Tiefe ausgehend von der Spitze des Stalagmiten.	57
Abbildung 31: Ermittelte Alter mit resultierendem Altersmodell (grün) und dessen +/- Fehlern (rot).	58
Abbildung 32: Links: Scheibe des Stalagmiten NG01 nach der Probennahme; rechts: Eine gesägte Probe ca. 0,6 x 0,7 cm.	59
Abbildung 33: Experimenteller Aufbau der Festphasenextraktion mittels <i>Large Volume Sampler</i> .	61
Abbildung 34: Schema der verwendeten HPLC-MS Messparameter.	62
Abbildung 35: Chromatographische Trennung der Analyten (1: C <sub>12</sub> , 2: C <sub>14</sub> , 3: C <sub>16</sub> , 4: C <sub>18</sub> , 5: C <sub>20</sub> ); EICs ( <i>extracted ion chromatogram</i> ) der einzelnen Massenspuren, gemessen im ESI(-)-Modus.	67
Abbildung 36: Untergrundsignal von C <sub>18</sub> aus gespülten und ausgeheizten Glasgefäßen; EIC von <i>m/z</i> 283 im ESI(-)-Modus.	68
Abbildung 37: Reduktion der Signalfächen der Blindwerte durch dreifache Destillation von DCM.	69
Abbildung 38: Ermittelte Signalfächen bei Variation der verwendeten Abdampftemperatur.	70
Abbildung 39: Relative Signalfächen in % von C <sub>20</sub> bei unterschiedlichen Extraktionszeiten.	71
Abbildung 40: Relative Signalfächen in % bei unterschiedlichen Lösungsmittelzusammensetzungen zur Wiederaufnahme vor der HPLC-MS Messung.	72
Abbildung 41: Fettsäurekonzentrationen in ng g <sup>-1</sup> in vier Stalagmitproben des NG01 aus verschiedenen Tiefen; Extraktion mittels LLE und Quantifizierung mittels externer Kalibrierung.	73
Abbildung 42: Fettsäurekonzentration in ng L <sup>-1</sup> in sechs verschiedenen Tropfwasserproben aus dem Herbstlabyrinth-Adventhöhle System; Extraktion mittels LLE und Quantifizierung mittels externer Kalibrierung.	74
Abbildung 43: Relative Standardabweichung von 3 Replikaten in % bei unterschiedlichen Zugaben von organischen Modifiern.	76
Abbildung 44: Ermittelte Fettsäuremengen in ng bei Mehrfachverwendung der SPE Kartusche.	77
Abbildung 45: Vergleich der Signalfächen einer Blindprobe und einer Poolwasserprobe aus dem Herbstlabyrinth-Adventhöhle System, Extraktion mittels SPE.	78
Abbildung 46: Externe Kalibrierung über Reinstwasser <i>Spikes</i> ; Extraktion mittels SPE.	79
Abbildung 47: Vergleich der von externer Kalibrierung und Standardaddition erhaltenen Ergebnisse einer Poolwasserprobe in ng L <sup>-1</sup> .	80
Abbildung 48: Streudiagramm der LC-MS und GC-MS Ergebnisse (R=0,83; p<0,0001).	82

Abbildung 49: Vergleich der mittels HPLC-MS und GC-MS ermittelten Fettsäuremengen in ng aus den $\text{CaCO}_3$ Spikes. ....	82
Abbildung 50: Beispielhafte Kalibriergerade von $\text{C}_{20}$ ; Messung mittels GC-MS und Quantifizierung mittels Standardaddition. ....	83
Abbildung 51: Ermittelte Fettsäurekonzentrationen in $\text{ng L}^{-1}$ in Tropfwasserprobe T1, Bunkerhöhle. ....	84
Abbildung 52: Gesamtfettsäurekonzentration in $\text{ng L}^{-1}$ in jeweils einer langsamen (T8, T2) und schnellen (T1) Tropfstelle aus der Bunkerhöhle und dem Herbstlabyrinth-Adventhöhle System. ....	85
Abbildung 53: Tropfwasserverlauf der Fettsäuren $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{20}$ von September 2012 bis April 2014 der Tropfstelle T1 in $\text{ng L}^{-1}$ ; zu beachten sind die Achsenunterbrechungen bei $\text{C}_{12}$ und $\text{C}_{14}$ . ....	89
Abbildung 54: Tropfwasserverlauf der Fettsäuren $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{20}$ von September 2012 bis April 2014 der Tropfstelle T5 in $\text{ng L}^{-1}$ ; zu beachten sind die Achsenunterbrechungen bei $\text{C}_{12}$ und $\text{C}_{20}$ . Blau schattierte Fläche: keine Probe vorhanden. ....	90
Abbildung 55: Tropfwasserverlauf der Fettsäuren $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{20}$ von September 2012 bis April 2014 der Tropfstelle T2 in $\text{ng L}^{-1}$ ; zu beachten ist die Achsenunterbrechung bei $\text{C}_{12}$ . Blau schattierte Fläche: keine Probe vorhanden. ....	91
Abbildung 56: Tropfwasserverlauf der Fettsäuren $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{20}$ von September 2012 bis April 2014 des PWs in $\text{ng L}^{-1}$ ; zu beachten sind die Achsenunterbrechungen bei $\text{C}_{14}$ und $\text{C}_{18}$ . Blau schattierte Fläche: keine Probe vorhanden. ....	92
Abbildung 57: Streudiagramme von a: $\text{C}_{12}$ und $\text{C}_{14}$ , b: $\text{C}_{18}$ und $\text{C}_{16}$ sowie c: $\text{C}_{20}$ und $\text{C}_{16}$ in $\text{ng L}^{-1}$ der Tropfstelle T1. ....	94
Abbildung 58: Elektrische Leitfähigkeit in $\mu\text{S cm}^{-1}$ im Vergleich zu den Fettsäureverläufen $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{20}$ der Tropfstelle T1. ....	95
Abbildung 59: $\text{Na}^+$ , $\text{SO}_4^{2-}$ und $\text{Cl}^-$ in $\text{mg L}^{-1}$ im Vergleich zu den Fettsäureverläufen $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{20}$ der Tropfstelle T1. ....	97
Abbildung 60: Tropfrate in $\text{mL min}^{-1}$ im Vergleich zu den Fettsäureverläufen $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{20}$ der Tropfstelle T1. ....	98
Abbildung 61: $\text{Mg}^{2+}$ in $\text{mg L}^{-1}$ im Vergleich zu den Fettsäureverläufen $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{20}$ der Tropfstelle T1. ....	100
Abbildung 62: Stabile Isotope $\delta^{13}\text{C}$ im Vergleich zu den Fettsäureverläufen $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{20}$ der Tropfstelle T1. ....	101
Abbildung 63: Streudiagramme von a: $\text{C}_{16}$ und b: $\text{C}_{20}$ mit $\delta^{13}\text{C}$ der Tropfstelle T1. ....	102
Abbildung 64: Fettsäureverlauf von $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{20}$ in $\text{ng g}^{-1}$ des Stalagmiten NG01, Herbstlabyrinth-Adventhöhle; zu beachten ist die Achsenunterbrechung bei $\text{C}_{18}$ . Untenstehend: Ergebnisse der $^{230}\text{Th}/\text{U}$ -Datierung mit entsprechenden Fehlerbalken und durch das Altersmodell ermittelte Hiatus (schattierte Fläche). ....	106
Abbildung 65: Streudiagramme der Gesamtverläufe von a: $\text{C}_{16}$ und $\text{C}_{18}$ , b: $\text{C}_{12}$ und $\text{C}_{14}$ , c: $\text{C}_{16}$ und $\text{C}_{12}$ und d: $\text{C}_{18}$ und $\text{C}_{14}$ in $\text{ng g}^{-1}$ . ....	107
Abbildung 66: Streudiagramme von a: $\text{C}_{20}$ und $\text{C}_{16}$ , b: $\text{C}_{20}$ und $\text{C}_{18}$ in $\text{ng g}^{-1}$ während der zweiten Wachstumsphase, sowie c: $\text{C}_{20}$ und $\text{C}_{12}$ in $\text{ng g}^{-1}$ während der ältesten Wachstumsphase von NG01. ....	109
Abbildung 67: Vergleich des originalen und des geglätteten Verlaufs (rot) von $\delta^{13}\text{C}$ , gemessen im Calcit des NG01. ....	111
Abbildung 68: Geglättete Verläufe von $\delta^{13}\text{C}$ , $\delta^{18}\text{O}$ im Vergleich zu den Fettsäureverläufen $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{20}$ gemessen in NG01. ....	112
Abbildung 69: Geglättete Verläufe von Mg, P, U im Vergleich zu den Fettsäureverläufen $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{20}$ gemessen in NG01. ....	114
Abbildung 70: Streudiagramme von a: $\text{C}_{12}$ und b: $\text{C}_{20}$ mit den geglätteten Werten von U während der ältesten Wachstumsphase von NG01. ....	115

Abbildung 71: Van-Krevelen-Diagramm der mittels HRMS ermittelten Summenformeln der CHO- (blau) und CHNO-Verbindungen (rot) in Stalagmit NG01 mit charakteristischen Regionen verschiedener Biomolekülgruppen ([Kim <i>et al.</i> , 2003], [Sleighter & Hatcher, 2007], [Reemtsma, 2009]); Pfeile markieren Reaktionswege: A: Dealkylierung, B: Dehydrierung, C: Kondensation und D: Reduktion.....	122
Abbildung 72: Strukturbeispiel eines Lignins mit entsprechenden Monolignolen; modifiziert nach [Simoneit <i>et al.</i> , 1993] und [Lignoworks, 2014].....	123
Abbildung 73: Strukturbeispiel eines Tannins [Sengbusch, 2003].....	124
Abbildung 74: $m/z$ aufgetragen gegen DBÄ der ermittelten CHO- (blau) und CHNO-Verbindungen (rot). .....	124
Abbildung 75: Massenspektrum von C <sub>18</sub> mit charakteristischen Fragmentationen; Messung mittels GC-MS.....	134
Abbildung 76: EIC von $m/z$ 121,0296 ; oben: Blindprobe, unten: Realprobe NG01....	137

## 7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und entsprechende Reinheiten. ....	51
Tabelle 2: Verwendete Fettsäurestandards und die $m/z$ -Verhältnisse der entsprechenden Quasimolekülonen. ....	60
Tabelle 3: Verwendete $m/z$ -Verhältnisse im SIM-Modus.....	64
Tabelle 4: Ergebnisse der linearen Regression der Wasser <i>Spikes</i> .....	78
Tabelle 5: Ermittelte Wiederfindungsraten der verschiedenen Fettsäuren. ....	81
Tabelle 6: Korrelationskoeffizienten R und zugehörige p-Werte von C <sub>20</sub> in unterschiedlichen Wachstumsphasen. ....	108
Tabelle 7: CHO enthaltende organische Verbindungen bestimmt durch <i>non-target</i> Analyse der NG01-Proben mittels UHPLC-(-)ESI-HRMS. ....	119
Tabelle 8: CHNO enthaltende organische Verbindungen bestimmt durch <i>non-target</i> Analyse der NG01-Proben mittels UHPLC-(-)ESI-HRMS. ....	121
Tabelle 9: Probennahmeplan der Tropfstelle T1, Bunkerhöhle. ....	129
Tabelle 10: Probennahmeplan der Tropfstelle T8, Bunkerhöhle. ....	129
Tabelle 11: Probennahmeplan der Tropfstelle T1, Herbstlabyrinth-Adventhöhle. ....	129
Tabelle 12: Probennahmeplan der Tropfstelle T2, Herbstlabyrinth-Adventhöhle. ....	130
Tabelle 13: Probennahmeplan der Tropfstelle T5, Herbstlabyrinth-Adventhöhle. ....	131
Tabelle 14: Probennahmeplan des Poolwassers, Herbstlabyrinth-Adventhöhle. ....	132
Tabelle 15: Probennahmeplan des Stalagmiten NG01, Herbstlabyrinth-Adventhöhle. ....	133
Tabelle 16: Probennahmeplan der <i>non-target</i> Analyse Proben, Herbstlabyrinth-Adventhöhle. ....	134
Tabelle 17: Ergebnisse der <sup>230</sup> Th/U-Datierung mit entsprechenden Fehlern.....	135
Tabelle 18: Alter der NG01-Proben, welche für die Fettsäureanalyse verwendet wurden. ....	136

## 7.5 Literaturverzeichnis

- Alberts, B. (1999), *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Allen, C.F. und Good, P. (1965), "Plant lipids", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Vol. 42 Nr. 7, S. 610–614.
- Ardrey, R.E. (2006), *Liquid chromatography - mass spectrometry: An introduction, Analytical techniques in the sciences*, Neuauflage mit Korrektur, Wiley, Chichester.
- Baker, A., Smart, P.L., Edwards, R. und Richards, D.A. (1993), "Annual growth banding in a cave stalagmite", *Nature*, Vol. 364, S. 518–520.
- Baker, A., Barnes, W.L. und Smart, P.L. (1996), "Speleothem luminescence intensity and spectral characteristics: Signal calibration and a record of palaeovegetation change", *Chemical Geology*, Vol. 130 1–2, S. 65–76.
- Baker, A., Barnes, W.L. und Smart, P.L. (1997), "Variations in the discharge and organic matter content of stalagmite drip waters in Lower Cave, Bristol", *Hydrological Processes*, Vol. 11 Nr. 11, S. 1541–1555.
- Baker, A., Smith, C.L., Jex C., Fairchild, I.J., Genty, D. und Fuller, L. (2008), "Annually laminated speleothems a review", *International Journal of Speleology*, Vol. 37 Nr. 3, S. 193–206.
- Ban, F., Pan, G., Zhu, J., Cai, B. und Tan, M. (2008), "Temporal and spatial variations in the discharge and dissolved organic carbon of drip waters in Beijing Shihua Cave, China", *Hydrological Processes*, Vol. 22 Nr. 18, S. 3749–3758.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. und Stryer, L. (2007), *Biochemie*, 6. Auflage, Elsevier, München.
- Blaum, K., Geppert, C., Müller, P., Nörttershäuser, W., Otten, E., Schmitt, A., Trautmann, N., Wendt, K. und Bushaw, B. (1998), "Properties and performance of a quadrupole mass filter used for resonance ionization mass spectrometry", *International Journal of Mass Spectrometry*, Vol. 181 1-3, S. 67–87.
- Blyth, A.J., Farrimond, P. und Jones, M. (2006), "An optimised method for the extraction and analysis of lipid biomarkers from stalagmites", *Organic Geochemistry*, Vol. 37 Nr. 8, S. 882–890.
- Blyth, A.J., Baker, A., Collins, M., Penkman, K.E.H., Gilmour, M.A., Moss, J.S., Genty, D. und Drysdale, R. (2008), "Molecular organic matter in speleothems and its potential as an environmental proxy", *Quaternary Science Reviews*, Vol. 27 9-10, S. 905–921.
- Blyth, A.J. und Watson, J.S. (2009), "Thermochemolysis of organic matter preserved in stalagmites: A preliminary study", *Organic Geochemistry*, Vol. 40 Nr. 9, S. 1029–1031.

- Blyth, A.J., Watson, J.S., Woodhead, J. und Hellstrom, J. (2010), "Organic compounds preserved in a 2.9million year old stalagmite from the Nullarbor Plain, Australia", *Chemical Geology*, Vol. 279 3-4, S. 101–105.
- Blyth, A.J., Baker, A., Thomas, L.E. und van Calsteren, P. (2011), "A 2000-year lipid biomarker record preserved in a stalagmite from north-west Scotland", *Journal of Quaternary Science*, Vol. 26 Nr. 3, S. 326–334.
- Blyth, A.J. und Schouten, S. (2013), "Calibrating the glycerol dialkyl glycerol tetraether temperature signal in speleothems", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 109, S. 312–328.
- Blyth, A.J., Jex, C.N., Baker, A., Khan, S.J. und Schouten, S. (2014), "Contrasting distributions of glycerol dialkyl glycerol tetraethers (GDGTs) in speleothems and associated soils", *Organic Geochemistry*, Vol. 69, S. 1–10.
- Boch, R., Spötl, C. und Frisia, S. (2011), "Origin and palaeoenvironmental significance of lamination in stalagmites from Katerloch Cave, Austria", *Sedimentology*, Vol. 58 Nr. 2, S. 508–531.
- Bögli, A. (1978), *Karsthydrographie und physische Speläologie*, Springer, Berlin.
- Bosle, J.M., Mischel, S., Schulze, A.-L., Scholz, D. und Hoffmann, T. (2014), "Quantification of low molecular weight fatty acids in cave drip water and speleothems using HPLC-ESI-IT/MS — development and validation of a selective method", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 406 Nr. 13, S. 3167–3177.
- Bradley, R.S. (1999), *Paleoclimatology: Reconstructing climates of the quaternary*, *International geophysics series*, Vol. 68, 2. Auflage, Academic Press, Amsterdam, Boston.
- Brassel, S.C., Eglinton, G., Marlowe, I.T., Pflaumann, U. und Sarnthein, M. (1986), "Molecular stratigraphy: a new tool for climatic assessment", *Nature*, Vol. 320, S. 129–133.
- Bull, I.D., van Bergen, P.F., Nott, C.J., Poulton, P.R. und Evershed R.P. (2000), "Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments-V. The fate of lipids in different long-term experiments", *Organic Geochemistry*, Vol. 31 Nr. 5, S. 389–408.
- Cammann, K. (Ed.) (2010), *Instrumentelle analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen, Qualitätssicherung*, 1. Auflage, Spektrum Akad. Verl, Heidelberg.
- Carrie, R.H., Mitchell, L. und Black, K.D. (1998), "Fatty acids in surface sediment at the Hebridean shelf edge, west of Scotland", *Organic Geochemistry*, Vol. 29 5-7, S. 1583–1593.
- Cheng, H. (2000), "The half-lives of uranium-234 and thorium-230", *Chemical Geology*, Vol. 169 1-2, S. 17–33.
- Colombo, J., Silverberg, N. und Gearing, J. (1996), "Lipid biogeochemistry in the Laurentian Trough: I—fatty acids, sterols and aliphatic hydrocarbons in rapidly settling particles", *Organic Geochemistry*, Vol. 25 3-4, S. 211–225.

- Croley, T.R., White, K.D., Callahan, J.H. und Musser, S.M. (2012), "The Chromatographic Role in High Resolution Mass Spectrometry for Non-Targeted Analysis", *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, Vol. 23 Nr. 9, S. 1569–1578.
- Dansgaard, W., Johnsen, S.J., Clausen, H.B., Dahl-Jensen, D., Gundestrup, N.S., Hammer, C.U., Hvidberg, C.S., Steffensen, J.P., Sveinbjörnsdottir, A.E., Jouzel, J. und Bond, G. (1993), "Evidence for general instability of past climate from a 250-kyr ice-core record", *Nature*, Vol. 364 Nr. 6434, S. 218–220.
- Dawson, P.H. (1986), "Quadrupole mass analyzers: Performance, design and some recent applications", *Mass Spectrometry Reviews*, Vol. 5 Nr. 1, S. 1–37.
- de Hoffmann, E. und Stroobant, V. (2013), *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3. Auflage, Wiley-Interscience, s.l.
- Douglas, D.J. (2009), "Linear quadrupoles in mass spectrometry", *Mass Spectrometry Reviews*, Vol. 28 Nr. 6, S. 937–960.
- Dreybrodt, W. (2011), "Letters: Comments on processes contributing to the isotope composition of  $^{13}\text{C}$  and  $^{18}\text{O}$  in calcite deposited to speleothems", *ACTA CARSOLOGICA*, Vol. 40 Nr. 2, S. 233–238.
- Drozd, J. (1975), "Chemical derivatization in gas chromatography", *Journal of Chromatography A*, Vol. 113 Nr. 3, S. 303–356.
- Fairchild, I.J., Smith, C.L., Baker, A., Fuller, L., Spötl, C., Matthey, D., McDermott, F. und E.I.M.F. (2006), "Modification and preservation of environmental signals in speleothems", *Earth-Science Reviews*, Vol. 75 1-4, S. 105–153.
- Fairchild, I.J., Frisia, S. und Tooth, A.F. (Ma Blackwell, 2007), "Chapter 7: Speleothems", in Nash, D.J. (Ed.), *Geochemical Sediments and Landscapes*, Blackwell, Malden, S. 200–245.
- Fairchild, I.J. und Treble, P. (2009), "Trace elements in speleothems as recorders of environmental change", *Quaternary Science Reviews*, Vol. 28 5-6, S. 449–468.
- Fairchild, I.J. und Baker, A. (2012), *Speleothem science: From process to past environments*, *Blackwell Quaternary Geoscience Series*, Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, Hoboken, N.J.
- Ficken, K.J., Barber, K.E. und Eglinton, G. (1998), "Lipid biomarker,  $\delta^{13}\text{C}$  and plant macrofossil stratigraphy of a Scottish montane peat bog over the last two millennia", *Organic Geochemistry*, Vol. 28 3-4, S. 217–237.
- Fohlmeister, J., Scholz, D., Kromer, B. und Mangini, A. (2011), "Modelling carbon isotopes of carbonates in cave drip water", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 75 Nr. 18, S. 5219–5228.
- Frisia, S., Borsato, A., Fairchild, I.J. und McDermott, F. (2000), "Calcite Fabrics, Growth Mechanisms, and Environments of Formation in Speleothems from the Italian Alps and Southwestern Ireland", *Journal of Sedimentary Research*, Vol. 70 Nr. 5, S. 1183–1196.
- Frisia, S., Borsato, A., Fairchild, I.J., McDermott, F. und Selmo, E.M. (2002), "Aragonite-Calcite Relationships in Speleothems (Grotte De Clamouse, France): Environ-

- ment, Fabrics, and Carbonate Geochemistry”, *Journal of Sedimentary Research*, Vol. 72 Nr. 5, S. 687–699.
- Genty, D., Baker, A. und Vokal, B. (2001), “Intra- and inter-annual growth rate of modern stalagmites”, *Chemical Geology*, Vol. 176 1-4, S. 191–212.
- Genty, D. (2008), “Palaeoclimate research in Villars Cave (Dordogne, SW-France)”, *International Journal of Speleology*, Vol. 37 Nr. 3, S. 173–191.
- Grant, D.W. (1976), “Column development and technology in gas chromatography”, *Journal of Chromatography A*, Vol. 122, S. 107–128.
- Gross, J.H. (2013), *Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch*, Imprint: Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
- Hampe, M.J. (1985), “Lösungsmittel-Auswahl bei der Flüssig/Flüssig-Extraktion unter physikalisch-chemischen Aspekten”, *Chemie Ingenieur Technik*, Vol. 57 Nr. 8, S. 669–681.
- Harris, D.C., Werner, G. und Werner, T. (2014), *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Hartland, A., Fairchild, I.J., Lead, J.R. und Baker, A. (2010), “Fluorescent properties of organic carbon in cave dripwaters: Effects of filtration, temperature and pH”, *Science of The Total Environment*, Vol. 408 Nr. 23, S. 5940–5950.
- Heldt, H.-W., Piechulla, B. und Heldt, F. (2011), *Plant Biochemistry*, 4. Auflage, Elsevier, Saint Louis, Mo.
- Hemström, P. und Irgum, K. (2006), “Hydrophilic interaction chromatography”, *Journal of Separation Science*, Vol. 29 Nr. 12, S. 1784–1821.
- Henderson, G.M. (2006), “CLIMATE: Caving In to New Chronologies”, *Science*, Vol. 313 Nr. 5787, S. 620–622.
- Hernández, F., Sancho, J.V., Ibáñez, M., Abad, E., Portolés, T. und Mattioli, L. (2012), “Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 403 Nr. 5, S. 1251–1264.
- Hill, C.A. und Forti, P. (1997), *Cave minerals of the world*, 2. Auflage, National Speleological Society, Huntsville, Ala.
- Hoffmann, D.L., Prytulak, J., Richards, D.A., Elliott, T., Coath, C.D., Smart, P.L. und Scholz, D. (2007), “Procedures for accurate U and Th isotope measurements by high precision MC-ICPMS”, *International Journal of Mass Spectrometry*, Vol. 264 2-3, S. 97–109.
- Hoffmann, T., Bandur, R., Marggraf, U. und Linscheid, M. (1998), “Molecular composition of organic aerosols formed in the  $\alpha$ -pinene/O<sub>3</sub> reaction: Implications for new particle formation processes”, *Journal of Geophysical Research*, Vol. 103 D19, S. 25569.
- Holland, H.D., Kirsipu, T.V., Huebner, J.S. und Oxburgh, U.M. (1964), “On Some Aspects of the Chemical Evolution of Cave Waters”, *The Journal of Geology*, Vol. 72 Nr. 1, S. 36–67.

- Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M. und Graham Cooks, R. (2005), "The Orbitrap: a new mass spectrometer", *Journal of Mass Spectrometry*, Vol. 40 Nr. 4, S. 430–443.
- Huang, X., Cui, J., Pu, Y., Huang, J. und Blyth, A.J. (2008), "Identifying "free" and "bound" lipid fractions in stalagmite samples: An example from Heshang Cave, Southern China", *Applied Geochemistry*, Vol. 23 Nr. 9, S. 2589–2595.
- Huang, Y., Fairchild, I.J., Borsato, A., Frisia, S., Cassidy, N.J., Frank McDermott und Hawkesworth, C.J. (2001), "Seasonal variations in Sr, Mg and P in modern speleothems (Grotta di Ernesto, Italy)", *Chemical Geology*, Vol. 175 3-4, S. 429–448.
- Huijzer, B. und Vandenberghe, J. (1998), "Climatic reconstruction of the Weichselian Pleniglacial in northwestern and Central Europe", *Journal of Quaternary Science*, Vol. 5 Nr. 13, S. 391–417.
- Jochum, K.P., Wilson, S.A., Abouchami, W., Amini, M., Chmeleff, J., Eisenhauer, A., Hegner, E., Iaccheri, L.M., Kieffer, B., Krause, J., McDonough, W.F., Mertz-Kraus, R., Raczek, I., Rudnick, R.L., Scholz, D., Steinhoefel, G., Stoll, B., Stracke, A., Tonarini, S., Weis, D., Weis, U. und Woodhead, J. (2011), "GSD-1G and MPI-DING Reference Glasses for In Situ and Bulk Isotopic Determination", *Geostandards and Geoanalytical Research*, Vol. 35 Nr. 2, S. 193–226.
- Jorgenson, J.W. (2010), "Capillary Liquid Chromatography at Ultrahigh Pressures", *Annual Review of Analytical Chemistry*, Vol. 3 Nr. 1, S. 129–150.
- Kebarle, P. und Tang, L. (1993), "From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry", *Analytical Chemistry*, Vol. 65 Nr. 22, S. 972A.
- Kebarle, P. und Verkerk, U.H. (2009), "Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now", *Mass Spectrometry Reviews*, Vol. 28 Nr. 6, S. 898–917.
- Kim, S., Kramer, R.W. und Hatcher, P.G. (2003), "Graphical Method for Analysis of Ultrahigh-Resolution Broadband Mass Spectra of Natural Organic Matter, the Van Krevelen Diagram", *Analytical Chemistry* Nr. 75, S. 5336–5344.
- Kögel-Knabner, I. (2002), "The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter", *Soil Biology & Biochemistry*, Vol. 34 Nr. 2, S. 139–162.
- Konermann, L., Ahadi, E., Rodriguez, A.D. und Vahidi, S. (2013), "Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization", *Analytical Chemistry*, Vol. 85 Nr. 1, S. 2–9.
- Kourtchev, I., Fuller, S.J., Giorio, C., Healy, R.M., Wilson, E., O'Connor, I., Wenger, J.C., McLeod, M., Aalto, J., Ruuskanen, T.M., Maenhaut, W., Jones, R., Venables, D.S., Sodeau, J.R., Kulmala, M. und Kalberer, M. (2014), "Molecular composition of biogenic secondary organic aerosols using ultrahigh-resolution mass spectrometry: comparing laboratory and field studies", *Atmospheric Chemistry and Physics*, Vol. 14 Nr. 4, S. 2155–2167.
- Krauss, M., Singer, H. und Hollender, J. (2010), "LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 397 Nr. 3, S. 943–951.

- Lachniet, M.S. (2009), "Climatic and environmental controls on speleothem oxygen-isotope values", *Quaternary Science Reviews*, Vol. 28 5-6, S. 412–432.
- Lauritzen, S.-E., Haugen, J.E., Lovlie, R. und Gilje-Nielsen, H. (1994), "Geochronological Potential of Isoleucine Epimerization in Calcite Speleothems", *Quaternary Research* Nr. 41, S. 52–58.
- Lauritzen, S.-E. und Lundberg, J. (1999), "Speleothems and climate: a special issue of *The Holocene*", *The Holocene*, Vol. 9 Nr. 6, S. 643–647.
- Li, X., Wang, C., Huang, J., Hu, C. und Xie, S. (2011), "Seasonal variation of fatty acids from drip water in Heshang Cave, central China", *Applied Geochemistry*, Vol. 26 Nr. 3, S. 341–347.
- Lignoworks (2014), "What is Lignin?", verfügbar: <http://www.lignoworks.ca/content/what-lignin> (Zugriff 02. September 2014).
- Lin, P., Rincon, A.G., Kalberer, M. und Yu, J.Z. (2012), "Elemental Composition of HULIS in the Pearl River Delta Region, China: Results Inferred from Positive and Negative Electrospray High Resolution Mass Spectrometric Data", *Environmental Science & Technology*, Vol. 46 Nr. 14, S. 7454–7462.
- Liška, I., Krupčík, J. und Leclercq, P.A. (1989), "The use of solid sorbents for direct accumulation of organic compounds from water matrices—a review of solid-phase extraction techniques", *Journal of High Resolution Chromatography*, Vol. 12 Nr. 9, S. 577–590.
- Liška, I. (2000), "Fifty years of solid-phase extraction in water analysis – historical development and overview", *Journal of Chromatography A*, Vol. 885 1-2, S. 3–16.
- Litt, T., Schölzel, C., Köhl, N. und Brauer, A. (2009), "Vegetation and climate history in the Westeifel Volcanic Field (Germany) during the past 11 000 years based on annually laminated lacustrine maar sediments", *Boreas*, Vol. 38 Nr. 4, S. 679–690.
- Makarov, A. (2000), "Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis", *Analytical Chemistry*, Vol. 72 Nr. 6, S. 1156–1162.
- Mark, T.D. (1982), "Fundamental aspects of electron impact ionization", *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, Vol. 45, S. 125–145.
- Matsuda, H. und Koyama, T. (1977), "Early diagenesis of fatty acids in lacustrine sediments—II. A statistical approach to changes in fatty acid composition from recent sediments and some source materials", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 41 Nr. 12, S. 1825–1834.
- Mazzoleni, L.R., Ehrmann, B.M., Shen, X., Marshall, A.G. und Collett, J.L. (2010), "Water-Soluble Atmospheric Organic Matter in Fog: Exact Masses and Chemical Formula Identification by Ultrahigh-Resolution Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry", *Environmental Science & Technology*, Vol. 44 Nr. 10, S. 3690–3697.
- McDermott, F., Frisia, S., Huang, Y., Longinelli, A., Spiro, B., Heaton, T.H.E., Hawkesworth, C.J., Borsato, A., Keppens, E., Fairchild, I.J., van der Borg, K., Verheyden, S. und Selmo, E. (1999), "Holocene climate variability in Europe: Evidence from

- $\delta^{18}\text{O}$ , textural and extension-rate variations in three speleothems”, *Quaternary Science Reviews*, Vol. 18 8-9, S. 1021–1038.
- McDermott, F. (2004), “Palaeo-climate reconstruction from stable isotope variations in speleothems: a review”, *Quaternary Science Reviews*, Vol. 23 7-8, S. 901–918.
- McDonald, J., Drysdale, R., Hill, D., Chisari, R. und Wong, H. (2007), “The hydrochemical response of cave drip waters to sub-annual and inter-annual climate variability, Wombeyan Caves, SE Australia”, *Chemical Geology*, Vol. 244 3-4, S. 605–623.
- McGarry, S.F. und Baker, A. (2000), “Organic acid fluorescence: applications to speleothem palaeoenvironmental reconstruction”, *Quaternary Science Reviews*, Vol. 19 Nr. 11, S. 1087–1101.
- Meyer, V.R. (2009), *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, 10. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim.
- Meyers, P.A. und Ishiwatari, R. (1993), “Lacustrine organic geochemistry-an overview of indicators of organic matter sources and diagenesis in lake sediments”, *Organic Geochemistry*, Vol. 20 Nr. 7, S. 867–900.
- Meyers, P.A. (1997), “Organic geochemical proxies of paleoceanographic, paleolimnologic, and paleoclimatic processes”, *Organic Geochemistry*, Vol. 27 5-6, S. 213–250.
- Mischel, S. (2010), “Petrographische Untersuchungen,  $^{230}\text{Th}/\text{U}$ -Altersdatierungen und Spurenelementanalysen an Speläothemen aus dem Herbstlabyrinth-Adventhöhle-System bei Breitscheid-Erdbach, Hessen”, Diplomarbeit, Marburg, 2010.
- Müller-Tautges, C. (2014), “Development and application of mass-spectrometric methods for the quantification and characterization of organic compounds in ice cores”, Dissertation, Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, 2014.
- Murphy, D.J. (2005), *Plant lipids: Biology, utilisation, and manipulation*, *Biological sciences series*, CRC Press, Oxford, Boca Raton, FL.
- Nizkorodov, S.A., Laskin, J. und Laskin, A. (2011), “Molecular chemistry of organic aerosols through the application of high resolution mass spectrometry”, *Physical Chemistry Chemical Physics*, Vol. 13 Nr. 9, S. 3612.
- Nott, C.J., Xie, S., Avsejs, L.A., Maddy, D., Chambers, F.M. und Evershed, R.P. (2000), “n-Alkane distributions in ombrotrophic mires as indicators of vegetation change related to climatic variation”, *Organic Geochemistry*, Vol. 31 2-3, S. 231–235.
- Ohtonen, R. und Väre, H. (1998), “Vegetation Composition Determines Microbial Activities in a Boreal Forest Soil”, *Microbial Ecology*, Vol. 36 Nr. 3, S. 328–335.
- Olsen, J.V., Godoy, L.M.F. de, Li, G.Q., Macek, B., Mortensen, P., Pesch, R., Makarov, A., Lange, O., Horning, S. und Mann, M. (2005), “Parts per Million Mass Accuracy on an Orbitrap Mass Spectrometer via Lock Mass Injection into a C-trap”, *Molecular & Cellular Proteomics*, Vol. 4 Nr. 12, S. 2010–2021.

- Perry, R.H., Cooks, R.G. und Noll, R.J. (2008), "Orbitrap mass spectrometry: Instrumentation, ion motion and applications", *Mass Spectrometry Reviews*, Vol. 27 Nr. 6, S. 661–699.
- Pietrogrande, M.C. und Bacco, D. (2011), "GC–MS analysis of water-soluble organics in atmospheric aerosol: Response surface methodology for optimizing silyl-derivatization for simultaneous analysis of carboxylic acids and sugars", *Analytica Chimica Acta*, Vol. 689 Nr. 2, S. 257–264.
- Poole, C.F. (2003), "New trends in solid-phase extraction", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 22 Nr. 6, S. 362–373.
- Railsback, L.B. (2000), "An Atlas of Speleothem Microfabrics", verfügbar: <http://www.gly.uga.edu/railsback/speleoatlas/SAindex1.html>. (Zugriff 02. September 2014).
- Reemtsma, T. (2009), "Determination of molecular formulas of natural organic matter molecules by (ultra-) high-resolution mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, Vol. 1216 Nr. 18, S. 3687–3701.
- Rehner, G. und Daniel, H. (2010), *Biochemie der Ernährung [Elektronische Resource]*, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Reinhardt, A., Emmenegger, C., Gerrits, B., Panse, C., Dommen, J., Baltensperger, U., Zenobi, R. und Kalberer, M. (2007), "Ultrahigh Mass Resolution and Accurate Mass Measurements as a Tool To Characterize Oligomers in Secondary Organic Aerosols", *Analytical Chemistry*, Vol. 79 Nr. 11, S. 4074–4082.
- Richards, D.A. und Dorale, J.A. (2003), "Uranium-series Chronology and Environmental applications of speleothems", *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, Vol. 52 Nr. 1, S. 407–460.
- Riechelmann, D.F.C. (2010), "Aktuospeläologische Untersuchungen in der Bunkerhöhle des Iserlohner Massenkalks (NRW/Deutschland): Signifikanz für kontinentale Klimaarchive", Dissertation, Institut für Geowissenschaften, Ruhr-Universität Bochum, Bochum, 2010.
- Riechelmann, D.F.C., Schröder-Ritzrau, A., Scholz, D., Fohlmeister, J., Spötl, C., Richter, D.K. und Mangini, A. (2011), "Monitoring Bunker Cave (NW Germany): A prerequisite to interpret geochemical proxy data of speleothems from this site", *Journal of Hydrology*, Vol. 409 3-4, S. 682–695.
- Roberts, M.S., Hawkesworth, C.J., Smart, P.L., Perkins, W.T. und Pearce, N.J.G. (1999), "Trace element variations in coeval Holocene speleothems from GB Cave, southwest England", *The Holocene*, Vol. 9 Nr. 6, S. 707–713.
- Rousseau, L., Laafar, S., Pèpe, C. und Lumley, H. de (1995), "Sterols as biogeochemical markers: Results from ensemble E of the stalagmitic floor, Grotte du Lazaret, Nice, France", *Quaternary Science Reviews*, Vol. 14 Nr. 1, S. 51–59.
- Rushdi, A.I., Clark, P.U., Mix, A.C., Ersek, V., Simoneit, B.R.T., Cheng, H. und Edwards, R. (2011), "Composition and sources of lipid compounds in speleothem calcite from southwestern Oregon and their paleoenvironmental implications", *Environmental Earth Sciences*, Vol. 62 Nr. 6, S. 1245–1261.

- Sabel, K.-J. und Fischer, E. (1992), *Boden- und vegetationsgeographische Untersuchungen im Westerwald, Frankfurter geowissenschaftliche Arbeiten Ser. D*, Vol. 7, 2. Auflage, Inst. für Physische Geographie, Frankfurt am Main.
- Sasowsky, I.D. und Mylroie, J. (2007), *Studies of Cave Sediments: Physical and Chemical Records of Paleoclimate*, Springer, Dordrecht.
- Scheffer, F., Schachtschabel, P. und Blume, H.-P. (2002), *Lehrbuch der Bodenkunde, Spektrum-Lehrbuch*, 15. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Scholz, D. und Hoffmann, D.L. (2008), "(230)Th/U-dating of fossil corals and speleothems", *Quaternary Science Journal (Eiszeitalter und Gegenwart) Nr. 57*, S. 52–77.
- Scholz, D. und Hoffmann, D.L. (2011), "StalAge – An algorithm designed for construction of speleothem age models", *Quaternary Geochronology*, Vol. 6 3-4, S. 369–382.
- Scholz, D., Frisia, S., Borsato, A., Spötl, C., Fohlmeister, J., Mudelsee, M., Miorandi, R. und Mangini, A. (2012), "Holocene climate variability in north-eastern Italy: potential influence of the NAO and solar activity recorded by speleothem data", *Climate of the Past*, Vol. 8 Nr. 4, S. 1367–1383.
- Schönwiese, C.-D. (1995), *Klimaänderungen: Daten, Analysen, Prognosen*, Springer, Berlin.
- Scigelova, M. und Makarov, A. (2006), "Orbitrap Mass Analyzer – Overview and Applications in Proteomics", *PROTEOMICS*, Vol. 6 S2, S. 16–21.
- Sengbusch, P. von (2003), "Basic Structure of a Tannin", verfügbar: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e26/11.htm> (Zugriff 02. September 2014).
- Simoneit, B.R.T., Rogge, W.F., Mazurek, M.A., Standley, L.J., Hildemann, L.M. und Cass, G.R. (1993), "Lignin pyrolysis products, lignans, and resin acids as specific tracers of plant classes in emissions from biomass combustion", *Environmental Science & Technology*, Vol. 27 Nr. 12, S. 2533–2541.
- Skoog, D.A. und Leary, J.J. (1996), *Instrumentelle Analytik: Grundlagen, Geräte, Anwendungen ; mit 86 Tabellen*, Springer-Lehrbuch, Springer, Berlin.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. und Crouch, S.R. (2007), *Principles of instrumental analysis*, 6. Auflage, Thomson Brooks/Cole, Belmont, Calif.
- Sleighter, R.L. und Hatcher, P.G. (2007), "The application of electrospray ionization coupled to ultrahigh resolution mass spectrometry for the molecular characterization of natural organic matter", *Journal of Mass Spectrometry*, Vol. 42 Nr. 5, S. 559–574.
- Splendore, M., Lausevic, M., Lausevic, Z. und March, R.E. (1997), "Resonant Excitation and/or Ejection of Ions Subjected to DC and RF fields in a Commercial Quadrupole Ion Trap", *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Vol. 11 Nr. 2, S. 228–233.
- Spötl, C. und Mangini, A. (2007), "Speleothems and paleoglaciers", *Earth and Planetary Science Letters*, Vol. 254 3-4, S. 323–331.

- Spötl, C., Scholz, D. und Mangini, A. (2008), "A terrestrial U/Th-dated stable isotope record of the Penultimate Interglacial", *Earth and Planetary Science Letters*, Vol. 276 3-4, S. 283–292.
- Stafford, G.C., Kelley, P.E., Syka, J., Reynolds, W.E. und Todd, J.F.J. (1984), "Recent improvements in and analytical applications of advanced ion trap technology", *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, Vol. 60 Nr. 1, S. 85–98.
- Stumpf, P.K. und Bradbeer, C. (1959), "Fat Metabolism in Higher Plants", *Annual Review of Plant Physiology*, Vol. 10 Nr. 1, S. 197–222.
- Taylor, G. (1964), "Disintegration of Water Drops in an Electric Field", *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, Vol. 280 Nr. 1382, S. 383–397.
- Thermo Fisher Scientific (2014), "Schematic of the Q Exactive", verfügbar: <http://planetorbitrap.com/q-exactive#tab:schematic>. (Zugriff 02. September 2014).
- Tooth, A.F. und Fairchild, I.J. (2003), "Soil and karst aquifer hydrological controls on the geochemical evolution of speleothem-forming drip waters, Crag Cave, southwest Ireland", *Journal of Hydrology*, Vol. 273 1-4, S. 51–68.
- Treble, P., Shelley, J.M.G. und Chappell, J. (2003), "Comparison of high resolution sub-annual records of trace elements in a modern (1911–1992) speleothem with instrumental climate data from southwest Australia", *Earth and Planetary Science Letters*, Vol. 216 1-2, S. 141–153.
- van Beynen, P.E., Schwarcz, H.P., Ford, D.C. und Timmins, G.T. (2002), "Organic substances in cave drip waters: studies from Marengo Cave, Indiana", *Canadian Journal of Earth Sciences*, Vol. 39 Nr. 2, S. 279–284.
- van Dongen, B.E., Rijpstra, W.I.C., Philippart, C.J.M., Leeuw, J.W. de und Sinninghe Damste, J.S. (2000), "Biomarkers in upper Holocene Eastern North Sea and Wadden Sea sediments", *Organic Geochemistry*, Vol. 31 Nr. 12, S. 1533–1543.
- van Krevelen, D. (1950), "Graphical-statistical Method for the Study of Structure and Reaction Processes of Coal.", *Fuel*, Vol. 29, S. 269–283.
- Verheyden, S., Genty, D., Deflandre, G., Quinif, Y. und Keppens, E. (2008), "Monitoring climatological, hydrological and geochemical parameters in the Pere Noel cave (Belgium): implication for the interpretation of speleothem isotopic and geochemical time-series", *International Journal of Speleology*, Vol. 37 Nr. 3, S. 221–234.
- Wang, C., Zhang, H., Huang, X., Huang, J. und Xie, S. (2012), "Optimization of acid digestion conditions on the extraction of fatty acids from stalagmites", *Frontiers of Earth Science*, Vol. 6 Nr. 1, S. 109–114.
- Wassenburg, J.A., Immenhauser, A., Richter, D.K., Niedermayr, A., Riechelmann, S., Fietzke, J., Scholz, D., Jochum, K.P., Fohlmeister, J., Schröder-Ritzrau, A., Sabaoui, A., Riechelmann, D.F.C., Schneider, L. und Esper, J. (2013), "Moroccan speleothem and tree ring records suggest a variable positive state of the North Atlantic Oscillation during the Medieval Warm Period", *Earth and Planetary Science Letters*, Vol. 375, S. 291–302.

- Xie, S., Yi, Y., Huang, J., Hu, C., Cai, Y., Collins, M. und Baker, A. (2003), "Lipid distribution in a subtropical southern China stalagmite as a record of soil ecosystem response to paleoclimate change", *Quaternary Research* Nr. 60, S. 340–347.
- Xie, S., Huang, J., Wang, H., Yi, Y. und Hu, C. (2005), "Distributions of fatty acids in a stalagmite related to paleo-climate change at Qingjiang in Hubei, southern China", *Science in China Series D*, Vol. 48 Nr. 9, S. 1463.
- Yang, H., Ding, W., Zhang, C.L., Wu, X., Ma, X., He, G., Huang, J. und Xie, S. (2011), "Occurrence of tetraether lipids in stalagmites: Implications for sources and GDGT-based proxies", *Organic Geochemistry*, Vol. 42 Nr. 1, S. 108–115.
- Yoshinari, K. (2000), "Theoretical and numerical analysis of the behavior of ions injected into a quadrupole ion trap mass spectrometer", *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Vol. 14 Nr. 4, S. 215–223.
- Žák, K., Richter, D.K., Filippi, M., Živor, R., Deininger, M., Mangini, A. und Scholz, D. (2012), "Coarsely crystalline cryogenic cave carbonate – a new archive to estimate the Last Glacial minimum permafrost depth in Central Europe", *Climate of the Past*, Vol. 8 Nr. 6, S. 1821–1837.
- Zhao, Y., Hallar, A.G. und Mazzoleni, L.R. (2013), "Atmospheric organic matter in clouds: exact masses and molecular formula identification using ultrahigh-resolution FT-ICR mass spectrometry", *Atmospheric Chemistry and Physics*, Vol. 13 Nr. 24, S. 12343–12362.
- Zocatelli, R., Lavrieux, M., Disnar, J.-R., Milbeau, C., Jacob, J. und Bréheret, J.G. (2012), "Free fatty acids in Lake Aydat catchment soils (French Massif Central): sources, distributions and potential use as sediment biomarkers", *Journal of Soils and Sediments*, Vol. 12 Nr. 5, S. 734–748.

## **8. Tagungsbeiträge und Publikationen**

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

### **8.1 Posterbeiträge**

**In der elektronischen Version gelöscht.**

## **8.2 Vorträge**

**In der elektronischen Version gelöscht.**

### **8.3 Publikationen**

#### **Quantification of low molecular weight fatty acids in cave drip water and speleothems using HPLC-ESI-IT/MS - development and validation of a selective method**

Janine M. Bosle, Simon A. Mischel, Anna-Lena Schulze, Denis Scholz  
and Thorsten Hoffmann

**Analytical and Bioanalytical Chemistry 2014, Volume 406, Issue 13, pp 3167-3177; DOI: 10.1007/s00216-014-7743-6**

**In der elektronischen Version gelöscht**

**A Holocene record of low molecular weight fatty acids preserved in a stalagmite from the Herbstlabyrinth-Adventhöhle cave system, Germany**

Janine M. Bosle, Simon A. Mischel, Denis Scholz, Christoph Spötl, Klaus P. Jochum,  
and Thorsten Hoffmann

**Applied Geochemistry, submitted 30.06.2014 (under review)**

**In der elektronischen Version gelöscht**

## **Danksagung**

**In der elektronischen Version gelöscht**

## **Lebenslauf**

**In der elektronischen Version gelöscht**