

2 Allgemeiner Teil

2.1 Pharmazeutische Reststoffe und andere Problemstoffe urbanen Einflusses in der Umwelt und deren Spurenanalyse

Eine Umweltverschmutzung durch bioaktive Verbindungen wurde bereits Ende der 1970er Jahre sichtbar [Richardson 1985]. Seit Mitte der 1990er Jahre, als Clofibrinsäure, ein aktiver Metabolit des Lipidsenkers Clofibrat, erstmals im Berliner Oberflächenwasser gefunden wurde [Stan 1994], ist auch die Öffentlichkeit in Deutschland sensibilisiert für die Problematik der Xenobiotika in der Umwelt. Als Xenobiotika in der aquatischen Umwelt gelten unter anderem Arzneimittel und deren Rückstände, hormonaktive Verbindungen (*engl.* endocrine disrupting compounds, EDCs), sowie Stoffe aus Körperpflege und Hygiene und deren Metabolite. Vor allem die weit verbreiteten Lipidsenker (Bezafibrat, 33 t 2001 [BLAC 2003], Clofibrat, Gemfibrozil, Fenofibrat), beta-Blocker (Metoprolol, 93 t 2001 [BLAC 2003], Propranolol), Antiphlogistika/Analgetika (Diclofenac 86 t 2001 [BLAC 2003], Ibuprofen, Phenazon, Naproxen, Indometacin), das Antiepileptikum Carbamazepin und das Antibiotikum Erythromycin sollen aufgrund ihrer Verwendungshäufigkeit und hohen eingesetzten absoluten Menge Bestandteil der Forschung dieser Arbeit sein. Weiterhin werden EDCs industrieller Herkunft (technisches Nonylphenol, Bisphenol A) und ein synthetisches Hormon (Ethinylestradiol) sowie die derzeit am häufigsten eingesetzten synthetischen Moschusduftstoffe (Galaxolid und Tonalid), die in Produkten des täglichen Bedarfs wie Waschmittel und Seife Verwendung finden, betrachtet.

Arzneistoffe werden als hochaktive Stoffe eingesetzt – ihre Wirksamkeit ist breit gefächert und richtet sich im Allgemeinen gegen pathogene Bakterien, Protozoen, Würmer und Insekten. Antibiotika und Antiparasitika beeinflussen den Stoffwechsel und/oder verändern das hormonelle Gleichgewicht. Sie können die Signalübertragung in einem Organismus modulieren oder töten als Zytostatika schnell wachsende entartete Zellen ab. Dass Humanpharmaka unerwünschte Nebenwirkungen beim Patienten hervorrufen können, ist bekannt. Dass jedoch ebenso Effekte auf Flora und Fauna auftreten können, wenn Arzneistoffe in die Umwelt gelangen, ist aufgrund ihrer biologischen Aktivität nicht nur denkbar, sondern wahrscheinlich.

Als Beispiel soll hier der rapide Populationsrückgang mehrerer Geierarten in Indien und Pakistan angeführt werden [Oaks 2004]. Der Geier hat in der Region eine große

kulturelle und religiöse Bedeutung (Religion der Parsen). Als Aasfresser spielen sie jedoch eine ebenso wichtige Rolle bei der Vorbeugung und Eindämmung von Infektionskrankheiten. Ausgelöst wurde das Massensterben der Vögel, das fast zur Ausrottung einiger Arten führte, durch den Entzündungshemmer Diclofenac. Der Wirkstoff, der Rindern bei Entzündungskrankheiten verabreicht wird, führt bei Geiern, die behandelte Tiere fressen, jedoch zu akutem Nierenversagen. Die Rettung der Arten ist auch Dank der Naturschutzorganisation Birdlife International in Sicht, denn mittlerweile wurde die Anwendung von Diclofenac in der Tierzucht in Indien gesetzlich verboten. In Zuchtzentren soll der Fortbestand der betroffenen Arten gesichert werden.

Das Beispiel der indischen Geier zeigt, wie Xenobiotika indirekt der Natur nachhaltig schaden können. Hauptsächlich erfolgt der Eintrag von bioaktiven Stoffen in die Umwelt über die Haushalte auf natürlichem Ausscheidungs- bzw. Abwasserweg, in geringem Maß auch über die Entsorgung im Abfallpfad. Nur die Klärsysteme der neuesten Generation sind mit Technologien ausgestattet, die polare Verbindungen der oben genannten Schadstoffgruppe aus dem Abwasser filtern. Gelingt dies nicht, erfolgt der Eintrag über den Kläranlagenauslauf ins Oberflächenwasser. Hohe Wasserlöslichkeit und die Resistenz gegenüber biotischem und abiotischem Abbau können dazu führen, dass verschiedene Substanzen als Spurenkontaminanten auch im Grundwasser wiedergefunden werden. Der Kreislauf schließt sich, wenn einzelne besonders resistente Stoffe wie Carbamazepin im Trinkwasser auftauchen, welches aus Uferfiltrat oder aus Grundwasser gewonnen wurde [Ternes 2001].

Ein Teil der betreffenden Verbindungen hat ein bekanntes Risikopotenzial. Hierzu zählen z. B. die östrogenen Effekte, die EDCs auf das Hormonsystem aquatischer Organismen ausüben [Phillips 1999; Propper 2005; Mills 2005] oder die Inhibierung der MRX-Transporter des Multi-Xenobiotic-Resistance (MRX) Mechanismus in *Mytilus californianus*, einer Meeresmuschel, durch die synthetischen Moschusduftstoffe Tonalid und Galaxolid [Luckenbach 2004]. Für den Großteil der Schadstoffklasse ist das Gefahrenpotenzial noch unbekannt, allerdings kann ein Risiko, das von einer Dauerbelastung mit niedrigen Konzentrationen der Xenobiotika ausgeht, nicht ausgeschlossen werden. Ein Monitoring zur Abschätzung potentieller Gefährdungen von Mensch und Umwelt durch Xenobiotika ist damit der erste Schritt für einen nachhaltigen Umweltschutz.

Die Herausforderung eines solchen Monitorings aus analytisch chemischer Sicht stellt sich durch die erfahrungsgemäß niedrigen Schadstoffkonzentrationen, die detektiert werden müssen, die auftretenden Störeffekte durch Matrixeinflüsse und die für die instrumentelle Analytik ungünstige chemische Beschaffenheit der meisten dieser Verbindungen. Die Konzentrationen der Zielanalyten liegen im Spuren- und Ultra-spurenbereich (ppb und ppt), so dass die Nachweisgrenzen der Analysegeräte nicht ausreichend sind und die Probenvorbereitung zum entscheidenden Faktor für verwertbare Analyseergebnisse wird. Da es sich bei Realproben zumeist um ein Gemisch verschiedener Substanzklassen handelt, muss eine Multikomponentenmethode gefunden werden, die einen großen Bereich polarer, neutraler und basischer Analyte mit der geringsten Anzahl unterschiedlicher Arbeitsschritte erlaubt. Eine Tabelle mit den Strukturen und ausgewählten Eigenschaften der betrachteten Verbindungen ist im Anhang zu finden (Tabelle 14).

In der Wasseranalytik im Spurenbereich ist die sehr zeitaufwändige und kostenintensive Festphasenextraktion weit verbreitet. Mithilfe von unterschiedlichen Membranverfahren als innovative Probenvorbereitungstechniken konnten für einige Substanzgruppen (z. B. Organophosphorpestizide, Chlorphenole) Alternativen gefunden werden (siehe Abschnitt 2.3.2.3), die kostengünstig und vor allem mit weniger Zeitaufwand zuverlässige Ergebnisse erzielen. Nur schnelle, preiswerte Analysemethoden ermöglichen großflächige Screeninguntersuchungen, um Verbleib, Verhalten und Schicksal der Stoffe in der aquatischen Umwelt zu betrachten.

Das Spektrum der Analyten potenziert sich, betrachtet man deren Metabolismus in Lebewesen bzw. den chemischen und biologischen Abbau in Kläranlagen und aquatischer Umwelt. Diese überaus vielfältigen Umsetzungsreaktionen begründen die Notwendigkeit die Risikoabschätzung auf die entstandenen Metabolite zu erweitern, wofür die Detektion und Identifikation der gebildeten Produkte Voraussetzung ist.

2.2 Humanpharmaka mit besonderem Fokus

Die Humanpharmaka Carbamazepin, Clarithromycin und Metoprolol werden in diesem Abschnitt näher betrachtet, da sie als Beispielsubstanzen eingesetzt wurden, um das Verhalten dieser Stoffe bei chemischem und biologischem Abbau zu betrachten.

2.2.1 Carbamazepin

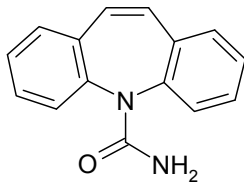


Abbildung 1: Strukturformel Carbamazepin

Carbamazepin (Abbildung 1) ist ein Antiepileptikum. Weitere häufig eingesetzte Vertreter der Antiepileptika/Antikonvulsiva sind Phenytoin, Valproat, Diazepam und Clonazepam. Carbamazepin wird hauptsächlich in der Leber verwertet und dort zu 10,11-Epoxycarbamazepin und anderen Produkten metabolisiert [van Rooyen 2002]. Carbamazepin vermindert zur Vermeidung und Abschwächung epileptischer Anfälle die Leitfähigkeit spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle. Nebenwirkungen sind u. a. Schwindelgefühl, Benommenheit, Sehstörungen, Nystagmus, Ataxie, Herzrhythmusstörungen und Nierenfunktionsstörungen. Die verschriebene Verbrauchsmenge für Carbamazepin in Deutschland lag im Jahr 2001 bei 87,6 t [BLAC 2003], dabei entspricht die definierte Tagesdosis (*engl.* defined daily dose, DDD) DDD = 1 g [WHO 2006].

Carbamazepin gilt als sehr persistent in der Umwelt [Löffler 2005] und passiert zu einem Großteil die kommunale Kläranlage. Die Eliminierungsrate ist mit 7 % sehr gering [Ternes 1998]. Zur Einstufung der ökotoxikologischen Relevanz des Carbamazepins wurden von Cleuvers Toxizitätstests mit Algentests und akutem Daphnientest durchgeführt. Die EC₅₀-Werte¹ lagen bei 85 mg/L bzw. 157 mg/L [Cleuvers 2002]. Substanzen mit einem EC₅₀ zwischen 10 und 100 mg/L werden laut EU als „schädlich für Wasserorganismen“ (R52) eingestuft. Zur Klassifizierung gelten die R-Sätze. Da Carbamazepin als schwer abbaubar gilt [Heberer 2002], kommt der Zusatz „kann in Gewässern längerfristig schädliche Auswirkungen haben“ (R53) hinzu. Eine korrekte Einstufung wäre demnach R52/53. Zur Abschätzung der Gefährdung der Umwelt wird weiterhin das Verhältnis zwischen PEC- und PNEC-Wert² eingesetzt.

¹ EC₅₀-Wert ... *engl.* effect concentration, Effektkonzentration; Bsp. Daphnientest: die Konzentration, bei der 50 % der Testorganismen Bewegungsunfähigkeit zeigen

² PEC_{OG}-Wert ... *engl.* predicted environmental concentration, kalkulierte Konzentration des Wirkstoffes im Oberflächengewässer, Berechnung nach EU Draft Guideline III/5504/94:

Übersteigt dieser Quotient den Wert 1, so wird von einem Umweltrisiko ausgegangen und es ist eine weitere Prüfung notwendig [Apel 2005]. Verwendet man für die Berechnung des PEC/PNEC-Wertes für Carbamazepin den von Ternes gefundenen Medianwert von 250 ng/L [Ternes 1998], ergibt sich ein Quotient von 0,003. Demnach besteht keine akute Gefährdung der Umwelt. In der gleichen Studie wird gezeigt, dass Carbamazepin ubiquitär im Kompartiment Wasser auftritt. Die Detektion des Medikaments im Rheinuferfiltrat (90 Perzentil: 360 µg/L) [Sacher 1998] beweist die unvollständige Eliminierung bei der Bodenpassage und ist Ursache für die Wiederfindung von Carbamazepin im Trinkwasser, das aus den Uferfiltraten gewonnen wurde. Medianwerte für Carbamazepinkonzentrationen in Kläranlagenabläufen liegen bei 2,1 µg/L, in Oberflächenwässern bei 0,25 µg/L. Die im Trinkwasser gefundene Konzentration lag bei 30 ng/L [Ternes 2000].

$$PEC[g/L] = \frac{A \cdot (100 - E)}{365 \cdot P \cdot V \cdot D \cdot 100} \quad (2.1)$$

A ... Verbrauch in kg/a

E ... Elimination in %

P ... Anzahl der Einwohner

V ... Abwasservolumen pro Einwohner in m³/d (default: 200 L/(Einwohner·Tag))

D ... Verdünnungsfaktor mit Oberflächenwasser (default: 10)

PNEC_{aquat.}-Wert ... *engl.* predicted no-effect concentration, Konzentration, bei der im aquatischen Bereich keine Effekte erwartet werden; Gewinnung aus ökotoxikologischen Tests

Der Quotient aus PEC und PNEC charakterisiert das Risiko eines Stoffes für die Umwelt. Bei PEC/PNEC < 1 liegt kein Risiko für die Umwelt vor. Bei PEC/PNEC > 1 werden eingehendere Untersuchungen notwendig. Auflagen zum Umweltschutz werden eingesetzt, wenn das Medikament verwendet wird.

2.2.2 Clarithromycin

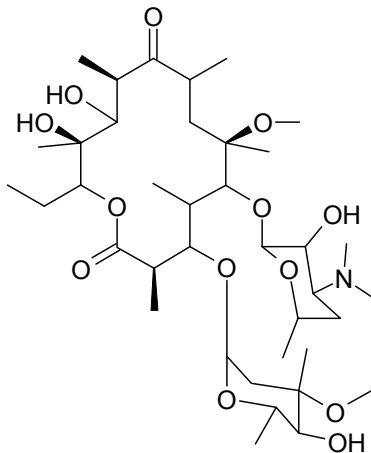


Abbildung 2: Strukturformel Clarithromycin

Clarithromycin (Abbildung 2) ist ein makrolidisches Antibiotikum. Weitere Antibiotika dieser Gruppe sind Erythromycin und Roxithromycin. Sie werden bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten wie Diphtherie, Scharlach oder Keuchhusten, die durch Pneumokokken, Staphylokokken und Streptokokken ausgelöst werden, eingesetzt. Außerdem hemmen sie das Wachstum von Legionellen. Interessanterweise variiert die Verschreibung der einzelnen makrolidischen Antibiotika stark von Land zu Land. Clarithromycin wird in der Schweiz, Österreich und Frankreich zehnmal häufiger als in Deutschland eingesetzt. Erythromycin wird häufig in Großbritannien (1200 mg pro Person pro Jahr), aber kaum in der Schweiz (24 mg pro Person pro Jahr) [McArdell 2003] verschrieben. Die Gesamtsumme makrolidischer Antibiotika, die 1995 in Deutschland eingesetzt wurden, betrug 8,3 – 28,6 t [Hirsch 1999]. Die Ausscheidungs-raten des nicht metabolisierten Clarithromycin sind mit mehr als 60 % hoch [Hirsch 1999]. Herkömmliche Abwasserbehandlungsanlagen sind nicht dafür ausgelegt Antibiotika vollständig zu eliminieren. In Kläranlagenausläufen konnten Clarithro-mycinkonzentrationen zwischen 57 und 330 ng/L detektiert werden [McArdell 2003]. Eine viel versprechende Möglichkeit, die Menge an in Oberflächenwasser eingeleitete Antibiotika zu reduzieren, ist die Nachbehandlung des Klärwerksauslaufes mit Ozon [Huber 2003; Huber 2004; Huber 2005; Ternes 2003].

2.2.3 Metoprolol

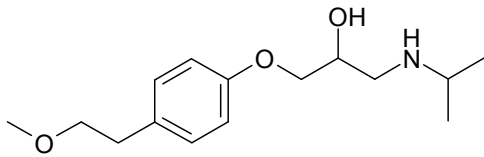


Abbildung 3: Strukturformel Metoprolol

Metoprolol (Abbildung 3) gehört zur Gruppe der selektiven beta-1-Adrenozeptorenblocker (β -Blocker). Weitere β -Blocker sind Propranolol, Sotalol und Atenolol. Diese werden eingesetzt zur Behandlung von Bluthochdruck, Arteriosklerose (koronare Herzkrankheit), bei Herzrhythmusstörungen und zur Akutbehandlung des Herzinfarktes. Durch die Besetzung der beta-Rezeptoren wird die Wirkung von Adrenalin am Herzen verhindert, der Herzschlag wird weniger kraftvoll und langsamer, der Blutdruck sinkt und es werden weniger Energie und Sauerstoff verbraucht.

Bei einer Verschreibungsmenge von 93 t/a in Deutschland im Jahr 2001 [BLAC 2003] ist der Eintrag in die Klärwerke hoch, ein großer Anteil des eingeleiteten Metoprolols wird aber hier auch umgesetzt (86 %, [Ternes 1998]). Trotzdem konnten in einer Studie in 38 von 45 Flusswasserproben Metoprolol mit einem Medianwert von 0,45 $\mu\text{g/L}$ detektiert werden [Ternes 1998]. Das ins Oberflächenwasser eingeleitete Metoprolol gilt als toxisch für aquatische Organismen [Cleuvers 2005].

2.3 Probenvorbereitung

2.3.1 Extraktionsmethoden – erschöpfende vs. Gleichgewichtsmethoden

In der instrumentellen analytischen Chemie ist die Probenvorbereitung der wichtigste Schritt der Gesamtanalyse. Die wenigsten Proben können aufgrund von Matrixbeschaffenheit und vorliegender Konzentration direkt vermessen werden. Somit ist die Aufarbeitung essenziell, aber nicht selten mit vielen Fehlerquellen verbunden. Ziele der Probenvorbereitung sind Abtrennung von störenden Matrixbestandteilen und Einstellen der optimalen Analytkonzentration. Dies verbessert die Selektivität und Richtigkeit der Analyse. Die Richtigkeit kann gesteigert werden, wenn durch gute Reproduzierbarkeit einer Messung zufällige Fehler ausgeschlossen werden können.

Die Anforderungen an moderne Probenvorbereitungstechniken sind hoch. Sie sollten möglichst schnell, preiswert und einfach zu handhaben sein, dabei aber die geforderte Richtigkeit zeigen. Idealerweise sollte die Möglichkeit zur Automatisierung des Verfahrens bestehen. Lösemittelfreie bzw. –sparende Methoden gewinnen hierbei mit steigendem Umweltbewusstsein zunehmend an Bedeutung.

Eine Vielzahl von Probenvorbereitungstechniken mit unterschiedlichem Fokus und variierendem Aufwand ist bekannt. Entscheidend bei der Wahl der geeigneten Technik sind drei Komponenten: Die Probe (physikalische Eigenschaften), die Matrix (Menge und Art) und das im Anschluss eingesetzte Analyseverfahren [Major 2003].

Bei der Extraktion unterscheidet man zwischen erschöpfenden und Gleichgewichtsmethoden. Bei der erschöpfenden Extraktion werden die Analyten vollständig aus der Probe in das Lösemittel überführt. Dies kann mithilfe großer Lösemittelvolumina und Mehrfachextraktionen statisch oder dynamisch in Gegenstromanlagen geschehen. Anwendung findet die erschöpfende Extraktion bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion (*engl.* liquid-liquid-extraction, LLE), der Festphasenextraktion (*engl.* solid phase extraction, SPE) oder der Soxhletmethode. Ausbeute und Geschwindigkeit der Extraktion kann erhöht werden durch Modifikation von Randbedingungen wie Erhöhung von Temperatur und Druck. Die beschleunigte Lösemittlextraktion (*engl.* accelerated solvent extraction, ASE) macht sich dies zunutze.

Verfahren, deren Grundprinzip auf dem Einstellen eines Gleichgewichtes (GGW) beruht, benötigen im Gegensatz zu den erschöpfenden Methoden eine Kalibrierung des Gesamtsystems. Werden Gemische unterschiedlicher Analyten betrachtet, kann die Zeit bis zum Erreichen des GGW von Verbindung zu Verbindung stark variieren. Deshalb wird bei den nicht-erschöpfenden Methoden nach strengem Zeitprotokoll gearbeitet, dadurch wird die GGW-Einstellung normiert. Vorteil der GGW-Methoden ist die Möglichkeit zur Minimierung von Probe- und Lösemittelmenge und die damit verbundene Möglichkeit zur Miniaturisierung der Apparatur. Etablierte Verfahren nicht-erschöpfender Extraktionsmethoden sind die Festphasenmikroextraktion (*engl.* solid phase micro extraction, SPME), die Stabextraktion (*engl.* stir bar sorptive extraction, SBSE) und die Headspace-Methode. Im Anhang sind die physikalischen Grundsätze zu Verteilungsgleichgewichten detailliert dargestellt.

2.3.1.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE)

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion ist eines der ältesten Trennverfahren. Um 1800 war bereits bekannt, dass sich Eisenverbindungen mit Ether ausschütteln lassen. Die Verteilung eines Analyten auf zwei nicht mischbare Phasen ist die Grundlage der LLE. Die optimale Extraktionsausbeute wird durch die Wahl des geeigneten Lösemittels und dessen Volumens sowie durch den pH-Wert und die Temperatur erzielt. Zusätzlich kann die Zugabe von Alkalisalzen (NaCl, Na₂SO₄), die in der Probenmatrix gut löslich sind, bei der Extraktion hilfreich sein. Der dadurch erreichte Aussalzeffekt verringert die Größe der Hydrathülle und verschiebt das Lösungsgleichgewicht hin zur nichtionisierten Form des Substrats, wodurch dieses für organische Lösemittel löslich, sprich extrahierbar wird. Der Aussalzeffekt verstärkt sich mit zunehmender Polarität des Analyten.

Die LLE hat einen hohen Verbrauch an toxischen Lösemitteln und ist schwer zu automatisieren. Probleme können durch die Entstehung von Emulsionen und Schäumen auftreten.

2.3.1.2 Festphasenextraktion (SPE)

Die Aufkonzentration der Analyten erfolgt durch Anreicherung an einer festen Phase, während die flüssige Probe an dieser vorbeigeleitet wird. Die Extraktion beruht auf Oberflächenwechselwirkung von Analyt und Adsorbens (Physisorption und Chemisorption). Das feste Sorbens ist lose gepackt in Kartuschen oder auf einem Trägermaterial aufgebracht (Discs). Die Analyten werden nach Anreicherung aus dem gesamten Probenvolumen durch geringe Mengen eines geeigneten Lösemittels von der festen Phase desorbiert.

Die Methode gilt mit zahlreichen Arbeitsschritten (Konditionieren, Anreichern, Trocknen, Eluieren, Einengen, ...) als zeit- und arbeitsaufwendig und beinhaltet aufgrund der vielen Vorgänge einige Fehlerquellen. Automatisierte und gekoppelte Verfahren können aufgrund apparativer Einschränkungen meist nicht mit den für die Ultraspuren benötigten großen Probemengen ($V \geq 1 \text{ L}$) betrieben werden.

2.3.1.3 Festphasenmikroextraktion (SPME)

Die SPME ist eine Gleichgewichtsmethode. Sie wurde zuerst 1989 von Belardi und Pawliszyn [Belardi 1989] beschrieben. Etabliert hat sich die Methode erst im Jahr 2005 mit einer DIN-Vorschrift vom Dezember 2005 zur Analyse von Pflanzenschutzmitteln, Bioziden und deren Abbauprodukten in Trinkwasser nach DIN 38407-34.

Das Extraktionsmodul besteht aus einer Kanüle. In der Nadel ist auf ein Trägermaterial das Sorptionsmaterial aufgebracht, das somit ein- und ausgefahren werden kann. Als extrahierende Phasen stehen verschiedene Polymermaterialien (Polyacrylat, Polydimethylsiloxan), Divinylbenzen, Carboxen und Carbowax in unterschiedlichen Filmstärken (7 – 100 µm) und Mischungen zur Verfügung.

Die Extraktion kann bei nicht volatilen Analyten durch Eintauchen des Sorptionsmaterials in die flüssige Probe oder bei flüchtigen Analyten durch Exposition der Faser in den über der Probe befindlichen Gasraum erfolgen. Die Anreicherung beruht auf der Adsorption der Analyten im Sorptionsmaterial. Die Desorption kann thermisch im heißen Injektor des Gaschromatographen (GC) oder bei der Kopplung mit Hochleistungsflüssigchromatographie (*engl.* high performance liquid chromatography, HPLC) durch Lösemittel in einer Probenschleife geschehen.

Die SPME benötigt nur kleine Probevolumina und kann in Verbindung mit der Gaschromatographie lösemittelfrei betrieben werden. Die Matrixabtrennung ist gut, was den Einsatz in stark matrixbelasteten Proben, wie beispielsweise Lebensmitteln, ermöglicht (Triazine in der Tomate [Lord 2004]). Die Methodik ist einfach und zeitsparend gegenüber SPE und LLE. Durch die Verwendung automatischer Probengeber (z. B. CombiPal) können Effizienz und Zeitaufwand optimiert werden. Im Vergleich zu erschöpfenden Methoden, bei denen mit großen Probevolumina gearbeitet wird, ist die Sensitivität der SPME geringer. Da die SPME schwer mit der HPLC zu koppeln ist, kam sie in dieser Arbeit wenig zum Einsatz.

2.3.2 Membranen

2.3.2.1 Grundlagen

Die Auftrennung von Stoffgemischen ist in Medizin, Industrie und Forschung notwendig. Klassische Methoden der Trennung von Gemischen sind Kristallisation und

Destillation. Hierbei kommt es zu einer Änderung des Aggregatzustandes der zu betrachtenden Stoffe. Wenn jedoch der Aggregatzustand nicht verändert werden darf, wie z. B. bei der Blutdialyse, gilt die Trennung an Membranen als eine interessante Alternative.

Im Trennprozess stellt die Membran eine physische Barriere dar, die Bereiche unterschiedlicher Konzentrationen der Teilchen abgrenzt und nur für bestimmte Arten von Teilchen durchlässig ist. Der Stofftransport dieser Teilchen durch die Membran wird durch unterschiedliche Triebkräfte realisiert. Hierzu dienen Konzentrationsgradienten, pH-Gradienten, Druck, elektrisches Potenzial oder die Temperatur. Die Trennung von Gemischen, also die Anreicherung einer Komponente in einer der Phasen, wird erreicht, wenn die Membran nur selektiv Durchlass gewährt. Abbildung 4 gibt die Trennung eines Stoffgemisches an einer Membran schematisch wieder.

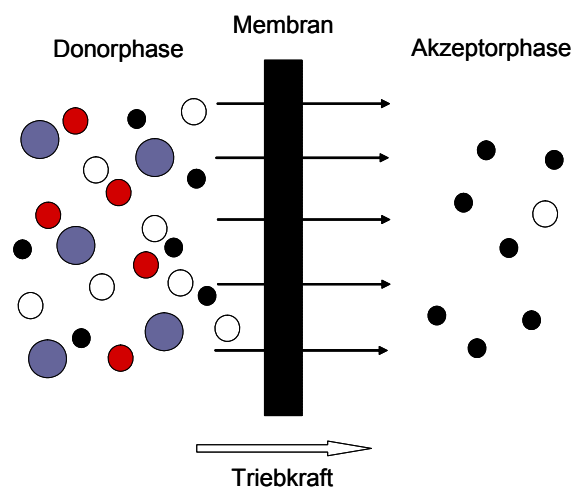


Abbildung 4: Das Schema zeigt den selektiven Stofftransport durch eine Membran.

Zur Herstellung von Membranen werden synthetische und natürliche Polymere (Polypropylen, PP, Polyethylen, PE, Polyvinylchlorid, PVC, Zellulose) oder anorganische Materialien (Keramiken, Palladium, Aluminiumoxid) verwendet. Man unterscheidet zwischen porösen und unporösen Membranen wobei ein Porendurchmesser von 20 Å als Grenzwert zwischen porös und unporös gilt [Stauda 1992]. Bei porösen Membranen beruht das Prinzip der Trennung auf dem Größenausschlussverfahren. Die Poren der Membran sind zwar größer als die membranbildenden Moleküle, aber immer noch klein genug, um hochmolekulare Verbindungen ausschließen zu können. Ein Beispiel für die Stofftrennung an porösen Membranen ist die Filtration. Unporöse Membranen bestehen aus Polymeren oder einer Flüssigkeit, wobei

die höhere Flexibilität und schnellere Diffusion durch die flüssigen Membranen der besseren Haltbarkeit der Polymermaterialien gegenüber steht. Als flüssige Membranen werden unterschiedliche, schwer verdampfbare Lösemittel verwendet [Müller 2003; Rasmussen 2004], die mit Wasser nicht mischbar sein dürfen, gut in den Poren der porösen Membran immobilisiert werden und die gewünschte Selektivität bei der Extraktion aufweisen. Im Anhang sind die theoretischen Betrachtungen zu Thermodynamik und Kinetik beim Stofftransport durch unporöse Membranen detailliert beschrieben.

2.3.2.2 Membranvermittelte Flüssig-Flüssig-Extraktion

Jönsson und Matthiason [Jönsson 1999a; Jönsson 1999b] entwickelten das auf dem Prinzip von Melcher [Melcher 1990] und Audunsson [Audunsson 1986] basierende Prinzip der Lösemittelunterstützten Membranextraktion (*engl.* Supported Liquid Membrane Extraction, SLM). Hierbei ist eine organische Phase als Grenzschicht zwischen zwei wässrigen Phasen platziert. Für die praktische Handhabung ist die organische Phase, vorzugsweise ein schwer verdampfbares Lösemittel (n-Undecan, Dihexylether, n-Octanol), in den Poren eines Trägermaterials (mikroporöses PP, PE) aufgetragen. Die Triebkraft der Extraktion bildet ein angelegter pH-Gradient zwischen Donor- und Akzeptorphase. Zur Anreicherung basischer Verbindungen wird der basischen Donorlösung eine saure Akzeptorlösung gegenüber gestellt. Nach dem Übergang aus der Membran in die saure Phase ist der Rücktransport des zuvor ungeladenen basischen Analyten aufgrund der Protonierung behindert. Die Gleichgewichtseinstellung ist damit stark zur Akzeptorlösung verschoben und hohe Extraktionsausbeuten können erzielt werden. In umgekehrter Weise ist auch die Anreicherung saurer Analyten möglich, Voraussetzung ist allein die Ionisierbarkeit der Substanzen.

Handelt es sich um unpolare organische Analyten, ist der Einsatz der Flüssig-Flüssig-Extraktion an Mikroporösen Membranen (*engl.* Microporous Membrane Liquid Liquid Extraction, MMLLE) zweckmäßiger. Bei der zuerst von Jönsson und Matthiason [Jönsson 1999a] verwendeten Technik wird anstatt der wässrigen Donorphase ein organisches Lösemittel verwendet. Je nach verwendeter Analysetechnik und Detektionsmethode können Akzeptorphase und Flüssigmembran, die wie bei der SLM

in den Poren eines mikroporösen Materials aufgebracht ist, identisch oder verschieden sein. Die miniaturisierte Version der MMLLE ist die Flüssigphasenmikroextraktion (*engl.* Liquid Phase Micro Extraction, LPME). Diese Methode wurde etabliert von Rasmussen und Pedersen-Bjergaard [Rasmussen 2000] und findet hauptsächlich Anwendung in der klinischen Chemie zur Bestimmung von Pharmaka in komplexen Proben (Blut, Urin). Bei dieser Anwendung liegen die Konzentrationen der zu detektierenden Substanzen nicht im Spurenbereich, weshalb vorwiegend Kapillarelektrophorese/MS als Analysensystem eingesetzt wird, wodurch sich die Wahl des Lösungsmittels vereinfacht. Für die Bestimmung geringer Konzentrationen kommen HPLC/MS- und GC/MS-Systeme zum Einsatz, dies beschränkt die Wahl des Lösemittels der Akzeptorphase und/oder Flüssigmembran. Es müssen die Mischbarkeit mit dem Eluenten der HPLC bzw. die Verdampfbarkeit im Injektor des GC gewährleistet sein.

2.3.2.3 Membranunterstützte Lösungsmittlextraktion

Die membranunterstützte Lösungsmittlextraktion (*engl.* Membrane Assisted Solvent Extraction, MASE) wurde 2001 von Hauser [Hauser 2001] erstmals erwähnt. Sie basiert auf der LLE, wobei die zwei Phasen durch eine unporöse Membran getrennt werden. Es werden geringe Mengen an organischen Lösemitteln eingesetzt. Das Verhältnis Probe/Extraktionsmittel liegt bei rund 100/1 v/v.

In den ersten Versuchen wurde eine Folie als Flachbettmembran zwischen zwei Phasen gebracht [Hauser 2001] und anschließend die Extrakte mit einer Spritze entnommen und in ein GC-MS-System injiziert. Das Verfahren wurde zur Bestimmung von Chlororganika in wässrigen Proben eingesetzt.

Eine Weiterentwicklung in Zusammenarbeit mit der Firma Gerstel (Mühlheim an der Ruhr, Deutschland) ermöglichte 2002 die Vereinfachung des Moduls. Dazu wurde die Folie zu einem Beutel mit einem Fassungsvermögen von ca. 750 μL verschweißt und mit einer speziellen Vorrichtung in einem 20 mL Headspace-Vial befestigt. Das Headspace-Vial enthielt 15 mL Probe, die als Donorphase vorlagen und der Membranbeutel 500 μL n-Hexan als Akzeptorphase [Hauser 2002]. Die Detektion erfolgte wiederum durch manuelles Entfernen des Extraktes mit einer Spritze und Injektion in

ein GC-MS-System. Eine Optimierung wurde für Triazine, Hexachlorcyclohexane und Phenanthren durchgeführt.

Unter Verwendung eines CombiPal Autosamplers (Gerstel) und der Large-Volume-Injektion (LVI) konnte der oben beschriebene Ablauf teilweise automatisiert werden [Schellin 2006]. Nach dem manuellen Befüllen des Vials mit Probe und Einsetzen des Membranbeutels inkl. Verschließen des Vials werden die verbleibenden Schritte (Befüllen des Beutels mit Akzeptorphase, Temperieren und Rühren, LVI) durch den Autosampler übernommen. Diese halbautomatisierte MASE mit LVI wurde eingesetzt zur Detektion von polychlorierten Biphenylen, Organophosphorpestiziden, Phenolen und Chlorphenolen aus Wässern.

Der deutlichste Vorteil der verschiedenen Mikroextraktionsmethoden gegenüber der LLE und der SPE ist die gute Abtrennung von Matrix [Kuورانne 2003]. Weiterhin ist auch der verminderte Zeitaufwand und die Möglichkeit mehrere Proben parallel zu bearbeiten relevant. Der niedrige Preis des mikroporösen Polymermaterials erlaubt die Einmal-Verwendung und bewahrt somit vor Recoveryfehlern. Dem steht entgegen, dass einsatzbereite Module nur für wenige Anwendungen kommerziell erworben werden können. Die Fa. Gerstel bietet ein Setup zur MASE mit PP-Beuteln mit einer Wandstärke von 30 µm und ca. 1 mL Volumen an. Für spezielle Applikationen bedarf es nach wie vor der manuellen Herstellung der Folienbeutel.

2.4 Trenn- und Detektionstechniken – Quantifizierung und Identifikation der Problemstoffe und ihrer Metaboliten

Zur Bestimmung komplexer organischer Gemische, wie sie in Wasserproben vorliegen, ist, je nach Detektionsart, eine zuverlässige Auftrennung unumgänglich. Die in der organischen Analytik meist verbreiteten Methoden sind hierbei die Gaschromatographie (GC) und die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC). Die GC wird zur Analyse von Molekülen mit einer Molmasse bis ca. 550 g/mol eingesetzt. Die Verbindungen müssen verdampfbar und thermostabil sein. Für thermolabile, schwer flüchtige oder polare Stoffe kommt die HPLC zum Einsatz. Sie ermöglicht zusätzlich die Trennung hochmolekularer Verbindungen. Die Trennleistung basiert auf unterschiedlich gearteten Wechselwirkungen der Analyten mit stationärer und mobiler Phase.

Unter der Vielzahl der Detektoren, die mit den jeweiligen Trennverfahren gekoppelt werden können, werden für die weiteren Ausführungen lediglich die Massenspektrometer näher beschrieben, da diese in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich zum Einsatz kamen.

2.4.1 Die Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS)

Massenselektive Detektoren (MSD) ermöglichen sowohl eine sensitive Detektion bekannter Zielanalyte als auch die Identifikation unbekannter Verbindungen in komplexen Gemischen.

Nach der Trennung im GC gelangen die Analyten über die Transferline in die Ionenquelle des MSD, wo durch Elektronenstoßionisation (*engl.* electron impact, EI) oder Chemische Ionisation (CI) Ionen erzeugt werden. Die am häufigsten verwendete Ionisationsart ist die Elektronenstoßionisation. Hierbei entstehen aus dem Analyt durch den Beschuss mit Elektronen (70 eV) typische Molekülfragmente. Die EI-Ionisation gilt als energiereiche, „harte“ Ionisation. Eine energieärmere, „weiche“ Form der Ionisation stellt die chemische Ionisation dar. Hierbei wird ein Reaktandgas ionisiert. Die dabei entstehenden thermischen Elektronen ermöglichen die Ionisation der Analyten. Ergebnis ist eine schwächere Fragmentierung im Vergleich zur Ionisation durch Elektronenstoß. Die Funktionsweise der Negativen Chemischen Ionisation (NCI) ist beispielhaft für die chemische Ionisation in Abschnitt 2.4.2 gezeigt. Die Ionisation erfolgt im Plasma.

Die entstandenen Molekülfragmente werden im Massenanalysator entsprechend ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis getrennt. Die Trennung der Ionen beruht auf unterschiedlichen physikalischen Prinzipien: (a) Ionenstrahlen können in elektrischen oder magnetischen Feldern abgelenkt werden (Sektorfeldgeräte); (b) Ionen unterschiedlicher Masse können in elektrischen Wechselfeldern gefiltert werden (Quadrupole, Ionenfallen, Cyclotronresonanz-Analysatoren) oder (c) die Ionen werden getrennt durch unterschiedlich lange Flugzeiten im feldfreien Raum (Flugzeit-Analysatoren). Am häufigsten kommen Quadrupole als Massenanalysatoren zum Einsatz. Sollen unbekannte Verbindungen identifiziert werden, wird das Masse-Ladungs-Verhältnis in einem weiten Massenbereich gescannt (Scan-Mode). Anhand des für jede Verbindung typischen Fragmentierungsmusters kann daraufhin mithilfe von

Spektrenbibliotheken meist eine Zuordnung erfolgen. Ist die quantitative Analyse bekannter Substanzen gefordert, werden nur einzelne Ionenspuren (*engl.* Single Ion Monitoring, SIM) aufgenommen. Die Aufnahme im SIM-Mode ermöglicht eine wesentlich sensitivere Aufnahme im Vergleich zum Scan-Mode.

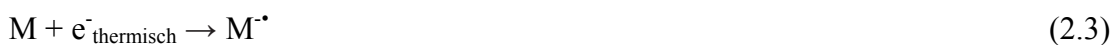
2.4.2 Das Prinzip der Chemischen Ionisation in der GC-MS

Die Ionisation erfolgt mithilfe eines großen Überschusses an Reaktandgas, das infolge seiner Ionisation langsame, sog. thermische Elektronen, liefert. Als Reaktandgas werden üblicherweise Methan oder Ammoniak eingesetzt, es kann aber z. B. auch Isobutan, Wasserstoff oder Kohlenwasserstoffe verwendet werden. Da die Ionisation durch eine chemische Reaktion erfolgt, spricht man von einer sanften Ionisation, die weniger Fragmentierungen als die Elektronenstoßionisation zur Folge hat. Als Quasimoleküle entstehen im positiven Mode durch Protonentransfer $[M+H]^+$ -Ionen und im negativen Mode aufgrund von Elektroneneinfangprozessen M^- -Ionen.

Ionisation des Reaktandgases und Erzeugung thermischer Elektronen:



Elektroneneinfangprozess des Analytmoleküls:



Die NCI wird hauptsächlich verwendet für die Detektion von mit Halogenen substituierten Analyten wie PCBs und Dioxine oder in Verbindung mit Derivatisierungsreaktionen, die Gruppen mit dem Potenzial zur Aufnahme von Elektronen in das Molekül einführen. In dieser Arbeit wurde die Umsetzung von polaren Gruppen (Hydroxyl-, Carboxyl-) mit Pentafluorbenzylbromid (PFBBBr) zu Pentafluorbenzylderivaten nach Nakamura et al. [Nakamura 2000; Nakamura 2001] eingesetzt. Abbildung 5 zeigt den Reaktionsmechanismus eines Alkohols mit PFBBBr.

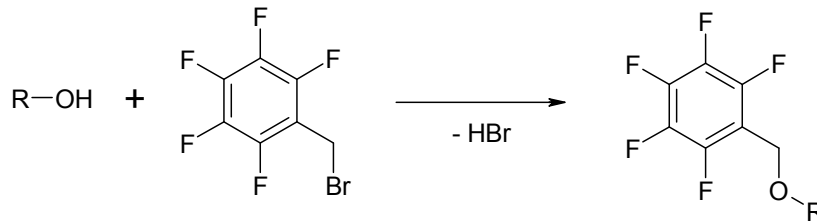


Abbildung 5: Reaktion von polaren Gruppen mit PFBBr. Im Beispiel ist die Umsetzung eines Alkohols gezeigt.

2.4.3 Die Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung (HPLC-MS)

Wie schon bei der GC-MS beschrieben, gelangen die Analyten nach der Trennung auch hier direkt in die Ionenquelle. Während bei der GC-MS die Ionisation im Vakuum geschieht, wird in der HPLC-MS unter Atmosphärendruck ionisiert. Erst im Massenspektrometer liegt Hochvakuum an. Die räumliche Trennung von Ionisation und Massendetektion ist notwendig, um die hohen Lösemittelflüsse in der HPLC (0,1 bis 2 mL/min) realisieren zu können.

Drei unterschiedliche Ionisationsarten sind bekannt. Am weitesten verbreitet ist die Elektronensprayionisation (ESI). Die Analyten in der flüssigen Phase werden bei hohem Druck und hoher Temperatur über eine Spraynadel zu kleinen, mehrfach geladenen Tröpfchen versprüht, da an dieser Nadel Hochspannung anliegt. Ein parallel eingeleitetes Gas, das Nebulizergas, unterstützt die Bildung der geladenen Tröpfchen. Durch die Verdampfung des Lösungsmittels steigt das elektrische Feld und aufgrund der erfolgten Ladungsverdichtung in den Tröpfchen können die Ionen an die Oberfläche treten, bis schließlich eine Coulomb-Explosion die Ionen freisetzt. Das Curtaingas unterstützt die Desolvation der Ionen. Die gebildeten Ionen gelangen über das Orifice in den Massenspektrometer. Bevorzugt entstehen, je nach angelegter Spannung und Modus, einfach protonierte bzw. deprotonierte Molekülionen ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$). Die mögliche Bildung von Addukten kann die Analyse erschweren, da z. B. $[M+Na]^+$ -Ionen auch bei starker Energiezufuhr kaum fragmentieren. Durch die gezielte Zugabe von Salzen zum Laufmittel (z. B. Ammoniumacetat) kann die Ionisationsausbeute gesteigert werden.

Weitere Ionisationstechniken in der Kopplung mit LC sind die Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI) und die relativ neue Technik der Atmosphärendruck-photoionisation (APPI). Die Funktionsweise der APPI ist in Abschnitt 2.4.4 näher erläutert.

2.4.4 Die Funktionsweise der APPI-Quelle

Bruins et al. entwickelten 2000 die Atmosphärendruckphotoionisation (APPI) als neue Ionisationsmethode in der LC-MS zur sensitiven Detektion verschiedener Stoffgruppen [Robb 2000]. Generell ist das Anwendungsspektrum dem der APCI-Ionisation ähnlich, wohingegen deutlich höhere Sensitivität erzielt werden kann (Abbildung 6).

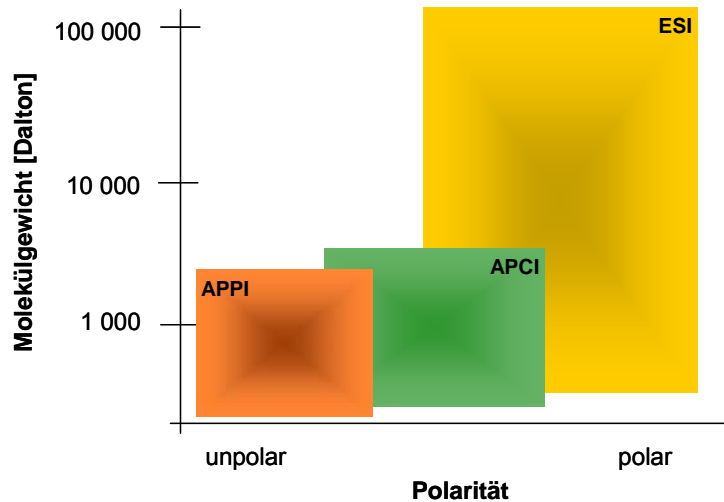
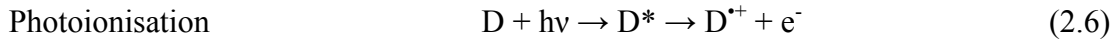


Abbildung 6 Einsatzspektren der unterschiedlichen Ionisationsarten APPI, APCI und ESI. Die Abbildung ist verändert nach [Fiedler 2004].

Die APPI gilt als weiche Ionisationsmethode. Die Ionisation findet in der Gasphase statt. Dazu muss zunächst das Laufmittel verdampft werden. Die Ionisationsenergie (IE) liefert eine Kr-Entladungslampe (10 eV). Moleküle mit einer IE kleiner als die der Entladungslampe können auf verschiedene Weise angeregt werden, Moleküle mit einer IE größer als 10 eV (z. B. die Bestandteile der Luft N_2 , H_2O , O_2) werden nicht angeregt.



Da die Ionisationsrate der Analyten auf Grund der umgebenden Lösungsmittelmoleküle statistisch gesehen sehr klein ist, wird ein Zusatzstoff (Dopant) im Überschuss zugegeben. Dieser Dopant ist photoionisierbar und dient als Ladungsüberträger zwischen Photonen und Analyt, indem er mit dem Analyt über Ladungsaustausch oder Protonentransfer reagiert.



Daraus resultierend werden in den MS-Spektren Molekülonen ($\text{M}^{+\bullet}$) und protonierte Molekülonen gefunden ($[\text{M}+\text{H}]^{+\bullet}$). Typische Dopants sind Toluol (IE = 8,83 eV) und Aceton (IE = 9,70 eV). Die APPI findet hauptsächlich Verwendung bei der Ionisation von Molekülen, die aufgrund ihrer Struktur zur Protonenaufnahme nicht oder nur geringfügig dazu in der Lage sind (z. B. Anthracen) [Raffaelli 2003]. Der Aufbau der APPI-Quelle ist in Abbildung 7 dargestellt.

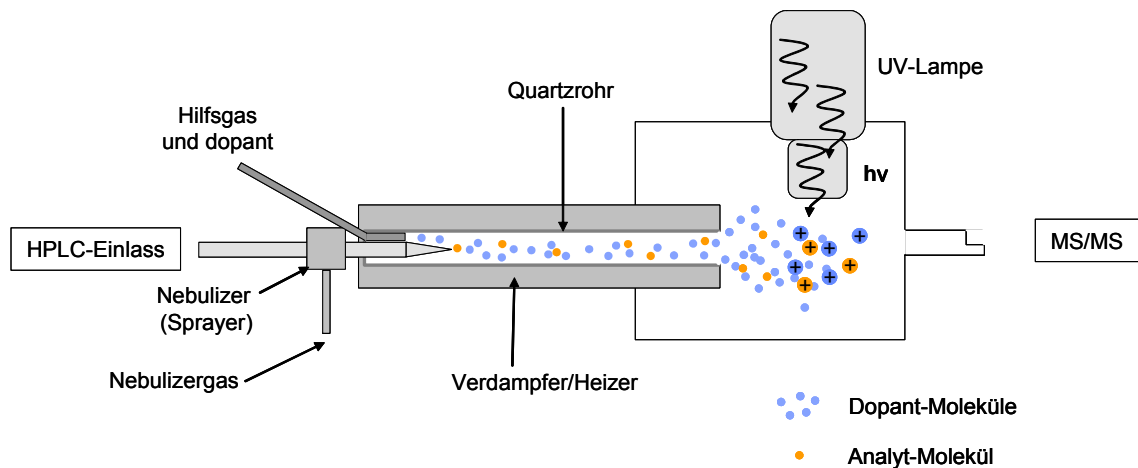


Abbildung 7: Schematische Darstellung der APPI-Quelle. Die Abbildung ist verändert nach [Bos 2006].

2.4.5 Die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

Die Tandem-Massenspektrometrie mit Triple-Quadrupole-Geräten gilt als eine der leistungsfähigsten analytischen Instrumente. Einerseits können strukturelle Informationen der Analyten erhalten werden, andererseits kann aus komplexen Gemischen eine Einzelsubstanz auch mit geringer Konzentration bestimmt werden. Damit ist sie prädestiniert für den Einsatz in Metabolitenidentifizierung und Spurenanalytik.

Ein MS/MS besteht aus zwei hintereinander geschalteten Massenspektrometern (MS), die durch eine Stoßkammer miteinander verbunden sind. Aus der ionisierten Probe (alle Ionisationsarten sind möglich) wird im ersten MS (Q1) ein Ion mit besonderem

Interesse gefiltert und in die Stoßkammer gelenkt. Dort wird seine kinetische Energie teilweise in Vibrationsenergie umgewandelt und durch Kollisionen mit Gasmolekülen eines Inertgases in der Stoßzelle kommt es zur weiteren Fragmentierung. Diese Massen werden im zweiten MS (Q3) aufgetrennt und analysiert (MS II). Dieses Prinzip ist schematisch in Abbildung 8 gezeigt.

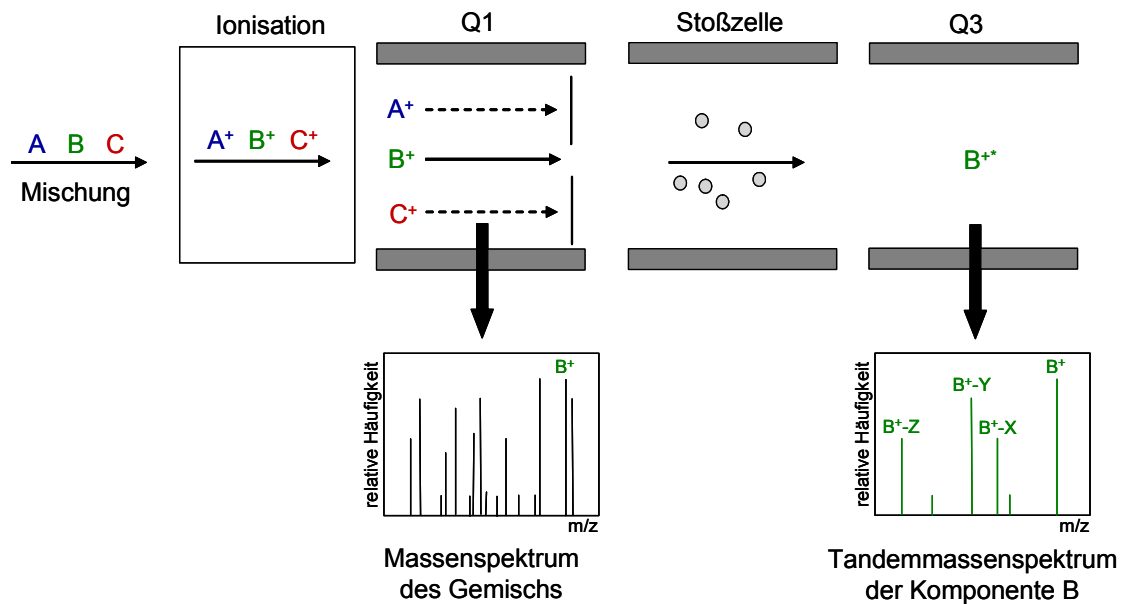


Abbildung 8: Prinzip des Tandemmassenspektrometers. Die Abbildung ist verändert nach [Hesse 2005]

Als Hilfsmittel zur strukturellen Aufklärung stehen „Q1 Full Scan“, „Product Ion Scan“, „Precursor Ion Scan“ und „Constant Neutral Loss“ und zur sensitiven Quantifizierung „Selected Ion Monitoring (SIM)“ und „Multiple Reaction Monitoring (MRM)“ zur Verfügung. Im Folgenden sind die oben genannten Modi kurz erläutert und mithilfe von Abbildungen beschrieben. Die Abbildungen 9 bis 14 sind verändert nach [Applied Biosystems].

2.4.5.1 Q1 Full Scan

Das erste Massenspektrometer (Q1) wird als einfacher Massenanalysator eingesetzt. Die Massen werden aufgetrennt und analysiert, während über einen breiten Bereich von Massen gescannt wird (z. B. m/z 100 bis 600). Ergebnis ist ein Spektrum der in der

Probe vorhandenen Massen. Der Q1 Full Scan kommt zur Identifizierung von Molekülonen zum Einsatz.

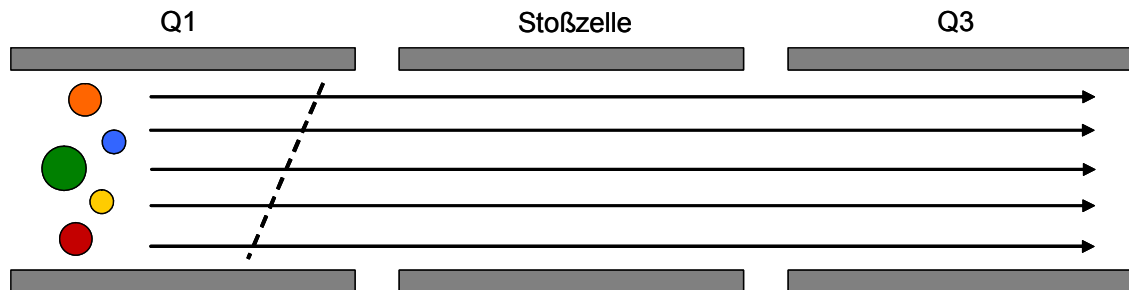


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Q1 Full Scan

2.4.5.2 Product Ion Scan

Q1 wird auf eine bestimmte Masse fixiert. Dieses Ion wird in der Stoßzelle fragmentiert. Das zweite Massenspektrometer (Q3) scannt über einen bestimmten Massebereich und trennt und analysiert die Fragmente. Der Product Ion Scan gibt Strukturinformationen und ist ein Zwischenschritt bei der Entwicklung einer quantitativen Methode.

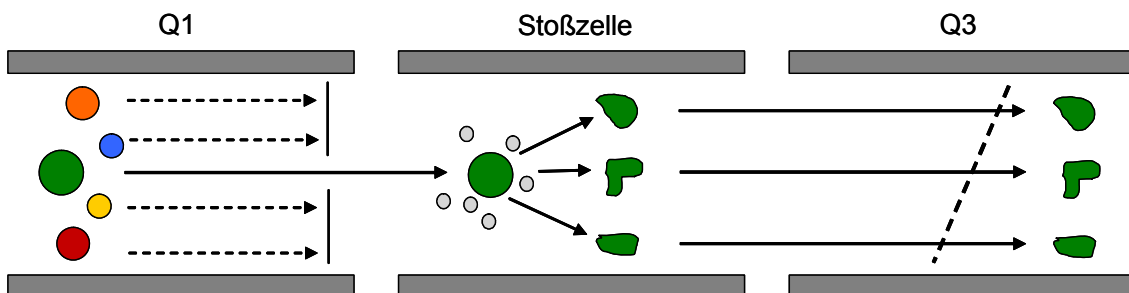


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Product Ion Scan

2.4.5.3 Precursor Ion Scan

Q3 wird auf eine Masse fixiert. Q1 scannt einen bestimmten Massebereich. Diese Kombination ermöglicht die Identifikation des Ursprungs eines bestimmten Produktions. Bei der Metabolitenidentifizierung können so z. B. verschiedene Metaboliten mit demselben Product Ion bestimmt werden.

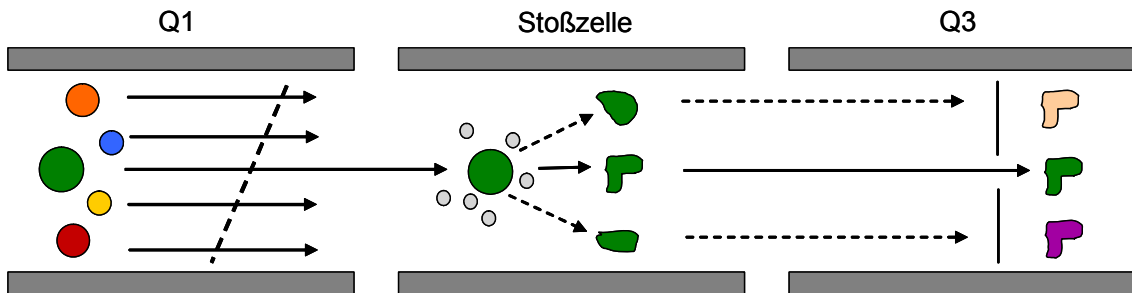


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Precursor Ion Scan

2.4.5.4 Constant Neutral Loss

Q1 und Q3 scannen über bestimmte Massenbereiche, allerdings mit einer festen Differenz zueinander. Das Spektrum zeigt, welche Ionen neutrale Teilchen mit der Q1-Q3-Differenz abgeben. Der Constant Neutral Loss ist eine Ergänzung zum Precursor Ion Scan und unterstützt bei der Identifikation ähnlicher Metabolite.

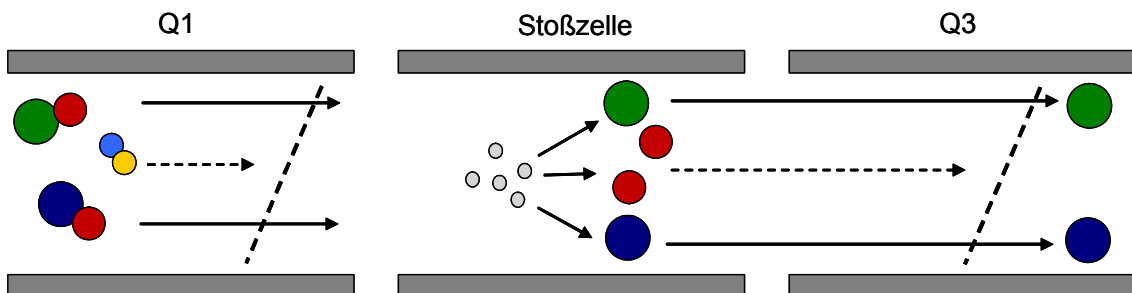


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Constant Neutral Loss

2.4.5.5 Selected Ion Monitoring (SIM)

Eine einzelne Masse wird vom Q1 aufgenommen. Das SIM kann zur Quantifizierung oder Optimierung des Q1 für ein späteres MRM eingesetzt werden.

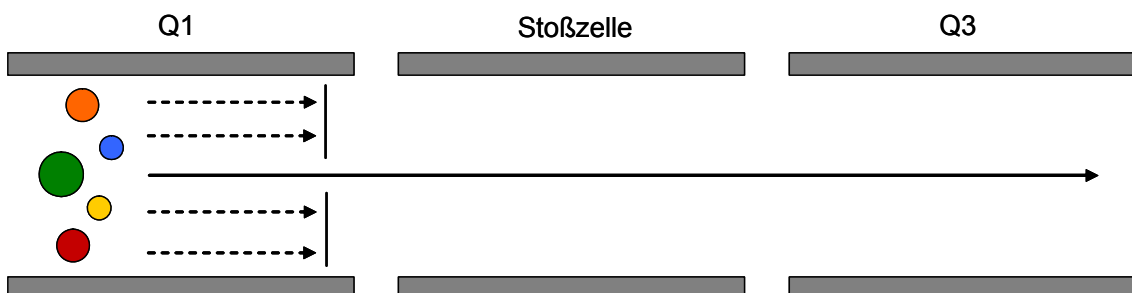


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Selected Ion Monitoring

2.4.5.6 Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Es wird ein bestimmter Übergang von Precursor Ion zu Product Ion aufgenommen. Das MRM ermöglicht das maximale Signal-Rausch-Verhältnis der Analyten und wird somit primär für die Quantifizierung verwendet. Eine Vielzahl von Übergängen kann gleichzeitig gemessen werden.

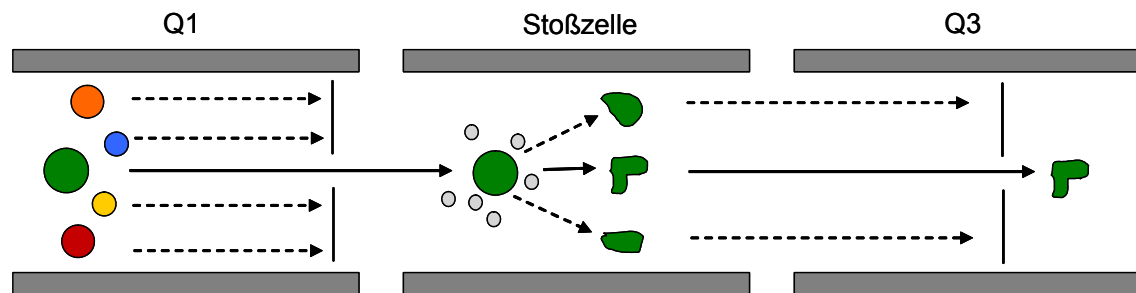


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Multiple Reaction Monitoring

2.4.6 Der Einsatz von Derivatisierungen in der GC und HPLC

Als Derivatisierung bezeichnet man allgemein die Umsetzung des Analyten mit einem Reagenz zur Modifizierung der chemischen und physikalischen Eigenschaften. In vielen Fällen ist sie notwendig und vor allem in der Spurenanalytik unerlässlich.

Man unterscheidet drei Anwendungsgebiete der Derivatisierungen. Zum einen wird die Derivatisierung eingesetzt, um Moleküle, welche nicht geeignet sind für gaschromatographische Analysen aufgrund von schlechter Flüchtigkeit in dieser Eigenschaft zu modifizieren. Durch gezielte Substitution der problematischen Funktion im Molekül wird die Flüchtigkeit der Verbindung erhöht und damit ein besseres chromatographisches Ergebnis erzielt. Hierfür werden hauptsächlich die verschiedenen Methoden der Silylierung von Hydroxy- und Carboxygruppen eingesetzt. Weiterhin wird die Derivatisierung verwendet, um die Empfindlichkeit der Detektion der Analyten zu erhöhen, wie z. B. durch die Einführung halogenhaltiger Substituenten in das Molekül bei der Verwendung von Elektroneneinfangdetektoren (*engl.* electron capture detector, ECD) oder durch negative chemische Ionisation (NCI, siehe Abschnitt 2.4.2) in der GC-MS bzw. Einführung UV-aktiver Gruppen für die HPLC-UV-Detektion. Ein dritter Anwendungsbereich der Derivatisierung ist in der qualitativen Analyse organischer Verbindungen zu sehen, die während der Aufklärung von Metaboliten gebildet durch

biologischen und chemischen Abbau zum Einsatz kommt. Als Bsp. ist hier die Umsetzung von Aldehyden und Ketonen mit Dinitrophenylhydrazin (DNPH) zu farbigen Hydrazonen zu nennen. Vorschrift und Reaktionsgleichung sind in Abschnitt 3.10 zu finden.

2.5 Oxidationsprozesse zum Abbau problematischer Verbindungen

In der Regel besteht eine konventionelle Kläranlage aus drei Reinigungsstufen: (1) der mechanischen Reinigung zur Entfernung von groben Stoffen, (2) der biologischen Reinigung durch Mikroorganismen im Belebtschlamm-Verfahren und (3) der chemischen Ausfällung von Phosphat. Als vierte Stufe kann ein Sandfilter angeschlossen sein. Seit ca. 10 Jahren werden außerdem in der kommunalen Abwasserreinigung Membranfilter eingesetzt.

Wie oben beschrieben ist die Eliminationskraft dieser herkömmlichen Kläranlagen für einige der betrachteten Verbindungen limitiert [Ternes 1998]. Zum weiteren Abbau können deshalb verschiedene zusätzliche Prozesse vor- oder nachgeschaltet werden. Eine große Rolle spielen hier Oxidationsprozesse wie die Ozonierung und der Einsatz von H_2O_2 . Im Folgenden sind diese zwei Möglichkeiten des verstärkten Abbaus kurz erläutert.

2.5.1 Ozonierung

Die Aufbereitung von Wasser zur Entfernung von Mikroverunreinigungen durch Ozonierung ist eine Technik, die in der Trinkwasseraufbereitung bereits etabliert ist und mehr und mehr in der Abwasseraufbereitung an Bedeutung gewinnt. Die Verteilung des Ozons im belasteten Abwasser geschieht meist durch Begasung. Die Ozonierung ist teurer aber umweltfreundlicher als die außerdem in der Wasseraufbereitung eingesetzte Chlorung.

Die Mikroverunreinigungen werden durch Ozon oxidiert und sehr rasch abgebaut. Mit dieser effektiven Methode wurden bereits gute Erfolge bei der Entfernung von recht persistenten Verbindungen wie z. B. Carbamazepin aus Abwasser erreicht [Ternes 2004]. Aus diesem Grunde wurde die Ozonierung auch für den Abbau eines Antibiotikums, Clarithromycin, sowie eines β -Blockers, Metoprolol, getestet. Detaillierte Ausführungen zu den einzelnen Reaktionsmechanismen sind in Abschnitt 4.2.3 zu finden.

2.5.2 Oxidation mit FENTON'S Reagenz

FENTON'S Reagenz setzt sich zusammen aus Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und einem Fe(II)-Salz. Die Fe(II)-Ionen katalysieren in saurer Lösung die Bildung von Hydroxyl-Radikalen aus H_2O_2 . Bei einem Redoxpotenzial von +2,85 V gelten die Hydroxyl-Radikale als sehr starkes Oxidationsmittel. Sie lagern sich bevorzugt an Doppelbindungen an oder abstrahieren ein H-Atom. Radikalische Substitutionsreaktionen an Aromaten sind bekannt.

vereinfachtes Reaktionsschema der Radikalkettenreaktion:



Der Einsatz von FENTON'S Reagenz als Nachklärstufe ist beschränkt, da für bestimmte Verbindungen erst bei sehr niedrigem pH-Wert (< 3) die gewünschten Reaktionen ablaufen. Das macht einen Einsatz nicht praktikabel oder ist mit enormer Kostensteigerung (Neutralisation des Ablaufes) verbunden [Ternes 2006]. In dieser Arbeit wurde die Oxidation mit FENTON'S Reagenz unterstützend bei der Identifikation von Metaboliten des biologischen Abbaus von Carbamazepin eingesetzt.