

**Entwicklung eines Summenparameters für
potenziell bioakkumulierbare Stoffe (PBS) im Abwasser**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2001

vorgelegt von
Georg Stenz

Tag der mündlichen Prüfung: 01.06.2001

Dekan: Prof. Dr. Hansgeorg Probst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Krauß

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Günther Jung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Jörg W. Metzger und Herrn Prof. Dr. Peter Krauß in der Zeit von Oktober 1997 bis Mai 2001 am Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Jörg Metzger danke ich sehr für die Überlassung des spannenden Themas, die wertvollen Anregungen und Diskussionen und die in jeder Hinsicht umfangreiche, rückhaltlose Unterstützung.

Herrn Prof. Peter Krauß danke ich sehr für seine Bereitschaft als Hauptberichterstatter der Dissertation zu fungieren und die leidenschaftlichen Diskussionen, die ich mit ihm führen durfte.

Mein besonderer Dank gilt zudem:

- Susann Petrick und Ines Graf für Ihre engagierte, gründliche und selbstständige Arbeit im Laboratorium.
- Silke Rupp, Tobias Kober und allen anderen wissenschaftlichen Hilfskräften für die gewissenhafte Probennahme und Probenaufarbeitung.
- allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Hydrochemie für das angenehme Arbeitsklima, die interessanten Diskussionen und die erholsamen Ablenkungen.
- Dr. Joachim Heidemeier und Joachim D'Eugenio vom Umweltbundesamt für die stets gute Zusammenarbeit.
- den Kläranlagenbetreibern für die Unterstützung bei den Probennahmen

dem Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit für die finanzielle Förderung der Arbeit.

Meiner Familie

Guter Rat zum Frühlingserwachen

Allen In- und Vertebraten,
die auf dieser schönen Welt
bisher nichts zu lachen hatten
sei es nun anheimgestellt,
ob in wässrigen Substraten,
oder wo es sonst gefällt,

aquatisch, benthisch auch submers,
terrestrisch oder gar pervers,
hingebungsvoll den lauen Wellen
des neuen Frühlings sich zu stellen.

Friedemann Dinglinger

Meine akademischen Lehrer waren:

E. Bayer, D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, J. Gelinek, W. Göpel, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, W. Jäger, G. Jung, P. Krauß, D. Krug, E. Lindner, H. A. Mayer, I.-P. Lorenz, U. Nagel, W. Nakel, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, H. Pommer, B. Rieger, A. Rieker, D. Schrenk, V. Schurig, F. F. Seelig, H. Stegmann, J. Strähle, W. Voelter, M. Wolff, K.-P. Zeller.

Lebenslauf

Geboren	8. April 1966
Geburtsort:	Mayen
Schulbildung	
1972-1976	Grundschule im Aischbach in Tübingen
1976-1986	Keplergymnasium in Tübingen Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Zivildienst	
08/1986 - 03/1988	Rettungshelfer beim Arbeiter-Samariter-Bund in Tübingen
Studium	
04/1988 - 08/1997	Chemie an der Universität Tübingen Abschluss: Diplom Diplomarbeit: „Orientierende Erkundungen zur ubiquitären Belastung von Böden mit polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK)“ unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Peter Krauß
10/1997 - 06/2001	Dissertation: „Entwicklung eines Summenparameters für potenziell bioakkumulierbare Stoffe (PBS) im Abwasser“ unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Jörg W. Metzger am Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart, Lehrstuhl für Hydrochemie und Hydrobiologie in der Siedlungswasserwirtschaft Doktorvater: Prof. Dr. Peter Krauß, Institut für Organische Chemie an der Universität Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	4
TABELLENVERZEICHNIS	6
EINHEITEN UND VORSÄTZE	7
ABKÜRZUNGEN	8
1 ZUSAMMENFASSUNG	10
2 SUMMARY	13
2.1 INTRODUCTION	13
2.2 AIM	14
2.3 EXPERIMENTAL	14
2.4 PROCEDURE	15
2.5 RESULTS AND DISCUSSION	18
3 EINLEITUNG	22
4 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	25
5 ALLGEMEINER TEIL	27
5.1 DAS PHÄNOMEN BIOAKKUMULATION UND SEIN STELLENWERT IN DER STOFFBEWERTUNG	27
5.2 ABWASSERÜBERWACHUNG MIT SUMMENPARAMETERN	34
5.3 HÖHERMOLEKULARE STOFFE (HUMINSTOFFE HS)	35
5.4 FESTSTOFFE, SEDIMENTE UND KLÄRSCHLAMM	38
5.5 DIE BIOVERFÜGBARKEIT	40
5.6 ABWASSER UND POTENZIELL BIOAKKUMULIERBARE STOFFE	41
5.7 GESAMTABWASSERBEWERTUNG	41
5.7.1 <i>Gesamtabwasserbewertung als neuer strategischer Ansatz</i>	41
5.7.2 <i>Niederländische Arbeitsgruppe</i>	42
5.7.3 <i>Schwedische Arbeitsgruppe</i>	42
5.7.4 <i>Französische Arbeitsgruppe</i>	44
5.7.5 <i>Dänische Arbeitsgruppe</i>	44
5.7.6 <i>Deutsche Arbeitsgruppe</i>	45

5.8	GEMEINSAMKEITEN UND UNTERSCHIEDE BEI DER ENTWICKLUNGEN VON BIOAKKUMULATIONS-SUMMENPARAMETERN	49
5.8.1	<i>Die PBT-Eigenschaften organischer Verbindungen</i>	49
5.8.2	<i>Niederländischer Ansatz</i>	50
5.8.3	<i>Schwedischer Ansatz</i>	52
5.8.4	<i>Französischer Ansatz</i>	54
5.8.5	<i>US-amerikanischer Ansatz</i>	55
5.8.6	<i>Dänischer Ansatz</i>	55
5.8.7	<i>Vergleich der verschiedenen internationalen Ansätze</i>	56
6	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	62
6.1	AUSWAHLKRITERIEN FÜR DIE ANALYTISCHEN EINZELSCHRITTE DES PBS-VERFAHRENS.....	62
6.2	BESCHREIBUNG DES ENTWICKELTEN PBS-VERFAHRENS.....	63
6.3	RANDBEDINGUNGEN DES ENTWICKELTEN VERFAHRENS.....	64
6.3.1	<i>Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient</i>	64
6.3.2	<i>Feststoffgebundene PBS</i>	65
6.3.3	<i>Blindwertproblematik</i>	66
6.3.4	<i>Trocknung</i>	68
6.4	HERSTELLUNG VON STANDARDPROBEN	69
6.5	AUSWAHL DER ANREICHERUNGSMETHODE	74
6.5.1	<i>Flüssig-flüssig-Extraktion</i>	74
6.5.2	<i>Festphasenextraktion</i>	74
6.5.3	<i>Soxhlet-Extraktion der abfiltrierbaren Stoffe</i>	80
6.6	TRENNUNG UND DEFINITION DES LIPOPHILIEFENSTERS	80
6.7	DETEKTION.....	87
6.7.1	<i>Gravimetrie</i>	87
6.7.2	<i>Feststoff-TOC</i>	89
6.8	ANWENDUNG DES VERFAHRENS FÜR REALE ABWASSERPROBEN	90
6.8.1	<i>Mit Standardverbindungen dotierte Abwasserproben</i>	90
6.8.2	<i>PBS-Bestimmungen in Abwasserproben aus Kläranlagenabläufen in Baden-Württemberg</i>	93
6.8.3	<i>PBS-Bestimmungen in industriellen Abwasserproben aus Kläranlagenabläufen in den Niederlanden</i>	97

7	EXPERIMENTELLER TEIL	103
7.1	ARBEITSVORSCHRIFT ZUR BESTIMMUNG DES PBS-SUMMENPARAMETERS	103
7.2	ARBEITSVORSCHRIFT FÜR DIE FLÜSSIG-FLÜSSIG-EXTRAKTION	107
7.3	HPLC-ANALYSEBEDINGUNGEN	107
7.4	GC-ANALYSEBEDINGUNGEN (KONTROLLANALYTIK).....	108
7.5	CHEMIKALIEN UND GERÄTE	108
8	LITERATURVERZEICHNIS	114
9	ANHANG.....	121
9.1	ALLGEMEINE ANMERKUNG	121
9.2	EXTRAKTION.....	121
9.2.1	<i>Flüssig-flüssig-Extraktion</i>	121
9.2.2	<i>Bewertung der Flüssig-flüssig-Extraktion</i>	121
9.3	FESTPHASENEXTRAKTION	123
9.4	DETEKTION	130
9.5	UNTERSUCHUNGEN MIT EINEM VERDAMPFUNGLICHTSTREUDETektor (ELSD) ...	130
9.5.1	<i>Grundlagen</i>	130
9.5.2	<i>Betriebsparameter des Lichtstreuendetektors SEDEX 55 (S.E.D.E.R.E.)</i>	134
9.5.3	<i>Response-Untersuchungen</i>	134
9.5.4	<i>Diskussion der Messergebnisse</i>	144
9.6	GC-FID, GC-ECD, GC-MS.....	145
9.7	HPLC-MS.....	146
9.8	VERGLEICH DER TRENNLEISTUNG DER ZWEI GETESTETEN STATIONÄREN PHASEN .	147
9.9	KALIBRIERUNG DES FESTSTOFF-TOC	148
9.10	UNTERSUCHUNGEN VON ABWASSERPROBEN AUS KLÄRANLAGEN.....	149

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Scheme of the method	16
Abb. 2: Gelöster und partikulär gebundener Kohlenstoff (DOC und POC) in aquatischen Systemen.....	36
Abb. 3: Fließschema des modularen Ablaufs des Untersuchungskonzepts	46
Abb. 4: Fraktionierung des PBS-Anteils im Modul „Bioakkumulierbarkeit“	48
Abb. 5: Schema des Verfahrens.....	63
Abb. 6: Sorption der Standardverbindungen an Schwebstoffe	65
Abb. 7: Reduktion der Blindwerte bei der Festphasenextraktion durch Konditionierung mit Tetrahydrofuran und Methanol (Mittelwerte aus je 2 Bestimmungen)	67
Abb. 8: Reduktion der Blindwerte bei der semipräparativen HPLC durch Spülung mit Tetrahydrofuran	68
Abb. 9: Wiederfindungsraten nach Anreicherung auf C18 (EC) und fraktionierte Elution mit Methanol und Tetrahydrofuran.....	77
Abb. 10: Vergleich zwischen einer dotierten Reinstwasserprobe und einer dotierten Abwasserprobe (n=3).....	77
Abb. 11: Konzentrationsreihe zur Bewertung der Kapazität des Festphasenmaterials, fraktionierte Elution mit MeOH und THF.....	78
Abb. 12: Vergleich der Festphasen verschiedener Hersteller	79
Abb. 13: Einfluss von Ammoniumacetat im HPLC-Eluenten auf die PBS-Bestimmung	81
Abb. 14: HPLC-UV-Chromatogramm (235 nm, analytische HPLC) einer dotierten Reinstwasserprobe mit einem Huminstoffstandard, den Standard- und Markerverbindungen	83
Abb. 15: HPLC-UV-Chromatogramm ($\lambda = 235$ nm) der Markerverbindungen 2-Acetylnaphthalin und Decachlorbiphenyl	84
Abb. 16: HPLC-UV-Chromatogramm ($\lambda = 235$ nm) eines Extrakts einer industriellen (chemisch-pharmazeutische Industrie) Abwasserprobe (Ablauf) vor der Trennung mittels semipräparativer HPLC	85
Abb. 17: HPLC-UV-Chromatogramm ($\lambda = 235$ nm) eines Extrakts einer industriellen (chemisch-pharmazeutische Industrie) Abwasserprobe (Ablauf) nach der Trennung mittels semipräparativer HPLC	85
Abb. 18: HPLC-UV-Chromatogramm ($\lambda = 235$ nm) eines Extrakts einer Abwasserprobe der kommunalen Kläranlage Stuttgart-Büsnau vor der Separation mittels semipräparativer HPLC	86
Abb. 19: TOC-Bestimmung der Standardverbindung CaCO_3	90
Abb. 20: Adsorption der Standardverbindungen an Schwebstoffe.....	92
Abb. 21: Chromatogramme zweier Abwasserproben bei der Fraktionierung mittels semipräparativer HPLC	94

Abb. 22: Messunsicherheit bei einer PBS-Bestimmung in der flüssigen Phase eines Abwassers der KA Stuttgart-Büsnau)	95
Abb. 23: Vergleich der PBS- und der TTC-Konzentrationen der niederländischen industriellen Abwasserproben	102
Abb. 24: Wiederfindungen der Standardverbindungen bei Flüssig-flüssig-Extraktion mit n-Hexan.....	122
Abb. 25: Wiederfindungen der Standardverbindungen bei Flüssig-flüssig-Extraktion mit Petrolether 40 - 60.....	122
Abb. 26: Wiederfindungsraten der Standardverbindungen nach Anreicherung auf C2	125
Abb. 27: Wiederfindungsraten der Standardverbindungen nach Anreicherung auf der Schichtphase C2/C18	126
Abb. 28: Wiederfindungsraten der Standardverbindungen nach Anreicherung auf Styroldivinylbenzol-Harz SDB 2	126
Abb. 29: Wiederfindungsraten der Standardverbindungen nach Anreicherung auf ENV(100 mg)/C 18 (300 mg), Elution mit Acetonitril (n = 3)	127
Abb. 30: Wiederfindungsraten der Standardverbindungen nach Anreicherung auf C8 (EC)	128
Abb. 31: Wiederfindungsraten nach Anreicherung auf C18 (EC)	128
Abb. 32: Wiederfindungsraten nach Anreicherung auf C18 (EC)	129
Abb. 33: Wiederfindungsraten der Standardverbindungen nach Anreicherung auf ENV(100 mg)/C 18 (300 mg), Elution mit Methanol bzw. Tetrahydrofuran.....	130
Abb. 34: Funktionsweise eines Lichtstredetektors	131
Abb. 35: Response des Lichtstredetektors bei Variation der Verstärkung	137
Abb. 36: Response des ELSD gegenüber den Standardverbindungen bei Variation der Eluentzusammensetzung.....	139
Abb. 37: Response des ELSD gegenüber den Standardverbindungen bei Variation der Verdampfungstemperatur	141
Abb. 38: Kalibrierfunktionen von Nitrophenol (NIP), Pentachlorphenol (PCP) und 4-n-Nonylphenol (NOP).....	142
Abb. 39: Kalibrierfunktionen von Parathion-methyl (PAM), 4-Aminobiphenyl (ABP) und Diethylhexylphthalat (DEHP).....	142
Abb. 40: Kalibrierfunktionen von Atrazin (ATZ), Methoxychlor (MOC) und DDT	143
Abb. 41: LC/MS-Chromatogramm der Standardverbindungen.....	146

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Auswahlkriterien für das Analyseverfahren	61
Tab. 2: Wiederfindungen der Standardverbindungen nach Trocknung im Exsikkator.....	69
Tab. 3: Ausgewählte Standardverbindungen	70
Tab. 4: Physikalisch-chemische Daten der Standardverbindungen	72
Tab. 5: Retentionszeiten der eingesetzten Standardverbindungen.....	82
Tab. 6: Verschiebung der Retentionszeiten der Standardverbindungen in realer Abwassermatrix	91
Tab. 7: Summenparameter der niederländischen Abwasserproben	100
Tab. 8: Hintergrundrauschen des Lichtstreuendetektors	134
Tab. 9: Dampfdrücke der Standardverbindungen	135
Tab. 10: Signalintensitäten der Standardverbindungen bei Variation der Verstärkung	136
Tab. 11: Signalintensitäten des Lichtstreuendetektors in mV·s bei Variation der Eluentzusammensetzung	138
Tab. 12: Signalintensitäten in mV·s in Abhängigkeit der Verdampfungstemperatur	140
Tab. 13: Signalintensitäten der Lichtstreuendetektors in mV·s in Abhängigkeit von der Konzentration der Standardverbindungen.....	141
Tab. 14: Kalibrierfunktionen der Standardverbindungen	143
Tab. 15: Stoffmengenbezogene relative Empfindlichkeit der Detektoren gegenüber den Standardverbindungen	145
Tab. 16: Vergleich der Trennleistung der eingesetzten stationären Phasen bei der HPLC.....	147
Tab. 17: Kalibrierung des Feststoff-TOC mit CaCO ₃	148
Tab. 18: Bearbeitungsschema der Abwasserproben.....	149
Tab. 19: Charakterisierung der beprobten Kläranlagen.....	150
Tab. 20: Angaben zu den Probennahmen der Abwässer der Kläranlagenabläufe	151
Tab. 21: Summenparameter der Abwässer der kommunalen Kläranlagen	152
Tab. 22: PBS der Abwässer der kommunalen Kläranlagen.....	153
Tab. 23: Summenparameter der Abwässer der industriellen Kläranlagen	154
Tab. 24: PBS der Abwässer der industriellen Kläranlagen	154
Tab. 25: TOC der niederländischen Abwasserproben.....	155
Tab. 26: AOX der niederländischen Abwasserproben.....	155
Tab. 27: PBS-Konzentrationen der niederländischen Abwasserproben.....	156

EINHEITEN UND VORSÄTZE

a	Jahr
°C	Grad Celsius
d	Tag
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
m	Meter
min	Minute
mol	Mol
Pa	Pasqual
t	Tonne

n	nano	10^{-9}
μ	mikro	10^{-6}
m	milli	10^{-3}
c	centi	10^{-2}
k	kilo	10^3
M	mega	10^6

ABKÜRZUNGEN

AbwAG	Abwasserabgabengesetz
AbwV	Abwasserverordnung
ALIF	extrahierbare aliphatische Substanzen
AOX	Adsorbierbares organisch gebundenes Halogen
AROM	extrahierbare aromatische Substanzen
BAT	Beste verfügbare Techniken (engl.: Best Available Techniques)
BEP	Beste Umweltpraxis (engl.: Best Environmental Practice)
BSB	Biochemischer Sauerstoffbedarf
BUA	GDCh-Beratergremium für Altstoffe
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
CT ₅₀	Halbwertszeit der Elimination (engl.: Time of Clearance)
CTC	Critical Target Concentration
DIN	Deutsches Institut für Normung
DOC	Gelöster organischer (gebundener) Kohlenstoff (engl.: Dissolved Organic Carbon)
DTB	para-Dimethoxytetrachlorbenzol
EG	Europäische Gemeinschaft
EGOM	extrahierbare gaschromatographisch bestimmbare organische Substanz
ELSD	Lichtstreuendetektor (engl.: Evaporative Light Scattering Detector)
EOX	Extrahierbares organisch gebundenes Halogen
EPA	Environmental Protection Agency
EU	Europäische Union
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
GDCh	Gesellschaft Deutscher Chemiker
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: High Performance Liquid Chromatography)
HS	Huminstoffe
KW	Kohlenwasserstoffe
MS	Massenselektiver Detektor
N _{ges}	Gesamtstickstoff

NO ₂ ⁻ -N	Nitrit-Stickstoff
NO ₃ ⁻ -N	Nitrat-Stickstoff
N _{org}	gesamter organisch gebundener Stickstoff
OPOL	unpolare organische Kohlenwasserstoffe
OSPAR	Oslo-Paris-Konferenzen
PBT	Persistent Bioaccumulative Toxic Chemicals
PBS	potenziell bioakkumulierbare Stoffe
PCB	Polychlorierte Biphenyle
POC	Ungelöster organischer (gebundener) Kohlenstoff (engl.: Particulate Organic Carbon)
P _{ow}	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
P _{tot}	Gesamtphosphor
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship
RIZA	Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwater- behandeling
SIM	Selected-Ion Monitoring
SPE	Festphasenextraktion (engl.: Solid Phase Extraction)
SPME	Festphasenmikroextraktion (engl.: Solid Phase Microextraction)
TC	Gesamter Kohlenstoff (engl.: Total Carbon)
TGD	Technical Guidance Document
TIC	Gesamter anorganischer (gebundener) Kohlenstoff (engl.: Total Inorganic Carbon)
TID	Tentatively Identified Chemicals
TLC	Dünnschichtchromatographie (engl.: Thin Layer Chromatography)
TN _b	Gesamter anorganischer und organischer gebundener Stickstoff (engl.: Total Bound Nitrogen)
TOC	Gesamter organischer (gebundener) Kohlenstoff (engl.: Total Organic Carbon)
VPO	Dampfdruckosmometrie (engl.: Vapour Pressure Osmometry)
WHG	Wasserhaushaltsgesetz

1 Zusammenfassung

Es wurde ein Summenparameter für potenziell bioakkumulierbare Stoffe (PBS) im Abwasser entwickelt. Er soll als Ergänzung zu den etablierten Summenparametern das Instrumentarium zur Kontrolle von (industriellen) Abwassereinleitungen vervollständigen. Die Methode zur Bestimmung der potenziell bioakkumulierbaren Stoffe (PBS) ist wie fast alle Summenparameter für organische Wasserinhaltsstoffe eine analytische Konvention.

Der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient P_{OW} diene als theoretischer Ausgangspunkt für die praktische Verfahrensentwicklung. Bei der Chemikalienbewertung gilt nämlich ein Stoff dann als potenziell bioakkumulierbar, wenn dessen $\log P_{OW}$ -Wert größer als drei ist. Die Abwasserinhaltsstoffe werden über eine semipräparative HPLC-Säule nach der Größe ihrer $\log P_{OW}$ -Werte aufgetrennt und die potenziell bioakkumulierbaren Stoffe werden als Fraktion innerhalb eines definierten $\log P_{OW}$ -Bereichs („Lipophiliefenster“) aufgefangen. Dieses Lipophiliefenster wird in einem der eigentlichen Analyse vorausgehenden Analysenlauf durch die Retentionszeiten zweier Markerverbindungen ($3 < \log P_{OW} < 8$, UV-Detektion) festgelegt. Huminstoffe und andere biogene, hydrophile Wasserinhaltsstoffe werden bei dem Verfahren spätestens bei der HPLC-Fraktionierung abgetrennt. Die PBS-Fraktion wird nach dem weitgehenden Entfernen des Fließmittels (Rotationsverdampfer) bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und die Masse an schwerflüchtigen PBS mithilfe einer Semimikrowaage (Ablesbarkeit: 10 μg) bestimmt. Um zwischen dem gelösten PBS und den an feste Abwasserinhaltsstoffe sorbierten potenziell bioakkumulierbaren Stoffen differenzieren zu können, werden diese getrennt analysiert.

Die PBS werden deshalb gravimetrisch bestimmt, weil sich keiner der üblichen HPLC- bzw. GC-Detektoren, auch nicht der nach der Theorie massenproportional arbeitende Lichtstreuendetektor (ELSD), für die Detektion der potenziell bioakkumulierbaren Stoffe als geeignet herausstellte. Da bei einer einfachen Wägung die Masse direkt bestimmt wird, wird jede Substanz unabhängig von ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, a priori mit der gleichen Empfindlichkeit erfasst. Zudem wird die Gravimetrie der Forderung nach DIN 38 402 Teil 1 gerecht, dass Gehalte an Wasserinhaltsstoffen wenn

möglich als Massenkonzentrationen angegeben werden sollten. Ein weiterer Vorzug ist, dass die Analyten bei der Quantifizierung nicht zerstört werden und somit für weitere Untersuchungen, z. B. einer Einzelstoffidentifizierung oder der Bestimmung des Kohlenstoff- oder AOX-Gehaltes, zur Verfügung stehen.

Bei der Festphasenanreicherung und der semipräparativen HPLC traten durch „Bluten“ der stationären Phasen Blindwerte bis maximal 160 µg (über das Gesamtverfahren) auf, sodass eine Bestimmung von PBS-Konzentrationen ab ca. 0,5 mg/l als sinnvoll erscheint (3-facher Blindwert). Es lassen sich nur schwerflüchtige Verbindungen erfassen, da Stoffen mit niedrigen Siedepunkten während der Trocknung verloren gehen. Über eine Auswahl anderer Markerverbindungen kann das Fraktionierungsfenster schnell und einfach neu definiert werden. Damit wird eine hohe Flexibilität des Verfahrens erreicht. Somit kann man beispielsweise auf (gesetzliche) Änderungen bei der Chemikalienbewertung unmittelbar reagieren und das Verfahren auf die neue Problemstellung zuschneiden.

Das mit Standardverbindungen erarbeitete Verfahren wurde für die Bestimmung von PBS in Abwasserproben von Kläranlagenabläufen angewendet. Kommunale und industrielle Kläranlagen verschiedener Branchen wurden beprobt (2 h- bzw. 24 h-Mischproben). Die PBS-Konzentrationen in den beprobten deutschen Kläranlagen (kommunal und industriell) waren in der Regel niedrig (< 1 mg/l). Erhöhte PBS-Gehalte wurden bei einem Abwasser eines Indirekteinleiters aus der metallverarbeitenden Industrie erhalten (> 1 mg/l). Zusammenhänge zwischen dem PBS und den Summenparametern TOC, DOC und AOX wurden, wie zu erwarten war, nicht festgestellt. Zudem waren keine Korrelationen zwischen den PBS-Konzentrationen und der Größe, der technischen Ausstattung, der örtlichen Lage und der Art des Abwassers feststellbar.

Im Rahmen einer Kooperation mit dem niederländischen RIZA wurde eine vergleichende Untersuchung mit dem an dem jeweiligen Institut entwickelten Verfahren durchgeführt. Das niederländische SPME-GC/MS-Verfahren und die gravimetrische PBS-Methode wurde an sieben industriellen Abwässern verschiedenener Branchen angewendet. Dazu wurden Stichproben aus den Abläufen der Kläranlagen (Direkteinleiter) genommen.

Die PBS-Konzentrationen dieser industriellen Abwasserproben lagen in einigen Fällen deutlich über denen, die bei den deutschen Abwässern erhalten wurden. Auch wurden zum Teil erhebliche Unterschiede zwischen dem gelösten und dem feststoffgebundenen PBS gefunden. Die PBS lagen in zwei Fällen fast vollständig (über 90 %) an Feststoffe adsorbiert vor. Auch die TOC- bzw. DOC- und AOX-Gehalte der niederländischen Abwasserproben waren im Vergleich zu den deutschen Abwasserproben zum Teil deutlich höher.

Ein Vergleich der mit den beiden Verfahren (SPME/GC-MS bzw. SPE/Gravimetrie) gefundenen Analysenwerte zeigte gewisse Tendenzen auf, obwohl keine direkten Zusammenhänge ableitbar waren. Die Gründe hierfür liegen in der prinzipiellen unterschiedlichen Vorgehensweise bei den beiden Verfahren. Während die potenziell bioakkumulierbaren Stoffe bei dem niederländischen Verfahren passiv angereichert werden, werden sie bei der deutschen Methode erschöpfend extrahiert. Bei dem gravimetrischen Verfahren werden leichtflüchtige PBS nicht erfasst. Mit der GC-MS-Methode hingegen werden nur GC-gängige Verbindungen und Substanzen detektiert, die underivatisiert ionisierbar sind, während bei der Gravimetrie diese Limitierungen nicht existieren.

Die Analyseergebnisse im Rahmen dieser orientierenden Erkundungen zeigten, dass der Summenparameter PBS eine sinnvolle Ergänzung zu den Summenparametern für organische Wasserinhaltsstoffe darstellen kann. Primäre Aufgabe in der Zukunft wird vor allem sein, die Anwendbarkeit der Methode im Routinebetrieb zu ermitteln.

2 Summary

2.1 Introduction

One of the main results of the 4th *International North Sea Conference* was the decision to reduce the emissions, discharges and losses of hazardous substances in order to prevent toxic effects to marine organisms. In accordance with this general aim, the objective of the *OSPAR-Commission with Regard to Hazardous Substances* was to prevent pollution of the maritime area by continuously reducing discharges, emissions and losses of persistent, toxic and bioaccumulating substances, with the ultimate aim of achieving concentrations in the marine environment near background values for naturally occurring substances and close to zero for man-made synthetic substances. The OSPAR-Commission will develop programmes and measures to identify, prioritise, monitor and control the emissions, discharges and losses of hazardous substances. So far no method exists which allows the determination of potentially bioaccumulating substances in water samples. For this purpose, in this research project a summative parameter for the determination of potentially bioaccumulative substances (PBS) in effluents of waste water treatment plants has been developed.

The distribution of an organic compound in the solvent-system octanol-water is the simplest approach to describe the behaviour of bioaccumulation in organisms. It has been often reported that there are close correlations between $\log P_{OW}$ and $\log BCF$ values for different classes of organic compounds. It has been also demonstrated that the n-octanol/water partition coefficients of organic compounds can be detected by reversed-phase HPLC, because good correlations between $\log P_{OW}$ values and the logarithm of the capacity factors ($\log k'$) obtained by RP-HPLC have been found. With respect to these relationships, a HPLC-method has been developed for the quantification of potentially bioaccumulating substances. It was recommended by the Technical Guidance Document (TGD) that all organic compounds with $\log P_{OW}$ higher than three should be regarded as potentially bioaccumulative.

Traditionally, regulatory approaches to assess the bioaccumulation potential of hydrophobic organic chemicals have emphasized the direct accumulation from solution, leading to the development of determination methods of the bioconcentration factor (BCF) as a measure of direct uptake of dissolved substances. However, often a large fraction of the lipophilic compounds in water is not dissolved, but is partitioned among suspended sediments and particulate matter. Non-polar organic micropollutants adsorbed to sediments are normally less bioavailable to freshwater and marine animals compared to freely dissolved contaminants. But benthic organisms ingest the contaminated particulate matter, and the adsorbed compounds get bioavailable. Moreover, this can lead to a food chain accumulation. In our opinion, it is therefore imperative also to determine the PBS adsorbed to suspended solids.

2.2 Aim

The summary parameter PBS should comply with several prerequisites:

1. **All** relevant organic compounds with a tendency for bioaccumulation should be detectable by the method.
2. The response factors and the recoveries of all unknown analytes should be equal.
3. Humic acids should be separated from the PBS.
4. In order to determine all PBS, an exhaustive extraction method should be used.
5. The PBS-determination should be applicable both to the liquid phase and to the PBS adsorbed to suspended solids, because solid-bounded potentially bioaccumulative substances are regarded as a hazard criterion for benthic ecosystems, especially for the marine environment.

2.3 Experimental

The crucial analytical step of the developed method is the separation of the PBS by RP-HPLC according to their lipophilic character and their tendency for bioaccumulation. Not all of the potentially bioaccumulative substances present in a sample are normally known. They may differ totally in their structural and chemical properties. Therefore, the

detection method should be universal for all compounds contributing to PBS and the response factors should be equal for all (unknown) organic substances. In view of their utilizability for PBS determination, several detectors were investigated: GC-FID, GC-ECD, HPLC-UV/VIS and MSD coupled with GC and HPLC. The evaporative light scattering detector (ELSD) is described in literature as a mass proportional detector. Therefore, this detector was tested too. None of the GC- and HPLC-detectors has shown a mass proportional response for the numerous standard compounds tested and therefore none of them were applicable in this method.

Our investigations demonstrated, that gravimetric detection is a practicable alternative. To reach a detectable mass level of PBS, the upscaling of the method to semi-preparative dimensions was necessary. An advantage of this direct mass detection is that it is a non-destructive method. This allows further analyses of the PBS sample. Because the unit of the PBS is mg/l, it is possible to directly compare PBS with other conventional summary parameters, such as DOC, TOC and AOX.

2.4 Procedure

In the present research project the following method for the determination of PBS in waste water has been developed (Abb. 1). 1 l of the waste water sample is filtered by a glass fibre paper. The filter is washed three times with 10 ml of distilled water. The filter is dried in a circulating air drying oven at 30 °C and then it is placed in a desiccator until weight constance.

The mass of the filter is calculated as:

$$m_{AS} = \frac{m_T}{V_P} \cdot f \quad m_T = m_V - m_L \quad (\text{Gl. 1})$$

m_{AS}	mass of filterable substances in mg/l
m_T	dry mass in g
m_V	mass of filter after filtration in g
m_L	mass of filter before filtration in g
V_P	sample volume in l
f	factor (f = 1 000)

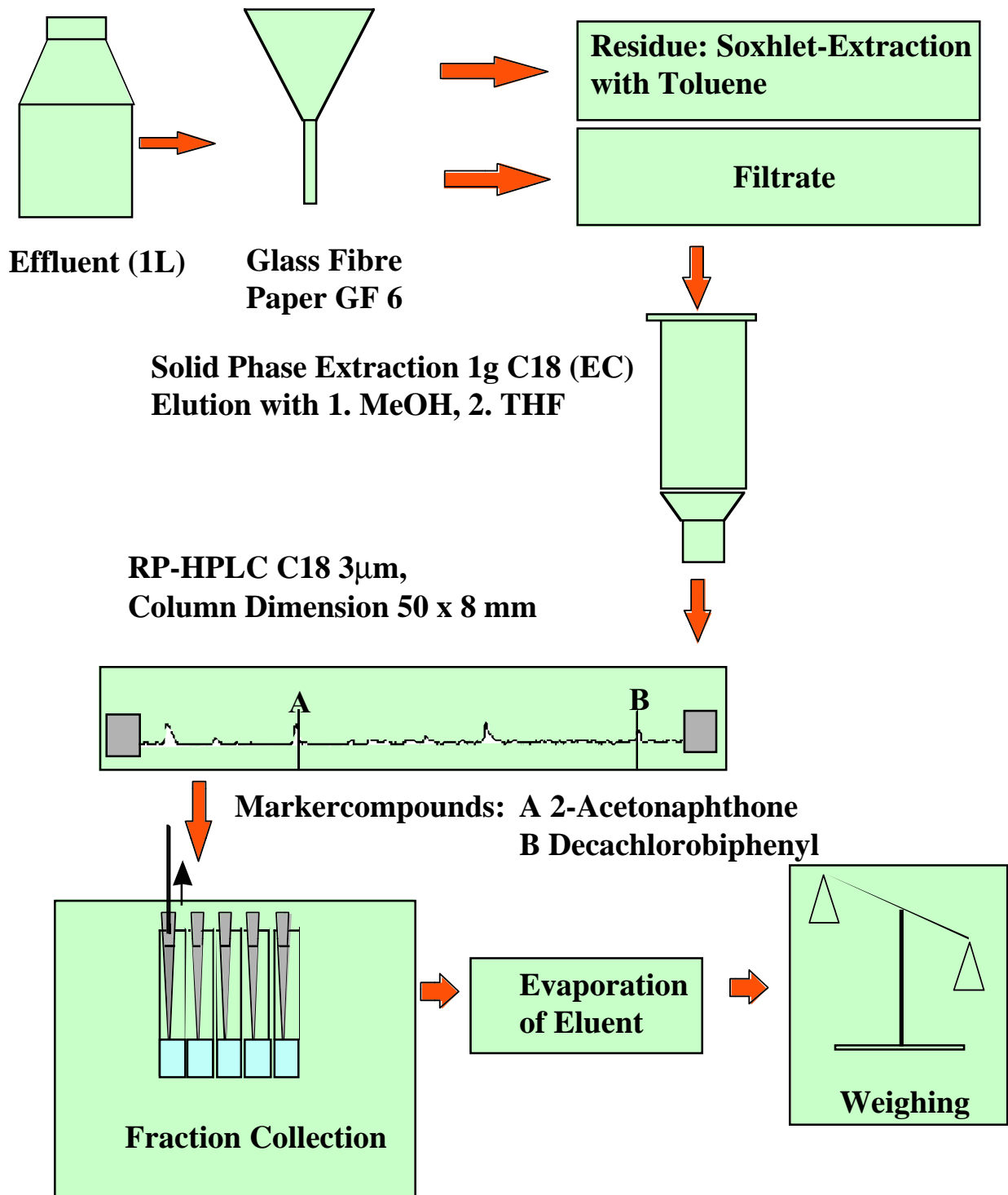


Abb. 1: Scheme of the method

After drying, the filter is extracted by toluene soxhlet extraction and the filtrate is extracted by solid phase extraction (SPE). With a SPE vacuum chamber, it is possible to extract 12 samples in parallel.

The SPE-column (1 g of RP-C18, endcapped) is dried in gentle stream of nitrogen. The adsorbed compounds are successively eluted with two column volumes of methanol and two column volumes tetrahydrofuran from the solid phase. The eluates are confined with a speed vac (50 °C, 60 mbar) to 1,5 - 2 ml. The extracts were injected onto a semipreparative RP-HPLC-column (C18, 3 µm, 50 x 8 mm). The mobile phase was acetonitril/water (5 mmol/l ammonium acetate buffer). The mobile-phase flow rate was 3.2 ml/min. After each analysis the column is washed with tetrahydrofuran in order to reduce the blank.

The following gradient program was applied:

Time in min	H ₂ O/NH ₄ CH ₃ COO (5 mmol/l) in %	ACN in %	THF in %
0	70	30	0
2	60	40	0
5	50	50	0
8	20	80	0
10	0	100	0
20	0	100	0
25	0	0	100
45	0	0	100
50	0	100	0
55	0	100	0
60	70	30	0

In a separate HPLC run, the retention times of two marker compounds define a "lipophilicity window". The used marker compounds were 2-acetonaphthone (log P_{OW} = 2,85) or bromobenzene (log P_{OW} = 2,99) and decachlorobiphenyl (log P_{OW} = 8,27). The fraction within this window (PBS-fraction) is collected. The solvent is confined with a rotary evaporator (50 mbar, 60 °C) and transferred into a porcelain crucible (for further TOC

analysis) or an aluminium vessel. The PBS-fraction is lyophilized with a freeze drying apparatus (-10 °C, 0,220 mbar) or dried in a circulating air drying oven at 30 °C. The dried PBS is placed into an desiccator until the weight is constant. Finally, the PBS is quantified gravimetrically with a semi micro balance. The TOC of the PBS can be determined with a multi N-C-analysator.

The concentration of the potentially bioaccumulative substances PBS is calculated from:

$$c(\text{PBS}) = (m_v - m_l) \cdot \frac{V_{\text{ges}}}{V_{\text{inj}}} \cdot \frac{1}{V_P} \quad (\text{Gl. 2})$$

c (PBS)	PBS concentration in g/l
m_v	mass of the sample vessel after drying in g
m_l	mass of the empty sample vessel in g
V_{ges}	volume of the eluate in ml
V_{inj}	volume of the sample loop in ml
V_P	volume of the extracted waste water sample in l

2.5 Results and Discussion

The developed summary parameter PBS has several advantages. It represents a fast procedure, no sophisticated analytical equipment is required. The determination of all potentially bioaccumulative organic compounds present in a sample is possible, largely independent of their structural and chemical properties. The method is applicable to potentially bioaccumulative substances in the liquid phase and PBS adsorbed to suspended solids. Using the direct mass detection by weighing, there are no problems with the variation of the response factors for different class of compounds. The PBS-value has the dimension of a mass concentration and the unit is mg/l. This comfortably allows to compare the PBS with other summary parameters, such as TOC, DOC, COD, BOD or AOX. The facile change of the marker compounds gives a high flexibility by defining the “lipophilicity window”. The gravimetric detection is a non-destructive method, so further analysis are possible. The humic acids are removed at the latest by the HPLC separation, because they are outside of the “lipophilicity window”.

The method to determine potentially bioaccumulative substances (PBS) is an analytical convention. For example, volatile PBS cannot be detected by this procedure. Furthermore, the limitations of the octanol-water model, which is normally used to describe the phenomenon of bioaccumulation, subsequently also define the limitations of the newly developed summary parameter. As an example, a functional relationship between $\log P_{OW}$ and $\log BCF$ values can only be observed, if the process of bioaccumulation is based on passive diffusion. Consequently, specific mechanisms of bioaccumulation in organisms, such as active transport mechanisms or the bioaccumulation processes of surfactants, cannot be described by this model. These organic compounds are not detectable by the summary parameter PBS, if they have a $\log P_{OW}$ lower than three.

Another limitation of $\log P_{OW}$ as screening parameter is that the log-log correlation between the bioconcentration factors in organisms and the n-octanol/water partition coefficients deviates from linearity for organic compounds with a molecular weight greater than 600 Da, because the uptake is controlled by the size of the pores in the lipid membrane. This phenomenon cannot be registered by the PBS summary parameter.

A prerequisite of the PBS summary parameter was, that the degree of recovery of all compounds within the "lipophilicity window" should be comparable. This was realized by a solid phase extraction with a fractionated elution with methanol and tetrahydrofuran. The recoveries of the standard compounds varied from 60 to 100 %.

A major problem of this detection method was the relatively high blank values, which probably are caused by "bleeding" of the used C 18-materials. The blank value was minimized to 80 to 160 $\mu\text{g/l}$ by washing the stationary phases with tetrahydrofuran before use. The detection limit of PBS is 0.5 mg/l, determined by the threefold blank.

A further advantage of the new method is the possibility of changing the marker compounds, which allows a high flexibility in defining the „lipophilicity window“. In this way, it is possible to react very fast to changes in the guidelines of chemical assessment. One disadvantage of the new PBS parameter is that in semipreparative

HPLC normally broad signal peaks are obtained. A reduction of the peak width could be realized by the optimization of the gradient elution program.

The developed method was validated with several waste waters from different sewage treatment plants (STP). The samples were taken from the effluents of municipal STPs, as well as from STPs of different industrial branches (2 h or 24 h mixed samples). Biogenic water ingredients, e. g. humic substances, were selectively removed from the PBS by semipreparative HPLC. Most of the PBS, both in the liquid phase and adsorbed to suspended solids, were found in lower concentrations than 0.5 mg/l. Only two samples from indirect discharges from metal working showed higher concentrations of 1.3 and 2.7 mg/l. One effluent from a plant from pharmaceutical industry exhibited PBS of 0.7 mg/l.

Correlations between PBS and the summary parameters TOC, DOC and AOX were not found. Relationships between the PBS and the effluent composition of the STP, as well as the size of the STP, the technical equipment and the location could not be demonstrated by our investigations.

In a cooperation with the Dutch *Institute for Inland Water Management and Waste Water Treatment (RIZA)* a GC-MS-based method involving solid phase micro-extraction (SPME) was compared with the developed summary parameter PBS by the measurement of seven effluents (direct introducers) representing a wide variety of industrial branches. All effluents were random samples.

The PBS values in the liquid phase of a waste water sample of a food oil extraction factory, a pesticide producer and a metal blast furnace were lower than 0.4 mg/l, whereas the concentration in the solid phase of the respective samples of the food oil extractor and the metal smelting industry were much higher with 5.5 mg/l and 11.3 mg/l. With respect to these results, more than 90 % of PBS were bound to suspended solids. One reason for this phenomenon could be the high suspended matter content of the samples (76 mg/l for the sample from food oil extractor, 218 mg/l for the sample from metal blast furnace).

High concentrations of 0.9 mg/l and 2.2 mg/l PBS were found in the liquid phase of the sample from the effluent of a paper mill and a waste incineration facility, respectively. The highest PBS value in the liquid phase of 13.8 mg/l was detected in a waste water of a metal plating company. The corresponding PBS solid-bound was 2.2 mg/l. The C-content of the PBS, which also was determined, was in the range from 21 to 55 %. Only in the effluent of the metal plating company the C-content in the liquid phase was much higher with 90 %.

Several correlations between the SPME/GC-MS- and the HPLC/gravimetric method were found. The Dutch approach to quantify the bioaccumulative compounds is defined as the summary parameter **Total Target Concentration (TTC)**. In the effluents of a pesticide and a chemicals producing factory both methods showed low concentrations of PBS and TTC, respectively. The TTC and the PBS of the effluent of the metal plating factory were much higher. There was only a discrepancy between the two methods in the case of the waste water sample of the metal blast furnace, where the detected value for the TTC was low and the PBS was high. These differences can be explained by the spectrum of detectable substances, which due to the different extraction and detection methods is different for the two methods, at least in part.

In future further investigations are needed to prove the applicability of the PBS summary parameter as a routine method for surveillance of industrial discharges.

3 Einleitung

Der Eintrag gefährlicher Stoffe in die Umwelt stellt eine langfristige, nicht prognostizierbare Gefährdung für Natur und Mensch dar¹. Kriterien zur Beurteilung der Gefährlichkeit von Stoffen sind insbesondere die Toxizität, die Persistenz und die *Bioakkumulierbarkeit*, aber auch die endokrine, cancerogene, teratogene oder mutagene Wirkung. Besonders gefährdet für langfristige Schädigungen ist die Meeresumwelt, da die Meere als Schadstoffsенke fungieren. Eine effiziente Überwachung und Regulierung des Eintrags gefährlicher, gewässerrelevanter Verbindungen aus Punktquellen gewinnt deshalb zunehmend an Bedeutung.

Auf der 4. Nordseeschutzkonferenz wurde beschlossen, dass gewährleistet werden muss, dass die Nordsee als nachhaltiges, stabiles und gesundes Ökosystem erhalten bleibt². Durch die Umsetzung des Vorsorgeprinzips sollen binnen einer Generation (ca. 25 Jahre) die Einleitungen, Emissionen und Verluste von gefährlichen Stoffen soweit vermindert werden, dass für natürliche Stoffe die Hintergrundwerte und für anthropogene, synthetische Stoffe Umweltkonzentrationen nahe Null erreicht werden¹. Die Anwendung der besten verfügbaren Techniken (BAT = Best Available Techniques) und der besten Umweltpraxis (BEP = Best Environmental Practice) beziehungsweise in Deutschland des „Standes der Technik“ für Punktquellen wurde als ein wichtiger Baustein des Vorsorgeprinzips angesehen, um das gesteckte Ziel zu erreichen³. Als „Stand der Technik“ bezeichnet man den Entwicklungsstand technisch und wirtschaftlich durchführbarer fortschrittlicher Verfahren, Einrichtungen oder Betriebsweisen, die als beste verfügbare Techniken zur Begrenzung von Emissionen praktisch geeignet sind⁴.

Daraufhin wurde durch die Kommissionen zum Schutz des Nordostatlantiks (OSPAR-Kommission) und zum Schutz der Ostsee (HELCOM) eine Liste von prioritären Stoffen (List of Chemicals for Priority Action) vorgeschlagen, für deren Reduktion vorrangiger Handlungsbedarf besteht. Es wurden Stoffe ausgewählt, die giftig, persistent oder bioakkumulierbar sind und Stoffe, die ein ähnliches Vorgehen fordern, obwohl sie nicht alle Kriterien für Toxizität, Persistenz und Bioakkumulierbarkeit erfüllen¹.

In Deutschland wurden (WHG) 1996 aufgrund dieser Aktivitäten mit der 6. Novelle des Wasserhaushaltsgesetzes die Anforderungen an Abwassereinleitungen verändert⁴. In den Anhängen der auf Grundlage des §7a WHG erlassenen Abwasserverordnung (AbwV) sind branchenspezifische Mindestanforderungen nach dem Stand der Technik für Abwassereinleiter festgelegt⁵.

Abwässer sind Vielstoffgemische, deren Inhaltsstoffe sich auch bei sehr großem analytischem Aufwand nur teilweise bestimmen lassen. Interaktionen, die bei Vielstoffgemischen möglicherweise auftreten können (wie additive Wirkungen, Synergismen oder Antagonismen), lassen sich durch die Überwachung prioritärer Einzelverbindungen und Stoffgruppen nicht abschließend beurteilen. Beispielsweise werden bei der Überwachung von einzelnen Zielsubstanzen Metaboliten und Abbauprodukte nicht miterfasst. Um eine Abbildung des Gefährdungspotenzials eines komplexen Abwassers vornehmen zu können, sind somit Kontroll- und Überwachungsverfahren erforderlich, die eine nachteilige Wirkung wie etwa die Giftigkeit eines Abwassers direkt abbilden. Solche Konzepte werden zur Zeit erarbeitet^{7,8}, haben aber in der bestehenden Gesetzgebung bislang nur in Deutschland Berücksichtigung gefunden (z.B. im Anhang 22 zur AbwV „Chemische Industrie“). Um eine Gesamtbeurteilung für Abwassereinleitungen vornehmen zu können, soll dabei eine kombinierte Überwachungsstrategie unter Verwendung einer begrenzten Zahl von physikalisch-chemischen Parametern, insbesondere Summenparametern, und biologischen Untersuchungsverfahren eingesetzt werden^{3,9}. Darunter fallen auch analytische Methoden, die Hinweise auf bioakkumulierende Eigenschaften geben. Diese Einleiterüberwachungsstrategien sollten für die jeweiligen industriellen Sektoren zugeschnitten sein, d. h. es sollen die jeweils relevanten Prüfparameter kontrolliert werden.

Die Überwachung der gesetzlich festgelegten Einleitergrenzwerte wird mit geeigneten physikalischen, chemischen, physikalisch-chemischen und biologischen Analyseverfahren durchgeführt. In der Abwasseranalytik haben sich unter anderem verschiedene kosteneffektive Summen- und Gruppenparameter etabliert, die Stoffgruppen bzw. deren Wirkungen gemeinsam erfassen. Summen- und Gruppenparameter auf der einen Seite

und die Einzelstoffanalytik auf der anderen Seite ergänzen sich ideal und können je nach Anforderung und Fragestellung zielgerichtet eingesetzt werden.

Während Wirkparameter, wie etwa die Giftigkeit gegenüber bestimmten Wasserorganismen seit langem eingeführt sind, fehlt bislang ein standardisierter Summenparameter, der den bioakkumulierenden organischen Anteil in komplexen Abwässern erfasst und quantifiziert.

Dieser zu entwickelnde Summenparameter zur Quantifizierung der potenziell bioakkumulierbaren Stoffe (PBS) soll damit das Regelungsinstrumentarium nach dem Wasserhaushaltsgesetz (§ 7a WHG) komplettieren. Er soll Bund und Länder in die Lage versetzen, die Anwendung des Standes der Technik, die die Verringerung der Umweltbelastung durch potenziell bioakkumulierbare Stoffe zum Ziel hat, zu überwachen.

4 Problemstellung und Zielsetzung

Stoffe werden unter anderem dann als gefährlich eingeschätzt, wenn sie eine Anreicherungsfähigkeit in Organismen besitzen. Die Fähigkeit des Stoffes zur Bioakkumulation stellt dabei auch dann ein Gefährdungskriterium dar, wenn in biologischen Untersuchungen keine akute oder chronische Toxizität nachgewiesen wurde, denn durch solche herkömmlichen biologischen Wirkungstests können keine negativen Effekte nachgewiesen werden, die möglicherweise erst in einer späteren Lebensphase, bei den nachfolgenden Generationen oder bei Lebewesen der trophisch höheren Ebene eintreten^{10,11}.

Um eine umfassende Gefahren- und Risikobewertung von Stoffgemischen in komplexen Matrices vornehmen zu können, sind Befunde über subakute und chronische Effekte, indirekte Schadeffekte, Kenntnisse über das Bioakkumulationsverhalten und die Bioverfügbarkeit und mögliche Kombinationswirkungen vonnöten. Verbindungen, die aufgrund ihrer intrinsischen Stoffeigenschaften im Verdacht stehen zu bioakkumulieren, werden allein schon deshalb als gefährlich eingestuft, weil hierdurch ein Potenzial für das Auftreten eines negativen Effekts besteht¹².

Um den Transfer und die Verteilung eines Stoffes zwischen den Umweltkompartimenten näherungsweise vorhersagen, beschreiben oder berechnen zu können, wurden verschiedene Modellsysteme entwickelt. Als einfachstes Modell für das Bioakkumulationsverhalten eines Stoffes in Organismen hat sich dabei seine Gleichgewichtsverteilung im Lösungsmittelsystem 1-Octanol/Wasser durchgesetzt. 1-Octanol dient dabei als Modell-Lösungsmittel zur Simulierung des Lipidanteils tierischer Gewebe¹¹. Das Verhältnis der Gleichgewichtskonzentrationen eines Stoffes in der 1-Octanol- und Wasserphase (P_{OW} -Wert) ist also ein Maß für die Lipophilie einer Verbindung. Substanzen mit hinreichender Lipophilie können sich aufgrund ihrer Fettlöslichkeit im Fettgewebe von Organismen anreichern und gelten aufgrund dieser Eigenschaft als potenziell bioakkumulierbar.

Zur Kontrolle von Einleitungen von Abwässern, die bioakkumulierbare Verbindungen enthalten, existiert bisher kein einfaches Analyseverfahren. Ziel des Vorhabens war

deshalb die Entwicklung, Optimierung und Validierung eines einfach anwendbaren, kosteneffektiven Parameters zur summarischen Quantifizierung potenziell bioakkumulierbarer Stoffe (PBS) im Abwasser. Mittels eines RP-HPLC-Verfahrens sollten dabei die Abwasserinhaltsstoffe nach dem Grad ihrer Lipophilie aufgetrennt, innerhalb eines $\log P_{OW}$ -Bereichs als Fraktion gesammelt und anschließend summarisch quantifiziert werden. Hiermit soll der in der Stoffbewertung eingeführte Screeningparameter $\log P_{OW}$ für die Abwasseranalytik anwendbar gemacht werden.

5 Allgemeiner Teil

5.1 Das Phänomen Bioakkumulation und sein Stellenwert in der Stoffbewertung

Um die Gefährlichkeit von Umweltchemikalien umfassend evaluieren zu können, sind unter anderem Kenntnisse zu den vier Grundsäulen der Gefahrenbewertung vonnöten:

- Toxizität
- Persistenz
- Bioakkumulation
- Mobilität

Unter *Bioakkumulation* versteht man die „Fähigkeit von Organismen, Substanzen im Körper über die Konzentration hinaus anzureichern, in der diese in der Umgebung vorliegen“¹¹. Die Bioakkumulation umfasst die *Biokonzentration*, die *Biomagnifikation* und die *Biosorption*.

Unter der *Biokonzentration* versteht man die Anreicherung von Substanzen, die direkt aus dem umgebenden Medium über die Haut, die Kieme oder die Lunge von einzelnen Organismen aufgenommen werden. Die Anreicherung erfolgt in diesem Fall durch Diffusions- und Verteilungsprozesse. Die Verbindungen liegen in diesem Fall gelöst in der wässrigen Phase vor. Der *Biokonzentrationsfaktor* BCF ist das Verhältnis der Konzentration der Verbindung im Organismus zur Konzentration des gelösten Stoffes in der Matrix im „Steady State“, d. h. nach Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts.

Die *Biomagnifikation* (auch *Amplifikation*) beschreibt die Akkumulation über die Nahrungskette, d. h. die Aufnahme der Stoffe erfolgt nicht direkt aus dem umgebendem Medium. Sie tritt bei Stoffen auf, die von Organismen verschiedener Trophiestufen schlecht abgebaut bzw. eliminiert werden. Die Anreicherung kann auch unter Mitwirkung aktiver biologischer Prozesse ablaufen¹³.

Als *Biosorption* bezeichnet man alle Mechanismen, die zu einer passiven Anreicherung an äußeren Zellstrukturen führen, wie verschiedene Arten der chemischen Bindung, der Präzipitation oder der Kristallisation¹⁴.

Bei Vielstoffgemischen in komplexen Matrices ist es meist nicht möglich zwischen verschiedenen Aggregatzuständen exakt zu differenzieren, da oft Kolloide, Emulsionen und Dispersionen ohne klare Phasengrenze vorliegen. Eine scharfe Abgrenzung der Aufnahmewege dieser Verbindungen ist in der Regel deshalb nicht möglich¹¹.

Ein weiterer wichtiger Parameter, der die Anreicherung einer Verbindung in Organismen entscheidend beeinflusst, ist die *Elimination*. Unter der *Eliminationsgeschwindigkeit* versteht man die Geschwindigkeit der Ausscheidung bzw. Umwandlung der Substanz unter den Bedingungen einer schadstofffreien Matrix. Als Maß für die Geschwindigkeit der Elimination wird meist die Halbwertszeit CT_{50} (engl.: Clearance Time, 50 %) angegeben. Sie ist definiert als die Zeit, in der die Verbindung bis zur Hälfte ihrer maximal akkumulierten, d. h. im Gleichgewicht zwischen Aufnahme und Ausscheidung befindlichen Konzentration, ausgeschieden wird¹⁵. Die Angabe gilt für die Annahme, dass die Ausscheidung einer fallenden Exponentialfunktion folgt. In diesem Fall gilt (k_2 Geschwindigkeitskonstante der Elimination):

$$CT_{50} = \frac{\ln 2}{k_2} \quad (\text{Gl. 3})$$

Obwohl bisher noch keine direkten Zusammenhänge zwischen der Bioakkumulation und der akuten Toxizität von Vielstoffgemischen nachgewiesen wurden, sind nachteilige Wirkungen durch kombinierte oder langfristige Effekte durchaus möglich. Beispielsweise wird bei Nahrungsmangel das Fettgewebe der Fische abgebaut, wodurch die akkumulierten Stoffe verstärkt aus den lipidhaltigen Speicherkompartimenten freigesetzt werden¹⁶. Die Bioakkumulation ist somit grundsätzlich als Gefährdungspotenzial einzuschätzen, da immer die Gefahr einer chronischen oder subchronischen Schädigung besteht¹⁵.

Deshalb ist allein die Möglichkeit einer Gefährdung ausreichend, um in der Vollzugspraxis der Stoffbewertung die Bioakkumulation als negativ zu bewerten. Das Verfahren und die Kriterien zur substanzbezogenen Bewertung der Umweltgefährlichkeit von Alt- und Neustoffen im Rahmen des Vollzugs des Chemikaliengesetzes und der EU-Gesetzgebung wird in den *Technical Guidance Documents* (TGD) beschrieben¹⁷.

Hierin wird definiert, welche intrinsischen Eigenschaften von Stoffen Hinweise auf eine potenzielle Bioakkumulierbarkeit geben. Diese sind:

- $\log P_{OW} \geq 3$ und/oder
- hohe Adsorptionskapazität und/oder
- Zugehörigkeit zu einer Stoffklasse, bei der eine Anreicherung in lebenden Organismen nachgewiesen wurde und/oder
- strukturelle Eigenschaften, die auf ein Anreicherungsvermögen schließen lassen, und dass der Stoff keine Eigenschaften (wie Hydrolysierbarkeit) besitzt, die zu einer Reduktion des Bioakkumulationspotenzials führen.

Auch Verbindungen, bei denen keine akute Toxizität beobachtet wurde, müssen einem Test auf Langzeiteffekte (Daphnientest) unterzogen werden, wenn der $\log P_{OW} \geq 3$ bzw. der BCF ≥ 100 ist.

Das Verhältnis aus der Konzentration beziehungsweise dem Massenanteil eines angereicherten Stoffes im Organismus oder einem seiner Teile (Organe, Gewebe) und der Konzentration beziehungsweise dem Massenanteil in der umgebenden Matrix nach Erreichen des Verteilungsgleichgewichts wird als *Bioakkumulationsfaktor* (BAF) bezeichnet. Er entspricht gleichzeitig dem Verhältnis aus Aufnahme- und Eliminationsgeschwindigkeit im Gleichgewichtszustand¹¹.

Erfolgt die Aufnahme ausschließlich aus der wässrigen Phase, d. h. liegt die Verbindung darin gelöst vor, dann entspricht der Bioakkumulationsfaktor dem *Biokonzentrationsfaktor* (BCF). Der Biokonzentrationsfaktor kann auf den Gesamtorganismus oder bestimmte Teile (z. B. Organe), auf das Nass-, Trocken- oder Fettgewicht bezogen werden.

Zur Abschätzung der Biokonzentration im System Fisch/Wasser werden international vereinheitlichte statische und dynamische Testmethoden angewendet¹⁸. Mit dem statischen Test kann eine einmalige Exposition durch eine Punktquelle, und mit dem dynamischen Test eine dauerhafte Belastung durch diffuse Einträge simuliert werden. Für Verbindungen mit einem $\log P_{OW}$ -Wert > 5 wird in der Regel dem dynamischen Test der Vorzug gegeben, da für diese Verbindungen die Gleichgewichtseinstellung im System Wasser/Fisch nur sehr langsam erfolgt.

Obwohl die Verfahren zur Bestimmung der BCF-Werte weitgehend standardisiert sind, beeinflussen eine Reihe von Faktoren die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Messergebnisse, z. B.:

- die Konzentration der Verbindung (die im Testsystem immer geringer als deren Wasserlöslichkeit sein sollte),
- die Temperatur,
- der pH des wässrigen Mediums,
- die Salinität des wässrigen Mediums,
- die Bioverfügbarkeiten der Verbindungen,
- innerartliche Varianzen,
- Konditionsfaktoren (Körpergröße, Stoffwechsel, Hunger, Lipidgehalte, Korpulenzfaktoren und andere),
- Altersstadien,
- Metabolismen und
- substanz- oder organspezifische Anreicherungen.

Die Lipophilie einer Verbindung ist einer der wichtigsten Einflussfaktoren zur Abschätzung einer potenziellen Bioakkumulierbarkeit einer organischen Verbindung¹⁹, denn fettlösliche Substanzen können sich im lipiden und lipidähnlichen Gewebe von Organismen anreichern. Der lipophile Charakter einer Verbindung wird dabei gebräuchlicherweise mit dem Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (P_{OW} bzw. K_{OW}) beschrieben¹¹. Der $\log P_{OW}$ -Wert spiegelt damit das einfachste Modell zur quantitativen Beschreibung der Bioakkumulation wieder.

Die $\log BCF$ - und $\log P_{OW}$ -Werte von Stoffen lassen sich in weiten Bereichen linear korrelieren. Eine lineare Abhängigkeit der beiden Größen ist vor allem gegeben, wenn die Anreicherung im Fettgewebe passiv stattfindet, d. h. der Durchtritt des Stoffes durch die Zellmembran diffusionsgesteuert ist und die Anreicherung in erster Linie von der Lipophilie der Verbindung abhängt¹⁰. Die Verteilung einer organischen Verbindung im System 1-Octanol/Wasser ist somit das einfachste Modell zur Simulation der Bioakkumulierbarkeit. Spezielle Verhaltensweisen von Stoffen in lebenden Organismen, die durch aktive Transportprozesse, die Membrangängigkeit, die Kinetik der Aufnahme, des Abbaus, der Elimination und der Metabolisierung, der Organspezifität, der Adsorption

auf (biologischen) Oberflächen und der strukturellen Eigenschaften (z. B. Ionisierbarkeit) bedingt sind, können durch das Octanol-Wasser-Modell nicht hinreichend präzise beschrieben werden.

Außerdem liegen praktisch keine Kenntnisse über die Beeinflussung des P_{OW} -Werts einer Verbindung durch die Anwesenheit anderer gelöster Stoffe vor. Bei komplexen Matrices wurde lediglich aus thermodynamischen Erwägungen postuliert, dass das Verteilungsverhalten der Verbindung bei stark verdünnten Lösungen durch die Anwesenheit der anderen Kontaminanten nicht beeinflusst wird²⁰.

Des Weiteren sind Abweichungen vom linearen Zusammenhang zwischen dem $\log BCF$ - und dem $\log P_{OW}$ -Wert bei hochlipophilen Verbindungen zu beobachten. Bei diesen oft als superlipophile Substanzen bezeichneten Stoffen (z. B. hochchlorierte PCB und Dioxine), können die molekularen Strukturen und die sterischen Eigenschaften entscheidenden Einfluss auf die Biokonzentration bekommen, da sie nicht mehr ungehindert durch die Lipiddoppelschichten der Membranen diffundieren können. Nach QSAR-Berechnungen liegt die obere Grenze für die Permeation der organischen Verbindung bei einer molaren Masse von ca. 600 g/mol²¹. In diesen Fällen kann die Korrelationsgleichung, die aus den QSAR-Berechnungen entwickelt wurde, um einen negativen $(\log P_{OW})^2$ -Term erweitert werden.

Nach einem Modell von Opperhuizen²² sind Verbindungen mit einem zweitgrößten Molekülquerschnitt* („effective cross section“) $> 0,95$ nm nicht mehr membrangängig. Es wird angenommen, dass beim Transfer der Moleküle durch die Lipiddoppelschicht eine Potenzialbarriere überwunden werden muss. Der Betrag der Aktivierungsenergie zur Überwindung der Energiebarriere hängt dabei vor allem von der Packungsdichte der polaren Reste der Lipide ab. Hochlipophile Verbindungen können deshalb die Membran der Zelle auf diesem Weg nicht mehr passieren. Da die Lipidmembran aber ständig in

* Stellt man sich ein dreidimensionales Molekül als Quader vor, so ist die zweitgrößte Kantenlänge entscheidend für die Membrangängigkeit, da die Fläche, die die kleinste und mittlere Kante einschließt, entscheidend für den Transport durch die Zellmembran ist.

Bewegung ist, werden laufend sphärische Kavitäten ausgebildet, deren Größe auch von der Packungsdichte der Lipidmoleküle abhängt. In den Fischkiemen haben diese Hohlräume einen durchschnittlichen Moleküldurchmesser von ca. 0,95 nm und mit dem Anwachsen des Durchmessers dieser Kavitäten nimmt deren Anzahl stetig ab. Da der Durchmesser dieser Kavitäten im Darm im Durchschnitt größer ist als der in den Kiemen, erfolgt die Aufnahme von hochlipophilen Verbindungen bevorzugt über den Darmtrakt. Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse wurde postuliert, dass organische Verbindungen dann als potenziell bioakkumulierbar einzustufen sind, wenn sie einen $\log P_{OW} > 3$ und eine molare Masse $M < 600$ g/mol besitzen.

Nach neueren Erkenntnissen sollte die allgemeine Annahme, dass Verbindungen mit einem $\log P_{OW} > 6$ und einem Molekülquerschnitt $> 0,95$ nm von Organismen über das umgebende Wasser nicht in bedeutendem Ausmaß biokonzentriert werden, kritisch überprüft werden²³, denn in der Regel wurden die hochlipophilen Verbindungen bei den Bestimmungen der BCF-Werte in solch hohen Konzentrationen eingesetzt, dass sie nicht mehr vollständig in der wässrigen Phase gelöst vorlagen. Zudem wurde gezeigt, dass der BCF-Wert dieser hochlipophilen Verbindungen erst dann absinkt, wenn die Löslichkeit der Substanzen überschritten wird. Die Ermittlung der Biokonzentrationsfaktoren sollte deshalb für Verbindungen mit einem $\log P_{OW} > 6$ mittels der kinetischen Methode bestimmt werden. Die Testverbindungen müssen dabei in solchen Konzentrationen vorgelegt werden, dass sie noch vollständig gelöst vorliegen. Außerdem dürfen bei der Aufnahme des Stoffes und während der Elimination keine toxischen Effekte bei den Testorganismen auftreten.

Oberflächenaktive Substanzen, wie Tenside oder einige Pestizide, besitzen unter Umständen auch dann das Vermögen zur Bioakkumulation, wenn deren $\log P_{OW}$ -Wert kleiner als drei ist²⁴. Substanzen werden dann als oberflächenaktiv bezeichnet, wenn sie in wässriger Lösung bei einer Konzentration von ≤ 1 g/l eine Oberflächenspannung ≤ 50 mN/m besitzen.

Die klassische Methode zur Bestimmung des $\log P_{OW}$ -Wertes ist die Schüttelmethode (Anwendungsbereich: $\log P_{OW} \leq 4$). Bei ihr wird die Gleichgewichtsverteilung einer Einzelverbindung im System 1-Octanol-Wasser durch direkte Messung der Konzent-

rationen in den beiden Phasen vorgenommen. Für hochlipophile Verbindungen ist die Ermittlung des $\log P_{OW}$ -Werts über die Schüttelmethode allerdings ungeeignet, da die Konzentration der Testverbindung in der wässrigen Phase dann sehr gering ist und die Konzentrationsbestimmung mit einer großen Unsicherheit behaftet ist. Des Weiteren können bei diesem Verfahren die Messungen sehr leicht durch Verunreinigungen und Schwebstoffe gestört werden¹⁴.

Um eine direkte Konzentrationsbestimmung wie bei der Schüttelmethode zu umgehen, wurde ein chromatographisches Verfahren entwickelt²⁵. Vor allem bei der Ermittlung der $\log P_{OW}$ -Werte von Verbindungen mit niedriger Löslichkeit, hoher Hydrophobizität und hohem Molekulargewicht wird die HPLC-Methode häufig angewendet. Dabei wird die Beziehung zwischen der Lipophilie einer Verbindung und deren Kapazitätsfaktor k' bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie an Umkehrphasen (RP-HPLC) ausgenutzt, denn die $\log P_{OW}$ -Werte und die $\log k'$ -Werte von (lipophilen organischen) Verbindungen verhalten sich über weite Bereiche proportional. Jedoch sind alle Methoden zur $\log P_{OW}$ -Wert-Bestimmung mit einer gewissen Messunsicherheit behaftet, sodass in der Literatur oftmals stark streuende $\log P_{OW}$ -Werte angegeben werden.

Bei der HPLC-Methode werden die Kapazitätsfaktoren k' zwischen der Verbindung und einer Reihe von Referenzverbindungen bei isokratischer Elution miteinander verglichen. Der P_{OW} -Wert wird somit indirekt bestimmt. Trotzdem hat die HPLC-Methode gegenüber der Schüttelmethode einige Vorzüge, sodass sie als analytisches Bestimmungsverfahren des P_{OW} -Werts eine breite Anwendung findet. So entfällt einerseits die analytisch sehr aufwendige direkte Bestimmung der Konzentrationen der Verbindung in den beiden Lösungsmitteln. Andererseits können die P_{OW} -Werte von hochlipophilen Verbindungen mit einer größeren Messgenauigkeit bestimmt werden. Außerdem können mit der HPLC-Methode die P_{OW} -Werte von Einzelverbindungen in Gemischen bzw. in komplexen Matrices abgeschätzt werden²⁶.

Da die P_{OW} -Werte der Verbindungen mehrere Zehnerpotenzen überstreichen, wurden in der HPLC auch Lösungsmittelgradienten eingesetzt, um eine zeitoptimierte Elution der Analyten zu erreichen^{27,28}. Ein weiterer Vorteil der Gradientenelution ist, dass die Peakbreiten verringert und die Peaksymmetrie erhöht wird.

5.2 Abwasserüberwachung mit Summenparametern

Als *Summenparameter* werden Analysenwerte bezeichnet, die die Einzeleffekte beziehungsweise die Einzelkonzentrationen einer Reihe verschiedener Wasserinhaltsstoffe summarisch in einem Zahlenwert ausdrücken. Der Summenparameter sollte die Gesamtheit der Einzelverbindungen, die die zu untersuchende Eigenschaft besitzen, möglichst quantitativ erfassen, um eine richtige Beurteilung der Gewässersituation zu ermöglichen. Trotz modernster Methoden der Analytik ließen sich bisher nur etwa 5 – 10 % aller in einem Wasser vorhandenen organischen Inhaltsstoffe identifizieren²⁹. Summenparameter sollen deshalb unter anderem dazu dienen, eine drastische Verringerung des Analysenaufwands und der Analysendaten zu erreichen. Die Mehrzahl der Verfahren sind in der DIN 38 409 der DEV genormt³⁰.

Der TOC (*Total Organic Carbon*) gilt als der aussagekräftigste Summenparameter für den gesamten Gehalt an organisch gebundenem Kohlenstoff. Er erfasst die im Wasser gelösten und ungelösten organischen Stoffe sowie die an Feststoffen adsorbierten organischen Verbindungen. Wird die Wasserprobe vor der Bestimmung durch ein Membranfilter mit 0,45 µm Porenweite filtriert, so erfasst man den gelösten Anteil DOC (*Dissolved Organic Carbon*).

Mit dem Summenparameter AOX (*Adsorbierbares organisches Halogen*) wird die Summe aller halogenorganischen (Chlor, Brom, Iod, nicht aber Fluor) Verbindungen, die aus wässriger Lösung unter festgelegten Bedingungen an Aktivkohle adsorbiert werden, erfasst. Un- bis schwach polare organische Halogenverbindungen werden gut adsorbiert, während stärker polare Verbindungen (z.B. Chloralhydrat oder Dichlormethan) oftmals nur unzureichend adsorbiert werden.

Der *Chemische Sauerstoffbedarf* (CSB) gibt an, wie viele Sauerstoffäquivalente zur vollständigen chemischen Oxidation der Wasserinhaltsstoffe mit Kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$) notwendig sind. Der CSB ist ebenso wie der TOC ein Maß für die organische Gesamtbelastung des Abwassers und gleichzeitig der obere Grenzwert für den BSB. Der Wert wird in mg/l O_2 angegeben.

Unter dem *Biochemischen Sauerstoffbedarf* (BSB_n , n = Messdauer in Tagen) versteht man den Sauerstoffverbrauch, der in einem Wasser dadurch entsteht, dass die darin enthaltenen organischen Stoffe mikrobiell bei einer Temperatur von 20 °C oxidativ verwertet werden. Der BSB ist somit eine Kenngröße für die Gruppe organischer Verbindungen, die einer biochemischen Oxidation zugänglich sind. Die BSB-Bestimmung setzt die Anwesenheit einer Biozönose voraus, die zum Abbau der in der Probe enthaltenen Substanzen befähigt ist.

Der in diesem Vorhaben entwickelte PBS-Summenparameter stellt eine echte Teilmenge des TOC und in der Regel auch des CSB dar. Der gelöste Anteil des PBS kann mit dem DOC verglichen werden. Verbindungen, die durch den AOX erfasst werden, werden teilweise auch mit dem PBS-Summenparameter abgebildet. Ein Vergleich mit dem BSB bzw. CSB/BSB-Verhältnis kann zusätzlich Informationen zur Charakterisierung des Abwassers liefern. Aus diesem Grund ist es günstig, wenn der PBS-Parameter die gleiche Dimension (z. B. mg/l) hat, wie die etablierten Parameter.

5.3 Höhermolekulare Stoffe (Huminstoffe HS)

Biogene Wasserinhaltsstoffe, wie Huminstoffe und Kohlenwasserstoffe, die ca. 25 – 75 % des DOC in Oberflächengewässern bilden³¹, könnten die PBS-Bestimmung beeinflussen, wenn sie in das PBS-Lipophiliefenster fallen und deshalb bei der Fraktionierung miterfasst werden.

Höhermolekulare Stoffe in dem zu untersuchenden Abwasser können die Wiederfindungen der Analyten beeinflussen³². Vor allem bei hydrophoben Verbindungen findet eine nicht zu vernachlässigende Wechselwirkung dieser Substanzen mit den biogenen Wasserinhaltsstoffen statt. Dieses Verhalten beeinflusst auch die Analytik, denn in diesem Fall werden die lipophilen sorbierten Verbindungen nicht unbedingt mitextrahiert.

Bei den Huminstoffen handelt es sich um relativ polare organische Säuren, die sich sowohl in terrestrischen als auch in aquatischen Ökosystemen bilden. Polysaccharide, Lignine und Peptide sowie Monomer-Einheiten und chemisch oder physikalisch verän-

derte Komponenten, die nicht mineralisiert werden, können in den Huminstoff-Molekülverband eingebaut werden. Als funktionelle Gruppen treten vor allem Carboxyl-Gruppen, phenolische und alkoholische Hydroxylgruppen, Carbonyl- und Amino-Gruppen auf.

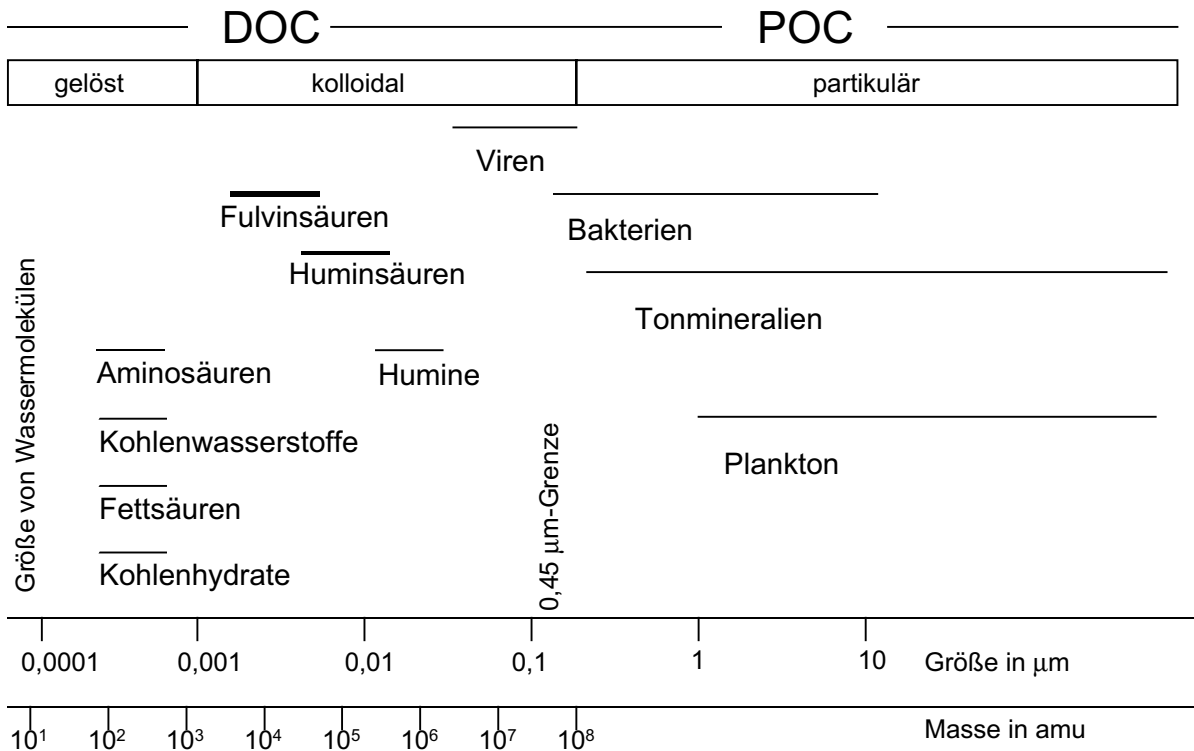


Abb. 2: Gelöster und partikulär gebundener Kohlenstoff (DOC und POC) in aquatischen Systemen

Durch die Vielzahl an funktionellen Gruppen besitzen die Huminstoffe ähnlich wie Tenside oberflächenaktive Eigenschaften und erhöhen dadurch die Löslichkeit von organischen Verbindungen im Wasser. Vor allem die Carboxyl- und die phenolischen Hydroxyl-Gruppen reagieren sauer und stellen Austauschplätze für Kationen zur Verfügung. Die alkoholischen Hydroxyl-Gruppen, die Carbonyl-, die Methoxy- und die Amino-Gruppen fördern die Komplexbildung. Außerdem wirkt die Amino-Gruppe als Base und Anionentauscher.

Die große Zahl möglicher Ausgangsstoffe, die komplexe Genese und das Fehlen von reaktionssteuernden Mechanismen bedingen, dass Huminstoffe keine einheitliche

Strukturformel besitzen. Huminstoffe sind polyfunktionell und besitzen eine spezifische Oberfläche im Bereich von 500 bis 800 m²/g. Die Huminstoffe haben molare Massen zwischen 500 und 100 000 g/mol.

Es wurde festgestellt, dass eine pH-Wert-Erhöpfung zur Ausbildung ionischer Strukturbereiche innerhalb der Huminstoffe führt³³. Daraus resultiert eine Aufweitung der Molekülcluster, da die negativen Ladungen der deprotonierten funktionellen Gruppen sich gegenseitig abstoßen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass durch Erhöhung der Ionenstärke die ionogenen Wechselwirkungen innerhalb der molekularen Strukturen verkleinert werden, indem die Ladungen der deprotonierten funktionellen Gruppen durch anorganische Kationen kompensiert werden. In diesem Fall ballen sich die Huminstoff-Moleküleinheiten zu kleineren Knäueln zusammen.

Dies hat sowohl Einfluss auf ihr Assoziationsverhalten gegenüber den Wasserinhaltsstoffen, als auch Auswirkungen auf ihr Verhalten bei chromatographischen Trennungen an Umkehrphasen. Da die Huminstoffe bei einem pH-Wert zwischen 6 und 9 maximal aufgeweitet sind, ist in diesem Bereich ein Schwellenwert der Löslichkeitserhöhung der organischen Moleküle zu beobachten. Außerdem wurde beobachtet, dass sämtliche Huminstoffe ab einem pH-Wert > 5 deprotoniert vorliegen und mit RP-Phasen kaum mehr wechselwirken^{33,34}. Sie laufen quantitativ durch die RP-Säule ohne retardiert zu werden. Bei DOC-Bestimmungen der Fraktion vor und nach der Chromatographie wurden Wiederfindungsraten von 98 ± 3 % bestimmt³⁴. Durch eine Änderung der Zusammensetzung des Eluenten wurde keine entscheidende Verbesserung bei der Trennung beobachtet. Zwar zeigt sich, dass die Huminsäuren durch die größeren molaren Massen ihrer Moleküle stärker auf dem C18-Material retardieren als die Fulvinsäuren, doch sind sie durch die (zum Teil ionisierbaren) funktionellen Gruppen immer noch so hydrophil, dass sie nur relativ kleine Retentionszeiten besitzen. Alle klassischen Huminstoff-Fraktionen, Fulvinsäuren und Huminsäuren, eluieren bei der RP-HPLC relativ rasch, stören daher bei der log P_{OW} Fraktionierung nicht.

5.4 Feststoffe, Sedimente und Klärschlamm

Feststoffe nennt man ungelöste und feinteilig in einer Wasserprobe enthaltene Stoffe, zum Beispiel Tonminerale, Schluff und Humus-Substanzen. An Feststoffe lagern sich häufig vor allem gering wasserlösliche Substanzen an. Je hydrophober eine Verbindung ist, desto größer ist in der Regel ihre Tendenz zur Sorption an Feststoffe. Zwar führt dies meist zu einer Schadstoffreduktion der wässrigen Phase, doch können auch feststoffgebundene Schadstoffe (z. B. durch Remobilisierung) bioverfügbar werden und somit ein (öko-)toxikologisches Wirkungspotenzial besitzen. Bei genügender Teilchenfeinheit kann es zu einer Schadstoffmobilität in Grund- und Oberflächenwässern kommen, die das aufgrund der Löslichkeiten zu erwartende Transportverhalten bei weitem übertreffen kann. Die Feststoffpartikel setzen sich häufig im Sediment ab, so dass die Sedimente Schadstoffsinken bilden.

Die feststoffgebundenen Schadstoffe können die Wirkung des Sediments bei der Selbstreinigung eines Gewässers verringern. Dies geschieht vor allem durch die Schädigung von Organismen, die zum Abbau beitragen. Zudem können die Wirkungen wichtiger Rückhalte Mechanismen beeinträchtigt werden oder verloren gehen, z. B. wenn die Sorptionskapazität durch Umwelteinflüsse abnimmt. Hierdurch kann eine Remobilisierung der Schadstoffe eintreten.

In der Regel sinkt die Bioverfügbarkeit von hydrophoben organischen Verbindungen bei der Alterung der Sedimente und Böden. Jedoch können feststoffgebundene organische Schadstoffe auch remobilisiert werden, wenn im Laufe der Mineralisierung der organische Kohlenstoffgehalt der Feststoffe abnimmt und damit deren Sorptionskapazität sinkt³⁵. So können hydrophobe Verbindungen relativ leicht von den Huminstoffen desorbieren, da es sich bei den Wechselwirkungen lediglich um van der Waals-Kräfte, Wechselwirkungen mit dem π -Elektronensystem von Aromaten oder um Elektronenaustauschkomplexe handelt³⁶. Außerdem kann die Verfügbarkeit von sorbierten organischen Verbindungen innerhalb verschiedener Organismen zum Teil stark variieren. So wurde gezeigt, dass durch Sedimentingestion und durch die nachfolgende Passage durch den Verdauungstrakt wegen der massiven pH-Wert-Änderung die

Bioverfügbarkeit der adsorbierten Stoffe verändert wird³⁷. Für sorbierte und kovalent gebundene Stoffe stellen die Ingestion von Sedimentpartikeln sowie der direkte Kontakt des Sediments und den Oberflächen der Atmungsorgane und dem Körper wichtige Aufnahmepfade dar.

Das Verfahren zur Stoffbewertung nach der Strategie der „Technical Guidance Documents (TGD)“ wird deshalb für Sedimente als nicht ausreichend angesehen³⁷. Der Grund liegt bei der Auswahl der Testverfahren. Die vorgeschlagenen Gleichgewichtsverteilungsmethoden berücksichtigen nur den Aufnahmeweg über die wässrige Phase, in denen die Verbindungen gelöst vorliegen. Da aber die hochlipophilen Substanzen meist stark an Feststoffpartikel adsorbieren, kann eine Bewertung der Testergebnisse zu einer signifikanten Unterschätzung des Risikos für das Sediment und das Benthos führen, denn für solche Stoffe stellen die Ingestion durch kontaminierte Sedimentpartikel über die Oberflächen der Atmungsorgane und des Körpers wichtige Aufnahmepfade dar³⁷. Im Falle der Bioakkumulation dieser Verbindungen können so toxische Langzeiteffekte bei benthischen Organismen auftreten.

Sedimente bilden relativ stabile Senken für Schadstoffe. Jedoch kann bei diesen Schadstoffdepots durch Veränderungen von Randbedingungen (z. B. Veränderung von Puffersystemen) oder nach Absättigung der Adsorptionsplätze eine Freisetzung der Schadstoffe resultieren. Andererseits können auch im Wasser vorhandene gelöste organische Verbindungen (Wirkung als Lösungsvermittler) und Kolloide das Sorptions- und Mobilisierungsverhalten von feststoffgebundenen Schadstoffen beeinflussen.

Das Vorkommen von feststoffgebundenen, lipophilen Stoffen in den Sedimenten sollte deshalb schon als negativ bewertet werden, da Schädigungen auf der Individual- und Populationsebene sowie Folgen für benthische Artengemeinschaften nicht ausgeschlossen werden können. Außerdem kann eine Biomagnifikation der lipophilen Stoffe über benthivore Fische stattfinden. Daraus können Funktionsstörungen des gesamten Ökosystems resultieren.

Die Sedimente dienen als Lebensraum zahlreicher Organismen und Lebensgemeinschaften. Eine Anreicherung gefährlicher Stoffe in den Senken der marinen Umwelt

kann daher zu nicht vorhersagbaren langfristigen Effekten führen und eine solche Anreicherung wäre weitgehend irreveribel³⁷. Lipophile Stoffe zeigen meist eine besonders große Affinität zur Fixierung an Feststoffe, sodass nicht nur der PBS in der wässrigen Phase bestimmt werden sollte, sondern auch die feststoffgebundenen potenziell bioakkumulierbaren Stoffe.

5.5 Die Bioverfügbarkeit

Bei benthischen Organismen wurde beobachtet, dass diese hydrophoben organischen Verbindungen über die gesamte sedimentäre Phase (Sediment und Schlämme, Interstitialwasser und wässrige Umgebung) akkumulieren^{38,39}. Verglichen wurde bei der Untersuchung die Bioakkumulation diverser Testverbindungen durch benthische Organismen aus dem wässrigen Extrakt der sedimentären Phase und dem Gesamtsediment. Es stellte sich heraus, dass die Bioakkumulationsfaktoren deutlich größer sind, wenn die Sedimentbewohner mit der gesamten sedimentären Phase in Kontakt waren.

Der Darmtrakt und die Kiemen von Muscheln sind in der Lage, feine Partikel durch Endocytose aufzunehmen⁴⁰. Die Bioverfügbarkeit lipophiler Verbindungen kann für Depositfresser und Nahrungsfiltrierer durch die Bindung an Partikel somit gesteigert werden⁴¹. Besonders für hochlipophile Verbindungen erfolgt die Anreicherung vor allem über die Nahrung und nicht durch passive Aufnahme von gelösten Verbindungen im Interstitialwasser⁴².

Da die Bioverfügbarkeit einen entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß der Bioakkumulation einer Verbindung hat, ist es von Vorteil, wenn man den gelösten Anteil und die partikelgebundene Fraktion getrennt betrachtet. Trotzdem sollte nach dem Vorsorgeprinzip davon ausgegangen werden, dass organische Wasserinhaltsstoffe grundsätzlich als potenziell bioverfügbar zu betrachten sind, unabhängig von der Art ihres Vorliegens in der Umwelt und dem möglichen Aufnahmeweg durch den Organismus¹¹.

5.6 Abwasser und potenziell bioakkumulierbare Stoffe

Bei einer Studie einer schwedischen Arbeitsgruppe⁴³ wurde Abwasser einer Papierrecyclingfabrik mit einem eigens dafür entwickelten Verfahren auch auf potenziell bioakkumulierende Stoffe hin untersucht. Basierend auf den Analyseergebnissen (siehe Kap. 5.8.3) wurde geschätzt, dass über das Abwasser täglich bis zu ca. 6,2 kg (Abwasserfracht: ca. 7 000 m³) PBS in das Oberflächengewässer gelangt. Der Fluss, in den das Abwasser eingeleitet wird, transportiert nach diesen Berechnungen bei einer Fracht von etwa 1 728 000 m³/d ungefähr 1 700 kg potenziell bioakkumulierende Stoffe am Tag. Es wird geschätzt, dass 60 bis 80 % der potenziell bioakkumulierenden Stoffe in der biologischen Stufe von Kläranlagen eliminiert werden.

5.7 Gesamtabwasserbewertung

5.7.1 Gesamtabwasserbewertung als neuer strategischer Ansatz

Bis in die Gegenwart wird die Abwasserqualität über die Einhaltung von Richt- und Grenzwerten von Einzel- bzw. Leitsubstanzen oder ganzer Stoffgruppen kontrolliert. Zusätzlich kommen Summenparameter und Wirkparameter (z. B. Toxizitätstests) zum Einsatz.

Schätzungen gehen davon aus, dass sich der TOC von Abwässern zu ca. 90 % aus bisher noch nicht identifizierter organischer Verbindungen zusammensetzt. Umfassende Einzelstoffanalysen zur Abwasserbewertung sind in der Routineanalytik weder sinnvoll noch durchführbar⁴⁴. Im Gegensatz dazu ist die wirkungsbezogene *Abwassergesamtbewertung* ein neuartiger Ansatz zur Bewertung der Abwasserqualität. Dabei sollen neben akuten toxischen Effekten auch chronische, sublethale, langfristige und kombinierte Wirkungen, z. B. synergetische und akkumulierende Effekte, mit berücksichtigt werden⁴⁵. Von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Umsetzung dieser Strategie ist die Anwendung von standardisierten Überwachungsmethoden in der Routineanalytik. Die stoffbezogene Vorgehensweise soll deshalb durch neue einfache, schnelle und kosteneffektive Summen- und Wirkungsparameter ergänzt werden, die die Quantifizierung solcher Wirkungen ermöglicht.

Diverse Ansätze in dieser Richtung wurden bereits konzipiert. In verschiedenen Ländern wird versucht, mit einer Auswahl von Analysemethoden solch eine Gesamtbeurteilung vorzunehmen.

5.7.2 Niederländische Arbeitsgruppe

In den Niederlanden wurde durch das „Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling“ (RIZA) eine Strategie zur Überwachung der Gesamtabwasserqualität erarbeitet. Das Programm erhielt den Titel ‚Whole Effluent Environmental Risk (WEER*)‘³. Der Schwerpunkt der Methodik liegt auf der Bestimmung von Wirkparametern⁴⁶, mit denen es möglich sein sollte, die kombinierte Wirkung aller bekannten und unbekannt wasserbelastenden Stoffe zu erfassen. Es handelt sich damit um eine auf Effekte ausgerichtete Bewertungsstrategie.

Dazu sollen verschiedene Parameter zur Erfassung der akuten und chronischen Toxizität, der Mutagenität, der Persistenz, des Sauerstoffbedarfs und der Bioakkumulation entwickelt werden. Die Methoden sind jedoch zum größten Teil noch nicht ausgereift. Bisher ist nur ein Verfahren zur Bestimmung der akuten Toxizität verfügbar. Alle anderen Methoden befinden sich noch in der Entwicklungsphase. Zur Bestimmung der potenziell bioakkumulierenden Verbindungen befinden sich drei Verfahren im Prüfungsstadium⁴⁶.

5.7.3 Schwedische Arbeitsgruppe

In Schweden wurde im Rahmen des Stork-Projekts³ eine Strategie zur Bewertung von Industrieabwässern entwickelt. Sowohl das niederländische als auch das schwedische Konzept wurden für den Einsatz im Rahmen von Genehmigungsverfahren entwickelt. Die Anwendung bei der Routineüberwachung ist primär nicht vorgesehen.

^(*) geändert in: Whole Effluent Assessment (WEA)

Die Abwässer werden mittels biologisch-chemischer Methoden auf deren Persistenz, akute Toxizität und Bioakkumulationsvermögen hin untersucht und die organischen Wasserinhaltsstoffe in bestimmte Stoffgruppen fraktioniert. Es wurde unter anderem ein Verfahren zur Bestimmung potenziell bioakkumulierender Verbindungen ausgearbeitet⁴⁷.

Neben dem Einsatz von biologischen Tests an Organismen verschiedener trophischer Stufen (Testsysteme: Invertebraten, Fisch, Algen, Bakterien) zur Bestimmung der akuten Toxizität, der Wachstums- und Reproduktionsstörung, der Gentoxizität, der Biomasseproduktion und der Nitrifikationshemmung wird zur chemischen Charakterisierung zunächst der CSB oder der TOC und der BSB zur Abschätzung des Gesamtgehalts an organischen Verbindungen eingesetzt. Danach wird eine Fraktionierung mittels Ultrafiltration durchgeführt, um den Anteil an hochmolekularen organischen Substanzen zu ermitteln. Zusätzlich soll der pH-Wert, die Leitfähigkeit, die abfiltrierbaren Stoffe, der Gesamtphosphorgehalt (P_{tot}), die Schwermetalle, der Chloridgehalt und die gängigen Stickstoffparameter (N_{ges} , NO_2^- -N, NO_3^- -N, N_{org}) bestimmt werden. Zur Bestimmung der abbaubaren Verbindungen werden respirometrische bzw. „Die-Away“-Tests durchgeführt.

Des Weiteren sollen Gruppenparameter bestimmt werden, um die organischen Wasserinhaltsstoffe besser charakterisieren zu können, z. B. AOX, EOX, extrahierbare gaschromatisch bestimmbare organische Substanz (EGOM), unpolare organische Kohlenwasserstoffe (OPOL), extrahierbare aromatische Substanzen (AROM), extrahierbare aliphatische Substanzen (ALIF) und die potenziell bioakkumulierbaren Verbindungen (PBS). Danach werden zusätzlich, abhängig von der Art der Einleitung, Einzelstoffanalysen durchgeführt. Abschließend werden die Biokonzentrationsfaktoren auffälliger Einzelverbindungen mittels Fishtests bestimmt.

Im Vergleich zum niederländischen Ansatz, bei dem vor allem neue Wirkungs- und Effektparameter zum Einsatz kommen sollen, ist die Intention bei dieser Strategie, bestehende Parameter durch neue chemische Analyseverfahren zu ergänzen, bei denen die Wasserinhaltsstoffe in bestimmte Fraktionen sich ähnlich verhaltender Stoffgruppen separiert werden.

5.7.4 *Französische Arbeitsgruppe*

Im Industriekonzern ATOFINA^(*) wurde ein Arbeitsschema zur Gesamtabwasserbewertung (Whole Effluent Assessment WEA) entwickelt⁴⁸. Es wird bei der Einrichtung von neuen Produktionsprozessen und bei der Planung von neuen Kläranlagen bzw. Reinigungsstufen abgearbeitet, um zukünftige Gewässerbelastungen abschätzen zu können.

Dabei wird eine Kombination von physikalisch-chemischen Parametern, ökotoxikologischen Testmethoden und chemisch-analytischen Verfahren zur Identifizierung von organischen Wasserinhaltsstoffen eingesetzt. Die Ökotoxizitätstests auf Kurzzeiteffekte (z. B. der akuten Toxizität) dienen vor allem zur Risikobewertung für lokale Bereiche. Anschließend werden durch chemische Analyseverfahren persistente, bioakkumulierbare und toxische Substanzen (PBT) identifiziert, die Hinweise auf Langzeiteffekte liefern und eine regionale Risikoabschätzung ermöglichen sollen.

Gewöhnlich werden zwei Proben untersucht. Eine Abwasserprobe der bis dahin existierenden Anlage und eine synthetische Abwasserprobe, die die zukünftige Abwasserzusammensetzung möglichst exakt simulieren soll. Abschließend wird eine Risikobewertung des geplanten Verfahrens bezüglich der Abwassereinträge durchgeführt.

5.7.5 *Dänische Arbeitsgruppe*

Beim dänischen Ansatz wird Abwasser als ein eigenständiges Umweltkompartiment betrachtet⁴⁹⁵⁰. In einem mehrstufigen Prozess werden Untersuchungen auf Abbaubarkeit, Bioakkumulation und Toxizität durchgeführt. Gleichzeitig werden Analysen der prioritären Stoffe der Liste I der EU und PBT-Verbindungen durchgeführt. Abschließend wird nach der ökotoxikologischen Risikobewertung eine Kategorisierung der Abwasserqualität vorgenommen.

^(*) ATOFINA ist der chemische Zweig des Konzerns TotalFinaElf.

5.7.6 Deutsche Arbeitsgruppe

Die deutsche Konzeption beruht auf einer modularen Untersuchungsstrategie, die hierarchisch abgearbeitet werden soll⁵¹. Das Ziel ist, die Gefährlichkeit einer bestehenden industriellen Abwassereinleitung für das aquatische Ökosystem des Vorfluters zu erfassen. Der Strategie liegt ein emissionsorientierter Ansatz zugrunde, wie er sich in allen deutschen rechtlichen Regelungen findet. Dies entspricht dem Vorsorgeprinzip. Bei der effektorientierten Beurteilung der gesamten Abwasserbelastung spielen die drei PBT-Kriterien Toxizität, Persistenz und Bioakkumulierbarkeit die zentrale Rolle. Zusätzliche Informationen sollen durch die Kombination von physikalisch-chemischen Fraktionierungsmethoden mit stoff- oder wirkungsbezogenen Untersuchungen dieser Fraktionen erhalten werden. Der modulare Aufbau ermöglicht es, neue Testverfahren zukünftig mit einzubinden und somit auf den Stand der Wissenschaft flexibel zu reagieren. Die Strategie soll dem Untersuchungsziel bestmöglich angepasst werden, um den Untersuchungsaufwand möglichst gering zu halten.

Die Abwasserprobe sollte zuallererst chemisch charakterisiert werden. Grundlegende Kenntnisse über die Abwassereigenschaften werden hiermit erhalten. Es sollen bestehende Datensätze, wie sie im Rahmen der Überwachung und Kontrolle gewonnen werden, ausgewertet werden. Die Charakterisierung soll erste Hinweise auf notwendige Untersuchungen im Rahmen der Strategie (z. B. Bestimmung der Trübung für das Modul „Partikuläre Fracht“) liefern. Einzelne Parameter aus diesem Modul werden bei den weiteren Stufen der Strategie (z. B. zur Plausibilitätskontrolle) herangezogen. Dazu gehören insbesondere der DOC und die UV-Absorption.

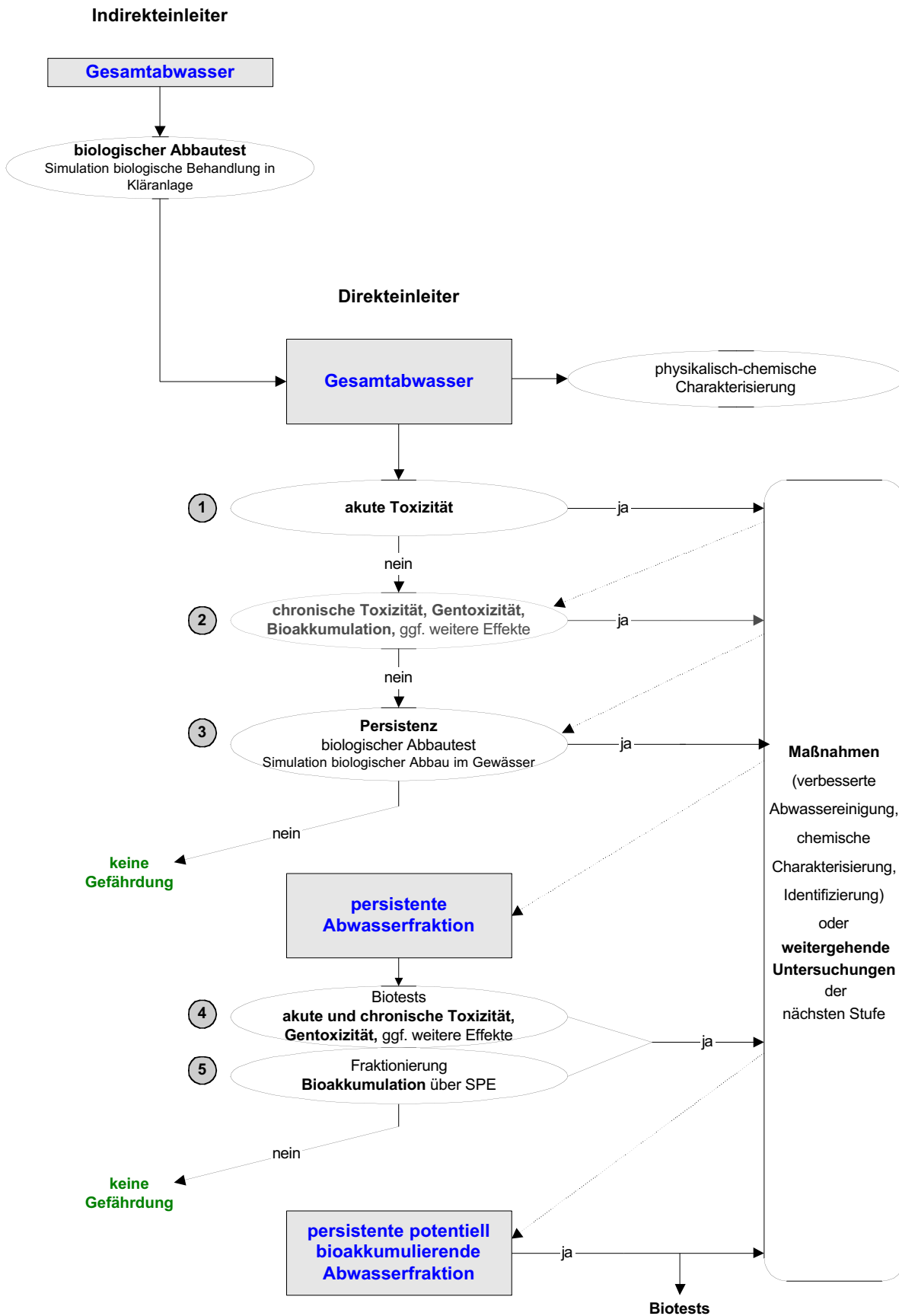


Abb. 3: Fließschema des modularen Ablaufs des Untersuchungskonzepts

Die Charakterisierung umfasst Parameter basierend auf der Abwasserverordnung wie pH, Leitfähigkeit und abfiltrierbare Stoffe bzw. zur anorganischen und organischen Belastung des Abwassers, wie Chlorid, Nitrat, Sulfat, Ammonium-Stickstoff, AOX, CSB, TOC und TN_b. Zusätzlich soll der DOC und die UV-Absorption bestimmt werden.

Im Modul „Toxizität“ soll die akute und chronische Toxizität sowie die Gentoxizität in sequenziell zu bearbeitenden Versuchsreihen bestimmt werden. Sind in einem Versuchsblock deutliche Effekte zu beobachten, kann die Untersuchung gegebenenfalls beendet und direkt Maßnahmen zur Qualitätsverbesserung veranlasst werden, um die Ursachen der toxischen Wirkung zu reduzieren bzw. zu beseitigen.

Für die Bestimmung der *akuten Toxizität* sollen standardisierte biologische Untersuchungen mit Organismen aus vier Trophieebenen durchgeführt werden. Beispiele sind der Leuchtbakterien-, der Algen-, der Daphnien- und der Fischtest. Die chronischen Kurzeittests erfassen die Mortalität und das Wachstum von Fischen in frühen Entwicklungsstadien (Embryonal- und Larvalentwicklung) oder die Reproduktion von Daphnien. Als standardisierte *Gentoxizitätstests* für industrielle Abwässer wurden der *umu-Test* bzw. der *Ames-Test* vorgeschlagen.

Im Modul „Persistenz“ soll zur Erfassung des persistenten Anteils an Abwasserinhaltsstoffen ein Abbautest durchgeführt werden, der den biologischen Abbau im Oberflächengewässer simuliert. Daraufhin wird der DOC-Gehalt und die UV-Absorption der biologisch behandelten Probe bestimmt. Durch Vergleich der Messdaten mit der Urprobe wird der persistente Anteil am Gesamtgehalt an Wasserinhaltsstoffen ermittelt.

Der Die-away Test eignet sich besonders zur Bestimmung der Persistenz, da er einerseits standardisiert ist und andererseits mit ihm die leichte Abbaubarkeit im Gewässer simuliert wird. Zur Differenzierung zwischen sorptiver Entfernung und Mineralisation wird eine 3 h-Probe herangezogen. Es wird davon ausgegangen, dass die Sorption hydrophober Stoffe vergleichsweise schnell verläuft, während der Abbau erst nach mehreren Stunden einsetzt. Eine Konzentrationsabnahme innerhalb der ersten 3 Stunden eines Abbautests wird somit der Sorption zugeschrieben, spätere Verminderungen aber auf mikrobiellen Abbau zurückgeführt.

Im Modul „Bioakkumulierbarkeit“ soll die organische Fraktion mit einem $\log P_{OW} > 3$ erfasst werden. Es wird die biologisch behandelte Probe aus dem Modul „Persistenz“ eingesetzt, da eine Anreicherung im Organismus nur stattfindet, wenn der Stoff langsam metabolisiert wird. Zudem sorbieren Verbindungen mit einem $\log P_{OW} > 3$ rasch an die partikuläre Phase. Dieser Tatsache wird durch die Untersuchung der 3h-Probe Rechnung getragen.

Zur Bestimmung der potenziell bioakkumulierbaren Anteile sollen diese durch *Festphasenextraktion* (engl.: Solid Phase Extraction, SPE) aus der Probe entfernt werden. Danach wird an der verbleibenden Probe der DOC und die UV-Absorption bestimmt. Die Differenz zwischen diesen Ergebnissen und den DOC- bzw. UV-Bestimmungen vor der Festphasenextraktion charakterisiert die potenziell bioakkumulierbare Fraktion.

Die Abtrennung des PBS-Anteils soll mittels RP-SPE an C18-Materialien erfolgen. Der organische Kohlenstoffanteil des PBS wäre durch DOC-Differenzbestimmung vor und nach Festphasenextraktion erfassbar.

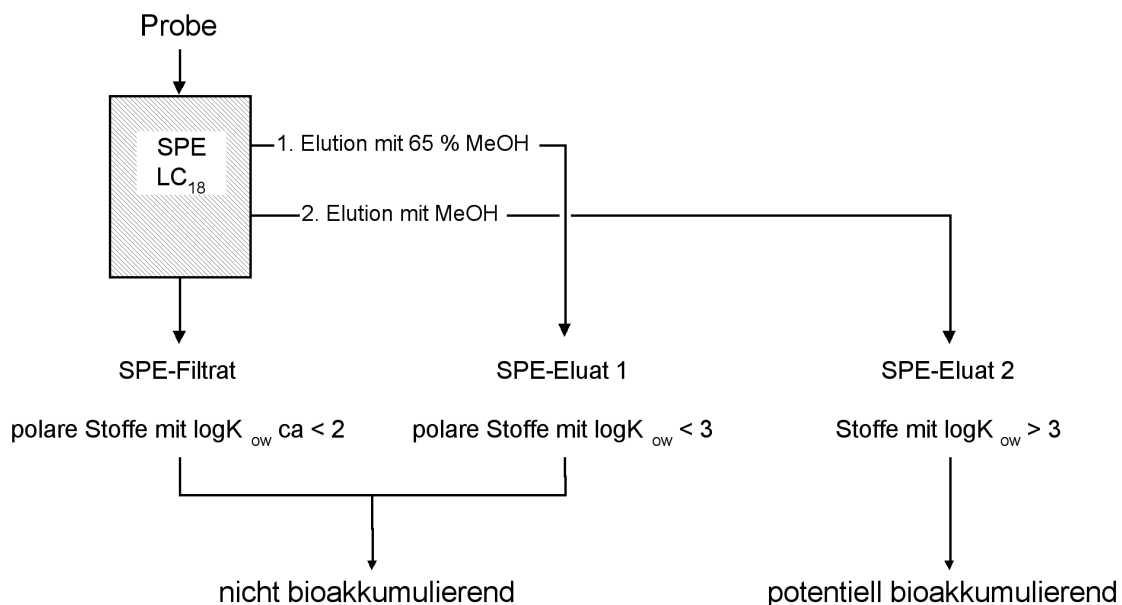


Abb. 4: Fraktionierung des PBS-Anteils im Modul „Bioakkumulierbarkeit“

Eine hierfür geeignete sehr hydrophobe Phase existiert jedoch nicht. Alle hydrophoben Phasen extrahieren auch Verbindungen mit $\log P_{OW} < 3$. Die meisten polaren Stoffe verbleiben zwar in der Probe und finden sich im SPE-Filtrat, ein gewisser Anteil von

Stoffen mit $\log P_{OW} < 3$ wird aber mitextrahiert. Durch Elution der Festphase mit einem geeigneten Lösungsmittelgemisch sollen diese, nicht zur PBS-Fraktion zu rechnenden Stoffe, von der Festphase eluiert und aufgefangen werden. Dieses Eluat kann dann entweder alleine, oder gemeinsam mit dem SPE-Filtrat den weiteren analytischen Verfahren zugeführt werden. Die Summe der DOC-Werte von Filtrat und diesem Eluat ergibt den nicht potenziell bioakkumulierbaren DOC. Durch Differenzbildung mit dem DOC der für die Extraktion verwendeten Probe kann so der DOC der PBS ermittelt werden. Dieser kann zusätzlich nach Elution der PBS von der Festphase bestimmt werden. In analoger Weise lässt sich die Toxizität der potenziell bioakkumulierbaren Stoffe ermitteln.

5.8 Gemeinsamkeiten und Unterschiede bei der Entwicklungen von Bioakkumulations-Summenparametern

5.8.1 Die PBT-Eigenschaften organischer Verbindungen

Bei den Strategien für eine Gesamtabwasserbewertung spielen die PBT-Eigenschaften der Wasserinhaltsstoffe eine entscheidende Rolle, da vor allem diese zur Gefährdung regionaler Bereiche über größere Zeiträume beitragen. Um Aussagen über die Persistenz und die Toxizität von organischen Abwasserinhaltsstoffen zu erhalten, gibt es bereits eine Reihe gängiger Verfahren, die in der Routineanalytik angewendet werden³⁰, während standardisierte Verfahren zur summarischen Bestimmung aller potenziell bioakkumulierenden Stoffe oder Bioakkumulationstests für das Gesamtabwasser bisher noch nicht existieren.

Anhaltspunkte über das Abbauverhalten organischer Verbindungen im Abwasser können über BSB_n- und CSB-Bestimmungen erhalten werden, da das Verhältnis BSB_n/CSB auf den Anteil abbaubarer Verbindungen schließen lässt. Die Toxizität von Abwässern lässt sich nur mithilfe biologischer Testverfahren (Biotests) untersuchen. Es gibt eine Reihe von Verfahren, die international standardisiert sind³⁰. Sie können an Wasserorganismen unterschiedlicher trophischer Ebenen durchgeführt werden, wie Bakterien, Pilze, Algen, Protozoen, Kleinkrebse, Mollusken und Fischen.

Im Rahmen der Entwicklung der Strategiepapiere zur Gesamtabwasserbewertung wurden allerdings verschiedene Möglichkeiten untersucht. Da sich die methodischen Vorgehensweisen zum Teil schon vom Ansatz her grundlegend unterscheiden, sollen die einzelnen Verfahren detailliert vorgestellt werden. Es ist zu bemerken, dass keines der Verfahren bisher Einzug in die Routineanalytik gefunden hat.

5.8.2 *Niederländischer Ansatz*

Im Rahmen der Strategie der Abwassergesamtbewertung⁸ wurden zwei unterschiedliche Verfahren zur quantitativen Bestimmung bioakkumulierender Stoffe entwickelt.

a) Gesamtlipophilie komplexer Matrices

Es wurde ein HPLC-Verfahren mit linearem Lösungsmittelgradient entwickelt, mit dem es möglich ist, den P_{OW} -Wert einer unbekanntes Verbindung über deren Kapazitätsfaktor abzuschätzen²⁶. Die Retentionszeiten bzw. Kapazitätsfaktoren von Verbindungen mit bekanntem P_{OW} -Wert werden bestimmt. Vergleicht man nun diese mit den Retentionszeiten von Substanzen in Extrakten aus Umweltproben, so lassen sich deren Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten abschätzen. So kann man mit diesem Verfahren qualitative Hinweise auf die Anwesenheit von bioakkumulierenden Verbindungen in realen Umweltproben erhalten. Nach einer Fraktionierung nach steigendem P_{OW} -Wert soll anschließend die gesamte molare Konzentration aller Inhaltsstoffe bestimmt werden. Die Quantifizierung der einzelnen Fraktionen erfolgt massenspektrometrisch (GC/MS) oder mittels Dampfdruckosmometrie (VPO = Vapour Pressure Osmometry)⁵². Zum Schluss wird aus den Retentionszeiten und den molaren Konzentrationen jeder einzelnen Fraktion ein hypothetischer Wert der Gesamtlipophilie des Gemisches berechnet^{53,54}. Abschließend wird über mathematische Modelle das Anreicherungsverhalten (TBR = Total Body Residues) und die Toxizität (Baseline Toxicity) abgeschätzt⁵⁵.

Da bei der Dampfdruckosmometrie die Konzentration aller Stoffe über eine kolligative Eigenschaft bestimmt wird, wird die Messung nicht durch die chemische Natur der Verbindungen beeinflusst. Somit arbeitet der Detektor zwar stoffmengenproportional, jedoch hat er sich für die Analytik von Umweltproben nicht bewährt, da seine

Empfindlichkeit zu gering ist. Außerdem zeigten Verbindungen mit einem, im Vergleich zum Lösungsmittel, hohen Dampfdruck nur geringe und untereinander unterschiedliche Empfindlichkeiten.

b) „Biomimetische“ Extraktion

Der grundlegende Gedanke dieser Methode ist, dass die Gleichgewichtsverteilung von Stoffen in Phasen unterschiedlicher Polarität abhängig von der Lipophilie der Substanzen ist. Taucht man in eine wässrige Probe eine Empore Disk™⁵⁶ oder einen SPME-Faden (SPME = Solid Phase Micro Extraction)⁵⁷, die jeweils mit RP C18-Material belegt sind, so sorbieren lipophile Verbindungen rascher und stärker an deren Oberflächen als hydrophile Substanzen. Die Kontaktzeit muss mindestens so lang sein, bis sich ein dynamisches Gleichgewicht eingestellt hat, d. h. die Sorptionsgeschwindigkeit gleich der Desorptionsgeschwindigkeit für alle Wasserinhaltsstoffe ist.

Bei der Extraktion handelt es sich um eine passive Anreicherung der in der wässrigen Phase gelöst vorliegenden organischen Verbindungen in Abhängigkeit von den lipophilen Eigenschaften der Wasserinhaltsstoffe. Diese Separation soll die Biokonzentration aquatischer Organismen simulieren. Aus diesem Grund wurde der Terminus „biomimetische Extraktion“ eingeführt. Der niederländische Ansatz der „biomimetischen Extraktion“ durch passive Anreicherung aus der wässrigen Phase hat somit nicht zum Ziel, die Gesamtbelastung des Abwassers mit potenziell bioakkumulierenden Stoffen zu erfassen. Es soll vielmehr die Biokonzentration durch Diffusion simuliert und nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes die Gesamtkonzentration der adsorbierten Stoffe bestimmt werden⁵⁸.

Es wird postuliert, dass mittels der passiven Anreicherung auf hydrophoben Materialien nur die bioverfügbaren Stoffe angereichert werden, da die Extraktion ausschließlich aus der gelösten Phase heraus erfolgen kann⁵⁹, denn nur in der wässrigen Matrix gelöste Stoffe sind nach Auffassung der Autoren für Organismen bioverfügbar.

Bei der Methode mit der Empore Disk™ wird diese in die gerührte Wasserprobe (Volumen = 10 l) eingetaucht. Nach 7 Tagen (!) wird die Probe erneuert und wiederum 7 Tage angereichert. Nach 14 Tagen wird die Empore Disk™ aus der Probe entnommen

und angelagerte Feststoffpartikel mit einem Tuch entfernt. Die Empore Disk™ wird daraufhin 24 Stunden mit Cyclohexan eluiert.

Bei der Festphasenmikroextraktion (SPME) wird 24 Stunden angereichert, d. h. es wird angenommen, dass sich das Verteilungsgleichgewicht in dieser Zeit eingestellt hat⁵⁸. Die SPME-Faser auf Polyacrylat-Basis wird meist direkt, das heißt ohne vorherige Extraktion, in das Aufgabesystem des GC eingeführt (On-Column-Injektion)⁶⁰. Dabei werden die Analyten von der Faser thermisch desorbiert und gaschromatographisch aufgetrennt.

Die Quantifizierung erfolgt mittels GC-MS. Dazu wird als externer Standard 2,4,5-Trichlortoluol zudosiert, dessen Empfindlichkeit definitionsgemäß gleich eins gesetzt wird. Dabei wird vorausgesetzt, dass die molaren Response-Faktoren für alle organischen Verbindungen, die in komplexen Abwasserproben vorkommen können, gleich groß sind und der Empfindlichkeit des Standards sehr ähneln⁵⁸.

Um dies zu belegen, wurden eine ganze Reihe organischer Verbindungen diverser Stoffklassen auf deren molare Empfindlichkeiten hin untersucht⁵⁶. Es zeigte sich, dass von 42 Testverbindungen 12 überhaupt nicht detektierbar waren und die restlichen eine Standardabweichung der molaren Empfindlichkeit von 43 % besaßen. Diese durchschnittliche Abweichung wird für das Verfahren als akzeptabel definiert.

5.8.3 Schwedischer Ansatz

Die Bestimmung der potenziell bioakkumulierenden Stoffe (PBS) beruht auf einem dünnschichtchromatographischen Verfahren an Umkehrphasen (RP-TLC)^{61,62}. Dabei wird die Abwasserprobe auf $\text{pH} \leq 2$ eingestellt und mit Cyclohexan oder n-Hexan/tert-Butylmethylether (7:3) ausgeschüttelt. Der Extrakt wird mit Natriumsulfat getrocknet und enthält „saure“ und „neutrale“ Verbindungen. Zusätzlich wird eine Abwasserprobe auf $\text{pH} \geq 12$ eingestellt und auf dieselbe Weise extrahiert. Dieser Extrakt enthält „basische“ Verbindungen.

Ein Aliquot des Extrakts wird auf eine RP-C18-Dünnschichtplatte aufgetragen. Gleichzeitig werden verschiedene Referenzsubstanzen mit bekanntem P_{OW} -Wert aufgetra-

gen. Als Laufmittel wird Aceton/Wasser 80:20 eingesetzt. Die Lauffronten der Referenzsubstanzen werden mit einer UV-Lampe verfolgt. Man teilt die Lauffronten auf der DC-Platte in verschiedene Zonen ein. Dies entspricht einer Fraktionierung der Analyten nach deren P_{OW} -Werten, wobei sich per Definition im Bereich $3 \leq \log P_{OW} \leq 6$ die PBS befinden sollen. Die stationäre Phase der einzelnen Zonen werden von der DC-Platte gekratzt und mit Aceton/Cyclohexan 1:1 extrahiert. Den Extrakten wird ein interner Standard (z. B. Octadecan oder Dodecan) zugesetzt. Der Extrakt wird eingengt, und anschließend wird über GC-FID quantifiziert. Die Flächen der einzelnen Peaks werden integriert und aufsummiert. Die Gesamtfläche wird ins Verhältnis zur Fläche des internen Standards gesetzt. Die Angabe des Ergebnisses erfolgt in Milligramm Kohlenstoff pro Liter (mg C/l) als Gehalt an organischem Kohlenstoff der PBS-Fraktion.

Da die Handhabung der Dünnschichtplatten bei deren Extraktion diffizil ist, wurde eine Alternative des Separationsschritts ausgearbeitet^{43,47}. Dabei werden die eingengten organischen Extrakte flüssigkeitschromatographisch mittels Gradientenelution (Laufmittel: Methanol/Phosphatpuffer) aufgetrennt. Es wird zur Fraktionierung eine semipräparative HPLC eingesetzt. Die Trennung erfolgt an RP-C18-Materialien nach aufsteigenden P_{OW} -Werten der organischen Verbindungen. Es werden drei Fraktionen abgenommen:

Fraktion 1:	$\log P_{OW} < 3$
Fraktion 2:	$3 < \log P_{OW} < 5$
Fraktion 3:	$\log P_{OW} > 5$

Nach der Fraktionierung werden die Fraktionen 2 und 3 derivatisiert (methyliert bzw. acetyliert) und an Kieselgel aufgereinigt. Danach sollen die Inhaltsstoffe mittels GC-MS identifiziert und mithilfe von GC-FID quantifiziert werden⁴³. Die Konzentrationen in den einzelnen Fraktionen können bei diesem Verfahren nicht nur mit GC-FID bzw. GC-MS, sondern zusätzlich gravimetrisch bestimmt werden.

Bei einer groß angelegten Studie (STORK-Projekt) wurden PBS-Bestimmungen von Abwässern aus verschiedenen Branchen nach diesem Verfahren durchgeführt⁴⁷. Die PBS-Konzentrationen lagen immer unter 10 mg/l (mit einer Ausnahme mit einem

gemessenen Spitzenwert von 210 mg/l). In 75 % der Fälle lagen die Werte unter 2 mg/l bzw. 60 % unter 1 mg/l.

Für drei andere industrielle Abwasserproben wurden bei der gravimetrischen Bestimmung für die PBS-Fractionen ($\log P_{OW} > 3$) Konzentrationen von 0,15 bzw. 9,5 mg/l gefunden⁶². Die Wiederfindung bei der HPLC-Fraktionierung in Bezug zur Gesamtmenge der extrahierten Verbindungen betrug zwischen 24 und 49 %. Der Anteil der Verbindungen mit einem $\log P_{OW} > 5$ an der PBS-Fraktion betrug bei der ersten Probe nur etwa 7 % und bei der zweiten Probe lediglich ca. 1 %. Des Weiteren wurde bei einer anderen Abwasserprobe gezeigt, dass nur ca. 25 % der organischen Wasserinhaltsstoffe gaschromatographisch analysierbar sind. Von diesen GC-gängigen Verbindungen haben 75 % einen $\log P_{OW} < 3$ und 2 % einen $\log P_{OW} > 5$ ⁶².

In einer weiteren Untersuchung wurden die PBS-Gehalte von Abwässern einer Papierrecyclingfabrik (Entfärbung) gravimetrisch und gaschromatographisch bestimmt⁴³. Im Vergleich zur gravimetrischen Bestimmung ließen sich zwischen 31 und 69 % der PBS gaschromatographisch analysieren. Folgende Konzentrationen wurden gefunden (in Klammern sind die gemessenen Blindwerte über das Gesamtverfahren angegeben):

Gesamter Extrakt:	3,5 mg/l (2,2 mg/l)
Fraktion $\log P_{OW} < 3$:	0,9 mg/l (0,4 mg/l)
Fraktion $\log P_{OW} > 3$	1,3 mg/l (1,1 mg/l)

5.8.4 Französischer Ansatz

Bioakkumulierbare Verbindungen werden nach Flüssig/Flüssig-Extraktion mittels einer semipräparativen HPLC fraktioniert ($\log P_{OW} > 4$) und eine Identifizierung und Quantifizierung von Inhaltsstoffen dieser Fraktion mithilfe von Massenspektren (GC-MS) versucht⁴⁸. Hier ist festzustellen, dass die Quantifizierung bioakkumulierender Substanzen nicht über einen Summenparameter erfolgt, sondern Einzelstoffkonzentrationen zu einem einzelnen Analysenwert aufsummiert werden.

5.8.5 US-amerikanischer Ansatz

Die US-amerikanische Umweltbehörde (EPA) hat ein Verfahren vorgestellt, bei dem biokonzentrierbare Stoffe aus Abwässern und Sedimenten isoliert werden. Anschließend soll mithilfe chemischer Analysemethoden (GC-MS im Scan-Modus) nach unbekanntem Verbindungen gescreent werden. Nach der Identifizierung mittels MS-Datenbanken wird eine Liste von Zielsubstanzen (TID = Tentatively Identified Chemicals) erstellt. Diese Substanzen werden quantifiziert (GC-MS im SIM-Modus)⁶³.

Zu den Abwasser- bzw. Sedimentproben wird ein Mischstandard von ²H₁₀-Biphenyl, ¹³C₆-1,2,4,5-Tetrachlorbenzol und ¹³C₆-Hexachlorbenzol (Konzentration je 1 mg/l) zudosiert. Danach werden die Abwasserproben mit n-Hexan extrahiert. Die Sedimentproben werden mit Natriumsulfat getrocknet und Soxhlet-extrahiert (Extraktionsmittel: Aceton/n-Hexan 1:1). Die vereinigten Eluate werden auf 525 µl aufkonzentriert und mittels HPLC in drei Fraktionen steigender Lipophilie aufgetrennt. In einem externen HPLC-Lauf wird ein Gemisch von 1,4-Dichlorbenzol, 1,3-Diethylbenzol, p,p'-DDE und PCB 209 injiziert. Die Retentionszeiten dieser Markerverbindungen bestimmen das Fraktionierungsfenster.

Die 3 Fraktionen werden mit mindestens dem zehnfachen Volumen bidestilliertem Wasser verdünnt. Diese Lösungen werden daraufhin einer Festphasenextraktion an C18-Material unterworfen. Die SPE-Säulen werden am Stickstoffstrom getrocknet und mit Dichlormethan und Hexan fraktioniert eluiert. Jede einzelne Fraktion wird auf 100 µl eingeeengt und ²H₁₂-Chrysen zudosiert. Die Identifizierung der Inhaltsstoffe erfolgt nach einem GC-MS-Full-Scan mithilfe einer MS-Datenbank.

5.8.6 Dänischer Ansatz

Um potenziell bioakkumulierende Stoffe zu bestimmen, wird nach Verbindungen mit einem log P_{OW} ≥ 3 gescreent und diese dann als Einzelstoffe quantifiziert. Bioakkumulierende Metalle werden mittels Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt. Gleichzeitig wird die Abbaubarkeit der Verbindung nach Adaption mittels HPLC verfolgt, das heißt die zeitliche Veränderung des Peaks des Analyten wird verfolgt. Kann bei dieser Risiko-

bewertung eine Gefährdung durch bioakkumulierende Stoffe nicht ausgeschlossen werden, sind abschließend BCF-Bestimmungen mit aquatischen Organismen durchzuführen, um eine vollständige Beurteilung gewährleisten zu können. Auch hier wird eine Einzelstoffidentifizierung vorgenommen.

5.8.7 Vergleich der verschiedenen internationalen Ansätze

a) Extraktion und Separation

Es stellt sich grundsätzlich die Frage, welche Extraktionsmethode für die Erfassung von lipophilen organischen Wasserinhaltsstoffe aus der komplexen Matrix Abwasser am geeignetsten ist. In Frage kommen folgende Extraktionsmethoden:

- Flüssig-flüssig Extraktion,
- Festphasenextraktion,
- Festphasenmikroextraktion,
- Extraktion mit einer Empore Disk™.

Keine der Methoden erfasst bioakkumulierbare Metalle, sondern es werden ausschließlich organische Verbindungen quantifiziert. Zudem lässt sich bei keinem Verfahren zwischen anthropogenen und biogenen Stoffen unterscheiden.

Es ist zu beachten, dass Verbindungen, die an Feststoffpartikel oder gelöste hochmolekulare bzw. kolloidale Wasserinhaltsstoffe gebunden sind, in der Regel weniger bioverfügbar sind. Gleichzeitig sind sie aber nur dann extrahierbar, wenn ihre Affinität gegenüber dem Lösungsmittel bzw. der RP-Phase größer ist als gegenüber den hochmolekularen Wasserinhaltsstoffen. Dies bedeutet, dass vor allem bei Wasserproben mit hohem DOC-Gehalten die gefundenen Konzentrationen der lipophilen Analyten nicht unbedingt die tatsächlichen Gehalte in der Gesamtprobe widerspiegeln. Adsorbierte, physikalisch oder chemisch gebundene Verbindungen werden bei der Extraktion nicht oder nur bedingt erfasst. Dies ist ein grundsätzliches Problem bei der Extraktion von komplexen Umweltproben, die aus mehreren Phasen bestehen.

Die Flüssig-flüssig-Extraktion mit einem unpolaren Lösungsmittel hat gegenüber der Festphasenextraktion zwar den Vorteil, dass die Feststoffpartikel vorher nicht abge-

trennt werden müssen, die Effizienz der Schwebstoffextraktion lässt sich aber nicht bestimmen. Außerdem ist der Lösungsmittel- und Zeitbedarf bei der Flüssig-flüssig-Extraktion deutlich höher als bei der Festphasenextraktion. Bei der Verwendung nur eines organischen Lösungsmittels kann die Extraktionseffizienz von Verbindungen aus einem bestimmten Polaritätsbereich verringert sein. Deshalb werden zum Teil Lösungsmittelgemische eingesetzt, um die gesamte PBS-Fraktion möglichst effektiv zu erfassen.

Durch Variation des pH können ionische Verbindungen in ihre neutrale Form überführt werden. In der neutralen Form haben organische Substanzen einen deutlich höheren P_{OW} -Wert und können somit in das PBS-Fenster fallen. Somit kann man durch Messungen im Sauren, Neutralen und Alkalischen die Zusatzinformation erhalten, welche Stoffe theoretisch bei diesen Randbedingungen bioakkumuliert werden können.

Ein methodischer Nachteil bei der Flüssig-flüssig Extraktion ist, dass sich in realen Abwassermatrices oftmals Emulsionen ausbilden. Diese resultieren entweder aus dem Vorhandensein von oberflächenaktiven Tensiden oder von Huminstoffen, die durch ihre zahlreichen funktionellen Gruppen respektive ihren ionischen Bindungsanteilen ebenfalls grenzflächenaktiv sind. Da sich die Tenside bzw. Huminstoffe gerade an der Phasengrenze anreichern, lässt sich in diesen Fällen keine ausreichende Phasentrennung erreichen. Eventuell kann durch Zugabe eines Salzes die Phasentrennung bis zu einem gewissen Grad verbessert und beschleunigt werden.

Bei der Festphasenextraktion (SPE) handelt es sich, wie z. B. bei der Flüssig-flüssig- oder der Soxhlet-Extraktion, um eine erschöpfende Extraktionsmethode, während durch Passivanreicherung mit einer Empore-Disk™ bzw. SPME die Konzentrationen der lipophilen Stoffe nach Einstellung des dynamischen Verteilungsgleichgewichts der Substanz zwischen wässriger Probe, Feststoffbestandteilen und Festphase bestimmt werden soll. Die Passivanreicherung dauert einerseits länger, andererseits ist es aufwendig, das Erreichen des Gleichgewichtszustandes zu verfolgen. Die Gesamtgehalte an PBS werden und sollen bei der Passivanreicherung nicht bestimmt werden, sondern es soll eine Situation simuliert werden, die der Anreicherung des Stoffes im Organismus ähnelt. Die Bestimmung entspricht damit einer Abbildung der momentanen Abwasser-

situation. Parameteränderungen, die zu Veränderungen der Schadstoffverteilung führen können, werden außer Acht gelassen, während mit einer erschöpfenden Extraktion eine „Worst Case“-Situation beschrieben werden kann. Dies könnte bei der Festlegung von Grenzwerten von Interesse sein.

Die SPME hat den Vorteil, dass keine organischen Lösungsmittel eingesetzt werden müssen. Es werden dadurch, dass der SPME-Faden zur Passivanreicherung direkt in die Probe eingetaucht wird, nur die frei gelösten Stoffe angereichert. Feststoffgebundene PBS werden nicht erfasst.

Der grundsätzliche Unterschied zwischen der SPME- bzw. Empore Disk™-Anreicherung und der Flüssig-flüssig- bzw. Festphasenextraktion besteht darin, dass bei der passiven Anreicherung der Extraktionsschritt gleichzeitig der Separationsschritt ist, während bei der erschöpfenden Extraktion die Separation z. B. mittels HPLC nachgeschaltet wird. Dies führt zwangsläufig dazu, dass bei der Passivanreicherung die Separation nicht exakt gesteuert werden kann, während bei der HPLC die Fraktionierung, z. B. durch Variation der Markersubstanzen, dem Untersuchungsziel recht unkompliziert angepasst werden kann. Ein methodischer Nachteil bei der Extraktion mit der Empore-Disk™ liegt zudem darin, dass es bis zu 7 Tagen dauert, bis sich das Verteilungsgleichgewicht eingestellt hat.

Bei dem niederländischen Verfahren muss zudem geklärt werden, ob unterschiedliche RP-Phasen zu vergleichbaren Ergebnissen führen, denn es ist bekannt, dass sogar unterschiedliche Chargen von Festphasen des gleichen Herstellers zum Teil ein deutlich unterschiedliches Anreicherungsverhalten zeigen. In diesem Fall wäre es wichtig zu ermitteln, welche Umkehrphase das Akkumulationsverhalten von Organismen am exaktesten simuliert. Des Weiteren kann mit der Passivanreicherung nur die Aufnahme aus der gelösten Phase (Biokonzentration) simuliert werden. Die Aufnahme von Schadstoffen über andere Pfade als das umgebende Wasser, wie z. B. das Sediment oder die Nahrung, die in benthischen Organismen auch eine Rolle spielen kann, kann mit einer passiven Extraktion nicht nachgeahmt werden.

Da die Stoffaufnahme durch Organismen recht komplex verlaufen kann, kann das Akkumulationsverhalten durch Passivanreicherung nur beschränkt simuliert werden,

denn das Anreicherungsverhalten ist unter anderem abhängig vom Testorganismus und dessen Zugehörigkeit zu einer trophischen Ebene. Außerdem spielen die biologischen, physikalischen und chemischen Umgebungsbedingungen, wie pH, Sauerstoff-, Kohlenstoff-, Mineral- und Tongehalt im Kompartiment eine wesentliche Rolle. Da bei der passiven Anreicherung der hydrophoben Verbindungen auf dem SPME-Faden bzw. der Empore™-Disk die Gleichgewichtseinstellung zwischen der gelösten Phase und dem Festphasenmaterial maßgebend ist, kann für das Schutzgut Sediment vor allem eine Unterschätzung, aber auch eine Überschätzung der Bioverfügbarkeit der Stoffe resultieren. Deshalb ist kritisch zu hinterfragen, ob das Modell der „biomimetischen Extraktion“ eine befriedigende Abbildung der tatsächlichen Situation darstellt. Aufgrund dieser Tatsache, dass es sich bei den Anreicherungsmechanismen zum Teil um sehr komplexe Vorgänge handelt, sollten Begriffe wie „Bioverfügbarkeit“ und „biomimetische Extraktion“ mit Bedacht verwendet werden.

b) Detektion

Zur routinemäßigen Überwachung von Abwassereinleitungen eignen sich im allgemeinen nur Methoden, die einfach, schnell und kostengünstig sind. Ansätze, bei denen Einzelstoffidentifizierungen und -quantifizierungen vorgesehen sind, schränken den Einsatz im Routinealltag erheblich ein. Sie sind eher geeignet, den Kenntnisstand über das Auftreten der Analyten in der Umwelt zu erweitern. Alle Verfahren, bei denen eine Einzelstoffidentifizierung vorgesehen ist, sind für einen Summenparameter nicht geeignet.

Zur Bestimmung der PBS soll ein Detektor zum Einsatz kommen, mit dem es möglich ist alle Analyten universell, d. h. unabhängig von deren Struktur bzw. deren chemischen und physikalischen Eigenschaften, zu quantifizieren. Voraussetzung dafür ist, dass alle Verbindungen mit nahezu den gleichen Empfindlichkeiten detektiert werden und so eine massen- oder stoffmengenproportionale Erfassung möglich ist.

Beim niederländischen Verfahren wurde mit der Dampfdruckosmometrie ein Detektionsverfahren eingesetzt, das die kolligativen Eigenschaften der Stoffe ausnutzt. Die Signalintensität ist nur von der Teilchenanzahl und nicht von der Teilchenart abhängig. Das

wäre sehr interessant für den Einsatz bei der Bestimmung eines PBS-Summenparameters. Jedoch war die Bestimmungsgrenze bei diesem Verfahren zu hoch, sodass der Detektor in der Umweltanalytik in der Regel nicht einsetzbar ist. Zudem ist die Handhabung des Detektors kompliziert und bedarf einiger Erfahrung. Somit kam dieser Detektor für den PBS-Summenparameter nicht in Betracht.

Der Einsatz eines Gaschromatographen, gekoppelt mit verschiedenen Detektoren hat mehrere Limitierungen. Einerseits können nur Analyten erfasst werden, die GC-gängig (thermostabil) sind. Andererseits arbeitet keiner der GC-Detektoren massenproportional. Die Responsefaktoren der Analyten unterscheiden sich zum Teil um Zehnerpotenzen. Außerdem lassen sich viele Analyten erst nach Derivatisierung detektieren. Zudem ist der massenselektive Detektor als summarischer Detektor nur im TIC-Modus einsetzbar. Der TIC-Modus ist gegenüber dem SIM-Modus deutlich unempfindlicher. Die Detektionsgrenze für Bestimmungen im Scan-Modus liegt deutlich höher.

Die gravimetrische Detektion hat den Vorteil, dass die Masse der PBS-Fraktion direkt bestimmt wird. Es handelt sich also nicht nur um eine massenproportionale Detektion, sondern um eine direkte Massenbestimmung. Damit wird diese Bestimmungsmethode der Forderung der DIN 38 402 Teil 1³⁰ gerecht, nach der Gehalte an Wasserinhaltsstoffen in der Regel als Massenkonzentrationen angegeben werden sollten. Ein weiterer Vorzug ist, dass die Analyten bei der Quantifizierung nicht zerstört werden und somit für weitere Untersuchungen, z. B. Einzelstoffidentifizierung, zur Verfügung stehen. Da die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Analyten bei der gravimetrischen Bestimmung keine Selektivitätskriterien darstellen, ist die Gravimetrie zur summarischen Quantifizierung universell einsetzbar. Ein methodischer Nachteil liegt darin, dass flüchtige Verbindungen quantitativ verloren gehen und bei der Messung nicht erfasst werden.

Zusammenfassend sind die ausschlaggebenden Auswahlkriterien für die in dieser Arbeit entwickelte Analysenmethode dargestellt (Tab. 1), wobei das Verfahren in folgende Einzelschritte aufgeteilt wurde:

- Anreicherung aus der Probenmatrix (Extraktion)
- Isolierung der zu untersuchenden Substanzen (Separation)
- Quantifizierung (Detektion)

Tab. 1: Auswahlkriterien für das Analyseverfahren

Extraktion				
	Flüssig/flüssig	Empore Disk	SPME	SPE
Vorzüge	gleichzeitige Extraktion der gelösten und festen Phase	einfache Handhabung	einfache Handhabung	einfache Handhabung, hoher Probendurchsatz, erschöpfende Extraktion, geringer Lösungsmittelverbrauch
Nachteile	Lösungsmittelverbrauch, Emulsionsbildung	passive Anreicherung, keine Feststoffextraktion, lange Extraktionsdauer	passive Anreicherung, keine Feststoffextraktion	verschiedene Festphasenmaterialien zeigen unterschiedliches Anreicherungsverhalten

Separation				
	SPME	Empore Disk	TLC	HPLC
Vorzüge	einfache Handhabung	einfache Handhabung	geringer apparativer Aufwand	Trennung nach log P _{OW} -Werten (Chemikalienbewertung)
Nachteile	Einstellung von Standardbedingungen schwierig, verschiedene Festphasenmaterialien zeigen unterschiedliches Anreicherungsverhalten	Einstellung von Standardbedingungen schwierig, verschiedene Festphasenmaterialien zeigen unterschiedliches Anreicherungsverhalten	schwierige Handhabung, Trennleistung gering	apparativer Aufwand

Detektion				
	VPO	GC-MS	LSD	Gravimetrie
Vorzüge	massenproportional	thermische Desorption des SPME-Fadens	für viele Verbindungsklassen einsetzbar	massenproportional, Analyten werden nicht zerstört
Nachteile	geringe Empfindlichkeit	nicht massenproportional, diskriminierend	nicht massenproportional, diskriminierend	flüchtige Verbindungen werden nicht erfasst

Als Anreicherungsverfahren wurde die Soxhlet- und die Festphasenextraktion vor allem deshalb gewählt, weil die Extraktionsausbeuten der Analyten dabei sehr hoch liegen. Die Fraktionierung über HPLC erschien als besonders geeignet, weil bereits ein standardisiertes HPLC-Verfahren zur log P_{OW}-Wert-Bestimmung existiert. Die Quantifizierung über Wägung der PBS wurde gewählt, da man dabei mit dem Problem der unterschiedlichen Detektorempfindlichkeiten gegenüber den verschiedenen Analyten nicht konfrontiert ist.

6 Ergebnisse und Diskussion

6.1 Auswahlkriterien für die analytischen Einzelschritte des PBS-Verfahrens

Der zentrale analytische Schritt des PBS-Verfahrens ist die Erfassung aller potenziell bioakkumulierbaren Stoffe in einer definierten RP-HPLC-Fraktion (Kap. 6.6). Die Bestimmung der $\log P_{OW}$ -Werte von organischen Verbindungen durch Vergleich von deren Kapazitätsfaktoren bei der RP-HPLC ist ein seit den 80er Jahren angewendetes Verfahren bei der Chemikalienbewertung⁷⁶. Bei dem entwickelten Verfahren wird ein „Lipophiliefenster“ durch einen externen semipräparativen HPLC-Lauf mit zwei Marker-substanzen mit bekannten $\log P_{OW}$ -Werten festgelegt, zwischen dem die Fraktion der PBS liegt.

Die für eine summarische Quantifizierung notwendige massenproportionale Detektion der potenziell bioakkumulierbaren Stoffe war der kritischste Punkt des Verfahrens. Da die Lipophilie die einzige gemeinsame Eigenschaft bei allen potenziell bioakkumulierbaren Stoffen ist, können sich diese bzgl. der molaren Massen und chemischen Strukturen völlig unterscheiden. Aus diesem Grunde zeigte keiner der üblichen HPLC- bzw. GC-Detektoren (Kap. 9.6), auch nicht der zunächst vielversprechend erscheinende Lichtstreuendetektor (Kap. 9.5), eine zufriedenstellende massen- bzw. stoffmengenproportionale Empfindlichkeit für alle Standard-PBS. Deshalb wurde die Masse an PBS gravimetrisch ermittelt (Kap. 6.7.1). Diese **direkte** Massenbestimmung ist zur summarischen Quantifizierung ideal geeignet. Da bei der gravimetrischen Bestimmung die Analyten nicht zerstört werden, kann zudem der C-Gehalt der PBS-Fraktion mittels eines Feststoff-TOC bestimmt werden, was eine wertvolle analytische Kontrollmöglichkeit darstellt (Kap. 6.7.2). Es können damit allerdings nur schwerflüchtige PBS bestimmt werden, da die leichterflüchtigen Verbindungen im Trocknungsschritt verloren gehen.

Für die Anreicherung der PBS aus den Abwasserproben wurde die Festphasenextraktion eingesetzt (Kap. 6.5.2), weil diese gegenüber der Flüssig-flüssig-Extraktion (Kap. 6.5.1) mehrere methodische Vorteile aufweist. Die Wiederfindungsraten bei der Verfahrensentwicklung mit Standardverbindungen sind bei der SPE vergleichbar, zum

Teil sogar besser als bei der Flüssig-flüssig-Extraktion. Die Möglichkeit der vorherigen Abtrennung von Feststoffpartikeln vor der Extraktion mittels Glasfaserfiltration erlaubt zudem eine Differenzierung zwischen feststoffgebundenen und gelösten PBS.

6.2 Beschreibung des entwickelten PBS-Verfahrens

Das prinzipielle Vorgehen bei dem entwickelten PBS-Verfahren wird an dieser Stelle beschrieben (Abb. 5). Eine genaue Arbeitsvorschrift findet sich in Kap. 7.1.

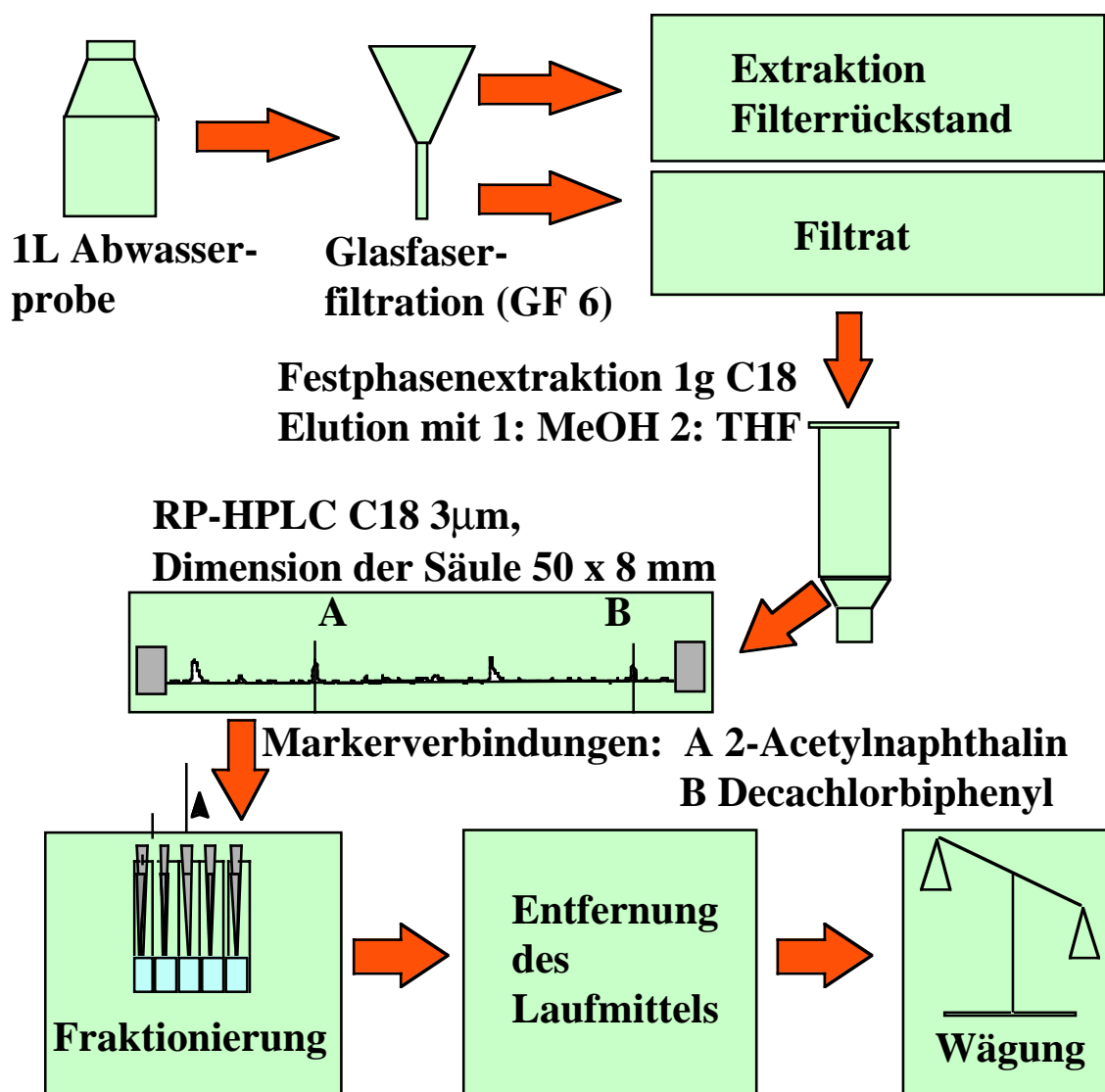


Abb. 5: Schema des Verfahrens

Bei dem PBS-Verfahren wird die Abwasserprobe über einen Glasfaserfilter filtriert. Die Masse an abfiltrierbaren Stoffen des Abwassers wird über Differenzwägung des Filters nach bzw. vor der Filtration ermittelt. Das Filter wird anschließend in einer Soxhlet-Apparatur extrahiert (Extraktionsmittel: Toluol) und auf die gleiche Weise wie der Extrakt der gelösten Phase über RP-HPLC fraktioniert und weiter aufgearbeitet.

Die PBS aus der wässrigen Phase werden mittels Festphasenextraktion (RP-C18) angereichert. Durch den Einsatz von Vakuumkammern können zwischen 12 und 20 Proben parallel extrahiert werden. Anschließend werden die PBS mit Methanol und Tetrahydrofuran von der Festphase eluiert.

Der Extrakt wird eingeeengt und auf eine semipräparative HPLC-Säule gegeben (RP-C18 als stationäre Phase). Die Elution erfolgt über einen Stufengradienten (Elutionsmittel: Acetonitril-Wasser/Ammoniumacetat). Die PBS werden dabei entsprechend ihrer $\log P_{OW}$ -Werte aufgetrennt und als Fraktion aufgefangen. Die Fraktion wird zuvor in einem ersten HPLC-Lauf durch zwei Markerverbindungen (2-Acetylnaphthalin und Decachlorbiphenyl) bestimmt. Es wird die Fraktion aufgefangen, die zwischen dem Signalanstieg der Markerverbindung 1 und dem Abklingen des Signals der Markerverbindung 2 liegt. Von der aufgefangenen Fraktion wird das Elutionsmittel im Rotationsverdampfer eingeeengt und das Lösungsmittel im Abzug weitgehend entfernt. Die PBS werden anschließend in einem Exsikkator vollständig getrocknet und der Trockenrückstand als Masse an PBS gravimetrisch mithilfe einer Semimikrowaage bestimmt. Zur Kontrolle kann der C-Gehalt der PBS mittels eines Feststoff-TOC ermittelt werden.

6.3 Randbedingungen des entwickelten Verfahrens

6.3.1 Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient

Der $\log P_{OW}$ -Wert ist das einfachste Modell zur Beschreibung der Bioakkumulation. Somit gelten die Einschränkungen, die dieses Modell mit sich bringt, gleichzeitig auch für den entwickelten PBS-Summenparameter. Bioakkumulationsmechanismen, die aufgrund bestimmter Eigenschaften von Stoffen, wie z. B. Oberflächenaktivität, auftreten, lassen sich mit diesem Modell nicht simulieren, d. h. diese Stoffe werden mit dem PBS-

Verfahren nicht erfasst. Auch Stoffe, die bei neutralem pH ionisch vorliegen, im Säuren bzw. Alkalischen jedoch einen $\log P_{OW} > 3$ besitzen, werden mit dem Verfahren ebenfalls nicht erfasst. Es lässt sich auch nicht differenzieren, ob ein durch die Molekülgröße der Verbindung verändertes Anreicherungsverhalten auftritt.

6.3.2 Feststoffgebundene PBS

Lipophile organische Verbindungen zeigen eine Tendenz zur Sorption an Schwebstoffe. Je hydrophober die Verbindung ist, desto größer ist in der Regel ihre Tendenz, sich an Feststoffe anzulagern. Dies konnte durch ein Experiment belegt werden, bei dem parallel eine schwebstoffhaltige Abwasserprobe und eine Probe, bei der zuvor die Feststoffe mittels Glasfaserfiltration entfernt wurden, mit den Standardverbindungen dotiert wurden. Nach einer Kontaktzeit von 30 Minuten lagen die hydrophileren Standardverbindungen ($\log P_{OW} < 4$) immer noch vollständig gelöst vor, während die lipophileren Verbindungen ab einem $\log P_{OW}$ -Wert größer vier eine deutliche Tendenz zeigten, an Schwebstoffe zu sorbieren, und zwar umso stärker, je hydrophober sie sind (Abb. 6).

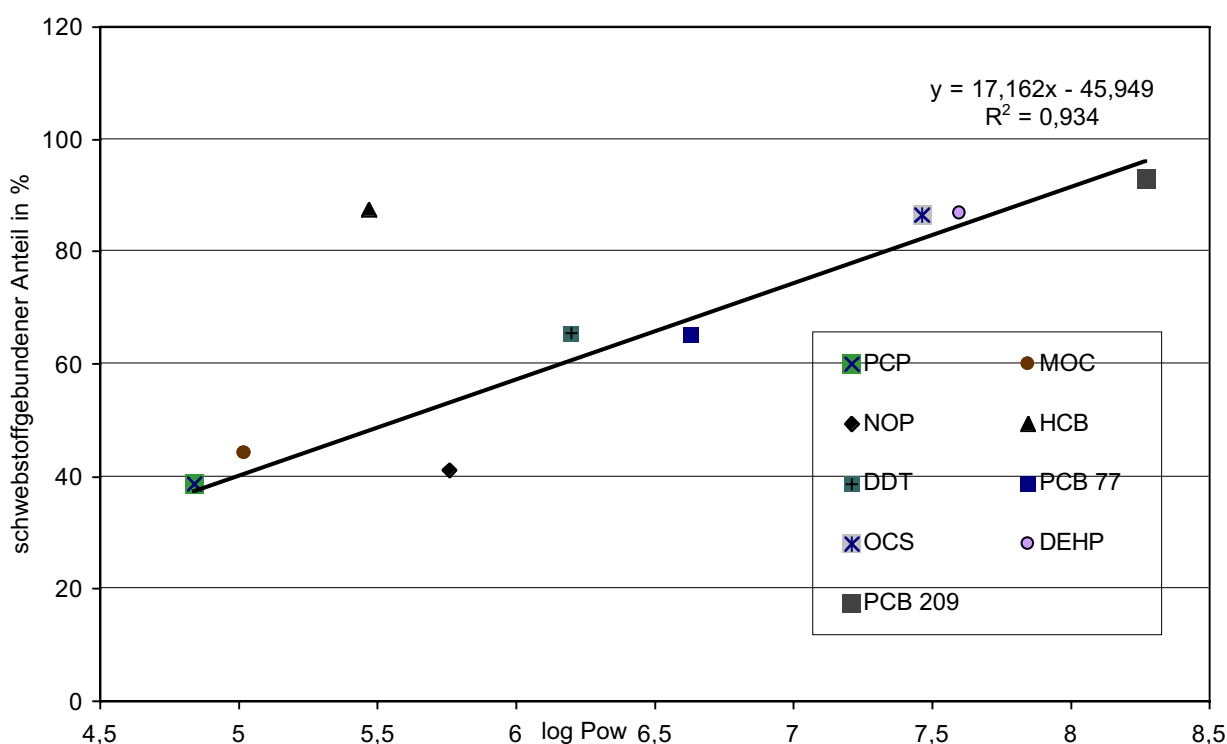


Abb. 6: Sorption der Standardverbindungen an Schwebstoffe

Dieser Sachverhalt zeigt deutlich die Notwendigkeit der Extraktion der Feststoffe, damit auch die sorbierten potenziell bioakkumulierbaren Stoffe miterfasst werden können. Hexachlorbenzol lag trotz seines relativ gesehen niedrigen $\log P_{OW}$ -Wertes von 5,47 zu 88 % feststoffgebunden vor. Der Datenpunkt dieser Verbindung wurde für die Berechnung der Regressionsgerade in Abb. 6 nicht berücksichtigt.

6.3.3 *Blindwertproblematik*

Ein Problem bei analytischen Verfahren, wie beispielsweise bei der Bestimmung von bestimmten Phthalsäureestern, ist oftmals das Auftreten von Blindwerten, die von Kontaminationen in den einzelnen Arbeitsschritten herrühren können. Bei dem entwickelten PBS-Summenparameter ergeben sich erhöhte Blindwerte z. B. dann, wenn das Festphasenmaterial bzw. die stationäre Phase der HPLC-Säule bei der Elution Stoffe verliert, die in das PBS-Lipophiliefenster fallen. Um diese Kontaminationen zu minimieren, wurden die SPE-Kartuschen vor dem Gebrauch nacheinander mit je 2 Säulenreservoirvolumina Tetrahydrofuran und Methanol eluiert und anschließend mit 2 Säulenreservoirvolumina Wasser äquilibriert, denn es hat sich herausgestellt, dass durch den zusätzlichen Waschschritt mit Tetrahydrofuran ein Großteil der Verunreinigungen aus dem Festphasenmaterial entfernt werden kann (Abb. 7). Für diese Untersuchung wurde das Eluat nach der Konditionierung aufgefangen. Zusätzlich wird ersichtlich, dass sich die Mengen an herauswaschbaren Stoffen bei den Produkten verschiedener Hersteller deutlich unterscheiden. So werden z. B. bei den C 18-Festphasen Supelclean (Hersteller: Supelco) und Bondesil (Hersteller: Varian) durch das erste Säulenreservoirvolumen Tetrahydrofuran ca. 1 mg nicht näher charakterisierter Stoffe aus dem Festphasenmaterial herausgelöst, während bei den anderen Herstellern nur 0,15 bis 0,35 mg herausgewaschen werden. Jedoch reicht die gewählte Konditionierung (2 x THF, 2 x MeOH) bei allen getesteten Festphasenmaterialien aus, um die Kontaminationen auf ein Minimum von $\leq 30 \mu\text{g}$ zu reduzieren.

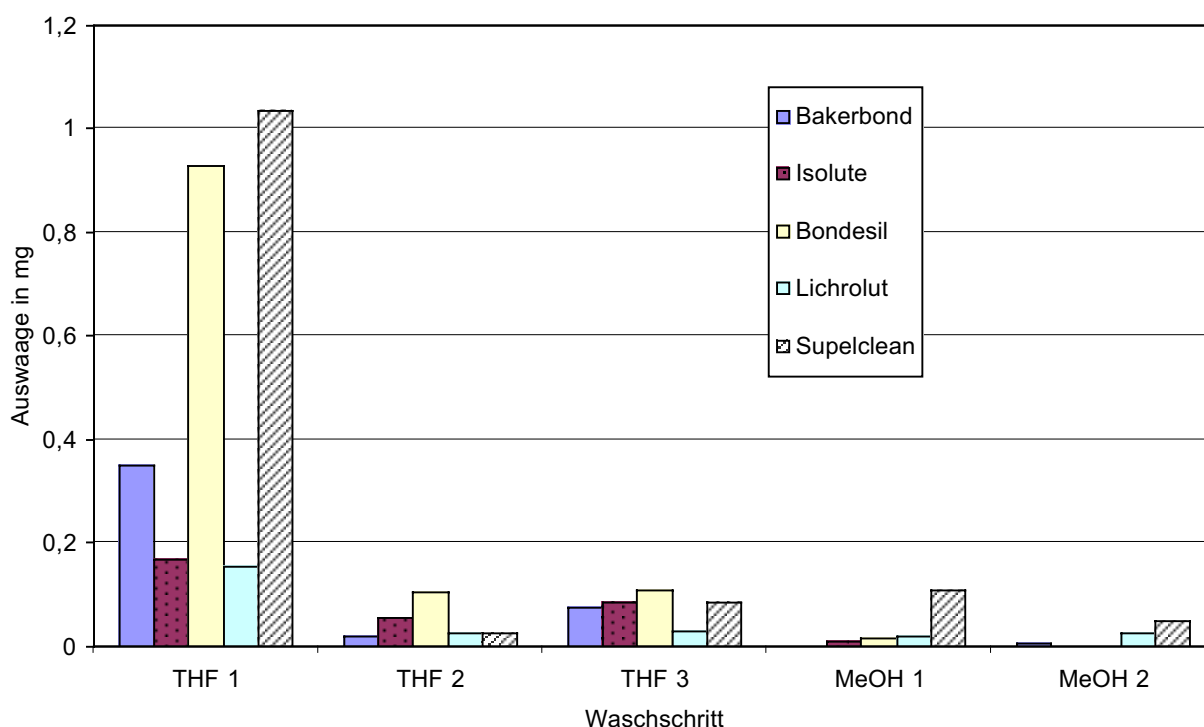


Abb. 7: Reduktion der Blindwerte bei der Festphasenextraktion durch Konditionierung mit Tetrahydrofuran und Methanol (Mittelwerte aus je 2 Bestimmungen)

Bei der HPLC-Trennung tritt das gleiche Blindwertproblem auf wie bei der Festphasenextraktion. Dieses „Bluten“ der stationären Phase trat nicht nur bei neuen HPLC-Säulen auf, sondern auch dann, wenn mit der Säule schon eine Vielzahl von Analysen durchgeführt wurden. Spült man die HPLC-Säule nacheinander mit je 2 x 100 ml Methanol, Tetrahydrofuran und wiederum Methanol, so reduziert sich der Blindwert bei jedem Spülschritt. Das Elutionsmittel Tetrahydrofuran wirkt auch hier als sehr effektives Lösungsmittel, um „Verunreinigungen“ von der Säule herunterzuwaschen (Abb. 8). Aus diesem Grunde wurde das System vor jeder HPLC-Trennung mit Tetrahydrofuran gespült. Das Eluenten-Programm wurde um diesen Spülschritt erweitert.

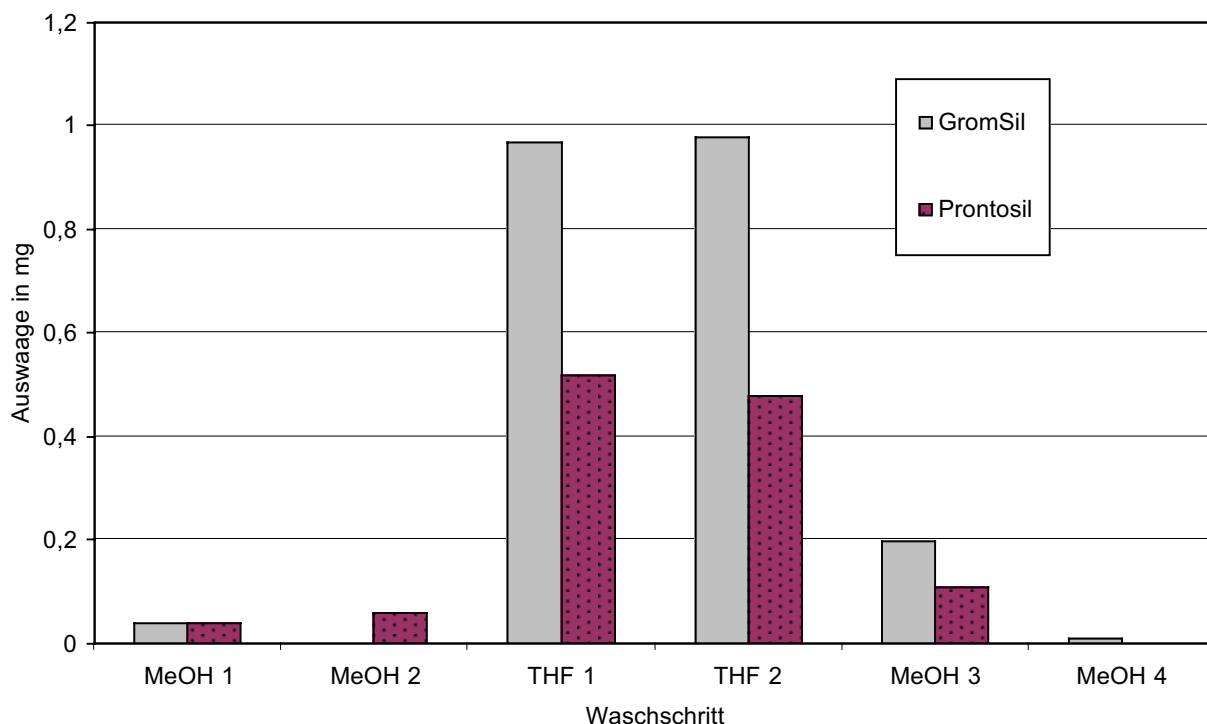


Abb. 8: Reduktion der Blindwerte bei der semipräparativen HPLC durch Spülung mit Tetrahydrofuran

Der maximale Blindwert bei der eigentlichen HPLC-Analyse, der bei 5 Parallelbestimmungen über das Gesamtverfahren auftrat, lag bei 160 µg (Mittelwert 80 µg).

6.3.4 Trocknung

Die gravimetrische Bestimmung der PBS macht es notwendig, das Lösungsmittel des Extrakts vor der Wägung vollständig zu entfernen. Dabei gehen auch flüchtige Analyten verloren. Während Diethylhexylphthalat ($97 \pm 1 \%$, $n = 5$), γ -Hexachlorcyclohexan ($95 \pm 2 \%$, $n = 5$) und Pyren ($96 \pm 3 \%$, $n = 5$) bei der Trocknung im Exsikkator, nach vorheriger Entfernung des Elutionsmittels im Abzug, nahezu vollständig erhalten bleiben, wird nach einer Trocknungszeit von 48 Stunden von 2-Acetylnaphthalin ($54 \pm 6 \%$, $n = 5$) nur noch etwa die Hälfte der Ausgangseinwaage wiedergefunden. Brombenzol, Ethylbenzol und Naphthalin gehen zu 100 % verloren. Ob die Analyten durch die Trocknung im Exsikkator verloren gehen, hängt in erster Linie von deren Siedepunkten bzw. deren Dampfdrücken ab.

Tab. 2: Wiederfindungen der Standardverbindungen nach Trocknung im Exsikkator

Verbindung	Wiederfindung in % [*]	Fp. in °C	Sdp. in °C	Dampfdruck in Pa bei T = 20 °C [†]
DEHP	97 ± 1	-50	385	1,3 · 10 ⁻³
γ-HCH	95 ± 2	113	323	3,0 · 10 ⁻³
2-Acetylnaphthalin	54 ± 6	52-54	300	5,2 · 10 ⁻²
Pyren	96 ± 3	151-152	393	8,2 · 10 ⁻²
Naphthalin	0	80-82	218	6,6 · 10 ⁰
Brombenzol	0	-31	156	4,1 · 10 ²
Ethylbenzol	0	-95	136	4,9 · 10 ²

^{*} angegeben ist die einfache Standardabweichung, Anzahl der Parallelbestimmungen: n = 5

[†] Literatur: Beilstein Commander 2000, Version 5.0, MDL Information Systems GmbH

Verbindungen scheinen dann verlustfrei getrocknet werden können, wenn deren Siedepunkte über 300 °C liegen.

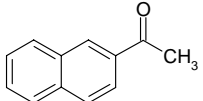
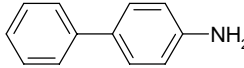
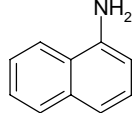
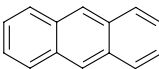
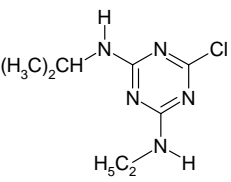

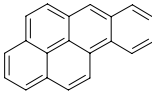
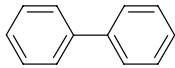
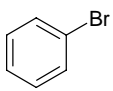
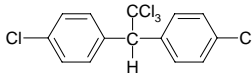
6.4 Herstellung von Standardproben

Bei der Verfahrensentwicklung des PBS-Summenparameters wurden insgesamt 27 organische Standardverbindungen eingesetzt, die aufgrund ihrer Eigenschaften (z. B. PBT-Kriterien) behördlicherseits als besonders überwachungsbedürftig gelten. Für die einzelnen Versuchsreihen wurden aus diesen Standardverbindungen geeignete Mischstandardlösungen (Konzentration meist 50 mg/l pro Einzelsubstanz) zusammengestellt.

Die Standardverbindungen wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt (Tab. 3):

- Abdeckung eines großen Lipophiliebereichs ($3 \leq \log P_{OW} \leq 8$)
- Repräsentation ökotoxikologisch relevanter Substanzklassen, z. B. aus der Liste prioritärer Stoffe (engl: Priority Substances) der EU-Wasser-rahmenrichtlinie, Listen prioritärer Stoffe für Nord- und Ostsee, Liste relevanter Stoffe für den Rhein, BUA-Altstoffliste, PBT-Chemikalien- und POP-Liste der US-EPA⁶⁴⁻⁶⁶
- Abdeckung unterschiedlicher Strukturen (z. B. sauer/basisch, chlorierte Verbindungen, Polycyclen u.a.)

Tab. 3: Ausgewählte Standardverbindungen

Substanzname <i>syst. Name</i> Abkürzung	Summen- formel	Strukturformel	Substanzname <i>syst. Name</i> Abkürzung	Summen- formel	Strukturformel
2-Acetyl- naphthalin (ANAP)	C ₁₂ H ₁₀ O		4-Amino- biphenyl (ABP)	C ₁₂ H ₁₁ N	
1-Amino- naphthalin (ANP)	C ₁₀ H ₉ N		Anthracen (ANT)	C ₁₄ H ₁₀	
Atrazin 4-Chlor-2-ethyl- amino-6- (2-propylamino)- 1,3,5-triazin (ATZ)	C ₈ H ₁₄ ClN ₅		Benzol (BE)	C ₆ H ₆	
Benzo[a]pyren (BaP)	C ₂₀ H ₁₂		Biphenyl (BP)	C ₁₂ H ₁₀	
Brombenzol (BB)	C ₆ H ₅ Br		p,p'-DDT 1,1-Bis-(4-chlor- phenyl)-2,2,2- trichlorethan (DDT)	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	

Substanzname syst. Name Abkürzung	Summen- formel	Strukturformel	Substanzname syst. Name Abkürzung	Summen- formel	Strukturformel
Decachlor- biphenyl (PCB 209)	$C_{12}Cl_{10}$		2,3-Dichlor- anilin (DCA)	$C_6H_5Cl_2N$	
4,4'-Dichlor- biphenyl (PCB 15)	$C_{12}H_8Cl_2$		Hexachlor- benzol (HCB)	C_6Cl_6	
Lindan γ -Hexachlor- cyclohexan (HCH)	$C_6H_6Cl_6$		Methoxychlor 1,1,1-Trichlor- ethyliden)bis- [4-methoxy- benzol] (MOC)	$C_{16}H_{15}Cl_3O_2$	
Naphthalin (NAP)	$C_{10}H_8$		4-Nitrophenol (NIP)	$C_6H_5NO_3$	
4-n-Nonylphenol (NOP)	$C_{15}H_{24}O$		Octachlorstyrol (OCS)	C_8Cl_8	
Parathion-methyl O,O-Dimethyl- O-4-nitrophenyl- thiophosphat (PAM)	$C_8H_{10}NO_5PS$		Pentachlor- phenol (PCP)	C_6HCl_5O	
Di-(2-ethyl- hexyl)phthalat Phthalsäure- bis(2-ethyl- hexyl)-ester (DEHP)	$C_{24}H_{38}O_4$		Pyren (PYR)	$C_{16}H_{10}$	
3,3',4,4'-Tetra- chlorbiphenyl (PCB 77)	$C_{12}H_6Cl_4$		Tetrachlor- ethen (PER)	C_2Cl_4	
Trichlorethen (TRI)	C_2HCl_3				

Aus den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Standardverbindungen (Tab. 4, geordnet nach steigenden P_{OW} -Werten) wird die Tendenz ersichtlich, dass mit steigender Lipophilie in der Regel auch die molaren Massen der organischen Verbindungen ansteigen. Dies liegt daran, dass höherlipophile Verbindungen oft mehrere aromatische Ringsysteme oder einen hohen Halogenierungsgrad besitzen. Polare funktionelle Gruppen senken dagegen den lipophilen Charakter. Damit einhergehend steigen mit wachsender Lipophilie meist die Schmelz- und Siedepunkte und es sinkt die Wasserlöslichkeit. Die Verteilung von ionisierbaren Verbindungen im System 1-Octanol/Wasser hängt direkt vom Dissoziationsgrad und damit unmittelbar vom pH-Wert ab.

Tab. 4: Physikalisch-chemische Daten der Standardverbindungen* (geordnet nach steigender Lipophilie)

Substanz	CAS-Nr.	M in g/mol	Fp. in °C	Kp. in °C	log Pow	Wasser- löslichkeit in g/l bei T = 20 °C	pK _a bei T = 20° C
4-Nitrophenol	100-02-7	139,1	113-115	279	1,93 (pH 7) 2,18 (pH 3)	$1,37 \cdot 10^1$	7,17
Benzol	71-43-2	78,1	5,5	80,1	2,13	$1,8 \cdot 10^0$	---
1-Aminonaphthalin*	134-32-7	143,2	43-45 ⁶⁷	301 ⁶⁸	2,25 ⁶⁹	$1,4 \cdot 10^0$	---
Trichlorethen	79-01-6	131,8	-73	87	2,53	$1,4 \cdot 10^0$	---
Atrazin*	1912-24-9	215,7	174	---	2,65	$4,5 \cdot 10^{-2}$	1,68
2,3-Dichloranilin*	608-27-5	162,0	23-24 ⁶⁸	252 ⁶⁸	2,69 ⁶⁹	$2,6 \cdot 10^{-1}$ ⁶⁹	---
Parathion-methyl*	298-00-0	263,2	34-35 ⁶⁷	---	2,81 ⁶⁹	$5,5 \cdot 10^{-2}$ ⁶⁷	---
2-Acetylnaphthalin	93-08-3	170,2	52-54 ⁷⁰	300 ⁷⁰	2,85 ⁶⁹	---	---
4-Aminobiphenyl*	92-67-1	169,2	52-54 ⁶⁷	191	2,86 ⁶⁹	---	4,38 (18 °C)

* Die physikalisch-chemischen Daten (nach Plausibilitätskriterien zum Teil gemittelt) sind aus Rippen, G.: **Handbuch der Umwelt-Chemikalien: Physikalisch-chemische und ökotoxikologische Daten ausgewählter chemischer Stoffe**; "Loseblattsammlung"; 52. Erg.Lfg. 9/2000, ecomed Verlag; Landsberg/Lech (2000); zum Teil Literaturverweise. Wenn abweichend von Rippen, sind Quellenverweise angegeben.

Substanz	CAS-Nr.	M in g/mol	Fp. in °C	Kp. in °C	log Pow	Wasser- löslichkeit in g/l bei T = 20 °C	pK _a bei T = 20° C
Tetrachlorethen	127-18-4	165,8	-23	121	2,87	1,5·10 ⁻¹	---
Brombenzol	108-86-1	157,0	-31 ⁷⁰	156 ⁷⁰	2,99 ⁶⁹	4,0·10 ^{0 70}	---
Naphthalin*	91-20-3	128,2	80-82 ⁶⁷	218 ⁷⁰	3,32 ⁶⁹	3,1·10 ^{-2 67}	---
γ-HCH (Lindan)	58-89-9	290,8	113	323	3,72	6,3·10 ⁻³	---
Biphenyl*	92-52-4	154,2	69 ⁶⁷	255 ⁷⁰	3,98 ⁶⁹	6,6·10 ⁻³	---
Anthracen	120-12-7	178,2	215-217 ⁷⁰	340 ⁷⁰	4,45 ⁶⁹	4,8·10 ⁻⁵	---
Pentachlorphenol*	87-86-5	266,3	189	310	2,80 (pH 7) 4,84 (pH 0,8)	2,0·10 ⁻²	4,80
Pyren	129-00-0	202,3	151-152	393 ⁷⁰	4,90	1,5·10 ⁻⁴ (20-30 °C)	---
Methoxychlor*	72-43-5	345,7	85-87 ⁶⁷	---	5,02	1,0·10 ⁻⁴ (25°C) ⁶⁷	---
PCB 15	2050-68-2	223,1	149 ⁷¹	317	5,23 ⁶⁹	5,7·10 ^{-5 71}	---
Hexachlorbenzol*	118-74-1	284,8	229	332	5,47	5,0·10 ⁻⁵	---
4-n-Nonylphenol*	104-40-5	220,4	41-43 ⁶⁷	290- 300 ⁷² *	5,76 ⁷³ , 2,86 (pH 10)	5,9·10 ⁻³	4,53 ⁷⁴
Benzo[a]pyren	50-32-8	252,3	175-177	495	6,15	4,5·10 ⁻⁶ (20-30 °C)	---
p,p'-DDT*	50-29-3	354,5	107-110 ⁶⁷	260	6,20	3,4·10 ⁻⁶	---
PCB 77*	32598-13-3	292,0	180 ⁷¹	---	6,63 ⁶⁹	7,5·10 ^{-7 71}	---
Octachlorstyrol*	29082-74-4	379,7	95-97 ⁶⁷	---	7,46 ⁶⁹	1,7·10 ^{-6 #}	---
DEHP*	117-81-7	390,6	-50	385	7,60 ⁶⁹	2,9·10 ⁻⁵	---
PCB 209*	2051-24-3	498,7	305 ⁷¹	---	8,27 ⁶⁹	1,6·10 ^{-8 71}	---

Die mit *) gekennzeichneten Verbindungen wurden bei der Optimierung der Festphasenextraktion (Kap. 6.5.2) eingesetzt

berechnet nach 69

† Isomerengemisch

6.5 Auswahl der Anreicherungs-methode

6.5.1 Flüssig-flüssig-Extraktion

Um die Eignung der Flüssig-flüssig-Extraktion als Anreicherungsverfahren zu untersuchen, wurden die Wiederfindungsraten der Standardverbindungen in dotierten Reinstwasserproben bestimmt. Es wurden n-Hexan und Petrolether (40-60) als Extraktionsmittel getestet. Die Flüssig-flüssig-Extraktion ergibt keine besseren Wiederfindungsraten als die Festphasenextraktion (Kap. 9.2.1). Die Wiederfindungsraten bei der Flüssig-flüssig-Extraktion mit n-Hexan und Petrolether (Siedebereich 40 – 60 °C) sind für alle Verbindungen relativ gering. Im mittleren Bereich des Lipophiliefensters liegt die maximale Wiederfindung bei ca. 50 %. Verbindungen mit kleineren log P_{OW} -Werten und hochlipophile Stoffe zeigen noch geringere Wiederfindungsraten.

Ein wesentlicher Nachteil der Flüssig-flüssig-Extraktion von realen Abwasserproben ist auch die Bildung von Emulsionen, die aus der Anwesenheit von Tensiden und anderen oberflächenaktiven Stoffen in Abwasserproben resultiert. Bei den durchgeführten Versuchen mit Abwässern aus Kläranlagenabläufen trat dieses Problem stets auf. Nur durch die Zugabe großer Mengen Salz (bis zu 50 g/l $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$) und Ansäuern mit Salzsäure auf pH 2 wurde eine ausreichende Phasentrennung zwischen wässriger und organischer Phase erzielt. Jedoch kann die Zugabe von Salzen zu Problemen bei den weiteren analytischen Schritten (Trennung, Detektion) führen, da diese in geringem Maße auch in manchen organischen Lösungsmitteln löslich sind. Zudem lässt sich die Extraktionsausbeute von partikelgebundenen PBS nicht ohne Weiteres bestimmen.

6.5.2 Festphasenextraktion

Die *Festphasenextraktion* (engl.: Solid Phase Extraction, SPE) eignet sich durch ihre Variationsbreite (große Vielfalt an Sorbensmaterialien, z. B. Polymere, Kieselgel bzw. kieselgelgebundene Phasen; viele Elutionsmittel einsetzbar) und Flexibilität (z. B. Verwendung von Schicht- und Mischphasen) besonders gut zur Probenaufbereitung von organischen Verbindungen verschiedener Polarität. Zur Anreicherung hydrophober Analyten aus der Matrix Wasser werden meist Umkehrphasen als Adsorbensmaterialien

eingesetzt. Eine Trennung von Analyten steigender Lipophilie kann durch fraktionierte Elution mit mehreren Lösungsmitteln sinkender Polarität erfolgen. Im Vergleich zur Flüssig-flüssig-Extraktion ist die Festphasenextraktion bequemer zu handhaben (z. B. Parallelextraktionen mittels Vakuumkammer). Zudem ist der Lösungsmittelverbrauch deutlich geringer.

Bei dem zu entwickelnden Anreicherungsverfahren traten zwei Hauptprobleme auf:

- a) Bei der summarischen Quantifizierung (Massenbestimmung) eines Substanzgemisches ohne Einzelstoffanalytik („non-target-Analytik“) kann nicht über einen internen Standard kalibriert werden. Somit tritt ein Bestimmungsfehler auf, wenn die Wiederfindungsraten für Einzelverbindungen $< 100\%$ sind. Ziel war es deshalb, die Festphasenextraktion soweit zu optimieren, dass möglichst hohe Wiederfindungsraten **aller** Testverbindungen bei der Anreicherung erhalten werden.
- b) Die zu erfassenden Verbindungen liegen innerhalb eines sehr breiten Lipophiliefensters (die $\log P_{OW}$ -Werte variieren um bis zu 5 Zehnerpotenzen). Zusätzlich haben sie zum Teil sehr unterschiedliche physikalische und chemische Eigenschaften (z.B. Säure- und Basenkonstanten). Während hochlipophile Stoffe auf den RP-Materialien sehr stark zurückgehalten werden, sind die Wechselwirkungen zwischen der Festphase und Verbindungen mit kleinerem $\log P_{OW}$ -Wert erheblich geringer. Es ist deshalb quasi unmöglich, Verbindungen mit solch unterschiedlichen Eigenschaften in gleichem Maße anzureichern und zu eluieren (z. B. Verbindungen, die bei gegebenem pH-Wert ionisch vorliegen bzw. flüchtige Verbindungen). Der Optimierung der Festphasenextraktion kommt somit grundlegende Bedeutung für das Verfahren zu. Die Optimierung kann durch Variation des Festphasenmaterials und des Elutionsmittels erreicht werden.

Auswahl der Festphasenmaterialien

Es wurden ca. 20 verschiedene Festphasenmaterialien von zwei Herstellern (ict, Bad Homburg; Mallinckrodt Baker, Griesheim) und daraus hergestellte Schichtphasen mit 7 Elutionsmitteln kombiniert. Zum Einsatz kamen C2-, C4-, C6-, C8-, C18-, Amino-propyl- und Styroldivinylbenzol-Phasen. Von den RP-Phasen wurden sowohl die „end-capped“- (EC) und die „nicht-endcapped“-Versionen getestet. Die endcapped-RP-

Phasen haben bei diesem Anreicherungsproblem den Vorteil, dass sie eine verringerte Wechselwirkung mit funktionellen Gruppen zeigen und somit unspezifischer sind. Es wurden folgende Schichtphasen eingesetzt: C2/C8, C2/C18, C4/C8, C4/C18, C8/C18, C18/Styroldivinylbenzol. Zur fraktionierten Elution wurde Methanol, Acetonitril und Tetrahydrofuran als Lösungsmittel getestet. Erfahrungsgemäß lassen sich damit die Wiederfindungsraten von Verbindungen, die in einen bestimmten Lipophiliebereich fallen, erhöhen⁷⁵. Die Standardverbindungen, die für die Optimierung der Extraktionsmethode ausgewählt wurden, sollten den gesamten Lipophiliebereich abdecken und gut detektierbar sein (Verbindungen in Tab. 3, die mit Asterisken (*) markiert sind). Es sind auch Verbindungen enthalten, die eine saure bzw. basische funktionelle Gruppe besitzen.

Zwar gibt es keine Festphase, auf der **alle** Testverbindungen in gleicher Weise nahezu **quantitativ** angereichert werden können, endcapped-C18 bzw. endcapped-C8-Materialien erwiesen sich aber für die PBS-Extraktion am geeignetsten. Durch die geeignete Wahl einer Lösungsmittelkombination zur Elution wurde die Festphasenextraktion weiter optimiert. Die fraktionierte Elution mit Methanol und Tetrahydrofuran lieferte vergleichbare Wiederfindungen für alle eingesetzten Standardverbindungen über den ganzen log P_{OW} -Bereich. Dieses Festphasen/Lösungsmittelsystem führt zu gut reproduzierbaren Ergebnissen und zu Wiederfindungsraten im Bereich von 60 - 100 % (Abb. 9).

Verbindungen, die im Neutralbereich weitgehend ionisiert vorliegen, werden auf der RP-Phase sowohl bei der Extraktion als auch bei der HPLC-Trennung (Kap. 9.7, Abb. 41) nicht zurückgehalten. Dies führt zu verringerten Wiederfindungsraten. Pentachlorphenol beispielsweise wurde bei diesem Versuch nicht wiedergefunden. Bei anderen Untersuchungen zur Bestimmung der Wiederfindungsraten lagen diese zwischen null und maximal vierzig Prozent.

Verluste an Standardverbindungen können nicht nur von einer unzureichenden Retention bzw. irreversiblen Sorption an das Festphasenmaterial herrühren. Es ist durchaus wahrscheinlich, dass schon bei der Probenvorbereitung Effekte auftreten, die zu verringerten Wiederfindungen der Analyten führen. Beispiele hierfür sind Glaswandeffekte und unzureichende Löslichkeiten der Standardverbindungen.

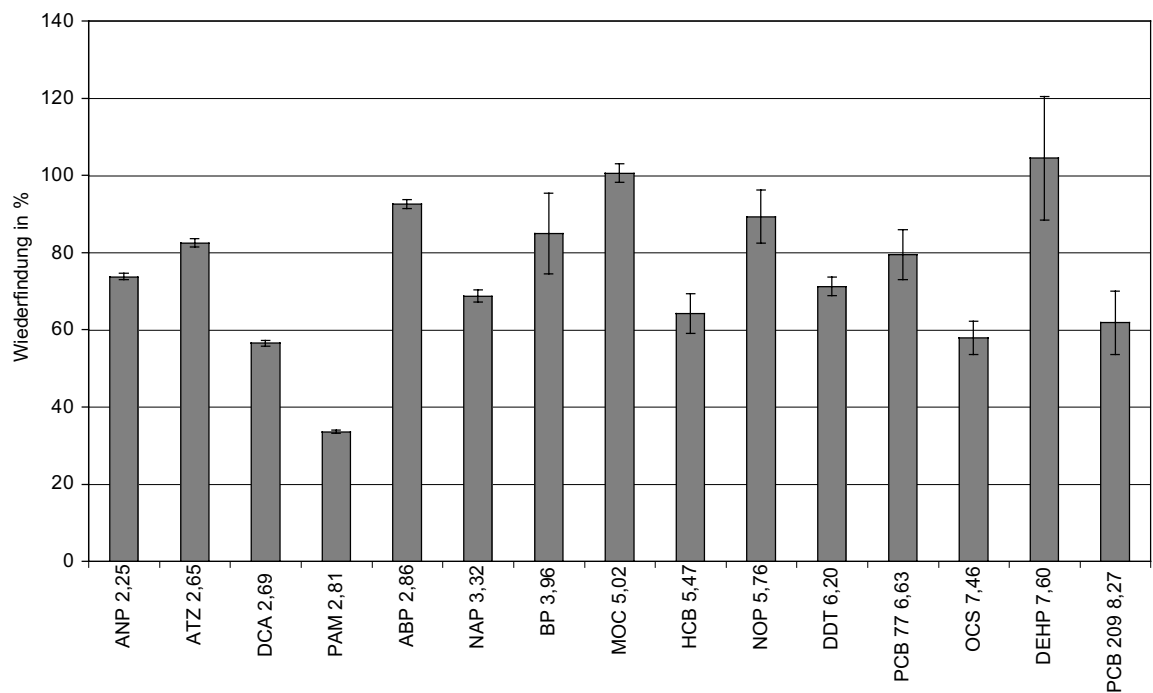


Abb. 9: Wiederfindungsraten nach Anreicherung auf C18 (EC) und fraktionierte Elution mit Methanol und Tetrahydrofuran

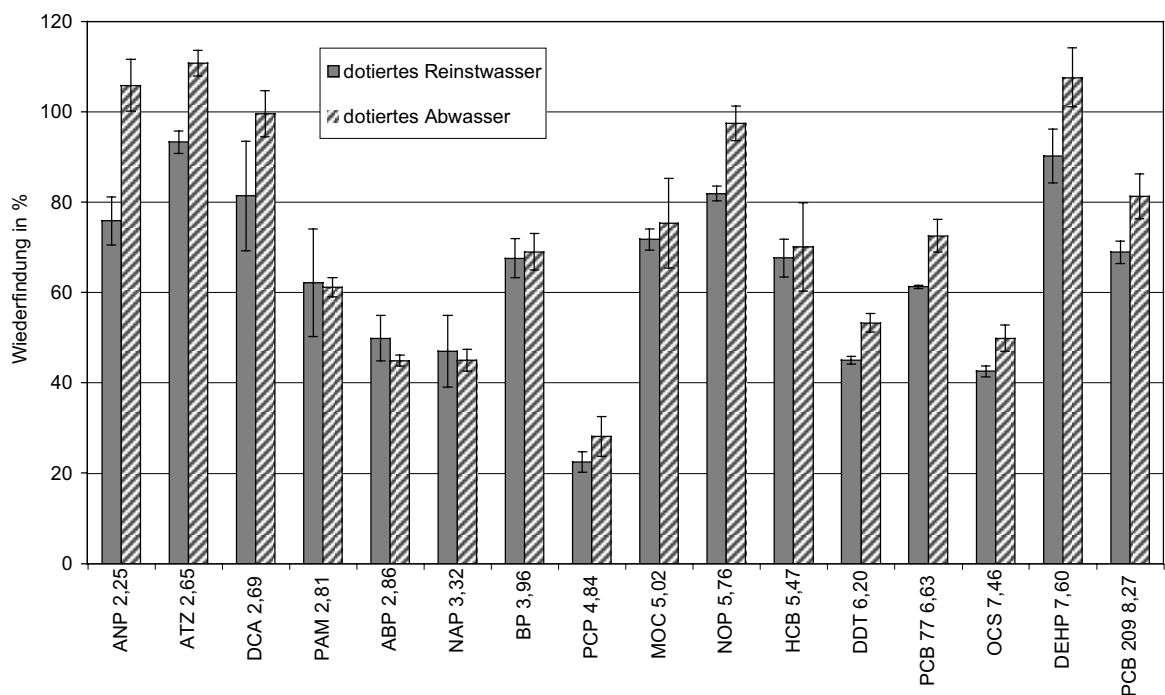


Abb. 10: Vergleich zwischen einer dotierten Reinstwasserprobe und einer dotierten Abwasserprobe (n=3)

Ein Hinweis auf solche Effekte wurde bei einer Versuchsreihe erhalten, bei der vergleichend eine Reinstwasserprobe und eine Abwasserprobe (Abb. 10) mit gleichen Konzentrationen an Standardverbindungen dotiert wurden. Bei der dotierten Abwasserprobe traten höhere Wiederfindungen auf als bei der dotierten Reinstwasserprobe. Eine Ursache hierfür kann im Vorhandensein von biogenen Wasserinhaltsstoffen oder Salzen liegen, die aufgrund ihrer Struktur und ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften als Lösungsvermittler fungieren und so die Extraktionseffizienz erhöhen.

Um die Kapazität des eingesetzten Festphasensäulchens (1 000 mg Sorbensmaterial) zu ermitteln, wurden 5 Reinstwasserproben mit Konzentration von 25, 50, 75, 100 und 125 µg/l pro Einzelsubstanz analysiert.

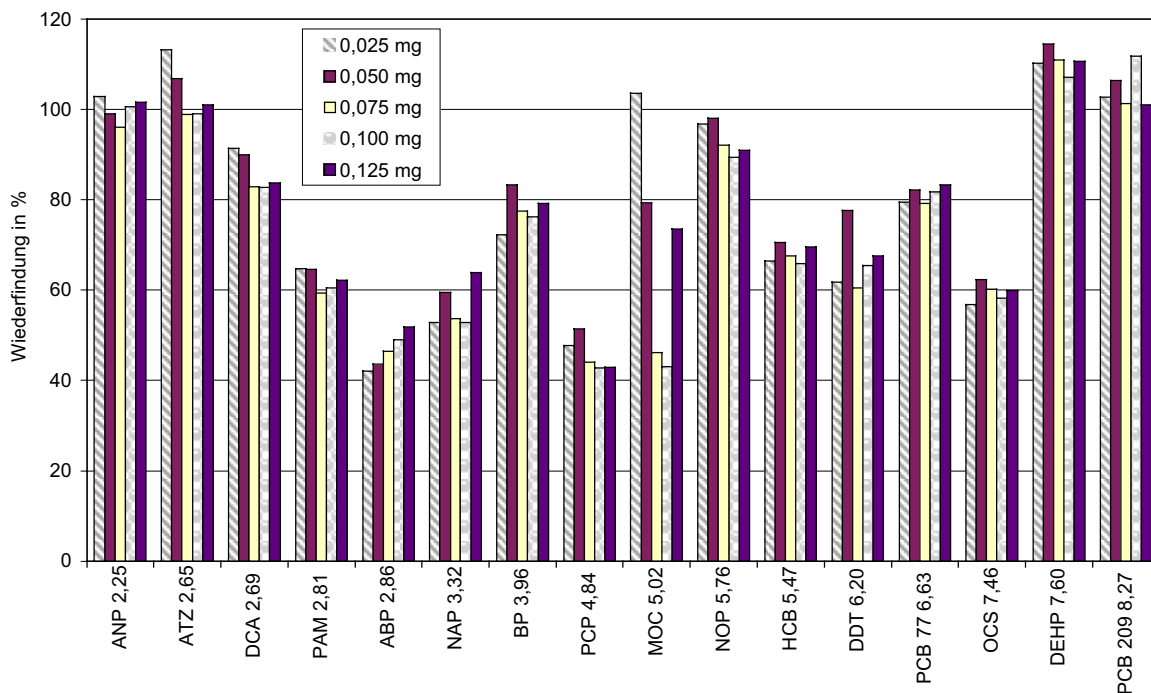


Abb. 11: Konzentrationsreihe zur Bewertung der Kapazität des Festphasenmaterials, fraktionierte Elution mit MeOH und THF

Die Wiederfindungen in allen Konzentrationsbereichen waren vergleichbar, so dass davon ausgegangen werden kann, dass bei realen Abwasserproben die Kapazität der verwendeten Festphasensäule bei umweltrelevanten Konzentrationen nicht überschritten wird.

Da bei diesem Verfahren kein interner Standard verwendet werden kann, ist es wichtig, dass Festphasen verschiedener Hersteller bzgl. ihres Anreicherungsverhaltens verglichen werden. Ein solcher Vergleich zwischen den C18-Materialien der Firma ict und Mallinckrodt Baker zeigte (Abb. 12), dass die Wiederfindungen zwar für die einzelnen Verbindungen variierten, bei diesen Festphasen im allgemeinen aber ähnliche Wiederfindungsraten erhalten wurden.

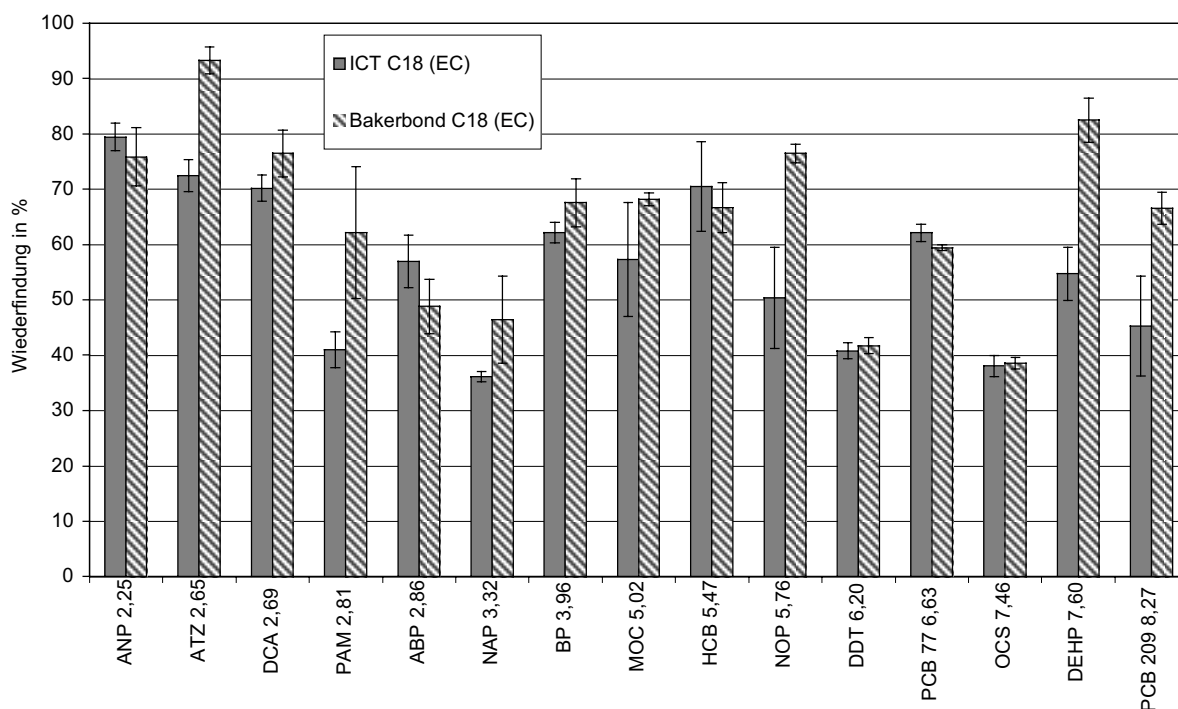


Abb. 12: Vergleich der Festphasen verschiedener Hersteller (n = 3)

Aufgrund der Ergebnisse der Extraktionsversuche wurde für das Verfahren bei der SPE C18 (EC)-Festphasenmaterial mit fraktionierter Elution mit MeOH und THF eingesetzt. Die Wiederfindungsrate über das Gesamtverfahren einer Standardmischung aus 10 schwerflüchtigen Verbindungen (Einwaage 1 mg) betrug $51 \pm 12 \%$ (95 %, n = 10^{*}).

* 10 Parallelbestimmungen, 95 % Vertrauensbereich

6.5.3 Soxhlet-Extraktion der abfiltrierbaren Stoffe

Das Verfahren, bei dem die vorherige Abtrennung der Schwebstoffe über Glasfaserfiltration erfolgt, hat den Vorteil, dass die Filter anschließend mittels einer Soxhlet-Apparatur extrahiert werden können. Diese Extraktion mit heißem Lösungsmittel führt gegenüber der Schüttelmethode mit kaltem Lösungsmittel erfahrungsgemäß zu erheblich höheren Extraktionsausbeuten. Ein weiterer Vorteil dieses Vorgehens ist, dass die gelösten und die feststoffgebundenen potenziell bioakkumulierbaren Stoffe getrennt betrachtet werden können. Damit lassen sich evtl. Tendenzen über die Bioverfügbarkeit der Substanzen abschätzen. Die absolute Extraktionseffizienz von feststoffgebundenen PBS lässt sich jedoch nicht ermitteln.

6.6 Trennung und Definition des Lipophiliefensters

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie an Umkehrphasen wird seit den 80er Jahren zur Bestimmung von Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten unpolarer Stoffe verwendet⁷⁶. Die Probensubstanzen werden von der Oberfläche des unpolaren RP-Materials in der Säule umso stärker retardiert, je lipophiler sie sind. Die Eluentzusammensetzung ist immer ein Kompromiss zwischen Schnelligkeit der Elution und Selektivität des Eluenten. Der Eluent Methanol/Wasser zeigt gegenüber dem Eluent Acetonitril/Wasser eine erhöhte Viskosität, was zu einem erhöhten Pumpendruck führt. Wird der Fluss bei einem Gradientenlauf konstant gehalten, steigt der Druck in erheblichen Maße an. Beim Einsatz einer stationären Phase mit kleiner Korngröße ($\leq 3 \mu\text{m}$) kann so schnell der Maximaldruck der HPLC-Anlage überschritten werden.

Aus diesem Grund wurde der Eluent Acetonitril-Wasser/Ammoniumacetat (5 mmol/l) verwendet. Die Verwendung von Ammoniumacetat ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$) anstatt reinen Wassers zeichnet sich durch eine bessere Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten der Analyten und einem verminderten Tailing der Signale aus, da durch die Erhöhung der Ionenstärke die polaren Wechselwirkungen zwischen freien Silanolgruppen und den Analyten abgeschwächt werden.

Um zu überprüfen, ob der prinzipiell flüchtige Puffer Ammoniumacetat beim Trocknungsschritt vollständig entfernt wird, wurden fünf Aliquote eines Extrakts einer Abwasserprobe über eine semipräparative RP-HPLC-Säule aufgetrennt, die mit unterschiedlichen Ammoniumacetatkonzentrationen (0, 5, 10, 15, 20, 25, 50 mmol/l) im Eluenten sukzessive aufgestockt wurden. Erst bei Verwendung eines Ammoniumacetatpuffers der Konzentration 25 mmol/l (entspricht einer absoluten Masse an 29 mg $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ in der PBS-Fraktion) konnte die Ammoniumacetatmenge durch den Trocknungsschritt nicht mehr vollständig entfernt werden (Abb. 13).

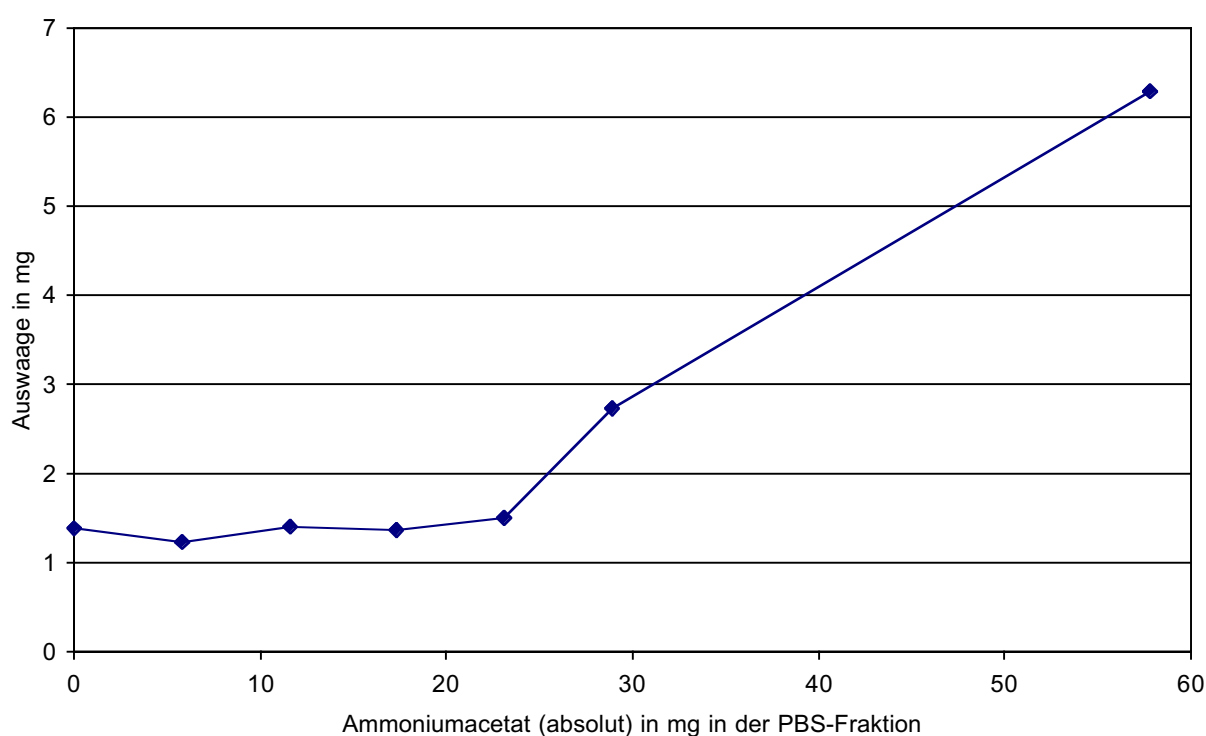


Abb. 13: Einfluss von Ammoniumacetat im HPLC-Eluenten auf die PBS-Bestimmung

Wegen des großen Lipophiliefensters, das bei der HPLC-Trennung abgedeckt werden muss, ist eine isokratische Elution für dieses Verfahren nicht geeignet. Aus diesem Grund wurde zur Verkürzung der Analysenzeiten einerseits die Säulenlänge reduziert und andererseits ein Lösungsmittelstufengradient entwickelt und optimiert (Kap. 7.1), mit dem Ergebnis, dass hochlipophile Verbindungen deutlich schneller eluieren. Um die Trennleistung durch die Verkürzung der HPLC-Säule nicht entscheidend zu verschlechtern, wurde feinkörniges Trägermaterial (3 μm) eingesetzt.

Durch Verwendung der kurzen Trennsäule (Länge: 53 mm, Vorsäule: 33 mm) und des optimierten Lösungsmittelgradienten wurde eine Reduktion der reinen Analysenzeit (ohne Waschschrift mit THF) von ca. 70 % im Vergleich zu den Zeiten der anfänglich eingesetzten HPLC-Säule (Länge: 250 mm) erreicht.

Es zeigte sich, dass die Verbindungen in der Regel wie erwartet entsprechend ihres log P_{OW}-Werts auf der RP-Phase retardiert werden (Tab. 5). Geringe Abweichungen sind plausibel, wenn man bedenkt, dass die in der Literatur angegebenen log P_{OW}-Werte von organischen Verbindungen zum Teil erheblich differieren. Legt man ein Lipophiliefenster für die Fraktion der potenziell bioakkumulierbaren Stoffe durch zwei Markerverbindungen fest, so ist auch hier zu beachten, dass deren log P_{OW}-Werte in der Literatur differieren können.

Tab. 5: Retentionszeiten der eingesetzten Standardverbindungen

Substanz	Abkürzung	log Pow	Retentionszeit in min (1)	Retentionszeit in min (2)
4-Nitrophenol	NIP	2,18	2,48	-
1-Aminonaphthalin	ANP	2,25	5,19	4,89
Atrazin	ATZ	2,65	5,04	4,67
2,3-Dichloranilin	DCA	2,69	6,75	6,40
Parathion-methyl	PAM	2,81	8,12	7,98
4-Aminobiphenyl	ABP	2,86	6,79	6,51
Naphthalin	NAP	3,32	8,68	8,54
Biphenyl	BP	3,96	9,44	9,35
Pentachlorphenol	PCP	4,84	3,88	-
Methoxychlor	MOC	5,02	10,04	10,01
Hexachlorbenzol	HCB	5,47	11,83	11,84
4-n-Nonylphenol	NOP	5,76	11,26	11,20
p,p'-DDT	DDT	6,20	11,24	11,26
3,3',4,4'-Tetrachlorbenzol	PCB 77	6,63	11,77	11,75
Octachlorstyrol	OCS	7,46	12,57	12,67
Diethylhexylphthalat	DEHP	7,60	12,94	13,07
Decachlorbiphenyl	PCB 209	8,27	15,16	15,43

(1) Messung am 13.05.98

(2) Messung am 20.01.99

Da eine massenproportionale Detektion aller potenziell bioakkumulierbaren Stoffe mit keinem der getesteten Detektoren möglich war (siehe Kap. 6.7), war eine direkte Quantifizierung der PBS über die erhaltenen HPLC-Daten (UV-Detektion) nicht möglich. Es musste ein „Upscaling“ auf einen semipräparativen Maßstab durchgeführt werden. Als Markerverbindungen wurde 2-Acetylnaphthalin (Marker 1, $\log P_{OW} = 2,85$) bzw. Brombenzol ($\log P_{OW} = 2,99$) und Decachlorbiphenyl (Marker 2, $\log P_{OW} = 8,27$) eingesetzt. Ein Vorteil dieser Vorgehensweise ist die Flexibilität bei der Definition des Lipophiliefensters durch die Auswahl geeigneter Markerverbindungen. Das Lipophiliefenster, das durch die beiden Markerverbindungen festgelegt wird, wird vor der eigentlichen Messung der Abwasserprobe in einem gesonderten Analysenlauf bestimmt. Durch die Fraktionierung werden die PBS von Verbindungen abgetrennt, die weniger lipophil sind bzw. eine größere Lipophilie aufweisen (Abb. 14). Fulvin- und Huminsäuren als biogene, relativ hydrophile Verbindungen werden so ebenfalls von den PBS abgetrennt.

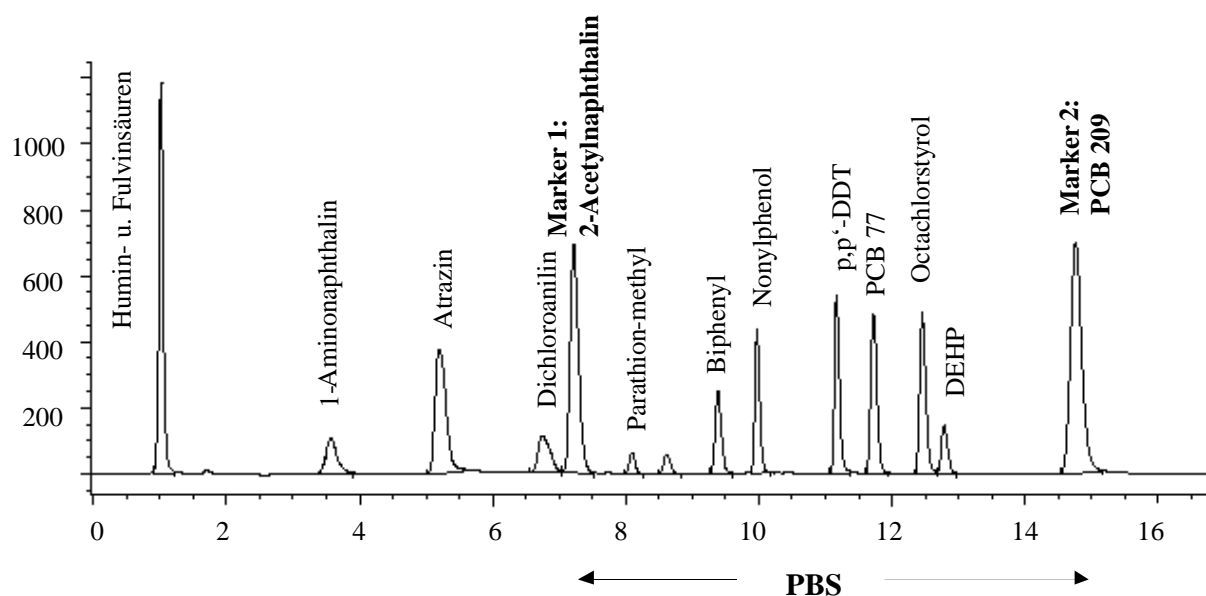


Abb. 14: HPLC-UV-Chromatogramm (235 nm, analytische HPLC) einer dotierten Reinstwasserprobe mit einem Huminstoffstandard*, den Standard- und Markerverbindungen

* IHSS Suwannee River Humic and Fulvic Acid Standard

Da mit präparativen HPLC-Säulen (Säulendurchmesser > 4 mm) im Vergleich zu analytischen HPLC-Säulen immer eine Bandenverbreiterung der Signalpeaks auftritt, wurde als Fraktionierungsgrenzen die Retentionszeiten bei Beginn des Messsignals von Marker 1 bzw. bei Ende von Marker 2 festgelegt. Das Eluat innerhalb dieses Lipophiliefensters wird als PBS-Fraktion aufgefangen und bis zur gravimetrischen Bestimmung weiterverarbeitet.

In der Regel ist der Anteil an weniger lipophilen Wasserinhaltsstoffen erheblich größer als der an potenziell bioakkumulierbaren Stoffen (Abb. 16, Abb. 18). Während in dem UV-Chromatogramm ($\lambda = 235 \text{ nm}$) einer Abwasserprobe aus der chemisch-pharmazeutischen Industrie in der Fraktion mit $\log P_{\text{OW}} < 3$ ein ganzer „Signal-Berg“ auftritt, treten innerhalb des PBS-Fensters nur drei Signalpeaks auf.

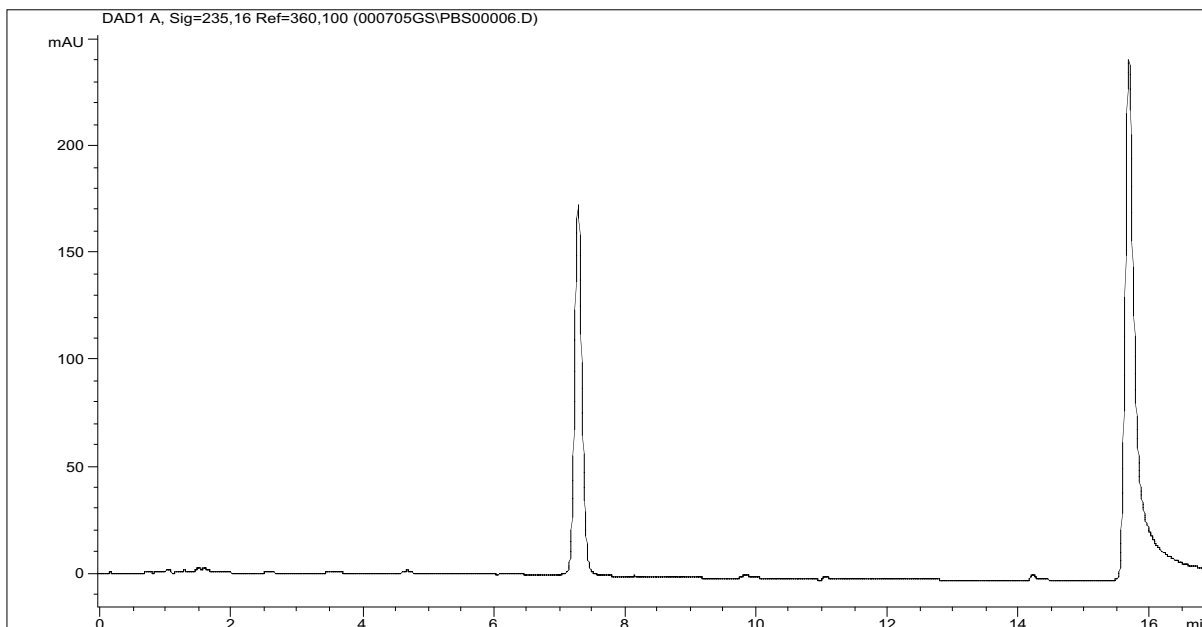


Abb. 15: HPLC-UV-Chromatogramm ($\lambda = 235 \text{ nm}$) der Markerverbindungen 2-Acetylnaphthalin und Decachlorbiphenyl

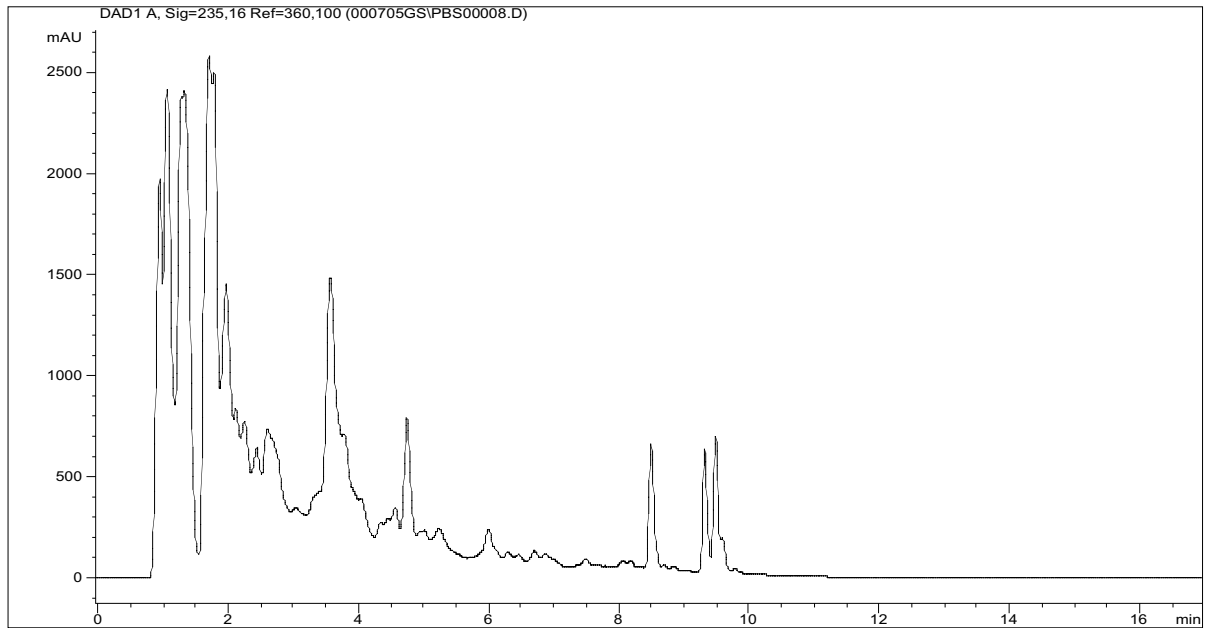


Abb. 16: HPLC-UV-Chromatogramm ($\lambda = 235 \text{ nm}$) eines Extrakts einer industriellen (chemisch-pharmazeutische Industrie) Abwasserprobe (Ablauf) vor der Trennung mittels semipräparativer HPLC

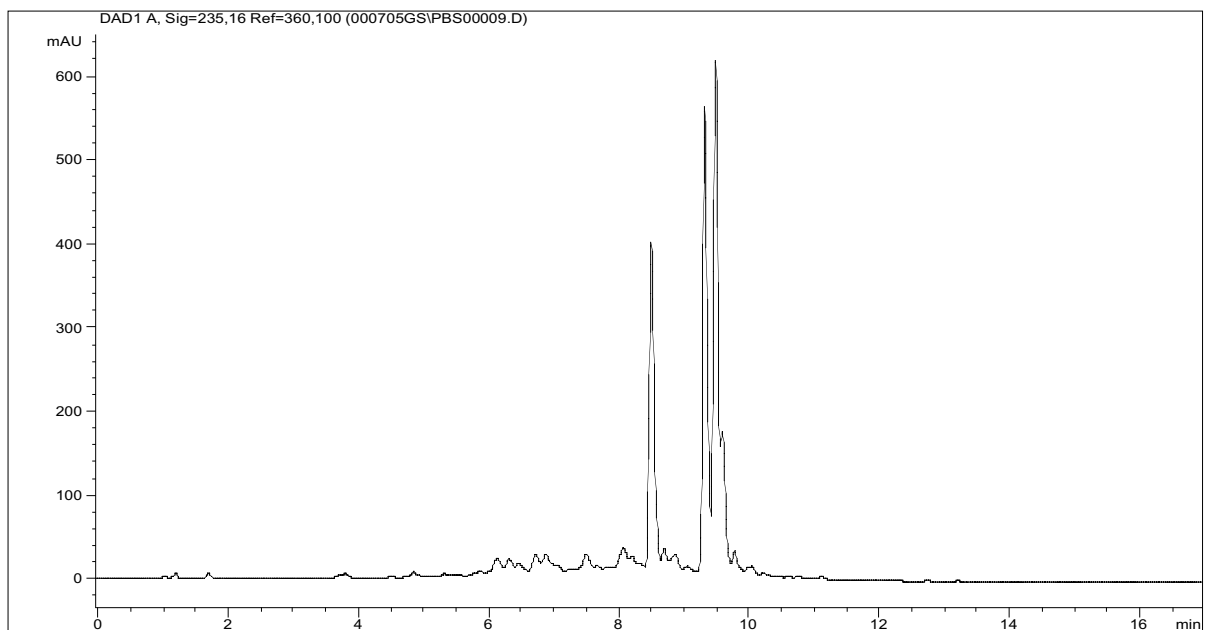


Abb. 17: HPLC-UV-Chromatogramm ($\lambda = 235 \text{ nm}$) eines Extrakts einer industriellen (chemisch-pharmazeutische Industrie) Abwasserprobe (Ablauf) nach der Trennung mittels semipräparativer HPLC

Oftmals deuten die HPLC-UV-Chromatogramme darauf hin, dass sich nur geringe Konzentrationen an potenziell bioakkumulierbaren Stoffen im Abwasser befinden. So treten beim UV-Chromatogramm ($\lambda = 235 \text{ nm}$) einer Abwasserprobe des Kläranlagenablaufs Stuttgart-Büsnau im PBS-Fenster gar keine Signale auf.

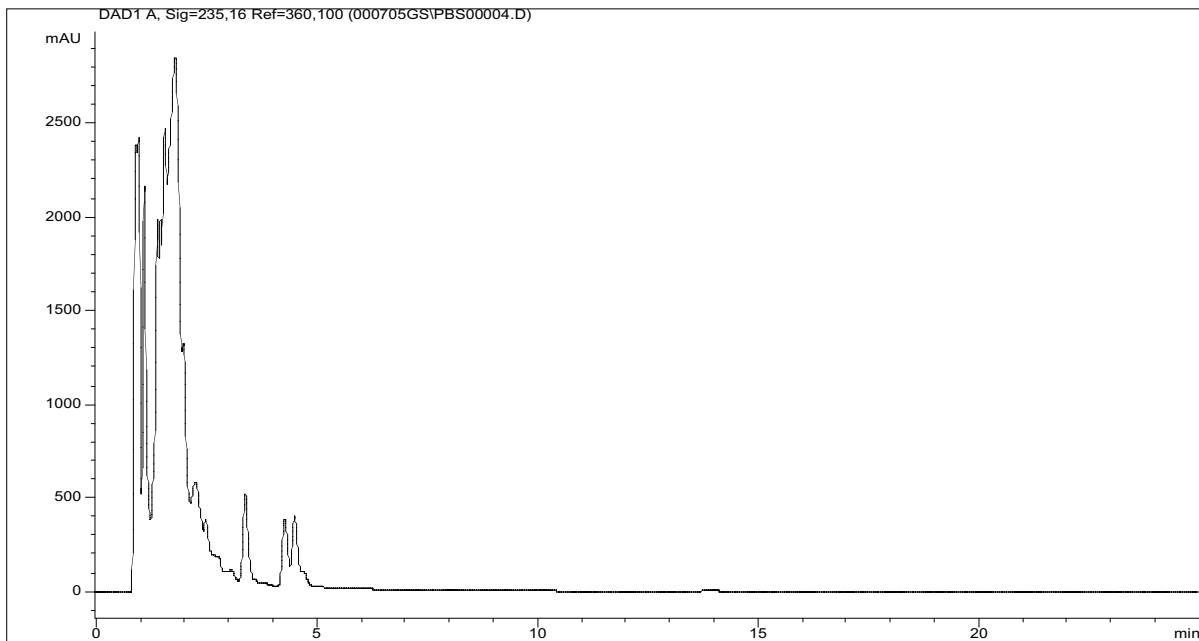


Abb. 18: HPLC-UV-Chromatogramm ($\lambda = 235 \text{ nm}$) eines Extrakts einer Abwasserprobe der kommunalen Kläranlage Stuttgart-Büsnau vor der Separation mittels semipräparativer HPLC

Aus diesem Grund ist es notwendig, eine möglichst große Probenmenge über die semipräparative HPLC zu fraktionieren, um auswägbare Massen an PBS zu erhalten. Dabei treten einige Effekte auf, die diesem Ziel entgegenwirken. Bei der Injektion großer Volumina in die HPLC kommt es zu erheblichen Bandenverbreiterungen, die die Fraktionierung erschweren. Engt man den Extrakt vorher stark ein, um das Volumen zu reduzieren, können Feststoffe ausfallen, vor allem wenn ein Lösungsmittelgradient mit hohen Anteilen Wasser eingesetzt wird. Das Injektionsvolumen eines Extrakts von 1 l Abwasserprobe sollte zwischen 1,5 und 2 ml liegen, um noch mit einer üblichen analytischen HPLC-Anlage arbeiten zu können (bis 10 ml/min).

6.7 Detektion

Um die gesamte Stoffmenge an bioakkumulierbaren Verbindungen in der Probe erfassen zu können, ist ein Detektionsverfahren notwendig, das eine lineare Abhängigkeit zwischen der Stoffmengenkonzentration (als Summe über alle in der Probe vorhandenen Einzelstoffe) und der Messgröße zeigt.

Ein idealer Detektor zur Quantifizierung der PBS, d. h. der Summe der Massen bzw. Konzentrationen oder Stoffmengen, sollte verschiedene Voraussetzungen erfüllen. Der Detektor sollte für alle denkbaren Stoffgruppen einsetzbar sein, damit alle Analyten im Lipophiliefenster quantifiziert werden können. Der Arbeitsbereich des Detektors sollte an das Messproblem angepasst sein; optimalerweise sollte er im Bereich umweltrelevanter Konzentrationen linear arbeiten. Die Empfindlichkeit des Detektors sollte für alle Analyten gleich sein und die Detektorsignale der einzelnen Verbindungen sollten sich additiv verhalten. Damit wären theoretisch alle Detektionsverfahren anwendbar, deren Messprinzip auf den kolligativen Eigenschaften der Materie (Dampfdruckosmometrie, Gefrierpunktserniedrigung, Siedepunktserhöhung) beruhen. Jedoch sind alle diese Verfahren aufgrund ihrer hohen Nachweisgrenzen für die Abwasseranalytik in der Praxis nicht einsetzbar.

Folgende Verfahren wurden trotz ihrer bzgl. des Messproblems nicht idealen Eigenschaften für die Kontrollanalytik eingesetzt: HPLC-DAD, HPLC-MS, GC-FID, GC-ECD. Neben diesen Verfahren wurde auch der Verdampfungslichtstreuendetektor auf seine Eignung als stoffmengenproportionaler Detektor hin getestet. Es zeigte sich, dass keiner der eingesetzten Detektoren für die PBS-Bestimmung geeignet ist (Kap. 9.4).

6.7.1 Gravimetrie

Eine direkte Massenbestimmung der PBS kann gravimetrisch erfolgen. Um PBS in einer wägbaren Menge zu erhalten, wurde ein „Upscaling“ des Verfahrens auf (semi-)präparative Maßstäbe durchgeführt. Da die Analysenprobe bei der Messung nicht zerstört wird, kann anschließend auch der Gehalt an organisch gebundenem Kohlenstoff mittels Feststoff-TOC bestimmt werden.

Zur Massenbestimmung wird eine Semimikrowaage (Ablesbarkeit 10 µg) eingesetzt, da Schätzungen zufolge der PBS-Gehalt in Abwässern von Kläranlagenabläufen im Mikro- bis Milligramm-Bereich liegen sollte (TOC-Gehalt von kommunalem Abwasser nach biologischer Klärung durchschnittlich ca. 15 mg/l). Ausgehend von dieser Prüfanforderung sollte bei einer Toleranz von 10 % und einer Auswaage von 1 mg die Messunsicherheit 10 µg nicht überschreiten.

Bei der gravimetrischen Bestimmung der PBS wird dem Bestreben Rechnung getragen, dass Gehalte von Wasserinhaltsstoffen nach DIN 38 402 als Massenkonzentrationen (Einheit mg/l) angegeben werden sollten, wobei vor allem Praktikabilitätskriterien in der Vollzugspraxis für diese Angabe des Analyseergebnisses sprechen. Die entscheidende Limitierung der gravimetrischen PBS-Bestimmung besteht darin, dass flüchtige Verbindungen bzw. Substanzen mit einem hohen Dampfdruck mit dem Verfahren nicht erfasst werden können. So gehen beispielsweise Brombenzol und Naphthalin bei der Trocknung vollständig verloren. Die Verfahrenskenndaten wurden mithilfe eines Mischstandard aus zehn schwerflüchtigen Verbindungen (γ -HCH, Biphenyl, Pyren, Anthracen, BaP, PCB 15, HCB, p,p'-DDT, PCB 77, und DEHP, siehe Tab. 3, Konzentration $c = 100$ mg/l pro Einzelsubstanz) ermittelt.

Um Verluste, die bei der Trocknung im Exsikkator auftreten, zu bestimmen, wurden in drei Versuchsreihen (0,5 mg, 1,0 mg und 10 mg) die Mischstandardlösungen getrocknet und die Wiederfindungen bestimmt. Bei der Einwaage von 0,5 mg wurden $86,0 \pm 14,6$ %* (n = 6), bei 1,0 mg wurden $90,0 \pm 3,0$ % (n = 6) und bei der Einwaage von 10 mg wurden $91,9 \pm 0,4$ % (n = 6) wiedergefunden. Es ist ersichtlich, dass die Messunsicherheit umso größer ist, je geringer die Auswaage an PBS ist. Bei Auswaagen von 200 µg des Mischstandards liegt die Messunsicherheit der Wägung dann schließlich in der Größenordnung des Messwerts.

* 95 % Vertrauensbereich

6.7.2 Feststoff-TOC

Nach Entfernung des Lösungsmittels der PBS-Fraktion und der gravimetrischen Bestimmung der PBS kann der Anteil an organischem Kohlenstoff der verbleibenden Trockensubstanz deren C-Gehalt ermittelt werden.

Dies geschieht mithilfe eines Feststoff-TOC-Geräts, bei dem ein entsprechendes Verbrennungsmodul (Arbeitstemperatur ca. 1250 °C) mit einem ND-Infrarotdetektor (nichtdispersive Infrarotabsorption) zur CO₂-Bestimmung und einer nachgeschalteten Coulometerzelle gekoppelt wird. Zur Verbrennung wird Sauerstoff vorgelegt. Der Sauerstoff wirkt gleichzeitig als Oxidationsmittel, als Trägergas für das Verbrennungsprodukt und als Sperrgas gegen Kontaminationen aus der Umgebungsluft. Nach der Kalibrierung mittels eines zertifizierten Referenzmaterials wird der C-Gehalt als Funktion des Flächenintegrals des Messsignals ermittelt. Als Kalibriersubstanz wurde ein Seesediment (C-Gehalt 4,5 %) eingesetzt. Der C-Gehalt des Sediments wurde mit Calciumcarbonat (theoret. C-Gehalt 12,0 %) verifiziert. Die Angabe des Messergebnisses erfolgt als Massengehalt an Kohlenstoff (% C).

Bei Einwaagen von unter 10 mg CaCO₃ wurde ein arithmetischer Mittelwert von $12,5 \pm 1,3$ % C (95 %, n = 6^{*}) erhalten (Abb. 19). Bei Einwaagen im Bereich bis ca. 250 mg CaCO₃ verbesserte sich die Messgenauigkeit auf $12,2 \pm 0,9$ % C (95 %, n = 22). Um die Geräteempfindlichkeit des Feststoff-TOC für organische Verbindungen zu ermitteln, wurde 2-Acetylnaphthalin (theoret. Kohlenstoffgehalt 84,7 %) verwendet. Bei Einwaagen zwischen 0,2 und 1,0 mg wurde ein C-Gehalt von $74,5 \pm 9,0$ % C (95 %, n = 9) gefunden. Bei Einwaagen zwischen 1,0 und 20 mg lag der C-Gehalt bei $71,6 \pm 3,4$ % C (95 %, n = 11). Die Streuung bei kleinen Einwaagen im Mikrogrammbereich ist damit deutlich größer als bei Probenmengen im Milligrammbereich. Die Messunsicherheit ist deutlich größer als beim Calciumcarbonat. Zudem lagen die Messwerte deutlich unter dem theoretischen Wert von 84,7 %.

* Angegeben ist die zweifache Standardabweichung aus sechs Parallelbestimmungen

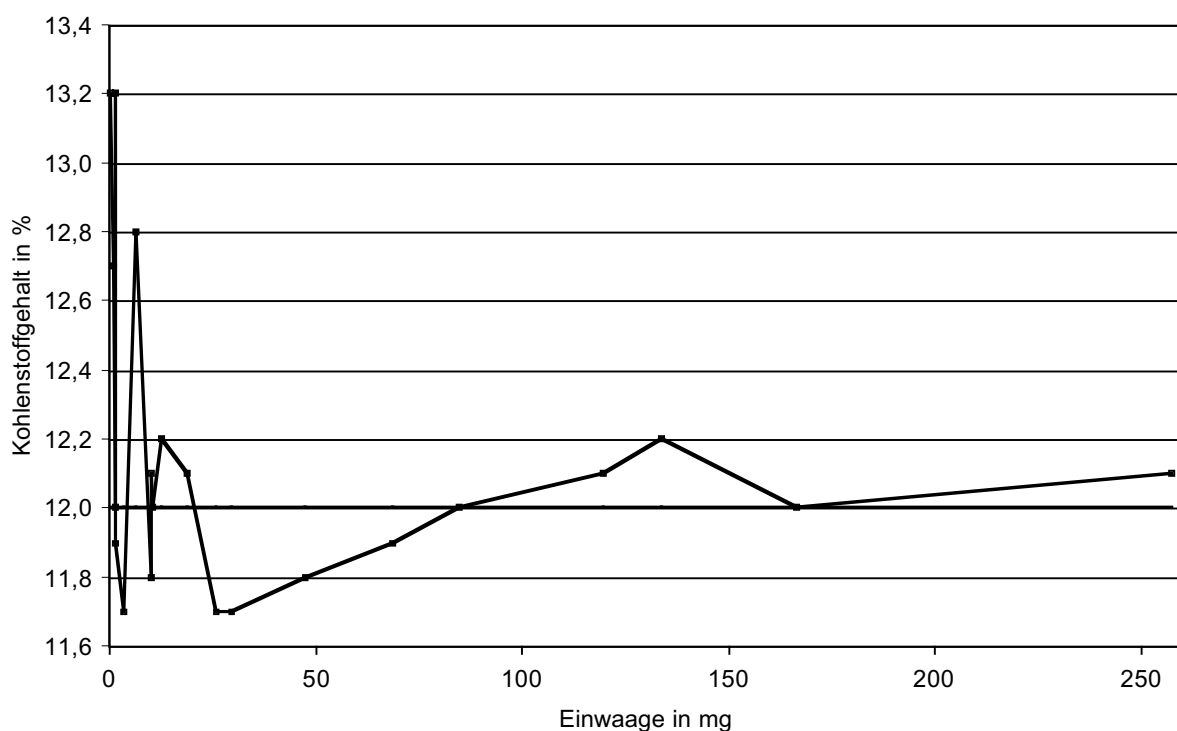


Abb. 19: TOC-Bestimmung der Standardverbindung CaCO_3

Dies kann einerseits an Verunreinigungen der Testverbindung und/oder an einer nicht optimalen und daher unvollständigen Verbrennung der Substanz liegen. Des öfteren wurden bei PBS-Proben von Abwässern ungleichmäßige Verbrennungen beobachtet, manchmal traten sogar kleine Verpuffungen auf. Diese Unregelmäßigkeiten wurden dann in jedem Fall im Analysenbericht vermerkt.

6.8 Anwendung des Verfahrens für reale Abwasserproben

6.8.1 Mit Standardverbindungen dotierte Abwasserproben

Die mit dotierten Reinstwasserproben erarbeitete Methode wurde auf Abwasserproben aus Kläranlagenabläufen übertragen. Hierzu wurde Abwasser aus dem Kläranlagenablauf des Lehr- und Forschungsklärwerts Stuttgart-Büsnau (überwiegend kommunales Abwasser) mit 15 Standardverbindungen ($25 \mu\text{g}$ pro Einzelverbindung) dotiert und nach der üblichen Methode untersucht. Die Trennung und Detektion wurde unter den

gleichen Chromatographie- und Detektionsbedingungen durchgeführt wie für die Reinstwasserproben.

Vergleicht man die Retentionszeiten der Standardverbindungen in der Reinstwasserprobe mit denen in einer realen Abwassermatrix, so werden geringe Verschiebungen zu kleineren Retentionszeiten bei der realen Abwassermatrix deutlich (Tab. 6). Im unteren Lipophiliebereich ist dieser Effekt stärker ausgeprägt. Die Arten der Wechselwirkungen können vielfältiger Natur sein und lassen sich ohne eingehende Untersuchungen nicht charakterisieren. Die Interferenzen spielen sich in einem Multikomponentensystem ab: dem Elutionsmittel, der stationären Phase, den Testverbindungen und der komplexen Abwassermatrix.

Tab. 6: Verschiebung der Retentionszeiten der Standardverbindungen in realer Abwassermatrix

Substanz	Abkürzung	log Pow	Retentionszeit der Reinstwasserprobe in min	Retentionszeit der Realprobe in min	Differenz $t_R(\text{Real})-t_R(\text{Reinst})$ in min
1-Aminonaphthalin	ANP	2,25	4,88	4,53	-0,35
Atrazin	ATZ	2,65	5,08	4,72	-0,36
2,3-Dichloranilin	DCA	2,69	6,64	6,25	-0,39
Parathion-methyl	PAM	2,81	8,01	7,64	-0,36
4-Aminobiphenyl	ABP	2,86	6,70	6,30	-0,40
Naphthalin	NAP	3,32	8,65	8,30	-0,35
Biphenyl	BP	3,96	9,41	9,27	-0,13
Methoxychlor	MOC	5,02	9,97	9,86	-0,11
Hexachlorbenzol	HCB	5,47	11,70	11,68	-0,02
4-n-Nonylphenol	NOP	5,76	9,97	9,86	-0,11
p,p'-DDT	DDT	6,20	11,21	11,14	-0,07
PCB 77	PCB 77	6,63	11,76	11,76	-0,00
Octachlorstyrol	OCS	7,46	12,59	12,49	-0,10
Phthalsäure-bis (2-ethylhexyl-ester)	DEHP	7,60	12,89	12,81	-0,08
PCB 209	PCB 209	8,27	15,15	14,92	-0,23

Je lipophiler die Verbindungen sind, desto geringer scheint der Einfluss der Abwassermatrix auf das Retentionsverhalten der Verbindung zu werden. Die Verschiebungen der Retentionszeiten haben jedoch keinen Einfluss auf die Festlegung des Lipophiliefensters durch die zwei Markersubstanzen.

Um festzustellen, ob die Standardverbindungen an die Feststoffpartikel in den Abwasserproben sorbiert werden, wurde eine Abwasserprobe des Ablaufs der Kläranlage Stuttgart Büsnau 30 min vor der Glasfaserfiltration mit je 0,5 ml Standardgemisch pro Liter Abwasserprobe dotiert und anschließend gerührt. Gleichzeitig wurde ein Aliquot derselben Probe erst nach der Filtration mit den Standardverbindungen dotiert. Die Proben wurden anschließend mit dem üblichen Verfahren analysiert und die Wiederfindungsraten der Standardverbindungen bestimmt (Abb. 20).

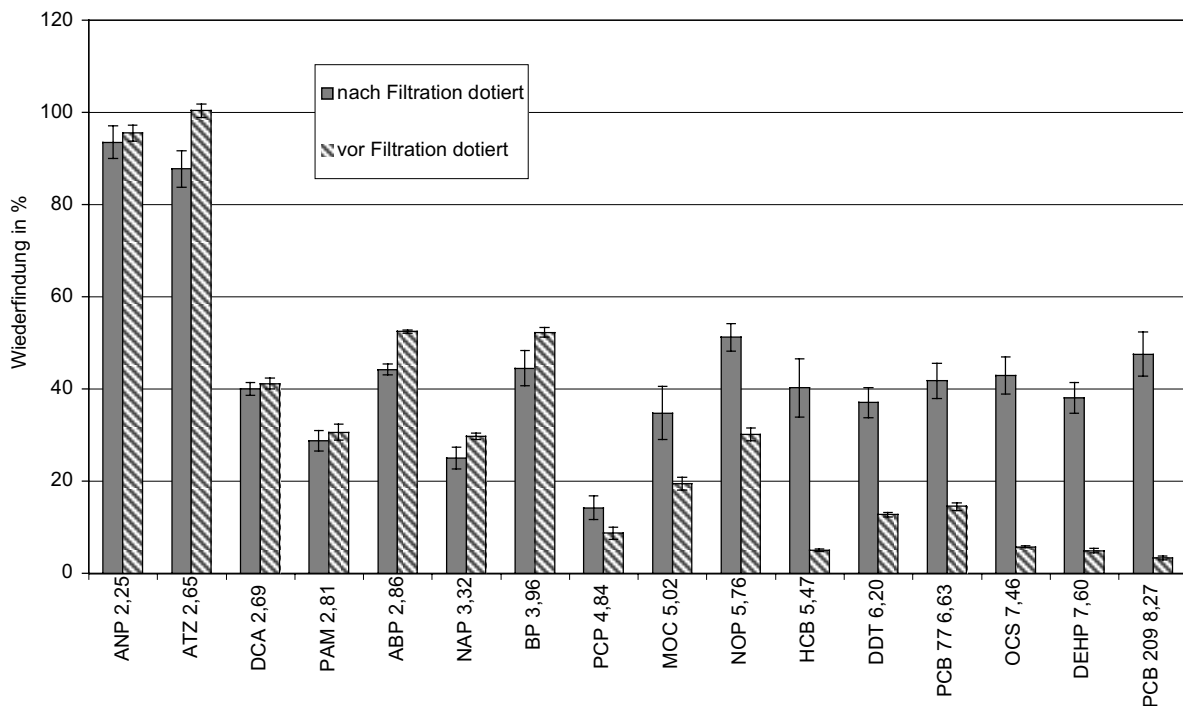


Abb. 20: Adsorption der Standardverbindungen an Schwebstoffe (n = 5)

Der Versuch zeigt deutlich, dass es zu Adsorptionseffekten der Standardverbindungen an Feststoffpartikel kommt. Vor allem die lipophileren Verbindungen haben wie erwartet eine höhere Tendenz an Schwebstoffe zu binden. Es ist deshalb auf jeden Fall

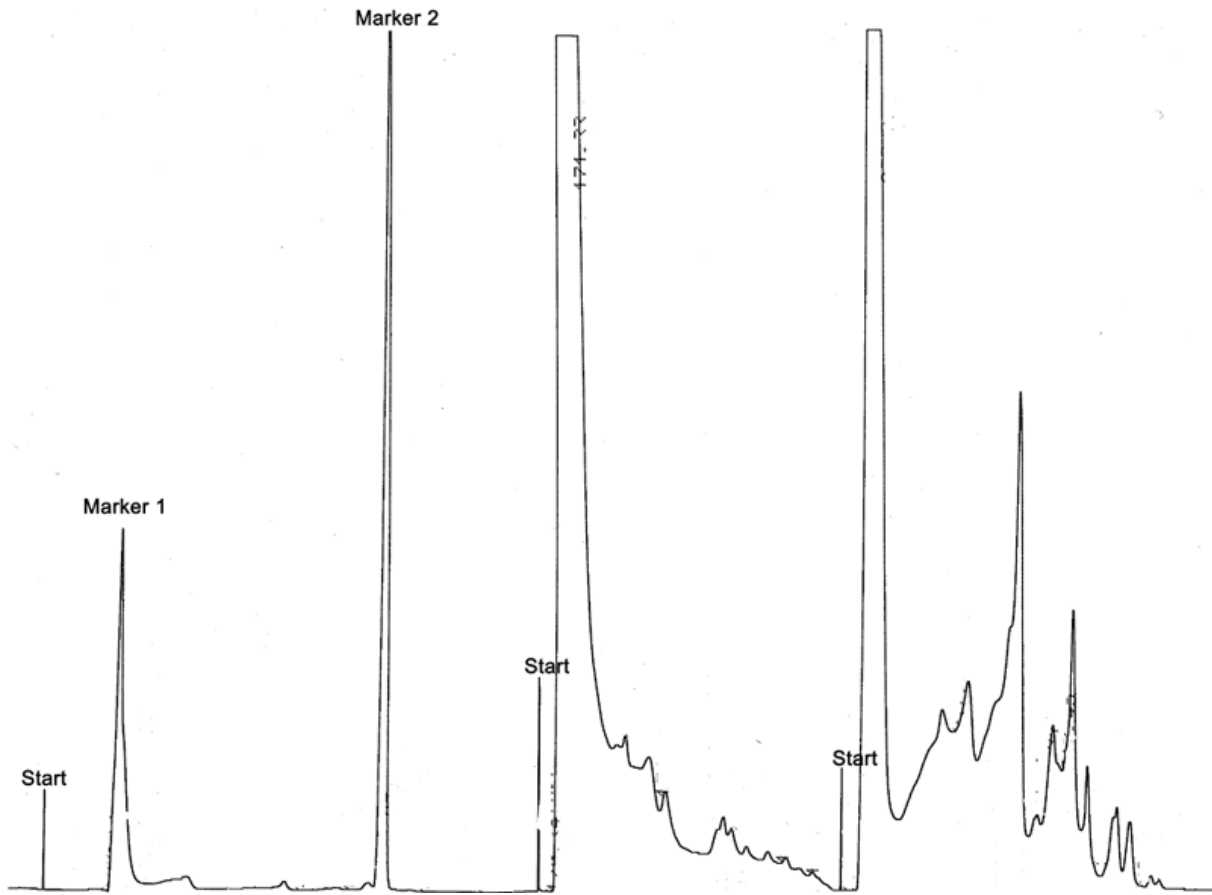
notwendig, die Feststoffe ebenfalls zu analysieren, wobei die Extraktionseffizienz nicht bestimmt werden kann.

6.8.2 PBS-Bestimmungen in Abwasserproben aus Kläranlagenabläufen in Baden-Württemberg

Im Sinne einer orientierenden Erkundung wurden die PBS-Gehalte von Abwässern aus Abläufen von kommunalen Kläranlagen und Industrieabwässern bestimmt. Damit sollten erste Anhaltspunkte über die Größenordnung der PBS-Konzentrationen in Abwässern erhalten werden. Es wurden insgesamt 12 Kläranlagen mit überwiegend kommunalen Abwässern, 4 Industriekläranlagen und zwei Abwässer eines Indirekt-einleiters beprobt. Einige kommunale Kläranlagen wurden mehrfach beprobt. Zusätzlich wurden im Rahmen einer Kooperation mit dem niederländischen RIZA 7 Abwasserproben von niederländischen Unternehmen aus diversen industriellen Branchen untersucht und die Ergebnisse der PBS-Untersuchungen mit denen des niederländischen SPME-Verfahrens (Kap. 5.8.2) vergleichend bewertet.

Die Abwasserproben wurden entweder als qualifizierte Stichprobe oder als Tagesdurchschnittsprobe (24 h-Mischprobe) nach DIN 38 402-11 aus den Abläufen (nach der letzten Reinigungsstufe) der Kläranlagen entnommen. Die Proben wurden gekühlt und luftfrei in 1 l-Braunglas-Schliffflaschen transportiert und bei 4 °C im Kühlschrank bis zur Probenaufbereitung gelagert. Die Probenaufbereitung erfolgte sofort nach dem Eintreffen im Laboratorium (Glasfaserfiltration), die Extraktion spätestens am Morgen des folgenden Tages. Parallel wurde ggf. der pH-Wert, der AOX, der TOC und der DOC bestimmt. Die AOX-Bestimmung wurde auch an der membranfiltrierten Probe durchgeführt, um Anhaltspunkte über den gelösten AOX zu erhalten.

Abwasserproben aus Abläufen von kommunalen bzw. industriellen Kläranlagen zeigen meist stark variierende HPLC-UV-Chromatogramme ($\lambda = 235 \text{ nm}$, Abb. 21), die darauf hindeuten, dass auch der Anteil an PBS sehr unterschiedlich sein kann.



Markerverbindungen | Abwasser Kläranlage Bünsau (kommunal) | Abwasser aus Papierindustrie

Abb. 21: Chromatogramme zweier Abwasserproben bei der Fraktionierung mittels semipräparativer HPLC

Die PBS-Konzentrationen der Abwasserproben der kommunalen Kläranlagen lagen für die flüssige Phase fast immer unter 0,5 mg/l (Kap. 9.10, Tab. 22). Bei einer Abwasserprobe der Kläranlage Stuttgart-Bünsau wurde eine PBS-Konzentration von $1,3 \pm 0,4$ mg/l (95 %, n = 11, die Messabweichungen sind in Abb. 22 dargestellt) in der flüssigen Phase gefunden.

Die Auswaagen an feststoffgebundenen PBS liegen noch häufiger im Bereich der Blindwerte. Bei keiner Probe wurden hier PBS-Konzentrationen über 0,5 mg/l gefunden. Auch die Proben von kommunalen Kläranlagen mit Anteilen von industriellen Abwässern wiesen sowohl in der gelösten Phase als auch in der feststoffgebundenen Fraktion keine signifikant erhöhten PBS-Konzentrationen auf (Kap. 9.10, Tab. 24).

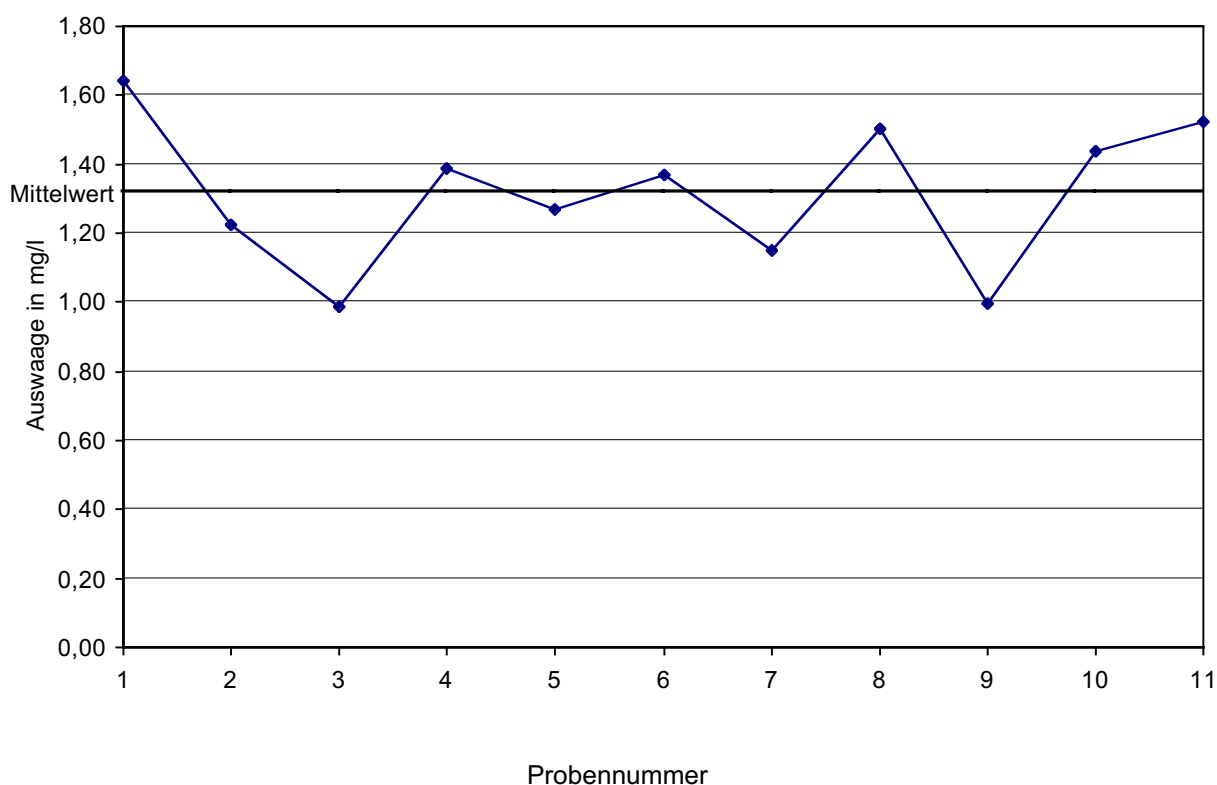


Abb. 22: Messunsicherheit bei einer PBS-Bestimmung in der flüssigen Phase eines Abwassers der KA Stuttgart-Büsnau (11 Parallelbestimmungen)

Der TOC der Abwasserproben lag zwischen 4,2 und 21,1 mg/l C (Kap. 9.10, Tab. 21), meist jedoch unter 10 mg/l C, der AOX lag zwischen 17 und 390 µg/l. Der AOX betrug somit meist unter 1 %, maximal jedoch 5 % des TOC. Die TOC bzw. AOX-Belastungen der kommunalen Abwasserproben waren somit in den für diese Abwässer üblichen Größenordnungen. Durch die Filtration der Probe wurde der AOX zum Teil deutlich verringert, d. h. ein Teil des AOX lag offensichtlich feststoffgebunden vor. Auf den TOC hatte die Filtration hingegen keinen solch großen Einfluss, d. h. der DOC wich vom TOC meist nur geringfügig ab. Beispielsweise war der AOX-Gehalt der Abwasserprobe der Kläranlage Stuttgart-Büsnau in der flüssigen Phase nur etwa 2/3 so groß wie der Gesamt-AOX, während der TOC und der DOC gleich groß waren.

Es war kein direkter Zusammenhang zwischen dem PBS und dem TOC bzw. AOX einer Probe erkennbar. Abwasserproben mit einem hohen AOX-Gehalt zeigten keine signifikant erhöhten TOC- bzw. DOC-Werte. Bei der Mehrfachbeprobung der KA Sindelfingen wurde sogar bei den höheren TOC-Werten ein jeweils kleinerer AOX-Wert gefunden.

Meist wurden bei Mehrfachbeprobungen von kommunalen Kläranlagen bei höheren TOC- bzw. DOC-Werten auch höhere PBS-Konzentrationen gefunden, wobei zu bedenken ist, dass in den unteren Messbereichen ($< 0,5$ mg/l) durch die auftretenden Blindwerte eine nicht unerhebliche Messunsicherheit auftritt. Bei den Abwasserproben aus den deutschen industriellen Kläranlagen lagen die TOC- bzw. DOC-Werte zwischen 13 und 80 mg/l C (Kap. 9.10, Tab. 23). Auch hier waren die DOC-Werte nur geringfügig kleiner als die TOC-Werte. Der AOX betrug zwischen < 20 μ g/l und 460 μ g/l.

Bei den Abwässern mit höheren TOC- bzw. DOC-Werten wurden auch höhere PBS-Konzentrationen gefunden. So wurde bei der Industriekläranlage 1 (chemisch-pharmazeutische Industrie) bei einem TOC von 72 mg/l C und einem DOC von 64 mg/l C eine PBS-Konzentration in der flüssigen Phase von $< 0,5$ mg/l und in der festen Phase von 0,7 mg/l erhalten. Der AOX betrug 89 μ g/l. Bei der Industriekläranlage 2 (Papierindustrie) lag der TOC bei 45 mg/l C und der DOC bei 41 mg/l C. Der AOX war hingegen äußerst gering mit < 20 μ g/l. Auch der PBS in beiden Phasen war gering. Er lag im Bereich des Blindwerts.

Der TOC der Industriekläranlage 3 (Gerberei) war mit 18 mg/l C (DOC 17 mg/l) vergleichsweise niedrig, während ein erhöhter AOX-Wert von 460 μ g/l erhalten wurde. Auch hier wurde ein PBS-Wert in der flüssigen Phase im Bereich des Verfahrensblindwerts gefunden, auch der feststoffgebundene Anteil an PBS betrug unter 0,5 mg/l. In der Industriekläranlage 4 (Gelatineherstellung) war der PBS-Gehalt sowohl in der flüssigen als auch in der festen Phase äußerst gering und lag im Bereich des Blindwerts. Der TOC betrug hier 15 mg/l C, der DOC 13 mg/l C und der AOX 150 μ g/l.

Es wurde zudem ein Indirekteinleiter aus der metallverarbeitenden Industrie beprobt. Hier wurden Proben aus zwei unterschiedlichen Abwasserströmen genommen. Einerseits handelte es sich um das Abwasser aus der Oberflächenbehandlung von Stahl (Galvanik, Verzinkung), andererseits um ein Eloxyalverfahren zur Oberflächenveredelung von Aluminium. Bei beiden Abwasserproben war der PBS-Gehalt in der festen Phase so gering, dass er nicht bestimmt werden konnte. Hingegen wurde eine PBS-Konzentration in der flüssigen Phase von 1,3 mg/l (Stahlveredelung) bzw. 2,7 mg/l (Aluminiumveredelung) gefunden. Auch der TOC war relativ hoch. Er betrug beim Abwasser

aus der Stahlveredelung 32 mg/l C (DOC 34,9 mg/l C) und beim Abwasser aus der Aluminiumbehandlung 80 mg/l C (DOC 76 mg/l C). Bei beiden Abwasserproben war der AOX hingegen relativ niedrig (28 µg/l und < 20 µg/l).

Im allgemeinen lässt sich sagen, dass sich die PBS-Gehalte der untersuchten industriellen und kommunalen Abwasserproben bei dieser orientierenden Erkundung nicht signifikant unterschieden. Dies gilt auch für die TOC-, DOC- und AOX-Werte. Nur bei dem Indirekteinleiter wurden höhere PBS-Konzentrationen in der flüssigen Phase gefunden. Auch waren keine direkten Abhängigkeiten zwischen den einzelnen Summenparametern TOC, AOX und PBS erkennbar. Das Verteilungsverhalten der potenziell bioakkumulierbaren Stoffe zwischen der flüssigen und der festen Phase lässt sich nicht vorhersagen.

6.8.3 PBS-Bestimmungen in industriellen Abwasserproben aus Kläranlagenabläufen in den Niederlanden

Im Rahmen einer Kooperation mit dem *Staatlichen niederländischen Amt für Integralverwaltung der Binnengewässer und für Abwasserreinigung (RIZA)* wurde eine vergleichende Untersuchung mit den jeweils entwickelten Verfahren durchgeführt. Das niederländische SPME-GC/MS-Verfahren und die gravimetrische PBS-Methode wurde an sieben industriellen Abwässern verschiedener Branchen angewendet. Dazu wurden Stichproben aus den Abläufen der Kläranlagen (Direkteinleiter) genommen.

Die pH-Werte aller Abwasserproben lagen im neutralen bzw. leicht alkalischen Bereich (Tab. 25). Die TOC bzw. DOC-Werte variierten stark innerhalb der einzelnen Industriezweige (Tab. 25). Am niedrigsten war der organische Kohlenstoffgehalt bei einem Abwasser aus der chemischen Industrie (TOC 7,9 mg/l C, DOC 5,6 mg/l C), am höchsten bei einer Abwasserprobe einer Müllverbrennungsanlage (TOC 84 mg/l C, DOC 72 mg/l C). Auch bei den niederländischen Abwasserproben war ebenso wie bei den Abwässern aus Deutschland der DOC gegenüber dem TOC nur geringfügig kleiner. Auffällig bei den Abwasserproben einer Eisenverhüttung und einem Hersteller von Pestiziden waren die hohen AOX-Werte von 2,0 mg/l bzw. 6,9 mg/l (Tab. 26).

Die PBS in der flüssigen Phase lagen bei den Abwässern aus einer Speiseölfabrik, des Pestizidherstellers, der Eisenverhüttung und der chemischen Industrie jeweils unter 0,5 mg/l (Tab. 27). Auffällig waren dagegen die hohen Gehalte der feststoffgebundenen PBS bei der Speiseölfabrik und der Eisenverhüttung von 5,5 mg/l bzw. 11 mg/l. Dies bedeutet, dass die PBS in diesen Fällen fast vollständig (über 90 %) an Feststoffe sorbiert vorlagen. Ein Grund dafür kann der außerordentlich hohe Feststoffanteil sein, der in der Abwasserprobe gefunden wurde. Bei der Probe aus der Speiseölfabrik betrug er 76 mg/l, bei der Eisenverhüttung sogar 220 mg/l.

Höhere PBS-Konzentrationen in der flüssigen Phase wurden bei den Abwässern der Papierindustrie (PBS 0,9 mg/l), der Müllverbrennungsanlage (PBS 2,2 mg/l) erhalten. Einen deutlich höheren PBS-Gehalt als alle anderen untersuchten Abwässer besaß die Probe aus der metallverarbeitenden Industrie mit 14 mg/l in der flüssigen Phase. Der feststoffgebundene PBS betrug in diesem Fall 2,2 mg/l.

Vom PBS der niederländischen Abwasserproben wurde auch der Kohlenstoffgehalt mittels Feststoff-TOC bestimmt. Er lag zwischen 21 und 55 %. Nur der Kohlenstoffgehalt des PBS der flüssigen Phase aus der metallverarbeitenden Industrie war mit 90 % deutlich höher. Der TOC des feststoffgebundenen PBS lag hingegen deutlich niedriger bei 55 %. Bei allen anderen Abwasserproben waren die TOC-Gehalte des feststoffgebundenen bzw. gelösten PBS recht ähnlich. Nur beim Abwasser der Papierindustrie wurde eine größere Differenz zwischen dem C-Gehalt des gelösten PBS (C-Gehalt 48 %) und dem feststoffgebundenen PBS (C-Gehalt 30 %) gefunden. Beim Abwasser aus der Pestizidproduktion waren die PBS-Konzentrationen zu gering, um eindeutige Aussagen treffen zu können.

Zur Quantifizierung der bioakkumulierbaren Verbindungen wird in den Niederlanden der Summenparameter TTC bestimmt. TTC steht für „Total Target Concentration“. Der TTC soll der in Zellmembranen zu erwartenden Konzentration an bioakkumulierbaren Verbindungen entsprechen. Zur Bestimmung wird ein Polyacrylat-SPME-Faden 16 - 24 Stunden in eine gerührte Abwasserprobe eingetaucht und es wird bis zur Einstellung des dynamischen Gleichgewichts gewartet. Der TTC-Wert wird aus der gesamten Stoffmenge aller adsorbierten Verbindungen abgeschätzt. Der SPME-Faden soll dabei

das Anreicherungsverhalten von organischen Verbindungen in Zellmembranen simulieren und wird deshalb von der niederländischen Arbeitsgruppe als „Biomimetische Extraktion“ bezeichnet.

Um die Bioakkumulation an einen direkten negativen Effekt zu koppeln, wurde die narkotisierende Wirkung der Stoffe betrachtet, denn die narkotisierende Wirkung solcher sogenannter nichtreaktiver Schadstoffe wird nicht durch spezifische Mechanismen hervorgerufen. Dabei wird vorausgesetzt, dass sich die narkotisierende Wirkung organischer Stoffe vollkommen additiv verhält. Dies würde bedeuten, dass jeder narkotisierend wirkende Stoff das gleiche Effektpotenzial für diese Wirkung besitzt. Somit sollte ein Effekt immer nur dann auftreten, wenn die Summe der Einzelkonzentrationen aller narkotisierend wirkender Substanzen die Effektkonzentration („Critical Target Concentration“, CTC) überschreitet, denn es soll gelten:

$$c_m = P_{mw} \cdot LC_{50} \text{ in mmol/l (Gl. 4)}$$

c_m	Effektkonzentration in der Zelle für eine narkotisierende Wirkung
P_{mw}	Verteilungskoeffizient Membran-Wasser
LC_{50}	Lethale Konzentration für 50 % der Versuchstiere (<i>Daphnia magna</i>) nach 96 Stunden in mmol/l

In Untersuchungen mit zwei unterschiedlichen Ölgemischen wurde ein CTC-Wert von 125 mmol/l ermittelt. Anders ausgedrückt ist, einen narkotisch-toxischen Mechanismus vorausgesetzt, durch 125 mmol/l eines Gemischs von narkotisierend wirkenden Stoffen eine Lethalität von 50 % der Versuchstiere (*Daphnia magna*, Expositionsdauer 96 h) zu erwarten.

Voraussetzung für die Abschätzbarkeit des TTC-Werts mithilfe der „Biomimetischen Extraktion“ ist, dass sich die Verteilungskoeffizienten zwischen dem SPME-Faden und der wässrigen Phase bei allen Stoffen mit deren Verteilungskoeffizienten im System Zellmembran/Wasser linear korrelieren lassen. Von der niederländischen Arbeitsgruppe wurde folgender Zusammenhang zwischen diesen Größen gefunden:

$$\log P_{mw} = \log P_{SPME} + 0,32 \text{ (Gl. 5)}$$

P_{SPME}	Verteilungskoeffizient SPME-Wasser
------------	------------------------------------

Zur Bestimmung der an den SPME-Faden gebundenen Stoffmenge muss ein externer Bezugsstandard (2,4,5-Trichlortoluol) zudosiert und dessen molarer Response bei der massenspektrometrischen Detektion gleich eins gesetzt werden. Die Flächen aller GC-MS-Peaks (Full-Scan-Modus) werden aufsummiert und anschließend auf die Peakfläche des Standards bezogen. Problematisch bei diesem Vorgehen ist, dass der Response des massenselektiven Detektors (GC-MS) nicht massenproportional ist und sich zudem für die einzelnen Analyten unterscheidet. Die Konzentration in der Zellmembran wird aus der SPME-Konzentration mit der Gleichung

$$c_m \cong 2,07 \cdot c_{\text{SPME}} \text{ in mmol/l} \quad (\text{Gl. 6})$$

abgeschätzt. Der Faktor von 2,07 wurde empirisch ermittelt.

Mit $\text{TTC} = \sum c_m$ folgt schließlich:

$$\text{TTC} \cong 2,07 \cdot c_{\text{SPME}} \text{ in mmol/l} \quad (\text{Gl. 7})$$

Betrachtet man nun die erhaltenen Analysenwerte (Tab. 7), die mit den beiden Verfahren erhalten wurden, so sind Tendenzen ersichtlich.

Tab. 7: Summenparameter der niederländischen Abwasserproben

Untersuchungs- institut	ISWA	RIZA	ISWA	RIZA	RIZA	ISWA	RIZA
Parameter	TOC in mg/l C	TOC in mg/l C	DOC in mg/l C	DOC in mg/l C	CSB in mg/l O ₂	PBS _{ges} * in mg/l	TTC in mmol/l
Müllverbrennung	84	78	72	74	250	4	90
Papierindustrie	54	49	43	46	170	2	120
Speiseölfabrik	13	n.g.	12	n.g.	n.g.	6	220
Eisenverhüttung	58	150	63	58	290	12	36
Pestizidproduktion	34	n.g.	37	n.g.	n.g.	< 0,5	9
Chemische Industrie	8	10	6	7	25	0,8	13
Metallverarbeitende Industrie	49	61	36	46	210	16	350

* Summe aus PBS_{flüssig} und PBS_{fest}

Die gemessenen TOC bzw. DOC-Werte lagen in derselben Größenordnung. Nur im Falle des Abwassers aus der Eisenverhüttung weicht der vom RIZA gemessene TOC-Wert mit 150 mg/l C von dem ISWA-Wert mit 58 mg/l C deutlich ab.

Um eine Vergleichbarkeit der TTC- bzw. PBS-Analysenergebnisse herzustellen, wurde hier der PBS-Gesamt (PBS_{ges} = Summe der PBS-Werte von flüssiger und fester Phase) gebildet, da dem TTC die unfiltrierte Abwasserprobe zugrunde liegt. Auffällig war in erster Linie, dass bei beiden Verfahren bei den Abwässern aus der Pestizidproduktion und der chemischen Industrie jeweils niedrige Analysenwerte und beim Abwasser aus der metallverarbeitenden Industrie ein deutlich erhöhter PBS- bzw. TTC-Wert erhalten wurde. Eine deutliche Abweichung zwischen den Ergebnissen der beiden Verfahren zeigte dagegen das Abwasser aus der Eisenverhüttung. Hier wurde eine hohe PBS-Konzentration gefunden, die vor allem aus einem sehr hohen PBS-Wert der festen Phase resultiert, während der TTC vergleichsweise niedrig war. Ein Grund könnte darin liegen, dass mit dem SPME-Faden als passive Anreicherungsmethode die feststoffgebundenen PBS nicht erfasst werden, da sie bei der Extraktion nicht von den Feststoffen desorbieren. Die Soxhlet-Extraktion als erschöpfende Extraktionsmethode dagegen ermöglicht dagegen die Abtrennung der an die Feststoffe adsorbierten PBS.

Die TTC- bzw. PBS-Konzentrationen der Abwässer aus der Papierindustrie und der Speiseölfabrik lagen im mittleren Bereich der untersuchten niederländischen Abwässer. Da das SPME-Verfahren zum einen auf einer selektiven (nicht-erschöpfenden) Extraktion basiert und außerdem eine Diskriminierung bei der GC-MS-Detektion auftritt (mit GC und EI-MS können nur Verbindungen gemessen werden, die sich unzersetzt verdampfen lassen), das gravimetrische Verfahren jedoch nicht-selektiv ist, waren Unterschiede in den Messwerten zu erwarten.

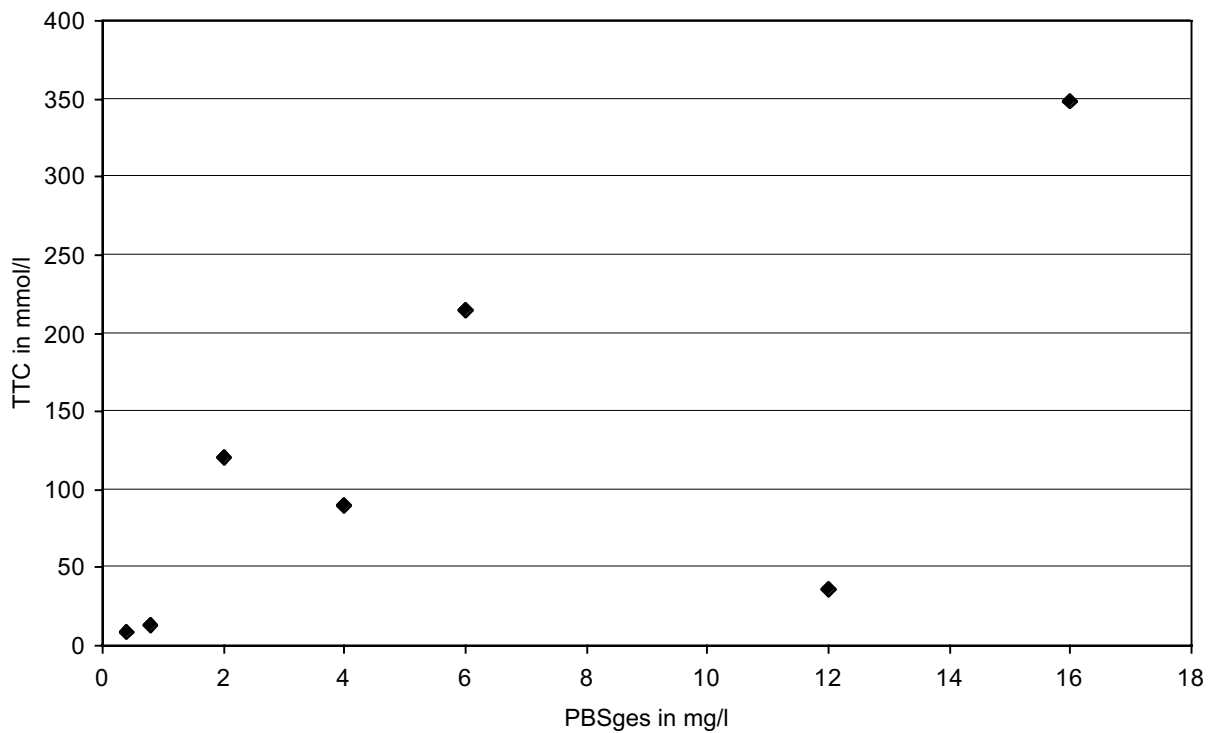


Abb. 23: Vergleich der PBS- und der TTC-Konzentrationen der niederländischen industriellen Abwasserproben

Daneben treten auch Responseunterschiede zwischen den einzelnen organischen Verbindungen bei der GC-MS-Analyse auf. Aufgrund dieser Verfahrensunterschiede lassen sich die Analysenergebnisse der beiden Verfahren nur bedingt miteinander vergleichen. Die Messwerte bei beiden Verfahren zeigten dennoch in den meisten Fällen die gleiche Tendenz (Abb. 23).

7 Experimenteller Teil

7.1 Arbeitsvorschrift zur Bestimmung des PBS-Summenparameters

1 l Abwasserprobe eines Kläranlagenablaufs wird über einen mit Toluol gespülten, gewogenen Glasfaserfilter (GF 6, Schleicher & Schuell, Dassel) unter Anlegen eines Vakuums (100 mbar) filtriert, wobei peinlichst genau darauf zu achten ist, dass das Filter nicht beschädigt wird. Anschließend wird 3 mal mit 10 ml bidestilliertes Wasser nachgespült. Das exakte Volumen der abfiltrierten Probe wird durch Rückwiegen des Probengefäßes bestimmt.

Das Filter wird im Trockenschrank bei 30 °C bis zur Gewichtskonstanz (ca. 48 h) mit einem geöffneten Wägegglas getrocknet und - nach Erkalten im Exsikkator (Trocknungsmittel: Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator) auf Raumtemperatur - bei verschlossenem Wägegglas auf 1 mg gewogen. Für eine sichere Abführung der Abluft im Trockenschrank ist zu sorgen. Die Masse wird als konstant angesehen, wenn das Gewicht nach einer weiteren halbstündigen Trocknung von dem vorhergehenden Wert um nicht mehr als 2 mg abweicht.

Die Masse der abfiltrierbaren Stoffe (Glasfaserfilter) ergibt sich aus:

$$m_{AS} = \frac{m_T}{V_P} \cdot f \quad m_T = m_V - m_L \quad (\text{Gl. 8})$$

m_{AS} Masse der abfiltrierten Stoffe in mg/l

m_T Trockenmasse in g

m_V Masse Filter voll in g

m_L Masse Filter leer in g

V_P Volumen Wasserprobe in l

f Faktor ($f = 1\,000$)

Für die Festphasenextraktion des Filtrats werden Glastrennsäulchen (8 ml Leervolumen) verwendet, die manuell mit 1 g Sorbensmaterial gepackt werden (Spezifikation des RP-C18-Materials: Partikelgrößenverteilung (sphärisch) 40 - 60 µm, spez. Oberfläche (BET) ca. 500 m²/g, Porengröße Ø 60 Å, Kohlenstoffgehalt 17 - 21 %).

Bei der Befüllung der Glassäulchen wird zuerst eine Teflonfritte mithilfe eines Teflonstempels in das SPE-Säulchen eingebracht. Auf dieses wird 1 g des losen Bulk-Material geschüttet, durch leichtes Klopfen verdichtet und eine weitere Fritte handfest aufgesetzt. Durch weiteres leichtes Klopfen wird gewährleistet, dass das Sorbensmaterial das Säulchen kompakt ausfüllt. Nötigenfalls wird die obere Fritte leicht nachgedrückt.

Das SPE-Säulchen wird mit 2 Säulenreservoirvolumina (SV) Tetrahydrofuran („Blindwertreduktion“) und mit 2 SV Methanol konditioniert. Anschließend wird mit 2 SV bidest. Wasser äquilibriert. Dabei ist es eventuell notwendig, kurzfristig ein Vakuum anzulegen, damit das Methanol vom Wasser auf der Festphase verdrängt werden kann. Sobald der erste Tropfen Wasser die Festphase passiert hat, ist das Vakuum aufzuheben.

Die Festphasenextraktion der Abwasserprobe wird mithilfe einer Vakuumkammer durch Anlegen eines Vakuums (400 - 600 mbar) durchgeführt. Die Fließrate sollte ca. 10 ml/min betragen. Nach der Anreicherung wird das SPE-Säulchen mit 1 SV bidest. Wasser nachgespült. Der Probendurchlauf und das Spülwasser wird verworfen. Die Probenflasche wird zurückgewogen, um das angereicherte Volumen zu ermitteln. Die Festphase wird im Stickstoffstrom getrocknet (ca. 1 - 1,5 h). Anschließend wird mit 2 SV Methanol (Einwirkzeit 30 min) eluiert und die Festphase wiederum im Stickstoffstrom getrocknet. Dann wird mit 2 SV Tetrahydrofuran (Einwirkzeit 30 min) eluiert.

Das vereinigte Eluat wird in einem Vakuumkonzentrator (50 °C, 60 mbar) weitgehend eingeeengt, wobei darauf zu achten ist, dass keine Feststoffe ausfallen. Anschließend wird das Eluat mit Acetonitril aufgenommen (ca. 2,5 ml). Das exakte Volumen wird durch Rückwiegen des Reagenzglases ermittelt.

Das Fraktionsfenster wird durch einen gesonderten HPLC-Lauf mit den beiden Markerverbindungen festgelegt. Dazu werden 0,2 - 0,4 ml einer Lösung der beiden Markerverbindungen (c = 10 mg/l pro Einzelsubstanz) in die präp. HPLC injiziert und mit dem üblichen Lösungsmittelgradienten aufgetrennt. Die zu sammelnde PBS-Fraktion wird durch den Zeitraum zwischen Anwachsen des Signals der Markerverbindung 1 und dem Verschwinden des Signals der Markerverbindung 2 definiert.

Gradientenprogramm:

Zeit in min	H ₂ O/NH ₄ CH ₃ COO (5 mmol/l) in %	ACN in %	THF in %
0	70	30	0
2	60	40	0
5	50	50	0
8	20	80	0
10	0	100	0
20	0	100	0
25	0	0	100
45	0	0	100
50	0	100	0
55	0	100	0
60	70	30	0

Das Eluat der Abwasserprobe wird in ein 6-Wege-Ventil mit 2 ml Probenschleife injiziert und die PBS-Fraktion in einem 100 ml Spitzkolben (NS 29) aufgefangen. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer (Druck: 230 mbar, Wasserbadtemperatur: 40 °C) auf ca. 2 ml (TOC-Porzellanschiffchen) bzw. 10 ml (Aluwägeschälchen) eingengt.

Die Probe wird entweder auf ein bei 1200 °C ausgeglühtes Porzellanschiffchen oder auf ein Aluwägeschälchen transferiert und mit kleinen Lösungsmittelmengen nachgespült, um die Probe möglichst verlustfrei zu überführen. Durch das größere Volumen des Aluschälchen gegenüber dem Porzellanschiffchen ist das Transferieren auf dieses deutlich bequemer. Das Lösungsmittel wird bei den TOC-Porzellanschiffchen mittels Gefriertrocknung (Sollwert Gefrieren: -40 °C, Sollwert Haupttrocknung: -10 °C, Sollwert Vakuum: 0,220 mbar) bzw. bei den Aluschälchen bei 30 °C im Trockenschrank entfernt. Die Porzellan- bzw. Aluschälchen werden anschließend im Exsikkator auf Raumtemperatur gebracht und bis zur Gewichtskonstanz weitergetrocknet.

Durch Differenzwägung der probengefüllten, getrockneten TOC-Porzellanschiffchen bzw. Aluschälchen und den leeren Gefäßen kann die Masse an PBS ermittelt werden. Die Massenkonzentration der PBS in der Abwasserprobe wird folgendermaßen ermittelt:

$$c(\text{PBS}) = (m_v - m_l) \cdot \frac{V_{\text{ges}}}{V_{\text{inj}}} \cdot \frac{1}{V_P} \text{ in g/l (Gl. 9)}$$

$c(\text{PBS})$	PBS-Konzentration in g/l
m_v	Masse des Probengefäßes nach Trocknung der PBS in g
m_l	Masse des leeren Probengefäßes in g
V_{ges}	Gesamtvolumen des Eluats in ml
V_{inj}	Volumen der Probenschleife in ml
V_P	Volumen der angereicherten Abwasserprobe in l

Die Bestimmung der feststoffgebundenen PBS erfolgt mittels Soxhletextraktion. Die Soxhletapparatur wird vor der eigentlichen Extraktion mitsamt der Extraktionshülse mit Toluol dem Extraktionsvorgang unterzogen und anschließend mit Aceton gespült und an der Luft getrocknet. Das Filter wird in die Extraktionshülse eingebracht, um Verunreinigungen des Extrakts durch Flusen aus dem Filter zu vermeiden.

Das Filter wird mit etwa 75 ml Toluol extrahiert (ca. 100 Extraktionszyklen). Der Extrakt wird im Rotationsverdampfer bei kontrolliertem Vakuum (40 °C, 80 mbar) auf ca. 40 ml eingeengt und in einen 100 ml Spitzkolben transferiert. Es wird 3 mal mit ca. 10 ml Toluol nachgespült. Der Extrakt wird am Rotationsverdampfer auf ca. 1 ml eingeengt und zur Lagerung in ein Bördelrandgläschen transferiert. Es wird mit einer kleinen Menge Toluol nachgespült, so dass das Gesamtvolumen des Extrakts kleiner als 2 ml ist. Anschließend erfolgt die Trennung und Massenbestimmung analog dem Festphasenextrakt.

Die TOC-Bestimmung erfolgt mit einem multi N-C-Analysator mit Hochtemperaturofen. Mit einer integrierten Auswertungssoftware (multi N-C-Programm) wird der TOC-Gehalt automatisch über das Flächenintegral des Messsignals berechnet. Die Kalibrierung wird mit einem zertifizierten Seesediment (C-Gehalt 4,5 %) durchgeführt. Der Betrieb des multi N-C-Analysators erfolgt laut Angaben des Geräteherstellers.

Zur Kalibrierung wird von der Software eine Bezugskurve erstellt, indem die Massenanteile an Kohlenstoff in der eingewogenen Menge Sediment gegen den Messwert aufgetragen wird. Daraus wird automatisch der Kalibrierfaktor ermittelt. Dazu sind 5 etwa äquidistante Massen an Sediment im Bereich von 3 -30 mg einzusetzen.

Zusätzlich wird eine Blindprobe (Einwaage 0 mg) gemessen. Die Probe wird auf dem Porzellanschiffchen in den Hochtemperaturofen eingeschleust. Die Verbrennungstemperatur beträgt 1 250 °C. Zur Spülung der Verbrennungsschleuse werden 125 l/h O₂ vorgelegt.

7.2 Arbeitsvorschrift für die Flüssig-flüssig-Extraktion

1 l Probe wird mit je 25 ml Lösungsmittel versetzt und 45 min auf dem Magnetrührer gerührt. Die organische Phase wird von der wässrigen Phase über einen Scheidetrichter abgetrennt. Dies wird zweimal wiederholt. Die drei Extrakte (75 ml) werden anschließend vereinigt. Die organische Phase wird über 3 g Natriumsulfat getrocknet. Danach wird über einen Glasfaserfilter abfiltriert und mit 30 ml Lösungsmittel nachgewaschen. Der Extrakt wird am Rotationsverdampfer auf ein kleines Volumen (ca. 2 ml) eingeeengt (Druck: 580 mbar, Wasserbadtemperatur: 40 °C), mit Acetonitril aufgenommen und in ein HPLC-Gläschen transferiert. Es wurden n-Hexan und Petrolether (40-60) als Extraktionsmittel getestet.

7.3 HPLC-Analysebedingungen

Analytische HPLC

Eluenten: 5 mmol wässrige Ammoniumacetat-Lösung/Acetonitril.

Fluss: 0,8 ml/min; Temperatur: 25 °C; Injektionsvolumen: 10 µl.

Wellenlängen: 235 nm, 250 nm, 275 nm.

Lösungsmittelgradient:

Zeit in min	Acetonitril in %
0,00	30
2,00	40
5,00	50
8,00	80
10,00	100
15,00	100
16,00	30

Stoptime 17,00

7.4 GC-Analysebedingungen (Kontrollanalytik)

GC-MS-Analysebedingungen:

Injektor: 2 µl (splitlos, 280 °C)

Säule: HP-5MS, 30 m, 0,25 µm Filmdicke, 0,22 mm ID

Fluss: 1,0 ml/min (Helium, constant flow)

Ofenprogramm: 120 °C (2min), 10 °C/min (330 °C, 5 min)

Detektor: 280 °C, Quadrupol im SIM-Modus

Ionisation: EI

7.5 Chemikalien und Geräte

Lösungs- und Elutionsmittel

Cyclohexan SupraSolv[®], Dichlormethan SupraSolv[®], Methanol LichroSolv[®], Petroleumbenzin 40-60 SupraSolv[®], Toluol LichroSolv[®] (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt).

Aceton HPLC gradient grade, Acetonitril HPLC gradient grade, Tetrahydrofuran HPLC gradient grade (J.T. Baker Deventer, NL).

Standard- und Markerverbindungen; geordnet nach steigendem log P_{OW}

Substanz	CAS-Nr.	Reinheit in %	Bezugsquelle	Lösungsmittel
4-Nitrophenol	100-02-7	99,4	Dr. Ehrenstorfer	Methanol
Benzol	71-43-2	99,9	Aldrich	
1-Aminonaphthalin	134-32-7	99,6	Dr. Ehrenstorfer	
Trichlorethen	79-01-6	99,5	Aldrich	
Atrazin	1912-24-9	98,4	Dr. Ehrenstorfer	Methanol
2,3-Dichloranilin	608-27-5	98	Riedel-de Haën	Acetonitril
Parathion-methyl	298-00-0	99	Dr. Ehrenstorfer	Acetonitril

Substanz	CAS-Nr.	Reinheit in %	Bezugsquelle	Lösungsmittel
2-Acetylnaphthalin	93-08-3	99	Aldrich	
4-Aminobiphenyl	92-67-1	98,5	Dr. Ehrenstorfer	
Tetrachlorethen	127-18-4	99,9	Aldrich	
Brombenzol	108-86-1	99,9	Dr. Ehrenstorfer	Methanol
Naphthalin	91-20-3	99,9	Dr. Ehrenstorfer	Acetonitril
γ -HCH (Lindan)	58-89-9	97	Dr. Ehrenstorfer	Methanol
Biphenyl	92-52-4	99,9	Dr. Ehrenstorfer	Methanol
Anthracen	120-12-7	99	Acros Organics	
Pentachlorphenol	87-86-5	99,9	Riedel-de Haën	Acetonitril
Pyren	129-00-0	98	Aldrich	
Methoxychlor	72-43-5	98,5	Dr. Ehrenstorfer	Methanol
PCB 15	2050-68-2	99	Riedel-de Haën	
Hexachlorbenzol	118-74-1	98,8	Dr. Ehrenstorfer	Acetonitril
4-n-Nonylphenol	104-40-5	99,5	Dr. Ehrenstorfer	Acetonitril
Benzo[a]pyren	50-32-8	98	Acros Organics	
p,p'-DDT	50-29-3	99,3	Dr. Ehrenstorfer	Methanol
PCB 77	32598-13-3	99	Riedel-de Haën	
Octachlorstyrol	29082-74-4	97	Dr. Ehrenstorfer	Acetonitril
DEHP	117-81-7	99	Dr. Ehrenstorfer	Acetonitril
PCB 209	2051-24-3	99	Riedel-de Haën	

Reinigung

Laborspülautomat Mielabor G7783 (Miele, Gütersloh), Spülmittel neodisher[®]A8 (Chemische Fabrik Dr. Weigert, Hamburg), Trockenschrank ULM 800 (memmert, Schwabach).

Filtration, Trocknung

Membran-Vakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim) mit Sicherheitsflasche, Saugflasche 2 000 ml, Vakuumfiltrationsgerät 300 ml (Gröpl, Mühlheim/Main), Glasfaser Rundfilter GF 6, Ø 55 mm (Schleicher & Schuell, Dassel), Porzellannutsche, Wägegglas mit Verschlussstopfen, Trockenschrank Modell 400 (memmert, Schwabach), Exsikkator, Trocknungsmittel: Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator.

Festphasenextraktion

Bakerbond spe Glassäulchen, leer, 8 ml (J.T. Baker, Deventer NL), LiChrolut® PTFE-Fritten für Glassäulchen, 8 ml (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt), Baker spe 12G Vakuumkammer (J.T. Baker, Deventer NL), Wasserrezirkulationspumpe Heto Sue 300 Q; (Heto-Holten A/S, Dänemark).

Festphasensorbentien (Bulk-Material):

Baker Bond C18 for Flash (40 µm) spez. Oberfläche 520 m²/g, Porengröße Ø 60 Å, Kohlenstoffgehalt 17,2 % (J.T. Baker, Deventer NL), Baker Bond SDB 1, (43 - 123 µm) spez. Oberfläche 965 m²/g Porengröße Ø 27 Å (J.T. Baker, Deventer NL).

Isolute C2; (bzw. C2 (EC); C4; C6; C8; C8 (EC); C18, C18 (EC), NH₂) 40 – 70 µm, Porengröße Ø 60 Å, Kohlenstoffgehalt 18,7 %; Isolute ENV+, (40 - 140 µm) spez. Oberfläche 1 000 m²/g (Separtis, Grenzach-Wyhlen).

Soxhlet-Extraktion

Soxhlet-Extraktor (30 ml, Schliff-Kern NS 29), Einhals-Rundkolben mit Glasstopfen (100 ml, NS 29), Kolbenheizer für 100 ml Rundkolben, Extraktionsfilterhülsen (Schleicher & Schuell), Dimrothkühler.

Einengen von Lösungsmitteln

Vakuum-Konzentrator Alpha-RVC (Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode) Rotationsverdampfer mit kontrollierter Druckminderungseinrichtung (Büchi Laboratoriumstechnik, Flawil Schweiz), Kolben extra spitz, 100 ml, NS 29/32 (Landgraf Laborgeräte, Langenhagen).

Präparative HPLC-Anlage

Niederdruckmischsystem: WellChrom Solvent Organizer K-1500 (Knauer, Berlin).

Pumpe: WellChrom Maxi-Star K 1001 (Knauer, Berlin).

Probenaufgabesystem: 3-Kanal-Schaltventil A0615 (Knauer, Berlin), 2 ml-Probenschleife (Edelstahl).

Säulenthermostat: BFO-04 1s (W.O. Electronics, Langenzersdorf, Österreich).

Injektionsspritze: Mikroliter-Glasspritze mit gerader Kanüle A0730, (Knauer, Berlin), Volumen: 2500 µl.

Detektor: Spektralphotometer mit Digitalanzeige A0293 (Knauer, Berlin), Messwellenlänge 254 nm.

Schreiber: Carlo Erba Strumatazione MEGA series integrator SP 4270 (San Jose, USA).

Analytische HPLC-Anlage

HP 1100 Vakuumentgaser G1322A (Hewlett Packard, Böblingen).

HP 1100 Binäre Pumpe G1312A (Hewlett Packard, Böblingen).

HP 1100 Automatischer Probengeber G1313A (Hewlett Packard, Böblingen).

HP 1100 Thermostatisierbarer Säulenraum G1316A (Hewlett Packard, Böblingen).

HP 1100 Dioden-Array-Detektor G1312A (Hewlett Packard, Böblingen), Messwellenlängen 235, 250, 275 nm.

HPLC- Trennsäulen

a) Trennsäulen für Analytische HPLC

Vorsäule: Prontosil 120-3-C18-SH (33 x 4,0 mm), 10 µm (Bischoff Analytik, Leonberg);

Hauptsäule: Prontosil 120-10-C18-SH (53 x 4,0 mm), 3 µm (Bischoff Analytik, Leonberg).

Vorsäule: GROM-SIL 120 ODS-5 ST (10 x 4,0 mm), 11 µm (Grom Analytik + HPLC, Herrenberg); *Hauptsäule:* GROM-SIL 120 ODS-5 ST (60 x 4,0 mm), 3 µm (Grom Analytik + HPLC, Herrenberg).

b) Trennsäulen für Semipräparative HPLC

Vorsäule: Prontosil 120-3-C18-SH (33 x 8,0 mm), 10 µm (Bischoff Analytik, Leonberg); *Hauptsäule:* Prontosil 120-10-C18-SH (53 x 8,0 mm), 3 µm (Bischoff Analytik, Leonberg).

Vorsäule: GROM-SIL 120 ODS-5 ST (20 x 8,0 mm), 11 µm (Grom Analytik + HPLC, Herrenberg); *Hauptsäule:* GROM-SIL 120 ODS-5 ST (50 x 8,0 mm), 3 µm (Grom Analytik + HPLC, Herrenberg).

Verdampfungs-Lichtstreuendetektor

Verdampfungs-Lichtstreuendetektor SEDEX 55 (SEDERE, Alfortville Cedex, France).

HP Interface 35900E (Hewlett Packard, Böblingen).

Gas: Stickstoffanlage AGA Nitroprime™ Membrane Unit, Stickstoff ölfrei, gefiltert (0,025 µm), (AGA Gas, Hamburg).

Gerätespezifikationen für den Lichtstreuendetektor

Gasverbrauch: ca. 3 l/min.

Temperaturbereich: Umgebungstemperatur bis 100°C.

Licht-Quelle: 20 W polychromatische Wolfram-Halogen-Lampe.

Detektion: hochempfindlicher Photomultiplier.

Drift: weniger als 1 mV/h

Flussraten: 0,2 bis 5 ml/min für konventionelle HPLC

Waagen

Präzisionswaage: Satorius basic, MA BB 200, Ablesbarkeit 10 mg, Höchstlast: 3,1 kg (Satorius, Göttingen).

Semimikrowaage: Satorius MC 1, Research RC 210 P, Ablesbarkeit: 10 µg innerhalb 60 g, Reproduzierbarkeit: 20 µg innerhalb 60 g, max. Linearitätsabweichung: 20 µg innerhalb 5 g, Wägebereich gesamt: 210 g (Satorius, Göttingen).

TOC-Analysator

TN/TC-Analysator multi N-C (IDC Instrument Development Company, Langewiesen) mit Hochtemperaturofen HTF 540 (Eltra GmbH, Neuss).

Vakuumpumpe MP 050 Z (Eltra GmbH, Neuss).

Gas: Sauerstoff für medizinische Zwecke (DAB 10), (Kraiss & Fiz Gase + Technik, Stuttgart).

Porzellanschiffchen Größe 1, NF (W. Haldenwanger, Technische Keramik GmbH, Berlin).

Zertifiziertes Seesediment (Kalibriersubstanz), C-Gehalt 4,5 % (Canada Centre for Mineral and Energy Technology, Ottawa, Ontario), Calciumcarbonat 99,95 Suprapur® (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt).

8 Literaturverzeichnis

Diese Seite bitte tauschen gegen Seite 114 des Literaturverzeichnisses am Ende des Dokuments.

Diese Seite bitte tauschen gegen Seite 115 des Literaturverzeichnisses am Ende des Dokuments.

Diese Seite bitte tauschen gegen Seite 116 des Literaturverzeichnisses am Ende des Dokuments.

Diese Seite bitte tauschen gegen Seite 117 des Literaturverzeichnisses am Ende des Dokuments.

Diese Seite bitte tauschen gegen Seite 118 des Literaturverzeichnisses am Ende des Dokuments.

Diese Seite bitte tauschen gegen Seite 119 des Literaturverzeichnisses am Ende des Dokuments.

Diese Seite bitte tauschen gegen Seite 120 des Literaturverzeichnisses am Ende des Dokuments.

9 Anhang

9.1 Allgemeine Anmerkung

In diesem Anhang werden der Vollständigkeit halber Untersuchungen beschrieben, die die Methodenentwicklung beeinflussten. Einige der hier untersuchten Verfahren, wie beispielsweise die Flüssig-flüssig-Extraktion oder die Detektion mit dem Lichtstreuendetektor, gingen jedoch nicht in das optimierte PBS-Bestimmungsverfahren ein.

9.2 Extraktion

9.2.1 Flüssig-flüssig-Extraktion

Die Wiederfindungsraten der Standardverbindungen in dotierten Reinstwasserproben nach Flüssig-flüssig-Extraktion mit n-Hexan und Petrolether (40-60) wurden bestimmt. Bei der Extraktion mit Petrolether 40 - 60 wurden höhere Wiederfindungsraten, vor allem für Verbindungen mit $\log P_{OW} > 3$, im Vergleich zur Extraktion mit n-Hexan erhalten

(Abb. 24, Abb. 25). Dies hängt unter Umständen mit der komplexeren Alkanzusammensetzung des Petrolethers zusammen. Allerdings liegen die Wiederfindungen auch hier meist nur zwischen 40 und 70 %. Der Grund, weshalb Octachlorstyrol (OCS) überhaupt nicht wiedergefunden wird, könnte an dessen geringen Löslichkeit und Glaswandeffekten liegen.

9.2.2 Bewertung der Flüssig-flüssig-Extraktion

Die Flüssig-flüssig-Extraktion mit n-Hexan bzw. Petrolether 40 - 60 zeigte nur im mittleren Lipophiliebereich Wiederfindungsraten größer 50 %. Gegenüber der Festphasenextraktion ist der Lösungsmittelverbrauch erheblich größer. Zwar kann bei der Flüssig-flüssig-Extraktion prinzipiell eine gleichzeitige gemeinsame Erfassung der in Lösung befindlichen PBS und der Verbindungen, die an Schwebstoffe gebunden sind erfolgen, doch gibt es keine einfache Möglichkeit, die Extraktionsausbeuten von an Schwebstoffe gebundene PBS zu quantifizieren.

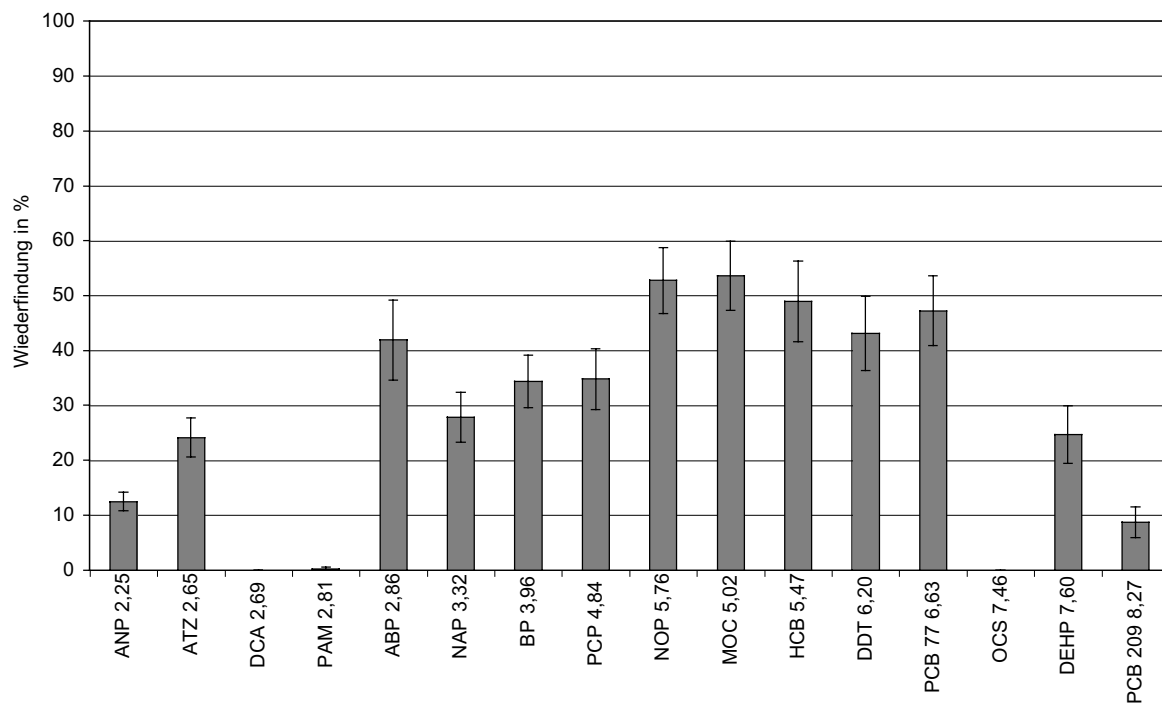


Abb. 24: Wiederfindungen der Standardverbindungen bei Flüssig-flüssig-Extraktion mit n-Hexan (n = 2, n = Anzahl der Parallelbestimmungen über das Gesamtverfahren)

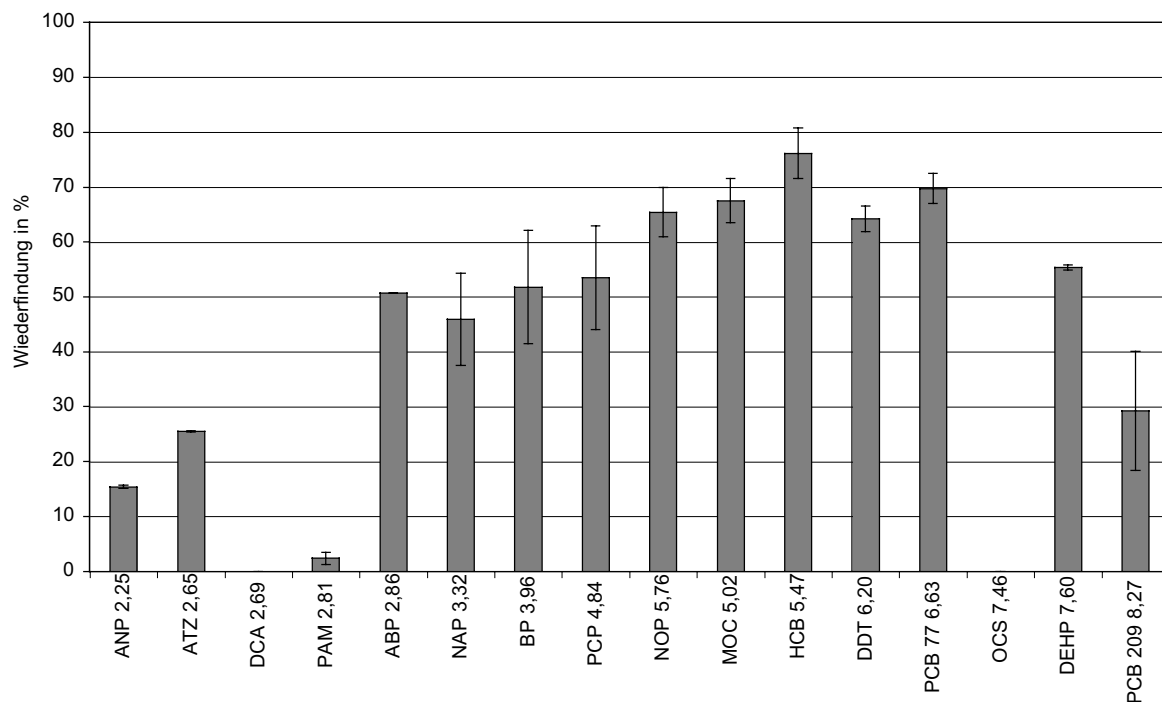


Abb. 25: Wiederfindungen der Standardverbindungen bei Flüssig-flüssig-Extraktion mit Petrolether 40 - 60 (n = 2)

9.3 Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion ist ein chromatographischer Prozess, d. h. die Adsorption und Desorption sind dynamische Vorgänge, die durch variable Randbedingungen, wie z. B. der Fließgeschwindigkeit der Probe durch das SPE-Säulchen beeinflusst wird. Zu berücksichtigende Faktoren bei der Extraktion sind unter anderem die Kapazität des Adsorbentmaterials und das Durchbruchverhalten der Analyten.

Die Festphasenextraktion hat gegenüber der Flüssig-flüssig-Extraktion mehrere methodische Vorteile:

- Geringerer Lösungsmittelbedarf
- Höhere Anreicherungsfaktoren (≥ 1000)
- Keine Probleme bei der Phasentrennung
- Bequemere Handhabung
- Parallele Extraktion von Proben möglich
- Geringerer Zeitbedarf bei der Anreicherung

Allerdings besitzt die Festphasenextraktion auch einige methodische Nachteile. Es kommt immer zu Verlusten durch unvollständige oder irreversible Adsorption auf dem Festphasenmaterial, woraus verringerte Wiederfindungsraten resultieren^{77,78}. Das Adsorptionsverhalten der Analyten auf der Festphase hängt von der Wechselwirkung der Analyten mit dem Festphasenmaterial und der Matrix sowie deren Beschaffenheit ab³⁶. Je stärker z. B. die Wechselwirkung der Analyten mit Schwebstoffen oder Huminstoffen ist, desto schwieriger wird es, die hydrophoben organischen Stoffe aus der Matrix zu extrahieren. Durch Optimierung der Extraktionsbedingungen (z. B. Sorbensmaterial, Säulenmaterial und -geometrie, Anreicherungs geschwindigkeit, Elutionsmittel) kann die Extraktionseffizienz für die Zielanalyten erhöht werden.

So werden durch die Verminderung der Durchflussrate gewöhnlich die Wiederfindungsraten der Analyten erhöht. Zudem hat schon die Art der Konditionierung und die Trocknung Einfluss auf die Anreicherung der Analyten. Zudem können Salze, der pH-Wert, in der Probe vorhandene Lösungsmittel oder Detergentien das Adsorptions- und Desorptionsverhalten der Zielanalyten beeinflussen. Als weiterer Effekt kann die

Wechselwirkungen der Analyten mit der Oberfläche der Säule zu einer verringerten Wiederfindung der Substanzen führen. Aus diesen Gründen ist es prinzipiell unmöglich, völlig identische Extraktionsausbeuten für Analyten einer Mischung mit sehr unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften zu erhalten.

Für die Isolierung und Anreicherung von lipophilen Stoffen aus der Matrix Wasser werden bei der SPE Umkehrphasen (engl.: Reversed-Phase, RP) benutzt. Es handelt sich um oberflächenmodifizierte Kieselgele, bei denen organische Reste über eine Silylethergruppe gebunden sind. Nicht umgesetzte Silanolgruppen können durch eine nachfolgende Reaktion, genannt „endcapping“, deaktiviert werden. Durch das „endcapping“ wird eine Oberfläche geschaffen, deren grundlegende Sorptionseigenschaften nur von der Umkehrphase abhängt und die nur noch minimale polare Wechselwirkungen mit dem Silicasubstrat aufweist. Allgemein lässt sich sagen, dass die Extraktionseffizienz von organischen Analyten aus wässrigen Proben mittels RP-SPE vor allem von der Lipophilie der gesuchten Verbindungen abhängt.

Von RP-Materialien mit kurzer Alkylgruppe (C2; C2(EC); C4; C6) können hochlipophile Verbindungen, die auf C8 bzw. C18-Materialien zu stark zurückgehalten werden, oftmals ohne Schwierigkeit wieder eluiert werden. In der Mehrheit traten bei diesen Phasen jedoch nur Wiederfindungen < 50 % auf (Abb. 26).

Verbindungen mit $\log P_{OW} < 5$ zeigten die geringsten Wiederfindungsraten (zum Teil unter 10 %). Kurze Alkylgruppen schirmen die polaren Reste der Silicaoberfläche weniger stark ab, sodass es zu unspezifischen polaren Wechselwirkungen mit dem Sorbens kommen kann. Dies führt einerseits dazu, dass mit wachsender Kettenlänge meist eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erhalten wird. Andererseits lassen sich auch saure und basische Verbindungen, die im neutralen pH-Bereich weitgehend ionisch vorliegen, bis zu einem gewissen Grad anreichern.

Umkehrphasen mit kurzen Ketten sind somit für die Anreicherung der PBS nicht geeignet. Als obere Schicht in Mehrphasensäulen (z.B. C2/C8 oder C2/C18) finden sie jedoch verstärkt Anwendung.

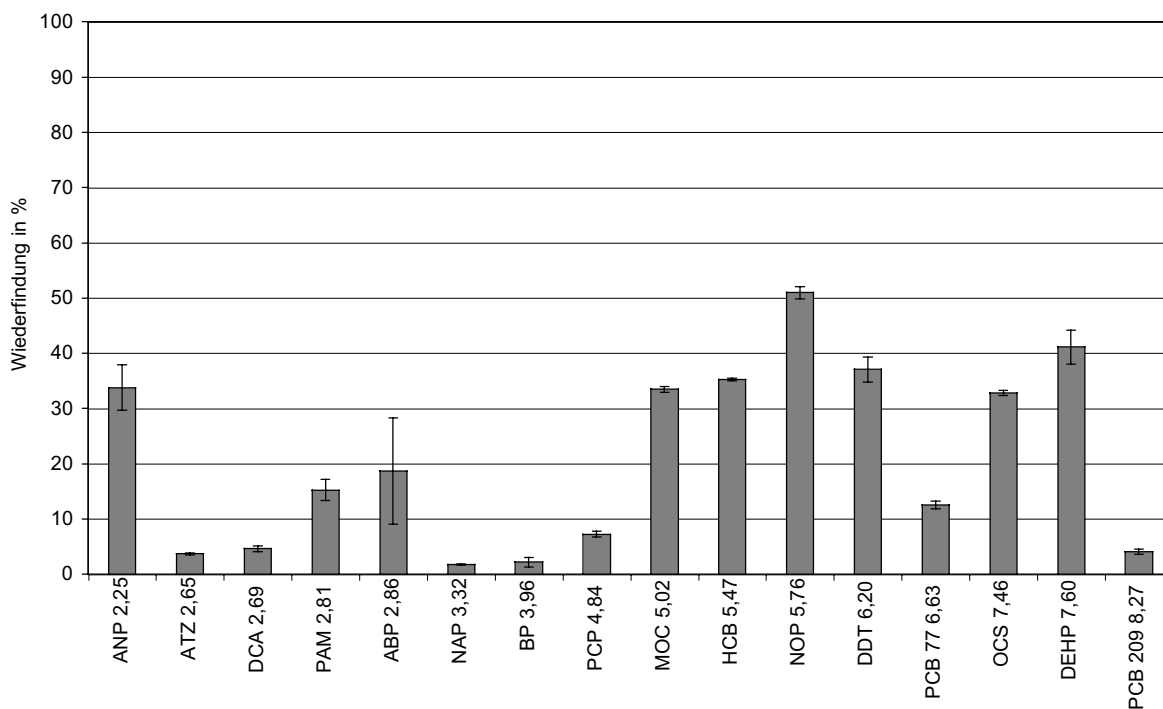


Abb. 26: Wiederfindungsraten der Standardverbindungen nach Anreicherung auf C2, Elution mit MeOH (n = 2)

Es zeigte sich, dass sich die Wiederfindungsraten vor allem bei den weniger lipophilen Standardverbindungen (zwischen 10 und 60 %) und den hochlipophilen (zwischen 10 und 40 %) durch Einsatz der Mischphase deutlich erhöhen ließen (Abb. 27). Allerdings liegen die Wiederfindungsraten, die mit diesen Schichtphasen erreichbar sind, durchschnittlich unter 50 %.

Eine immer häufiger angewendete Alternative zu den RP-Phasen sind Styroldivinylbenzol-Harze. Zwar zeigen hier die weniger lipophilen Standardverbindungen befriedigende Wiederfindungsraten, für hochlipophile Verbindungen sinkt die Wiederfindung jedoch auf ungefähr 20 % und darunter (Abb. 28). Styroldivinylbenzolharz hat demnach eine solch hohe Sorptionskraft, dass sich hochlipophile Verbindungen nicht mehr von der Festphase eluieren lassen.

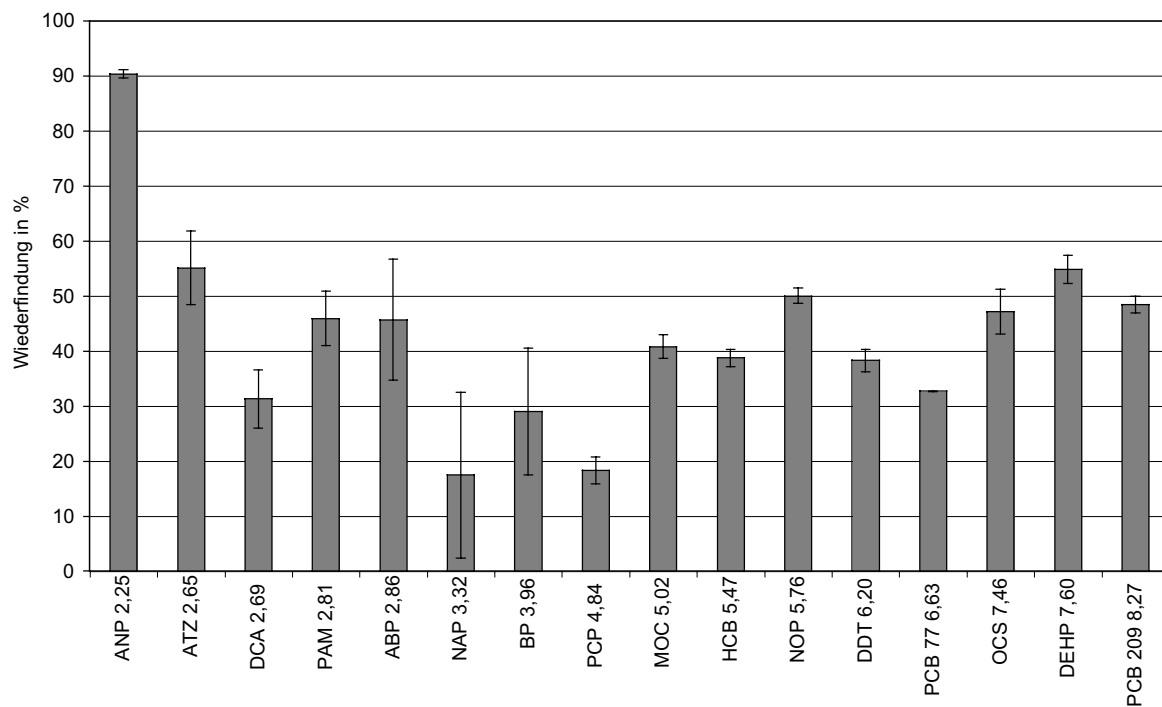


Abb. 27: Wiederfindungsraten der Standardverbindungen nach Anreicherung auf der Schichtphase C2/C18, Elution mit MeOH (n = 2)

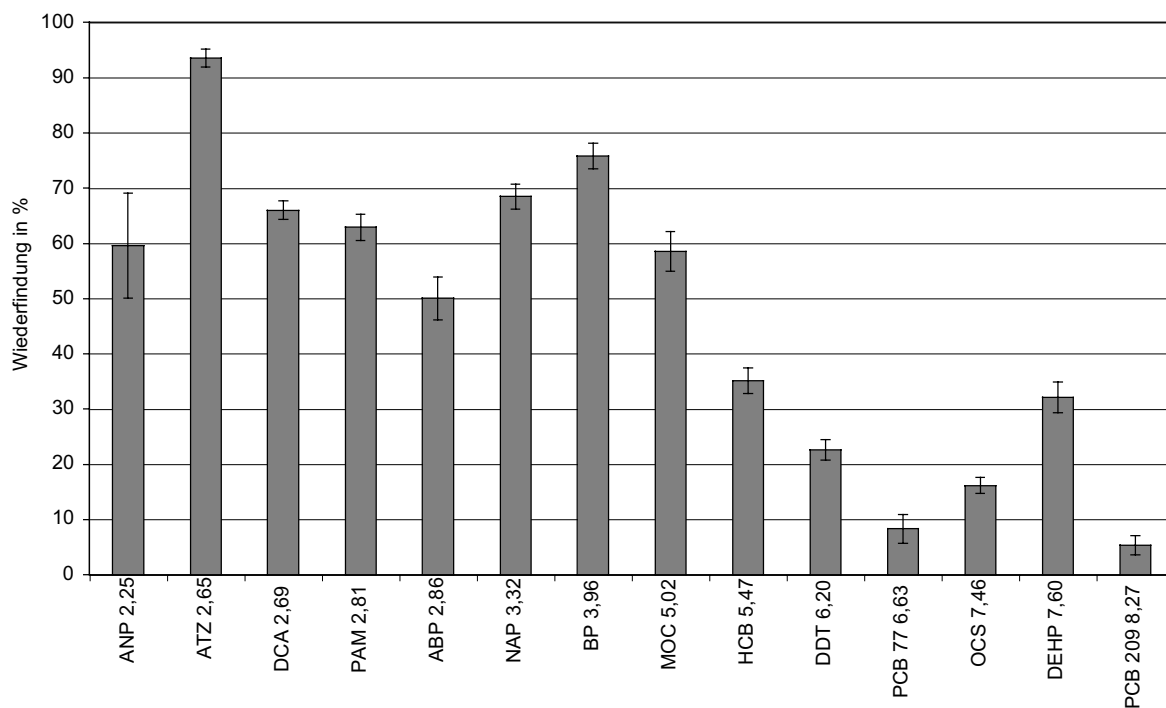


Abb. 28: Wiederfindungsraten der Standardverbindungen nach Anreicherung auf Styroldivinylbenzol-Harz SDB 2, Elution mit Acetonitril (n = 3)

Beim Einsatz einer Schichtphase aus RP-C18 und Styroldivinylbenzol-Harz tritt derselbe Effekt auf (Abb. 29). Alle Verbindungen mit $\log P_{OW} > 5$ zeigen Wiederfindungsraten $< 35\%$.

Unpolare RP-Phasen wie C8, C8(EC), C18 und C18(EC) sind weniger selektiv als solche mit kurzen Alkylgruppen. Polare sekundäre Wechselwirkungen zwischen Analyt und Sorbens sind aufgrund der langen Kohlenwasserstoffketten geringer als bei den anderen Sorbentien. Durch „Endcapping“ lassen sich noch weiter reduzieren. Jedoch bleiben hochlipophile Verbindungen auf diesen C8- bzw. C18-Phasen oftmals irreversibel gebunden. Dies führt zu verringerten Wiederfindungen.

Langkettige RP-Phasen zeigen bei der Anreicherung der Testverbindungen in der Regel bessere Wiederfindungsraten als die getesteten kurzkettigen RP-Materialien (Abb. 30 - Abb. 32).

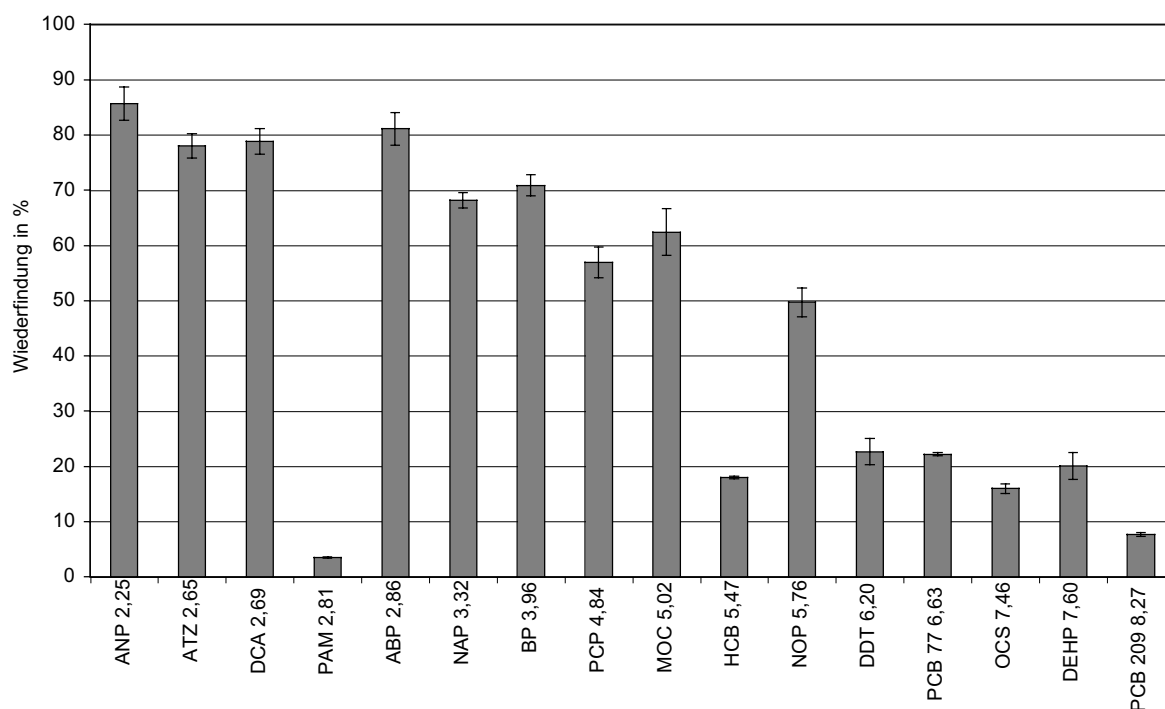


Abb. 29: Wiederfindungsraten der Standardverbindungen nach Anreicherung auf ENV(100 mg)/C 18 (300 mg), Elution mit Acetonitril (n = 3)

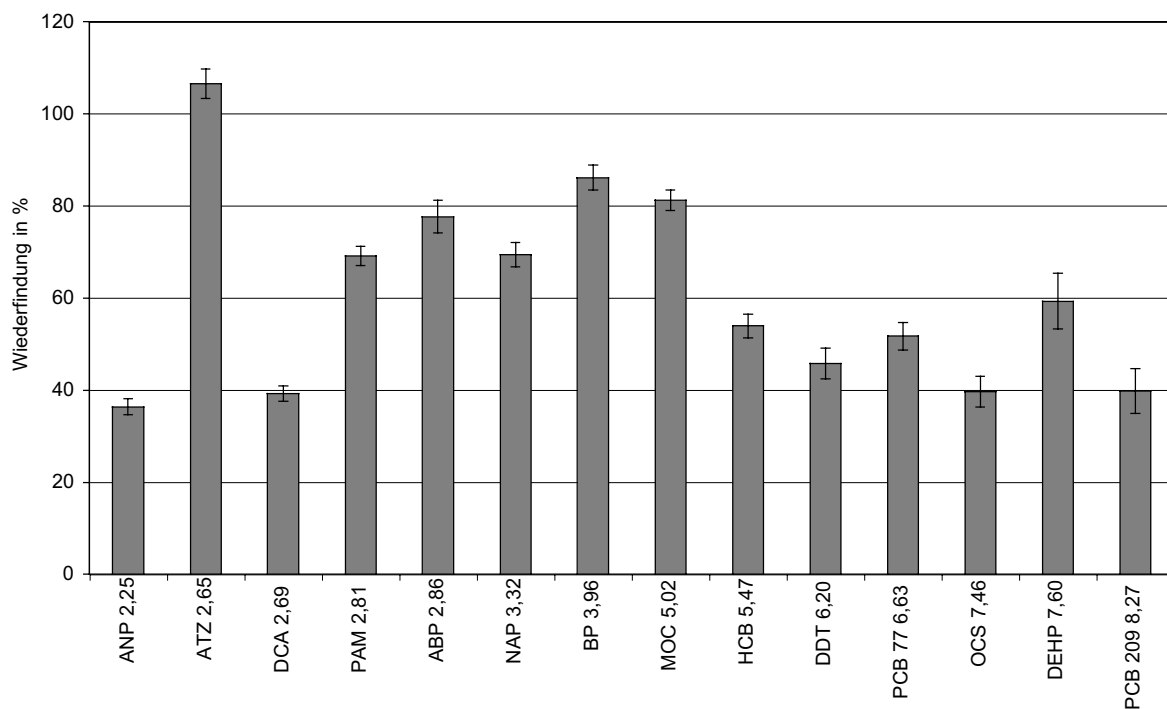


Abb. 30: Wiederfindungsraten der Standardverbindungen nach Anreicherung auf C8 (EC), Elution mit Acetonitril (n = 5)

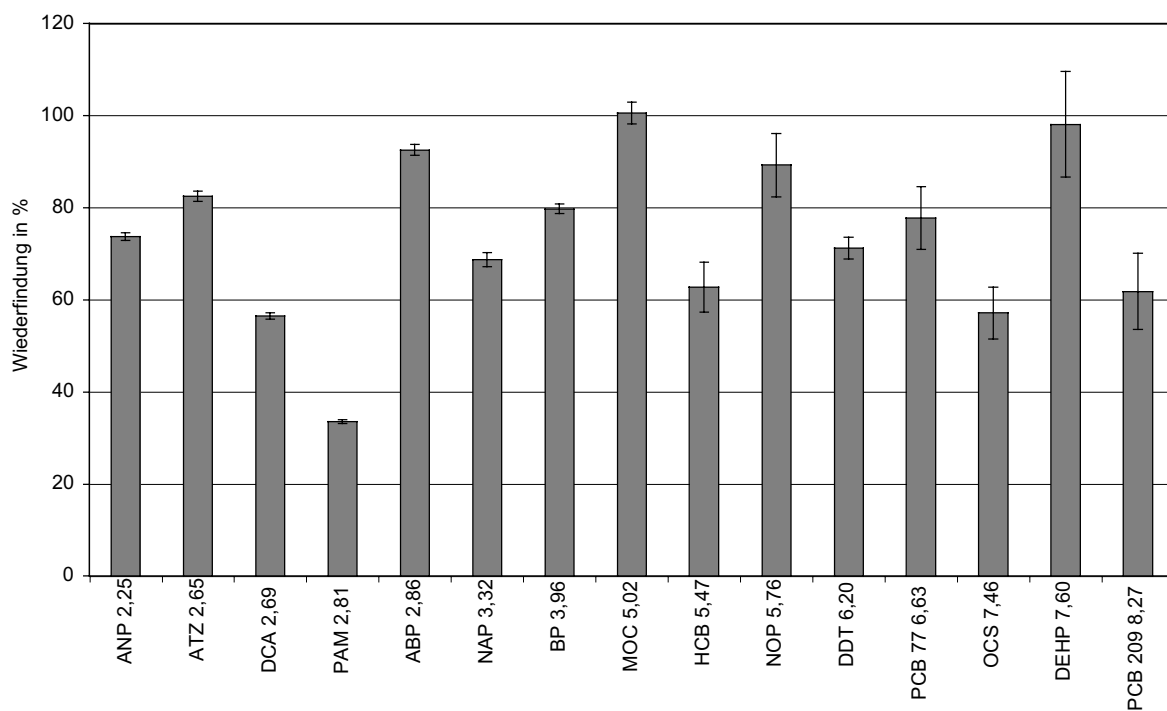


Abb. 31: Wiederfindungsraten nach Anreicherung auf C18 (EC), Elution mit Methanol (n = 4)

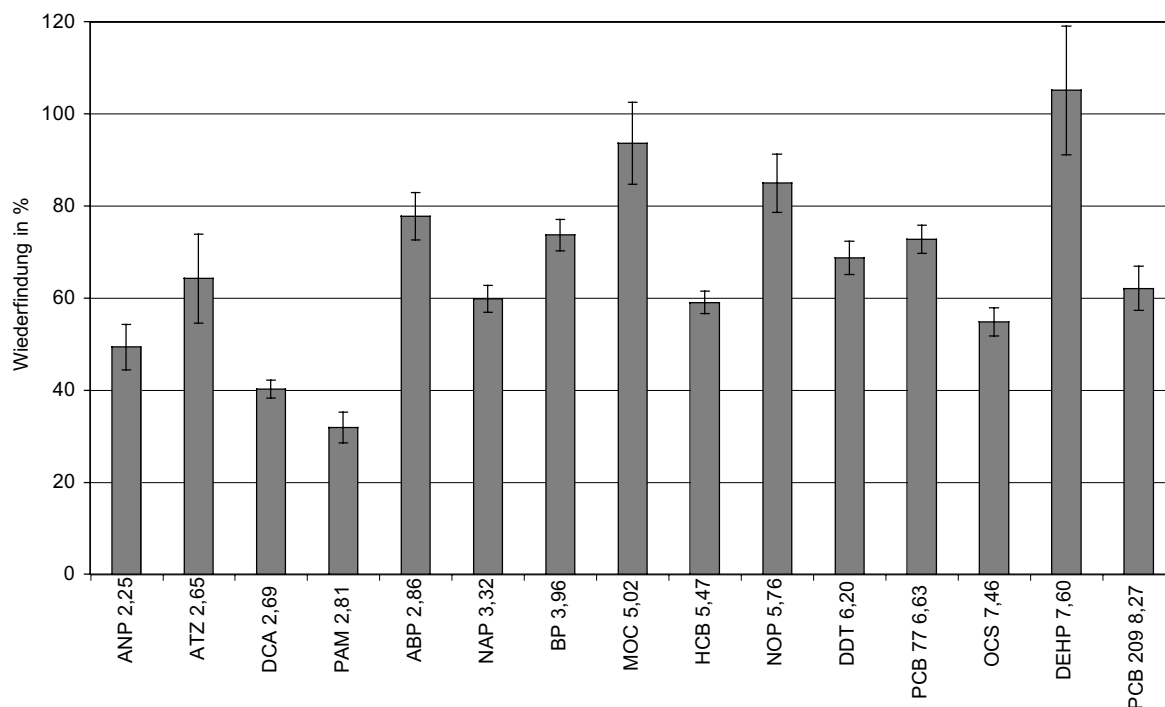


Abb. 32: Wiederfindungsraten nach Anreicherung auf C18 (EC), Elution mit Tetrahydrofuran (n = 4)

Es wird die Tendenz deutlich, dass sich die Wiederfindungsraten der Standardverbindungen im gesamten Lipophiliebereich annähern. Allerdings lassen sich Verbindungen, die im neutralen pH-Bereich als Salze vorliegen mit diesen RP-Phasen nicht anreichern. So findet man 4-Nitrophenol ($pK_a = 7,2$) und Pentachlorphenol ($pK_a = 4,8$) nicht wieder.

Noch höhere Wiederfindungen werden mit C18-Materialien erhalten. Ein Vergleich der Elutionsmittel Methanol (Abb. 31) und Tetrahydrofuran (Abb. 32) zeigt, dass sich bei weniger lipophilen Verbindungen mit Methanol bessere Wiederfindungsraten erzielen lassen, während Tetrahydrofuran ein geeignetes Elutionsmittel für stärker lipophile Stoffe ist. Im Gegensatz zu Methanol besitzt Tetrahydrofuran die nötige Elutionsstärke, um die Standardverbindungen von der Festphase zu eluieren (Abb. 33). Mit Tetrahydrofuran sind deutlich bessere Elutionsergebnisse zu erzielen.

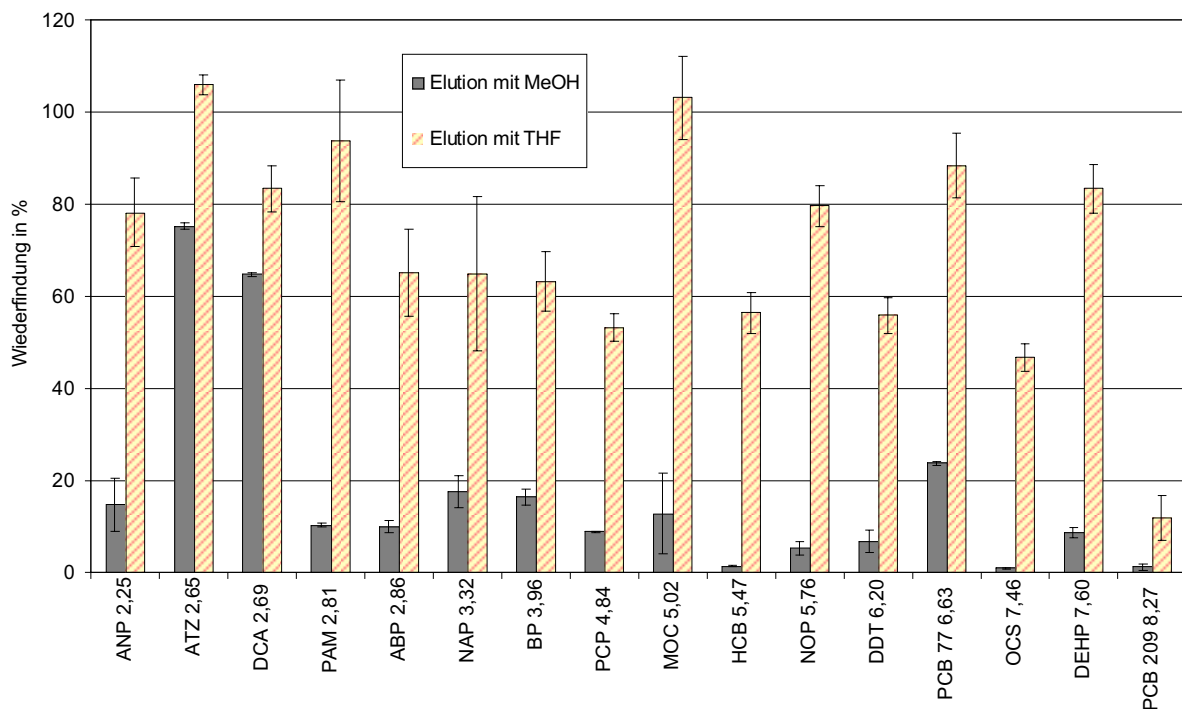


Abb. 33: Wiederfindungsraten der Standardverbindungen nach Anreicherung auf ENV(100 mg)/C 18 (300 mg), Elution mit Methanol bzw. Tetrahydrofuran (n = 3)

9.4 Detektion

9.5 Untersuchungen mit einem Verdampfungslichtstreuendetektor (ELSD)

9.5.1 Grundlagen

Nach der chromatographischen Trennung des Analytgemisches wird der Eluent im Lichtstreuendetektor in eine Verneblerkammer mit einer sogenannten Venturi-Düse geleitet.

Durch die Venturi-Düse wird der Eluentenstrom mit einem Inertgas, üblicherweise Stickstoff oder Helium, in feinste Nebeltröpfchen zerlegt. Je geringer die Tröpfchengröße ist, desto leichter lässt sich der Eluent entfernen. Wichtig für die Nachweisempfindlichkeit und die Reproduzierbarkeit ist zudem eine möglichst schmale Größenverteilung der Tröpfchen. Dies kann durch eine spezielle Verneblerkammer erreicht werden, in der größere Tröpfchen an der Glaswand kondensieren und abgeleitet werden. Die

Tröpfchen gelangen anschließend in eine Verdampferkammer. In der Verdampferkammer wird das Laufmittel thermisch entfernt. Durch die Dampfdruckdifferenz zwischen Eluent und Analyten wird nur das Laufmittel in den gasförmigen Zustand überführt.

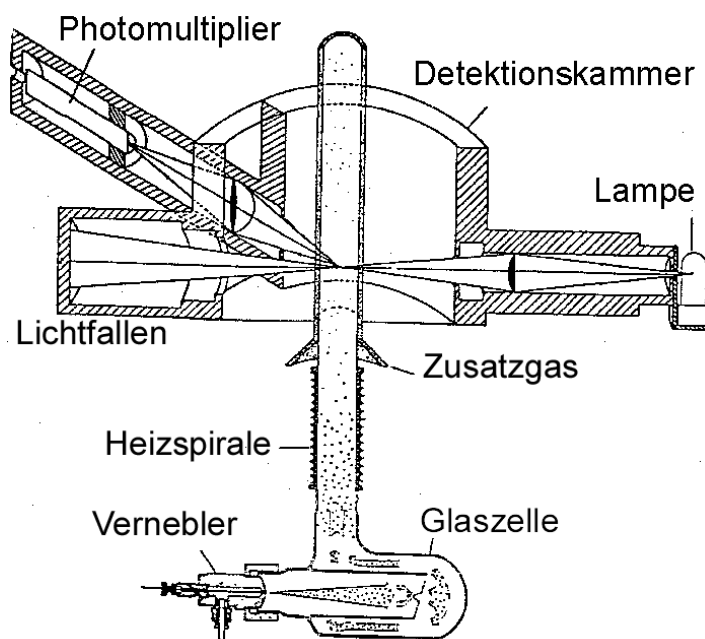


Abb. 34: Funktionsweise eines Lichtstreuendetektors

Die Verdampferkammer ist regelbar, um eine optimale Anpassung an verschiedene Eluenten zu erreichen. Je geringer die Verdampferkammer-Temperatur ist, desto flüchtiger können die Analyten sein, die detektiert werden sollen. Ein Hauptziel bei der Weiterentwicklung der Lichtstreuendetektoren ist deshalb, die Verdampferkammern dahingehend zu optimieren, dass geringere Verdampferkammer-Temperaturen verwendet werden können. In der Zwischenzeit reichen je nach Eluent Temperaturen zwischen 25 - 55 °C zur Evaporation aus. Dies wirkt sich zudem günstig auf das Kristallisationsverhalten aus. Je größer die gebildeten Kristalle sind, desto intensiver ist die Lichtstreuung. Außerdem streuen feste Partikel das Licht stärker als Tropfen gleicher Dimension. Allerdings verschlechtert sich die Nachweisempfindlichkeit umso mehr, je flüchtiger die Analyten sind.

Die Probenmoleküle sollen in der Verdampferkammer nach Entfernung des Eluenten als Mikropartikel oder -tropfen zurückbleiben und werden durch einen konzentrisch zugeführten Gasstrom (ca. 2 ml/min) in die Detektionskammer weitergeführt. Der vom Verneblergas unabhängige Gasstrom sorgt für eine Umhüllung der Partikel bzw. Tröpfchen nach dem Venturiprinzip und verhindert Ablagerungen von Analyten auf der Messzelle. Zusätzlich werden die Partikel bzw. Tröpfchen im Zentrum der Messzelle fokussiert. Da nur die Probentropfen über die Lichtstreuung erfasst werden, kann der Lichtstredetektor problemlos im Gradientenbetrieb betrieben werden. Voraussetzung allerdings ist, dass das Eluentengemisch vollständig verdampfbar ist.

In der Detektionskammer sind im rechten Winkel zur Eintrittsöffnung eine Lichtquelle und ein Photomultiplier angebracht. Diese stehen in einem Winkel von 120° zueinander. Als Lichtquelle wird entweder ein Laser oder eine Wolframfadenlampe verwendet. Das Licht wird durch eine Collimatorlinse auf das Zentrum der Messzelle fokussiert. Falschlicht wird durch Lichtfallen ausgefiltert. Das von den Mikrotropfen gestreute Licht trifft auf den Photomultiplier, das Signal wird verstärkt und einer entsprechenden Auswerteeinrichtung zugeführt.

Die Intensität des gestreuten Lichtes ist in erster Linie eine Funktion der Größe der Mikropartikel. Rayleigh-Streuung findet statt, wenn das Verhältnis des Radius r der Partikel zu der Wellenlänge λ des einfallenden Lichts kleiner als 0,05 ist. In diesem Fall ist das Verhältnis der gestreuten Lichtintensität I_d zur Intensität des einfallenden Lichts I_0 proportional zu r^6 . Mie-Streuung tritt auf, wenn $0,05 < r/\lambda < 1$ ist. In diesem Fall ist das Verhältnis I_d/I_0 proportional r^4 . Für $r/\lambda > 1$ gelten die Gesetze der Reflexion und Refraktion. I_d/I_0 ist dann proportional r^2 . Aus diesen Zusammenhängen wird ersichtlich, dass eine möglichst homogene Größenverteilung der Mikropartikel bzw. -tröpfchen erreicht werden sollte.

Da die Analytkonzentration die Größe, nicht aber die Anzahl der Mikrotropfen beeinflusst, ist das Signal die Messgröße für die Probenmenge.

Für die Beziehung zwischen der Peakfläche A des Detektorsignals und der Masse m des Analyten gilt:

$$A = k \cdot m^b \text{ (Gl. 10)}$$

Die Werte der Konstanten k und b sind von einer Reihe experimenteller Bedingungen abhängig, z. B. der Tröpfchen- und Partikelgröße, der Verdampfungstemperatur, der Art der mobilen Phase und von dessen Fluss. Zudem geht noch der Brechungsindex und der Absorptionskoeffizient der Tropfen in die Funktion ein, sodass der Signal-Response auch abhängig von der Art der Analyten ist. Die Signalfäche ist somit **nicht** linear abhängig von der Masse des Analyten. Der Wert für b variiert beim ELS-Detektor zwischen 0,9 und 1,8.

Nach der Theorie sollte der Lichtstreuendetektor (ELSD) aufgrund seines Funktionsprinzips mehrere Vorzüge gegenüber anderen HPLC-Detektoren, wie z. B. dem UV-Detektor, besitzen:

- Die Signalintensität sollte in erster Linie abhängig von der Masse der Analytmoleküle sein, sodass eine massenproportionale Detektion von organischen Verbindungen unterschiedlichster Struktur möglich sein sollte.
- Der Detektor sollte über weite Bereiche linear arbeiten.
- Es sollten sehr steile Lösungsmittelgradienten möglich sein, wodurch die Analysenzeiten deutlich reduziert werden könnten.

Der Dampfdruck der Analyten sollte dabei deutlich kleiner als der der Eluenten sein, damit eine empfindliche Detektion ermöglicht wird. Bei Verbindungen mit extrem geringem Dampfdruck können sogar Eluenten eingesetzt werden, deren Dampfdrücke deutlich höher liegen als die in der HPLC gewöhnlich verwendeten organischen Elutionsmittel. So kann zur Polymer-Analytik 1,2,4-Trichlorbenzol (Dampfdruck (20 °C) 130 Pa, Sdp. 213 °C, log P_{OW} = 4,02) als Eluent eingesetzt werden.

9.5.2 Betriebsparameter des Lichtstreuendetektors SEDEX 55 (S.E.D.E.R.E.)

a) Test Grundrauschen

Verdampfungstemperatur 46 °C, Druck 1,9 bar, Grundrauschen 20 mV.

b) Test Hintergrundrauschen (Streulicht)

Tab. 8: Hintergrundrauschen des Lichtstreuendetektors

Signalverstärkung	Signal (erwartet)	Signal (gemessen)
1	0	0
6	1	1
7	10	2
8	40	4
9	70	9
10	90	21
11	120	49
12	160	112

c) Test Solvent bzw. Säulenrauschen

Ohne Säule 25 mV (Fluss 1ml/min)

Mit Säule 114mV (Fluss 1ml/min)

9.5.3 Response-Untersuchungen

Für die Response-Untersuchungen mit dem Lichtstreuendetektor wurden Standardverbindungen eingesetzt, die einen breiten Lipophiliebereich überstreichen. Dabei ist die Tendenz festzustellen, dass Verbindungen mit größeren $\log P_{OW}$ -Werten meist niedrige Dampfdrücke besitzen, denn hochlipophile Verbindungen besitzen in der Regel eine größere molare Masse und damit eine geringe Flüchtigkeit. Dies wird z. B. bei den PCB-Kongeneren deutlich, deren die Dampfdrücke mit steigendem Substitutionsgrad sukzessiv sinken. Deshalb ist vor allem bei den Standardverbindungen mit hohen $\log P_{OW}$ -Werten die Differenz zwischen deren Dampfdrücken und dem des Eluenten besonders groß.

Tab. 9: Dampfdrücke der Standardverbindungen

Substanz	M in g/mol	log Pow	Dampfdruck in Pa
Acetonitril	41,1		$9,7 \cdot 10^{-3}$ (20 °C)
Wasser	18,0		$2,3 \cdot 10^3$ (20 °C)
4-Nitrophenol	139,1	2,18 (pH=3)	$5,4 \cdot 10^{-3}$ (25 °C)
1-Aminonaphthalin	143,2	2,25	-
Atrazin	215,7	2,65	$4 \cdot 10^{-5}$ (20 °C)
2,3-Dichloranilin	162,0	2,69	-
Parathion-methyl	263,2	2,81	$2 \cdot 10^{-4}$ (20 °C)
2-Acetylnaphthalin	170,2	2,85	-
4-Aminobiphenyl	169,2	2,86	-
Naphthalin	128,2	3,32	$1 \cdot 10^1$ (25 °C)
γ -HCH (Lindan)	290,8	3,63	$7,3 \cdot 10^{-3}$ (25 °C)
Biphenyl	154,2	3,96	$7 \cdot 10^0$ (25 °C)
Methoxychlor	345,7	5,02	-
Pentachlorphenol	266,3	4,84 (pH=0,8)	$7,4 \cdot 10^{-3}$ (25 °C)
4-n-Nonylphenol	220,4	5,76	$3 \cdot 10^{-1}$ (25 °C)
DEHP	390,6	5,11	$1,9 \cdot 10^{-3}$ (25 °C)
Hexachlorbenzol	284,8	5,47	$2,5 \cdot 10^{-3}$ (25 °C)
p,p'-DDT	354,5	5,96	$2,5 \cdot 10^{-5}$ (25 °C)
Octachlorstyrol	379,7	6,29	$1,5 \cdot 10^{-2}$ (25 °C)
PCB 77	292,0	6,63	$1,8 \cdot 10^{-4}$ (25 °C)
PCB 209	498,7	8,27	$2,0 \cdot 10^{-7}$ (25 °C)

Da die Kristallisation entscheidend von der Differenz der Dampfdrücke zwischen dem zu verdampfenden Eluenten und dem Analyten abhängt, zeigen Verbindungen mit hohen log P_{OW}-Werten meist höhere Signalempfindlichkeiten bei der Lichtstreuungsdetektion.

Um den Einfluss der Betriebsparameter auf die Empfindlichkeiten des Detektors gegenüber den einzelnen Standardverbindungen zu untersuchen, wurden Messungen bei Variation der Verstärkung, der Verdampfungstemperatur und der Zusammensetzung des Eluenten durchgeführt.

a) Variation der Verstärkung

Durch Variation des Geräteparameters „Verstärkung“ (engl.: gain) kann das elektronische Detektorsignal verstärkt werden. Gleichzeitig steigt dabei auch das Grundrauschen des Detektors an.

Tab. 10 Signalintensitäten der Standardverbindungen bei Variation der Verstärkung

	Verstärkung (Signalintensität in mV·s)						
	6	7	8	9	10	11	12
ABP	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	29,61
ANP	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	31,77
NIP	0,00	0,00	1,67	4,47	11,26	24,71	64,42
NOP	0,00	0,00	2,77	7,99	24,50	54,09	145,25
PAM	0,00	1,56	5,08	12,44	35,34	96,18	225,67
PCP	0,00	1,81	6,45	19,13	47,62	133,74	310,45
MOC	2,15	7,61	22,07	61,16	156,44	361,01	859,58
ATZ	3,27	18,79	54,28	161,20	395,05	931,94	2096,89
DEHP	6,80	19,94	63,23	160,89	383,19	535,32	2415,56

Alle Standardverbindungen ließen sich bei der maximalen Verstärkung von 12 am empfindlichsten detektieren, d. h. in diesem Fall wurden die größten Detektorsignale erhalten. Aminobiphenyl (ABP) und Aminonaphthalin (ANP) zeigten sogar erst bei der maximalen Verstärkung von 12 ein messbares Detektorsignal. Nonylphenol (NOP) wurde erst bei einer Verstärkung von 8 detektiert. Alle Untersuchungen wurden bei einer Verstärkung von 12 durchgeführt.

Es zeigte sich zusätzlich, dass weder die Standardverbindungen massenproportional detektiert werden, noch die Verhältnisse der Signalflächen der Standardverbindungen zueinander bei Variation der Verstärkung konstant bleiben. Am deutlichsten wird dies beim Vergleich zwischen den Signalen von Diethylhexylphthalat (DEHP) und Atrazin (ATZ). Atrazin lässt sich im Vergleich zu DEHP bei der Verstärkung 11 empfindlicher detektieren, bei der Verstärkung 12 jedoch DEHP.

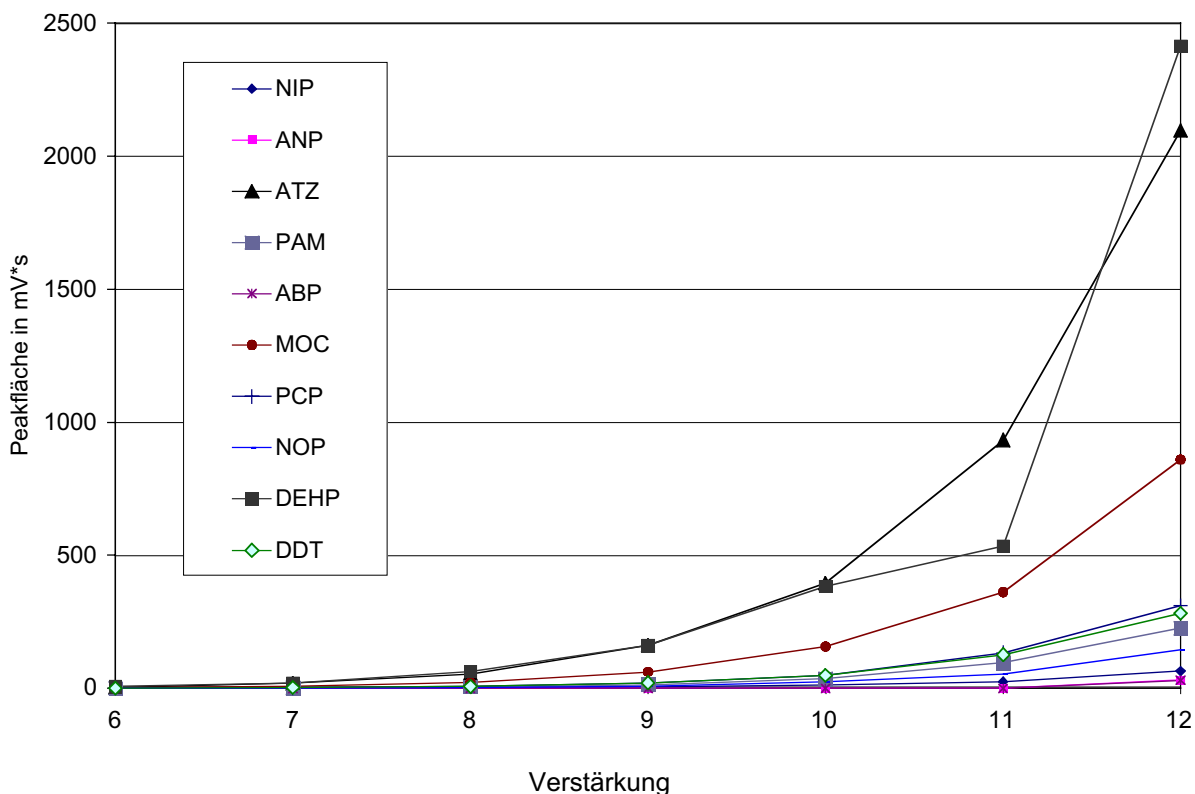


Abb. 35: Response des Lichtstredetektors bei Variation der Verstärkung

b) Variation der Eluentzusammensetzung

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Zusammensetzung der mobilen Phase bei der HPLC auf die Lichtstredetektion hat, wurden Response-Untersuchungen der Standardverbindungen bei 3 unterschiedlichen Eluentzusammensetzungen vorgenommen. Es zeigte sich auch hier die allgemeine Tendenz, dass sich die lipophileren Standardverbindungen mit höherer Empfindlichkeit detektieren lassen als die Verbindungen mit kleineren $\log P_{OW}$ -Werten. Ausnahmen bilden die Verbindungen Atrazin (ATZ) und Parathion-methyl (PAM), die sich trotz niedrigerer $\log P_{OW}$ -Werten relativ empfindlich detektieren lassen. Dies liegt wohl daran, dass diese Substanzen niedrige Dampfdrücke besitzen. Ähnliches gilt für die lipophileren Verbindungen Hexachlorbenzol (HCB) und Octachlorstyrol (OCS), die sich offensichtlich wegen ihrer höheren Dampfdrücke nicht so empfindlich mit dem ELSD detektieren lassen. Einige Verbindungen zeigen zudem

Responseunterschiede bei Variation der Eluentzusammensetzung, was den Einsatz des Lichtstreuendetektors im Gradientenbetrieb einschränkt.

Tab. 11: Signalintensitäten des Lichtstreuendetektors in mV·s bei Variation der Eluentzusammensetzung

(Konzentration der Standardverbindungen: 10 mg/l; Injektionsvolumen: 50 µl; Fluss 0,8 ml/min; Verdampfungstemperatur: 30 °C; Verstärkung: 12)

	Eluentzusammensetzung		
	50 % ACN	80 % ACN	100 % ACN
NIP	731	1149	1040
ANP	1509	1030	1137
ATZ	6987	7264	6641
DCA	840	992	991
PAM	2069	2123	1767
ACNP	100	93	133
ABP	1003	1489	1134
NAP	404	525	645
HCH	760	979	1050
BP	1031	1368	1339
PCP	665	636	652
MOC	6257	6658	6319
HCB	720	813	717
NOP	3072	3798	3132
DDT	4637	5945	6064
PCB77	3822	5445	5445
OCS	995	1173	1272
DEHP	17094	16536	16193
PCB 209	3845	3946	4196

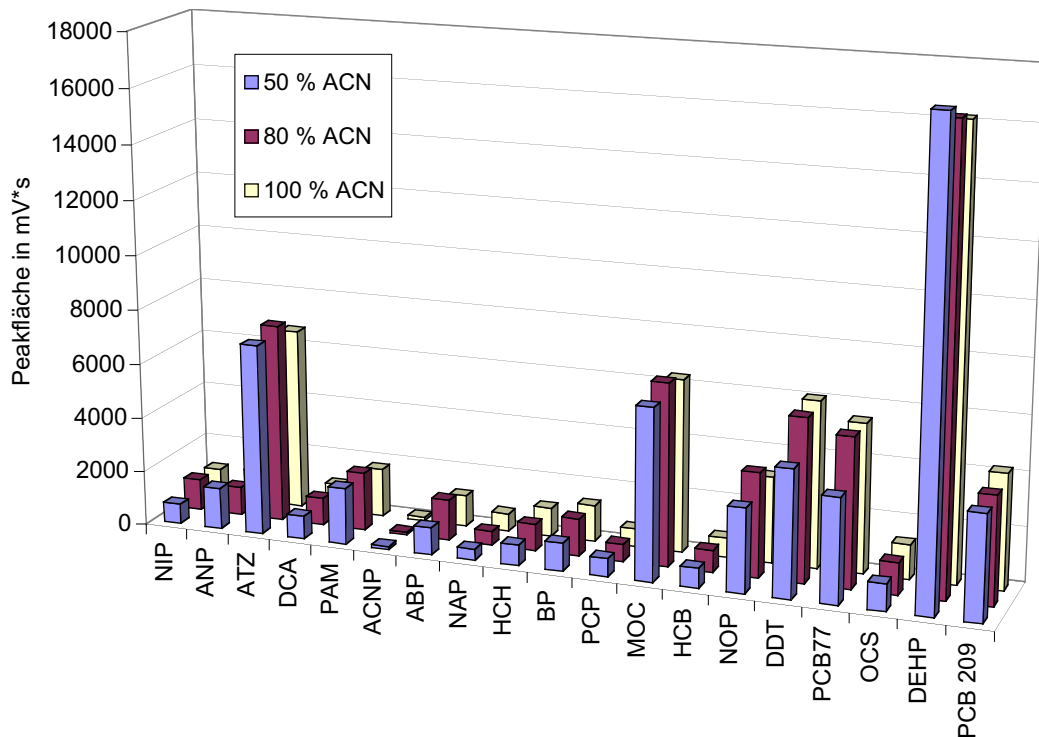


Abb. 36: Response des ELSD gegenüber den Standardverbindungen bei Variation der Eluentzusammensetzung

c) Variation der Verdampfungstemperatur

Der Einfluss der Verdampfungstemperatur auf die Detektorempfindlichkeit wurde bei 30, 40 und 50 °C untersucht. Die zu erwartende Signalerhöhung bei Reduktion der Verdampfungstemperatur wurde bei allen Standardverbindungen gefunden. Meist verdoppelte sich die Signalintensität bei Verminderung der Verdampfungstemperatur von 50 auf 30 °C. Für Atrazin (ATZ), Parathion-methyl (PAM) und PCB 77 wurde die Empfindlichkeit durch diese Maßnahme sogar um den Faktor 3 - 5 gesteigert. Dies bedeutet, dass die Messungen mit dem ELSD in der Regel bei möglichst niedrigen Verdampfungstemperaturen durchgeführt werden sollten. Da die Detektorempfindlichkeit entscheidend von der Verdampfungstemperatur abhängt, kann die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse reduziert sein, da die Verdampfungstemperatur mit dem SEDEX 55 einerseits schwer zu kontrollieren, andererseits schwierig zu regulieren ist.

Tab. 12: Signalintensitäten in mV·s in Abhängigkeit der Verdampfungstemperatur
 (Konzentration der Standardverbindungen: 10 mg/l; Injektionsvolumen: 50 µl;
 Eluent: 5mM NH₄CH₃COO/ACN 50:50, Fluss 0,8 ml/min; Verstärkung: 12)

	Verdampfungstemperatur		
	50 °C	40 °C	30 °C
NIP	515	780	1040
ANP	624	955	1137
ATZ	1857	5338	6641
DCA	593	805	991
PAM	306	463	1767
ACN	63	67	133
ABP	659	927	1134
NAP	342	513	645
HCH	577	855	1050
BP	845	1089	1339
PCP	379	530	652
MOC	4337	5810	6319
HCB	464	606	717
NOP	610	1018	3132
DDT	1249	3928	6064
PCB77	915	2527	5445
OCS	706	965	1272
DEHP	12724	14258	16193
PCB 209	3333	3754	4196

Bei maximaler Verstärkung wurden Kalibriergeraden von Nitrophenol (NIP), Atrazin (ATZ), Parathion-methyl (PAM), 4-Aminobiphenyl (ABP), Pentachlorphenol (PCP), Methoxychlor (MOC), 4-n-Nonylphenol (NOP) und DDT im Bereich von 50 - 200 mg/l aufgenommen.

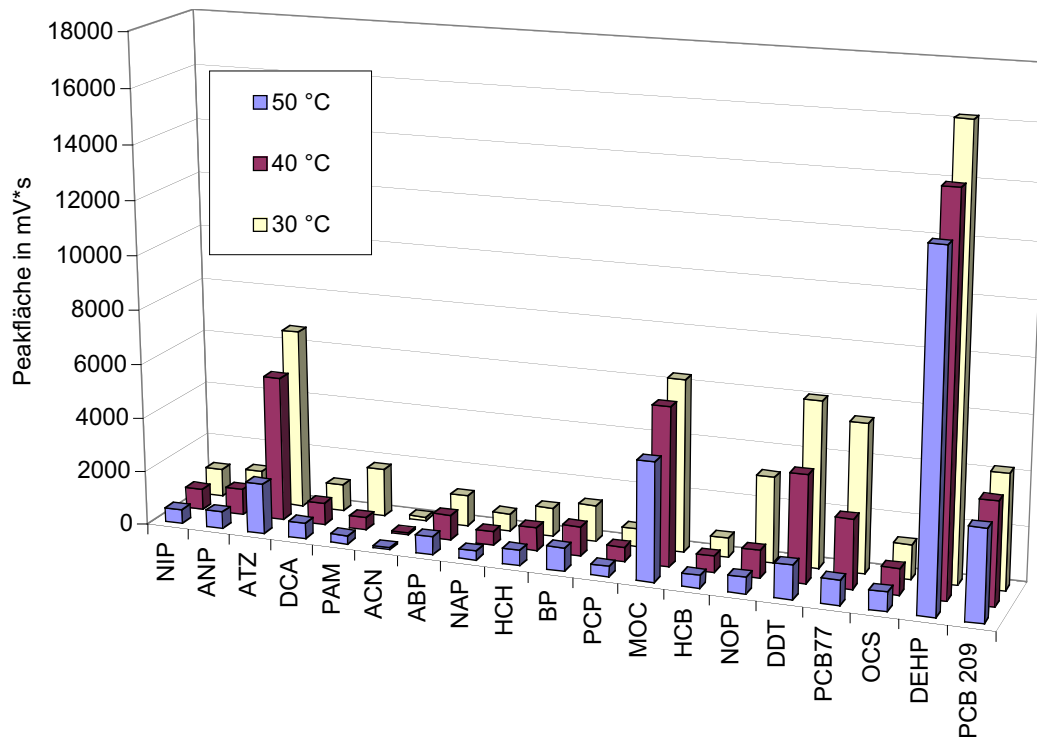


Abb. 37: Response des ELSD gegenüber den Standardverbindungen bei Variation der Verdampfungstemperatur

Tab. 13: Signalintensitäten der Lichtstredetektors in mV·s in Abhängigkeit von der Konzentration der Standardverbindungen

Konz. in mg/l	NIP	ATZ	PAM	ABP	MOC	PCP	NOP	DDT	DEHP
50	1051	6154	1821	2597	7390	1019	1364	3856	2929
75	2520	9212	3965	5137	13243	1407	3686	8090	6141
100	3864	11272	6096	6111	16674	1603	6483	15079	9866
125	4000	13001	7999	8269	18403	1653	9726	18935	14482
150	4377	14985	10042	10122	20385	1901	14453	21609	19759
175	4727	16126	11603	10978	21547	1965	16967	23101	36882
200	5008	16766	13444	12720	23184	2137	18137	24935	48617

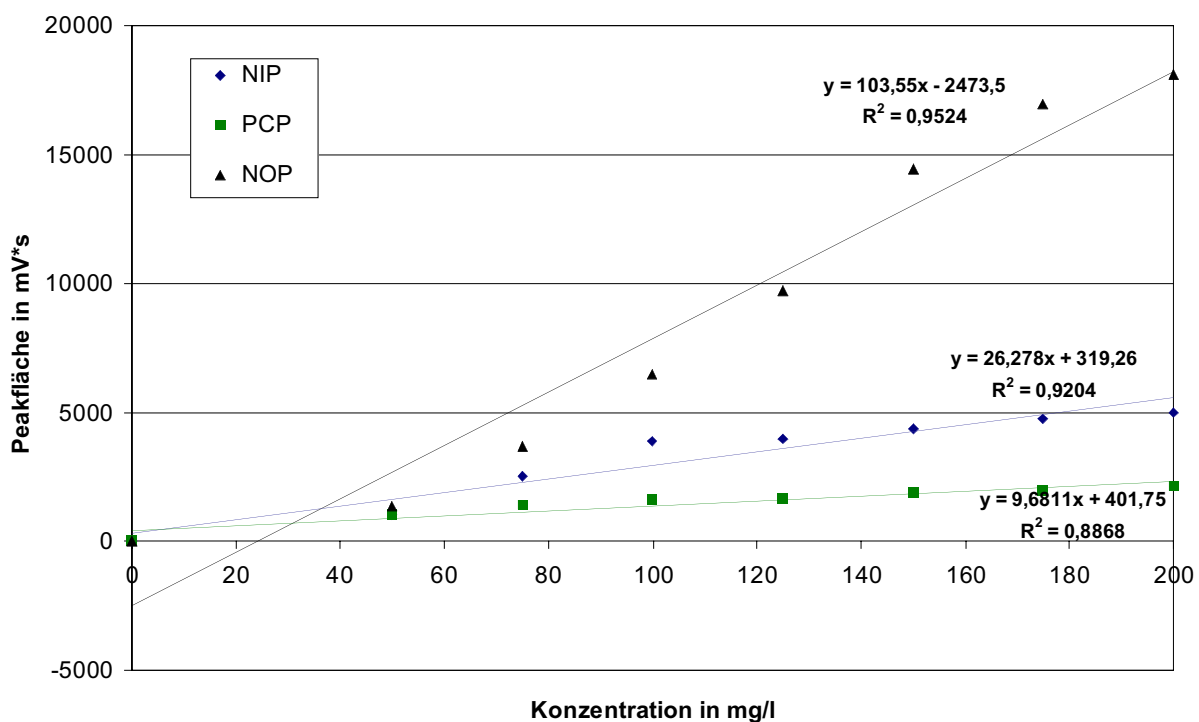


Abb. 38: Kalibrierfunktionen von Nitrophenol (NIP), Pentachlorophenol (PCP) und 4-n-Nonylphenol (NOP)

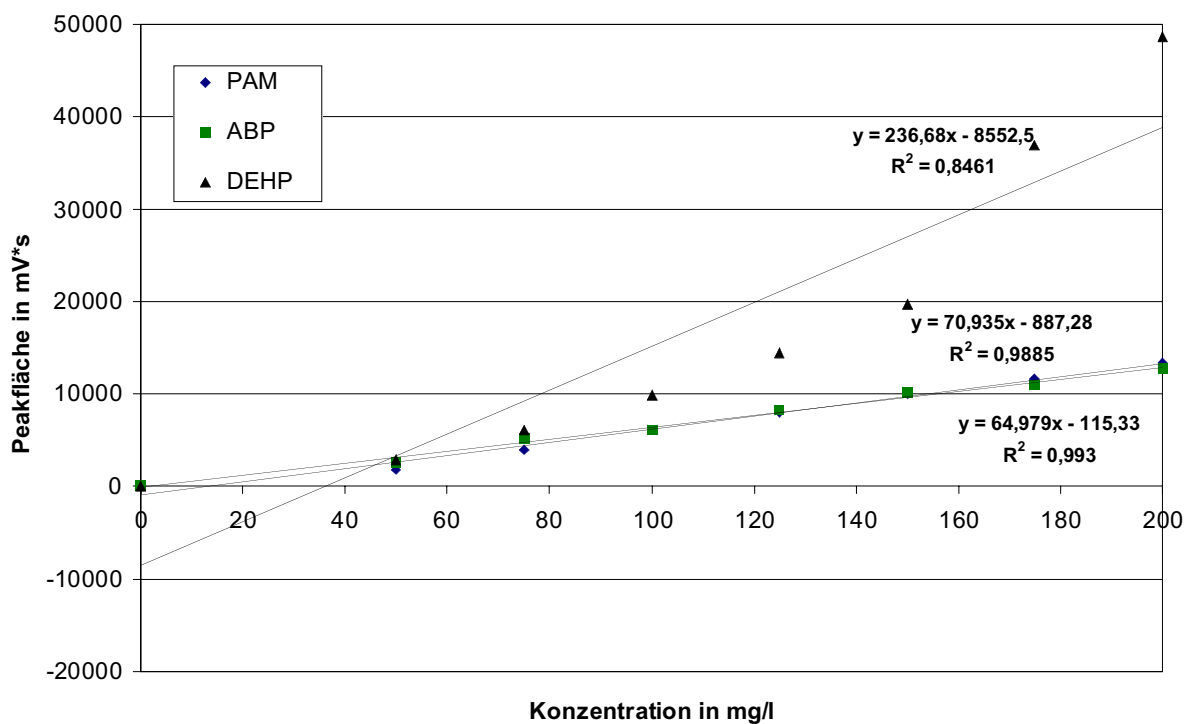


Abb. 39: Kalibrierfunktionen von Parathion-methyl (PAM), 4-Aminobiphenyl (ABP) und Diethylhexylphthalat (DEHP)

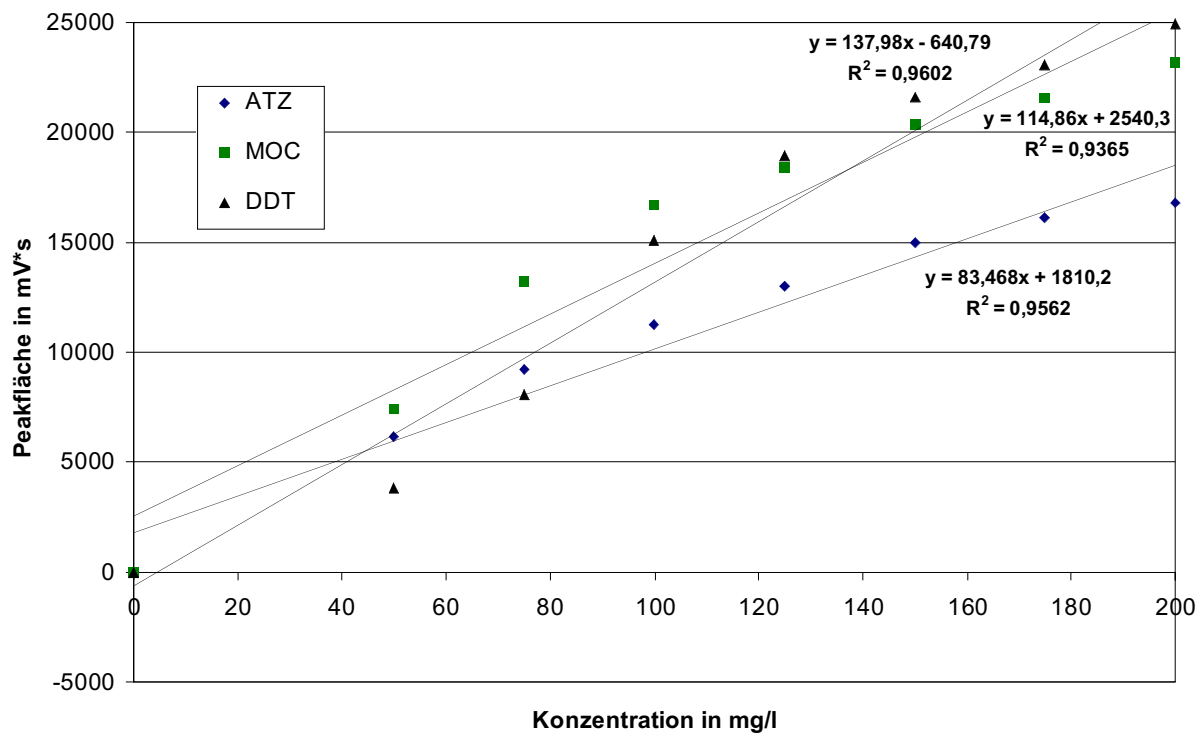


Abb. 40: Kalibrierfunktionen von Atrazin (ATZ), Methoxychlor (MOC) und DDT

Tab. 14: Kalibrierfunktionen der Standardverbindungen

Verbindung	Kalibrierfunktion	Korrelationskoeffizient R^2
DEHP	$y = 236,68x - 8552,5$	0,8461
PCP	$y = 9,6811x + 401,75$	0,8868
NIP	$y = 26,278x + 319,26$	0,9204
MOC	$y = 114,86x + 2504,3$	0,9365
NOP	$y = 103,55x - 2473,5$	0,9524
DDT	$y = 137,98x - 640,79$	0,9602
ATZ	$y = 83,468x + 1810,2$	0,9636
ABP	$y = 64,979x - 115,33$	0,993
PAM	$y = 70,935x - 887,28$	0,9978

9.5.4 Diskussion der Messergebnisse

Der Verdampfungslichtstredetektor wurde in der Analytik von Zuckern- und Zuckerderivaten, Fetten und Ölen, Lipiden und Phospholipiden, Detergentien, Polymeren und Steroiden, also von Verbindungen mit relativ großen molaren Massen, erfolgreich eingesetzt. Er ist ein äußerst empfindlicher Detektor für viele schwer flüchtige Verbindungen und kann diese bis in den ng-Bereich (absolut) detektieren.

Der ELSD ist in seiner Handhabung nicht unproblematisch. Er zeigte sich äußerst empfindlich gegenüber Verunreinigungen. So traten häufig plötzlich und nicht reproduzierbar Störpeaks auf, obwohl beim vorgeschalteten Diodenarraydetektor (DAD) kein Signal beobachtet wurde. Des Weiteren stieg bisweilen das Basislinienrauschen stetig an, auch dann wenn keine Trennsäule vorgeschaltet war und die HPLC mit reinem organischen Lösungsmittel (Reinheit: HPLC gradient grade) betrieben wurde. Erst durch häufiges Spülen und langes Ausheizen des Verdampferrohrs über mehrere Stunden und mehrmalige Reinigung der Zerstäuberdüse reduzierte sich das Basislinienrauschen auf ein akzeptables Maß. Zudem zeigten zum Teil die Analytsignale ein extrem starkes Tailing, was die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse verschlechtert.

Der Detektor ist sehr empfindlich gegenüber Veränderungen der Betriebsparameter, wie Eluentzusammensetzung, Vernebler- bzw. Verdampfer Temperatur. Viele Verbindungen, die aufgrund ihres Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten in das PBS-Fenster fallen, sind mit dem Verdampfungslichtstredetektor nur schlecht detektierbar. Der Grund liegt wahrscheinlich in der Tatsache, dass die Differenz der Dampfdrücke der Standardverbindungen und der mobilen Phase zu gering ist. Des Weiteren zeigten die Standardverbindungen untereinander sehr unterschiedliche Messempfindlichkeiten. Es ließen sich keine zufriedenstellenden Kalibriergeraden der Standardverbindungen erstellen, d. h. es wurde keine Linearität zwischen der Konzentration der Standardverbindungen und dem Detektorsignal (Response) gefunden.

9.6 GC-FID, GC-ECD, GC-MS

Bei der Gaschromatographie können ausschließlich Verbindungen mit ausreichender thermischer Stabilität und nicht zu hohen Siedepunkten erfasst werden, doch dürften die meisten PBS wohl GC-gängig sein. Eine Reihe der ausgewählten Standardverbindungen ist jedoch ohne vorherige Derivatisierung nicht detektierbar. Außerdem zeigen alle GC-Detektoren für die Standardverbindungen Empfindlichkeiten, die sich um mehrere Zehnerpotenzen unterscheiden (Tab. 15). Keiner der getesteten GC-Detektoren ist zur summarischen, massenproportionalen Detektion einsetzbar.

Tab. 15: Stoffmengenbezogene relative Empfindlichkeit der Detektoren gegenüber den Standardverbindungen (n.d. = nicht detektiert, n.g. = nicht gemessen)

Verbindung	MSD rel. Response in %	FID rel. Response in %	ECD rel. Response in %
Naphthalin	100,0	58,0	n.d.
n-Butylbenzol	80,1	n.g.	n.g.
Biphenyl	45,8	100,0	n.d.
2-Acetylnaphthalin	34,2	n.g.	n.g.
PCB 77	21,1	20,5	50,0
DEHP	20,8	30,7	n.d.
Hexachlorbenzol	17,0	1,3	100,0
PCB 209	16,1	15,6	65,9
Octachlorstyrol	14,1	14,5	40,7
p,p'-DDT	5,2	14,6	37,8
Methoxychlor	4,5	15,9	11,3
4-n-Nonylphenol	n.d.	14,2	n.d.
Parathion-methyl	n.d.	7,6	5,0
Pentachlorphenol	n.d.	4,0	6,4
4-Nitrophenol	n.d.	3,4	n.g.
Benzol	n.d.	n.g.	n.g.
Brombenzol	n.d.	n.g.	n.g.
Trichlorethen	n.d.	n.g.	n.g.
2,3-Dichloranilin	n.g.	26,7	1,7
4-Aminobiphenyl	n.g.	15,8	n.d.
1-Aminonaphthalin	n.g.	25,4	0,1
Atrazin	n.g.	8,7	n.d.
Lindan	n.g.	0,2	24,1

9.7 HPLC-MS

Für die HPLC-MS-Untersuchungen wurde ein Elektronenspray-Interface verwendet. Von dem Standardgemisch wurde sowohl im Positiv-Modus (+Q) als auch im Negativ-Modus (-Q) ein Totalionen-Chromatogramm aufgenommen (Abb. 41). Im Negativ-Modus sind nur Pentachlorphenol und Nitrophenol und im Positiv-Modus nur Atrazin und Phthalsäure-bis(2-ethylhexylester) detektierbar. Pentachlorphenol liegt dissoziiert vor und wird deshalb auf der RP-C18-Säule nicht retardiert. Die Verbindung wird deshalb zeitgleich mit dem Injektionspeak eluiert.

Da nur wenige Verbindungen des Testgemischs überhaupt detektiert werden können, ist Elektronenspray-MS als Detektionsmethode nicht geeignet, um die potenziell bioakkumulierbaren Stoffe summarisch zu quantifizieren.

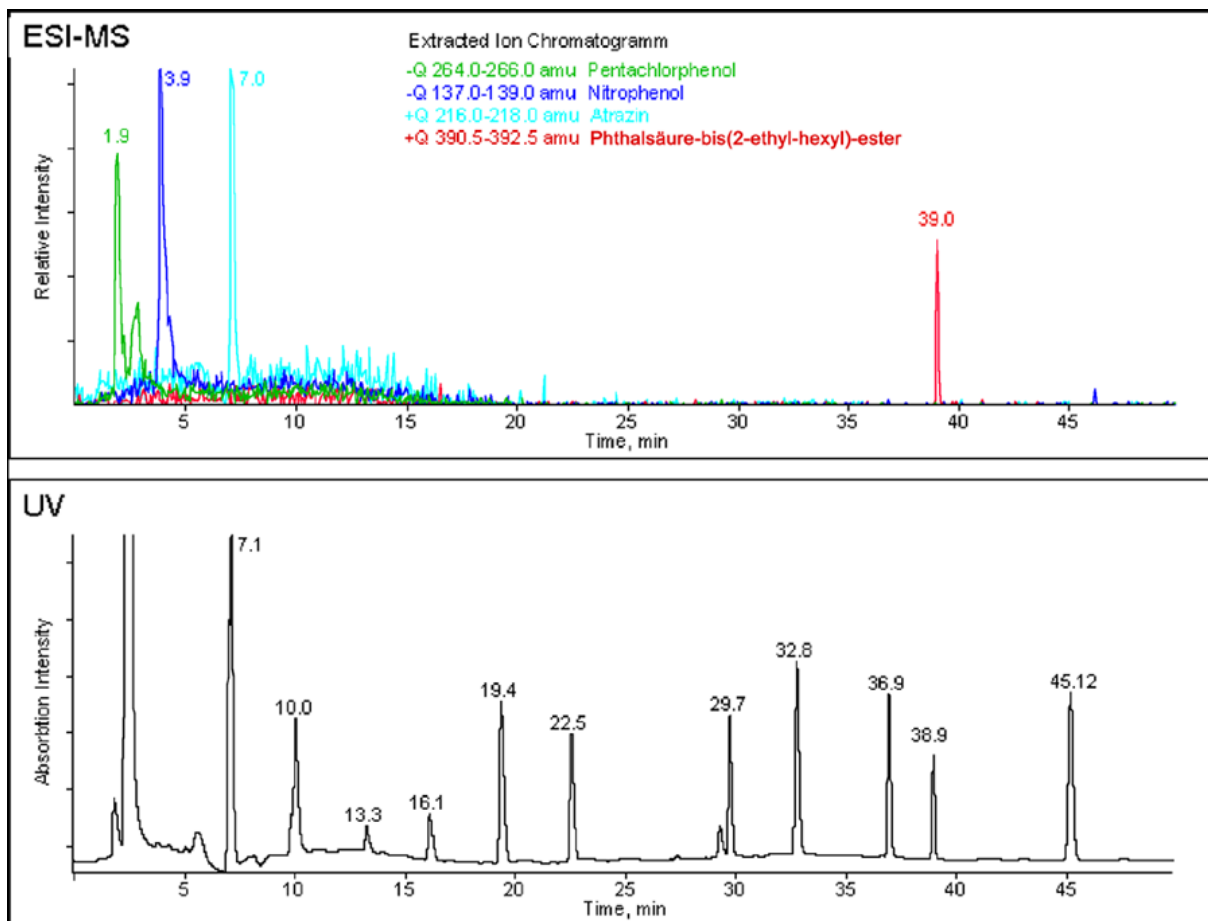


Abb. 41: LC/MS-Chromatogramm der Standardverbindungen

9.8 Vergleich der Trennleistung der zwei getesteten stationären Phasen

Um Chromatogramme, die mit Säulen unterschiedlicher Länge und Durchmesser bzw. mit unterschiedlicher Flussrate oder an unterschiedlichen HPLC-Anlagen erhalten wurden, vergleichen zu können, wird der Kapazitätsfaktor k' als dimensionslose Größe bestimmt:

$$k' = \frac{(t_R - t_m)}{t_m} \quad (\text{Gl. 11})$$

mit t_R : Retentionszeit

t_m : Totzeit

Der Kapazitätsfaktor k' ist die auf die Totzeit (bzw. das Totvolumen) der Säule normierte Nettoretentionszeit (bzw. das Nettoretentionsvolumen). Die Totzeit wurde mit Thioharnstoff bestimmt (unverzögerte Substanz). Als Testverbindungen wurden vier homologe n-Alkylbenzole verwendet.

Tab. 16: Vergleich der Trennleistung der eingesetzten stationären Phasen bei der HPLC

	Prontosil 120-10-C18-SH (53 x 4,0 mm), 3 μm inkl. Vorsäule	GROM-SIL 120 ODS-5 ST (60 x 4,0 mm), 3 μm , inkl. Vorsäule
	Kapazitätsfaktor k'	
Toluol	1,13	1,14
Ethylbenzol	1,51	1,52
n-Propylbenzol	2,11	2,13
n-Butylbenzol	2,98	2,99

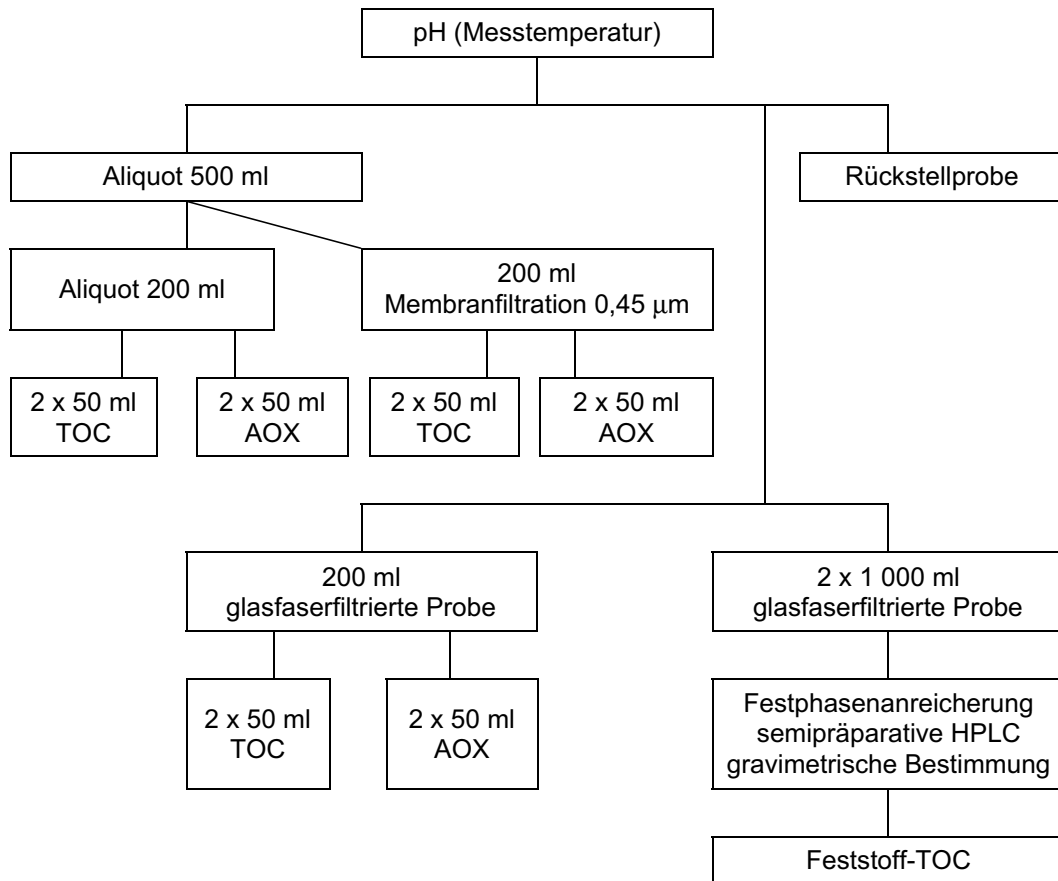
9.9 Kalibrierung des Feststoff-TOC

Tab. 17: Kalibrierung des Feststoff-TOC mit CaCO₃

Einwaage CaCO ₃ in mg	TOC in % C	Einwaage 2-ACN in mg	TOC in % C
0,33	13,2	0,24	83,4
1,40	12,7	0,30	66,4
1,52	12,0	0,56	75,4
1,62	13,2	0,75	76,8
1,84	11,9	0,80	71,6
3,59	11,7	0,86	72,8
6,84	12,8	0,86	74,3
10,42	11,8	0,89	75,2
10,51	12,1	1,05	75,0
10,73	12,0	1,26	73,5
12,88	12,2	1,78	69,9
19,18	12,1	2,44	66,1
26,32	11,7	2,89	71,1
30,05	11,7	3,11	69,9
47,77	11,8	3,24	71,9
68,73	11,9	3,49	72,3
85,07	12,0	3,51	71,2
119,98	12,1	3,79	72,3
133,88	12,2	14,40	69,5
166,68	12,0	19,20	70,5
257,55	12,1		

9.10 Untersuchungen von Abwasserproben aus Kläranlagen

Tab. 18: Bearbeitungsschema der Abwasserproben



Tab. 19: Charakterisierung der beprobten Kläranlagen

Kläranlage	Flussgebiet	Ausbau in EW	Technische Ausstattung	Bemerkungen
Stuttgart-Büsnau	Neckar	9 660	B, N, D, P, Ms	rein kommunal
Ludwigsburg-Eglosheim	Neckar	18 400	B, N, D, P	überwiegend kommunal
Ludwigsburg-Poppenweiler	Neckar	31 000	B, P	überwiegend kommunal
Ludwigsburg-Hoheneck	Neckar	167 000	B, N, D, P	überwiegend kommunal
Waiblingen	Neckar	70 000	B, N, D, P	überwiegend kommunal
Waiblingen-Hegnach	Neckar	25 000	B, N, D, P	überwiegend kommunal
Heidenheim-Mergelstetten	Donau	160 000	T	überwiegend kommunal
Heidenheim-Schnaitheim	Donau	42 100	T,P	überwiegend kommunal
Sindelfingen	Neckar	226 000	T, N, P	50 % industriell, Metallbearbeitung
Pforzheim	Neckar	250 000	B, T, N, P	50 % industriell, Metallbearbeitung
Wehr	Rhein	65 000	B, N, D, P	30 % industriell, Textilveredelung
Industriekläranlage 1	Rhein	464 000	T, B	Chemische Industrie
Industriekläranlage 2	Rhein	130 000	B	Papierherstellung, Anteile kommunal
Industriekläranlage 3	Donau	50 000	B	Lederherstellung
Industriekläranlage 4	Neckar	67 000	B, N, D, P	Gelatineherstellung
Indirekteinleiter	Neckar	-	Neutralisation, Fällung	Oberflächenbehandlung von Stahl (Galvanik, Verzinkung)
Indirekteinleiter	Neckar	-	Neutralisation, Fällung	Oberflächenbehandlung von Aluminium (Eloxalverfahren)

B = Belebung, T = Tropfkörper, N = Nitrifikation, D = Denitrifikation, Ms = Mikrosieb, S = Sandfilter

Tab. 20: Angaben zu den Probennahmen der Abwässer der Kläranlagenabläufe

Kläranlage	Tag der Proben- nahme	Art der Probennahme	Vorfluter	Wetter
Stuttgart-Büsnau	21.06.99	qS	Bandtälesbach	Trocken
Ludwigsburg-Eglosheim	18.07.99	24 h-M, k, v	Gründelbach	Trocken
	26.07.99	24 h-M, k, v		Trocken
Ludwigsburg-Poppenweiler	18.07.99	24 h-M, k, v	Zipfelbach	Trocken
	26.07.99	24 h-M, k, v		Trocken
Ludwigsburg-Hoheneck	18.07.99	24 h-M, k, v	Neckar	Trocken
	26.07.99	24 h-M, k, v		Trocken
Waiblingen	12.07.99	24 h-M, dk, v	Rems	Trocken
Waiblingen-Hegnach	12.07.99	24 h-M, dk, z	Rems	Trocken
Heidenheim-Mergelstetten	27.07.99	24 h-M, k, z	Brenz	Trocken
Heidenheim-Schnaitheim	27.07.99	24 h-M, k, z	Brenz	Trocken
Sindelfingen	05.07.99	qS	Neckar	Trocken
	16.07.99	qS		Trocken
	28.07.99	qS		Trocken
Pforzheim	30.07.99	24 h-M, k, v	Enz	Trocken
Kläranlage Wehr	05.07.00	24 h-M, dk, d	Rhein	Trocken
Industriekläranlage 1	30.06.00	qS	Rhein	Trocken
Industriekläranlage 2	06.07.00	24 h-M, dk, d	Rhein	Niederschlag
Industriekläranlage 3	24.07.00	qS	Günz	Niederschlag
Industriekläranlage 4	30.07.00	qS	Enz	Trocken
Indirekteinleiter	07.07.00	qS	KA Ditzingen	Trocken

24 h-M = Mischprobe, qS = qualifizierte Stichprobe, k = kontinuierlich, dk = diskontinuierlich, d = durchflussproportional, v = volumenproportional, z = zeitproportional

Tab. 21: Summenparameter der Abwässer der kommunalen Kläranlagen

Kläranlage	Datum	pH	AOX in µg/l			TOC in mg/l C			
			original	glasfaser filtriert	membran filtriert	original	glasfaser filtriert	membran filtriert	
Büsnau	21.06.99	7,4		390	310	260	6,7	5,4	6,7
Sindelfingen	05.07.99	7,9	a	210	190	180	8,4	7,8	7,4
			b	220	190	180			
	16.07.99	8,1	a	110	85	79	8,7	7,9	7,4
			b	110	86	76			
	28.07.99	8,3	a	86	78	60	9,0	8,1	7,8
			b	86	80	63			
Hechingen	08.07.99	7,6	a	160	120	36	9,4	9,3	11,0
			b	140	120	40			
Waiblingen-Ost	12.07.99	8,0	a	200	150	130	8,1	6,9	9,6
			b	200	160	130			
	21.07.99	8,2	a	92	78	64	7,2	6,9	7,0
			b	94	80	65			
Hegnach	14.07.99	8,3	a	33	24	17	8,8	8,4	9,1
			b	33	26	18			
	21.07.99	8,3	a	100	89	84	9,7	9,2	9,0
			b	99	89	84			
LB-Poppenweiler	19.07.99	8,2	a	48	42	42	4,3	4,2	4,8
			b	50	44	43			
	26.07.99	8,2	a	150	53	45	4,7	4,7	4,6
			b	140	53	44			
LB-Eglosheim	19.07.99	8,2	a	49	37	37	7,4	7,5	7,7
			b	48	38	36			
	26.07.99	8,2	a	74	47	44	7,9	7,6	7,3
			b	73	47	45			
LB-Hoheneck	19.07.99	8,3	a	93	66	64	7,6	7,3	7,4
			b	94	67	80			
	26.07.99	8,3	a	90	59	54	6,9	6,4	6,3
			b	90	59	54			
Mergelstetten	28.07.99	8,1	a	54	48	45	13	10	9,5
			b	54	47	44			

Kläranlage	Datum	pH		AOX in µg/l			TOC in mg/l C		
				original	glasfaser filtriert	membran filtriert	original	glasfaser filtriert	membran filtriert
Schnaitheim	28.07.99	8,3	a	75	65	56	11	8,8	8,0
			b	76	65	56			
Pforzheim	30.07.99	8,1	a	81	68	50	7,6	7,4	7,7
			b	80	68	51			
Wehr	05.07.00	7,8		54	-	-	21	-	18

a,b = Parallelbestimmungen

Tab. 22: PBS der Abwässer der kommunalen Kläranlagen

Kläranlage	Tag der Probennahme	PBS, flüssige Phase in mg/l	PBS, feststoffgebunden in mg/l
Büsnau	25.02.99	0,5 ± 0,1*; n = 12	< 0,5
	06.04.99	0,5 ± 0,1; n = 12	< 0,5
	21.06.99	1,3 ± 0,2; n = 11	nicht auswertbar [†]
Sindelfingen	05.07.99	< 0,5; n = 4	nicht auswertbar
	16.07.99	< 0,5; n = 5	nicht auswertbar
	28.07.99	0,6 ± 0,1; n = 5	nicht auswertbar
Hechingen	08.07.99	< 0,5; n = 4	nicht auswertbar
Waiblingen-Ost	12.07.99	< 0,5; n = 5	nicht auswertbar
	21.07.99	< 0,5; n = 4	nicht auswertbar
Hegnach	14.07.99	< 0,5; n = 4	nicht auswertbar
	21.07.99	< 0,5; n = 4	nicht auswertbar
LB-Poppenweiler	19.07.99	< 0,5; n = 4	nicht auswertbar
	26.07.99	< 0,5; n = 4	nicht auswertbar
LB-Eglosheim	19.07.99	< 0,5; n = 4	nicht auswertbar
	26.07.99	< 0,5; n = 4	nicht auswertbar
LB-Hoheneck	19.07.99	< 0,5; n = 3	nicht auswertbar
	26.07.99	< 0,5; n = 4	nicht auswertbar
Mergelstetten	28.07.99	0,5 ± 0,1; n = 4	nicht auswertbar
Schnaitheim	28.07.99	< 0,5; n = 4	< 0,5
Pforzheim	30.07.99	< 0,5; n = 3	< 0,5
Wehr	05.07.00	< 0,5; n = 7	< 0,5

* einfache Standardabweichung σ , n = Anzahl der Parallelbestimmungen

[†] zu geringer Gehalt an abfiltrierbaren Stoffen

Tab. 23: Summenparameter der Abwässer der industriellen Kläranlagen

Kläranlage		pH	AOX in µg/l	TOC in mg/l C	DOC in mg/l C
Industriekläranlage 1		7,6	89	72	64
Industriekläranlage 2		7,8	< 20	45	41
Industriekläranlage 3		8,0	460	18	17
Industriekläranlage 4		7,3	150	15	13
Indirekteinleiter	A	8,4	28	32	35
	B	7,2	< 20	80	76

A = Stahlveredelung, B = Aluminiumveredelung; alle Messwerte sind Mittelwerte aus zwei Parallelbestimmungen

Tab. 24: PBS der Abwässer der industriellen Kläranlagen

Kläranlage		PBS, flüssige Phase in mg/l	PBS*, feststoffgebunden in mg/l
Industriekläranlage 1		< 0,5; n = 5	0,7
Industriekläranlage 2		< 0,5; n = 9	< 0,5
Industriekläranlage 3		< 0,5; n = 5	< 0,5
Industriekläranlage 4		< 0,5; n = 4	< 0,5
Indirekteinleiter	A	1,3 ± 0,4*; n = 4	nicht auswertbar
	B	2,7 ± 0,5; n = 4	nicht auswertbar

*einfache Standardabweichung σ , n = Anzahl der Parallelbestimmungen

Tab. 25: TOC der niederländischen Abwasserproben

Branche	pH	Art der Filtration					
		unfiltriert		glasfaserfiltriert		membranfiltriert	
		TOC in mg/l C	Mittelwert in mg/l C	TOC in mg/l C	Mittelwert in mg/l C	DOC in mg/l C	Mittelwert in mg/l C
Müllverbrennung	7,5	84	85	74	75	73	73
		85		75		72	
Papierindustrie	7,2	54	54	46	47	39	43
		54		47		48	
Speiseölfabrik	7,6	12	13	10	10	12	12
		13		10		12	
Eisenverhüttung	7,8	59	58	59	60	65	63
		57		60		60	
Pestizidproduktion	7,6	33	34	33	33	40	37
		35		34		33	
Chemische Industrie	8,3	7,3	7,9	6,2	6,0	5,7	5,7
		8,4		5,8		5,6	
Metallverarbeitende Industrie	8,0	49	49	44	43	36	36
		49		42		36	

Tab. 26: AOX der niederländischen Abwasserproben

Branche	Art der Filtration					
	unfiltriert		glasfaserfiltriert		membranfiltriert	
	AOX in µg/l	Mittelwert in µg/l	AOX in µg/l	Mittelwert in µg/l	AOX in µg/l	Mittelwert in µg/l
Müllverbrennung	270	250	250	250	200	210
	240		240		210	
Papierindustrie	110	110	110	120	110	110
	100		120		110	
Speiseölfabrik	140	140	130	130	110	120
	140		130		120	
Eisenverhüttung	2000	2000	2000	1950	1800	1800
	2000		1900		1800	
Pestizidproduktion	7000	6900	6000	6000	5900	5900
	6700		6000		5900	
Chemische Industrie	110	110	100	100	100	100
	110		100		100	
Metallverarbeitende Industrie	270	270	200	210	170	170
	270		220		170	

Tab. 27: PBS-Konzentrationen der niederländischen Abwasserproben

Branche	PBS (flüssige Phase) in mg/l	Mittelwert in mg/l	TOC in %	Mittelwert in %	abfiltrierbare Stoffe in mg/l	PBS (feste Phase) in mg/l	TOC in %
Müllverbrennung	2,4	2,2	50	54	54	1,4	46
	1,9		57				
Papierindustrie	0,8	0,9	48	48	30	1,2	30
	1,0		49				
Speiseölfabrik	< 0,5	< 0,5	22	27	76	5,5	37
	< 0,5		31				
Eisenverhüttung	< 0,5	< 0,5	34	33	220	11	31
	< 0,5		32				
Pestizidproduktion	< 0,5	< 0,5	21	21	12	0,3	54
	< 0,5		22				
Chemische Industrie	< 0,5	< 0,5	31	32	38	0,5	26
	< 0,5		32				
Metallverarbeitende Industrie	11	14	91	90	39	2,2	55
	16		89				

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ¹ OSPAR - Ministerial Meeting of the OSPAR Commission: **OSPAR Strategy with Regard to Hazardous Substances**; Draft Summary Record OSPAR 98/14/1, Annex 34, Reference Number: 1998-16; Sintra, 22-23 July 1998.
- ² Liersch, K.-M.: **Aspekte und Ergebnisse der 4. Internationalen Nordseeschutzkonferenz**; *Korresp. Abwasser* **42**, 2172 – 2181 (1995).
- ³ Umweltbundesamt (Hrsg.): **OSPAR Workshop: Ecotoxicological Evaluation of Waste Water**; UBA-Texte Nr. 97/85, Berlin, 23. und 24. September 1997.
- ⁴ Gesetz zur Ordnung des Wasserhaushalts (Wasserhaushaltsgesetz - WHG) I. d. Bek. d. Neufassung vom 12. November 1996 (BGBl. I S. 1695) zul. geänd. d. G. vom 25. August 1998 (BGBl. I S. 2455).
- ⁵ Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer (**Abwasserverordnung - AbwV**), Fassung vom 9. Februar 1999 (BGBl. I 1999 S. 86, 2000 S. 751).
- ⁶ Rahmen-Abwasser-Verwaltungsvorschrift über Mindestanforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer (**Rahmen-AbwasserVwV**), Fassung vom 31. Juli 1996 (GMBI. 1996 S. 729)
- ⁷ Pedersen, F., Kristensen, P., Damborg, A., Christensen, H. W.: **Ecotoxicological Evaluation of Industrial Wastewater**; (Hrsg.: Ministry of the Environment, Danmark; Danish Environmental Protection Agency); Danmark (1994).
- ⁸ Tonkes, M., van de Guchte, C., Botterweg, J., de Zwart, D., Hof, M.: **Monitoring Strategies for Complex Mixtures**; in: *Monitoring Water Quality in the Future 4* (Hrsg.: Ministry of Housing, Spatial Planning and the Environment, The Netherlands); Zoetermeer (1995).
- ⁹ Villars, M. T.: **Executive Summary**; in: *Monitoring Water Quality in the Future* (Hrsg.: Ministry of Housing, Spatial Planning and the Environment, The Netherlands); Zoetermeer (1995).
- ¹⁰ Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D., Jöhncke, U.: **The Assessment of Bioaccumulation**; *Chemosphere* **29**, 1501 - 1514 (1994).
- ¹¹ Beek, B., Böhling, S., Bruckmann, U., Franke, C., Jöhncke, U., Studinger, G.: **The Assessment of Bioaccumulation**; in: *The Handbook of Environmental Chemistry – Reactions and Processes*, Bd. 2 Teil J, S. 239 – 275, Springer-Verlag Berlin 1999.
- ¹² Klöpffer, W., Rippen, G., Frische, R.: **Physicochemical Properties as Useful Tools for Predicting the Environmental Fate of Organic Chemicals**; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **6**, 294 - 301 (1982).

- ¹³ Bartell, S. M., LaKind, J. S., Moore, J. A., Anderson, P.: **Bioaccumulation of Hydrophobic Organic Chemicals by Aquatic Organisms: A Workshop Summary**; *Int. J. Environ. Pollut.*, **9**, 3 - 25 (1998).
- ¹⁴ Nagel, R., Loskill, R. (Hrsg.): **Bioaccumulation in Aquatic Systems - Contributions to the Assessment**; VCH Verlag, Weinheim (1991).
- ¹⁵ Beek, B., Böhling, S., Franke, C., Studinger, G.: **Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug**; (Hrsg.: Umweltbundesamt Berlin); UBA-Texte **42/91** (1991).
- ¹⁶ Boon, J. P., Duinker, J. C.: **Kinetics of Polychlorinated Biphenyl (PCB) Components in Juvenile Sole (*Solea Solea*) in Relation to Concentrations in Water and to Lipid Metabolism under Conditions of Starvation**; *Aquat. Toxicol* **7**, 119 – 134 (1985).
- ¹⁷ Office for Official Publications of the European Communities: **Technical Guidance Document in Support of the Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances and the Commission Regulation (EC) 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances**, Parts I-IV, Luxembourg, 1996.
- ¹⁸ OECD Guideline 305: **Bioaccumulation**; OECD, Paris (1981).
- ¹⁹ Franke, C.: **How Meaningful is the Bioconcentration Factor for Risk Assessment?**; *Chemosphere* **32**, 1897 - 1905 (1996).
- ²⁰ Tewari, Y. B., Martire, D. E., Wasik, S. P., Miller, M. M.: **Aqueous Solubilities and Octanol-Water Partition Coefficients of Binary Liquid Mixtures of Organic Compounds at 25 °C**; *J. Solut. Chem.* **11**, 435 - 445 (1982).
- ²¹ Tulp, M. T. M., Hutzinger, O.: **Some Thoughts on Aqueous Solubilities and Partition Coefficients of PCB and the Mathematical Correlation between Bioaccumulation and Physico-Chemical Properties**; *Chemosphere* **7**, 849 – 860 (1978).
- ²² Opperhuizen, A., van der Velde, E. W., Gobas, F. A. P. C., Liem, D. A. K., Steen, J. M. D., Hutzinger, O.: **Relationship between Bioconcentration in Fish and Steric Factors of Hydrophobic Chemicals**; *Chemosphere* **14**, 1871 - 1896 (1985).
- ²³ Geyer, H. J., Muir, D. C. G.: **New Results and Considerations on the Bioconcentration of the Superlipophilic Persistent Chemicals Octachlorodibenzo-p-Dioxin (OCDD) and Mirex in Aquatic Organisms**; in: *Fate and Prediction of Environmental Chemicals in Soils, Plants, and Aquatic Systems* (Hrsg.: M. Mansour); Lewis Publishers; Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo; 185 - 197; (1993).
- ²⁴ Tolls, J.: **Bioconcentration of Surfactants**; Dissertation, Universität Utrecht 1998.

- ²⁵ Eadsforth, C. V., Moser, P.: **Assessment of Reverse-Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients**; *Chemosphere* **12**, 1459 - 1475 (1983).
- ²⁶ Klamer, H. J. C., Beekman, M.: **Estimating the 1-Octanol/Water Partition Coefficients (K_{ow}) and Fish Bioconcentration Factors (BCF) of Unknown Compounds Using a Gradient HPLC Method**; *Toxicol. Model.* **1**, 169 - 179 (1995).
- ²⁷ Kaune, A., Knorrenschild, M., Kettrup, A.: **Predicting 1-Octanol-Water Partition Coefficient by High-Performance Liquid Chromatography Gradient Elution**; *Fresenius' J. Anal. Chem.* **352**, 303 - 312 (1995).
- ²⁸ Valkó, K., Bevan, C., Reynolds, D.: **Chromatographic Hydrophobicity Index by Fast-Gradient RP-HPLC: A High-Throughput Alternative to Log P/Log D**; *Anal. Chem.* **69**, 2022 - 2029 (1997).
- ²⁹ Sontheimer, H., Spindler, P., Rohmann, U.: **Wasserchemie für Ingenieure**; DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut der Universität Karlsruhe (TH) (1986).
- ³⁰ Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker in Gemeinschaft mit dem Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V. (Hrsg.): **Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlamm-Untersuchung - Physikalische, chemische, biologische und bakteriologische Verfahren**; Losebl.-Ausg. 47. Lfg., WILEY-VCH Verlag Weinheim und Beuth Verlag Berlin 2000.
- ³¹ Thurman, E. M., Malcolm, R. L.: **Preparative Isolation of Aquatic Humic Substances**; *Environ. Sci. Technol.* **15**, 463 - 466 (1981).
- ³² Gremm, T., Huber, S., Frimmel, H. F.: **Untersuchung über den Einfluß gelöster Huminstoffe auf die Analytik organischer Schadstoffe**; *Vom Wasser* **80**, 109 - 121 (1993).
- ³³ Gremm, T., Abbt-Braun, G., Frimmel, F. H.: **Einfluß verschiedener Parameter auf die HPLC-Charakterisierung organischer Säuren**; *Vom Wasser* **77**, 231 - 241 (1991).
- ³⁴ Landrum, P. F., Nihart, S. R., Eadie, B. J., Gardner, W. S.: **Reverse-Phase Separation Method for Determining Pollutant Binding to Aldrich Humic Acid and Dissolved Organic Carbon of Natural Waters**; *Environ. Sci. Technol.* **18**, 187 - 192 (1984).
- ³⁵ Gobas, F. A. P. C., Maclean, L. G.: **Relationship between Sediment Diagenesis and the Fate, Accumulation and Trophic Transfer of Contaminants**; 3rd SETAC World Congress, 21-25 May 2000, Brighton, United Kingdom, Abstract Book, Society of Environmental Toxicology and Chemistry (Hrsg.) S. 9.

- ³⁶ Sturm, B.: **Ein System zur automatischen und ferngesteuerten Probennahme von organischen Verunreinigungen in Küstengewässern: Untersuchungen zur Festphasenextraktion ausgewählter chlorierter und polycyclisch-aromatischer Kohlenwasserstoffe unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses von Huminstoffen**; (Hrsg.: GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH), Geesthacht (1996).
- ³⁷ Beratergremium für Altstoffe (BUA): **Chemikalienbewertung – Konzepte für Sedimente und marine Ökosysteme** (Hrsg. Behret, H.; Nagel, R.), 8. BUA-Kolloquium, Chemikalienbewertung – Konzepte für Sedimente und marine Ökosysteme, GDCh-Monographie Bd. 17, Frankfurt am Main 2000.
- ³⁸ Harkey, G. A., Landrum, P. F., Klaine, S. J.: **Comparison of Whole-Sediment, Elutriate and Pore Water Exposures for Use in Assessing Sediment-Associated Organic Contaminants in Bioassays**; *Environ. Toxicol. Chem.* **13**, 1315 – 1329 (1994).
- ³⁹ Thomann, R. V., Connolly, J. P., Parkerton, T. F.: **An Equilibrium Model of Organic Chemical Accumulation in Aquatic Food Webs with Sediment Interaction**; *Environ. Toxicol. Chem.* **11**, 615 – 629 (1992).
- ⁴⁰ Martoja, M., Ballan-Dufrançais, C., Jeantet, A. Y., Truchet, M., Coulon, J.: **Influence de la composition chimique de l'environnement sur le bivalve *Abra alba*. Etude comparative d'animaux récoltés dans des milieux naturels et d'animaux contaminés expérimentalement par un effluent industriel**; *Ann. Agron.* **64**, 1 – 24 (1988).
- ⁴¹ Knezovich, J. P., Harrison, F. L.: **The Bioavailability of Sediment-Sorbed Chlorobenzenes to Larvae of the Midge, *Chironomus decorus***; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **15**, 226 - 241 (1988).
- ⁴² Belfroid, A., Meiling, J., Drenth, H.-J., Hermens, J., Seinen, W., van Gestel, K.: **Dietary Uptake of Superlipophilic Compounds by Earthworms (*Eisenia Andrei*)**; *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **31**, 185 - 191 (1995).
- ⁴³ Solyom, P., Hynning, P.-Å., Remberger, M., Viktor, T., Blomqvist, N.: **Biological and Chemical Characterisation of an Effluent from Production of Deinked Pulp and Tissue**; *Pap. Puu* **77**, 209 - 214 (1995).
- ⁴⁴ de Maagd, P. G.-J.: **Bioaccumulation Tests Applied in Whole Effluent Assessment: A Review**; *Environ. Toxicol. Chem.* **19**, 25 – 35 (2000).
- ⁴⁵ Society of Environmental Toxicology and Chemistry – SETAC (Hrsg.): **Effluent Ecotoxicology: A European Perspective - Programme & Abstract Book**; Edinburgh 1999.
- ⁴⁶ Tonkes, M., Pols, H., Warmer, H., Bakker, V.: **Gesamtabwasserbewertung**; Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling - RIZA (1998).

- ⁴⁷ Adolfsson-Erici, M.; Wahlberg, C.: **Extraherbart gaskromatograferbart organiskt material (EGOM). Extraherbart organiskt bunden halogen (EOX). Potenziellt bioackumulerbara substanser (PBS): in Utsläpp av stabila organiska ämnen från kemiindustrin (Undersökningar 1989 –1991);** Naturvårdsverket Rapport 4103; Bilaga D; Swedish Environmental Protection Agency, Solna, Sweden (1992).
- ⁴⁸ Boutonnet, J. C., Bouraly, M., Thiébaud, H., Vérot, Y.: **Whole Effluent Assessment: Method Development and Use for Chemical Plants Permits;** 3rd SETAC World Congress, 21-25 May 2000, Brighton, United Kingdom, Abstract Book, Society of Environmental Toxicology and Chemistry (Hrsg.) S. 246.
- ⁴⁹ Andrén, C., Eklund, B., Gravenfors, E., Kukulska, Z., Tarkpea, M.: **A Multivariate Biological and Chemical Characterization of Industrial Effluents Connected to Municipal Sewage Treatment Plants;** *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 228 – 233 (1998).
- ⁵⁰ Pedersen, F., Damborg, A., Kristensen, P.: **Guidance Document for Risk Assessment of Industrial Waste Water;** *Miljøprojekt Nr. 298*, Danish Environmental Protection Agency, Ministry of Environment and Energy, Denmark (1995).
- ⁵¹ Jekel, M., Klinkow, N., Reemtsma, T.: **Untersuchungsstrategie für gefährliche Stoffe in Abwassereinleitungen der Industrie,** Forschungsbericht F+E Vorhaben 299 22 297, Umweltbundesamt Berlin, eingereicht.
- ⁵² van Loon, W. M. G. M., Hermens, J. L. M.: **Mixture Toxicity Parameters;** in: *Monitoring Water Quality in the Future 2* (Hrsg.: Ministry of Housing, Spatial Planning and the Environment, The Netherlands); Zoetermeer (1995).
- ⁵³ Verbruggen, E. M. J., van Loon, W. M. G. M., Hermens, J. L. M.: **Hydrophobicity of Complex Organic Mixtures;** *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **3**, 163 – 168 (1996).
- ⁵⁴ Verbruggen, E. M. J., Klamer, H. J. C., Villerius, L., Brinkmann, U. A. T., Hermens, J. L. M.: **Gradient Elution Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography for Fractionation of Complex Mixtures of Organic Micropollutants According to Hydrophobicity Using Isocratic Retention Parameters;** *J. Chromatogr., A* **835**, 19 - 27 (1999).
- ⁵⁵ van Loon, W. M. G. M., Verwoerd, M. E., Wijnker, F. G., van Leeuwen, C. J., van Duyn, P., van de Guchte, C., Hermens, J. L. M.: **Estimating Total Body Residues and Baseline Toxicity of Complex Organic Mixtures in Effluents and Surface Waters;** *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 1358 - 1365 (1997).
- ⁵⁶ van Loon, W. M. G. M., Wijnker, F. G., Verwoerd, M. E., Hermens, J. L. M.: **Quantitative Determination of Total Molar Concentrations of Bioaccumulatable Organic Micropollutants in Water Using C₁₈ Empore Disk and Molar Detection Techniques;** *Anal. Chem.* **68**, 2916 - 2926 (1996).

- ⁵⁷ Verbruggen, E. M. J., van Loon, W. M. G. M., Tonkes, M., van Duijn, P., Seinen, W., Hermens, J. L. M.: **Biomimetic Extraction as a Tool to Identify Chemicals with High Bioconcentration Potential - An Illustration by Two Fragrances in Sewage Treatment Plant Effluents and Surface Waters**, *Environ. Sci. Technol.* **33**, 801 - 806 (1999).
- ⁵⁸ Verbruggen, E.M.J.: **Predicting Hydrophobicity, Bioconcentration and Baseline Toxicity of Complex Organic Mixtures**, Utrecht (Niederlande), Univ., Diss., 1999.
- ⁵⁹ Verhaar, H. J. M., Busser, F. J. M., Hermens, J. L. M.: **Surrogate Parameter for the Baseline Toxicity Content of Contaminated Water: Simulating the Bioconcentration of Mixtures of Pollutants and Counting Molecules**; *Environ. Sci. Technol.* **29**, 726 - 734 (1995).
- ⁶⁰ Arthur, C. L., Pawliszyn, J.: **Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers**; *Anal. Chem.* **62**, 2145 – 2148 (1990).
- ⁶¹ Renberg, L. O., Sundstroem, S. G., Rosen-Olofsson, A. C.: **The Determination of Partition Coefficients of Organic Compounds in Technical Products and Wastewaters for the Estimation of Their Bioaccumulation Potential Using Reversed Phase Thin Layer Chromatography**; *Toxicol. Environ. Chem.* **10**, 333 - 349 (1985).
- ⁶² Hynning, P.-Å.: **Separation, Identification and Quantification of Components of Industrial Effluents with Bioconcentration Potential**; *Water Res.* **30**, 1103 - 1108 (1996).
- ⁶³ Burkhard, L. P., Sheedy, B. R.: **Evaluation of Screening Procedures for Bioconcentratable Organic Chemicals in Effluent and Sediments**; *Environ. Toxicol. Chem.* **14**, 697 - 711 (1995).
- ⁶⁴ The USEPA Persistent, Bioaccumulative and Toxic Pollutants (PBT) Plenary Group and The USEPA Office Directors Multimedia and Pollution Prevention Forum: **A Multimedia Strategy for Priority Persistent, Bioaccumulative, and Toxic (PBT) Pollutants - Draft PBT Strategy** (1998).
- ⁶⁵ Snyder, E. M., Snyder, S. A., Giesy, J. P., Blonde, S. A., Hurlburt, G. K., Summer, C. L., Mitchell, R. R. Bush, D. M.: **SCRAM - A Scoring and Ranking System for Persistent, Bioaccumulative and Toxic Substances for the North American Great Lakes - Part I: Structure of the Scoring and Ranking System**; *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **7**, 52 - 61 (2000).
- ⁶⁶ Snyder, E. M., Snyder, S. A., Giesy, J. P., Blonde, S. A., Hurlburt, G. K., Summer, C. L., Mitchell, R. R. Bush, D. M.: **SCRAM - A Scoring and Ranking System for Persistent, Bioaccumulative and Toxic Substances for the North American Great Lakes - Part II: Bioaccumulation Potential and Persistence**; *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **7**, 116 - 121 (2000).
- ⁶⁷ Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers, Certificate of Analysis, Augsburg 1998.

- ⁶⁸ Aldrich: **Katalog Handbuch Feinchemikalien und Laborgeräte 2000-2001**, Taufkirchen (2000).
- ⁶⁹ Meylan, W., Howard, P.: **SRC Estimation Programs v2.0 for Windows**, Syracuse Research Corporation, Environmental Science Center Merrill Lane Syracuse, NY 13210 (1995).
- ⁷⁰ Merck Eurolab: **Der Laborkatalog Merck 2000**, Darmstadt 2000.
- ⁷¹ Brodsky, J., Ballschmiter, K.: **Reversed Phase Liquid Chromatography of PCBs as a Basis for the Calculation of Water Solubility and log K_{ow} for Polychlorobiphenyls**; *Fresenius' J. Anal. Chem.* **331**, 295 - 301 (1988).
- ⁷² Ciba Additives Division: Safety Data Sheet for Irgacor NPA 1999.
- ⁷³ Devillers, J., Bintein, S., Domine, D.: **Comparison of BCF Models Based on Log P**; *Chemosphere* **33**, 1047 - 1065 (1996).
- ⁷⁴ Risk and Policy Analysts: **Risk Assessment of 4-Nonylphenol (Branched) and Nonylphenol**, (Draft) 1999.
- ⁷⁵ Durhan, E., Lukasewycz, M., Baker, S.: **Alternatives to the Methanol-Water Elution of Solid-Phase Extraction Columns for the Fractionation of High Log K_{ow} Organic Compounds in Aqueous Environmental Samples**; *J. Chromatogr.* **629**, 67 - 74 (1993).
- ⁷⁶ OECD Guideline for Testing of Chemicals 117: **Partition Coefficient n-Octanol/Water: High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method**, OECD, Paris (1989).
- ⁷⁷ Fiehn, O.: **Toxizitätsgeleitete Fraktionierung und Charakterisierung organischer Schadstoffe in gewerblichen Abwässern**; Fortschr.-Ber. VDI, Reihe 15, Nr. 187 (1997).
- ⁷⁸ Nakamura, M., Yamada, S.: **Conditions for Solid-Phase Extraction of Agricultural Chemicals in Waters by Using n-Octanol-Water Partition Coefficients**; *Analyst* **121**, 469 - 475 (1996).