



Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5549

**Anreicherung und
Identifizierung polarer
und unpolarer
Stickstoffverbindungen
niederer molarer Masse
in Abläufen kommunaler
Kläranlagen mit
biologischer
Reinigungsstufe**

K. Grohmann

Institut für Technische Chemie

Februar 1995

Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 5549

**Anreicherung und Identifizierung polarer und
unpolarer Stickstoffverbindungen niederer molarer
Masse in Abläufen kommunaler Kläranlagen mit
biologischer Reinigungsstufe**

Konstanze Grohmann

Institut für Technische Chemie

**Von der Fakultät für Chemie der Universität Karlsruhe (TH) genehmigte
Dissertation**

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

1995

Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

ISSN 0947-8620

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, zur Aufklärung der etwa zu 99% unbekannt organischen Stickstoffverbindungen beizutragen, die den gelösten organischen Stickstoff (DON) einer Kläranlage ausmachen. Dazu wurde zunächst eine Anreicherungsmethode unter Verwendung von Reversed-Phasen entwickelt, die nach einer Anreicherung um den Faktor 5000 zumindest für zudotierte Stickstoffverbindungen eine reproduzierbare Wiederfindung bis zu 99% ermöglicht. Die Versuchsbedingungen müssen aufgrund der möglichen Adsorptionsverluste an Gefäßmaterialien und Probenbestandteilen sehr genau eingehalten werden.

Bei der Anwendung dieser Methoden auf belassene und membranfiltrierte Proben wurden Effekte festgestellt, die nahelegen, daß die untersuchten Verbindungen mit anderen Probenbestandteilen vergesellschaftet sind. Dies erforderte eine Neudefinition für die durch Membranfiltration erhaltenen Fraktionen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Raster aufgestellt, das nach Anwendung des PBM-Algorithmus auf die GC/MS-Spektren, die bei der Analyse von Realproben erhalten wurden, eine hinsichtlich ihrer Identifizierungswahrscheinlichkeit bewertete Aussage über die vorliegende organische Verbindung ermöglicht. Demzufolge gibt eine Übereinstimmungszahl von mindestens 30% an, daß es sich vermutlich um eine Stickstoffverbindung handelt. Die Anwendung der ausgearbeiteten Anreicherungs- und Auswertmethoden ergab zehn Probenaufarbeitungen mit einem Konzentrierungsfaktor von 1000-20000 und damit 133 verschiedene Stickstoffverbindungen, die mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 30% ausgegeben wurden.

Davon wurden siebzehn sicher und weitere zehn mit hoher Wahrscheinlichkeit identifiziert. Es ergaben sich zehn Übereinstimmungen mit anderen Autoren. 9-Methylacridin wurde in neun von zehn untersuchten Probenaufarbeitungen gefunden.

Der erfaßte Anteil an niedermolekularen DON wurde zu 20% abgeschätzt, wobei der höhermolekulare Anteil am DON maximal 70% beträgt.

Die Stoffklasse der Amide und Thiazole scheint nur unzureichend biologisch abbaubar zu sein, da ein Transfer bis in den Rhein beobachtet werden kann.

Für andere Stoffe konnten Hinweise für eine Bildung in der Kläranlage und damit für einen möglichen Einsatz als Indikatorverbindung für Abläufe von Kläranlagen gefunden werden.

Enrichment and Identification of Polar and Nonpolar Nitrogen Compounds with Low Molecular Masses in Effluents of Municipal Sewage Clarification Plants with Secondary Treatment

It is proposed in this report to contribute to elucidating about 99% unknown organic nitrogen compounds present as Dissolved Organic Nitrogen (DON) in a sewage clarification plant. For this, an enriching method based on reversed phases was developed as a first step which, following enrichment by the factor 5000, allows reproducible recovery up to 99% to be achieved, at least for the nitrogen compounds metered in. Considering possible losses due to adsorption on the vessel materials and on sample constituents, the experimental conditions must be very strictly observed.

When these methods were applied to untreated and membrane filtered samples, effects were observed which suggest that the compounds investigated are associated with other sample constituents. This called for a new definition of the fractions obtained by membrane filtration.

In the second part of the report a screen is elaborated which, after application of the PBM algorithm to the GC/MS spectra obtained in the analysis of true samples, allows an evaluated statement to be made on the organic compound present. Consequently, an at least 30% agreement indicates that a nitrogen containing compound can be supposed. The elaborated enrichment and evaluation methods were applied and ten samples processed with concentration factors of 1000-20.000 which yielded 133 different nitrogen compounds, with an probability of occurrence of at least 30% put out.

Seventeen of these nitrogen compounds were identified with certainty and another ten with high probability. Agreement with other authors has been obtained in ten cases. 9-Methyl-aciridine was found in nine of ten processed samples investigated. The fraction of the low moleculare DON recorded was estimated at 20%, whereas the fraction of higher molecular DON amounted to 70% at the maximum. The class of substances including amides and thiazoles seem to be biodegradable to only an insufficient extent as their transfer up to the river Rhine has been observed. Regarding other substances, there had been evidence of their being formed in the sewage clarification plant and, hence, of their possible use as indicators of processes taking place in sewage calrification plants.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Aufgabenstellung	1
2. Stand des Wissens	3
2.1. Molekulargewichtsverteilung stickstoffhaltiger, organischer Stoffe	3
2.2. Identifizierte niedermolekulare Stickstoffverbindungen.....	5
3. Die Anreicherung organischer Stickstoffverbindungen aus wäßrigen Lösungen.....	10
3.1. Anreicherung an Ionenaustauschern	12
3.2. Anreicherung an XAD-Harzen	13
3.3. Anreicherung an Reversed-Phasen.....	14
3.4. Anreicherung über Lösungsmittlextraktion.....	15
3.5. Aufarbeitung nach Elsässer.....	17
3.6. Zusammenfassung	18
4. Matrixeffekte in Kläranlagenabläufen	19
4.1. Bedeutung der Einzelkomponenten als analytische Matrix	19
4.2. Konkurrenzreaktionen	19
4.2.1. Konkurrenzreaktionen anorganischer Bestandteile	20
4.2.2. Konkurrenzreaktionen organischer Bestandteile	21
4.3. Adsorption an organischen und anorganischen Makromolekülen.....	23
4.4. Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen.....	24
4.5. Zusammenfassung der Matrixeinflüsse	25
4.6. Zusammenfassung von Kapitel 3 und 4	27
5. Auswahl und Optimierung der gaschromatographischen Bedingungen	28
5.1. Auslegung des Injektionssystems, Säulenauswahl	28
5.2. Chromatographische Analyse schwach basischer und nicht basischer Stickstoff- verbindungen	29
5.3. Gaschromatographische Analyse basischer Stickstoffverbindungen.....	30
5.3.1. Chromatographie ohne Derivatisierung nach Silanisierung des Liners.....	30
5.3.2. Gaschromatographische Analyse nach Derivatisierung	31
5.3.3. Optimierung der Derivatisierungsbedingungen	32
5.3.4. Quantitative Bestimmung von Stickstoffverbindungen als Dinitrophenylderivate	36

6. Stabilität von Lösungen mit Stickstoffverbindungen bei Herstellung und Lagerung.....	37
6.1. Problemdarstellung.....	37
6.2. Eigene Untersuchungen.....	38
6.2.1. Direkte Verluste beim Ansetzen der Dotierlösung.....	39
6.2.2. Vergleichende Bewertung.....	41
6.2.3. Stabilität der Dotierlösungen bei der Lagerung.....	41
6.3. Zusammenfassung.....	44
7. Extraktion von Stickstoffverbindungen aus Modellösungen.....	45
7.1. Charakterisierung der verwendeten Reversed-Phasenmaterialien.....	45
7.2. Stand des Wissens.....	46
7.3. Gestaltung eigener Anreicherungsversuche.....	47
7.3.1. Versuchsaufbau.....	47
7.3.2. Einzelne Arbeitsschritte.....	47
7.3.3. Vorversuche zum Einsatz von Modifikatoren.....	49
7.4. Anreicherungsversuche aus Modellösungen.....	51
7.4.1. Screening verschiedener Festphasenmaterialien bei pH=7.9.....	52
7.4.2. Screening verschiedener Festphasenmaterialien bei pH=12.....	54
7.4.3. Extraktion an RP-C18-Phasen (Adsorbex) bei pH=6 und pH=12.....	56
7.4.4. Extraktion an RP-C18-Phasen (Adsorbex) bei pH=6, 7.9 und 12.....	58
7.4.5. Extraktion an RP-CI-Phasen von Merck (Polyspher).....	60
7.4.6. Extraktion an RP-C18-Phasen von Merck (Adsorbex) bei pH=7.2 und 12 nach Konditionierung mit TRIS.....	61
7.5. Zusammenfassung der Anreicherungsversuche aus Modellösungen.....	63
8. Anreicherung von Stickstoffverbindungen an Reversed-Phasen aus Kläranlagenabläufen.....	65
8.1. Versuche zur Wiederfindung von Stickstoffverbindungen bei der Filtration von Kläranlagenabläufen.....	65
8.1.1. Die 0.45 µm-Filtration.....	65
8.1.2. Abtrennung niedermolekularer Inhaltsstoffe von Kläranlagenabläufen mit der höhermolekularen Fraktion bei der 1000 Dalton-Filtration.....	66
8.1.3. Wiederfindung von zudotierten Stickstoffverbindungen in 0.45 µm filtrierte und 1000 Dalton-filtrierte Fraktionen von Kläranlagenabläufen.....	69
8.2. Versuche zur Miterfassung vergesellschafteter Stickstoffverbindungen.....	70
8.2.1. Anreicherung an hintereinander geschalteten Reversed-Phase-Kartuschen, die unterschiedliche Adsorptionsmaterialien enthalten.....	70
8.2.2. Anreicherung an gemischten Anreicherungsmaterialien.....	72
8.2.3. Zurückdrängung der Vergesellschaftung niedermolekularer Stoffe mit anderen Bestandteilen des Kläranlagenablaufs durch pH-Änderung.....	73

8.3. Versuche zur Unterdrückung der mikrobiologischen Aktivität in Kläranlagen-abläufen	75
8.3.1. Stand des Wissens	75
8.3.2. Anwendung chemischer Konservierungsmittel	75
8.4. Zusammenfassung der Anreicherungsversuche im Hinblick auf die quantitative Erfassung von Stickstoffverbindungen	78
8.5. Modell zum Verhalten der organischen Stoffe im Kläranlagenablauf	79
9. Identifizierung von Stickstoffverbindungen in Kläranlagenabläufen	83
9.1. Bedeutung der Übereinstimmungszahl	83
9.1.1. Auswertung von Bibliothekspektren mit dem PBM-Algorithmus	83
9.1.2. Vergleich von zugeordneten Massenspektren einer Abwasserprobe mit selbst aufgenommenen Spektren der betreffenden Verbindung	86
9.1.3. Vorgehensweise bei der Interpretation der vom Rechner ausgegebenen Übereinstimmungen	89
9.2. Identifizierung von Stickstoffverbindungen in Kläranlagenabläufen	89
9.2.1. Identifizierung ohne Derivatisierung	89
9.2.2. Vergleich der ausgegebenen Stickstoffverbindungen mit den in anderen Arbeiten identifizierten Stoffen	94
9.2.3. Auswirkungen der Anreicherungs-methode auf die Zahl der ausgegebenen Stickstoffverbindungen	95
9.2.4. Einfluß der gaschromatographischen Bedingungen auf den Detektionsgrad von Stickstoffverbindungen in den hier hergestellten Probenaufarbeitungen	97
9.2.5. Identifizierung als Dinitrophenylderivate	100
9.3. Zusammenfassung	102
10. Bedeutung der identifizierten Stickstoffverbindungen	105
10.1. Wie häufig kommen die identifizierten Stoffe in Abläufen vor?	105
10.2. Stammen die Stoffe aus anthropogenen Quellen oder sind sie Produkte des natürlichen Stoffkreislaufes?	105
10.3. Sind die Stoffe biologisch bzw. chemisch schlecht abbaubar und bei schlechter Abbaubarkeit bedeutend für das aquatische System?	108
10.4. Sind die Stoffe toxisch bzw. nicht toxisch ?	112
10.5. In welchen Konzentrationen kommen die Stoffe vor ?	112
10.5. Zusammenfassung	114
11. Der gelöste Kjeldahl-Stickstoff und der gelöste organische Stickstoff von biologisch gereinigten Kläranlagenabläufen	119
Anhang A Liste der verwendeten Geräte und Hilfsmittel	123
Anhang B Tabellenanhang	128
Literaturverzeichnis	138

Abkürzungsverzeichnis

DNFB:	Dinitrofluorbenzol
DOC :	Dissolved Organic Carbon, gelöster organischer Kohlenstoff
DON :	Dissolved Organic Nitrogen, gelöster organischer Stickstoff
F _A :	Anreicherungsfaktor
F _K :	Konzentrierungsfaktor
GC/MS :	Gaschromatographie / Massenspektrometrie
MSD	Massenselektiver Detektor
PA :	Probenaufarbeitung
PBM :	Probability Based Matching of Mass Spectra
RP :	Reversed-Phase
SIM :	Selectiv Ion Monitoring
TKN :	Total Kjeldahl Nitrogen, Kjeldahl-Stickstoff
ÜZ :	Übereinstimmungszahl
W :	Wiederfindungsgrad

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Bereits zur Zeit der Römer wurde Schmutzwasser mit einer Kanalisation, der "cloaca maxima" aus dem bewohnten Gebiet wegtransportiert. Mit zunehmender Bevölkerungsdichte wurde die Entsorgung des Abwassers ein immer größer werdendes Problem, das in Deutschland schließlich seit Ende des letzten Jahrhunderts durch den Bau von Kläranlagen gelöst wurde.

Zur differenzierten Abschätzung eines human- oder ökotoxikologischen Gefährdungspotentials des Kläranlagenablaufs, der in großen Mengen in Oberflächengewässer eingeleitet wird, ist die Kenntnis der Einzelstoffe notwendig. Auch ein sekundäres Potential der Stoffe, das bei einer weitergehenden Abwasserbehandlung, wie z.B. Ozonung des Wassers, durch Bildung toxiologisch relevanter Produkte freigesetzt wird, kann nur bei Kenntnis der Einzelverbindungen beurteilt bzw. weiter untersucht werden.

In den letzten Jahren wurden zur Aufklärung der organischen Einzelverbindungen einige analytische Arbeiten veröffentlicht, die maximal 10% des Dissolved Organic Carbon (DOC) erfassen [1, 2, 3]. Bei den identifizierten Stoffen handelt es sich um Vertreter der Stoffklassen Kohlenwasserstoffe, chlorierte Kohlenwasserstoffe, Fettsäureester, Alkohole, Aldehyde, Ketone, Aminosäuren und Heterozyklen.

Um die Bedeutung einer geeigneten Analytik für die Identifizierung von Stickstoffverbindungen aus Abläufen kommunaler Kläranlagen abzuschätzen, wird die Arbeit von Elsässer herangezogen, welche die umfassendsten Ergebnisse beinhaltet. Der Dissolved Organic Nitrogen (DON) dient als Bezugsgröße, um den Anteil an identifizierten organischen Stickstoffverbindungen quantifizieren zu können. Dieser Parameter beschreibt den Gehalt an Stickstoff, der nach einer 0.45 µm Filtration und Austreiben des Ammoniaks über Messung des "Kjeldahl-Stickstoffs" erfaßt wird.

Nach Hydrolyse konnte Elsässer [1] 0.5% des DON über eine Quantifizierung von Aminosäuren mit einem Gesamtgehalt von ca. 100 µg/l erfassen. Er bestimmte auch den Gehalt der Kernbasen Guanin, Thymin und Adenin jeweils zu etwa 10 µg/l mit einem Anteil von 0.2% am DON. Weiterhin identifizierte Elsässer etwa weitere 0.2% des DON in Form von 19 Stickstoffverbindungen meist heterozyklischer Struktur. Ein Anteil von 99.1% am DON, für den keine Einzelverbindungen identifiziert werden konnten, macht das Potential einer Aufklärung des DON und damit auch des DOC durch die Entwicklung geeigneter Analysemethoden deutlich.

Möchte man weitere Verbindungen identifizieren, ist eine Analyse der Ursachen, welche die Identifizierung bisher erschwerten, von besonderem Interesse. Diesen Ursachen wird in dieser Arbeit nachgegangen.

Bei einer näheren Betrachtung der bisher identifizierten Verbindungen fällt auf, daß mit der von Clark [2] und Gulyas [3] angewandten Anreicherung mit Lösungsmitteln und XAD-Harzen vor allem "unpolare" Stoffe (Kohlenwasserstoffe, chlorierte Kohlenwasserstoffe und Fettsäureester)

und wenige "mittelpolare" Verbindungen (Ketone, Aldehyde und Alkohole, 12 Stickstoffverbindungen) identifiziert wurden. Elsässer [1] gelang mit einem Verfahren, welches nach Abtrennen des Wassers anorganische und organische Stoffe als Feststoffe liefert, die Identifizierung von 32 "mittelpolaren" Heterozyklen. Davon enthalten 19 Verbindungen Stickstoff im Molekül. Die Klasse der Stickstoffverbindungen ist offensichtlich eine Stoffgruppe, bei der die Anzahl erfaßter Verbindungen von der Analysenmethode abhängt.

Obwohl Elsässer schon fast doppelt so viele Verbindungen identifizieren konnte wie Gulyas und Clark, liegt der Verdacht nahe, daß auch diese Methode für "polare" Stickstoffverbindungen nicht das Optimum ist. Er konnte nämlich, abgesehen von den zwei Aminderivaten 1H-Indol-3-ethanamin und 4-Methyl-2-pyridinamin, keine weiteren Aminderivate nachweisen. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, daß im Abwasser nur zwei Amine vorkommen, d.h. es müssen während der Aufarbeitung Verluste dieser Substanzen eingetreten sein. Eine mögliche Ursache für die Verluste von Stickstoffverbindungen in den sieben aufeinanderfolgenden Aufarbeitungsschritten von Elsässers Verfahren ist die Adsorption an Gefäßmaterialien. So verzeichnete Walle in Lösungen von Phenmetrazin (ein basischer, phenylsubstituierter Heterozyklus) mit einer Konzentration von etwa 100 µg/l Adsorptionsverluste bis zu 80% an Glas [4]. Am Beispiel der Stickstoffverbindungen zeigt sich also, daß die bisher angewandten Anreicherungsverfahren zur Identifizierung von geladenen Verbindungen nur bedingt geeignet sein könnten.

Die Identifizierung der starken Gifte Dimethylbenzylamin, Dimethylformamid und 2,4-Dimethylpyridin [5] und des Mutagens Diphenylamin [6] von Clark [2], Chudoba [7] bzw. Elsässer [1] unterstreicht die Bedeutung einer Aufklärung der Einzelverbindungen, die den DOC und insbesondere den DON einer Kläranlage ausmachen und damit die Bedeutung einer Entwicklung neuer Analysenmethoden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zur Aufklärung des niedermolekularen, organisch gebundenen Stickstoffs im Auslauf einer kommunalen Kläranlage durch die Identifizierung von Einzelverbindungen mittels Gaschromatographie/ Massenspektroskopie (GC/MS) beizutragen. Dazu sollte ein Analysenverfahren entwickelt werden, das geeignet ist, "polare" und "unpolare" Stickstoffverbindungen mit einer Konzentration von 1 µg/l aus wäßrigen Lösungen um den Faktor 10000 anzureichern und gaschromatographisch zu analysieren.

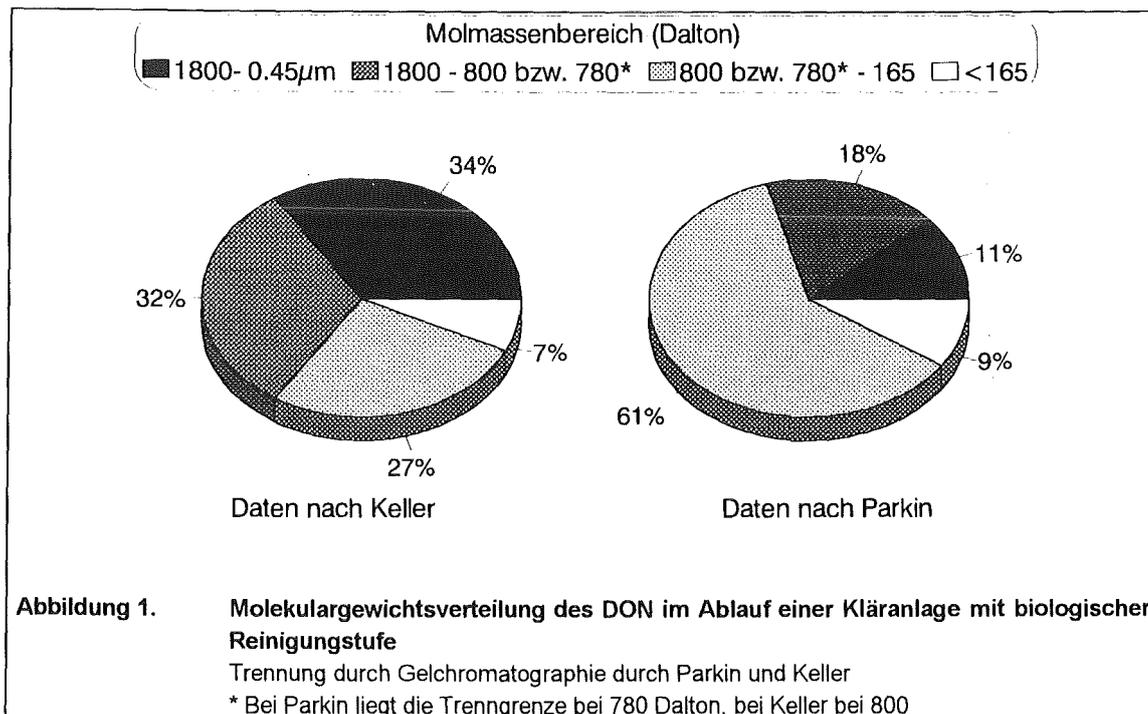
2. Stand des Wissens

Zur Quantifizierung der Gesamtbelastung eines Abwassers an organisch gebundenem Stickstoff ist der zuvor schon erwähnte DON geeignet. Er ist definiert als der Stickstoff, der nach einer 0.45 µm Filtration und Austreiben des Ammoniaks über Messung des "Kjeldahlstickstoffs" erfaßt wird.

Die organischen Stickstoffverbindungen, die in einer 0.45 µm filtrierten Probe enthalten sind, können jedoch nicht alle mit dem Massenspektrometer detektiert werden, denn ein Teil der Moleküle ist in komplexen organischen Strukturen, wie z.B. Viren und Zellfragmenten, gebunden. Ein anderer Teil kann mit dem im Hause verfügbaren Massenspektrometer nicht erfaßt werden, da das Verhältnis von Masse zu Ladung der Fragmente, die bei der Ionisation gebildet werden, größer als 800 ist und damit außerhalb des Meßbereiches liegt. Eine Einschätzung des Gehaltes an Stickstoffverbindungen, die mit der GC/MS registriert werden können, ist aus der Molekulargewichtsverteilung des DON möglich.

2.1. Molekulargewichtsverteilung stickstoffhaltiger, organischer Stoffe

Zur Untersuchung der Molekülmassenverteilung sind aus der Literatur die Gelchromatographie und die Membranfiltration bekannt. Keller [8] und Parkin [9] untersuchten die Molekulargewichtsverteilung von organischen Verbindungen in biologisch gereinigten Abwässern mittels Gelchromatographie. Wie Abbildung 1 zeigt, fand Keller, daß etwa 34% des DON aus

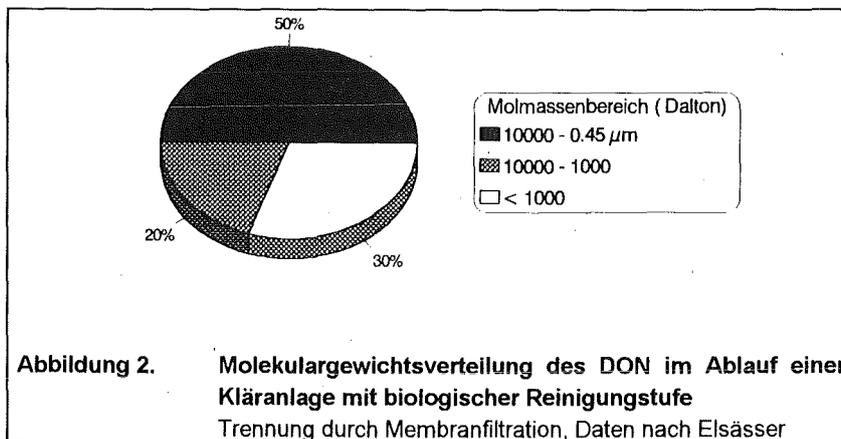


Molekülen mit einer Molmasse kleiner als 800 bestehen. Parkin ermittelte einen Anteil von 70% mit einer Molmasse kleiner als 780. Diese Unterschiede der experimentell ermittelten Molmassenverteilung machen klar, daß die Zusammensetzung des DON stark variiert, auch wenn "Wässer" der gleichen Art untersucht wurden.

Für die Analytik niedermolekularer Stickstoffverbindungen ergibt sich, daß mindestens 30 und bis zu 70% des DON mit herkömmlichen Massenspektrometern, die im Massenbereich 10-800 arbeiten, erfaßbar sind.

Um die Abhängigkeit der Analysenwerte von der Meßmethode aufzuzeigen, ist ein Vergleich dieser Daten mit Resultaten, welche mit einer anderen Trennmethode erhalten wurden, interessant.

Abbildung 2 zeigt die DON-Molmassenverteilungen von Elsässer, der den Ablauf einer kommunalen Kläranlage mit biologischer Reinigungsstufe mittels Diafiltration auftrennte.



Bei Anwendung dieser Trennmethode findet man 50% des DON in der Fraktion 10000 Dalton bis 0.45 µm. Im Gegensatz dazu ordneten Keller und Parkin nur 34% bzw. 11% des DON einer Fraktion zu, die einen Bereich von 1800 Dalton bis 0.45 µm umfaßt. Diese Unterschiede können auf Differenzen der Abwasserzusammensetzung hinweisen, es kann sich aber auch um eine Auswirkung der Trennmethode handeln. Aus den Daten von Elsässer ist der Anteil des DON, der mittels GC/MS erfaßt werden kann, auf ca. 30% zu schätzen.

2.2. Identifizierte niedermolekulare Stickstoffverbindungen

Als Einzelverbindungen konnten Aminosäuren und Verbindungen, die überwiegend zur Klasse der Heterozyklen gehören, identifiziert werden. Die bisher hierzu publizierten Ergebnisse werden im folgenden ausgewertet.

A. Aminosäuren

Zur Identifizierung und Quantifizierung von Aminosäuren im Abwasser wird insbesondere die HPLC eingesetzt. Sie wurde schon von Legube [10], Waggott [11], Scully [12], Hejzlar [14], Pitt [13], Parkin [9] und von Elsässer [1] erfolgreich auf biologisch gereinigte Kläranlagenabläufe angewandt. Beim Vergleich der Einzelkonzentrationen der Aminosäuren und ihrer Gesamtgehalte vor und nach einer Hydrolyse, die in Tabelle 1 dargestellt sind, wird deutlich, daß der größte Anteil der Aminosäuren in gebundenem Zustand vorliegt und erst nach Hydrolyse analytisch zu erfassen ist.

Tabelle 1. Identifizierte und quantifizierte Aminosäuren in biologisch gereinigten Kläranlagenabläufen nach 0.45 µm Membranfiltration in µg/l

Autor	Legube [10]	Wagott [11]	Scully [12]	Pitt [13]	Parkin [9]	Hejzlar [14]	Elsässer [1]
Aufarbeitung	ohne Hydrolyse	Hydrolyse	ohne Hydrolyse	ohne Hydrolyse	Hydrolyse	hochmolekulare Ablaufraction	Hydrolyse
Alanin	1.1	5	Spuren		10	30	20.9
2-Aminobuttersäure		100				0.6	3.1
Arginin	0.2					1.4	
Asparaginsäure		0.1	Spuren		33	30	9.4
Glutaminsäure	0.7	10	Spuren		7	0.6	
Glycin	0.3		15	30	19	58	11.1
Histidin	0.2				11	Spuren	5.6
Isoleucin			5		2.6	18	4.0
Leucin			11				
Lysin			4		23	18	0.12
Methionin						Spuren	2.1
Phenylalanin		40			3.5	25	1.7
Prolin						11	
Serin	0.2	0.5	Spuren		41	15	12.0
Threonin	0.4	0.3	Spuren		18	22	
Asparagin							6.9
Cystein							7.9
Thyrosin			Spuren		2.6	6.3	5.6
Valin		100	11			10	2.9
Summe [µg/l]	3.1	255.9	46	30	170.7	245.9	97.8

Die Aminosäurezusammensetzung, die nach einer Hydrolyse ermittelt wird, zeigt kein homogenes Bild. Zwar kommen alle Aminosäuren (Ausnahme: 2-Aminobuttersäure) in freiem und gebundenem Zustand vor und der Gesamtgehalt an Aminosäuren nach Hydrolyse ist mit 100 und 250 µg/l relativ konstant.

Geht man jedoch von einem für den Mittelwert aller Einwohner konstanten durchschnittlichen Eintrag an Aminosäuren durch Lebensmittelreste und Ausscheidung und von einem konstanten Eintrag durch die Mikroorganismen in der Kläranlage aus, so ist eine Aminosäurezusammensetzung zu erwarten, die auch bei einer unterschiedlichen Gesamtbelastung gleiche Verhältnisse der einzelnen Aminosäuren aufweist.

Betrachtet man aber das Verhältnis von Alanin, Phenylalanin, Serin, Valin und 2-Aminobuttersäure, so ergibt sich nach den Ergebnissen

von Wagott ein Verhältnis von etwa	5 : 40 : 0.5 : 100 : 100
nach Elsässer von etwa	21 : 2 : 12 : 3 : 3
und nach Parkin für die drei erstgenannten von etwa	10 : 4 : 41 .

Diese Unterschiede sprechen auch hier, wie bei der Zusammensetzung des DON, für Differenzen in der Abwasserzusammensetzung. Zumindest teilweise sind diese Unterschiede durch die Anwendung von Methoden verursacht, die nicht die gleichen Aminosäuren erfassen und deshalb nicht uneingeschränkt vergleichbar sind.

Nimmt man als Berechnungsgrundlage die größten Gehalte, die von Scully [12] für freie Aminosäuren zu 46 µg/l und für den Gesamtgehalt an Aminosäuren von Wagott [5] zu 256 µg/l bestimmt wurden, so beträgt das Verhältnis der freien Aminosäuren zum Gesamtgehalt etwa ein Fünftel.

Der Anteil des Stickstoffs, der in Form von Aminosäuren gebunden ist, macht nach Elsässer 0.5% des DON aus. Mit einem Verhältnis von 0.2 für freie Aminosäuren zu "Gesamtaminosäuren" ergibt sich ein Anteil an freien Aminosäuren von etwa 0.1% des DON.

B. Andere Stickstoffverbindungen

Die bekannt gewordenen, nicht der Klasse der Aminosäuren zuzuordnenden Stickstoffverbindungen des Abwassers sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Eine Einordnung der identifizierten Verbindungen in Giftklassen zeigt, daß zu dieser Stoffklasse toxikologisch relevante Substanzen gehören. Von den identifizierten Substanzen sind Coffein und Benzothiazol nach dem heutigen Wissenstand als mindergiftig einzuordnen [5]. Dimethylbenzylamin, Dimethylformamid und 2,5-Dimethylpyridin, die Clark [2] bzw. Elsässer [1] im Auslauf einer kommunalen Kläranlage nachgewiesen haben, werden der Gruppe der starken Gifte zugeordnet [5]. Das von Elsässer identifizierte Diphenylamin hat mutagene Wirkungen gezeigt [6].

Betrachtet man die Ergebnisse, die unter Anwendung der Lösungsmittelextraktion bzw. der XAD-Anreicherung erzielt wurden und somit vergleichbar sind, zeigt sich, daß von 15 identifizierten Verbindungen [1,2,15,16] die drei Substanzen Coffein, Methylbenzothiazol und Benzothiazol von mehreren Autoren nachgewiesen werden konnten.

Manche Stoffe wurden also bei Anwendung der gleichen Methode auf verschiedene Abwässer mehrmals, andere nur einmalig identifiziert.

Dies spricht dafür, daß im kommunalen Abwasser nach biologischer Reinigung bestimmte Stoffe immer wieder vorkommen, also "abwassertypisch" sind. Gleichzeitig bedingen "untypische" Stickstoffverbindungen ein insgesamt wechselndes Substanzspektrum, wie es auch schon für die Molekulargewichtsverteilung und das Aminosäurespektrum festgestellt wurde. Diese für kommunales Abwasser untypischen und typischen Substanzen treten mit wechselnden Konzentrationen auf. So konnte Clark [2] Coffein mit einer Konzentration von 3 bis 20 µg/l und Methylbenzothiazol mit einer Konzentration im Bereich 3 bis 57 µg/l nachweisen.

Der hier gezogene Vergleich wird aber durch Anwendung nicht vollständig identischer Aufarbeitungsmethoden zur Analyse nicht immer rein kommunaler Abwässer eingeschränkt.

Tabelle 2. In Kläranlagenabläufen identifizierte organische Stickstoffverbindungen

Literatur	identifizierte Verbindungen	Konz. (µg/l)	Art der Kläranlage	Zusammensetzung des Wassers	Anreicherungs-methode
Paxeus [15]	Coffein	0,1-0,5	biologische Reinigung	etwa 20% Industrie	Lösungsmittelextraktion
Gulyas [3]	1-Methyl-2-pyrrolidinon Benzothiazol 2-Amino-4(1H)-pteridinon Nitrofurantoin Isothiocyanato-cyclohexan N-Butyl-benzolsulfonamid		biologische Reinigung	rein kommunale Abwässer	Umkehrosmose Lösungsmittelextraktion
Ellis [16]	Acetaminophen Benzothiazol 2-(Methylthio)-benzothiazol		biologische Reinigung	etwa 20% Industrie	Lösungsmittelextraktion/ Anreicherung an XAD-Harzen
Clark [2]	Coffein Dimethylguanin Thienopyridin Dimethylbenzylamin Dimethylformamid Methylthiobenzothiazol	3, 20, 8 0,5 57, 3, 4	nicht angegeben	rein kommunale Abwässer	Lösungsmittelextraktion/ Anreicherung an XAD-Harzen
Legube [10]	Benzothiazol N,N'-Disopropyl-p-phenylenediamin N,N'Dimethylphenobarbituron		biologische Reinigung		Anreicherung an XAD-4

Fortsetzung Tabelle 2

Literatur	identifizierte Verbindungen	Konz. ($\mu\text{g/l}$)	Art der Kläranlage	Zusammensetzung des Wassers	Anreicherungs- methode
Chudoba [7]	Diphenylamin Benzothiazolderivat 2-Benzothiazoyl- methylsulfoxid 2-Benzothiazoyl- iminsulfamid 2-Hydroxybenzothiazol Nitrophenol		Laborkläranlage mit biologischer Reinigung	Wasser mit Glukose und Glutaminsäure	Vakuumdestillation Lösungsmittel- extraktion
Scully [12]	Isoamylamin Isobutylamin 2-Methylbutylamin Piperidin Pyrrolidin	14 15 9 17 26	keine biologische Reinigung Kjeldahl-N= 25,7 mg/l		Ionenaustausch
Elässer [1]	1-H-Imidazol- 4-ethanolamin,5-methyl Benzenethanamin- N-,alpha dimethyl(S) 4-Imidazolinon-2-thioxo 2-Pyridinamin-4-methyl Chinazolin-2-chloro Benzensulfonamid- N,N-dimethyl Pyridin-2-methyl Pyridin-2,4-dimethyl Pyridin3-ethenyl 1-H-Imidazol- 2-(diethoxymethyl) 4-Pyridincarboxylicacid ester 1-H-Indol 2,4(1-H, 3-H) Pyrimidinon- 1,3-dimethyl Benzenamid-4-methoxy Benzaldehyd-4-methyl-oxim 1-H-Isoindol- 1,3 (2H) dion-2-methyl Benzenesulfonamid- N,N,4-trimethyl 1H-Purin-2,6-dione,3,7- dihydro-trimethyl 1-H-Indol-3-ethanamin- N,1-dimethyl Heptanamid-4-ethyl-5-methyl	8 0,4 3 1 1 2 1 1 0,4 1 1 1 0,4 1 1 1 0,4 1 1 0,3 1 2 6	biologische Reinigung	rein Kommunale Abwässer	Glasfaserfiltration Membranfiltration Gefrieranreicherung Membranfiltration Elektrodialyse Vakuumverdampfung Gefriertrocknung

Für das mehrfach identifizierte Methylbenzothiazol konnte Chudoba [7] die Bildung in einer Laborkläranlage zeigen. Deshalb ist Methylbenzothiazol für ein biologisch gereinigtes Abwasser eine möglicherweise typische Komponente und kann dann als Indikator für ein biologisch behandeltes Abwasser herangezogen werden.

Bei Coffein, das Paxeus und Clark nachweisen konnten, handelt es sich wahrscheinlich um eine durch coffeinhaltige Getränke verursachte und damit anthropogen bedingte Substanz, die nicht vollständig in der Kläranlage abgebaut wird.

Für Stickstoffverbindungen können damit zwei Möglichkeiten der Herkunft gezeigt werden. Einmal können die Verbindungen eingetragen und zumindest nicht vollständig abgebaut werden (Coffein), zum anderen können sie biologischen Ursprungs sein und entweder schon im Kanalnetz oder in der Kläranlage gebildet werden (Benzothiazolderivate).

Zur Frage, inwiefern analoge Ergebnisse mit unterschiedlichen Anreicherungsverfahren erzielbar sind, sollen die Ergebnisse der Anreicherung über Lösungsmittelextraktion bzw. an XAD, an Ionenaustauschern von Scully [12] und nach dem Verfahren von Elsässer [1] verglichen werden. Es zeigt sich, daß keine der identifizierten Verbindungen mit einer zweiten hier aufgeführten Methode nachgewiesen werden konnte.

Dies spricht dafür, daß die Identifizierbarkeit einer Stickstoffverbindung von der Auswahl des Analyseverfahrens abhängt. Die Ergebnisse, die mit verschiedenen Anreicherungsverfahren erzielt wurden, zeigen keine Übereinstimmung.

3. Die Anreicherung organischer Stickstoffverbindungen aus wäßrigen Lösungen

In der vorliegenden Literatur sind im wesentlichen fünf Verfahren zur Extraktion von Stickstoffverbindungen aus wäßrigen Lösungen beschrieben. Dies sind die Ionenaustauschchromatographie, die Anreicherung an XAD-Harzen, die Reversed-Phase-Chromatographie, die Lösungsmittelextraktion und die Aufarbeitung nach Werner Elsässer.

Diese Verfahren sollten auf ihre Eignung für die Identifizierung von Stickstoffverbindungen aus Kläranlagenabläufen beleuchtet werden.

Zur Bewertung wurden folgende Größen oder Aspekte herangezogen, die in den Spalten der nachfolgenden Tabellen zusammengetragen sind.

1. Übergang zum nicht wäßrigen Lösungsmittel
2. Maximaler Anreicherungsfaktor
3. Eignung der Methode für ein möglichst breites Substanzspektrum

zu 1.

Durch die Aufarbeitung muß ein *Übergang zu einem nicht wäßrigen Lösungsmittel* erreicht werden. Denn die meisten gaschromatographischen Säulen sind zur Analyse wäßriger Lösungen nicht geeignet. Eine Randbedingung war, *auf den Einsatz von chlorierten Kohlenwasserstoffen soweit wie möglich zu verzichten*, da diese erhebliche Entsorgungsprobleme bereiten.

zu 2.

Zur Identifizierung eines organischen Stoffes im Scan-Modus (Aufnahme von "Totalionenspektren") muß der Gehalt in der zur Messung gelangenden Lösung die Nachweisgrenze von 10 mg/l übertreffen. Dazu muß bei einer Ausgangskonzentration von 1 µg/l ein Anreicherungsfaktor F_A von 10000 erreicht werden. Der Anreicherungsfaktor ist das Produkt aus Wiederfindungsgrad W und "Konzentrierungsfaktor" F_K .

$$F_A = W * \frac{1}{100} * F_K$$

Zum "Konzentrierungsfaktor":

Beim Aufkonzentrieren der wäßrigen Lösung einer Substanz durch Verdampfen sind Verluste durch Adsorption ((z.B. für Phenmetrazin 80% an Glas [4]), eventuell unterstützt durch Unterschreiten der Löslichkeit und durch Verdampfen flüchtiger Komponenten nicht ganz zu vermeiden. Deshalb soll auf die Aufkonzentrierung wäßriger Lösungen möglichst verzichtet werden.

Liegt der Stoff nach der Anreicherung erst einmal in einem organischen Lösungsmittel vor, kann nahezu jeder Konzentrierungsfaktor erreicht werden. Da die Verluste bei dieser Art der Aufkonzentrierung in keiner der vorliegenden Arbeiten bestimmt wurden und in die Wiederfindungsgrade einfließen, soll bei der Berechnung der Konzentrierungsfaktoren nur das Verhältnis von Probevolumen zu Volumen an Extrakt herangezogen werden. Mögliches Erhöhen des Faktors durch Einengen wird nicht berücksichtigt.

Zum "Wiederfindungsgrad":

Da die Wiederfindungsgrade je nach Ausgangskonzentration verschieden sein können, lassen sich Anreicherungs-faktoren nur für gleiche Ausgangskonzentrationen vergleichen. Die Übertragbarkeit auf andere Konzentrationsbereiche muß untersucht werden.

hier : W (Ausgangskonzentration in ppb) = W (c)

Da dann auch F_A von der Konzentration abhängt, gilt für F_A einer Ausgangskonzentration:

$$F_{A(c)} = W(c) * \frac{1}{100} * F_K$$

Anreicherungs-faktoren von 10000 werden als ideal angesehen, von 1000 - 10000 als gut, Anreicherungs-faktoren von unter 100 lassen Chancen für eine geeignete Analysenmethode nach Verbesserung offen und Anreicherungs-faktoren < 1 weisen ein Verfahren als ungeeignet aus.

Zu 3.

Weiterhin muß überprüft werden, ob die Methode möglichst für "alle" Stickstoffverbindungen geeignet ist. Beim pH-Wert eines Abwassers von 7 bis 8 sind stark basische Stickstoffverbindungen protoniert. Sie haben die Möglichkeit zur Ausbildung von ionischen und Wasserstoffbrückenbindungen. Ungeladene, sogenannte "mittelpolare" Stickstoffverbindungen können nur Van der Waalssche Wechselwirkungen ausüben. Deshalb werden zwei Klassen von Stickstoffverbindungen definiert, die "mittelpolaren", nicht basischen bzw. schwach basischen und die "polaren", basischen Stickstoffverbindungen.

Erst wenn Vertreter beider Klassen mit der gleichen Methode angereichert werden können, ist die Anwendbarkeit der Methode für ein breites Substanzspektrum in Aussicht gestellt.

Die Qualität der fünf Anreicherungsverfahren sollen jetzt an Hand der drei hier aufgestellten Kriterien im Hinblick auf eine Identifizierung von Stickstoffverbindungen mit der Gaschromatographie / Massenspektrometrie abgeschätzt werden.

3.1. Anreicherung an Ionenaustauschern

Kaczvinsky [17] und Scully [12] reichern Stickstoffverbindungen aus wässrigen Lösungen an. Wie Tabelle 3 zeigt, ist das Verfahren von Scully wegen der Verwendung wässriger Eluenten so nicht geeignet.

Kaczvinsky verwendet nach dem Begasen des Austauschermaterials mit Ammoniak Methanol zum Eluieren und damit nicht wässrige, chlorfreie Lösungsmittel. Ein Anreicherungsfaktor von 18 weist das Verfahren als Methode aus, die Chancen zur Identifizierung nach Optimierung läßt, zumindest bei einer Ausgangskonzentration von 50 ppb. Für Stoffe, die mit 1 µg/l vorliegen, müßte die Übertragbarkeit der Anreicherungsfaktoren geprüft werden. Das untersuchte Substanzspektrum läßt die Anwendbarkeit auf ein breites Substanzspektrum erwarten. Für nicht basische Stickstoffverbindungen, die nicht an einem Anionenaustauscher adsorbiert werden, scheidet das Verfahren jedoch aus.

Tabelle 3. Qualitätsmerkmale der Anreicherung von organischen Stickstoffverbindungen an Ionenaustauschern

Literatur	Eluent	Wiederfindungsgrad W	Ausgangskonzentration	Konzentrierungsfaktor [#] F _K	FA (c in ppb) [#] = W(c in ppb) · % · F _K	Angereicherte Substanzen
Kaczvinsky [17]	NH ₃ Methanol	0-100% überwiegend > 90%	50 ppb	20	für die meisten Verbindungen FA(50)=18	aliphatische u. aromatische Amine basische Heterozyklen
Scully [12]	wässrige Lösung mit Methanol	8-51%	ppb	nicht bekannt	FA(1)= nicht zu ermitteln	Isoamylamin Piperidin Isobutylamin Methylbutylamin Pyrrolidin

Der angegebene Konzentrierungsfaktor ist durch das Verhältnis von Probevolumen zu Volumen an Eluent gegeben. Mögliches Erhöhen des Faktors durch Einengen ist nicht berücksichtigt.

Die Anreicherung an Ionenaustauschern läßt mit einem derzeit erreichten Anreicherungsfaktor von 18 für den 50 ppb- Bereich nur Chancen bei einer Weiterentwicklung der Methode für eine Identifizierung von Stickstoffverbindungen im 1 ppb-Bereich offen.

3.2. Anreicherung an XAD-Harzen

Zur Anreicherung von Stickstoffverbindungen an XAD-Harzen liegen, wie Tabelle 4 zeigt, drei Veröffentlichungen vor.

Tabelle 4. Qualitätsmerkmale der Anreicherung von organischen Stickstoffverbindungen mit XAD-Harzen

Literatur	Eluent	Wiederfindungsgrad W	Ausgangskonzentration	Konzentrationsfaktor [#] FK	FA (c in ppb)= W(c in ppb)*%*FK	Angereicherte Substanzen
Junk [19]	Diethyl- ether	> 80%	100 ppb	40	FA(50)=32	Hexadecylamin Nitrobenzol Indol o-Nitrotoluol N-Methylanilin Benzothiazol Quinolin Isoquinolin Benzonitril Benzoxazol
Mills [18]	Wasser und Wasser mit Ethanol	>96%	nicht bekannt		FA(?)= nicht zu ermitteln	Purine Pyrimidine Nucleoside
Leqube [10]	Dichlor- methan	nicht angegeben	nicht bekannt	30	FA(?)= nicht zu ermitteln	Benzothiazol N,N'-Diisopropyl- phenylendiamin N,N'-Dimethyl- phenobarbituron 2-Methyl-β- quinolin

[#] Der angegebene Konzentrationsfaktor ist durch das Verhältnis von Probevolumen zu Volumen an Eluent gegeben. Mögliches Erhöhen des Faktors durch Einengen ist nicht berücksichtigt.

Die Anreicherung von Mills [18] ist wegen der Verwendung von wäßrigen Eluenten so nicht allgemein vorteilhaft, zeigt aber ein Anreicherungsvermögen der XAD-Harze für Kernbasen. Mit der Verwendung von wasserfreien, chlorierten Eluenten durch die anderen Autoren ist das Verfahren für die vorliegende Problemstellung geeignet, wobei die Entsorgung des Eluenten heutzutage ein Problem darstellt.

Nach Junk [19] hat das Verfahren mit einem Anreicherungsfaktor von 32 bei einer Ausgangskonzentration von 100 ppb nur nach einer Weiterentwicklung Chancen, den geforderten Anreicherungsfaktor $F_{A(1)}=10000$ für "polare" und "mittelpolare" Verbindungen zu erreichen. Die Methode ist auf Grund der Erfahrungen von Legube [10], Mills und Funk für "polare" und "unpolare" Stickstoffverbindungen und damit für ein großes Substanzspektrum geeignet.

Auch die Anreicherung von Stickstoffverbindungen über XAD-Harze erfordert eine Weiterentwicklung der Methode für Ausgangskonzentrationen von 1 ppb.

3.3. Anreicherung an Reversed-Phasen

Reversed-Phasen wurden von verschiedenen Autoren erfolgreich zur Anreicherung von Stickstoffverbindungen eingesetzt. Die Mehrzahl der Autoren verwendet, wie Tabelle 5 zeigt, wasserfreie, organische Eluenten. Obwohl einige Autoren chlorierte Lösungsmittel verwenden, sind die Stoffe zum überwiegenden Anteil mit unchlorierten Lösungsmitteln eluierbar. Der erste Punkt der Liste zur Eignung des Verfahrens ist also erfüllt.

Im zweiten Schritt soll das Verfahren nach seinem Anreicherungsfaktor eingeordnet werden. Dieser ist nur bei zwei der hier dargestellten Verfahren angegeben. Er liegt für die Anreicherung von Sciacca [20] bei 40, für die Anreicherung von Öhmichen bei 950. Zusammenfassend rückt das Verfahren von Öhmichen [24] in den Bereich der "guten" Methoden, die eventuell mit einfachen Veränderungen einen Anreicherungsfaktor von 10000 realisieren. (So könnte z.B. die Reduzierung der eingesetzten Menge der Eluenten den Anreicherungsfaktor entscheidend erhöhen.) Mit einer Ausgangskonzentration von 0.05 ppb bis 1 ppb wurde der relevante Konzentrationsbereich erfaßt, so daß die Werte uneingeschränkt auf das bestehende Problem übertragbar sind.

Zum dritten soll untersucht werden, ob ein großes Substanzspektrum erfaßt werden kann. Öhmichen untersuchte nur "polare" Aniline. Prinzipiell ist das Verfahren, wie die anderen, in Tabelle 5 dargestellten Veröffentlichungen zeigen, auch zur Anreicherung von "mittelpolaren" Verbindungen geeignet.

Damit ist die Reversed-Phase-Anreicherung eine Methode, die als "gutes" Anreicherungsverfahren in Hinblick auf eine Identifizierung von Stickstoffverbindungen einzuordnen ist.

Tabelle 5. Qualitätsmerkmale der Anreicherung von organischen Stickstoffverbindungen an Reversed-Phasen

Literatur	Eluent	Wiederfindungsgrad W	Ausgangskonzentration	Konzentrierungsfaktor [#] FK	FA (c in ppb)= W(c in ppb)*%*FK	Substanz
Sciacca [20]	Acetonitril	~ 100%	8 ppb	40	FA(8)=40	1-(2-Pyrimidinyl)-piperazin Buspiron
Sherma [21]	nicht angegeben	95%	1 ppm	nicht angegeben	FA(?)= nicht zu ermitteln	Cyclohexylamin
Lambrechts [22]	Dichlormethan Acetonitril Methanol Chloroform	nicht angegeben	nicht angegeben	nicht angegeben	FA(?)= nicht zu ermitteln	N-Formylamphetamin 4-Methyl-5-phenylpyrimidin N,N-di(β-phenyl-ethylisopropyl)-formamid
Falkowski [23]	wäßrige Pufferlösung	> 70%		nicht angegeben	FA(?)= nicht zu ermitteln	5-Hydroxyindol-derivat
Öhmichen [24]	Ethylacetat	> 95%	0.05 ppb- 1 ppb	1000	FA(0.05)= 950	Anilin
Walter [25]	Hexan Methanol	nicht angegeben	nicht angegeben	500	FA(?)= nicht zu ermitteln	Triazine Carbamate Captafol Folpet und viele andere stickstoffhaltige Pestizide

[#] Der angegebene Konzentrierungsfaktor ist durch das Verhältnis von Probenvolumen zu Volumen an Eluent gegeben. Mögliches Erhöhen des Faktors durch Einengen ist nicht berücksichtigt.

3.4. Anreicherung über Lösungsmittelextraktion

Die Lösungsmittelextraktion ist ein Verfahren, das bei der Identifizierung von organischen Substanzen in kommunalen Kläranlagenabläufen häufig angewendet wurde. Wie Tabelle 6 zeigt, werden "mittelpolare" und "polare" Stickstoffverbindungen mit organischen Lösungsmitteln angereichert. Mit der Anwendung von wasserfreien, zum Teil unchlorierten Lösungsmitteln erfüllt die Methode das erste Kriterium der Anforderungsliste.

Tabelle 6. Qualitätsmerkmale der Anreicherung von organischen Stickstoffverbindungen mit Lösungsmittlextraktion

Literatur	Lösungsmittel	Wiederfindungsgrad W	Ausgangskonzentration	Konzentrationsfaktor [#] F _K	FA (c in ppb)= W(c in ppb)*%*F _K	Substanz
Paxeus [15]	Dichlormethan	nicht angegeben	unbekannt	nicht angegeben	FA(?)= nicht zu ermitteln	Coffein 2, 4-Dinitrotoluol 2,4-Dinitrotoluol 3-Nitroanilin 2-Nitroanilin Indol
Gulyas [3]	Dichlormethan	nicht bestimmt	unbekannt	60 fache Konzentrierung mit Umkehrosmose dann 3 fach konzentriert	FA(?)= nicht zu ermitteln	1-Methyl-2-pyrrolidinon Isocyanatocyclohexan Benzothiazol 2-Amino-4(1H)-pteridinon N-Butyl-benzolsulfonamid Nitrofurantoin
Walle [4]	Benzol	95	1-0.1 ppb	dreifach verdünnt 0.3	~ = 0.3	2-Phenylethylamin Amphetamin und andere phenylsubstituierte Amine

[#] Der angegebene Konzentrationsfaktor ist durch das Verhältnis von Probevolumen zu Volumen an Eluent gegeben. Mögliches Erhöhen des Faktors durch Einengen ist nicht berücksichtigt.

Zur Einordnung des Verfahrens nach dem zweiten Punkt der Liste werden die Anreicherungsfaktoren betrachtet. Die Chancen für eine Identifizierung von Stickstoffverbindungen können nach den Angaben von Paxeus [15] und Gulyas [3] wegen fehlender Wiederfindungsgrade und Konzentrationsfaktoren nicht abgeschätzt werden.

Walle [4] hat ein Verfahren zur Anreicherung von phenylsubstituierten Aminen aus wässrigen Lösungen mit einem Wiederfindungsgrad von 95% ausgearbeitet. Der Anreicherungsfaktor bei seiner Methode errechnet sich zu 0.3. So sind zur Extraktion von einem Liter Wasser drei Liter Benzol notwendig. Damit ist das Verfahren nach Punkt 2 der Liste für phenylsubstituierte Amine als ungünstig einzuordnen. Um das Verfahren für andere Stickstoffverbindungen einschätzen zu können, wurde erfolglos nach weiteren Anreicherungsfaktoren in der Literatur gesucht. Eine Abschätzung der Anreicherungsfaktoren ist über den Vergleich von Löslichkeiten von Stickstoffverbindungen möglich:

$$F_A \sim F_K \sim \text{Verteilungskoeffizient} \sim \frac{\text{Löslichkeit in der organischen Phase}}{\text{Löslichkeit in der Wasserphase}} \quad \text{nach Nemst}$$

Auf Grund der unterschiedlichen Löslichkeit für verschiedene organische Verbindungen in Wasser, die alle gut in Diethylether löslich sind :

Anthracen, Heptachlor Amphetamin Isopropylamin Pyrrolidin, Piperidin
 unlöslich << teilweise löslich << unbegrenzt löslich

gilt für den Anreicherungsfaktor F_A der Substanzen für die Extraktion mit Ether :

F_A (Anthracen, Heptachlor) >> F_A (Amphetamin) >> F_A (Pyrrolidin, Piperidin)
 5 >> 0.3 >> ?

Es zeigt sich aus dieser Abschätzung, daß die Lösungsmittelextraktion, die für PAK wie Anthracen und Pflanzenschutzmittel wie Heptachlor eine übliche Methode mit Anreicherungsfaktoren von etwa 5 [26] ist, für das in Wasser besser lösliche Amphetamin mit einer Abreicherung (($F_A= 0.3$) im Eluenten verbunden ist [4]. Mit steigender Löslichkeit der Analyten lassen sich noch größere "Abreicherungsfaktoren" extrapolieren. Es zeigt sich, daß die Lösungsmittelextraktion insbesondere für gut wasserlösliche Stickstoffverbindungen ein ungünstiges Anreicherungsverfahren ist.

3.5. Aufarbeitung nach Elsässer

Elsässers Verfahren, das für die Identifizierung organischer Verbindungen bisher am erfolgreichsten war, verwendet nicht wäßrige, chlorfreie Eluenten (siehe Tabelle 7) und erfüllt damit die erste Anforderung.

Tabelle 7. Qualitätsmerkmale der Anreicherung von organischen Stickstoffverbindungen nach dem Verfahren von Elsässer

Literatur	Eluent	Wiederfindungsgrad W	Ausgangskonzentration	Konzentrierungsfaktor F_K	F_A (c in ppb)= $W(c \text{ in ppb}) \cdot \% \cdot F_K$	Substanz
Elsässer [1]	Methanol	nicht	nicht	nicht	$F_A(?) = ?$	viele
	Hexan	bestimmt	angegeben	angegeben		Heterozyklen 2-Pyridinamin- 4-methyl 4-Ethanolamin- 5-methyl

Der angegebene Konzentrierungsfaktor ist durch das Verhältnis von Probevolumen zu Volumen an Eluent gegeben. Mögliches Erhöhen des Faktors durch Einengen ist nicht berücksichtigt.

Die Leistungsfähigkeit hinsichtlich des Anreicherungsfaktors nach den aufgestellten Kriterien kann nicht eingeschätzt werden, da Wiederfindungsgrade für die identifizierten Substanzen nicht bestimmt wurden. Die Anwendbarkeit für "mittelpolare" Stickstoffverbindungen ist wegen der vielen identifizierten Heterozyklen sicherlich gegeben. Als "polare" Stickstoffverbindungen konnten nur die zwei, in Tabelle 7 dargestellten Aminderivate nachgewiesen werden. Das stellt die Möglichkeit zum Nachweis weiterer "polarer" Stickstoffverbindungen in Frage.

3.6. Zusammenfassung

Die erste Forderung nach einem wasserfreien Eluenten erfüllen alle hier betrachteten Verfahren. Nach dem Anreicherungsfaktor ergibt sich folgende Klassifikation der Methoden:

Verfahren	Lösungsmittel- extraktion	Anreicherung an XAD und Ionenaustauschern	Reversed- Phase- Anreicherung	Ziel: (von Keiner Anreicherungs- methode erfüllt)
FA	< 1	1-100	1000-10000	10000
Beurteilung	ungeeignet	Verbesserung notwendig	gut	ideal

Elsässers Methode kann wegen nicht ermittelbarem Anreicherungsfaktor nicht klassifiziert werden.

Die dritte Anforderung bestand darin, daß "polare" und "unpolare" Substanzen und damit ein breites Substanzspektrum erfaßbar sind. Dieses Kriterium erfüllen die Anreicherung an XAD-Harzen, die Reversed-Phase-Anreicherung und die Lösungsmittlextraktion. Die Methode von Elsässer ist für basische Verbindungen nur beschränkt, die Ionenaustauschchromatographie ist für Substanzen ohne basisches Stickstoffatom nicht geeignet.

Insgesamt sind Reversed-Phasen und XAD-Harze zur Anreicherung von "polaren" und "mittelpolaren" Stickstoffverbindungen aus wäßrigen Lösungen am besten geeignet.

4. Matrixeffekte in Kläranlagenabläufen

4.1. Bedeutung der Einzelkomponenten als analytische Matrix

Als effektivste Anreicherung wurde unter den fünf zur Diskussion stehenden Methoden die Reversed-Phase-Chromatographie für eine Identifizierung von Stickstoffverbindungen aus wäßrigen Lösungen ermittelt. Dabei wurden Einflüsse auf die Wiederfindung durch weitere Probenbestandteile, wie z. B. Salze und andere anorganische oder organische Stoffe noch nicht diskutiert.

Die Effektivität einer Anreicherungs-methode hängt aber nicht nur davon ab, ob das Adsorptionsmaterial die zu bestimmende Substanz nach Bedarf aufkonzentrieren kann, sondern auch, ob Einflüsse durch weitere Probenbestandteile auf die Anreicherung ausgeschlossen sind. Deshalb sollte die Methode so spezifisch sein, daß die übrigen Bestandteile der zu analysierenden Probe, die "Matrix", möglichst keine Konkurrenzreaktionen zum Analyten zeigen.

Die zur Verfügung stehenden Daten über die Zusammensetzung des Kläranlagenablaufs in Bezug auf die Anreicherung von Stickstoffverbindungen sind in diesem Kapitel zusammengetragen und die Auswirkungen auf die Verfahren diskutiert.

Folgende Bestandteile bzw. Faktoren haben möglicherweise Einfluß auf die Analytik von Stickstoffverbindungen:

- *Konkurrenzreaktionen von Salzen*
- *Konkurrenzreaktionen organischer Bestandteile*
- *Adsorption von Stickstoffverbindungen an organischen und anorganischen Stoffen*
- *Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen*

4.2. Konkurrenzreaktionen

Treten Konkurrenzreaktionen auf, kann der Verlust eines Analyten vermindert werden, indem die Menge des vorgelegten Extraktionsmittels proportional zum aktiven Matrixanteil erhöht wird. Dazu muß aber der aktive Anteil der Matrix und der zur Sorption aller aktiven Probenbestandteile (also Analyt + aktive Matrix) notwendige Bedarf bestimmt werden.

Im einfachsten Fall, wenn der in Konkurrenz tretende Matrixbestandteil in allen Kläranlagenabläufen in gleichen Konzentrationen vorkommt, kann der Mehrbedarf an Extraktionsmittel mit dem "Normalbedarf" ermittelt werden.

Kann bei wechselnder Matrixzusammensetzung der Anteil an aktivem Matrixbestandteil quantifiziert werden, und gibt es eine Korrelation zwischen dem Gehalt an aktivem Material und dem Bedarf an Adsorptionsmaterial, so ist die Berechnung des benötigten Adsorptionsmaterials für jede Matrix möglich.

Gibt es aber keine einfache Methode, einen Wechsel der aktiven Matrixbestandteile zu erfassen und zu quantifizieren, muß der Bedarf an Adsorptionsmaterial für jeden Fall bestimmt werden. Damit ist ein großer analytischer Aufwand verbunden. Ein solches Verfahren ist soweit als möglich zu meiden. Sofern der Gehalt an konkurrierendem Matrixbestandteil einfach bestimmt werden kann, ist eine Kalkulation des Adsorptionsmaterials vorzuziehen.

Deshalb soll anhand von Literaturdaten ermittelt werden, welche Matrixeffekte zu erwarten sind, und ob die für ein Anreicherungsverfahren "aktive" Matrix im Kläranlagenablauf in konstanten Mengen zu erwarten ist.

Erst dann kann abgeschätzt werden, ob eine Anreicherungsverfahren für die Identifizierung von Stickstoffverbindungen in der Matrix "kommunaler Kläranlagenablauf" geeignet ist.

4.2.1. Konkurrenzreaktionen anorganischer Bestandteile

Der Anteil an Salzen im Auslauf einer kommunalen Kläranlage setzt sich zusammen aus dem Anteil, der schon im Trinkwasser vorhanden ist und einem zusätzlichen Eintrag durch die Nutzung des Wassers. Dieser ist für ein kommunales Abwasser relativ konstant und liegt bei etwa 5 mmol/l. Für Abwässer mit besonders hoher anorganischer Grundbelastung im abgegebenen Trinkwasser liegt der Salzgehalt bei etwa 20 mmol/l.

Ob Salze bei der Anreicherung von Stickstoffverbindungen sich störend auswirken, hängt vom Anreicherungsverfahren ab. Deshalb sind die Matrixeffekte für die fünf Verfahren unterschiedlich und im Einzelfall zu diskutieren.

Der Bedarf an Reversed-Phase-Material ist vom Salzgehalt unabhängig, da Ionen mit Reversed-Phase-Materialien nicht in Wechselwirkung treten und nur in geringem Ausmaß Konkurrenzreaktionen zu Stickstoffverbindungen ausüben. Anorganische Ionen konkurrieren weder bei der Lösungsmittelextraktion noch bei der Anreicherung an XAD-Harzen mit Stickstoffverbindungen.

Der Einfluß der Salze wurde von Elsässer nicht quantifiziert und läßt sich auch nachträglich nicht abschätzen.

Bei der Anreicherung von Stickstoffverbindungen an Ionenaustauschern treten Salze in Konkurrenz zum Analyten um die aktiven Stellen. Das setzt die Anzahl der aktiven Gruppen, die für organische Stickstoffverbindungen zugänglich sind, herab und erhöht dadurch den Bedarf an Austauschmaterial. Da die Ionenkonzentration kommunaler Abwässer normalerweise 20 mmol/l nicht übersteigt, kann der maximale Bedarf an Ionenaustauschmaterial festgelegt werden. Der für die Anreicherung von Stickstoffverbindungen in einem Kläranlagenwasser mit besonders hoher Belastung (etwa 20 mmol/l) bestimmte Bedarf an Ionenaustauschermaterial kann auf andere biologisch gereinigte Abläufe übertragen werden.

4.2.2. Konkurrenzreaktionen organischer Bestandteile

a.) Zusammensetzung des organischen Anteils

Der organische Anteil eines 0.45 µm filtrierten, biologisch gereinigten Kläranlagenablaufs setzt sich aus einer hochmolekularen und einer niedermolekularen Fraktion zusammen. Levine [28] bestimmte die Partikelgrößen der organischen Stoffe im ungereinigten Abwasser, die in Abbildung 3 dargestellt sind.

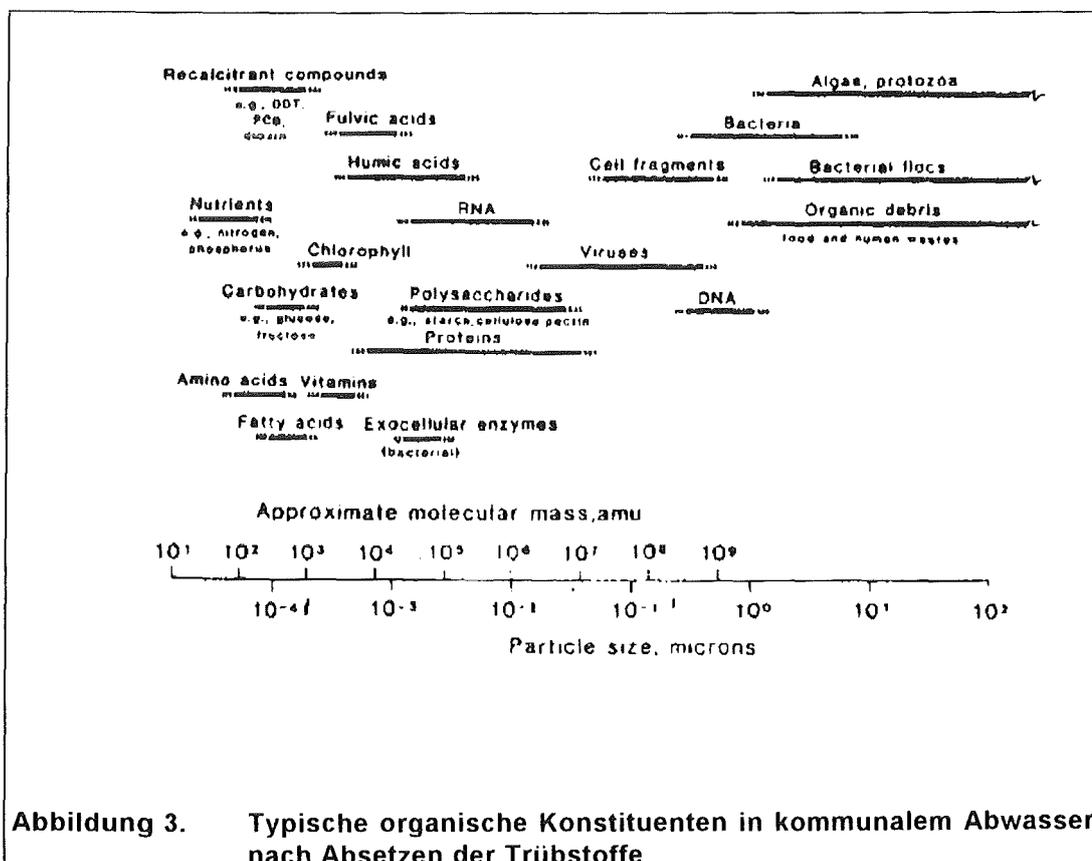


Abbildung 3. Typische organische Konstituenten in kommunalem Abwasser nach Absetzen der Trübstoffe

Geht man für die hochmolekulare Fraktion von gleichen Partikelgrößen wie im unge-reinigten Abwasser aus, kann man in der hochmolekularen Fraktion größer 1000 Dalton Zellfragmente, Viren, hochmolekulare huminstoffähnliche Substanzen, Proteine (als extrazelluläre Enzyme) und RNA-Fragmente als Produkte der biologischen Aktivität erwarten. Die niedermolekulare Fraktion besteht nach Legube [4], Ellis [16] und Elsässer [1] aus relativ einfachen Stoffen, wie z.B. aus Fettsäuren, Aminosäuren, Alkoholen und Heterozyklen.

b.) Kalkulation des Mehrbedarfs bei Konkurrenzreaktionen organischer Stoffe

Die Konzentration organischer Stoffe im Auslauf einer Kläranlage ist nicht konstant. So wurde z.B. im Auslauf einer kommunalen Kläranlage ein DOC zwischen 4.2 mg/l und 30.5 mg/l gemessen.

Werden organische Matrixbestandteile selbst angereichert, reduzieren sie die Kapazität des Anreicherungsmaterials und können so die Extraktion stickstoffhaltiger Stoffe beeinträchtigen. Entscheidend für eine ausreichende Kapazität ist dann nicht mehr der Analyt, sondern der Gesamtgehalt an resorbierbaren Stoffen.

Im Falle der Reversed-Phase-Anreicherung ist eine einfache Abschätzung der erforderlichen Menge an Austauschermaterial mit den folgenden Angaben möglich:

Die Kapazität von Reversed-Phasen wird vom Hersteller mit 1 bis zu 5% der Sorbensmasse angegeben. Da neben den anzureichernden Stickstoffverbindungen maximal alle anderen organischen Substanzen adsorbiert werden können, ist der Gesamtgehalt an organischen Stoffen ein Maß zur Abschätzung der im Maximum notwendigen Sorbensmasse. Zur Anreicherung von 1 mg organischem Material benötigt man 100 mg Reversed-Phase-Material [29].

Ist der DOC einer Probe bekannt, kann der Gehalt an gelösten, organischen Stoffen daraus näherungsweise abgeschätzt werden. Unter der Annahme, daß der Kohlenstoffgehalt der organischen Substanz etwa 50% beträgt, benötigt man für 1 mg/l DOC etwa 200 mg Reversed-Phase-Material.

Im Falle der Anreicherung an XAD-Harzen ist zu erwarten, daß man mit dem gleichen Festphasenbedarf rechnen kann. Eine Korrelation zwischen Bedarf an XAD-Material in Abhängigkeit vom Gehalt an organischer Masse ist aber der vorliegenden Literatur nicht zu entnehmen.

Auch bei der Extraktion mit organischen Lösungsmitteln ist eine Reduzierung der Löslichkeit von Stickstoffverbindungen und damit eine Reduzierung des Wiederfindungsgrades nicht auszuschließen. Zur Kalkulation des Mehrbedarfs an Lösungsmitteln in Abhängigkeit vom Gehalt an organischen Substanzen liegen keine verwertbaren Erfahrungen vor.

Hochmolekulare, organische Substanzen können, sofern sie positiv geladen sind, an Kationenaustauschern mit niedermolekularen Stickstoffverbindungen in Konkurrenz treten. Setzt man voraus, daß die Anzahl der organischen Kationen mit der Menge an organischer Fracht korreliert, lassen variierende DOC-Gehalte auch unterschiedliche Gehalte an kationischen Species und damit eine variierende Matrix für den Ionenaustausch erwarten. Da es keine einfachen analytische Methoden zur quantitativen Erfassung dieser aktiven Gruppen gibt, ist der Mehrbedarf durch die Matrix nicht kalkulierbar. Gleichzeitig ist eine Desaktivierung des Austauschers durch die Adsorption mit ungeladenen organischen Molekülen am Polymergerüst des Austauschers nicht auszuschließen und ebenfalls nicht zu quantifizieren.

Eine Beeinträchtigung der Wiederfindung von Stickstoffverbindungen in Elsässers Aufarbeitung durch Konkurrenzreaktionen mit anderen organischen Bestandteilen sind bei der Gefrieranreicherung, Membranfiltration und beim Lösen der organischen Stoffe aus der zum Feststoff aufkonzentrierten Probe nicht auszuschließen. Die Verluste an organischem Stickstoff bei diesen Arbeitsschritten wurden nicht quantifiziert.

Zusammenfassend ist bei allen Methoden mit Konkurrenzreaktionen zu rechnen. Die Kalkulation des Mehrbedarfs ist nur für die Reversed-Phase-Anreicherung mit einfachen Methoden möglich.

4.3. Adsorption an organischen und anorganischen Makromolekülen

Wie schon festgestellt, können auch assoziative Wechselwirkungen von organischen und anorganischen Substanzen mit den Stickstoffverbindungen, eine Adsorption am Feststoff und damit eine Erfassung des Analyten verhindern.

Inhaltsstoffe von kommunalem Abwasser, die für solche Effekte in Frage kommen, sind z.B. Kieselsäuren, Eisenkolloide, der huminstoffähnliche Anteil und Proteine. Im Falle einer Adsorption des Analyten an weitere Bestandteile, muß der Analyt zur gaschromatographischen Analyse desorbiert werden. Dazu gibt es zwei Möglichkeiten.

Einerseits kann eine Konkurrenzreaktion des Anreicherungsmaterials eine Desorption bewirken, wenn das Extraktionsmittel größere Wechselwirkungen als die Matrix ausübt. Da unklar ist, ob ionische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen oder Van der Waalssche-Wechselwirkungen zur Sorption an der Matrix führen, ist die Voraussage einer Desorption durch verschiedene Extraktionsmaterialien nicht möglich.

Andererseits kann eine Abschwächung der Wechselwirkungen nach einer chemischen oder physikalischen Veränderung des Adsorptionsmaterials bzw. des Analyten und damit eine Desorption erreicht werden. So konnten Arzneimittel in biologischen Matrices deshalb nicht erfaßt werden, weil sie an Matrixbestandteile (wahrscheinlich an Proteine) gebunden waren [29]. Die adsorbierten Stoffe können durch einen pH-

Wechsel oder z. B. durch die Zugabe von Methanol oder Ameisensäure freigesetzt und dann analytisch erfaßt werden. Analoge Effekte sind auch für Stickstoffverbindungen, wegen der strukturellen Ähnlichkeit mit vielen Arzneimitteln, vorstellbar.

Die Adsorption von Stickstoffverbindungen an Bestandteilen des Kläranlagenablaufs ist, wenn überhaupt, ein generelles Problem, das keines der hier diskutierten Anreicherungsverfahren ausschließen kann. Eine Desorption von Stickstoffverbindungen ist mit den genannten Mitteln für alle Anreicherungsverfahren möglich. Diese Optimierung der Bedingungen im Hinblick auf eine Anreicherung von Stickstoffverbindungen ist jedoch für die 1000 Dalton Membranfiltration, wie sie auch Elsässer zur Abtrennung des höhermolekularen Anteils angewandt hat, problematisch. Denn die 1000 Dalton Membranen sind nur im pH-Bereich 6-8 stabil und werden von organischen Lösungsmitteln (Methanol) aufgelöst.

4.4. Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen

Auf Grund der Anwesenheit von Mikroorganismen im biologisch gereinigten Abwasser kann auch nach der Probenahme noch biologische Aktivität auftreten und die Probe verändern.

Der organische Stickstoffgehalt ist nach Funk [30] und Gundernatsch [31] in Wasserproben nicht stabil. Deshalb kann eine Stabilisierung bzw. Konservierung von Stickstoffverbindungen in Kläranlagenabläufen über die Analysenzeit notwendig sein.

Führt man eine Lösungsmittelextraktion durch, so werden die Mikroorganismen in der wäßrigen Phase zurückgelassen und sind so sehr schnell von den Analyten abgetrennt. Ein Einfluß durch die Mikrobiologie ist deshalb für diese Methode nicht zu erwarten. Bei allen anderen Methoden betragen die Kontaktzeiten zwischen biologischer Matrix und Analyt einige Stunden. Eine Stabilisierung kann für diese Anreicherungsverfahren erforderlich sein.

Die Stabilisierbarkeit von organischem Stickstoff wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. So gibt Funk [30] in seinen Konservierungsempfehlungen für organisch gebundenen Stickstoff an, daß dieser nach seinen Untersuchungen noch nicht einmal einen Tag konservierbar sei, wobei er das Alkalisieren auf pH=12, Ansäuern auf pH=2, Tiefgefrieren, Tiefkühlen sowie den Zusatz von Chloroform und Quecksilberchlorid als Stabilisierungsmethoden für häusliche Abwasserproben untersuchte. Dagegen gibt Gundernatsch [31] als eingeführte Konservierungsmethode für Gesamtstickstoff das Ansäuern auf pH<2 an, ohne weitere Angaben über die Zusammensetzung der Wasserproben hinzuzufügen.

Übereinstimmende Aussagen über die Konservierbarkeit / Stabilisierbarkeit von Stickstoffverbindungen in Kläranlagenabläufen sind aus der Literatur nicht zu entnehmen und müssen deshalb untersucht werden.

4.5. Zusammenfassung der Matrixeinflüsse

In Tabelle 8 ist zusammengestellt, ob einer der vier Matrixbestandteile eine Konkurrenzreaktion zum Analyten eingeht. Sofern ein Inhaltsstoff in Konkurrenz tritt, wird angegeben, ob er in veränderlichen Anteilen auftritt. Ist mit unterschiedlichen Gehalten eines konkurrierenden Matrixbestandteils zu rechnen, wird in der Tabelle 8 erfaßt, ob der Mehrbedarf an Analysenmaterial für veränderliche Matrices abgeschätzt werden kann. In der Konzentration veränderliche Matrixbestandteile des kommunalen Abwassers werden, sofern der durch sie bedingte Mehrbedarf eines Analyten nicht kalkulierbar ist, in der Tabelle 8 mit einem + gekennzeichnet. Anreicherungsverfahren, für die in der Konzentration veränderliche, aktive Matrixanteile in Kläranlagenwasser erwartet werden, sollen, soweit wie möglich, vermieden werden. Denn bei diesen Anreicherungsverfahren ist die Reproduzierbarkeit der Methode in Frage gestellt. Matrixeffekte, die nicht auszuschließen, aber auch nicht unbedingt zu erwarten sind, werden mit einem (+) gekennzeichnet.

Insgesamt zeigt sich, daß keines der Anreicherungsverfahren für die Identifizierung von Stickstoffverbindungen in der Matrix Kläranlagenablauf alle zu erwartenden Matrixeffekte ausschließen kann. Trotzdem kann über die Anzahl der möglichen Matrixeffekte bei gleichzeitiger Wichtung (+ Verfahren ungeeignet, (+) Verfahren eventuell ungeeignet) folgende Reihenfolge für die zu erwartenden und nicht kalkulierbaren Matrixeffekte vorgenommen werden:

XAD, Ionenaustausch > Elsässer > Lösungsmittelextraktion, Reversed-Phase

Tabelle 8. Gegenüberstellung der möglichen Matrixefflüsse für die fünf Anreicherungsverfahren

Alle mit + gekennzeichneten Matrixeffekte sind zu erwarten und nicht abzuschätzen.
 Alle mit (+) gekennzeichneten Matrixeffekte sind nicht auszuschließen.

aktive Matrix	Matrixeffekte bei der Ionenaustauschchromatographie		Matrixeffekte bei der Reversed-Phase-Anreicherung	
anorganische Bestandteile (Konkurrenzreaktion)	Konkurrenzreaktion zu erwarten Mehrbedarf generell für Kläranlagenabläufe bestimmbar		keine Konkurrenzreaktion zu erwarten	
organische Bestandteile (Konkurrenzreaktion)	zu erwarten nicht quantifizierbar	+	zu erwarten, Sorbensbedarf kalkulierbar: 100 mg Sorbens/ 1g organische (Substanz + Matrix)	
Adsorption an organischen und anorganischen Bestandteilen	nicht auszuschließen	(+)	nicht auszuschließen	(+)
Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen	Stabilität nicht gesichert	+	Stabilität nicht gesichert	+

aktive Matrix	Matrixeffekte bei der Anreicherung an XAD		Matrixeffekte bei der Lösungsmittelextraktion	
anorganische Bestandteile (Konkurrenzreaktion)	keine Konkurrenzreaktion zu erwarten		keine Konkurrenzreaktion zu erwarten	
organische Bestandteile (Konkurrenzreaktion)	zu erwarten nicht quantifizierbar	+	zu erwarten nicht quantifizierbar	+
Adsorption an organischen und anorganischen Bestandteilen	nicht auszuschließen	(+)	nicht auszuschließen	(+)
Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen	Stabilität nicht gesichert	+	kein Einfluß zu erwarten	

aktive Matrix	Matrixeffekte beim Verfahren nach Elsässer	
anorganische Bestandteile (Konkurrenzreaktion)	Einfluß nicht abschätzbar	(+)
organische Bestandteile (Konkurrenzreaktion)	nicht auszuschließen nicht quantifizierbar	(+)
Adsorption an organischen und anorganischen Bestandteilen	nicht auszuschließen mit bekannten Methoden nicht zu umgehen	(+)
Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen	Stabilität nicht gesichert	+

4.6. Zusammenfassung von Kapitel 3 und 4

Faßt man die Vor- und Nachteile der Verfahren zusammen, so wird, wegen der hohen Konzentrierungsfaktoren und den zusammen mit der Lösungsmittelextraktion am besten kalkulierbaren Matrixeinflüssen, die Reversed-Phase-Anreicherung als am aussichtsreichsten für eine Identifizierung von "polaren" und "mittelpolaren" Stickstoffverbindungen im Ablauf kommunaler Kläranlagen mit biologischer Reinigungsstufe bewertet. Matrixeffekte durch mikrobiologische Veränderungen und durch eine Adsorption der Stickstoffverbindungen am höhermolekularen Anteil sind aber nicht auszuschließen.

Der Bedarf an Reversed-Phase-Material ist vom Gehalt organischer Stoffe abhängig. Da der Gehalt in den Proben Unterschiede aufweisen kann, ist eine Kalkulation des Reversed-Phase-Materials über den DOC notwendig:

$$\text{maximaler Reversed-Phase-Materialbedarf} = C(\text{org. Substanz}) \cdot 100 = (2 \cdot \text{DOC}) \cdot 100$$

5. Auswahl und Optimierung der gaschromatographischen Bedingungen

Nach der Anreicherung der organischen Stickstoffverbindungen können diese identifiziert werden, wenn mindestens 10 mg/l in der Meßlösung vorliegen und diese Menge quantitativ auf die gaschromatographische Trennsäule gebracht, dort von den übrigen Probenbestandteilen abgetrennt und in einem kurzen Zeitintervall in den Massendetektor überführt wird. Deshalb ist ein Probentransfer von Probenaufarbeitung → Detektor ohne Substanzverluste, wobei die Substanz in einem möglichst kleinen Zeitintervall verteilt sein soll, eine weitere Voraussetzung für eine Identifizierung von Stoffen, die im Konzentrationsbereich ppb in der Probe vorliegen. Die Optimierung dieses Probentransfers ist im folgenden Kapitel dargestellt.

Der Gaschromatograph, gekoppelt mit einem Massenspektrometer, der in dieser Arbeit verwendet wurde, ist in Anhang A, Nr. A1 beschrieben.

5.1. Auslegung des Injektionssystems, Säulenauswahl

Ein Probentransfer zum Detektor ohne Substanzverluste ist nur möglich, wenn das Injektionssystem eine vollständige Übertragung auf die Säule zuläßt.

Als Injektionsmodus wird die Splitless-Injektion verwendet, die den größten Anteil des Solventen von den Probenbestandteilen abtrennt und dadurch eine weitere Anreicherung der zu identifizierenden Substanzen im Injektorsystem bewirkt. Diese Injektionsart bedingt Kontaktzeiten von 0.5 bis 1 min im Injektor, wobei die Temperaturen etwa 50°C über dem Siedepunkt der Stickstoffverbindung liegen. Dies kann zur thermischen Zersetzung oder Abscheidung im Injektorsystem führen. Soweit erforderlich, soll auch die wartungsintensive Cool-on-column-Injektion zur Analyse thermisch labiler Stoffe eingesetzt werden. Mit dieser Injektionsart kann zwar das Lösungsmittel nicht abgetrennt werden, jedoch werden die Substanzen unterhalb des Siedepunktes des Lösungsmittels und damit sehr schonend injiziert [52], so daß thermisch induzierte Reaktionen wie z.B. eine reduktive Desaminierung von primären oder sekundären Aminen in Gegenwart von Aldehyden nur wenig zum Tragen kommen sollen.

Die Kopplung des Gaschromatographen an einen Massenselektiven Detektor (MSD) erfordert den Einsatz von Kapillarsäulen, da das Vakuum im MSD nur bei limitierten Gasflüssen aufrechtzuhalten ist. Die Verwendung von Kapillarsäulen ist auch wegen der hohen theoretischen Bodenzahlen, die eine Trennung der zu erwartenden

komplexen Mischungen möglich machen, notwendig. Neben dem Säulenmaterial ist die Temperatur des Injektors, des Detektors und die Säulenangfangstemperatur für einen guten Probentransfer entscheidend.

Bei der Auswahl des Säulenmaterials und der Wahl der Temperatur des Injektors, Detektors und der Säule ergeben sich für einen guten Probentransfer für basische und nicht basische Stickstoffverbindungen unterschiedliche Optima. Die Gestaltung dieser Parameter wird deshalb in dieser Arbeit getrennt diskutiert.

5.2. Chromatographische Analyse schwach basischer und nicht basischer Stickstoffverbindungen

Nicht und schwach basische Stoffe wie Alkaloide, Drogen, Nitrotoluole und Alkylpyridine werden ohne weitere Derivatisierung direkt splitless injiziert. Wie in Tabelle 9 dargestellt, sind "unpolare" Säulenmaterialien mit 95 und 100% Dimethylpolysiloxan und "mittelpolare" Säulenmaterialien mit 50% Diphenylpolysiloxan zur Trennung geeignet.

Tabelle 9. Kapillarsäulenmaterialien zur Trennung nicht basischer und schwach basischer Stickstoffverbindungen

Substanz	Material		Literatur
Alkylpyridine	SP-2250	50% Dimethylpolysiloxan 50% Diphenylpolysiloxan	[32]
Alkaloide, Barbiturate	Ultra-2	95% Dimethylpolysiloxan 5% Diphenylpolysiloxan	[33]
Nitrotoluole	DB-5	95% Dimethylpolysiloxan 5% Diphenylpolysiloxan	[34]
Drogen	Se-30	100% Dimethylpolysiloxan	[35]

Das Optimum der Injektortemperatur und Detektortemperatur ist substanzspezifisch. Sie sollte für einen guten Probentransfer bei einer Splitless-Injektion etwa 50°C über dem Siedepunkt des Stoffes, aber unter der Zersetzungstemperatur liegen. Für unbekannte Stoffe kann das Optimum nur im Versuch bestimmt werden. Die Säulenangfangstemperatur richtet sich nach dem verwendeten Lösungsmittel. Sie sollte, um den sogenannten "Solventeffekt" auszunutzen, etwa 10-20°C unter dem Siedepunkt des Lösungsmittels liegen. Dann kondensiert das Lösungsmittel auf der Chromatographie-säule, und im entstehenden "Solventlayer" können sich gut lösliche Stoffe aus dem Gasraum anreichern. Bei der anschließenden Steigerung der Säulentemperatur verdampft das Lösungsmittel, ausgehend vom Säulenangfang und konzentriert die gelösten Probenbestandteile auf [52].

5.3. Gaschromatographische Analyse basischer Stickstoffverbindungen

Stickstoffverbindungen mit hoher Basenkapazität neigen zur Adsorption im Inletsystem. Dies führt zum Tailing und zur Peaküberlagerung, wodurch eine Identifizierung erschwert wird. Dieses Verhalten erfordert spezielle Maßnahmen zur Unterdrückung dieser Effekte.

Zunächst wurde versucht, die Adsorption der Stoffe im Glasliner (ein Glasröhrchen, das den Injektor auskleidet) des Injektorsystems durch Silanisieren zu reduzieren.

5.3.1. Chromatographie ohne Derivatisierung nach Silanisierung des Liners

So vergleicht z.B. Abbildung 4 das chromatographische Verhalten einer Lösung mit Stickstoffverbindungen (Gehalt: etwa 50 mg/l an Isopropylamin, β -Phenylamin, Pyrrolidin, 3-Indoilmethylketon, Imidazolin-2-on, Indol) bei silanisiertem und unsilanisiertem Liner an einer DB-17-Säule.

Bei Verwendung des unsilanisierten Liners werden Isopropylamin und Pyrrolidin vollständig im Inlet adsorbiert und damit nicht mehr detektiert. Nach der Silanisierung der Inlets werden diese detektierbar, wobei Isopropylamin vom Solventen nicht zu trennen ist. In beiden Fällen tritt ein starkes Tailing der Stickstoffverbindungen durch Wechselwirkungen im Splitless-Injektor und auf der Säule auf.

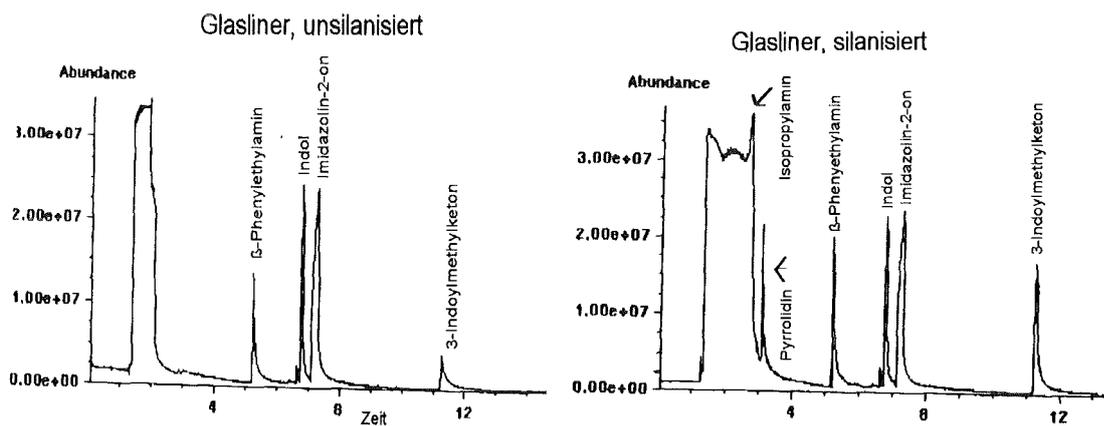


Abbildung 4. Gaschromatogramme verschiedener Stickstoffverbindungen bei Verwendung von silanisierten und unsilanisierten Linern zur Splitless-Injektion

Bei längerer Verwendung der silanisierten Liner stellte sich heraus, daß sich die Silanisierung unter dem Temperatureinfluß langsam zersetzt und zu großem Untergrund im Chromatogramm führte. Dies setzte dann die Nachweisgrenzen für Analyten herab. Deshalb wurden die Stickstoffverbindungen derivatisiert, da die Derivate keine Adsorption an unsilanisierten Linern zeigen und ohne Silanisierung des Glasliners chromatographierbar sind.

5.3.2. Gaschromatographische Analyse nach Derivatisierung

In der Literatur werden basische Stickstoffverbindungen bei der Injektion im Splitless-Modus immer derivatisiert. Zur Derivatisierung werden von Lee [36], Coutts [37] und Felice [38] Acetyl-derivate und von Walle [4] und Felice [38] Butyryl-derivate eingesetzt. Dabei entstehen jedoch viele Nebenprodukte, die durch weitere Flüssig-Flüssig-Extraktionsschritte entfernt werden müssen. Tabelle B1 (Anhang B) gibt eine Übersicht über die verschiedenen Derivatisierungsmöglichkeiten und die weiteren Aufarbeitungsschritte.

Walle [26] und Koga [39] verwenden zum Nachweis aliphatischer Amine Dinitrofluorbenzol als Derivatisierungsreagenz, auch bekannt als Sangers Reagenz. Damit werden Stickstoffverbindungen in einer schnellen und einfachen Reaktion zu den entsprechenden Dinitrophenylderivaten umgesetzt.

Die Derivatisierung mit Dinitrofluorbenzol wurde für diese Arbeit ausgewählt, da eine gaschromatographische Analyse ohne weitere Aufarbeitungsschritte möglich ist.

Weil in den Abläufen kommunaler Kläranlagen ein möglichst großes Spektrum basischer Stickstoffverbindungen identifiziert werden soll und Walle [26] und Koga [39] nur aliphatische Amine, Aniline und phenylsubstituierte Amine derivatisieren, soll das Derivatisierungsreagenz für basische Heterozyklen getestet werden. Gleichzeitig soll untersucht werden, ob die Derivatisierung auch in anderen organischen Lösungsmitteln, als in dem von Walle und Koga verwendeten Benzol, möglich ist. Denn welches Lösungsmittel zur Elution von der Reversed-Phase am geeignetsten ist, muß noch untersucht werden. Zur Derivatisierung in diesem Lösungsmittel muß das Derivatisierungsreagenz ebenfalls geeignet sein.

Weiterhin muß die Auswahl des Säulenmaterials und der Temperatur für Injektor, Detektor und Säule zur gaschromatographischen Analyse getroffen werden.

Walle verwendet zur Analytik der Dinitrophenylderivate eine gepackte Säule aus 0.8% SE-30+0.1% NPGSE. Gepackte Säulen können jedoch in Verbindung mit einem Massendetektor nicht verwendet werden. Das Packungsmaterial entspricht jedoch in seinen chromatographischen Eigenschaften in etwa einer HP-1-Kapillarsäule.

Koga verwendet eine 2 m x 1.6 mm i.d. Glassäule mit OV-17+PZ-197 auf gaschrom Q80/100 mesh, die in dieser Geometrie ebenfalls nicht an den hier verwendeten Gas-

chromatographen angeschlossen werden kann. Als Säule mit ähnlichen Trenneigenschaften bietet sich eine DB-17-Säule aus 50% Dimethylpolysiloxan und 50% Methylpolysiloxan an.

Deshalb wurden beide Trennphasen hinsichtlich ihrer Trenneigenschaften auf Dinitrophenylderivate untersucht. Es zeigte sich, daß beide Säulenmaterialien dafür geeignet sind. Die Temperatúrauswahl wurde an der DB-17-Säule optimiert. Bei der Analyse von Isopropylamin, Pyrrolidin, 1-Methylpiperazin und Piperidin bei einer Injektor- und Detektor-temperatur von 290°C (Maximaltemperatur für die Säule 280°C), 275°C bzw. 250°C und sonst gleichen gaschromatographischen Bedingungen ergeben für die höheren Temperaturen gleich große Peakflächen für die untersuchten Stoffe. Dies zeigt, daß die Derivate bei diesen Bedingungen stabil sind. Weiterhin liegen die gewählten Temperaturen offensichtlich hoch genug, daß die Dinitrophenylderivate vollständig verdampfen. Damit ist die Peakfläche von der Temperatur des Injektors und Detektors unabhängig. Bei einer Temperatur von 250°C sind die Peakflächen von 1-Methylpiperazin und Pyrrolidin kleiner, da bei dieser Temperatur die Substanzen nicht verdampfen. Diese Temperatur gewährleistet also keinen quantitativen Proben transfer.

5.3.3. Optimierung der Derivatisierungsbedingungen

Die Derivatisierung der Stickstoffverbindungen unter besonderer Berücksichtigung der Heterozyklen, wurde unter Berücksichtigung der Parameter Lösungsmittel, Temperatur, Derivatisierungszeit untersucht:

- **Derivatisierung für aliphatische und nicht aliphatische Stickstoffverbindungen in Methanol:**

Insgesamt wurden 40 Stickstoffverbindungen, die in Tabelle 10 zusammengefaßt sind, auf die Derivatisierbarkeit mit Dinitrofluorbenzol getestet. Dazu wurden die Substanzen in Methanol gelöst, mit Dinitrofluorbenzol 30 Minuten bei 70°C zur Reaktion gebracht und anschließend die Monodinitrophenylderivate mittels GC/MS identifiziert. Methanol ist als Lösungsmittel von besonderem Interesse, da es zur Elution von Stickstoffverbindungen von Reversed-Phasen verwendet wird und selbst mit Dinitrofluorbenzol reagiert. Deshalb steht die Frage offen, ob durch eine Konkurrenzreaktion des im Überschuß vorhandenen Lösungsmittels Methanol die Derivatisierung der Stickstoffverbindungen unterdrückt wird.

Bei der gaschromatographischen Analyse zeigt sich, daß alle aliphatischen und aromatischen Stickstoffverbindungen, die in Tabelle 10 zusammengestellt sind, sich zu

dem entsprechenden Derivat umgesetzt haben. Auch Heterozyklen, wie 1-Methylpiperazin, Methylbenzimidazol, Pyrrolidin und Piperidin reagieren zu den entsprechenden Dinitrophenylderivaten.

Heterozyklen, die Stickstoff im aromatischen System enthalten, wie Methylcholin, Pyrazin und Pyridin, sowie tertiäre Amine, wie Benzylidenmethylamin, konnten erwartungsgemäß nicht zur Reaktion gebracht werden. Gleichzeitig entstehen auch keine Abbauprodukte, welche die Anwesenheit anderer Substanzen vortäuschen könnten.

Indol und Imidazol können wahrscheinlich wegen der geringen Basizität des Stickstoffes nicht zur Reaktion gebracht werden.

Tabelle 10. Reaktivität verschiedener Stickstoffverbindungen mit Dinitrofluorbenzol in Methanol

Derivatisierbare Stickstoffverbindungen:

Dimethylamin, Diethylamin, Isopropylamin, Diisopropylamin, p-Aminodiphenylamin, Benzylamin, Dicyclohexylamin, β -Phenylethylamin, Di-N-Octylamin, n-Ethyl-m-toluidin, Pyrrolidin, Monoethanolamin, 1-Aminopropanol, 3-Indoylacetat, 3-Indoylmetylketon, 2-Methylbenzimidazol, 2-Piperazin-1-yl-ethanol, 2-Methylimidazol, 2-Methylnitroanilin, 1-Methylpiperazin, Diphenyl-amin, Dibutylamin, Diethanolamin, N-Octylamin, Imidazolin-2-on

Stickstoffverbindungen, die nicht mit Dinitrofluorbenzol reagieren:

Pyrazin, 2-Methylbenzoxazol, Pyrrol, Methylcholin, Benzylidenmethylamin, Imidazol, Pyridin, 2-Piperidinon, Indol, Lepidin, Melamin,

In den zitierten Arbeiten in Tabelle B1 (im Anhang B) werden die Derivate immer zum Nachweis eines bekannten Substanzspektrums eingesetzt. Trotzdem ist nach der Derivatisierung eine Identifizierung von unbekanntem Stickstoffverbindungen aus den folgenden Gründen möglich:

Alle Massenspektren enthalten als charakteristische Massenfragmente aus dem Derivatisierungsreagenz entweder die Masse 190, 210 oder die Masse 196, so daß

Derivate, auch wenn die Matrix der Probe nicht ausreichend abgetrennt wurde, leicht durch die Aufnahme eines Chromatogrammes im SIM-Modus (Selektiv Ion Monitoring) zu detektieren sind. Weiterhin findet man bei allen Derivaten den (M-1)-Peak (Molekülmasse-1-Peak), so daß die Molekülmasse der einzelnen Stickstoffsubstanzen errechnet werden kann.

Weiterhin entstehen Fragmente mit hohen Massen, die sich aus dem allgemeinen Untergrund von kleinen Massenfragmenten, wie sie bei der Fragmentierung von allen Stoffen entstehen, herausheben und damit den qualitativen und quantitativen Nachweis ebenfalls erleichtern.

- **Einfluß von Derivatisierungszeit auf die Derivatausbeute :**

Eine Lösung mit je 30 mg/l Piperidin, Pyrrolidin, Dibutylamin, β -Phenylethylamin in Ethylacetat wurde einmal 20 Minuten und einmal 45 Minuten derivatisiert und dann mit Hilfe der GC/MS analysiert.

Durch die Verlängerung der Derivatisierungszeit werden die Peakintensitäten erhöht. Gleichzeitig steigt der Untergrund nur in unerheblichem Umfang.

Die Derivatisierung soll in dieser Arbeit mindestens 45 Minuten lang durchgeführt werden.

- **Einfluß des Lösungsmittels auf die Derivatausbeute:**

Walle [26] verwendet für seine Derivatisierung Benzol. Dieser cancerogene, mutagene und teratogene Stoff soll, soweit möglich, durch Toluol ersetzt werden. Da eine optimale Elution in Zusammenhang mit der anzuwendenden Festphasenextraktion vom Lösungsmittel abhängt, Benzol aber, wenn möglich, nicht angewandt werden soll, wurde der Einfluß des Lösungsmittels auf die sich anschließende Derivatisierung getestet:

Bei der Umsetzung eines Gemisches verschiedener Stickstoffverbindungen (Piperidin, Pyrrolidin, Dibutylamin, β -Phenylethylamin, je etwa 30 mg/l) in je 500 ml Methanol, Ethylacetat, Toluol, Aceton und Hexan mit je 200 μ l Dinitrofluorbenzol und anschließender quantitativer Erfassung mittels GC/MS zeigte sich, daß die Derivatisierung in allen Lösungsmitteln erfolgt, wobei die Peakfläche von gleichen Substanzen in Methanol und Ethylacetat größer ist als bei der Derivatisierung in Benzol und Aceton.

Dies wird auf unterschiedliche Solventeffekte im Splitless-Aufgabesystem des Injektors zurückgeführt.

In Hexan sind die Derivate sehr schlecht löslich, so daß sich eine zweite Phase aus Derivatisierungsreagenz und Derivaten bildet. Der Effekt war durch den Einsatz kleinerer Mengen an Derivatisierungsreagenz von 10-25 µl je 500 ml Hexan vermeidbar. Damit sind alle untersuchten Lösungsmittel für qualitative Untersuchungen geeignet.

Die endgültige Auswahl des Lösungsmittels muß, wie oben schon erläutert, nach den Bedürfnissen der Lösungsmittelextraktion ausgerichtet werden.

• Einfluß der Temperatur auf die Derivatausbeute :

Zur Bestimmung des Einflusses der Temperatur auf den Umfang der Derivatisierung wurden drei methanolische Lösungen mit je 30 mg/l Piperidin, Pyrrolidin, Dibutylamin, β-Phenylethylamin bei 65°C, 85°C und 100°C derivatisiert und anschließend mittels GC/MS analysiert. Dabei zeigte sich, daß mit zunehmender Derivatisierungstemperatur zwar der Umfang der Derivatisierung, aber auch der Untergrund des Chromatogrammes stieg. Optimal scheint eine Derivatisierungstemperatur von 85°C zu sein, da hier eine relativ gute Derivatausbeute bei relativ geringem Untergrund erreicht wird.

Unter diesen Derivatisierungsbedingungen wurde eine Lösung von verschiedenen Stickstoffverbindungen mit etwa 10 mg/l je Stoff umgesetzt und die Lösung gaschromatographisch analysiert. Die gaschromatographischen Bedingungen sind in Anhang A, A10. Nr.8 angegeben. Abbildung 5 zeigt das erhaltene Chromatogramm.

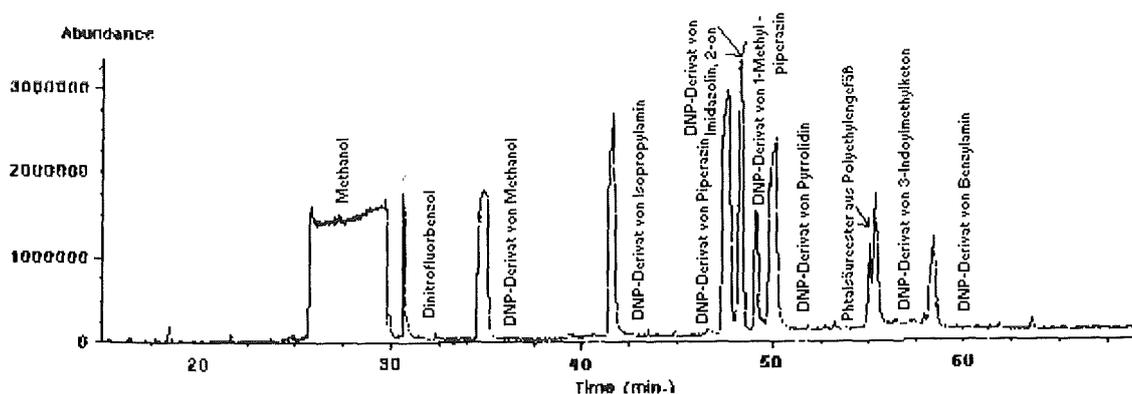


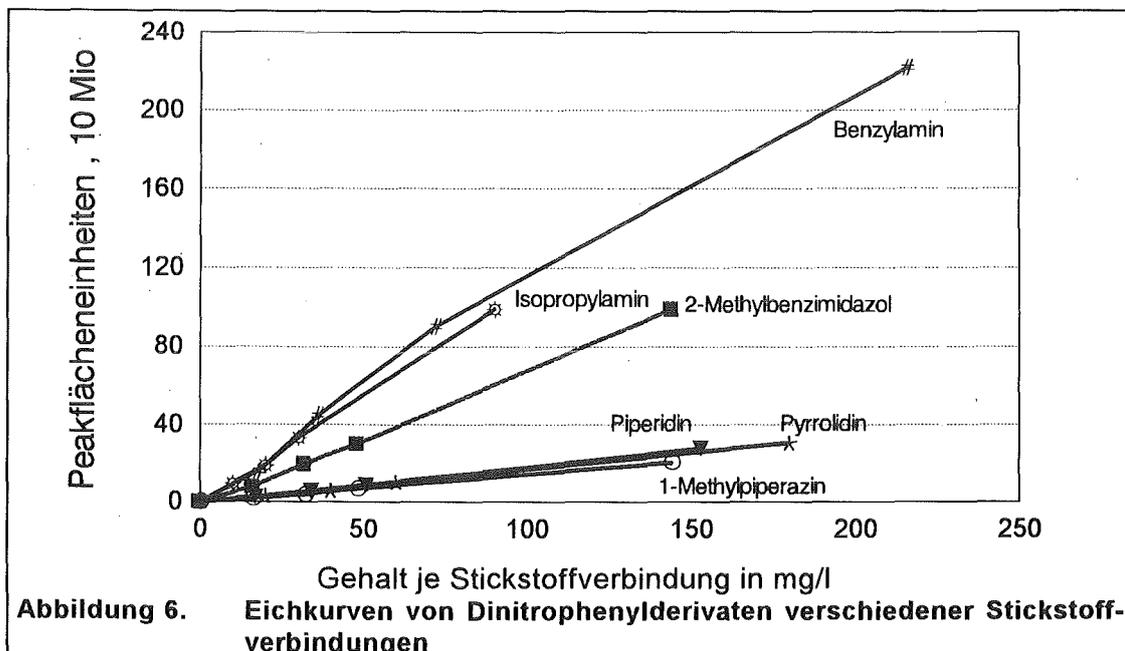
Abbildung 5. Gaschromatogramm von Dinitrophenylderivaten verschiedener Stickstoffverbindungen, SCAN: 100-400 AMU,

5.3.4. Quantitative Bestimmung von Stickstoffverbindungen als Dinitrophenyl-derivate

Für verschiedene Lösungsmittel und vor allem heterozyklische Stickstoffverbindungen wird die Anwendbarkeit der Methode durch Aufnahme von Eichgeraden, dargestellt in Abbildung 6 gezeigt. Dabei wird die Derivatisierung unter den optimierten Derivatisierungsbedingungen durchgeführt:

- Derivatisierungstemperatur : 85°C
- Derivatisierungszeit : 45 min
- Derivatisierungsmittel : 10 µl Dinitrofluorbenzol
- Lösungsmittel : Methanol

Die chromatographische Analyse erfolgte für alle in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen von Dinitrophenylderivaten mit der Gerätekonfiguration, die im Anhang A, Nr.A3 beschrieben ist. Die gaschromatographischen Bedingungen sind in Anhang A, Nr A10.8 angegeben.



Die Korrelationskoeffizienten liegen für das Benzylaminderivat bei 0.998 und für alle anderen Derivate bei 0.999. Die Nachweisgrenze liegt deutlich unter 10 mg/l je Stickstoffverbindung.

6. Stabilität von Lösungen mit Stickstoffverbindungen bei Herstellung und Lagerung

6.1. Problemdarstellung

Für die Versuche zur Bestimmung des Wiederfindungsgrades wurden organische Stickstoffverbindungen in einer "Dotierlösung" verwendet. Je 500 µl dieser Dotierlösung wurden zu einem Liter Wasser gegeben und dieser dem Anreicherungsprozeß unterzogen. Die Ausbeutebestimmung erfolgte gaschromatographisch nach Derivatisierung mit Dinitrofluorbenzol unter den Bedingungen, die in 5.3.4 festgelegt wurden, wobei als Standardlösung eine Verdünnung dieser Lösung verwendet wurde. Diese Dotierlösung soll mindestens 1 Woche stabil sein, d.h. die Konzentrationen sollen sich nicht um mehr als 10% relativ zur Ausgangskonzentration ändern.

Eine Untersuchung über die Stabilität von Dotierlösungen hat Walle [4] veröffentlicht. Seine Ergebnisse über Adsorptionsverluste an Glasoberflächen von Phenmetrazin in Benzol bei der Lagerung über 10 Stunden sind in Tabelle 11 dargestellt. In einem mit Ethanol gewaschenen Glasgefäß wurden innerhalb von 10 Stunden nur noch 21% wiedergefunden. Einhundert % Wiederfindung wurde beim Zusatz von Trimethylamin, Iso-Butylalkohol oder Natronlauge erreicht.

Tabelle 11. Wiederfindungsgrade für 113 µg/l Phenmetrazin in Benzol bei Lagerung bei 20°C über 10 Stunden in Abhängigkeit der Vorbehandlung des Glasgefäßes

Vorbehandlung der Probengefäße	Vorbehandlung	Wiederfindung
Waschen mit Ethanol	Glaskolben wurde vor dem Test eine Woche der Laborluft ausgesetzt	21%
Waschen mit Ethanol	-	51%
Waschen mit Ethanol	Testlösung enthält 0,05 mol/l Trimethylamin	100%
Waschen mit Ethanol	Testlösung enthält 0,05 mol/l Isobutylalkohol	100%
Silanisierung und Waschen mit Ethanol	-	89%
Silanisierung und Waschen mit Ethanol	Zusatz von 0.5 ml 0.1 molare NaOH	100%

6.2. Eigene Untersuchungen

Auf Grund der Ergebnisse von Walle wurde der Alkohol Methanol als Lösungsmittel zur Herstellung der Standardlösungen verwendet. Eine Lösung von je etwa 20 mg/l an Diethylamin, β -Phenylethylamin, Pyrrolidin und N-Octylamin in Methanol, aufbewahrt in einem nicht vorbehandelten Glaskolben, erwies sich bei Lagerung über drei Wochen bei 5°C und -20°C als stabil. Bei der Durchführung weiterer quantitativer Versuche mit anderen Stickstoffverbindungen zeigte sich jedoch, daß Lösungen nicht aller Stickstoffverbindungen über den Zeitraum von mehreren Wochen ohne Verluste zu lagern sind. So war z.B. 1-Methylpiperazin (100-200 mg/l) nach einer Woche nicht mehr nachweisbar.

Auf Grund dieses Befundes wurde die Stabilität von Standardlösungen verschiedener Stickstoffverbindungen untersucht.

Für die Versuche werden relativ konzentrierte Stammlösungen benötigt, jedoch reicht die Löslichkeit einiger Stoffe in reinem Methanol bzw. Toluol nicht aus. Deshalb wurden Stammlösungen mit etwa 30 mg/l je Stickstoffverbindung mit einem Gehalt Methanol zu Toluol von 8:2 frisch hergestellt. Angesichts der hohen Konzentrationen in dieser Stammlösung sollten Konzentrationsverluste nicht signifikant sein.

Von dieser Stammlösung werden zur Herstellung von Dotierlösungen 350 μ l in zwei silanierte und zwei nicht silanierte Glaskolben, zwei Polyethylengefäße und zwei Teflongefäße mit je 10 ml Toluol dotiert. Je 500 μ l der Lösungen werden direkt unter den Bedingungen von 5.3.4 derivatisiert. Von jeder Gefäßart wird eine Probe bei 5°C, die andere Probe bei -20°C über 21 Tage gelagert. Danach werden je 500 μ l aller gelagerten Proben derivatisiert und gaschromatographisch analysiert.

Analog dazu wurden aus einer weiteren Stammlösung ähnlicher Zusammensetzung Dotierlösungen mit Methanol hergestellt. Diese wurden ebenfalls direkt analysiert, aber auch 32 Tage gelagert. Dabei wurden analoge Lagerungsbedingungen wie bei den Toluolversuchen gewählt, aber zusätzlich bei 20°C und in Aluminium gelagert.

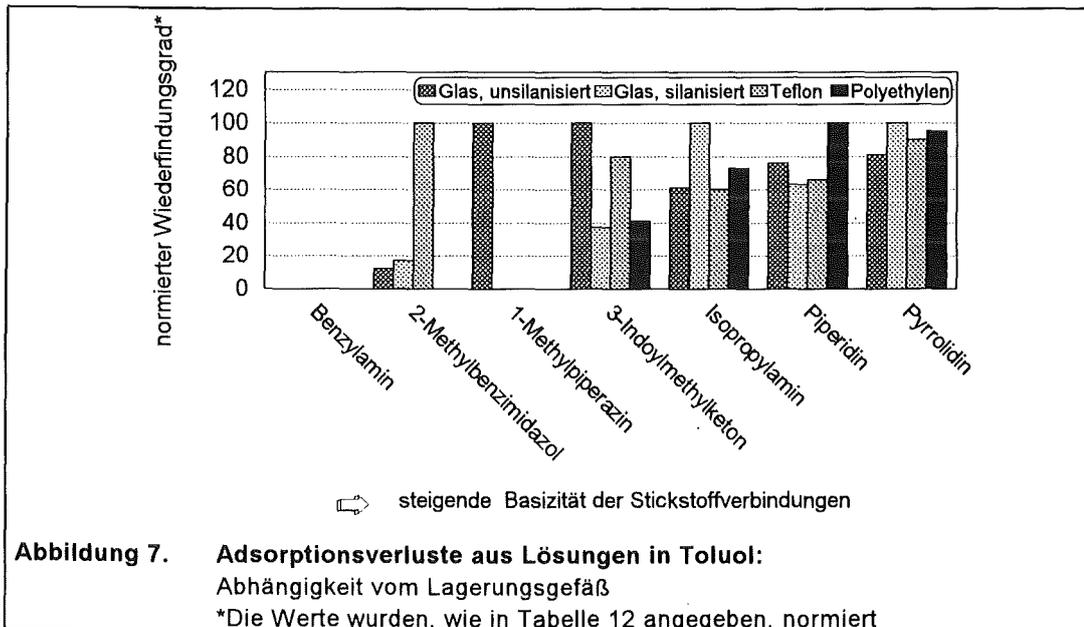
Normierung der Ergebnisse

Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden nicht die integrierten Peakflächen aufgetragen, sondern die Peakflächen auf die größte, die bei einem der Gefäße aufgetreten ist, bezogen. Dieser Peakfläche wurde der Wert 100 zugeordnet. Die gewählte Zuordnung ist in Tabelle 12 (Toluol) bzw. 13 (Methanol) dargestellt.

6.2.1. Direkte Verluste beim Ansetzen der Dotierlösung

a.) Toluol

Wie Abbildung 7 zeigt, gibt es kein Gefäßmaterial, das zu weniger als 10% Verlust für alle untersuchten Stoffe führt.



Betrachtet man den mittleren, normierten Wiederfindungsgrad (x) eines Stoffes an den verschiedenen Materialien, so steigt dieser von 2-Methylbenzimidazol bis zum Pyrrolidin, also mit steigender Basizität fast kontinuierlich (2-Methylbenzimidazol x=32%, 1-Methylpiperazin X=25%, 3-Indoymethylketon x=65%, Isopropylamin x=74%, Piperidin x=76%, Pyrrolidin x= 92%) (Zahlenwerte in Tabelle B2, Anhang B).

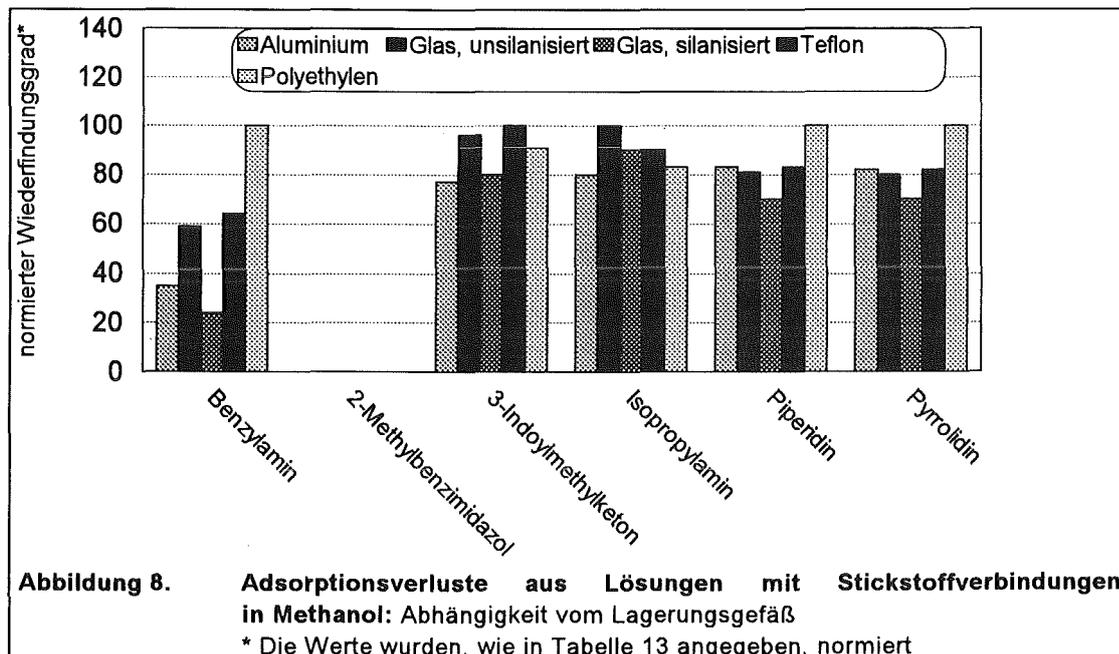
In den Lösungen, die in den silaniserten Glasgefäßen aufbewahrt wurden, entstand durch aufgelöstes Silanisierungsmaterial ein großer Untergrund an Fragmenten des polymerisierten Silanisierungsmittels, welcher die Analyse in erheblichem Umfang störte.

Auf Grund dieser Befunde wurden sowohl die Verwendung von Toluol, als auch die Verwendung von silaniserten Glasgefäßen als ungeeignet bewertet.

Tabelle 12. Zuordnung der Referenzversuche zur Ermittlung der normierten Peakflächen für die Versuche mit Toluol als Lösungsmittel

Substanz	Gefäßmaterial, in dem die Lösung mit der größten detektierten Peakfläche hergestellt wurde
1-Methylpiperazin	Glas, unsilanisiert
3-Indoylmethylketon	Glas, unsilanisiert
Pyrrolidin	Glas, silanisiert
Isopropylamin	Glas, silanisiert
Piperidin	Poyethylen
2-Methylbenzimidazol	Teflon
Benzylamin	nicht detektierbar

b.) Methanol



Wird Methanol als Lösungsmittel eingesetzt, ist, wie Abbildung 8 zeigt, Polyethylen, abgesehen von 2-Methylbenzimidazol mit einem mittleren Wiederfindungsgrad x für alle untersuchten Stoffe (außer 2-Methylbenzimidazol) von $x=71\%$ in Aluminium, von $x=83\%$ in unsilanisiertem Glas, von 67% in silanisiertem Glas, von $x=84\%$ in Teflon und von 95% in Polyethylen zur Herstellung von Dotierlösungen am besten geeignet. Danach folgen Teflon und unsilanisiertes Glas (Zahlenwerte in Tabelle B3, Anhang B).

Zur Herstellung von Dotierlösungen von 2-Methylbenzimidazol ist Methanol prinzipiell ungeeignet, da 2-Methylbenzimidazol nicht detektierbar ist.

Tabelle 13. Zuordnung der Referenzversuche zur Ermittlung der normierten Peakflächen für die Versuche mit Methanol als Lösungsmittel

Substanz	Gefäßmaterial, in dem die Lösung mit der größten detektierten Peakfläche hergestellt wurde
Pyrrolidin	Polyethylen
Piperidin	Polyethylen
Isopropylamin	Glas, unsilanisiert
3-Indoilmethylketon	Polyethylen
2-Methylbenzimidazol	nicht detektierbar
Benzylamin	Polyethylen

6.2.2. Vergleichende Bewertung

Für die Herstellung von Dotierlösungen zeigten sich Polyethylengefäße und Methanol als Lösungsmittel am besten geeignet. Dabei kann man mit einem Verlust bei der Herstellung von im Mittel 5% und im Einzelfall von 20% rechnen. Zur Dotierung von 2-Methylbenzimidazol muß jedoch Toluol eingesetzt werden.

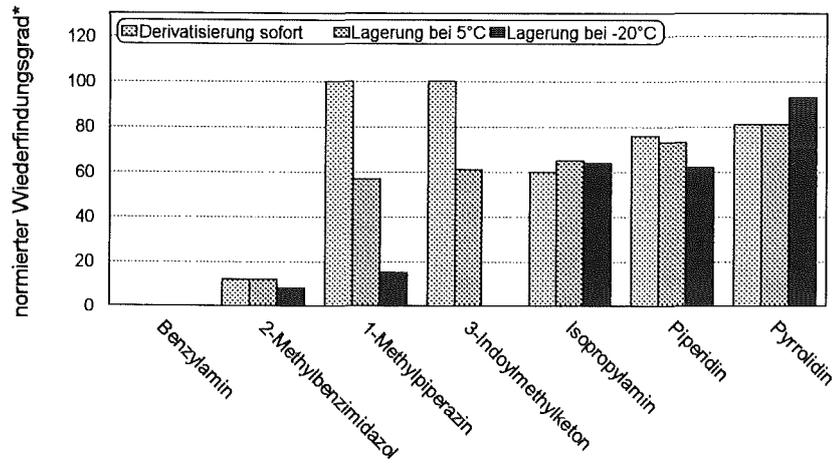
6.2.3. Stabilität der Dotierlösungen bei der Lagerung

Frisch hergestellte Dotierlösungen (in Toluol bzw. Methanol) wurden gelagert und dann gaschromatographisch untersucht. Die, wie zuvor beschrieben, normierten Meßergebnisse sind in Abbildung 9 (für Toluol) und in Abbildung 10 (für Methanol) zusammengestellt.

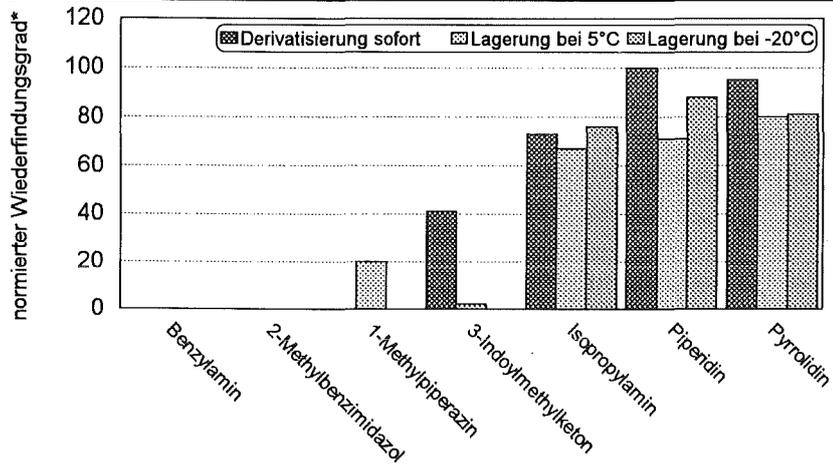
Wie Abbildung 9 zeigt, treten für viele Stickstoffverbindungen bei allen hier untersuchten Lagerungsbedingungen Verluste von über 40% auf.

Zusammenfassend gibt es kein Material, in dem Dotierlösungen mit Toluol bei einer der untersuchten Temperaturen ohne weitere Verluste von mindestens 10% gelagert werden können.

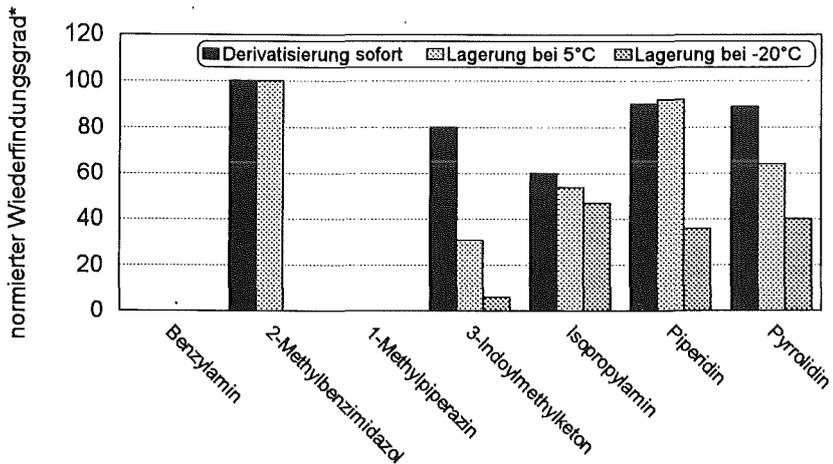
a.) Lagerung von Lösungen in Toluol:



Stabilität von Lösungen in Glasgefäßen



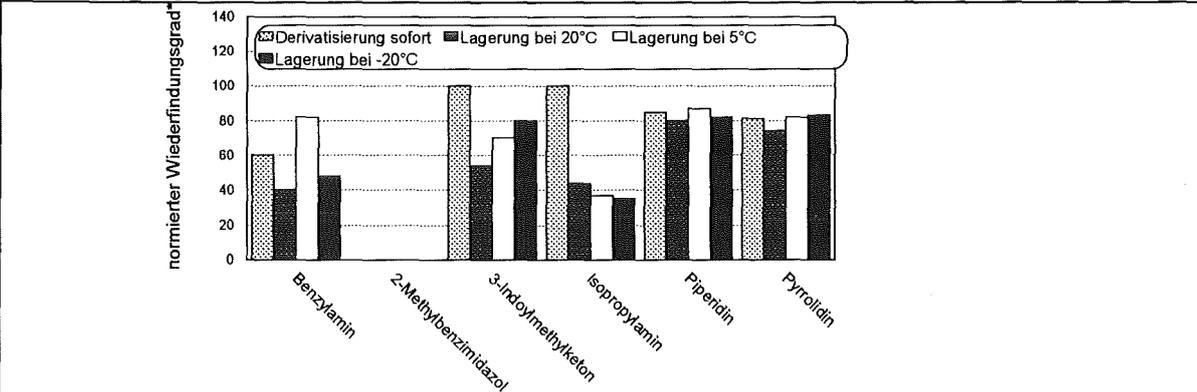
Stabilität von Lösungen in Polyethylengefäßen



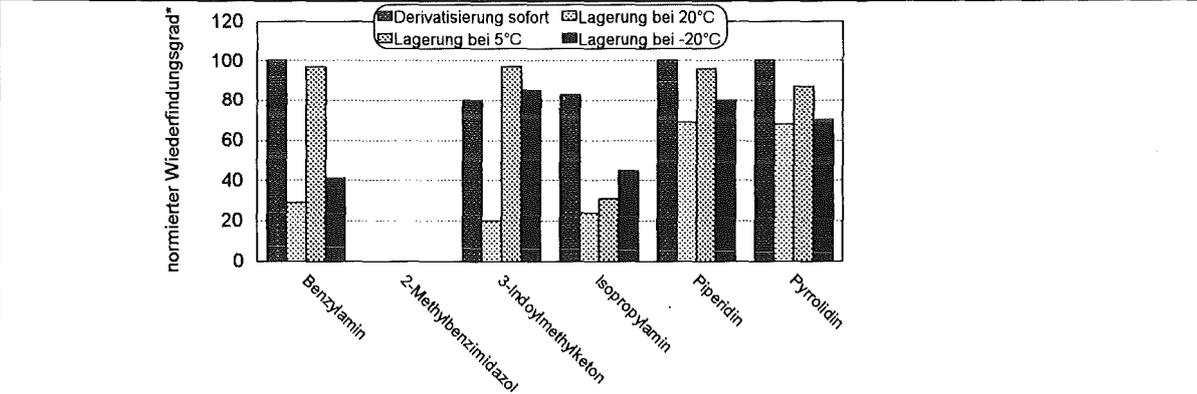
Stabilität von Lösungen in Teflongefäßen

Abbildung 9. Stabilität von Lösungen mit Stickstoffverbindungen in Toluol: Adsorptionsverluste bei der Lagerung über 21 Tage in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur für verschiedene Gefäßmaterialien (Zahlenwerte in Tabelle B4, Anhang B)
*Die Werte wurden, wie in Tabelle 12 angegeben, normiert.

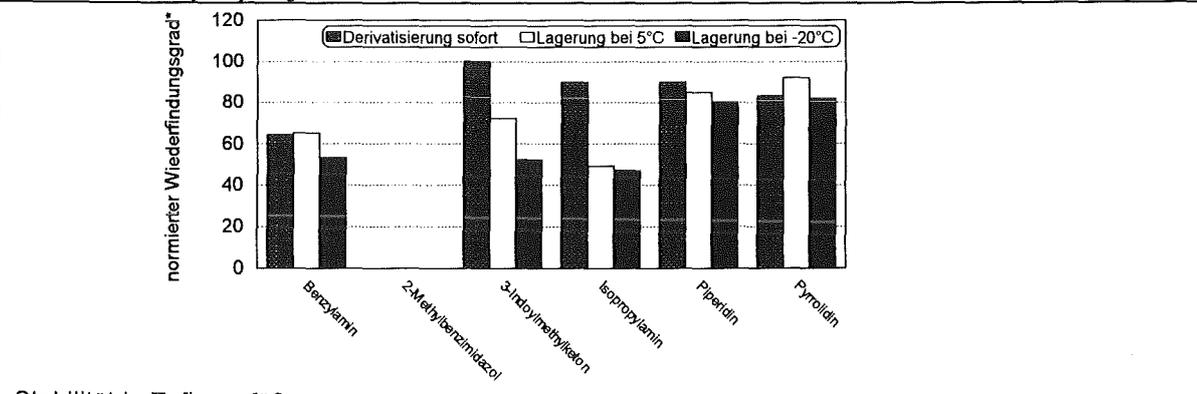
b.) Lagerung von Lösungen mit Methanol



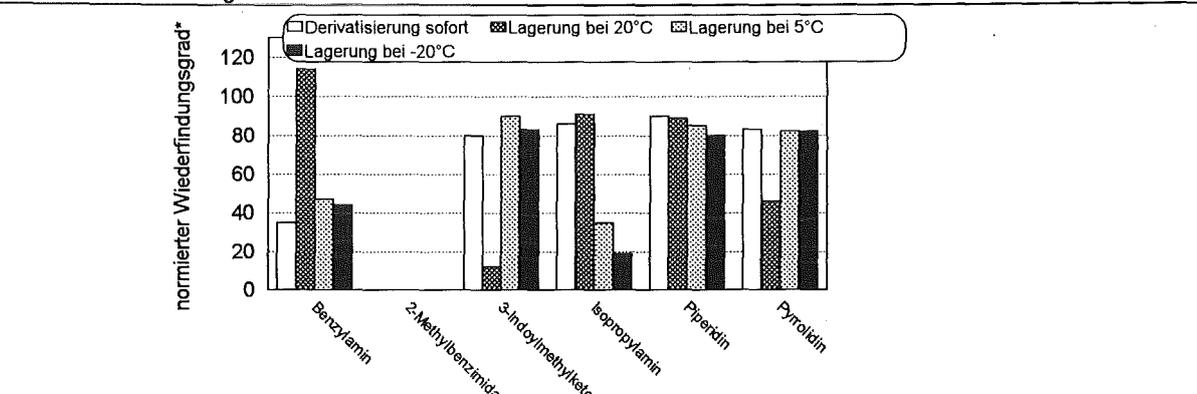
Stabilität in Glasgefäßen



Stabilität in Polyethylengefäßen



Stabilität in Teflungefäßen



Stabilität in Aluminiumgefäßen

Abbildung 10. Stabilität von Lösungen mit Stickstoffverbindungen in Methanol: Adsorptionsverluste bei der Lagerung über 32 Tage in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur für verschiedene Gefäßmaterialien (Zahlenwerte in Tabelle B5, Anhang B9)* Die Werte wurden, wie in Tabelle 13 angegeben, normiert.

Keine der untersuchten Methoden kann, wie Abbildung 10 zeigt, zur stabilen Lagerung von Lösungen aller hier untersuchten Stickstoffverbindungen in Methanol herangezogen werden, da sich immer mindestens für eine Substanz Differenzen größer als 10% ergeben.

Für die unterschiedlichen Substanzen ergeben sich unterschiedliche Optima, die eine stabile Lagerung ermöglichen.

Piperidin und Benzylamin konnten bei 5°C unter Verwendung von Polyethylengefäßen und Pyrrolidin und 3-Indoymethylketon bei Herstellung in Aluminiumgefäßen bei 5°C ohne Differenzen von mehr als 10% gelagert werden.

Für Isopropylamin führten keine Bedingungen zu Differenzen, die kleiner als 10% waren.

6.3. Zusammenfassung

Da Verluste bei der Lagerung mit keiner Kombination von Gefäßmaterial und Lösungsmitteln für alle Stoffe ganz auszuschließen sind, wurden die Dotierlösungen jeweils frisch hergestellt. Ein eventueller Verlust bei der Herstellung der Dotierlösung durch Verdünnen der Stammlösung kann bei der Bestimmung der Wiederfindungsgrade unberücksichtigt bleiben, da die Bestimmung der Stickstoffverbindungen sowohl direkt aus der Dotierlösung, als auch aus den dotierten Wässern simultan erfolgte.

7. Extraktion von Stickstoffverbindungen aus Modellösungen

Nach den Erwägungen in Kapitel 3 und 4 hat sich die Reversed-Phase-Chromatographie als aussichtsreichstes Verfahren für die Anreicherung von Stickstoffverbindungen aus Kläranlagenabläufen herausgestellt. Nachdem in den vorangegangenen Versuchen die Voraussetzungen für die quantitative Messung von Einzelverbindungen geschaffen wurden, sollten in den folgenden Versuchen die Wiederfindungsgrade für Stickstoffverbindungen an Reversed-Phasen ermittelt werden.

Unter Verwendung von acht verschiedenen organischen Stickstoffverbindungen wurde die Anreicherung an einer Reihe von festen Sorptionsphasen sowie die Elution der sorbierten Stoffe von diesen Phasen mit verschiedenen Lösungsmitteln untersucht. Auf Grund der Ergebnisse war eine Vielzahl von Kombinationen erforderlich, um schließlich eine für jede Verbindung geeignete Vorgehensweise zu erhalten. Die untersuchten Kombinationen werden im folgenden Text der Reihe nach besprochen. Das Gesamtergebnis wird in Kapitel 7.5. dargelegt und kommentiert.

7.1. Charakterisierung der verwendeten Reversed-Phasenmaterialien

Wie in Tabelle 14 dargestellt ist, unterscheiden sich die Phasenmaterialien dadurch, daß sie entweder ein Polyethylengerüst oder ein silicatisches Grundgerüst haben.

Tabelle 14. Unterschiedliche Polymermaterialien in Reversed-Phase-Materialien

Hersteller	Chemische Natur des Polymergerüsts
Baker	Polymeres Silicagerüst, endcapped, d.h. freie OH-Gruppen wurden mit Methanol verestert
Analytichem	Polymeres Silicagerüst
Merck, Adsorbex	Polymeres Silicagerüst
Merck, Polyspher	Polyethylengerüst über Styrol vernetzt

Diese Polymermaterialien tragen reaktive Endgruppen, die mit den Bestandteilen der Probe wechselwirken können.

Als Endgruppen werden üblicherweise C₁₈H₃₇- ("RP-C18"), C₈H₁₇- ("RP-C8"), C₂H₅- ("RP-C2"), Phenyl- ("RP-PH"), Cyclohexyl- ("RP-CH") und Cyanopropyl- ("RP-CN")-Reste eingeführt. Polyspher RPCI- und Polyspher-CAT sind neuere Entwicklungen der

Firma Merck mit einem Polyethylengerüst, das über Styrolgruppen miteinander vernetzt ist. Polyspher RPCI trägt am Polyethylengerüst Pyridin, RPCAT trägt Sulfonsäuregruppen als funktionelle Gruppen. Die unterschiedlichen Endgruppen führen zu unterschiedlichen Selektivitäten der Materialien.

Die in dieser Arbeit verwendeten Reversed-Phase-Materialien sind im Tabellenanhang A, Liste A5 genauer beschrieben.

7.2. Stand des Wissens

Tabelle 15 enthält eine Literaturübersicht über die Veröffentlichungen, die zur Anreicherung von Stickstoffverbindungen aus wäßrigen Lösungen an Reversed-Phasen vorliegen. Die zitierten Publikationen enthalten keine systematischen Untersuchungen der Einflüsse von Anreicherungsmedium, pH, Trockenschritt und Eluent auf den Wiederfindungsgrad.

Tabelle 15. Versuchsbedingungen für die Anreicherung von Stickstoffverbindungen an Reversed-Phasen

Substanz	Konditionierung	Anreicherungsbed.	Trocknen	Elution	LIT
Amphetamine	Methanol Wasser	Phosphatpuffer, pH=7 RP-C2, RP-C18, RP-C8, BOND-ELUT	Anlegen von Vakuum	5x 100 µl Acetonitril	22
Cyclohexylamin	nicht angegeben	pH=12,5 RP-C18 von Baker	-	Aceton?	21
Hydroxytryptamin	Citratpuffer, pH=4,5 mit EDTA (0.1 mmol/l)	RP-C18 BOND-ELUT Citratpuffer, pH=4,5 mit EDTA (0.1 mmol/l)	-	Citratpufferlösung, pH=4,5 mit 25% Acetonitril	23
substituierte Aniline	Ethylacetat	RP-C18 pH=10-11	im Stickstoffstrom	2x 0.5 ml Ethylacetat	24
Pflanzenbehandlungsmittel	n-Hexan Methanol Wasser	RP-C18 von Baker	Anlegen von Vakuum	2x 1 ml n-Hexan 2x 1 ml Methanol	25

Zusammenfassend ist festzustellen, daß vier der fünf Autoren nur RP-C18-Phasen verwenden und ein Autor neben diesen auch RP-C2- und RP-C8-Phasen untersucht hat. Zur Konditionierung wird meist das gleiche Lösungsmittel wie zur Elution verwendet.

7.3. Gestaltung eigener Anreicherungsversuche

7.3.1. Versuchsaufbau

Die Wasserproben wurden, wie in Abbildung 11 dargestellt, mit Hilfe von Schläuchen aus Vorratsgefäßen über die Reversed-Phasen geleitet. Über ein Vakuummanifold wurde am Ende der Kartusche ein Vakuum bis zu 3000 Pa angelegt, so daß ein Fluß von etwa 2 ml pro Minute erreicht wurde. Vorratsflasche, Schlauch und Reversed-Phase-Kartusche sind aus Polyethylen. Die Verwendung von Polyethylen ist sinnvoll, da die Stickstoffverbindungen, deren Adsorption in Kapitel 6 untersucht wurde, an Polyethylen im "mittelpolaren" Lösungsmittel Methanol die geringsten Adsorptionsverluste zeigen.

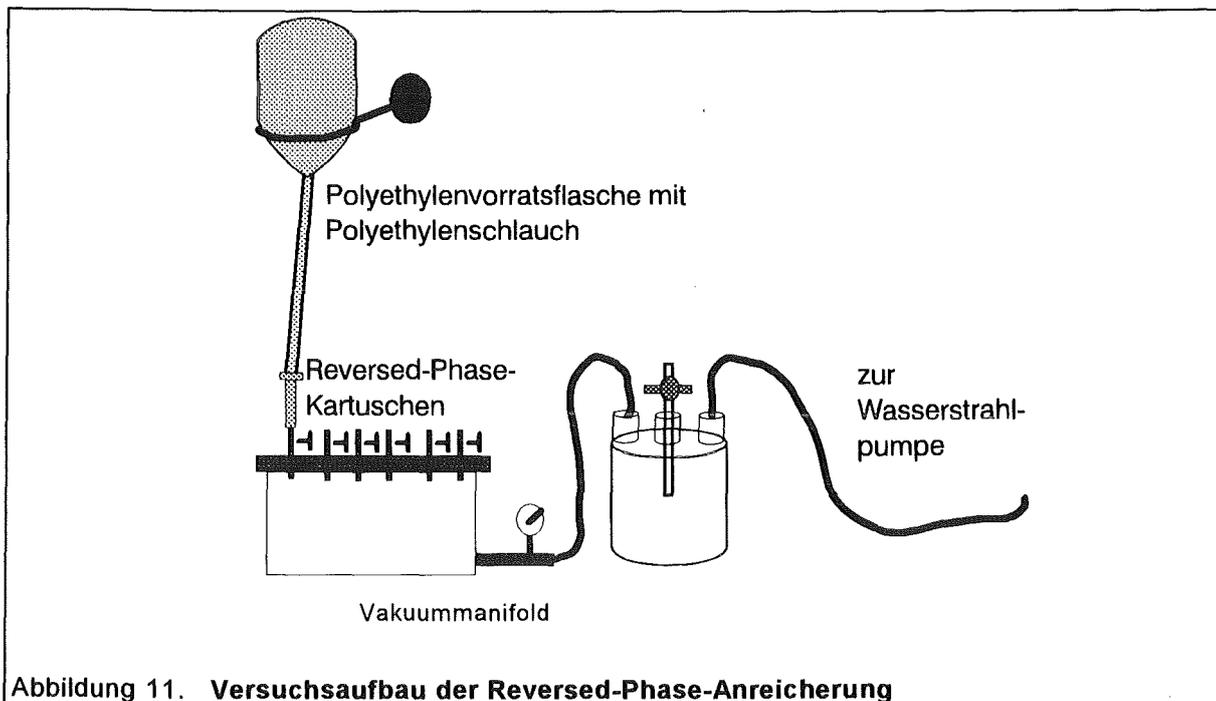


Abbildung 11. Versuchsaufbau der Reversed-Phase-Anreicherung

7.3.2. Einzelnen Arbeitsschritte

Die Anreicherung an Reversed-Phasen erfolgt in drei Schritten:

- a.) Konditionierung des Festphasenmaterials
- b.) Anreicherung
- c.) Trocknen
- d.) Elution

Alle Einzelschritte haben Auswirkungen auf den Wiederfindungsgrad der Verbindungen.

a.) Konditionierung:

Systematische Untersuchungen zum Einfluß der Konditionierung sind in der Literatur nicht veröffentlicht. Meistens werden die gleichen Lösungsmittel zur Konditionierung, wie zur Elution verwendet.

Beim Konditionieren der Festphase muß ein Kontakt der wäßrigen Phase mit dem lipophilen Trägermaterial hergestellt werden. Um das vorhandene Trägermaterial voll ausnutzen zu können, ist eine Verdrängung der in den Poren eingeschlossenen Luft notwendig. Am besten geeignet erscheint dazu nach eigenen Erfahrungen Methanol zu sein, da es die lipophile Phase besser als Wasser benetzt und die Luft in den Poren gut verdrängt. Gleichzeitig ist ein leichter Wechsel zu einer rein wäßrigen Lösung für die nachfolgende Anreicherung möglich. Bei Anreicherung aus Lösungen mit pH=13 an RP-C18-, RP-C8, RP-CN-, RP-PH Phasen von Baker RP-SI- und RP-C18 Phasen von Merck (Adsorbex) sowie eine RP-CI-Phase von Merck (Polyspher) löste sich das Festphasenmaterial vollständig auf. Die anderen Phasen hydrolisierten teilweise. Dieser Effekt wird vorwiegend durch die Umesterung des Phasenmaterials zu den entsprechenden Methylestern in Anwesenheit von restlichem Methanol vom Konditionierungsschritt im stark alkalischen Milieu verursacht. Durch intensives Spülen vor dem Anreicherungsschritt mit neutralem Wasser konnte die Auflösung verhindert werden.

b.) Anreicherung:

Die Proben müssen so eingefüllt werden, daß der Flüssigkeitsfilm vor und während der Anreicherung nicht unterbrochen wird. Es werden Flüsse von etwa 2 ml Probenlösung pro Minute eingestellt. Systematische Untersuchungen zur pH-Wahl liegen nicht vor.

Je nach pH-Wert der Lösung sind unterschiedliche Wechselwirkungen mit der Festphase zu erwarten. Im alkalischen Milieu liegen die Stickstoffverbindungen unprotoniert vor, wobei sie vor allem über lipophile Gruppen mit den lipophilen Gruppen der Festphase wechselwirken können. Sind die Moleküle protoniert, so können Wasserstoffbrückenbindungen mit den nicht umgesetzten OH-Gruppen des Silicagels gebildet werden.

Der Wiederfindungsgrad soll für verschiedene Verbindungen bei etwa pH=8 (dem natürlichen pH-Wert eines Auslaufes einer Kläranlage) und bei pH=13 untersucht werden.

c.) Trocknen:

Nach dem scharfen Absaugen der Kartuschen mit der Wasserstrahlpumpe werden die Festphasenmaterialien im Stickstoffstrom getrocknet. Einige Vorversuche zeigen, daß ein Stickstoffstrom über einen Zeitraum von 15 Minuten mit 1 bis 2 bar Vordruck ausreichend ist, um das Anreicherungsmaterial zu trocknen.

d.) Elution:

Hierzu wurden eine Reihe organischer Lösungsmittel eingesetzt. Einzelheiten dazu folgen im nächsten Abschnitt. Es wurde untersucht, ob sich die Elutionswirksamkeit durch Modifikatoren verbessern läßt.

7.3.3. Vorversuche zum Einsatz von Modifikatoren

a.) Einsatz von Tributylamin als Modifikator

Tributylamin soll als tertiäres Amin auf seine Einsatzfähigkeit als Modifikator getestet werden. Es scheint geeignet, da es nach den Versuchen von Walle [4] in der Lage ist, die Wechselwirkungen von aliphatischen Aminen an Glasoberflächen zu unterdrücken. Gleichzeitig ist zu erwarten, daß es die gaschromatographische Analyse nicht stört, da es als leicht flüchtige Komponente nach sehr kurzen Retentionszeiten die Säule verläßt.

Versuchsdurchführung:

RP-C18-Phasen von Baker wurden nach der Dotierung mit konzentrierten, wäßrigen Lösungen mit Stickstoffverbindungen und dem Trocknen im Stickstoffstrom **mit Methanol, das 5% an Tributylamin enthält**, eluiert und die Lösung wird wie unter 5.3.4. beschrieben, derivatisiert und analysiert.

Es zeigt sich, daß Tributylamin als Modifikator im Eluenten nicht einsetzbar ist, da es sich unter den bestehenden Reaktionsbedingungen entweder während der Derivatisierung oder durch die thermische Belastung im Injektionssystem des Gaschromatographen zu Dibutylamin zersetzt und dann mit Dinitrofluorbenzol reagiert. Das entsprechende Derivat entsteht in großem Umfang und stört dann die gaschromatographische Analyse der anderen Derivate.

b.) Einsatz von Pyridin als Modifikator

Pyridin ist im Gegensatz zu Tributylamin ein thermisch stabiler Aromat, der mit dem Derivatisierungsreagenz nicht reagiert. Deshalb wurde Pyridin als Modifikator ebenfalls untersucht.

Versuchsdurchführung:

Dazu werden verschiedene RP-C18-Kartuschen von Baker mit Methanol und dann mit Wasser von pH=7.9 konditioniert.

200 µl einer wäßrigen Lösung (pH=7.9), die etwa 100 µg je Stickstoffverbindungen enthält, wird direkt auf das Anreicherungsmaterial dotiert und nach dem Trocknen wieder sofort mit **500 µl Methanol mit 10, 50, 80 und 100% Pyridin eluiert**. Die Lösungen werden, wie unter 5.3.4. beschrieben, derivatisiert und analysiert.

Auch diese Eluate enthält große Mengen an Silandifluorbenzyl. Dies scheint sich unter Zersetzung des Festphasenmaterials oder des Säulenmaterials in Anwesenheit des Pyridins und des Derivatisierungsreagenzes zu bilden. Damit sind Lösungen in Methanol, die Pyridin enthalten, als Eluenten ungeeignet.

c.) Salzsäure als Modifikator

Eine potentielle Bindung der Stickstoffverbindungen über Van der Waalssche Bindungskräfte könnte eventuell leicht durch die Überführung in ein geladenes Ion unter Aufnahme eines Protons gebrochen werden. Deshalb wurde der Einsatz von Salzsäure getestet.

Versuchsdurchführung:

Dazu werden verschiedene RP-C18-Kartuschen von Baker mit Methanol und dann mit Wasser von pH=7.9 konditioniert.

200 µl einer wäßrigen Lösung (pH=7.9), die etwa 100 µg je Stickstoffverbindung enthält, wird direkt auf das Anreicherungsmaterial dotiert und nach dem Trocknen wieder sofort mit **500 µl Methanol 10%ig an HCl eluiert**. Die Lösungen werden wie unter 5.3.4. beschrieben, derivatisiert und analysiert.

Jedes der untersuchten Eluate enthält große Mengen an Silandifluorbenzyl, das anhand seines Massenspektrums identifiziert werden konnte. Dies scheint sich unter Zersetzung des Festphasenmaterials oder des Säulenmaterials in Anwesenheit der Salzsäure und des Derivatisierungsreagenzes zu bilden. **Damit ist Methanol, das Salzsäure enthält, als Eluent ungeeignet.**

Resumee

Zusammenfassend ergibt sich, daß alle säure- oder basenhaltigen Eluenten zu einer Hydrolyse des Phasenmaterials führen und wahrscheinlich mit der Zeit auch zur Hydrolyse der gaschromatographischen Trennsäule, die aus ähnlichem Material besteht.

Säure- und basenhaltige Eluenten wurden deshalb nicht verwendet.

7.4. Anreicherungsversuche aus Modellösungen

Zunächst müssen die Anreicherungsbedingungen so optimiert werden, daß eine Wiederfindung von zudotierten Stickstoffverbindungen möglich ist. Es ist wichtig, zunächst mögliche Überlagerungen der zu untersuchenden Effekte mit anderen Effekten ausschließen zu können. Deshalb wird die Anreicherung zunächst in Modellösungen untersucht. Folgende Versuchsparameter sind bei allen Anreicherungen gleich, sofern nicht auf eine abweichende Versuchsdurchführung hingewiesen wird:

-Konditionierung des Festphasenmaterials

mit einigen Bettvolumina Methanol, dann mit neutralem Wasser und schließlich mit Wasser, das den gleichen pH-Wert hat, wie die anzureichernde Lösung.

-Dotierlösungen

Als Dotierlösungen wurden Lösungen von Stickstoffverbindungen in Methanol in Teflongefäßen hergestellt. Es wurden keine Polyethylengefäße verwendet, obwohl diese nach den Versuchen von Kapitel 6 zu den geringsten Adsorptionsverlusten führen, da große Mengen an herausgelösten Weichmachern die gaschromatographische Analyse stören.

-Modellösung

Zur Herstellung der Modellösungen wurde Leitungswasser mit den Dotierlösungen versetzt.

-Trocknung

15 Minuten im Stickstoffstrom bei 1 bis 2 bar Stickstoffvordruck

-Derivatisierung von Standard- und Probelösung, Gaschromatographische Analyse

Sowohl der Gehalt der Standardlösung (hergestellt durch Verdünnen der Dotierlösung), als auch der aufgearbeiteten Probe, werden, wie unter 5.3.4 beschrieben, nach der Derivatisierung gaschromatographisch untersucht.

7.4.1. Screening verschiedener Festphasenmaterialien bei pH=7.9

Da keine systematischen Untersuchungen zur Phasenauswahl für die Anreicherung von Stickstoffverbindungen vorliegen, sollen verschiedene Phasen in einem vergleichenden Versuch auf ihr Anreicherungsverfahren für ausgesuchte Stickstoffverbindungen untersucht werden. Zunächst soll der Wiederfindungsgrad beim natürlichen pH-Wert eines Ablaufs einer kommunalen Kläranlage, also $\text{pH} \approx 8$, ermittelt werden.

Versuchsdurchführung:

-Gefäßmaterial zur Herstellung der Dotierlösungen: Glas

-Anreicherungsmaterial:

RP-C18-Phasen von Baker und Merck (Adsorbex), RP-C8 von Baker, RP-CN-Phasen von Baker,

RP-CI-Phasen von Merck (Polyspher) und RP-C2-Phasen von Baker.

-Modellösung:

Je ein Liter Leitungswasser, eingestellt auf $\text{pH}=7.9$ (mit Salzsäure bzw. Natronlauge) mit etwa 50 mg/l an Isopropylamin, Pyrrolidin, Piperidin, 1-Methylpiperazin, Imidazolin-2-on, 2-Methylbenzimidazol und 2-Methylnitroanilin.

-Elution:

Nacheinander wird mit je 500 μl Methanol und 500 μl Ethylacetat extrahiert.

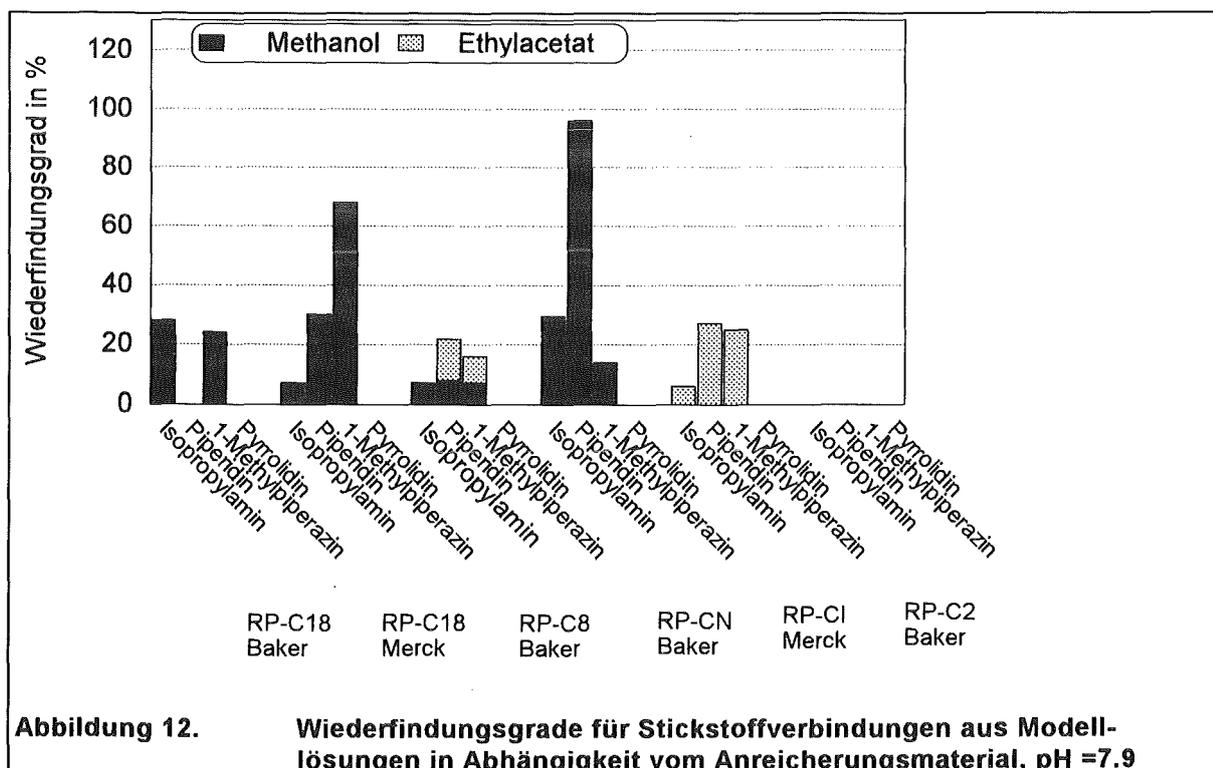


Abbildung 12. Wiederfindungsgrade für Stickstoffverbindungen aus Modellösungen in Abhängigkeit vom Anreicherungsmaterial, $\text{pH} = 7.9$

Wie Abbildung 12 zeigt, konnten nur drei der eingesetzten Verbindungen wiedergefunden werden. Nicht wiedergefunden wurden Imidazolin-2-on, 2-Methylbenzimidazol, 2-Methylnitroanilin und Pyrrolidin. Im Falle der ersten drei Stoffe trat bereits ein Verlust in der Dotierlösung auf. Bei Pyrrolidin wurde kein Verlust in der Standardlösung beobachtet. Man muß daher annehmen, daß es unter den gewählten Bedingungen nicht wiedergefunden wird.

Beim Vergleich des Anreicherungsvermögens von Festphasenmaterialien mit gleichen funktionellen Gruppen (C18), aber unterschiedlichen Materialien des Grundgerüsts (Silicagerüst, freie OH-Gruppen methyliert bei Baker-Phasen, Silicagerüst bei Adsorbex-Phasen) wird deutlich, daß zur Anreicherung der Heterozyklen Piperidin und 1-Methylpiperazin die Adsorbex-Phasen besser geeignet sind. Denn Piperidin kann an der Adsorbex-Phasen zu 30% wiedergefunden werden, an den Baker-Phasen jedoch nicht. Weiterhin ist der Wiederfindungsgrad von 1-Methylpiperazin an den Adsorbex-Phasen mehr als 40% größer.

Der höhere Wiederfindungsgrad könnte aber auch durch die Elutionswirkung des Methanols bedingt sein, die vom Anreicherungsmaterial abhängig ist.

In Bezug auf die hier angereicherten hydrophilen Stickstoffverbindungen haben auch die RP-CN-Phasen und die RP-CI-Phasen ein gewisses Anreicherungsvermögen, das auch unter variierten Bedingungen hinsichtlich Eluent und pH-Wert, verfolgt werden soll.

Bei der Betrachtung der Wiederfindungsgrade in Abhängigkeit der Eluenten zeigt sich, daß durch den zweiten Extraktionsschritt mit Ethylacetat die Wiederfindungsgrade von Piperidin und 1-Methylpiperazin erhöht werden können. Methanol ist offensichtlich nicht der ideale Eluent.

Deshalb sollen in den weiteren Versuchen lipophilere Lösungsmittel zur Elution eingesetzt werden, um dann auch weniger polare Stickstoffverbindungen eluieren zu können.

Zusammenfassend können die in Tabelle 16 aufgeführten Stoffe Piperidin und 1-Methylpiperazin mit Wiederfindungsgraden > 60% angereichert werden.

Tabelle 16. Zusammenstellung der Versuchsbedingungen für Versuche mit Wiederfindungsgrad > 60%

Stickstoffverbindung	pH-Wert	Elutionsmittel	Anreicherungsmaterial	Wiederfindungsgrad in %
Piperidin	7.9	Methanol	RP-CN/Baker	96
1-Methylpiperazin	7.9	Methanol	RP-C18/Merck/Adsorbex	68

7.4.2. Screening verschiedener Festphasenmaterialien bei pH=12

Wurde das Anreicherungsmaterial nach dem Konditionieren mit Methanol mit Wasser pH=12 konditioniert und dann angereichert, so löste sich das Anreicherungsmaterial während der Anreicherung vollständig auf. Dies ist durch eine Umesterung des Phasenmaterials erklärbar. Die Einführung eines weiteren Konditionierungsschrittes mit neutralem Wasser nach der Konditionierung mit Methanol, aber vor der Konditionierung mit Wasser pH=12, verhinderte die Auflösung des Materials, so daß eine Anreicherung bei pH=12 möglich wurde.

Versuchsdurchführung:

- Anreicherungsmaterial:

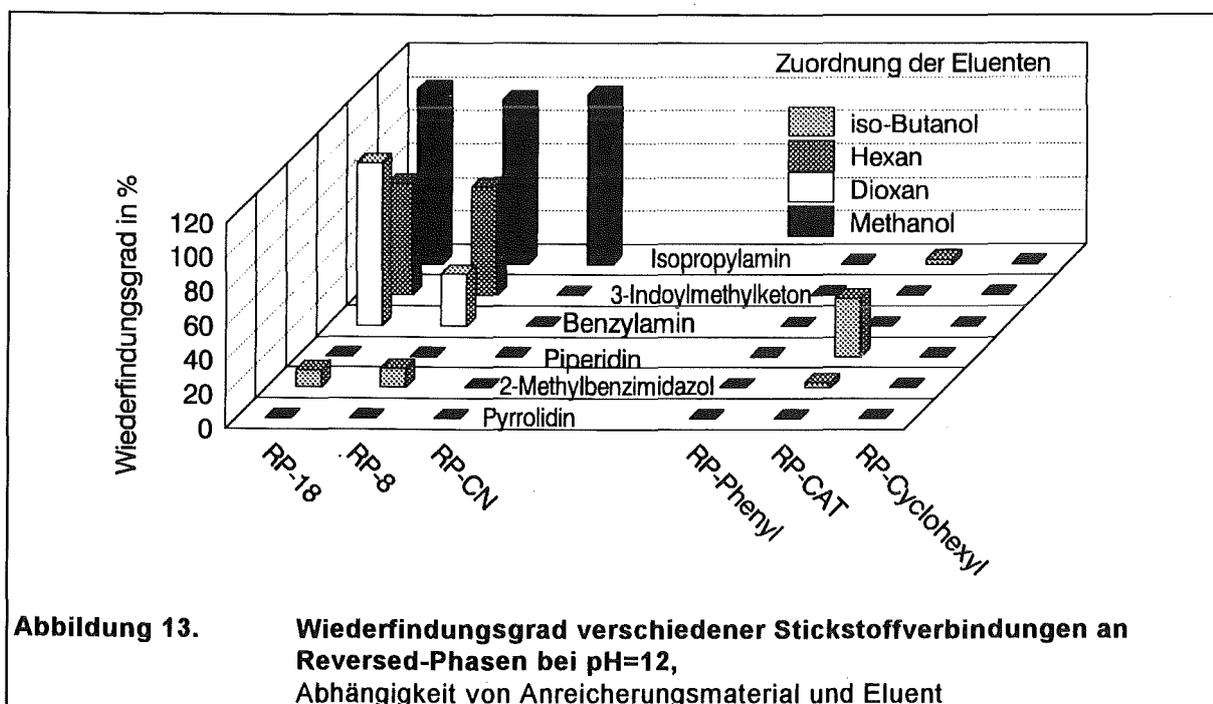
RP-CAT-Phasen von Merck (Polyspher), RP-PH-Phasen von Baker, RP-CN-Phasen von Baker, RP-C8-Phasen von Baker, RP-C18-Phasen von Baker, und RP-CH-Phasen von Baker.

- Modelllösung:

Je ein Liter destilliertes Wasser, eingestellt auf pH=12, und mit einer Lösung (in einem Teflongefäß), die etwa 50 mg an Isopropylamin, Piperidin, Pyrrolidin, Benzylamin, 2-Methylbenzimidazol, 3-Indoymethylketon, 1-Methylpiperazin und Imidazolin-2-on in 10 ml Methanol enthält, dotiert.

-Elution:

Als Eluenten werden nacheinander 500 µl iso-Butanol, Dioxan, Hexan und Methanol eingesetzt.



Wie Abbildung 13 zeigt, sind auch bei Nichtbetrachtung der schon in der Dotierlösung nicht detektierbaren Stoffe (Imidazolin-2-on und 1-Methylpiperazin) an keiner der untersuchten Phasen alle Stickstoffverbindungen wiederzufinden. Pyrrolidin konnte an keiner der Phasen wiedergefunden werden. Die besten Effekte zeigten RP-C18 und RP-C8, mit denen Isopropylamin, 3-Indoilmethylketon, Benzylamin und 2-Methylbenzimidazol, nicht aber Piperidin und Pyrrolidin wiedergefunden wurden.

Besonders interessant ist RP-CAT, das Piperidin anreichert, was mit keiner der anderen untersuchten Phasen möglich war.

Mit der verwendeten Sequenz an Elutionsmittel konnte jeweils eine Stickstoffverbindung selektiv wiedergefunden werden.

Beim letzten Elutionsschritt mit Methanol nach der Verwendung von Hexan entstanden kleine Tröpfchen von nicht abgesaugtem Hexan. Dies kann zwar durch längeres Absaugen von Hexan verhindert werden. Eine Verwendung von Methanol im ersten Extraktionsschritt könnte dieses Problem vollständig umgehen.

Auch unter diesen Versuchsbedingungen wurden, wie Tabelle 17 zeigt, Wiederfindungsgrade größer 60% für Isopropylamin, 3-Indoilmethylketon und Benzylamin erreicht.

Tabelle 17. Zusammenstellung der Versuchsbedingungen für Versuche mit Wiederfindungsgrad > 60%

Stickstoffverbindung	pH-Wert	Elutionsmittel	Anreicherungsmaterial	Wiederfindungsgrad in %
Benzylamin	12	Dioxan	RP-C18/Baker	96
3-Indoilmethylketon	12	Hexan	RP-C18/Baker	66
3-Indoilmethylketon	12	Hexan	RP-C8/Baker	64
Isopropylamin	12	Methanol	RP-C18/Baker	104
Isopropylamin	12	Methanol	RP-C8/Baker	98

Zusammenfassung der Ergebnisse von Versuch 7.4.1. und 7.4.2.

In den vorangegangenen Versuchen ist es gelungen, Isopropylamin, Piperidin, und Benzylamin mit Wiederfindungsgraden von fast 100% anzureichern.

Auch für 3-Indoilmethylketon wurden Versuchsbedingungen gewählt, unter denen diese Substanz mit einem Wiederfindungsgrad von 66% aus Modellösungen angereichert werden konnte.

Dabei zeigten sich die RP-C18-Phasen in allen Fällen am geeignetsten. Nur für die Anreicherung von Piperidin, das an RP-C18-Phasen mit Wiederfindungsgraden kleiner als 40% angereichert werden konnte, war die Aufarbeitung über RP-CN-Phasen mit 100% Wiederfindungsgrad erfolgreicher.

Die Anreicherung von 1-Methylpiperazin, Pyrrolidin und 2-Methylbenzimidazol zeigte sich mit Wiederfindungsgraden kleiner 70% in allen Versuchen als problematisch.

Im Fall von 2-Methylbenzimidazol kann eine Adsorption aus der Standardlösung, wie sie in den Versuchen von Kapitel 6.2.1 für Methanol als Lösungsmittel festgestellt wurde, für die geringen Wiederfindungsgrade verantwortlich sein. Dieser Effekt wird in Wasser größer als in Methanol eingeschätzt. Auch 1-Methylpiperazin zeigt in Polyethylen, Teflon und silanisierten Glasgefäßen, die zur Aufbewahrung der untersuchten Lösungen verwendet wurden, Adsorptionsverluste. Für diese Verbindungen ist eine Wiederfindung über eine Reversed-Phase-Anreicherung, aber auch mit allen anderen Anreicherungsverfahren, durch die Kontakte mit dem Gefäßmaterial in Frage gestellt. Gleichzeitig ist aber dann auch die Anwesenheit dieser Verbindungen nach einem intensiven Klärprozeß mit vielfältigen Möglichkeiten zur Adsorption am Klärschlamm unwahrscheinlich.

Pyrrolidin zeigte in den Anreicherungsversuchen Verluste von etwa 20% bei allen untersuchten Materialien. Die geringen Wiederfindungsgrade in den Anreicherungsversuchen von etwa 20% lehren, daß die angewandten Anreicherungs- bzw. Elutionsbedingungen nicht geeignet sind. Die Optimierung der Anreicherung von Pyrrolidin soll deshalb im Mittelpunkt der folgenden Untersuchungen stehen.

7.4.3. Extraktion an RP-C18-Phasen (Adsorbex) bei pH=6 und pH=12

In Versuch 7.4.1 zeigte sich, daß Piperidin bei einer Anreicherung an RP-C18-Phasen (Adsorbex) wiederzufinden ist, an RP-C18-Phasen von Baker dagegen nicht (auch nicht in Versuch 7.4.2). Daraus wird gefolgert, daß für das Anreicherungsvermögen der Festphase auch das Polymermaterial entscheidend sein könnte und das Anreicherungs-

material von Merck (Adsorbex) für die Anreicherung von Piperidin geeigneter ist. Da Pyrrolidin dem Piperidin in seiner Struktur ähnlich ist, soll seine Wiederfindung an den RP-C18-Phasen (Adsorbex) noch einmal unter anderen Bedingungen untersucht werden.

Das Anreicherungsvermögen der RP-C18-Phasen (Adsorbex) bei pH-Werten von 6 und 12 war Gegenstand des folgenden Experimentes. Dabei wurde die Elutionsreihenfolge Iso-Butanol/ Methanol, Dioxan, Hexan und Methanol/Acetonitril angewandt.

Versuchsdurchführung:

-Anreicherungsmaterial:

RP18-Phasen von Merck (Adsorbex)

-Modellösung:

Je ein Liter Leitungswasser, eingestellt auf pH=6 und pH=12. Die Lösungen enthalten alle etwa 40 µg an Isopropylamin, Benzylamin, Piperidin, Pyrrolidin, 1-Methylpiperazin und 3-Indoymethylketon im Liter Lösung.

-Elution:

Als Eluenten werden nacheinander 2 x 200 µl Methanol und 2 x 100 µl iso-Butanol, 2 x 200 µl Dioxan, 2 x 200 µl Hexan und 2x 200 µl Methanol/ Acetonitril (1:1) eingesetzt.

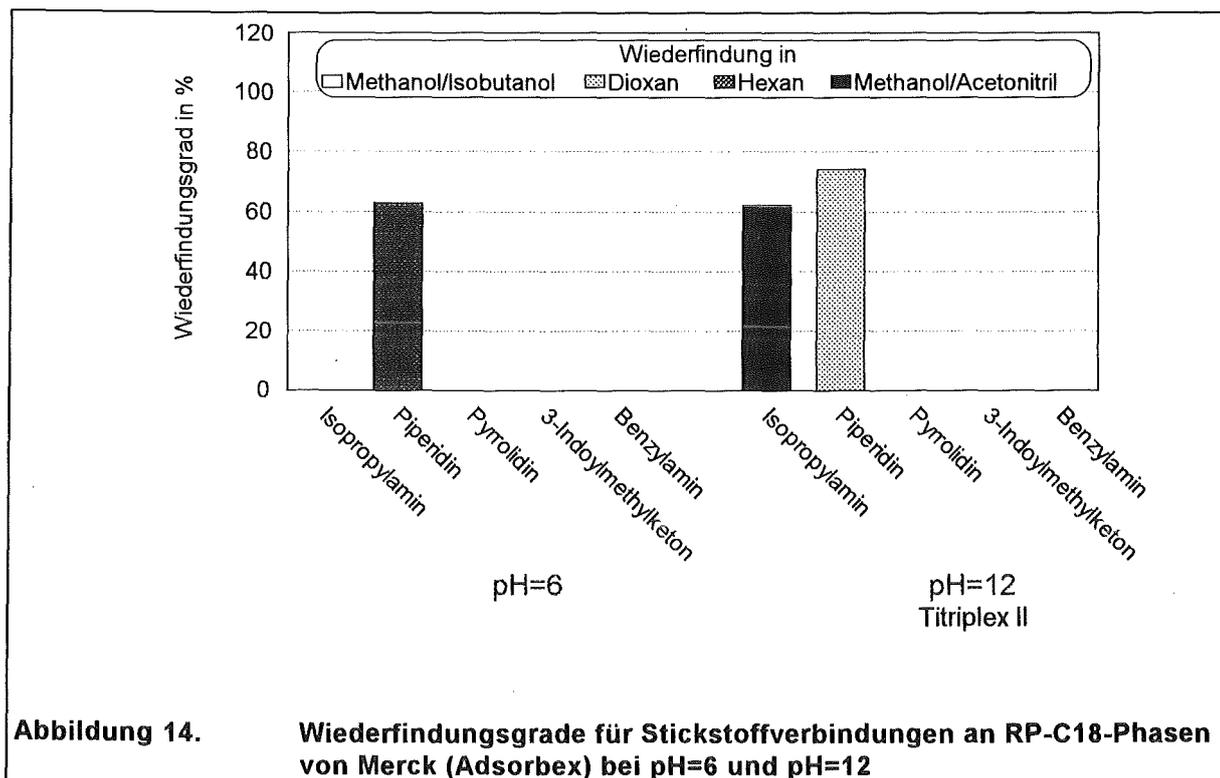


Abbildung 14. Wiederfindungsgrade für Stickstoffverbindungen an RP-C18-Phasen von Merck (Adsorbex) bei pH=6 und pH=12

Wie Abbildung 14 zeigt, sind auch unter diesen Bedingungen nur zwei von sechs eingesetzten Stoffen wiederzufinden. 1-Methylpiperazin ist schon in der Standardlösung nicht mehr detektierbar.

Der Wiederfindungsgrad ist bei einer Anreicherung unter den hier gewählten Versuchsbedingungen bei pH=12 für Piperidin mit über 70% größer als in allen vorangegangenen Versuchen.

Dies kann durch die veränderte Eluentenauswahl oder die pH-Änderung verursacht worden sein.

Pyrrolidin wird aber auch unter diesen Anreicherungsbedingungen nicht wieder gefunden.

Benzylamin und 3-Indoilmethylketon, die unter den Versuchsbedingungen in 7.4.2 (Anreicherungsmaterial von Baker und kein Einsatz von Titriplex II) für pH=12 mit Wiederfindungsgraden > 60% nachgewiesen wurden, konnten unter den hier gewählten Versuchsbedingungen nach der Anreicherung nicht mehr nachgewiesen werden.

Dies zeigt, daß es offensichtlich in Abhängigkeit von der Struktur (aliphatischer Anteil im Molekül bei Isopropylamin, Benzylamin und 3-Indoilmethylketon und ausschließlich heterozyklisches Molekül (Piperidin)) zwei geeignete Phasenmaterialien gibt.

7.4.4. Extraktion an RP-C18-Phasen (Adsorbex) bei pH=6, 7.9 und 12

In Versuch 7.4.1. gelang im ersten Extraktionsschritt die Elution von Piperidin, Isopropylamin und 1-Methylpiperazin mit Methanol. Mit Iso-Butanol in Versuch 7.4.2 und einem Iso-Butanol/ Methanol in Versuch 7.4.3 konnten diese Verbindungen nicht eluiert werden. Deshalb soll in diesem Versuch, der nochmal die Wiederfindung von Pyrrolidin zum Ziel hat, wieder mit Methanol als erstem Eluenten begonnen werden. Dabei sollen unterschiedliche pH-Werte untersucht werden.

Versuchsdurchführung:

-Anreicherungsmaterial:

RP18-Phasen von Merck (Adsorbex)

-Modelllösung:

Je ein Liter Leitungswasser, eingestellt auf pH=6, 7.9 bzw. 12. Dabei wurde dem Wasser, das auf pH=12 eingestellt wurde ein Spatel Titriplex II zur Bindung der Wasserhärte zugesetzt. Die Lösungen enthalten alle etwa 60 µg an Isopropylamin, Piperidin, Pyrrolidin und 1-Methylpiperazin im Liter Lösung.

-Elution:

Als Eluenten werden nacheinander 2x250 µl Methanol, 2x250 µl Dioxan und 2x 250 µl Hexan eingesetzt.

Wie Abbildung 15 zeigt, kann unter den hier gewählten Versuchsbedingungen Pyrrolidin wiedergefunden werden. Dies gelang unter keinen Versuchsbedingungen, die bis dahin angewandt worden sind. Vergleicht man die Wiederfindungsgrade von Isopropylamin, Piperidin und Pyrrolidin in Methanol mit den Wiederfindungsgraden, die in Versuch 7.4.1 unter fast analogen Anreicherungsbedingungen ermittelt wurden, so stellt man für Piperidin und Pyrrolidin eine Erhöhung fest. Der einzige Versuchsparameter, der für Isopropylamin und Pyrrolidin geändert wurde, war die Elution in zwei Schritten, wobei die ersten 250 µl Methanol nach einigen Minuten abgesaugt wurden.

Eine verlängerte Einwirkzeit des Lösungsmittels und die Wiederholung der Elution haben offensichtlich einen positiven Effekt auf den Wiederfindungsgrad. Sie sollen deshalb in den folgenden Versuchen analog zu diesem Versuch durchgeführt werden.

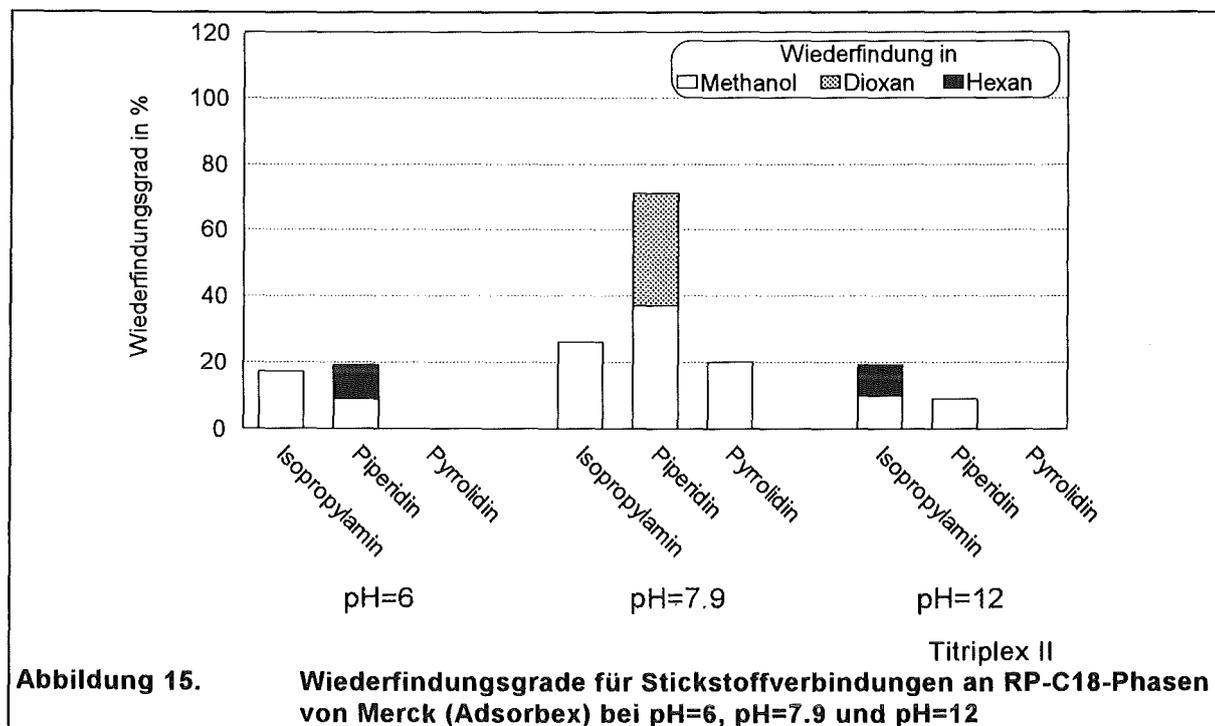


Abbildung 15. Wiederfindungsgrade für Stickstoffverbindungen an RP-C18-Phasen von Merck (Adsorbex) bei pH=6, pH=7.9 und pH=12

In Hinblick auf eine maximale Wiederfindung von Isopropylamin, Piperidin und Pyrrolidin ergibt sich bei pH=7.9 ein Optimum. Dieser Effekt des pH-Wertes kann nicht allein durch eine Verschiebung des Gleichgewichtes von freier Base und protonierter Stickstoffverbindung verstanden werden. Denn oberhalb von pH=7.9 ist bei pK_B -Werten von etwa drei für alle drei Stoffe keine Verschiebung des Gleichgewichtes mehr zu erwarten.

Die Tatsache, daß diese Stoffe überhaupt bei diesen pH-Werten sorbiert werden, kann durch Wechselwirkungen mit dem silicatischen Grundgerüst des Festphasenmaterials erklärt werden. Ähnliche Effekte könnten auch die Verluste von organischen Stickstoffverbindungen, wie sie in Kapitel 6 festgestellt wurden, verursachen.

Tabelle 18. Zusammenstellung der Anreicherungsbedingungen für Wiederfindungsgrade > 60%

Stickstoffverbindung	pH-Wert	Elutionsmittel	Anreicherungsmaterial	Wiederfindungsgrad in %
Piperidin	7.9	Methanol	RP-C18/Merck/Adsorbex	37
Piperidin	7.9	Dioxan	RP-C18/Merck/Adsorbex	34
				$\Sigma=71$

7.4.5. Extraktion an RP-CI-Phasen von Merck (Polyspher)

Nachdem in Versuch 7.4.1 ein Anreicherungsvermögen der RP-CI-Phasen von Merck (Polyspher) gegenüber Isopropylamin, Piperidin und 1-Methylpiperazin bei pH=7.9 und in den folgenden Versuchen eine starke Abhängigkeit des Wiederfindungsgrades vom Eluenten und pH-Wert festgestellt wurde, sollen Eluenten und verschiedene pH-Werte auch an RP-CI-Phasen bestimmt werden. Die Auswahl des pH-Wertes wurde auf 7, 9 und 12 festgelegt.

Versuchsdurchführung:

-Anreicherungsmaterial:

RP-CI-Phasen von Merck (Polyspher)

-Modellösung:

Je ein Liter Leitungswasser, eingestellt auf pH=7, 9 und 12. Dabei wurde dem Wasser, das auf pH=12 und 9 eingestellt wurde, ein Spatel Titriplex II zur Bindung der Wasserhärte zugesetzt. Die Lösungen enthalten alle etwa 60 µg an Isopropylamin, Piperidin, Pyrrolidin und 1-Methylpiperazin im Liter Lösung.

-Elution:

Als Eluenten werden nacheinander 2x 250 µl Methanol, 2x 250 µl Dioxan und 2x 250 µl Hexan eingesetzt.

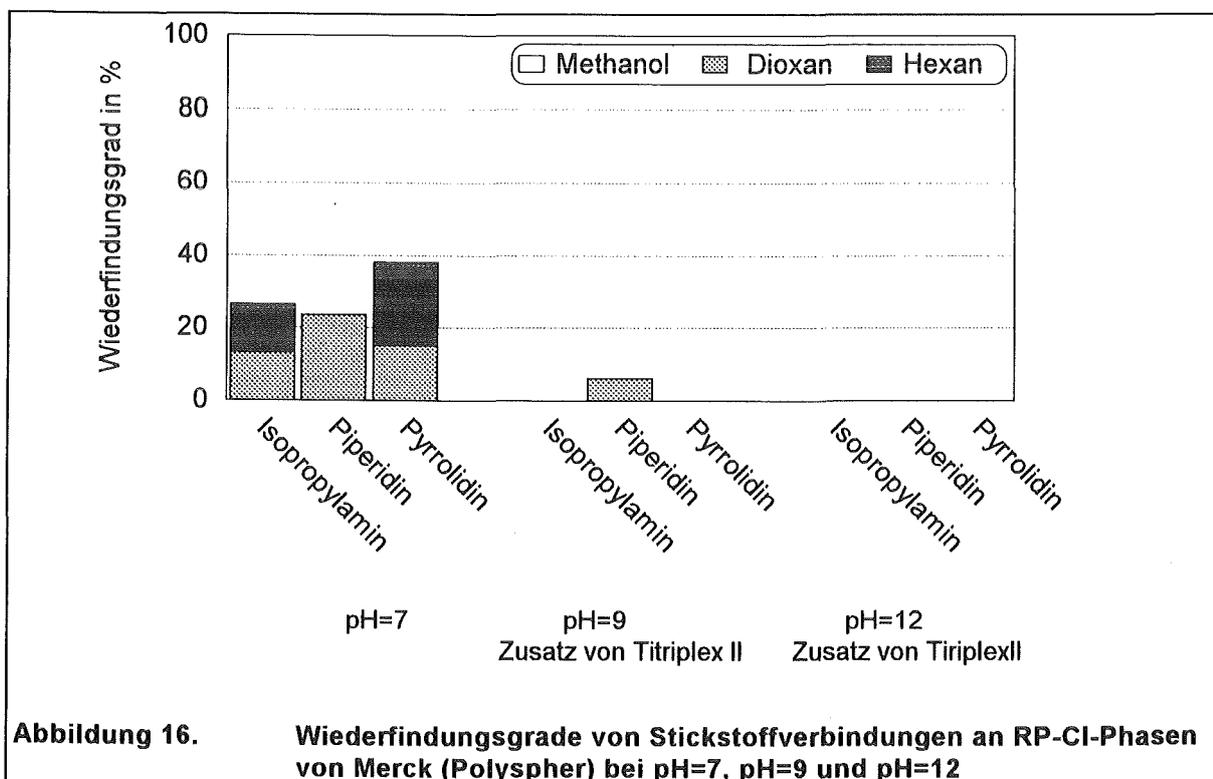


Abbildung 16.

Wiederfindungsgrade von Stickstoffverbindungen an RP-CI-Phasen von Merck (Polyspher) bei pH=7, pH=9 und pH=12

In Analogie zu Versuch 7.4.1. sind Piperidin und Isopropylamin, wie Abbildung 16 zeigt, an RP-CI-Phasen wiederzufinden. (1-Methylpiperazin war in der Dotierlösung nicht mehr nachzuweisen. Deshalb sind die Versuche für diesen Stoff nicht vergleichbar.) Der Wiederfindungsgrad kann von Isopropylamin unter den veränderten Elutionsbedingungen um etwa 10% gesteigert werden. Für die Anreicherung von Pyrrolidin ergaben sich im Vergleich mit allen vorangegangenen Versuchen die größten Wiederfindungsgrade. Der Vergleich mit Versuch 7.4.1 legt auch in diesem Fall eine Verbesserung des Wiederfindungsgrades durch die veränderte Elution (Zwei Elutionsschritte, Verwendung von Dioxan als zweiter Eluent) nahe.

7.4.6.Extraktion an RP-C18-Phasen von Merck (Adsorbex) bei pH=7.2 und 12 nach Konditionierung mit TRIS

Gleichzeitig zu den Versuchen 7.4.2.-7.4.5. wurden folgende Versuche 7.4.6. und 7.4.7. durchgeführt, um noch eine verbesserte Anreicherungsmöglichkeit für Pyrrolidin zu finden. Im Handbuch der Firma Analytchem [29] ist ein Hinweis gegeben über ein verbessertes Anreicherungsvermögen von Reversed-Phasen für Stickstoffverbindungen bei Konditionierung mit Triethanolamin (TRIS). Nähere Angaben werden nicht gemacht. Der Einfluß der Konditionierung mit TRIS wird in den nächsten Experimenten untersucht.

Versuchsdurchführung:

-Anreicherungsmaterial:

RP18-Phasen von Merck (Adsorbex)

-Konditionierung:

pH=7.2: mit einigen Bettvolumina Methanol, dann mit einem TRIS-Puffer pH=7.2, überschüssiges TRIS mit Wasser pH=7.2 eluieren

pH=12 bzw. 9: mit einigen Bettvolumina Methanol, mit einigen Bettvolumina destilliertes Wasser spülen, dann mit einer 0.2molaren wäßrigen TRIS-Lösung, die mit NaOH auf pH=12 bzw. 9 eingestellt wurde, überschüssiges TRIS mit Wasser pH=12 bzw. 9 eluieren

-Modellösung:

Je ein Liter Leitungswasser, eingestellt auf pH=7.2 und pH=12. Die Lösungen enthalten alle etwa 40 µg an Isopropylamin, Benzylamin, Piperidin, Pyrrolidin, 1-Methylpiperazin und 3-Indoilmethylketon im Liter Lösung. Die Lösung mit pH=12 enthält zusätzlich etwa 30 mg Titriplex II zur Bindung der Wasserhärte.

-Elution:

Als Eluenten werden nacheinander (Elutionssequenz 1): 2x 200 µl Methanol und 2x 100 µl iso-Butanol, 2x 200 µl Dioxan, 2x 200 µl Hexan und 2x 200 µl Methanol/ Acetonitril (1:1) bzw. (Elutionssequenz 2): 2x 250 µl Methanol, 2x250 µl Dioxan und 2x 250 µl Hexan eingesetzt.

Pyrrolidin, Benzylamin, 3-Indoilmethylketon und 1-Methylpiperazin (nicht mehr in Dotierlösung) konnte mit keiner der gewählten Versuchsbedingungen wiedergefunden werden. Von den wiedergefundenen Stickstoffverbindungen wurde keine mit Dioxan oder Methanol/ Iso-Butanol eluiert.

Wie Tabelle 19 zeigt, liegen bei pH=7.2 die Wiederfindungsgrade für Piperidin und Isopropylamin bei etwa 100%.

Die Wiederfindungsgrade sind bei Anwendung der Elutionssequenz 2 deutlich niedriger als bei Sequenz 1.

Tabelle 19. Wiederfindungsgrade verschiedener Stickstoffverbindungen an mit TRIS konditionierten Phasen

pH	Elutionssequenz	Methanol	Wiederfindungsgrad in % Isopropylamin	Wiederfindungsgrad in % Piperidin
7.2	1	Hexan	106	0
7.2	1	Methanol/ Acetonitril	0	104
12	1	Methanol/ Acetonitril	58	0
7.2	2	Methanol	21	12
9	2	Methanol	18	8

7.4.7. Extraktion an RP-CN-Phasen von Baker

Da in den Versuchen mit RP-CN-Phasen Piperidin zu über 80%, 1-Methylpiperazin zu etwa 20% (Versuch 7.4.1.) und Isopropylamin mit fast 100% (Versuch 7.4.2.) wiedergefunden wurden, sollen jetzt RP-CN-Phasen noch mal unter veränderten Versuchsparametern getestet werden:

Versuchsdurchführung:

-Anreicherungsmaterial:

RP-CN von Baker

-Konditionierung:

pH=6, wie unter 7.3.2. angegeben

pH=7.2, TRIS-Konditionierung analog zu Versuch 7.4.6

-Modellösung:

Je ein Liter Leitungswasser, eingestellt auf pH=6, pH=7.2 und TRIS und pH=12. Die Lösungen enthalten alle etwa 40 µg an Isopropylamin, Benzylamin, Piperidin, Pyrrolidin, 1-Methylpiperazin und 3-Indoilmethylketon im Liter Lösung.

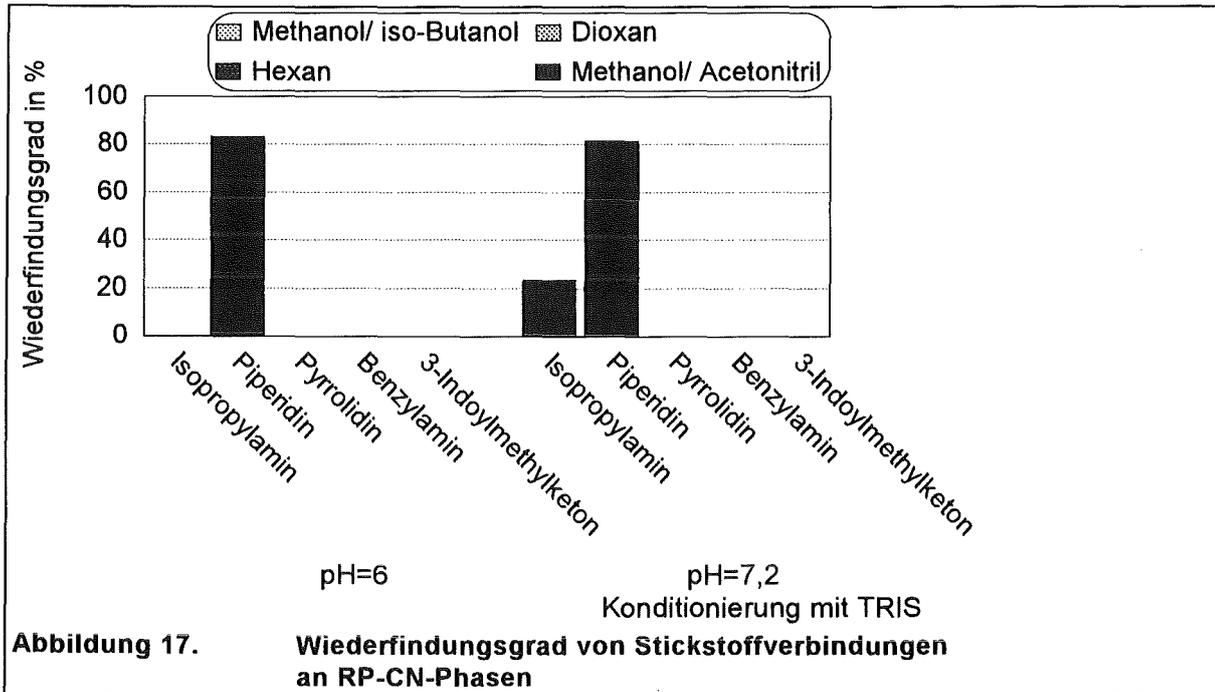
-Elution:

Als Eluenten werden nacheinander 2x 250 µl Methanol, 2x 250 µl Dioxan, 2x 250 µl Hexan und 2x 250 µl Methanol/Acetonitril (1:1) eingesetzt.

Bei der Anreicherung bei pH=12 hat sich das Anreicherungsmaterial, obwohl nach dem Konditionieren mit Methanol gründlich mit neutralem Wasser gespült wurde, aufgelöst.

Wie Abbildung 17 zeigt, sind die Wiederfindungsgrade bei pH=6 und veränderten Elutionsbedingungen relativ zu Versuch 7.4.1. um etwa 10 bis 30% geringer, wobei Pyrrolidin und Isopropylamin nicht mehr wiedergefunden werden.

Die in Versuch 7.4.7 gewählten Bedingungen führen nicht zu höheren Wiederfindungsgraden.



7.5. Zusammenfassung der Anreicherungsversuche aus Modellösungen

Obwohl vielfältige Untersuchungen durchgeführt wurden, hat sich gezeigt, daß es kein Anreicherungsmedium gibt, an dem alle Stickstoffverbindungen wiedergefunden werden. Auch gibt es kein Lösungsmittel, mit dem alle Stickstoffverbindungen eluiert werden. Deshalb ist bei einer Anreicherung aus den hier gewählten Modellösungen, die aus Leitungswasser hergestellt wurden, immer eine Kombination verschiedener Phasenmaterialien und verschiedener Lösungsmittel anzuwenden.

Einen besonderen Einfluß zeigte für eine Anreicherung von verschiedenen Stickstoffverbindungen das Grundgerüst der Festphasenmaterialien. Für die Anreicherung der lipophileren Stickstoffverbindungen Isopropylamin, 3-Indoymethylketon, Benzylamin und 2-Methylbenzimidazol waren Baker-Phasen am besten geeignet. Diese Phasen haben ein silicatisches Grundgerüst, dessen OH-Gruppen methyliert sind. Für die hydrophileren Heterozyklen Piperidin und 1-Methylpiperazin ergaben sich an Adsorbex-Phasen mit nicht derivatisiertem silicatischem Grundgerüst die höchsten

Wiederfindungsgrade. Für Pyrrolidin erwies sich eine Anreicherung an RP-CI-Phasen von Merck (Polyspher) mit einem Wiederfindungsgrad von 38% als die am besten geeignete Methode. Für Piperidin führte eine Anreicherung an RP-CN und an mit TRIS konditionierten RP-C18-Phasen von Merck (Adsorbex) zu den größten Wiederfindungsgraden.

Zusammenfassend werden die Versuchsbedingungen, unter denen Stickstoffverbindungen aus Modellösungen mit Wiederfindungsgraden > 60% angereichert werden, in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20. Optimierte Anreicherungsbedingungen für Stickstoffverbindungen aus Modellösungen

Stickstoffverbindung	pH-Wert	Elutionsmittel	Anreicherungsmaterial	Wiederfindungsgrad in %	Versuch
1-Methylpiperazin	7.9	Methanol	RP-C18/Merck/Adsorbex	68	7.4.1.
Piperidin	7.9	Methanol	RP-CN/Baker	96	
Benzylamin	12	Dioxan	RP-C18/Baker	96	7.4.2.
3-Indoilmethylketon	12	Hexan	RP-C18/Baker	66	
Isopropylamin	12	Methanol	RP-C18/Baker	104	
Piperidin	7.9	Methanol	RP-C18/Merck/Adsorbex		7.4.4.
Piperidin	7.9	Dioxan	RP-C18/Merck/Adsorbex	71	
Pyrrolidin	7	Methanol	PP-Cl/ Merck/ Polyspher	38	7.4.5.
Isopropylamin	7.2	Hexan	RP-C18/Merck/Adsorbex, TRIS	106	7.4.6
Piperidin	7.2	Methanol/ Acetonitril	RP-C18/Merck/Adsorbex, TRIS	104	7.4.6

8. Anreicherung von Stickstoffverbindungen an Reversed-Phasen aus Kläranlagenabläufen

Nach den Versuchen zur Reversed-Phase-Anreicherung von Stickstoffverbindungen aus Modellösungen sollte das Anreicherungsvermögen aus der Matrix Kläranlagenwasser untersucht werden. Für diese Untersuchungen wurden zur Kontrolle dem Wasser Indikatorverbindungen zugesetzt. Die Versuchsbedingungen sind bei allen Extraktionen, wie unter 7.4. angegeben, sofern nicht auf eine abweichende Versuchsdurchführung hingewiesen wird.

Da Kläranlagenabläufe im Gegensatz zu Leitungswasser eine Vielzahl an Partikeln größer 0.45 μm enthalten, welche die Poren einer Reversed-Phase verstopfen, müssen sie vor der Anreicherung 0.45 μm filtriert werden. Im folgenden werden die Vor- und Nachteile verschiedener Filtrationsmethoden im Hinblick auf eine quantitative Erfassung von Stickstoffverbindungen diskutiert.

8.1. Versuche zur Wiederfindung von Stickstoffverbindungen bei der Filtration von Kläranlagenabläufen

8.1.1. Die 0.45 μm -Filtration

Der ungelöste Anteil von Wasserproben kann zur Erfassung der gelösten Verbindungen durch ein Abfiltrieren mit Membranfiltern oder Tangentialflußsystemen mit 0.45 μm Porendurchmesser vom gelösten und kolloidal gelösten Anteilen abgetrennt werden. Eine vollständige Filtration ist bei der Anwendung des Tangentialflußsystems nicht möglich, da im Vorlagekreislauf immer ein Flüssigkeitsvorrat vorhanden sein muß. Deshalb kann man nicht ohne weiteres quantitative Aussagen über den Umfang der Filtration von Einzelverbindungen machen. Die Filtration mit Feststofffiltern erscheint, da die Probe vollständig filtriert werden kann, zur Quantifizierung von Einzelverbindungen geeigneter zu sein.

Die Abwasserproben werden daher mit einem Glasfaserfilter zur Abtrennung von groben Feststoffpartikeln und im gleichen Schritt mit einem unterlegten 0.45 μm Nitrocellulosefilter filtriert.

8.1.2. Abtrennung niedermolekularer Inhaltsstoffe von Kläranlagenabläufen mit der höhermolekularen Fraktion bei der 1000 Dalton-Filtration

In den ersten Anreicherungsversuchen mit 0.45 µm filtriertem Kläranlagenwasser traten folgende Probleme auf: Wurden die organischen Inhaltsstoffe von Kläranlagenabläufen (pH=7.9), die nach der 0.45 µm Filtration einige Stunden standen, bei einem Durchfluß von etwa 2 ml/min an Reversed-Phase-Materialien angereichert, so verminderte sich der Durchfluß nach etwa 300 ml und war nach 500 ml Probe fast nicht mehr möglich. Wurde die restliche Wasserprobe erneut filtriert und wieder aufgearbeitet, so flossen maximal 200 ml der vorgelegten Probe bis zum Verstopfen der Kartuschen. Gleichzeitig bildet sich an den Gefäßinnenwänden von Vorratsgefäßen und Schläuchen ein weißes, schleimiges Material.

Unter der Annahme, daß es sich dabei um ein Ergebnis mikrobieller Aktivität handelt,

wurden diese vor jedem Versuch in der Spülmaschine gereinigt,

wobei durch das Trocknungsprogramm Gefäß- und Schlauchoberflächen weitgehend sterilisiert wurden. Damit ließ sich die Belagbildung verhindern. Ein Spülen der Gefäße von Hand mit handelsüblichen Detergentien war nicht ausreichend.

Zusätzlich wurde in Zukunft ausschließlich die Druckfiltration mit Stickstoff zur Filtration eingesetzt, um den Eintrag von Luft und damit Sauerstoff in die Probe zu verhindern.

In den vorangegangenen Versuchen wurde unter Anlegen von Vakuum filtriert. Auch unter diesen Bedingungen zeigte sich für Piperidin, Pyrrolidin und Isopropylamin, daß diese Verbindungen bei pH=7.9 mit Leitungswasser anzureichern sind, aus Kläranlagenwässern jedoch nicht.

Ursachen dafür kann zum einen der mikrobielle Abbau der Verbindungen oder die Adsorption am organischen Anteil, wie z.B. huminstoffähnlichen Verbindungen, RNA-Fragmenten und Proteinen sein. Der Nachweis und die Eliminierung dieser Effekte ist Gegenstand der nachfolgenden Versuche.

Eine Möglichkeit zur Abtrennung des höhermolekularen Anteils bietet dies von Elsässer [1] zur Aufarbeitung von Kläranlagenwasser eingesetzte 1000 Dalton-Filtration mit Hilfe eines Tangentialflußsystemes, wobei über eine Membran definierter Porengröße filtriert wird.

Nach Elsässer ist jedoch mit dem Tangentialflußsystem maximal 70% des Ausgangsvolumens filtrierbar, ohne eine Veränderung des Permeationskoeffizienten herbeizuführen. Inwiefern dabei Einzelverbindungen, auch unter dem Einfluß des höhermolekularen

Anteils, bevorzugt permeieren bzw. bevorzugt im Retentat zurückbleiben, wurde von Elsässer nicht untersucht.

Experimentelles :

Parallele Reversed-Phase-Anreicherungen von Kläranlagenablauf (hier: ohne Dosage und ohne Derivatisierung !) zum einen nur 0.45 µm filtriert zum anderen, nachdem 70% des vorgelegten Probevolumens durch das Tangentialflußsystem geleitet waren, ergaben die in Abbildung 18 dargestellten Chromatogramme. Sie zeigen, daß in einer 1000 Dalton-filtrierten Probenaufarbeitung ein großer Teil der niedermolekularen, organischen Bestandteilen nicht mehr zu erfassen war. Das ist durch eine Adsorption von Molekülen kleiner 1000 Dalton an nicht permeierenden Probenbestandteilen und eine dadurch bedingte Retention im Vorlagekreislauf erklärbar.

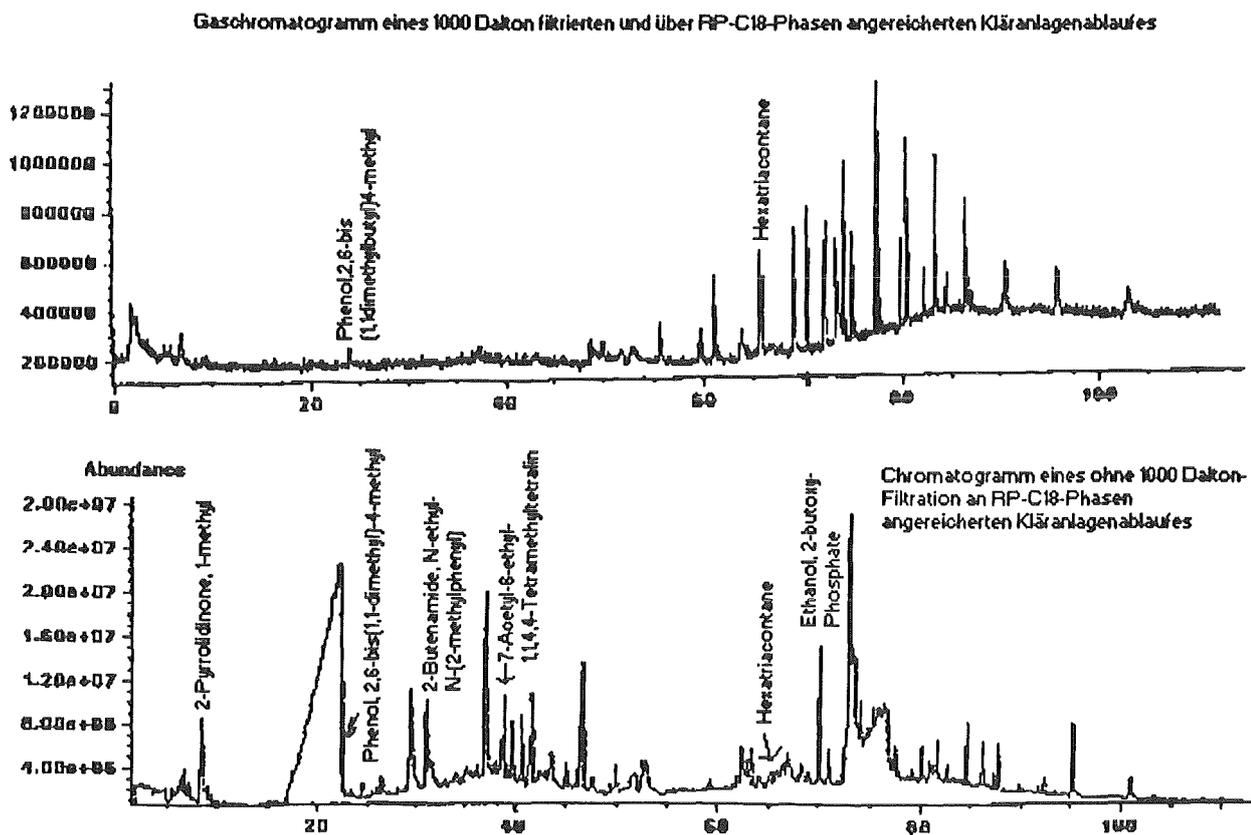


Abbildung 18. Gaschromatogramme des gleichen Kläranlagenablaufs, einmal zusätzlich 1000 Dalton filtriert, ansonsten unter analogen Bedingungen über Reversed-Phase-Material aufgearbeitet.

Die Stoffe wurden, wie in Kapitel 9 beschrieben, identifiziert.

Beispielhaft wurden verschiedene Einzelverbindungen in der 1000 Dalton filtrierten und in der unfiltrierten Probenaufarbeitung quantifiziert. Berechnet man das Verhältnis der Peakflächeneinheiten ausgewählter Ionen der 1000 Dalton filtrierten zur nur 0.45 µm filtrierten Probenaufarbeitung, wie in Tabelle 21 dargestellt, so ergibt sich für die Mehrzahl der Stoffe ein Faktor kleiner als 1. Diese werden also durch die 1000 Dalton-Filtration vermindert, wobei viele in der 1000 Dalton filtrierten Probe nicht mehr nachweisbar sind. Für die nicht mehr nachweisbaren organischen Verbindungen wurde der minimale Abreicherungsfaktor berechnet, indem das Verhältnis der Peakfläche der Nachweisgrenze zur Peakfläche der nur 0.45 µm filtrierten Probe gebildet wurde. So wird z.B. 2-Butoxy-ethyl-phosphat mindestens um den Faktor 0.001 abgereichert, sonst müßte es zumindest bei Messung des selektiven Ions der Masse 199 AMU noch nachweisbar sein.

Tabelle 21. Extraktionsfaktoren verschiedener Verbindungen bei der 1000 Dalton Filtration in einer Matrix aus Kläranlagenablauf
Die Identifizierung erfolgte analog zu Kapitel 9.

Organische Verbindung (Name, wie bei Untersuchung ausgegeben, im Text geändert, vgl. Kapitel 9))	Selektives Ion	1000 Dalton filtriert (A)	ohne 1000 Dalton- Filtration angereichert(B)	A / B
Einheiten	AMU	Peakflächen- einheiten ×1000	Peakflächen- einheiten×1000	
Ethanol, 2-butoxy- phosphat	199	< 26 *	25099	< 0,001
	299	< 35*	10818	< 0,003
Phenol, 2, 6-bis (1,1-dimethylethyl)-4-methyl	205	2195	10199	0,2
7-Acetyl-6-ethyl-1,1,4,4- Tetramethyltetralin	243	< 65*	702888	< 0,009
	159	< 33*	24562	< 0,001
2-Pyrrolidinon, 1-methyl	44	< 210*	197997	< 0,01
	98	< 97*	120596	< 0,008
2-Butenamid, N-ethyl -N-(2-methylphenyl)	203	< 35*	44979	< 0,0008
	188	< 39*	85628	< 0,0005
Hexatriacontan	57	7942	2471	3,3

*Nachweisgrenze= 2 * mittlere Peakflächeneinheiten der Basislinie

Insgesamt kann für fünf der sechs betrachteten Stoffe und insbesondere die Stickstoffverbindungen gezeigt werden, daß diese im Filtrat der 1000 Dalton filtrierten Probe mit Trennfaktoren <0.001 in deutlich geringeren Konzentrationen vorliegen. Dies kann mit einer Adsorption an nicht permeierenden Probenbestandteilen erklärt werden. Eine andere Möglichkeit liegt in den Trenneigenschaften der Membranen, die, wie Knobel [41] feststellte, Moleküle mit zunehmender molarer Masse immer mehr verzögern. Bei den hier festgestellten Trennfaktoren von < 0.001 ist das jedoch unwahrscheinlich.

Bei Hexatriacontan ist auffällig, daß sich nach der 1000 Dalton-Filtration ein Anreicherungsfaktor von 3.3 ergibt. Man kann das dadurch erklären, daß in der unfiltrierten Probe Stoffe, die bei einer 1000 Dalton filtrierten Probe abgetrennt werden, Hexatriacontan in einem Schleppeffekt durch die Festphase transportieren und die Sorption an der RP-C18 Phase reduzieren. Dieser Effekt, daß an Bodenpartikeln gut adsorbierbare Stoffe in den Anreicherungssäulen nicht adsorbiert werden, tritt sehr häufig auf.

Zusammenfassend ergibt sich, daß die Auswirkungen der 1000 Dalton-Filtration schwer vorhersehbar und nicht für alle Probeninhaltsstoffe gleich sind.

Dieses Ergebnis weckt Zweifel an der durch die Verwendung von Filtern verschiedener Porengröße ermittelte Verteilung des DON, die in Kapitel 2.1 dargestellt ist. Denn auch dort ist von einer Retention der kleinen Moleküle durch Sorption am hochmolekularem Anteil und eine dadurch bedingte Verschleppung niedermolekularer Anteile in hochmolekulare Fraktionen auszugehen. Dieser Effekt ist sowohl für das Tangentialflußsystem, als auch für die Gelchromatographie zu erwarten.

Da über die Art der Bindung, die zu diesen Effekten führt, nichts ausgesagt werden kann, wird sie im folgenden als "Vergesellschaftung" bezeichnet.

Dies verlangt eine Neudefinition der in Kapitel 2.1. ermittelten Werte der Molekulargewichtsverteilung des DON. Je nach Trenngrenze wird der mit dem entsprechenden Molmassenbereich vergesellschaftete, organische Stickstoff gemessen. Ein Teil der Moleküle, die in der hochmolekularen Fraktion erfaßt werden, kann eine kleinere Molmasse haben, als die Trenngrenze angibt.

Am Beispiel von N-Ethyl-N-(2-methylphenyl)-2-butenamid und 1-Methyl-2-pyrrolidinon konnte gezeigt werden, daß maximal ein tausendstel des Gehaltes der unfiltrierten Probe nachzuweisen war.

8.1.3. Wiederfindung von zudotierten Stickstoffverbindungen in 0.45 µm filtrierten und 1000 Dalton-filtrierten Fraktionen von Kläranlagenabläufen

In einem weiterem Experiment wurden zudotierte Stickstoffverbindungen (eine Mischung mit Isopropylamin, Piperidin, Benzylamin und Pyrrolidin, Konzentration je etwa 50 µg/l)

sowohl in einer durch 0.45 µm Filtration, als auch in einer durch 1000 Dalton Filtration gewonnenen Fraktion des Kläranlagenablaufs nicht detektiert (Dosage nach der Filtration, Versuchsdurchführung analog zu 7.4.4). Da bei einer Anreicherung unter analogen Bedingungen aus Leitungswasser Isopropylamin, Piperidin und Pyrrolidin wiedergefunden wurden, müssen Bestandteile beider Fraktionen des Kläranlagenablaufs für die geringe Wiederfindung verantwortlich sein.

8.2. Versuche zur Miterfassung vergesellschafteter Stickstoffverbindungen

Ziel der weiteren Versuche ist es, zudotierten Stickstoffverbindungen quantitativ zu erfassen. Drei unterschiedliche Verfahren wurden untersucht, um auch eine Erfassung von zudotierten Stickstoffverbindungen zu ermöglichen, die sich nach der Dosage mit anderen Probeninhaltsstoffen vergesellschaften und so maskiert werden:

- Kosorption des höhermolekularen Anteils an selektiven Reversed-Phasen und Anreicherung freier Stickstoffverbindungen an nachgeschalteten Reversed-Phasen, die andere Anreicherungsmaterialien enthalten
- Kosorption des 1000 Dalton-filtrierbaren Anteils unter Verwendung gemischter Reversed-Phase-Materialien und damit Miterfassung bei der Elution
- Zurückdrängung der Vergesellschaftung niedermolekularer Stoffe mit anderen Bestandteilen des Kläranlagenablaufs durch pH-Änderung.

8.2.1. Anreicherung an hintereinander geschalteten Reversed-Phase-Kartuschen, die unterschiedliche Adsorptionsmaterialien enthalten

Cyclohexylphasen kommen als Adsorptionsmaterial für den huminstoffähnlichen, höhermolekularen Anteil in Frage. Dieser kann möglicherweise Stickstoffverbindungen vergesellschaften. Stellt man sich den huminstoffähnlichen, höhermolekularen Anteil im Aufbau analog zu den Huminstoffen aus aromatischen Systemen über verschiedene funktionelle Gruppen vernetzt vor, so können zumindest theoretisch Adsorptionskräfte mit Cyclohexylphasen wirken.

In den Versuchen zur Adsorption von Stickstoffverbindungen aus Modellösungen (Leitungswasser) an Cyclohexylphasen (Versuch 7.4.2) konnten keine der zudotierten

Stickstoffverbindungen wiedergefunden werden. Dies könnte bedeuten, daß diese Phasen die zudotierten Verbindungen gar nicht erst anreichern. Damit wäre dann eine selektive Adsorption der am höhermolekularen Anteil adsorbierten Stickstoffverbindungen möglich. In den folgenden Versuchen wurde ein Phasensystem, das aus Cyclohexylphasen (RP-CH) mit nachgeschalteten RP-C18 Phasen besteht, im Hinblick auf eine Wiederfindung von Stickstoffverbindungen in Leitungswasser und Kläranlagenablauf getestet.

Versuchsdurchführung:

-Anreicherungsmaterial:

RP-CH-Phasen von Baker und dann über Polyethylenschlauch gekoppelt zwei RP-C18-Phasen von Merck (Adsorbex).

-Modelllösung:

Je ein Liter Leitungswasser bzw. Kläranlagenablauf werden auf pH=7.9 eingestellt und mit 100 µl einer Lösung, die etwa 30 µg an Isopropylamin, Piperidin, Indol, 1-Methylpiperazin, Benzylamin und 3-Indoilmethylketon enthält, versetzt.

-Elution:

Die Elution erfolgt nacheinander mit 2x 250 µl Methanol, 2x 250 µl Dioxan und 2x 250 µl Hexan.

-Konditionierung, Trocknung, Derivatisierung und gaschromatographische Analyse:

analog zu 7.4.

Sowohl in den Extrakten des Leitungswassers, wie auch in den Extrakten des Kläranlagenablaufs, die durch Elution mit Dioxan und Hexan gewonnen wurden, war keiner der zudotierten Stoffe nachweisbar.

Unter den relativ zu Versuch 7.4.2 veränderten Elutionssequenz konnte, wie in Tabelle 22 dargestellt, die Anreicherung an Cyclohexylphasen für ein breites Spektrum an Verbindungen aus Leitungswasser verzeichnet werden.

Tabelle 22. Wiederfindungsgrade im Methanol-Extrakt verschiedener Stickstoffverbindungen bei einer Extraktion aus Leitungswasser und Kläranlagenwasser

Stickstoffverbindungen	Leitungswasser	Kläranlagenablauf
Isopropylamin	86	3
3-Indoilmethylketon	22	76
Piperidin	52	7
1-Methylpiperazin	16	3
Pyrrolidin	32	10
Benzylamin	12	10

Bei der Anreicherung aus Kläranlagenablauf zeigte sich, daß die Cyclohexylphasen einen braunen Farbstoff in großem Umfang adsorbieren. Dabei handelt es sich vermutlich um

den huminstoffähnlichen, höhermolekularen Anteil, dessen Bildung in der Kläranlage von Link [42] nachgewiesen wurde. Es wird etwa 50% mehr 3-Indoilmethylketon wiedergefunden als aus Leitungswasser.

Dies wird durch die Adsorption der niedermolekularen Stoffe an den hochmolekularen Verbindungen des Kläranlagenablaufs erklärt. Bei der Adsorption dieser höhermolekularen Stoffe an den CH-Phasen wird auch 3-Indoilmethylketon angereichert.

Für die Stoffe Isopropylamin und Piperidin ist die Wiederfindung in Kläranlagenablauf relativ zum Leitungswasser viel kleiner. Es gibt hierfür drei mögliche Erklärungen:

- *Die Substanzen gehen mit der adsorbierbaren Matrix keine Wechselwirkungen ein, sondern mit anderen nicht adsorbierbaren Molekülen, wie z. B. Proteinen oder Kieselsäuren.*
- *Die Stoffe können vom adsorbierten Matrixanteil nicht eluiert werden, da sie zu fest an den höhermolekularen Anteil gebunden sind.*
- *Es findet ein Abbau durch Mikroorganismen statt.*

8.2.2. Anreicherung an gemischten Anreicherungsmaterialien

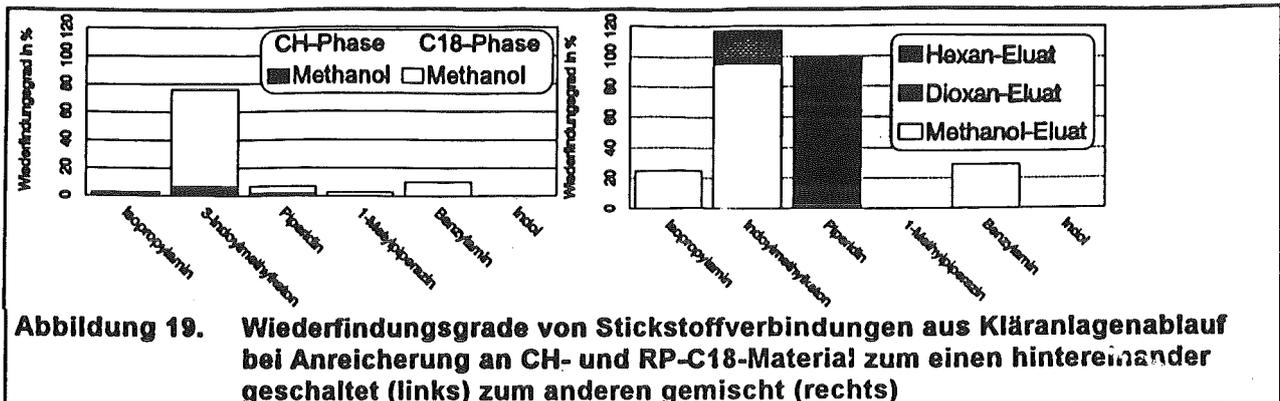
Die zweite Idee die quantitative, matrixunabhängige Anreicherung von Stickstoffverbindungen zu ermöglichen, war die Kosorption der "Vergesellschaftung" mit den adsorbierten Stickstoffverbindungen und der freien Stickstoffverbindungen an einem gemischten Phasensystem. Dies bietet sich auch deshalb an, weil bei ineinander gesteckten Kartuschensystemen es immer wieder zu einer Zerstörung der Wassersäule in der Kartusche kam, indem das Wasser in der Vorsäule langsamer floß, als in der nachgeschalteten Säule. In diesem Versuch wurde das Vorsäulenmaterial RP-CH aus den entsprechenden Kartuschen entnommen, mit dem RP-18-Material vermischt und in eine Kartuschen eingefüllt.

Versuchsdurchführung:

Anreicherung zum einen an gemischtem und zum anderen an hintereinander geschaltetem Kartuschenmaterial: RP-CH von Baker und RP-C18 von Merck (Adsorbex), sonst analog zur Versuch 8.2.1.

Wie Abbildung 19 zeigt, wird Piperidin, Isopropylamin und Benzylamin an dem gemischten Anreicherungsmaterial im Gegensatz zum hintereinander geschalteten mit deutlich höheren Wiederfindungsgraden nachweisbar. Auffällig ist dabei, daß Piperidin, das in den hintereinander geschalteten Phasensystemen im Methanolextrakt nur in geringem Umfang

wiedergefunden wird und im Hexanextrakt gar nicht, im gemischten Phasensystem im Hexanextrakt mit fast 100% nachzuweisen war. Ein ähnlicher Effekt zeigt sich in geringeren Umfang auch für 3-Indoilmethylketon, das bei Verwendung des gemischten Phasensystems auch im Dioxan-Eluat wiedergefunden wird. Dies kann durch eine verbesserte Adsorption im gemischten Phasensystem, aber auch durch eine verbesserte Benetzbarkeit dieses Systems für Dioxan und Hexan verursacht werden.



8.2.3. Zurückdrängung der Vergesellschaftung niedermolekularer Stoffe mit anderen Bestandteilen des Kläranlagenablaufs durch pH-Änderung

Sind Stickstoffverbindungen an Matrixbestandteile gebunden, so könnte durch einen pH-Wechsel und eine dadurch bedingte Ladungsänderung eine Desorption bewirkt werden. Um dies zu überprüfen, wurde eine Anreicherung bei pH=12 durchgeführt.

Versuchsbedingungen:

-Anreicherungsmaterial:

C18-Phasen von Baker

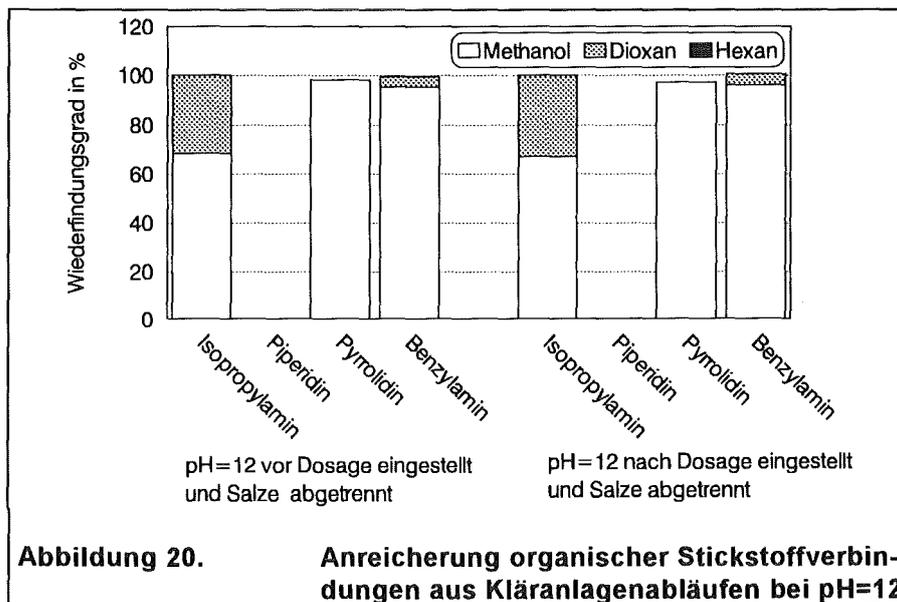
-Modellösung:

Je ein Liter Kläranlagenwasser wird auf pH=12 eingestellt, die ausfallenden Salze werden abfiltriert und mit 30 µl einer Lösung, die etwa 10 µg an Isopropylamin, Piperidin, Benzylamin und Pyrrolidin enthält, versetzt. Eine zweite Probe wird analog aufgearbeitet, wobei die Stickstoffverbindungen vor dem Ausfällen der Salze zudosiert werden.

-Elution:

Die Elution erfolgt nacheinander mit je 2x 250 µl Methanol, Dioxan und Hexan.

-Konditionierung, Trocknung, Derivatisierung und gaschromatographische Analyse: wie unter 7.4.4. angegeben



Beim Einstellen von pH=12 bildet sich in den Proben ein Niederschlag, der unter anderem Calciumcarbonat und Magnesiumcarbonat enthalten muß.

Wie Abbildung 20 zeigt, findet bei pH = 12 eine matrixunabhängige Anreicherung für Isopropylamin, Pyrrolidin und Benzylamin statt, da die Wiederfindungsgrade für diese Verbindungen fast 100% bei Abtrennung der Salze vor und nach der Dosage der Stickstoffverbindungen betragen. Der Unterschied im Wiederfindungsgrad beträgt maximal 0.25%. Piperidin wird nicht angereichert. Dies ist wahrscheinlich auf die Verwendung der Baker-Phasen zurückzuführen, an denen in vielen vorangegangenen Versuchen dieser Stoff gleichfalls nicht wiedergefunden wurde.

8.3. Versuche zur Unterdrückung der mikrobiologischen Aktivität in Kläranlagenabläufen

Da verschiedene Hinweise auf einen mikrobiologischen Abbau der zudotierten Stickstoffverbindungen hindeuten, wurde mit den folgenden Versuchen, der Einfluß von Konservierungsmitteln auf die Wiederfindungsgrade untersucht.

8.3.1. Stand des Wissens

Obwohl man unter Konservierung definitionsgemäß nur die Unterdrückung bzw. starke Verlangsamung biologischer und biochemischer Prozesse versteht, hat sich international eingebürgert, unter dem Begriff Konservierung auch andere Stabilisierungsfaktoren zu verstehen, die eine Veränderung der Wasserprobe soweit verhindern, daß diese innerhalb des Schwankungsbereiches von $\pm 10\%$ bleibt. Verschiedene Veröffentlichungen befassen sich mit der Konservierung von organisch gebundenem Stickstoff in wäßrigen Lösungen. Funk [30] hat festgestellt, daß weder Ansäuern auf $\text{pH} < 2$, noch das Kühlen oder Tiefgefrieren, noch der Zusatz von Chloroform oder HgCl_2 eine ausreichende Konservierung von Abwasser ergeben. Dem gegenüber berichtet Gundernatsch [31], daß der organischen Stickstoff durch Ansäuern auf $\text{pH} = 2$ konservierbar sei. Er macht dabei aber keine Angaben über die Herkunft der Wasserprobe.

8.3.2. Anwendung chemischer Konservierungsmittel

Die Wirksamkeit der chemischen Konservierungsmittel war Gegenstand der folgenden Versuche:

- Konservierung von $0.45 \mu\text{m}$ filtrierten Kläranlagenabläufen mit Natriumazid
- Konservierung von $0.45 \mu\text{m}$ filtrierten und 1000 Dalton filtrierten Kläranlagenabläufen mit HgI_2 , Chloroform, Formalin, $\text{HgI}_2 + \text{Formalin}$

zu Natriumazid

Versuchsdurchführung:
analog zu Versuch 8.2.1.

Dabei reagiert Natriumazid mit Isopropylamin, Piperidin und 1-Methylpiperazin, so daß diese Stoffe schon im Leitungswasser nicht mehr nachweisbar sind. (Ohne Natriumazid ergaben sich nach Versuch 8.2.1 Wiederfindungsgrade in Leitungswasser zwischen 16 und 86%).

Im konservierten Kläranlagenablauf konnten analog zur konservierten Leitungswasserprobe 1-Methylpiperazin, Pyrrolidin und Piperidin nicht mehr nachgewiesen werden. Auch in diesem Fall wird eine Reaktion mit Natriumazid dafür verantwortlich gemacht. Für 3-Indoymethylketon zeigt sich in Analogie zur unkonservierten Probe mit Kläranlagenzulauf (Versuch 8.2.1.) wieder das erhöhte Anreicherungsvermögen des Phasensystems.

Die Wiederfindungsgrade zu diesen Versuchen befinden sich im Tabelle B6 (Anhang B).

Natriumazid ist kein geeignetes Konservierungsmittel für stickstofforganische Verbindungen, da es diese in einer chemischen Reaktionen umsetzt.

Zu HgI₂, Chloroform, Formalin, HgI₂+ Formalin

Versuchsdurchführung:

Dazu wurde in 0.45 µm filtriertem sowie 0.45 µm und 1000 Dalton filtriertem Kläranlagenzulauf der Wiederfindungsgrad von Pyrrolidin, Isopropylamin, Piperidin und Benzylamin unter Zusatz von Chloroform [5 ml/l], Formalin [1 ml/l], Quecksilberiodid [50 mg/l] und Quecksilberiodid [50 mg/l] in Kombination mit Formalin [1 mg/l] unter analogen Bedingungen wie in Versuch 7.4.4. untersucht. Pyrrolidin wurde zudotiert, obwohl es in Versuch 7.4.4 nicht wiedergefunden worden war, um eventuelle positive Einflüsse auf den Wiederfindungsgrad durch den höhermolekularen Anteil verfolgen zu können. Um Verluste durch Überladung des Reversed-Phase-Systems mit anderen organischen Bestandteilen zu kontrollieren, wurden drei Phasensysteme hintereinandergesetzt. Zwei Kartuschen erwiesen sich in den vorangegangenen Versuchen als ausreichend.

Pyrrolidin, Isopropylamin und Benzylamin konnten weder in den Probenaufarbeitungen der 1000 Dalton filtrierten, noch in den 0.45 µm filtrierten Kläranlagenabläufe wiedergefunden werden. Dabei hatte es keinen Einfluß, ob die Proben konserviert waren oder nicht.

Piperidin war in der Probenaufarbeitung des 1000 Dalton filtrierten Kläranlagenzulaufs nicht nachweisbar. Aus einem nur 0.45 µm filtriertem Kläranlagenzulauf wurde es mit reduzierten Wiederfindungsgraden relativ zu den Anreicherungsversuchen in Leitungswasser nachgewiesen. Tabelle 23 gibt eine Übersicht über die Wiederfindungsgrade für Piperidin in Abhängigkeit vom verwendeten Konservierungsmittel.

Tabelle 23. Wiederfindungsgrade von Piperidin in 0.45 µm filtriertem Kläranlagenablauf mit und ohne Konservierungsmittel

Konservierung	Wiederfindungsgrad von Piperidin in % je nach Kartuschenposition			
	oben	mitte	unten	gesamt
unkonserviert	0	0	0	0
Hgl ₂	0	0	0	0
Chloroform	3	0	3	6
Formalin	6	5	8	18
Hgl ₂ + Formalin	6	4	5	15

Ergab sich ein Wiederfindungsgrad für Piperidin in Leitungswasser von 71% (Versuch 7.4.4), so waren in Kläranlagenwasser mit Chloroform noch 6% der zudotierten Verbindungen nachweisbar, bei Zusatz von Formalin noch 18% und beim gleichzeitigen Einsatz von Hgl₂ und Formalin noch 15% der zugesetzten Menge.

Ein mikrobieller Abbau des Piperidins ist in derart konservierten Proben eher unwahrscheinlich. Das Phänomen, daß in den Proben, die mit organischen Stoffen konserviert wurden, mehr Piperidin nachweisbar ist, kann folgendermaßen erklärt werden. Für organische Lösungsmittel ist bekannt, daß sie Wechselwirkungen mit Probeninhaltsstoffen zurückdrängen [29]. Die Verteilung über die unterschiedlichen Phasensysteme, die bei der Anreicherung verschiedener organischer Verbindungen ohne Zusatz eines organischen Lösungsmittels nicht beobachtet wurde, unterstützt diese These. Denn man kann sich die gleichförmige Verteilung des Piperidins durch eine Neueinstellung des folgenden Gleichgewichtes vorstellen:

ungebundenes Piperidin ↔ an hochmolekulare Stoffe adsorbiertes Piperidin

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Verluste an zudotierten Stickstoffverbindungen mit Hilfe von Chloroform, Formalin, Quecksilberiodid nicht in ausreichendem Maße reduziert werden konnten.

8.4. Zusammenfassung der Anreicherungsversuche im Hinblick auf die quantitative Erfassung von Stickstoffverbindungen

In den vorangegangenen Versuchen zeigte sich, daß die unterschiedliche Zusammensetzung von Modellwässern und Kläranlagenabläufen entscheidende Konsequenzen für die Wiederfindungsgrade nach Probenaufarbeitungsschritten haben.

So konnten Piperidin, Pyrrolidin und Isopropylamin unter analogen Versuchsbedingungen zwar aus Leitungswasser, nicht jedoch aus Kläranlagenabläufen angereichert werden. Dabei führte auch der Einsatz von Konservierungsmitteln zu keinem anderen Ergebnis. Weiterhin hat eine 1000 Dalton-Filtration eine Abtrennung des größten Anteils an niedermolekularen Probestandteilen zur Folge. Bei Verwendung eines Festphasenmaterials, das die huminstoffähnlichen Bestandteile des Kläranlagenablaufs gut adsorbieren kann, ergeben sich im Vergleich zur Anreicherung aus Leitungswasser für die Mehrzahl der Stoffe gleichfalls reduzierte Wiederfindungsgrade. Für 3-Indoymethylketon wird dieser jedoch deutlich erhöht und beträgt, wie in Tabelle 24 dargestellt, etwa 100%. Dies weist darauf hin, daß nicht alle Stickstoffverbindungen an die gleichen Inhaltstoffe bzw. über gleiche Wechselwirkungen gebunden sein müssen. Sonst müßte dieses Phänomen für alle untersuchten Stoffe nachweisbar sein. Bei Verwendung dieser Phasenmaterialien in gemischter Form läßt sich auch für Piperidin ein Wiederfindungsgrad von nahezu 100% erreichen.

Schließlich wurde eine andere Möglichkeit zur matrixunabhängigen Wiederfindung mit Ausbeuten von fast 100% bei pH=12 an Baker-Phasen gefunden. Diese Vorgehensweise ist geeignet zur quantitativen Anreicherung von Stoffen mit aromatischen (Benzylamin), aliphatischen (Isopropylamin) und heterozyklischen (Pyrrolidin) Strukturelementen. Nachweislich sind aber manche Stoffe, wie Piperidin unter den genannten Bedingungen nicht wiederfindbar.

Die Ergebnisse lassen sich dahingehend interpretieren, daß beim Arbeiten bei pH=12 sowohl freie als auch mit Matrixbestandteilen vergesellschaftete, bei pH=7.9 aber nur die freien Stoffe erfaßt werden. Da es aber keine analytischen Möglichkeiten gibt, die nur die adsorbierten bzw. nur die freien niedermolekularen Stoffen erfassen, ist ein Nachweis nicht möglich. Eine zusammenfassende Übersicht über die besten Methoden zur Anreicherung von Stickstoffverbindungen aus Kläranlagenabläufen ist in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24. Optimierte Anreicherungsverfahren zur Identifizierung und Quantifizierung verschiedener Stickstoffverbindungen in Kläranlagenabläufen bei Wiederfindungsgraden von etwa 100%

Stickstoffverbindung	pH-Wert	Phasenmaterial	Eluent
Isopropylamin	12	RP-C18 von Baker	Methanol und Dioxan
Pyrrolidin	12	RP-C18 von Baker	Methanol
Benzylamin	12	RP-C18 von Baker	Methanol und Dioxan
Piperidin	7.9	RP-CH von Baker gemischt mit RP-C18 von Merck (Adsorbex)	Hexan
3-Indoymethylketon	7.9	RP-CH von Baker gemischt mit RP-C18 von Merck (Adsorbex)	Methanol und Dioxan

8.5. Modell zum Verhalten der organischen Stoffe im Kläranlagenablauf

Auf Grund der vorangegangenen Versuchsergebnisse muß davon ausgegangen werden, daß Matrixbestandteile von Kläranlagenabläufen gelöste Verbindungen vergesellschaften. Dies führt zu anderen Wiederfindungsgraden in Kläranlagenabläufen, als sie für Leitungswasser festgestellt wurden.

Im folgenden wird versucht, eine modellartige Vorstellung für diese Effekte in Kläranlagenabläufen zu entwickeln. Grundlegend sind dabei folgende Beobachtungen:

- Bei einer Anreicherung von 1000 Dalton filtriertem Kläranlagenablauf konnte für fünf von sechs betrachteten Stoffen im Vergleich zur gleichen, nicht filtrierten Probe eine deutliche Abreicherung im Filtrat relativ zur unfiltrierten Probe nachgewiesen werden. Dies ist durch die Adsorption an Probestandteilen, die größer als die Trenngrenze 1000 Dalton sind, erklärbar.
- Stickstoffverbindungen sind bei einer Dosage in 0.45 µm filtrierten und in zusätzlich 1000 Dalton filtrierten Kläranlagenablauf nicht mehr an Reversed-Phasen-Materialien wiederfindbar. Mögliche Erklärung dafür sind ein Abbau durch Mikroorganismen oder die Adsorption an Bestandteilen. Zur Erklärung des zweiten Phänomens muß von einer Adsorption an Probestandteilen kleiner 1000 Dalton ausgegangen werden.

- 3-Indoilmethylketon wird in Kläranlagenabläufen mit höheren Wiederfindungsgraden angereichert als in Leitungswasserproben. Dieses Phänomen könnte durch einen "positiven" Matrixeffekt verursacht werden, also eine Kosorption Matrixanteilen an dem Phasensystem.
- Bei einer Anreicherung bei pH=12 können Benzylamin, Piperidin und Pyrrolidin ohne Matrixeinflüsse wiedergefunden werden. Dies kann durch eine Unterdrückung von mikrobiologischen Effekten, aber auch durch eine Unterdrückung von Adsorptionseffekten an Bestandteilen bedingt sein.
- Eine Stabilisierung von organischen Stickstoffverbindungen mit Quecksilbersalzen gelang nicht, in Gegenwart von Formalin konnten jedoch zumindest geringe Anteile von Piperidin wiedergefunden werden. Dies wird auch durch Adsorption der Stickstoffverbindungen Probestandteilen erklärt, die in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln zurückgedrängt wird.

Am naheliegendsten für die gefundenen Effekte erscheint zunächst die Annahme, daß die Stickstoffverbindungen mit Matrixbestandteilen vergesellschaftet sind. Dafür spricht auch der beobachtete Einfluß organischer Stoffe auf das Adsorptionsgleichgewicht.

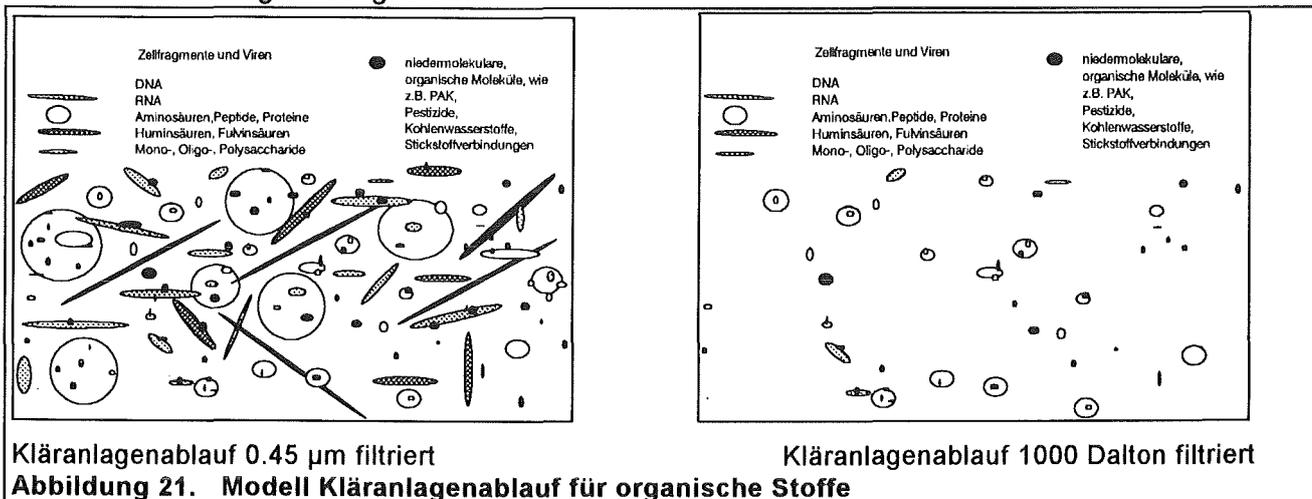
Eine andere Alternative ist aber der biologische Abbau. Diese Frage ließ sich aber leider durch die Verwendung der Desinfektionsmittel nicht entscheiden, weil bei dem Einsatz von erwiesenermaßen konservierend wirkenden Stoffen die Wiederfindungsgrade nicht besser sind. Nur bei Natronlauge ließen sich gute Wiederfindungsgrade realisieren. Daraus spricht eigentlich mehr, daß es sich um physikalisch-chemische Effekte handelt. Diese verhindern dann eine Adsorption an den Kartuschen.

Das folgende Modell beschreibt den Aufbau des Kläranlagenablaufs, der die potentiellen Adsorptionseffekte erklärt:

Ein 0.45 µm filtrierter Ablauf einer kommunalen Kläranlage enthält organische und anorganische Moleküle. Diese können als Sorptionsmittel wirken. Als aktive organische Stoffe kommen Zellfragmente und Viren, Proteine, Peptide, RNA, DNA, Fulvinsäuren, Huminsäuren, Polysaccharide, Oligosaccharide sowie gelöste, organische Moleküle in Frage. Es ist aber auch möglich, daß anorganische Stoffe, wie Eisen-, Aluminiumkolloide oder Kieselsäure mit organischen Stoffen vergesellschaftet sind. Eine Bindung über geladenes Eisen oder Aluminium ist aber weniger wahrscheinlich, da der Ladungsnullpunkt für diese Stoffe bei etwa pH=7 bzw. 8 liegt [43]. Anders verhält sich das allerdings bei Kieselsäuren, die ihren Ladungsnullpunkt bei etwa pH=3 haben [43]. In dieser Hinsicht ist auf die starke Sorption an Glasoberflächen hinzuweisen, die in Kapitel 6 für viele Stickstoffverbindungen festgestellt wurde. Diese Bestandteile haben zumindest zum Teil die Eigenschaft kleinere, organische Moleküle an sich zu binden. Da über diese Art der Bindung nichts ausgesagt werden kann,

wird sie als Vergesellschaftung bezeichnet. Auch zudotierte Verbindungen können je nach ihrem chemischen Aufbau mit den Molekülen wechselwirken und sind dann analytisch nicht mehr erfaßbar.

Diese Vergesellschaftung tritt aber nicht nur mit Stoffen kolloidaler Größe auf, da ja eine Wiederfindung auch im 1000 Dalton-Filtrat bei der Untersuchung dotierter Wasserproben in allen Fällen 0 war (Versuch 8.1.3. und Versuch 8.3.2.). Es ist natürlich vorstellbar, daß auch Matrixbestandteile, die diese Membran passieren können (selbst Fulvosäuren können eine 1000 Dalton-Membran passieren), sich mit anderen organischen oder anorganischen Bestandteilen vergesellschaften. Der stoffliche Bestand der beiden Filtrate ist für die organischen Stoffe in Abbildung 21 dargestellt.



Bei einer derartigen Zusammensetzung der Wasserprobe ist für eine quantitative Erfassung von Stickstoffverbindungen entscheidend, daß sowohl mikrobiologische Aktivität unterdrückt wird, als auch die Vergesellschaftung zwischen den zu bestimmenden Stoffen und den Partikeln aufgehoben wird.

Wenn dieses Bild eines Kläranlagenablaufs richtig ist, hat das wichtige Konsequenzen für die Abtrennwirkung der biologischen Behandlung auf biologisch schwer abbaubare Stoffe, wie auch auf deren weiteres Schicksal im Gewässer. Bei der normalen Abwasserbehandlung sind im Ablauf noch weit mehr suspendierte Stoffe enthalten als in der 0.45 µm filtrierten Fraktion. Für diese ist eine ähnliche Vergesellschaftung anzunehmen, was einen bedeutenden Faktor für den Austrag von Schadstoffen in das Gewässer darstellen kann. Dabei kann durch eine Erhöhung der Löslichkeit der Stoffe nach Bindung an gut wasserlösliche Bestandteile des Kläranlagenablaufs ein Austrag von Stoffen über die Löslichkeit des reinen Stoffes hinaus erfolgen. Im Gewässer andererseits gehen vor allem die großen Partikel in das Sediment und führen dort zu einer Anreicherung der damit vergesellschafteten Schadstoffe. Eine Entfernung der niedermolekularen Vergesellschaftung ist auf diesem Wege weniger wahrscheinlich, so daß man für die Vergesellschaftung mit einem Verbleib im Gewässer rechnen kann. Eine tertiäre Abwasserreinigung, die eine Entfernung den Stickstoffverbindungen zum Ziel hätte, müßte einen chemischen Abbau oder physikalische Entfernung des Stoffes am oder auch mit dem Makromolekül ermöglichen.

9. Identifizierung von Stickstoffverbindungen in Kläranlagenabläufen

In den folgenden Kapiteln sind in den Tabellen immer die vom Auswertprogramm ausgegebenen Stoffnamen angegeben. Im Text dagegen sind die Stoffe gemäß der IUPAC-Nomenklatur benannt.

9.1. Bedeutung der Übereinstimmungszahl

Bei einer Identifizierung von organischen Verbindungen über Massenspektren unter Zuhilfenahme von Spektrenbibliotheken wird zur Quantifizierung der Übereinstimmung von Vergleichsspektrum und Analysenspektrum meist eine prozentuale Übereinstimmungszahl (ÜZ) beider angegeben.

9.1.1. Auswertung von Bibliothekspektren mit dem PBM-Algorithmus

In dieser Arbeit wurde zur Erfassung dieser Übereinstimmung der PBM (Probability Based Matching of Mass Spectra)-Algorithmus verwendet. Um die Bedeutung der Übereinstimmung zu ermessen, wurde dieser Algorithmus auf Originalspektren angewandt. Diese wurden dazu aus der Referenzbibliothek (NBS49K.1) ausgelesen und als experimentelles Spektrum in das Auswertprogramm eingelesen.

Wie die in Tabelle 25 dargestellten Ergebnisse der PBM-Suche zeigen, werden in 18 von 19 Fällen mehrere Vorschläge gemacht, im Extremfall bis zu acht, wobei die richtige Verbindung die höchste Übereinstimmungszahl hat.

Das Auswertprogramm ordnet in keinem Fall der 19 untersuchten Spektren Übereinstimmungszahlen von 100% für die eingegebenen Stoffe zu. Die ausgegebenen Zahlen liegen zwischen 91% bis 99%, im Mittel bei 96%. Ein Befund unter 100% begründet also nicht grundsätzlich einen Zweifel an der Identifizierung.

Im Falle der untersuchten Spektren von Stickstoffverbindungen gibt der Rechner in fast allen Fällen die richtige molare Masse aus. Werden mehrere Isomere ausgegeben, so hat das richtige Isomer immer die höchste Übereinstimmungszahl. In keinem Fall der untersuchten Stickstoffverbindungen werden andere Verbindungen als die tatsächlich vorliegende Verbindung mit mehr als 90% Übereinstimmung ausgegeben. Einen gleich-

wertigen Doppelvorschlag gibt es nur bei dem Paar 4,4'-Bipyridin und 3,3'-Bipyridin. Auch bei den Stellungsisomeren, wie bei den drei verschiedenen Dimethylbenzolen, werden alle mit Wahrscheinlichkeiten größer 90% angegeben.

Ein weiteres Indiz für das Vorliegen einer Stickstoffverbindung ergibt sich, wenn die molare Masse des ausgegebenen Stoffe ungerade ist. Eine ungerade molare Masse haben Stoffe, die eine ungerade Anzahl an Stickstoffatomen im Molekül enthalten und deren Molekül nur aus den Elementen Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Wasserstoff und Schwefel aufgebaut ist, sofern keine besonderen Verhältnisse (wie z.B. Radikale) vorliegen. Das liegt daran, daß Sauerstoff, Kohlenstoff und Schwefel eine gerade Wertigkeit haben, Stickstoff dagegen eine ungerade.

Bei den Aliphaten vom Typ der langkettigen Monocarbonsäuren oder Kohlenwasserstoffe werden mit nahezu gleicher Übereinstimmung mehrere Vorschläge von benachbarten Homologen, sowohl höherer, als auch niederer molarer Masse ausgegeben. In solchen Fällen bedeutet ein hoher Grad der Übereinstimmung zwischen gemessenem und Bibliothekspektrum nur die Zugehörigkeit zu einer homologen Reihe.

Abgesehen von den Verhältnissen bei homologen Reihen bedeutet nach diesem Ergebnis eine Ausgabe mit 90 oder mehr % eine hohe Wahrscheinlichkeit, daß die richtige Masse getroffen wird und der Vorschlag mit gleich hoher Übereinstimmung einfache Stellungsisomere betrifft.

Zur Abschätzung der Wahrscheinlichkeit für die Ausgabe einer Stickstoffverbindung anstatt einer vorliegenden Nichtstickstoffverbindung wird das Ergebnis bei einer Anwendung des PBM-Algorithmus auf fünf verschiedene, nicht stickstoffhaltige, organische Verbindungen betrachtet. Die Ausgabe von nur einer falsch ausgegebenen Stickstoffverbindung von mehr als 24 Vorschlägen zeigt, daß diese Wahrscheinlichkeit klein ist, sofern es sich um den Vorschlag mit der größten Übereinstimmung handelt.

Tabelle 25. Ergebnisse der Anwendung des PBM-Algorithmus auf Originalspektren der Datenbank bis zur Übereinstimmungszahl von 30%

Ausgangsspektrum	MGW	Summenformel	Ergebnis nach PBM-Suche	ÜZ in %
Pyridin, 4-phenyl	155	C ₁₁ H ₉ N	Pyridin, 4-phenyl	97
	155	C ₁₁ H ₆ N	Pyridin, 3-phenyl	50
	155	C ₁₁ H ₉ N	Pyridin, 2-phenyl	40
	297	C ₁₂ H ₁₂ IN	Pyridinium, 1-methyl-2-phenyl-, iodid	40
4,4'-Bipyridin	156	C ₁₀ H ₈ N ₂	4,4'-Bipyridin	97
	156	C ₁₀ H ₈ N ₂	3,3'-Bipyridin	95
	156	C ₁₂ H ₁₂	Benzol, (1,4-Cyclohexadien-1-yl)	80
	156	C ₁₂ H ₁₂	Naphtalen, 1,5-dimethyl	59

	156	C12H12	Naphtalen, 2,7-dimethyl	56
	156	C12H12	Naphtalen, 1,7-dimethyl	56
	156	C12H12	Naphtalen, 1,6-dimethyl	56
	156	C12H12	Naphtalen, 2,6-dimethyl	50
Furo[2,3-b]pyridin, 2-methyl	133	C8H7NO	Furo[2,3-b]pyridin, 2-methyl	91
	133	C7H7N3	1,2,4-Triazolo[4,3-a]pyridin, 3-methyl	64
	133	C7H7N3	1H-Benzotriazol, 1-methyl	50
	133	C8H7NO	1,2-Benzisooxazol, 3-methyl	45
	133	C8H7NO	Furo[2,3-c]pyridin, 2-methyl	42
2-Pyrrolidinon, 1-methyl	99	C5H9NO	2-Pyrrolidinon, 1-methyl	96
	99	C5H9NO	Piperidin, 1-methyl	23
2-Pyrrolidinon	85	C4H7NO	2-Pyrrolidinon	97
	86	C3H6N2O	Ethenamin, N-methyl-N-nitroso	38
Pyrrolidin	71	C4H9N	Pyrrolidin	95
3-Imidazolin(1-N)-3-oxid-1-oxyl, 2,2,4,5,5-pentamethyl	171	C8H15N2O2	3-Imidazolin(1-N)-3-oxid-1-oxyl, 2,2,4,5,5-pentamethyl	98
	171	C8H15N2O2	3-Imidazolin-3-oxid-1-oxyl, 2,2,4,5,5-pentamethyl	37
Pyridin, 4-(1-pyrrolidinyl)-	148	C9H12N2	Pyridin, 4-(1-pyrrolidinyl)-	98
	148	C9H8O2	1,4-Benzoldicarboxaldehyd, 2-methyl	53
	148	C10H12O	Benzaldehyd, 2, 4, 5-trimethyl	53
	148	C8H8N2O	2H-Benzimidazol-2-on, 1,3-dihydro-5-methyl	45
	148	C9H8O2	2-Propenoic acid, 3-phenyl	40
[1,2,4]Triazolo[1,5-a]pyridin 3-methyl	133	C7H7N3	[1,2,4]Triazolo[1,5-a]pyridin, 3-methyl	92
	133	C7H7N3	[1,2,4]Triazolo[4,3-a]pyridin, 3-methyl	50
	133	C8H7NO	1H-Indol-4-ol	47
	133	C8H7NO	Benzoxazol, 2-methyl	47
	133	C8H7NO	1,2-Benzisiooxazol, 3-methyl	42
3-(1-Methyl-3-pyrrolidiny)pyridin	162	C10H14N2	3-(1-Methyl-3-pyrrolidiny)pyridin	94
	162	C10H14N2	4-(1-Methyl-3-pyrrolidiny)pyridin	72
4-Pyridincarboxaldehyd	107	C6H5NO	4-Pyridincarboxaldehyd	96
	107	C6H5NO	3-Pyridincarboxaldehyd	36
1-Benzyl-2-Pyrrolidinon	175	C11H13NO	1-Benzyl-2-Pyrrolidinon	98
2-Pyrrolidinone, 1-methyl-5-(1-methylpyrrol-2-yl)	178	C10H14N2O	2-Pyrrolidinon, 1-methyl-5-(1-methylpyrrol-2-yl)	99
	178	C10H14N2O	2-Pyrrolidinon, 1-methyl-5-(1-methylpyrrol-3-yl)	64
2-Pyrrolidinon, 1-(9-octadecenyl)-	335	C22H41NO	2-Pyrrolidinon, 1-(9-octadecenyl)-	99
	365	C24H47NO	2-Pyrrolidinon, 1-(3,7,11,15 tetramethyl)-	45
Hexatriacontan	506	C36H74	Hexatriacontan	99
	408	C29H60	Nonacosan	87
	492	C35H72	Pentatriacontan	87
	352	C25H52	Pentacosan	83

		Ergebnis	verkürzt dargestellt	
	618	C44H90	Tetratetracontan	90
Dodecan	170	C12H26	Dodecan	96
	198	C14H30	Tetradecan	90
	184	C13H28	Tridecan	86
	352	C35H72	Pentacosan	78
	156	C11H24	Undecan	78
		Ergebnis	verkürzt dargestellt	
Octadecanoic acid, methylester	298	C19H38O2	Octadecanoic acid, methylester	99
	298	C19H38O2	Heptadecanoic acid, 16-methyl, methylester	91
	284	C18H36O2	Cyclopentaneundecanoic acid, methylester	86
	298	C19H38O2	Heptadecanoic acid, 10-methyl, methylester	78
	256	C16HO2	Pentadecanoic acid, methyl ester	56
	159	C10H9NO	2-Naphtalenol, 8-amino	56
Octadecanoic acid	284	C18H36O2	Octadecanoic acid	99
	270	C17H34O2	Hexadecanoic acid	96
	228	C14H28O2	Tetradecanoic acid	64
	242	C15H30O2	Pentadecanoic acid	58
Benzol, 1,4-dimethyl	106	C8H10	Benzol, 1,4-dimethyl	97
	106	C8H10	Benzol, 1,3-dimethyl	91
	106	C8H10	Benzol, 1,2-dimethyl	90
	106	C8H10	Cyclopenten, 1-ethenyl-3-3-methylen	45

9.1.2. Vergleich von zugeordneten Massenspektren einer Abwasserprobe mit selbst aufgenommenen Spektren der betreffenden Verbindung

Zur weiteren Absicherung der Identifizierung wurden Lösungen von Benzothiazol, Caprolactam und 1-Methyl-2-pyrrolidinon gaschromatographisch untersucht und die Aufarbeitungen von Kläranlagenabläufen, in denen diese Stoffe nachgewiesen wurden, nochmals analysiert. Wie Abbildung 22 zeigt, ergaben sich für Benzothiazol und 1-Methyl-2-pyrrolidinon die gleichen Retentionszeiten, wie die im Dioxanextrakt von Probenaufarbeitung E1 eines Kläranlagenauslaufs, (Probenaufarbeitung ist in Tabelle 27 angegeben, Charakterisierung der Probe in Tabelle B7, Anhang B) mit 87% Übereinstimmung als Benzothiazol und mit 83% Übereinstimmung als 1-Methyl-2-pyrrolidinon identifizierten Stoffe. Auch das in Probenaufarbeitung B2 eines Kläranlagenablaufs (Probenaufarbeitung ist in Tabelle 27 angegeben, Charakterisierung der Probe in Tabelle B7, Anhang B) mit 90% Übereinstimmung identifizierte Caprolactam wurde über gleiche Retentionszeiten mit seiner Vergleichssubstanz verifiziert.

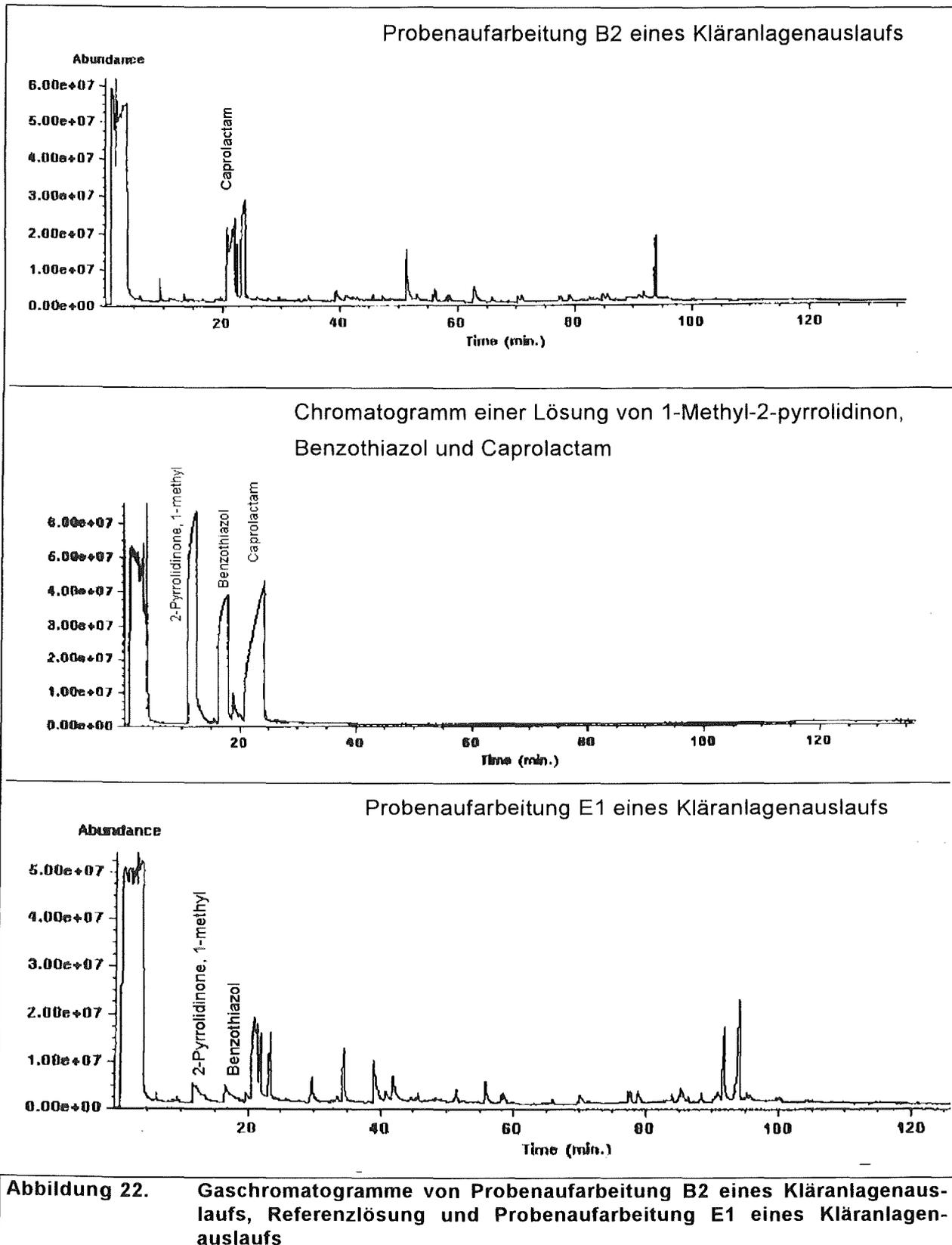
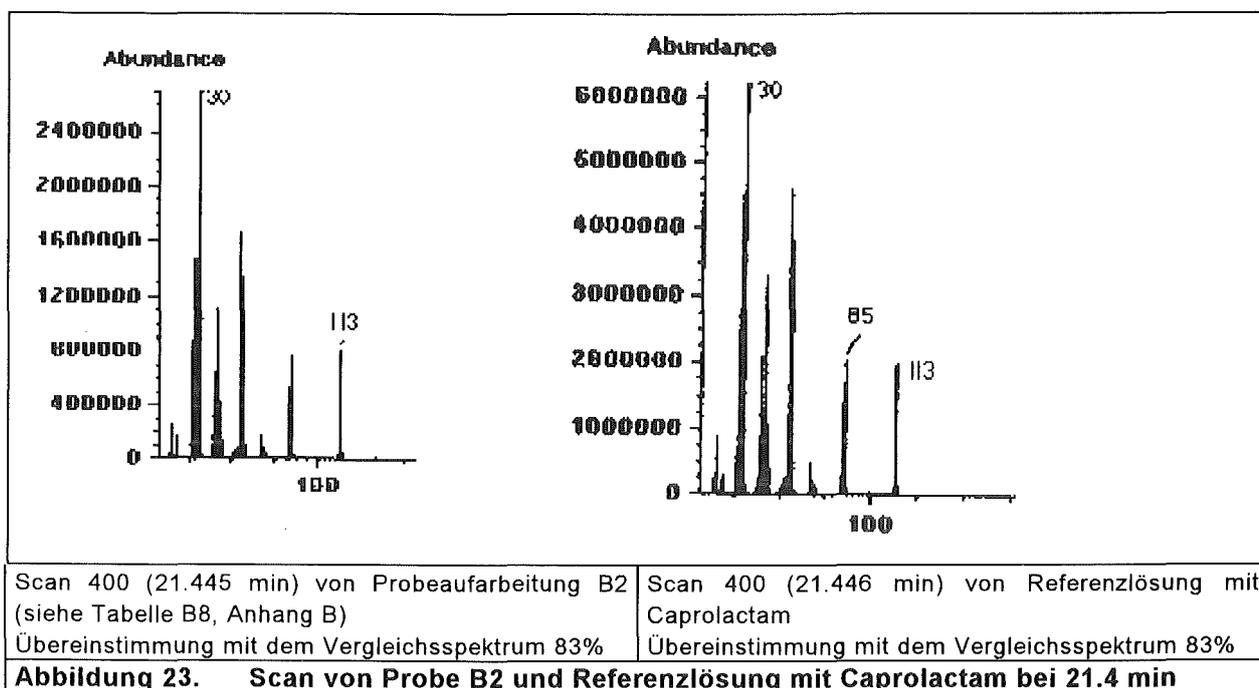


Abbildung 22. Gaschromatogramme von Probenaufarbeitung B2 eines Kläranlagenauslaufs, Referenzlösung und Probenaufarbeitung E1 eines Kläranlagenauslaufs

Auch bei Betrachtung der Ionenspektren identifizierter Stickstoffverbindungen ergeben sich gute Übereinstimmungen, wie die folgende Abbildung 23 für Caprolactam zeigt.



Es zeigt sich, daß mit Caprolactam, das bei der wiederholten Aufnahme der Spektren mit einer Übereinstimmung von 83% ausgegeben wurde, die Ausgabe der richtigen Stickstoffverbindung erfolgte. Das gleiche gilt für Benzothiazol und 1-Methyl-2-pyrrolidinon, die ebenfalls auf Grund der übereinstimmenden Retentionszeiten und Massenspektren (Abbildung B1 und B2, Anhang B) in der Probenaufarbeitung und Vergleichssubstanz verifiziert wurden.

Auffallend ist, daß die Übereinstimmung des Spektrums von Referenzsubstanz mit dem Bibliothekspektrum, wie Tabelle 26 zeigt, in zwei der drei untersuchten Fälle nur geringfügig über 80% liegt. Dies macht deutlich, daß auch bei einer Übereinstimmung von 80% durchaus die richtige Stickstoffverbindung identifiziert werden kann.

Tabelle 26. Ergebnisse der PBM-Suche von Originalspektrum, Probenaufarbeitung und Referenzsubstanz im Vergleich

	Ergebnis der PBM-Suche, Übereinstimmung mit Originalspektrum in %		
	des Bibliothekspektrums	des Spektrums der Probenaufarbeitung	des Spektrums der Vergleichssubstanz
Caprolactam	98	83	83
Benzothiazol	96	91	85
2-Pyrrolidinon, 1-methyl	96	80	81

9.1.3. Vorgehensweise bei der Interpretation der vom Rechner ausgegebenen Übereinstimmungen

Auf Grund der Ergebnisse von Kapitel 9.1 wird davon ausgegangen, daß es sich bei einer Identifizierung mit mindestens 90% Übereinstimmung um die richtige und bei einer Übereinstimmung zwischen 80% und 90% mit sehr großer Wahrscheinlichkeit um die richtige Stickstoffverbindung handelt.

Bei den Stoffen, die mit einer Übereinstimmungszahl zwischen 30 und 80% ausgegeben wurden, ist vermutlich von einer Stickstoffverbindung auszugehen, wenn als Vorschlag mit der höchsten Übereinstimmung eine stickstoffhaltige Verbindung ausgegeben wurde.

Dies ist besonders wahrscheinlich, wenn die vorgeschlagene Stickstoffverbindung eine ungerade Zahl an Stickstoffatomen je Molekül enthält, da diese Stoffe im Gegensatz zu einer Vielzahl nicht stickstoffhaltiger, organischer Stoffe (Voraussetzung: Stoffe sind zusammengesetzt aus C, S, H, O, keine besonderen Verhältnisse, wie z.B. Radikale) eine ungerade Molmasse haben.

9.2. Identifizierung von Stickstoffverbindungen in Kläranlagenabläufen

Die in dieser Arbeit untersuchten Abläufe wurden der Kläranlage Leopoldshafen entnommen, die kommunale Abwässer mechanisch und biologisch reinigt. Während der biologischen Reinigung findet auch eine Nitrifikation statt.

Diese Kläranlagenabläufe wurden zur Identifizierung von Stickstoffverbindungen an Reversed-Phase-Materialien angereichert und die Eluate gaschromatographisch/ massenspektrometrisch analysiert. Die Ergebnisse werden für underivatisierte und derivatisierte Aufarbeitungen getrennt betrachtet.

9.2.1. Identifizierung ohne Derivatisierung

In den unter verschiedenen Bedingungen aufgearbeiteten Proben wurden Stickstoffverbindungen ohne Derivatisierung identifiziert. Dabei unterscheiden sich die Aufarbeitungen im pH-Wert der zur Anreicherung gelangenden filtrierten Probe, in den Reversed-Phase-Materialien, im Aufkonzentrierungsfaktor und in der Wahl der chromatographischen Bedingungen. Ein Überblick über die Anreicherungsbedingungen für die unterschiedlichen Proben gibt Tabelle 27.

Tabelle 27. Anreicherungsbedingungen für verschiedenen Probenaufarbeitungen

Kennzeichen der Anreicherungs-methode	1000 Dalton-Filtration durchgeführt	pH-Wert bei der Anreicherung	Phasenmaterial
U	nein	7.9	RP-C18-/ RP-CH-Phasen
W	ja	7.9	RP-C18/Merck
X	nein	7.9	RP-C18/ Merck
Y	nein	12	RP-C18/Baker
Z	nein	12	RP-CI

Daten zur Charakterisierung der Proben (Datum der Probenahme, DOC, DON, pH-Wert bei Probenahme, Anreicherungs-methode und Konzentrierungsfaktor) befinden sich im Tabelle B7 (Anhang B).

In 10 verschiedenen Probenaufarbeitungen hat das Auswertprogramm als Vorschlag mit der höchsten Übereinstimmung 178 mal Stickstoffverbindungen vorgeschlagen, wobei nur Vorschläge mit einer Übereinstimmung von über 30% mit dem Referenzspektrum gezählt wurden. Diese sind in Tabelle B8 (im Anhang B) aufgeführt.

Abzüglich der Mehrfachvorschläge sind 133 verschiedene Stickstoffverbindungen vorgeschlagen. Über die Sicherheit dieser Vorschläge wird im folgenden diskutiert.

a.) Übereinstimmungszahl größer 90%

Nach den Ergebnissen von Kapitel 9.1 gelten Stickstoffverbindungen, die mit einer Übereinstimmung größer 90% detektiert wurden, als identifiziert. Alle Stickstoffverbindungen, die bei der Detektion in den hier untersuchten Probenaufarbeitungen dieses Kriterium erfüllen, wurden in Tabelle 28 zusammengestellt.

Davon sind die folgenden in mehr als einer Wasserprobe identifiziert:

1. 9-Methyl-acridin
2. 1-Methyl-2-pyrrolidinon
3. N-Butyl-benzolsulfonamid
4. Caprolactam
5. 4-Ethenyl-pyridin
6. N-Ethyl-N-(2-methyl-phenyl)-2-butenamid
7. 4-Methoxy-benzotriazol
8. N,N-Dimethyl-octadecanamid
9. S-(2-Aminoethylester)-thioschwefelsäure

9-Methyl-acridin ist in neun von zehn der untersuchten Probenaufarbeitungen zu identifizieren. Es ist zu berücksichtigen, daß die Probenaufarbeitung, in der dieser Stoff nicht nachzuweisen war, besonders schlechte Wiederfindungsgrade und Konzentrierungsfaktoren aufwies. Dies deutet auf Unterschreitung der Nachweisgrenze hin, die durch die Probenaufarbeitung bedingt ist.

Dieser Stoff scheint damit zur kontinuierlichen Belastung dieser Kläranlage zu gehören.

Tabelle 28. Übereinstimmungszahlen verschiedener Stickstoffverbindungen in %, die mindestens einmal mit einer Übereinstimmungszahl größer 90% identifiziert wurden

Probenaufarbeitung	A1	B1	B2	C1	D1	E1	F1	D2	E2	F2
Anreicherungsmethode	U	W	X	X	Y	Y	Y	Z	Z	Z
Datum der Probenahme	18.8. 1992	16.2. 1993	16.2. 1993	18.2. 1993	10.3. 1993	10.4. 1993	14.4. 1993	10.3. 1993	10.4. 1993	14.4. 1993
Anreicherungsfaktoren in Tausendern	2	20	20	1	4	20	20	4	20	20
1 Ethanon 1H-(1Hindol-3yl)	91									
2 Acridin-9-methyl	91	87, 64	93, 81		95, 83	80	94	90	90	90
3 Benzenamin, 4-(1,1-dimethylethyl), 2,6-dinitro	90									
4 Caprolactam			90		95	87	85			
5 2-Pyrrolidinon-1-methyl			95 90 43		32	92				
6 Dodecanamid, N,N-bis(2-hydroxyethyl)			95, 95							
7 Dodecanamid			91 80							
8 Butenamid,N-ethyl-N-(2-methylphenyl)		30	93		43 83	94	93	59	42	59
9 Benzolsulfonamid,N-butyl					95	43	91	81	81	
10 2-Penten-1-amin,N,N-dimethyl-,(E)					90					
11 Aziridin, 2-methyl-3-(1-methylethyl) trans						94				
12 Heptanamid, 4-ethyl-5-methyl			72			90				
13 Pyridin, 3-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)-,(S)							94			
14 Pyridin, 4-ethenyl							96		38	
15 Octadecenamid, N,N-dimethyl							97	97		
16 Benzotriazol, 4-methoxy-							93		93	
17 Thiosulfuric acid, S(2-aminoethyl)ester								90	90	

9-Methyl-acridin ist aber in keiner der hier vorliegenden Veröffentlichungen genannt. Das kann an den verwendeten Anreicherungsverfahren liegen. Analoge Verhältnisse liegen bei N-Ethyl-N-(2-methyl-phenyl)-2-butenamid vor, das bei der Untersuchung von zehn Probenaufarbeitungen in den acht höherkonzentrierten identifiziert wurde.

Da diese beiden Stoffe nicht in den untersuchten Zuläufen (siehe Kapitel 10.2.) der selben Kläranlage detektiert wurden, ist das ein Hinweis auf eine Bildung während des Klärprozesses. Weiterhin sind beide Stoffe wahrscheinlich keine natürlichen Inhaltsstoffe von Oberflächengewässern, wie die Untersuchungen des Rheines (siehe Kapitel 10.3.) zeigen. Das macht eine Untersuchung dieser Stoffe als Indikatorverbindungen für kommunale Abwässer interessant.

Andere hier identifizierte Stoffe können offensichtlich nur in Abhängigkeit der verwendeten Anreicherungsverfahren detektiert werden. So z.B. 1-Methyl-2-pyrrolidinon, das nur bei Anwendung der Methoden X und Y, identifiziert wurden. Da in beiden Fällen RP-C18-Material (Methode X von Merck (Adsorbex), Methode Y von Baker), Methode U und Z jedoch auch andere Adsorbentien verwenden, ist von einer durch das Phasenmaterial bedingten Anreicherung auszugehen. Das gleiche gilt für 4-Ethyl-5-methyl-heptanamid und Caprolactam. Andere Stoffe, wie N-Ethyl-N-(2-methyl-phenyl)-2-butenamid, N-Butyl-benzolsulfonamid, N,N-Dimethyl-octadecenamid, 4-Methoxy-benzotriazol, S-(2-Amino-ethylester)-thioschwefelsäure und 4-Ethenyl-pyridin werden nach den hier vorliegenden Ergebnissen offensichtlich nur unter den Anreicherungsverfahren Y und Z in einem zur Identifizierung ausreichendem Umfang wiedergefunden.

Die Tatsache, daß diese Stoffe dann bei Anwendung der gleichen Methoden mehrfach nachzuweisen sind, weist darauf hin, daß auch sie regelmäßig in dieser Kläranlage auftreten können.

Dies gilt für Caprolactam, N-Ethyl-N-(2-methyl-phenyl)-2-butenamid und N-Butyl-benzolsulfonamid, die bei Anwendung der gleichen Anreicherungsverfahren Y in drei von drei untersuchten Kläranlagenabläufen zu detektieren sind.

b.) Übereinstimmungszahl zwischen 80 und 90%

Die in Tabelle 29 aufgeführten zehn verschiedenen Stickstoffverbindungen gelten auf Grund ihres Nachweises mit einer Übereinstimmungszahl zwischen 80 und 90% als mit großer Wahrscheinlichkeit identifiziert.

Tabelle 29. Übereinstimmungszahlen verschiedener Stickstoffverbindungen in %, die mindestens einmal mit einer Übereinstimmungszahl zwischen 80 und 90% identifiziert wurden

	Probenaufarbeitung	A1	B1	B2	D1	E1	F1	D2	E2	F2
	Anreicherungsmethode	U	W	X	Y	Y	Y	Z	Z	Z
	Datum der Probenahme	18.8. 1992	16.2. 1993	16.2. 1993	10.3. 1993	10.4. 1993	14.4. 1993	10.3. 1993	10.4. 1993	14.4. 1993
1	2-Phenantrenamin 9,10-dihydro-7-nitro	87								
2	Benzeneacetonitril, alpha.-(benzoyloxy)-4-chloro	83								
3	Piperazin, 3-butyl 2, 5-dimethyl	86								
4	Benzothiazol-3(2H)one 2-methyl-1,1-dioxid	80								
5	Pyridin, 4-[1,1-dimethylethylthio]			80						
6	Formamid,N,N-dioctyl			83						
7	Benzol dicarbocyclic acid, 3-nitro				86					
8	Benzothiazol, thieno-[2,3-c]pyridin				82					
9	Benzothiazol					87		30		
10	Piperidin, 1, 2-trimethyl-, cis							80		

c.) Übereinstimmungszahl zwischen 30 und 80%

Die elf in Tabelle 30 aufgeführten Stoffe wurden bei der Untersuchung in mehreren der zehn Probenaufarbeitungen als Vorschläge mit der höchsten Übereinstimmung von dem Auswertprogramm gemacht und mit einer Übereinstimmung zwischen 30 und 80% ausgegeben. Nach den Ergebnissen von Kapitel 9.1. ist damit vermutlich davon auszugehen, daß es sich um Stickstoffverbindungen handelt, insbesondere, wenn Verbindungen mit einer ungeraden Anzahl an Stickstoffatomen vorgeschlagen wurden. Von diesen Stoffe wurden neun verschiedene bei der Untersuchung mehrerer Kläranlagenabläufen ausgegeben. (Die mit Nummer neun und elf gekennzeichneten Stoffe dieser Tabelle wurden nur in der gleichen Kläranlagenprobe detektiert und deshalb nicht mitgezählt). Sie gehören damit zu 22 verschiedenen Stickstoffverbindungen, die mit einer Übereinstimmung zwischen 30 und 100% mehrmals bei der Untersuchung des Auslaufs ausgegeben wurden.

Tabelle 30. Übereinstimmungszahlen verschiedener Stickstoffverbindungen in %, die bei der Untersuchung von Kläranlagenabläufen mehrmals mit der größten Übereinstimmungszahl, die zwischen 30 und 80% liegt, ausgegeben wurden

	Probenaufarbeitung	A1	B1	B2	C1	D1	E1	F1	D2	E2	F2
	Anreicherungsverfahren	U	W	X	X	Y	Y	Y	Z	Z	Z
	Datum der Probenahme	18.8. 1992	16.2. 1993	16.2. 1993	18.2. 1993	10.3. 1993	10.4. 1993	14.4. 1993	10.3. 1993	10.4. 1993	14.4. 1993
1	Methylamin, N(1-methylhexyliden)					59	59			59	
2	Methacrylamid				49					35	
3	4(1H)-Pteridinon, 2-amino					43			50	43	
4	3-Pentanon, dimethylhydrazon								43		43
5	2,4(1H,3H)-Pyrimidinon, 5-nitro								32		32
6	Phenazoncarbonitril					46	30				
7	2-Piperidinon, 2-amino					43	41				
8	Oxadiazolin-5on, 3-(4-nitrophenyl)								50		50
9	Pyrido[3,2-d]pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion		52	49							
10	1-Propanol, 3-(dimethylamino)		59		64						
11	2(3H)-Benzofuranon, 3-[3-(dimethylamino)-2-propenyl]		38	45							

9.2.2. Vergleich der ausgegebenen Stickstoffverbindungen mit den in anderen Arbeiten identifizierten Stoffen

Vergleicht man die ausgegebenen Stickstoffverbindungen mit denen, die von anderen Autoren als in Kläranlagenausläufen identifiziert angegeben werden, so ergeben sich die in Tabelle 31 genannten Übereinstimmungen.

Die hier genannten Stoffe gehören damit zu dem Spektrum an Stickstoffverbindungen, das auch in anderen Ausläufen von Kläranlagen mit biologischer Reinigungsstufe gefunden wird.

Es wird für Stoffe mit Übereinstimmungszahlen größer 90%, wie auch mit Übereinstimmungszahlen zwischen 30 und 80%, eine Identifizierung durch andere Autoren angegeben.

Prinzipiell kann eine Übereinstimmung kleiner 80% zwei Ursachen haben. Zum einen können geringe Konzentrationen oder andere probenspezifische Faktoren für die schlechte Identifizierung verantwortlich sein, zum anderen kann das Massenspektrum der vor-

liegenden Stickstoffverbindung nicht in der Bibliothek enthalten sein, so daß mit der höchsten Übereinstimmung andere, ähnlich fragmentierende Stoffe ausgegeben werden.

Tabelle 31. Übereinstimmungszahlen von Stickstoffverbindungen, die auch von anderen Autoren identifiziert wurden

	Übereinstimmend ausgegebene Stoffe	ÜZ in % in dieser Arbeit	Autor, der den genannten Stoff auch identifiziert hat	ÜZ in % bei der Identifizierung durch andere Autoren
1	2-Pyrrolidinon, 1-methyl	95,90,43,32, 43	Gulyas [3]	nicht angegeben
2	Heptanamid-4-ethyl-5-methyl	90,72	Elsässer [1]	>80
3	Benzolsulfonamid, N-butyl	95,43,91,81,81	Gulyas [3]	nicht angegeben
4	Benzothiazol	87,30	Gulyas [3]	nicht angegeben
			Legube [10]	nicht angegeben
			Ellis [16]	nicht angegeben
5	Benzolsulfonamid N,N-4-trimethyl	48	Elsässer [1]	> 80
6	2-Amino-4(1H) Pteridinon	43,50,43	Gulyas [3]	nicht angegeben

Die Tatsache, daß das gleiche Auswertprogramm bei Elsässers Untersuchungen die gleichen Stoffe, die in dieser Arbeit mit Übereinstimmungszahlen unter 80% ausgegeben wurden, mit Übereinstimmungszahlen größer 80% ausgab, läßt vermuten, daß auch Übereinstimmungen kleiner als 80% durchaus den richtigen Stoff angeben können.

Beim Vergleich der von anderen Autoren als identifiziert angegebenen Stoffe mit den in dieser Arbeit ausgegebenen Stickstoffverbindungen, sind etwa 30 Nichtübereinstimmungen zu zählen.

9.2.3. Auswirkungen der Anreicherungs-methode auf die Zahl der ausgegebenen Stickstoffverbindungen

Um die Frage nach der erfolgversprechendsten Methode zu beantworten, wird die Anzahl der in einer Probenaufarbeitung identifizierten Stoffe, die in Tabelle 32 zusammengestellt ist, betrachtet.

Die Anzahl der identifizierten Stickstoffverbindungen ist bei einer direkten Anreicherung (Probenaufarbeitung B2) deutlich höher als bei der Untersuchung der gleichen Probe nach Abtrennung des höhermolekularen Anteils über eine Membranfiltration (Probenaufarbeitung B1) (13 bzw. 49; ÜZ>30%).

Tabelle 32. Anzahl der ausgegebenen Stickstoffverbindungen in Abhängigkeit von der Anreicherungsmethode und dem Konzentrierungsfaktor

Probe	Probenauf- arbeitung	Anzahl der ausgegebenen Stickstoffverbindungen mit ÜZ>30%	Anreicherungs- methode	Konzentrierungsfaktor
A	A1	12	U	2000
B	B1	13	W	20000
B	B2	49	X	20000
C	C1	2	X	1000
D	D1	21	Y	4000
D	D2	14	Z	4000
E	E1	36	Y	20000
E	E2	26	Z	20000
F	F1	9	Y	20000
F	F2	9	Z	20000

Vergleicht man die Zahl der Stickstoffverbindungen, die bei der Untersuchung von Proben-
aufarbeitungen mit unterschiedlichen Anreicherungsfaktoren ausgegeben werden (B2 und
C1), so zeigt ein Verhältnis von zwei zu 49 Stoffen bei Faktoren von 1000 und 20000, daß
ein Anreicherungsfaktor von deutlich über 1000 Voraussetzung für eine Identifizierung ist.
Diese Aussage wird zwar dadurch eingeschränkt, daß zwei unterschiedliche Proben
miteinander verglichen werden. Trotzdem ist der Unterschied für verschiedene Proben
nicht so signifikant, wie die folgenden Betrachtungen zeigen.

Das Verhältnis der Anzahl an ausgegebenen Stickstoffverbindungen bei der Untersuchung
unterschiedlicher Abwässer mit gleichen Methode läßt sich für zwei untersuchte Fälle zu
vier bzw. drei berechnen: In verschiedenen Abwässern wurden zum einen 36 bzw. neun
(Probenaufarbeitung E1 bzw. F1), zum anderen 26 bzw. neun (Probenaufarbeitung E2
bzw. F2) Stickstoffverbindungen bei Untersuchung mit jeweils derselben Anreicherungs-
methode ausgegeben.

Die Anreicherung an RP-C18-Phasen von Baker bei pH=12 (Methode Y), führte, wie in
Kapitel 8.2.3. dargestellt, für drei der vier untersuchten Stickstoffverbindungen zu Wieder-
findungsgraden von etwa 100%. Dies ließ eine große Anzahl an detektierbaren Stickstoff-
verbindungen in einer entsprechend aufgearbeiteten Probe erwarten. Beim Vergleich der
Zahlen an ausgegebenen stickstoffhaltigen Verbindungen bei Anreicherung an diesem
Material relativ zur Anreicherung an RP-CI-Material (Methode Z) von 21 zu 14 bzw. 36 zu
26 bzw. 9 zu 9 zeigt, daß die RP-C18-Phasen besser als die RP-CI- Phasen geeignet sind.
Die Anreicherung an den selbstgemischten Kartuschen aus RP-C18- und RP-CH-Material
bei pH=7.9 (Methode U) führte nach den Ergebnissen von Kapitel für zwei Stickstoffver-

bindungen zu Wiederfindungsgraden von ca. 100%. Die Effektivität dieses Materials wurde in dieser Arbeit nur an Hand von Probenaufarbeitungen, die einen Konzentrierungsfaktor von 2000 aufwiesen, untersucht. Diese Anreicherungsmethode, die zumindest einen Teil der höhermolekularen Fraktion, optisch sichtbar als ein brauner Belag, erfaßt, führte zur Detektion von insgesamt 12 verschiedenen Stickstoffverbindungen. Für den relativ zu den meisten anderen Aufarbeitungen kleinen Konzentrierungsfaktor wird eine relativ große Zahl von Verbindungen detektiert. Die Stickstoffverbindungen unterscheiden sich bis auf 9-Methyl-acridin prinzipiell vom Stickstoffspektrum, das bei der Analyse der anderen hier untersuchten Probenaufarbeitungen ausgegeben wurde. Dies zeigt, daß diese Methode zur Anreicherung eines Stickstoffspektrums geeignet ist, das mit den anderen Methoden nicht erfaßt werden konnte. Es könnte sich dabei um Stickstoffverbindungen handeln, die mit dem höhermolekularen Anteil vergesellschaftet sind.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß zur Untersuchung von Stickstoffverbindungen in Kläranlagenausläufen eine Anreicherung an RP-C18-Material von Baker bei pH=12 (Methode Y) und eine Anreicherung an RP-C18-Material von Merck (Adsorbex) bei pH=7.9 (Methode Z) relativ gut geeignet sind. Mit Methode U ist die Anreicherung eines anderen Stickstoffspektrums möglich, das mit Methode W, X, Y und Z nicht erfaßt werden kann. Dabei kann es sich um mit dem höhermolekularen Anteil vergesellschaftete Stickstoffverbindungen handeln. Als wesentliche Voraussetzung für die Identifizierung von Stickstoffverbindungen hat sich ein Anreicherungsfaktor von etwa 5000-20000 je nach Einzelstoff und Anreicherungsmethode ergeben.

9.2.4. Einfluß der gaschromatographischen Bedingungen auf den Detektionsgrad von Stickstoffverbindungen in den hier hergestellten Probenaufarbeitungen

Zur Frage, welchen Einfluß die Auswahl der gaschromatographischen Bedingungen auf die Identifizierbarkeit einzelner Stoffe hat, werden die Ergebnisse der Analyse von Probenaufarbeitung D1 verglichen, dargestellt in Tabelle 33, die unter drei unterschiedlichen chromatographischen Bedingungen erzielt wurden. Die Unterschiede liegen neben Differenzen im Temperaturprogramm vor allem in der Wahl des Säulenmaterials. Dieses besteht bei Versuchsdurchführung 3 aus zwei gekoppelten Säulen mit HP-1-Material und DB-17-Material, bei Versuchsdurchführung 4 aus HP-5-Material und bei Versuchsdurchführung 5 aus Carbowax-Material.

Es zeigt sich, daß von 20 ausgegebenen Stoffen nur zwei, nämlich 9-Methyl-acridin und 2-N-Ethyl-N-(2-methyl-phenyl)-2-butenamid bei Untersuchung mit zwei unterschiedlichen Säulenmaterialien nachweisbar sind. Alle anderen werden nur bei der Verwendung eines Säulenmaterials ausgegeben. Die Identifizierbarkeit der meisten Stoffe hängt damit von der Wahl der geeigneten Säulenmaterialien ab. Die Verwendung von Säulenmaterialien, die in der Literatur vorgeschlagen wurden (Kapitel 5.2.) und in Bezug auf ihre Trenneigenschaften einer HP-1 bzw. einer HP-5 entsprechen, führte nur zu einer geringen Zahl an ausgegebenen Stickstoffverbindungen.

Tabelle 33. Detektierte Stickstoffverbindungen in Probenaufarbeitung D1 in Abhängigkeit von den gaschromatographischen Bedingungen

	Stickstoffverbindung	ÜZ in %	Chromatographischen Bedingungen, dargestellt im Anhang A, A.10
1	Acetamid, (N-6-phenylhexyl)-	35	3
2	Methylamin, N(1-methylhexyliden)	59	3
3	Benzensulfonamid,N-butyl	95	4
4	2-Pyrrolidinon, 1-methyl	32	4
5	Acridin, 9-methyl	83	4
		95	5
6	2-Butenamid, N-ethyl-N-(2-methylphenyl)	43	4
		83	5
7	2-Piperidinon, 1-methyl	47	5
8	o-Toluamid, .alpha.-1-cyclohexen-1-yl	35	5
9	Phenazincarbonitril	46	5
10	Benzoldicarboxylic acid, 3-nitro	86	4
11	Caprolactam	95	4
12	Benzothiazol, thieno-[2,3-c]pyridin	82	4
13	Benzamid,N,N-diethyl-3methyl	52	4
14	4(1H)-Pteridinon, 2-amino	43	4
15	2(2-Carbovinyl)pyridin, trans	35	4
16	Acetamid, N.(4-aminophenyl)-N-methyl	32	4
17	Thiazol, 2,5-diethyl	30	4
18	2-Penten-1-amin,N,N-dimethyl-, (E)	90	4
19	Pyridin, (3,4-dihydro-2H-pyrrol-5-yl)	43	4
20	Benzonitril, 2,4-dimethoxy	30	4

Betrachtet man alle identifizierten Stickstoffverbindungen, die mit einer gaschromatographischen Methode analysiert wurden, dargestellt in Tabelle 34, so zeigt sich, daß die gaschromatographischen Bedingungen von Methode 4, 5, 6 auf Grund der großen Anzahl

der detektierten Stoffe von 47, 56 bzw. 36, der insgesamt 178 detektierten Stoffe, gut zur gaschromatographischen Trennung der aufgearbeiteten Proben geeignet sind.

Da Mehrfachdetektionen der gleichen Stoffe in gleichen Probenaufarbeitungen (wie für 9-Methyl-acridin, in Tabelle 28) bei unterschiedlichen gaschromatographischen Bedingungen nur in 22 von 178 Fällen (Tabelle 28, 29 und 30) auftraten, ist die Wahl der richtigen gaschromatographischen Bedingungen und damit vor allem die Wahl des Säulenmaterials Voraussetzung für eine Detektion der Stickstoffverbindungen.

Tabelle 34. Anzahl der detektierten Stickstoffverbindungen in Abhängigkeit von den chromatographischen Bedingungen

Methodennummer	Zahl der detektierten Stickstoffverbindungen	Injektionsmethode	Säulenmaterial
1	4	Cool-on-column	DB-17
2	27	Splitless	DB-17
3	8	Splitless	HP-1- und DB-17-
4	47	Splitless	HP-5
5	55	Splitless	Carbowax
6	36	Splitless	DB-17
7	6	Splitless	HP-1- und DB-17-

Als weitere Injektionsmethode, wurde die Cool-on-column-Methode auf ihre Vorteile zur Detektion der angereicherten Stickstoffverbindungen in Methode 1 untersucht. Diese Injektionsart ist vor allem zur Detektion zersetzlicher Probenbestandteile geeignet, die auf Grund der relativ niedrigen Injektionstemperatur von 30-50°C (Splitless-Injektion: 200-280°C) zur Detektion thermolabiler Verbindungen eingesetzt wird. Diese können so ohne Zersetzung die Injektion überstehen und analysiert werden. Diese Methode hat bei der Identifizierung der hier untersuchten Stoffe, wie der Detektionsgrad von vier Stoffen (Tabelle 34) zeigt, keine Vorteile. Da das Injektionsvolumen bei der Injektion auf 1 µl beschränkt ist (Splitless-Injektion maximal 5 µl) und keine Möglichkeit zur Abtrennung des Lösungsmittels und einer dadurch resultierenden Aufkonzentrierung der Probenbestandteile, wie bei der Splitless-Injektion besteht (Abtrennung des Lösungsmittel durch das Purge-Ventil), setzt diese Injektionsart die Nachweisgrenze herab. Dies schlägt sich in diesem Fall offensichtlich in der geringen Anzahl identifizierter Stoffe nieder.

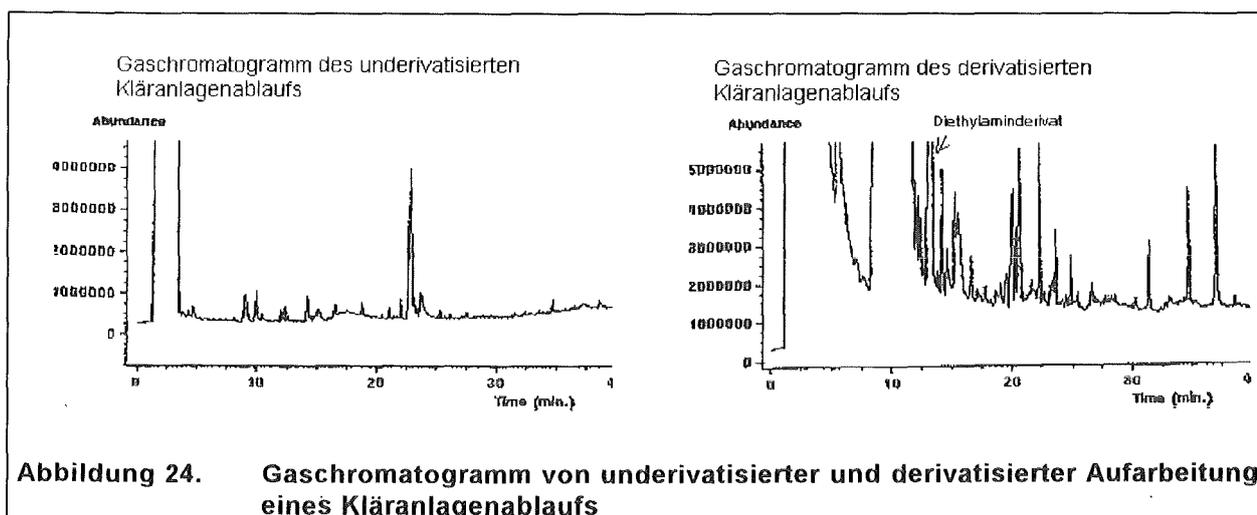
Zusammenfassend ist zu sagen, daß zur Identifizierung der hier angereicherten Stickstoffverbindungen die Verwendung eines einzigen Säulenmaterials nicht ausreichend ist. DB-17-Material ist zwar am besten geeignet. Trotzdem wurden bei dessen Verwendung nur etwa 1/3 der insgesamt ausgegebenen Stickstoffverbindungen detektiert. Das Cool-on-column-Injektionssystem ist schlechter geeignet als das Splitless-Injektionssystem.

9.2.5. Identifizierung als Dinitrophenylderivate

Die Wiederfindungsgrade von Versuch 8.2.3. für basische, mit Dinitrofluorbenzol (DNFB) derivatisierbare Stickstoffverbindungen zeigen, daß für die meisten basischen Stickstoffverbindungen unter den gewählten Bedingungen eine quantitative Anreicherung aus Kläranlagenabläufen sichergestellt ist. Die ausgearbeitete Methode wurde in den folgenden Versuchen zur Identifizierung von basischen Stickstoffverbindungen in Kläranlagenabläufen eingesetzt.

Versuchsdurchführung:

Es wurden 2 mal 10 Liter Kläranlagenablauf (DON 2,1 mg/l bzw. 2.7 mg/l \pm 0.6 mg/l, TKN=5.3 mg/l bzw. 5.3 mg/l \pm 0.2 mg/l) nach einer 0.45 μ m Filtration unter den Versuchsbedingungen von 8.2.3. an 10 RP-C18-Phasen von Baker angereichert. Beide Hälften der aus 10 Liter Kläranlagenablauf aufgearbeiteten Proben wurden auf etwa 100 μ l eingengt und gaschromatographisch/ massenspektrometrisch analysiert.



Beim Vergleich der Chromatogramme in Abbildung 24 von derivatisierter zur underivatisierten Probenaufarbeitung zeigt sich, daß in beiden Chromatogrammen Peaks mit gleichen Retentionszeiten auftreten. Da diese in allen Fällen die gleichen Massenspektren aufwiesen, muß es sich um nicht derivatisierte organische Inhaltsstoffe der Probenaufarbeitungen handeln. Andere Peaks treten zusätzlich zu diesen Peaks in der derivatisierten Probe auf. Im Falle der zusätzlich auftretenden Peaks sollte es sich um Derivate von DNFB mit Probeninhaltsstoffen handeln. Durch den Vergleich mit der Spektrenbibliothek, die Derivate von allen in Kapitel 5, Tabelle 10 erwähnten

Stickstoffverbindungen enthält, ist das Derivat des internen Standards und das Derivat des Ammoniaks identifizierbar.

Die Spektren aller anderen Peaks haben Fragmente, für deren Ausgangsverbindungen durch Subtraktion von 167 (Masse von Dinitrophenyl) vom größten Massenpeak Massen über 130 berechnet werden. Das bedeutet, daß es sich nicht um niedere, aliphatische Amine handelt, wie 2-Aminopropan, 1-Aminobutan, 1-Aminohexan und Dibutylamin. Die Nachweisgrenze liegt dabei für Diethylamin deutlich unter 1 µg/ Liter. Auch eine Suche nach diesen Verbindungen über das für viele aliphatische Amine charakteristische Fragment 210 im SIM-Modus war erfolglos.

Niedere aliphatische Amine und Pyrrolidin, die als Abbauprodukte des biologischen Eiweißabbaues gebildet werden, scheinen nicht vorzuliegen.

Auch Scully konnte in zwei von drei untersuchten Kläranlagenabläufen mit biologischer Reinigungsstufe keine der oben genannten, flüchtigen Amine nachweisen, wobei seine Nachweisgrenze bei etwa 2 µg/l lag [12]. Der TKN betrug in den Proben von Scully etwa 2.2 mg/l. Daraus ergibt sich mit einem NH₃-Gehalt von ca. 0.6 mg/l, in etwa der gleiche Gehalt an stickstofforganischer Gesamtbelastung (DON) von 1.6 mg/l wie in der hier untersuchten Probe (DON=2.1 mg/l±0.6 mg/l bzw. DON=2.7 mg/l±0.9 mg/l, TKN=5.3 mg/l±0.2 mg/l). Ein Verlust dieser Stoffe durch die Probenaufarbeitung ist unwahrscheinlich, da in den Versuchen zur Bestimmung der Wiederfindungsgrade von Kapitel 8.2.3. für Isopropylamin und Pyrrolidin ein Wiederfindungsgrad von fast 100% gemessen wurde und auch Scully Wiederfindungsgrade von fast 50% erreicht.

Deshalb kann man vermuten, daß die niederen aliphatischen Amine, sowie Pyrrolidin in biologisch gereinigten Kläranlagenabläufen bei weitgehenden Abbaugraden in Konzentrationen über 1 µg/l nicht vorliegen.

Für die Stoffe, die aus Ausgangsverbindungen einer Molmasse größer als 130 gebildet werden, ist eine Identifizierung allein mit Hilfe der Molekülmasse schwierig, da die Anzahl der Isomeren sehr groß ist.

So gibt es bei einer Molekülmasse von 127 mindestens 25 Stickstoffverbindungen mit gleicher molarer Masse, die als Ausgangsverbindung in Frage kommen. Deshalb wurde versucht, aus den ohne Derivatisierung identifizierten Stickstoffverbindungen und Alkoholen, (die ebenfalls mit Dinitroflourbenzol reagieren können), Stoffe mit einer Molmasse zu finden, die bei einer Derivatisierung Produkte mit nachgewiesenen Molmassen bilden. Dies gelang jedoch auch nicht unter Betrachtung aller Verbindungen, die in dieser Probenaufarbeitung unter den unterschiedlichsten chromatographischen Bedingungen identifiziert wurden. Welcher Natur die Stoffe sind, ließ sich aus den Untersuchungen nicht sagen.

9.3. Zusammenfassung

Zur Identifizierung wurden in der vorliegenden Arbeit drei Verfahren angewendet. Der Vergleich von Spektren mit einer Referenzbibliothek über den PBM-Algorithmus, die Anwendung eines Derivatisierungsmittels und der Vergleich von Retentionszeiten und Massenspektren mit Referenzmaterialien.

Für den PBM-Algorithmus ließ sich zeigen, daß bei einer Übereinstimmung von über 90% mit dem Vergleichsspektrum von einer sicheren Identifizierung auszugehen ist. Da die Übereinstimmung von analysiertem Vergleichsspektrum mit der Spektrenbibliothek in zwei von drei untersuchten Fällen nur etwas über 80% betrug, werden Identifizierungen mit einer Übereinstimmung zwischen 80 und 90% als mit großer Wahrscheinlichkeit sicher eingestuft. Bei den Stickstoffverbindungen, für die bei Untersuchung der Probenaufarbeitungen von Kläranlagenabläufen Übereinstimmungszahlen zwischen 30 und 80% ausgegeben wurden, handelt es sich vermutlich um Stickstoffverbindungen, wenn diese mit der höchsten Übereinstimmungszahl ausgegeben wurden. Dies gilt insbesondere für ausgegebene Stoffe mit einer ungeraden Zahl an Stickstoffatomen, da diese sich durch ihre ungerade Molmasse und daraus resultierenden spezifischen Molmassenpeaks, von einer Vielzahl organischer Stoffe mit meist gerader Molmasse unterscheiden. Besteht ein organisches Molekül nur aus Sauerstoff, Kohlenstoff, Wasserstoff und Schwefel, so hat es, wenn keine besonderen Umstände, wie z.B. Radikale, vorliegen, eine geradzahlige Molmasse.

Zur weiteren Absicherung der Identifizierungsergebnisse wurden Referenzsubstanzen von Caprolactam, 1-Methyl-2-pyrrolidinon und Benzothiazol gaschromatographisch untersucht. Dabei wurden mit den Originalproben übereinstimmende Spektren und gleiche Retentionszeiten aufgezeichnet. Keiner der drei hier untersuchten Stoffe, für die sich bei der Untersuchung der Originalprobe Übereinstimmungszahlen zwischen 80 und 90% ergaben, wurde falsch identifiziert.

Bei der Anwendung des PBM-Algorithmus im Rahmen der Untersuchung von biologisch gereinigten Kläranlagenabläufen wurden als Vorschläge mit der höchsten Übereinstimmungszahl (ÜZ mindestens 30%) 133 verschiedene Stickstoffverbindungen gemacht. Davon gelten 17 Stoffe auf Grund ihrer Übereinstimmung mit der Referenzspektren von über 90% als sicher, weitere zehn Stickstoffverbindungen mit einer Übereinstimmung zwischen 80 und 90% als mit großer Wahrscheinlichkeit identifiziert. Sechs Stoffe wurden übereinstimmend mit anderen Autoren ausgegeben.

Insgesamt wurden 22 Stickstoffverbindungen mit einer Übereinstimmung zwischen 30 und 100% mehrfach ausgegeben. Davon gelten zehn als sicher identifiziert.

In neun von zehn Probenaufarbeitungen und damit am häufigsten wurde 9-Methyl-acridin nachgewiesen. Ethyl-N-(2-methyl-phenyl)-2-butenamid war in acht von zehn untersuchten Proben zu detektieren. Außer diesen beiden wurden die folgenden Stickstoffverbindungen mehrmals ausgegeben: Caprolactam, N-Butyl-benzolsulfonamid, 1-Methyl-2-pyrrolidinon, 4-Ethyl-5-methyl-heptanamid, 4-Ethenyl-pyridin, N,N-Dimethyl-octadecenamid, 4-Methoxy-benzotriazol, Benzothiazol und S-(2-Aminoethylester)-thioschwefelsäure. Von diesen Stoffen wurden 1-Methyl-2-pyrrolidinon, N-Butyl-benzolsulfonamid, 4-Ethyl-5-methyl-heptanamid und Benzothiazol auch durch andere Autoren nachgewiesen, so daß man für diese Stoffe eine allgemeine Präsenz in Kläranlagenabläufen vermuten kann.

Als gute Methoden in Hinblick auf die Detektion einer möglichst großen Zahl von Stickstoffverbindungen wurde die Anreicherung bei pH=12 unter Verwendung von RP-C18-Material von Baker (Methode Y) und die Anreicherung bei pH=7.9 an RP-C18-Material von Merck (Adsorbex) (Methode X) bestimmt. Eine Anreicherung an gemischtem Material (Cyclohexyl und RP-C18) bei pH=7.9 (Methode U), führt zumindest zum Teil zu einer Anreicherung des höhermolekularen Anteils. Dies könnte die Ursache dafür sein, daß diese Methode auch zur Anreicherung von Stickstoffverbindungen geeignet ist, die mit Methode W, X, Y und Z nicht detektiert wurden.

Als wesentliche Voraussetzung hat sich, übereinstimmend mit der Abschätzung eines Anreicherungsfaktors von 10000 in Kapitel 3, ein Anreicherungsfaktor von etwa 5000-20000 je nach Einzelstoff und Anreicherungsmethode ergeben.

Zur Untersuchung der hier angereicherten Stickstoffverbindungen war die gaschromatographische Trennung an mindestens drei verschiedenen Säulenmaterialien erforderlich. Die Untersuchung der unter Verwendung von Carbowax-Material erhaltenen Chromatogramme führte zur Ausgabe der meisten Stickstoffverbindungen.

Mit Hilfe der Cool-on-column-Injektion war nur eine sehr geringe Anzahl an Stickstoffverbindungen detektierbar. Weiterhin führte diese Injektionsmethode zu geringeren Nachweisgrenzen. Sie scheint hier keinen Vorteil zu haben.

Primäre und sekundäre Amine wurden getrennt untersucht, da zur ihrer Detektion eine Derivatisierung notwendig ist. Weil derartige Verbindungen als Abbauprodukte von Eiweißen bekannt sind, wurde erwartet, daß sie in biologisch gereinigten Kläranlagenabläufen nachweisbar sind. Versuche zeigten, daß sich mit DNFB umgesetzte Modellverbindungen in Kläranlagenabläufen nachweisen lassen. Auf Grund der Ergebnisse der vorangegangenen Versuche konnte gezeigt werden, daß in biologisch gereinigten Kläran-

lagenabläufen kleine Stickstoffverbindungen mit niederer molarer Masse nicht gefunden werden. Da diese Stoffe nach dem heutigen Stand des Wissens gut abbaubar sind, ist auch ein vollständiger Abbau in einer Kläranlage mit biologischer Reinigungsstufe möglich. Es zeigte sich aber, daß Stickstoffverbindungen mit Molekulargewichten größer 130 g/mol anwesend sein müssen, deren Natur nicht aufgeklärt werden konnte.

10. Bedeutung der identifizierten Stickstoffverbindungen

Die Bedeutung von Inhaltsstoffen in Ausläufen kommunaler Kläranlagen, die einen nicht zu vernachlässigenden Eintrag in die Oberflächengewässer darstellen, hängt von folgenden Punkten ab:

- 1.) Wie häufig kommen die identifizierten Stoffe in den Abläufen vor?
- 2.) Stammen die Stoffe aus anthropogenen Quellen oder sind sie Produkte des natürlichen Stoffkreislaufes?
- 3.) Sind die Stoffe biologisch bzw. chemisch schlecht abbaubar und bei schlechter Abbaubarkeit bedeutend für das aquatische System?
- 4.) Sind die Stoffe toxisch bzw. nicht toxisch ?
- 5.) In welchen Konzentrationen kommen die Stoffe vor ?

10.1. Wie häufig kommen die identifizierten Stoffe in Abläufen vor?

Punkt 1 wurde in Kapitel 9 eingehend diskutiert.

10.2. Stammen die Stoffe aus anthropogenen Quellen oder sind sie Produkte des natürlichen Stoffkreislaufes?

Um aufzuklären, ob die nachgewiesenen Stickstoffverbindungen schon im Zulauf der Kläranlage vorliegen oder ob sie erst in der Kläranlage gebildet werden, wurde der Zulauf der Kläranlage Leopoldshafen untersucht. Dabei wurden die gleichen Analysemethoden, wie für die Probe B1 (Kläranlagenauslauf) angewendet, also der Zulauf vor der Anreicherung auch 1000 Dalton filtriert.

Es wurden, wie Tabelle 35 zeigt, (S)-3-(1-Methyl-2-pyrrolidinyl)-pyridin, N,N-bis-(2-Hydroxyethyl)-dodecanamid und N-Methyl-N'-phenyl-thioharnstoff auf Grund ihrer Übereinstimmung mit dem Referenzspektrum größer als 90% sicher identifiziert. Dodecanamid, 4,5-Dihydro-2-methyl-thiazol und N,N-Dimethyl-dodecanamid wurden mit hoher Wahrscheinlichkeit in diesem Kläranlagenablauf nachgewiesen.

Tabelle 35. Detektierte Stickstoffverbindungen im Zulauf der Kläranlage, aufgearbeitet analog zur Auslaufprobe B1 mit biologischer Reinigungsstufe, Datum der Probenahme 16.2.93, DOC= 67.5 mg/l \pm 0.2 mg/l, DON= 7.0 mg/l \pm 1.5 mg/l

Stoff	Ü	Eluent	ÜZ[%]	Chr
Übereinstimmungszahl > 90%				
Pyridin, 3-(1-methyl-2-pyrrolidiny)-, (s)	F1(94)	M	94	3
Dodecanamid, N, N-bis(2-hydroxyethyl)	B2 (95)	M	91	4
			83	3
Thioharnstoff, N-methyl-N'-phenyl	D2(90), E2(90)	D	93	4
Übereinstimmungszahl 80 < ÜZ < 90				
Dodecanamid	B2(91)	M	81	4
Thiazol, 4, 5-dihydro-2-methyl	F1(30)	M	80	3
Dodecanamid, N,N-dimethyl		D	81	4
Übereinstimmungszahl 30 < ÜZ < 80				
Thiazolidin	B1(53)	M	59	4
Thiazol, 4-ethyl-2-propyl	B2(58)	M	50	4
Acetamid, 2-methoxy-N-(2-methoxyethyl)		M	47	3
1H-Indol-4-ol		D	50	4
Benzo[g]pteridin-2,4(3H,10H)-dion,8-hydroxy		D	18	4
2-Imidazolidinethion		D	47	4
1H-Pyrrol, 2, 4-diphenyl		D	36	4
6H-Purin-6-one, 1,7-dihydro-2-(methylamino)-		D	42	4
Pyridin 1,2,3,6-terahydro-1-nitroso-		D	30	4
4-Bromo-3-chloranilin		D	54	4
Benzothiazol, 2-methyl		H	64	3

"ÜZ [%]": Übereinstimmungszahl nach Anwendung des PBM-Algorithmus

"Eluenten" : "M" = Methanol, "D" = Dioxan, "H" = Hexan

"Chr" : Chromatographische Bedingungen nach Liste A10, Anhang A

"Ü": Übereinstimmende Identifizierung im Ablauf: Buchstabe kennzeichnet Probenaufarbeitung nach Tabelle B7, Anhang B, Zahl gibt die dort erreichte Übereinstimmungszahl in Prozent an

Sowohl im Zulauf, wie auch im Ablauf wurden folgende Stoffe identifiziert:

1. 3-(1-Methyl-2-pyrrolidiny)-, (S)-pyridin
2. N,N-bis(2-Hydroxyethyl)-dodecanamid
3. N-Methyl-N'-phenyl-thioharnstoff
4. Dodecanamid
5. 4,5-Dihydro-2-methyl-thiazol
6. 4-Ethyl-2-propyl-thiazol
7. Thiazolidin

Die Identifizierung von 4-Ethyl-2-propyl-thiazol und Thiazolidin ist nicht sicher. Da das Auswertprogramm bei der Festlegung der Übereinstimmung ähnliche Zahlen für Zu- und

Ablauf (Thiazolidin: 59% bzw. 53%, 4-Ethyl-2-propyl-thiazol: 50% bzw. 58%) aus gibt, ist aber anzunehmen, daß es sich um die gleichen Stoffe handelt.

Die genannten Stoffe sind entweder anthropogener Herkunft oder wurden im Kanalnetz gebildet.

Dagegen ist die Tatsache, daß 9-Methyl-acridin und N-Ethyl-N-(2-methylphenyl)-2-butenamid zwar im Auslauf, aber nicht im Zulauf detektiert wurden, ein Hinweis auf die Bildung in der Kläranlage und auf eine mögliche Funktion dieser Verbindungen als Indikatorstoff für Kläranlagenausläufe.

Von den in dieser Arbeit identifizierten Stoffen ist 1-Methyl-2-pyrrolidinon auf der VCI-Altstoffliste aufgeführt, d.h. von dieser Verbindung wurde im Jahre 1985 mehr als 10 Tonnen produziert bzw. aus den Staaten außerhalb der EG eingeführt. Für diesen Stoff ist damit eine anthropogen verursachte Herkunft möglich. Auch für Caprolactam, als Monomeres des vielseitig verwendeten Nylons kann ein anthropogener Eintrag angenommen werden.

Auffallend ist, daß 24 der Stoffe, die bei der Untersuchung des Ablaufs identifiziert bzw. von der Auswertsoftware ausgegeben wurden, Amide sind.

Man kann vermuten, daß ein größerer Teil anthropogener Natur ist. Allein in der VCI-Altstoffliste kommen 12 verschiedene Amide vor. Diese sind in vielen Fällen aus den gleichen Säuren jedoch anders substituierten Stickstoffverbindungen zusammengesetzt als die in dieser Arbeit identifizierten Stoffe. Da Dodecanamid und N,N-bis-(2-Hydroxyethyl)-dodecanamid auch im Zulauf schon identifiziert wurden, liegt für diese Stoffe eine anthropogene Herkunft nahe. Im Falle des letztgenannten Amids ist das Vorkommen als Inhaltsstoff von Waschmitteln bekannt [44]. Für die Stoffklasse der Amide gibt es damit viele Möglichkeiten einer anthropogenen Herkunft.

Eine mögliche Quelle für die im Abwasser nachgewiesenen Thiazolderivate sind organische Haushaltsabfälle, da sie Bestandteil vieler Nahrungsmittel sind. So ist z.B. 2-Isobutylthiazol wesentlicher Aromastoff der Tomate [45]. Thiazol selbst ist, wie auch Pyrimidin Baustein von Vitamin B1, dem Thiamin. Für Naturstoffe, wie 4-Ethyl-2-propylthiazol, die als Produkte des natürlichen Stickstoffkreislaufs zu verstehen sind, kann aber auch eine Neubildung während des Klärprozesses nicht ausgeschlossen werden.

10.3. Sind die Stoffe biologisch bzw. chemisch schlecht abbaubar und bei schlechter Abbaubarkeit bedeutend für das aquatische System?

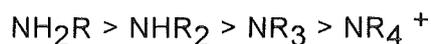
Die Detektion der 24 verschiedenen N-substituierten Amide im Kläranlagenablauf, dargestellt in Tabelle 36, davon sieben mit einer Übereinstimmungszahl größer 90% sicher und eines mit großer Übereinstimmung ($80\% \leq \text{ÜZ} < 90\%$) identifiziert, zeigt, daß diese Stoffgruppe in der Kläranlage schlecht biologisch abbaubar ist. Untersuchungen haben auch gezeigt, daß Amide bei der Ozonung sehr stabil sind [46].

Damit sind Amide Stoffe, die sich einer sekundären Abwasserbehandlung (biologischer Abbau) und manchen Methoden der tertiären Abwasserbehandlung zumindest teilweise entziehen.

Die biologische Abbaubarkeit für C18-Fettsäurediethanolamide und damit für das hier in Zu- und Ablauf identifizierte N,N-bis-(2-Hydroxyethyl)-dodecanamid wird mit 74% angegeben [44]. Dies reicht in der hier untersuchten Kläranlage anscheinend nicht für einen vollständigen Abbau aus.

Dies hat vor allem deshalb große Bedeutung, weil die Mikroorganismen in der Kläranlage durch die ständige Rückführung des Klärschlammes ausreichend Gelegenheit zur Adaption an dieses Substrat haben. In der aquatischen Umwelt ist ein noch langsamerer Abbau zu erwarten, da die Mikroorganismen an dieses anthropogen verursachte Substrat nicht adaptiert sind.

Die biochemische Abbaubarkeit der Amide nimmt in der Reihenfolge



ab, wie Pitter und Lischke [47] ausführen. Betrachtet man die Amide als zur Stoffgruppe der Amine gehörend und überträgt diese Reihenfolge auf diese Stoffgruppe, so ist folgende Reihenfolge der biologischen Abbaubarkeit zu erwarten:



Man könnte vermuten, daß die Anzahl der nachweisbaren Amide in dieser Reihenfolge zunimmt, was aber nicht der Fall ist.

Tabelle 36. Bei der Untersuchung von Kläranlagenablauf ausgegebene Amide

Amid		Probenaufarbeitung, (ÜZ in %)
Übereinstimmungszahl > 90%		
1	Caprolactam	B2 (90), D1 (95), E1 (87), F1 (85)
2	Dodecanamid, N,N-bis(2-hydroxyethyl)	B2 (95)
3	Dodecanamid	B2 (91)
4	Butenamid, N-ethyl-N-(2-methylphenyl)	B1 (30), B2 (93), D1 (83), E1 (94), F1 (93), D2 (59), E2 (42), F2 (59)
5	Benzolsulfonamid, N-butyl	D1 (95), E1 (43), F1 (91), D2 (81), E2 (81)
6	Heptanamid, 4-ethyl-5-methyl	B2 (72), E1 (90)
7	Octadecenamid, N,N-dimethyl	F1 (97), D2 (97)
Übereinstimmungszahl 80% ≤ ÜZ < 90%		
1	Formamid, N, N-dioctyl	B2 (83)
Übereinstimmungszahl 30% ≤ ÜZ < 80%		
1	Acetamid-2,2-dichloro	B1 (70)
2	Formamid-N-ethyl-N-phenyl	B1 (50)
3	Hexadecanamid	B2 (64)
4	Acetamid-[4- (trimethylsilyl)phenyl]	B2 (47)
5	Propandiamid, 2,2-diethyl-N,N,N',N'-tetramethyl	B2 (47)
6	Methacrylamid	C1 (49), E1 (38)
7	Acetamid, N-6-phenylhexyl	D1 (35)
8	o-Toluamid, .alpha.-1-cyclohexen-1-yl	D1 35)
9	Benzamid, N,N-diethyl-3-methyl	D1 (52)
10	Acetamid, N.- (4-aminophenyl)N-methyl	D1 (32)
11	Acetamid	E1 (35)
12	Acatamid, N -(aminocoarbonyl)	E1 (64)
13	Benzosulfonamid, N, N,4-trimethyl	E1 (48)
14	Propandiamid	E1 (38)
15	Benzamid, 2-methyl	E2 (35)
16	Propanamid, N-acetyl	E2 (38)

Auch Heterozyklen, die vor allem mit mehreren Heteroatomen in großer Zahl identifiziert wurden, sind mit steigender Anzahl der Heteroatome schlecht biologisch abbaubar [47]. Dies bedeutet, daß auch für die vielen Thiazolderivate ein unzureichender biologischer Abbau zu vermuten ist.

Die Vermutung, daß die genannten Stoffe schlecht abbaubar sind, wurde hier abgeleitet aus ihrem Auftreten in biologisch gereinigten Abläufen. Wenn das richtig ist, müßten sie sich im Flußwasser nachweisen lassen. Um dies zu überprüfen, wurde Wasser des Rheines untersucht und zwar etwa 5 km unterhalb der Einleitstelle der Kläranlage. Tabelle 37 zeigt die im Rheinwasser identifizierten Stickstoffverbindungen.

Tabelle 37. Im Rheinwasser identifizierte Stickstoffverbindungen, Querschnittsmischprobe, Datum der Probenahme: 9.3.93, DOC=2.7 mg/l \pm 0.2 mg/l, DON= 0.2 mg/l \pm 0.2 mg/l

Stoff		Ü	Eluent	ÜZ[%]	PA	Chr.
Übereinstimmungszahl $\geq 90\%$						
1	Pyridin, 2,3,5 trimethyl		M	93	B2	5
2	Pyridin, 3-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)-, (S)	F1 (94)	M	95	B2	5
3	Dodecanamid, N,N-bis(2-hydroxyethyl)	B2(95)	M	96	B2	5
Übereinstimmungszahl $80\% \leq \text{ÜZ} < 90\%$						
4	Pyridin, 2,6-dimethyl		M	87	B2	5
Übereinstimmungszahl $30\% \leq \text{ÜZ} < 80\%$						
5	7H-Purin-6-amin, 7-methyl		D	59	B1	3
6	Isothiazol, 4-phenyl		D	59	B1	3
7	Methacrylamid	C1(49), E2 (35)	D	64	B1	3
8	Benzothiazol, 2-methyl-		D	60	B1	3
9	3-Benzylquinolin		D	64	B1	3
10	Pentanol, 5-amino-		D	47	B1	3
11	Thiazol, 4-ethyl-2-propyl-	B2(58)	D M	55 60	B1 B2	3 4
12	9-Octadecenamid		M	53	B2	4
13	Ethanol, 2-(dibutylamino)-		M	35	B2	4
14	Pyridin, 3-butyl-, oxide	E1(43)	M	35	B2	4
15	4-Pyridinmethanol, 3-hydroxy-2,5-dimethyl		M	60	B2	4
16	Dimethylamino-6,7-Dihydro-4-oxo-4H-thiazolo[3,2-5]		M	40	B2	4
17	1H-Indol		M	49	B2	4
18	1-Naphtalensulfonsäure, 5-(dimethylamino)		M	64	B2	4
19	Thiazolidin	B2 (53)	M	53	B2	4
20	1-Propanol, 3-(dimethylamino)	B1(59)	M	59	B2	4
21	Nitrofurantoin		M	49	B2	4
22	Thiazol, 2-ethyl-5-methyl		M	64	B2	4
23	Isothiazol, 4-phenyl		D	59	B2	7
24	Benzeneamin, 4-iodo		D	64	B2	7
25	Pyrido[3,2-d]pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion	B2 (49)	D	68	B2	7
26	Piperazin, 1-methyl-4-nitroso		H	58	B2	3
27	[1,2,4]Triazololo[1,5-a]pyridin,2-methyl		H	58	B2	3
28	1,3,4-Thiadiazol-2(3H)-thion, 5-amino		H	58	B2	3
29	Pyridazin, 3,6-dichloro		H	27	B2	3
30	Pyridin, 2,3,6 trimethyl		M	43	B2	5
31	Pyridin, 2,4,6 trimethyl		M	42	B2	5
32	Benz[c]acridin, 7, 10-dimethyl		M	64	B2	5
33	Acetamid, N-(3-hydroxyphenyl)		M	50	B2	5
34	Benzacridin, 1, 5-dimethyl		M	50	B2	5
35	Hydroxylamin, o-decyl		M	38	B2	5
36	Aspidospermidin-17-ol, 1-acethyl-19-21-epoxy-		M	70	B2	5

37	2-Pteridinamin, N, N-dimethyl-4-(trifluoro)		M	35	B2	5
38	1-Hydroxy-2,2,4,5,5-pentamethyl-3-imidazol		M	43	B2	5
39	Piperidin, 2,6-dimethyl-1-nitroso		M	38	B2	5
40	Benzeneethanamin, N,N.alpha.-trimethyl		M	33	B2	5
41	2-Pyrrolidincarboxamid, 5-oxo-(s)-		M	49	B2	5
42	Propanamid, N-1-isoquinolinyl-2-2-dimethyl		M	38	B2	5
43	Quinazolin, 4-phenyl-, 1-oxid		M	35	B2	5
44	10-H-Phenothiazin,10-methyl-5,5-dioxid		M	27	B2	5
45	Ethanol, 2-(ethylamino)-		M	35	B2	5
46	Benzofurazan, 4-nitro		M	58	B2	5
47	6H-Purin-6-on, 1,7-dihydro-2-(methyl)amino)-		M	59	B2	4
48	Thiazol, 2,4,5-trimethyl-		M	53	B2	4
49	Pentanol, 5-amino	E2 (52)	M	79	B2	4

"ÜZ" [%]: Übereinstimmungszahl nach Anwendung des PBM-Algorithmus

"Eluenten" : "M" = Methanol, "D"= Dioxan, "H" = Hexan

"Chr" : Chromatographische Bedingungen nach Liste A10, Anhang A

"Ü":Übereinstimmung mit dem Stoffspektrum, das im Ablauf identifiziert wurde: Buchstabe gibt Probenaufarbeitung nach Tabelle B7,Anhang B an, in Klammern steht Übereinstimmungszahl in %

"PA": Probenaufarbeitung erfolgte analog zu der in dieser Spalte angegebenen Probenarbeitung aus Kläranlagenablauf

Folgende Stoffe wurden sowohl bei der Untersuchung von Kläranlagenablauf, wie auch bei der Untersuchung des Rheinwassers (ÜZ zwischen 30 und 90%) von der Auswertsoftware ausgegeben, die ersten beiden waren sicher zu identifizieren.

1. (S)-3-(1-Methyl-2-pyrrolidinyl)-pyridin
2. N,N-bis-(2-Hydroxyethyl)-dodecanamid
3. Pyrido[3,2-d]pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion
4. Methacrylamid
5. 3-(Dimethylamino)-1-propanol
6. 4-Ethyl-2-propyl-thiazol
7. 3-Butoxy-pyridin
8. 5-Amino-pentanol
9. Thiazolidin.

Somit stellen anthropogen verursachte Stoffe und Stoffe des natürlichen Stickstoffkreislaufs eine potentielle Dauerbelastung der Gewässer dar, weil offensichtlich Selbstreinigungsmechanismen der Gewässer, wie die Adsorption an Sedimenten und der biologische Abbau bei diesen Stoffen stark verlangsamt sind bzw. versagen.

Da die Abwasserabgabe von der Kläranlage Leopoldshafen nach dem Eintritt in den Rhein um rechnerisch etwa den Faktor 1:10000 verdünnt wird, können diese Stoffe eigentlich

nicht aus der Kläranlage Leopoldshafen stammen. Das bedeutet, daß diese Stoffe auch von anderen Kläranlagen eingetragen sind (sofern sie nicht natürlicher Herkunft sind).

Die Tatsache, daß auch im Oberflächenwasser wiederum N,N-bis-(2-Hydroxyethyl)-dodecanamid sicher zu identifizieren war, unterstreicht nochmal die besondere Stabilität dieses Stoffes und die daraus resultierende, unzureichende biologische Abbaubarkeit im aquatischen System.

10.4. Sind die Stoffe toxisch bzw. nicht toxisch ?

Von den in dieser Arbeit als mindestens mit hoher Wahrscheinlichkeit identifizierten Stickstoffverbindungen wird Benzothiazol als mindergiftig [5], 1-Methyl-2-pyrrolidinon als gesundheitsschädlich [48] und Caprolactam als stark toxisch [48] eingestuft.

Toxikologische Daten über die weiteren nachgewiesenen Amide und die weiteren abgegebenen Stickstoffverbindungen wurden in der vorliegenden Literatur keine gefunden. Nur für Amide mit kleinen Molekulargewichten, wie Formamid und Acetamid ist bekannt, daß diese nach dem heutigen Stand des Wissens als starke Gifte einzuordnen sind [5].

10.5. In welchen Konzentrationen kommen die Stoffe vor ?

Quantitative Untersuchungen wurden für Caprolactam, Benzothiazol und 1-Methyl-2-pyrrolidinon durchgeführt. Dabei wurden zunächst die Wiederfindungsgrade dieser Stoffe nach Dotieren eines Kläranlagenablaufs analog zu den Anreicherungsbedingungen von Versuch 8.2.3. bestimmt.

Die Ausgangskonzentrationen betragen in der dotierten Lösung etwa 100mg/l. Bei zwei der Stickstoffverbindungen ergaben sich, wie in Tabelle 38 dargestellt, Wiederfindungsgrade von etwa 10%. Ausgehend davon, daß es sich um Wandadsorption an den Autosamplergefäßen handelt, wurden die Eluate deshalb nach einem weiteren Tag gegen eine frisch hergestellte Referenzlösung nochmals quantifiziert. Es ergaben sich die in Tabelle 38 aufgezeichneten Wiederfindungsgrade, die den Effekt belegen.

Tabelle 38. Wiederfindungsgrad (W) verschiedener Stickstoffverbindungen in %

	W nach 1 Tag	W nach 1 Tag	W nach 2 Tagen	W nach 2 Tagen
1-Pyrrolidinon, 2-methyl	11	11	5	5
Benzothiazol	98	99	100	100
Caprolactam	11	11	5	5

Bei der Untersuchung der Kläranlagenabläufe ergeben sich unter Berücksichtigung der oben bestimmten Wiederfindungsgrade dieser Stoffe und einem DON-Gehalt der Probe von 3.1 mg/l±0.6 mg/l

	die Gehalte (µg/l),	ein DON (µg/l) von	und ein Anteil am DON (%)
1-Methyl-2-pyrrolidinon	55	8.5	0.25
Benzothiazol	18	1.8	0.05
Caprolactam	48	6.5	0.21

und in einer weiteren Probe mit einem DON von 2.7 mg/l für

Caprolactam	66	8.9	0.4.
-------------	----	-----	------

Die drei Stoffe machen damit insgesamt etwa 0.5 % des DON dieser Probe aus.

Wenn man die Peakhöhen in den Gaschromatogrammen betrachtet, haben die hier quantifizierten Stickstoffverbindungen sicherlich die höchsten Peakintensitäten und sollten daher im Vergleich zu anderen Stoffen in den höchsten Konzentrationen vorliegen. Damit liegen alle ausgegebenen Stoffe in Konzentrationen von mindestens 1 µg/l (Nachweisgrenze des Detektors im Scan bei Anreicherungsfaktor 20000) und geringer als 50 µg/l vor.

N-N,4-Trimethylbenzolsulfonamid wurde in dieser Arbeit in einem nicht 1000 Dalton filtrierten Kläranlagenablauf identifiziert. Elsässer bestimmte den mit der niedermolekularen Fraktion vergesellschafteten Anteil dieses Stoffes nach Abtrennen der höhermolekularen Fraktion über eine 1000 Dalton-Filtration zu 0.3 µg/l (siehe Tabelle 2). Auf dieser Grundlage kann das Verhältnis der Konzentrationen in den Fraktionen, die eine 1000 Dalton-Membran nicht passiert bzw. passiert, unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze dieses Stoffes (in einer Probenaufarbeitung mit Anreicherungsfaktor 20000: Nachweisgrenze 1 µg/l) auf mindestens 30 abgeschätzt werden. Für andere Stickstoffverbindungen wurde das Verhältnis zwischen dem mit dem höhermolekularen Anteil und dem

mit dem niedermolekularen vergesellschafteten Anteil zu mindestens 1000 bzw. 10000 abgeschätzt (vergleiche Kapitel 8.1.2.) .

Wie oben ausgeführt, liegen die Konzentrationen der Stickstoffverbindungen zwischen eins und 50 µg/l. Setzt man für diese Stoffe im Mittel 10µg/l an, so läßt sich für die 35 Stickstoffverbindungen, die bei der Untersuchung von Probeaufarbeitung E1 ausgegeben wurden, ein Gehalt an erfaßten organischen Stickstoffverbindungen von etwa 300 µg/l abschätzen. Bei der Annahme einer durchschnittlichen molaren Masse von 100 g/mol ergibt sich ein Anteil am DON (Gesamt: 3.1 mg/l±0.6 mg/l) von etwa 5%. Unter Berücksichtigung aller 133 Stickstoffverbindungen, die unter Anwendung der Auswertsoftware auf unterschiedliche Probenaufarbeitungen ausgegeben wurden, machen der Anteil des detektierten DON bei einer analogen Abschätzung etwa 20% des DON aus. Es müssen also sehr viele weitere Stickstoffverbindungen in den Kläranlagenabläufen enthalten sein. Dabei handelt es sich unter Umständen auch um den im höhermolekularen Anteil (passiert keine 1000 Dalton Membran) gebundenen Stickstoff, der zusammen mit dem Anteil der mit dieser Fraktion vergesellschafteten, niedermolekularen Stoffe zu maximal 70% bestimmt wurde (Kapitel 2.1.).

10.5. Zusammenfassung

9-Methyl-acridin, Ethyl-N-(2-methyl-phenyl)-2-butenamid, N-Butyl-benzolsulfonamid, Caprolactam, Benzothiazol, 1-Methyl-2-pyrrolidinon, 4-Ethyl-5-Methyl-heptanamid, 4-Ethenyl-pyridin, N,N-Dimethyl-octadecenamid, 4-Methoxy-benzotriazol und S-(2-Amino-ethylester)-thioschwefelsäure wurden bei der Untersuchung von Ausläufen der Kläranlage Leopoldshafen mehrfach mit großer Wahrscheinlichkeit identifiziert. Die ersten beiden wurden in mindestens acht von zehn untersuchten Probenaufarbeitungen nachgewiesen. Die genauere Betrachtung dieser Stoffe ist deshalb besonders interessant.

Bei einer Untersuchung des Zulaufs der Kläranlage Leopoldshafen und des Rheines nach dem Zufließen des gereinigten Kläranlagenauslaufs wurde, wie Tabelle 39 zeigt, keiner der mehrfach im Auslauf identifizierten Stoffe detektiert. Im Fall von Caprolactam, 9-Methyl-acridin, N-Ethyl,N-(2-methylphenyl)-butenamid, 1-Methyl-2-pyrrolidinon und 4-Ethyl-5-methyl-heptanamid wurden zur Probenaufarbeitung in Zu-, Auslauf und Rheinwasser die gleiche Anreicherungs-methode verwendet, so daß die genannten Unterschiede nicht durch die Probenaufarbeitung bedingt sein können. Für diese Stoffe ist damit eine Bildung in der Kläranlage möglich. Allerdings wurden nicht zusammenhängende Proben von Zu- und

Ablauf untersucht, so daß die Annahme einer Bildung im Klärprozeß nicht sicher belegt ist. Durch die Quervermischung beim Zufluß des Auslaufs in den Rhein, die eine Verdünnung bis zum Faktor 10000 bewirken kann, ist auch eine Unterschreitung der Nachweisgrenze eine mögliche Ursache für diesen Befund.

Tabelle 39. Zusammenstellung der Informationen über die mehrfach ausgegebenen Stickstoffverbindungen, ÜZ >80%, sofern nicht anders angegeben

in Kläranlagen- ausläufen identifiziert	mehrfach identi- fiziert	von anderen Autoren identifiziert	anthropogene Herkunft	Im Zulauf detektiert	biologische Abbaubarkeit	in Rhein- wasser detektiert	Toxizität	Konzentration im Abwasser in µg/l
Acridin-9-methyl	+	-	-	nein	-	nein	-	mindestens 1
Butenamid, N-ethyl, N-(2-methylphenyl)	+	-	-	nein	da Amid wahrscheinlich schlecht	nein	-	mindestens 1
Heptanamid, 4-ethyl-5-methyl	+	+	-	nein	-	nein	-	mindestens 1
Caprolactam	+	-	wahrscheinlich	nein	da Amid wahrscheinlich schlecht	nein	stark toxisch	48 66
2-Pyrrolidinon, 1-methyl	+	+	wahrscheinlich	nein	schlechter als Hetrozyklen mit einem Heteroatom	nein	gesundheits-schädlich	55
Bezolsulfonamid, N-butyl	+	+	-	nein*	da Amid wahrscheinlich schlecht	nein*	-	mindestens 1
Octadecenamid, N, N-dimetyl	+	-	-	nein *	da Amid wahrscheinlich schlecht	nein*	-	mindestens 1
Benzotriazol, 4-methoxy	+	-	-	nein*	schlechter als Hetrozyklen mit einem Heteroatom	nein*	-	mindestens 1
Thiosulfuric acid, S(2-aminoethyl)ester	+	-	-	nein *	-	nein *	-	mindestens 1
Pyridin, 4-ethenyl	+	-	-	nein*	-	nein*	-	mindestens 1
2-Amino-4(1H)-pteridinon	+, ÜZ<80%	+	-	nein*	schlechter als Hetrozyklen mit einem Heteroatom	nein*	-	mindestens 1
Benzothiazol	+	+	aus organischen Abfällen	nein	schlechter als Hetrozyklen mit einem Heteroatom	nein	minder-giftig	18

"-" gibt an, daß keine Angaben in der Literatur gefunden wurden

"nein*" bedeutet, daß die Anreicherung in Abläufen im Gegensatz zu den Zuläufen bei pH=12 und nicht bei pH=7.9 durchgeführt wurde. Das Fehlen eines Nachweises in Zulauf oder Rheinwasser kann daher durch die Methode bedingt sein.

Für Caprolactam und 1-Methyl-2-pyrrolidinon besteht die Möglichkeit für einen anthropogenen Eintrag. Zu den beiden Stoffen liegen toxikologische Daten vor. Caprolactam wird als stark toxische Substanz und 1-Methyl-2-pyrrolidinon als gesundheitsschädlich eingestuft. Da beide etwa zu 50 µg/l im Auslauf der Kläranlage vorkommen, ist der Auslauf dieser biologisch gereinigten Kläranlage vermutlich toxikologisch bedenklich für Mensch und Tier.

Bei der Untersuchung der Probenaufarbeitungen mit Anreicherungsfaktor von mindestens 4000 waren 9-Methyl-acridin und N-Ethyl-N-(2-methylphenyl)-butenamid in allen Kläranlagenausläufen zu detektieren.

Sie könnten damit als Produkte der biologischen Reinigungsstufe entstehen und charakteristische Inhaltsstoffe von Kläranlagenausläufen sein. Deshalb ist für diese Stoffe die Untersuchung als Indikatorsubstanzen für biologisch gereinigte Kläranlagen interessant. Dabei sollten diese Stoffe aber auch im Oberflächengewässer identifizierbar sein. Da die verwendete Anreicherungsmethode X (pH=7.9) eventuell nur geeignet ist, den freien Anteil an Stickstoffverbindungen zu erfassen, könnte die Anwendung Methode Y (pH=12) zu einem anderen Ergebnis führen, da durch die pH-Änderung möglicherweise vergesellschaftete Stickstoffverbindungen freigesetzt werden und dann analytisch erfaßbar sind.

Eine zweite Gruppe von Stickstoffverbindungen zeichnet sich, wie Tabelle 40 zeigt, dadurch aus, daß sie in Auslauf der Kläranlage und ein Teil dieser Stoffe sogar bei der Untersuchung des Rheinwassers, als naheliegendstes Umweltkompartiment zu detektieren sind. In allen drei Probearten wurden (S)-3-(1-Methyl-2-pyrrolidinyl)-pyridin und N,N-bis(2-Hydroxyethyl)-dodecanamid sicher identifiziert.

Für diese Stoffe ist somit ein Transfer durch die Kläranlage ohne vollständige Elimination wahrscheinlich, die dann zur Belastung der Oberflächengewässer beiträgt. Dabei kann auf Grund der Art der Probenahme eine Belastung angenommen werden, die auf den Eintrag dieser Stoffe durch viele Kläranlagen rückschließen läßt.

Im Falle von N,N-bis(2-Hydroxyethyl)-dodecanamid ist von einem anthropogener Eintrag als Waschmittelinhaltsstoff auszugehen.

Zwei in ähnlicher Weise wie Thiazolidin und 4-Ethyl-2-propyl-thiazol fragmentierende Stoffe wurden ebenfalls in allen drei Wasserproben detektiert, wobei die Übereinstimmungszahlen unter 80% liegen. Auf Grund der sehr ähnlichen Übereinstimmungszahlen kann aber vom Vorliegen der gleichen Stoffe ausgegangen werden. Für diese Stoffe ist vermutlich ein analoger Transfer durch die Kläranlage möglich. Da es sich

wahrscheinlich um Stoffe des biochemischen Stickstoff- und Schwefelkreislaufs handelt, ist eine Neubildung in der Kläranlage nicht auszuschließen.

Für die Identifikation verschiedener Stoffe nur in Zu- und Ablauf, nicht aber im Rheinwasser, kann man die gleichen Ursachen vermuten, die schon für den Fall der mehrfach identifizierten Stickstoffverbindungen diskutiert wurden.

Tabelle 40. Detektierte Stickstoffverbindungen die gleichzeitig in mindestens zwei der drei untersuchten Probearten Zulauf, Ablauf und Rheinwasser detektiert werden konnten.

Stoff	Zulauf	Ablauf	Rheinwasser	anthropogene Herkunft	biologische Abbaubarkeit	
Übereinstimmungszahl $\geq 90\%$						
1	Pyridin, 3-(1-methyl-2-pyrrolidiny)-(S)	94	94	95	-	-
2	Dodecanamid, N, N-bis(2-hydroxyethyl)	91	95	96	in Tensiden	74%
3	Thioharnstoff, N-methyl-N'-phenyl	93	90	n.n.	-	-
Übereinstimmungszahl: $80 < \text{ÜZ} < 90$						
4	Dodecanamid	81	91	n.n.	möglich	-
5	Thiazol, 4, 5-dihydro-2-methyl	80	30	n.n.	organische Abfälle	schlechter als Heterozyklen mit einem Heteroatom
Übereinstimmungszahl: $30 \leq \text{ÜZ} < 80$						
6	Thiazolidin	59	53	53	organische Abfälle	schlechter als Heterozyklen mit einem Heteroatom
7	Thiazol, 4-ethyl-2-propyl	50	58	58	organische Abfälle	schlechter als Heterozyklen mit einem Heteroatom
8	Methacrylamid	n.n.	49,35	64	-	da Amid wahrscheinlich schlecht
9	Pyridin, 3-butyl-oxide	n.n.	43	35	-	-
10	Pyrido[3,2-d]pyrimidin-2,4[1H,3H]-dion	n.n.	49	68	-	-
11	Pentanol, 5-amino	n.n.	52	79	-	-
12	Benzothiazol, 2-methyl	64		60	organische Abfälle	schlechter als Heterozyklen mit einem Heteroatom

"n.n." = nicht nachweisbar

"-" = keine Angaben in der Literatur gefunden

Insgesamt treten zwei Stoffklassen besonders häufig im Auslauf der Kläranlage und im Rheinwasser auf, die Amide und die Thiazole.

Die Stoffklasse der Amide, die in Form 24 verschiedener Derivate, davon fünf mehrfach im Ablauf detektiert wurden, wird in der hier untersuchten Kläranlage mit biologischer Reinigungsstufe nur unvollständig abgebaut. Weiterhin wurden die besondere Stabilität dieser Stoffe gegenüber Ozon, einem Reagenz, das zur tertiären Abwasserbehandlung eingesetzt wird, von anderen Autoren nachgewiesen. Auch die Thiazole, die auf Grund ihrer chemischen Struktur eine geringe biologische Abbaubarkeit erwarten lassen, passieren zumindest zum Teil die biologische Reinigungsstufe. Für diese Stoffe des natürlichen Stickstoff- und Schwefelkreislaufs kann aber eine Neubildung in Kläranlage nicht ausgeschlossen werden.

Die quantitative Bestimmung der drei mit Hilfe von Referenzsubstanzen identifizierten Stoffe ergab einen Gehalt im Kläranlagenablauf an 55 µg/l 1-Methyl-2-pyrrolidinon, 18 µg/l Benzothiazol und 48 bzw. 66 µg/l Caprolactam. Die hier bestimmten Konzentrationen liegen damit an der oberen Grenze, die auch von anderen Autoren für Stickstoffverbindungen angegeben werden (Clark bestimmt Methyl-benzothiazol zu 57 µg/l, andere Konzentrationen liegen meist unter 10 µg/l).

Der Anteil der drei quantifizierten Stoffe beträgt etwa 0.5% des DON. In der Probenaufarbeitung, in der die meisten Stickstoffverbindungen detektiert wurden, ließ sich der Anteil an detektierten Stickstoffverbindungen von 6% abschätzen. Für die insgesamt 133 verschiedenen Stickstoffverbindungen, die mit verschiedenen Aufarbeitungsmethoden angereichert wurden, ergibt eine analoge Abschätzung einen Anteil am DON von etwa 20%. Es muß also noch eine Vielzahl anderer Stickstoffverbindungen vorliegen, wobei der im höhermolekularen Anteil (passiert keine 1000 Dalton-Membran) gebundene DON auf maximal 70% abgeschätzt wurde.

Für das Verhältnis zwischen mit der höhermolekularen und der niedermolekularen Fraktion vergesellschafteten Anteil einzelner Stickstoffverbindungen wurden je nach Methode und Einzelstoff Faktoren von 30 bis zu 10000 gefunden. Dies zeigt, daß der Hauptanteil der niedermolekularen Stoffe mit der höhermolekularen Fraktion vergesellschaftet ist.

11. Der gelöste Kjeldahl-Stickstoff und der gelöste organische Stickstoff von biologisch gereinigten Kläranlagenabläufen

Um die Gesamtbelastung eines Abwassers an gebundenem Stickstoff bzw. an organisch gebundenem Stickstoff und die Relevanz von Einzelverbindungen in Bezug auf die Gesamtbelastung abschätzen zu können, war die Messung eines Summenparameters interessant, der diese Stoffklasse erfaßt. Ein aussagekräftiger und einfach bestimmbarer Summenparameter könnte auch zur Beurteilung von Anreicherungsverfahren herangezogen werden. Eine allgemein gebräuchliche Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in einer Probe ist die Bestimmung des "Kjeldahlstickstoffs" (TKN). Zur Ermittlung des organisch gebundenen Stickstoffs (DON) wird vorhandenes Ammonium vor dem Aufschluß in alkalischem Milieu abdestilliert.

Der gelöste TKN im 0.45 µm filtrierten Auslauf der Kläranlage Leopoldshafen wurde in vier parallel durchgeführten Aufschlüssen einer Probe nach der Methode No. 3690 der American Standard Methods [27] im Mittel zu 8.8 mg/l±0.2 mg/l bestimmt.

In der gleichen Probe wurde der gelöste DON in vier Einzelversuchen im Mittel zu 3.1 mg/l±1.2 mg/l bestimmt. Nach diesen Ergebnissen macht der DON rund ein Drittel des TKN aus.

Die Ursache für die relativ zur Bestimmung des Kjeldahlstickstoffs hohe Standardabweichung liegt in dem nicht reproduzierbaren Verlust von etwa 1/3 organischem Material während des Einengens der Wasserproben [49]. Neben dieser hohen Standardabweichung ist die Aussage dieses Parameters dadurch beeinträchtigt, daß nur ein Teil der Heterozyklen als Ammonium erfaßt werden kann.

Der erfaßbare, prozentuale Anteil des DON für verschiedene Stickstoffverbindungen in Abhängigkeit von den Aufschlußbedingungen ist in Tabelle 41 dargestellt [50]. Wie aus den Analysenwerten geschlossen werden kann, steigt der erfaßte Stickstoff einiger Heterozyklen, wenn zunächst ein reduzierender Aufschluß vor dem Kjeldahlaufschluß durchgeführt wird. Für andere Heterozyklen kann die Reduktion des Stickstoffs jedoch so gestört werden, daß nahezu die gesamte Stickstoffmenge zu elementarem Stickstoff oxidiert wird und damit für die Bestimmung verloren geht [50].

Dies bedeutet für einen biologisch gereinigten Kläranlagenablauf, der nach den Ergebnissen dieser Arbeit viele Heterozyklen enthält, daß der DON nur bedingt als Maß für die Gesamtbelastung eines Ablaufes an organischen Stickstoffverbindungen betrachtet werden kann. Da von den identifizierten Pyridinen, Thiazolen, Imidazolen und Pyrrazolen im Durchschnitt etwa 30% erfaßt werden, kann je nach Zusammensetzung des Ablaufes der gesamte organisch gebundene Stickstoff leicht das Doppelte des gemessenen Wertes betragen. Der DON kann vor allem die biologisch schlecht abbaubaren Stoffe nur teilweise quantifizieren, weil diese nicht nur chemisch, sondern auch biologisch schlecht abbaubar sind [47]. Diese Methode erfaßt

sehr gut leicht abbaubare Stoffe, wie aliphatische Amine und Aminosäuren. Letztgenannte liegen nach den Analysendaten von Elsässer vorwiegend in Form von Proteinen vor.

Wie eigene Untersuchungen zeigen, weicht der erfaßte organische Stickstoff auch bei der Durchführung eines reduzierenden Aufschlusses nicht wesentlich von dem in nicht reduzierend aufgeschlossenen Proben ab (Versuchsdurchführung in Anhang A, Nr. A9). In einem Kläranlagenablauf wurde bei direktem Aufschluß der DON zu $3.1 \text{ mg/l} \pm 1.2 \text{ mg/l}$ und nach einem reduzierenden Aufschluß zu $3.4 \text{ mg/l} \pm 0.9 \text{ mg/l}$ bestimmt. Diese Aufschlußmethode hat also bei der Erfassung des organischen Stickstoffs in biologisch gereinigten Abwässern keinen wesentlichen Vorteil im Vergleich mit dem normalen Kjeldahlaufschluß.

Tabelle 41. Erfäßbarer Stickstoff in Abhängigkeit von der Art des Aufschlusses in % [50]

Stoff	erfaßter Stickstoff, direkt	erfaßter Stickstoff, nach Hydrierung
Pyridin	13	91
Pyrazin	63	98
Pyrimidin	94	99
Hexahydropyrimidin	100	nicht erfaßbar
Thiazol	76	98
Thiazolidin	97	nicht erfaßbar
Imidazol	45	88
Pyrazol	1	12
Tetrahydroimidazol	89	nicht erfaßbar

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der DON nur zur Einschätzung der Größenordnung der Gesamtbelastung an organisch gebundenem Stickstoff herangezogen werden kann.

Die Größenordnung des DON von Kläranlagenabläufen mit biologischer Reinigungsstufe wurde zu ein bis etwa drei mg/l mit den folgenden Daten ermittelt. Zum einen errechnet sich der DON aus dem TKN und Ammonium-Gehalt, die Scully in Kläranlagenabläufen einer Anlage mit biologischer Reinigung bestimmte, zwischen ein und zwei mg/l. Zum anderen zeigen die in dieser Arbeit ermittelten DON-Gehalte in der untersuchten Kläranlage zwischen 1.7 und 3.1 mg/l (Werte in Tabelle B7, Anhang B), daß die Größenordnungen dieser Werte für die betrachteten Kläranlagen übereinstimmen.

Das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff liegt für die in dieser Kläranlage untersuchten Abläufe (nach den Analysendaten in Tabelle B7, Anhang) zwischen 2.6 : 1 und 3.9 : 1, im Mittel bei 3.1 : 1. Dies entspricht in etwa dem Verhältnis von 3.6 : 1, das für Bakterienmasse angegeben wird. Es beträgt etwa die Hälfte des Wertes, der vielfach für belebten Schlamm gemessen wurde [49]. Das gemessene Verhältnisse von TKN/DON und DOC/DON zeigen, daß die untersuchte Kläranlage Stickstoffverbindungen weitgehend in Bakterienmasse umwandelt und einen guten Wirkungsgrad für diese Stoffe hat.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, zur Aufklärung der organischen Fracht in einem Kläranlagenablauf beizutragen. Ein Identifizierungsgrad von organischen Stickstoffverbindungen in biologisch gereinigten Kläranlagenabläufen von 0.9% des DON, davon etwa 0.7% als Proteine und Kernbasen und weitere 0.2% in Form Stickstoffverbindungen meist heterozyklischer Natur, weckten das Interesse einer Aufklärung dieser auch toxikologisch bedeutenden Stoffklasse.

Da neben den Aminosäuren bisher nur sehr wenige Stoffe mit Aminogruppen identifiziert wurden, lag der Verdacht des Einflusses der Aufarbeitungsmethode nahe. Deshalb wurde besonderes Augenmerk auf die Erfassung von Stickstoffverbindungen mit aliphatischen Aminogruppen gelegt.

Es wurde eine Methode zur chromatographischen Analyse von Stickstoffverbindungen mit Konzentrationen unter 10 mg/l ausgearbeitet, die auch zu Messung aliphatischer Amine geeignet war. Die Lösungen von Stickstoffverbindungen sind als instabil, so daß für die Versuche alle Lösungen frisch hergestellt wurden.

Die Reversed-Phase-Anreicherung lies nach der Literaturlauswertung erwarten, am besten für die Identifizierung eines breiten Spektrums an Stickstoffverbindungen geeignet zu sein.

Bei Versuchen zur Anreicherung von Stickstoffverbindungen aus Kläranlagenabläufen an Reversed-Phasen führten Einflüsse von Probeninhaltsstoffen zu anderen optimalen Anreicherungsbedingungen, wie sie für Leitungswasser festgestellt wurden. Fünf Stickstoffverbindungen wurden unter Anwendung zweier Adsorptionsmaterialien mit Wiederfindungsgraden von fast 100 % auf den Faktor 5000 angereichert.

Die in Kläranlagenabläufen beobachteten Effekte führten zur Aufzeichnung eines Modells zum Verhalten der organischen Stoffe im biologisch gereinigten Kläranlagenablauf. Demnach sind die Stickstoffverbindungen mit anderen organischen und anorganischen Inhaltsstoffen vergesellschaftet, wobei auch Stoffe kleiner 1000 Dalton Stickstoffverbindungen vergesellschafteten können. Dieses Modell hat, sofern es richtig ist, Konsequenzen für die Abtrennwirkung der biologischen Behandlung. Das Verhältnis der Konzentrationen von Stickstoffverbindungen, die mit einer die 1000 Dalton Membran nicht passierenden Fraktion vergesellschaftet sind, zu Stickstoffverbindungen, die mit einer die 1000 Dalton passierenden Fraktion vergesellschaftet ist, wurde je nach Methode und Einzelstoff mindestens auf das 30 Fache bis zum 10000 fachen abgeschätzt. Auf der Grundlage dieser Beobachtungen wurde die Molekulargewichtsverteilung neu definiert.

Zur Identifizierung von Stickstoffverbindungen war der Vergleich der gemessenen Spektren mit Spektren der Referenzbibliothek unter Anwendung des Probability Based

Matching of Mass Spectra (PBM)-Algorithmus aufgrund der Ausarbeitung eines Rasters möglich, das die Sicherheit der Identifizierung anhand der mit ausgegebenen Übereinstimmungszahl beschreibt.

Für drei Stoffe, die bei Anwendung des PBM-Algorithmus mit Übereinstimmungszahlen > 80 % ausgegeben wurden, zeigte der Vergleich von Retentionszeiten und Massenspektren mit Referenzsubstanzen, daß diese Stoffe richtig identifiziert wurden.

Durch Anwendung des PBM-Algorithmus auf 10 Probenaufarbeitungen mit einem Konzentrierungsfaktor von 1000-20000 wurden 133 verschiedene Stickstoffverbindungen als Vorschlag mit der höchsten Wahrscheinlichkeit gemacht. Bei diesen handelt es sich vermutlich um Stickstoffverbindungen.

Von den 133 detektierten Stickstoffverbindungen konnten 17 Stickstoffverbindungen sicher und weitere 10 mit hoher Wahrscheinlichkeit identifiziert werden. Sechs Stoffe wurden übereinstimmend mit anderen Autoren identifiziert. 22 verschiedene Stoffe wurden mehrfach ausgegeben, davon einzelne bis zu 9 mal. Für einzelne Stoffe konnten Hinweise für eine Entstehung in der Kläranlage und damit als eventuelle Indikatorverbindungen für Kläranlagenausläufe gefunden werden.

Besonders häufig treten Amide mit 24 von 133 ausgegebenen Stoffen, davon 5 mehrfach identifiziert, auf. Diese müssen als unzureichend abbaubar eingestuft werden, da für Vertreter dieser Stoffklasse ein Transfer durch die Kläranlage bis ins Oberflächengewässer Rhein beobachtet wurde. Das gesagte wurde darüber hinaus für verschiedene als Thiazole ausgegebene Stoffe gefunden.

Die Konzentrationen von drei verschiedenen Stickstoffverbindungen wurden alle zu etwa 50µg/l bestimmt. Der Anteil dieser Stoffe beträgt insgesamt etwa 0.5% des DON. Für die Probenaufarbeitung mit den meisten ausgegebenen Stickstoffverbindungen, ließ sich der Anteil an detektierten Stickstoffverbindungen, die viele Thiazole und Amide enthalten, von mindestens 0.6% bis zu 30% des DON abschätzen.

Niedere aliphatische Amine, als Abbauprodukte von Eiweißen, konnten weder unter mit dieser Methode, noch unter Anwendung des Derivatisierungsreagenzes mit Konzentrationen über 1µg/l identifiziert werden. Diese Stoffe sind nach dem heutigen Stand des Wissens gut biologisch abbaubar, so daß ein Abbau in einer Kläranlage mit gutem Wirkungsgrad möglich ist.

Beim Vergleich des DON von mechanischen mit biologisch gereinigten Kläranlagen, ließen sich keine gravierenden Unterschiede feststellen. Da aber ein Abbau von niederen aliphatischen Aminen stattfindet, ist zu vermuten, daß parallel dazu ein Aufbau von Heterozyklen stattfindet. Der DON kann vorallem heterozyklische Stickstoffverbindungen nur teilweise erfassen, so daß dieser Umbau des Stickstoffs auch in größerem Umfang möglich ist, als es durch die DON-Werte wiedergegeben wird.

Anhang A Liste der verwendeten Geräte und Hilfsmittel

A1. Gaschromatographie/ Massenspektrometrie

- Injektionssystem:
Split/Splitless Injektor von Hewlett Packard
und Cool-on Column-System von Hewlett Packard
mit Autosampler 7673 von Hewlett-Packard
- Gaschromatograph 5890 Serie II von Hewlett Packard
- Massendetektor 5970 von Hewlett Packard
- Computersteuerung, Hewlett/ Packard , 9000 /340

A2. Derivatisierung mit Dinitrofluorbenzol

Zusatz von 2,4-Dinitrofluorbenzol p.a. von Fluka

A3. Gaschromatographische Analyse der DNP-Derivate

- Injektion:
Splitless-Injektion
Verwendung eines unsilanisierten Glasliners
Säulenvordruck: 18 psi
- Chromatographische Trennsäule:
30 m x 0.25 mm x 0.15 µm, DB-17 von J&W Scientific
- Gaschromatograph / Massenselektiver Detektor (MSD): siehe A.1

A4. Messung des gelösten organischen Kohlenstoffs, DOC

Oxidationseinheit: Dünnfilmreaktor(Grüntzel/ Karlsruhe)

Detektionseinheit: Ultramat 3 (Siemens/ Karlsruhe)

Betriebsparameter: Nullwasseranlage, betrieben mit dest. Wasser (pH=2.5 mit Schwefelsäure);
kontinuierliche Messung der Probe. Automatische Verdünnung im Verhältnis 1:3. Automatische
Entfernung von Kohlendioxid, das aus Carbonat nach Ansäuerung gebildet wird.

Eichung mit Kaliumhydrogenphthalat.

A5. Verwendete Reversed-Phasematerialien

RP-C18, Adsorbex von Merck (100mg)

RP-C18, Baker, spe (500mg)

RP-C8, Baker, spe (500mg)

RP-CN, Baker, spe (500mg)

RP-C2, Baker, spe (500mg)

RP-CH, Baker, spe (500mg)

RP-PH, Baker, spe (500mg)
RP-Cl, Adsorbex, Polyspher (100mg)
RP-CAT, Adsorbex, Polyspher(100mg)

A6. Grobfiltration und 0.45 µm Filtration

Glasfaserfilter SM134 (Sartorius, Göttingen) und Cellulosenitratfilter SM 11306 (Sartorius, Göttingen) mit Filterhalter aus Edelstahl und Druckvorratsgefäß mit 30 Litern Volumen (Amicon/Witten)

A7. Membranfiltration, 1000 Dalton

Pellicon Kassetten-System (Millipore/Eschborn)
Membrane 1000 D nominelle Trenngrenze PCAC 0.46 m², Millipore
Druckerzeugung mittels Zahnradschleuse: 1.5 AT

A8. Bestimmung des TKN

1 Liter Probe wird in einem Becherglas mit 5 ml konz. Schwefelsäure versetzt und auf etwa 100 ml eingeeengt. Diese Lösung wird in einen Aufschlußkolben überführt und nach Zusatz einer Katalysatortablette (95, 4% K₂SO₄, 2,8% TiO₂, 1,8% CaSO₄)(Merck) und weiteren 15 ml konz. Schwefelsäure über mindestens 4 Stunden aufgeschlossen, bis die Reaktionsmischung eine hellgrüne Färbung angenommen hat.

Danach wird das entstandene Ammonium an einer Wasserdampfdestillationseinheit der Firma Büchi in eine Vorlage von 20 ml 2%ige Borsäure abdestilliert. Das Ammoniak wird gegen den Mischindikator 5 (Merck) unter Verwendung von 0.01 molarer Salzsäure titriert.

Der Wiederfindungsgrad beträgt beim Aufschluß einer Lösung mit Leucin (4.9mg/l N) 99%.

A9. Bestimmung des DON

oxidierender Aufschluß [27]:

1 Liter Probe wird in einem Becherglas mit NaOH (30%ig) auf pH=11 gebracht und auf etwa 100 ml eingeeengt, die eingeengte Lösung wird in einen Aufschlußkolben überführt und nach Zusatz einer Katalysatortablette (95, 4% K₂SO₄, 2,8% TiO₂, 1,8% CaSO₄)(Merck) und weiteren 20 ml konz. Schwefelsäure über mindestens 4 Stunden aufgeschlossen, bis die Reaktionsmischung eine hellgrüne Färbung angenommen hat.

Danach wird das entstandene Ammonium an einer Wasserdampfdestillationseinheit der Firma Büchi in eine Vorlage von 20 ml 2%ige Borsäure abdestilliert. Das Ammoniak wird gegen den Mischindikator 5 (Merck) unter Verwendung von 0.01 molarer Salzsäure titriert.

Der Wiederfindungsgrad beträgt beim Aufschluß einer Lösung mit Leucin (4.9 mg/l N) 98,5%.

reduzierender Aufschluß [50]:

Nach dem Einengen bei pH=11 (siehe oben) wird vor dem oxidierenden Aufschluß (siehe oben) ein reduzierender Aufschluß durchgeführt:

Unter Zusatz von 50 ml 10%ige ZnCl₂-Lösung, 1g Ferrum Reduktum, 20 ml konz. Schwefelsäure wird 2 Stunden aufgeschlossen. Die weitere Bestimmung erfolgt analog zum oxidierenden Aufschluß:

A10. Chromatographische Bedingungen zur Identifizierung von Stickstoffverbindungen

Nr 1.

Cool-on-column-Injektion:

Injektion mit Autosampler in 530 µm Retentionsfalle, desaktiviert
Inj.B. 38°C, Oven Track ON

Druckprogramm:

INJ.B Pressure: 200 kPa, Time: 0.5 min

Rate: -600 kPa/min, Final Pressure 100 kPa, Final Time 650 min

Temperaturprogramm:

Init. Temp 35°C

Rate: 70°C, Final Temp: 45 °C, Final Time, 10min

Rate: 3°C, Final Temp: 270°C, Final Time, 10min

Det. Temp.: 270 °C

Chromatographische Trennsäule:

30 m x 0.25 mm x 0.15 µm, DB-17 von J&W Scientific

Nr 2.

Injektion:

Splitless, Inj.Temp.: 275 °C

Purge on: 2min

Menge: 5 µl

unsilanisierter Glasliner

Säulenvordruck: 18 psi

Temperaturprogramm:

Init. Temp.:45°C

Rate: 25°C/ min, Final Temp :210°C

Rate: 20°C/ min, Final Temp.:280°C, Final Time 15 min

Chromatographische Trennsäule:

30 m x 0.25 mm x 0.15 µm, DB-17 von J&W Scientific

Nr 3.

Injektion:

Splitless, Inj.Temp.: 275 °C

Menge: 5 µl

unsilanisierter Glasliner

Chromatographische Trennsäule:

20 m x 0.30 mm x 0.20 µm, HP-1 von Hewlett/ Packard

30 m x 0.25 mm x 0.15 µm, DB-17 von J&W Scientific

Temperaturprogramm:

Init. Temp.:50°C

Rate: 5°C/ min, Final Temp :210°C

Rate: 7°C/ min, Final Temp.:280°C, Final Time 15 min

Nr 4.*Injektion:*

Splitless, Inj.Temp.: 275 °C

Menge: 5 µl

unsilanisierter Glasliner

Chromatographische Trennsäule:

50 m x 0.30 mm x 0.20 µm, HP-5 von Hewlett/ Packard

Temperaturprogramm:

Init. Temp.: 50°C

Rate: 5°C/ min, Final Temp : 210°C

Rate: 7°C/ min, Final Temp.: 280°C, Final Time 15 min

Nr 5.*Injektion:*

Splitless, Inj.Temp.: 250 °C

Menge: 5 µl

unsilanisierter Glasliner

Chromatographische Trennsäule:

Carbowax 50 m x 0.30 mm x 20 µm

Temperaturprogramm:

Init. Temp. 30°C

Rate: 10°C/ min, Final Temp : 55°C

Rate: 2°C/ min, Final Temp.: 220°C, Final Time 20 min

Nr 6.*Injektion:*

Splitless, Inj.Temp.: 290 °C

Menge: 5 µl

unsilanisierter Glasliner

Temperaturprogramm:

Init. Temp.: 90°C

Rate: 25°C/ min, Final Temp : 210°C

Rate: 20°C/ min, Final Temp.: 280°C, Final Time 15 min

Chromatographische Trennsäule:

30 m x 0.25 mm x 0.15 µm, DB-17 von J&W Scientific

Nr 7.*Injektion:*

Splitless, Inj.Temp.: 290 °C

Purge on: 2 min

Menge: 5 µl

unsilanisierter Glasliner

Säulenvordruck 21 psi

Chromatographische Trennsäule:

30 m x 0.25 mm x 0.15 µm, DB-17 von J&W Scientific

20 m x 0.30 mm x 0.20 µm, HP-1 von Hewlett/ Packard

Temperaturprogramm:

Init. Temp.:90°C

Rate: 5°C/ min, Final Temp :210°C

Rate: 7°C/ min, Final Temp.:280°C, Final Time 15 min

Nr 8.

Injektion:

Splitless, Inj.Temp.:290 °C

Purge on: 2.5 min

Menge:5 µl

unsilanisierter Glasliner

Säulenvordruck 18 psi

Temperaturprogramm:

Init. Temp.:60°C

Rate:10° C/ min, Final Temp 190°C, Final Time 10 min

Rate 5° C/ min, Final Temp: 280.°C, Final Time 30 min

Chromatographische Trennsäule:

30 m x 0.25 mm x 0.15 µm, DB-17 von J&W Scientific

A 11. Verwendete Referenzsubstanzen

- 1-Methyl-2-Pyrrolidinon von Sigma
- Benzothiazol zur Synthese von Merck
- Caprolactam von Sigma

Anhang B Tabellenanhang

Tabelle B1. Derivatisierungsreagenzien für basische Stickstoffverbindungen

Substanz	Derivat	Aufarbeitung nach Derivatisierung	Quantifizierung	Autor
Biogene Stickstoffverbindungen	N-Acyl-O-trimethylsilyl	Lösungsmittlextraktion Lyophilisierung nochmalige Derivatisierung	nicht durchgeführt	[40]
Phenylsubstituierte Amine	Heptafluorobutyryl	zweifache Lösungsmittlextraktion	möglich	[4]
Aniline Chloraniline	Heptafluorobutyryl Trifluoroacetyl Pentafluorobutyryl	Lösungsmittlextraktion Trocknen über Na ₂ SO ₄ Abblasen des Lösungsmittels Aufnehmen in Octan	möglich	[36]
Aniline Alkylpyridine	Acetyl	Lösungsmittlextraktion Trocknen über Na ₂ SO ₄ Abblasen des Lösungsmittels	möglich	[38]
Aminophenole	Trifluoracetyl	Lösungsmittlextraktion Trocknen über Na ₂ SO ₄ Abblasen des Lösungsmittels	möglich	[37]
aliphatische Amine	Dinitrophenyl	Derivatisierung in Wasser Extraktion mit Benzol	möglich	[39]
aliphatische Amine	Dinitrophenyl	Derivatisieren in Wasser Erhitzen nach Zusatz von NaOH Lösungsmittlextraktion Waschen mit Wasser Lösungsmittlextraktion	möglich	[51]
Aliphatische Amine Phenylsubstituierte Amine	Dinitrophenyl	Keine weitere Aufarbeitung	möglich	[26]

Tabelle B2. Detektierte Peakfläche von Dotierlösungen in Toluol bei Zugabe gleicher Mengen verschiedener Stickstoffverbindungen in Abhängigkeit vom verwendeten Gefäßmaterial:
Relative Anteile der Peakflächen, wobei die größte detektierte Peakfläche auf 100 normiert wurde.

	Glas, unsilanisiert	Glas, silanisiert	Teflon	Polyethylen	Mittelwert X
Benzylamin	nicht detektiert	nicht detektiert	nicht detektiert	nicht detektiert	-
2-Methylbenzimidazol	12	17	100	0	32
1-Methylpiperazin	100	0	0	0	25
3-Indoymethylketon	100	37	80	41	65
Isopropylamin	61	100	60	73	74
Piperidin	76	63	66	100	76
Pyrrolidin	81	100	90	95	92

Tabelle B3. Detektierte Peakfläche von Dotierlösungen in Methanol bei Zugabe gleicher Mengen verschiedener Stickstoffverbindungen in Abhängigkeit vom verwendeten Gefäßmaterial: Relative Anteile der Peakflächen, wobei die größte detektierte Peakfläche auf 100 normiert wurde.

	Aluminium	Glas, unsilanisiert	Glas, silanisiert	Teflon	Polyethylen
Benzylamin	35	59	24	64	100
2-Methylbenzimidazol	nicht detektiert	nicht detektiert	nicht detektiert	nicht detektiert	nicht detektiert
Indoymethylketon	77	96	80	100	91
Isopropylamin	80	100	90	90	83
Piperidin	83	81	70	83	100
Pyrrolidin	82	80	70	82	100
Mittelwert Y	71	83	67	84	95

Tabelle B4. Detektierte Peakfläche von Dotierlösungen in Toluol als Lösungsmittel bei Zugabe gleicher Mengen verschiedener Stickstoffverbindungen in Abhängigkeit vom verwendeten Gefäßmaterial und Lagerungstemperatur:

Relative Anteile der Peakflächen, wobei die größte detektierte Peakfläche auf 100 normiert wurde.

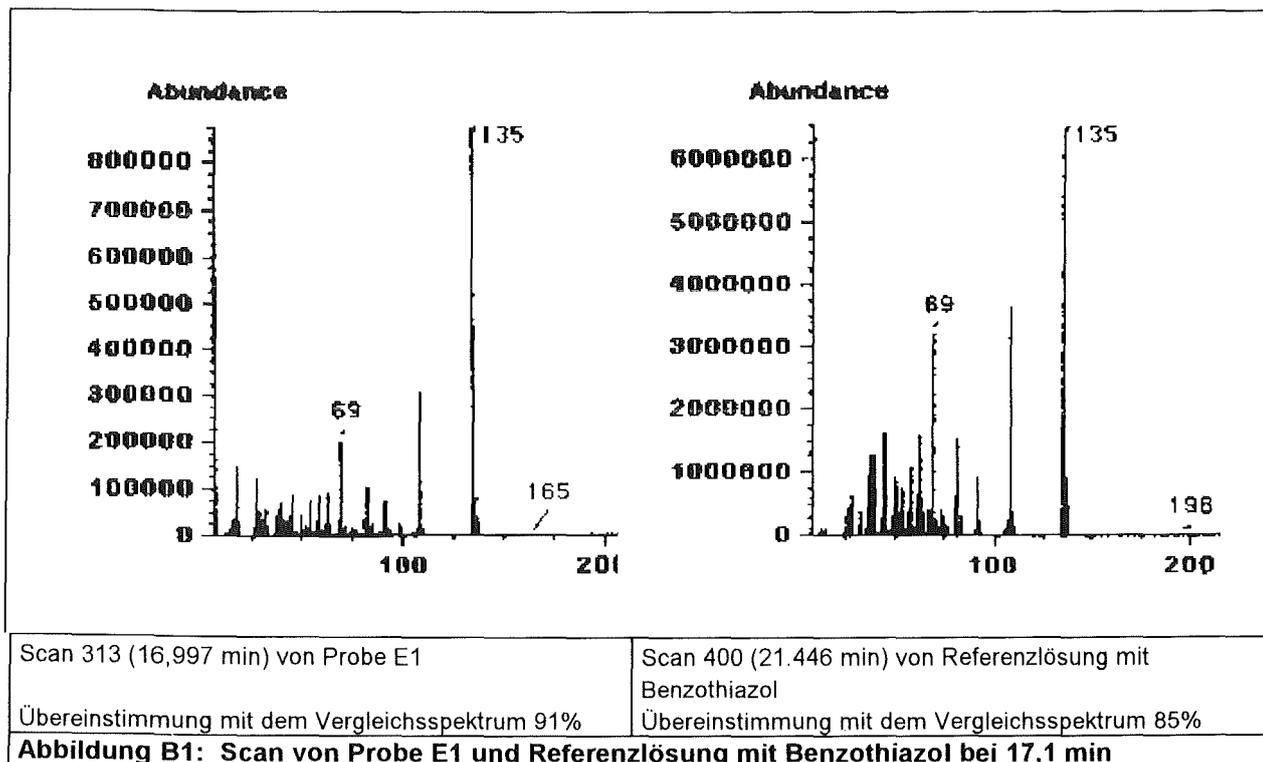
Gefäßmaterial: Glas	Derivatisierung sofort	Lagerung bei 5°C	Lagerung bei -20°C
Benzylamin	nicht detektiert	nicht detektiert	nicht detektiert
2-Methylbenzimidazol	12	12	8
1-Methylpiperazin	100	57	15
3-Indoymethylketon	100	61	0
Isopropylamin	60	65	64
Piperidin	76	73	62
Pyrrolidin	81	81	93
Gefäßmaterial: Polyethylen	Derivatisierung sofort	Lagerung bei 5°C	Lagerung bei -20°C
Benzylamin	nicht detektiert	nicht detektiert	nicht detektiert
2-Methylbenzimidazol	0	0	0
1-Methylpiperazin	0	20	0
3-Indoymethylketon	41	2	0
Isopropylamin	73	67	76
Piperidin	100	71	88
Pyrrolidin	95	80	81
Gefäßmaterial: Teflon	Derivatisierung sofort	Lagerung bei 5°C	Lagerung bei -20°C
Benzylamin	nicht detektiert	nicht detektiert	nicht detektiert
2-Methylbenzimidazol	100	100	0
1-Methylpiperazin	0	0	0
3-Indoymethylketon	80	31	6
Isopropylamin	60	54	47
Piperidin	90	92	36
Pyrrolidin	89	64	40

Tabelle B5. Detektierte Peakfläche von gelagerten Dotierlösungen in Methanol bei Zugabe gleicher Mengen verschiedener Stickstoffverbindungen in Abhängigkeit vom verwendeten Gefäßmaterial und den Lagerungsbedingungen: Relative Anteile der Peakflächen, wobei die größte detektierte Peakfläche in den ungelagerten Proben auf 100 normiert wurde

Gefäßmaterial: Glas	Derivatisierung sofort	Lagerung bei 20°C	Lagerung bei 5°C	Lagerung bei -20°C
Benzylamin	60	40	82	48
2-Methylbenzimidazol	nicht detektiert	nicht detektiert	nicht detektiert	nicht detektiert
3-Indoilmethylketon	100	54	70	80
Isopropylamin	100	44	37	35
Piperidin	85	80	87	82
Pyrrolidin	81	74	82	83
Gefäßmaterial: Teflon	Derivatisierung sofort	Lagerung bei 20°C	Lagerung bei 5°C	Lagerung bei -20°C
Benzylamin	64		65	53
2-Methylbenzimidazol	nicht detektiert		nicht detektiert	nicht detektiert
3-Indoilmethylketon	100		72	52
Isopropylamin	90		49	47
Piperidin	90		85	80
Pyrrolidin	83		92	82
Gefäßmaterial: Polyethylen	Derivatisierung sofort	Lagerung bei 20°C	Lagerung bei 5°C	Lagerung bei -20°C
Benzylamin	100	29	97	41
2-Methylbenzimidazol	nicht detektiert	nicht detektiert	nicht detektiert	nicht detektiert
3-Indoilmethylketon	80	20	97	85
Isopropylamin	83	24	31	45
Piperidin	100	69	96	80
Pyrrolidin	100	68	87	70
Gefäßmaterial: Aluminium	Derivatisierung sofort	Lagerung bei 20°C	Lagerung bei 5°C	Lagerung bei -20°C
Benzylamin	64		65	53
2-Methylbenzimidazol	nicht detektiert	nicht detektiert	nicht detektiert	nicht detektiert
3-Indoilmethylketon	100		72	52
Isopropylamin	90		49	47
Piperidin	90		85	80
Pyrrolidin	83		92	82

Tabelle B6. Wiederfindungsgrade (W) verschiedener Stickstoffverbindungen bei Konservierung mit Natriumazid

	W für Leitungswasser in %		W für Kläranlagenablauf in %		
	Methanol-Extrakt CH-Phase	Methanol-Extrakt C18-Phase	Methanol-Extrakt CH-Phase	Methanol-Extrakt C18-Phase	Dioxan-Extrakt C18-Phase
Isopropylamin	0	0	0	10	4
3-Indoymethylketon	12	6	65	3	0
Piperidin	0	0	0	0	0
1-Methylpiperazin	0	0	0	0	0
Pyrrolidin	0	0	0	0	0
Benzylamin	12	5	0	0	0



Scan 313 (16,997 min) von Probe E1

Scan 400 (21.446 min) von Referenzlösung mit Benzothiazol

Übereinstimmung mit dem Vergleichsspektrum 91%

Übereinstimmung mit dem Vergleichsspektrum 85%

Abbildung B1: Scan von Probe E1 und Referenzlösung mit Benzothiazol bei 17,1 min

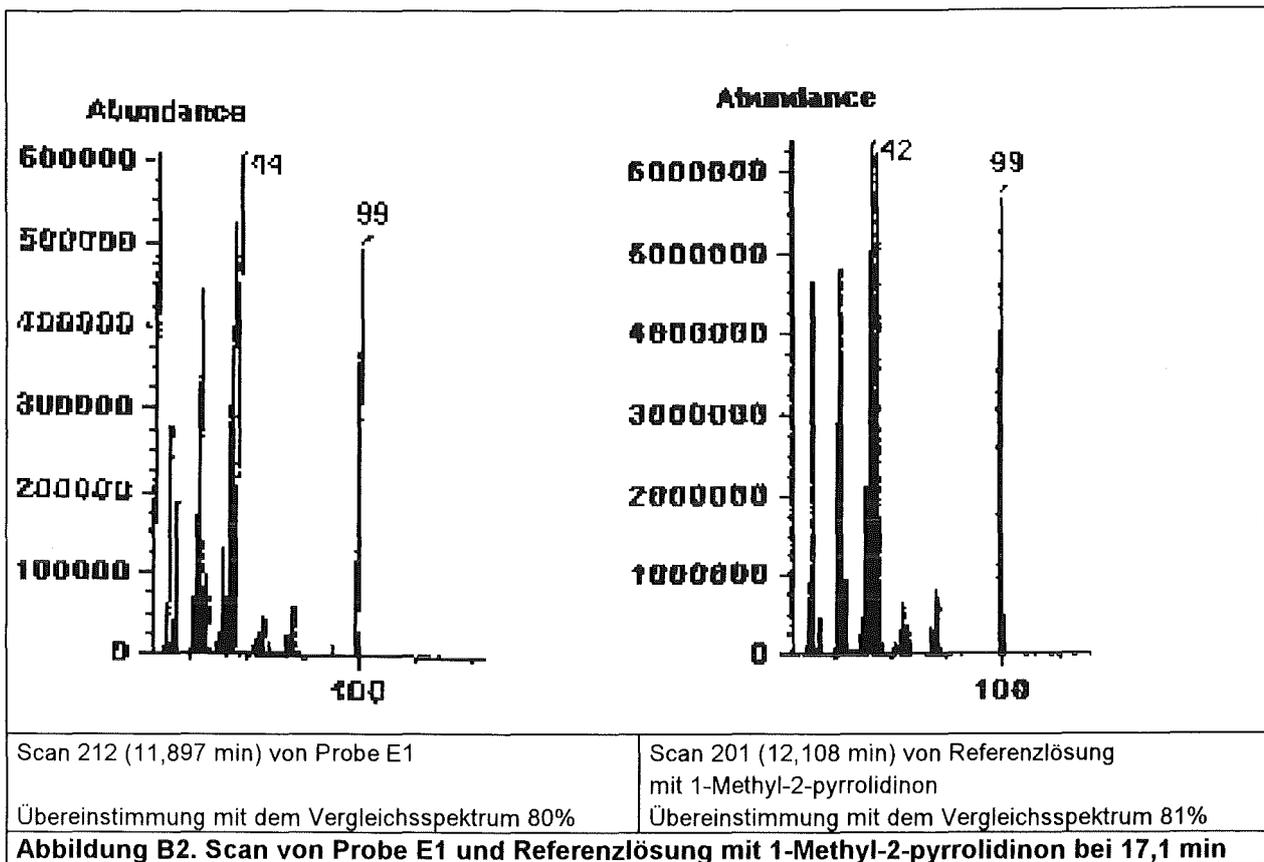


Tabelle B7. Zusammenstellung der Daten zur Charakterisierung der Probenaufarbeitungen

Proben- aufarbeitung	Zeitpunkt der Probenahme	DOC* des 0,45 µm Filtrates in mg/l	DON des 0,45 µm- Filtrates in mg/l	pH-Wert bei Probenahme	Anreicherungs- methode	Konzentrie- rungsfaktor
A1	18.8.92	7.	-	7.4	U	2000
B1	16.2.93	6.7±0.2	1.7±1.5	7.8	W	20000
B2	16.2.93	1000 Dalton Filtrat: 4.5±0.2	-	7.8	X	20000
C1	18.2.92	7.4	-	7.4	X	1000
D1	10.3.93	11.3±0.2	3.2±1.7	7.8	Y	4000
E1	10.4.93	8.1±0.2	3.1±1.2	7.7	Y	20000
F1	14.4.93	8.0±0.2	2.7±0.4	7.9	Y	20000
D2	10.3.93	11.3±0.2	3.2±1.7	7.8	Z	4000
E2	10.4.93	8.1±0.2	3.1±1.2	7.7	Z	20000
F2	14.4.93	8.0±0.2	2.7±0.4	7.9	Z	20000

* Messung des DOC erfolgte, wie unter A4, Anhang A beschrieben.

Tabelle B8. Bei der Anwendung des PBM-Algorithmus auf GC/MS Chromatogramme von Probenaufarbeitungen mit Kläranlagenauslauf ausgegebene Stickstoffverbindungen

Y [%]: Ausgegebene Übereinstimmungszahl in % bei Anwendung des PBM-Algorithmus

Eluenten : M = Methanol, D= Dioxan, H = Hexan

Z : Chromatographische Bedingungen nach Tabelle A10 (Anhang A)

Ü: Übereinstimmung mit dem Stoffspektrum, das von anderen Autoren identifiziert wurde

Ell: Ellis, E: Elsässer, G, Gulyas (Tabelle2)

X : Angaben zur Probenaufarbeitung nach Tabelle B7 (Anhang B)

	Substanz	Ü	Eluent	Y[%]	X	Z
1	2-Phenanthrenamin 9,10-dihydro-7-nitro		M	87	A1	2
2	Benzenacetonitril, .alpha.-(benzoyloxy)-4-chloro-		M	83	A1	2
3	1-H-Indol, 2-(1,1-dimethylethyl)		M	70	A1	2
4	9-Fluorenon, 2-amino-3-nitro		M	54	A1	2
5	Piperazin, 3-butyl 2,5-dimethyl		M	86	A1	2
6	Benzenamin,4-(1,1-dimethylethyl)-2,6-dinitro		H	50	A1	2
7	Acridin-9-methyl		M	91	A1	2
8	6,7-Dihydro-2-dimethylamino-4H-thiazolo(3,2-a)-1,3,5-triazin		M	70	A1	2
9	Benzenamin,4-(1,1-dimethylethyl)-2,6-dinitro		M	90	A1	2
10	3-Methyl-6,7-benzoisoquinolin		M	77	A1	2
11	1,2-Benzothiazol-3(2H)one-2-methyl-1,1-dioxid		M	80	A1	2
12	Ethanon-1H-(1H indol-3yl)		M	91	A1	2
13	2-Butenamid, N-ethyl-N-(2-methylphenyl)-		M	30	B1	1
14	Acridin, 9-methyl		M	87 64	B1	1 2
15	1-H-Indol,2-phenyl (1H)		M	70	B1	1
16	Acetamid, 2,2-dichloro		M	25	B1	1
17	Pyrido[3,2-d]pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion		M	52	B1	3
18	Thiazolidin		M	53	B1	3
19	1-Propanol,-(dimethylamino)		M	59	B1	3
20	Diaziridinon, bis(1,1-dimethylpropyl)		M	41	B1	2
21	2H-Azirin, 2,3-diphenyl		M	30	B1	2
22	2(3H)-Benzofuranon,3-[3-dimethylamino]2-propenyl		M	38	B1	2
23	Formamid, N-ethyl-N-phenyl-		M	50	B1	2
24	3,5-Pyrazolidindion, 4-butyl-1-phenyl-		M	32	B1	2
25	Benzen, 1-isocyanato-3-methoxy		M	58	B1	2
26	Caprolactam		M	90	B2	2
27	2-Pyrrolidinon-1-methyl	G	M	90 95 43	B2	7 2 6
28	Pyridin, 4-[(1,1-dimethylethyl)thio]		M	80	B2	2
29	Formamid,N,N-diocetyl		M	83	B2	2
30	Thiazol, 2-ethyl-5-methyl		M	47	B2	2

31	Dodecenamid,N,N-bis(2-hydroxyethyl)		M	95 95	B2	4 2
32	Acridin, 9-methyl		M	93 81	B2	2 4
33	2-Pyrrolidinon,1-methyl	G	M	95 43	B2	2 4
34	Dodecanamid		M	91 80	B2	4 5
35	Butenamid, N-ethyl-N-(2-methylphenyl)-		M	93	B2	5
36	2(5H)-Thiophenon, 5-methyl		M	35	B2	6
37	Piperidin, 1,2,6-trimethyl-, cis		M	30	B2	6
38	Propanal, 2-methyl-, dimethylhydrazon		M	37	B2	6
39	Thiazol, 4-ethyl-2-propyl-		M	58	B2	6
40	Pyridin,3-(butylthio)		M	46	B2	6
41	Benz[c]acridin-7,9-dimethyl-		M	47	B2	6
42	Phosphonic acid, (1-amino-2-methylpropyl- bis(trimethyl), ester		M	44	B2	6
43	Methimazol		M	64	B2	6
44	Pyrido[3,2-d]pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion		M	49	B2	6
45	Hydrazin, 1-methyl-1-(2-propenyl)		M	47	B2	6
46	Pyrrazoindol		M	46	B2	6
47	Thieno[3,2-c]pyridin		M	38	B2	6
48	Pyrimidin, 2-methyl-4-phenyl		H	47	B2	4
49	Pyrrolo[1,2-b][1,2,4]oxadiazol-2(1H)-thion		H	49	B2	4
50	Heptanamid, 4-ethyl-5-methyl-	E	H	72	B2	4
51	Pyridin, 2-(methylthio)-3,6-diphenyl-		H	35	B2	4
52	1H-Phenantro[9,10-d]imidazol-2-amin		H	50	B2	4
53	1,2,4-Oxadiazol-3-amin,N,5-diphenyl-		H	45	B2	4
54	Hexadecanamid		H	64	B2	4
55	2(3H)-Benzofuranon, 3-[3-(dimethylamino)-2-propenyl]		H	45	B2	4
56	3-Pyridinmethanol, 4,5-dihydroxy-6-methyl		H	38	B2	4
57	2-Naphturic Acid		H	59	B2	4
58	Dodecanamid		D	91	B2	7
59	Propandiamid, 2,2-diethyl-N,N,N',N'-tetramethyl-		D	47	B2	7
60	Harnstoff, N'-(4-chlorophenyl)-N,N-dimethyl-		D	64	B2	7
61	Acetamid, N-[4-(trimethylsilyl)phenyl]		D	47	B2	7
62	Quinolin, 4-methyl-2-phenyl-		D	76	B2	7
63	Methacrylamid		H	49	C1	4
64	1-Propanol, 3-(dimethylamino)		H	64	C1	4
65	Acetamid, N-6-phenylhexyl-		D	35	D1	3
66	Methylamin, N(1-methylhexyliden)		D	59	D1	3
67	Benzensulfonamid,N-butyl		D	95	D1	4
68	2-Pyrrolidinon, 1-methyl		D	32	D1	4
69	Acridin, 9-methyl		D	83 95	D1	4 5
70	2-Butenamid, N-ethyl-N(2-methylphenyl)		D	43 83	D1	4 5

71	2-Piperidinon, 1-methyl		D	47	D1	5
72	o-Toluamid, .alpha.-1-cyclohexen-1-yl		D	35	D1	5
73	Phenazincarbonitril		D	46	D1	5
74	Benzoldicarboxylic acid, 3-nitro		D	86	D1	4
75	Caprolactam		D	95	D1	4
76	Benzothiazol, thieno-[2,3-c]pyridin		D	82	D1	4
77	Benzamid,N,N-diethyl-3methyl		D	52	D1	4
78	4(1H)-Pteridinon, 2-amino	G	D	43	D1	4
79	2(2-Carbovinyl)pyridin, Trans		D	35	D1	4
80	Acetamid, N.(4-aminophenyl)-N-methyl		D	32	D1	4
81	Thiazol, 2,5-diethyl		D	30	D1	4
82	2-Penten-1-amin,N,N -dimethyl-, (E)-		D	90	D1	4
83	Pyridin, (3,4-dihydro-2H-pyrrol-5-yl)		D	43	D1	4
84	Benzonitril, 2,4-dimethoxy		D	30	D1	4
85	Methylamin, N(1-methylhexyliden)		M	59	E1	3
86	2-Naphtalenol, 8-amino		M	72	E1	3
87	2-Butenamid, N-ethyl-N-(2-methylphenyl)-		M	94	E1	5
88	Acridin, 9-methyl		M	80	E1	5
89	Caprolactam		M	87	E1	5
90	2-Pyrrolidinon, 1-methyl	G	M	47	E1	5
91	Aziridin, 2-methyl-3-(1-methylethyl)-trans		M	94	E1	5
92	Acetamid, N-(aminocarbonyl)		M	64	E1	5
93	Acetamid		M	35	E1	5
94	Guanidin, N,N-dimethyl-		M	38	E1	5
95	Methacrylamid		M	38	E1	5
96	2-Piperidinon, 1-methyl		M	41	E1	5
97	Benzensulfonamid, N-butyl-	G	M	43	E1	5
98	1H-4-Azacycloprop[cd]inden, octahydro-		M	32	E1	5
99	Pyrido[2,3]pyridazin-5-(6H)-thion		M	43	E1	5
100	Benzenamin, 4-(phenylazo)-		M	60	E1	5
101	Piperidinol		M	38	E1	5
102	Phenazincarbonitril		M	30	E1	5
103	Propandiamid		M	38	E1	5
104	1-Azabicyclo[2.2.2]octan, 4-methyl-		M	41	E1	5
105	Benzolsulfonamid,N,N,4-trimethyl-		M	48	E1	5
106	Butandion, monooxim		M	37	E1	5
107	Propanoic acid, 2(-aminooxy)		M	30	E1	5
108	Pyridin, 3-butyl-1-oxid		M	43	E1	5
109	4-Piperidincarboxylic acid, 4-phenyl-		D	35	E1	6
110	Morpholin,4,4'-ethenyliden-bis-		D	49	E1	6
111	Piperazon, 3-butyl-2,5-dimethyl-		D	37	E1	6
112	Piperazin, 1, 4-dimethyl		D	38	E1	6
113	Benzothiazol	EII,G	D	87	E1	6
114	Heptanamid, 4-ethyl-5-methyl-	E	D	90	E1	6
115	2-Pyrrolidinon, 1-methyl	G	D	83	E1	5
116	Caprolactam		D	64	E1	5
117	Piperidin, 2,6-dimethyl		D	38	E1	5

118	2-Methyl-1-pyrrolin		D	43	E1	5
119	Azocin, octahydro		D	43	E1	5
120	1H-Pyrrol-2-carboxaldehyd		D	49	E1	5
121	Pyridin, 3-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)-, (S)		M	94	F1	5
122	Acridin,9-methyl		D	94	F1	6
123	Benzolsulfonamid, N-butyl-		D	91	F1	6
124	Caprolactam		D	85	F1	6
125	Pyridin, 4-ethenyl-		D	96	F1	6
126	2-Butenamid, N-ethyl-N-(2-methylphenyl)		D	93	F1	6
127	Benzaldehyd, 4-methoxy-, oxim		D	33	F1	6
128	9-Octadecenamid, N,N-dimethyl		D	97	F1	6
129	1,2-Benzisothiazol		D	58	F1	6
130	Thiazol, 4,5-dihydro-2-methyl		D	30	F1	6
131	1H-Benzotriazol, 4-methoxy-		M	93	D2	4
132	4(1H)-Pteridinon, 2-amino	G	M	50	D2	4
133	Benzolmethanol, 2-(2-aminopropoxy)-3-methyl		M	38	D2	4
134	4,6-Dimethyl-5H-1,3,5-dithiazin		M	50	D2	4
135	3-Pentanon, dimethylhydrazon		M	43	D2	4
136	2,4(1H,3H)-Pyrimidinon, 5-nitro		M	32	D2	4
137	1,2,3-Oxadiazolin-5-on,3-(4-nitrophenyl)		M	50	D2	4
138	Acridin, 9-methyl		M	90	D2	4
139	Thiosulfuric acid, S-(2-aminoethyl) ester		M	90	D2	4
140	9-Octadecenamid,N,N-dimethyl		M	97	D2	4
141	Benzensulfonamid, N-butyl-		M	81	D2	4
142	Piperidin, 1,2-trimetyl-, cis		M	80	D2	4
143	Butenamid, N-ethyl-N-(2-methylphenyl)-		M	42	D2	4
144	Benzothiazol	G, EII	D	30	E2	5
145	2-Butenamid, N-ethyl-N-(2-methylphenyl)		D	59	E2	5
146	4(1H)-Pteridinon, 2-amino	G	D	43	E2	5
147	2(1H)-Naphtalenon-4a-methyl-7-(1-methyl)		D	82	E2	5
148	2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-on		D	70	E2	5
149	Pentanol, 5-amino		D	52	E2	5
150	Benzamid, 2-methyl-		D	35	E2	5
151	1-Butenamin, N-pentyliden		D	38	E2	5
152	Pyridin, 2-butyl-, oxid		D	43	E2	5
153	Butanoic acid, 2-aminoxy		D	43	E2	5
154	Propanamid, N-acetyl-		D	38	E2	5
155	2-Propanol, 1-amino		D	59	E2	5
156	5-Chloro-2-methyl-3-(2H)-isothiazolon		D	38	E2	5
157	Benz[c]acridin, 7, 8-dimethyl		D	46	E2	5
158	Pyridin, 2-methoxy		D	35	E2	5
159	Benzenamin, 2-methoxy-5-nitro		D	30	E2	5
160	Benzen, 1-azido-4-nitro		D	35	E2	5
161	Methacrylamid		D	35	E2	5
162	1,2-Hydrazindicarboxaldehyd		D	32	E2	5

163	Pyridin, 4-ethenyl		D	38	E2	5
164	1H-Isoindol-1,3(2H)-dion, 2-hydroxy.		M	35	E2	3
165	5-(Phenylsulfonyl)dihydro-1,3,5-dioxazin		M	38	E2	3
166	Methylamin, N(1-methylhexyliden)		M	59	E2	3
167	Thiosulfuric acid, S-(2-aminoethylester)		M	90	E2	4
168	Benzolsulfonamid, N-butyl	G	M	81	E2	4
169	Acridin, 9-methyl		M	90	E2	4
170	1H-Benzotriazol, 4-methoxy-		D	93	F2	6
171	4(1H)-Pteridinon, 2-amino	G	D	50	F2	6
172	Benzenmethanol, 2-(2-aminopropoxy)-3-methyl		D	38	F2	6
173	4,6-Dimethyl-5H-1,3,5-dithiazin		D	50	F2	6
174	3-Pentanon, dimethylhydrazone		D	43	F2	6
175	2,4(1H,3H)-Pyrimidinon, 5-nitro		D	32	F2	6
178	1,2,3-Oxadiazolin-5-on,3-(4-nitrophenyl)		D	50	F2	6
178	Acridin, 9-methyl		D	90	F2	6

Literaturverzeichnis

- [1] Elsässer, W.: Charakterisierung organischer Stoffe niederer molarer Masse in Abläufen kommunaler Kläranlagen, Dissertation, Universität Karlsruhe (1989)
- [2] Clark, L.B., Rosen, R.T., Hartman, T.G.: Determination of nonregulated pollutants in three New Jersey publicly owned treatment works (POTW's), *Research Journal WPCF*, Volume 63, 104-113, (1991)
- [3] Gulyas, H., Reich, M., Eickenhoff, H.P., Holst, H.J., Sekulov, I.: Identifizierung organischer Einzelsubstanzen in Abläufen biologischer Kläranlagen, *Gas-und Wasserfach*, 134, 8, (1993)
- [4] Walle, T., Ehrson, H.: Quantitative gaschromatographic determination of picogram quantities of amino and alcoholic compounds by electron capture detection, *Acta Pharm. Suecica*, 7, 389-406, (1970)
- [5] Merck, *Chemikalienkatalog*, Darmstadt (1994)
- [6] Sabbioni, G., Wild, D.: Quantitative Structureactivity relationships of mutagenic aromatic azides and amines, *Carcinogenesis*, 13,4, (1992)
- [7] Chudoba, V.J., Tueck, F., Lischke, P.: Isolierung und Identifizierung organischer Reststoffe aus der Produktion von Belebtschlamm-Mikroorganismen, *Z.f. Wasser- und Abwasserforschung*, 4, (1975)
- [8] Keller, J.V., Leckie, J.O., McCarty, P.L.: Investigation of soluble organic nitrogen compounds in municipal secondary effluent, *Journal WPCF*, 2522-2529, (1978)
- [9] Parkin, G.F., McCarty: A Comparison of the Characteristics of Soluble Organic Nitrogen in Untreated and Activated Sludge Treated Wastewaters, *Water Research*, 15, 139-149, (1980)
- [10] Legube, B., Dore, M.: Changes in the Chemical Nature of a Biologically Treated Wastewater during Disinfection by Ozone, *Ozone, Science and Engineering*, 9, 66, (1987)
- [11] Wagott, A., Britscher, H.V.: Analysis of the organic Carbon Content of Sewage Effluent. General and Specific Group Analysis, *Water Research Center Stevenage, Tech. Rep. 29*, (1976)
- [12] Scully, F.E., Howell, G. D., Penn, H.H. and Mazina, K.: Small Molekular Weight Organic Amino Nitrogen Compounds in Treated Municipal Waste Water, *Environ. Sci Technol.*, 22, 1186-1190, (1988)
- [13] Pitt, W.W., Jolley, R., Katz, S.: An automated Analysis of individual refractory Organics in polluted Water, *NTIS Rep. PB239774*, (1974)
- [14] Hejzlar, J., Chudoba, J.: Micobial Polymers in the aquatic environment, *Water Res.*, 20, 1209, (1986)
- [15] Paxeus, N., Robinson, P., Balmer, P.: Study of Organic Pollutants in Municipal Wastewater in Göteborg, Sweden, *Wat.Sci.Tech. Vol.25, No.11*, 259-256, (1992)
- [16] Ellis, D.D. et al.: Organic Constituents of Mutagenic Secondary Effluents from Wastewater Treatment Plants, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 11, 373, (1982)
- [17] Kacvinsky, J.R., Saitoh, J.K., Fritz, J.S.: Cation-Exchange Concentration of Basic Organic Compounds from Aqueous Solution, *Anal.Chem.*, 55, 1210, (1983)
- [18] Mills, G.C.: Removal of Salts from Purines, Pyrimidines and Nucleosides using an XAD-4 Resin, *Journ. of Chrom.*, 242, 103, (1982)
- [19] Junk, G.A. et al.: Use of Macroreticular Resins in the Analysis of Water for Trace, *Journ. of Chrom.*, 99, 745-762, (1974)

- [20] Sciacca, M.A., Duncan, G.F.: Simultaneous Quantitation of Buspirone and 1-(2-Pyrimidyl)Piperazine in Human Plasma and Urine by Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography*, 428,265-274, (1988)
- [21] Sherma, J. Dallasta, L.: Determination of Cyclohexylamine in Water by Solid-Phase Extraction and Quantitative High Performance Thin Layer Chromatography, *Journal of Liquid Chromatography*, 9(16), 3439-3446, (1986)
- [22] Lambrechts, M., Rasmussen, K.,E.: Use of Bonded- Phase Silica -Sorbents for Rapid Sampling of Impurities in Illicit Amphetamine for HPLC-Analysis, *J. of Chromatography*, 331,(1985).
- [23] Falkowski, A.,J., Wei, R.: Optimized Isocratic Conditions for the Simultaneous Determination of Serotonin Precursors and Metabolites by Reversed-Phase-High-Pressure Liquid Chromatography with Electrochemical Detection, *Analytical Biochemistry* 115, 311-317, (1981)
- [24] Oehmichen,U., Aimene,A.: Spurenbestimmung von substituierten Anilinen, Kurzfassungen zur Jahrestagung 1991 der Fachgruppe Wasserchemie, Poster 12 (1991)
- [25] Weber, W.H.: Probenvorbereitung für die Bestimmung von Pflanzenbehandlungsmitteln und ähnlichen Stoffen aus Grund- und Trinkwässern mittels Festphasen-Extraktion, *Chemische Landesuntersuchungsanstalt Sigmaringen, LIT 223*
- [26] Walle,T., Ehrsson,H.: Quantitative Gaschromatography of Picogram Quantities of Amines as 2,4-Dinitrophenyl derivatives, *Acta. Pharm. Succi*a, 5, 367, (1968)
- [27] Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., Trussel, R:R: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17th Edition, Part 6630, (1989)
- [28] Levine, A.D., Tchobanoglous, G., Asano, T.: Charakterization of size distribution of contaminants in wastewater: treatment and reuse implications, *Journal WPCF*, 57, 865, (1985)
- [29] Horne, K.C.: Sorbens-Extraktionstechnologie, *Analytchem International* (1985)
- [30] Funk,W.: Konservierung von Proben zur späteren Analytik im Laboratorium, *Vom Wasser*, 75-105, (1990)
- [31] Gudernatsch, H.:Probennahme als wesentlicher Bestandteil der Wasser-und Abwasseranalytik, *Vom Wasser*, 95-105, (1989)
- [32] Rilley, R.G., Garland, T.R., Shiosaki, K., Mann, D.C., Wildung, R.E.: Alkylpyridines in Surface Waters, Groundwaters and Subsoils of a Drainage Located Adjacent to an Oil Shale Facility, 15, 6, (1981)
- [33] Hewlett Packard, *Chromatography Users Catalog*,64, (1993)
- [34] Haas, R., Storch, G.: Konzept zur Untersuchung von Rüstungsalzlasten, *Fresenius Z.anal Chem.*, 335,839, (1989)
- [35]Finkle, B.S., Taylor, D.M.: A GC/MS Reference Data System for the Identification of Drugs of Abuse, *J.of Chromatographic Science*,10,313, (1972)
- [36] Lee,H.-B., Perfluoro- and Chloroamidederivatives of Aniline and Chloraniline, *J.of Chromatography*, 457, 267-278, (1988)
- [37] Coutts, R.T., Hargesheimer, E.E., Pasutto, F.M., Baker, G.B.: Analysis of Aniline and Aminophenols in Aqueous Solutions using Electron Capture Gas Chromatography, *J. of Chromatographic Science*, 19, 222-225, (1981)

- [38] Felice, L.J.: Determination of Alkyl Anilines and Alkyl Pyridines in Solvent Refined Coal Distillates and Aqueous Extracts by Gaschromatography / Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 54, 869-872, (1982)
- [39] Koga et al.: Determination of Trace Aliphatic Amines with 2,4-Dinitrophenylamine Derivatives by GC/MS, *Bunseki Kagaku*, 30,11, 745-750, (1981).
- [40] Kobelt, R., Wiesener, G.W., Kühn, R.: A Simple Preparation for the Simultaneous Assay of Biogenic Amines and Metabolites from Rat Heart, Plasma, Blood Cell Components and Urine by GC-MS, *Journal of HRC&GC*, VOL.4, 520, (1981)
- [41] Knobel, K.P.: Untersuchungen über das Extraktionsverhalten und Diafiltrationsverhalten von organischen Säuren des Wassers, Dissertation, Universität Karlsruhe (1982)
- [42] Link, J., Gilbert, E., Eberle, S.H.: Untersuchungen über die Art und Menge der Reststoffe in den Abläufen biologischer Kläranlagen, Sonderdruck aus VOM WASSER, 72.Band (1989)
- [43] Eberle, S.H., Wasserchemievorlesung: Weitergehende Abwasserreinigung, Universität Karlsruhe(1994)
- [44] Schöberl, P., Bock, K.P., Marl, Huber, L.: Ökologisch relevante Daten von Tensiden in Wasch- und Reinigungsmitteln, Sonderdruck 5263, erschienen in *Tenside Detergents*, 86-107, Ausgabe März/ April (1988)
- [45] Belitz, H.D., Grosch, W.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer Verlag, Berlin, (1987)
- [46] Gauducheau, Ch., Gilbert, E., Eberle, S.H.: Einfluß der Ausgangskonzentration organischer Stoffe im Wasser auf die Wirkung der Ozonung, *Z. Wasser-Abwasser-Forschung*, 20,6-12, (1987)
- [47] Pitter, P., Lischke, P.: Biochemische Abbaubarkeit organischer Stoffe, *Acta hydrochim. hydrobiol.*, 17, 217-226, (1989)
- [48] Sigma, Hinweis auf der Verpackung
- [49] Koppe, P., Stozek, A.: Kommunales Abwasser, Vulkan Verlag, Essen, (1986)
- [50] Ugrinovits, M.: Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl, überarbeitete Auflage, Büchi Laboratoriumstechnik, (1988)
- [51] Day, E.W., Golab, Jr., Koons, J.R.: Determination of Micro Quantities of C1-C4 Primary and Secondary Amines by Electron Affinity Detection, *Analytical Chemistry*, Vol 38,8, (1966)
- [52] Grob, K.: On-column Injection in Capillary Gas Chromatography, Basic Technique, 2nd Edition, Hüthig Verlag, Darmstadt (1991)