Entwicklung von Analysenverfahren und Referenzmaterialien für die Bestimmung von Phenolen in umweltrelevanten Matrices

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Chem. Christian Lüders
geboren am 10. November 1970 in Ratzeburg

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h.c. H. Meyer

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. J.P. Rabe

Gutachter: 1. Prof. Dr. A. Zschunke
2. Prof. Dr. M. Linscheid
3. Prof. Dr. W. Engewald

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Oktober 1999

Inhalt

1 Einleitung ... 4

2 Vorkommen und Stoffeigenschaften der Phenole ... 5

3 Untersuchungstechniken in der Phenolanalytik ... 7

3.1 Extraktionstechniken ... 8
3.2 Instrumentelle Analysenverfahren ... 11
3.2.1 HPLC ... 11
3.2.1.1 HPLC-MS ... 15
3.2.1.2 HPLC-NMR ... 20
3.2.2 GC ... 21
3.2.3 Kapillarelektrophorese ... 23
3.2.3.1 Meßprinzipien der Kapillarelektrophorese ... 25
3.2.3.2 Kapillarzonenelektrophorese ... 29
3.2.3.3 Micellare Elektrokinetische Chromatographie ... 30
3.2.3.4 Anreicherungstechniken ... 39

4 Entwicklung neuer Analysenverfahren für die Phenolanalytik ... 43

4.1 Extraktionstechniken ... 44
4.1.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion ... 44
4.1.2 Festphasenextraktion ... 45
4.1.3 Beschleunigte Lösemittelextraktion ... 46
4.2 Instrumentelle Analysenverfahren ... 47
4.2.1 HPLC-MS ... 47
4.2.1.1 HPLC-ESI-MS ... 48
4.2.1.2 HPLC-APCI-MS ... 53
4.2.2 HPLC-NMR ... 63
4.2.3 GC-MS ... 71
4.2.3.1 GC-LRMS ... 71
4.2.3.2 GC-HRMS ... 76
4.2.3.3 Validierung der GC-MS-Verfahren ... 78
4.2.4 Kapillarelektrophorese ... 85
4.2.4.1 Kapillarzonenelektrophorese ... 85
4.2.4.2 Micellare Elektrokinetische Chromatographie ... 87
4.2.4.3 Validierung des CE-Verfahrens ... 91
4.2.4.4 Durchführung eines Ringversuches ... 95

5 Referenzmaterialien ... 101

6 Zusammenfassung ... 106

7 Anhang ... 109

8 Literaturverzeichnis ... 114

Häufig verwendete Abkürzungen

APCI	„Atmospheric Pressure Chemical Ionization“
API	„Atmospheric Pressure Ionization“
ASE	Beschleunigte Lösemittelextraktion
CE	Kapillarelektrophorese
CI	Chemische Ionisation
CMC	Kritische Micellare Konzentration
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
DAD	Dioden-Array-Detektor
DCP	Dichlorphenol
DMP	Dimethylphenol
DNP	Dinitrophenol
EI	Elektronenstoß Ionisation
EOF	Elektroosmotischer Fluß
ESI	„Electrospray Ionization“
GC	Gaschromatographie
HPLC	Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie
LRMS	Niederauflösende Massenspektrometrie
MEKC	Micellare Elektrokinetische Chromatographie
MeOP	Methoxyphenol
MID	„Multiple Ion Detection“
MP	Methylphenol
MS	Massenspektrometrie
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektrometrie
NP	Normalphasen
NP	Nitrophenol
PCP	Pentachlorphenol
RP	Umkehrphasen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIR	„Single Ion Recording“
SPE	Festphasenextraktion
SPME	Festphasenmikroextraktion
TCP	Trichlorphenol
TMP	Trimethylphenol
TMS	Trimethylsilyl-
TNP	Trinitrophenol
TNT	Trinitrotoluol

1 Einleitung

Phenolische Verbindungen gelangen durch eine Vielzahl industrieller Prozesse in die Umwelt. Viele dieser Substanzen sind bereits bei Konzentrationen im Spurenbereich für Menschen und Mikroorganismen toxisch[1] und können in Abhängigkeit von ihrer chemischen Stabilität jahrelang im Ökosystem präsent bleiben. Einige Verbindungen sind cancerogen bzw. mutagen. Aus diesen Gründen werden ausgewählte phenolische Verbindungen in den Prioritäts-Schadstofflisten der US- „Environment Protection Agency“ (EPA) und der Europäischen Union (EU) aufgeführt. Ihre Analytik in den Umweltmatrices Wasser und Boden ist von besonderer Dringlichkeit.

Ziel der Arbeit war es, auf Basis moderner Analysentechniken (Kapillarelektrophorese, Chromatographie, Kopplungstechniken der Chromatographie sowohl mit der Massenspektrometrie als auch der Kernmagnetischen Resonanzspektrometrie) neue spezifische Analysenverfahren mit einer über internationale Normen hinausgehenden Substanzpalette zu entwickeln, zu validieren und miteinander zu vergleichen. Dazu wurden Phenol-Modellgemische definierter Konzentration sowohl in Wasser als auch in organischen Lösungsmitteln hergestellt und mit den genannten Techniken untersucht. Besonders geeignet für die Phenolanalytik zeigte sich das auf Basis der Kapillarelektrophorese entwickelte Verfahren, dessen Kenngrößen in einem Ringversuch abgesichert wurden. Die Kapillarelektrophorese ist durch Schnelligkeit, Umweltfreundlichkeit und geringen Kostenaufwand gekennzeichnet. Damit hat diese Technik alle Voraussetzungen, in der Umweltanalytik stärker als bisher genutzt zu werden. Die für den Verfahrensvergleich und zur Durchführung des Ringversuches ausgewählten Modellgemische wurden bezüglich Stabilität, Homogenität und reproduzierbarer Herstellung geprüft. Damit sind sie als synthetische Referenzmaterialien zur laborinternen Qualitätssicherung, zur Kalibrierung, zur Methodenbewertung und zum Laboratoriumsvergleich (Ringversuche, Eignungsprüfungen, Akkreditierung) einsetzbar. Verschiedene Extraktionstechniken wurden optimiert, um an realen Matrixproben die Anwendbarkeit der entwickelten Verfahren zu prüfen.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Analysenverfahren bilden zusammen mit den Ergebnissen des Ringversuches die Grundlage für die Herstellung und Zertifizierung von natürlichen Matrix-Referenzmaterialien und fließen außerdem in die Normungsarbeit der Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung und des Umweltbundesamtes mit ein.

2 Vorkommen und Stoffeigenschaften der Phenole

Chlor-, Nitro- und Alkylphenole[2,3,4] werden als Pflanzenschutzmittel[5] (Fungizide, Insektizide und Herbizide) in großen Mengen in der Land- und Forstwirtschaft[6] eingesetzt[7] und gelangen in das Ökosystem. Über Nahrungsmittel und Hautkontakt (Leder- und Textilien) können die toxischen Substanzen auch direkt in den menschlichen Organismus gelangen[8].

Phenolderivate gelangen als Inhaltsstoffe von Wasch- und Reinigungsmitteln sowie Kosmetika über den Abwasserkreislauf[9] in die Umwelt. Die Waschmittel enthalten große Mengen an Tensiden, bei deren Abbau Alkylphenole entstehen. Diese stehen im Verdacht östrogene Eigenschaften zu haben und die männliche Fertilität zu hemmen (Nonylphenol[10]).

Auch die Papier- und Zellstoffindustrie emittiert über das Abwasser große Mengen an phenolischen Verbindungen, die bei Prozessen der Bleiche (vorwiegend Chlorphenole) eingesetzt werden. Obwohl mittlerweile ein Großteil der Bleichmittel durch umweltfreundlichere Substanzen wie Wasserstoffperoxid ersetzt wurde, ist die Freisetzung von Phenolen noch immer ein Problem und bedarf wirksamer Kontrolle. Zahlreiche Phenolderivate sind auch in Öl, Braunkohle, Steinkohle und Teer sowie in deren Verarbeitungsprodukten enthalten (besonders Alkylphenole[11]). Diese Substanzen finden sich dort, wo die Umwelt mit Raffinerieprodukten kontaminiert ist. Auf Standorten der ehemaligen Rüstungsindustrie[12,13] (Rüstungsaltlasten) ist der Boden häufig mit Erzeugnissen der Sprengstoffproduktion[14] und deren Abbauprodukten[15,16] belastet (Nitroaromaten[17], Nitrophenole, Aminophenole und kondensierte Produkte). Die Substanzen gelangen mit dem Regen in den Wasserkreislauf[18] und können so Bioorganismen schädigen[19].

Phenolische Verbindungen gelangen jedoch auch auf natürlichem Weg in die Umwelt. So werden beispielsweise bei der Hydrolyse von Huminstoffen verschiedene Phenolderivate freigesetzt.

Die biologische Wirksamkeit phenolischer Substanzen ist auf ihre stoffspezifischen Eigenschaften zurückzuführen. Phenolderivate können kovalente Bindungen zu organischen Zellbestandteilen (Proteine, Lipide oder DNA) ausbilden. Deshalb sind die Substanzen einerseits hochwirksame Pflanzenschutzmittel (z.B. Pentachlorphenol), schädigen andererseits aber bei Kontakt auch Menschen und Tiere. Viele der Substanzen sind

langfristig nicht vollständig abbaubar und verbleiben deshalb jahrelang in den Umweltmatrices Wasser und Boden[20]. Anhand der Toxizität wurden in Gesetzen (z.B. Chemikaliengesetz) und Verordnungen (z.B. Chemikalienverbotsverordnung) Grenzwerte für die maximal tolerierbaren Konzentrationen der Substanzen in einer definierten Matrix festgelegt.

Die Methoden der Phenolanalytik werden durch die physikochemischen Eigenschaften der Analyte bestimmt. Polarität, Lipophilie (log p) und Acidität (pKs-Wert) sind Eigenschaften, die für die Extraktion[21] der Analyte aus der Umweltmatrix und ihre Trennung entscheidend sind. Je polarer die Substanzen sind, desto leichter können sie an der Matrix adsorbiert werden und desto komplizierter wird die Extraktion.

Dampfdruck, Siedepunkt, Zersetzungstemperatur und Henry-Konstante (Pa x m^3/mol) müssen besonders bei Prozessen mit erhöhter Temperatur (z.B. GC, ASE) beachtet werden.

In Tabelle 1 sind einige für die Analytik wichtige Eigenschaften[22] für ausgewählte Phenolderivate aufgelistet[23,24,25].

Tabelle 1: Physikochemische Eigenschaften ausgewählter Phenole

Phenolverbindung	Molgewicht /(g/mol)	Schmelzpunkt /°C	Siedepunkt /°C	pKs bei 25°C
Phenol	94,11	41	182	9,9
2-Methylphenol	108,13	31	191	10,0-10,3
3-Methylphenol	108,13	12	203	10,0
4-Methylphenol	108,13	35	202	10,2
4-Ethylphenol	122,17	45	218	10,0
2,4-Dimethylphenol	122,17	24	212	10,6
2,6-Dimethylphenol	122,17	46	203	10,6
2,4,6-Trimethylphenol	136,20	72	246	10,9
1-Naphthol	144,17	97	288	3,7
2-Naphthol	144,17	124	295	4,2
2-Nitrophenol	139,11	46	216	7,1
3-Nitrophenol	139,11	97	194	8,3
4-Nitrophenol	139,11	115	279	7,2
2,4-Dinitrophenol	184,11	114	300	4,1
2,4,6-Trinitrophenol	229,11	123	225	0,4
2-Chlorphenol	128,56	9	176	8,3-8,5
3-Chlorphenol	128,56	33	214	8,8-9,1
4-Chlorphenol	128,56	43	220	9,2-9,4
2,4-Dichlorphenol	163,00	44	210	7,7-8,1
2,4,6-Trichlorphenol	197,45	69	246	6,0-7,4
Pentachlorphenol	266,35	191	300	4,6-5,3
4-Nonylphenol	220,36	41	Zersetzung	9,9

3 Untersuchungstechniken in der Phenolanalytik

Die Analysenverfahren beschreiben Probenahme, Probenvorbereitung und analytische Gehaltsbestimmung. Durch die Probenahme soll eine entsprechend der analytischen Aufgabenstellung repräsentative Probe bereitgestellt werden. Obwohl in diesem Verfahrensabschnitt in der Regel der größte Beitrag zur Gesamtunsicherheit entsteht, wird in dieser Arbeit darauf nicht vertiefend eingegangen. Für verschiedene Matrices und Zielstellungen sind DIN-Verfahren vorgeschrieben[26].

Für die Bestimmung von Phenolen in der Matrix Boden existiert bisher noch kein analytisches Normverfahren. Für die Bestimmung von Chlorphenolen ist jedoch bereits ein ISO-Standard-Verfahren vorgeschlagen worden[27]. Das Verfahren basiert auf der Ultraschallextraktion von Chlorphenolen aus Böden, Derivatisierung der Analyte zu den entsprechenden Acetaten und Bestimmung mit Gaschromatographie und Elektronen-Einfangdetektion (GC-ECD). Die Grenzwerte, die von der EPA für phenolische Einzelverbindungen vorgegeben wurden, liegen bei 10 µg/L für Abwasser und 0,3 bis 1 mg/kg für Boden.

Ein älterer ISO-Vorschlag[28] beschreibt die Bestimmung der Phenole aus der EPA-Prioritätenliste in Boden durch Soxhletextraktion mit einem Gemisch aus Dichlormethan/ Aceton und anschließender GC-FID Detektion.

Der Grenzwert für die maximal zulässige Konzentration der Summe aller phenolischen Verbindungen in Trinkwasser beträgt in der EU[29] 0,5 µg/L. Für die Angabe von Phenolgehalten in Wasser wird in mehreren Ländern der Phenolindex[30] eingesetzt, der die Summe aller Analyte erfaßt. Da sich die verschiedenen phenolischen Verbindungen in ihrer Toxizität und Persistenz stark unterscheiden, ist die Bestimmung der Einzelverbindungen von großer Bedeutung.

In Anlehnung an die Verfahren der EPA[31,32] wurden Normvorschläge unterbreitet[33,34,35]. Die EPA-Methoden beschreiben die gaschromatographische Bestimmung von Phenolen mit Flammen-Ionisations-Detektor (FID) oder ECD (Derivatisierung) nach Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Dichlormethan. In der EPA-Testmethode 604 werden dabei 14 Phenole aus der EPA-Prioritätenliste ausgewählt. In den DIN-Entwürfen wurde die Auswahl an phenolischen Verbindungen noch erweitert (darunter auch um 4 Alkylphenole).

Um diese genormten Analysenverfahren bezüglich Selektivität, Spezifität, Empfindlichkeit, Zeit- und Kostenaufwand sowie Lösungsmittelverbrauch zu verbessern, wird weltweit intensiv geforscht. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei den Bereichen der Probenextraktion sowie den Analysentechniken der HPLC und GC mit diversen Detektionsprinzipien und den Kopplungstechniken zur MS gewidmet.
In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Analysentechniken unter besonderer Beachtung der Kapillarelektrophorese miteinander verglichen, um die Leistungsfähigkeit der Techniken für die Analytik von Phenolen zu beurteilen.

3.1 Extraktionstechniken

Extraktionstechniken haben das Ziel, Analyte vollständig und unzersetzt aus der Matrix zu entfernen. Zur Extraktion von Phenolderivaten aus flüssigen Matrices eignen sich die Techniken der Flüssig-Flüssig-Extraktion, Festphasenextraktion (SPE) und Festphasenmikroextraktion (SPME).
Bei der SPE werden die Analyte von der Matrix nach den chromatographischen Prinzipien von Adsorption und Desorption getrennt. Dabei wird mit Kartuschen gearbeitet, die mit Material gefüllt sind, das dem von analytischen HPLC-Säulen entspricht (siehe Kapitel 3.2.1), sich von diesem jedoch durch wesentlich größere Partikeldurchmesser unterscheidet. Je nach Polarität des SPE-Materials werden entweder Analyte oder Matrixbestandteile adsorbiert. Es gibt zahlreiche SPE-Materialien mit unterschiedlichen Eigenschaften und Selektivitäten bezüglich der Analyten. Für die Abtrennung der Analyte aus der Matrix Wasser[36] ist die SPE[37] sehr gut geeignet. Die Analyte werden auf dem Trägermaterial adsorbiert, während die Matrix eluiert. Dabei werden die Analyte angereichert. Durch Wechsel des Lösungsmittels werden danach die Analyte vom Trägermaterial eluiert. Die Vorteile der SPE[38] sind geringer Lösungsmittelverbrauch, einfache Automatisierbarkeit der Technik und ihre Selektivität, wobei letztere bei komplexen Matrixproben häufig zur Analytabtrennung alleine nicht ausreicht (Reinigung der Probenlösung (Clean-Up) erforderlich).
Die SPME[39] ist eine miniaturisierte Variante der SPE und kann zur Extraktion von Analyten[40] aus Wasser eingesetzt werden. Sie ist besonders gut für Gemische geeignet, die anschließend mit der GC getrennt werden, da die SPME-Fasern direkt in den Injektor des

Gaschromatographen eingebracht werden können, wo die Analyte dann durch thermische Desorption auf die Säule gegeben werden. Die Fasern bestehen aus einem Fused-Silica Material, das mit einer hochtemperaturstabilen Schicht (z.B. Polydimethylsiloxan) belegt ist (ähnlich der stationären Phasen der GC-Säulen, siehe Kapitel 3.2.2). Wird die Faser in die Analytlösung getaucht, adsorbieren die gelösten Analyte an der Faser. Diese Technik arbeitet lösungsmittelfrei und ist gut automatisierbar. Während bei der SPE das gesamte Probenvolumen extrahiert werden kann, stellt sich bei der SPME stets ein Verteilungsgleichgewicht der Analyte zwischen Adsorbens und Probe ein. Aufgrund unterschiedlicher Verteilungskoeffizienten der Analyte müssen in Abhängigkeit der gewählten SPME-Parameter die Wiederfindungsraten gesondert bestimmt werden.

Bei der Extraktion fester Matrices wie Boden und Sediment werden verschiedene Extraktionstechniken eingesetzt.

Sind die Analyte thermisch stabil, können Heißextraktionsverfahren eingesetzt werden. Hierzu zählen die Soxhletextraktion, die Mikrowellenextraktion und die Beschleunigte Lösemittelextraktion (ASE, © Firma Dionex).

Die Soxhletextraktion als eine klassische Standardtechnik zur Extraktion von festen Matrices ist Bestandteil vieler Normverfahren. Die Probe wird dabei mit dem Lösungsmittel unter Rückfluß extrahiert. Da diese Technik mit Extraktionszeiten von 4 bis 12 Stunden und mehr sehr zeitaufwendig ist und außerdem viel Lösungsmittel verbraucht, werden alternative Extraktionsverfahren bevorzugt, wenn damit vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können.

Die Mikrowellenextraktion[41] benötigt im Vergleich zur Soxhletextraktion weniger Lösungsmittel und Zeit. Durch die Mikrowellen wird die Probe gleichmäßig von innen und außen erwärmt, so daß die Extraktion besonders effizient ist. Bei der Extraktion von Sedimenten wurden im Vergleich zur Soxhletextraktion höhere Wiederfindungsraten bei geringerer Standardabweichung gefunden[42]. Bei Matrices, wie Boden mit hohem Huminstoffanteil, sind die Extraktionsausbeuten jedoch oft unzureichend, da die Analyte an der Matrix adsorbieren. Zudem können Huminstoffe durch die Mikrowellenenergie freigesetzt und zerstört werden, so daß die nachfolgende Analytik durch mitextrahierte Matrixbestandteile behindert wird, und eine Reinigung der Probenlösung (Clean-Up)

erforderlich ist. Teilweise werden die Analyte durch die Mikrowellenenergie auch selber zersetzt, wodurch Minderbefunde auftreten können.

Bei der ASE werden die Proben in druckfeste Extraktionskartuschen eingefüllt, anschließend mit Lösungsmittel gefüllt und unter erhöhten Temperatur- und Druckwerten extrahiert. Im Vergleich zur Soxhletextraktion werden oft sogar höhere Wiederfindungsraten bei gleicher Standardabweichung gefunden. Die ASE hat gegenüber der Soxhletextraktion einen wesentlich geringeren Lösungsmittelverbrauch bei deutlich kürzeren Analysenzeiten und gleicher Extraktionsausbeute[43]. Ursache dafür ist die höhere Diffusionsgeschwindigkeit der Analyte sowie das bessere Lösungsvermögen der Extraktionsmittel unter den gegebenen Druck- und Temperaturwerten. Werden die Analyte durch die hohen Temperaturen oder Drücke nicht zerstört, ist die ASE für feste Matrices wie Boden oder Holz die Technik der Wahl.

Bei der Ultraschallextraktion wird die Probe bei Raumtemperatur extrahiert. Dies ist besonders bei thermolabilen und leicht verdampfbaren Analyten unumgänglich[3]. Im Vergleich zur Soxhletextraktion ist der Bedarf an Lösungsmittel und Zeit ebenfalls wesentlich geringer. Die Extraktion polarer und basischer Verbindungen ist mit der Ultraschallextraktion jedoch problematisch, da diese Verbindungen leicht an der Matrix adsorbieren und die Extraktionsausbeuten zu gering sind. Daher ist die Ultraschallextraktion zur Extraktion phenolischer Verbindungen weniger gut geeignet.

3.2 Instrumentelle Analysenverfahren

Die Bestimmung der Konzentration an phenolischen Verbindungen in einer Matrix kann summarisch erfolgen (Summenparameter). Ein Beispiel hierfür ist ein DIN-Normverfahren zur Bestimmung von Phenolen in der Matrix Wasser (Phenolindex[30]). Die Phenole werden mit einem Reagenz (4-Aminoantipyrin) derivatisiert und über eine charakteristische Wellenlänge des Derivatisierungsproduktes mit einem Photometer bestimmt.

Die Verfahren zur Bestimmung von Summenparametern sind relativ anfällig gegen Querstörungen durch andere, chemisch ähnliche Substanzen. Da außerdem nicht alle Analyte gleich toxikologisch und ökologisch relevant sind, werden substanzspezifische Trenn- und Nachweistechniken benötigt.

Bei der Phenolanalytik sind die chromatographischen Trenntechniken der HPLC und GC vorherrschend. Gegenwärtig wird aber auch die Kapillarelektrophorese wegen ihrer hohen Trennleistung eingesetzt. Im folgenden werden diese Trenntechniken in Verbindung mit verschiedenen Detektionsprinzipien bezogen auf die Phenolanalytik beschrieben. Dabei werden die Leistungsmöglichkeiten der eingesetzten Techniken anhand eigener Untersuchungen dokumentiert. Für die kapillarelektrophoretische Trenntechnik der Micellaren Elektrokinetischen Chromatographie wurden die Micellbildungsprozesse anhand von Oberflächenspannungsmessungen untersucht.

3.2.1 HPLC

Die Techniken der Hochleistungs Flüssigchromatographie („High Performance Liquid Chromatography“, HPLC) sind für die Trennung von polaren und thermolabilen Verbindungen weit verbreitet. Ziel der Optimierung einer Trennung ist die Verbesserung der Auflösung bei möglichst kurzer Analysenzeit. Die Auflösung ist von der Selektivität und Trennleistung des chromatographischen Systems abhängig. Die Selektivität kann durch Veränderung der Eigenschaften der mobilen und stationären Phasen (z.B. Polarität, pH-Wert, Hydrophobizität, Partikelgröße, Porenvolumen) beeinflußt werden[44,45].

Typische analytische Säulen sind zwischen 60 und 300 mm lang und haben einen Innendurchmesser zwischen 2 und 4 mm. Die Trennung wird thermostatisiert bei einem Druck zwischen 50 und 250 bar durchgeführt.

Bei der Flüssigchromatographie wird unter anderem je nach Polarität der stationären Phase zwischen Normalphasen- (NP) und Umkehrphasen- (RP) Chromatographie unterschieden. Bei der NP-Chromatographie wird als stationäre Phase hochporöses Material mit großer spezifischer Oberfläche, oft Kieselgel (SiO_2) oder Aluminiumoxid (Al_2O_3), verwendet (Adsorptionschromatographie). Um die Trenneigenschaften weiter zu modifizieren, können diese Materialien durch Einbringen von funktionellen Gruppen (z.B. NO_2-, NH_3-) verändert werden. Die Analyte werden durch unterschiedlich starke Adsorption an die stationäre Phase getrennt. Als mobile Phase werden apolare Lösungsmittel wie aliphatische Kohlenwasserstoffe (z.B. n-Hexan) eingesetzt.

Bei der Umkehrphasen-Chromatographie wird die Polarität der stationären Phase durch chemische Anbindung einer apolaren Verbindung an das Füllmaterial umgekehrt. Am weitesten verbreitet ist die sogenannte ODS-Phase (von octadecyl silica) auf Kieselgelbasis. Bei diesem Material wird durch Reaktion mit Alkyldimethylchlorsilan eine lange apolare C-18 Alkylgruppe chemisch an das Kieselgel gebunden. Kommerziell sind aber auch Materialien mit anderer Alkylkettenlänge erhältlich. Die Analyte werden in diesem System durch unterschiedliche Verteilungsgleichgewichte basierend auf verschiedenen Hydrophobizitäten zwischen stationärer und mobiler Phase getrennt (Verteilungschromatographie). Als mobile Phase werden polare Lösungsmittel wie Methanol, Acetonitril und Wasser verwendet.

Die Retentionszeiten der Analyte unterscheiden sich normalerweise so stark voneinander, daß die Analyse eines komplexen Gemisches innerhalb realistischer Analysenzeiten nicht möglich ist. Der gebräuchlichste Weg zur Beeinflussung der Retentionszeiten der Analyte ist die zeitlich programmierte Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase (Lösungsmittelgradienten). Dabei ändert sich vor allem die Polarität des Lösungsmittelgemisches und somit die Löslichkeit der Analyte in der mobilen Phase, wodurch sich die Retentionszeiten verkürzen. Die Trenneigenschaften des Systems können durch Zusatz von Additiven zu den Lösungsmitteln der mobilen Phase beeinflußt werden, indem beispielsweise der pH-Wert verändert wird. Bei der Variation der Zusammensetzung der mobilen Phase muß jedoch darauf geachtet werden, daß die Detektion nicht gestört wird. So können bei der massenspektrometrischen Analyse keine unverdampfbaren Puffer eingesetzt werden, da ihre Rückstände die Einlaßsysteme verstopfen (siehe Kapitel 3.2.1.1).

Bei der Analytik von phenolischen Verbindungen ist der Einsatz von RP-Trennsäulen weit verbreitet. Säulen mit C-18 Material liefern dabei die besten Trennungen. Neben ihrer Robustheit ist die weite Verbreitung der RP-Chromatographie[46,47,48] unter anderem darauf zurückzuführen, daß die Analyte aus flüssigen polaren Matrices[49] auf das Trennsystem aufgegeben werden können. Im Bereich der Umweltanalytik[50] ist dies vor allem für die Matrix Wasser[51,52] von zentraler Bedeutung und beispielsweise bei GC-Techniken häufig (siehe Kapitel 3.2.2) nicht möglich.

Auf RP-Phasen werden die Analyte wegen ihrer unterschiedlichen Hydrophobizität getrennt. So werden z.B. Phenole mit apolaren Alkylketten unterschiedlicher Länge sehr leistungsstark separiert. Je höher dabei der Alkylanteil eines Analyten ist, desto stärker kann er mit der stationären Phase der RP-Säule wechselwirken, und desto länger wird seine Retentionszeit. Die Trennleistung des RP-Materials für verschiedene Stellungsisomere der Alkylphenole ist hingegen nicht so hoch, da sie sich in ihrer Hydrophobizität nicht wesentlich unterscheiden.

Phenole lassen sich auch mit der NP-Chromatographie trennen. Dabei ändern sich jedoch im Vergleich zu der RP-Chromatographie die Selektivitäten. Da die Analyte in diesem Fall durch unterschiedlich starke Adsorption an die stationäre Phase getrennt werden, sind Eigenschaften wie Polarität und Geometrie für die Trennung entscheidend. Deshalb ist die NP-Chromatographie für die Trennung von Stellungsisomeren (z.B. 3,4-Dimethylphenol und 3,5-Dimethylphenol) besonders gut geeignet. Die Hydrophobizität der Analyte hat auf die Trennung mit der NP-Chromatographie hingegen nur wenig Einfluß, so daß die Alkylphenole unterschiedlicher Kettenlänge, die sich auf RP-Material gut trennen lassen, hier nur schlecht aufgelöst werden.

Die Analyte können in apolaren Matrices auf das Trennsystem aufgegeben werden. Dies ist vorteilhaft, wenn solche Matrices aus Extraktionen der Probenvorbereitung vorliegen. In diesem Fall müssen die Analyte nicht erst wie bei der RP-Chromatographie in eine polare Phase überführt werden, bevor sie analysiert werden können.

Da die untersuchten phenolischen Verbindungen sich in ihren physikochemischen Eigenschaften stark unterscheiden, muß die Trennung sowohl bei der NP- als auch bei der RP-Chromatographie mit einem Lösungsmittelgradienten erfolgen. Die Fließgeschwindigkeit des Laufmittels beträgt zwischen 100 und 1000 µL/min.

Der Nachweis von Phenolen erfolgt vorherrschend UV-vis-spektrometrisch oder elektrochemisch[53,54]. Die elektrochemische Detektion ist dabei oft die empfindlichere der beiden Techniken. Mit der Entwicklung der Multielektroden-Array-Detektoren können sogar Aussagen über die Abhängigkeit des Potentials von der Struktur des Analyten gemacht werden. Des weiteren ist auch der Einsatz von Infrarot-[55], Fluoreszenz-[56], Leitfähigkeits- und Brechungsindex-Detektoren möglich.

Bei Einsatz eines Dioden-Array-Detektors (DAD) liefert die UV-vis-Detektion neben der Retentionszeit als zusätzliche Information noch das Spektrum des Analyten, so daß dieser Detektor in der Praxis häufig eingesetzt wird.

Anhand der DAD-Spektren lassen sich Spektrenbibliotheken aufbauen. Bei der Untersuchung unbekannter Analyte können die Analytspektren mit den Bibliotheksspektren verglichen werden, und so hilfreiche Aussagen bei der Charakterisierung liefern.

Phenole absorbieren Licht im Wellenlängenbereich von 200 bis 400 nm (π-π^*-Übergänge).

In Abbildung 1 ist das UV-vis-Spektrum von ionischem Pentachlorphenol dargestellt. In dem Spektrum sind drei charakteristische Absorptionsmaxima zu erkennen, deren intensivstes bei 219 nm liegt. Anhand der Maxima kann die optimale Wellenlänge für die Bestimmung der Analyte ausgewählt werden. Normalerweise wird die Wellenlänge mit der stärksten Absorption gewählt, um die höchste Empfindlichkeit zu erzielen.

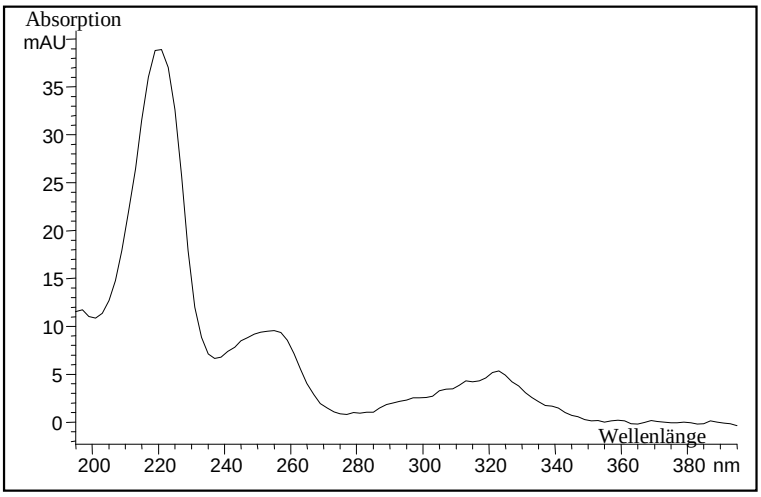

Abbildung 1: UV-vis-Spektrum von ionischem Pentachlorphenol

Zur Differenzierung chromatographisch ungetrennter Substanzen können auch andere Wellenlängen genutzt werden.

Beim Spektrenvergleich ist darauf zu achten, daß die gleichen Analytspezies untersucht werden. Ändert sich beispielsweise der pH-Wert des Eluenten, kann bei der Detektion auch eine andere Analytspezies (deprotoniert/ protoniert) vorliegen.

In Abbildung 2 ist das UV-vis-Spektrum von neutralem Pentachlorphenol dargestellt. In der neutralen Spezies verändern sich durch Verschiebung der an der Absorption beteiligten Energieniveaus die Maxima des UV-vis-Spektrums. Das Maximum der ionischen Spezies bei 256 nm in Abbildung 1 ist in der neutralen Spezies in Abbildung 2 zu 236 nm verschoben. Dadurch wird der Vergleich der Spektren erschwert. In Spektrenbibliotheken sollten daher möglichst beide Analytspezies zu finden sein.

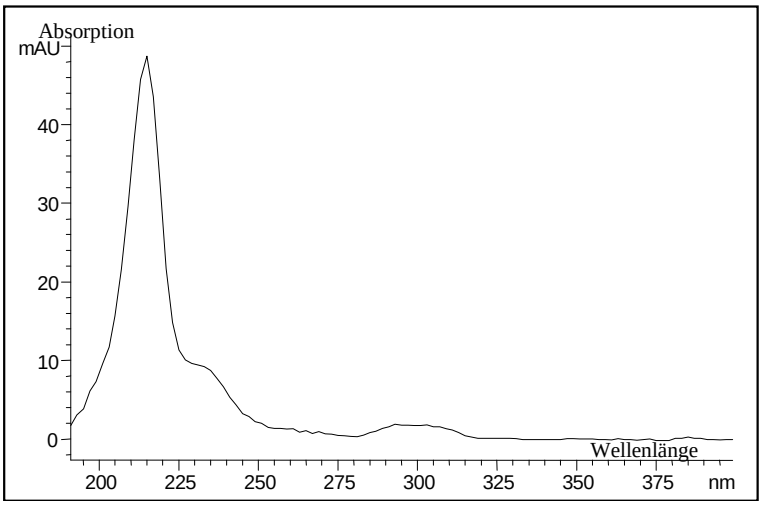

Abbildung 2: UV-vis-Spektrum von neutralem Pentachlorphenol

3.2.1.1 HPLC-MS

Unter den verschiedenen HPLC-Detektoren nimmt die Massenspektrometrie wegen ihrer Universalität[57] eine besondere Stellung ein[58,59]. Sie ist einerseits empfindlich und selektiv, andererseits ist sie auch in der Lage, Molekulargewichts- und Strukturaussagen zu liefern. Die Selektivität ermöglicht es in vielen Fällen sogar, chromatographisch unvollständig getrennte Komponenten massenspektrometrisch aufzulösen und quantitativ zu erfassen.

Die normalen Arbeitsbedingungen eines Massenspektrometers (Hochvakuum, hohe Temperatur, niedrige Flußrate) sind denen der HPLC diametral entgegengesetzt (flüssige Phase, hoher Druck, relativ niedrige Temperaturen). Wegen dieser Gegensätzlichkeit der Bedingungen ist es erst seit kurzer Zeit gelungen, effektive und robuste Kopplungstechniken

zu entwickeln[60]. Die gebräuchlichsten von ihnen sind „Particle Beam“, Thermospray[46], „Atmospheric Pressure Chemical Ionization“ (APCI) und „Electrospray Ionization“ (ESI).
Jede dieser Interfacetechniken hat ihre eigene Charakteristik und ihren speziellen Einsatzbereich. Mit der geeigneten HPLC-MS Konfiguration ist so die Analyse von kleinen unpolaren, großen polaren bzw. von leichter und schwerer verdampfbaren Molekülen möglich. Geeignete Interface sind für Massenspektrometer unterschiedlicher Trenntechniken verfügbar. Am häufigsten werden routinemäßig die kleinen, robusten, preisgünstigen und leicht zu bedienenden Quadrupol-Massenspektrometer und Ionenfallengeräte eingesetzt.
In der vorliegenden Arbeit stand ein doppelfokussierendes Sektorfeld-Massenspektrometer zur Verfügung. Dabei werden die mit einer Spannung von 4000 V beschleunigten Ionen in einem Magnetfeld entsprechend ihres Masse/ Ladung (m/z) Verhältnisses getrennt und mit einem zusätzlichen elektrischen Sektorfeld bezüglich ihrer Energiedispersion fokussiert. Das so erreichte Auflösungsvermögen von 60.000 (bei praktischer HPLC-MS Messung von bis zu 15.000) ermöglicht die Differenzierung von Isonukliden und in vielen Fällen eine sichere Identifizierung der Substanz über ihre Elementarzusammensetzung. Doppelfokussierende Geräte können wie mehrfach hintereinandergeschaltete Massenspektrometer (MS/MS) zur Untersuchung des Fragmentierungsverhaltens und damit zur Strukturaufklärung der Substanzen eingesetzt werden. Ein bekanntes Fragmentierungsverhalten ist im umgekehrten Fall eine extrem selektive Nachweismethode, die sowohl in der Pharmaforschung als auch in der Umweltanalytik verstärkt Eingang findet.
Für die HPLC-MS Kopplung standen die zu den „Atmospheric Pressure Ionization“ (API) zählenden Techniken der „Electrospray Ionization“ (ESI) und „Atmospheric Pressure Chemical Ionisation“ (APCI) zur Verfügung. Sie sind empfindlich, selektiv, robust, erfassen ein breites Substanzspektrum und werden deshalb auch in der Umweltanalytik verstärkt eingesetzt.

Die Ionisierung mit *„Electrospray Ionization“ (ESI)* basiert auf der Überführung von in der flüssigen Phase vorgebildeten Ionen in die Gasphase[61]. Das ESI-Interface (siehe Abbildung 3) besteht aus einer feinen Kapillare und einer Reihe von Skimmerblenden. Die durch die Kapillare strömende flüssige Phase (z.B. HPLC-Eluat) wird durch eine am Ende der Kapillare angelegte Hochspannung mit Unterstützung eines Gasflusses (Sheath-Gas, in der Regel Stickstoff) in geladene Tröpfchen versprüht.

Im weiteren Prozeß der Lösungsmittelverdampfung verkleinert sich der Tropfenradius, wodurch sich die Feldstärke bis zu einer kritischen Größe erhöht, der Tropfen platzt (Coulomb-Explosion) und die Analytionen so in die Gasphase übergehen.

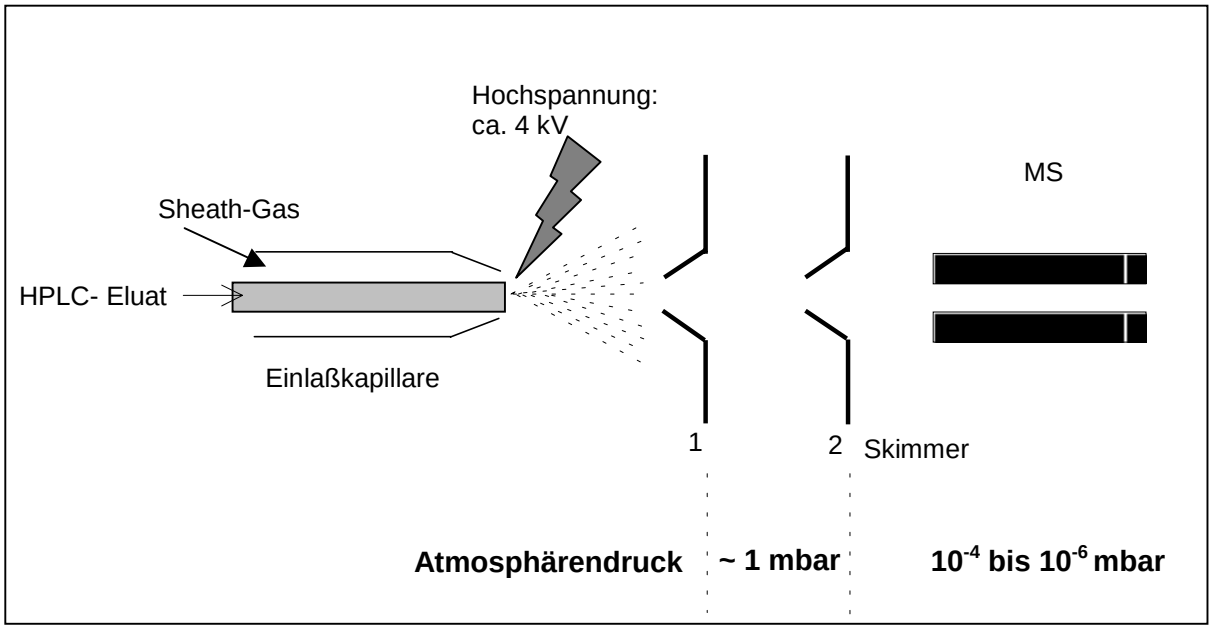

Abbildung 3: Schematische Darstellung der ESI-Technik

Bei kleineren Molekülen (bis zu etwa 1000 Dalton) entstehen vorwiegend einfach geladene $[M+H]^+$ bzw. $[M-H]^-$ Ionen. Einige Substanzklassen neigen zur Adduktbildung mit in der Lösung vorhandenen Ionen, so daß statt der protonierten bzw. deprotonierten Quasimolekülionen Addukte mit Ammonium-, Natrium- oder Kaliumionen auftreten. Wegen der „sanften“ Ionisierung ist die Fragmentierung gewöhnlich gering bzw. kaum vorhanden.

Moleküle mit Massen bis zu 200.000 Dalton oder mehreren funktionellen Gruppen bilden in der Regel eine Reihe von mehrfach geladenen Ionen aus deren Verteilung ein Molekulargewichtsprofil mit hoher Genauigkeit berechnet werden kann. Diese Eigenschaft hat die ESI besonders für die Analytik von Peptiden und Nucleotiden interessant gemacht.

Die ESI ist (wie auch die unten beschriebene APCI) anfällig gegenüber verunreinigende und die Transferkapillare verstopfende Belege, weswegen die Verwendung salzhaltiger Puffer in der HPLC stark eingeschränkt ist. Gegenüber der in Abbildung 3 gezeigten axialen Anordnung des Spraykopfes zur ersten Skimmerblende (wie sie auch im benutzten Gerät Verwendung fand) sind „Off-Axis“- Systeme bezüglich salzhaltiger Lösungen robuster.

Wegen der notwendigen Vorbildung der Ionen in der flüssigen Phase eignet sich die ESI besonders für polare bis ionische Substanzen. Dabei sind der pKs-Wert der Substanz und der pH-Wert der Lösung, sowie für die Emission der Ionen in die Gasphase deren Solvatationsenergie von Bedeutung.
Viele phenolische Verbindungen liegen bei den üblichen pH-Werten der HPLC (pH < 9) in neutraler Form vor. Deshalb wurden bisher auch nur Substanzen mit relativ kleinem pKs-Wert (wie z.B. Nitrophenole), die in den Eluenten dissoziiert vorliegen, mit der HPLC-ESI-Kopplung detektiert. Substanzen wie Alkylphenole liegen bei diesen pH-Werten als neutrale Spezies vor. Da sie keine fremden Ladungsträger anlagern und erst im alkalischen Bereich dissoziieren, konnten sie bisher mit der ESI-Technik nicht detektiert werden. Bei alkalischen Eluenten können die handelsüblichen HPLC-Säulen nicht eingesetzt werden, da sie durch Zersetzung der stationären Phasen zerstört werden.
Durch Einsatz einer speziellen HPLC-Säule, auf der auch alkalische Eluenten benutzt werden können, wurde in dieser Arbeit auch die Messung der Alkylphenole mit der HPLC-ESI-MS ermöglicht (siehe Kapitel 4.2.1.1).

Die *„Atmospheric Pressure Chemical Ionization“ (APCI)* ist der ESI-Technik sehr ähnlich. Die Ionisation erfolgt ebenfalls unter Atmosphärendruck, auch der Übergang der Ionen durch das Linsensystem in das Massenspektrometer folgt dem selben Prinzip. Die Ionisationsbedingungen sind jedoch härter als bei der ESI-Technik, so daß auch die Ionisation weniger polarer Verbindungen gelingt. Da bei der APCI in der Regel keine mehrfach geladenen Ionen entstehen, eignet sich diese Technik nicht für die Messung von Substanzen mit hohem Molekulargewicht. Der Unterschied zwischen den beiden Ionisationstechniken besteht darin, daß bei der APCI keine Hochspannung an der Einlaßkapillare anliegt, sondern daß das Eluat durch verschiedene Gasflüsse (Sheath- und Auxiliary- (Aux-) Gas) zerstäubt, fokussiert und anschließend mit einem Heizer (dem sogenannten Vaporizer) verdampft wird (siehe Abbildung 4).
Im Austrittsbereich des so entstehenden Gasstroms ist eine Metallnadel (Corona) angebracht, an der eine Hochspannung (ca. 2,5 bis 3,0 kV) angelegt ist. Gelangen die Lösungsmittelmoleküle in den Bereich der Hochspannung, bildet sich ein Reaktionsplasma nach dem Prinzip der Chemischen Ionisation. Ist der Energieunterschied zwischen Analyten

und Reaktandionen groß genug, werden die Analyte z.B. durch Protonentransfer oder Adduktbildung in der Gasphase ionisiert.

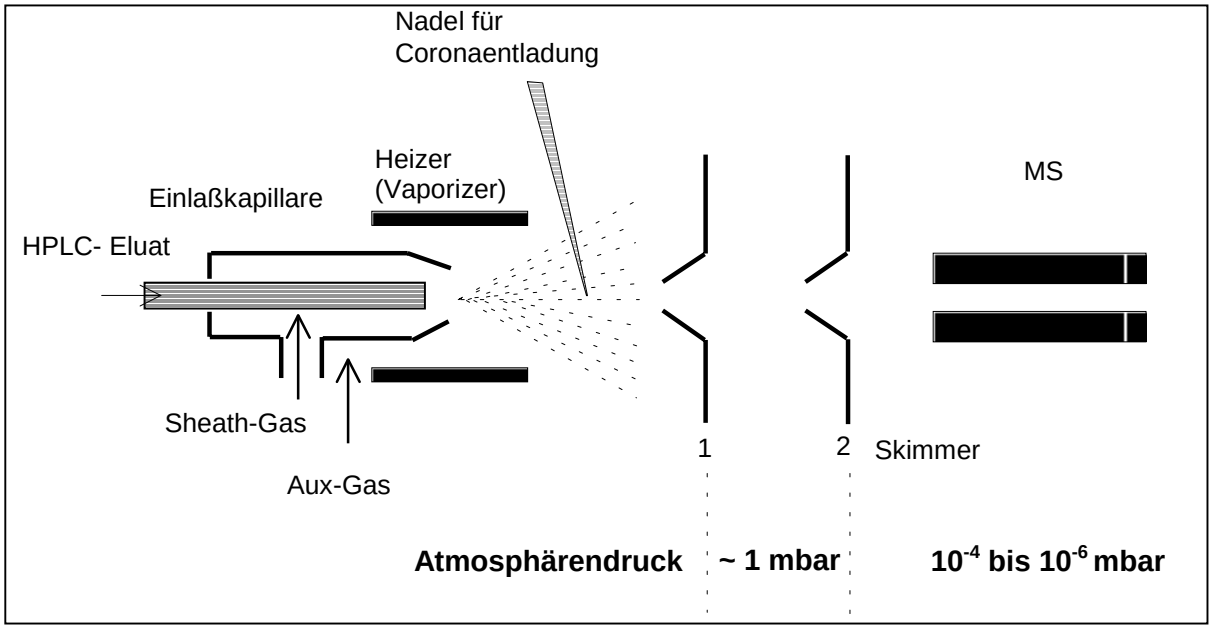

Abbildung 4: Schematische Darstellung der APCI-Technik

Die Ionisationsausbeute der APCI wird durch Vaporizertemperatur sowie Sheath- und Aux-Gasdruck beeinflußt, die deshalb für das jeweilige Analysenproblem optimiert werden müssen.

3.2.1.2 HPLC-NMR

Die Kernmagnetische Resonanzspektrometrie (NMR) ist ein etabliertes Analysenprinzip zur Strukturaufklärung und Identifizierung organischer Substanzen. Sie wird zunehmend auch für quantitative Problemstellungen eingesetzt. Für die Analytik komplexer Gemische[62] sind der NMR, bedingt durch die Vielzahl der Signale, jedoch Grenzen gesetzt[63]. Deshalb ist es sinnvoll, die NMR als Hochleistungsdetektor[64] mit der HPLC zu koppeln[65,66]. Gegenüber anderen Detektionstechniken wie UV-vis oder MS ermöglicht die NMR-Detektion über charakteristische Werte der chemischen Verschiebung und Kopplungskonstanten beispielsweise die Zuordnung von Strukturisomeren.

In der Bioanalytik[67] wurde die HPLC-NMR bereits erfolgreich bei komplizierten Analysenproblemen eingesetzt (z.B. in den Matrices Urin[68], Blutplasma[69], Wein). In der Umweltanalytik[70] gibt es bedingt durch die hohen Nachweisgrenzen der NMR für Analyte in komplexen Matrices bisher nur wenige Applikationen.

Die Kopplung der HPLC an das NMR-Spektrometer erfolgt zum einen mit einer sogenannten „Peak-Sampling-Unit“, mit der einzelne Fraktionen gesammelt werden können. Sie werden dann in den Probenkopf des NMR-Spektrometers überführt und können dort bei angehaltenem Fluß vermessen werden (stopped-flow Messung). Erfolgt die Messung dagegen im Durchfluß, entspricht dieses Vorgehen (on-flow Messung[71,72]) den anderen on-line Kopplungstechniken.

Für optimale Ergebnisse müssen die unterschiedlichen Parameter der HPLC und der NMR aneinander angepaßt werden. Durch die hohen Nachweisgrenzen der NMR muß eine möglichst hohe Probenmenge auf die HPLC-Säule aufgegeben werden, so daß ausreichend Substanz in den NMR-Probenkopf gelangt. Außerdem muß die Flußrate der HPLC extrem niedrig eingestellt werden, damit die Analyte möglichst lange Zeit im Probenkopf der NMR zur Messung verweilen. Das Eluat sollte durch Einsatz deuterierter Lösungsmittel möglichst wenig störende NMR-Signale erzeugen. Das NMR-Spektrometer muß Techniken zur Unterdrückung der Lösungsmittelstörsignale bereitstellen. Dies ist besonders schwierig beim Einsatz von Lösungsmittelgradienten bei der HPLC-Trennung.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Leistungsfähigkeit der NMR zur Identifizierung und Quantifizierung von Strukturisomeren einiger Phenole genutzt werden kann, um als Referenzverfahren für die anderen Analysentechniken hilfreiche Aussagen zu liefern.

3.2.2 GC

Die Gaschromatographie (GC) ist die am weitesten verbreitete Trenntechnik für Gemische aus unzersetzt verdampfbaren organischen Substanzen[73]. Die im Injektor verdampften Gemische werden mit dem Trägergas (mobile Phase) durch eine mit der stationären Phase belegte Trennsäule transportiert. Durch die unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten der Analyte zwischen der mobilen und stationären Phase (Verteilungschromatographie) können die Komponenten des Gemisches am Säulenende zeitlich getrennt detektiert werden. Die in der Gaschromatographie vorhandene große Vielfalt an Injektorsystemen, mobilen und stationären Phasen, Säulen (Materialien, Säulenlängen und -durchmesser) und Detektoren erlaubt eine optimale Anpassung an viele analytische Aufgabenstellungen.

Die gaschromatographische Analyse von Phenolen[74,75,76] wird auch in verschiedenen Normverfahren eingesetzt (siehe Kapitel 3). Wegen der Polarität der Substanzen ist die Trennung jedoch problematisch (es entstehen z.B. Peakverbreiterungen). Deshalb werden die Analyte oft mit Derivatisierungsmitteln umgesetzt, da die Derivate flüchtiger und apolarer als die Ausgangssubstanzen sind und sich effizienter trennen lassen.

Für die Detektion werden Techniken mit unterschiedlicher Selektivität, Spezifität und Nachweisgrenze (z.B. FID, NPD, ECD) eingesetzt. Der Flammen-Ionisations-Detektor (FID) eignet sich beispielsweise gut zur Messung von Substanzen, die C-H-Bindungen enthalten (z.B. MKW). Die Analyte werden in einer Wasserstoffflamme verbrannt, wobei Ionen gebildet werden, die dann an einem Kollektor detektiert werden. Mit dem FID lassen sich Analyte im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und 10 mg/L bestimmen.

Der Stickstoff-Phosphor-Detektor (NPD) und der Elektronen-Einfang-Detektor (ECD) eignen sich zur selektiven Substanzdetektion. Der Mechanismus des NPD basiert auf der Substanzverbrennung in einem Plasma, wobei anschließend nur die Analyten, die Stickstoff- und Phosphoratome enthalten, ionisiert und mit einem Kollektor detektiert werden. Die Analyte lassen sich so selektiv in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 10 µg/L bestimmen. Der Mechanismus des ECD beruht auf der Messung von Elektronen, die von einer Strahlungsquelle emittiert werden (^{63}Nickel-Folie) und im Detektor einen Strom erzeugen. Gelangen elektronegative Substanzen in den Detektor, fällt der Strom ab, da von den Analyten Elektronen eingefangen werden. Der Stromabfall wird gemessen und in ein Signal umgewandelt. Mit dem ECD lassen sich beispielsweise für halogenhaltige Substanzen (wie chlorierte Phenole) Bestimmungsgrenzen im Bereich von 0,1 und 10 µg/L erreichen.

Bei der Analytik von Chlorphenolen wird er wegen der niedrigen Nachweisgrenze auch im DIN-Normverfahren (für die Matrix Wasser) eingesetzt.

Die *GC-MS Kopplung* übertrifft alle anderen spezifischen GC-Detektoren in Bezug auf Einsatzbreite, Identifizierungsvermögen und Strukturaussage (vgl. Kapitel 3.2.1.1).
Zur Kopplung an die GC lassen sich Quadrupolgeräte, Ion-Trap-Massenspektrometer und hochauflösende Sektorfeldgeräte einsetzen. Im „Single Ion Recording“- (SIR-) Modus zählt das Massenspektrometer zu den empfindlichsten Detektoren. In der Laborpraxis sind Quadrupol- und Ion-Trap-Massenspektrometer als Detektoren für die Gaschromatographie am weitesten verbreitet. Sie haben sich durch Robustheit und geringe Größe bewährt und bieten mit der dazugehörigen Software oft komfortable Spektrenbibliotheken, womit die Identifizierung der Substanzen stark erleichtert wird.
Quadrupolgeräte arbeiten in der Regel mit Einheitsauflösung bei einem Massenbereich von ca. 1000 Dalton. In Gegensatz zu Massenspektrometern mit nur einem Quadrupol („Single Stage“ Geräte), können durch Hintereinanderschalten von mehreren Quadrupolen auch Fragmentierungen untersucht werden (MS^n). Die Untersuchung von Fragmentierungsreaktionen liefert wertvolle Strukturinformationen über die Analyten. Sind diese Prozesse bekannt, lassen sie sich für einen hochspezifischen Nachweis der Analyte nutzen.
Ion-Trap-Geräte sind eine besonders kompakte Art der Massenspektrometer. Durch eine mittlere Ringelektrode, die zwei hemisphärische Elektroden trennt, werden einzelne Ionen auf geschlossenen Bahnen elektrisch festgehalten und können ebenfalls gezielt weiter fragmentiert werden (MS^n).
Erfordert das Analysenproblem z.B. wegen der Vielzahl möglicher Querstörungen eine höhere Massenauflösung als die Einheitsauflösung der Quadrupolgeräte, kann der Gaschromatograph an ein hochauflösendes Sektorfeld-Massenspektrometer gekoppelt werden. Für komplexe Matrixproben[77,78] und Vielkomponentgemische[79,80] ist die GC-MS wegen ihrer hohen Trennleistung und Empfindlichkeit sowie ihrer Strukturaussagefähigkeit und der damit möglichen Identifizierung der Substanzen die Technik der Wahl.

3.2.3 Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese (CE)[81] ist eine Trenntechnik, die auf der Mobilität von Ionen im elektrischen Feld beruht. Ionen mit unterschiedlicher Größe, Form und differierenden Masse-/ Ladungsverhältnissen haben im elektrischen Feld verschiedene Migrationszeiten und können so getrennt werden. Die Kapillaren haben Innendurchmesser von 25 bis 100 µm bei einer Länge zwischen 0,2 und 2 Meter. Das angelegte Potential liegt in der Regel zwischen 20 und 30 kV. Das Probenvolumen (zwischen 1 und 50 nL) wird hydrostatisch oder elektrisch auf die Kapillare aufgegeben und am anderen Ende mit den in der HPLC gebräuchlichen Detektoren (UV-vis, Fluoreszenzdetektion[82], elektrochemische Detektion, MS) nachgewiesen.

Für das Verständnis der heute beim Einsatz der Kapillarelektrophorese auftretenden Anforderungen an die Methodenentwicklung sind im folgenden einige wichtige *historische Entwicklungsschritte*[83] dargestellt. Die CE basiert auf elektrophoretischen Prozessen, deren Untersuchung Ende des vorigen Jahrhunderts begann. Die Elektrophorese ist als differentielle Bewegung geladener Teilchen (Ionen) im Elektrolyt innerhalb eines elektrischen Feldes definiert. Einer ihrer Grundsteine ist die 1897 formulierte Kohlrausch-Funktion, welche die Reihenfolge der elektrophoretischen Wanderung von Ionen beschreibt[84]. Als Trenntechnik wurde die Elektrophorese von Tiselius[85] 1930 eingeführt. Er untersuchte die Trennung von Proteinen, wofür er 1948 den Nobelpreis erhielt. Die Effizienz der elektrophoretischen Trennung ist durch wärmebedingte Diffusion und Konvektion begrenzt. Die klassische Flachbett-Elektrophorese wird deshalb in antikonvektiven Medien wie Polyacrylamid durchgeführt. Die angelegte Spannung darf wegen der Wärmeentwicklung nicht zu hoch gewählt werden, weshalb Analysenzeiten von mehreren Stunden oft nicht zu vermeiden sind. Diesen Problemen konnte durch den Einsatz von Kapillaren[86] an Stelle des Flachbettes begegnet werden – es entstand die sogenannte Kapillarelektrophorese. In den 70er Jahren wurden Kapillaren mit gleichmäßigen Innendurchmessern unter 500 µm entwickelt und in der CE eingesetzt[87,88]. Bei diesen Kapillaren konnte aufgrund des kleinen Innendurchmessers und damit des relativ großen Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen der störende Einfluß der thermisch induzierten Konvektion verringert werden. Da zudem der Abtransport der entstehenden Wärme bei Kapillaren durch entsprechende Kühlung gewährleistet ist, konnten nun hohe Feldstärken

eingesetzt werden. Damit ermöglicht die CE im Vergleich zur klassischen Elektrophorese sehr kurze Analysenzeiten. Die hohe Trennleistung, kombiniert mit kurzer Analysenzeit, führte zur raschen Verbreitung der CE in der medizinischen und pharmazeutischen Analytik.
Der Einsatz von Quarzkapillaren (Innendurchmesser unter 100 µm) ermöglicht die heute weit verbreitete on-line UV-Detektion[89], da Quarz im unteren UV-Bereich transparent ist. Ein weiterer Fortschritt war die Entwicklung der laserinduzierten Fluoreszenz. Gassmann et al.[90] konnten damit Analyte im Attomol-Bereich (10^{-18} mol/L) nachweisen. Olivares et al.[91] gelang 1987 die Kopplung der CE an die Massenspektrometrie. 1988 zeigten Kuhr und Yeung[92] die Möglichkeiten der indirekten Detektion auf, mit der die Messung von UV- und fluoreszenzinaktiven Verbindungen ermöglicht wurde. Terabe et al.[93] ermöglichten 1984 die Trennung neutraler Moleküle durch Kombination chromatographischer Trennprinzipien mit der Kapillarelektrophorese (Micellare Elektrokinetische Chromatographie, MEKC). Ende der 80er Jahre wurden die ersten kommerziellen CE-Geräte entwickelt. In den 90er Jahren begann die Applikations- und Methodenentwicklung[94,95] in den Vordergrund der Forschung zu treten. Heutige CE-Analysen sind in vergleichsweise kurzer Zeit mit hohem Trennvermögen und niedrigen stoffmengenbezogenen Nachweisgrenzen bei geringem Lösungsmittelverbrauch durchzuführen. Ein entscheidender Nachteil der CE sind jedoch die hohen konzentrationsbezogenen Nachweisgrenzen.
Die wärmebedingte Diffusion und Konvektion, die gleichzeitige Trennung von ionischen und neutralen Analyten sowie die komplexe Methodenentwicklung (zahlreiche Analysenparameter) ermöglichen einerseits diverse Einsatzfelder für die Analytik, sind andererseits jedoch auch heute noch die grundlegenden Probleme der CE. Wegen ihrer Vorzüge wird die CE auch für die Umweltanalytik zunehmend eingesetzt[96,97,98] obwohl hier die Anzahl der Applikationen[99,100,101] noch immer sehr beschränkt ist. Das liegt vor allem daran, daß Techniken zur Trennung von ionischen und neutralen Verbindungen entwickelt wurden, und die hohen konzentrationsbezogenen Nachweisgrenzen durch effektive Anreicherungstechniken ausgeglichen werden können.
Da das entwickelte CE-Verfahren („Direktes-MEKC-Stacking“, siehe Kapitel 4.2.4.2) einen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildet, wird im folgenden auf die relevanten Grundlagen, Probleme und Techniken eingegangen. Um Aussagen über den Einfluß organischer Modifier auf den Micellbildungsmechanismus im MEKC-Elektrolyten treffen zu können, wurden vertiefende Untersuchungen durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.3.3).

3.2.3.1 Meßprinzipien der Kapillarelektrophorese

Das in dieser Arbeit verwendete System (HP^{3D}-CE, Hewlett-Packard[102]) besteht aus zwei Elektrolytgefäßen, thermostatisierter Kapillare, Dioden-Array-Detektor (DAD), Hochspannungsversorgung und thermostatisiertem Autosampler. Der Aufbau dieser Apparatur ist in Abbildung 5 dargestellt. Die Kapillare überbrückt die beiden Elektrolytgefäße, zwischen denen eine Hochspannung (-30 kV bis +30 kV) angelegt wird. Die Probe wird bei positiver Potentialdifferenz am anodischen Ende auf die mit Elektrolyt gefüllte Kapillare aufgegeben, wobei das dortige Elektrolytgefäß gegen das Probengefäß ausgetauscht wird und die Kapillare in das Probengefäß eintaucht.

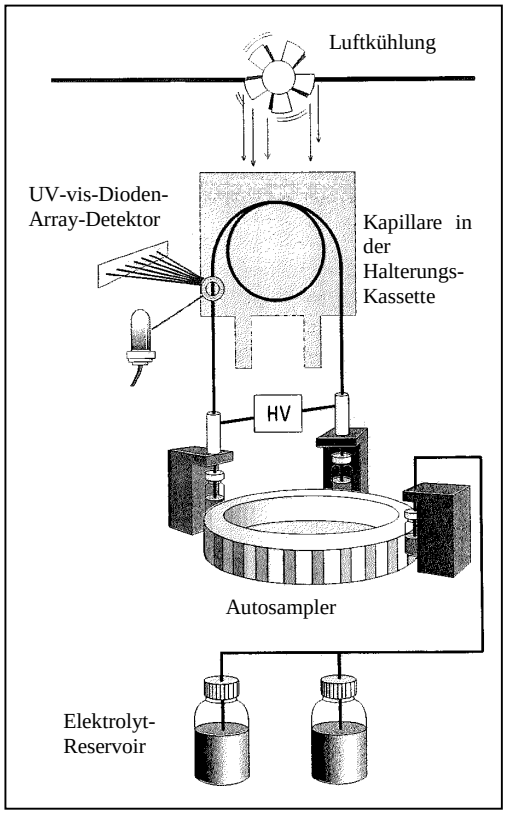

Abbildung 5: Schematische Darstellung des Kapillarelektrophorese-Systems

Die Probenaufgabe kann durch Anlegen eines Druckes oder eines elektrischen Feldes erfolgen. Das Elektrolytreservoir dient dem Austausch des Elektrolyten in den Meßgefäßen.

Die an der Meßapparatur angelegte Hochspannung bewirkt die *elektrophoretische Wanderung* der ionischen Analyte in der Kapillare. Der elektrophoretische Trennprozeß basiert auf unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten ν der Ionen im elektrischen Feld E (Gleichung 1).

Gleichung 1 $\nu = \mu_e E$

ν = elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit
μ_e = elektrophoretische Mobilität
E = elektrische Feldstärke

Die elektrische Feldstärke E ist eine Funktion der zwischen den Probengefäßen angelegten Spannung und der Kapillarlänge. Die Wanderungsgeschwindigkeit ν ist mit der Feldstärke E über die elektrophoretische Mobilität μ_e, einer stoffspezifischen Konstante, verknüpft. Die Konstante μ_e eines Ions ist in einem Medium bei konstantem pH-Wert definiert.

Die elektrophoretische Mobilität läßt sich durch die auf den ionischen Analyten einwirkenden Kräfte beschreiben. Auf den Analyten wirkt zum einen die beschleunigende elektrische Kraft F_E. Sie wird durch das Produkt aus effektiver Ionenladung und elektrischer Feldstärke beschrieben (Gleichung 2).

Gleichung 2 $F_E = z\,F\,E$

z = effektive Ionenladung
F = Faradaykonstante

Die effektive Ionenladung beschreibt dabei die absolute Ionenladung, abzüglich des Ladungsanteils der entgegengesetzt geladenen Moleküle in der Umgebung (Debye-Hückel Theorie).

Durch die Reibungskraft F_R wird der Analyt dagegen gebremst. Die Reibungskraft läßt sich angenähert durch das Stokessche Gesetz beschreiben (Gleichung 3).

Gleichung 3 $F_R = 6\,\pi\,\eta\,r\,\nu$

η = Viskosität des Lösungsmittels
r = Stokesscher Ionenradius

Da diese Kräfte im Gleichgewicht stehen (stationärer Zustand), ist ihr Quotient proportional zur Wanderungsgeschwindigkeit ν des Analyten. Daraus folgt mit Gleichung 1 auch die Proportionalität zu der elektrophoretischen Mobilität μ_e (Gleichung 4).

Gleichung 4 $\mu_e \sim F_E/F_R$

Es ergibt sich mit Gleichung 2 und Gleichung 3 für die elektrophoretische Mobilität:

Gleichung 5 $\boxed{\mu_e = z\,F\,/\,(6\,\pi\,\eta\,r)}$

Kleine Moleküle mit hoher Ladungsdichte haben nach Gleichung 5 eine höhere elektrophoretische Mobilität als große mit niedriger Ladung.

Wird nun zwischen den Elektrolytgefäßen über die Kapillare eine Spannung angelegt, werden Analyte mit unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten wegen ihrer ungleichen Wanderungsgeschwindigkeiten getrennt.

Der Migration der Analyte ist immer ein *Elektroosmotischer Fluß (EOF)* überlagert. Dieser trägt nicht zur Trennung der Substanzen bei, ist aber an ihrem Transport durch die Kapillare beteiligt. Die Größe des Elektroosmotischen Flusses hängt vom pH-Wert des Elektrolyten und der Ladungsverteilung in der Nähe der Kapillaroberfläche ab. Die Oberflächeneigenschaften der Kapillare werden auch durch organische Additive wie Methanol oder Acetonitril verändert. Durch Anlagerung an die Kapillarwand kann so die Oberflächenladung abgeschirmt werden.
In dieser Arbeit wurden Quarzkapillaren eingesetzt. Sie tragen bei pH-Werten > 3 durch Dissoziation der Silanolgruppen negative Ladungen an der Oberfläche. Durch Anlagerung der entsprechenden Gegenionen des Elektrolyten an der Kapillaroberfläche bildet sich eine Doppelschicht aus, die aus einer statischen und einer beweglichen diffusen Schicht besteht (Abbildung 6).

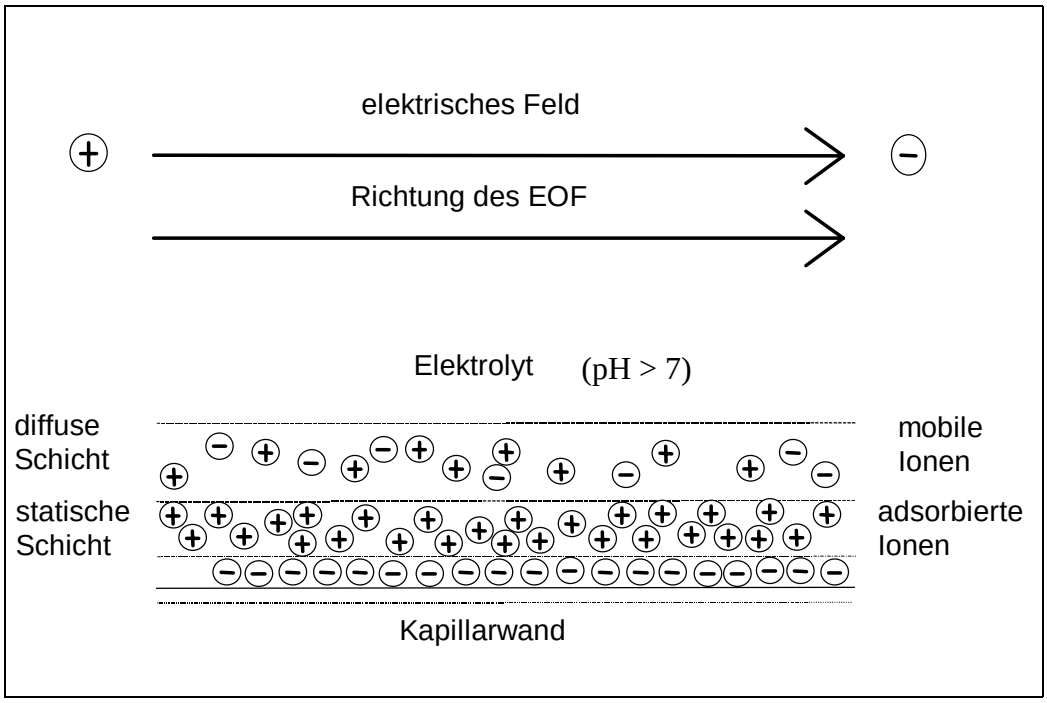

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Ladungsverteilung an der Oberfläche einer Quarzkapillare

Wird parallel zur Oberfläche ein elektrisches Feld angelegt, wandern darin die Gegenionen der mobilen Schicht und ziehen die gesamte Flüssigkeit in der Kapillare in Richtung Kathode mit sich.

Das sich so ausbildende Strömungsprofil ist im Gegensatz zu dem hydrodynamischer Flüsse (laminar oder parabolisch) stempelförmig und extrem flach. Dies führt zu einer wesentlich geringeren Bandenverbreiterung als ein hydrodynamisches Strömungsprofil, das stark vom Kapillarradius und der Strömungsgeschwindigkeit abhängig ist.

Die Größe des Elektroosmotischen Flusses wird vereinfacht durch Gleichung 6 und Gleichung 7 beschrieben (vgl. Gleichung 1).

Gleichung 6 $\mu_{EOF} = (\varepsilon\ \zeta/\eta)\ E$

Gleichung 7 $\nu_{EOF} = \varepsilon\ \zeta/\eta$

μ_{EOF} = EOF-Mobilität
ν_{EOF} = EOF-Geschwindigkeit
ε = Dielektrizitätskonstante des Elektrolyten
ζ = Zeta-Potential
η = Viskosität des Elektrolyten

Dabei beschreibt das Zeta-Potential die Potentialdifferenz der Doppelschicht, die sich zwischen der Kapillaroberfläche und der angrenzenden Flüssigkeit ausbildet.

Da die Oberflächenladung der Kapillare stark pH- abhängig ist, ändert sich der Elektroosmotische Fluß mit dem pH-Wert des Elektrolyten. Mit steigendem Protonierungsgrad der Silanolgruppen (niedrigerem pH-Wert) wird er beispielsweise langsamer, da das Zeta-Potential kleiner wird. Auch andere Elektrolytzusätze beeinflussen das Zeta-Potential und damit den Elektroosmotischen Fluß. Bei steigender Elektrolytkonzentration nimmt die Geschwindigkeit des Elektroosmotischen Flusses ebenfalls ab. Da bereits minimale pH-Wert- Änderungen den Elektroosmotischen Fluß verändern, sind standardisierte Spül- und Konditionierungszeiten der Kapillare für reproduzierbares Arbeiten erforderlich.

Ist der Elektroosmotische Fluß schnell genug, werden nicht nur Kationen, sondern auch neutrale Moleküle und Anionen mit entgegengesetzter Wanderungsrichtung im elektrischen Feld durch die Kapillare transportiert und können in derselben Messung analysiert werden. Da der Elektroosmotische Fluß in Richtung Kathode ausgerichtet ist, befindet sich in der CE-Apparatur an diesem Kapillarende auch das Detektionsfenster. Bei der in dieser Arbeit

verwendeten Apparatur wurde ein Dioden-Array-Detektor (DAD) benutzt. Die Detektion erfolgt in der Kapillare.

Um die Nachweisgrenzen zu senken, können spezielle Kapillaren eingesetzt werden. Bei diesen sogenannten „Bubble-Cell“-Kapillaren ist die Innenseite beim Detektionsfenster durch eine besondere Säurebehandlung blasenähnlich aufgeweitet. Die optische Weglänge des Detektorstrahls durch die Analytlösung ist dadurch größer und die Nachweisgrenze um ca. den Faktor 3 niedriger als in Normalkapillaren.

Für reproduzierbares Arbeiten ist es wichtig, die Hochspannung konstant zu halten sowie die Kapillare zu thermostatisieren und mit dem Elektrolyt zu konditionieren. Ferner muß die Reproduzierbarkeit der Probeninjektion gewährleistet sein.

3.2.3.2 Kapillarzonenelektrophorese

Die Kapillarzonenelektrophorese (CZE) ist die am weitesten verbreitete Technik der CE. Die Anwendungsgebiete umfassen die Analyse von Aminosäuren, Peptiden, Enantiomeren und vielen ionischen Spezies wie z.B. Amine, Phenole und Sulfonsäuren.

Das Trennprinzip der CZE ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Analyte befinden sich nach der Probenaufgabe (t = 0) am Anfang der Quarzkapillare. Nach Anlegen der Hochspannung beginnt die Trennung der Analyten, die auf den unterschiedlichen Migrationszeiten im elektrischen Feld beruht. Unter Ausnutzung des Elektroosmotischen Flusses gelingt mit der CZE die Trennung von anionischen und kationischen Spezies. Anionische Analyte können im Fall der in Abbildung 7 dargestellten Verhältnisse detektiert werden, wenn ihre Mobilität kleiner als die des EOF ist. So werden sie durch den EOF in Richtung Detektor (Kathode) transportiert. Für die Detektion schneller Analyten muß die Polarität der Trennspannung umgekehrt werden. Neutrale Moleküle werden nicht separiert und wandern mit der Geschwindigkeit des EOF durch die Kapillare.

Den größten Einfluß auf die Selektivität der Trennung haben Änderungen der Elektrolytkonzentration und -zusammensetzung sowie die Variation des pH-Wertes. Deshalb ist es wichtig, daß der Elektrolyt für das jeweilige Trennproblem optimiert wird. Zahlreiche Additive wie Methanol, Acetonitril, Cyclodextrine, etc. beeinflussen in komplexer Form (z.B. Einfluß auf Kapillaroberfläche, Viskosität und Leitfähigkeit des Elektrolyten) die

Trenneigenschaften des Systems und bieten somit weitreichende Möglichkeiten zur Variation und Optimierung des Elektrolyten.

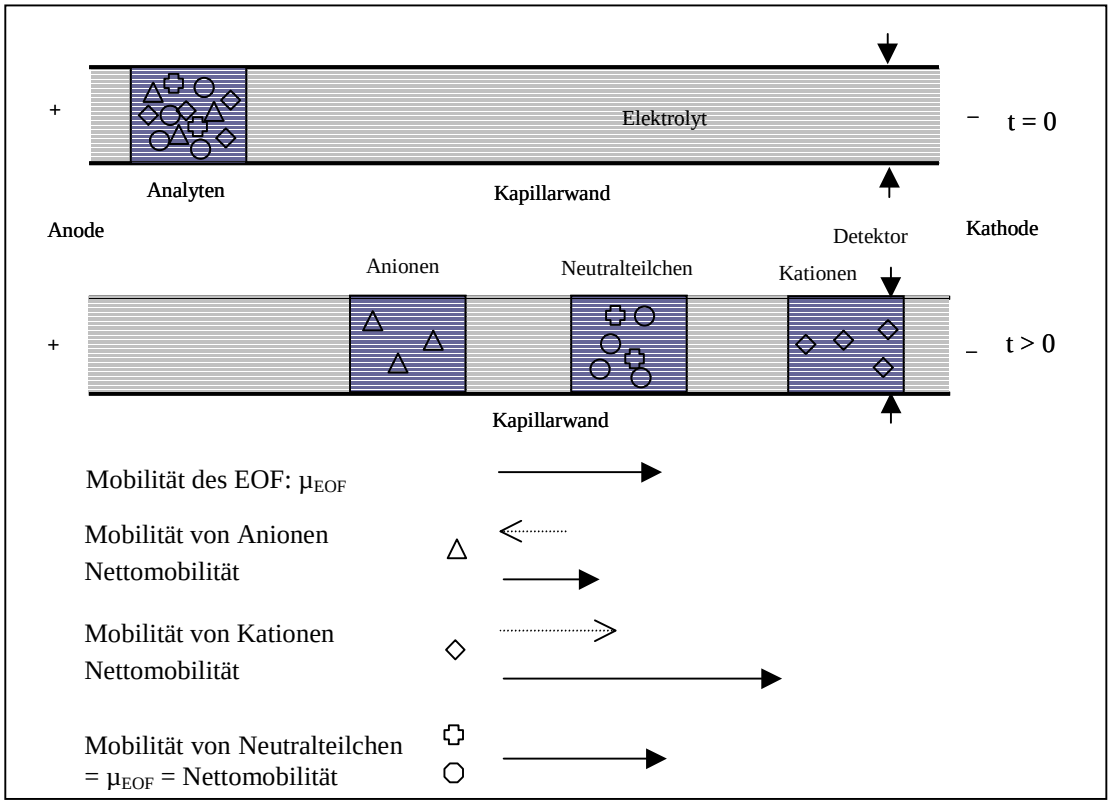

Abbildung 7: Schematische Darstellung des Trennprinzips von der CZE

3.2.3.3 Micellare Elektrokinetische Chromatographie

Bei der Micellaren Elektrokinetischen Chromatographie (MEKC) wird dem Elektrolyt ein Tensid in Konzentrationsbereichen oberhalb der sogenannten Kritischen Micellaren Konzentration (CMC, siehe unten) zugesetzt, so daß sich Micellen ausbilden. Das ionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) ist wegen hoher Wasserlöslichkeit, niedriger CMC (ca. 8 mmol/L in Wasser), geringer UV-Absorption und niedriger Kosten besonders weit verbreitet. Die Analyte werden durch unterschiedliche Aufenthaltswahrscheinlichkeiten – bedingt durch die Verteilungskoeffizienten – in der wäßrigen bzw. micellaren Phase des Elektrolyten getrennt.

Oberflächenaktive Moleküle (Tenside) setzen sich aus einem hydrophilen und hydrophoben Teil zusammen. Als Beispiel wird das in dieser Arbeit verwendete anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) betrachtet. Beim SDS besteht der hydrophile Teil aus der

anionischen Sulfatgruppe, die Kopf genannt wird. Die lange Alkylkette ist der hydrophobe Teil des Tensids und wird als Schwanz bezeichnet. Durch den hydrophilen Kopf ist SDS in Wasser löslich. Die SDS-Moleküle sind als Monomere gelöst. Jedoch bereits bei kleinen Tensidkonzentrationen kommt es zu einer abrupten Änderung der physikochemischen Eigenschaften der Lösung. Bei dieser kritischen Konzentration („Critical Micelle Concentration“, CMC) bilden die Tensidmoleküle Konglomerate (*Micellen*)[103]. Für SDS liegt diese Konzentration in Wasser bei ca. 8 mmol/L, bei wäßrigen Elektrolytlösungen wird sie auf 3 mmol/L herabgesetzt[104].

Die Bildungsgeschwindigkeit der Micellen[105] liegt im Bereich von Millisekunden.[106] Die Micellen stehen mit den Monomeren im Gleichgewicht.

Dieses Gleichgewicht läßt sich durch das Massenwirkungsgesetz beschreiben (Gleichung 8):

Gleichung 8

$$nS \underset{}{\overset{K_n}{\rightleftharpoons}} M_n$$

S: Tensid-Monomer

M: Micelle der Aggregationszahl n

K_n: Micellbildungskonstante (ca. 10^{-3} s)

Oberhalb der CMC stehen die Tensidmoleküle in den Micellen im dynamischen Assoziations-/ Dissoziations- Gleichgewicht mit Monomeren in Lösung. Die Gleichgewichtskonstante liegt dabei im Bereich von 10^{-5} s. Der Austausch zwischen Monomeren in Lösung und den an einer Micelle beteiligten Moleküle erfolgt um zwei Größenordnungen schneller als Bildung und Zerfall der Micellen. Diese Gleichgewichtskonstanten sind stark temperaturabhängig. Bei ionischen Tensiden wie SDS steigt beispielsweise die CMC bei höheren Temperaturen.

Die Tensidmonomer-Konzentration in der wäßrigen Phase bleibt konstant bei der CMC, unabhängig von der Gesamtkonzentration des Tensids. Form und Größe der entstehenden Micellen werden durch die Struktur der Monomere und die Gesamtkonzentration des Tensids beeinflußt.

Es bilden sich zweidimensionale Strukturen wie lamellenartige oder sphärische Körper und dreidimensionale Strukturen wie Diskus und Kugel. Je höher die Tensidkonzentration ist, desto höher sind auch die Aggregationszahlen der Micellen. Dreidimensionale Strukturen

bilden sich bevorzugt bei hohen Konzentrationen. Die Aggregationszahlen der Micellen folgen der statistischen Normalverteilung um die thermodynamisch stabilste Micelle.[107] Die Größenverteilung der Micellen ist in wäßriger Lösung jedoch sehr schmal. Für SDS-Micellen beträgt die Anzahl der Monomere, die eine Micelle bilden, ungefähr 70.

Wird in der Kapillarelektrophorese ein Elektrolyt mit Tensidanteil eingesetzt, ist bei geladenen Analyten der elektrophoretischen Migration ein chromatographischer Prozeß überlagert (Abbildung 8). Mit der *Micellaren Elektrokinetischen Chromatographie (MEKC)* gelingt auch die Trennung neutraler Substanzen. Da Neutralteilchen nicht elektrophoretisch wandern, ist für deren Trennung nur das Verteilungsgleichgewicht zwischen Micellen und wäßriger Phase maßgeblich.

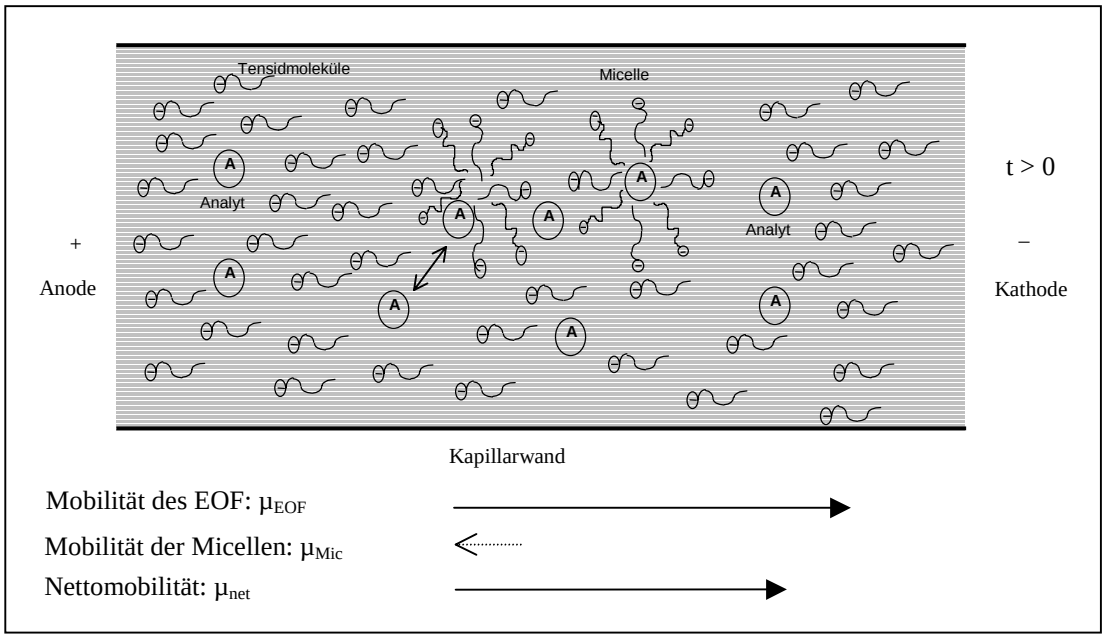

Abbildung 8: Schematische Darstellung des Trennprinzips der MEKC

Je nach Hydrophobizität wechselwirken die Analyte unterschiedlich stark mit der micellaren Phase des Elektrolyten.

Aufgrund ihrer negativen Ladung ist die Mobilität der SDS-Micellen (μ_{Mic}) dem Elektroosmotischen Fluß entgegengerichtet. Ist die EOF-Mobilität (μ_{EOF}) größer als die der Micellen, werden sie mit dem Elektroosmotischen Fluß in Richtung Kathode durch die Kapillare bewegt. Die Nettomobilität der Micelle (μ_{net}) ergibt sich aus der vektoriellen Summe der Mobilitäten des EOF und der Micellen.

Je stärker der Analyt mit der Micelle in Wechselwirkung tritt, desto länger wird seine Migrationszeit, da er mit der Micelle gegen den Elektroosmotischen Fluß transportiert wird. Je hydrophiler eine Substanz ist, desto stärker tritt sie mit der wäßrigen Phase in Wechselwirkung und hat eine entsprechend kürzere Migrationszeit. Bei ionischen Analyten ist der so resultierenden Wanderungsgeschwindigkeit zusätzlich noch die elektrophoretische Mobilität in der wäßrigen Phase (siehe Kapitel 3.2.3.2) vektoriell überlagert.

Der Selektivität der oben beschriebenen MEKC-Trennung sind Grenzen gesetzt. Je hydrophober ein Analyt ist, desto größer wird seine Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der micellaren Phase des Elektrolyten. Seine Wanderungsgeschwindigkeit nähert sich daher der Micellgeschwindigkeit an. Ein Gemisch aus stark hydrophoben Analyten wird demnach nicht mehr getrennt, da alle Analyte mit der Geschwindigkeit der Micellen durch die Kapillare wandern.

Die Selektivität der MEKC-Trennung läßt sich jedoch durch dieselben Parameter wie bei der CZE beeinflussen. So bewirkt der Zusatz von organischen Additiven wie Methanol und Acetonitril Änderungen der Löslichkeiten der Analyte in der wäßrigen Phase, indem die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und die Polarität beeinflußt werden.

Weiterhin können Additive mit hydrophoben Gruppen (z.B. n-Hexanol) in die äußere Schicht der Micelle eingebaut werden und so die Wechselwirkung zwischen Analyt und Micelle beeinflussen[104,108]. Stark polare Additive wie Methanol und Acetonitril wechselwirken hingegen kaum mit den Micellen und können daher als EOF-Marker eingesetzt werden[109].

Der Zusatz von organischen Additiven zum Elektrolyt beeinflußt jedoch in hohem Maße die micellaren Eigenschaften (Bildung, Größenverteilung, Form, CMC, etc.) und damit auch das Trennprinzip[110]. Bis heute sind die komplexen Trennmechanismen von Multikomponent-Elektrolyten noch nicht aufgeklärt[111]. Während einige Autoren der Meinung sind, daß das Trennprinzip weiterhin auf den Verteilungsgleichgewichten der Analyte zwischen der micellaren und wäßrigen Phase beruht, sagen andere, daß die CMC durch den Zusatz der Additive Acetonitril und Methanol so stark steigt, daß Micellen bei den gewöhnlich verwendeten Gemischen nicht mehr gebildet werden. Da jedoch neutrale Analyte in solchen Elektrolyten noch meßbare Eigenmobilitäten haben, die auf Wechselwirkungen mit Tensidmolekülen beruhen müssen, wird vermutet, daß die Trennung in diesem Fall auf

Wechselwirkungen mit Tensidmonomeren zurückzuführen ist. Diese Vermutung erklärt die Trennung jedoch nicht hinreichend, da gezeigt werden konnte, daß die Analytmobilitäten für diese Wechselwirkungen zu hoch sind[111]. Eine Untersuchung des Elektrolyten auf die Existenz von Micellen ist folglich naheliegend.

Ob Micellen in einem Elektrolytgemisch vorliegen oder nicht, kann durch *Messung der Kritischen Micellaren Konzentration* des Tensids untersucht werden, da oberhalb der CMC Micellen gebildet werden.

Dazu eignen sich beispielsweise Techniken wie konventionelle oder quasielastische Lichtstreuung, statische oder zeitaufgelöste Fluoreszenz, Voltammetrie[112], Kapillarelektrophorese[113,114] und Messungen der Konduktivität oder Oberflächenspannung[115,116]. Ein Vergleich gestaltet sich hierbei sehr schwierig, da die Meßergebnisse stark methodenabhängig sind.

Anhand von Konduktivitätsmessungen haben Seifar et al.[111] gezeigt, daß Meßergebnisse für die CMC in Gemischen mit dem organischen Modifier Acetonitril vorsichtig interpretiert werden müssen. In rein wäßrigen Tensidlösungen findet oberhalb der CMC ein abrupter Phasenübergang statt. Der thermodynamische Energieunterschied zur begünstigten micellaren Phase ist sehr gering. Rechnungen haben gezeigt, daß die micellare Phase dabei um etwa 1% energetisch bevorzugt ist. Wird die Tensidkonzentration oberhalb der CMC weiter erhöht, bilden sich immer mehr Micellen. Die Konzentration an freien Tensidmonomeren in der wäßrigen Phase bleibt hingegen konstant (siehe oben). Die Aggregationszahlen der Micellen sind für SDS-Lösungen in reinem Wasser relativ schmal um die Zahl 70 normalverteilt.

In Gegenwart von Acetonitril erfolgt dieser Phasenübergang hingegen nicht so abrupt. Es wird nun thermodynamisch nicht mehr nur der kleine Bereich an Micellaggregaten um die Zahl 70 begünstigt, sondern die Micellen haben eine breitere Verteilung bezüglich ihrer Aggregationszahl. Der Phasenübergang ist unschärfer, weswegen die Bezeichnung CMC in solchen Systemen nur eingeschränkt verwendet werden kann.

Außerdem bleibt bei steigender Tensidkonzentration die Konzentration der freien Tensidmonomere in der wäßrigen Phase nicht mehr konstant. Da sich das Lösungsvermögen der wäßrigen Phase durch Acetonitril für die Tensidmonomere verbessert, steigt deren Konzentration in der wäßrigen Phase bei steigender Gesamtkonzentration des Tensids

kontinuierlich an. Je höher dabei die Acetonitril-Konzentration ist, desto stärker werden die Monomere in der wäßrigen Phase gegenüber den Micellen begünstigt. Ein abrupter Wechsel der physikalischen Eigenschaften wie bei der Kritischen Micellaren Konzentration in rein wäßrigen Tensidlösungen ist bei Gemischen mit organischen Additiven nicht mehr zu beobachten.

Es ist daher wahrscheinlich, daß sich die micellare Phase bei Erhöhung der Tensidkonzentration sukzessiv von kleinen zu größeren Aggregationszahlen ausbildet, während gleichzeitig die Monomerkonzentration in der wäßrigen Phase steigt.

Um einen Einblick in das Trennprinzip des in dieser Arbeit verwendeten Elektrolyten zu gewinnen, wurde untersucht, ob in diesem System Micellen gebildet werden. Dazu wurde analysiert, ob ein Phasenübergang ähnlich wie bei der CMC in wäßrigen Systemen mit Hilfe von Oberflächenspannungsmessungen bestimmt werden kann. Die erhaltenen Daten wurden mit den Literaturwerten verglichen und die Ergebnisse interpretiert.

Die Oberflächenspannung einer Flüssigkeit läßt sich mit Hilfe eines Tensiometers messen[117]. Tenside haben die Eigenschaft, die Oberflächenspannung von wäßrigen Lösungen zu erniedrigen. Dies kommt dadurch zustande, daß die Tensidmoleküle aus dem inneren ihrer Lösung an die Oberfläche diffundieren und sich dort so orientieren, daß der hydrophobe Schwanz aus der Lösung herausgedreht ist und der hydrophile Kopf in die wäßrige Lösung eintaucht. Der so entstehende Grenzflächenfilm erniedrigt die Oberflächenspannung der Lösung.

Ab der CMC wird die Oberflächenspannung nicht weiter erniedrigt. Es bilden sich bei höheren Konzentrationen nur noch weitere Micellen in der Lösung, so daß die Konzentration an Monomeren nicht weiter steigt.

Das Meßprinzip des Tensiometers beruht auf der Messung der Kraft, die von der Flüssigkeit auf einen eintauchenden ringförmigen Meßkörper ausgeübt wird. Da die Größe der Kraft stark temperaturabhängig ist, wird das System bei 25°C thermostatisiert. Beim Herausziehen des Meßkörpers bildet sich am Ring eine Flüssigkeitslamelle, die auf den Ring eine Zugkraft ausübt. Die Messung erfolgt mit einem induktiven Kraftaufnehmer, der die gemessene Kraft in eine Gleichspannung umwandelt, die von einem Schreiber als Funktion der Zeit registriert wird. Da Zeit und Lamellenlänge linear verknüpft sind, wird so ein Kraft/

Dehnungsdiagramm der Lamelle registriert. Aus dem Maximum des Kraftverlaufes läßt sich die Oberflächenspannung δ berechnen (Gleichung 9).

Gleichung 9 $\delta = F_{ZM}/2U$ [mN/m]

F_{ZM} = maximale Zugkraft
U = Ringumfang

Um Absolutwerte für die Kraft anzugeben, wird das System mit speziellen Gewichten kalibriert. Danach entspricht ein Skalenteil des Schreiberausschlags einem mN/m. Aus dem Maximum des Schreiberausschlags kann direkt die Oberflächenspannung der Lösung abgelesen werden.

In wäßrigen Tensidlösungen kann die CMC bestimmt werden, indem die Oberflächenspannung gegen die logarithmierte Tensidkonzentration aufgetragen wird. Bis zur CMC fällt die Oberflächenspannung dabei kontinuierlich ab, darüber ändert sie sich hingegen nicht mehr. An diesem Minimum der Kurve kann die CMC direkt abgelesen werden. Danach steigt die Oberflächenspannung wieder leicht an oder bleibt bei diesem Wert konstant. Wird so die Kritische Micellare Konzentration von SDS in Wasser bestimmt, ergibt sich ein Wert von 8 mmol/L (vgl. Abbildung 9).

Die Optimierung des Elektrolytgemisches für die Bestimmung von Phenolen mit der MEKC hat die Zusammensetzung 50 mmol/L Natriumdihydrogenphosphat-Lösung, 100 mmol/L SDS, 5% (v/v) Methanol und 10% (v/v) Acetonitril (siehe Kapitel 4.2.4.2) ergeben. Aufgrund des Elektrolyten und des 15%igen Anteils an organischen Modifiern sollte die Micellbildung wie oben beschrieben beeinflußt werden. Daher wurde untersucht, ob sich durch die Messung der Oberflächenspannung des Elektrolyten Aussagen zur Micellbildung ableiten lassen.

Dazu wurde die Oberflächenspannung des MEKC-Elektrolyten (50 mmol/L Natriumdihydrogenphosphat-Lösung 5% (v/v) Methanol und 10% (v/v) Acetonitril) bei verschiedenen SDS-Konzentrationen von 0 bis 120 mmol/L mit einem Tensiometer bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt. Das Diagramm zeigt die Kraft/ Konzentrationskurven für SDS in Wasser und im MEKC-Elektrolyt bei 25°C. Die Oberflächenspannungs-Konzentrationskurve für SDS in Wasser fällt von 74 mN/m steil bis zum Minimum bei der CMC (31 mN/m, 8 mmol/L, Literaturwerte[117]) ab. Oberhalb der CMC gelangen alle Tensidmonomere in die micellare Phase. Das Auftreten dieses Minimums läßt

sich durch grenzflächenaktive Verunreinigungen im System SDS/ Wasser erklären. Unterhalb der CMC erniedrigen die Verunreinigungen die Oberflächenspannung der Lösung. Werden oberhalb der CMC Micellen gebildet, lagern sich die Verunreinigungen in die Micellen ein, so daß die Oberflächenspannung der Lösung wieder leicht steigt.

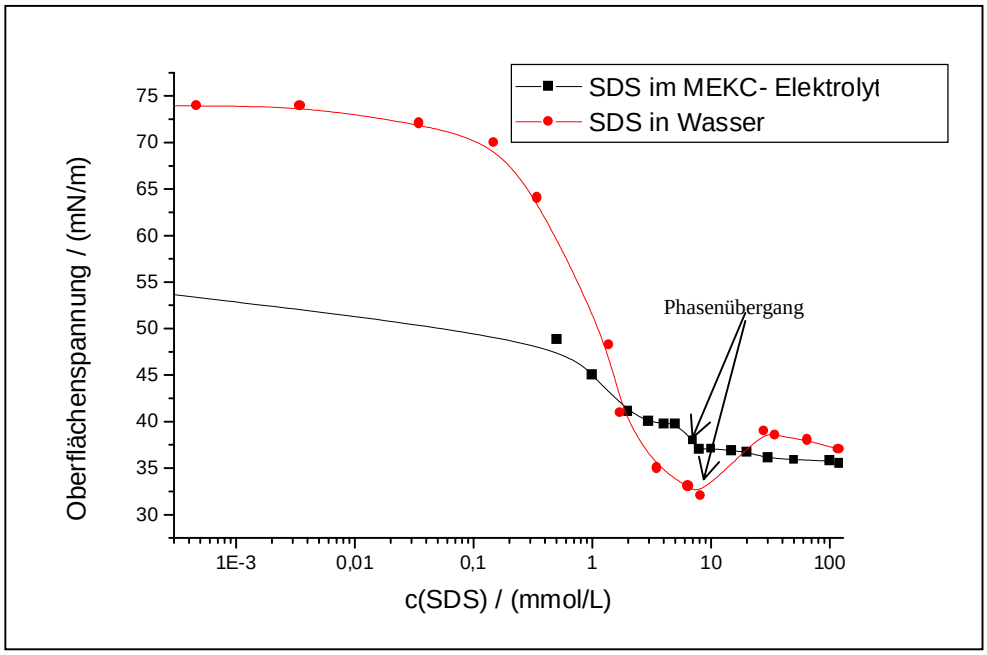

Abbildung 9: Oberflächenspannungs-/ Konzentrations-Kurven für SDS in Wasser und im MEKC-Elektrolyt

Das Ansteigen der Meßwerte oberhalb der CMC kommt auch dadurch zustande, daß es Teilchen der Lösung (Tensidhydrate und Micellen) gelingt, die bewegliche Oberflächenstruktur zu durchbrechen, um sich in den Oberflächenfilm einzulagern. Bei Werten im Bereich der Sättigungskonzentration liegen die Meßwerte für die Oberflächenspannung bei ca. 33 mN/m. Ein geringerer Wert als das Minimum der CMC wird nicht erreicht.

Im Vergleich zur wäßrigen SDS-Lösung ist der Kurvenverlauf für die Oberflächenspannung im MEKC-Elektrolyt wesentlich flacher. Dies kann auf den Phosphatpuffer zurückgeführt werden, durch den die Oberflächenspannung bereits von 74 auf 54 mN/m erniedrigt wird.

Der Zusatz der organischen Additive beeinflußt die Oberflächenspannung hingegen nicht (53,9 mN/m), da die kleinen und polaren Moleküle gut in das Netz der Wasserstoffbrückenbindungen des Wassers eingebaut werden können.

Vergleichbare Extremwerte für die Kurve der wäßrigen Lösung sind bei der Kurve für den Elektrolyt nicht vorhanden. Nach dem langsamen Absinken der Oberflächenspannung von 53,9 auf 39,8 mN/m fällt die Kurve zwischen den Meßwerten bei 5 und 8 mmol/L deutlich um 2 mN/m auf 37,2 mN/m ab. Dieses Abfallen läßt vermuten, daß hier ein Phasenübergang stattfindet, der dem bei der Kritischen Micellaren Konzentration in Wasser ähnelt. Bis zur höchsten SDS-Konzentration bei 120 mmol/L fallen die Meßwerte dann langsam weiter bis auf den Minimalwert bei 35,5 mN/m ab. Dieser Kurvenverlauf ist im Vergleich mit dem zur Bestimmung der CMC in Wasser ungewöhnlich, da das Minimum bei der CMC dort normalerweise nicht unterschritten wird. Ein Maximum bei Konzentrationen oberhalb der CMC tritt ebenfalls nicht auf.

Die Meßergebnisse lassen sich ebenso wie die von Seifar et al. interpretieren[111]. Der Phasenübergang bei 7-8 mmol/L läßt darauf schließen, daß ab dieser Konzentration im Elektrolyt die Micellbildung beginnt. Die Micellen im Elektrolyt werden jedoch im Gegensatz zu Micellen in Wasser sukzessiv von kleinen zu größeren Aggregationszahlen gebildet. Kleinere Tensidaggregate entstehen wahrscheinlich schon bei Konzentrationen unterhalb von 7 mmol/L. Ein abrupter Wechsel der physikochemischen Eigenschaften ist daher nicht mehr zu beobachten.

Das Lösungsvermögen der Monomere in der wäßrigen Phase hat sich durch die organischen Additive Methanol und Acetonitril verbessert. Daher steigt die Monomerkonzentration in der wäßrigen Phase des Elektrolyten mit steigender Gesamtkonzentration des Tensids ebenfalls kontinuierlich an. Da die Monomere in der wäßrigen Phase die Oberflächenspannung des Systems erniedrigen, sinken die Meßwerte dafür auch oberhalb des Phasenübergangs bis zum Minimalwert bei der Sättigungskonzentration weiter ab. Ein Minimum wie bei der CMC in Wasser wird nicht ausgebildet, da die dafür verantwortlichen oberflächenaktiven Verunreinigungen ebenso wie die Tensidmoleküle schon bei niedrigeren Konzentrationen Aggregate in der Lösung bilden.

Die Ergebnisse der Untersuchung des MEKC-Elektrolyten auf die Existenz von Micellen anhand von Oberflächenspannungsmessungen deuten darauf hin, daß trotz der relativ hohen Konzentration an organischen Additiven Micellen gebildet werden. Die Micellbildung erfolgt bei steigender SDS-Konzentration jedoch nicht abrupt wie in rein wäßrigen Systemen mit einer schmalen Größenverteilung um die Aggregationszahl 70. Wahrscheinlicher ist die kontinuierliche Bildung von Micellen mit sehr unterschiedlichen Aggregationszahlen.

Gleichzeitig steigt mit der SDS-Gesamtkonzentration auch die Konzentration der Monomere in der wäßrigen Phase des Elektrolyten. Dieses beeinflußt die Löslichkeit der Analyte in der wäßrigen Phase und folglich auch deren Verteilungskoeffizienten zwischen micellarer und wäßriger Phase.
Der Phasenübergang von Tensidmonomeren zu Micellen ist einerseits durch die breite Verteilung der Micellaggregationszahl und andererseits durch die hohe Tensidmonomer-Konzentration in der wäßrigen Phase unschärfer als im Vergleichssystem SDS/ Wasser.
Die Untersuchung der Micellbildungsprozesse am verwendeten MEKC-Elektrolyt bestätigt, daß durch die breite Verteilung der Micellaggregationszahl die Signalbreite zunimmt und die Dosiermenge in rein organischen Lösungsmitteln ohne Peakverbreiterung begrenzt ist.

3.2.3.4 Anreicherungstechniken

Die Empfindlichkeit der CE bezogen auf die Stoffmenge des Analyten ist sehr hoch. Mit der Fluoreszenzdetektion gelingt es zum Beispiel, nur wenige Moleküle einer Substanz nachzuweisen.
Die konzentrationsbezogenen Nachweisgrenzen liegen jedoch oft um Größenordnungen über denen anderer Analysentechniken wie z.B. der HPLC. Dies resultiert aus den extrem kleinen Probenvolumina, die auf die Kapillare aufgegeben werden, und aus der durch den Kapillardurchmesser begrenzten optischen Weglänge für die on-line UV-vis-Detektion.
Um die konzentrationsbezogenen Nachweisgrenzen zu senken, ist es möglich, die Probe innerhalb der Kapillare aufzukonzentrieren. Dabei unterscheidet man zwischen der Anreicherung von ionischen Analyten und Neutralteilchen.

Zur *Anreicherung von ionischen Analyten* aus wäßrigen Lösungen sind in der Literatur unterschiedliche Techniken beschrieben. Als gut geeignet für den Einsatz in der CZE hat sich die Technik des „Electro Stacking“ erwiesen[118] (Abbildung 10).
Die Kapillare wird dabei während der Dosierung durch Anlegen einer Druckdifferenz mit der Probenlösung überladen. Es ist theoretisch möglich, die gesamte Kapillare mit der zu analysierenden Lösung zu füllen (A).
Zur Anreicherung (B) von Anionen wird eine Hochspannung ($-V_s$) mit umgekehrter Polarität angelegt. Die wäßrige Probe hat einen wesentlich höheren elektrischen Widerstand als das

Elektrolytsystem. Daher ist die elektrische Feldstärke in dem Kapillarbereich, der mit wäßriger Probe gefüllt ist, höher, und die Ionen haben dort entsprechend höhere elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeiten. An der Konzentrationsgrenze zum Elektrolyt werden die Analyte langsamer und reichern sich an, während das Wasser durch den umgekehrten Elektroosmotischen Fluß aus der Kapillare herausgedrückt wird.

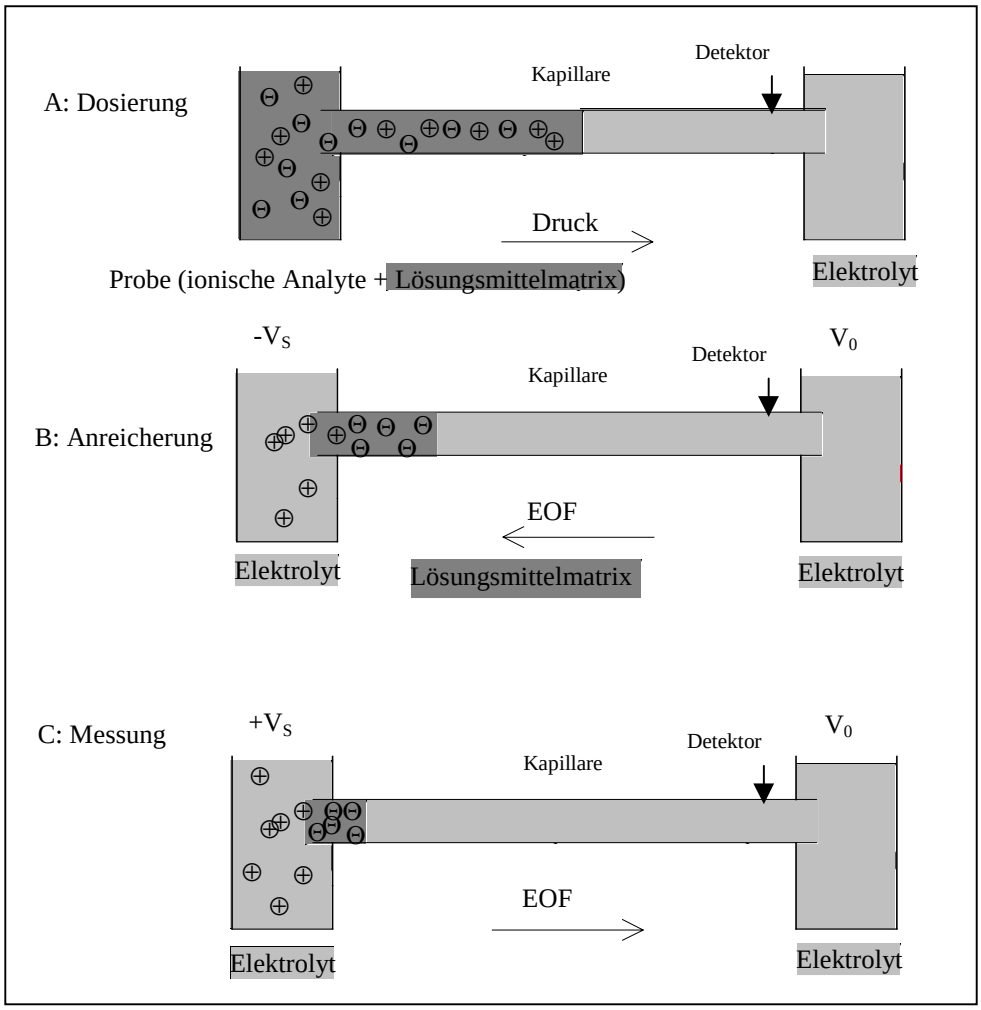

Abbildung 10: Schematische Darstellung der Anreicherungstechnik „Electro Stacking“

Der Strom steigt während dieses Prozesses kontinuierlich an. Hat er ca. 95% des Maximalwertes erreicht, wird mit der Messung begonnen, indem wieder zur normalen Polarität umgeschaltet wird (C). Nun beginnt der Trennprozeß der CZE. Für die Anreicherung von Kationen müssen die Polaritäten entsprechend geändert werden.

Neutrale Substanzen können so nicht angereichert werden. Auch für die Anwendung bei der MEKC ist „Electro Stacking“ ungeeignet. Wegen der breiten Größenverteilung der Micellen

kommt es zur Peakverbreiterung beim Anreicherungsprozeß, so daß ein erheblicher Verlust der Auflösung akzeptiert werden muß[119].

Für die *Anreicherung von Neutralteilchen* müssen andere Techniken eingesetzt werden. Diese Techniken sind neu und befinden sich noch weitestgehend im Stadium der Entwicklung. Es sind nur wenige Applikationen dazu in der Literatur beschrieben.

Die in dieser Arbeit eingesetzte Anreicherungstechnik für neutrale Analyte basiert auf Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe Terabe[120,121,122,123,124,125] zu diesem Thema und wurde für die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit entsprechend weiterentwickelt (siehe Kapitel 4.2.4.2). Die Anreicherungstechnik wird im folgenden als „Direktes-MEKC-Stacking“ bezeichnet (Abbildung 11).

Zunächst wird die Probe durch Anlegen eines Druckes auf die Kapillare aufgegeben (A). Ebenso wie beim „Electro Stacking“ für ionische Spezies wird die Kapillare mit Probenlösung überladen. Vor der Probe wird etwas Wasser dosiert, um eine große Differenz in der Feldstärke zwischen Probe und Elektrolyt zu erzielen. Bei niedrigen pH-Werten sind die Silanolgruppen an der inneren Kapillaroberfläche weitestgehend protoniert, wodurch sich das Zeta-Potential und damit auch der Elektroosmotische Fluß verringert.

Wird nun eine negative Spannung an der Seite der Probenaufgabe angelegt (B), fließt in diesem Fall der EOF in Richtung der Injektionsseite der Kapillare. Die negativ geladenen Micellen sind schneller als der EOF und wandern in Richtung Detektor. Eine Änderung der Polarität der Spannung ist in diesem Fall für die Anreicherung nicht nötig. Der Anreicherungsprozeß ist genauso wie beim „Electro Stacking“ auf unterschiedliche elektrische Feldstärken zwischen Probenzone und Elektrolyt zurückzuführen.

Während ihrer Verweilzeit innerhalb der micellaren Phase werden die Analyte in Richtung Detektor transportiert, innerhalb der wäßrigen Phase hingegen mit dem EOF in die andere Richtung (C). Die Trennung der Analyte erfolgt durch die unterschiedlichen Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der Analyte in der wäßrigen und micellaren Phase des Elektrolyten. Spezies, die mit der micellaren Phase nur wenig wechselwirken, können mit dieser Technik nur schlecht oder gar nicht angereichert werden (s. Kapitel 4.2.4.2, z.B. Phenol). Die Lösungsmittelmatrix wird mit dem EOF während der Trennung aus der Kapillare herausgespült.

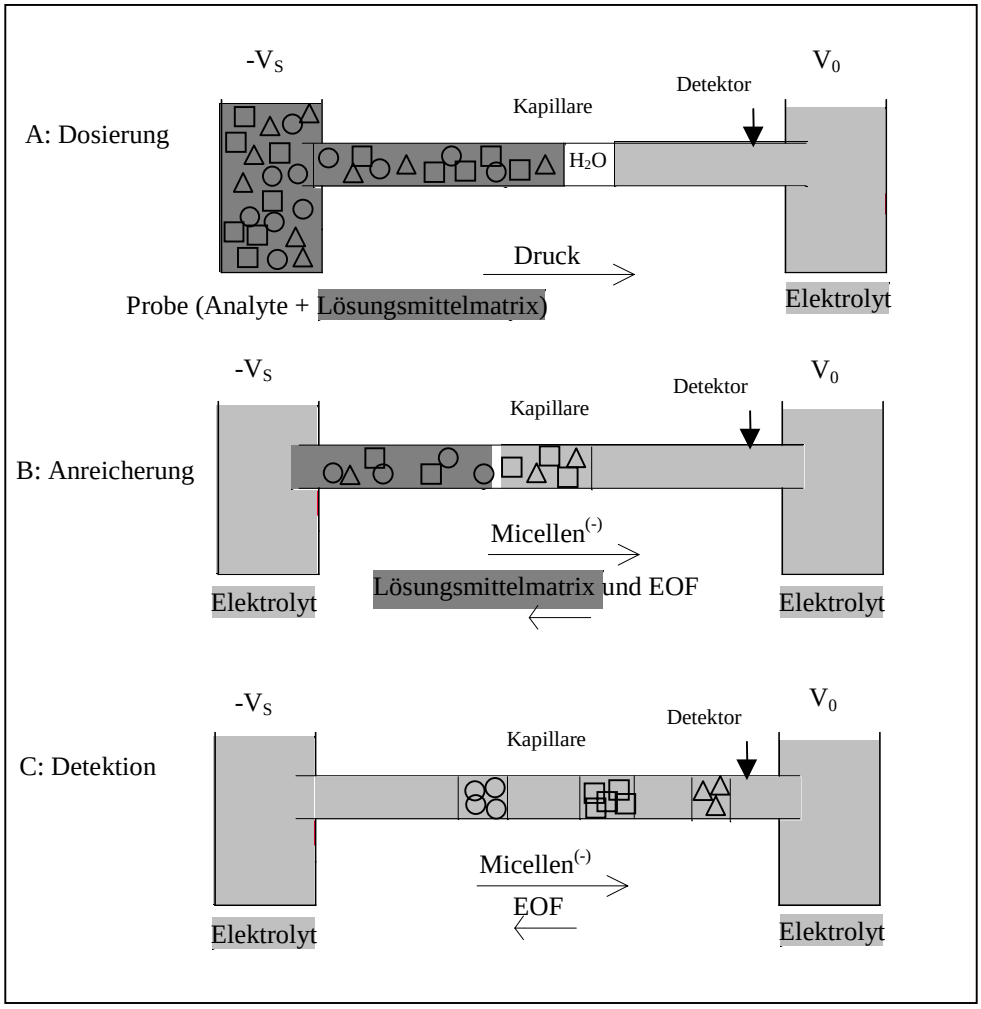

Abbildung 11: Anreicherungstechnik für neutrale Moleküle

4 Entwicklung neuer Analysenverfahren für die Phenolanalytik

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Optimierung von Analysenverfahren für die Phenolanalytik, die sowohl zur Screening- als auch zur quantitativen Analyse eingesetzt werden können, sowie als Standard- und Referenzverfahren zur Herstellung und Zertifizierung von natürlichen Matrix-Referenzmaterialien genutzt werden sollen. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Entwicklung spezifischer und unabhängiger Trenn- und Nachweistechniken für eine breite phenolische Substanzpalette. Die Validierung und der Vergleich der Analysenverfahren setzen Gemische bekannter Zusammensetzung und genau definierter Konzentration voraus. Diese können weder aus realen noch aus synthetisch hergestellten Matrixproben (siehe Kapitel 5) gewonnen werden. Die Extraktionstechniken standen daher nicht im Mittelpunkt der Untersuchungen, wurden aber an ausgewählten realen Matrixproben bezüglich ihrer Eignung für die Kombination mit den entwickelten Analysentechniken überprüft.

Für die Validierung und den Vergleich der Analysenverfahren wurden für diese Arbeit verschiedene Modellgemische hergestellt, die typische Vertreter der Alkyl-, Nitro- und Chlorphenole enthalten. Bei der Auswahl dieser Substanzen wurden folgende Gesichtspunkte berücksichtigt:

- Die Substanzpalette sollte soweit wie möglich die in den internationalen Normen aufgeführten Verbindungen umfassen.
- Die Modellgemische haben in Anpassung an die eingesetzten Analysenmethoden unterschiedliche Konzentrationsniveaus sowie in Lösungsmittel und Substanzpalette variierende Zusammensetzungen.
- Weiterhin sollten phenolische Abbauprodukte der Waschmittel- und petrochemischen Industrie (z.B. Methoxy- und Ethylphenole, Naphthole, Indanole) ausgewählt werden.
- Zur Charakterisierung und Einschätzung der Substanzspezifität der eingesetzten Analysenmethoden sollten außerdem gezielt Isomere und Homologe mit steigendem Substitutionsgrad den Modellgemischen zugesetzt werden.

Zur Bewertung der Leistungsfähigkeit und für den Vergleich der neu entwickelten Verfahren sind in dieser Arbeit Verfahrenskenndaten wie Bestimmungsgrenzen, Selektivität, Meßunsicherheit der Analysendaten und Zeitaufwand ermittelt worden.

Besonders geeignet für die Analytik von Phenolen zeigte sich das auf der Basis der Kapillarelektrophorese entwickelte Verfahren, das durch einen Ringversuch abgesichert werden konnte.

4.1 Extraktionstechniken

Für die Abtrennung der Analyte aus komplexen flüssigen und festen Umweltmatrices[126] stehen verschiedene Extraktionstechniken zur Verfügung (siehe Kapitel 3.1).
Zur Extraktion aus wäßrigen Proben wurden in der vorliegenden Arbeit die Flüssig-Flüssig-Extraktion und die Festphasenextraktion (SPE) eingesetzt. Aus festen Matrices wurden die Analyte mit der Beschleunigten Lösemittelextraktion (ASE, © Firma Dionex) abgetrennt.
Die Extraktion von phenolischen Verbindungen ist wegen ihrer unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften oft problematisch. Die polaren Substanzen sind aus ihrer Matrix nur schwer zu entfernen. Die vollständige Abtrennung von Substanzen aus flüssiger Matrix setzt unterschiedliche Verteilungskoeffizienten in der Matrix und dem Extraktionsmittel voraus. In festen Matrices können sich Phenole über polare funktionelle Gruppen an die Matrix anlagern, so daß die Extraktion erschwert wird, besonders für humoses Bodenmaterial.

4.1.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Im Rahmen von Ringversuchsmessungen (15. VGS-Ringversuch, April 1997) wurden drei Phenole aus synthetischen Abwasserproben mit der Flüssig-Flüssig-Extraktion extrahiert. Dabei wurde in Anlehnung an eine DIN-Vorschrift[35] (DIN 38407 F15) Pentachlorphenol, 2,4,6-Trichlorphenol und 2,6-Dichlorphenol durch Ausschütteln mit n-Hexan in einem Scheidetrichter extrahiert. Es wurden 250 mL Probe (pH = 4) drei mal mit je 8 mL n-Hexan extrahiert. Die organischen Phasen wurden in einem Maßkolben vereinigt und auf 25 mL mit n-Hexan aufgefüllt. Die Analyse erfolgte mit GC/MS nach Derivatisierung mit MSTFA (siehe Kapitel 4.2.3). Es zeigte sich, daß die Extraktionsausbeuten wegen unterschiedlicher Löslichkeiten der drei Substanzen zwischen Lösungsmittelmatrix und Extraktionsmittel sehr verschieden sind. So konnte PCP vollständig extrahiert werden, während bei 2,4-DMP nur Wiederfindungsraten unter 30% gefunden wurden (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Wiederfindungsraten der Flüssig-Flüssig-Extraktion

Analyt	Wiederfindungsrate /%
PCP	120
2,4-DMP	26
2,4,6-TCP	94

Daher wurde die Probe mit einer definierten Menge isotopenmarkierter Verbindungen der Analyte versetzt ($^{13}C_6$-PCP, 2,4-DMP-ring-d_3, 2,4,6-TCP-ring-d_2). Während der Extraktion verhalten sich die nicht markierten und die isotopenmarkierten Analyte gleich, so daß bei der quantitativen Analytik Wiederfindungsraten keinen entscheidenden Einfluß haben. Sind die Wiederfindungsraten jedoch sehr gering, wird die Unsicherheit durch die größere Streuung der Analysenergebnisse zu hoch. Bei Einsatz von isotopenmarkierten Standards kann die Flüssig-Flüssig-Extraktion als zuverlässiges Verfahren in der Phenolanalytik eingesetzt werden. Nachteilig sind jedoch der hohe Lösungsmittelverbrauch und die hohen Kosten für die isotopenmarkierten Verbindungen.

4.1.2 Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion (SPE) wird zur Trennung und Anreicherung[127] von Phenolen[128] aus flüssiger Matrix[129,130] eingesetzt. Untersuchungen an unterschiedlichen Trägermaterialien[131,132] haben ergeben, daß für jeden Analyt Wiederfindungsraten und Durchbruchszeiten bestimmt werden müssen. Die Analyte werden als neutrale Spezies aus der Matrix entfernt, um adsorptive Effekte zwischen der Matrix und den Analyten zu minimieren (pH-Wert des Extraktionsmittels je nach Analysentechnik ca. 2-4). Da die unterschiedlichen Stoffgruppen der Phenole sich in diesen Parametern stark unterscheiden, ist hier ebenso wie bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion der Einsatz von isotopenmarkierten Standards anzuraten.

Teilweise werden phenolische Verbindungen mit Matrixbestandteilen ähnlicher physikochemischer Eigenschaften extrahiert. Aus demselben Grund werden die Phenole auf dem SPE Material gleichzeitig mit den Matrixkomponenten angereichert und wieder eluiert. Bei der Analyse der Proben sind die Analytsignale oft mit Signalen von Matrixkomponenten überlagert.

Ziel der Analytik von flüssigen Matrixproben sollte daher die direkte Analyse der Proben sein. So kann auf die stark fehlerbehaftete Bestimmung von Wiederfindungsraten und Durchbruchszeiten verzichtet werden.

4.1.3 Beschleunigte Lösemittelextraktion

Die Beschleunigte Lösemittelextraktion (ASE) ist mittlerweile als effiziente Heißextraktionstechnik neben der Soxhletextraktion für feste Matrices anerkannt[43].

Die ASE hat gegenüber der Soxhletextraktion den Vorteil, auch bei geringem Lösungsmittelverbrauch und schnellen Bearbeitungszeiten hohe Extraktionsausbeuten zu liefern.

Bei den erhöhten Druck- und Temperaturwerten (140 bar, 100 bis 140°C) während der Extraktion haben die Lösungsmittel andere Eigenschaften, die sich vorteilhaft nutzen lassen. Beispielsweise gelingt die Extraktion relativ polarer Phenole aus Bodenproben mit dem unpolaren Lösungsmittel n-Hexan, da sich die Verteilungskoeffizienten der Analyte bei den Extraktionsbedingungen gegenüber Soxhlet-Bedingungen ändern. Es ist jedoch darauf zu achten, daß thermolabile Analyte bei den gewählten Extraktionsbedingungen nicht zerstört werden. In diesem Fall muß die Probe mit Ultraschall extrahiert werden (Kaltextraktionsverfahren).

Bei der Soxhletextraktion müssen Lösungsmittelgemische aus n-Hexan und Aceton verwendet werden, um die Phenole quantitativ aus ihrer Matrix zu entfernen. Dadurch erhöht sich die Menge der mitextrahierten Matrixkomponenten drastisch.

Die Extraktion polarer Analyte aus Bodenproben mit der ASE muß für jede Matrix neu überprüft und optimiert werden. Bei humosen Bodenproben ist es möglich, daß die Extraktion mit n-Hexan aufgrund von Adsorption der Analyte an die Matrix nicht mehr ausreichend ist und zu polareren Extraktionsmitteln gewechselt werden muß. Bei den untersuchten Bodenproben wurde durch doppelte Nachextraktion der Proben gewährleistet, daß die Extraktionsausbeuten über 95% lagen.

Anhand von Holzproben, die mit PCP und anderen Holzschutzmittelwirkstoffen belastet waren, sind Extraktionsergebnisse von ASE und Soxhlet mit einander verglichen worden. Für die Mehrzahl der Substanzen liefert die ASE höhere Extraktionsausbeuten als die Soxhletextraktion. Das ist vor allem auf das bessere Eindringvermögen des Extraktionsmittels in die Holzmatrix unter ASE-Bedingungen zurückzuführen.

Die ASE ist in der Lage, eine Probe von ca. 10 g innerhalb von 30 min mit ca. 40 mL Lösungsmittel zu extrahieren. Mit der Soxhlet-Technik werden dazu mindestens 500 mL Lösungsmittel und eine Bearbeitungszeit von ca. 24 Stunden benötigt.

4.2 Instrumentelle Analysenverfahren

Verschiedene qualitative und quantitative Anforderungen an die Analytik von phenolischen Verbindungen sowie die große Bandbreite der Stoffeigenschaften und Lösungsmittelmatrices der Analyte erfordern die Entwicklung von unterschiedlichen Analysenverfahren. In der vorliegenden Arbeit wurden die instrumentellen Techniken der HPLC-MS, HPLC-NMR, GC-MS und CE für die Entwicklung von Analysenverfahren für die Bestimmung von Phenolen in umweltrelevanten Matrices eingesetzt.

Auf dem Gebiet der HPLC-MS sind die Techniken der „Electrospray Ionization“ (ESI) und „Atmospheric Pressure Chemical Ionization“ (APCI) für die Untersuchung von Phenol-Modellgemischen in hydrophilen und hydrophoben Lösungsmitteln eingesetzt worden. Für die HPLC-NMR Kopplung wurden Verfahrenskenngrößen ermittelt sowie Möglichkeiten und Grenzen der Strukturaufklärung für die Phenolanalytik untersucht. Mit den besonders empfindlichen Techniken der GC-LR- und GC-HR-Massenspektrometrie wurden Analysenverfahren für hydrophobe Matrices entwickelt und validiert[133] (Bestimmung von Verfahrenskenngrößen und -unsicherheit). Es wurden kapillarelektrophoretische Trennverfahren für die Analytik von Phenolen in hydrophiler Matrix entwickelt. Das Verfahren der „Direkten-MEKC-Stacking“-Technik wurde wegen seiner besonderen Eignung ebenfalls validiert.

Aus dem Vergleich der Analysenverfahren ergibt sich die Einsatzfähigkeit als Standard- oder Referenzverfahren.

4.2.1 HPLC-MS

Für die Analytik von Phenolen sind die APCI- und ESI-Techniken bisher noch nicht universell einsetzbar gewesen, da die Substanzen wegen ihrer verschiedenartigen physikochemischen Eigenschaften nicht alle erfolgreich ionisiert bzw. detektiert wurden (siehe Kapitel 3.2.1.1). Bisher gelang nur die Analyse der relativ polaren bzw. aciden Chlor- und Nitrophenole. Die unpolaren und wenig aciden Substanzen wie Alkylphenole konnten bisher mit den API-Techniken nicht gemessen werden[134]. Daher wurde untersucht, ob sich durch Wahl geeigneter Meßparameter auch die bisher nicht detektierten Substanzen ionisieren lassen.

In dieser Arbeit wurde eine modulare HPLC-Apparatur der Firma Gynkotek eingesetzt (Gynkotek HPLC-System mit Niederdruck-Gradientenpumpe (Model 480) und Autosampler (CTC Analytics Liquid Sampler A200SE)). Die HPLC wurde an ein hochauflösendes, doppelfokussierendes Sektorfeld-Massenspektrometer der Firma Finnigan (MAT 95), über ein API-Interface (API II) gekoppelt. Das Interface wurde im APCI- und ESI-Modus betrieben.

4.2.1.1 HPLC-ESI-MS

Die „Electrospray Ionization“- (ESI-) MS wird vorwiegend zur Analyse ionischer bzw. stark polarer Verbindungen eingesetzt (siehe Kapitel 3.2.1.1). Phenolische Substanzen liegen in Lösung je nach pH-Wert der Matrix entweder als neutrale Spezies oder als Ionen vor.

Mit der HPLC werden phenolische Verbindungen üblicherweise mit Eluenten im sauren bis neutralen pH-Bereich getrennt. Bei pH-Werten kleiner 9 liegen nur Substanzen mit einem niedrigen pKs-Wert wie Chlor- und Nitrophenole im Laufmittel als Ionen vor. Diese Substanzen lassen sich mit der ESI in das Massenspektrometer überführen und dort als negative Ionen nachweisen (siehe Abbildung 3). Verbindungen mit höheren pKs-Werten wie Alkylphenole sind bei diesen pH-Werten undissoziiert und massenspektrometrisch nicht zu erfassen. Bei alkalischen Laufmitteln (wäßrige Natronlauge, 100 mmol/L, pH = 12) liegen jedoch alle untersuchten Substanzen in der deprotonierten Form vor (siehe Tabelle 1) und können mit der ESI nachgewiesen werden.

Die ESI-negativ-Massenspektren der Analyte zeigen alle das gleiche Ionisierungsmuster. Als Beispiel ist in Abbildung 12 das ESI-negativ-Spektrum für 2,6-Dimethylphenol dargestellt. Das Signal für das deprotonierte Molekülion ($[M-H]^-$) ist dabei dominierend. Daneben werden Addukte aus zwei deprotonierten Molekülionen und einem Natriumion ($[2[M-H]^- +Na^+]^-$) detektiert. Natriumionen sind im Eluenten ubiquitär vorhanden.

Aus den Massenspektren lassen sich demnach nur Informationen über das Molekulargewicht der Phenolverbindung entnehmen. Da keine Fragmentionen auftreten, lassen sich vertiefende Aussagen zur Molekülstruktur des Phenolderivates (Struktur der Alkylketten, Stellungsisomerie) nicht treffen. Dagegen ist über die Erfassung des deprotonierten Molekülions im MID-Modus eine hochselektive und empfindliche Bestimmung der Verbindungen möglich.

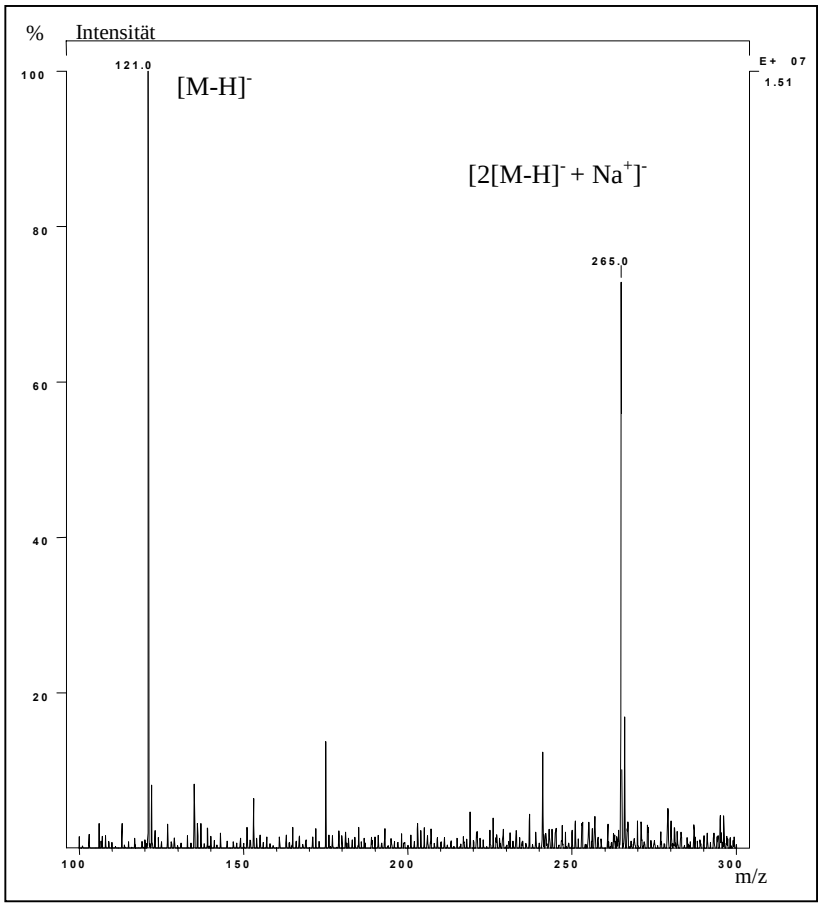

Abbildung 12: ESI-negativ-Massenspektrum für 2,6-Dimethylphenol

Meßparameter: MS: FIA mit wäßriger Natronlauge (100 mmol/L, pH = 12), ESI-negativ-Parameter: Spray-Spannung: 2,8 kV, Temperatur der Transferkapillare: 290°C, Sheath-Gas: 6 bar Luft, Full-Scan-Massenbereich: 100-600 Dalton, Auflösung: 1000, äquivalente Spektren zeigen folgende Substanzen: Phenol, 2-Methylphenol, 3-Methylphenol, 4-Methylphenol, 2-Ethylphenol, 3-Ethylphenol, 4-Ethylphenol, 2,3-Dimethylphenol, 2,4-Dimethylphenol, 2,5-Dimethylphenol, 3,4-Dimethylphenol, 3,5-Dimethylphenol, 2,3,5-Trimethylphenol, 2,3,6-Trimethylphenol, 2,4,6-Trimethylphenol, 3,4,5-Trimethylphenol, 2-Isopropylphenol, 2-Methoxyphenol, 3-Methoxyphenol, 4-Methoxyphenol, 2,6-Dimethoxyphenol, 1-Naphthol, 2-Naphthol, 5-Indanol, 2-Hydroxybiphenyl, 2,2´-Dihydroxydiphenyl, 2-Chlorphenol, 2,4-Dichlorphenol, 2,4,6-Trichlorphenol, Pentachlorphenol, 4-Nitrophenol, 2,4-Dinitrophenol, 2,4,6-Trinitrophenol, 2,4,6-Trinitrotoluen

Da sich die üblicherweise eingesetzten HPLC-Säulen (z.B. ODS-Material) bei pH-Werten oberhalb von pH = 9 zersetzen und die Säulen so zerstört werden, müssen spezielle Säulen eingesetzt werden, deren stationäre Phase über den gesamten pH-Bereich stabil ist.

Abbildung 13 zeigt das HPLC-UV-vis-Chromatogramm für die Trennung eines Modellgemisches (bestehend aus C_1- bis C_3-Alkylphenolen sowie verschieden substituierten Nitro- und Chlorphenolen, Zusammensetzung siehe Abbildung 14) an einer derartigen pH-stabilen Säule (polymerisiertes Trägermaterial, Firma Astec). Die Messung erfolgte im Gradientenbetrieb mit einem Laufmittel aus wäßriger Natronlauge (100 mmol/L, pH = 12) und Methanol.

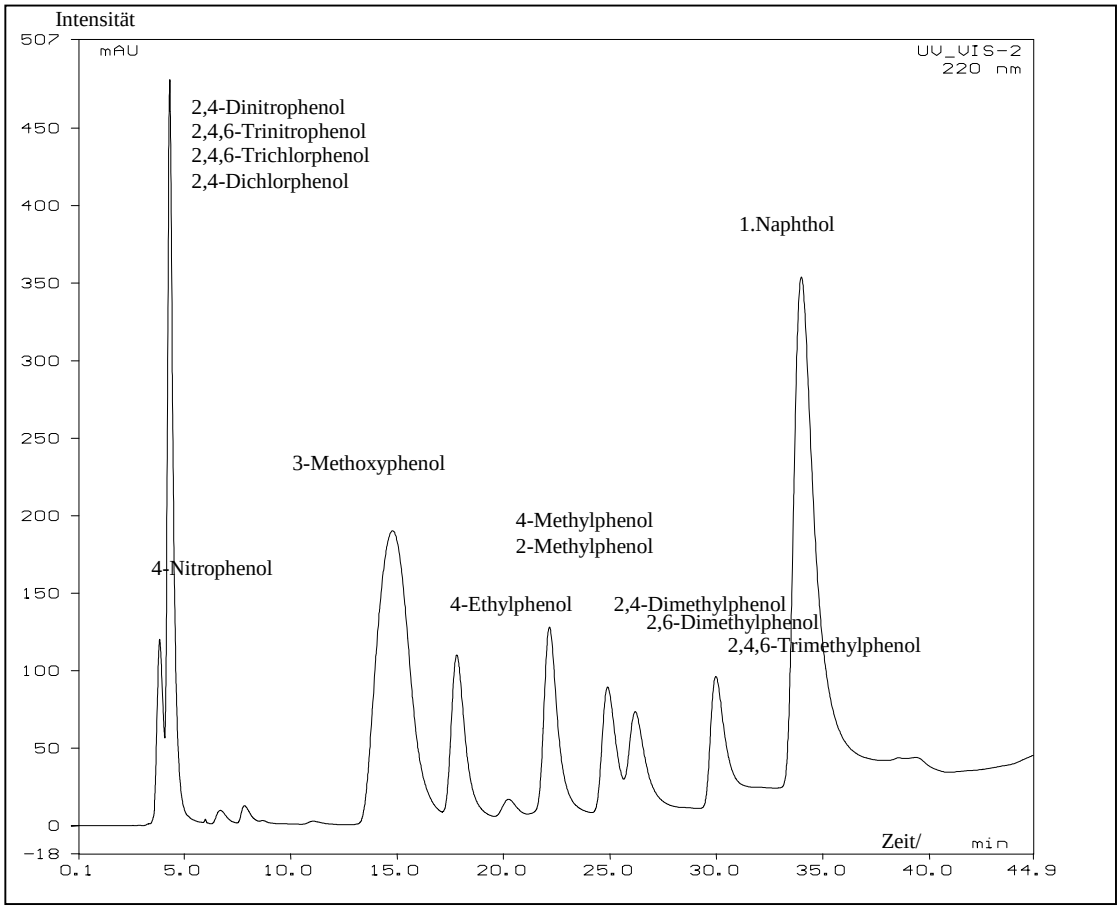

Abbildung 13: UV-vis-Chromatogramm für ein Phenolgemisch, Trennung bei pH = 12

Meßparameter: Gynkotek HPLC-System mit Niederdruck-Gradientenpumpe (Model 480) und Autosampler (CTC Analytics Liquid Sampler A200SE), Probenaufgabe: 7 µL (ca. 30 ng pro Einzelverbindung), Säule: Astec Polymer C18, Abmessungen: 250 x 4,6 mm, 5 µm Porengröße, thermostatisiert auf 40°C, Laufmittelzusammensetzung: 0 bis 10 min isokratisch: 40% Methanol/ 60% wäßrige Natronlauge (100 mmol/L, pH = 12) (v/v), 10 bis 45 min Gradientenbetrieb: bis 100% Methanol, 45 bis 55 min isokratisch: 100% Methanol, Fließgeschwindigkeit: 550 µL/min, UV-vis-Detektion mit DAD, abgebildete UV-Spur: 220 nm

Die Trenneigenschaften der Polymersäule ähneln denen der RP-Säulen. Die Phenolderivate mit polaren Substituenten (Nitro- und Chlorphenole) haben die kürzesten Retentionszeiten, die Alkylphenole werden entsprechend der Anzahl der C-Atome in der Alkylgruppe getrennt. Je mehr C-Atome in der Alkylkette des Analyten sind, desto hydrophober wird er und desto später wird er von der Säule eluiert.

Die Retentionszeiten lassen sich bei diesen Parametern nur schlecht reproduzieren, da sie sich schon bei geringfügigen pH-Wert- Schwankungen ändern, wie sie beispielsweise bei Erneuerung des Eluenten auftreten. Wegen der Eigenschaften des API-Interfaces (lineare Spraygeometrie) ist der Einsatz von stabilisierenden Puffern nicht möglich. Bei Verdampfen des Eluenten kann die Transferkapillare durch Rückstände der Puffersalze verstopft werden.

Da deshalb keine Puffer für die Optimierung der HPLC-Trennung eingesetzt werden konnten, weisen die Signale „Tailing“ auf, das ebenso in den Massenchromatogrammen der Analyse zu erkennen ist (siehe Abbildung 14). Die Messungen mit der HPLC-ESI-MS erfolgen im negativen Meßmodus.

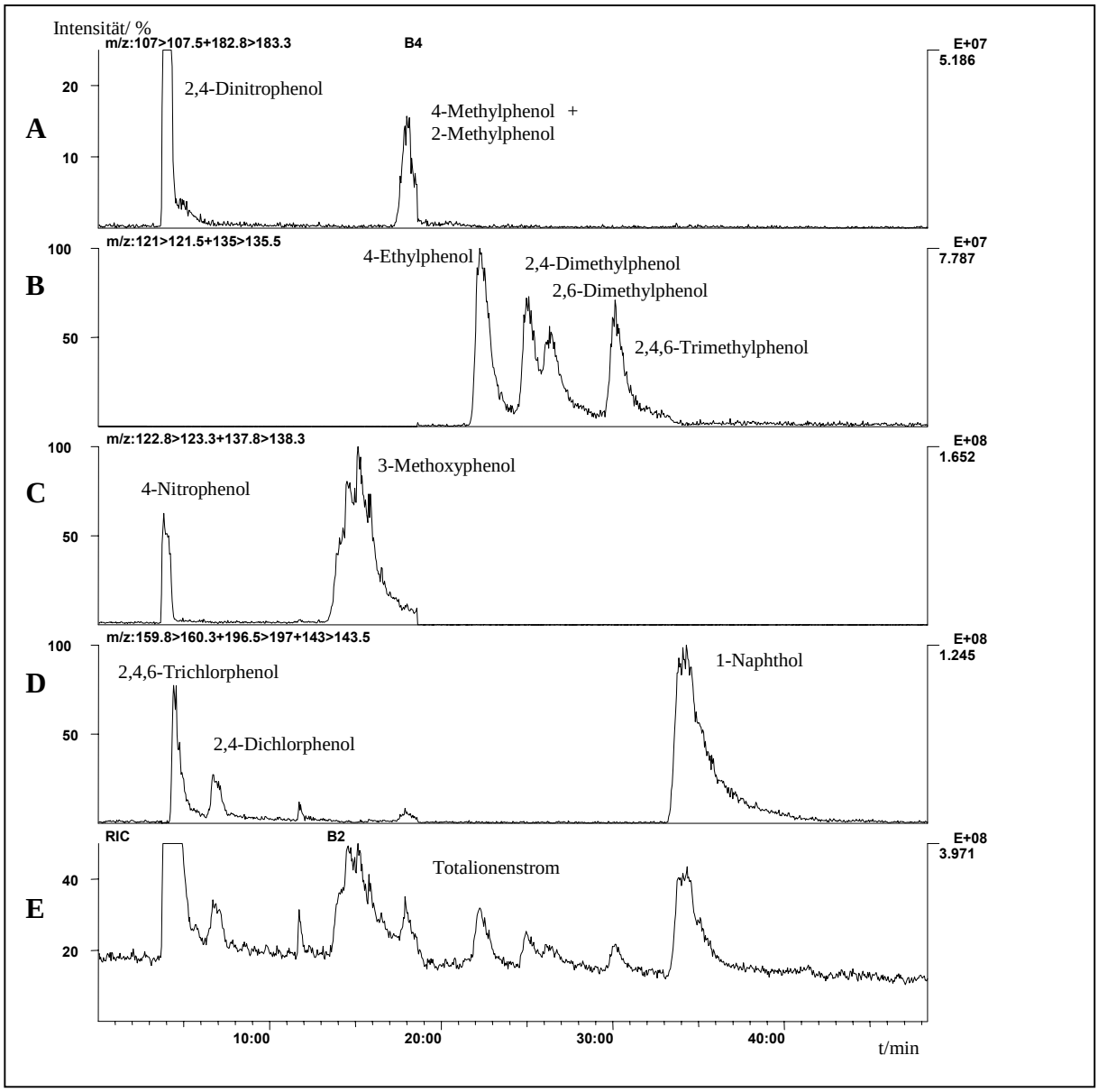

Abbildung 14: Full-Scan-ESI-negativ-Massenchromatogramm des Phenolgemisches

Meßbedingungen: HPLC: siehe Abbildung 13, MS: ESI-negativ-Parameter: Spray-Spannung: 2,8 kV, Temperatur der Transferkapillare: 290°C, Sheath-Gas: 6 bar Luft, Full-Scan-Massenbereich: 100-600 Dalton, Auflösung: 1000

Da die Substanzen zuerst den Dioden-Array-Detektor und erst danach das Massenspektrometer passieren, sind die Retentionszeiten des UV-vis-Chromatogramms

(Abbildung 13) und des Full-Scan-ESI-negativ-Massenchromatogramms (Abbildung 14) um einige Sekunden zueinander versetzt. Da es sich um dieselbe Analyse handelt, entsprechen die dosierten Substanzmengen denen aus Abbildung 13.

In Spur E (Abbildung 14) ist der Totalionenstrom (Summe über den Massenbereich von 100 bis 600 Dalton) der Analyse dargestellt. Der Totalionenstrom ist zu dem UV-vis-Chromatogramm der HPLC-Trennung aus Abbildung 13 äquivalent. Das Signal-/ Rausch-Verhältnis des Totalionenstroms ist etwa um den Faktor 10 kleiner als das des UV-vis-Signals.

Durch Auswahl geeigneter Massenspuren für die Analytionen können die Einzelverbindungen selektiv dargestellt werden. Bei den Chlor- und Nitrophenolen reicht die chromatographische Auflösung der HPLC zur Bestimmung der Einzelverbindungen nicht aus (siehe Abbildung 13). Die Selektivität des Massenspektrometers bezüglich der unterschiedlichen Analytmassen erlaubt hingegen die Einzeldarstellung und Bestimmung aller Komponenten (Spur A bis D).

Die Methylphenole werden bei diesem pH-Wert wegen ihrer identischen Nominalmassen jedoch nicht aufgelöst (A). Durch weitere Erhöhung des pH-Wertes können diese Substanzen aber auch chromatographisch getrennt werden.

Obwohl bei der Darstellung der Einzelmassenspuren sich das Signal-/ Rausch-Verhältnis um über eine Größenordnung verbessert, sind die Messungen im Full-Scan-Modus für die meisten analytischen Problemstellungen nicht empfindlich genug. Bei einer Verdünnung des untersuchten Modellgemisches um etwa drei Größenordnungen (auf ca. 1,5 mg/L) liegen die Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze.

Um die Empfindlichkeit der Messung zu steigern, kann die massenspektrometrische Aufnahme direkt im MID-Modus („Multiple Ion Detection“) durchgeführt werden. Dabei werden an Stelle des gesamten Massenbereichs (Full-Scan) nur die charakteristischen Massen der Analytionen detektiert (siehe das um etwa drei Größenordnungen verdünnte Modellgemisch in Abbildung 15). Während für die Alkylphenole (Spur A bis C) der Konzentrationsbereich der Nachweisgrenze erreicht ist, können Chlor- und Nitrophenole (Spur D) noch in weit geringerer Konzentration bestimmt werden.

Niedrigere Nachweisgrenzen lassen sich noch durch Erhöhung der dosierten Probenmenge erzielen. Diese Überdosierung kann bei HPLC-Gradientenbetrieb jedoch nur bei Wasserproben eingesetzt werden.

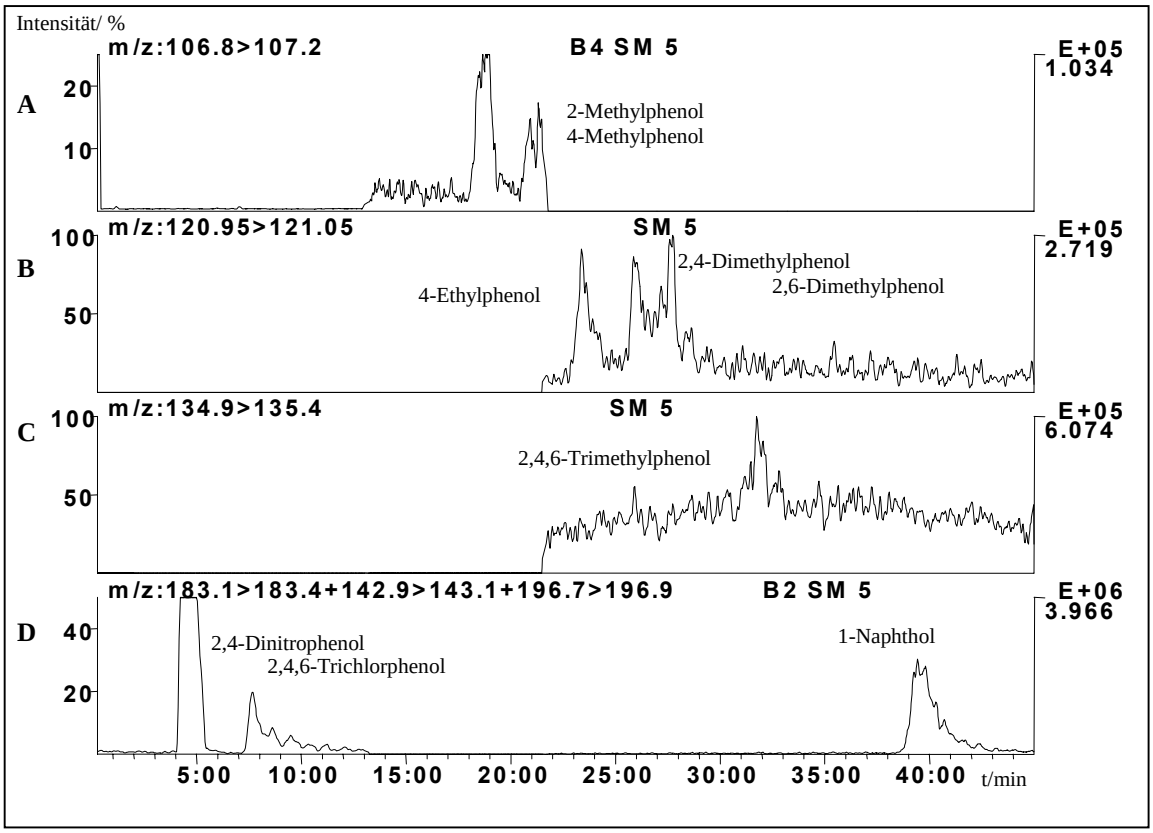

Abbildung 15: MID-Massenchromatogramm für ausgewählte Substanzen des Phenolgemisches

Meßbedingungen: HPLC: Probenaufgabe: 30 µL (ca. 50 pg pro Einzelverbindung), ansonsten siehe Abbildung 13, MS: ESI-negativ-Parameter: Spray-Spannung: 2,8 kV, Temperatur der Transferkapillare: 290°C, Sheath-Gas: 6 bar Luft, MID: Massenspuren für die deprotonierten Molekülionen der Verbindungen: 2-Methylphenol, 4-Methylphenol, 4-Ethylphenol, 2,4-Dimethylphenol, 2,6-Dimethylphenol, 2,4,6-Trimethylphenol, 1-Naphthol, 3-Methoxyphenol, 4-Nitrophenol, 2,4-Dinitrophenol, 2,4-Dichlorphenol, 2,4,6-Trichlorphenol, Auflösung: ca. 3000

4.2.1.2 HPLC-APCI-MS

Die „Atmospheric Pressure Chemical Ionization“ (APCI, siehe Kapitel 3.2.1.1 und Abbildung 4) wird häufiger als die ESI-Technik in der Umweltanalytik eingesetzt. Während es Applikationen für polare und acide Phenole gibt[135], sind bisher keine für Alkylphenole bekannt[136,137]. Phenolische Verbindungen mit acidem Charakter (Chlor- und Nitrophenole) lassen sich mit der APCI im Gegensatz zu den apolaren und nur schwach aciden Alkylphenolen relativ leicht zum Quasimolekülion deprotonieren und massenspektrometrisch erfassen.

Die Ionenausbeute wird wesentlich durch APCI-Parameter wie Temperatur und Volumen der Gasflüsse beeinflußt[138,139].

Bei niedrigen Temperaturen des Vaporizers (siehe Abbildung 4) werden vermehrt Addukte zwischen Analyt und Lösungsmittel oder Molekülen der APCI-Gase gebildet.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob durch systematische Variation der APCI-Parameter auch Alkylphenole ionisiert werden können, und sich mit der HPLC-APCI-MS nachweisen lassen. Daher wurde die Ionenausbeute für ausgewählte Analyte (3-Methylphenol, 4-Nonylphenol, 2-Isopropylphenol), die sich in ihrer Alkylkettenlänge unterscheiden, anhand der Signalintensität (doppelte quantitative Analyse) im gesamten möglichen Temperaturbereich des Vaporizers untersucht.

Wie Abbildung 16 zeigt, lassen sich Alkylphenole bei niedrigen Vaporizertemperaturen unterhalb von 300°C am besten ionisieren. Bei APCI-Messungen wird der Vaporizer sonst üblicherweise bei Temperaturen zwischen 350 und 450°C (substanzabhängig) betrieben.

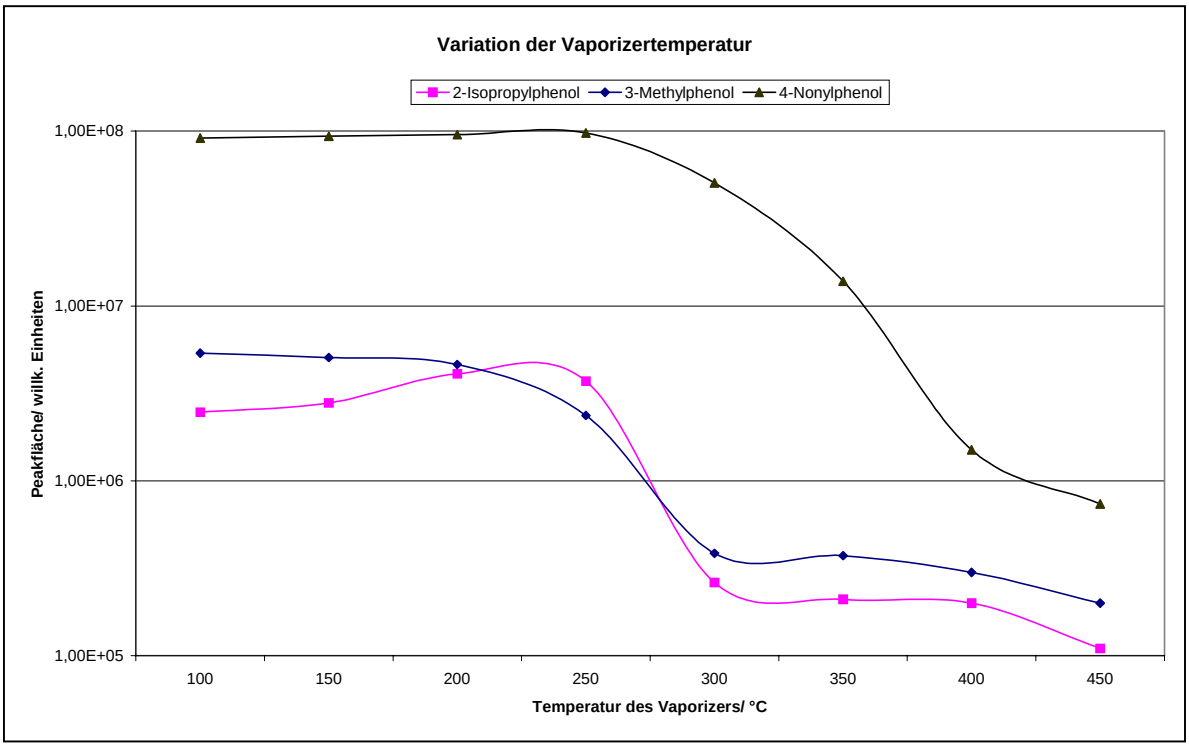

Abbildung 16: Signalintensitäten für Alkylphenole bei Variation der Vaporizertemperatur

Meßparameter: FIA: Laufmittel: Methanol, Probenaufgabe: 5 µL methanolische Lösung, APCI: Gasflüsse: Sheath-Gas = 2060 mL/min, Aux Gas = 3181 mL/min, Temperatur der Transferkapillare: 210°C, Analyten: 3-Methylphenol: Menge: 7 µg, Massenbereich der Integration: 107,2-107,9+142,1-142,9 Dalton, 2-Isopropylphenol: Menge: 4 µg, Massenbereich der Integration: 135,05-135,3+167,05-167,3 Dalton, 4-Nonylphenol: Menge: 3 µg, Massenbereich der Integration: 218-220 Dalton

Abbildung 16 zeigt, daß die Signalintensitäten der untersuchten Proben bei diesen Temperaturen im Bereich des Untergrundrauschens liegen. Nur 4-Nonylphenol zeigt bei diesen Temperaturen Signalintensitäten, die deutlich über dem Rauschen liegen. Durch Absenkung der Temperatur bis auf ca. 200°C nimmt die Signalintensität für alle Alkylphenole kontinuierlich bis zu 3 Größenordnungen zu, so daß es möglich ist, sie bei diesen vergleichsweise niedrigen Temperaturen zu detektieren. Die relative Intensitätszunahme ist bei allen untersuchten Substanzen gleich, so daß unterschiedliche Alkylkettenlängen für die Optimierung nicht berücksichtigt werden müssen. Änderungen bei der Temperatur der Transferkapillare zeigen eine ähnliche Wirkung, so daß sie an dieser Stelle nicht graphisch dokumentiert wurden.

Die Gasflüsse der APCI beeinflussen die Signalintensitäten ebenfalls deutlich. In Abbildung 17 sind die systematischen Untersuchungen am Beispiel von 4-Nonylphenol aufgezeigt. Das Eluat wird bei der APCI im Vaporizer durch das Sheath-Gas versprüht (siehe Abbildung 4).

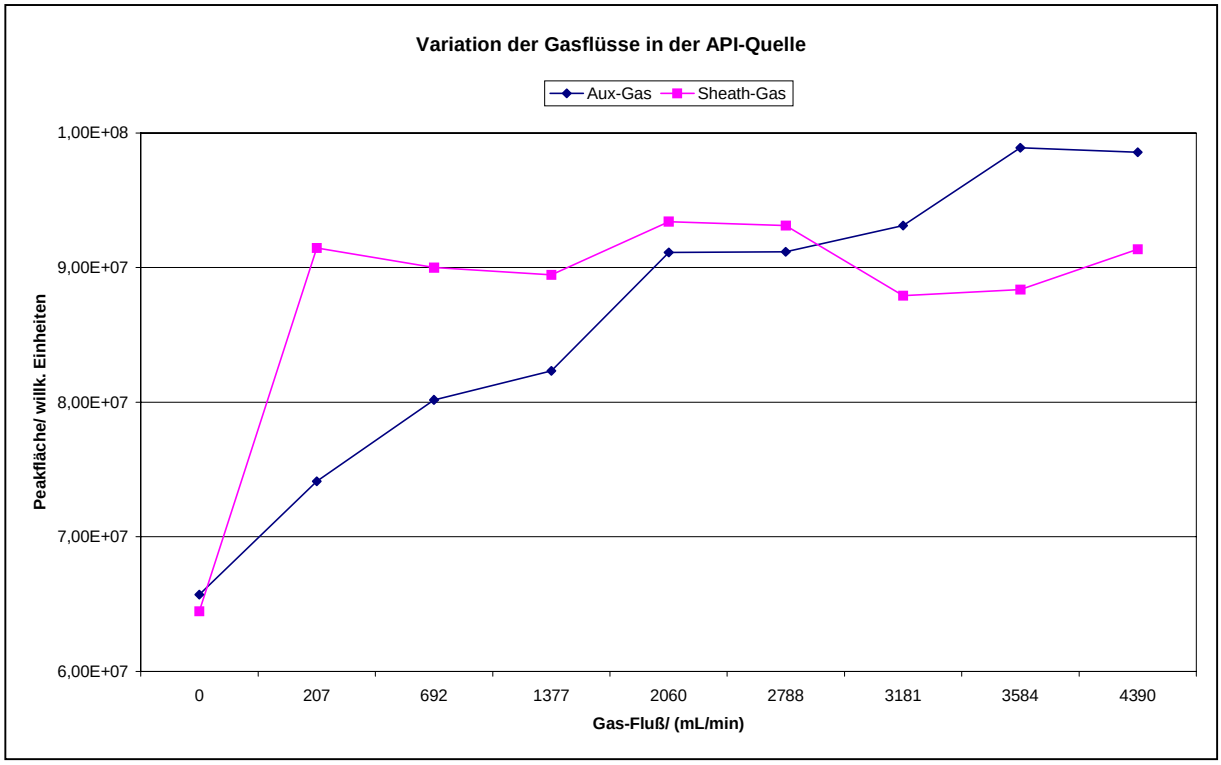

Abbildung 17: Signalintensitäten für 4-Nonylphenol bei Variation der Gasflüsse in der APCI

Meßparameter: FIA: Laufmittel: Methanol, Probenaufgabe: 4-Nonylphenol, Menge: 3 µg in methanolischer Lösung, Integrationswerte erhalten durch Doppelbestimmung, Massenbereich der Integration: 218-220 Dalton Temperatur der Transferkapillare: 210°C, Temperatur des Vaporizers: 190°C, die Werte für die Variation des Sheath-Gases wurden bei Aux-Gas Werten von 3181 mL/min gemessen, die Werte für die Variation des Aux-Gases wurden mit Sheath-Gas Werten von 2060 mL/min detektiert.

Der Sheath-Gasfluß ist für die Ionenausbeute von geringer Bedeutung. Bereits bei sehr niedrigen Werten von 200 mL/min werden Intensitäten im Bereich des Maximums erreicht. Der Spraystrahl wird durch das Aux-Gas in Richtung Transferkapillare fokussiert. Die Signalintensitäten steigen kontinuierlich mit höheren Aux-Gas Werten an und erreichen bei ca. 3500 mL/min das Maximum. Die in der oben gezeigten Abbildung dargestellten Untersuchungen wurden bei einer Vaporizertemperatur von 190°C und optimierten Gasflüssen im APCI-Interface durchgeführt. Wie weitere Messungen zeigten, ist bei anderen Temperaturen und Gasflüssen diese Tendenz der Intensitätszunahme gleichbleibend. Die Untersuchung der Ionenbildungsprozesse liefert einige Hinweise für die ungewöhnlichen APCI-Parameter, bei denen Alkylphenole detektiert werden können.

Abbildung 18 zeigt das APCI-Massenspektrum von 2,6-Dimethylphenol bei negativer Ionisierung. Das $[M-H]^-$-Quasimolekülion ist in dem Spektrum dominierend.

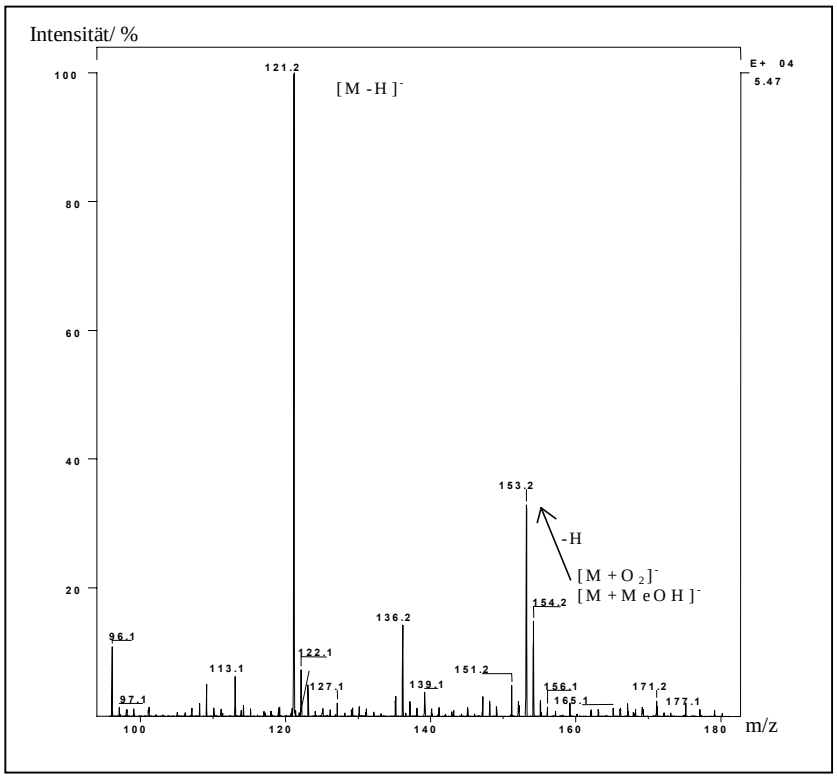

Abbildung 18: APCI-negativ-Massenspektrum von 2,6-Dimethylphenol

Meßparameter: MS: FIA mit Methanol, APCI-negativ-Parameter: Temperatur des Vaporizers: 190°C, Temperatur der Transferkapillare: 210°C, Sheath-Gas: ca. 300 mL/min, Aux-Gas: ca. 3500 mL/min, Full-Scan-Massenbereich: 80-300 Dalton, Auflösung: 1000, äquivalente Spektren zeigen folgende Substanzen: Phenol, 2-Methylphenol, 3-Methylphenol, 4-Methylphenol, 2-Ethylphenol, 3-Ethylphenol, 4-Ethylphenol, 2,3-Dimethylphenol, 2,4-Dimethylphenol, 2,5-Dimethylphenol, 3,4-Dimethylphenol, 3,5-Dimethylphenol, 2,3,5-Trimethylphenol, 2,3,6-Trimethylphenol, 2,4,6-Trimethylphenol, 3,4,5-Trimethylphenol, 2-Isopropylphenol, 2-Methoxyphenol, 3-Methoxyphenol, 4-Methoxyphenol, 2,6-Dimethoxyphenol, 1-Naphthol, 2-Naphthol, 5-Indanol, 2-Hydroxybiphenyl, 2,2´-Dihydroxydiphenyl, 2,4-Di-tert.-butylphenol, 2,4,6-Tri-tert.-butylphenol, 4-Nonylphenol

Neben dem deprotonierten Molekülion werden Signale für negativ geladene Adduktionen aus Analyt plus Lösungsmittelmolekül (in diesem Fall Methanol) oder Analyt plus Sauerstoffmolekül (aus den APCI-Gasen, eventuell ein Oxidationsprodukt) detektiert (Masse: 154 Dalton). Durch hochauflösende Messungen wurde die Zuordnung dieser Ionen bestätigt. Eine Änderung der Laufmittelzusammensetzung hat keinen Einfluß auf die Spektren. Die Intensität der Signale für die Adduktionen ist stark von den Gasflüssen und den Temperaturparametern des Vaporizers und der Transferkapillare abhängig.

Zum Ionenbildungsmechanismus wurden MS-MS Experimente durchgeführt. In Abbildung 19 ist das Tochterspektrum (Massenspektrum, aus dem hervorgeht, welche Fragmentionen -Tochterionen- aus welchen Primärionen -Mutterionen- gebildet werden) für die Ionen der Masse 154 Dalton von 2,6-Dimethylphenol dargestellt.

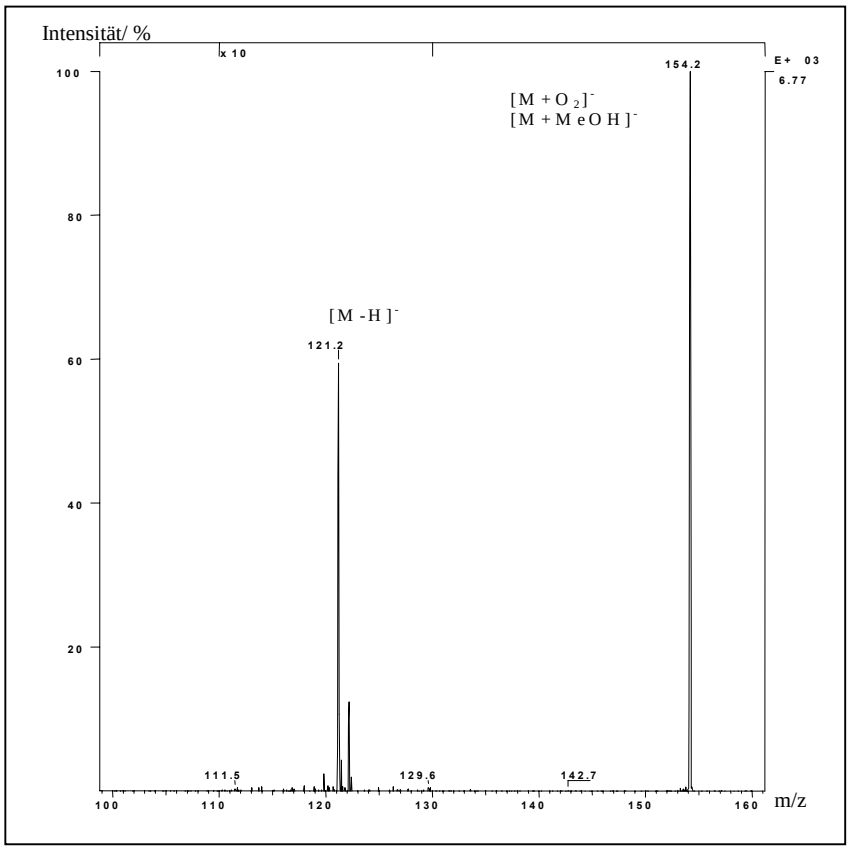

Abbildung 19: Tochterspektrum für die Ionen der Masse 154 Dalton von 2,6-Dimethylphenol

Meßparameter: MS: FIA mit Methanol, APCI-negativ-Parameter: Temperatur des Vaporizers: 190°C, Temperatur der Transferkapillare: 210°C, Sheath-Gas: ca. 300 mL/min, Aux-Gas: ca. 3500 mL/min, Full-Scan-Massenbereich: 90-300 Dalton, Auflösung: 1000, MS-MS-Parameter: linked-scan, 1. feldfreier Raum, collision activated, Stoßgas: Luft

Abbildung 19 verdeutlicht, daß im ersten feldfreien Raum das deprotonierte Molekülion (Tochterion) aus den Ionen der Masse 154 (Mutterion) gebildet wird. Dieser Prozeß findet vermutlich im Massenspektrometer auf der gesamten Wegstrecke zwischen Ionenquelle und Detektor statt. Für hohe Intensitäten der Alkylphenole ist daher die Bildung der Adduktionen (Addukt-Precursor-Ionen) im Vaporizer und deren Transport in den Detektionsbereich des Massenspektrometers erforderlich.
Die Adduktionen entstehen bevorzugt bei den vergleichsweise niedrigen Temperaturen des Vaporizers (190°C). Das Eluat wird im Vaporizer durch das Sheath-Gas leicht versprüht. Hohe Sheath-Gasflüsse erhöhen die Ionenausbeute nicht.
Der Transport und die Fokussierung der Analyte in Richtung Transferkapillare wird hauptsächlich durch das Aux-Gas beeinflußt. Bei höheren Aux-Gasflüssen werden die Adduktionen schärfer auf die Transferkapillare fokussiert, so daß eine hohe Anzahl den Detektionsbereich des Massenspektrometers erreicht. Die Signalintensitäten der Alkylphenole nehmen deshalb zu höheren Aux-Gas-Werten hin zu.

Für die HPLC-APCI-MS Kopplung können neben Eluenten für die Umkehrphasen-Chromatographie (Methanol, Acetonitril und Wasser) auch hydrophobe Eluenten für die Normalphasen-Chromatographie (z.B. n-Hexan) verwendet werden. Auch mit diesem Lösungsmittel gelingt die Ionisierung der Analyte in der APCI. Für die Zusammensetzung der Eluenten gelten jedoch die gleichen Einschränkungen wie für die Kopplung zur ESI, so daß keine Puffer verwendet werden können (Salzfracht, vgl. Kapitel 4.2.1.1).
Da die Ionisation der phenolischen Verbindungen sowohl in Eluenten für Normal- als auch für Umkehrphasen-Chromatographie gelang, wurden Trenntechniken für beide chromatographische Systeme entwickelt, um die unterschiedlichen Trenneigenschaften und Vorteile beider Techniken auszunutzen, sowie Extrakte aus unterschiedlichen Probenvorbereitungstechniken (hydrophile und hydrophobe Lösungsmittel) direkt analysieren zu können. Liegen die Analyte beispielsweise in einer hydrophoben Matrix vor (z.B. organische Phase der Flüssig-Flüssig-Extraktion mit n-Hexan aus der Matrix Wasser), sind sie direkt für die HPLC-MS über eine Normalphasentrennung zugänglich und müssen nicht erst in eine polare Matrix wie Methanol überführt werden, um dann mit Umkehrphasen-Chromatographie getrennt zu werden. Die Umkehrphasen-Chromatographie kann für alle polaren Lösungsmittel (insbesondere Wasser) eingesetzt werden. Daher werden

auch die meisten Trennungen in der Umweltanalytik auf RP-Säulen durchgeführt. Die Trennungen in den HPLC-Systemen wurden mit verschiedenen Säulen bezüglich Retentionszeiten, Auflösung, Eluent-Zusammensetzung und Gradient angepaßt.

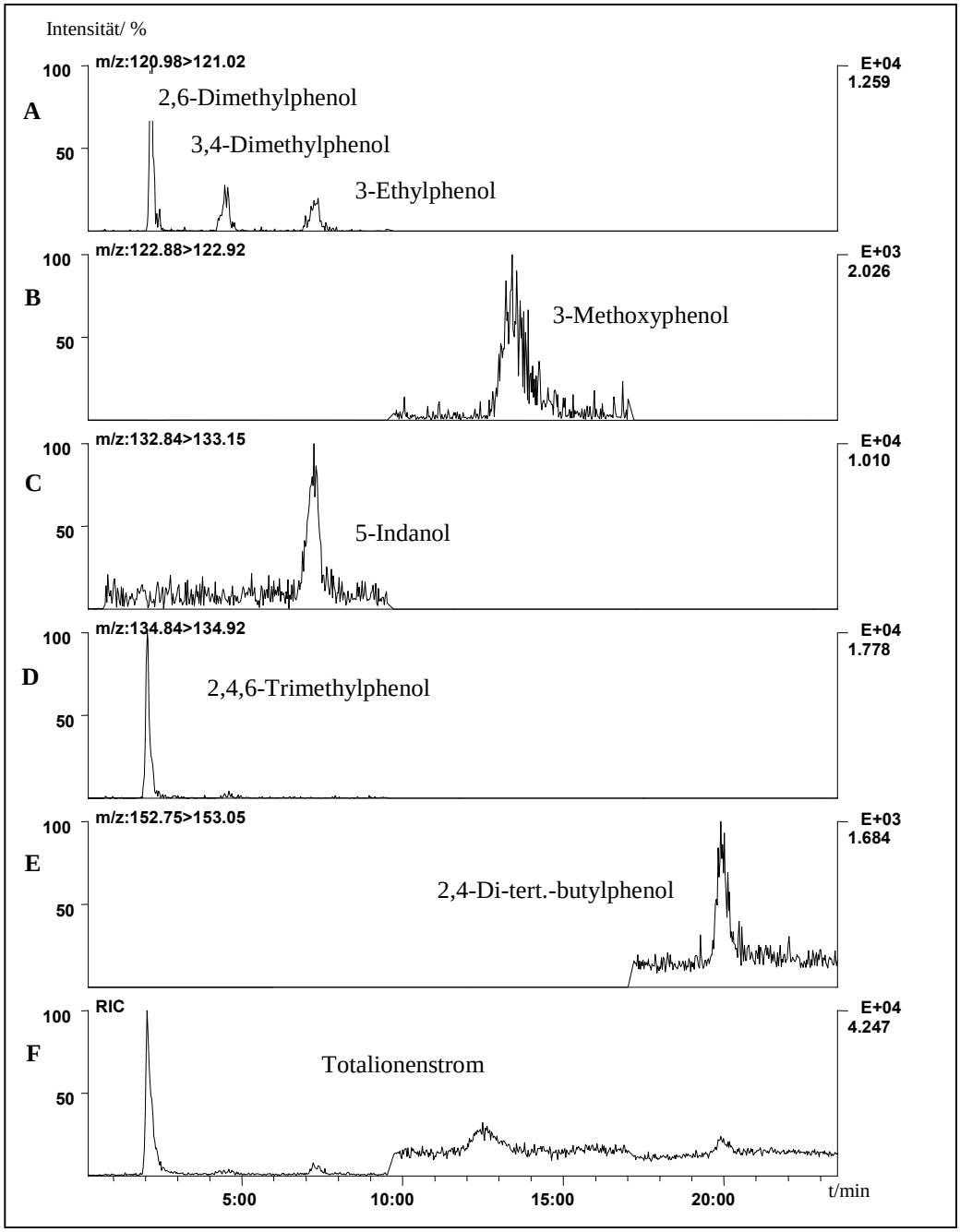

Abbildung 20: Full-Scan-Massenchromatogramm eines Phenolgemisches nach Normalphasentrennung

Meßparameter: Gynkotek HPLC-System mit Niederdruck-Gradientenpumpe (Model 480) und Autosampler (CTC Analytics Liquid Sampler A200SE), Probenaufgabe: 7 µL (ca. 30 ng pro Einzelverbindung), Säule: Gynkotek Hypersil CPS, Abmessungen: 135 x 2 mm incl. Vorsäule, 5 µm Porengröße, thermostatisiert auf 25°C, Laufmittelzusammensetzung: 0 bis 8 min isokratisch: 100% n-Hexan, 8 bis 25 min Gradientenbetrieb: bis 3% Isopropanol/ 97% n-Hexan (v/v), 25 bis 35 min isokratisch bei diesen Bedingungen, Fließgeschwindigkeit: 450 µL/min, MS: APCI-negativ-Parameter: siehe: Abbildung 19

In Abbildung 20 ist ein HPLC-APCI- Full-Scan-Massenchromatogramm (Massenbereich 100 bis 600 Dalton) für ein Phenolgemisch nach Trennung mit einer Normalphasen-Säule (Eluent: n-Hexan/ Isopropanol) dargestellt. Bei der dosierten Substanzmenge von 30 ng je Einzelverbindung ist im Totalionenstrom (Spur F) keine Differenzierung der Analyte möglich. Durch Auswahl der Massenspuren für die deprotonierten Molekülionen (Spuren A bis E) können die Einzelverbindungen jedoch selektiv dargestellt und quantifiziert werden. Die Selektivität des Massenspektrometers bezüglich der unterschiedlichen Analytmassen erlaubt oft auch die Bestimmung ungetrennter Komponenten.
Wegen der unterschiedlichen Selektivität der Normalphasen-Säule im Vergleich zu Umkehrphasen-Säulen ändern sich die Retentionszeiten der Analyten. Bei der Normalphasen-Chromatographie eluieren Alkylphenole mit höherer Anzahl an C-Atomen in den Alkylketten und entsprechend hohem lipophilen Anteil (z.B. C_3-Alkylphenole – Spur D) vor weniger lipophilen Verbindungen (C_2- und C_1-Alkylphenole – Spuren A und B). Bei der RP-Chromatographie ist die Reihenfolge genau entgegengesetzt. Sterische Effekte der Molekülgeometrie beeinflussen bei der Normalphasentrennung in weit stärkerem Umfang die Retention als bei RP-Chromatographie. Aufgrund der beiden tert.-Butylgruppen hat 2,4-Di-tert.-butylphenol als C_8-Alkylphenol eine längere Retentionszeit als alle anderen dargestellten Verbindungen.

Bei der RP-Chromatographie erfolgt die Trennung der Alkylphenole im Vergleich zur Normalphasen-Chromatographie mit umgekehrter Retentionsreihenfolge (vgl. Polymersäule, Abbildung 14).
Um die Empfindlichkeit der massenspektrometrischen Bestimmung zu steigern, kann im MID-Modus gearbeitet werden. Bei realen Matrixproben ist die Konzentration an Alkylphenolen oft so gering, daß im Full-Scan-Modus keine Quantifizierung möglich ist.
Dafür ist als Beispiel die HPLC-APCI-MS-Analyse einer Realprobe (Bodenprobe von einem Standort der petrochemischen Industrie) nach Umkehrphasentrennung (MID-Massenchromatogramm, in Abbildung 21) dargestellt.
Bei diesem Methanolextrakt ist eine Überdosierung wie bei Wasserproben aufgrund des Lösungsmittels und der mitextrahierten organischen Matrixbestandteile nicht möglich. Die Alkylphenole aus dem Extrakt einer Bodenprobe wurden entsprechend ihrer Hydrophobizität getrennt.

Die relativ hydrophilen Alkylphenole (Spur A) eluieren vor den anderen hydrophoberen Substanzen (Spur B und C). Die Konzentration der Methylphenole (Spur A) liegt im Bereich der Nachweisgrenze, während die C_2- und C_3- Alkylphenole den Hauptanteil der Phenolkontamination des Bodens bilden.

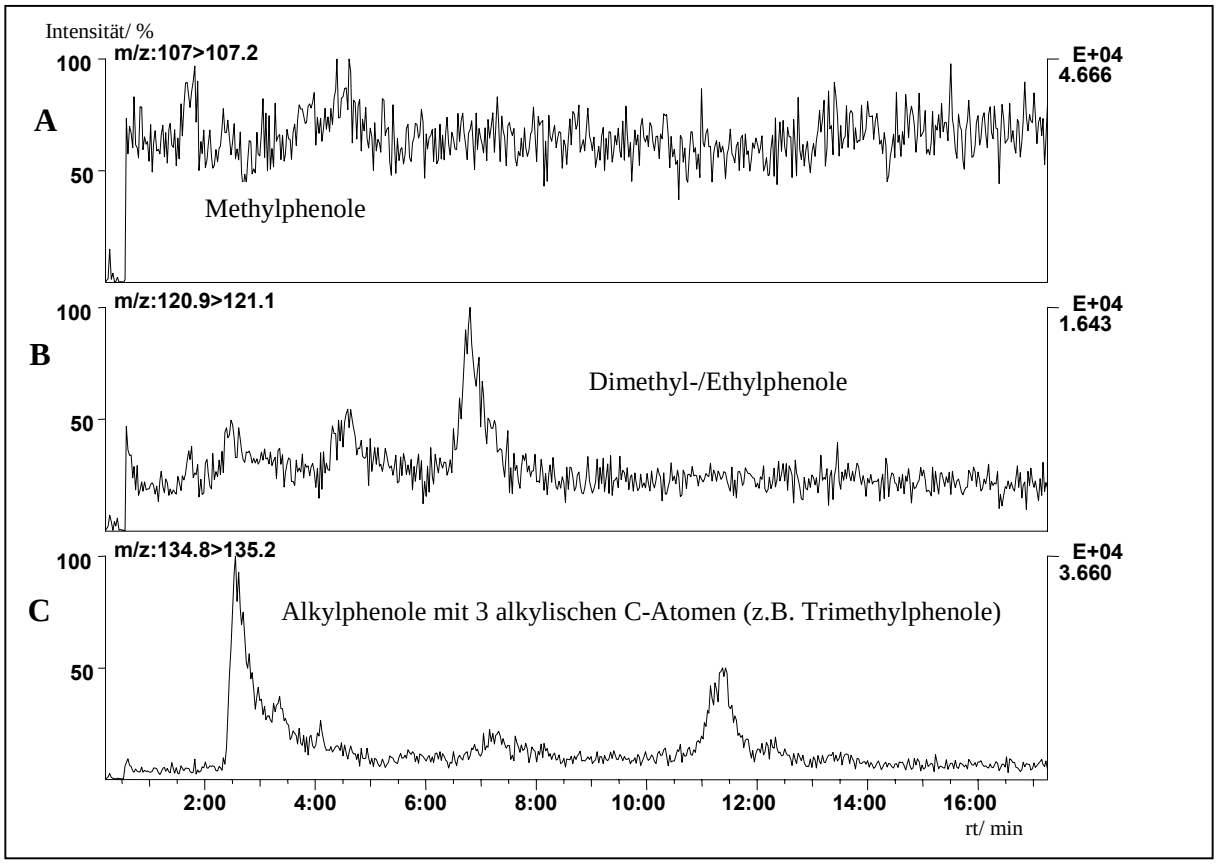

Abbildung 21: APCI-MID-Massenchromatogramm für eine Realprobe nach Umkehrphasentrennung

Meßbedingungen: HPLC: Gynkotek HPLC-System mit Niederdruck-Gradientenpumpe (Model 480) und Autosampler (CTC Analytics Liquid Sampler A200SE), Probenaufgabe: 9 µL methanolischer Bodenextrakt, Säule: Gynkotek Inertsil ODS-2 (C-18-Material), Abmessungen: 270 x 2 mm incl. Vorsäule, 5 µm Porengröße, thermostatisiert auf 55°C, Laufmittelzusammensetzung: 0 bis 13 min isokratisch: 55% Wasser/ 45% Methanol (v/v), 13 bis 18 min Gradientenbetrieb: bis 100% Methanol, 18 bis 38 min isokratisch bei 100% Methanol, Fließgeschwindigkeit: 450 µL/min, MS: MID: Massenspuren für die deprotonierten Molekülionen der Alkylphenole mit unterschiedlicher Anzahl an C-Atomen in der Alkylkette (C_1 bis C_4) Auflösung: ca. 3000, andere Parameter wie Abbildung 19

In Tabelle 3 sind die Nachweisgrenzen (bestimmt bei dem Signal-/ Rausch-Verhältnis von 3/1) der untersuchten HPLC-APCI-MS-Techniken zusammengefaßt.

Tabelle 3: Nachweisgrenzen des HPLC-APCI-MS-Verfahrens

Substanzname	NWG/(µmol/L) Umkehrphasen	NWG/(mg/L) Umkehrphasen	NWG/(µmol/L) Normalphasen	NWG/(µg/L) Normalphasen
3-Methylphenol	20	2,2	-	600
2,4-Dimethylphenol	10	1,2	3,3	400
3,4-Dimethylphenol	10	1,2	1,6	200
2,6-Dimethylphenol	1	0,1	4,9	600
3-Ethylphenol	10	1,2	2,5	300
4-Ethylphenol	10	1,2	2,5	300
2,3,6-Trimethylphenol	7	1,0	0,7	100
2,4,6-Trimethylphenol	40	5,5	2,1	300
2-Isopropylphenol	4	0,5	2,1	300
2,4-Di-tertiär-Butylphenol	2	0,4	2,4	500
2,6-Di-tertiär-butyl-4-methylphenol	2	0,4	0,23	5
2,4,6-Tri-tertiär-butylphenol	0,3	0,8	0,19	5
2-Methylresorcin	2	0,2	-	-
2-Hydroxybiphenyl	19	3,2	1,8	300
1-Naphthol	40	5,8	0,7	100
2-Naphthol	2	0,3	0,7	100
5-Indangl	75	10,0	7,5	1000
3-Methoxyphenol	64	8,0	4,0	500
4-Ethoxyphenol	4	0,5	3,6	500
3,5-Dimethoxyphenol	1	0,2	3,2	500

Mittels "Multiple Ion Detection" (MID) lassen sich Nachweisgrenzen im Bereich von 10 µmol/L im HPLC-Eluent Methanol erreichen. Wird mit Normalphasen (Eluent: n-Hexan) gearbeitet, ist die Detektion um ca. eine Größenordnung empfindlicher als bei Umkehrphasen (Methanol).

4.2.2 HPLC-NMR

In der Umweltanalytik gibt es bedingt durch die hohen Nachweisgrenzen in komplexen Matrices bisher nur wenige Applikationen für die HPLC-NMR.

Gegenüber anderen Detektionsverfahren wie UV-vis oder MS ermöglicht die NMR neben einer substanzspezifischen Charakterisierung auch Aussagen zur Struktur der Moleküle.

In dieser Arbeit wurden deshalb die Möglichkeiten und Grenzen der HPLC-NMR Kopplung für die Analytik von Phenolen untersucht. Unter anderem sollte geklärt werden, ob die Leistungsfähigkeit der NMR bezüglich ihrer Strukturaussagefähigkeit zur Identifizierung von Isomeren in komplexen Alkylphenolgemischen eingesetzt werden kann. Dazu wurden mehrere Phenol-Modellgemische hergestellt. Bei der Auswahl der Einzelverbindungen wurden möglichst viele Strukturisomere gleicher Massenzahl berücksichtigt, um die Aussagekraft der Methode vor allem gegenüber der HPLC-MS zu vergleichen.

Die Kopplung der HPLC an das NMR-Spektrometer erfolgt mit einer sogenannten „Peak-Sampling-Unit“, mit der HPLC-Fraktionen gesammelt werden können. Sie können einzeln in den Probenkopf des NMR-Spektrometers überführt und dort bei angehaltenem Fluß vermessen werden (stopped-flow Messung). Wird die „Peak-Sampling-Unit“ im Durchfluß betrieben, so erfolgt die Messung im „on-flow“ Modus. Diese Technik wurde auf Grundlage vorausgegangener Untersuchungen[140,72] eingesetzt.

Die Messungen wurden an einer Bischoff HPLC-Anlage mit UV-Detektor in Kopplung an ein Bruker AMX 600 Spektrometer bei der Meßfrequenz 600 MHz durchgeführt (^{1}H-NMR-Spektrometrie). Der NMR-Probenkopf für die HPLC-Kopplung hat eine Durchfluß-Meßzelle mit 4 mm Innendurchmesser und 120 µL Detektionsvolumen.

Als Lösungsmittel für die Modellgemische wurden Methanol-d_4 und Acetonitril-d_3 verwendet. Die in Methanol-d_4 aufgenommenen Spektren sind klarer auszuwerten, als die in Acetonitril-d_3, da die phenolischen OH-Signale im Spektrum durch einen langsamen Protonenaustausch mit Methanol alle bei der chemischen Verschiebung 4,8 ppm liegen, wodurch die Spektren vereinfacht werden. In Acetonitril-d_3 treten die phenolischen OH-Signale im Verschiebungsbereich der Aromaten auf und erschweren dort die Zuordnung der Signale.

Die Auflösungsgrenze der NMR zur Untersuchung komplexer Gemische ohne vorherige chromatographische Trennung ist schnell erreicht. Selbst bei hochauflösenden NMR-Spektrometern überlagern sich die Signale bereits bei Gemischen aus wenigen Substanzen.
Während Chor- und Nitrophenole in ihren Spektren Signale mit charakteristischen chemischen Verschiebungen aufweisen, sind die Spektren der Alkylphenole einander sehr ähnlich, so daß die Signale in Alkylphenolgemischen besonders stark überlagern.
In Abbildung 22 ist ein Ausschnitt aus dem Aromatenbereich für das ^{1}H-NMR-Spektrum eines Modellgemisches aus 7 Alkylphenolen (Spur B, Konzentration ca. 500 mg/L) dargestellt.

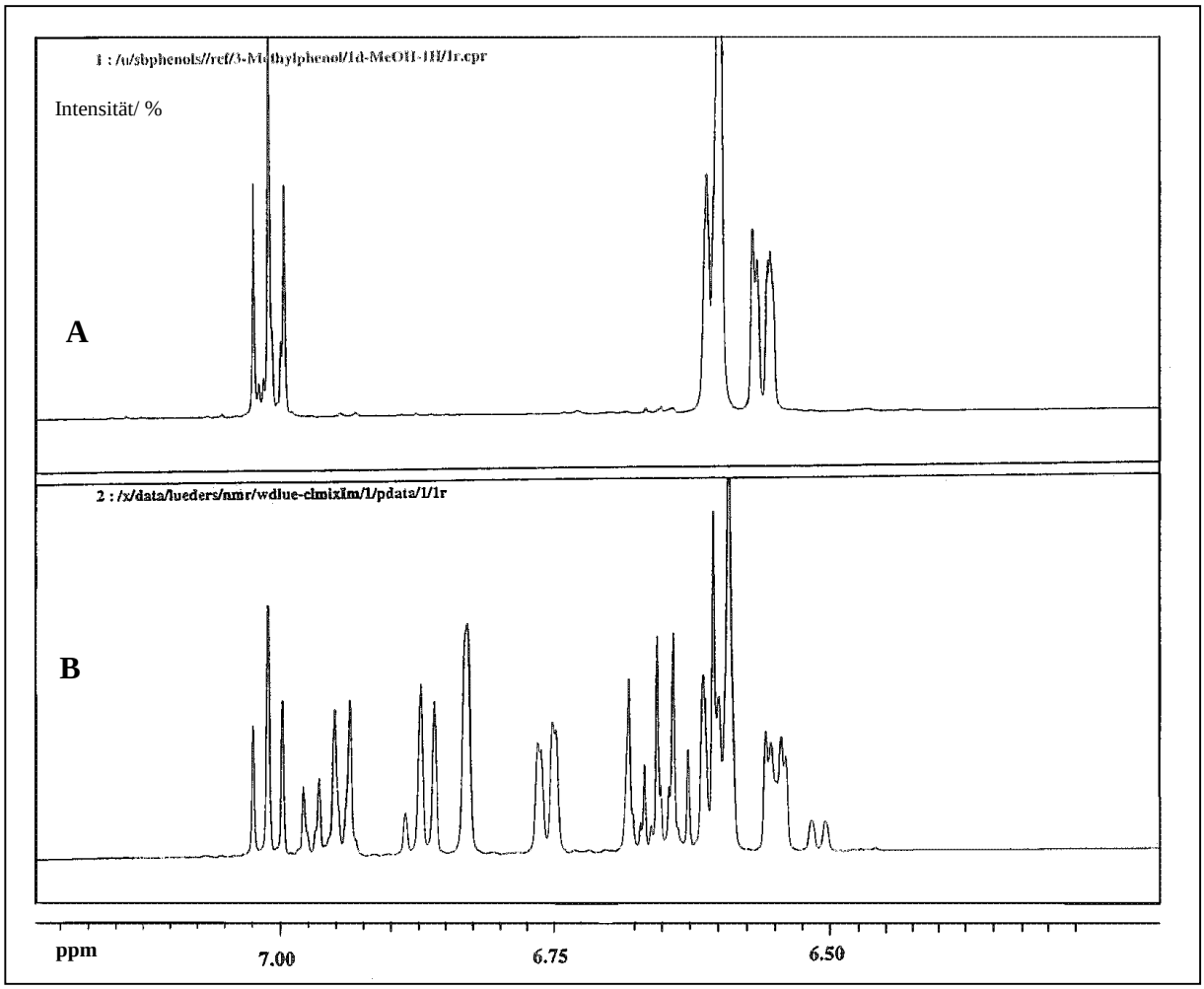

Abbildung 22: Aromatenbereich der Spektren für ein Alkylphenolgemisch (B) und 3-Methylphenol (A)

Meßparameter: Bruker AMX 600 Spektrometer, Protonenspektren, Meßfrequenz: 600 MHz, Lösungsmittel: Methanol-d_4, obere Abbildung: 3-Methylphenol, untere Abbildung: Gemisch aus 3-Methylphenol, 4-Methylphenol, 2,4-Dimethylphenol, 2,5-Dimethylphenol, 2,6-Dimethylphenol, 4-Ethylphenol, 2,4,6-Trimethylphenol, Konzentration: ca. 500 mg/L je Einzelsubstanz

Dieses Modellgemisch enthält lediglich zwei Methylphenole, vier Strukturisomere der C_2-Alkylphenole sowie ein Trimethylphenol. Schon bei dieser geringen Anzahl an Substanzen ist die Grenze der NMR für die eindeutige Signalzuordnung durch Signalüberlagerung erreicht. Zum Vergleich ist darüber der Ausschnitt aus dem Spektrum für 3-Methylphenol abgebildet (Spur A). Bereits diese eine Substanz ist mit 4 Signalen bei unterschiedlichen chemischen Verschiebungen und Aufspaltungsmustern (4 chemisch nicht äquivalente Aromatenprotonen) an dem Gemischspektrum (Spur B) beteiligt.
Eine Konzentrationsänderung des Modellgemisches beeinflußt die Auflösung der NMR-Signale nicht, sondern verändert nur das Signal-/ Rausch-Verhältnis. Bei einem Modellgemisch mit 12 phenolischen Verbindungen (zusätzlich 5 weitere C_2- und C_3-Alkylphenole) konnte demzufolge keine eindeutige Signalauflösung mehr erreicht werden.

In Kopplung mit der HPLC lassen sich auch komplexe Gemische mit der ^{1}H-NMR-Spektrometrie untersuchen, da durch die chromatographische Trennung die Überlagerungen in den ^{1}H-NMR-Spektren wesentlich verringert werden können.
Für die Kopplung der HPLC an die NMR wurden die Parameter der Umkehrphasen-HPLC der HPLC-MS Kopplung (siehe Kapitel 4.2.1) an die Anforderungen der NMR angepaßt. Es wurden die Eluenten aus den Umkehrphasentrennungen mit Methanol/Wasser und Acetonitril/Wasser eingesetzt.
In der HPLC-NMR ist der Einsatz der üblicherweise in der Flüssigchromatographie verwendeten Lösungsmittel Wasser und Methanol nur eingeschränkt möglich. Die Analytprotonen haben um mehrere Größenordnungen niedrigere Konzentrationen als die hochkonzentrierten Lösungsmittelprotonen und können in undeuterierten Lösungsmitteln nicht detektiert werden, da die Detektoren nicht in der Lage sind, den hohen dynamischen Bereich mit ausreichender Empfindlichkeit abzudecken. Daher wurde das Wasser in den HPLC-Eluenten gegen Deuteriumoxid ausgetauscht.
Der Austausch der anderen Lösungsmittel gegen deuterierte Substanzen ist aus ökonomischen Gründen nicht sinnvoll. Die Protonensignale der anderen Lösungsmittel des Eluenten lassen sich durch spezielle Techniken vermindern, indem sie durch den Einsatz spezieller Pulsprogramme (in dieser Arbeit: eine eindimensionale (1-D) Version der Pulssequenz *Noesyprtp*, Firma Bruker) unterdrückt werden können.

Die HPLC-NMR-Messung erfolgte mit dem Eluenten Acetonitril/Deuteriumoxid im Verhältnis 60/40. Es wurde Acetonitril verwendet, da es mit dem Pulsprogramm im Vergleich zu Methanol relativ einfach zu unterdrücken ist (nur ein Protonensignal). Die unterdrückten Signale sind nur noch ca. 2 Größenordnungen intensiver als die Analytsignale, so daß eine quantitative Auswertung der Analyte möglich ist.

Sind acidere Substanzen in der Probe vorhanden, wie beispielsweise Chlor- und Nitroverbindungen, wird das Laufmittel mit Trifluoressigsäure-d_1 angesäuert. Dadurch liegen die Analyte als Neutralteilchen vor und können selektiver getrennt werden.

Die Proben müssen in der Lösungsmittelzusammensetzung des Eluenten auf das HPLC-NMR-System aufgegeben werden. Anderenfalls treten häufig Störungen bei der Lösungsmittelunterdrückung auf, die dazu führen, daß die NMR-Spektren nicht mehr auszuwerten sind.

Die NMR-spektrometrische Messung erfolgt im Durchfluß. Das Laufmittel wird dazu bei sehr niedrigen Fließgeschwindigkeiten durch den Probenkopf geleitet. Je niedriger die Fließgeschwindigkeit ist, desto mehr NMR-Scans lassen sich pro Volumeneinheit messen. Die Anzahl der Scans n beeinflußt die Empfindlichkeit, da durch Akkumulation der Scans das Signal-/ Rausch-Verhältnis um $n^{½}$ verbessert wird. Nach jedem Scan muß die Relaxationszeit der Analyte (ca. 12 Sekunden) abgewartet werden, bevor ein neuer Scan gestartet wird. Anderenfalls kommt es zu Verfälschungen der Signalintensitäten.

Die graphische Darstellung der HPLC-NMR-Analysen erfolgt nach Fourier-Transformation und Basislinienkorrektur in Form einer pseudo-zweidimensionalen Darstellung (chemische Verschiebung in F1-Richtung, chromatographische Zeitachse in F2-Richtung). Die Zeitachse wird dabei in Reihen eingeteilt, die einer definierten Anzahl an Scans (16 oder 32K Datenpunkte pro Reihe, je nach Fließgeschwindigkeit) entsprechen.

In Abbildung 23 ist das HPLC-NMR-Chromatogramm für das 7-Komponenten-Modellgemisch (siehe Abbildung 22) in der Gesamtansicht dargestellt. Im Bereich von 1,0 bis 2,5 ppm und bei 4,3 ppm liegen die durch das Pulsprogramm unterdrückten Lösungsmittelsignale. Die Basislinie ist in der Nähe der Signale durch die Unterdrückung stark verzerrt, so daß Analytsignale in diesen Bereichen oft nicht ausgewertet werden können. Der Aromatenbereich des Chromatogramms ist weitestgehend störungsfrei. Die Signale zwischen 5 und 12 ppm werden daher für die Auswertung der Analysen genutzt.

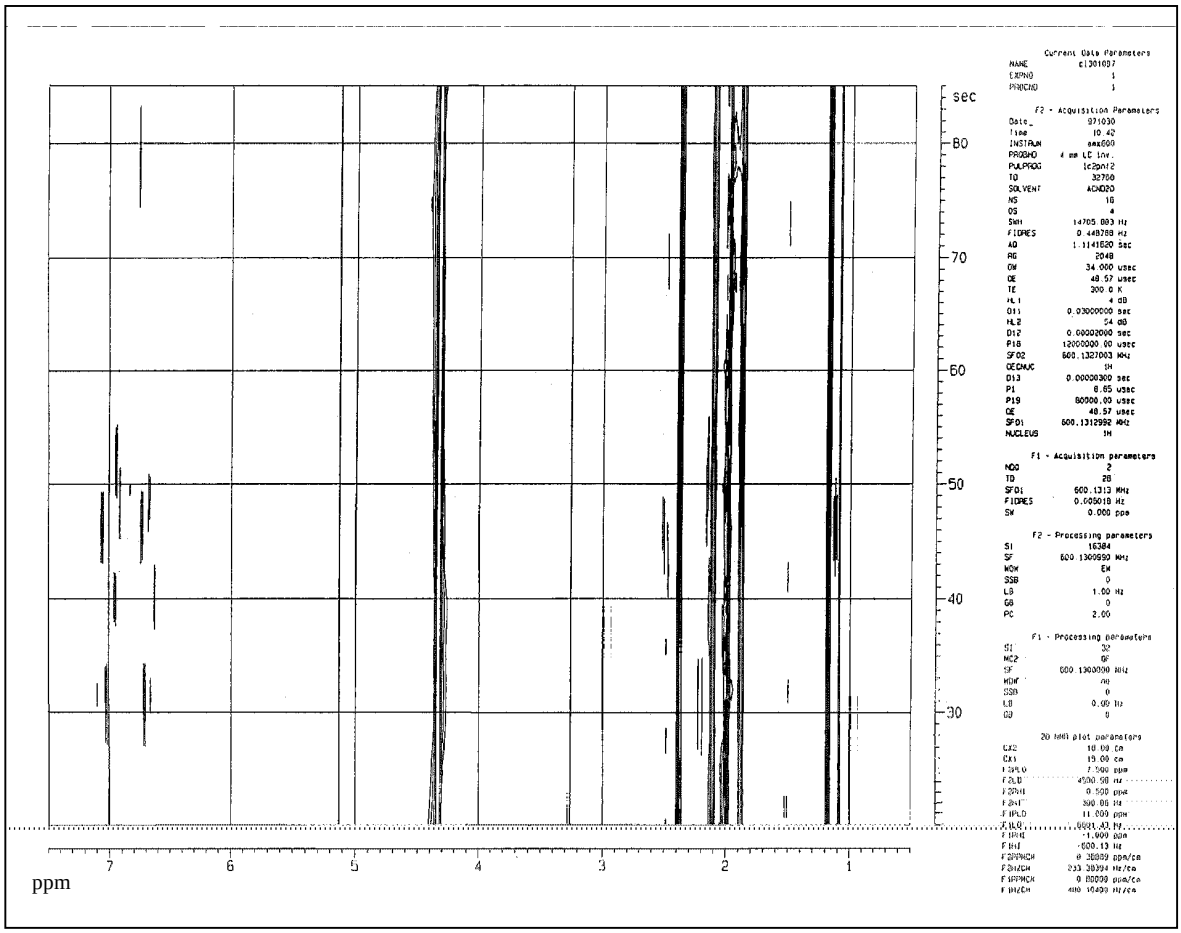

Abbildung 23: HPLC-NMR-Chromatogramm für ein Alkylphenolgemisch, Gesamtansicht

Meßparameter: Bischoff HPLC-System (Modell 1155), Säule: Gynkotek Inertsil ODS-2 (RP-18 Material) Länge: 250 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße, Injektion: 300 µL, ca. 50 µg pro Einzelsubstanz, Eluent: 60/40 Deuteriumoxid/ Acetonitril (v/v), Fluß: 0,05 mL/min, Gemisch aus 3-Methylphenol, 4-Methylphenol, 2,4-Dimethylphenol, 2,5-Dimethylphenol, 2,6-Dimethylphenol, 4-Ethylphenol, 2,4,6-Trimethylphenol, Bruker AMX 600 Spektrometer Protonenspektren, Meßfrequenz: 600 MHz, 32K Datenpunkte in F2-Richtung, 90° Puls: 8,68 µs, Frequenzen und Leistungswerte für die Lösungsmittelunterdrückung: Acetonitril: O1 ~ 1300 Hz, dl0: 60 dB, Hydrogen-deuteriumoxid-d_1 (Restwasser): O2 ~ 2700 Hz, hl2: 54 dB, Relaxationszeitintervall: p18: 12 s, Dauer einer Messung: ca. 4 Stunden

In Abbildung 24 ist der Aromatenbereich des HPLC-NMR-Chromatogramms vergrößert dargestellt und zeigt die hohe Auflösung der Analytsignale. Das Phenolgemisch ist chromatographisch nicht vollständig aufgelöst (chromatographische Zeitachse in F2-Richtung). Für die C_2-Alkylphenole (Dimethyl- und Ethylphenole) lassen sich zwar noch unterschiedliche Retentionszeiten erkennen, die C_1-Alkylphenole (Methylphenole) koeluieren bei diesen Bedingungen jedoch.

Durch die Einbeziehung der NMR-Signale wird die vollständige Auflösung der Substanzen anhand ihrer Protonensignale bei unterschiedlichen chemischen Verschiebungen ermöglicht.

Anders als in Abbildung 22 können die einzelnen Signale zur quantitativen Auswertung herangezogen werden.

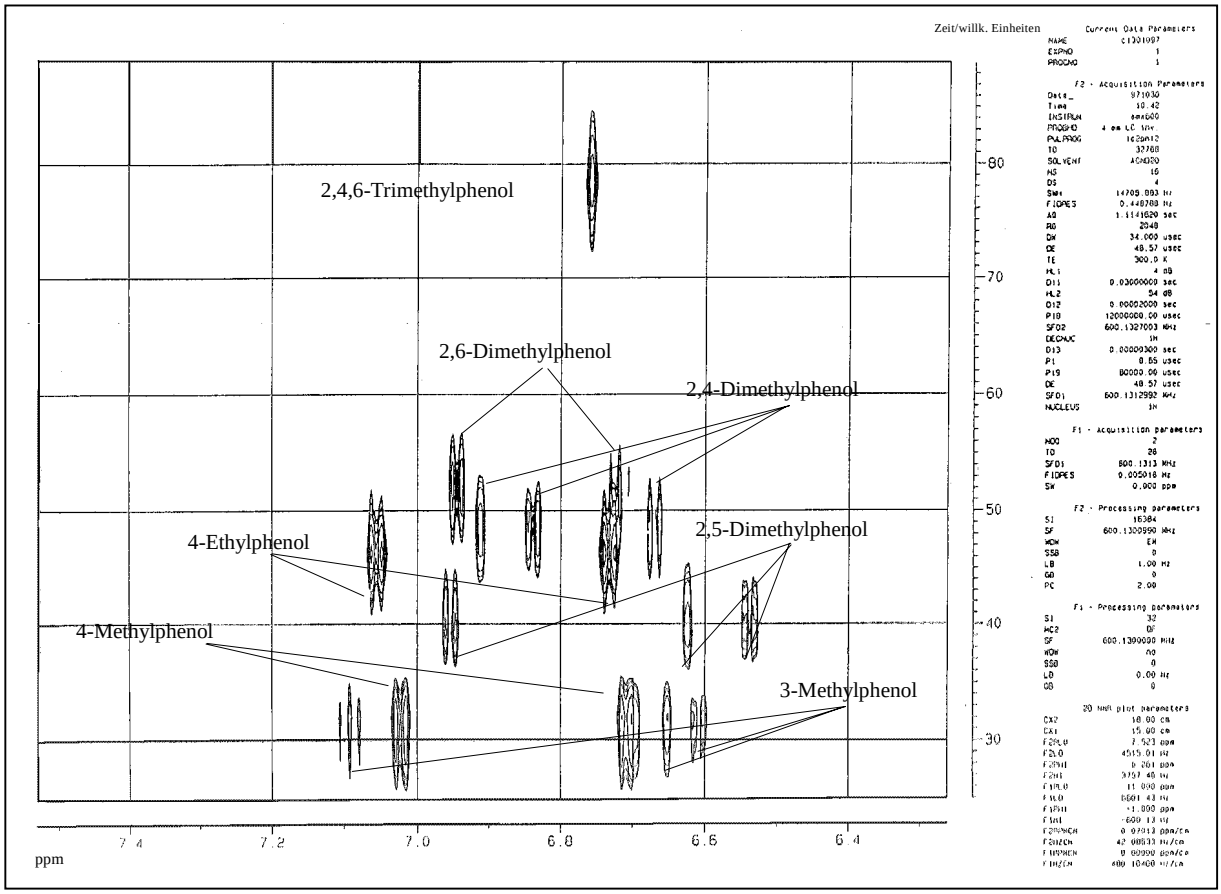

Abbildung 24: Ausschnitt aus dem Aromatenbereich des HPLC-NMR-Chromatogramms

Die Strukturisomere der Alkylphenole lassen sich auf diese Weise charakterisieren und bestimmen. Zur Quantifizierung werden die Reihen auf der Zeitachse (F2-Richtung), in denen die Protonensignale für die zu bestimmende Substanz detektiert werden, aufsummiert und als eindimensionale Spektren abgebildet. In Abbildung 25 ist die Summe über die Reihen für die Methylphenole dargestellt.

Die Substanzen lassen sich über ihre chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten qualitativ zuordnen. Je nach Anzahl äquivalenter Protonen lassen sich mehrere Signale für die einzelnen Analyte durch Integration quantitativ auswerten.

Die Absolutmengen der Methylphenole (3-Methylphenol: 32 µg, 4-Methylphenol: 42 µg, entspricht Konzentrationen von ca. 10 mg/L) liegen für diese Meßparameter bereits im Bereich der Bestimmungsgrenze. 4-Methylphenol läßt sich im Vergleich zu 3-Methylphenol

etwas empfindlicher detektieren, da zwei der vier Protonen des aromatischen Systems äquivalent sind. Daher ist die Intensität der vier aromatischen Protonen auf nur 2 Signale verteilt. Bei 3-Methylphenol sind die aromatischen Protonen nicht äquivalent und erzeugen vier Signale mit entsprechend geringerer Intensität.

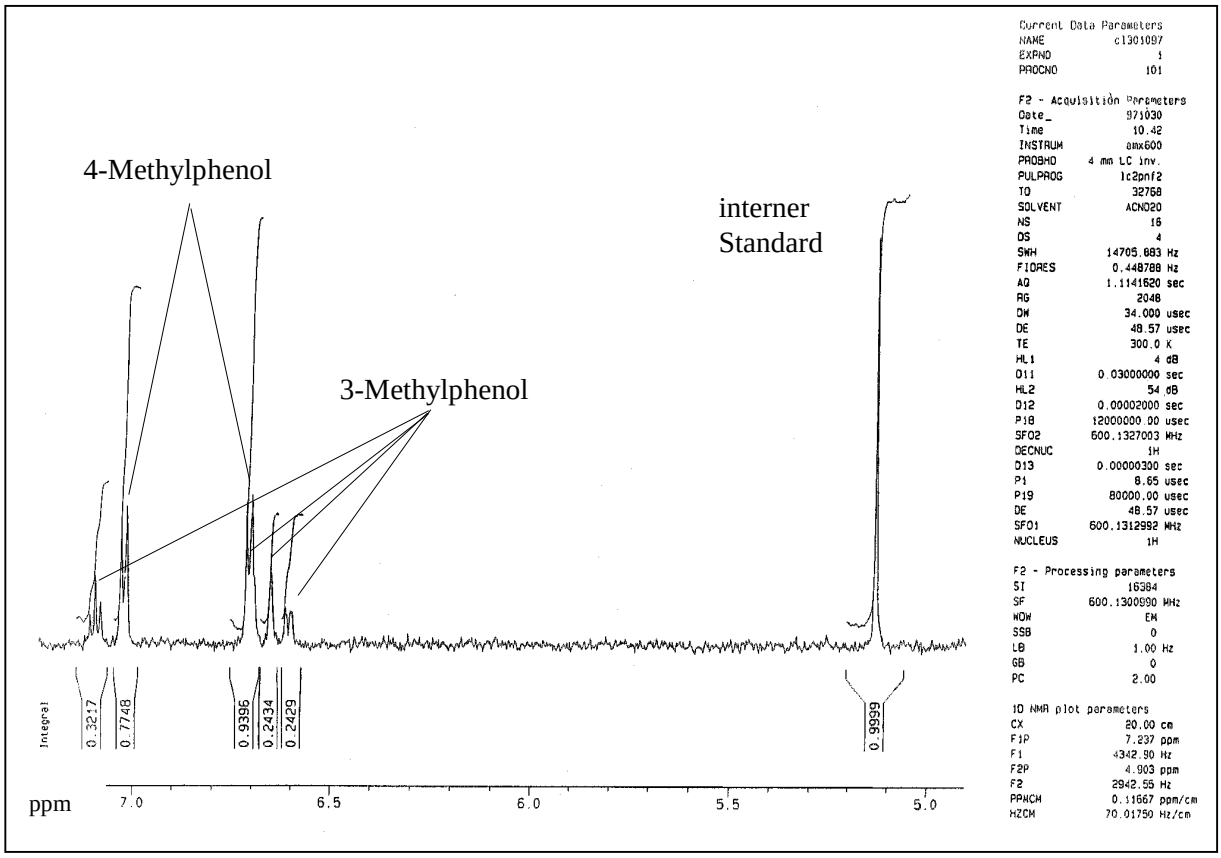

Abbildung 25: Summe über den Retentionsbereich der Methylphenole

Bei der Analyse eines komplexen Modellgemisches aus 23 phenolischen Verbindungen ähnlicher Zusammensetzung wie das mit den GC-MS-Verfahren (siehe Kapitel 4.2.3) analysierte Gemisch, werden die Grenzen der HPLC-NMR erreicht. Das Gemisch enthielt unter anderem alle Strukturisomere der Methyl-, Ethyl- und Dimethylphenole. Die Protonensignale der C_2-Alkylphenole lassen sich nicht mehr auflösen. Die qualitative Zuordnung der Signale ist auch in diesem Fall noch möglich, die Quantifizierung hingegen nicht.

Zur Abschätzung der Nachweisgrenzen der HPLC-NMR wurden die Parameter, mit denen sich die Signalintensität beeinflussen lassen, verändert. Den größten Einfluß auf die Signalintensität hat die auf das Analysensystem aufgegebene Probenmenge, die nur durch

das Durchbruchsverhalten begrenzt wird. Daher wurden große Volumina an Probenlösung (bis zu 1000 µL) dosiert. Durch Überladung der HPLC-Säule nimmt zwar ihre Trennleistung ab, dieser Nachteil wird jedoch durch die NMR-spektrometrische Auflösung wieder ausgeglichen. Die Untersuchungen ergaben, daß Probenvolumina von 300 bis 500 µL der analysierten Gemische auf der benutzten HPLC-Säule ohne Durchbruchsverluste eingesetzt werden können.

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Empfindlichkeit besteht in der Erhöhung der Zahl der akkumulierten Scans pro Volumenäquivalent. Je mehr Scans über dem Signal der Substanz akkumuliert werden, desto besser wird das Signal-/ Rausch-Verhältnis. Um die Scanzahl erhöhen zu können, muß die Verweilzeit der Substanz in der Detektionszelle verlängert werden - dieses geschieht durch die Reduzierung der Flußrate. So kann beispielsweise die Scanzahl durch Halbieren der Flußrate verdoppelt werden. Mit Halbierung der Flußrate verdoppelt sich allerdings auch die Analysenzeit (bei diesen Untersuchungen: 0,1 mL/min entspricht ca. 2,5 Stunden, 0,05 mL/min ca. 4 Stunden). Durch Verdopplung der Scanzahl n pro Volumeneinheit konnte die theoretisch erreichbare Verbesserung des Signal-/ Rausch-Verhältnisses um den Wert $n^{½}$ nicht erreicht werden. Da außerdem die Analysenzeiten extrem lang werden, sollte die Erhöhung der Scanzahl nur im Bereich der Nachweisgrenze angewendet werden.

Die Nachweisgrenzen der HPLC-NMR liegen bei maximaler Probendosierung (1000 µL) und hoher Scanzahl pro Volumenäquivalent für die untersuchten Substanzen im Bereich von 10 bis 100 mg/L bzw. zwischen 5 und 20 µg pro aufgegebener Einzelsubstanz. Wie der Vergleich mit Tabelle 3 zeigt, liegen sie damit um bis zu drei Größenordnungen höher als die der HPLC-MS.

Obwohl die HPLC-NMR bedingt durch die Nachweisgrenzen im Bereich der quantitativen organisch-chemischen Spurenanalytik derzeit nicht einsetzbar ist, kann sie bei ausreichender Analytkonzentration eine genaue Strukturidentifizierung unbekannter Einzelkomponenten selbst in komplexen Matrixproben ermöglichen. Damit bietet sich die HPLC-NMR-Kopplung beispielsweise zur Aufklärung von Abbau- und Metabolisierungsprozessen phenolischer Inhaltsstoffe bzw. als Referenzverfahren an. Aktuelle technische Entwicklungen (z.B. HPLC-NMR im Gradientenbetrieb) lassen weitere Einsatzgebiete in der Umweltanalytik erwarten.

4.2.3 GC-MS

Die Kopplung der gaschromatographischen Trenntechnik mit der massenspektrometrischen Detektion, die aufgrund von charakteristischen Massenspektren einen spezifischen Nachweis der einzelnen Komponenten erlaubt, ist besonders für die Analyse unbekannter Gemische in der Laborpraxis unverzichtbar geworden. Die Technik setzt voraus, daß die Analyte sich unzersetzt verdampfen lassen.

Da die GC-MS gleichzeitig eine hohe Selektivität mit einer hohen Empfindlichkeit verbindet und die Bestimmung vieler Analyte bis in den Ultra-Spurenbereich ermöglicht, wird sie auch in zahlreichen Normverfahren eingesetzt.

Für die GC-MS-Analyse von Phenolen wurden Verfahren für Gerätekopplungen mit niedriger Massenauflösung (GC-LRMS) und mit hoher Massenauflösung (GC-HRMS) entwickelt und validiert. Jede Variante hat ihre individuellen Vor- und Nachteile. In beiden Verfahren erfolgte die Ionisation durch Elektronenstoß (EI) unter Erzeugung positiver Ionen.

Für die Untersuchung wurde ein Modellgemisch verschiedener Phenole in n-Hexan hergestellt. Dieses Gemisch umfaßte sämtliche C_1- und C_2-Alkylphenole, 5 C_3-Alkylphenole, verschiedene Chlorphenole, Naphthole und Indanole sowie einige Alkoxyphenole. Von diesem Modellgemisch ausgehend wurden verschiedene Verdünnungen hergestellt. Eine Konzentrationsstufe wurde zu Vergleichszwecken so gewählt, daß sie dem Meßbereich der Kapillarelektrophorese entsprach (siehe Kapitel 4.2.4). Die unterste Konzentrationsstufe lag im Bereich der Bestimmungsgrenze für die GC-MS (1 µg/L).

4.2.3.1 GC-LRMS

Für die Messungen mit einem niederauflösenden Massenspektrometer wurde ein GC-MS-System MD800 (Firma Fisons) mit einem Carlo-Erba GC 8035 eingesetzt. Die Trennung erfolgte auf einer schwach polaren Kapillarsäule DB-XLB der Firma J&W mit Helium als Trägergas.

Um die Flüchtigkeit der Phenole zu erhöhen, ihre zum Teil hohe Polarität zu erniedrigen und stabile chromatographische Bedingungen für alle Analyte zu gewährleisten, ist eine Derivatisierung erforderlich. Als Derivatisierungsreagenzien wurden die Substanzen N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-2,2,2-trifluoracetamid (MSTFA), Bis-(trimethylsilyl)-2,2,2-

trifluoracetamid (BSTFA) und Trimethylsilyl-imidazol bezüglich ihrer Eignung untersucht. Bedingt durch die Derivatisierungsreaktion treten in den Massenchromatogrammen diverse Störsignale auf. Es zeigte sich, daß die Umsetzung mit MSTFA zu den besten Ergebnissen führte, da nach dieser Reaktion die wenigsten Störsignale in den Massenchromatogrammen der Analysen detektiert wurden. Deshalb wurde MSTFA als Silylierungsreagenz eingesetzt.

Für die Optimierung der Trennung wurden die Retentionszeiten der Einzelsubstanzen bestimmt und die Auflösung der Analyte durch Anpassung des Temperaturprogramms bis zur Basislinientrennung verbessert. Wegen der Selektivität des Massenspektrometers können chromatographisch ungetrennte Substanzen unterschiedlicher Nominalmasse massenspektrometrisch aufgelöst werden.

Bei der quantitativen Analytik derivatisierter Phenole muß die Vollständigkeit der Derivatisierungsreaktion gewährleistet sein. Deshalb wurde die Reaktion mit hohem Überschuß an Derivatisierungsreagenz durchgeführt (mindestens im Verhältnis 3/1 Mol). Es muß auch beachtet werden, daß Wasserdampf aus der Luft sowie Lösungsmittelrückstände aus der Probenvorbereitung oder -extraktion (wie z.B. Methanol) mit dem Silylierungsmittel reagieren. In der Praxis haben sich für die Silylierungsreaktion Mengen von 500 µL Probe und 100 µL MSTFA-Lösung als praktikabel erwiesen. Die derivatisierten Proben bleiben innerhalb von 24 Stunden stabil.

Zur Prüfung der Vollständigkeit der Derivatisierung wurden die Retentionszeiten und Massenspektren der derivatisierten und underivatisierten phenolischen Verbindungen gemessen und katalogisiert. In Abbildung 26 ist als Beispiel das EI-Spektrum für 2,4,6-Trimethylphenol dargestellt. Das Spektrum zeigt neben dem Molekülion (136 Dalton) das intensivste Signal für das Fragment $[M\text{-}CH_3]^+$. Diese beiden Signale sind charakteristisch für die Spektren aller untersuchten Phenole. Abbildung 27 zeigt demgegenüber das EI-Massenspektrum für das Silylierungsprodukt des gleichen Phenols (2,4,6-Trimethylphenol). Auch in den Spektren der silylierten Proben werden die charakteristischen Signale für das Molekülion (208 Dalton) und das Fragment $[M\text{-}CH_3]^+$ detektiert. Durch die Reaktion mit MSTFA erfolgte im Analyt an der OH-Gruppe ein Austausch des Wassserstoffatoms gegen eine Trimethylsilylgruppe, wodurch sich eine Massenverschiebung um 72 Masseneinheiten im Vergleich zum freien Phenol ergibt. Ebenso wie bei den nicht silylierten Phenolen ist das abgebildete Spektrum mit den Signalen für Molekülion und dealkyliertes Fragment charakteristisch für alle untersuchten Substanzen.

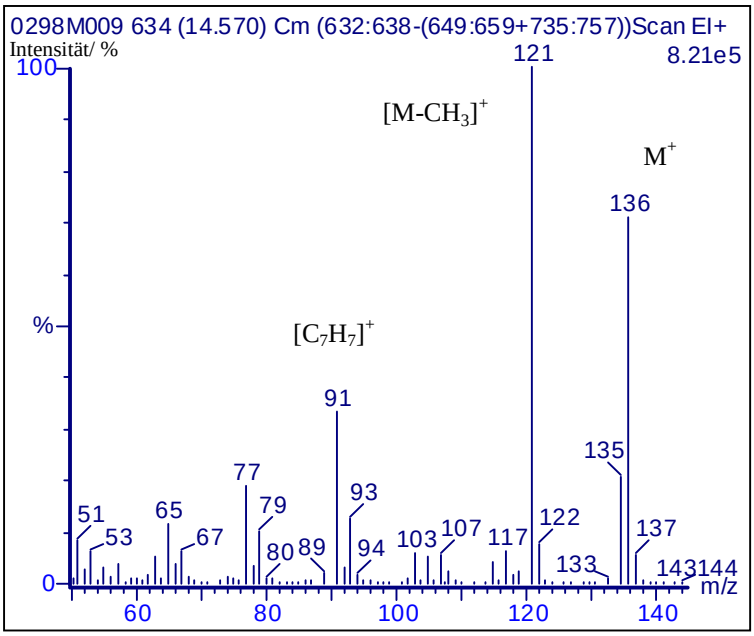

Abbildung 26: EI-Massenspektrum für 2,4,6-Trimethylphenol, nicht derivatisiert

Meßparameter: GC: Carlo-Erba GC-System (GC 8035), Säule: J&W DB-XLB, Länge: 30 m, Innendurchmesser: 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm, He-Vordruck: 13 psi, Injektortemperatur: 240°C, Splitless Injektion (45 sec), Temperaturprogramm: von 55°C auf 220°C Heizrate: 6°/min, von 220°C auf 320°C Heizrate: 27°/min, Gesamtdauer: ca. 45 min, Interfacetemperatur: 250°C, Dosierung: 1 µL der Probe in n-Hexan, ca. 10 pg pro Einzelkomponente, GC-LRMS: Fisons (MD800), Ionenquellentemperatur: 230°C, Kathodenstrom: 150 µA, Multiplier: 600 V

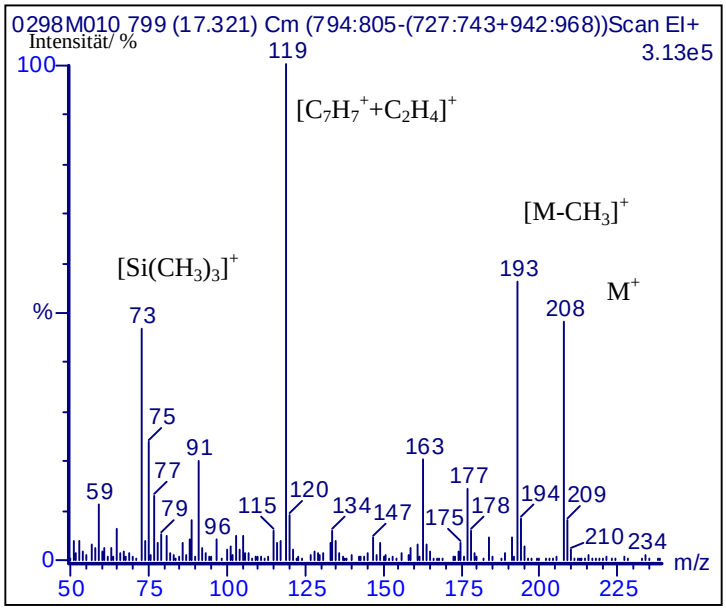

Abbildung 27: EI-Massenspektrum für das TMS-Produkt von 2,4,6-Trimethylphenol

Meßparameter: Dosierung: 1 µL der silylierten Probe in n-Hexan, ca. 10 pg pro Einzelkomponente, weitere Parameter: siehe Abbildung 26

Bei der Messung von derivatisierten Proben kann nun durch Auswahl geeigneter Massenspuren für die nicht derivatisierten Substanzen die Vollständigkeit der Reaktion überprüft werden. Zur Verifizierung kann im Full-Scan-Modus die Spektrenbibliothek mit den nicht derivatisierten Analyten genutzt werden.

Die quantitativen Analysen wurden im ionenselektiven Meßmodus SIR („Single Ion Recording) durchgeführt, da so die Empfindlichkeit der Messungen gegenüber dem Full-Scan-Modus um bis zu zwei Größenordnungen verbessert wird (vgl. Kapitel 4.2.1).

Die Abbildung 28 zeigt den Ausschnitt eines Massenchromatogramms silylierter Phenole für eine GC-MS-Analyse im SIR-Modus. Die selektive Darstellung der Massenspuren (Molekülion der silylierten Phenole) erlaubt die Bestimmung der Einzelkomponenten, auch wenn diese chromatographisch nicht aufgelöst sind (Signale für 2-Isopropylphenol-TMS – Spur A – und 2-Methoxyphenol-TMS – Spur B).

Die Konzentration der Einzelkomponenten des in Abbildung 28 dargestellten Modellgemisches betrug ca. 1 µg/L. In dieser Konzentration sind auf allen Massenspuren bereits Störsignale im Intensitätsbereich der Analytsignale vorhanden (Spur A: Störsignal bei 15,117 min hat gleiche Intensität wie Signal von 2-Isopropylphenol bei 14,631 min). Durch die hohe Auflösung der Gaschromatographie ist die Quantifizierung der meisten Analytsignale trotzdem möglich. Die Bestimmungsgrenzen des GC-LRMS-Verfahrens liegen im Bereich von 0,2 bis 0,5 µg/L pro Einzelsubstanz.

Wegen der Einheitsauflösung eines Quadrupol-Massenspektrometers sind der quantitativen Analytik mit diesem Gerätetyp durch Querstörungen Grenzen gesetzt. So ist in diesem Fall die Bestimmung von 2,3-Dimethylphenol (15,090 min) im Spurenbereich nicht mehr möglich, da das Signal für das Molekülion von einem intensiven Matrixsignal (ebenso 15,090 min) gleicher Nominalmasse überlagert wird (vgl. Spur C in Abbildung 28).

Durch Wechsel der Massenspur auf das dealkylierte Fragmention kann in einigen Fällen der Überlagerung ausgewichen werden. In diesem Fall ist jedoch auch das Fragmention (179 Dalton) nicht frei von Überlagerungen. Für die Bestimmung von 2,3-Dimethylphenol in diesem Konzentrationsbereich müssen daher andere Messungen (z.B. mit einem hochauflösenden Gerät) durchgeführt werden (siehe Kapitel 4.2.3.2).

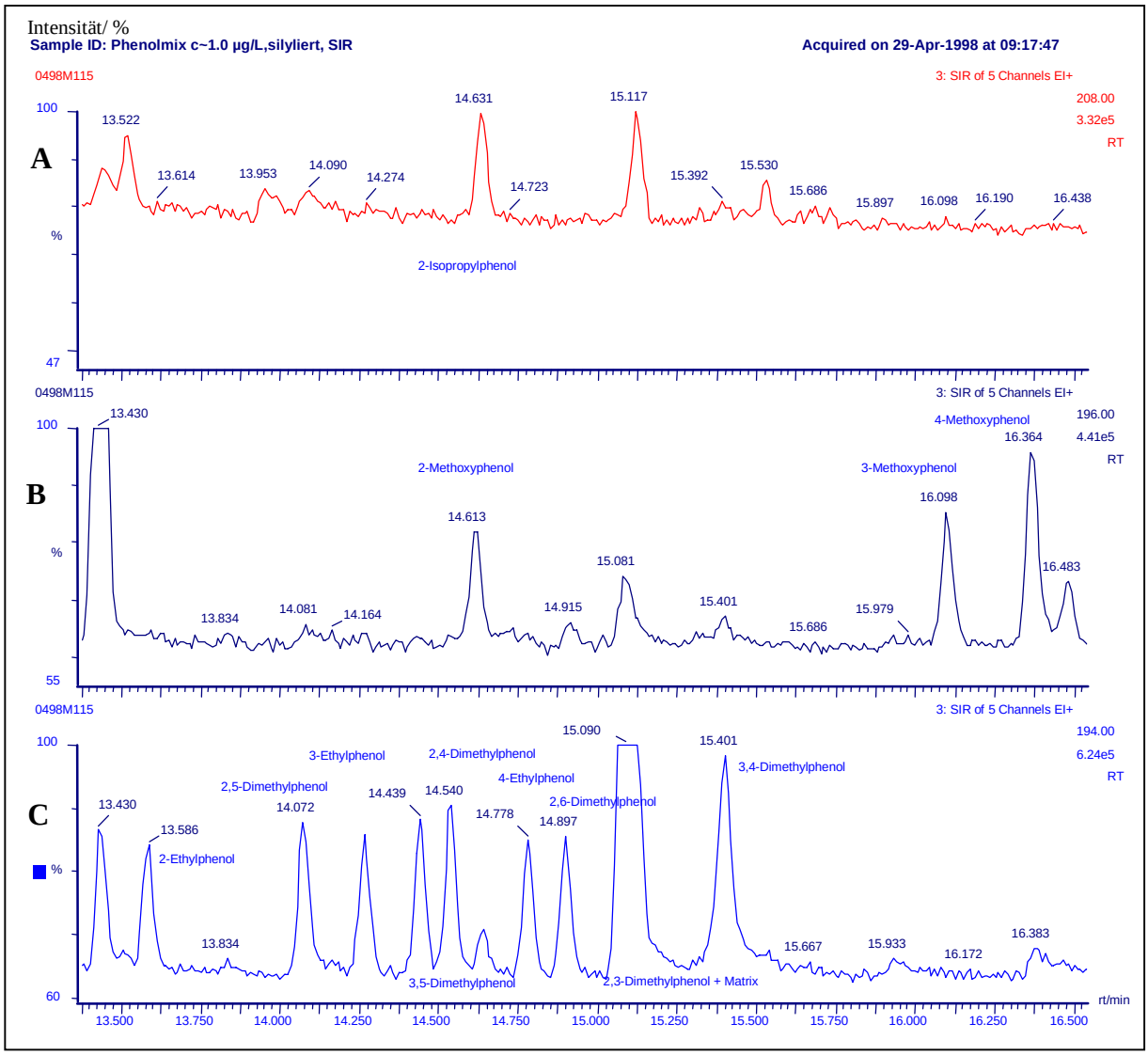

Abbildung 28: Chromatogramm für eine GC-MS-Analyse silylierter Phenole (Ausschnitt, SIR-Modus)

Meßparameter: Dosierung: 1 µL der silylierten Probe in n-Hexan, ca. 1 pg pro Einzelkomponente, weitere Parameter: siehe Abbildung 27

Das GC-LRMS-Verfahren eignet sich als Standardverfahren für die Phenolanalytik. Die Validierung ist in Kapitel 4.2.3.3 dargestellt.

4.2.3.2 GC-HRMS

Die hohe Selektivität der GC-HRMS ermöglicht es, auch Querstörungen durch Ionen gleicher Nominalmassen von den Analytsignalen zu trennen und so nahezu untergrundfrei zu messen. Der apparative und finanzielle Aufwand ist jedoch im Vergleich zu niederauflösenden Massenspektrometern wesentlich höher.

Es wurde ein doppelfokussierendes Sektorfeld-Massenspektrometer Finnigan MAT 95S mit Hewlett-Packard GC 5890 verwendet. Für die Derivatisierung und die chromatographische Trennung wurden die Parameter des im vorausgehenden Abschnitt beschriebenen GC-LRMS-Verfahrens genutzt.

In Abbildung 29 ist der Ausschnitt verschiedener Massenchromatogramme für eine GC-HRMS-Analyse silylierter Phenole dargestellt (Auflösung ca. 3000). Der Ausschnitt entspricht dem Retentionsbereich der GC-LRMS-Analyse aus Abbildung 28. Spur A in Abbildung 29 zeigt die unter hochauflösenden Bedingungen aufgenommenen C_2-Alkylphenole. Sie entspricht Spur C in Abbildung 28, die mit dem niederauflösenden Quadrupol-Massenspektrometer gemessen wurde. Obwohl unter hochauflösenden Bedingungen die absoluten Signalintensitäten um ca. zwei Größenordnungen geringer sind, ist das Signal-/ Rausch-Verhältnis deutlich besser. Der Abbildungsvergleich zeigt auch, daß die quantitative Erfassung von 2,3-Dimethylphenol mit GC-HRMS gelingt, da der bei Niederauflösung störende Matrixpeak durch die höhere Selektivität abgetrennt wird. Auch die Störsignale der Silylierungsprodukte sowie andere Matrixsignale können durch die Hochauflösung separiert werden. Dies läßt sich am Vergleich der hochaufgelösten Massenspur von 2-Isopropylphenol (Abbildung 29, Spur C) zu der entsprechenden Analyse des Quadrupol-Massenspektrometers (Abbildung 28, Spur A) dokumentieren. Der bei Niederauflösung auftretende Matrixpeak (15,117 min) ist bei Hochauflösung (14,111 min) fast vollständig abgetrennt und das Untergrundrauschen im Vergleich zur LRMS-Analyse um mehrere Größenordnungen geringer (Verhältnis ca. 50:1). Die gleichen Effekte lassen sich auch in den Abbildungen bei den Spuren B für die Methoxyphenole erkennen.

Die Bestimmungsgrenzen des GC-HRMS-Verfahrens liegen im Bereich von 0,1 bis 0,3 µg/L pro Einzelsubstanz. Bedingt durch das verbesserte Signal-/ Rausch-Verhältnis liegen sie damit ca. um den Faktor 2 unter denen des GC-LRMS-Verfahrens.

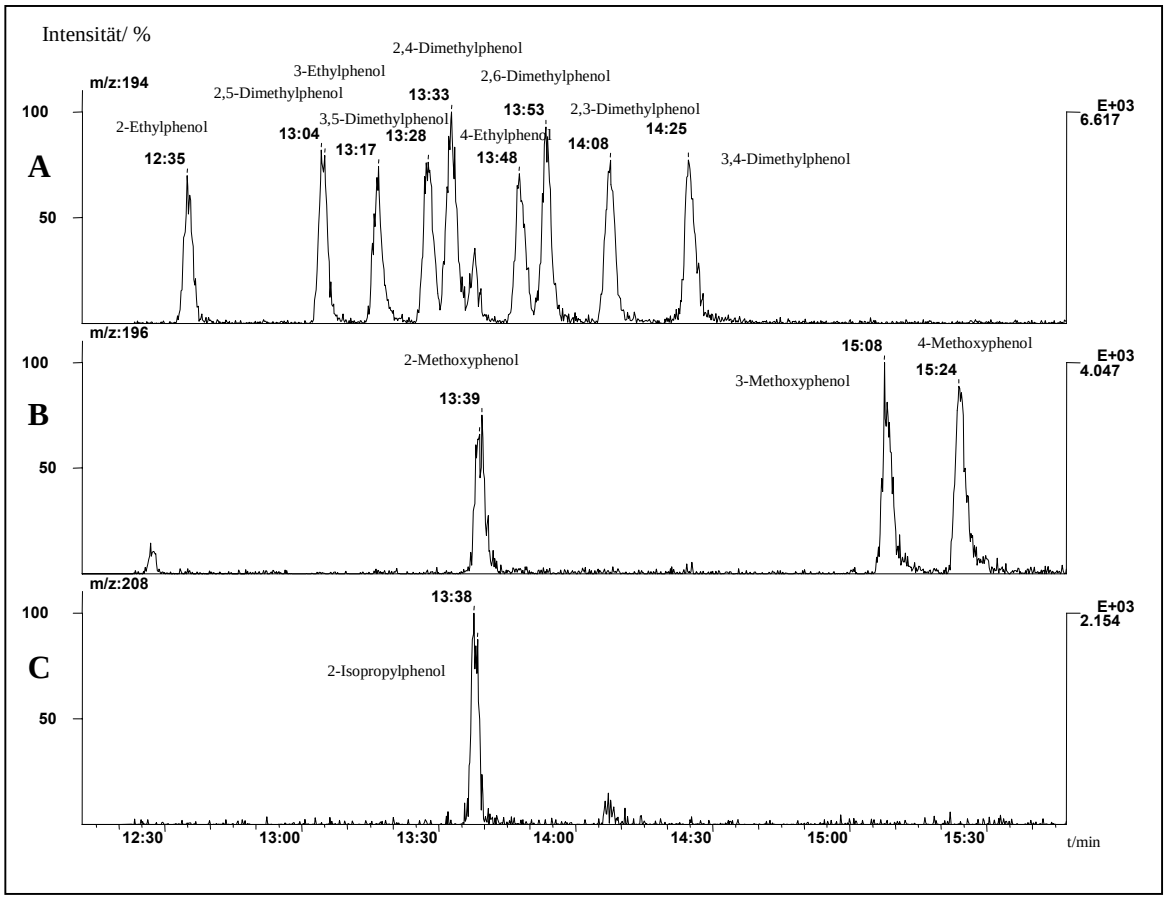

Abbildung 29: Chromatogramm für eine GC-MS-Analyse silylierter Phenole (Ausschnitt, MID-Modus)

Meßparameter: GC: Hewlett-Packard GC-System HP-GC 5890, Säule: J&W DB-XLB, Länge: 30 m, Innendurchmesser: 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm, He-Vordruck: 11 psi, Injektortemperatur: 240°C, Splitless Injektion (45 sec), Temperaturprogramm: von 55°C auf 220°C Heizrate: 6°/min, von 220°C auf 320°C Heizrate: 27°/min, Gesamtdauer: ca. 45 min, Interfacetemperatur: 250°C, Dosierung: 1 µL der silylierten Probe in n-Hexan, ca. 1 pg pro Einzelkomponente, HRMS: MAT 95S: Ionenquellentemperatur: 230°C, Kathodenstrom: 150 µA, Multiplier: 2,3 kV, Auflösung: 3000, MID: Massenspuren für die exakten Analytmassen (Molekülion), Referenzgas: FC 43

Das GC-HRMS-Verfahren eignet sich als leistungsfähiges Referenzverfahren für die Phenolanalytik. Die Validierung ist in Kapitel 4.2.3.3 dargestellt.

4.2.3.3 Validierung der GC-MS-Verfahren

Die entwickelten Analysenverfahren zur Bestimmung von Phenolen mit der GC-MS wurde in eine Labor-Standardarbeitsanweisung (BAM-STAA-I.23-006[141]) überführt. Zur Verfahrensoptimierung und -erarbeitung war es zuvor notwendig, sämtliche Einzelschritte wie Herstellung und Verdünnung des Modellgemisches, Abstimmung der GC- und MS-Parameter und Anpassung der Quantifizierung zu prüfen und mehrfach zu wiederholen.

Die Verfahren wurden entsprechend der Standardarbeitsanweisung bearbeitet und validiert[142]. Bestandteile dieser Standardarbeitsanweisung sind die gravimetrische Herstellung und Verdünnung der Modellgemische, die Silylierung der Meßlösung mit MSTFA sowie Messung und Auswertung der MID-Massenchromatogramme.

Die Wiederholpräzision wurde durch Messung der relativen Peakflächen des Modellgemisches (siehe Kapitel 4.2.3) bei einer Konzentration von 2 µg/L über 10 direkt hintereinander durchgeführte Messungen für alle Analyte im Mittel zu 6% bestimmt. Der Nachweis von Selektivität und Spezifität erfolgte in den GC-MS-Verfahren durch Zuordnung der Retentionszeiten und Spektren. Bei der Auswertung selektiver Massenspuren (MID- oder SIR-Modus) wurden neben den quantifizierten Molekülionen ($[M^+]$) zur Absicherung der Identifizierung auch die dealkylierten Fragmentionen ($[M\text{-}CH_3]^+$) detektiert. Die Unsicherheit der Probenvorbereitung zur Herstellung der synthetischen Proben beschränkt sich auf die Einwaage und Verdünnung. Da bei der Messung unterschiedlicher Proben im Rahmen der Wiederholpräzision keine signifikanten Abweichungen der Mittelwerte festgestellt wurden, wird der Anteil der Unsicherheit der Probenvorbereitung an der Verfahrensunsicherheit (Summe der Unsicherheiten aller Verfahrensabschnitte) zu unter 1% abgeschätzt (Berücksichtigung des 95% Vertrauensbereichs).

Die Verfahren wurden für zwei Konzentrationsbereiche validiert, (0,5 bis 50 µg/L und 5 bis 100 µg/L). Die Kalibrierkurven sind für alle Substanzen in den beiden Konzentrationsbereichen linear.

Für die Bestimmung der Vergleichspräzision ist es erforderlich, mit den Verfahren an mindestens einem Ringversuch teilzunehmen.

Die Bestimmungsgrenzen[143] liegen analytabhängig zwischen 0,1 und 0,7 µg/L (die Nachweisgrenzen ca. um den Faktor 2 niedriger). Die Bestimmungsgrenzen für 2,3-

Dimethylphenol und 2-Isopropylphenol wurden in der Tabelle für die GC-HRMS angegeben. Mit dem GC-LRMS-Verfahren sollten diese Analyte wegen der Querstörungen nicht bestimmt werden (siehe Abbildung 28 und Abbildung 29).

In Tabelle 4 sind ausgewählte Parameter der Validierung angegeben. Die Korrelationskoeffizienten wurden für die Kalibrierung einer Analysenreihe beispielhaft für das GC-LRMS-Verfahren angegeben und sind denen einer entsprechenden Kalibrierung der GC-HRMS gegenübergestellt. Die Anpassung der Werte an eine lineare Kalibrierung ist bei der GC-HRMS weniger fehlerbehaftet als bei der GC-LRMS (Korrelationskoeffizienten für die GC-HRMS liegen näher bei 1), da bei Messungen mit Hochauflösung das Signal-/ Rausch-Verhältnis größer ist.

Bei der GC-HRMS ergeben sich bezüglich der Tabelle 4 einige Abweichungen. Die Werte für die quantifizierte Masse entsprechen den exakten Massen der Molekülionen. Die Retentionszeiten weichen um einige Sekunden von den angegebenen ab, da sich die Säulen um ca. 20 cm in der Länge unterscheiden. Die Bestimmungsgrenzen der GC-HRMS liegen um ca. den Faktor 2 unter den Werten für die angegebenen GC-LRMS-Messungen.

Tabelle 4: Ausgewählte Validierungsparameter der GC-MS-Verfahren

Substanzname	quantifizierte Masse/ (m/z)	mittlere RT/ min	Bestimmungs-grenze/ (µg/L)	Korrelationskoeffizienten GC-LRMS	Korrelationskoeffizienten GC-HRMS
Phenol-TMS	166,00	9,71	0,38	0,94997	0,99942
13C-Pentachlorphenol-TMS	328,60	29,02	0,68	ISTD	ISTD
2-Methylphenol-TMS (2-MP)	180,00	11,89	0,24	0,99850	0,99588
3-Methylphenol-TMS (3-MP)	180,00	12,16	0,26	0,99712	0,99853
4-Methylphenol-TMS (4-MP)	180,00	12,52	0,28	0,99853	0,99976
2-Ethylphenol-TMS (2-EtP)	194,00	13,59	0,61	0,99610	0,99685
3-Ethylphenol-TMS (3-EtP)	194,00	14,27	0,28	0,99980	0,99929
4-Ethylphenol-TMS (4-EtP)	194,00	14,91	0,34	0,99924	0,99981
2,5-Dimethylphenol-TMS (2,5-DMP)	194,00	14,08	0,30	0,99429	0,99853
3,5-Dimethylphenol-TMS (3,5-DMP)	194,00	14,45	0,32	0,99983	0,99940
2,4-Dimethylphenol-TMS (2,4-DMP)	194,00	14,54	0,29	0,99908	0,99834
2,6-Dimethylphenol-TMS (2,6-DMP)	194,00	14,91	0,35	0,99924	0,99938
2,3-Dimethylphenol-TMS (2,3-DMP)	194,00	15,10	0,40	0,69879	0,99961
3,4-Dimethylphenol-TMS (3,4-DMP)	194,00	15,41	0,42	0,92533	0,99923
2-Methoxyphenol-TMS (2-MeOP)	196,00	14,62	0,30	0,99907	0,99985
3-Methoxyphenol-TMS (3-MeOP)	196,00	16,10	0,22	0,99989	0,99877
4-Methoxyphenol-TMS (4-MeOP)	196,00	16,37	0,28	0,99691	0,99794
2-Isopropylphenol-TMS (2-iPrP)	208,00	14,65	0,15	0,99648	0,99946
2,3,5-Trimethylphenol-TMS (2,3,5-TMP)	208,00	17,07	0,21	0,99798	0,99892
2,4,6-Trimethylphenol-TMS (2,4,6-TMP)	208,00	17,31	0,28	0,99867	0,99934
2,3,6-Trimethylphenol-TMS (2,3,6-TMP)	208,00	17,87	0,27	0,99712	0,99890
3,4,5-Trimethylphenol-TMS (3,4,5-TMP)	208,00	18,16	0,28	0,99873	0,99903
5-Indanol-TMS	206,00	19,14	0,24	0,99817	0,99810
2,6-Dimethoxyphenol-TMS (2,6-DMeOP)	196,00	19,10	0,27	0,99859	0,99892
2,4,6-Trichlorphenol-TMS (2,4,6-TCP)	254,80	21,12	0,33	0,99930	0,99992
2,3,6-Trichlorphenol-TMS (2,3,6-TCP)	254,80	21,94	0,11	0,99296	0,99637
1-Naphthol-TMS	216,00	22,35	0,33	0,99625	0,99836
2-Naphthol-TMS	216,00	22,91	0,30	0,96953	0,99897
2,2´-Dihydroxydiphenyl-TMS	330,00	25,97	0,18	0,95081	0,99959
Pentachlorphenol-TMS (PCP)	322,60	29,03	0,68	0,99415	0,99935

Die Abbildungen 30 bis 33 (Abkürzungen der Analyte siehe Tabelle 4) zeigen die aus mehreren Messungen bestimmten Mittelwerte für zwei Konzentrationsniveaus des Modellgemisches im unteren µg/L-Bereich und die dazugehörigen Standardabweichungen (Berechnung für eine Stichprobe aus einer Grundgesamtheit). Zusätzlich sind die Analyt-Sollkonzentrationen (Einwaage) für die Einzelverbindungen angegeben. Für jede Einzelmessung wurde gesondert eine Kalibrierreihe erstellt (interner Standard –ISTD: ^{13}C-Pentachlorphenol), wofür jeweils 5 Kalibrierlösungen unterschiedlicher Konzentration hergestellt und gemessen wurden (Meßzeit für eine Reihe ca. 7 Stunden). Innerhalb jeder Einzelmessung wurden jeweils die 29 Analyte des Modellgemisches quantifiziert.

In den Tabellen 10 bis 13 im Anhang sind die zu den Abbildungen gehörigen Zahlenwerte sowie die prozentuale Meßwertstreuung (Präzision) und die prozentuale Abweichung der Mittelwerte von der Sollkonzentration (Richtigkeit) für jede Einzelverbindung aufgelistet.

Abbildung 30 zeigt die Meßergebnisse für die GC-LRMS bei einem Konzentrationsniveau von 2 µg/L.

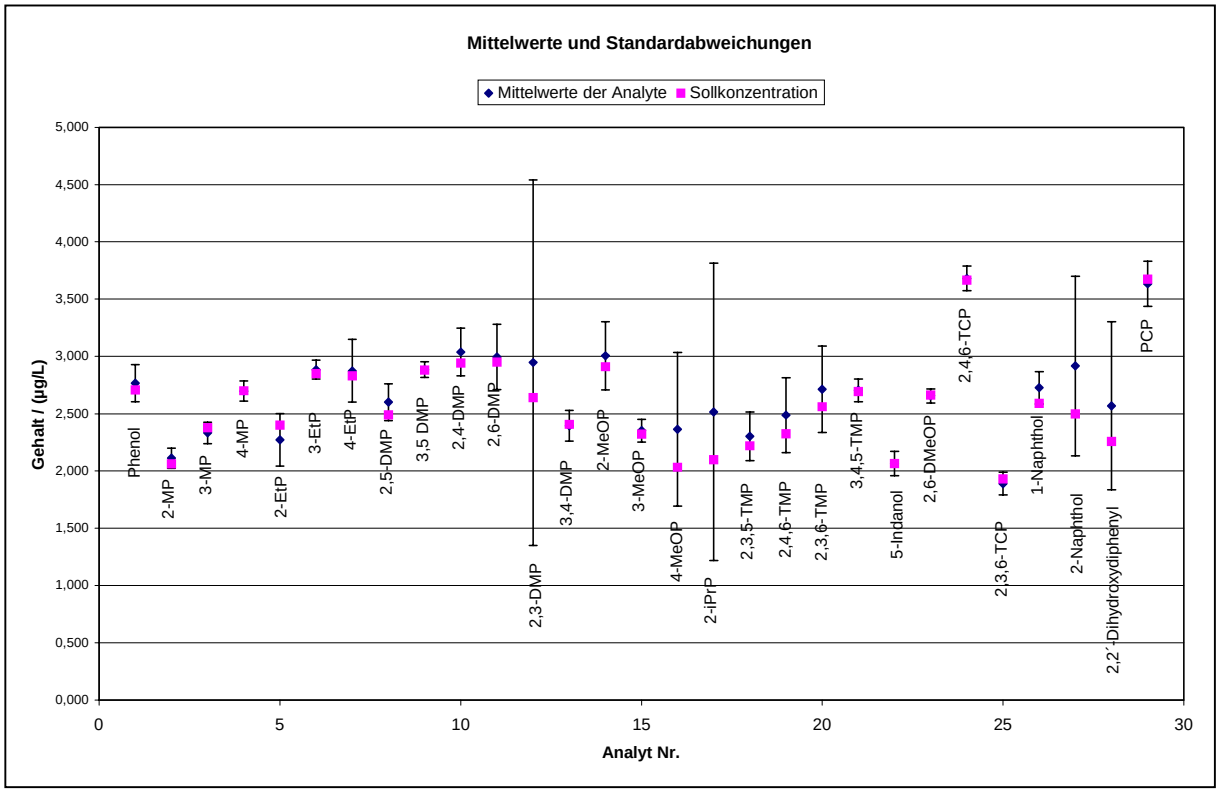

Abbildung 30: Parameter für die GC-LRMS, Konzentration des Modellgemisches ca. 2 µg/L

Die über alle Analyte gemittelte Abweichung der Mittelwerte von der Sollkonzentration liegt bei durchschnittlich 4% mit einer Streuung von 12% (siehe Anhang, Tabelle 10).

Die Werte für 2,3-Dimethylphenol und 2-Isopropylphenol haben signifikant erhöhte Abweichungen für die Streuung (größer 50%). Dies ist auf die problematische Integration der Analytsignale, die auf Querstörungen mit Matrixsignalen beruht, zurückzuführen (vgl. Abbildung 28). Die Querstörungen sind nicht immer vorhanden. So wurde die vergleichsweise große Streuung der Werte für 2-Naphthol in den folgenden Analysen nicht mehr beobachtet. Die Sollkonzentration der Einzelverbindungen liegen in allen Fällen innerhalb der Meßunsicherheit des Verfahrens.

In Abbildung 31 sind die entsprechenden Daten für die GC-HRMS für das identische Modellgemisch mit dem selben Konzentrationsniveau graphisch dargestellt. Die Vorgehensweise bei der Datenerfassung (z.B. Anzahl der Meßwerte und Kalibrierung) erfolgte auf die gleiche Weise wie bei der GC-LRMS.

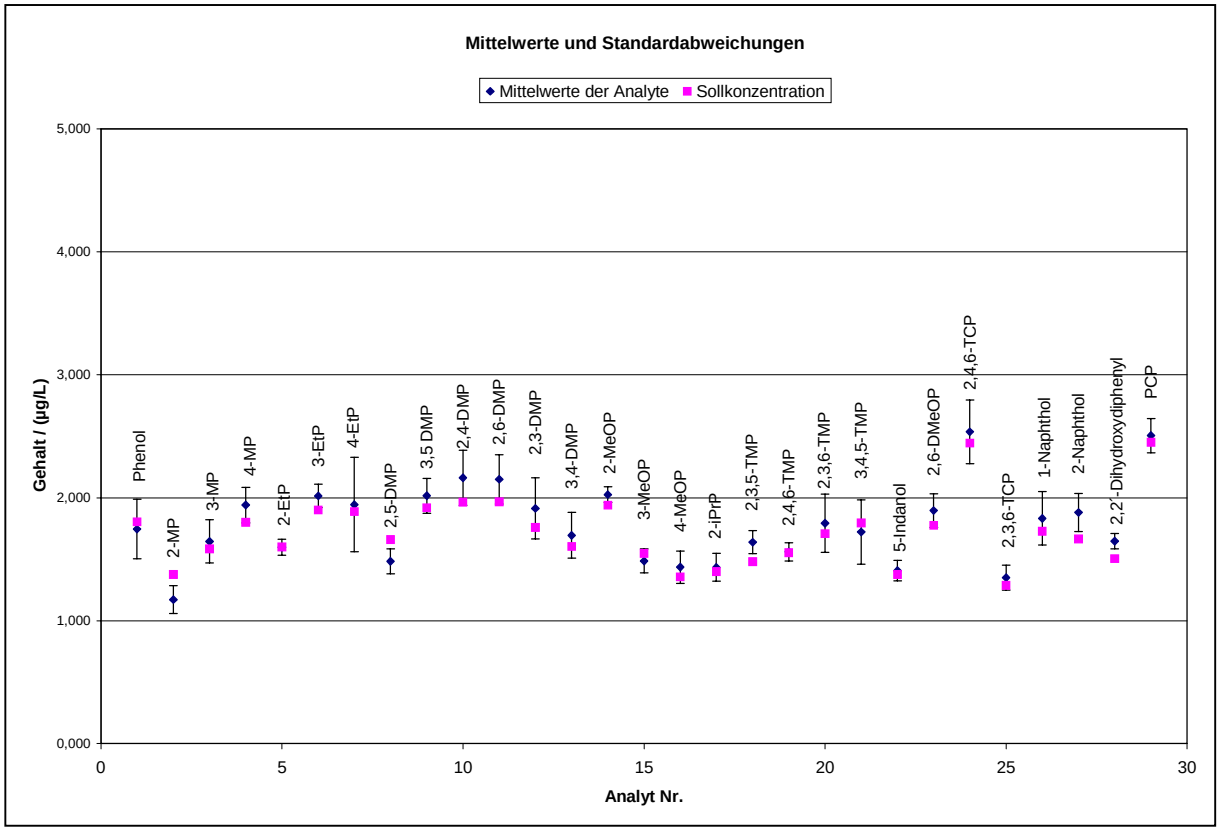

Abbildung 31: Parameter für die für GC-HRMS, Konzentration des Modellgemisches ca. 2 µg/L

Wie die Gegenüberstellung der Abbildungen 30 und 31 (Tabellen 10 und 11) zeigt, sind die Meßunsicherheiten für die Mehrzahl der Analyte für beide Verfahren vergleichbar. Die Werte der GC-HRMS weichen durchschnittlich um 5% von den Sollwerten ab und streuen dabei um 9% (Einzelwerte siehe Anhang, Tabelle 11). Wie aus Abbildung 31 ersichtlich ist, lassen sich die Signale für 2,3-Dimethylphenol und 2-Isopropylphenol, die bei den GC-LRMS-Analysen durch Matrix-Querstörungen überlagert waren, nun jedoch bedingt durch die Hochauflösung mit gleicher Präzision wie die anderen Analyte bestimmen.

Die Minimierung der Querstörungen beim Einsatz der GC-HRMS wird auch im Konzentrationsbereich der Bestimmungsgrenze (Konzentration ca. 0,8 µg/L) festgestellt.

Abbildung 32 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen für die Ergebnisse der GC-LRMS-Analysen. Während die nicht durch Querstörungen beeinflußten Signale noch mit Abweichungen von der Sollkonzentration von durchschnittlich 11% bei Streuungen um 17% bestimmbar sind, lassen sich die matrixgestörten Analytsignale (2,3-Dimethylphenol, 4-Methoxyphenol, 2-Isopropylphenol) nicht mehr mit ausreichender Qualität analysieren.

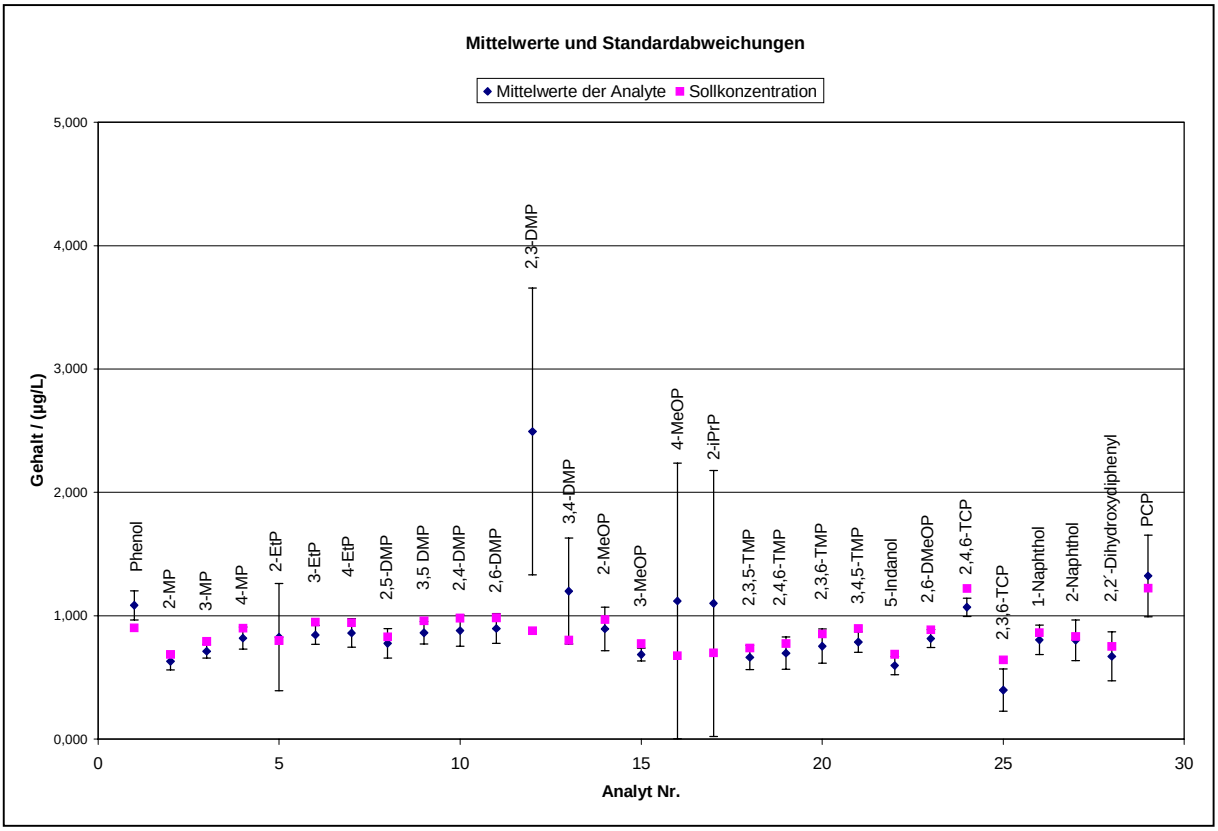

Abbildung 32: Parameter für die GC-LRMS, Konzentration des Modellgemisches ca. 0,8 µg/L

Die Analytsignale dieser drei Substanzen (2,3-Dimethylphenol, 4-Methoxyphenol, 2-Isopropylphenol) haben ungefähr die gleiche Intensität wie die Matrixsignale, so daß Abweichungen zwischen 50 und 100% auftreten (siehe Anhang, Tabelle 12).

Die GC-HRMS ermöglicht die Messung aller Analyte auch im unteren Spurenbereich (Abbildung 33). Die Signale der Analyte, die bei den GC-LRMS-Analysen gestört waren, sind durch die Hochauflösung störungsfrei und lassen sich ohne Qualitätsverlust bei diesem niedrigen Konzentrationsniveau (0,8 µg/L) auswerten.

Bedingt durch das verbesserte Signal-/ Rausch-Verhältnis sind die Werte für die Abweichung von der Sollkonzentration und die Streuung etwas kleiner als bei den Daten der GC-LRMS (Daten siehe Anhang, Tabelle 13).

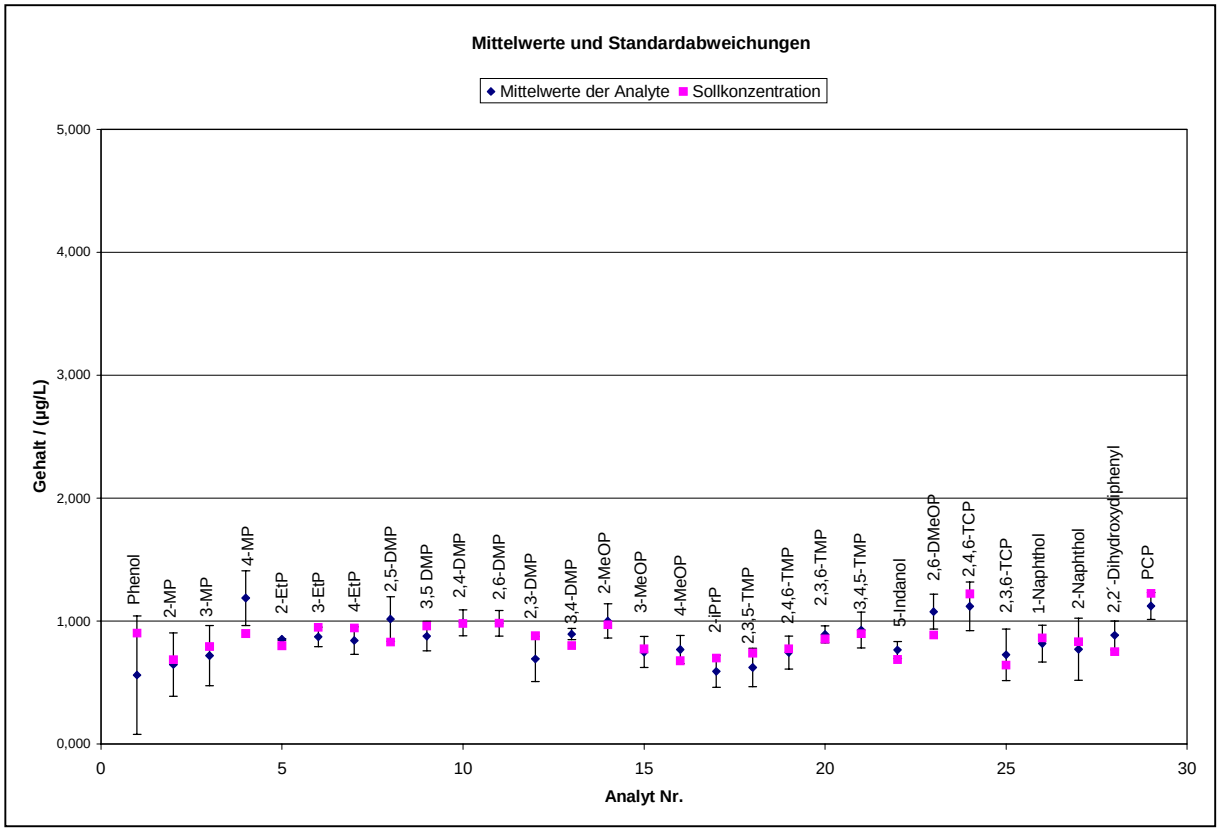

Abbildung 33: Parameter für die GC-HRMS, Konzentration des Modellgemisches ca. 0,8 µg/L

Die Validierung des Verfahrens in einem höheren Konzentrationsbereich liefert vergleichbare Ergebnisse.

In Abbildung 34 sind die Ergebnisse für die GC-HRMS aufgezeigt (11 Probenmessungen, Konzentration ca. 50 µg/L). In diesem Konzentrationsbereich liegen auch die mit der Kapillarelektrophorese untersuchten Proben (siehe Kapitel 4.2.4.3).

Die Werte für die Abweichung von der Sollkonzentration und die Streuung (Abweichung durchschnittlich 3%, Streuung 6%, Einzelwerte siehe Anhang, Tabelle 14) sind etwas geringer, als in dem zuvor diskutierten, um eine Größenordnung kleineren Konzentrationsbereich.

Normalerweise ist zu erwarten, daß mit steigender Analytkonzentration bei gleicher Probenmatrix die Meßunsicherheit des Verfahrens signifikant kleiner wird. Wie der Vergleich der Abbildungen 31, 33 und 34 erkennen läßt, wird diese Erwartung durch die Meßdaten der Validierung nicht bestätigt.

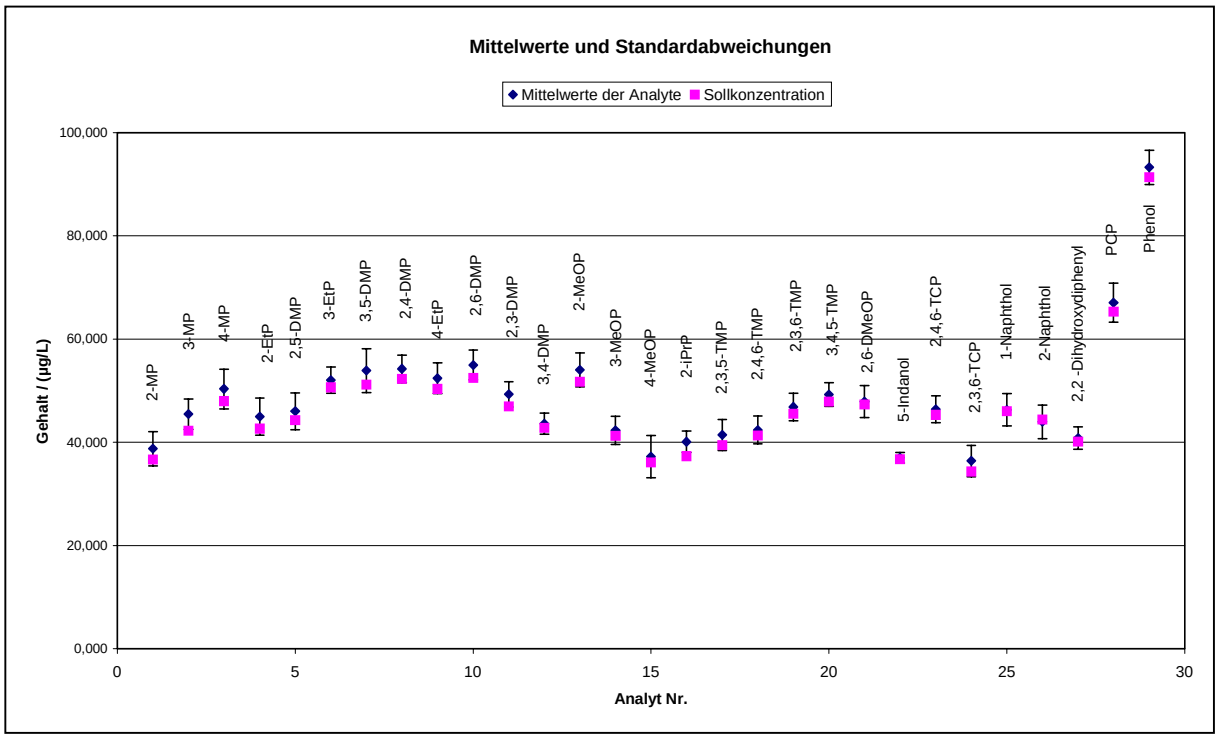

Abbildung 34: Parameter für die GC-HRMS, Konzentration des Modellgemisches ca. 50 µg/L

Hauptursache dafür ist, daß die Wiederholpräzision (6%) den größten Anteil zur Verfahrensunsicherheit beiträgt. Die Wiederholpräzision wiederum wird bei den gezeigten Signal-/ Rausch-Verhältnissen der GC-HRMS (siehe Abbildung 29) durch die automatische bzw. manuelle Signalintegration bestimmt. Mehrfachintegrationen haben ergeben, daß hierbei bereits Unsicherheiten von 3 bis 5% auftreten.

4.2.4 Kapillarelektrophorese

Während die Kapillarelektrophorese in der medizinischen und pharmazeutischen Analytik bereits weit verbreitet ist, existieren bisher nur wenige Anwendungsbeispiele[144,145,146] aus der Wasser- und Bodenanalytik[147,148,149]. In dieser Arbeit wurden kapillarelektrophoretische Trennverfahren für die Analytik von Phenolen entwickelt.

Um die Probleme der hohen konzentrationsbezogenen Nachweisgrenzen der Methode zu überwinden, müssen spezielle Verfahren entwickelt und eingesetzt werden (siehe Kapitel 3.2.3.4). Für die Entwicklung und Validierung neuer Anreicherungs- und Trenntechniken zur CE-Phenolanalytik wurde ein Modellgemisch 22 verschiedener Phenole in Isopropanol hergestellt. Dieses Gemisch umfaßte ausgewählte C_1-, C_2- und C_3-Alkylphenole, verschiedene Chlorphenole, Naphthole und Indanole sowie einige Alkoxyphenole. Von diesem Modellgemisch ausgehend wurden verschiedene Verdünnungen in Wasser, Methanol bzw. Acetonitril hergestellt. Die unterste Konzentrationsstufe lag im Bereich von 0,1 mg/L.

Die Trennung und Anreicherung der phenolischen Verbindungen des Modellgemisches konnte erfolgreich mit der neuentwickelten „Direkten-MEKC-Stacking“-Technik realisiert werden. Für die Validierung dieses Verfahrens wurde ein Ringversuch mit 12 phenolischen Inhaltsstoffen in Wasser organisiert und ausgewertet.

4.2.4.1 Kapillarzonenelektrophorese

Für die Untersuchung ionischer Analyten[150] läßt sich die Kapillarzonenelektrophorese (CZE) nutzen (siehe Abbildung 7). In dieser Arbeit wurde die CZE für die Bestimmung von Pentachlorphenol[151] in Holz eingesetzt. Die Analyse wird in einem Elektrolyt aus Phosphatpuffer und organischen Additiven durchgeführt (siehe Abbildung 35). Die Detektion erfolgt bei 214 nm (Absorptionsmaximum für ionisches Pentachlorphenol, vgl. Abbildung 1).

Die Schwierigkeit dieses Verfahrens liegt in der Trennung der Analyte von Matrixbegleitstoffen, die bei der Extraktion aus der Matrix mit abgetrennt wurden (Bereich im Elektropherogramm bis 14 min). Weitere Matrixbegleitstoffe im Konzentrationsbereich des Pentachlorphenols lassen sich jedoch auch im Migrationszeitbereich von 17 bis 19 min erkennen. Durch die hohe Trennleistung der CE ist dennoch eine ungestörte Quantifizierung von Analyt und internem Standard möglich.

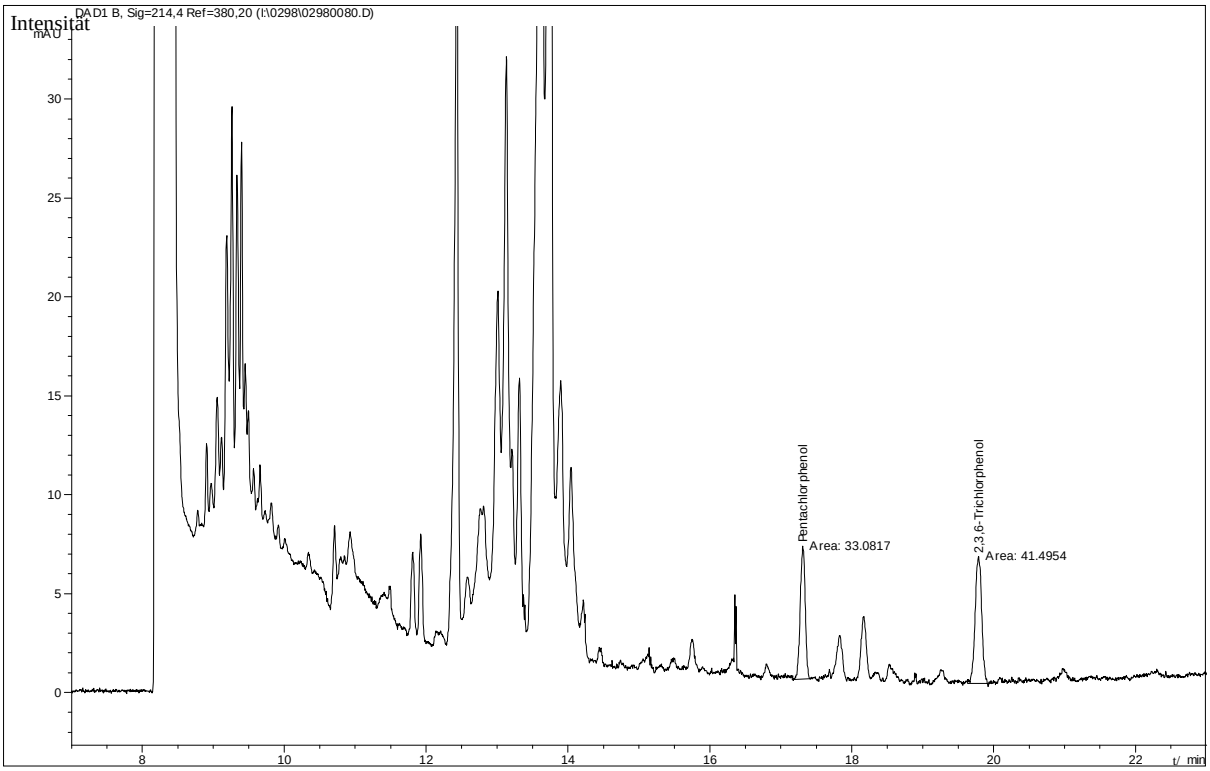

Abbildung 35: Bestimmung von Pentachlorphenol im methanolischen Extrakt einer Holzprobe

Meßparameter: Hewlett-Packard CE-System (HP-CE-3D), Fused-Silica-Kapillare („Bubble-Cell“): effektive Länge: 72 cm, Innendurchmesser 50 µm, Elektrolyt; 10 mmol/L Natriumdihydrogenphosphat, 20 mmol/L Dinatriumhydrogenphosphat, 15% Acetonitril (v/v), 5% Methanol (v/v), Probenaufgabe: 50 mbar x 12 s Probe, 50 mbar x 15 s Elektrolyt, interner Standard: 2,3,6-Trichlorphenol, c = 1,32 mg/L), DAD-Detektion, abgebildet: 214 nm

Die Bestimmungsgrenzen der CZE liegen für dieses Verfahren bei ca. 1 mg/kg Pentachlorphenol in Holz.

Um die Analyte im Spurenbereich bestimmen zu können, eignet sich für die CZE die Anreicherungstechnik des „Electro Stacking“[152,153] (siehe Abbildung 10).

Für die Bestimmung von Pentachlorphenol in Holz wird der Analyt um ca. den Faktor 10 angereichert und so die Bestimmungsgrenze erst bei ca. 100 µg/kg Holz erreicht. Die interne Anreicherung der Probe im Kapillarelektrophoresesystem ist jedoch nicht immer möglich, da ionische Matrixbegleitstoffe ebenfalls angereichert werden und es so zu Querstörungen kommen kann. Selbst mit säulenchromatographischer Vorreinigung und dem Einsatz der SPE kann ein ausreichendes Clean-Up nicht in jedem Fall erreicht werden. Durch Anwendung anderer Trenntechniken wie der MEKC kann diesen Problemen oft ausgewichen werden, da die Analyte bedingt durch das unterschiedliche Trennprinzip andere Migrationseigenschaften und -zeiten haben.

4.2.4.2 Micellare Elektrokinetische Chromatographie

Für die Untersuchung neutraler Analyte kann die CZE nicht eingesetzt werden, da diese Substanzen unspezifisch mit der Nettogeschwindigkeit des Elektroosmotischen Flusses transportiert werden. Zur Trennung neutraler Analyte wird die Micellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC) genutzt (siehe Abbildung 11).

Bei Einsatz der üblichen Elektrolytsysteme führen Anreicherungstechniken wie „Electro Stacking“ nach vorausgegangenen Arbeiten[119] bei der MEKC nur zu geringem Erfolg.

Auf Basis neuer Entwicklungen auf dem Gebiet der Anreicherungstechniken für Neutralteilchen (siehe Kapitel 3.2.3.4) wurde in dieser Arbeit ein neues Verfahren für die Trennung und Anreicherung von neutralen und ionischen Phenolen (unter besonderer Beachtung der Alkylphenole) entwickelt (siehe Abbildung 11) und anhand der für die Trennung und Anreicherung relevanten Parameter[154,155] optimiert.

Um die Anreicherungstechnik des „Direkten-MEKC-Stacking“ einsetzen zu können, ist es erforderlich, den pH-Wert des Elektrolyten im sauren Bereich zu wählen (siehe 3.2.3.4). Nach Tabelle 1 liegen bei diesem pH-Wert bis auf einige Chlor- und Nitrophenole alle Analyte als neutrale Spezies vor.

Auf der Basis vorausgegangener Untersuchungen[119] wurde ein MEKC-Elektrolyt aus Natriumdihydrogenphosphat-Lösung, SDS-Lösung und organischen Modifiern eingesetzt (50 mmol/L wäßrige Natriumdihydrogenphosphat-Lösung, 100 mmol/L SDS-Lösung, 10% Acetonitril (v/v), 5% Methanol (v/v)). Durch die Natriumdihydrogenphosphat-Lösung wird für den Elektrolyt ein pH-Wert[156] von 4,4 detektiert (die Bezeichnung „pH-Wert“, die hier der Einfachheit halber genutzt wird, ist in dem Elektrolytsystem fragwürdig, da die Definition des pH-Wertes nur in reinem Wasser gültig ist).

Die konzentrationsbezogenen Nachweisgrenzen des Analysenverfahrens sind davon abhängig, wie stark sich die Analyte anreichern lassen. Dazu muß entsprechend der „Direkten-MEKC-Stacking“-Technik nach (Kapitel 3.2.3.4) möglichst viel Probenlösung dosiert werden (Probenaufgabe durch Anlegen eines Drucks am Probengefäß über einen definierten Zeitraum). Erfahrungsgemäß liegen die Werte in einem Bereich von 50 mbar Druck über 50 bis 180 Sekunden. Die optimalen Werte sind von den physikochemischen Eigenschaften der Analyte abhängig. Daher wurden die Parameter für die maximal mögliche Dosierung ermittelt (siehe Abbildung 36).

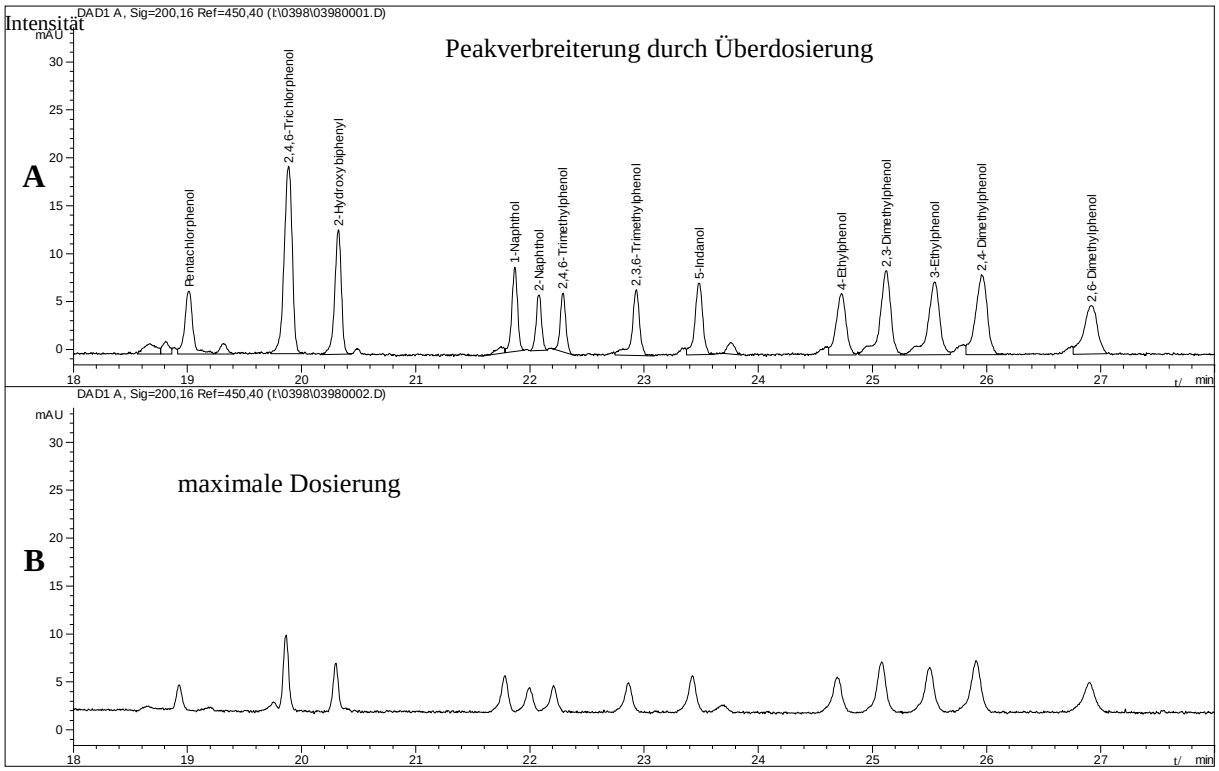

Abbildung 36: Vergleich von unterschiedlichen Dosiermengen

Meßparameter: Hewlett-Packard CE-System (HP-CE-3D), Fused-Silica-Kapillare („Bubble-Cell“): effektive Länge: 72 cm, Innendurchmesser 50 µm, Elektrolyt; 50 mmol/L Natriumdihydrogenphosphat, 15% Acetonitril (v/v), 5% Methanol (v/v), Probenaufgabe: 50 mbar x 12 s Wasser, 50 mbar x 60 s Probe, 50 mbar x 15 s Elektrolyt, DAD-Detektion, abgebildet: 200 nm

Abbildung 36 zeigt am Beispiel des Modellgemisches die Dosierung der maximal möglichen Probenmenge (50 mbar Druck über 60 Sekunden, B) im Vergleich zur Überdosierung (50 mbar Druck über 180 Sekunden, A). Während die Signale bei 50 mbar Druck über 60 Sekunden noch basisliniengetrennt sind, kommt es bei der Überdosierung durch Peaktailing zu Überlagerungen, die eine Quantifizierung der Analyse erschweren. Dieser Nachteil wird auch durch die höhere Signalintensität von A im Verhältnis zu B nicht ausgeglichen.

Bedingt durch die Eigenschaft der Phenole, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, ist die maximal dosierbare Probenmenge dieser Verbindungsklasse vergleichsweise gering. Es wird vermutet, daß die Phenole bevorzugt von einer Hydrathülle umgeben sind. Die Anzahl der an der Hydrathülle beteiligten Moleküle entspricht dabei einer statistischen Verteilung. Die verschieden großen Analyt-Hydrat-Addukte haben geringfügig unterschiedliche Retentionszeiten, so daß es beim Trennprozeß zu Peakverbreiterungen und Peakverdopplungen kommt. Bei der Trennung von Nitroaromaten ist beispielsweise die vergleichsweise hoheProbendosierung von 50 mbar Druck über 180 Sekunden noch

störungsfrei möglich, da diese Substanzen keine Hydrate bilden und die oben genannten Effekte nicht auftreten.

Die Trennschärfe der Analyse ist von der Wanderungsgeschwindigkeit der Micellen während des Anreicherungsprozesses abhängig. Je schneller die Analyte mit den Micellen durch die Probenlösung an die Konzentrationsgrenze beim Elektrolyt gelangen (vgl. Abbildung 11), desto schmaler werden die Analytsignale, wodurch wiederum die Trennschärfe erhöht wird. Dieser Effekt kann durch Dosierung von etwas Wasser („Wasserplug“) vor der Probe verstärkt werden, da so der Feldstärkengradient noch erhöht wird und die Micellen zusätzlich beschleunigt werden.

Für die Reproduzierbarkeit der Messungen ist es vorteilhaft, nach der Probe noch Elektrolyt auf die Säule zu dosieren (50 mbar Druck über 15 Sekunden). Dadurch müssen die Micellen zu Beginn des Trennprozesses nicht erst aus dem Elektrolytgefäß in die Kapillare wandern, sondern liegen bereits in der Säule vor.

Für die Bestimmung von phenolischen Verbindungen mit der entwickelten „Direkten-MEKC-Stacking“-Technik wurden daher folgende Parameter für die Dosierung eingesetzt: 50 mbar Druck über 12 Sekunden Wasser, 50 mbar Druck über 60 Sekunden Probe, 50 mbar Druck über 15 Sekunden Elektrolyt. Die konzentrationsbezogenen Nachweisgrenzen der Kapillarelektrophorese lassen sich durch Einsatz spezieller Säulen weiter absenken. Der Einfluß der „Bubble-Cell“-Kapillare (siehe 3.2.3.1) auf die Nachweisgrenzen ist in Abbildung 37 dargestellt. Die Aufnahme in A erfolgte mit einer Standardkapillare, die in B mit einer „Bubble-Cell“-Kapillare. Die elektrophoretische Auflösung ist für beide Kapillartypen nahezu identisch. Bei gleicher Dosiermenge der Probe läßt sich mit der „Bubble-Cell“-Kapillare eine Zunahme des Signal-/ Rausch-Verhältnisses von größer 3:1 erzielen, da die optische Weglänge des Detektorstrahls durch die Analytlösung entsprechend länger ist. Der Wechsel zwischen beiden Kapillartypen ist ohne jede Änderung der CE-Verfahrensparameter möglich.

Das Verfahren des „Direkten-MEKC-Stacking“ ist nicht für stark hydrophile Substanzen geeignet. Die Analyte müssen eine minimale Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der micellaren Phase des Elektrolyten haben (siehe Kapitel 3.2.3.3). Anderenfalls werden sie mit dem EOF an der Injektionsseite aus dem System herausgespült. Dieser Effekt wird bei der Analytik der Verbindung Phenol deutlich. Diese Substanz hat von allen untersuchten phenolischen Verbindungen die niedrigste Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der micellaren

Phase des Elektrolyten und daher die längste Migrationszeit (64,3 min). Bedingt durch die Diffusion ist das Signal für Phenol stark verbreitert und die Auswertung dadurch fehlerbehaftet.

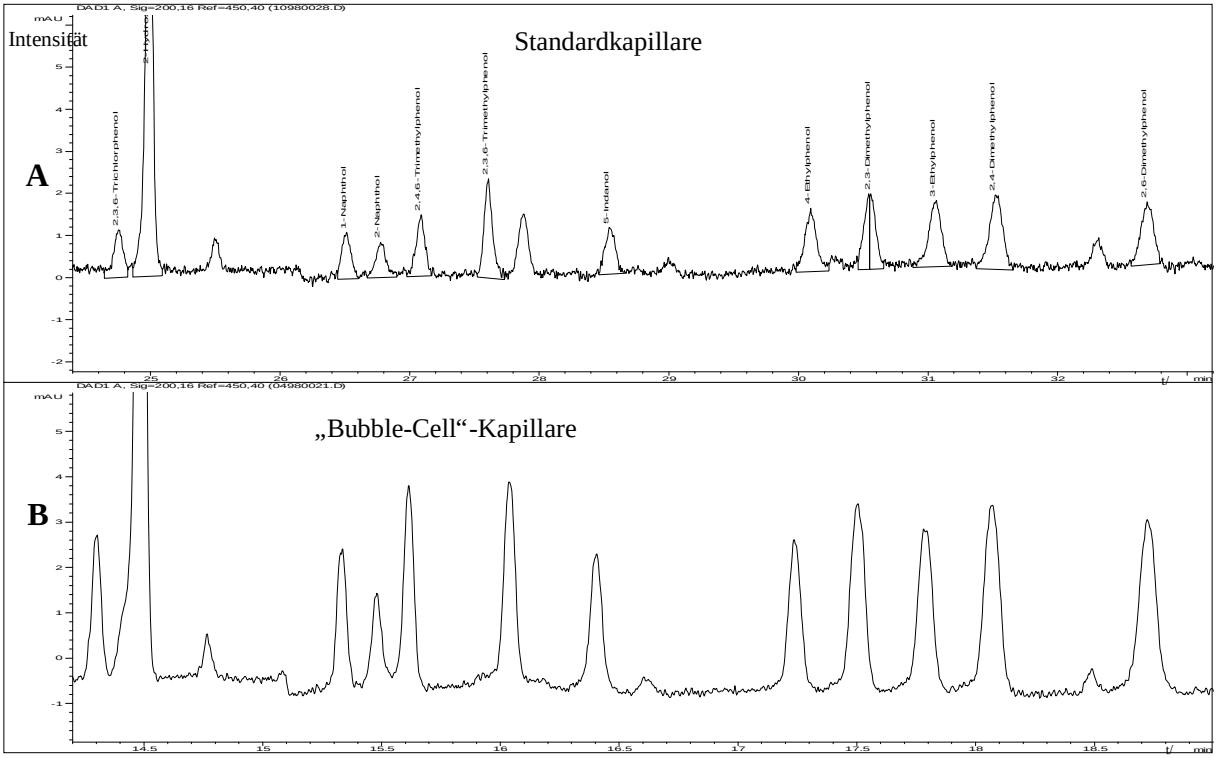

Abbildung 37: Vergleich des Nachweisvermögens für Normal- und „Bubble-Cell"-Kapillaren

Meßparameter: Hewlett-Packard CE-System (HP-CE-3D), Fused-Silica-Kapillare: oben Standardkapillare, effektive Länge: 92 cm (daher sind die absoluten Migrationszeiten der Analyte im Vergleich zur „Bubble-Cell"-Kapillare länger), Innendurchmesser 50 µm, „Bubble-Cell"-Kapillare: effektive Länge: 72 cm, Innendurchmesser 50 µm, Elektrolyt; 50 mmol/L Natriumdihydrogenphosphat, 15% Acetonitril (v/v), 5% Methanol (v/v), Probenaufgabe: 50 mbar x 12 s Wasser, 50 mbar x 60 s Probe, 50 mbar x 15 s Elektrolyt, DAD-Detektion, abgebildet: 200 nm

Das entwickelte Verfahren ermöglicht es, Phenole im Konzentrationsbereich von 0,2 bis 5 mg/L zu bestimmen. Die Bestimmungsgrenzen sind dabei von der Matrix der Analyte abhängig. Liegen rein wäßrige Lösungen vor, kann die Probe direkt dosiert werden. Befinden sich die Analyte dagegen in einem hydrophilen organischen Lösungsmittel wie Methanol oder Acetonitril, muß die Probe vor der Dosierung 4:1 mit Wasser verdünnt werden. Anderenfalls wird das Gleichgewicht zwischen micellarer und wäßriger Phase im Elektrolyt gestört, so daß die Trennung der Analyte nicht gelingt. Dadurch liegen die realen Nachweisgrenzen für Proben in organischen Lösungsmitteln um den Faktor 5 über denen in rein wäßrigen Systemen.

4.2.4.3 Validierung des CE-Verfahrens

Das entwickelte Analysenverfahren zur Bestimmung von Phenolen mit der „Direkten-MEKC-Stacking“-Technik in wäßrigen und polaren Lösungsmitteln wurde in eine Labor-Standardarbeitsanweisung (STAA-BAM-I.23-001[157]) überführt und validiert. Zur Verfahrensoptimierung und -erarbeitung war es zuvor notwendig, wie bei der GC-MS (siehe Kapitel 4.2.3.3) die Einzelschritte zu prüfen und mehrfach zu wiederholen.

Zur elektrophoretischen Trennung werden Fused-Silica-Kapillaren (effektive Länge: 72 cm, 0,5 µm Innendurchmesser) eingesetzt. Die für die Trennung angelegte Spannung betrug -24 kV. Das Trennsystem wurde bei 20°C konstant temperiert. Vor jeder Analyse muß die Fused-Silica-Kapillare mit Natronlauge (c = 0,5 mol/L), Wasser und Elektrolyt konditioniert werden.

Die Detektion der Substanzen erfolgt mit einem Dioden-Array-Detektor. Es muß beachtet werden, daß bei diesem Verfahren die Analyte vorwiegend als neutrale Spezies detektiert werden. Die UV-vis-Spektren unterscheiden daher sich von denen der ionischen Spezies der Analyte (siehe Kapitel 3.2.1). Die Quantifizierung erfolgte bei einer Wellenlänge von 200 nm, bei der die meisten der untersuchten Substanzen ein Absorptionsmaximum haben.

Zum Ausgleich verfahrensbedingter Schwankungen der Migrationszeiten und Intensitäten (Alterung des Elektrolyten, und Intensitätsschwankungen in der UV-Quelle) wurde die Technik des Internen Standards verwendet. Als interner Standard wurde 2-Hydroxybiphenyl eingesetzt, da diese Substanz bisher noch in keiner der untersuchten natürlichen Matrices detektiert wurde.

Das Verfahren wurde entsprechend der Standardarbeitsanweisung bearbeitet und validiert[158]. Bestandteile dieser Standardarbeitsanweisung sind die gravimetrische Herstellung und Verdünnung der Modellgemische und die Messung und Auswertung der Elektropherogramme.

Die Wiederholpräzision wurde durch Messung der relativen Peakflächen des Modellgemisches (siehe Kapitel 4.2.4) bei einer Konzentration von 1 mg/kg über 10 direkt hintereinander durchgeführte Messungen für alle Analyte im Mittel zu 10% bestimmt. Der Nachweis von Selektivität und Spezifität erfolgte durch Zuordnung der Migrationszeiten und UV-vis-Spektren. Die Unsicherheit der Probenvorbereitung zur Herstellung der synthetischen Proben beschränkt sich auf die Einwaage und Verdünnung. Da bei der Messung unterschiedlicher Proben im Rahmen der Wiederholpräzision keine signifikanten

Abweichungen der Mittelwerte festgestellt wurden, wird der Anteil der Unsicherheit der Probenvorbereitung an der Verfahrensunsicherheit ebenso wie bei der GC-MS zu unter 1% abgeschätzt. Die Kalibrierkurven sind über 2 Größenordnungen (0,05 bis 5 mg/L) linear. Die Bestimmungsgrenzen liegen analytabhängig zwischen 0,06 und 0,2 mg/L (die Nachweisgrenzen ca. um den Faktor 2 niedriger).

Die absoluten Retentionszeiten können bei Alterung des Elektrolyten erheblich schwanken. Die Streuung der relativen Retentionszeiten (bezogen auf die Retentionszeit des internen Standards) liegt jedoch bei unter 5%, wenn der Elektrolyt nach maximal 2 Wochen ausgetauscht wird.

Die Validierung wurde neben den aufgeführten Analyten (siehe Tabelle 5) noch für weitere phenolische Verbindungen durchgeführt (Phenol, 3-Ethylphenol, 2,3-Dimethylphenol, 2,3,6-Trimethylphenol, 2,6-Dimethoxyphenol, 2-Naphthol, 5-Indanol, 2-Methyl-4,6-dinitrophenol, 2,3,6-Trichlorphenol, Pentachlorphenol). An dieser Stelle wird jedoch auf die Auflistung ihrer Validierungsparameter verzichtet.

In Tabelle 5 sind ausgewählte Parameter der Validierung aufgeführt. Die Korrelationskoeffizienten wurden für die Kalibrierung einer Analysenreihe beispielhaft angegeben.

Tabelle 5: Ausgewählte Validierungsparameter des „Direkten-MEKC-Stacking“-Verfahrens

Substanzname	mittlere RT/ min	Bestimmungsgrenze/ (mg/L)	Korrelationskoeffizienten
2,4,6-Trichlorphenol (2,4,6-TCP)	15,26	0,111	0,9873
2-Hydroxybiphenyl	15,69	0,106	ISTD
2,4-Dichlorphenol (2,4-DCP)	15,78	0,204	0,9742
1-Naphthol	16,63	0,109	0,9967
2,4,6-Trimethylphenol (2,4,6-TMP)	16,94	0,086	0,9995
4-Ethylphenol (4-EtP)	18,65	0,085	0,9943
2,4-Dimethylphenol (2,4-DMP)	18,93	0,062	0,9990
2,6-Dimethylphenol (2,6-DMP)	20,25	0,080	0,9992
2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP)	22,53	0,199	0,9902
4-Methylphenol (4-MP)	24,52	0,141	0,9935
2-Methylphenol (2-MP)	25,03	0,141	0,9961
4-Nitrophenol (4-NP)	25,65	0,198	0,9955
3-Methoxyphenol (3-MeOP)	33,81	0,148	0,9979

Abbildung 38 und Abbildung 39 (Abkürzungen der Analyte siehe Tabelle 5) zeigen die aus mehreren Messungen bestimmten Mittelwerte für zwei Konzentrationsniveaus (0,5 und 1,0 mg/kg) des Modellgemisches in der Matrix Wasser sowie die dazugehörigen Standardabweichungen (Berechnung für eine Stichprobe aus einer Grundgesamtheit). Zusätzlich sind die Analyt-Sollkonzentrationen (Einwaage) für die Einzelverbindungen angegeben. Für jede Einzelmessung wurde gesondert eine Kalibrierreihe erstellt, wofür

jeweils 5 Kalibrierlösungen unterschiedlicher Konzentration hergestellt und gemessen wurden (Meßzeit für eine Reihe ca. 5 Stunden). Mit einer Kalibrierreihe lassen sich beide angegebenen Niveaus analysieren. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Menge an Analyt in Menge der Gemischprobe. Diese Angabe resultiert daraus, daß aus Genauigkeitsgründen die Lösungen nicht volumetrisch, sondern gravimetrisch hergestellt wurden (die Unsicherheit der volumetrischen Verdünnung ist größer als die der gravimetrischen Verdünnung). Innerhalb jeder Einzelmessung wurden jeweils die 12 Analyte des Modellgemisches quantifiziert. In Tabelle 15 und Tabelle 16 im Anhang sind die zu den Abbildungen gehörigen Zahlenwerte sowie die prozentuale Meßwertstreuung (Präzision) und die prozentuale Abweichung der Mittelwerte von der Sollkonzentration (Richtigkeit) für jede Einzelverbindung aufgelistet.

Abbildung 38 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen für die Validierungsmessungen im Konzentrationsbereich von 1,0 mg/kg. Die Werte weichen durchschnittlich um 6% von den Sollwerten ab und streuen dabei um 6%. Damit liegen die statistischen Abweichungen im Bereich der Wiederholpräzision (Einzelwerte: siehe Anhang, Tabelle 15).

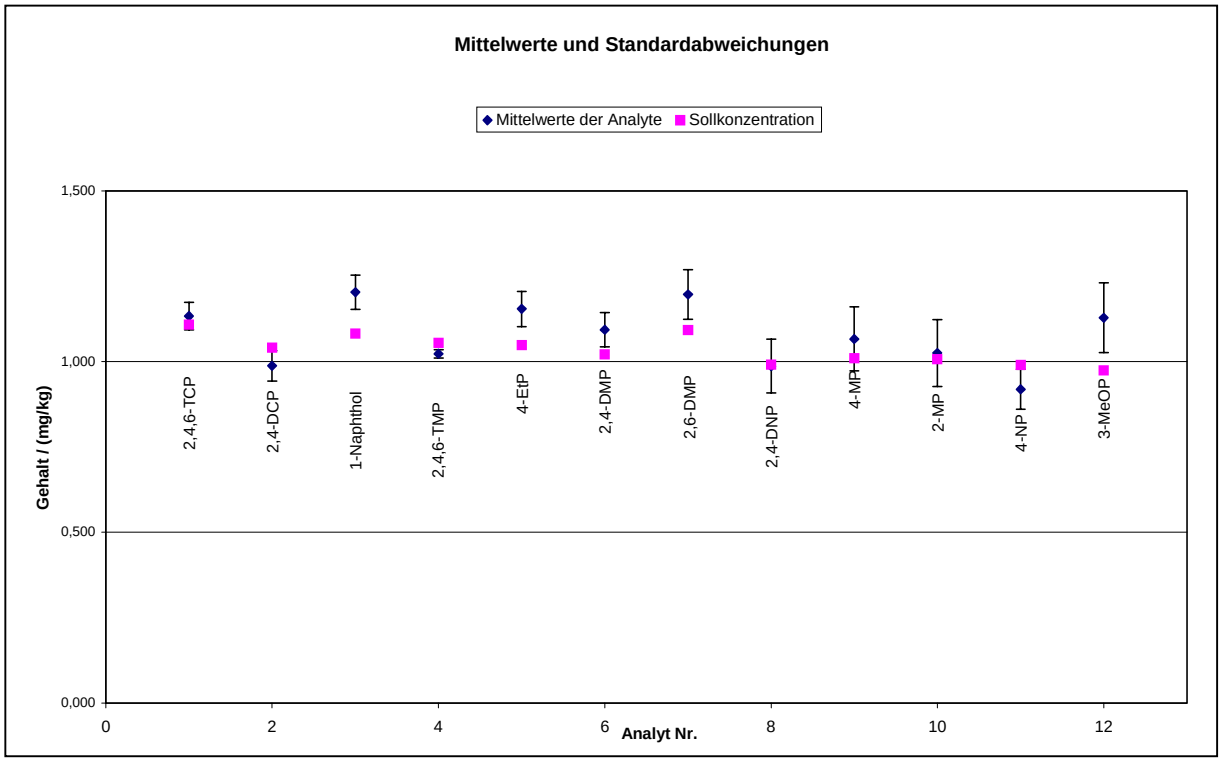

Abbildung 38: Parameter für das „Direkte-MEKC-Stacking"-Verfahren, Konzentration der Analyte der Analyte ca. 1 mg/kg

Auch im unteren Konzentrationsbereich (0,5 mg/kg, siehe Abbildung 39) liegen die Abweichungen von der Sollkonzentration durchschnittlich bei 10% und streuen im Bereich von 8%. Da dieses Konzentrationsniveau in der Größenordnung der Bestimmungsgrenze liegt, wird der Einfluß von Störsignalen des Untergrundes deutlich. So ist beispielsweise das Signal für 1-Naphthol durch Überlagerung mit einem Untergrundsignal gestört. Die statistischen Abweichungen liegen daher über 20% (siehe Anhang Tabelle 16).

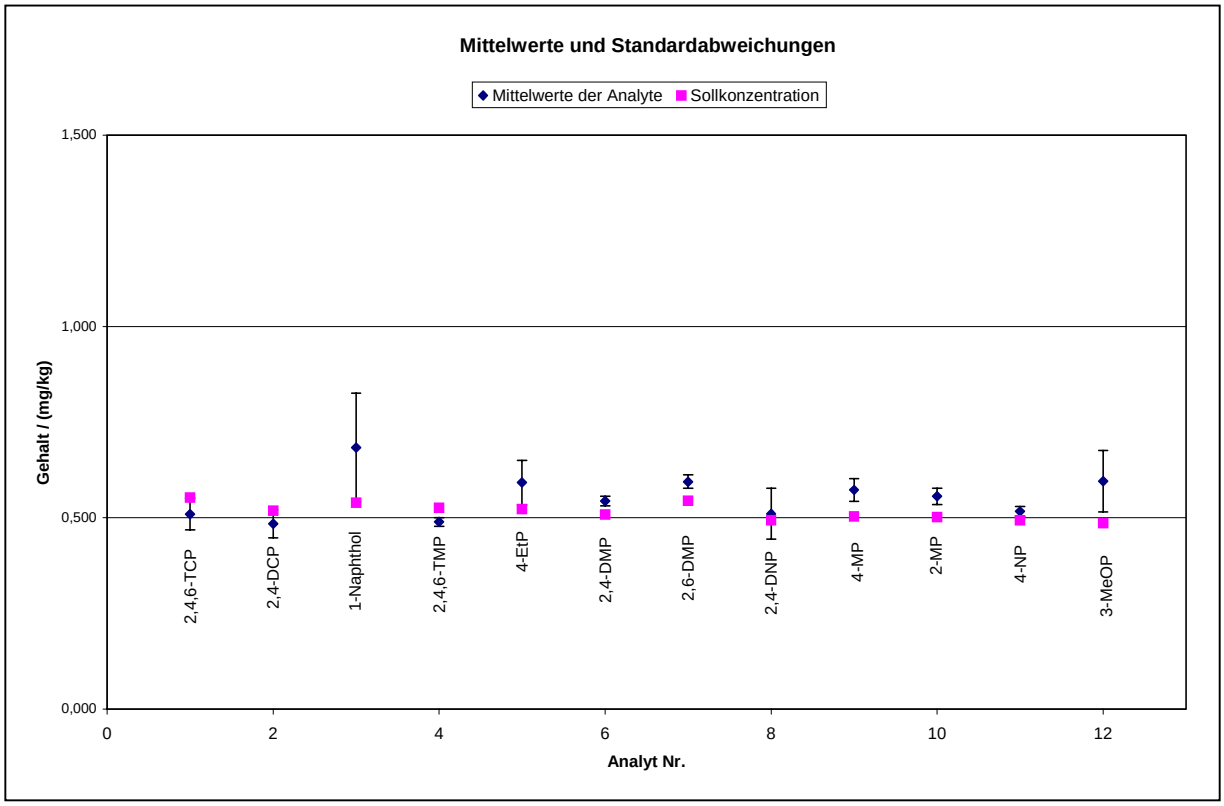

Abbildung 39: Parameter für das „Direkte-MEKC-Stacking"-Verfahren, Konzentration der Analyte ca. 0,5 mg/kg

Für die Bestimmung der Vergleichspräzision ist es erforderlich, das Verfahren in einem Ringversuch zu überprüfen. Da die Kapillarelektrophorese bisher in der Umweltanalytik kaum eingesetzt wird, wurde in dieser Arbeit ein Ringversuch zur Ermittlung der Verfahrenskenndaten durchgeführt (siehe 4.2.4.4). Danach ergeben sich für die Vergleichspräzision Werte von durchschnittlich 10% (analyt- und konzentrationsabhängig).

4.2.4.4 Durchführung eines Ringversuches

Für die im Rahmen der Validierung des Analysenverfahrens zur Bestimmung von Phenolen mit der „Direkten-MEKC-Stacking“-Technik (Kapitel 4.2.4.3) notwendige Abschätzung der Vergleichspräzision wurde ein Ringversuch organisiert und durchgeführt.

Der Ringversuch diente gleichzeitig der Prüfung, ob und mit welchen Unsicherheiten synthetisch hergestellte wäßrige Lösungen phenolischer Verbindungen als Referenzmaterial einsetzbar sind (siehe Kapitel 5). Darüber hinaus sollte der Ringversuch die Möglichkeiten der MEKC als Referenzverfahren für die Zertifizierung von Referenzmaterialien prüfen.

Dieser Ringversuch ist nach Wissen des Autors der erste, der in Deutschland mit der Kapillarelektrophorese im Bereich der Umweltanalytik durchgeführt wurde. Da die Kapillarelektrophorese von Routineanalytik-Laboratorien in der Umweltanalytik bisher kaum eingesetzt wird, bestand ein generelles Problem darin, Teilnehmer für den Ringversuch zu gewinnen, die in der Lage waren, diese Messungen durchzuführen.

Für die statistische Absicherung der Ringversuchsergebnisse ist die Teilnahme von mindestens 6 Laboratorien erforderlich. Zu Beginn des Ringversuches wurde jedoch trotz umfangreicher Werbung um Teilnehmer nur die Mindestanzahl von 6 Laboratorien erreicht.

Leider waren von den 6 teilnehmenden Laboratorien nur 3 in der Lage, Ergebnisse zu liefern (teils aus personellen Gründen, teils aus mangelnder Erfahrung mit der MEKC). Die positiven Ringversuchsergebnisse erlauben daher keine statistisch abgesicherte Bestimmung der Vergleichspräzision, sondern nur eine Abschätzung ihrer minimalen Größe.

In dieser Arbeit werden neben ausgewählten Einzelergebnissen die laborübergreifenden Statistiken präsentiert. Die vollständige Auswertung der Ergebnisse ist im Bericht zum Ringversuch BAM-OCA-027[159] dargestellt.

Für den Ringversuch wurden Proben für die Bestimmung von 12 phenolischen Verbindungen in der Matrix Wasser präpariert. Sämtliche Analyteinwaagen und Verdünnungen wurden dabei gravimetrisch durchgeführt, um die Unsicherheit bei der Herstellung der Probe zu minimieren.

Es wurden 7 Lösungen unterschiedlicher Konzentration im Bereich von 0,1 bis 2,0 mg/kg hergestellt. Fünf dieser Lösungen dienten der Kalibrierung, zwei Proben der Konzentrationsniveaus 0,5 und 1,5 mg/kg wurden als Unbekannte gekennzeichnet. Allen Gemischen wurde als interner Standard 2-Hydroxybiphenyl zugesetzt.

Die Kalibrierlösungen, die unbekannten Proben und die Lösungen der Einzelsubstanzen wurden an die Ringversuchsteilnehmer verschickt. Um die Stabilität der Lösungen für die Zeit des postalischen Probentransports zu gewährleisten, wurden sie bei Raumtemperatur gelagert und nach unterschiedlichen Zeitabständen untersucht. Es zeigte sich, daß die Proben bei Raumtemperatur maximal eine Woche gelagert werden können. Durch Abbauprozesse ist eine quantitative Auswertung der Probe zu stark fehlerbehaftet. Da die Proben durch den postalischen Versand nur ca. 1 bis 2 Tage nicht gekühlt wurden, ist die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet (siehe Kapitel 5).

Die Messungen wurden von allen teilnehmenden Laboratorien nach der erarbeiteten Standardarbeitsanweisung (STAA-BAM-I.23-001[157]) durchgeführt.

Die Tabellen 6 bis 8 listen die Werte für die Analyt-Sollkonzentrationen und die detektierten Mittelwerte der Laboratorien sowie die prozentuale Meßwertstreuung (Präzision) und die prozentuale Abweichung der Mittelwerte von der Sollkonzentration (Richtigkeit) innerhalb des jeweiligen Laboratoriums für zwei Konzentrationsniveaus auf.

Tabelle 6: Statistische Werte für Laboratorium A, N = 4 Probenmessungen

Probe	Substanzname	Sollkonzentration/ (mg/kg)	Mittelwert/ (mg/kg)	Standard-abweichung	Streuung/ (+/- %)	Abweichung/ (+/- mg/kg)	Abweichung/ (%)
Probe A	2,4,6-Trichlorphenol	1,108	1,133	0,040	3,6	0,025	2,2
	2,4-Dichlorphenol	1,041	0,988	0,044	4,5	-0,054	-5,4
	1-Naphthol	1,083	1,203	0,050	4,2	0,121	10,0
	2,4,6-Trimethylphenol	1,055	1,023	0,012	1,2	-0,032	-3,2
	4-Ethylphenol	1,048	1,154	0,052	4,5	0,106	9,2
	2,4-Dimethylphenol	1,021	1,094	0,050	4,6	0,073	6,7
	2,6-Dimethylphenol	1,092	1,197	0,072	6,1	0,104	8,7
	2,4-Dinitrophenol	0,992	0,987	0,079	8,0	-0,005	-0,5
	4-Methylphenol	1,010	1,067	0,094	8,8	0,057	5,3
	2-Methylphenol	1,008	1,025	0,098	9,6	0,017	1,7
	4-Nitrophenol	0,990	0,919	0,059	6,4	-0,071	-7,7
	3-Methoxyphenol	0,975	1,128	0,102	9,0	0,154	13,6
Probe B	2,4,6-Trichlorphenol	0,553	0,510	0,041	8,1	-0,043	-8,4
	2,4-Dichlorphenol	0,519	0,484	0,037	7,6	-0,035	-7,2
	1-Naphthol	0,540	0,684	0,142	20,8	0,144	21,1
	2,4,6-Trimethylphenol	0,526	0,489	0,011	2,3	-0,037	-7,5
	4-Ethylphenol	0,523	0,592	0,058	9,8	0,069	11,7
	2,4-Dimethylphenol	0,509	0,544	0,012	2,3	0,035	6,5
	2,6-Dimethylphenol	0,545	0,594	0,018	2,9	0,050	8,4
	2,4-Dinitrophenol	0,494	0,510	0,067	13,0	0,017	3,2
	4-Methylphenol	0,503	0,572	0,030	5,2	0,069	12,1
	2-Methylphenol	0,502	0,556	0,022	3,9	0,054	9,7
	4-Nitrophenol	0,493	0,517	0,013	2,5	0,024	4,6
	3-Methoxyphenol	0,486	0,596	0,080	13,5	0,110	18,4

Die Werte aus Laboratorium A (siehe Tabelle 6) ergeben für die Abweichung der Mittelwerte von der Sollkonzentration durchschnittlich 8% bei einer Streuung von 5%.

Tabelle 7: Statistische Werte für Laboratorium B, N = 2 Probenmessungen

Probe	Substanzname	Sollkonzentration/ (mg/kg)	Mittelwert/ (mg/kg)	Standard-abweichung	Streuung/ (+/- %)	Abweichung/ (+/- mg/kg)	Abweichung/ (%)
Probe A	2,4,6-Trichlorphenol	1,108	1,003	1 Wert	1	-0,105	-10,5
	2,4-Dichlorphenol	1,041	1,054	0,039	3,7	0,012	1,2
	1-Naphthol	1,083	1,095	0,033	3,0	0,012	1,1
	2,4,6-Trimethylphenol	1,055	1,108	0,156	14,1	0,052	4,7
	4-Ethylphenol	1,048	0,997	0,063	6,3	-0,052	-5,2
	2,4-Dimethylphenol	1,021	1,072	0,154	14,4	0,051	4,8
	2,6-Dimethylphenol	1,092	1,361	0,274	20,2	0,269	19,7
	2,4-Dinitrophenol	0,992	0,918	0,130	14,2	-0,074	-8,0
	4-Methylphenol	1,010	1,062	0,088	8,3	0,052	4,9
	2-Methylphenol	1,008	0,951	0,097	10,2	-0,057	-6,0
	4-Nitrophenol	0,990	0,829	0,290	35,0	-0,161	-19,4
	3-Methoxyphenol	0,975	0,931	0,107	11,5	-0,044	-4,7
Probe B	2,4,6-Trichlorphenol	0,553	0,506	0,040	8,0	-0,047	-9,3
	2,4-Dichlorphenol	0,519	0,487	0,190	39,1	-0,032	-6,7
	1-Naphthol	0,540	0,487	0,110	22,5	-0,053	-10,9
	2,4,6-Trimethylphenol	0,526	0,542	0,011	2,0	0,015	2,9
	4-Ethylphenol	0,523	0,451	0,017	3,8	-0,072	-15,9
	2,4-Dimethylphenol	0,509	0,505	0,054	10,8	-0,004	-0,9
	2,6-Dimethylphenol	0,545	0,629	0,292	46,5	0,084	13,4
	2,4-Dinitrophenol	0,494	0,497	0,035	7,0	0,003	0,5
	4-Methylphenol	0,503	0,519	0,008	1,5	0,015	2,9
	2-Methylphenol	0,502	0,546	0,025	4,5	0,043	7,9
	4-Nitrophenol	0,493	0,467	0,057	12,1	-0,026	-5,6
	3-Methoxyphenol	0,486	0,472	0,046	9,7	-0,014	-3,1

Die Werte aus Laboratorium B (siehe Tabelle 7) ergeben für die Abweichung der Mittelwerte von der Sollkonzentration durchschnittlich 7% bei einer Streuung von 12%. Die Werte aus Laboratorium C (siehe Tabelle 8) ergeben für die Abweichung der Mittelwerte von der Sollkonzentration durchschnittlich 5% bei einer Streuung von 6%.

Tabelle 8: Statistische Werte für Laboratorium C, N = 4 Probenmessungen

Probe	Substanzname	Sollkonzentration/ (mg/kg)	Mittelwert/ (mg/kg)	Standard-abweichung	Streuung/ (+/- %)	Abweichung/ (+/- mg/kg)	Abweichung/ (%)
Probe A	2,4,6-Trichlorphenol	1,108	1,066	0,058	5,5	-0,043	-4,0
	2,4-Dichlorphenol	1,041	1,011	0,042	4,2	-0,030	-3,0
	1-Naphthol	1,083	1,125	0,034	3,0	0,042	3,7
	2,4,6-Trimethylphenol	1,055	1,119	0,085	7,6	0,064	5,7
	4-Ethylphenol	1,048	1,101	0,057	5,2	0,053	4,8
	2,4-Dimethylphenol	1,021	1,084	0,060	5,6	0,063	5,8
	2,6-Dimethylphenol	1,092	1,177	0,091	7,7	0,084	7,1
	2,4-Dinitrophenol	0,992	0,925	0,078	8,5	-0,066	-7,2
	4-Methylphenol	1,010	1,074	0,091	8,5	0,064	5,9
	2-Methylphenol	1,008	1,077	0,092	8,6	0,069	6,4
	4-Nitrophenol	0,990	0,969	0,024	2,5	-0,022	-2,2
	3-Methoxyphenol	0,975	1,078	0,076	7,1	0,103	9,6
Probe B	2,4,6-Trichlorphenol	0,553	0,540	0,016	3,0	-0,012	-2,3
	2,4-Dichlorphenol	0,519	0,525	0,025	4,7	0,006	1,2
	1-Naphthol	0,540	0,512	0,039	7,6	-0,028	-5,5
	2,4,6-Trimethylphenol	0,526	0,591	0,038	6,4	0,065	10,9
	4-Ethylphenol	0,523	0,579	0,023	4,0	0,056	9,7
	2,4-Dimethylphenol	0,509	0,573	0,025	4,3	0,064	11,2
	2,6-Dimethylphenol	0,545	0,585	0,016	2,7	0,040	6,9
	2,4-Dinitrophenol	0,494	0,462	0,040	8,7	-0,032	-7,0
	4-Methylphenol	0,503	0,542	0,021	3,8	0,039	7,1
	2-Methylphenol	0,502	0,515	0,015	3,0	0,013	2,6
	4-Nitrophenol	0,493	0,494	0,074	15,0	0,001	0,1
	3-Methoxyphenol	0,486	0,511	0,023	4,5	0,025	4,8

Die Tabellen 6 bis 8 zeigen, daß die Messungen der verschiedenen Laboratorien für die Richtigkeit und Präzision des Analysenverfahrens Meßunsicherheiten von 5 bis 10% liefern.
Die Abweichung der Labormittelwerte vom Sollwert läßt sich graphisch in Form von sogenannten Z-Scores darstellen. Die Z-Scores geben die Abweichungen der Mittelwerte von der Sollkonzentration in Einheiten der Vergleichsstandardabweichung des Ringversuchs an. Die Vergleichsstandardabweichung steigt üblicherweise mit der Anzahl der Teilnehmer. Als obere Grenze des Toleranzbereiches ist der Wert für Z = 2 angenommen. Wegen der niedrigen Anzahl der Teilnehmer liegt der Toleranzbereich für diesen Ringversuch in sehr schmalen Grenzen. In Abbildung 40 sind die Z-Scores des Ringversuchs für Probe A (ca. 1 mg/kg) dargestellt (Abkürzungen der Substanznamen siehe Tabelle 5).

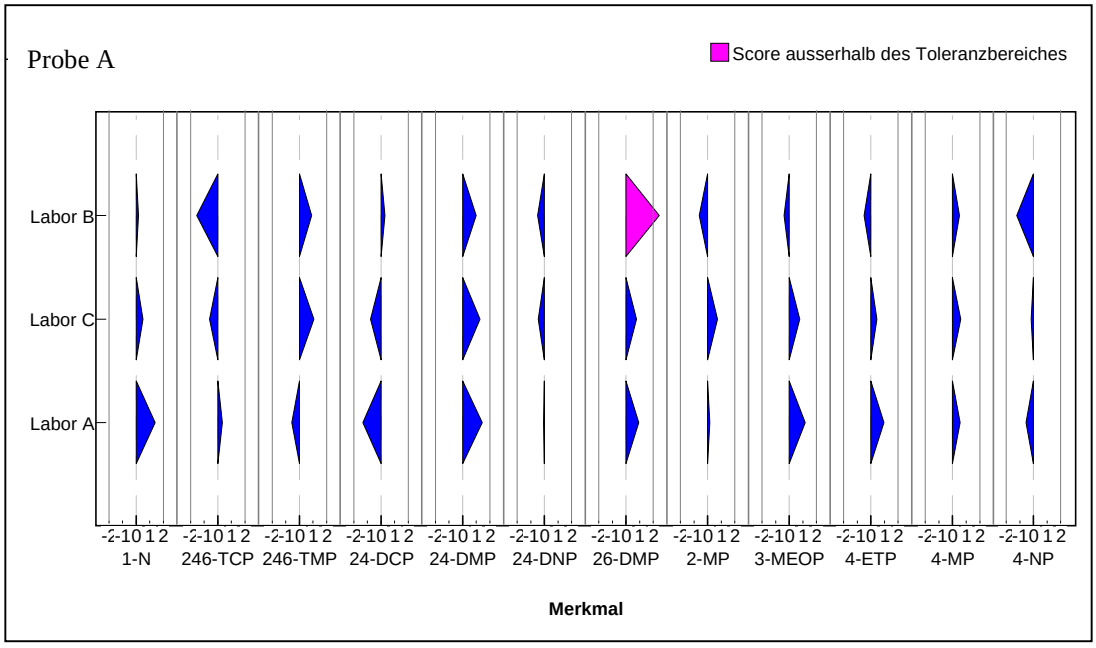

Abbildung 40: Darstellung der Z-Scores für die Probe A (ca. 1 mg/kg)

Wie aus der Abbildung hervorgeht, liegt nur ein Wert eines Labors (2,6-Dimethylphenol, Laboratorium B) knapp außerhalb des Toleranzbereiches.
Bei Probe B (ca. 0,5 mg/kg) liegen die Z-Scores für alle Analyte und Laboratorien innerhalb des Toleranzbereiches (Abbildung 41).

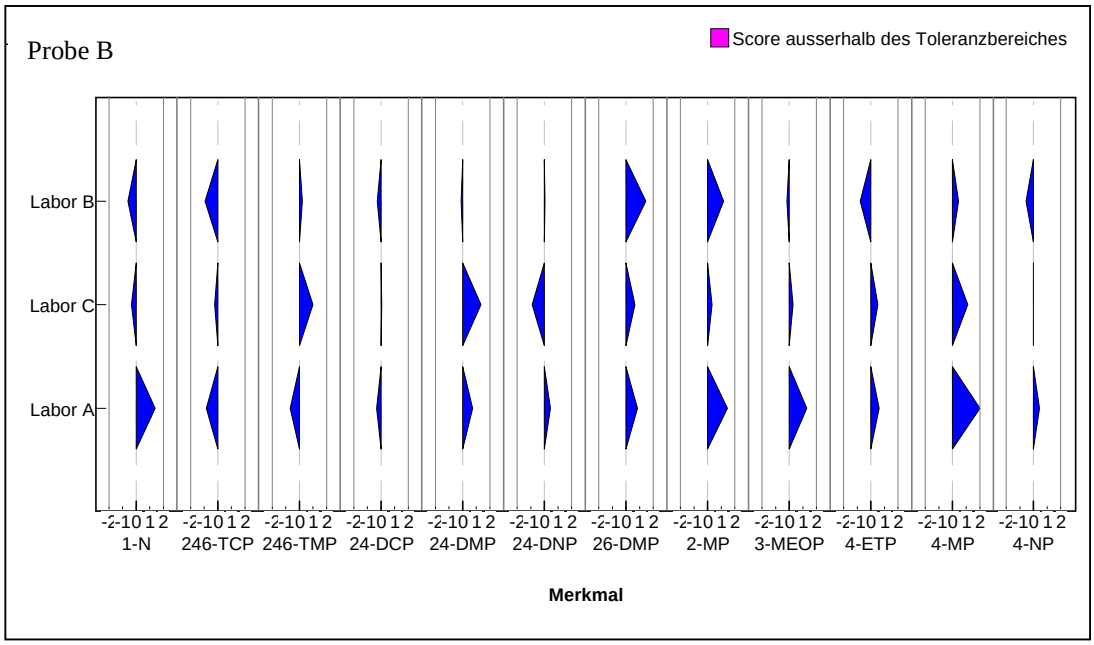

Abbildung 41: Darstellung der Z-Scores für die Probe B (ca. 0,5 mg/kg)

Um die Vergleichspräzision (näherungsweise) zu bestimmen, wurden die Werte der Laboratorien gemeinsam ausgewertet. Dazu wurden die Gesamtmittelwerte und Standardabweichungen aus den Einzelwerten aller Laboratorien bestimmt. Die Gesamtmittelwerte der Probe sind mit den zugehörigen Standardabweichungen (Berechnung für eine Stichprobe aus einer Grundgesamtheit) dargestellt.

Abbildung 42 zeigt die Gesamtmittelwerte und Standardabweichungen für alle Ringversuchsteilnehmer der Probe des Konzentrationsbereichs 1,0 mg/kg. Die Werte weichen durchschnittlich 5% von den Sollwerten ab. Die Vergleichspräzision des Verfahrens in diesem Konzentrationsbereich (entspricht der Spalte Streuung in Tabelle 17, siehe Anhang) ergibt sich damit näherungsweise zu 8%. Im unteren Konzentrationsbereich (0,5 mg/kg) liegen die Abweichungen von der Sollkonzentration bei durchschnittlich 5% und die Vergleichspräzision näherungsweise bei 11% (siehe Abbildung 43 und siehe Tabelle 18 im Anhang).

Die Auswertung des Ringversuchs zeigt, daß das entwickelte Verfahren zur Bestimmung von Phenolen mit der Kapillarelektrophorese geeignet ist, Analyte im Konzentrationsbereich von 0,05 bis 5 mg/kg mit etwa 10% Präzision und einer relativen Genauigkeit von minimal 5% unabhängig vom Meßlaboratorium zu bestimmen. Durch die hohe Genauigkeit der absoluten Gehaltsbestimmung konnte gleichzeitig der Nachweis erbracht werden, daß die entsprechend dem beschriebenen Verfahren gravimetrisch hergestellten synthetischen Proben die Voraussetzungen für den Einsatz als Referenzmaterial erfüllen (siehe Kapitel 5).

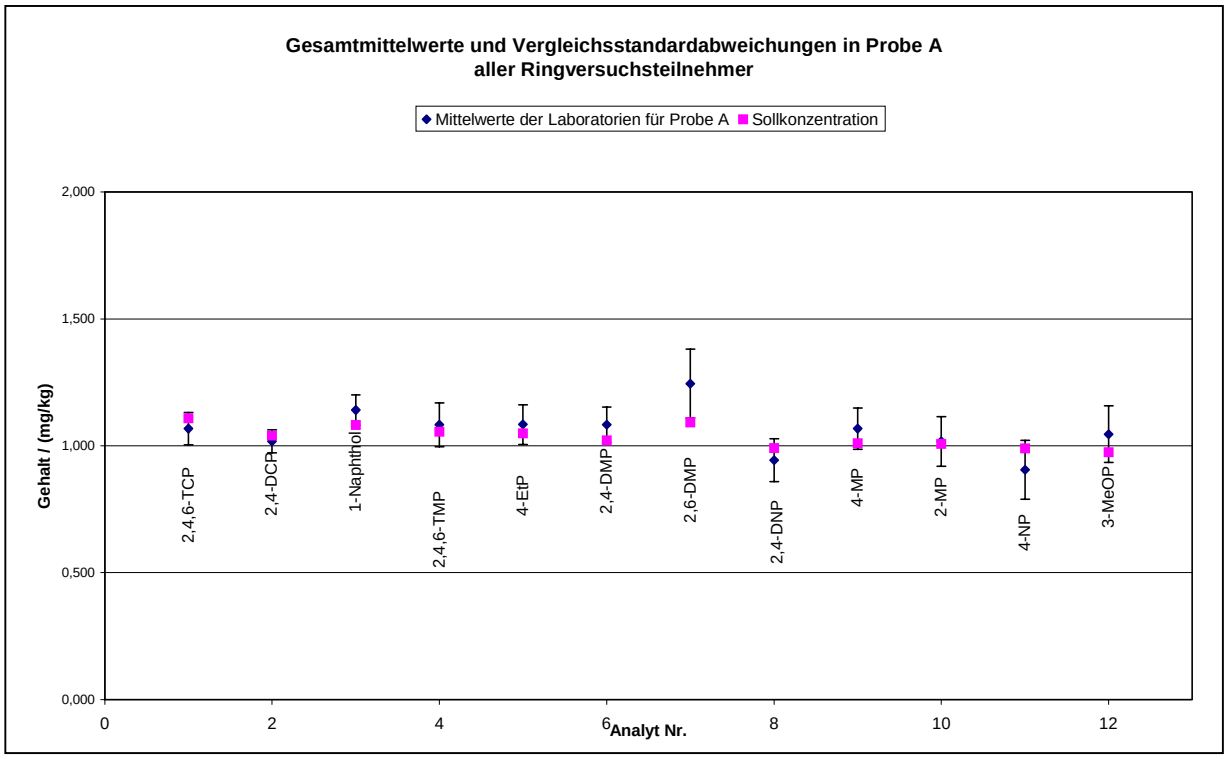

Abbildung 42: Mittelwerte und Standardabweichungen über alle Laboratorien für das „Direkte-MEKC-Stacking“-Verfahren, Konzentration der Analyte ca. 1 mg/kg

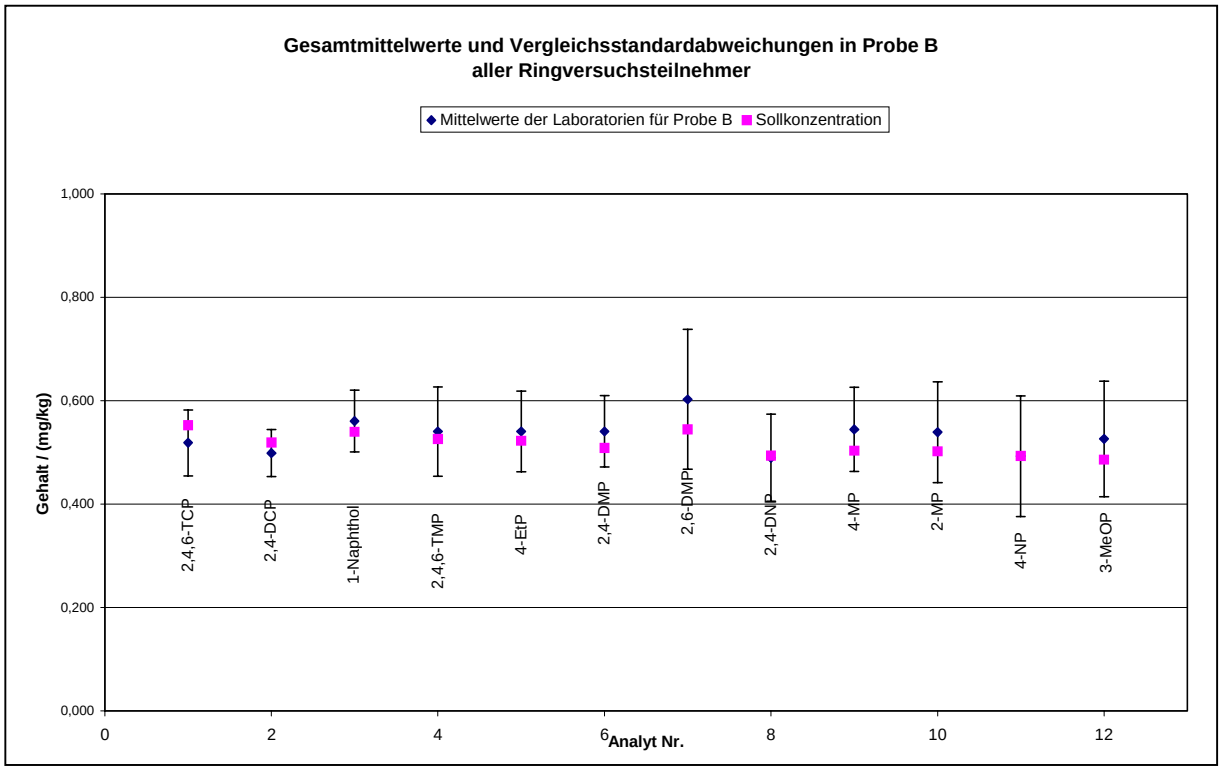

Abbildung 43: Mittelwerte und Standardabweichungen über alle Laboratorien für das „Direkte-MEKC-Stacking“-Verfahren, Konzentration der Analyte ca. 0,5 mg/kg

5 Referenzmaterialien

Referenzmaterialien dienen der Erhöhung der Zuverlässigkeit und der Verbesserung der Vergleichbarkeit analytischer Resultate[160] (z.B. für Qualitätssicherungssysteme (EN 45001, ISO 25) und Laboratorium-Akkreditierung). Die Anforderungen, die an Referenzmaterialien bezüglich ihrer qualitativen und quantitativen Zusammensetzung gestellt werden, richten sich nach ihrem Verwendungszweck. Ideale Referenzmaterialien der Umweltanalytik sind den natürlichen Proben möglichst ähnlich, bezüglich Matrix und Inhaltsstoffen charakterisiert und in den relevanten Parametern zertifiziert.

Referenzmaterialien müssen homogen und unter definierten Lagerungsbedingungen innerhalb eines definierten Zeitraums stabil sein, so daß sie bei Verwendung geeigneter Analysenverfahren die Bestimmung der Analyte innerhalb definierter Ergebnisunsicherheiten gestatten. Diese Materialien haben aus Gründen der Vergleichbarkeit von Analysenergebnissen und deren Akzeptanz große wirtschaftliche Bedeutung auf nationaler und internationaler Ebene[161].

Die Verfahrensentwicklung zur Bestimmung von Phenolen auf Basis unabhängiger Analysentechniken, die den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildet, setzt voraus, daß Materialien eingesetzt werden, deren Zusammensetzung genau bekannt ist. Das ist am besten durch gravimetrisch hergestellte Lösungen realisierbar. Sind diese Lösungen bezüglich Stabilität, Homogenität und Vertrauensbereich der Analytgehalte charakterisiert, lassen sie sich als laboratoriuminterne Referenzmaterialien einsetzen. Erst im darauffolgenden Schritt können Matrix-Referenzmaterialien eingesetzt werden, um die Qualitätssicherung der Probenvorbereitung mit einzuschließen.

Bei analytisch relevanten organischen Spurenkomponenten in Referenzmaterialien ist die Stabilität im Vergleich zu den anorganischen Komponenten gering. Die Analyte können z.B. durch thermische Zersetzung sowie oxidative, photochemische und mikrobielle Prozesse zerstört werden. Bei der Herstellung von Referenzmaterialien für die Phenolanalytik muß daher gewährleistet sein, daß die Analytkonzentration in einem definierten Zeitraum stabil bleibt und nicht durch Zersetzung oder Abbau verändert wird.

Die Homogenität ist bei flüssigen Referenzmaterialien im Gegensatz zu festen wegen der guten Durchmischbarkeit der Matrix gewährleistet, solange das Löslichkeitsprodukt der

Analyte nicht überschritten wird und die Substanzen in Konzentrationsbereichen vorliegen, in denen Wandadsorptionseffekte an Gefäßwände vernachlässigt werden können.

Es wurden Referenzmaterialien bestehend aus 12 phenolischen Verbindungen in der Matrix Wasser für den laborinternen Einsatz in 2 Konzentrationsniveaus durch gravimetrische Verdünnung hergestellt. Die Stabilität der Materialien wurden über den Zeitraum von 2 Monaten mit dem „Direkten-MEKC-Stacking“-Verfahren der Kapillarelektrophorese geprüft. Werden die Referenzmaterialien bei Raumtemperatur gelagert, zersetzen sie sich innerhalb einer Woche, so daß die Abweichungen der bestimmten Gehalte von den Sollkonzentrationen und die zugehörigen Streuungen im Bereich von 20 bis 30% liegen. Damit liegt die Abweichung deutlich über der durchschnittlichen Verfahrensunsicherheit (ca. 10%, siehe Kapitel 4.2.4.3). Die Meßwerte lassen auch eine Zeitabhängigkeit bedingt durch den Alterungsprozeß erkennen.

Die Messungen von gekühlt (–4°C) gelagerten Proben (Messung bei Herstellung, nach 3 Tagen, nach 30 Tagen und nach 60 Tagen) über den Zeitraum von 2 Monaten ergaben, daß die Materialien im Bereich der Meßunsicherheit stabil sind.

Die Werte der einzelnen Meßreihen lassen keine Tendenzen bezüglich der Mittelwerte und Standardabweichungen erkennen, die auf Zersetzung der Analyte schließen lassen. Als Beispiel ist in Abbildung 44 der Gehalt an 2,4,6-Trimethylphenol in Abhängigkeit von der Alterung dargestellt. Die Abweichungen von der Sollkonzentration liegen im Bereich der Toleranzgrenzen (+/- doppelte Wiederholpräzision).

Bei der Analyse vergleichbarer älterer Lösungen (Alter ca. 18 Monate, Lagerung ebenfalls bei –4°C) konnte ebenfalls keine Zersetzung der Proben beobachtet werden, so daß die Stabilität der Referenzmaterialien auf den Zeitraum von ca. 2 Jahren abgeschätzt wird.

An den vier Meßtagen über den Zeitraum von 60 Tagen wurden die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt. Die Werte zeigen keine signifikante Tendenz bezüglich eines Alterungsprozesses (vgl. Abbildung 44), so daß die Werte gemeinsam statistisch erfaßt wurden. Die Mittelwerte wurden daher zusammengefaßt und als Gesamtmittelwerte dargestellt.

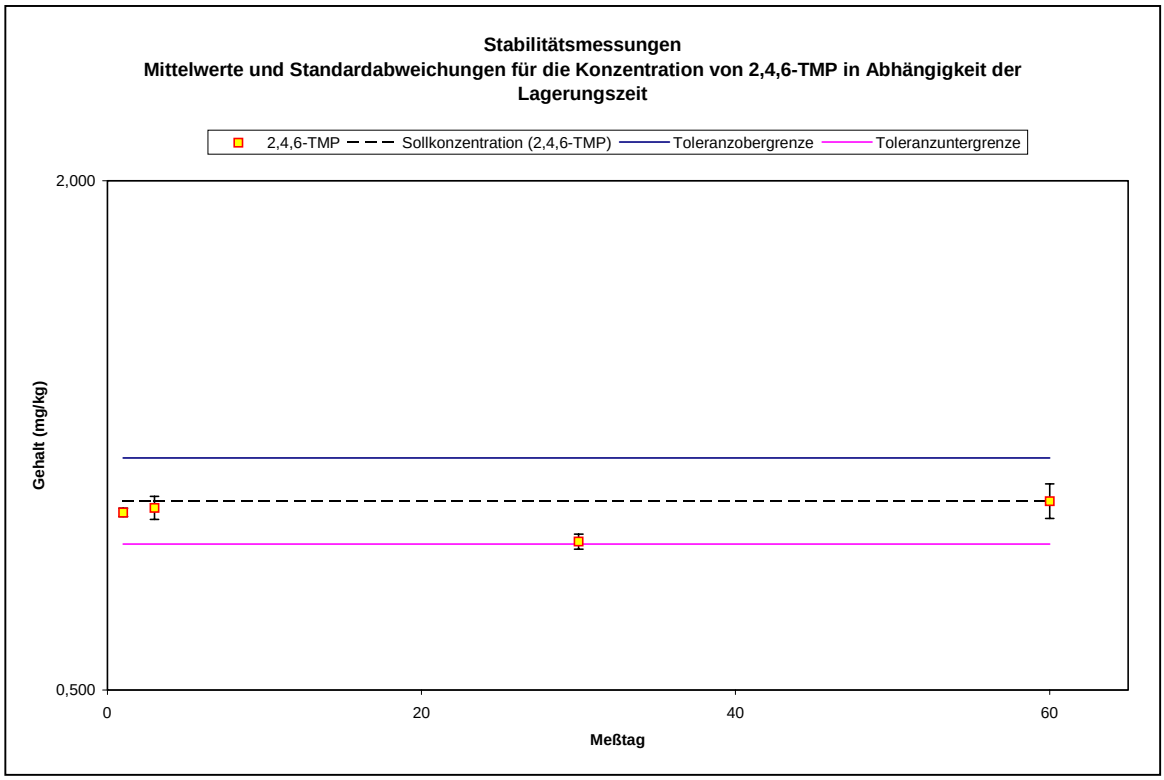

Abbildung 44: Stabilität von 2,4,6-Trimethylphenol in Abhängigkeit vom Alter des Referenzmaterials

Abbildung 45 und Abbildung 46 zeigen die Werte für die Analyt-Sollkonzentrationen und die detektierten Gesamtmittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen der Stabilitätsmessungen (Zeitraum 60 Tage) für die Referenzmaterialien. Die Gesamtmittelwerte ergeben sich aus den Mittelwerten für die verschiedenen Meßtage (Alterung). Jede Meßreihe wurde gemäß der erarbeiteten Standardarbeitsanweisung[157] (siehe auch Kapitel 4.2.4.3) durchgeführt. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Menge an Analyt in Menge der Probenlösung. In Tabelle 19 und Tabelle 20 im Anhang sind die zu den Abbildungen gehörigen Zahlenwerte sowie die prozentuale Meßwertstreuung (Präzision) und die prozentuale Abweichung der Mittelwerte von der Sollkonzentration (Richtigkeit) aufgelistet.

Abbildung 45 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen für die Stabilität des Referenzmaterials im Konzentrationsbereich von 1,0 mg/kg. Die Werte weichen durchschnittlich um 6% von den Sollwerten ab und streuen dabei um 4%. Damit liegen die statistischen Abweichungen der Werte des Referenzmaterials im Bereich der Wiederholpräzision des Analysenverfahrens.

Signifikant ist auch hier wieder die durch Querstörungen verfälschte Auswertung der Analyte 1-Naphthol und 2-Methoxyphenol, wodurch die größten Abweichungen entstehen.

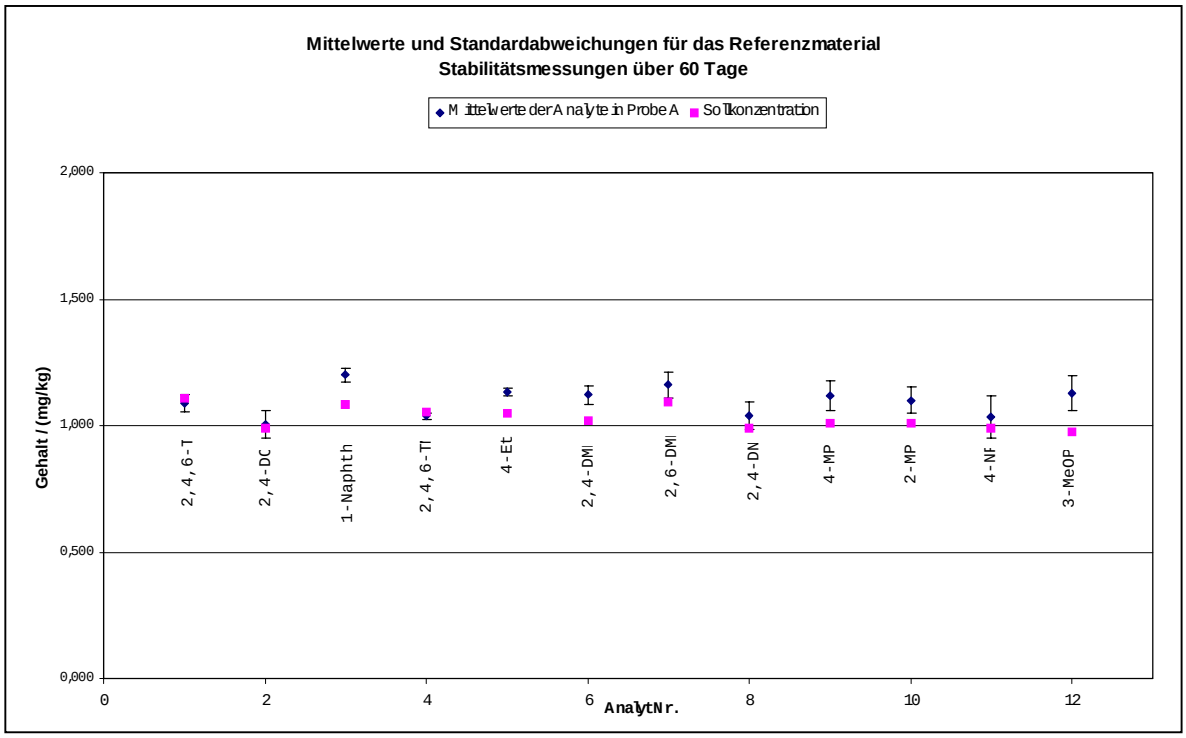

Abbildung 45: Mittelwerte und Standardabweichungen für das Referenzmaterial, Konzentration der Analyte ca. 1 mg/kg

Auch beim Referenzmaterial im unteren Konzentrationsbereich (0,5 mg/kg) liegen die Abweichungen von der Sollkonzentration und die Streuungen jeweils durchschnittlich bei 5%. Da dieses Konzentrationsniveau in der Größenordnung der Bestimmungsgrenze liegt, ist der Einfluß von Störsignalen des Untergrundes noch stärker. Daher betragen die Abweichungen für 1-Naphthol und 3-Methoxyphenol von der Sollkonzentration mehr als 15% (siehe Abbildung 46).

Um die Probenvorbereitung und Extraktion in die Verfahrensvalidierung mit einzubeziehen, werden feste Matrix-Referenzmaterialien mit bekannter Analytkonzentration benötigt. Dazu wurde unbelastetes Bodenmaterial mit verschiedenen Phenolen dotiert.

Bei ausführlichen Untersuchungen[162] wurde festgestellt, daß sich die Analyte innerhalb kurzer Zeit (ca. 1 Woche) nach Dotierung des Materials sowohl bei Raumtemperatur als auch bei Kühlung in andere Phenolderivate umwandelten.

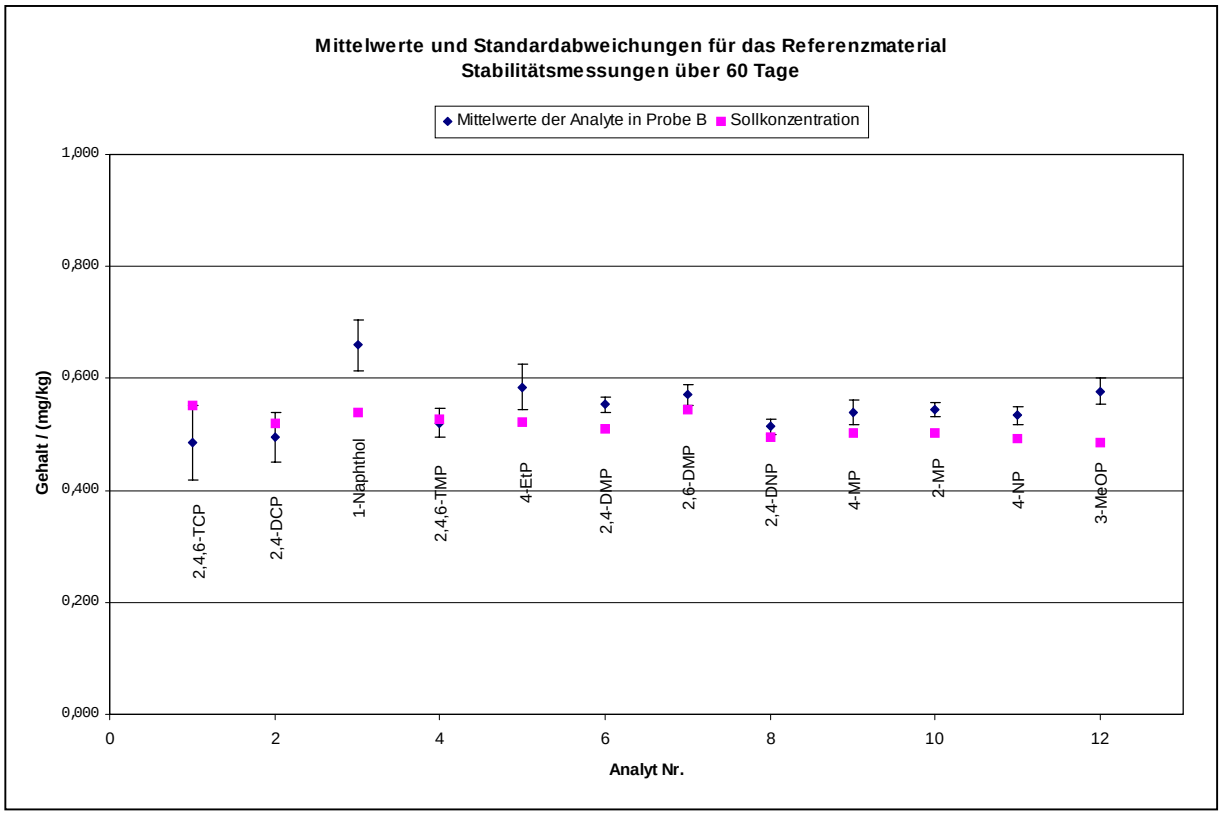

Abbildung 46: Mittelwerte und Standardabweichungen für das Referenzmaterial, Konzentration der Analyte ca. 0,5 mg/kg

Die Abbauprozesse wurden am Beispiel der Dotierung eines unbelasteten Bodens mit 2,4,6-Trimethylphenol untersucht. Die Identifizierung der Zersetzungsprodukte erfolgte mit den Verfahren der GC-MS und HPLC-MS. Die GC-MS-Massenspektren wurden mit Hilfe einer Spektrenbibliothek zugeordnet. Als Abbauprodukte von 2,4,6-Trimethylphenol konnten die Produkte einer Dimerisierung (symmetrisches Dimer: 4,4´-Methylenbis-2,6-dimethylphenol, Molekülmasse: 256 Dalton; asymmetrisches Dimer: α-4-(4-Hydroxy-2,3,5-trimethylphenyl)-mesitol, Molekülmasse 270 Dalton) und das Produkt einer Oxydation (4-Methoxymethyl-2,6-dimethylphenol, Molekülmasse: 152 Dalton) zugeordnet werden.

Die Massen der Molekülionen konnten mit dem HPLC-MS-Verfahren (nach Umkehrphasentrennung) bestätigt werden.

Die Zersetzung schreitet über den Zeitraum von mehreren Monaten fort. Da die Stabilität des Materials nicht gewährleistet ist, können feste synthetische Matrix-Referenzmaterialien der ausgewählten Analyten nicht hergestellt werden.

Die entwickelten Verfahren und die Erfahrungen bei der Herstellung des synthetischen flüssigen Materials bilden die Grundlage für die Entwicklung und Zertifizierung fester natürlicher Matrix-Referenzmaterialien.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Bestimmung von Phenolen, unter besonderer Berücksichtigung der Alkylphenole, in umweltrelevanten Matrices voneinander unabhängige Analysenverfahren auf Basis der Techniken der HPLC-MS, HPLC-NMR, GC-MS und Kapillarelektrophorese entwickelt und eingesetzt. Jedes Verfahren hat spezifische Vor- und Nachteile bezüglich Einsatzbereich, Meßunsicherheit, Selektivität, Empfindlichkeit sowie Zeit- und Kostenaufwand. Der Einsatzbereich der Verfahren wird durch Anfälligkeit gegenüber Matrixeinflüssen, detektierbare Substanzpalette, Routinefähigkeit sowie Eignung zur qualitativen und quantitativen Analytik bestimmt. Erst durch den kombinierten Einsatz verschiedener Verfahren kann eine umfassende analytische Aussage für die Charakterisierung von Matrixproben erzielt werden.
Die Kenndaten der entwickelten Analysenverfahren sind in Tabelle 9 gegenübergestellt.

Tabelle 9: Kenndaten der entwickelten Analysenverfahren

	GC-LRMS	GC-HRMS	CE	HPLC-MS	HPLC-NMR
Bestimmungsgrenzen	1 µg/L	1 µg/L	100 µg/L	50-500 µg/L	5×10^4 µg/L
Selektivität	hoch	sehr hoch	gering	mittel	sehr hoch
Einsatzbereich	sehr hoch	sehr hoch	hoch	mittel	gering
Zeitaufwand/ Stunden	1	1	< 1	1,5	4
Kosten	mittel	hoch	gering	hoch	sehr hoch
Meßunsicherheit	1-5%	1-5%	5-10%	5-10%	10-20%

Das GC-LRMS-Verfahren ist wegen seiner hohen Empfindlichkeit und Selektivität für die Bestimmung einer breiten Palette von Phenolen, die sich in ihren physikochemischen Eigenschaften stark unterscheiden, sowohl als quantitatives Standardverfahren als auch als wichtige Screeningmethode zur Analyse unbekannter Proben einsetzbar. Das Verfahren wurde validiert und an realen Proben geprüft. Nach Derivatisierung mit MSTFA gelingt die Trennung, Zuordnung und Bestimmung der meisten phenolischen Substanzen. Die direkte Gehaltsbestimmung der Analyte im Bereich der internationalen Grenzwerte ist oft ohne vorherige Aufkonzentrierung bei der Probenvorbereitung möglich (siehe Tabelle 9).
Das GC-HRMS-Verfahren hat die höchste Selektivität und erlaubt die Bestimmung aller untersuchten phenolischen Verbindungen, bedarf jedoch eines hohen Kostenaufwandes. Damit ist es ein leistungsstarkes Referenzverfahren für die Phenolanalytik.

Mit der Kapillarelektrophorese wurde das „Direkte-MEKC-Stacking“-Verfahren zur Anreicherung neutraler und ionischer Analyte entwickelt und validiert. Die Analyte werden dabei durch unterschiedliche Aufenthaltswahrscheinlichkeiten in der micellaren und wäßrigen Phase des MEKC-Elektrolyten getrennt. Die interne Anreicherung (Stacking) der Analyte in der Kapillare erfolgt ohne Feldumkehr während der Analyse. Anhand von Oberflächenspannungsmessungen am MEKC-Elektrolyten wurde festgestellt, daß die Micellbildung im Elektrolyt nicht so abrupt wie in rein wäßrigen Systemen bei der Kritischen Micellaren Konzentration erfolgt. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Konzentration an Tensidmonomeren in der wäßrigen Phase wegen des Anteils an organischen Lösungsmittel-Additiven (insgesamt 15% v/v) erhöht ist. Dadurch werden die kapillarelektrophoretischen Trenneigenschaften des MEKC-Elektrolyten beeinflußt, so daß die Trennung der untersuchten phenolischen Verbindungen gelingt. Die Verfahrenskenngrößen wurden in einem Ringversuch mit einem laborinternen Referenzmaterial abgesichert. Dabei wurde verifiziert, daß das „Direkte-MEKC-Stacking“-Verfahren auch im externen Laboratoriumsvergleich Ergebnisse mit Unsicherheiten kleiner 10% in Konzentrationsbereichen von 500 bis 5000 µg/L liefert. Der obere Bereich internationaler Grenzwerte kann mit den Bestimmungsgrenzen des Verfahrens (ca. 100 µg/L) erreicht werden (siehe Tabelle 9). Der untere Bereich wird durch Aufkonzentrierung der Analyte bei der Probenvorbereitung detektierbar. Das auf der Kapillarelektrophorese basierende Verfahren ist wegen seiner Schnelligkeit, Umweltfreundlichkeit und geringen Kosten als Standardverfahren für die Routineanwendung geeignet.

Die HPLC-MS-Verfahren (ESI-MS und APCI-MS) ermöglichen ebenfalls die Analyse einer breiten Palette phenolischer Verbindungen. Bei der ESI-MS wurden die Analyte durch Einsatz alkalischer HPLC-Eluenten in ionischer Form in das ESI-Interface überführt, so daß auch Alkylphenole detektiert werden konnten. Zur Kopplung an die HPLC wurde dazu eine spezielle Polymersäule eingesetzt, die bei dem alkalischen pH-Wert des Eluenten stabil ist. Auch mit der APCI-MS gelang durch Optimierung der APCI-Parameter die Detektion von Alkylphenolen. Die Kopplung an die HPLC wurde auf Normalphasen- und Umkehrphasen-Säulen mit verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt. Die HPLC-MS kann als unabhängiges Vergleichs- und Referenzverfahren für die GC-MS und Kapillarelektrophorese genutzt werden. Die Analyte können sowohl in hydrophiler als auch in hydrophober Matrix detektiert werden. Die Bestimmungsgrenzen liegen im Bereich von 50 bis 500 µg/L (siehe

Tabelle 9). Die internationalen Grenzwerte der EU und EPA für Einzelverbindungen in Wasser (0,5 bis 10 µg/L) und Boden (0,3 bis 10 mg/kg) können nach Aufkonzentrierung bei der Probenvorbereitung abgedeckt werden. Das Erreichen der Grenzwerte in Boden ist dabei stark von der eingesetzten Extraktionstechnik abhängig.

Bei Fragestellungen zur Analytstruktur hat die HPLC-NMR die höchste Aussagekraft. Zur Bestimmung von Phenolen wurde ein Analysenverfahren unter Anpassung der HPLC-Parameter an die Anforderungen der NMR-Detektion (z.B. Einsatz deuterierter Lösungsmittel, hohes Dosiervolumen) entwickelt. Das Verfahren setzt eine hohe Konzentration der Analyte voraus, die Bestimmungsgrenzen liegen bei 5×10^4 µg/L (siehe Tabelle 9). Mit der HPLC-NMR können Strukturisomere identifiziert werden, deren Zuordnung weder mit der UV-vis- noch mit der massenspektrometrischen Detektion möglich ist (z.B. Alkylphenole mit mehr als 3 C-Atomen in den Alkylketten).

Die entwickelten Analysenverfahren wurden in Kombination mit Extraktionstechniken an realen Matrixproben geprüft. Für die Matrices Boden und Holz zeigte sich die Beschleunigte Lösemittelextraktion (ASE) als die leistungsstärkste Technik und liefert unter der Voraussetzung, daß die Analyte thermisch stabil sind, die effizientesten Extraktionsergebnisse. Die Extrakte werden im Vergleich zu der Soxhletextraktion bei wesentlich geringerem Lösungsmittelverbrauch und extrem verkürzten Analysenzeiten (ca. 15 min gegenüber mehreren Stunden) gewonnen und sind dabei ca. 10 mal konzentrierter.

Die laborinternen Referenzmaterialien lassen sich nach der erarbeiteten Standardarbeitsanweisung durch gravimetrische Verdünnung herstellen. Ihre Homogenität, Reproduzierbarkeit und Stabilität (mindestens 2 Monate) wurde nachgewiesen. Die Referenzmaterialien können zur laborinternen Qualitätssicherung, zur Kalibrierung, zur Methodenbewertung und zum Laboratoriumsvergleich (Ringversuche, Eignungsprüfungen, Zulassungstests, Akkreditierung) eingesetzt werden. Die Entwicklung, Herstellung und Zertifizierung dringend benötigter natürlicher Matrix-Referenzmaterialien ist abhängig von der Stabilität der phenolischen Inhaltsstoffe.

Mit den entwickelten unabhängigen Analysenverfahren und laborinternen Referenzmaterialien sind die Voraussetzungen für die umfangreiche Charakterisierung realer Proben geschaffen worden. Auf Grundlage dieser Arbeit soll ein Normverfahren entwickelt werden.

7 Anhang

Tabelle 10: GC-LRMS, Konzentrationsniveau: 2 µg/L, statistische Werte für Abbildung 30, N = 7 Probenmessungen

Substanzname	Sollkonzentration/ (mg/L)	Mittelwert/ (mg/L)	Standard-abweichung	Streuung/ (+/- %)	Abweichung/ (+/- mg/L)	Abweichung/ (%)
Phenol-TMS	2,708	2,767	0,163	5,9	0,059	2,2
2-Methylphenol-TMS	2,063	2,111	0,089	4,2	0,049	2,4
3-Methylphenol-TMS	2,378	2,332	0,093	4,0	-0,046	-1,9
4-Methylphenol-TMS	2,700	2,698	0,089	3,3	-0,002	-0,1
2-Ethylphenol-TMS	2,400	2,272	0,230	10,1	-0,128	-5,4
3-Ethylphenol-TMS	2,850	2,886	0,081	2,8	0,036	1,2
4-Ethylphenol-TMS	2,831	2,874	0,274	9,5	0,043	1,5
2,5-Dimethylphenol-TMS	2,490	2,600	0,160	6,2	0,110	4,4
3,5-Dimethylphenol-TMS	2,880	2,885	0,069	2,4	0,005	0,2
2,4-Dimethylphenol-TMS	2,944	3,039	0,208	6,9	0,096	3,2
2,6-Dimethylphenol-TMS	2,951	2,996	0,286	9,5	0,045	1,5
2,3-Dimethylphenol-TMS	2,640	2,946	1,596	54,2	0,306	11,6
3,4-Dimethylphenol-TMS	2,408	2,395	0,134	5,6	-0,012	-0,5
2-Methoxyphenol-TMS	2,910	3,005	0,296	9,9	0,095	3,3
3-Methoxyphenol-TMS	2,321	2,352	0,099	4,2	0,031	1,3
4-Methoxyphenol-TMS	2,033	2,364	0,671	28,4	0,332	16,3
2-Isopropylphenol-TMS	2,100	2,516	1,298	51,6	0,416	19,8
2,3,5-Trimethylphenol-TMS	2,220	2,303	0,211	9,2	0,083	3,7
2,4,6-Trimethylphenol-TMS	2,325	2,488	0,326	13,1	0,163	7,0
2,3,6-Trimethylphenol-TMS	2,561	2,714	0,376	13,8	0,153	6,0
3,4,5-Trimethylphenol-TMS	2,693	2,703	0,099	3,7	0,011	0,4
5-Indanol-TMS	2,066	2,065	0,106	5,2	-0,001	-0,1
2,6-Dimethoxyphenol-TMS	2,663	2,656	0,061	2,3	-0,007	-0,2
2,4,6-Trichlorphenol-TMS	3,668	3,681	0,106	2,9	0,014	0,4
2,3,6-Trichlorphenol-TMS	1,931	1,889	0,098	5,2	-0,042	-2,2
1-Naphthol-TMS	2,591	2,725	0,142	5,2	0,134	5,2
2-Naphthol-TMS	2,498	2,916	0,784	26,9	0,418	16,8
2,2´-Dihydroxydiphenyl-TMS	2,258	2,569	0,734	28,6	0,312	13,8
Pentachlorphenol-TMS	3,675	3,634	0,198	5,4	-0,041	-1,1

Tabelle 11: GC-HRMS, Konzentrationsniveau: 2 µg/L, statistische Werte für Abbildung 31, N = 4 Probenmessungen

Substanzname	Sollkonzentration/ (mg/L)	Mittelwert/ (mg/L)	Standard-abweichung	Streuung/ (+/- %)	Abweichung/ (+/- mg/L)	Abweichung/ (%)
Phenol-TMS	2,708	2,480	0,343	13,8	-0,228	-8,4
2-Methylphenol-TMS	2,064	2,138	0,143	6,7	0,074	3,6
3-Methylphenol-TMS	2,376	2,386	0,123	5,2	0,010	0,4
4-Methylphenol-TMS	2,700	2,312	0,465	20,1	-0,389	-14,4
2-Ethylphenol-TMS	2,400	2,313	0,099	4,3	-0,087	-3,6
3-Ethylphenol-TMS	2,850	2,671	0,296	11,1	-0,179	-6,3
4-Ethylphenol-TMS	2,832	2,812	0,192	6,8	-0,020	-0,7
2,5-Dimethylphenol-TMS	2,490	2,349	0,328	14,0	-0,142	-5,7
3,5-Dimethylphenol-TMS	2,880	2,923	0,281	9,6	0,043	1,5
2,4-Dimethylphenol-TMS	2,946	2,910	0,152	5,2	-0,036	-1,2
2,6-Dimethylphenol-TMS	2,952	2,967	0,256	8,6	0,015	0,5
2,3-Dimethylphenol-TMS	2,640	2,413	0,449	18,6	-0,227	-8,6
3,4-Dimethylphenol-TMS	2,406	2,399	0,076	3,2	-0,007	-0,3
2-Methoxyphenol-TMS	2,910	3,330	0,224	6,7	0,420	14,4
3-Methoxyphenol-TMS	2,322	2,277	0,558	24,5	-0,046	-2,0
4-Methoxyphenol-TMS	2,034	2,031	0,109	5,4	-0,003	-0,2
2-Isopropylphenol-TMS	2,100	2,127	0,095	4,5	0,027	1,3
2,3,5-Trimethylphenol-TMS	2,220	2,370	0,136	5,7	0,150	6,7
2,4,6-Trimethylphenol-TMS	2,328	2,452	0,284	11,6	0,124	5,3
2,3,6-Trimethylphenol-TMS	2,562	2,649	0,177	6,7	0,087	3,4

Substanzname	Sollkonzentration/ (mg/L)	Mittelwert/ (mg/L)	Standard-abweichung	Streuung/ (+/- %)	Abweichung/ (+/- mg/L)	Abweichung/ (%)
3,4,5-Trimethylphenol-TMS	2,694	2,659	0,106	4,0	-0,035	-1,3
5-Indanol-TMS	2,064	2,040	0,084	4,1	-0,024	-1,2
2,6-Dimethoxyphenol-TMS	2,664	2,578	0,225	8,7	-0,086	-3,2
2,4,6-Trichlorphenol-TMS	3,666	3,236	0,165	5,1	-0,430	-11,7
2,3,6-Trichlorphenol-TMS	1,932	1,945	0,194	10,0	0,013	0,7
1-Naphthol-TMS	2,592	2,927	0,245	8,4	0,335	12,9
2-Naphthol-TMS	2,496	2,790	0,203	7,3	0,294	11,8
2,2´-Dihydroxydiphenyl-TMS	2,256	1,988	0,138	7,0	-0,268	-11,9
Pentachlorphenol-TMS	3,678	4,032	0,475	11,8	0,354	9,6

Tabelle 12: GC-LRMS, Konzentrationsniveau: 0,8 µg/L, statistische Werte für Abbildung 32, N = 7 Probenmessungen

Substanzname	Sollkonzentration/ (mg/L)	Mittelwert/ (mg/L)	Standard-abweichung	Streuung/ (+/- %)	Abweichung/ (+/- mg/L)	Abweichung/ (%)
Phenol-TMS	0,903	1,086	0,118	10,9	0,183	20,3
2-Methylphenol-TMS	0,688	0,631	0,070	11,0	-0,056	-8,2
3-Methylphenol-TMS	0,793	0,713	0,057	7,9	-0,080	-10,1
4-Methylphenol-TMS	0,900	0,819	0,090	10,9	-0,081	-9,0
2-Ethylphenol-TMS	0,800	0,827	0,434	52,5	0,027	3,3
3-Ethylphenol-TMS	0,950	0,846	0,077	9,1	-0,104	-11,0
4-Ethylphenol-TMS	0,944	0,861	0,116	13,5	-0,083	-8,8
2,5-Dimethylphenol-TMS	0,830	0,777	0,119	15,3	-0,053	-6,4
3,5-Dimethylphenol-TMS	0,960	0,863	0,091	10,5	-0,097	-10,1
2,4-Dimethylphenol-TMS	0,981	0,880	0,128	14,5	-0,101	-10,3
2,6-Dimethylphenol-TMS	0,984	0,898	0,121	13,5	-0,086	-8,8
2,3-Dimethylphenol-TMS	0,880	2,493	1,163	46,7	1,613	183,4
3,4-Dimethylphenol-TMS	0,803	1,200	0,429	35,8	0,397	49,5
2-Methoxyphenol-TMS	0,970	0,894	0,177	19,8	-0,076	-7,8
3-Methoxyphenol-TMS	0,774	0,686	0,053	7,7	-0,088	-11,4
4-Methoxyphenol-TMS	0,678	1,121	1,118	99,7	0,443	65,4
2-Isopropylphenol-TMS	0,700	1,101	1,078	97,9	0,401	57,3
2,3,5-Trimethylphenol-TMS	0,740	0,663	0,100	15,0	-0,077	-10,4
2,4,6-Trimethylphenol-TMS	0,775	0,697	0,130	18,7	-0,078	-10,1
2,3,6-Trimethylphenol-TMS	0,854	0,754	0,138	18,3	-0,100	-11,7
3,4,5-Trimethylphenol-TMS	0,898	0,787	0,084	10,6	-0,110	-12,3
5-Indanol-TMS	0,689	0,597	0,073	12,3	-0,092	-13,4
2,6-Dimethoxyphenol-TMS	0,888	0,815	0,073	9,0	-0,073	-8,2
2,4,6-Trichlorphenol-TMS	1,223	1,070	0,074	6,9	-0,152	-12,5
2,3,6-Trichlorphenol-TMS	0,644	0,399	0,171	42,9	-0,245	-38,1
1-Naphthol-TMS	0,864	0,805	0,120	14,9	-0,059	-6,8
2-Naphthol-TMS	0,833	0,802	0,164	20,5	-0,030	-3,6
2,2´-Dihydroxydiphenyl-TMS	0,753	0,672	0,198	29,4	-0,081	-10,8
Pentachlorphenol-TMS	1,225	1,324	0,330	25,0	0,099	8,0

Tabelle 13: GC-HRMS, Konzentrationsniveau: 0,8 µg/L, statistische Werte für Abbildung 33, N = 4 Probenmessungen

Substanzname	Sollkonzentration/ (mg/L)	Mittelwert/ (mg/L)	Standard-abweichung	Streuung/ (+/- %)	Abweichung/ (+/- mg/L)	Abweichung/ (%)
Phenol-TMS	0,903	0,562	0,481	85,6	-0,340	-37,7
2-Methylphenol-TMS	0,688	0,648	0,257	39,7	-0,040	-5,8
3-Methylphenol-TMS	0,793	0,719	0,244	33,9	-0,074	-9,3
4-Methylphenol-TMS	0,900	1,187	0,222	18,7	0,287	31,9
2-Ethylphenol-TMS	0,800	0,852	0,006	0,7	0,052	6,5
3-Ethylphenol-TMS	0,950	0,871	0,079	9,1	-0,079	-8,3
4-Ethylphenol-TMS	0,944	0,842	0,112	13,3	-0,101	-10,7
2,5-Dimethylphenol-TMS	0,830	1,018	0,182	17,9	0,188	22,6
3,5-Dimethylphenol-TMS	0,960	0,878	0,120	13,6	-0,082	-8,6
2,4-Dimethylphenol-TMS	0,981	0,986	0,106	10,7	0,005	0,5
2,6-Dimethylphenol-TMS	0,984	0,982	0,103	10,5	-0,001	-0,1

Substanzname	Sollkonzentration/ (mg/L)	Mittelwert/ (mg/L)	Standard-abweichung	Streuung/ (+/- %)	Abweichung/ (+/- mg/L)	Abweichung/ (%)
2,3-Dimethylphenol-TMS	0,880	0,692	0,183	26,4	-0,188	-21,3
3,4-Dimethylphenol-TMS	0,803	0,895	0,046	5,2	0,093	11,5
2-Methoxyphenol-TMS	0,970	1,001	0,139	13,9	0,031	3,2
3-Methoxyphenol-TMS	0,774	0,749	0,126	16,9	-0,025	-3,2
4-Methoxyphenol-TMS	0,678	0,768	0,114	14,9	0,091	13,4
2-Isopropylphenol-TMS	0,700	0,591	0,130	22,0	-0,109	-15,6
2,3,5-Trimethylphenol-TMS	0,740	0,623	0,157	25,1	-0,117	-15,8
2,4,6-Trimethylphenol-TMS	0,775	0,745	0,133	17,9	-0,030	-3,9
2,3,6-Trimethylphenol-TMS	0,854	0,892	0,070	7,8	0,038	4,5
3,4,5-Trimethylphenol-TMS	0,898	0,927	0,146	15,7	0,029	3,2
5-Indanol-TMS	0,689	0,766	0,068	8,9	0,077	11,1
2,6-Dimethoxyphenol-TMS	0,888	1,076	0,142	13,2	0,189	21,3
2,4,6-Trichlorphenol-TMS	1,223	1,120	0,197	17,6	-0,102	-8,4
2,3,6-Trichlorphenol-TMS	0,644	0,726	0,210	29,0	0,082	12,7
1-Naphthol-TMS	0,864	0,817	0,151	18,4	-0,047	-5,4
2-Naphthol-TMS	0,833	0,771	0,251	32,6	-0,062	-7,4
2,2´-Dihydroxydiphenyl-TMS	0,753	0,884	0,117	13,2	0,132	17,5
Pentachlorphenol-TMS	1,225	1,123	0,109	9,7	-0,102	-8,3

Tabelle 14: GC-HRMS, Konzentrationsniveau: 50 µg/L, statistische Werte für Abbildung 34, N = 11 Probenmessungen

Substanzname	Sollkonzentration/ (mg/L)	Mittelwert/ (mg/L)	Standard-abweichung	Streuung/ (+/- %)	Abweichung/ (+/- mg/L)	Abweichung/ (%)
Phenol-TMS	91,333	93,265	3,322	3,5	1,932	2,1
2-Methylphenol-TMS	36,667	38,759	3,324	8,6	2,093	5,7
3-Methylphenol-TMS	42,267	45,473	2,961	6,5	3,207	7,6
4-Methylphenol-TMS	48,000	50,334	3,838	7,6	2,334	4,9
2-Ethylphenol-TMS	42,667	44,979	3,593	8,0	2,312	5,4
3-Ethylphenol-TMS	50,667	52,050	2,553	4,9	1,383	2,7
4-Ethylphenol-TMS	50,333	52,400	2,967	5,7	2,066	4,1
2,5-Dimethylphenol-TMS	44,267	46,025	3,551	7,7	1,759	4,0
3,5-Dimethylphenol-TMS	51,200	53,899	4,271	7,9	2,699	5,3
2,4-Dimethylphenol-TMS	52,333	54,252	2,669	4,9	1,918	3,7
2,6-Dimethylphenol-TMS	52,467	54,978	2,907	5,3	2,511	4,8
2,3-Dimethylphenol-TMS	46,933	49,302	2,424	4,9	2,368	5,0
3,4-Dimethylphenol-TMS	42,800	43,598	2,028	4,7	0,798	1,9
2-Methoxyphenol-TMS	51,733	54,036	3,301	6,1	2,303	4,5
3-Methoxyphenol-TMS	41,267	42,306	2,725	6,4	1,039	2,5
4-Methoxyphenol-TMS	36,133	37,263	4,092	11,0	1,130	3,1
2-Isopropylphenol-TMS	37,333	40,096	2,080	5,2	2,763	7,4
2,3,5-Trimethylphenol-TMS	39,467	41,416	3,018	7,3	1,949	4,9
2,4,6-Trimethylphenol-TMS	41,333	42,392	2,710	6,4	1,059	2,6
2,3,6-Trimethylphenol-TMS	45,533	46,875	2,680	5,7	1,342	2,9
3,4,5-Trimethylphenol-TMS	47,867	49,277	2,315	4,7	1,410	2,9
5-Indanol-TMS	36,733	37,043	1,012	2,7	0,310	0,8
2,6-Dimethoxyphenol-TMS	47,333	47,887	3,115	6,5	0,554	1,2
2,4,6-Trichlorphenol-TMS	45,333	46,406	2,611	5,6	1,072	2,4
2,3,6-Trichlorphenol-TMS	34,333	36,389	3,041	8,4	2,056	6,0
1-Naphthol-TMS	46,067	46,302	3,119	6,7	0,235	0,5
2-Naphthol-TMS	44,400	43,972	3,241	7,4	-0,428	-1,0
2,2´-Dihydroxydiphenyl-TMS	40,133	40,829	2,190	5,4	0,696	1,7
Pentachlorphenol-TMS	65,333	67,059	3,765	5,6	1,725	2,6

Tabelle 15: „Direktes-MEKC-Stacking“, Konzentrationsniveau: 1 mg/kg, statistische Werte für Abbildung 38, N = 4 Probenmessungen

Substanzname	Sollkonzentration/ (mg/kg)	Mittelwert/ (mg/kg)	Standard-abweichung	Streuung/ (+/- %)	Abweichung/ (+/- mg/kg)	Abweichung/ (%)
2,4,6-Trichlorphenol	1,108	1,133	0,040	3,6	0,025	2,2
2,4-Dichlorphenol	1,041	0,988	0,044	4,5	-0,054	-5,4
1-Naphthol	1,083	1,203	0,050	4,2	0,121	10,0
2,4,6-Trimethylphenol	1,055	1,023	0,012	1,2	-0,032	-3,2
4-Ethylphenol	1,048	1,154	0,052	4,5	0,106	9,2
2,4-Dimethylphenol	1,021	1,094	0,050	4,6	0,073	6,7
2,6-Dimethylphenol	1,092	1,197	0,072	6,1	0,104	8,7
2,4-Dinitrophenol	0,992	0,987	0,079	8,0	-0,005	-0,5
4-Methylphenol	1,010	1,067	0,094	8,8	0,057	5,3
2-Methylphenol	1,008	1,025	0,098	9,6	0,017	1,7
4-Nitrophenol	0,990	0,919	0,059	6,4	-0,071	-7,7
3-Methoxyphenol	0,975	1,128	0,102	9,0	0,154	13,6

Tabelle 16: „Direktes-MEKC-Stacking“, Konzentrationsniveau: 0,5 mg/kg, statistische Werte für Abbildung 39, N = 4 Probenmessungen

Substanzname	Sollkonzentration/ (mg/kg)	Mittelwert/ (mg/kg)	Standard-abweichung	Streuung/ (+/- %)	Abweichung/ (+/- mg/kg)	Abweichung/ (%)
2,4,6-Trichlorphenol	0,553	0,510	0,041	8,1	-0,043	-8,4
2,4-Dichlorphenol	0,519	0,484	0,037	7,6	-0,035	-7,2
1-Naphthol	0,540	0,684	0,142	20,8	0,144	21,1
2,4,6-Trimethylphenol	0,526	0,489	0,011	2,3	-0,037	-7,5
4-Ethylphenol	0,523	0,592	0,058	9,8	0,069	11,7
2,4-Dimethylphenol	0,509	0,544	0,012	2,3	0,035	6,5
2,6-Dimethylphenol	0,545	0,594	0,018	2,9	0,050	8,4
2,4-Dinitrophenol	0,494	0,510	0,067	13,0	0,017	3,2
4-Methylphenol	0,503	0,572	0,030	5,2	0,069	12,1
2-Methylphenol	0,502	0,556	0,022	3,9	0,054	9,7
4-Nitrophenol	0,493	0,517	0,013	2,5	0,024	4,6
3-Methoxyphenol	0,486	0,596	0,080	13,5	0,110	18,4

Tabelle 17: Ringversuch Kapillarelektrophorese („Direktes-MEKC-Stacking“), Konzentrationsniveau: 1 mg/kg, statistische Werte für Abbildung 42 (alle Laboratorien), Vergleichspräzision entspricht der Streuung

Substanzname	Sollkonzentration/ (mg/kg)	Mittelwert/ (mg/kg)	Standard-abweichung	Streuung/ (+/- %)	Abweichung/ (+/- mg/kg)	Abweichung/ (%)
2,4,6-Trichlorphenol	1,108	1,067	0,064	6,0	-0,041	-3,8
2,4-Dichlorphenol	1,041	1,017	0,045	4,5	-0,024	-2,3
1-Naphthol	1,083	1,141	0,060	5,2	0,058	5,1
2,4,6-Trimethylphenol	1,055	1,083	0,086	8,0	0,028	2,6
4-Ethylphenol	1,048	1,084	0,078	7,2	0,035	3,3
2,4-Dimethylphenol	1,021	1,083	0,069	6,4	0,062	5,7
2,6-Dimethylphenol	1,092	1,245	0,135	10,9	0,152	12,2
2,4-Dinitrophenol	0,992	0,943	0,084	8,9	-0,048	-5,1
4-Methylphenol	1,010	1,067	0,081	7,6	0,058	5,4
2-Methylphenol	1,008	1,017	0,097	9,6	0,010	1,0
4-Nitrophenol	0,990	0,906	0,116	12,9	-0,085	-9,3
3-Methoxyphenol	0,975	1,046	0,112	10,7	0,071	6,8

Tabelle 18: Ringversuch Kapillarelektrophorese („Direktes-MEKC-Stacking“), Konzentrationsniveau: 0,5 mg/kg, statistische Werte für Abbildung 43 (alle Laboratorien), Vergleichspräzision entspricht der Streuung

Substanzname	Sollkonzentration/ (mg/kg)	Mittelwert/ (mg/kg)	Standard-abweichung	Streuung/ (+/- %)	Abweichung/ (+/- mg/kg)	Abweichung/ (%)
2,4,6-Trichlorphenol	0,553	0,518	0,033	6,4	-0,034	-6,6
2,4-Dichlorphenol	0,519	0,499	0,071	14,3	-0,020	-4,1
1-Naphthol	0,540	0,561	0,132	23,5	0,021	3,7
2,4,6-Trimethylphenol	0,526	0,540	0,053	9,8	0,014	2,7
4-Ethylphenol	0,523	0,541	0,068	12,5	0,018	3,3
2,4-Dimethylphenol	0,509	0,541	0,036	6,7	0,032	5,9
2,6-Dimethylphenol	0,545	0,603	0,100	16,6	0,058	9,6
2,4-Dinitrophenol	0,494	0,490	0,052	10,6	-0,004	-0,9
4-Methylphenol	0,503	0,544	0,030	5,6	0,041	7,5
2-Methylphenol	0,502	0,539	0,026	4,9	0,037	6,8
4-Nitrophenol	0,493	0,493	0,051	10,4	-0,001	-0,1
3-Methoxyphenol	0,486	0,526	0,073	13,9	0,040	7,6

Tabelle 19: Referenzmaterial, Konzentrationsniveau: 1 mg/kg, statistische Werte für Abbildung 45, N = 4 Meßreihen über 2 Monate

Substanzname	Sollkonzentration/ (mg/kg)	Mittelwert/ (mg/kg)	Standard-abweichung	Streuung/ (+/- %)	Abweichung/ (+/- mg/kg)	Abweichung/ (%)
2,4,6-Trichlorphenol	1,108	1,088	0,033	3,0	-0,020	-1,9
2,4-Dichlorphenol	0,992	1,007	0,054	5,4	0,015	1,5
1-Naphthol	1,083	1,201	0,028	2,3	0,118	9,8
2,4,6-Trimethylphenol	1,055	1,038	0,014	1,3	-0,018	-1,7
4-Ethylphenol	1,048	1,133	0,015	1,3	0,084	7,5
2,4-Dimethylphenol	1,021	1,122	0,037	3,3	0,101	9,0
2,6-Dimethylphenol	1,092	1,161	0,050	4,3	0,068	5,9
2,4-Dinitrophenol	0,992	1,039	0,056	5,3	0,048	4,6
4-Methylphenol	1,010	1,119	0,060	5,4	0,109	9,7
2-Methylphenol	1,008	1,101	0,054	4,9	0,093	8,5
4-Nitrophenol	0,990	1,036	0,084	8,1	0,046	4,4
3-Methoxyphenol	0,975	1,129	0,069	6,1	0,155	13,7

Tabelle 20: Referenzmaterial, Konzentrationsniveau: 0,5 mg/kg, statistische Werte für Abbildung 46, N = 4 Meßreihen über 2 Monate

Substanzname	Sollkonzentration/ (mg/kg)	Mittelwert/ (mg/kg)	Standard-abweichung	Streuung/ (+/- %)	Abweichung/ (+/- mg/kg)	Abweichung/ (%)
2,4,6-Trichlorphenol	0,553	0,486	0,067	13,9	-0,067	-13,8
2,4-Dichlorphenol	0,519	0,495	0,044	8,9	-0,024	-4,8
1-Naphthol	0,540	0,660	0,045	6,9	0,120	18,2
2,4,6-Trimethylphenol	0,526	0,521	0,025	4,8	-0,005	-1,0
4-Ethylphenol	0,523	0,585	0,041	7,1	0,062	10,6
2,4-Dimethylphenol	0,509	0,554	0,013	2,4	0,045	8,1
2,6-Dimethylphenol	0,545	0,571	0,018	3,2	0,026	4,6
2,4-Dinitrophenol	0,494	0,514	0,013	2,5	0,020	3,9
4-Methylphenol	0,503	0,540	0,022	4,0	0,037	6,8
2-Methylphenol	0,502	0,545	0,013	2,3	0,042	7,8
4-Nitrophenol	0,493	0,534	0,016	3,0	0,040	7,6
3-Methoxyphenol	0,486	0,577	0,023	4,0	0,091	15,8

8 Literaturverzeichnis

[1] R. Koch, B.O. Wagner, Umweltchemikalien, Physikalisch- Chemische Daten, Toxizitäten, Grenz- und Richtwerte, Umweltverhalten, VCH-Weinheim (1989)
[2] W.-Y. Shiu, K.-C. Ma, D. Varhaníczková, D. Mckay, „Chlorophenols and Alkylphenols: A Review and Correlation of Environmentally Relevant Properties and Fate in an Evaluative Environment“, *Chemosphere* **29 (6)** (1994) 1155-1224
[3] R.C. Dougherty, „Phenols and Chlorophenols“, in: J.W. Kiceniuk, S. Ray (Editors) Analysis of contaminants in edible aquatic resources, VCH Publishers, New York (1994) 453-466
[4] H. Fiege, „Cresols and Xylenols“, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5th Edition, **Vol. A8** (1987) 25-59
[5] F. Schweinsberg, D. Zöltzer, G. Volland, „Pentachlorphenol in Holz, Staub und Innenraumluft“, VDI Berichte Nr. 1060 (1993)
[6] G. Bartelt, H.G. Buge, W. Görner, T. Win, „Determination of chlorine and pentachlorophenol in wood“, *Fresenius J. Anal. Chem.* **360** (1998) 433-434
[7] „Quantitativer und qualitativer Nachweis von Pentachlorphenol in Holz“, *Holz Roh-Werkstoff* **31** (1973) 106-110
[8] G. Rosner, „Gesundheitsgefährdung durch PCP und PCP-spezifische Dioxine“, *Staub Reinhaltung der Luft* **47** (1987) 199-203
[9] H. Jobst, „Chlorphenole und Nonylphenole in Klärschlämmen. Teil 1: Vorkommen in Klärschlämmen westdeutscher Kläranlagen aus den Jahren 1987 bis 1989“, *Acta hydrochim. hydrobiol.* **23** (1995) 1: 20-25
[10] Presseinformation des Umweltbundesamtes Nr. 34 (1997)
[11] B. Bennett, B.F.J. Bowler, S.R. Larter, „Determination of C_0-C_3 Alkylphenols in Crude Oils and Waters“, *Anal. Chem.* **68** (1996) 3697-3702
[12] H. Lenke, G. Daun, D. Bryniok, H.-J. Knackmuß, „Biologische Sanierung von Rüstungsaltlasten“, *Spektrum der Wissenschaften* **10** (1993) 106-108
[13] G. Koss, A. Lommel, I. Ollroge, O. Tesseraux, R. Haas, A.D. Kappos, „Zur Toxikologie der Nitrotoluole und weiterer Nitroaromaten aus rüstungsbedingten Altlasten“, *Bundesgesundhbl.* **12** (1989) 527-536
[14] U. Dornberger, T. Welsch, „Explosivstoffe in Altlasten der Rüstungsproduktion“, *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.* **7** (1995) 302-316
[15] J.E. Walker, D.L. Kaplan, „Biological degradation of explosives and chemical agents“, *Biodegradation* **3** (1992) 369-385
[16] G. Fuchs, M. Magdy el Said, U. Altenschmidt, J. Koch, A. Lack, R. Brackmann, C. Lochmeyer, B. Oswald, „Biochemistry of anaerobic biodegradation of aromatic compounds“, in: C. Ratledge (Editor), „Biochemistry of Microbial Degradation“, Kluwer Academic Publishers, Dorndrecht (1994)
[17] D.E. Rickert, „Metabolism of Nitroaromatic Compounds“, *Drug Metabolism Reviews* **18** (1987) 23-53
[18] F.P.M. Karg, G. Koss, „Untersuchungen zur Umweltchemie, Kontaminationserkundung und -bewertung“, *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.* **5** (1993) 182-189
[19] J. Yinon, „Toxicity and Metabolism of Explosives“, CRC-Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston (1990)

[20] R.P. Schwarzenbach, R. Stierli, B.R. Folsom, J. Zeyer, „Compound Properties Relevant for Assessing the Environmental Partitioning of Nitrophenols“, *Environ. Sci. Technol.* **22** (1988) 83-92
[21] T. Hagiwara, S. Motomizu, „Contribution of Substituent Groups to the Extractability of Phenols and Benzoic Acids“, *Anal. Sci.* **7** (1991) 129-135
[22] M.J. Citra, „Estimating the pK_a of phenols, carboxylic acids and alcohols from semi-empirical quantum chemical methods“, *Chemosphere* **38** (1999) 191-206
[23] A. Dobos, „Electrochemical Data, A Handbook for Electrochemists in Industry and Universities“, Akadémiai Kiadó, Budapest (1975)
[24] A. Di Corcia, S. Marchese, R. Samperi, „Selective determination of phenols in water by a two-trap tandem extraction system followed by liquid chromatography“, *J. Chromatogr.* **642** (1993) 175-184
[25] T. Hanai, K. Koizumi, T. Kinoshita, R. Arora, F. Ahmed, „Prediction of pK_α values of phenolic and nitrogen- containing compounds by computational chemical analysis compared to those measured by liquid chromatography“, *J. Chomatogr. A* **762** (1997) 55-61
[26] Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser, Abwasser, Schlammuntersuchung und Bodenbeschaffenheit, Beuth Verlag Berlin
[27] ISO/TC 190/3/7, DIN ISO 14154, Bestimmung von ausgewählten Chlorphenolen in Böden: Gaschromatographisches Verfahren (1998)
[28] ISO/TC 190/SC 3/WG6 N50, Soil Quality - Determination of Phenols - Gas Chromatographic Method with Flame Ionisation Detection, DIN Berlin (1995)
[29] EU- Direktive 80/778 CEE
[30] Phenolindex: DIN 38709 H-16-3
[31] EPA Method 8040, Phenols (1986)
[32] EPA Test Method, Phenols - Method 604 (1982)
[33] H. Waldmann, „Die gaschromatographische Bestimmung von Phenolen in Wasser - Entwicklungen in der Normungsarbeit“, *GIT Spezial Chromatographie* **2** (1993) 58-59
[34] DIN EN 12673, Entwurf - Wassserbeschaffenheit: Gaschromatographische Bestimmung einiger ausgewählter Chlorphenole in Wasser (1997)
[35] DIN 38407-15 (1996): Gemeinsam erfaßbare Stoffgruppen in Wasser (GC-ECD), DIN EN 12673 (1997): Chlorphenole in Wasser (GC-ECD)
[36] D. Puig, D. Barceló, „Comparison of different sorbent materials for on-line liquid-solid extraction followed by liquid chromatographic determination of priority phenolic compounds in environmental waters“, *J. Chromatogr. A* **733** (1996) 371-381
[37] M.A. Crespín, E. Ballesteros, M. Gallego, M. Valcárcel, „Trace enrichment of phenols by on-line solid-phase extraction and gas chromatographic determination“, *J. Chromatogr. A* **757** (1997) 165-172
[38] G. Schwedt, „Festphasenextraktion als Probenvorbereitung für die Chromatographie“, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **44** (1996) Supplement S63-S68
[39] R. Eisert, K. Levsen, „Festphasenmikroextraktion organischer Spuren aus wäßrigen Umweltproben“, *GIT Fachz. Lab.* **6** (1996) 582-588
[40] K.D. Buchholz, J. Pawliszyn, „Optimization of Solid-Phase Microextraction Conditions for Determination of Phenols“, *Anal. Chem.* **66** (1994) 160-167
[41] V. Lopez-Avila, R. Young, R. Kim, „Accelerated Extraction of Organic Pollutants Using Microwave Energy“, *J. Chromatogr. Sci.* **33** (1995) 481-484

[42] E. Pocurull, M. Calull, R.M. Marcé, F. Borrull, „Determination of phenolic compounds at low µg l^{-1} levels by various solid-phase extractions followed by liquid chromatography and diode-array detection“, *J. Chromatogr. A* **719** (1996) 105-112
[43] EPA Methode 600/4-81-055: „Iterim Methods for the Sampling and Analysis of Priority Pollutants in Sediments and Fish Tissue“
[44] E. Bosch, P. Bou, H. Allemann, M. Rosés, „Retention of Ionizable Compounds on HPLC. pH Scale in Methanol – Water and pK and pH Values of Buffers“, *Anal. Chem.* **68** (1996) 3651-3657
[45] X. Li, J.S. Fritz, „Novel additives for the separation of organic compounds by high-performance liquid chromatography“, *J. Chromatogr. A* **728** (1996) 235-247
[46] G. Marko-Varga, D. Barceló, „Liquid Chromatographic Retention and Separation of Phenols and Related Aromatic Compounds on Reversed Phase Columns“, *Chromatographia* **34 (3/4)** (1992) 146-154
[47] C. Baiocchi, M.A. Roggero, D. Giacosa, E. Marengo, „HPLC Separation and Determination of Complex Mixtures of Phenolic Compounds on Different Stationary Phases. An Efficient General Screening Method for the Presence of Phenols in Water“, *J. Chromatogr. Sci.* **33** (1995) 338-347
[48] E.R. Brouwer, I. Liska, R.B. Geerdink, P.C.M. Frintrop, W.H. Mulder, H. Lingeman, U.A.T. Brinkman, „Determination of Polar Pollutants in Water Using an On-Line Liquid Chromatographic Preconcentration System“, *Chromatographia* **32 (9/10)** (1991) 445-452
[49] V. Coquart, M.-C. Hennion, „Trace-level determination of polar phenolic compounds in aqueous samples by high-performance liquid chromatography and on-line preconcentration on porous graphitic carbon“, *J. Chromatogr.* **600** (1992) 195-201
[50] J. Czuczwa, C. Leuenberger, J. Tremp, W. Giger, M. Ahel, „Determination of trace levels of phenol and cresols in rain by contiuous liquid-liquid extraction and high-performance liquid chromatography“, *J. Chromatogr.* **403** (1987) 233-241
[51] D. Barceló, aus: Environmental Analysis: Techniques, Applications and Quality Assurance, G.A. Marko-Varga, „Liquid chromatographic determination of phenols and substituted derivatives in water samples“, Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo (1993)
[52] D. Puig, D. Barceló, „Comparative study of on-line solid phase extraction followed by UV and electrochemical detection in liquid chromatography for the determination of priority phenols in river water samples“, *Anal. Chim. Acta* **311** (1995) 63-69
[53] B. Paterson, C.E. Cowie, P.E. Jackson, „Determination of phenols in environmental waters using liquid chromatography with electrochemical detection“, *J. Chromatogr. A* **731** (1996) 95-102
[54] J. Ruana, I. Urbe, F. Borrull, „Determination of phenols at the ng/l level in drinking and river waters by liquid chromatography with UV and electrochemical detection“, *J. Chromatogr. A* **655** (1993) 217-226
[55] R. Salzer, U. Mayer, W. Engewald, T. Welsch, J. Dib, „Direkte HPLC-FTIR-Kopplung zur Identifizierung von Phenolderivaten“, *Z. Chem.* **29 (6)** (1989) 215-216
[56] T.C. Schmidt, M. Petersmann, L. Kaminski, E. von Löw, G. Stork, „Analysis of aminobenzoic acids in waste water from a former ammunition plant with HPLC and combined diode array and fluorescence detection“, *Fresenius J. Anal. Chem.* **357** (1997) 121-126

[57] W.M.A. Niessen, J. van der Greef, „Liquid Chromatography - Mass Spectrometry“, Chromatographic Science Series Volume 58, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong (1992)
[58] M. Linscheid, „Die Kopplung von Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie“, *CLB* **41** (1990) 125-133
[59] K. Levsen, „Mass Spectrometry in Environmental Organic Analysis“, *Org. Mass Spectrom.* **23** (1988) 406-415
[60] J.F. Garcia, D. Barceló, „An Overview of LC-MS Interfacing Systems with Selected Applications“, *HRC* **16** (1993) 633-641
[61] P. Kebarle, L. Tang, „From Ions in Solution to Ions in the Gas Phase – The Mechanism of Electrospray Mass Spectrometry“, *Anal. Chem.* **65** (1993) 972A-986A
[62] A. Preiß, U. Levin, L Wennrich, M. Findeisen, J. Efer, „Analysis of nitrophenols and other nitroaromatic compounds in ammunition wastewater by high-field proton nuclear magnetic resonance (^{1}H-NMR) spectroscopy and chromatographic methods“, *Fresenius J. Anal. Chem.* **357** (1997) 676-683
[63] A. Preiß, K. Levsen, E. Humpfer, M. Spraul, „Application of high-field proton nuclear magnetic resonance (^{1}H-NMR) spectroscopy for the analysis of explosives and related compounds in groundwater samples - a comparison with the high-performance liquid chromatography (HPLC) method“, *Fresenius J. Anal. Chem.* **356** (1996) 445-451
[64] H.C. Dorn, „^{1}H-NMR: A New Detector for Liquid Chromatography“, *Anal. Chem.* **56** (1984) 747A-758A
[65] E. Bayer, K. Albert, M. Nieder, E. Gromm, T. Keller, „On-Line Coupling of High-Performance Liquid Chromatography and Nuclear Magnetic Resonance“, *J. Chromatogr.* **186** (1979) 497-507
[66] S.A. Korhammer, A. Bernreuther, „Hyphenation of high-performance liquid chromatography (HPLC) and other chromatographic techniques (SFC, GPC, GC, CE) with nuclear magnetic resonance (NMR): A review“, *Fresenius J. Anal. Chem.* **354** (1996) 131-135
[67] U.G. Sidelmann, A.W. Nicholls, P.E. Meadows, J.W. Gilbert, J.C. Lindon, I.D. Wilson, J.K. Nicholson, „High performance liquid chromatography directly coupled to ^{19}F and ^{1}H NMR for the analysis of mixtures of isomeric ester glucuronide conjugates of trifluoromethylbenzoic acids“, *J. Chromatogr. A* **728** (1996) 377-385
[68] M. Spraul, M. Hofmann, P. Dvortsak, J.K. Nicholson, I.D. Wilson, „High-Performance Liquid Chromatography Coupled to High-Field Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Application to the Urinary Metabolites of Ibuprofen“, *Anal. Chem.* **65** (1993) 327-330
[69] J.C. Lindon, J.K. Nicholson, I.D. Wilson, „Advances in Chromatography“, Marcel Dekker, New York (1996) 315-382
[70] M. Godejohann, A. Preiss, C. Mügge, G. Wünsch, „Application of On-Line HPLC - ^{1}H NMR To Environmental Samples: Analysis of Groundwater near Former Ammunition Plants“, *Anal. Chem.* **69** (1997) 3832-3837
[71] M. Godejohann, A. Preiss, C. Mügge, „Quantitative Messurements in Continuous-Flow HPLC/NMR“, *Anal. Chem.* **70** (1998) 590-595
[72] M. Godejohann, Dissertation: „Der Einsatz der HPLC-^{1}H-NMR in der Umweltanalytik“, Cuvillier Verlag, Göttingen (1997)
[73] K. Levsen, P. Mußmann, E. Berger-Preiß, A. Preiß, D. Volmer, G. Wünsch, „Analysis of Nitroaromatics and Nitramines in Ammunition Waste Water and in Aqueous Samples from

Former Ammunition Plants and Other Military Sites“, *Acta hydrochim. hydrobiol.* **21** (1993) 153-166
[74] A. Besner, R. Gilbert, P. Tétreault, L. Lépine, J.-F. Archambault, „Determination of Pentachlorophenol and Its Hydrocarbon Solvent in Wood, Soil, and Water by Gas Chromatography and FT-IR Spectroscopy in a Single-Sample Treatment“, *Anal. Chem.* **67** (1995) 442-446
[75] K.D. Buchholz, J. Pawliszyn, „Determination of Phenols by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatographic Analysis“, *Environ. Sci. Technol.* **27** (1993) 2844-2848
[76] M.I. Turnes, I. Rodriguez, M.C. Mejuto, R. Cela, „Determination of chlorophenols in drinking water samples at the subnanogram per millilitre level by gas chromatography with atomic emission detection“, *J. Chromatogr. A* **683** (1994) 21-29
[77] C. Minero, M. Vincenti, S. Lago, E. Pelizzetti, „Determination of trace amounts of high hydrophilic compounds in water by direct derivatization and gas chromatography - mass spectrometry“, *Fresenius J. Anal. Chem.* **350** (1994) 403-409
[78] W.M. Shackelford, J.M. McGuire, „Analysis of Extractable Priority Pollutants in Water by GC/MS“, *Spectra* **10(4)** (1986) 17-21
[79] P. Mußmann, K. Levsen, W. Radeck, „Gas-chromatographic determination of phenols in aqueous samples after solid phase extraction“, *Fresenius J. Anal. Chem.* **348** (1994) 654-659
[80] M.I. Turnes, I. Rodriguez, C.M. Garcia, R. Cela, „Determination of chlorophenols in drinking water with high resolution gas chromatography – tandem mass spectrometry“, *J. Chromatogr. A* **743** (1996) 283-292
[81] R. Weinberger, „Practical Capillarelektrophoresis“, Academic Press, Inc., Boston, San Diego, New York, London, Sydney, Tokyo, Toronto (1993)
[82] J.W. Jorgenson, K. DeArman Lukacs, „Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries“, *Anal. Chem.* **53** (1981) 1298-1302
[83] O. Vesterberg, „History of Electrophoretic Methods“, *J. Chromatogr*. **480** (1989) 3-19
[84] F. Kohlrausch, „Ueber Concentrations-Verschiebungen durch Electrolyse im Inneren von Lösungen und Lösungsgemischen“, *Ann. d. Phys. u. Chem. N.F.* **62** (1897) 209-239
[85] A. Tiselius, „A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures“, *Trans. Faraday Soc.* **33** (1937) 524-531
[86] S. Hjertén, „Free Zone Electrophoresis“, *Chromatogr. Rev.* **9** (1967) 122-219
[87] R. Virtanen, „Zone electrophoresis in a narrow-bore tube employing potentiometric detection“, *Acta Polytech. Scand.* **123** (1974) 1-67
[88] F.E.P. Mikkers, F.M. Everaerts, Th.P.E.M. Verheggen, „High-Performance Zone Electrophoresis“, *J. Chromatogr.* **169** (1979) 11-20
[89] Y. Walbroehl, J.W. Jorgenson, „On-Column UV Absorption Detector for Open Tubular Capillary Zone Electrophoresis“, *J. Chromatogr.* **315** (1984) 135-143
[90] E. Gassmann, J.E. Kuo, R.N. Zare, „Electrokinetic Separation of Chiral Compounds“, *Science* **230** (1985) 813-814
[91] J.A. Olivares, N.T. Nguyen, C.R. Yonker, R.D. Smith, „On-Line Mass Spectrometric Detection for Capillary Electrophoresis“, *Anal. Chem.* **59** (1987) 1230-1232
[92] W.G. Kuhr, E.S. Yeung, „Indirect Fluorescence Detection of Native Amino Acids in Capillary Zone Electrophoresis“, *Anal. Chem.* **60** (1988) 1832-1834
[93] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, „Electrokinetic Separations with Micellar Solutions and Open-Tubular Capillaries“, *Anal. Chem.* **56** (1984) 111-113
[94] H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt, „Capillary Electrophoresis“, F. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig, Wiesbaden (1996)

[95] D.M. Goodall S.J. Williams, D.K. Lloyd, „Quantitative aspects of capillary electrophoresis“, *Trends Anal. Chem.* **10** (1991) 272-279
[96] W. Kleiböhmer, K. Cammann, J. Robert, E. Mussenbrock, „Determination of explosives residues in soils by micellar electrokinetic capillary chromatography and high-performance liquid chromatography - A comparative study“, *J. Chromatogr.* **638** (1993) 349-356
[97] Y.F. Yik, C.L. Ng, C.P. Ong, S.B. Khoo, H.K. Lee, S.F.Y Li, „Analysis of Environmental Pollutants Using High Performance Capillary Electrophoresis“, *Bull. Singapore Natl. Inst. Chem.* **18** (1990) 91-100
[98] W.C. Brumley, „Environmental Applications of Capillary Electrophoresis for Organic Pollutant Determination“, *LC•GC* **13(7)** (1995) 556-568
[99] S.F.Y. Li, „Capillary Electrophoresis - Principles, Practice and Applications“, Journal of Chromatography Library Vol. 52, Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo (1992)
[100] W.C. Brumley, W.J. Jones, „Comparison of micellar electrokinetic chromatography (MEKC) with capillary gas chromatography in the separation of phenols, anilines and polynuclear aromatics Potential field-screening applications of MEKC“, *J. Chromatogr. A* **680** (1994) 163-173
[101] H. Süsse, H. Müller, „Application of the micellar electrokinetic capillary chromatography to the analysis of pesticides“, *Fresenius J. Anal. Chem.* **352** (1995) 470-473
[102] D.N. Heiger, „High-Performance Capillary Electrophoresis - An Introduction“, Hewlett Packard GmbH (1992)
[103] D.W. Armstrong, „Micelles in Separations: A Practical and Theoretical Review“, *Sep. Purif. Methods* **14** (1985) 213-304
[104] P.G. Muijselaar, K. Otsuka, S. Terabe, „Micelles as pseudo-stationary phases in micellar electrokinetic chromatography“, *J. Chromatogr. A* **780** (1997) 41-61
[105] S. Terabe, T. Katsura, Y. Okada, Y. Ishimaha, K. Otsuka, „Measurement of Thermodynamic Quantities of Micellar Solubilization by Micellar Elektrokinetic Chromatography with Sodium Dodecyl Sulfate“, *J. Microcol. Sep.* **5** (1993) 23-33
[106] Y. Moroi, „Micelles – Theoretical and Applied Aspects“, Plenum Press, New York, London (1992)
[107] J.N. Israelachvili, „Intermolecular and Surface Forces“, Second Edition, Academic Press, London San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto (1992)
[108] P.K. Misra, B.K. Mishra, G.B. Behera, „Micellization of ionic surfactants in tetrahydrofuran- water and acetonitrile- water mixed- solvent systems“, *Colloids Surf.* **57** (1991) 1-10
[109] M.G. Khaledi, „Micelles as separation media in high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis: overview and perspective“, *J. Chromatogr. A* **780** (1997) 3-40
[110] J.R. Kirchhoff, J.D. Skelton, Jr., K.T. Brooks, „Electrochemical and Spectrochemical Measurements in Sodium Dodecyl Sulfate Micellar Solution as a Function of Electrolyte Concentration“, Kapitel 4 in: Electrochemistry in Colloids and Dispersions, Editors: R.A. Mackay, J. Texter, VCH Publishers Inc., New York (1992) 43-53
[111] R.M. Seifar, J.C. Kraak, W.T. Kok, „Mechanism of Electrokinetic Separations of Hydrophobic Compounds with Sodium Dodecyl Sulfate in Acetonitrile – Water Mixtures“, *Anal. Chem.* **69** (1997) 2772-2778
[112] J. Texter, F.R. Horch, S. Qutubuddin, E. Dayalan, „Voltammetric Detection of Micelle Formation“, *J. Colloid Interface Sci.* **135** (1990) 263-271

[113] J.C. Jacquier, P.L. Desbène, „Determitation of critical micelle concentration by capillary electrophoresis – Application to oragano-saline electrolytes“, *J. Chromatogr. A* **743** (1996) 307-314
[114] A. Cifuentes, J.L. Bernal, J.C. Diez-Masa, „Determination of Critical Micelle Concentration Values Using Capillary Electrophoresis Instrumentation“, *Anal. Chem.* **69** (1997) 4271-4274
[115] K. Shinoda, T. Nakagawa, B.-I. Tamamushi, T. Isemura, „Colloidal Surfactants – Some Physicochemical Properties“, Academic Press, New York, London (1963)
[116] D. Danino, Y. Talmon, R. Zana, „Alkanediyl-α,ω- bis (dimethylalkylammonium bromide) Surfactants (Dimeric Surfactants). 5. Aggregation and Microstructure in Aqueous Solutions“, *J. Chromatogr. A* **780** (1997) 41-61
[117] Lauda- Tensiometer – Betriebsanleitung und Anwendungen, Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen
[118] R.-L. Chien, D.S. Burgi, „On-column Sample Concentration Using Field Amplification in CZE“, *Anal. Chem.* **64** (1992) 489A-496A
[119] C. Lüders, „Möglichkeiten und Grenzen der Kapillarelektrophorese bei der Analytik von Phenolen und Tensiden“, Diplomarbeit, Marburg/ Lahn (1996)
[120] J.P. Quirino, S. Terabe, K. Otsuka, J.B. Vincent, G. Vigh, „Sample concentration by sample stacking and sweeping using a microemulsion and a single- isomer sulfated β-cyclodextrin as pseudostationary phases in electrokinetic chromatography“, *J. Chromatogr. A* **838** (1999) 3-10
[121] J.P. Quirino, S Terabe, „On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography V. Field-enhanced sample injection with reverse migrating micelles“, *Anal. Chem.* **70** (1998) 1893-1901
[122] J.P. Quirino, S Terabe, „On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography IV. Field-enhanced sample injection“, *J. Chromatogr. A* **798** (1998) 251-257
[123] J.P. Quirino, S Terabe, „On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography II. Reversed electrode polarity stacking mode“, *J. Chromatogr. A* **791** (1997) 255-267
[124] J.P. Quirino, S. Terabe, „On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography – I. Normal stacking mode“, *J. Chromatogr. A* **781** (1997) 119-128
[125] J.P. Quirino, S. Terabe, „On-Line Concentration of Neutral Analytes for Micellar Electrokinetic Chromatography. 3. Stacking with Reverse Migrating Micelles“, *Anal. Chem.* **70** (1998) 149-157
[126] L.E. Vera-Avila, J. Reza, R. Covarrubias, „On-line trace enrichment, cleanup and determination of the most hydrophilic priority pollutant phenols in water“, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **63** (1996) 301-314
[127] C. Borra, A. Di Corcia M. Marchetti, R. Samperi, „Evaluation of Graphitized Carbon Black Cartridges for Rapid Organic Trace Enrichment from Water; Application to Priority Pollutant Phenols“, *Anal. Chem.* **58** (1986) 2048-2052
[128] Z.-l. Zhi, A. Riós, M. Valcárcel, „Continuous-flow Method for the Determination of Phenols at Low Levels in Water and Soil Leachates Using Solid-phase Extraction for Simultaneous Preconcentration and Separation“, *Analyst* **121** (1995) 1-6

[129] M. Castillo, D. Puig, D. Barceló, „Determination of priority phenolic compounds in water and industrial effluents by polymeric liquid-solid extraction cartridges using automated sample preparation with extraction columns and liquid chromatography – Use of liquid-solid extraction cartridges for stabilization of phenols“, *J. Chromatogr. A* **778** (1997) 301-311
[130] S. Dupeyron, M. Astruc, M. Marbach, „Automated solid-phase extraction for routine determination of phenol and chlorophenols at trace levels in water by high-performance liquid chromatography“, *Analysis* **23** (1995) 470-473
[131] N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, „Comparison of different sorbents for on-line solid-phase extraction of pesticides and phenolic compounds from natural water followed by liquid chromatography“, *J. Chromatogr. A* **793** (1998) 257-263
[132] A. Di Corcia, S. Marchese, R. Samperi, „Determination of Phenol Pollutants in Water at Trace Levels: Extraction by a Reversible Graphitized Carbon Black Cartridge“, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **77** (1994) 446-453
[133] W. Hässelbarth, „Uncertainty – The key topic of metrology in chemistry“, *Accred. Qual. Assur.* **3** (1998) 115-116
[134] D. Puig, D. Barceló, I. Silgoner, M. Grasserbauer, „Comparison of Three Different Liquid Chromatography - Mass spectrometry Interfacing Techniques for the Determination of Priority Phenolic Compounds in Water“, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **31** (1996) 1297-1307
[135] M.C. Alonso, D. Puig, I. Silgoner, M. Grasserbauer, D. Barceló, „Determination of priority compounds in soil samples by various extraction methods followed by liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry“, *J. Chromatogr. A* **823** (1998) 231-239
[136] D. Puig, I. Silgoner, M. Grasserbauer, D. Barceló, „Part-per-Trillion Level Determination of Priority Methyl-, Nitro-, and Chlorophenols in River Water Samples by Automated On-Line Liquid/Solid Extraction Followed by Liquid Chromatography / Mass Spectrometry Using Atmospheric Pressure Chemical Ionization and Ion Spray Interfaces“, *Anal. Chem.* **69** (1997) 2756-2761
[137] M. Castillo, M.F. Alpendurada, D. Barceló, „Characterization of Organic Pollutants in Industrial Effluents Using Liquid Chromatography - Atmospheric Pressure Chemical Ionization – Mass Spectrometry“, *J. Mass Spectrom.* **32** (1997) 1100-1110
[138] J. Sunner, G. Nicol, P. Kebarle, „Factors Determining Relative Sensitivity of Analytes in Positive Atmospheric Pressure Ionization Mass Spektrometry“, *Anal. Chem.* **60** (1988) 1300-1307
[139] J. Sunner, G. Ikonomou, P. Kebarle, „Sensitivity Enhancements Obtained at High Temperatures in Atmospheric Pressure Ionization Mass Spektrometry“, *Anal. Chem.* **60** (1988) 1308-1313
[140] M. Godejohann, A. Preiss, C. Mügge, „Quantitative Messurements in Continuous-Flow HPLC/NMR“, *Anal. Chem.* **70** (1998) 590-595
[141] C. Lüders, BAM Standardarbeitsanweisung, „Bestimmung von Chlor-, Nitro- und Alkylphenolen mittels GC-MS“, BAM-STAA-I.23-006 (1999)
[142] M. Green, „A Practical Guide to Analytical Method Validation“, *Analytical Proceedings* **25** (1988) 154-155
[143] DIN 32645, Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze: Ermittlung unter Wiederholbedingungen – Begriffe, Verfahren, Auswertung (1994)
[144] W.C. Brumley, „Techniques with Potential for Handling Environmental Samples in Capillary Electrophoresis“, *J. Chromatogr. Sci.* **33** (1995) 670-685

[145] R.C. Martínez, E.R. Gonzalo, A.I.M. Domínguez, J.D. Alvarez, J.H. Méndez, „Determination of triazine herbicides in water by micellar electrokinetic capillary chromatography“, *J. Chromatogr. A* **733** (1996) 349-360
[146] E. Mussenbrock, W. Keinböhmer, „Separation Strategies for the Determination of Residues of Explosives in Soils Using Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography“, *J. Microcol. Sep.* **7** (1995) 107-116
[147] Y.F. Yik, H.K. Lee, S.F.Y. Li, „Separation of Nitroaromatics by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography“, *J. High Resolution Chromatogr. (HRC&CC)* **15** (1992) 198-200
[148] D.M. Northrop, D.E. Martire, W.A. McCrehan, „Separation and Identification of Organic Gunshot and Explosive Constituents by Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis“, *Anal. Chem.* **63** (1991) 1038-1042
[149] M. Aguilar, A. Farran, V. Martí, „Analysis of phenoxyalkyl acid herbicides and chlorophenols by capillary zone electrophoresis“, *Sci. Total Environ.* **132** (1993) 133-140
[150] M.F. Gonnord, J. Collet, „Optimized capillary zone electrophoretic separation of chlorinated phenols“, *J. Chromatogr.* **645** (1993) 327-336
[151] M.I. Turnes, M.C. Mejuto, R. Cela, „Determination of pentachlorophenol in water samples by capillary zone electrophoresis“, *J. Chromatogr. A.* **733** (1996) 395-404
[152] D. Martínez, F. Borull, M. Calull, „Sample stacking using field- amplified sample injection in capillary zone electrophoresis in the analysis of phenolic compounds“, *J. Chromatogr. A* **788** (1997) 185-193
[153] I. Rodríguez, M.I. Turnes, M.H. Bollaín, M.C. Mejuto, R. Cela, „Determination of phenolic pollutants in drinking water by capillary electrophoresis in the sample stacking mode“, *J. Chromatogr. A* **778** (1997) 279-288
[154] C.-E. Lin, W.-C. Lin, W.-C. Chiou, „Migration behaviour and selectivity in micellar electrokinetic capillary chromatography - Influence of micelle concentration and buffer pH“, *J. Chromatogr. A.* **722** (1996) 333-343
[155] C. Sainthorant, Ph. Morin, M. Dreux, A. Baudry, N. Goetz, „Separation of phenylendiamine, phenol and aminophenol derivates by micellar electrokinetic chromatography Comparison of the role of anionic and cationic surfactants“, *J. Chromatogr. A.* **717** (1995) 167-179
[156] K. Otsuka, S. Terabe, „Effects of pH on Electrokinetic Velocities in Micellar Electrokinetic Chromatography“, *J. Microcol. Sep.* **1** (1989) 150-154
[157] C. Lüders, BAM Standardarbeitsanweisung, „Bestimmung von Alkyl-, Nitro- und Chlorphenolen mit der Kapillarelektrophorese in Wasser und polaren Lösungsmitteln“, *STAA-BAM-I.23-001* (1999)
[158] „Guideline for Industry – Text on Validation of Analytical Procedures“, *ICH-Q2A* (1995)
[159] C. Lüders, Ringversuchsbericht, „Bestimmung von Phenolen mittels Kapillarelektrophorese“, BAM-OCA-027 (1999)
[160] P. Quevauviller, „Reference materials: an inquiry into their use and prospects in Europe“, *Trends Anal. Chem.* **18** (1999) 76-84
[161] A. Zschunke, „Global comparability of analytical results“, *Accred. Qual. Assur.* **3** (1998) 393-397
[162] K. Krüger, C. Lüders, S. Schrahé, „BAM-interner Forschungsbericht: Untersuchungen der Konzentrationsveränderungen spezieller Alkylphenole im Ackerboden“ (April 1999)

Lebenslauf

Persönliche Angaben

- Geburtsdatum: 10. November 1970
- Geburtsort: Ratzeburg
- Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

1977-1981:	Grundschule Ratzeburg
1981-1990:	Lauenburgische Gelehrtenschule Ratzeburg
Mai 1990:	Abitur
1991-1996:	Chemiestudium an der Philipps Universität Marburg
Juli 1995:	Diplomhauptprüfung
bis Juli 1996:	Diplomarbeit bei der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung in Berlin Thema: „Möglichkeiten und Grenzen der Kapillarelektrophorese bei der Analytik von Phenolen und Tensiden“
Juli 1996:	Diplomchemiker

August 1996 bis August 1999:

Doktorand bei der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung

Selbständigkeitserklärung

Diese Arbeit wurde von Christian Lüders im Zeitraum von August 1996 bis Juli 1999 an der Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung selbständig angefertigt. Es wurden keine anderen als die aufgeführten Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Berlin, den 26. Juli 1999

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von August 1996 bis Juli 1999 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Zschunke und der Betreuung von Frau Prof. Dr. I. Nehls im Laboratorium I.23 der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung in Berlin-Adlershof.
Herrn Prof. Dr. A. Zschunke und Frau Prof. Dr. I. Nehls danke ich ganz herzlich für die Betreuung der Arbeit und die zahlreichen Diskussionen, die zum Gelingen der Dissertation beigetragen haben.
Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. A. Lehmann und Dr. W. Walther aus Labor I.23. Sie gewährten mir viel freundschaftliche Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit und waren jederzeit zu konstruktiven Diskussionen bereit.
Allen Kollegen aus Labor I.23 danke ich für das gute Arbeitsklima. Frau G. Rohde hat mich bei den zahllosen Messungen an der Kapillarelektrophorese intensiv unterstützt, wofür ich ihr besonders danke.
Herr Dr. U. Retter hat mir bei den Oberflächenspannungsmessungen hilfreich zur Seite gestanden. Herr Dr. C. Mügge hat die Untersuchungen mit der HPLC-NMR betreut. Ihnen sei an dieser Stelle ganz herzlich gedankt.
Der Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung danke ich für die Finanzierung dieser Arbeit.

BE STRONG – BE WRONG
NOMEANSNO