

Aromatische Sulfonate

Untersuchungen zum Stoffverhalten in Industrieabwasser und aquatischer Umwelt mit HPLC-MS

vorgelegt von
Diplom-Chemiker
Thomas Storm

Von der Fakultät III – Prozesswissenschaften –
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:
Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. U. Wiesmann
Berichter: Prof. Dr.-Ing. M. Jekel
Berichter: Prof. Dr. rer. nat. W. Rotard
Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 27.05.2002

Berlin 2002

D83

Dank

Die vorliegende Arbeit wurde im Fachgebiet Wasserreinhaltung der TU Berlin durchgeführt und im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 193, Projekt A14a, von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. Ich danke Herrn Prof. Dr. M. Jekel für die Themenstellung, die Förderung meiner Arbeit und seine vorbehaltlose Unterstützung. Ihm und Herrn Prof. Dr. W. Rotard danke ich für die Begutachtung der Arbeit sowie Herrn Prof. Dr. U. Wiesmann für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes. Herrn Dr. T. Reemtsma danke ich für die kompetente Leitung des Projektes A14a und den vielfältigen Zuspruch. Frau J. Jakobs danke ich herzlich für das große Engagement und für Ihre Geduld im Umgang mit einem gestressten Wissenschaftler. Die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Fachgebietes, des Institutes, des Sonderforschungsbereiches sowie der TU-Berlin haben durch die vielfältigen Hilfen und Anregungen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. In alphabetischer Reihenfolge waren dies:

A. M. Mohey Eldein Ahmed, Dr. C. Asmussen, Dr. P. Billian, Dr. T. Breithaupt, M. Borchert, Dr. M. Ernst, U. Förster, J. Friedrich, A. Grangler, G. Glauner, I. Habisreitinger, Dr. C. Hartig, Dr. A. Heinfling, Dr. S. Karcher, K. Karschunke, Dr. A. Kornmüller, K. von Nordheim, R. Opitz, Dr. A. Putschew, H. Riethof, Dr. I. Savric, A. Schlundt, K. Schön, J. Schürmann, Dr. M. Schuster, Dr. J. Spengler, M. Stüber, Dr. W. Weckwerth, W. Wichmann, H. Wilms, S. Wischnack, R. Witzig, Dr. D. Ziegler und B. Zywicki.

Herzlichen Dank für Alles!

Vielen Dank an Dr. C. Wolf und Dr. A. Keck für die schöne Zusammenarbeit über die Universitätsgrenzen hinweg, sowie an Dr. M. Godejohann, Dr. J. Spickermann, Dr. T. Gude und M. Schmitz für die engagierte Hilfestellung bei LC-NMR- und LC-TOFMS-Messungen. Ein herzliches Dankeschön auch an die Fa. Upstream Solutions GmbH für die Kooperation mit der Strukturgenerator-Software Upsol-Assemble.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Björn und Claudia.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden neue HPLC-MS-Methoden zur qualitativen Untersuchung und quantitativen Erfassung von aromatischen Sulfonaten vorgestellt. Diese neuen Methoden werden auf Fragestellungen aus dem Bereich der Behandlung von hochbelasteten Industrieabwässern sowie der Spurenanalytik von aromatischen Sulfonaten in Oberflächenwasser und Uferfiltraten angewandt.

Zur Analyse von Naphthalinsulfonat-Formaldehyd-Polymeren wurde eine Ionenpaarchromatographiemethode mit Fluoreszenzdetektion entwickelt und die Elutionsreihenfolge der einzelnen Oligomere mit HPLC-MS verifiziert. Um die Identifizierung von unbekanntem Verbindungen in komplexen Gemischen zu ermöglichen, wurde eine Methode zur Bestimmung von exakten Massen mit einem Quadrupol-Massenspektrometer on-line zur HPLC-Trennung entwickelt. Die mit dieser Methode erreichbaren Massengenauigkeiten liegen innerhalb eines 99.7%-Konfidenzintervalls von ± 4.5 mmu und erlauben die Ermittlung von Summenformeln unbekannter Verbindungen. Um die nicht zur Kopplung mit dem Massenspektrometer geeigneten nicht-flüchtigen Ionenpaarreagenzien wie Tetrabutylammoniumbromid (TBABr) zu ersetzen, wurde Tributylamin (TrBA) als Ionenpaarreagenz eingeführt. Eine Chromatographiemethode mit TrBA als Ionenpaarreagenz erlaubte die hochselektive und empfindliche Detektion von aromatischen Sulfonaten mit Nachweisgrenzen um 1-2 $\mu\text{g/L}$ bei Direktinjektion. Die Methode wurde mit einem on-line Anreicherungsschritt gekoppelt, um Nachweisgrenzen im unteren ng/L-Bereich für Naphthalinsulfonate zu erreichen.

Bei der Untersuchung von Abbau bzw. Oxidationsprodukten von Azofarbstoffen, Phthalocyaninfarbstoffen und Naphthalinsulfonaten wurden komplementäre massenspektrometrische Techniken wie exakte Massenbestimmung, Full-Scan-Massenspektren und Produktions-Spektren zusammen mit UV- und NMR-Spektroskopie genutzt, um unbekannte Analyten zu charakterisieren. Dabei wurden auch computergestützte Auswertetechniken eingesetzt.

Naphthalinsulfonate wurden in Textilabwasser und Gerbereiabwasser analysiert, dabei wurde der Einfluss der biologischen Behandlung dieser Abwässer auf die Gehalte von Naphthalinsulfonaten bestimmt. Bei der Analyse von Kläranlagenabläufen, Oberflächenwasser und Uferfiltraten im Einzugsgebiet des Tegeler Sees in Berlin wurden Naphthalinsulfonate identifiziert. Die Konzentrationen der Verbindungen lagen im Bereich einiger $\mu\text{g/L}$ in den Kläranlagenabläufen und im mittleren bis unteren ng/L-Bereich im Oberflächenwasser und den Uferfiltraten. Bei der Untersuchung der Uferfiltrate wurden Hinweise auf eine Eliminierung der Naphthalinmono- und -disulfonate gefunden. Die Konzentration von Naphthalin-1,5-disulfonat wurde durch die Uferfiltration nicht beeinflusst.

Summary

This thesis describes the development of new HPLC-MS methods for the qualitative and quantitative analysis of aromatic sulfonates. These newly developed methods were then applied to problems from the field of treatment of highly polluted industrial wastewater and to the trace analysis of aromatic sulfonates in surface water and bank-filtrates.

An ion-pair chromatography method for the analysis of naphthalene-formaldehyde-polymers was developed. The elution order of the individual oligomers was verified by HPLC-MS. A method to measure exact masses on a quadrupole mass spectrometer on-line with HPLC-separation was developed to facilitate the identification of unknown compounds in complex mixtures. With this method a mass accuracy within a confidence-interval of ± 4.5 mmu was obtained, sufficient to identify molecular formulas. To replace non-volatile ion-pairing agents like tetrabutylammonium bromide (TBABr) with volatile ion-pairing agents compatible with mass spectrometry, tributylamine (TrBA) was introduced. A chromatography method with TrBA as ion-pairing agent allowed the sensitive and selective determination of aromatic sulfonates, with detection limits around 1-2 $\mu\text{g}/\text{L}$ upon direct injection. The method was complemented with an on-line extraction step, thus lowering the detection limits for naphthalenesulfonates to the lower ng/L-range.

For the analysis of degradation and oxidation products of azo dyes, phthalocyanine dyes and naphthalenesulfonates mass spectrometric techniques like exact mass determination, full-scan mass spectra and product-ion scans were used together with UV- and NMR-spectrometry to characterize unknown compounds. Structure proposals were prepared with the aid of software designed for computer assisted structure elucidation.

Naphthalenesulfonates were identified in textile and tannery wastewater and the influence of biological treatment steps on the concentrations of these pollutants was assessed. Naphthalenesulfonates were also determined in municipal wastewater, surface water and bank-filtrates from the Lake Tegel area in Berlin. The contents of the naphthalenesulfonates were in the lower $\mu\text{g}/\text{L}$ -range in the municipal wastewater and in medium to lower ng/L-range in surface water and bank filtrates. The analytical findings suggested that the contents of all naphthalenesulfonates were reduced during bank filtration, with the exception of naphthalene-1,5-disulfonate.

Inhaltsverzeichnis

Dank	iii
Zusammenfassung	iv
Summary	v
Inhaltsverzeichnis	vii
Abbildungsverzeichnis	xi
Tabellenverzeichnis	xiii
Abkürzungsverzeichnis	xv
1 Einleitung	1
1.1 Ziele und Struktur der Arbeit	1
1.2 Aromatische Sulfonate	2
1.2.1 Herstellung und physiko-chemische Eigenschaften	3
1.2.2 Biologischer Abbau aromatischer Sulfonate	4
1.2.3 Aromatische Sulfonate in der aquatischen Umwelt	9
1.3 Analytik aromatischer Sulfonate	9
1.4 Massenspektrometrie	12
1.4.1 Überblick über Ionisierungstechniken	13
1.4.2 Massenspektrometer	16
1.4.3 Kopplungstechniken	20
2 Methodenentwicklung	23
2.1 Massenspektren aromatischer Sulfonate	23
2.1.1 ESIMS-Spektren aromatischer Sulfonate	24
2.1.2 Fragmentations-Reaktionen aromatischer Sulfonate	25
2.2 Analytik polymerer Naphthalinsulfonate	30
2.2.1 MS von SNFC	30
2.2.2 HPLC-Trennung	32
2.3 Exakte Massenbestimmung	34
2.3.1 Exakte Massenbestimmungen mit Quadrupol-MS	36
2.3.2 Exakte Massenbestimmungen mit oa-TOFMS	40
2.4 Flüchtige Ionenpaarreagenzien	42
2.5 Vorsäulenreicherung	47
2.5.1 Durchführung der Vorsäulenreicherung	48
2.5.2 Qualitative Kriterien zur Identifizierung	49

2.5.3	Quantifizierung bei der Vorsäulenanreicherung	52
3	Charakterisierung und Identifizierung	59
3.1	Bioabbau durch Pilzenzyme	59
3.1.1	Enzymatische Oxidation von Farbstoffen	60
3.1.2	Oxidationsprodukte von Reaktiv Violett 5	60
3.1.3	Phthalocyanine	64
3.2	Ozonung	66
3.2.1	Mechanismus der Ozonung	68
3.2.2	Ozonung	68
3.2.3	Charakterisierung der Ozonungsprodukte	73
3.2.4	Einordnung der Ergebnisse	83
3.3	Anaerob/aerobe Behandlung von Textilabwasser	84
3.3.1	Reduktion von RB5	85
3.3.2	Farbstoffe und Metabolite in Textilabwasser	88
3.4	Redoxmediatoren	94
3.5	Abbau von 2-Naphthol-6-sulfonat	98
4	Quantitative Analytik	101
4.1	Industrieabwasser	102
4.1.1	Textilabwasser	102
4.1.2	Gerbereiabwasser	104
4.2	Proben aus dem Wasserkreislauf Berlins	108
4.2.1	Untersuchungsgebiet Tegeler See	109
4.2.2	Naphthalinsulfonate in Oberflächenwasser	113
5	Zusammenfassende Diskussion	125
5.1	HPLC-MS	125
5.2	Integrierte Strukturaufklärung	126
5.3	Industrieabwasser und Uferfiltration	128
5.4	Ausblick	129
A	Material und Methoden	131
A.1	HPLC-Anlagen	131
A.2	Massenspektrometer	132
A.3	Gelöster organischer Kohlenstoff (DOC)	132
A.4	Chemischer Sauerstoffbedarf (COD)	132
A.5	HPLC-NMR	132
A.6	HPLC-Trennsysteme	133
A.7	Synthese von 3- und 4-Sulfophthalimid	135
A.8	Batch-Ozonung	136
A.9	Nomenklatur für Naphthalinsulfonate	137
A.10	Strukturgenerator UpSol Assemble	137

A.11 Weitere Daten Gerberei	137
B Daten	139
B.1 MS Daten Sulfonate	139
B.2 Daten zum Abbau mit Pilzenzymen	140
B.3 Ozonung	142
B.3.1 MS-Daten	142
B.3.2 LC-NMR-Daten	149
B.3.3 Computergenerierte Strukturvorschläge	150
B.4 UV-, MS- und NMR-Daten NQDSS	151
B.5 Daten Gerbereiabwasser	152
B.6 Daten Vorsäulenanreicherung	155
Literaturverzeichnis	163

Abbildungsverzeichnis

1.1	Polaritäts- und Molgewichtsbereiche von Ionisierungstechniken . . .	14
1.2	Stabilitätsdiagramm des Quadrupol-Massenspektrometers	18
2.1	Massenspektren von Naphthalin-1,5-disulfonat	24
2.2	Breakdown-Graphen von Naphthalin-1,5-disulfonat	26
2.3	Produktions-Massenspektren von Hydroxynaphthalinsulfonaten	28
2.4	ESIMS von SNFC mit Einfachladungen	31
2.5	LC-MS von SNFC mit Mehrfachladungen	32
2.6	HPLC-FLD von SNFC	33
2.7	m/ Δ m Quadrupol-MS und TOFMS	36
2.8	Fehlerverteilung der exakten Massenbestimmung	37
2.9	Limited mass range chromatogram	39
2.10	$\Delta m_{\text{oa-TOFMS}}$	40
2.11	$\Delta m_{\text{Quadrupol-MS - oa-TOFMS}}$	41
2.12	Chromatogramme flüchtige IPC	43
2.13	Empfindlichkeit und IPC-Konzentration	44
2.14	Aufbau Vorsäulenreicherung	48
2.15	Vorsäulenreicherung von Oberflächenwasser	49
2.16	Bestätigung über SRM-Peakflächen-Verhältnisse	50
2.17	Durchbruchskurven Vorsäulenreicherung Teil A	53
2.18	Durchbruchskurven Vorsäulenreicherung Teil B	54
2.19	Matrixeffekte	56
3.1	Strukturen RV5, RV5-OH, RB15 und RB38	61
3.2	Chromatogramm RV5 und Metabolite	62
3.3	Mögliche Strukturen der Metabolite von RV5-OH	63
3.4	Chromatogramm 3-SPI und 4-SPI	64
3.5	MS/MS von 3-SPI und 4-SPI	65
3.6	Reaktionsmechanismen bei der Ozonung	69
3.7	DOC- und COD-Eliminierung	70
3.8	Isokratische Trennung der Ozonungsprodukte	72
3.9	HPLC-TOFMS der Ozonungsprodukte	74
3.10	Ozonungsprodukt H ₁	76
3.11	Ozonungsprodukt H ₂	77

3.12 Ozonungsprodukt H ₃	79
3.13 Ozonungsprodukte	82
3.14 Identifizierung eines Metaboliten von RB5	86
3.15 Metabolismus RB5	87
3.16 LC-MS Chromatogramme Textilabwasser	89
3.17 Strukturvorschlag Metabolit M	92
3.18 Metabolit-Identifizierung mit MS/MS	93
3.19 Abbau von 2-NSA mit Stamm AKE1	96
3.20 Abbauweg mit AKE1	97
3.21 Batch-Abbautest 2-Naphthol-6-sulfonat	99
4.1 Naphthalinsulfonaten in Gerbereiabwasser	105
4.2 Probenahmestellen im Bereich Tegeler See	110
4.3 Schnitt Transsektegebiet Tegeler See	111
4.4 Aufsicht Transsekte Tegeler See	112
4.5 Uferfiltration von 2,6-NSA	116
4.6 Uferfiltration von 1,5-NSA	117
4.7 Uferfiltration von 2,7-NSA	118
4.8 Uferfiltration von 1,6-NSA	119
4.9 Uferfiltration von 1,7-NSA	120
4.10 Uferfiltration von 1-NSA	121
4.11 Uferfiltration von 2-NSA	122
A.1 Versuchsaufbau Batch-Ozonung	136
A.2 Abwasserbehandlung Gerberei	137
B.1 MS und UV/VIS von RV5/Metabolite	141
B.2 Strukturvorschläge für N ₈ und H ₃	150

Tabellenverzeichnis

1.1	Metabolismus und Abbau	6
1.2	Übersicht Analysenmethoden aromatische Sulfonate	11
1.3	Massenspektrometer-Typen	17
2.1	LOD von Benzol- und Naphthalinsulfonaten	45
2.2	Wiederfindungen Vorsäulenanreicherung	55
2.3	Vergleich interne Kalibrierung Standardaddition	57
3.1	Inhaltsstoffe Textilabwasser	90
3.2	Summenformel von m/z 309	91
4.1	Naphthalinsulfonate in Textilabwasser	103
4.2	Abwasseranteile in Bereich Tegeler See	111
A.1	Spektroskopische Daten 3-Sulfophthalimid	135
B.1	Messwerte exakte Massenbestimmungen	139
B.2	Produktionen der Oxidationsprodukte von RV5	140
B.3	LC-TOFMS (30 V) der Ozonungsprodukte	142
B.4	LC-TOFMS (70 V) der Ozonungsprodukte	143
B.5	Produktionen der Ozonungsprodukte, 20 eV	145
B.6	Produktionen der Ozonungsprodukte, 30 eV	147
B.7	LC-NMR-Daten	149
B.8	UV-, MS- und NMR-Daten von NQDSS	151
B.9	Daten Gerbereiabwasser Summenparameter	152
B.10	Daten Gerbereiabwasser Anorganische Parameter	153
B.11	Daten Gerbereiabwasser NSA	154
B.12	Daten Uferfiltration: 2,6-NSA	155
B.13	Daten Uferfiltration: 1,5-NSA	156
B.14	Daten Uferfiltration: 2,7-NSA	157
B.15	Daten Uferfiltration: 1,6-NSA	157
B.16	Daten Uferfiltration: 1,7-NSA	158
B.17	Daten Uferfiltration: 1-NSA	158
B.18	Daten Uferfiltration: 2-NSA	159
B.19	Probenahmestellen	159

B.20 Daten KL/OFW 160

Abkürzungsverzeichnis

1,5-NSA	Naphthalin-1,5-disulfonat
1,6-NSA	Naphthalin-1,6-disulfonat
1,7-NSA	Naphthalin-1,7-disulfonat
1-NSA	Naphthalin-1-sulfonat
2,6-NSA	Naphthalin-2,6-disulfonat
2,7-NSA	Naphthalin-2,7-disulfonat
2-NSA	Naphthalin-2-sulfonat
3-SC	3-Sulfocatechol
3-SPI	3-Sulfophthalimid
4-SC	4-Sulfocatechol
4-SPI	4-Sulfophthalimid
4-TSA	4-Toluolsulfonat
[M+H] ⁺	protoniertes Molekülkation
[M-H] ⁻	deprotoniertes Molekülanion
A	(Massen)Auflösung ($A = \frac{m}{\Delta m}$)
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
API	Atmospheric Pressure Ionization
BOD	Biological Oxygen Demand
BSA	Benzolsulfonat
BWB	Berliner Wasserbetriebe
CE	Collision Energy
CE	Kapillarelektrophorese
CEC	Capillary Electrochromatography
CID	Collisionally Induced Dissoziation
COD	Chemical Oxygen Demand
CV	Cone Voltage
CZE	Capillary Zone Electrophoresis
D ₂ O	Deuteriumoxid
Da	Dalton
DAD	Diode Array Detector
DCI	Desorption Chemical Ionization
DHND0	Dihydroxynaphthalindioxygenase

DMBA	Dimethylbutylamin
DOC	Dissolved Organic Carbon
e	Elementarladung ($e = 1.6021 \cdot 10^{-19} \text{C}$)
EIMS	Elektronenstoßionisations-MS
ESIMS	Elektrospray Ionization-MS
eV	Elektronenvolt ($eV = 1.602 \cdot 10^{-19} \text{J}$)
FABMS	Fast Atom Bombardment-MS
FD	Feld Desorption
FDMS	Feld Desorptions-MS
FI	Feld Ionisierung
FIMS	Feld Ionisierungs-MS
FLD	Fluoreszenz-Detektion
FTICR	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance
FWHM	Full Width Half Maximum
GC	Gaschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
GW	Grundwasser
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IC	Ionenchromatographie
IP	Ionenpaar
IPC	Ionenpaarchromatographie
K _{ow}	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
LAS	Linear Alkylierte Benzolsulfonate
LC-MS	Liquid Chromatography-MS
LC-MS/MS	LC-Tandem-MS
LiP	Ligninperoxidase
LOD	Limit Of Detection
M _w	Molekulargewicht
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
MALDIMS	Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization-MS
MCA	Multi Channel Aquisition
MeOD	teildeuteriertes Methanol
MeOH	Methanol
MnP	Manganperoxidase
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-MS
MW	Mittelwert
NBS6B	Naphtholblauschwarz 6B
NL	Neutral Loss
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NSA	Naphthalinsulfonate
NSADO	Naphthalenesulfonic Acid Dioxygenase
oa-TOFMS	orthogonal acceleration-TOFMS

OW	Oberflächenwasser
OWA	Oberflächenwasseraufbereitungsanlage
PBMS	Particle-Beam-MS
PDMS	Plasmadesorptions-MS
PEA	Phosphateliminierungsanlage
PEG	Polyethylenglykol
PEGMME	Polyethylenglykolmonomethylether
PEGSPE	Polyethylenglykolsulfopropylether
pH	pH-Wert (potentia Hydrogenii)
pKs	Säurekonstante
POA	Perfluoroktansulfonat
PPG	Polypropylenglykol
QC	Kontrollproben
QIT	Quadrupole Ion Trap
RB15	Reactive Blue 15
RB38	Reactive Blue 38
RB5	Reactive Black 5
RO16	Reactive Orange 16
RP-HPLC	Reversed Phase HPLC
RR198	Reactive Red 198
RV5	Reactive Violett 5
SG	Strukturgenerator
SIM	Selected Ion Monitoring
SLES	Sodiated Lauryl Ether Sulfate
SNFC	Sulfonated Naphthalene Formaldehyde Condensates
SPE	Solid-Phase-Extraction
SRM	Selected Reaction Monitoring
t	Zeit (Dimension s)
t _R	Retentionszeit
TBA	Tetrabutylammonium
TBABr	Tetrabutylammoniumbromid
TEA	Triethylamin
THA	Trihexylamin
TOC	Gesamt Gehalt organischer Kohlenstoff
TOFMS	Time Of Flight-MS
TrBA	Tributylamin
TSPMS	Thermospray-MS
u	mass unit ($u = \frac{1}{12}m(^{12}\text{C}) = 1.66044 \cdot 10^{-27}\text{kg}$)
UF	Uferfiltrat
UV	Ultraviolett
UV/VIS	Ultraviolett/Visible
z	Ladungszahl ($z = \frac{q}{e} $)

1 Einleitung

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Forschungstätigkeiten wurden zwischen Februar 1997 und November 2000 am Fachgebiet Wasserreinhalteung des Instituts für Technischen Umweltschutz der Technischen Universität Berlin durchgeführt. Die Arbeiten waren als Projekt A 14a eingebettet in den Sonderforschungsbereich 193 „Biologische Behandlung industrieller und gewerblicher Abwässer“. Gegenstand der Arbeiten dieses von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Forschungsverbundes von Biologen, Chemikern, Physikern, Verfahrenstechnikern und Umweltingenieuren war die Entwicklung von neuartigen Verfahren zur Behandlung von industriellem und gewerblichem Abwasser. Schwerpunkt des Projektes A 14a war die Untersuchung des Verhaltens von stark polaren bis anionischen organischen Verbindungen wie sulfonierten Azofarbstoffen oder Naphthalinsulfonaten bei der Behandlung von industriellem Abwasser. Zur Charakterisierung und quantitativen Erfassung dieser Stoffe war die Entwicklung von neuartigen Methoden der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS) notwendig. Diese Methoden sollten die für eine umfassende Charakterisierung erforderlichen Strukturinformationen bereitstellen und eine quantitative Erfassung auch in komplexen Matrices erlauben.

1.1 Ziele und Struktur der Arbeit

Entsprechend den Zielsetzungen des Projektes A 14a wurden in der vorliegenden Arbeit „Aromatische Sulfonate - Untersuchungen zum Stoffverhalten in Industrieabwasser und aquatischer Umwelt mit HPLC-MS“ drei aufeinander aufbauende Schwerpunkte bearbeitet.

Voraussetzung für alle weiteren Arbeiten und damit erster Arbeitsschwerpunkt war die Entwicklung von empfindlichen, spezifischen und selektiven HPLC-MS-Methoden zur Erfassung von aromatischen Sulfonaten. Dazu gehörte die Etablierung von optimalen Ionisierungsbedingungen sowie die Beschreibung von grundsätzlichen massenspektrometrischen Fragmentierungsreaktionen aromatischer Sulfonate.

Die zur HPLC-Analyse von aromatischen Sulfonaten üblicherweise verwendeten Ionenpaarchromatographie-Methoden sind inkompatibel mit der Massenspektrometrie. Daher war hier verstärkt Entwicklungsarbeit zu leisten, um den

unterschiedlichen Anforderungen einer optimaler HPLC-Trennung und optimaler Empfindlichkeit im Massenspektrometer gerecht zu werden.

Darauf aufbauend sollten mit den neuen HPLC-MS-Methoden Fragestellungen aus dem Bereich der qualitativen Analytik aromatischer Sulfonate und ihrer Abbauprodukte als zweite zentrale Aufgabe bearbeitet werden. Hier sollten die Möglichkeiten, aber auch die Grenzen der HPLC-MS bei der Charakterisierung und Identifizierung von sehr polaren Analyten aufgezeigt werden. Dabei sollte die HPLC-MS wenn möglich durch komplementäre strukturanalytische Methoden ergänzt werden, um Einblicke in das Abbau- bzw. Reaktionsverhalten von aromatischen Sulfonaten in verschiedenen Behandlungsschemata von industriellem Abwasser zu erlauben.

Der dritte Arbeitsschwerpunkt war die quantitative Erfassung von aromatischen Sulfonaten. Hier war die Praxistauglichkeit der neu entwickelten HPLC-MS-Methoden in der quantitativen Analytik von Interesse. Das Verhalten aromatischer Sulfonate bei der Behandlung von hochbelastetem Industrieabwasser und die Spurenanalytik in Oberflächenwasser und Grundwasser waren zwei wesentliche Arbeitsgebiete, wobei die dabei erzielten Ergebnisse einen Eindruck vom Verhalten ausgewählter Vertreter der Substanzklasse der aromatischen Sulfonate unter den Bedingungen der biologischen Abwasserbehandlung bzw. der Uferfiltration vermitteln sollten.

Die Darstellung der Ergebnisse dieser Untersuchungen im Anschluss an diese Einleitung gliedert sich in Kapitel 2 „Methodenentwicklung“, Kapitel 3 „Qualitative Analytik“ und Kapitel 4 „Quantitative Analytik“. Wegen der großen thematischen Spannweite sind den einzelnen Abschnitten kurze Einführungen vorgegestellt, die detaillierter auf einzelne Aspekte der jeweiligen Themen eingehen, als es im Rahmen der nun folgenden allgemeinen Einleitung möglich ist. Eine abschließende Bewertung der Ergebnisse erfolgt in Kapitel 5 „Zusammenfassende Diskussion“.

1.2 Aromatische Sulfonate

Sulfonate sind organische Verbindungen mit einer kohlenstoffgebundenen SO_3^- -Gruppe. Aliphatische Sulfonate spielen sowohl im Stoffwechsel zahlreicher Organismen als auch in der Bodenchemie eine bedeutende Rolle [1]. Im Gegensatz dazu sind aromatische Sulfonate natürlicher Herkunft seltene Ausnahmen. Neben einigen wenigen Naturstoffen dieser Substanzklasse [2, 3] sind hier Sulfobenzoesäuren zu nennen, die als Produkte der Photolyse bzw. der Oxidation der im Rohöl enthaltenen Methylbenzothiophene auftreten können [4]. Werden aromatische Sulfonate in der Umwelt vorgefunden, ist daher im allgemeinen von einer anthropogenen Herkunft auszugehen, es handelt sich bei dieser Verbindungsklasse also um typische Xenobiotika.

Synthetische aromatische Sulfonate spielen seit den Anfängen der industriellen Chemie in den letzten Jahrzehnten des vorletzten Jahrhunderts eine herausragende Rolle in den verschiedensten technischen Anwendungsfeldern. Sie sind Zwischenstufen einer Vielzahl synthetisch-chemischer Prozesse, werden häufig als Gegenionen in Salzen organischer Basen verwendet und dienen großtechnisch als „building-blocks“ für Ionenaustausch-Harze. Ein weiteres sehr wichtiges Anwendungsfeld finden aromatische Sulfonate als Dispergiermittel, Detergentien und synthetische Gerbstoffe. Zahlreiche Chemikalien werden zudem in eine sulfonierete Form überführt, um ihre Wasserlöslichkeit heraufzusetzen. Dies gilt unter anderem für Farbstoffe, Pharmazeutika, optische Aufheller und viele andere Prozesschemikalien.

Aufgrund der Vielzahl der Hersteller und der großen Anzahl verschiedener Produkte sind genaue Zahlen über Produktions- oder Einsatzmengen von aromatischen Sulfonaten nur schwer zugänglich. Für die als Tenside sehr bedeutsamen linear alkylierten Benzolsulfonate (LAS) wurde 1984 eine Jahresproduktion von $8 \cdot 10^5$ bis $1 \cdot 10^6$ t weltweit abgeschätzt [5]. Die Produktionsmenge von polymeren aromatischen Sulfonaten auf der Basis von Naphthalin-2-sulfonat (SNFC, Sulfonated Naphthalene Formaldehyde Condensates) liegt nach einer Schätzung von 1995 bei ca. $3 \cdot 10^5$ t/a weltweit. Diese Polymere werden zu ungefähr gleichen Anteilen als Betonverflüssiger und Dispergiermittel eingesetzt [6]. Auch sulfonierete Farbstoffe werden in bedeutenden Mengen eingesetzt. Von den nach einer Schätzung von 1995 ca. $5.3 \cdot 10^5$ t/a weltweit eingesetzten Farbstoffen [7] kann ein Anteil zwischen 20% und 40% sulfonierten Verbindungen zugeschrieben werden. Von den ungefähr $1.1 \cdot 10^4$ t 1988 in der BRD eingesetzten Farbstoffen waren sogar mehr als 44% sulfonierete Verbindungen [8], eine Folge des vermehrten Einsatzes moderner Reaktivfarbstoffe in diesem Markt. Eine weitere bedeutende Quelle aromatischer Sulfonate ist die Zellstoffindustrie, die Lignosulfonate im Maßstab von 10^6 t/a produziert [9]. Diese vielfältige und auch mengenmäßig bedeutende Anwendung vieler Vertreter dieser Stoffklasse in Industrie, verarbeitendem Gewerbe und privaten Haushalten hat zu ihrer ubiquitären Verbreitung in der aquatischen Umwelt geführt.

1.2.1 Herstellung und physiko-chemische Eigenschaften

Aromatische Sulfonate sind technisch entweder durch Umsatz von aromatischen Verbindungen mit konzentrierter bzw. rauchender Schwefelsäure oder durch Chlorsulfonierung mit überschüssiger Chlorsulfonsäure zugänglich. Mechanistisch handelt es sich hierbei um eine elektrophile Substitution von H-Atomen durch Schwefeltrioxid. Die resultierenden aromatischen Sulfonate lösen sich im allgemeinen gut bis sehr gut in Wasser und kommen hauptsächlich in Form ihrer Natriumsalze in den Handel.

Die pKs-Werte einfach und mehrfach sulfonierete Verbindungen liegen im Bereich von -0.5 - 2 [10, 11]. Bei mehrfach sulfonierten Verbindungen ist die Azidität

der weiteren Sulfonatgruppen geringer als die der ersten Sulfonatgruppe ($pK_{s_n} < pK_{s_{n+1}}$, mit $n = 1, 2, \dots$). Aufgrund der niedrigen pK_s -Werte liegen sie in wässriger Lösung oberhalb von $pH = 2$ vollständig dissoziiert vor und tragen eine permanente negative Ladung. Dies ist die Ursache der Oberflächen-Aktivität vieler aromatischer Sulfonate, die zu ihrem Einsatz als Detergentien und Dispergiermittel geführt hat.

Aufgrund ihrer ionischen Natur sind viele aromatische Sulfonate nur sehr schlecht sorbierbar [12, 13, 14, 15, 16]. Die Sorption an Biomasse, die bei unpolaren Verbindungen den dominanten Eliminationsmechanismus bei der üblichen biologischen Abwasserbehandlung darstellt, kann folglich besonders bei den polarerer Vertretern der aromatischen Sulfonate nur eine untergeordnete Rolle spielen.

1.2.2 Biologischer Abbau aromatischer Sulfonate

Aromatische Sulfonate gelangen im kt/a -Maßstab ins Abwasser. Dies wirft die Frage auf, ob die bei der Abwasserbehandlung eingesetzten Techniken wie z.B. die biologische Behandlung in der Lage sind, aromatische Sulfonate effektiv zu eliminieren.

Vor dem Hintergrund, dass eine sorptive Eliminierung dieser Verbindungen nicht zu erwarten ist, kommt der biologischen Abbaubarkeit zentrale Bedeutung zu. Möglichkeit und Mechanismus eines biologischen Abbaus aromatischer Sulfonate waren dementsprechend Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten. Zum Überblick sei auf drei Übersichtsartikel jüngerer Datums verwiesen [1, 17, 18]. Die Frage der biologischen Abbaubarkeit von aromatischen Sulfonaten hängt von der Struktur der betrachteten Verbindung, von Umgebungsbedingungen wie etwa Nährstoffsituation oder Temperatur und von dem Vorhandensein spezialisierter Organismen ab.

Mechanismen des biologischen Abbaus

Die Bioverfügbarkeit bzw. prinzipielle Abbaubarkeit aromatischer Sulfonate wird von ihren physiko-chemischen Eigenschaften bestimmt, wobei Sulfonatgruppen den biologischen Abbau von aromatischen Systemen grundsätzlich erschweren. Hierbei spielen folgende Faktoren eine maßgebliche Rolle:

- Sulfonatgruppen sind elektronenziehende Substituenten. Die Reaktivität beim elektrophilen Angriff von Oxidasen auf den aromatischen Kern ist herabgesetzt. Dieser Effekt kann durch weitere Substituenten verstärkt oder abgeschwächt werden, je nachdem, ob die Elektronendichte im aromatischen Ring verkleinert oder vergrößert wird. Insbesondere für den Abbau von mehrfach sulfonierten Verbindungen ist von einem erschwerten Abbau auszugehen.

- Als sterisch anspruchsvolle Substituenten, deren Raumbedarf etwa dem einer tertiären Butylgruppe vergleichbar ist, können Sulfonatgruppen enzymatische Reaktionen behindern.
- Aufgrund ihrer niedrigen pKs-Werte sind Sulfonatgruppen bei physiologischen pH-Werten permanent negativ geladen. Die Permeation von aromatischen Sulfonaten durch die ebenfalls negativ geladene Zellmembran von Bakterien ist damit erschwert und erfordert aktive Transportsysteme. Diese Transportsysteme können substratspezifisch sein.

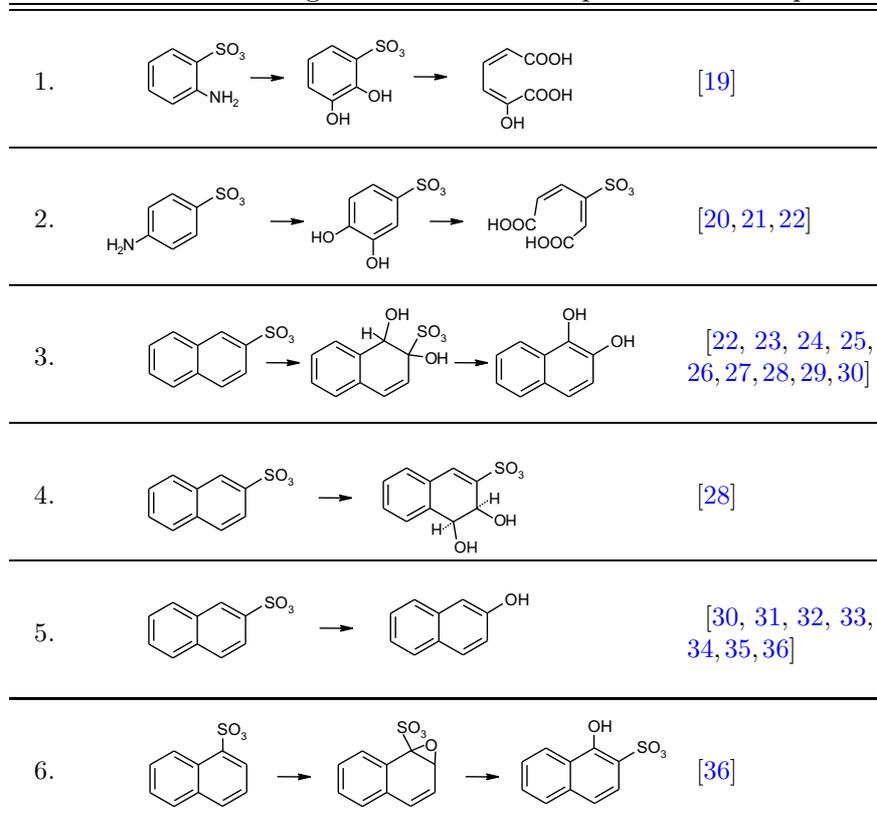
Zusätzlich zu den Eigenschaften der Sulfonatgruppe spielt das Molgewicht der einzelnen Verbindungen eine Rolle. Ist dieses prinzipiell zu groß, um einen Transport durch die Zellmembran zu erlauben, so ist nicht von einer biologischen Abbaubarkeit auszugehen. Dies ist z.B. bei polymeren aromatischen Sulfonaten oder einigen Azofarbstoffen der Fall. Ein Abbau derartiger Verbindungen wäre ausschließlich durch extrazellulär wirksame Abbau-Mechanismen denkbar.

Zahlreiche Organismen sind trotz dieser Limitierungen in der Lage, aromatische Sulfonate als Kohlenstoff- oder Schwefel-Quellen zu nutzen. Bedingung hierfür ist eine Desulfonierung, die zu leichter abbaubaren Produkten führt. Die Abbauprodukte werden entweder in die üblichen Kreisläufe des Kohlenstoff- bzw. Schwefelstoffwechsels eingeschleust oder ausgeschieden. Der initiale Angriff und die Desulfonierung beim biologischen Abbau aromatischer Sulfonate kann nach verschiedenen Reaktionsmechanismen erfolgen. Diese sind in Tabelle 1.1 zusammengestellt und sollen im Folgenden kurz skizziert werden.

Die Reaktionen 1. und 2. stellen Sonderfälle der bei Aromaten zur Ringöffnung führenden Meta- und Orthospaltung dar. Im ersten Fall wird durch eine einleitende oxidative Desaminierung 3-Sulfocatechol (3-SC) gebildet. 3-SC wird dann im Rahmen einer Metaspaltung desulfoniert, die entstehende 2-Hydroxymuconsäure steht dem Stoffwechsel als C-Quelle zur Verfügung. Im zweiten Fall führt eine oxidative Desaminierung zu 4-Sulfocatechol (4-SC), dessen Orthospaltung zur Ringöffnung führt. Die Desulfonierung des Moleküls erfolgt erst zu einem späteren Zeitpunkt des Katabolismus. Reaktionen dieser Art sind für zahlreiche Verbindungen beschrieben worden (s. Referenzen zu 1. und 2. in Tab. 1.1). Sie spielen sowohl als initiale Schritte des biologischen Abbaus von substituierten Benzolderivaten als auch bei Folgereaktionen des Abbaus komplexerer aromatischer Sulfonate eine Rolle.

Bei Reaktion 3. findet die Desulfonierung vor der ringöffnenden Metaspaltung statt. Das beim Angriff einer Dioxygenase intermediär entstehende cis-Diol zerfällt unter Eliminierung von Sulfit als guter Abgangsgruppe in das entsprechende Catechol. Dieses steht dann als Substrat dem Stoffwechsel der Zelle zur Verfügung. Diese Reaktionsfolge ist als Abbaumechanismus einer großen Anzahl aromatischer Sulfonate beschrieben worden (s. Referenzen zu 3. in Tab. 1.1). Darunter befanden sich 4-Toluolsulfonat, diverse amino- und hydroxysubsti-

Tabelle 1.1 Metabolismus und Abbau aromatischer Sulfonate. Initiale Abbau- und Metabolisierungsreaktionen mit den primären Abbauprodukten.



tuerte Naphthalinsulfonate und einige Positionsisomere des Naphthalindisulfonats. Der Angriff der Dioxygenase erfolgt im allgemeinen selektiv an der 1,2-Position des Ringes in direkter Nachbarschaft zur Sulfonsäuregruppe. Die Identifizierung von 3,4-Dihydro-3,4-dihydroxynaphthalin-2-sulfonat als „dead-end“-Nebenprodukt des Abbaus von Naphthalin-2-sulfonat durch *Pseudomonas* sp. TA1 belegte jedoch, dass der Angriff der Dioxygenase auch an den der Sulfonsäure benachbarten 3,4-Positionen des Rings stattfinden kann (s. Schema 4. und Referenz in Tab. 1.1). Bei Naphthalindisulfonaten stand die Reaktion am Anfang einer komplexen Reaktionskaskade. Als Zwischenprodukte dieser Kaskade traten 3- und 4-Sulfosalicylsäure auf, deren vollständige Desulfonierung dann zu 3- und 4-Hydroxysalicylsäure führte.

Die Desulfonierung von aromatischen Sulfonaten zum korrespondierenden Phenol findet unter sulfatlimitierten Bedingungen statt, dabei werden die aromatischen Sulfonate primär als S-Quelle genutzt (s. Referenzen zu 5. in Tab. 1.1). Der dabei wirksame Mechanismus ist noch unbekannt, Nebenprodukte wie 1-Hydroxynaphthalin-2-sulfonat beim Umsatz von Naphthalin-1-sulfonat zu 1-

Naphthol in Schema 6, Tab. 1.1, deuten auf einen Angriff einer Monooxygenase als initialen Schritt dieser Reaktion hin.

Die aus den Eigenschaften der Sulfonatgruppe resultierenden Limitierungen der Abbaubarkeit aromatischer Sulfonate wurden von zahlreichen Organismen überwunden. Eine große Anzahl von Substraten erwies sich unter speziellen Bedingungen als einem biologischen Abbau zugänglich. Ob die oben beschriebenen Mechanismen in der aquatischen Umwelt oder unter den Bedingungen der biologischen Abwasserbehandlung wirksam werden, hängt jedoch von einer Reihe zusätzlicher Faktoren ab, die unabhängig von der prinzipiellen Abbaubarkeit zu betrachten sind.

Biologische Abbaubarkeit

Die Metabolisierung bzw. der Abbau aromatischer Sulfonate setzt einen hohen Spezialisierungsgrad der abbauenden Organismen voraus. Dies gilt sowohl für die aktiven Transportsysteme in der Zellmembran als auch für die am eigentlichen Abbau beteiligten Enzyme. Aromatische Sulfonate können folglich nur dann abgebaut werden, wenn entweder entsprechend spezialisierte Organismen oder ausreichend Zeit zur Adaption vorhanden sind. Hohe Konzentrationen von Substraten und Kosubstraten sowie hohe Bakteriendichten und -diversitäten sind in den biologischen Stufen von Kläranlagen für gute Abbauleistungen verantwortlich. Der Abbau in Oberflächen- oder Grundwässern hingegen ist in vielen Fällen langsamer [37], zudem können hier Nähr- oder Spurenstofflimitierung den Abbau stark beeinflussen. Diesem langsameren Abbau stehen die begrenzten Aufenthaltszeiten in Kläranlagen gegenüber, so dass generelle Prognosen über den Abbau aromatischer Sulfonate schwierig sind.

Für die Praxis der Abwasserbehandlung sind die potentiell langen Adaptionzeiten von Bedeutung. Es können lange Anlaufphasen nötig sein, um einen Abbau im Rahmen einer biologischen Behandlung von Abwässern zu erzielen. Für den Fall, dass aromatische Sulfonate vorübergehend nicht als Substrat zur Verfügung stehen, stellt der hohe Spezialisierungsgrad für die abbauenden Organismen zudem einen Selektionsnachteil dar. Es kann zum Verlust von einmal erreichten Abbauleistungen innerhalb weniger Bakteriengenerationen kommen, wie sowohl an Zellkulturen [38] als auch in kommunalen Kläranlagen mit schwankender Abwasserqualität und wechselndem Abwasseraufkommen [39] beobachtet wurde. Es kann so das Problem auftreten, dass eigentlich abbaubare Substanzen wie Naphthalin-1-sulfonat (1-NSA) und Naphthalin-2-sulfonat (2-NSA) die Kläranlage passieren. Es stellt folglich ein grundsätzliches Problem dar, wenn hoch spezialisierte Organismen bei der Behandlung von Abwässern stark schwankender Qualität und Quantität eine bedeutende Rolle spielen.

Auch die Konzentration xenobiotischer Stoffe entscheidet über Abbau oder Persistenz. Liegen die Substanzen im Spurenbereich vor, so können Grenzkonzentrationen unterschritten werden, unterhalb derer kein biologischer Abbau mehr

stattfindet [40,41], da die geringen Konzentrationen die Etablierung einer stabilen für den Abbau adaptierten Bakterienpopulation nicht mehr erlauben. Dies kann zur Folge haben, dass sich auch prinzipiell abbaubare Stoffe im Spurenbereich nicht eliminiert werden. Daher wurden beim Abbau von aromatischen Sulfonaten sowohl beachtliche Unterschiede innerhalb der Substanzklasse als auch beim Abbau einzelner Verbindungen unter verschiedenen Bedingungen beobachtet.

Die Abbaubarkeit von Benzolsulfonaten wird von der Art und Anzahl der Substituenten am aromatischen Ring bestimmt. Unter den Benzolsulfonaten finden sich mit 3- und 4-Sulfocatechol oder 4-Toluolsulfonat sehr gut abbaubare Verbindungen. Das allerdings auch gut abbaubare Benzolsulfonate bei Screening- oder Target-Analysen in Grundwasser indentifiziert wurden, sei hier vermerkt [42].

Die von der Einsatzmenge bedeutsamsten aromatischen Sulfonate sind die linear alkylierten Benzolsulfonate (LAS). Sie sind biologisch gut abbaubar und daher im allgemeinen durch eine biologische Behandlung aus Abwasser eliminierbar. Dies wurde in zahlreichen Arbeiten zur analytischen Erfassung und zum Abbau von LAS¹ gezeigt [32, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50]. Dennoch wurden LAS in rezenten Fluss-Sedimenten nachgewiesen, was ein Anhaltspunkt dafür ist, dass auch diese eigentlich sehr gut abbaubaren Substanzen unter bestimmten Bedingungen nicht durch Mikroorganismen angegriffen werden [47].

Die technisch vielfältig eingesetzten Naphthalinsulfonate stellen eine gut untersuchte Gruppe der aromatischen Sulfonate dar, innerhalb derer große Unterschiede bezüglich der Abbaubarkeit zu beobachten sind. Naphthalin-1-sulfonat (1-NSA) und Naphthalin-2-sulfonat (2-NSA) sind gut bis sehr gut biologisch abbaubare Verbindungen, werden jedoch gleichzeitig häufig in der aquatischen Umwelt gefunden. Zahlreiche Derivate des Naphthalinsulfonats, wie z.B. amino- und hydroxysubstituierte Naphthalinsulfonate, können ebenfalls als biologisch abbaubar gelten [23, 24, 51, 52]. In Oberflächenwasser wurden bisher nur disulfonierte Aminonaphthalinsulfonate gefunden [15, 53, 54]. Naphthalinmono- und -disulfonate erwiesen sich in einem Airlift-Schlaufenreaktor als abbaubar [55]. Es zeigten sich jedoch deutliche Einflüsse von Faktoren wie Schwermetall- [56] und Salzgehalten [57] auf die Abbauleistung. Einzelne Isomere wie Naphthalin-1,5-disulfonat erwiesen sich oft auch unter den für einen Abbau günstigsten Bedingungen als nicht abbaubar. Auch an anderer Stelle wurden die Einflüsse von Umweltfaktoren wie der Temperatur, aber auch von Abwasseraufkommen und Adaptionsphänomenen auf das Abbauverhalten aromatischer Sulfonate betont [39].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass aromatische Sulfonate auch trotz grundsätzlich vorhandener biologischer Abbaubarkeit über kommunale oder industrielle Kläranlagen in die aquatische Umwelt gelangen können. Aufgrund

¹Als beim Abbau von LAS wirksamer Mechanismen wurde der unter aeroben Bedingungen stattfindende Angriff an der aliphatischen Seitenkette mit anschließender Mineralisierung über Sulfophenylcarbonsäuren und 4-Sulfocatechol (4-SC) beschrieben [43, 44].

ihrer physikalischen Eigenschaften² ist von einer weiten und permanenten Verbreitung in der aquatischen Umwelt auszugehen.

1.2.3 Aromatische Sulfonate in der aquatischen Umwelt

Aromatische Sulfonate wurden in Industrieabwasser [16, 59, 60, 61, 62], Deponiesickerwässern [63, 64, 65, 66, 67, 68], Kläranlagen und kommunalem Abwasser [16, 39, 69, 70], in stehenden und fließenden Oberflächengewässern [16, 53, 71, 72, 73, 74, 75], in Grundwasser und Uferfiltraten [15, 16, 42] und in Trinkwasser [16, 76] nachgewiesen.

Im allgemeinen wurden Benzolsulfonate mit Ausnahme der LAS nur in besonderen Belastungssituationen gefunden, wie etwa Aminobenzolsulfonat in Textilabwasser [39, 69] oder Toluolsulfonat in Deponiesickerwässern [63, 64, 65, 66, 67, 68]. Bei Naphthalinsulfonaten kann aufgrund ihrer vielfältigen Anwendungsfelder von einer ubiquitären Verbreitung in allen von anthropogenen Tätigkeiten stärker beeinflussten Wasserkompartimenten ausgegangen werden. Als bedeutsame Umweltkontaminanten haben sich Naphthalinsulfonat-Formaldehyd-Kondensate (SNFC) erwiesen. Einzelne Oligomere von SNFC wurden in Kläranlagenabläufen in Konzentrationen im oberen $\mu\text{g}/\text{L}$ -Bereich und in Oberflächen- und Grundwasser im unteren $\mu\text{g}/\text{L}$ -Bereich detektiert [16, 77, 78, 79]. Monomere Naphthalinsulfonate und -disulfonate haben sich als stetige Begleiter von polymeren Naphthalinsulfonaten erwiesen. Sie sind Ausgangsmaterialien oder Reaktionsnebenprodukte bei der Synthese von SNFC. Die Herstellung und der Einsatz polymerer Naphthalinsulfonate führt unweigerlich auch zu einer Umweltkontamination durch monomere Naphthalinsulfonate. Angesichts der Einsatzmengen von SNFC kann vermutet werden, dass die Herstellung und Verwendung von SNFC einen bedeutenden Anteil am Eintrag auch von monomeren Naphthalinsulfonaten hat.

Aromatische Sulfonate werden z.B. in Industrieabwasser in Konzentrationen von etlichen mg/L gefunden, während sie in Oberflächenwasser (OW), Uferfiltrat (UF) oder Grundwasser (GW) im allgemeinen nur im Spurenbereich (unterer $\mu\text{g}/\text{L}$ -Bereich) gefunden werden. Insbesondere die quantitative Erfassung im Spurenbereich stellt hohe Anforderungen an die Sensitivität und Spezifität der verwendeten Analyseverfahren.

1.3 Analytik aromatischer Sulfonate

Das ubiquitäre Vorkommen aromatischer Sulfonate in der aquatischen Umwelt war Motivation für die Entwicklung und Optimierung von empfindlichen und

²Die sehr gute Wasserlöslichkeit und die im allgemeinen hohe Polarität (K_{OW} -Werte < 1) führt zur Mobilität der Verbindungen im Wasserkörper. Die Eliminierung aufgrund von Adsorptionsphänomenen ist weitgehend auszuschließen [58].

praxistauglichen Analysenverfahren [80]. Verschiedene Trennmethode und Detektionstechniken, die bei der Analyse aromatischer Sulfonate zur Anwendung kamen, sind in Tab. 1.2 zusammengestellt.

Die Gaschromatographie (GC) als etablierte und ausgereifte Technik kam z.B. bei der Erfassung von LAS zum Einsatz. Die Überführung in flüchtige Derivate wie z.B. Trifluorethylester ist bei einfach sulfonierten Aromaten wie LAS routinemäßig durchführbar. Die Detektion erfolgte im allgemeinen über Massenspektrometrie (MS).

Viele aromatische Sulfonate sind im Gegensatz zu LAS nicht mit GC analysierbar. Multiple funktionelle Gruppen können Derivatisierungen behindern, thermolabile Verbindungen grundsätzliche Probleme bei der GC aufwerfen oder aber es sind, wie bei vielen sulfonierten Farbstoffen der Fall, aufgrund eines zu hohen Molekulargewichts keine flüchtigen Derivate mehr darstellbar. Für die chromatographische Analyse dieser Verbindungen kommen nur Trenntechniken in kondensierter Phase in Betracht. In Abhängigkeit vom Anwendungsfeld und den Eigenschaften der Analyte wurden Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), Kapillarelektrophorese (CE), Gelpermeationschromatographie (GPC) und Ionenchromatographie (IC) eingesetzt. Vorteile in Bezug auf Handhabbarkeit, Trennleistung und konzentrationsbezogene Nachweisempfindlichkeit haben dabei die HPLC zur Routinemethode zur Erfassung von aromatischen Sulfonaten werden lassen (Literatur s. Tab. 1.2).

Die negative Ladung aromatischer Sulfonate bewirkt eine deutlich geringere Retention als die ihrer nicht sulfonierten Analoga auf üblichen Umkehrphasen (RP-HPLC: Reversed Phase HPLC). Bei Abwesenheit von unpolaren Gruppen oder Seitenketten, wie etwa im Fall von Naphthalindisulfonaten, kann dies zur Elution im Totvolumen bei Verwendung von üblichen mobilen Phasen führen. Durch den Zusatz von Ionenpaarreagenzien zur mobilen Phase kann jedoch eine ausreichende Retention auch sehr polarer aromatischer Sulfonate mit RP-HPLC erzielt werden. Dies erklärt sich aus der Bildung von Ionenpaaren aus unpolaren Alkylammoniumkationen und den Anionen der aromatischen Sulfonate. Die Ionenpaare sind deutlich unpolarer als die freien Ionen und zeigen dementsprechend bei einer RP-HPLC aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen verbesserte Retentionseigenschaften. Diese Chromatographiemethode wird als Ionenpaarchromatographie (IPC) bezeichnet, sie wurde bei einem Großteil der in Tab. 1.2 unter HPLC-UV und HPLC-FLD aufgeführten Applikationen genutzt. Übliche Ionenpaarreagenzien sind nicht-flüchtige Salze³. Sie sind inkompatibel mit massenspektrometrischer Detektion, die Entwicklung von MS-kompatiblen IPC-Methoden war daher eines der Ziele dieser Arbeit.

³Weit verbreitete Reagenzien sind zum Beispiel Tetrabutylammoniumbromid (TBABr), Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBAHSO₄) und Trimethyloctadecylammoniumbromid (TOABr), s. z.B. [81].

Tabelle 1.2 Übersicht von zur Analyse aromatischer Sulfonate eingesetzten Analyse- und Detektionsverfahren.

Methoden	Detektor	Analyten	Matrix	Referenz
GC	MS	LAS	OW ¹ , Boden	[45, 46, 47, 82]
HPLC	UV	LAS	OW, AW ²	[83]
		NSA, BSA ³	OW, AW	[39, 53, 54, 66, 69, 71, 75, 76, 81, 84, 85, 86, 87]
		Farbstoffe	AW	[88]
	FLD ⁴	SNFC	Produkte	[89, 90, 91, 92]
		NSA	OW, AW	[16, 53, 54, 66, 71, 93, 94]
		SNFC	OW, AW	[79]
	MS	NSA	OW, AW	[59, 60, 61, 62, 63, 65, 68, 70, 73, 95, 96, 97]
		LAS	Meerwasser	[43]
		Farbstoffe	OW, AW	[95, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105]
SNFC		Produkte, OW	[79, 106]	
		BSA	OW, DW ⁵	[65, 66, 67, 68]
GPC	UV	SNFC	Produkte	[107]
IC	UV	NSA, BSA	OW, AW	[42]
	MS	BSA	OW, AW	[42, 108]
CE	UV	NSA, BSA	OW, AW	[48, 64, 84, 85, 109, 110, 111, 112, 113]
		LAS	OW, AW	[83, 114]
		Farbstoffe	Reinstoffe	[115]
	FLD	SNFC	AW	[116]
		NSA	Reinstoffe	[109]
		MS	NSA	OW, AW

¹ OW: Oberflächenwasser

² AW: Abwasser

³ BSA: Benzenesulfonic Acids, Benzolsulfonate

⁴ FLD: Fluoreszenzdetektion

⁵ DW: Deponiesickerwasser

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) wurde zur Ermittlung von Molekulargewichten und Molekulargewichtsverteilungen von technischen Gemischen und Formulierungen auf der Basis von Naphthalinsulfonat-Formaldehyd Kondensaten (SNFC) herangezogen [78]. Sie ist jedoch aufgrund ihrer geringen Selektivität insbesondere für Applikationen aus dem Bereich der Umweltanalytik wenig geeignet.

Auch für den Einsatz der Ionenchromatographie (IC) finden sich nur wenige Beispiele. Hintergrund hierfür war die in vielen Fällen geringere Trennleistung der IC im Vergleich zur IPC. Neuere Publikationen [108] lassen jedoch keine Unterschiede in der Trennleistung von IPC und IC mehr erkennen, ein Hinweis auf die Fortschritte in der Trennsäulen-Technologie der Ionenchromatographie.

Die verschiedenen kapillarelektrophoretischen Trenntechniken, wie zum Beispiel Kapillarelektrophorese (CE, Capillary Electrophoresis), Kapillaronenelektrophorese (CZE, Capillary Zone Electrophoresis) oder Kapillarelektrochromatographie (CEC, Capillary Electrochromatography), bieten im Vergleich zu IPC oder IC im allgemeinen deutlich überlegene Trennleistungen. Ihnen ist jedoch die niedrige konzentrationsbezogene Nachweisempfindlichkeit gemeinsam, die aus den sehr geringen Injektionsvolumina (nL-Bereich) resultiert. Dies ist insbesondere im Bereich der Spurenanalytik ein wesentlicher Nachteil. Dies stand einer breiteren Anwendung interessanter Applikationen wie der summarischen Erfassung von SNFC in Abwasser [116] oder der Erfassung von chiralen Abbauprodukten von LAS [48] bisher entgegen.

Die Kopplung von chromatographischen Trenntechniken mit der Massenspektrometrie gehört zu den sensitivsten Detektionsmethoden überhaupt. Dementsprechend wurden mit Ausnahme der GPC-MS-Kopplung alle chromatographischen Methoden auch mit MS-Detektion zur Analyse von aromatischen Sulfonaten herangezogen. Herausragendes Merkmal der massenspektrometrischen Detektion ist dabei, dass aufgrund der hohen Selektivität der Detektion Identitätsnachweise geführt werden können und in sehr günstigen Fällen sogar Strukturinformationen unbekannter Verbindungen zugänglich werden.

1.4 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine der leistungsfähigsten Methoden der qualitativen und quantitativen Analytik. Sowohl anorganische als auch organische Verbindungen können mit hoher Selektivität und Empfindlichkeit erfasst werden. Bei der Massenspektrometrie werden gasförmige Ionen erzeugt und ihr Masse zu Ladungsverhältnis m/z bestimmt⁴. Der Graph aus m/z und zugehörigen Intensitäten wird als Massenspektrum bezeichnet. Allen Massenspektrometern ist

⁴Alternativ werden die Größen u/e und Da/e verwendet.

gemeinsam, dass Trennung und Nachweis der Ionen im Hochvakuum erfolgen⁵. Die Anwendbarkeit der verschiedenen Methoden zur Generierung von gasförmigen Ionen hängt von den physikalischen Eigenschaften der Zielanalyte, der vorliegenden Matrix sowie der zu bearbeitenden Fragestellung ab. Zum Nachweis der Ionen werden unterschiedliche Typen von Massenspektrometern verwendet, die sich stark in Hinblick auf die Nachweisempfindlichkeit, den dynamischen Bereich und die Massenauflösung unterscheiden.

In der analytischen Praxis häufig verwendete Ionisierungstechniken und Massenspektrometer werden im Folgenden vorgestellt. Dabei wird ein besonderer Schwerpunkt auf die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte und Methoden gelegt.

1.4.1 Überblick über Ionisierungstechniken

Wie eingangs erwähnt gibt es zahlreiche Methoden, um organische Substanzen in gasförmige Ionen zu überführen. Diese können grob in harte und weiche Ionisierungsmethoden unterteilt werden.

Als harte Ionisierungsmethode gilt die klassische Elektronenstoß-Ionisierung (EI) [118]. Mit dieser Technik werden energiereiche Radikalkationen erzeugt, die stark zur Fragmentierung neigen. EI-Massenspektren weisen daher im allgemeinen zahlreiche Fragmente auf und zeichnen sich durch einen hohen Informationsgehalt aus. Die EI-Ionisierungsbedingungen sind sehr gut standardisierbar und gewährleisten eine sehr gute Reproduzierbarkeit der EI-Massenspektren. EI hat sich als Standard für die GC-MS etabliert. Über Spektren-Datenbanken⁶ wird die automatisierte Identifizierung von katalogisierten Substanzen möglich [119, 120, 121]. Dies hat die GC-EIMS zu einer der leistungsfähigsten und verlässlichsten Methoden in der Spurenanalytik werden lassen, die auch in der Umweltanalytik äußerst erfolgreich angewandt wurde⁷.

Durch chemische Ionisierung (CI) werden hauptsächlich protonierte bzw. deprotonierte Molekülonen ($[M + H]^+$ o. $[M - H]^-$) und deutlich weniger Fragmente erzeugt. Die Messbedingungen sind weniger gut standardisierbar. Mit EI und CI sind im allgemeinen unpolare bis mittelpolare flüchtige Substanzen bis ca. 10^3 Da analysierbar (s. Abb. 1.1). Dieser Bereich kann durch die Probenzu-

⁵Um eine hinreichende Transmission der Ionen im MS zu erreichen, muss die mittlere freie Weglänge der gasförmigen Ionen über den Gerätedimensionen liegen. Die dazu notwendigen Drücke liegen je nach verwendetem Massenspektrometer bei $10^{-5} - 10^{-9}$ mbar. Bei zu hohen Drücken geht ein großer Teil der Ionen durch Stöße verloren.

⁶Die NIST/EPA/NIH Mass Spectral Data Base, Ausgabe 1998, hat 129136 Einträge (<http://www.nist.gov/srd/nist1a.htm>), die Wiley Registry of Mass Spectral Data 7th-Edition Library hat 338000 Einträge (<http://www.wileyregistry.com>).

⁷Identifizierungen von unbekanntem Substanzen sollten im allgemeinen über den Vergleich mit authentischen Standards abgesichert werden. „Treffer“ bei der Suche in Spektrenbibliotheken reichen als alleiniger Identitätsbeweis nicht aus [122, 123], sondern erhöhen bestenfalls die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Strukturzuweisung [124].

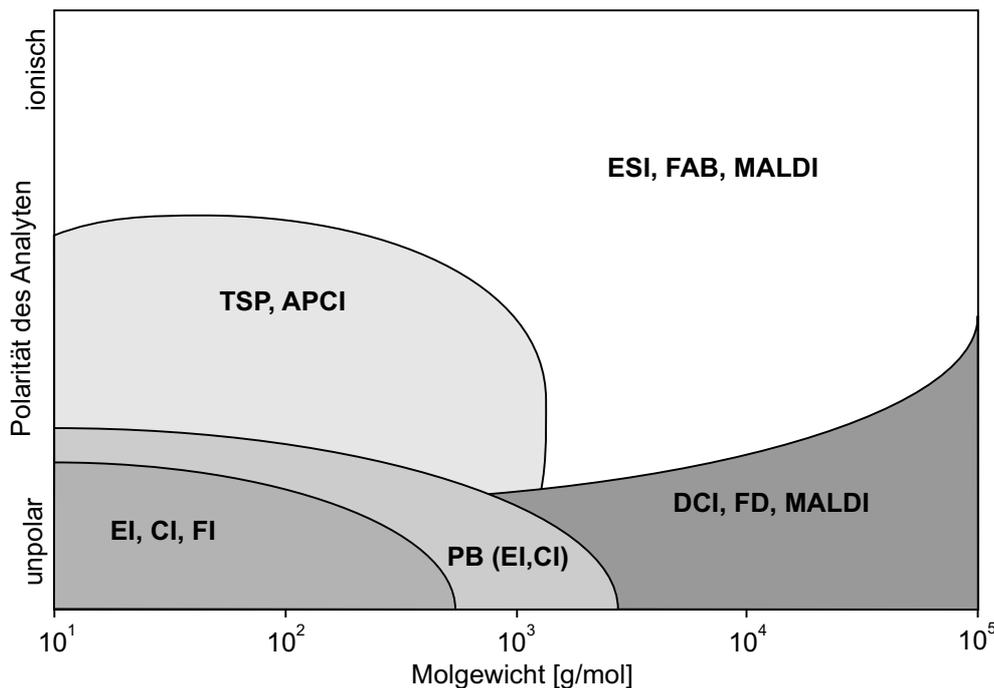


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der mit verschiedenen Ionisierungsarten zugänglichen Polaritäts- und Molgewichtsbereiche (nach [117]). Die Akronyme werden im Text (s. Kap. 1.4.1) erläutert.

führung als Aerosol, z.B. bei der LC-MS mit dem Particle-Beam-Interface, etwas erweitert werden.

Wird die chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck durchgeführt (APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization), kann von einer weichen Ionisierung gesprochen werden. Weiche Ionisierungstechniken erzeugen vor allem Molekülionen bzw. Molekülionen (z.B. M^+ , $[M + H]^+$, $[M + Na]^+$ oder $[M - H]^-$). Aufgrund ihrer geringen inneren Energie neigen diese nur wenig zur Fragmentierung. Sie eignen sich daher besonders zur Bestimmung von Molekulargewichten. Zu den weichen Ionisierungstechniken zählen Feldionisation (FI) und -desorption (FD) [125, 126], Fast-Atom-Bombardment (FAB) [126, 127, 128, 129], Desorption Chemical Ionization (DCI), Thermospray Ionisierung (TSP) [129], APCI [129], Electrospray Ionization (ESI) [129, 130] und Matrix-Assisted-Laser-Desorption and Ionization (MALDI) [131, 132]. Die mit diesen Techniken zugänglichen Polaritäts- und Molekulargewichtsbereiche sind in Abb. 1.1 skizziert. Die oben genannten weichen Ionisierungsmethoden erfordern tandem-massenspektrometrische Techniken, um Informationen über die Struktur der Molekülionen zu erhalten⁸.

⁸Die Erstellung von MS/MS-Spektrenbibliotheken zur Identifizierung unbekannter Verbindungen blieb aufgrund großer Unterschiede zwischen Massenspektrometern unterschiedlicher Hersteller und großer Variabilität der Fragmentierungsbedingungen bisher auf einzelne Substanzklassen und spezielle Problemstellungen beschränkt [133, 134].

Besonderheiten von ESIMS

Für aromatische Sulfonate als ionische Verbindungen ist ESI die Ionisierungsmethode der Wahl (s. Abb. 1.1) und sie wurde im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich verwendet. Daher folgt ein Überblick über den physikalischen Hintergrund des ESI-Prozesses sowie einige der für die Praxis bedeutsamen Besonderheiten von ESI.

Bei der ESI wird eine Elektrolytlösung in einer Kapillare durch Anlegen einer Spannung von 2–5 kV einem sehr starken elektrischen Feld ausgesetzt. Ab einer bestimmten Feldstärke kommt es zur Emission von geladenen Tropfen. Das Lösungsmittel verdampft⁹ und der Radius der geladenen Tropfen verringert sich, bis sie instabil werden und in kleinere geladene Tropfen zerfallen. Eine Kaskade von Zerfällen dieser Art führt schließlich zu Tropfen mit Durchmessern im Bereich von einigen 10 nm. Ob die im MS detektierbaren Ionen nun direkt von der Oberfläche der Tropfen desorbieren (Iribane-Thompson-Modell) oder weiter zerfallen bis einzelne geladene Ionen vorliegen (Dole-Röllgen-Modell) ist noch nicht endgültig geklärt [135, 136]. Eine Reihe weiterer Aspekte der ESI sind nur unvollständig verstanden [130, 137, 138], vor allem die Rolle und Bedeutung elektrochemischer Prozesse wird noch kontrovers diskutiert [139]. Der Prozess führt jedoch letztlich zu Ionen in der Gasphase. Die mit ESI erzeugten Molekülionen weisen äußerst geringe innere Energien auf [140] und fragmentieren daher kaum.

Im Gegensatz zu anderen weichen Ionisierungsmethoden werden bei ESI sehr häufig mehrfach geladene Ionen gebildet. Diese Eigenschaft ist besonders bei der Analyse höher-molekularer Verbindungen wie Proteinen von Vorteil. Mehrfach geladene Ionen werden bei niedrigeren m/z -Verhältnissen beobachtet und können dann z.B. mit Quadrupol-Massenspektrometern analysiert werden, deren Massenbereich¹⁰ für die einfach geladenen Ionen nicht ausreichen würde.

Von elementarer Bedeutung für die Praxis der ESI ist die Selektivität der Ionisierung. Abhängig von den physikalischen Eigenschaften der Analyte werden sehr unterschiedliche Ionisierungseffizienzen beobachtet. Diese unterschiedlichen Selektivitäten wurden mittlerweile im Rahmen eines quantitativen Modells beschrieben [141, 142], das im wesentlichen mit der Konkurrenz der einzelnen Analyte um die limitierten Oberflächenladungen der geladenen Tropfen argumentiert. Allgemein werden oberflächenaktive Substanzen mit ionischen funktionellen Gruppen deutlich effektiver ionisiert als ionische Verbindungen ohne Oberflächenaktivität. Unpolare Stoffe werden nicht oder nur sehr ineffektiv ionisiert. Responsefaktoren können sich daher um mehrere Zehnerpotenzen unterscheiden. Auch die aus der analytischen Praxis bekannten Matrixeffekte wurden anhand dieser Modellvorstellung beschrieben [141]. Unter Matrixeffekt versteht man die zum Teil extre-

⁹Dieser Prozess wird in den modernen ESI-Quellen mit Hilfe von geheizten Auxilliargasen unterstützt, meist wird Stickstoff verwendet.

¹⁰Der maximale Massenbereich von Quadrupol-Massenspektrometern liegt bei ca. m/z 4000.

me Beeinflussung der Ionisierung des Analyten durch Art und Menge organischer oder anorganischer Matrixbestandteile.

1.4.2 Massenspektrometer

Tabelle 1.3 gibt einen Überblick über die in der Praxis wichtigsten Massenspektrometer- und Tandem-Massenspektrometer-Typen. Bei der Tandem-Massenspektrometrie [143] werden Ionen über Stöße mit einem Kollisionsgas (CID: Collisionally Induced Dissociation) fragmentiert. Sowohl vor als auch nach der Fragmentierung können die Ionen massenselektiv erfasst werden. Sensitivität, dynamischer Bereich, die mit den verschiedenen Instrumenten erreichbare Präzision sowie die durchführbaren Scan-Funktionen sind einander gegenübergestellt. Von den prinzipiell durchführbaren massenspektrometrischen Experimenten [144] sind die im Folgenden beschriebenen Standardtechniken fest etabliert.

Grundsätzlich mit allen Massenspektrometern durchführbar ist der Massen-Scan, d.h. die Erfassung aller Ionen innerhalb eines spezifizierten m/z -Bereichs. Eine besondere Form des Massen-Scans stellt das Selected-Ion-Monitoring (SIM) dar, bei dem nur Ionen eines sehr engen m/z -Verhältnisses, üblicherweise 1 Masseneinheit, erfasst werden. Diese Technik spielt insbesondere als selektiver und empfindlicher Detektions-Modus für die Chromatographie eine Rolle. Eine Verfeinerung des Massen-Scans stellt die exakte Massen-Bestimmung dar. Bei diesen im einfachen Massen-Scan oder im SIM durchführbaren Messungen wird die Masse der Ionen mit sehr hoher Präzision ermittelt. In günstigen Fällen kann aus der exakten Masse die Elementarzusammensetzungen organischer Ionen berechnet werden [145]. Exakte Massenbestimmungen stellen erhöhte Anforderungen an die Leistungsfähigkeit des Massenspektrometers (Digitalisierungsraten, Präzision, Datenerfassung und Auswertung).

Wichtige Scan-Funktionen der Tandem-Massenspektrometrie sind der Product-Ion-Scan (Erfassung der CID-Fragmente (Products) eines selektierten Vorläuferions), Precursor-Ion-Scan (Erfassung aller Vorläuferionen (Precursors), die ein bestimmtes CID-Fragment aufweisen) sowie der Neutral-Loss-Scan (NL) (Erfassung aller Vorläuferionen, die bei CID-Fragmentation ein bestimmtes Neutralteilchen verlieren). Das Selected-Reaction-Monitoring (SRM, Selektion eines Vorläuferions und zugehörigen CID-Fragments) hat eine große Bedeutung als einer der selektivsten und empfindlichsten Detektions-Modi für die Chromatographie.

Auf das Messprinzip von Quadrupol- und TOF-Massenspektrometern wird, entsprechend der Bedeutung dieser Messinstrumente für die vorliegende Arbeit, im Folgenden ausführlicher eingegangen¹¹.

¹¹Zur Arbeitsweise weiterer häufig verwendeter Massenspektrometer wie den hochauflösenden Sektorfeld- (Sektor in Tab. 1.3) [118, 143, 146] und Fourier-Transform-Ionencyclotron-Resonanz- (FTICR) [147]-Massenspektrometern oder den zunehmend populären Quadrupol-Ionenfallen (QIT: Quadrupole Ion Trap) [148, 149] sei auf die Literatur verwiesen.

Tabelle 1.3 Übersicht über verschiedene häufig eingesetzte Massenspektrometer und Tandem-Massenspektrometer.

Eigenschaften im allgemeinen: +++: exzellent, ++: gut, +: ausreichend

Typ	Sensitivität ¹	Dynamik ²	Präzision ³	Scan-Typen
Massenspektrometer				
Sektor	+++	+++	+++	Scan, SIM, MIKE ⁴
Quad	++	+++	+ ⁵	Scan, SIM
TOF	++	+	++	Scan (Product)
Tandem-Massenspektrometer				
Sektor-Sektor	+++	+++	+++	Scan, SIM, SRM, NL, Product, Precursor
Sektor-Quad	+++	+++	+ ⁵	Scan, SIM, SRM, NL, Product, Precursor
Sektor-TOF	+++	+	++	Scan, Product
Sektor-QIT ⁶	+++	+	(+) ⁷	Scan, Product
Triple-Quad	+++	+++	+ ⁵	Scan, SIM, SRM, NL, Product, Precursor
Quad-TOF	++	+	++	Scan, Product
QIT ⁶	++	+	(+) ⁷	Scan, Product
FTICR ⁸	+++	+	+++	Scan, Product

¹ Die Sensitivität hängt stark vom gewählten Scan-Typ ab.
² Ein großer linearer dynamischer Bereich ist Voraussetzung für quantitative Arbeiten.
³ Die Präzision bestimmt die Eignung für exakte Massenbestimmungen.
⁴ Mass Analysed Ion Kinetic Energy
⁵ Exakte Massenbestimmungen sind mit Quadrupol MS möglich.
⁶ Quadrupole Ion Trap
⁷ Es gibt bisher keine Berichte über exakte Massenbestimmungen mit QITs.
⁸ Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance

Quadrupol-Massenspektrometer

Quadrupol-Massenspektrometer (Quad in Tab. 1.3) sind vergleichsweise einfach konstruierte Messinstrumente, deren Herzstück vier parallel angeordnete Elektroden, die sogenannten Quadrupolstäbe, sind. Der Abstand der Elektrodenoberfläche zur Achse der Anordnung wird im Folgenden als r_0 bezeichnet. Die Quadrupolstäbe werden mit einer Gleichspannung U und einer Wechselspannung $V\cos(\omega t)$ beaufschlagt. Die Quadrupolstäbe wirken auf Ionen der Ladung q ($q = ze$, mit $z =$ Anzahl der Ladungen und $e =$ Elementarladung) und Masse m als Bandpass-Massenfilter. Bei einem gegebenen Verhältnis von U/V befinden sich nur Ionen eines bestimmten $\frac{m}{z}$ -Verhältnisses auf stabilen Trajektorien in Richtung des Detektors. Bei allen anderen Ionen ist die Auslenkung in x -Richtung oder y -Richtung zu gross und sie werden an den Quadrupolstäben entladen. Die

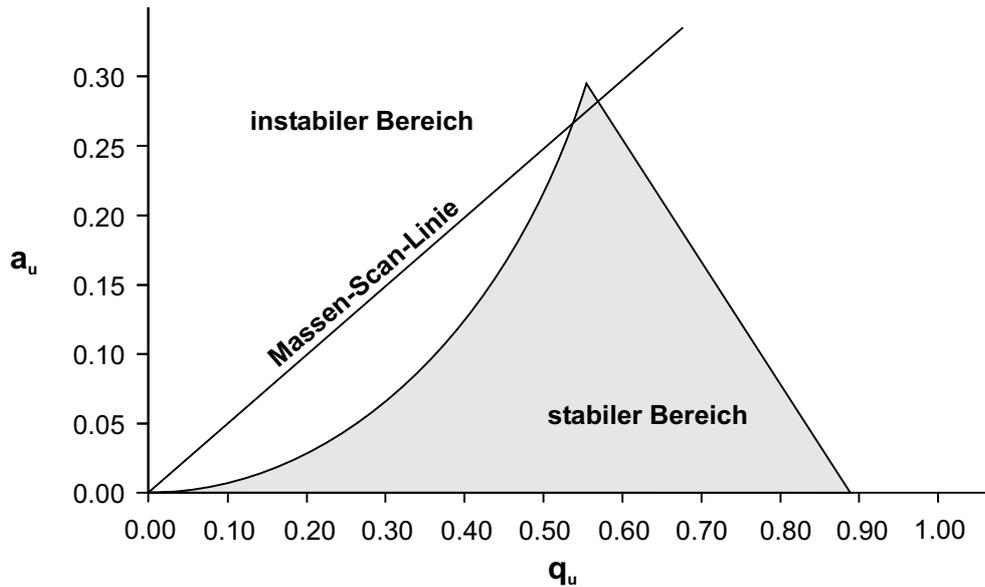


Abbildung 1.2 Stabilitätsdiagramm des Quadrupol-Massenspektrometers. Die Stabilität der Ionen wird von den Parametern $a_u = \frac{4qU}{\omega^2 r_0^2 m}$ und $q_u = \frac{2qV}{\omega^2 r_0^2 m}$ bestimmt, der grau unterlegte Bereich entspricht dem Bereich stabiler Lösungen der Mathieu-Gleichung und damit dem Bereich stabiler Trajektorien der Ionen. Die Steigung der Massen-Scan-Linie ist $\approx \frac{2U}{V}$ und gibt das konstante Verhältnis von Gleich- und Wechsellspannung beim Massen-Scan wieder (nach [150]).

mathematische Grundlage des Messprinzips ist die Mathieu'sche Differentialgleichung Gl. 1.1¹²:

$$\frac{d^2 u}{dt^2} \pm \frac{\omega^2}{4} [a_u + 2q_u \cos(\omega t)] u = 0 \quad (1.1)$$

mit $t = \text{Zeit}$, $\omega = \text{Winkelfrequenz}$, $u = x$ bzw. y , $a_u = \frac{4qU}{\omega^2 r_0^2 m}$ und $q_u = \frac{2qV}{\omega^2 r_0^2 m}$

Die Parameter a_u und q_u bestimmen, ob die Mathieu-Gleichung stabile Lösungen aufweist. Nur dann können sich Ionen eines bestimmten $\frac{m}{z}$ -Verhältnisses auf stabilen Trajektorien bewegen, d.h. die Auslenkungen in x - bzw. y -Richtung sind klein und die Ionen verbleiben innerhalb der Anordnung der Quadrupolstäbe. Trägt man die Parameter a und q gegeneinander auf, erhält man das bekannte Stabilitätsdiagramm eines Quadrupol-Massenspektrometers (s. Abb. 1.2).

Üblicherweise werden beim Massen-Scan eines Quadrupol-Massenspektrometers U und V mit einem konstanten $\frac{U}{V}$ -Verhältnis variiert. Die a - und q -Werte

¹²Zur Lösung der Differentialgleichung wird sie anhand $\xi = \frac{\omega t}{2}$ in ihre kanonische Form transformiert.

lassen sich dann als sogenannte „Massen-Scan-Linie“ mit der Steigung $\approx \frac{2U}{V}$ abbilden. Der Schnittbereich von Massen-Scan-Linie und dem Bereich stabiler Lösungen der Mathieu-Gleichung (grau in Abb. 1.2), entspricht dem $\frac{m}{z}$ -Bereich, in dem Ionen bei einem vorgegebenen $\frac{U}{V}$ -Verhältnis zum Detektor gelangen können. Die Parameter a und q sind umgekehrt proportional zur Masse, daher entsprechen hohe a_u - und q_u -Werte niedrigen Massen und umgekehrt. Je kleiner der Schnittbereich zwischen Massen-Scan-Linie und dem Bereich stabiler Lösungen, desto höher die Auflösung des Quadrupol-Massenspektrometers bei der gegebenen Masse.

Dank ihrer einfachen Bauart, geringen Anforderungen an die Qualität des Vakuums¹³, ihrer einfachen Koppelbarkeit mit Trenntechniken wie GC und HPLC und ihrer vergleichsweise simplen Bedienung sind Quadrupol-Massenspektrometer die am weitesten verbreiteten Massenspektrometer überhaupt. Auch als Tandem-Massenspektrometer haben sie sich in Form des Triple-Quadrupol-Massenspektrometers oder in Form von Hybridinstrumenten wie dem derzeit sehr populären Quadrupol-TOF-Massenspektrometer durchgesetzt.

Time-of-Flight-Massenspektrometer

Im Flugzeit-Massenspektrometer (TOFMS: Time-of-Flight-MS) werden die Ionen der Masse m und der Ladung q ($q = ze$, mit $z =$ Anzahl der Ladungen und $e =$ Elementarladung) durch eine Beschleunigungsspannung U in kV-Bereich beschleunigt. Um eine definierte Startzeit zu erhalten, muss entweder die Ionisierung (z.B. MALDI) oder die Beschleunigung (z.B. oa-TOF) pulsartig erfolgen. Auf einer feldfreien Driftstrecke s werden die Ionen anhand der Flugzeit t_{Flug} entsprechend ihrem $\frac{m}{z}$ -Verhältnis getrennt. Für ein lineares Flugzeit-Massenspektrometer ergibt sich ein sehr einfacher mathematischer Zusammenhang zwischen Flugzeit und $\frac{m}{z}$ -Verhältnis (s. Gl. 1.2).

$$t_{Flug} = s \sqrt{\frac{m}{z} \frac{1}{2eU}} \quad (1.2)$$

Lineare TOFMS haben einen fast unbeschränkten Massenbereich (über 10^6 Da). Kommerzielle TOFMS sind im allgemeinen mit einem Reflektron¹⁴ ausgestattet, das den Massenbereich auf etwa 10^4 Da begrenzt. Diese Messanordnung führt zu einer deutlich verbesserten Massenauflösung, jedoch auch zu etwas komplexeren Zusammenhängen zwischen Flugzeit und m/z -Verhältnis [151]. Da die Flugzeit bei den üblichen Gerätedimensionen auch für Ionen großer $\frac{m}{z}$ -Verhältnisse im μ s-Bereich liegt, können TOFMS mit sehr hoher Frequenz Full-Scan Massenspektren

¹³Dies ergibt sich aus den im Vergleich zu Sektor- bzw. TOF-Massenspektrometern geringeren Gerätedimensionen und der sehr viel geringeren Beschleunigung der Ionen.

¹⁴Das Reflektron ist eine Anordnung elektrostatischer Linsen, die eine Fokussierung der Verteilung der kinetischen Energie der Ionen und so eine Verbesserung der Auflösung bewirkt.

erfassen. TOFMS haben integrierende Detektoren, bei denen Bandbreite nicht auf Kosten der Empfindlichkeit erkauft werden muss. Dies macht TOFMS sehr attraktiv für eine Kopplung mit schnellen Chromatographietechniken. Die orthogonal acceleration-TOFMS (oa-TOFMS) erlaubt die Verwendung von kontinuierlichen Ionisierungstechniken wie ESI in Verbindung mit TOFMS und bietet Vorteile in Bezug auf die Empfindlichkeit¹⁵ und die Auflösung. Kommerzielle oa-TOFMS erreichen Massenauflösungen um 5000 FWHM (FWHM: Full Width Half Maximum) und erlauben exakte Massenbestimmungen [152, 153]. Dies hat zu einer steigenden Popularität der oa-TOFMS in vielen Bereichen der analytischen Praxis geführt [154]. Die Vorteile der Verbindung von hoher Transmission bzw. Sensitivität, sehr guter Massengenauigkeit (exakte Massen) und sehr schneller Scan-Geschwindigkeit gehen jedoch mit einem im Vergleich zu Sektorfeld- oder Quadrupol-Massenspektrometern geringeren dynamischen Bereich einher.

1.4.3 Kopplungstechniken

Die Analyse komplexer Probenmatrizes wie z.B. industriellem Abwasser stellt hohe Anforderungen an Spezifität, Selektivität und Empfindlichkeit der Analysemethoden. Die Kopplung von Chromatographie und Massenspektrometrie wird diesen Anforderungen in besonderem Masse gerecht [75, 117, 118, 155, 156, 157, 158]. Probleme wirft bei dieser Kopplung der Übergang ins Hochvakuum des Massenspektrometers auf.

Im Fall der Kapillargaschromatographie gelangen nur sehr geringe Mengen Trägergas und Substanz in das Massenspektrometer. Die GC-MS ist daher vergleichsweise einfach zu realisieren und heute eine fest etablierte Technologie. Durch geeignete Extraktions- und Derivatisierungsschritte sind zahlreiche umweltrelevante Verbindungsklassen einer Analyse zugänglich. Neuere Entwicklungen in der GC-MS zielen auf die Entwicklung schnellerer GC-Trennungen [159], dabei ist die GC-*oa*-TOFMS¹⁶ ins Zentrum des Interesses gerückt.

Chromatographietechniken wie HPLC, CE oder GPC arbeiten in kondensierter Phase und stellen dementsprechend deutlich höhere Anforderungen an die Leistungsfähigkeit des Vakuumsystems eines Massenspektrometers. Überzeugende Ergebnisse bei Kopplungstechniken wie HPLC-MS oder CE-MS konnten erst mit Verlagerung der Ionisierung auf die Atmosphärendruck-Seite erzielt werden. Robuste Ionisierungstechniken wie ESI und APCI erlaubten seither eine routinemäßige Anwendung der HPLC-MS oder CE-MS in Bioanalytik, Strukturaufklärung sowie Rückstands- und Umweltanalytik. Vor allem die HPLC-MS hat sich dabei in den letzten Jahren zu einer der universellsten Methoden der analytischen

¹⁵Ausschlaggebend für überlegene Sensitivität der *oa*-TOFMS in Scan-Modus ist ein „duty cycle“ von nahezu 100%, d.h. ein sehr hoher Prozentsatz der in das Massenspektrometer gelangten Ionen werden auch detektiert.

¹⁶Mit *oa*-TOFMS ist eine sehr hohe Spektrenaufnahmefrequenz (bis ca. 100 Hz) bei sehr guter Empfindlichkeit über den gesamten Massenbereich möglich.

Chemie entwickelt. Die mit dieser Technik erfassten Analyte wie Proteine, Oligonukleotide, Pharmaka, Tenside, Polymere und anorganische Anionen sind äußerst vielfältig [158, 160]. Besonders geeignet ist die HPLC-MS in der Analytik polarer bis ionischer Verbindungen, höhermolekularer Verbindungen oder thermisch labiler Substanzen.

Auch die Analytik aromatischer Sulfonate wurde zunehmend mit HPLC-MS durchgeführt (s. Referenzen in Tab. 1.2, S. 11). Schon die beiden ersten Arbeiten zur pneumatisch unterstützten HPLC-ESIMS [95, 100] berichteten im Jahr 1987 über die Analytik von aromatischen Sulfonaten in Wasserproben. Da die HPLC-MS neben quantitativen Daten auch Strukturinformationen zu unbekanntem Verbindungen bereitstellen kann, wurden im Folgenden zahlreiche HPLC-MS-Methoden zur Analyse aromatischer Sulfonate entwickelt. Dabei zeigte sich, dass Kompromisse zwischen den Anforderungen an eine optimale Chromatographie und an eine optimale massenspektrometrische Detektion oftmals schwer zu finden sind.

Im folgenden Kapitel werden Arbeiten zur Entwicklung von HPLC-MS-Methoden für die qualitative und quantitative Analyse aromatischer Sulfonate aus wässriger Matrix beschrieben. Dabei wurde den unterschiedlichen Anforderungen an die Methoden der Aufgabe entsprechend Rechnung getragen.

2 Methodenentwicklung

Die Bearbeitung von Fragestellungen aus dem Bereich der qualitativen und quantitativen Analytik aromatischer Sulfonate erforderte umfangreiche Entwicklungsarbeiten zur analytischen Methodik. Diese schlossen die Untersuchung des massenspektrometrischen Verhaltens aromatischer Sulfonate, die Optimierung von massenspektroskopischen Detektionsschemata sowie die Entwicklung von MS-kompatiblen HPLC-Trenntechniken und Anreicherungsmethoden ein. Im folgenden Kapitel zur Methodenentwicklung werden die Ergebnisse dieser Arbeiten zusammenfassend dargestellt.

2.1 Massenspektren aromatischer Sulfonate

Aromatische Sulfonate sind als im allgemeinen schwerflüchtige organische Salze schwierige Analyte für die Massenspektrometrie. Sie sind ohne vorherige Derivatisierung nicht mit GC-EIMS analysierbar. Einfach sulfonierte aromatische Sulfonate können routinemäßig derivatisiert und mit GC-EIMS analysiert werden (wie z.B. LAS [47]). Es gab jedoch schon früh Bestrebungen, auch mehrfach sulfonierte aromatische Sulfonate bzw. höher molekulare Vertreter dieser Substanzklasse der massenspektrometrischen Analyse zugänglich zu machen. Hier boten sich die sogenannten sanften Ionisierungsmethoden an, die eine Analyse ohne aufwändige Derivatisierungsschritte ermöglichen. Untersuchungen zum massenspektrometrischen Verhalten von aromatischen Sulfonaten und sulfonierten Azofarbstoffen wurden mit Felddesorptions-MS (FDMS) [125], Fast-Atom-Bombardment-MS (FABMS) [127, 161, 162, 163], Plasmadesorptions-MS (PDMS) [164], Matrix-Assisted Laser-Desorptions- und Ionization-MS (MALDIMS) [165], Thermospray-MS (TSPMS) [102] und mit Particle-Beam-MS (PBMS) [42] durchgeführt. Die Elektrospray-MS (ESIMS) [166] hat sich als besonders geeignet für die Analyse von aromatischen Sulfonaten erwiesen [95, 100, 165, 167, 168]. Die Kopplung von ESIMS mit der HPLC [95, 100] bietet auch für aromatische Sulfonate deutliche Empfindlichkeitsvorteile gegenüber HPLC-TSPMS [102] und HPLC-PBMS [42]. Dementsprechend wurde HPLC-ESIMS in zahlreichen Arbeiten genutzt [60, 61, 65, 66, 67, 73, 95, 108, 168, 169, 170], um aromatische Sulfonate selektiv und empfindlich in einer Vielzahl von Probenmatrizes zu erfassen.

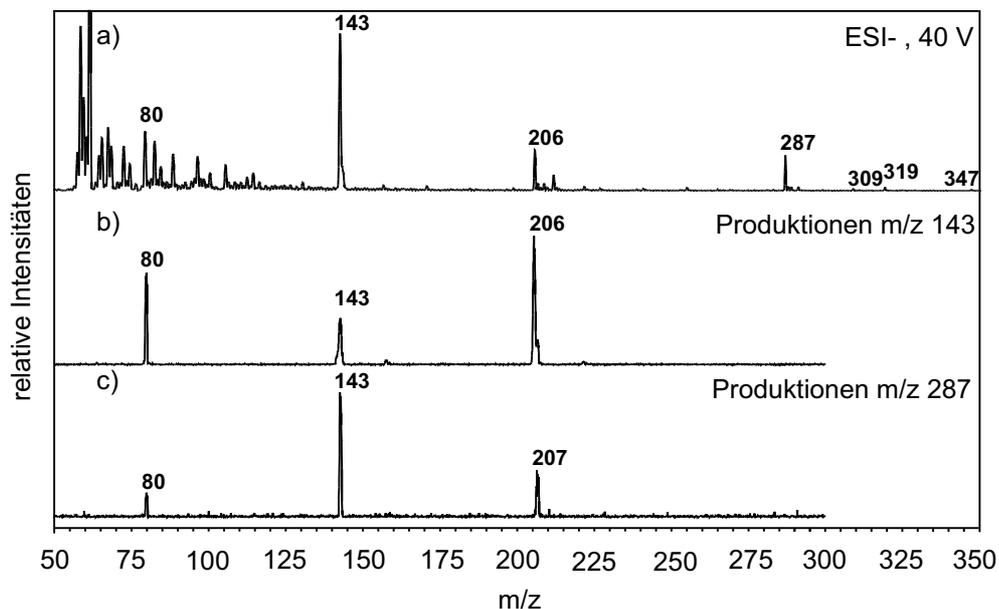


Abbildung 2.1 ESIMS-Spektrum und Produktions-Spektren von Naphthalin-1,5-disulfonat. a) ESIMS-Spektrum bei 30 V Cone-Spannung, b) Produktionen des Dianions m/z 143 bei 15 eV Kollisionsenergie und c) Produktionen-Spektren des Monoanions m/z 287 bei 35 eV Kollisionsenergie.

2.1.1 ESIMS-Spektren aromatischer Sulfonate

Entsprechend ihres stark sauren Charakters liegen aromatische Sulfonate ab einem pH-Wert von ca. 2 in Lösung vollständig dissoziiert als Anionen vor. Dementsprechend erfolgt ihr Nachweis mit ESIMS im negativen Ionisierungs-Modus. Neben den einfachen deprotonierten Molekülanionen vom Typ $[M - nH]^{n-}$ können dabei, abhängig vom Design der ESI-Quelle und des Massenanalysators, eine Reihe von Addukten beobachtet werden, wie z.B. Lösungsmitteladdukte oder Alkalkationenaddukte. Bei mehrfach sulfonierten aromatischen Sulfonaten kann der Ladungszustand bzw. die Verteilung der Ladungszustände stark von der Zusammensetzung des Lösungsmittels abhängen. Hohe Salzgehalte bewirken im allgemeinen Mehrfachladungen, während die Zugabe von Ammoniumionen oder Alkylaminen oder niedrigere pH-Werte zum vermehrten Auftreten von Einfachladungen führen können.

Das ESIMS-Spektrum von Naphthalin-1,5-disulfonat (1,5-NSA) (s. Abb. 2.1 a) wird bei mittleren Cone-Spannungen (hier 40 V) von den Peaks des Dianions ($[M - 2H]^{2-}$ bei m/z 143 und des Monoanions $[M - H]^{-}$ bei m/z 287) dominiert. Das relative Intensitäts-Verhältnis dieser beiden Molekülanionen konnte, je nach Lösungsmittelzusammensetzung, stark variieren. Während z.B. bei Direktinfusion aus Wasser/Actonitrilgemischen (s. Abb. 2.1 a) bei niedrigen bis mittleren Cone-Spannungen das Dianion deutlich intensiver ist als das Monoanion, wurde

bei Verwendung von Tributylamin (TrBA) als flüchtigem Ionenpaarreagenz (s. Kap. 2.4) im Massenspektrum von Naphthalin-1,5-disulfonat auch bei niedrigeren Cone-Spannungen fast ausschließlich das Monoanion beobachtet. Geringere Intensitäten wiesen, auch bei Kopplung zur Chromatographie, die Adduktionen bei m/z 309 ($[M + Na - 2H]^-$), m/z 319 ($[M + MeOH - H]^-$) und m/z 347 ($[M + AcOH - H]^-$) auf. Einfache Massenspektren, die hauptsächlich aus den Molekülanionen und einigen wenigen Fragmenten bestehen, sind charakteristisch für die ESIMS. Sie wurden bei einer größeren Anzahl von aromatischen Sulfonaten beobachtet.

Das Massenspektrum von 1,5-NSA wird von den Fragmenten m/z 80 (das Radikalanion $SO_3^{\cdot-}$), m/z 206 ($[M - 2H]^{2-} \rightarrow [M - SO_3 - 2H]^-$) und m/z 207 ($[M - SO_3 - H]^-$) beherrscht. Die Herkunft dieser Fragmente sowie der ihnen entsprechenden Produktionen werden im Folgenden diskutiert. Dabei soll auch das generelle Fragmentationsverhalten von aromatische Sulfonaten sowie dessen Abhängigkeit von bestimmten Strukturelementen beleuchtet werden.

2.1.2 Fragmentations-Reaktionen aromatischer Sulfonate

Bei der CID-Fragmentierung aromatischer Sulfonate werden zahlreiche charakteristische Fragmente gebildet. Im Folgenden werden einige davon am Beispiel der Massenspektren von Naphthalin-1,5-disulfonat vorgestellt.

In-source-Fragmentierung und CID-Massenspektren von 1,5-NSA

m/z 80 ($SO_3^{\cdot-}$): Das Radikalanion $SO_3^{\cdot-}$ bei m/z 80 wurde als charakteristisches Fragment der CID-Fragmentierung zahlreicher aliphatischer und aromatischer Sulfonate beschrieben [65, 66, 73, 95, 127, 161, 171]. Es trat sowohl bei der „in-source“-Fragmentierung¹ (s. z.B. [65, 73]) als auch in CID-Massenspektren auf, die mit Tandem-Massenspektrometern erhalten wurden (s. z.B. [61, 162, 163, 171]). Das $SO_3^{\cdot-}$ -Radikalanion wurde zur selektiven und spezifischen Detektion von Sulfonaten in Umweltproben über LC-MS mit SIM-Detektion auf das Ion m/z 80 verwendet [65].

Das Fragment bei m/z 80 war über einen weiten Bereich von Cone-Spannungen (35 V - 120 V) das intensivste Ion im ESI-Massenspektrum von 1,5-NSA (s. Abb. 2.2 A). Wie aus den Produktionen-Spektren ersichtlich, wurde dieses Fragment sowohl aus dem Dianion als auch aus dem Monoanion gebildet (s. Abb. 2.1 b) u. c)). Die Ausbeute des m/z 80-Fragmentes war im Fall des Dianions bei ca. 20 eV und beim Monoanion bei ca. 45 eV maximal (s. Abb. 2.2 B

¹Unter „in-source“-Fragmentierung werden CID-Fragmentierungen zusammengefasst, die schon in der Ionenquelle auftreten. Die Ionen werden beim Übergang vom Atmosphärendruck in das Hochvakuum des Massenspektrometers beschleunigt und kollidieren dabei mit Lösungsmittelmolekülen und Stickstoff. Die „in-source“-CID-Massenspektren sind denen mit Tandem-Massenspektrometern erhaltenen Niederenergie-CID-Massenspektren sehr ähnlich.

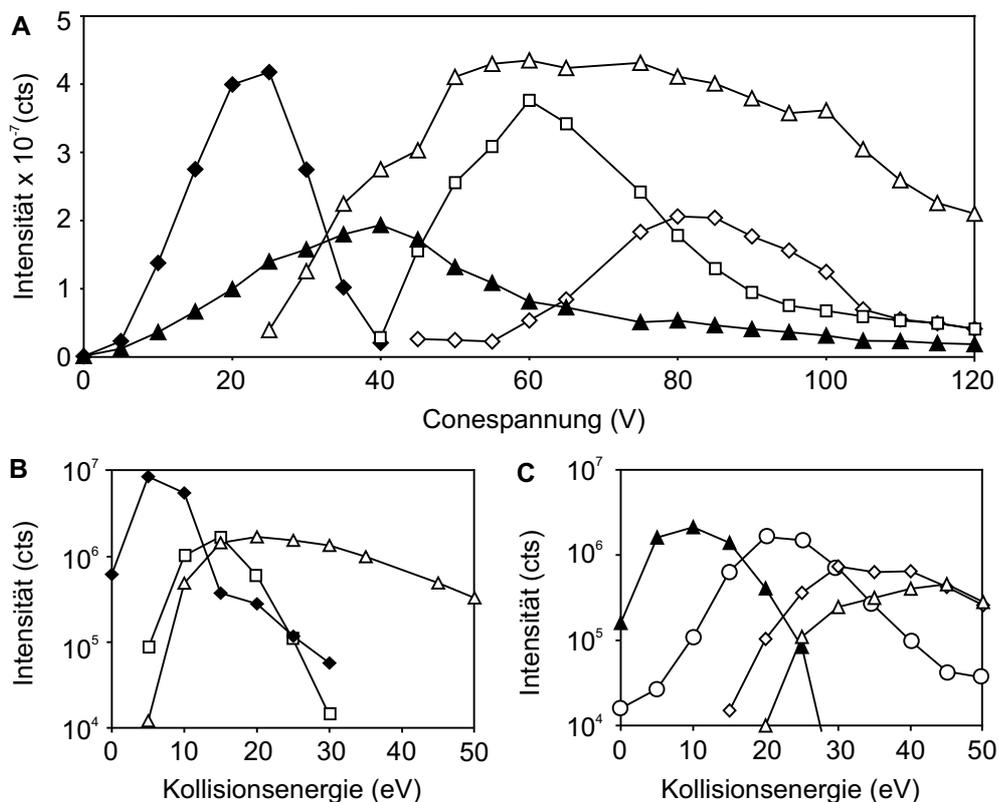


Abbildung 2.2 Breakdown-Graphen von Naphthalin-1,5-disulfonat. **A** Abhängigkeit der „in-source“-Fragmentierung von der Cone-Spannung. **B** Fragmentierung des Dianions (m/z 143) und **C** Fragmentierung des Monoanions (m/z 287) in Abhängigkeit von der Kollisionsenergie. Nicht-kalibrierte Kollisionsenergien (laboratory frame of reference), Kollisionsgas: Argon, $1,3 \cdot 10^{-3}$ mbar, **B** und **C** in logarithmischer Darstellung. \blacklozenge : Dianion m/z 143, \blacktriangle : Monoanion m/z 287, \triangle : Fragment m/z 80, \square : Fragment m/z 206, \diamond : Fragment m/z 143, \circ : Fragment m/z 207

u. C). Da die zur homolytischen Bindungsspaltung notwendige Energie für beide Fälle gleich ist, kann der Unterschied nur durch die beim Zerfall des Dianions in zwei Teilchen gleicher Ladung² zusätzlich frei werdende Coulomb-Energie erklärt werden. Für die bei der „in-source“-Fragmentierung beobachtete Abhängigkeit der Intensität des m/z 80-Ions von der Cone-Spannung bedeutete dies, dass das ausgeprägte Plateau zwischen 50 V und 80 V (s. Abb. 2.2 A) auf eine Überlagerung zweier Energie-Verteilungen zurückgeführt werden konnte. Die eine Energieverteilung ist die des aus dem Dianion m/z 143 gebildeten $\text{SO}_3^{\cdot-}$, die andere die des aus dem Monoanion m/z 287 gebildeten $\text{SO}_3^{\cdot-}$.

m/z 206 ($[\text{M} - \text{SO}_3 - 2\text{H}]^-$): Das Fragment ($[\text{M} - \text{SO}_3 - 2\text{H}]^-$) bei m/z 206 ist eindeutig ein Produkt des Dianions und trat bei der „in-source“-Fragmentierung

²Der Zerfall erfolgt entsprechend der Gleichung $[\text{M} - 2\text{H}]^{2-} \rightarrow [\text{M} - \text{SO}_3 - 2\text{H}]^{\cdot-} + \text{SO}_3^{\cdot-}$.

ung bei ca. 60 V mit maximaler Intensität auf (s. Abb. 2.2 A). Im Produktions-Spektrum des Dianions wurde eine maximale Intensität des Ions bei m/z 206 bei ca. 15 eV beobachtet³ (s. Abb. 2.2 B).

m/z 207 ($[M - SO_3 - H]^-$): Das Fragment ($[M - SO_3 - H]^-$) bei m/z 207 ist ein Produkt des Monoanions. Das Fragment m/z 207 konnte im Fall des ESIMS-Spektrums nicht quantitativ erfasst werden, da es zur isobaren Überlagerung mit dem $[M + 1]$ -Isotopenpeak des Fragments m/z 206 kam. Im Produktions-Spektrum lag die maximale Intensität von m/z 207 bei ca. 22 eV (s. Abb. 2.2 C). Dieses Fragment entsteht durch den Verlust von SO_3 als Neutralteilchen, einer bei aromatischen Sulfonaten häufig auftretenden Fragmentierung. Da diese Fragmentierungsreaktion bei den einfachen Vertretern wie Naphthalinsulfonat und Benzolsulfonat nicht auftrat, sondern nur bei Substanzen mit weiteren aziden funktionellen Gruppen wie z.B. Sulfonsäuregruppen oder Hydroxy- bzw. Aminofunktionen, konnte als Mechanismus eine „charge-remote“-Fragmentierung [172] vermutet werden, bei der SO_3 aus einer protonierten und damit ungeladenen Sulfonsäuregruppe eliminiert wurde.

m/z 143 ($[M - SO_3 - SO_2 - H]^-$): Das Fragment m/z 143 entsteht aus dem Monoanion in einer zweistufigen Fragmentierung über das Fragment m/z 207, mit maximalen Intensitäten bei ca. 85 V bei „in-source“-Fragmentierung und bei ca. 35 eV im Produktions-Spektrum. Das Maximum lag dabei, dem zweistufigen Mechanismus entsprechend, deutlich höher als das Intensitätsmaximum des Ions m/z 207 mit ca. 22 eV im Produktions-Spektrum (s. Abb. 2.2 C). Der erste Schritt dieser Fragmentierung entspricht der oben beschriebenen SO_3 -Eliminierung. Im zweiten Schritt (m/z 207 \rightarrow m/z 143) wird SO_2 als Neutralteilchen eliminiert. Die Eliminierung von SO_2 stellt eine weitere wichtige und für sehr viele aromatische Sulfonate beschriebene Fragmentierung dar. Als Mechanismus dieser nicht bei aliphatischen Sulfonaten auftretenden Reaktion wurde ein intramolekularer Addition/Elimination-Mechanismus bewiesen [173]. Die Produkte der SO_2 -Eliminierung sind aromatische Phenolat-Anionen, deren massenspektrometrisches Verhalten gut beschrieben ist [174,175,176,177,178]. Die für Phenolat-Anionen typischen Fragmentierungen wie CO-Eliminierung [176], Ringkontraktionen [177] oder Keten-Eliminierungen [178] spielen dementsprechend auch bei aromatischen Sulfonaten eine große Rolle.

Massenspektren von Positionsisomeren

Positions-Isomere von aromatischen Sulfonaten wiesen im allgemeinen, sowohl bei der „in-source“-Fragmentierung als auch in den Produktions-Spektren, sehr ähnliche Massenspektren auf. So sind beispielsweise die Produktions-Spektren

³Der SRM-Übergang m/z 143 \rightarrow m/z 206 ist potentiell sehr selektiv und wurde zur Detektion von Disulfonaten in der LC-MS in Betracht gezogen. Wegen der geringen Intensität mit der das Dianion in Verbindung mit flüchtigen Ionenpaarreagenzien beobachtet wurde, musste jedoch von diesem Ansatz Abstand genommen werden.

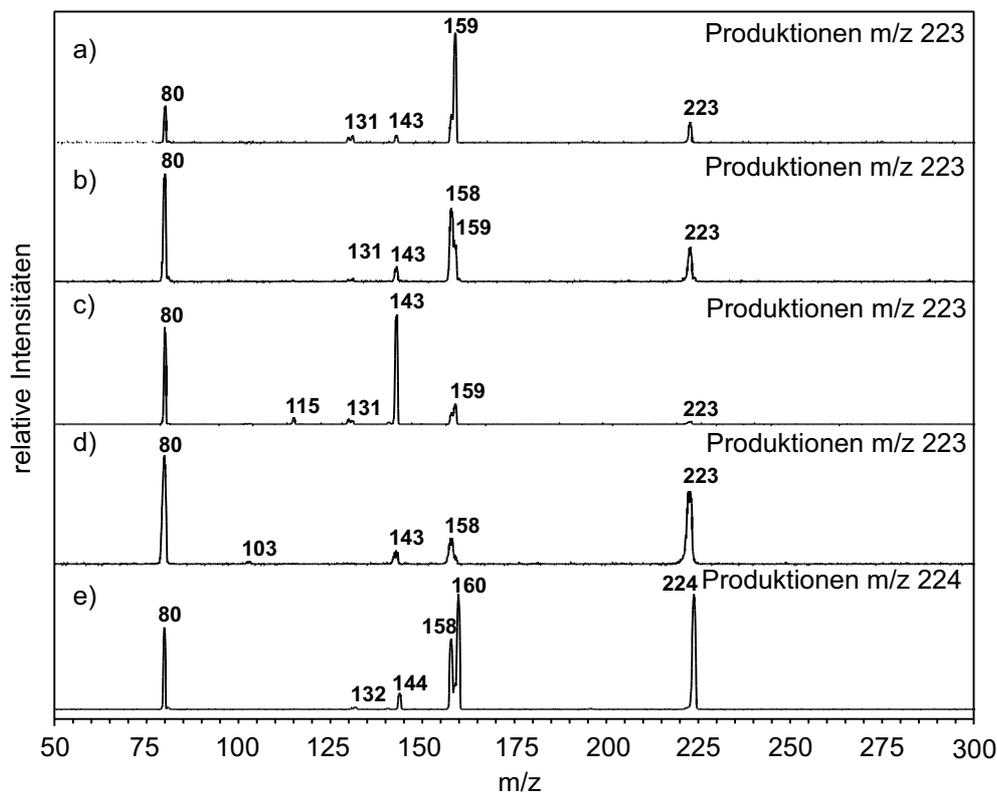


Abbildung 2.3 Produktions-Spektren einiger Positionsisomere des Hydroxynaphthalinsulfonats. **a)** 2-Hydroxynaphthalin-7-sulfonat, **b)** 2-Hydroxynaphthalin-6-sulfonat, **c)** 1-Hydroxynaphthalin-8-sulfonat, **d)** 1-Hydroxynaphthalin-8-sulfonat und **e)** 2-Hydroxynaphthalin-6-sulfonat (e) in $D_2O/MeOD$ gelöst.) Kollisionsenergie: **a) – d)** 35 eV, **e)** 25 eV. Kollisionsgas: Argon, $1,3 \cdot 10^{-3}$ mbar.

der fünf im Labor verfügbaren Positions-Isomeren des Naphthalindisulfonats⁴ nahezu identisch. Kleinere Unterschiede waren nur bei den relativen Intensitäten der Fragmente feststellbar. Dies hatte entscheidende Konsequenzen bei der Entwicklung von HPLC-MS-Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung von Naphthalindisulfonaten: Da die MS-Detektion die Unterscheidung der Positionsisomere nicht erlaubte, musste für die chromatographische Separation dieser Verbindungen Sorge getragen werden.

Zu größeren Unterschieden zwischen den Massenspektren von Positions-Isomeren kommt es nur dann, wenn ortho-ständige funktionelle Gruppe bei der Fragmentierung in Wechselwirkung treten. Dies wird z.B. aus den Produktions-Spektren einer Reihe von Positions-Isomeren des Hydroxynaphthalinsulfonats deutlich (s. Abb. 2.3), ein Beispiel aus der praktischen Strukturaufklärung ist die Identifizierung von Sulfophthalimid-Isomeren (s. Kap. 3.1.3, S. 64).

⁴Dies waren 2,6-NSA, 1,5-NSA, 2,7-NSA, 1,6-NSA und 1,7-NSA.

Die Produktions-Spektren von 2-Hydroxynaphthalin-7-sulfonat, 2-Hydroxynaphthalin-6-sulfonat und 1-Hydroxynaphthalin-4-sulfonat (s. Abb. 2.3 a), b) u. d)) sind einander sehr ähnlich und unterscheiden sich nur in den relative Intensitäten der Produktionen. Neben den auch beim Naphthalin-1,5-disulfonat feststellbaren Fragmentierungen (Radikalanion $\text{SO}_3^{\cdot-}$ (m/z 80), SO_2 -Verlust (m/z 159) und SO_3 -Verlust (m/z 143)) fanden sich bei den Hydroxynaphthalinsulfonaten weitere Fragmentionen.

$[\text{M} - 65 - \text{H}]^-$ bei m/z 158 ist eines davon. Es wurde auf die Eliminierung von HSO_2 als Neutralteilchen zurückgeführt. Ähnlich wie bei der Eliminierung von SO_3 konnte bei der Eliminierung von HSO_2 ein „charge-remote“-Mechanismus vermutet werden, wobei in diesem Fall die negative Ladung statt an einer deprotonierten Sulfonsäuregruppe an der deprotonierten Hydroxygruppe lokalisiert ist. Ein „charge-site“-Mechanismus hätte hingegen entweder die Wanderung eines H-Atoms von der phenolischen OH-Gruppe über den Ring hinweg zur Sulfonat-Gruppe erfordert, oder aber die Abstraktion eines H-Atoms aus dem aromatischen Ring. Die Interpretation als „charge-remote“-Mechanismus wird außerdem durch ein Produktions-Spektrum von 2-Hydroxynaphthalin-6-sulfonat aus $\text{D}_2\text{O}/\text{MeOD}$ gestützt. Das azide H-Atom der phenolischen OH-Gruppe wurde durch ein Deuterium-Atom ausgetauscht. Es wurde nun statt eines intensiven $[\text{M} - 65 - \text{H}]^-$ ein intensives $[\text{M} - 66 - \text{H}]^-$ -Fragment festgestellt, somit war DSO_2 eliminiert worden. Da immer noch ein $[\text{M} - 65 - \text{H}]^-$ -Fragment geringer Intensität sichtbar war, konnte die H-Abstraktion aus dem aromatischen Ring und damit ein „charge-site“-Mechanismus nicht ausgeschlossen werden, er war aber von untergeordneter Bedeutung.

Die Fragmente bei m/z 131 (Abb. 2.3 a) - c)), das Fragment bei m/z 115 (Abb. 2.3 c)) und m/z 132 (Abb. 2.3 d)) gingen auf die Eliminierung von CO aus den Phenolat-Anionen bei m/z 159, m/z 143 und m/z 160 hervor. Die Eliminierung von CO stellt eine der häufigsten Fragmentierungs-Reaktionen aromatischer Anionen dar.

Das $[\text{M} - \text{SO}_3 - \text{H}]^-$ -Fragment (m/z 143) im Produktions-Spektrum von 1-Hydroxynaphthalin-8-sulfonat (Abb. 2.3 c)) wies eine sehr viel höhere Intensität auf als das $[\text{M} - \text{SO}_2 - \text{H}]^-$ -Fragment (m/z 159) und das $[\text{M} - \text{HSO}_2 - \text{H}]^-$ -Fragment (m/z 158). Als Ursache konnte die Wechselwirkung der benachbarten Sulfonsäure- und Hydroxy-Gruppe angenommen werden. Vermutlich bestand dieser „ortho-Effekt“ [118, 175] in dem erleichterten Transfer eines Protons von der Hydroxy- auf die Sulfonsäuregruppe.

Insgesamt illustrieren die Beispiele von Naphthalin-1,5-disulfonat und der Hydroxynaphthalinsulfonate eine Reihe von typischen Merkmalen von ESIMS- und Tandem-MS-Spektren aromatischer Sulfonate. Die Spektren werden von den Molekülonen sowie von wenigen intensiven Fragmenten dominiert. Als diagnostische Fragmente treten das $\text{SO}_3^{\cdot-}$ -Radikalanion (m/z 80) sowie intensive Fragmente aufgrund von SO_2 -, SO_3 - und CO-Eliminierungen auf. Bei einigen Hydroxynaphthalinsulfonaten wird zudem ein Verlust von HSO_2 beobachtet. Die

Produktions-Spektren von Positionsisomeren weisen nur dann deutliche Unterschiede auf, wenn es zu „ortho-Effekten“, d.h. der Beeinflussung benachbarter Substituenten am aromatischen Ring, kommt. Für die Strukturaufklärung bedeutet dies, dass Produktions-Spektren nur in Einzelfällen zur Unterscheidung von Positions-Isomeren herangezogen werden können. Für die quantitative Analytik mit LC-MS bedingt dieses Verhalten die Notwendigkeit der chromatographischen Trennung von Positionsisomeren.

2.2 Analytik polymerer Naphthalinsulfonate

Die Bedeutung von polymeren Kondensaten aus Naphthalinsulfonat und Formaldehyd als sehr wichtige Quelle von aromatischen Sulfonaten in der aquatischen Umwelt wurde schon in der Einleitung dargestellt (s. Kap. 1.2.3, S. 9). Neben einfachen spektrophotometrischen Verfahren wurde in der Literatur zur Analytik dieser Polymere vom Einsatz der Ionenchromatographie (IC) [91], der Ionenpaarchromatographie (IPC) [91, 92], der Kapillarelektrophorese (CE) [116] und der Pyrolyse-GC-MS [179] berichtet. Die chromatographische Auflösung von einzelnen Oligomeren bis zu einem Kondensationsgrad von 21 gelang Piotte et al. [92] mit HPLC. Es fehlte jedoch an analytisch reinen Standards, um die einzelnen Oligomere von SNFC getrennt quantitativ erfassen zu können. Dies ist jedoch eine notwendige Voraussetzung, um das Verhalten dieser komplexen Gemische in der aquatischen Umwelt vollständig erfassen zu können. Diesem Ziel kamen Redin et al. [16] durch Synthese von drei isomeren Dimeren von SNFC näher. Sie konnten so erstmals einzelne Oligomere von SNFC in Umweltproben identifizieren und quantitativ erfassen. Die dabei verwendete Chromatographie war zur Erfassung höherer Oligomere jedoch nicht geeignet. Im folgenden werden die Ergebnisse der in Zusammenarbeit mit C. Wolf und F.-T. Lange (DZGW-Technologiezentrum Wasser, Karlsruhe) durchgeführten Entwicklungsarbeiten an einer HPLC-Methode zur Erfassung von SNFC beschrieben.

2.2.1 Massenspektrometrisches Verhalten von SNFC

Die Charakterisierung von SNFC durch ESI-MS ist dadurch erschwert, dass Polyanionen in der Regel nur sehr unempfindlich zu detektieren sind. Dieses Verhalten erklärt sich aus der Neigung von Polyanionen, insbesondere ihrer Natrium- und Kaliumsalze, zur Bildung von größeren Clusterionen beim Ionisierungsprozess [165, 171, 180]. Die Entfernung von Kationen wie Natrium und Kalium aus der Probenlösung, z.B. mit starken Ionentauschern, wurde daher als probates Mittel zur Verbesserung des massenspektrometrischen Verhaltens propagiert [181]. Das ESI-Massenspektrum von einer mit einem starken Kationentauscher in der H⁺-Form entsalzten SNFC-Probe zeigte Molekülionen von Oligomere bis zu einem Polymerisationsgrad von 9 (s. Abb. 2.4). Auffällig war hier, dass die Oligomere

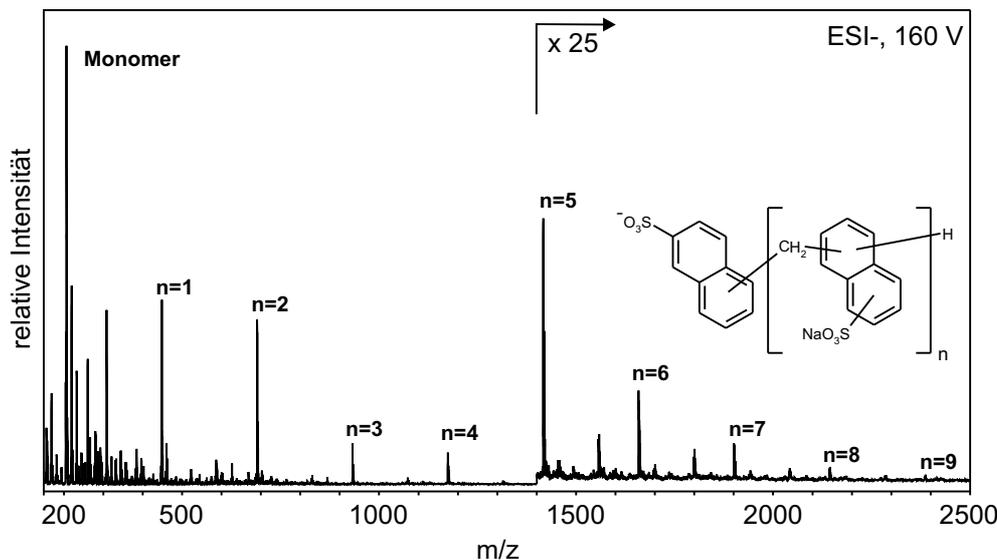


Abbildung 2.4 ESI-Massenspektrum von SNFC. Die Probe wurde mit einem starken Kationentauscher in der H^+ -Form entsalzt. Es werden einfach geladene Molekülanionen bis zum Polymerisationsgrad von 10 (das entspricht $n = 9$ in der Strukturformel) detektiert, Natriumaddukte stellen die prominentesten Peaks des Spektrums.

trotz Entsalzung noch immer als einfach negativ geladene Polynatriumaddukte beobachtet wurden.

Die Ermittlung von Molgewichtsverteilungen von Polymergemischen über ESI Massenspektren ist durch die variablen Responsefaktoren der einzelnen Homologen über den Massenbereich erschwert [126, 182]. Im allgemeinen wird eine Diskriminierung höherer Massen beobachtet. Der Vergleich von Ergebnissen der ESIMS und der Gelpermeationchromatographie (GPC) führt besonders bei polydispersen Molgewichtsverteilungen zu Unterschieden [183, 184]. Bei der Untersuchung von SNFC wurde deutlich, dass sich ESIMS nicht zur Charakterisierung des mittleren Molgewichtes des Polymers eignen würde. Die im Massenspektrum beobachtete Massenverteilung entsprach nicht der über HPLC mit Fluoreszenzdetektion (HPLC-FLD) ermittelten. Darüber hinaus konnten Oligomere mit einem Polymerisationsgrad über 10 im MS nicht detektiert werden.

Ohne Entsalzungsschritt wurden im ESI-Massenspektrum keine einfach geladenen Molekülanionen von SNFC beobachtet, sondern Polyanionen der Di- bis Hexamere im Massenbereich von m/z 213 bis m/z 217 (s. Abb. 2.5 A). Die Massenaufösung betrug hier $m/\Delta m = 1815$ (Peakbreite bei 10% Peakhöhe des Dianions des Dimers, m/z 213) und war ab dem Tetrameren nicht mehr ausreichend, die einzelnen mehrfach geladenen Polyanionen zu trennen. Die mehrfach geladenen Molekül-Ionen des Dimeren ($C_{21}H_{14}S_2O_6$), Trimeren ($C_{32}H_{21}S_3O_9$), Tetra-

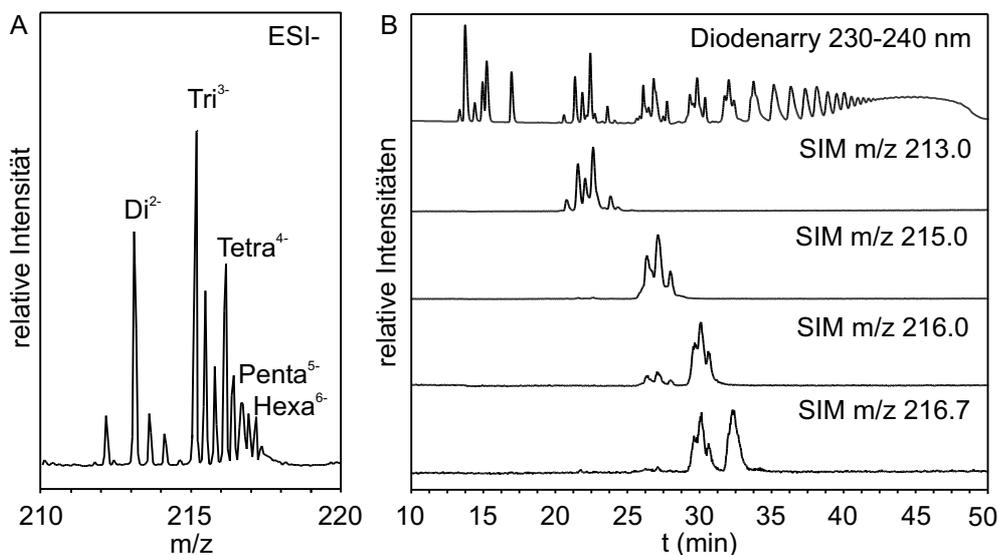


Abbildung 2.5 Bestimmung der Elutionsreihenfolge von SNFC über LC-MS. **A** Ohne Entsalzung konnten im ESI-MS von SNFC nur die Polyanionen der einzelnen Oligomere bis hin zum Hexameren detektiert werden. Die Massenauflösung betrug in diesem Fall $m/\Delta m = 1815$, ab dem Tetrameren kam es zu isobaren Überlagerungen. **B** LC-MS mit SIM-Detektion der Polyanionen konnte zur Ermittlung der Elutionsreihenfolge bis hin zum Pentameren verwendet werden. Die Massenauflösung wurde hier aus Empfindlichkeitsgründen mit $m/\Delta m = 403$ niedriger als im Spektrum **A** gewählt. Die Konzentration der SNFC-Probe (Setamol WS, Fa. Bayer) betrug 1 g/L. Trennbedingungen s. HPLC-Trennsystem 1, S. 133.

meren ($C_{43}H_{28}S_4O_{12}$) und Pentameren ($C_{54}H_{35}S_5O_{15}$) wurden im SIM-Modus in der HPLC-MS detektiert.

2.2.2 HPLC-Trennung

Die HPLC-Analytik von SNFC erforderte I) die chromatographische Trennung der Oligomeren, II) eine empfindliche Detektion, um die im aquatischen Bereich zu erwartenden niedrigen Konzentrationen erfassen zu können, und schließlich III) entsprechend reine Standards, um eine Quantifizierung zu ermöglichen. Das Ziel der Trennung der Oligomere wurde schon teilweise von Piotte et al. [92] erreicht, und konnte in Zusammenarbeit mit C. Wolf und F.-T. Lange (DVGW-Technologiezentrum Wasser, Karlsruhe) in verbesserter Form reproduziert werden. Die Trennung erforderte eine spezielle stationäre Phase⁵ und konnte nur mit einer mobilen Phase aus Acetonitril (ACN) und Tetrabutylammoniumbromid (TBABr) als Ionenpaarreagenz erreicht werden.

⁵In ausgedehnten Tests erwies sich Hypersil ODS 5 μ m als einziges geeignetes Material [78].

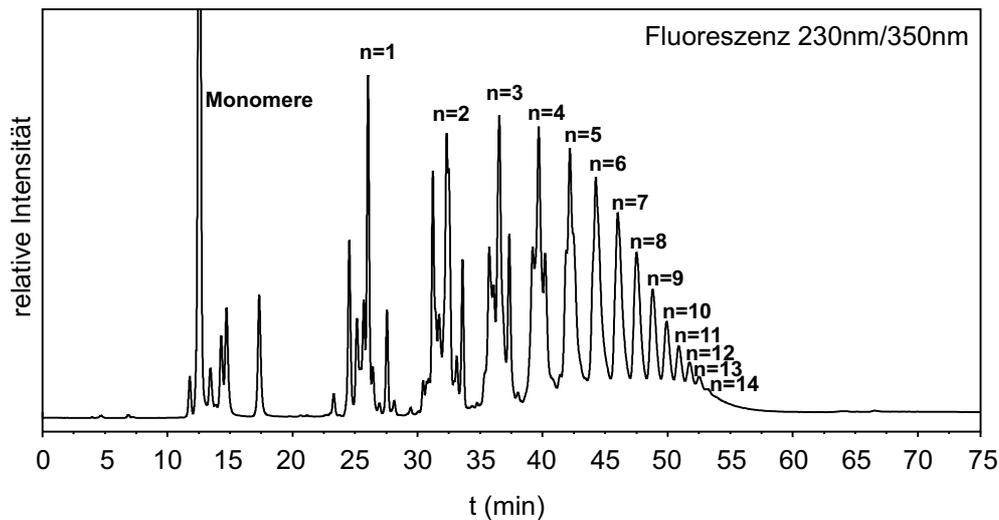


Abbildung 2.6 HPLC-FLD-Chromatogramm von SNFC. Die Detektion erfolgte mit Fluoreszenz (Excitation 230 nm, Emission 350 nm). Es wurden Oligomere mit einem Polymerisationsgrad bis 15 aufgelöst (entspricht $n=14$, s. Strukturformel in Abb. 2.4, Trennbedingungen s. HPLC-Trennsystem 1, S. 133). Die Methode wurde in Zusammenarbeit mit C. Wolf u. F.-T. Lange (DVGW-TZW, Karlsruhe) entwickelt und dort durch den Einsatz von analytischen Standards (gewonnen durch Isolierung einzelner Oligomere über präparative HPLC) zu einer quantitativen Methode ausgebaut [79].

Die Elution erfolgt entsprechend dem Polymerisationsgrad, wie sich über HPLC-ESIMS zeigen ließ (s. Abb. 2.5 B). Die Erfassung der SNFC-Oligomere gelingt mit HPLC-ESIMS jedoch nur bis zum Pentameren. Gleichzeitig wurde deutlich, dass aufgrund der sehr geringen Empfindlichkeit ESIMS kein geeigneter Ansatz zur Erfassung von SNFC im Spurenbereich sein kann. Selbst im hoch empfindlichen SIM-Modus waren Konzentrationen im g/L-Bereich notwendig, um die einzelnen Oligomere zu detektieren. Als Ursache für diese geringe Empfindlichkeit konnte die Unterdrückung der Ionisierung durch das nicht-flüchtige Ionenpaarrea-genz TBABr vermutet werden, eine generell geringere Detektions-Empfindlichkeit bei ESIMS für Polyanionen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zur massenspektrometrischen Detektion können mit der Fluoreszenz-Detektion (FLD, Excitationswellenlänge 230 nm, Emissionswellenlänge 350 nm) SNFC-Oligomere im wesentlichen unabhängig von ihrem Kondensationsgrad erfasst werden (s. Abb. 2.6).

Eine quantitative HPLC-FLD-Methode wurde am DVGW Technologiezentrum Wasser, Karlsruhe, entwickelt und zur Erfassung der einzelnen Oligomere herangezogen. Dazu wurden synthetisch und über präparative HPLC analytische Standards gewonnen. Die über präparative HPLC gewonnenen reinen Homologe wurden nur in sehr geringen Mengen isoliert, die Gehaltsbestimmung der isolierten Fraktionen musste dementsprechend über eine Bestimmung des Schwefelge-

halts mit ICP-AES erfolgen. In Verbindung mit einem off-line Festphasenextraktions-Verfahren (SPE) konnten mit der Methode bei Wiederfindungen von 73% bis 85% in Oberflächenwasser Nachweisgrenzen im Bereich von 3-8 ng/L für die einzelnen Homologen erreicht werden [79]. SNFC wurden von Wolf et al. [78, 79] in Kläranlagenabläufen, Oberflächenwasser und Grundwasser nachgewiesen und quantitativ erfasst. Dabei spielten nur die ersten 4 Kondensationsstufen im Bereich von Oberflächen und Grundwasser eine Rolle.

2.3 Exakte Massenbestimmung

Exakte Massenbestimmungen werden als Routine-Methode der Massenspektrometrie zur Ermittlung und Bestätigung von Elementarzusammensetzungen organischer Verbindungen [146, 185, 186] eingesetzt. Als exakt werden Massenbestimmungen üblicherweise dann bezeichnet, wenn die ermittelten Massen einen relativen Fehler⁶ von weniger als ± 5 ppm aufweisen [187]. Dies stellt hohe Anforderungen an die Genauigkeit und Präzision der Messung. Doppelfokussierende Sektorfeld- [146, 188, 189, 190] und FTICR-Massenspektrometer [191, 192] werden hierfür bevorzugt, da ihre sehr große Massen-Auflösung⁷ die Wahrscheinlichkeit von isobaren Interferenzen verringert.

Massenspektrometer mit niedriger oder mittlerer Massen-Auflösung⁸ können für exakte Massenbestimmungen gleichwohl eingesetzt werden. Die Präzision und Genauigkeit bei niedriger bis mittlerer Auflösung mit einfach- [193] und doppeltfokussierenden [194] Sektorfeldgeräten, Quadrupol- [195, 196, 197, 198] und Time-Of-Flight-Massenspektrometern (TOFMS) [199, 200, 201, 202] ist für die Ermittlung und Bestätigung von Elementarzusammensetzungen geeignet.

In einem bestimmten Fehlerintervall korrespondiert zu einer gegebenen exakten Masse eine finite Anzahl von Elementarzusammensetzungen. Diese Anzahl steigt exponentiell mit steigender Anzahl der im Molekül enthaltenen Elemente an [186]; d.h. je größer das Molekulargewicht ist und je mehr Elemente in einem Molekül vorhanden sein können, desto größer wird die Menge der möglichen Elementarzusammensetzungen. Üblicherweise wird ein Fehlerintervall von ± 5 ppm für exakte Massenbestimmungen akzeptiert [187], dies garantiert jedoch ab einem Molekulargewicht von etwa 150 Da [145] keine eindeutige Bestimmung von Elementarzusammensetzungen mehr⁹. Zur Ermittlung der Elementarzusammensetzung und damit der Summenformel unbekannter Verbindungen [203, 204, 205, 206] ist daher in der Praxis die exakte Masse des Molekülions

⁶ $((m_{\text{berechnet}} - m_{\text{gemessen}})/m_{\text{berechnet}}) \cdot 10^6 = \Delta m_{\text{ppm}}$

⁷ $A = m/\Delta m > 10000$

⁸ $A = m/\Delta m < 500$ bzw. $A = m/\Delta m = 500 - 10000$

⁹Der absolute Fehler in mmu $((m_{\text{berechnet}} - m_{\text{gemessen}}) \cdot 10^3 = \Delta m_{\text{mmu}})$ ist in Bezug auf Quadrupol- und TOF-Massenspektrometer ein aussagekräftigerer Parameter als der relative Fehler in ppm, da der relative Fehler in ppm von der Masse des Analyten abhängt. Nur bei Sektorfeld-Massenspektrometern ist der relative Fehler unabhängig von der Masse.

allein nicht hinreichend. Die gemeinsame Auswertung der exakten Massen von Molekülonen und ihren Fragmenten erlaubt jedoch in vielen Fällen die Ermittlung der Elementarzusammensetzung unbekannter Verbindungen [207]. Die Listen der den exakten Massen der Molekülonen und Fragmente entsprechenden Summenformeln werden dazu auf ihre Konsistenz geprüft. Die exakten Massendifferenzen von Molekülonen und Fragmenten sowie der Fragmente untereinander können wertvolle Hinweise auf Art und Anzahl der im Molekül enthaltenen Elemente liefern. Hochauflösende Massenspektrometer erlauben die Unterscheidung von ^{13}C -, ^{15}N und ^{34}S -Isotopomeren der $[M + 1]$ - und $[M + 2]$ -Isotopenpeaks. Dies kann einen direkten Zugang zur Elementarzusammensetzung des Molekülonen bieten [208, 209, 210, 211]. Oftmals können den Massenspektren (z.B. Produktionspektren [210]) oder anderen spektroskopischen Daten Informationen entnommen werden, die eine eindeutige Identifizierung von Elementarzusammensetzungen im Rahmen der integrierten Strukturaufklärung erlauben [212].

Neben der Bestätigung oder Ermittlung von Elementarzusammensetzungen können exakte Massen in Verbindung mit chromatographischen Trenntechniken zur hoch-selektiven Detektion von Target-Substanzen eingesetzt werden, da die höhere Massengenauigkeit eine effektive Reduktion des chemischen Rauschens erlaubt. Mit Sektorfeld- [208, 209] und TOF-Massenspektrometern [213] lassen sich mit dieser Technik sehr gute Nachweisempfindlichkeiten erreichen. Quadrupol-Massenspektrometer hingegen erreichen bei den für die exakte Massenbestimmung nötigen Massen-Auflösungen nur vergleichsweise schlechte Nachweisempfindlichkeiten.

Eine geringe Massen-Auflösung kann jedoch bei der direkten Analyse von Mischungen zu Problemen durch isobare Interferenzen führen. Durch die on-line Kopplung zu leistungsfähigen chromatographischen Trenntechniken können diese Probleme minimiert werden. Daher sind die Vorteile von Quadrupol- und TOF-Massenspektrometern bei der Kopplung zu GC, HPLC und CE auch für exakte Massenbestimmungen nutzbar. Insbesondere die neueren TOF-Massenspektrometer eignen sich aufgrund des hohen „duty-cycles“, sehr guter Empfindlichkeit bei Nutzung des gesamten Massenbereichs sowie der hohen Massengenauigkeit hierfür hervorragend. Sowohl die Kopplung mit CE- [214] als auch mit HPLC-Trenntechniken [201, 213, 215, 216] wurde beschrieben. Interessante Anwendungen für TOF-Massenspektrometer ergeben sich auch im Bereich der MS-Kopplung schneller GC-Trenntechniken [159, 217, 218]. Die experimentell etwas aufwändigere exakte Massenbestimmung mit Quadrupol-Massenspektrometern ist ebenfalls routinemäßig mit GC- [219] und HPLC-Trenntechniken [220] koppelbar. Letztere – im Rahmen dieser Arbeit entwickelte – Methode wird im Folgenden eingehender dargestellt.

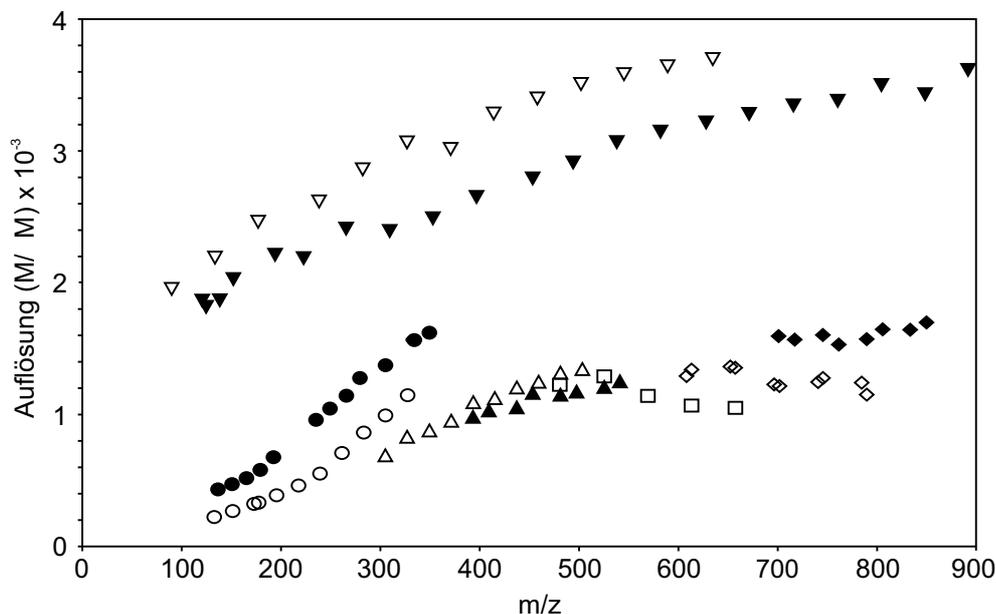


Abbildung 2.7 Auflösung $m/\Delta m$ von Quadrupol-MS und TOFMS. Die Peakbreite Δm in den Massenspektren der zur Massenkalisierung verwendeten Referenzsubstanzen (s. Fußnote 11, S. 37) wurde in verschiedenen Scan-Bereichen bei 10% der Peakhöhe bestimmt (10% valley - Definition). Messwerte für ESI+ in offenen, für ESI- in geschlossenen Symbolen. **Quadrupol-MS:** ○: m/z 125 - m/z 325; △: m/z 300 - m/z 500; □: m/z 475 - m/z 675; ◇: m/z 600 - m/z 800; ●: m/z 135 - m/z 335; ▲: m/z 375 - m/z 535; ◆: m/z 675 - m/z 850. **oa-TOFMS:** ▽: m/z 50-650; ▼: m/z 100 - m/z 1000.

2.3.1 Exakte Massenbestimmungen mit Quadrupol-MS

Für die exakte Massenbestimmung mit dem Quadrupol-Massenspektrometer wurde mit höherer Massenauflösung ($m/\Delta m$)¹⁰ gearbeitet als im Routinebetrieb. Die Auflösung hängt bei Quadrupol-Massenspektrometern stark von der Masse ab. Bei den vorliegenden Arbeiten wurden Auflösungen zwischen 200 und 1800 verwendet (s. Abb. 2.7). Für die exakte Massenbestimmung ist die genaue Erfassung der Peakform der einzelnen Massenpeaks entscheidend. Eine hohe Digitalisierungsrate (128 Datenpunkte/Da) war damit eine der Voraussetzungen der Messung [197]. Aus Empfindlichkeitsgründen wurden kleine Scanbereiche von 180 Da – 230 Da gewählt. Die Massenspektren wurden intern kalibriert. Dazu wurden Referenzsubstanzen¹¹ nach der HPLC-Trennung über ein T-Stück zum

¹⁰Auflösungen werden entsprechend der „10% valley“-Definition angegeben, d.h. Δm wurde bei 10% der Peakhöhe bestimmt. Diese Definition liefert ca. 50% niedrigere Werte als die FWHM-Methode (FWHM: Full Width Half Maximum).

¹¹Für positive Ionisierung wurden Polyethylenglykole (PEG), Polypropylenglykole (PPG) und Polyethylenmonomethylether (PEGMME) verschiedener mittlerer Molekulargewichte, für negative Ionisierung Laurylethersulfate (SLES), Polyethylenglykolsulfopropylether (PEGSPE)

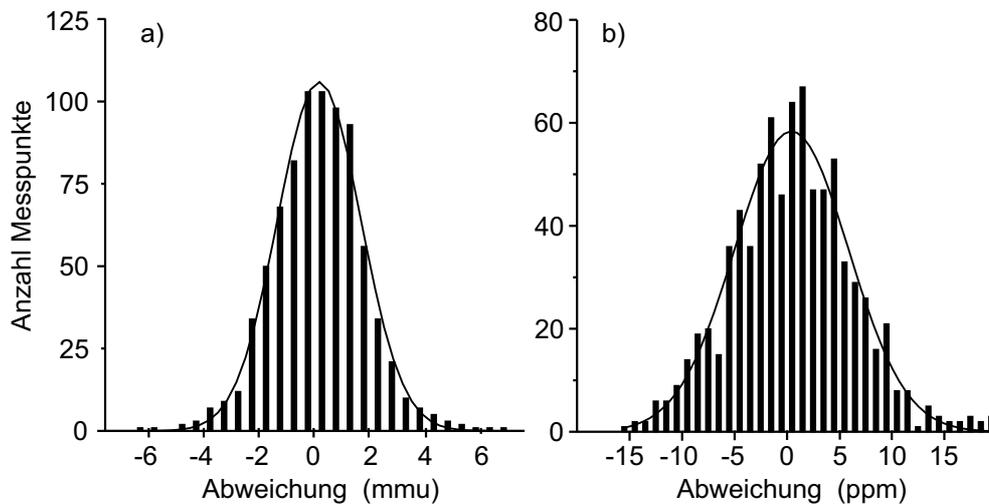


Abbildung 2.8 Fehlerverteilung der exakten Massenbestimmung mit dem Quadrupol-MS. Dynamische Probenaufgabe über HPLC-Kopplung, Trennbedingungen s. HPLC-Systeme 2, S. 133, und 3, S. 133. **a)** Absolute Fehler (mmu) und **b)** relative Fehler (ppm) von 808 Einzelmessungen. Die Gauss-Anpassung der Messwerte ergab einen mittleren Fehler von 0.1 mmu (0.45 ppm). Die Standardabweichung (σ) war ± 1.5 mmu (± 5.4 ppm), das 99.7%-Konfidenzintervall ($3\cdot\sigma$) ist damit ± 4.5 mmu (± 16.2 ppm).

Eluentenstrom addiert. Die Probenaufgabe erfolgte über die HPLC. Für die chromatographischen Bedingungen ergaben sich aus der Detektion mit exakter Massenbestimmung keine zusätzlichen Einschränkungen¹². Daher konnten die auch für andere Fragestellungen verwendeten HPLC-Methoden ohne Modifikationen angewandt werden. Es wurden 30 Testverbindungen ausgewählt¹³.

Um die bei diesem Verfahren auftretenden Messfehler zu bestimmen, wurden 808 Einzelmessungen ausgewertet¹⁴. Es wurden Analyten im Massenbereich von m/z 157 – m/z 796 verwendet. Die Messungen erfolgten je nach Substanz mit positiver oder negativer Ionisierung. Die Messfehler waren Gauss-verteilt (s. Abb. 2.8), die Gaussanpassung der Fehlerverteilung ergab einen mittleren Fehler von 0.1 mmu (0.45 ppm). Dies belegte die exzellente Genauigkeit der Methode,

verschiedener mittlerer Molekulargewichte und C4 – C18 n-Alkylsulfonate verwendet [220]. Diese Kalibriersubstanzen wurden sowohl mit dem Quadrupol-MS als auch mit dem TOFMS verwendet. Hinweise auf alternative Referenzsubstanzen für exakte Massenbestimmungen mit Elektrospray-Ionisierung finden sich in der Literatur [197, 221, 188].

¹²Aus der Verwendung des T-Stücks ergab sich keine spürbare Peakverbreiterung, die Flussraten mussten nicht angepasst werden.

¹³Es handelte sich bei den Testsubstanzen hauptsächlich um aromatische Sulfonamide (positive Ionisierung) und aromatische Sulfonate (negative Ionisierung), die durch einige Substanzen ergänzt wurden, um den gesamten Massenbereich von m/z 157 bis m/z 796 abzudecken.

¹⁴Dabei umfasste jede Einzelmessung die Summation von minimal 5 Scans, die dann intern kalibriert wurden.

weiterhin konnten schwere systematische Fehler ausgeschlossen werden. Die etwas inhomogenere Verteilung der Messfehler bei der Darstellung als relative Fehler (s. Abb. 2.8 b) kann möglicherweise auf die ungleiche Verteilung der Testsubstanzen über den Massenbereich von m/z 157 bis m/z 796 zurückgeführt werden. Die Standardabweichung (σ) betrug ± 1.5 mmu (± 5.4 ppm), das zur Beschreibung der Präzision der Methode geeignete 99.7% Konfidenzintervall ($3\cdot\sigma$) [222] lag bei ± 4.5 mmu (± 16.2 ppm). Die Präzision war damit etwas geringer als die von Taylor et al. für Direktinfusionsexperimente mit einem vergleichbaren Quadrupol-MS erreichte [197]. Hierfür können neben den höheren Konzentrationen bei der statischen Probenaufgabe die bei der dynamischen Probenaufgabe erforderlichen experimentellen Bedingungen (z.B. continuum-mode (CM) statt multi-channel-acquisition (MCA), größere Scan-Bereiche) verantwortlich sein. Die mit einem Quadrupol-MS bei dynamischer Probenaufgabe mit GC-MS [219] erreichte Präzision war mit 5 mmu (25 - 8 ppm) etwas geringer als die hier vorgestellte. Dort wurde jedoch eine andere Methode zur Massen-Kalibrierung angewandt (Kalibrierung eines vollständigen Chromatogramms anhand von bekannten Molekülonen und Fragmenten), die zu dieser etwas geringeren Präzision geführt haben könnte.

Für die 30 Testverbindungen wurden die Ergebnisse von jeweils 10 exakten Massenbestimmungen gemittelt und mit den theoretischen Massen verglichen (s. Tab. B.1, Anh. B.1, S. 139). Es zeigte sich, dass in fast allen Fällen eine Konzentration von 1 mg/L (20 ng absolut bei 20 μ L Injektionen) ausreichend war, um eine exakte Masse innerhalb des allgemein akzeptierten Fehlerbereiches von ± 5 ppm [187] zu erhalten. Die zugänglichen Konzentrationsbereiche lassen eine direkte Untersuchung z.B. von höher konzentrierten Abwasserproben oder Laborversuchen aussichtsreich erscheinen. Darüber hinaus lagen die maximalen Fehler typischerweise unter 3 mmu und überstiegen in keinem Fall 6.6 mmu. Daher schienen auch Einzelmessungen zur Untersuchung von unbekanntem Analyten verwendbar zu sein.

Über die Kalibrierung von vollständigen Chromatogrammen gelang es, extrahierte Ionenchromatogramme auf sehr kleine Massenbereiche zu beschränken. Die daraus resultierenden so genannten „limited mass range chromatograms“ konnten zur selektiven Detektion von Verbindungen bestimmter Elementarzusammensetzung herangezogen werden. Der minimale Massenbereich wurde dabei vom 99.7% Konfidenzintervall (± 4.5 mmu) der exakten Massenbestimmung bestimmt. Ein Beispiel dafür zeigt Abbildung 2.9. Das extrahierte Ionenchromatogramm von m/z 222.8 bis m/z 223.8 entspricht dem üblicherweise verwendeten Massenbereich von ± 0.5 u bei Einheitsauflösung. Es waren fünf chromatographische Signale (A-E, Abb. 2.9) sichtbar. Diese entsprachen den Molekülanionen zweier Hydroxynaphthalinsulfonate ($C_{10}H_7SO_4$, 223.0065 u, Abb. 2.9 a), B u. D), den $[M+1]$ -Isotopenpeaks zweier Aminonaphthalinsulfonate (Hauptbeitrag von $^{13}CC_9H_8NSO_3$, 223.0259 u, Abb. 2.9 b), A u. C.) und dem $[M - SO_2 - H]^-$ -Fragment von Anthrachinon-2-sulfonat ($C_{14}H_7O_3$, 223.0395 u, Abb. 2.9 b), D). Die relativen Massendifferenzen zwischen letzteren Ionen und den Molekülanionen

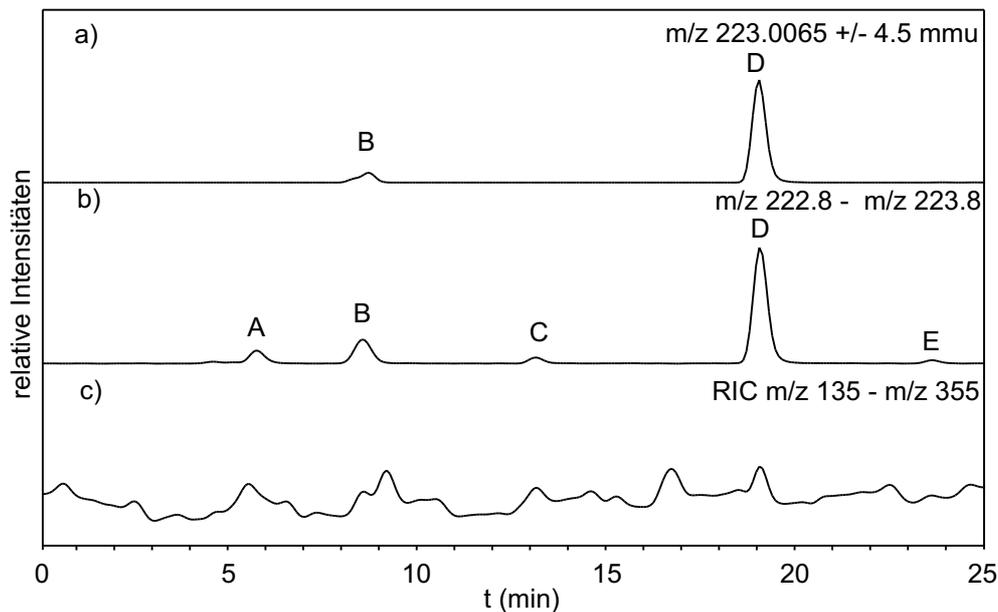


Abbildung 2.9 Hochselektive Detektion von aromatischen Sulfonaten mit „limited mass range chromatograms“. **a)** Die Hydroxynaphthalinsulfonate B und D werden in einem exakten Massen-Chromatogramm (m/z 223.0065 \pm 4.5 mmu) selektiv detektiert. **b)** Die isobaren ^{13}C -Isotopenpeaks zweier Aminonaphthalinsulfonate A und C und das ebenfalls isobare $[\text{M} - \text{SO}_2 - \text{H}]^-$ -Fragment von Anthrachinon-2-sulfonat E werden im 1 Da Fenster (m/z 222.8 – m/z 223.8) zusammen mit den Substanzen B und D erfasst. **c)** Reconstructed ion current. Die Konzentrationen war für alle Substanzen 1 mg/L. Trennbedingungen s. HPLC-Trennsystem 2, S. 133.

der Hydroxynaphthalinsulfonate betragen 87 ppm bzw. 148 ppm. Ohne chromatographische Trennung wäre zur Bestimmung der exakten Massen dieser Analyten ein Massen-Auflösungsvermögen von 11495 bzw. 6758 nötig. Wird der Massenbereich in der Chromatographie auf m/z 223.0065 \pm 4.5 mmu eingeschränkt, können die Hydroxynaphthalinsulfonate selektiv nachgewiesen werden (Abb. 2.9 a, Peak B u. D). Der Einsatz dieser sehr selektiven Detektionsmethode bleibt im Fall des Quadrupol-MS jedoch auf die Untersuchung von vergleichsweise hochkonzentrierten Mischungen beschränkt.

Die exakte Massenbestimmung war mit einem Quadrupol-Massenspektrometer folglich auch bei dynamischer Probenaufgabe mit HPLC möglich. Die erreichbare Genauigkeit und Präzision war zur Ermittlung von Elementarzusammensetzungen unbekannter Verbindungen zumindest bis in den Bereich mittlerer Molekulargewichte ausreichend. Die Verlässlichkeit der Methode wurde durch unabhängig mit HPLC-*oa*-TOFMS bestimmte exakte Massen abgesichert (s.u.).

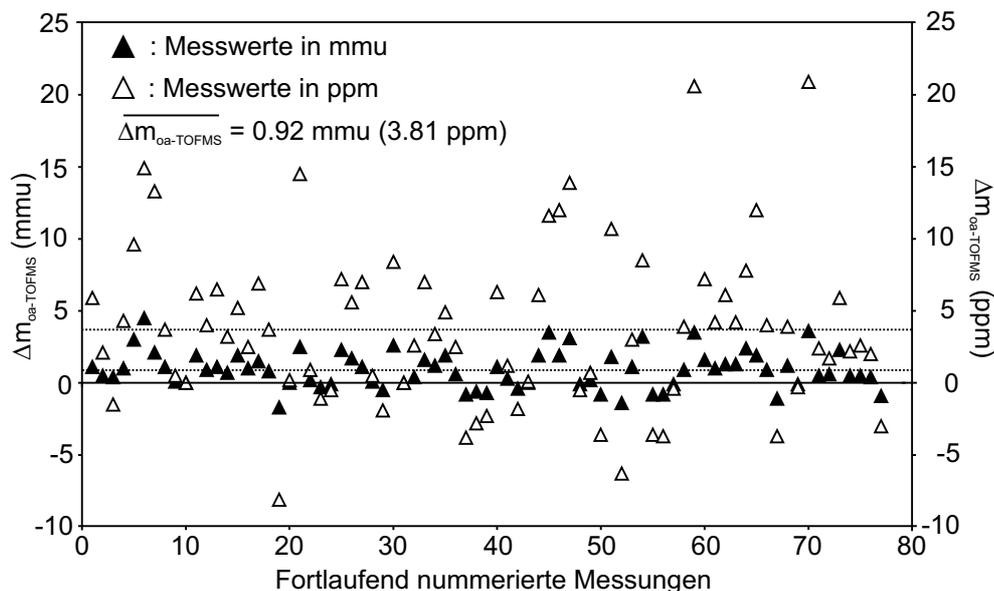


Abbildung 2.10 Messfehler in mmu und ppm bei der exakten Massenbestimmung mit HPLC-oa-TOFMS mit negativer Ionisierung. Es wurden vier Chromatogramme einer Standard-Mischung aromatischer Sulfonate (19 Komponenten, Molekülonen von m/z 157 bis m/z 367, Konzentration 1 mg/L) ausgewertet. Die Fehler (\blacktriangle = mmu und \triangle = ppm) haben Mittelwerte von 0.92 mmu bzw. 3.81 ppm (durchbrochene Linien).

2.3.2 Exakte Massenbestimmungen mit oa-TOFMS

Schon bald nach der Kommerzialisierung von TOF-Massenspektrometern mit orthogonaler Beschleunigung der Ionen [153] wurde gezeigt, dass mit oa-TOFMS exakte Massenbestimmungen durchgeführt werden können [194], die den üblichen Anforderungen an die Genauigkeit und Präzision derartiger Messungen gerecht werden. Exakte Massenbestimmung mit oa-TOFMS wurden dementsprechend in einer Vielzahl von Anwendungen genutzt [202, 213, 214, 215].

Ein besonderer Vorteil der Methode ist, dass aufgrund des einfachen mathematischen Zusammenhangs zwischen Flugzeit und Masse¹⁵ die interne Massenkali- brierung der Massenspektren über nur eine Referenzmasse (Lock-Masse) erfolgen kann. Damit wird die Gefahr von isobaren Überlagerungen durch Massenkali- briersubstanzen sehr stark reduziert.

Die exakte Massenbestimmung erforderte die genaue Kalibrierung des oa-TOFMS im gesamten Massenbereich¹⁶. Massen-Auflösungen von 2000 bis 4000 wurden erreicht (s. Abb. 2.7). Die Intensitäten der Lock-Masse wurde für die exakte Massenbestimmung auf ungefähr 100 bis 500 cts/s eingestellt, um Sät-

¹⁵s.a. Gl. 1.2, S. 19

¹⁶Als Referenzsubstanzen wurden die auch für das Quadrupol-MS verwendeten Gemische aus Polymeren und Einzelstoffen verwendet, s. Fußnote 11, S. 37.

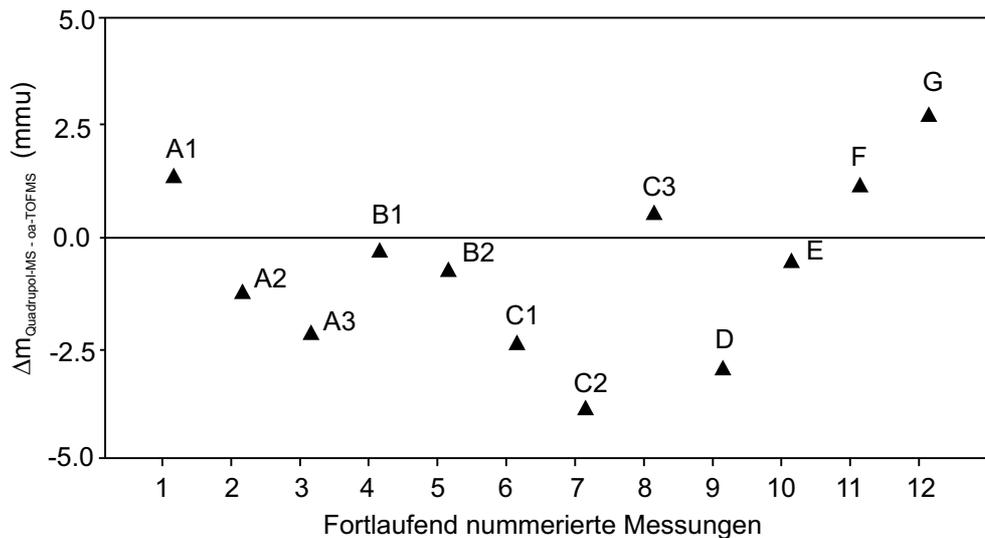


Abbildung 2.11 Massendifferenzen zwischen exakten Massenbestimmungen mit Quadrupol-MS und oa-TOFMS ($\Delta m_{\text{Quadrupol-MS} - \text{oa-TOFMS}}$). A1-A3, B1-B2 und C1-C3 sind die Molekülanionen bzw. Fragmente einer unbekannt-ten Verbindung in einer anaerob behandelten Textilabwasser-Probe (Metabolit M, s. Abb. 3.16, S. 89). Die Probe wurde dreifach analysiert, Fragment B wurde bei einer der Analysen mit dem TOFMS nicht detektiert. D und E sind die Molekülanionen einer Verbindung mit der nominalen Masse m/z 450 in unbehandeltem Textilabwasser. F und G sind die Molekülanionen von aerob gebildeten Sulfonamid-Metaboliten mit den nominalen Massen m/z 98 und m/z 156, s. [223].

tigungsphänomene des Detektors zu vermeiden, die zu Fehlern bei der exakten Massenbestimmung führen können. Bei vielen Referenz-Substanzen (wie z.B. Leucin-Enkephalin) bereitet dies Schwierigkeiten, da die Ionisierung bei der Gradientenelution vom steigenden Organikgehalt in der mobilen Phase zu stark beeinflusst wird [215]. Bei den hier beschriebenen Arbeiten wurde bei positiver Ionisierung das protonierte Molekülion von TrBA ($\text{C}_{12}\text{H}_{28}\text{N}$, 186.2222 u) und bei negativer Ionisierung das Molekülanion von Perfluorooctansulfonat (POA: Perfluorooctanesulfonic Acid) ($\text{C}_8\text{F}_{17}\text{SO}_3$, 498.9297 u) als Lock-Masse verwendet. Letztere ermöglichte Gradientenprofile von 10% bis 80% Methanol, da die Ionisierung nur wenig vom Organikgehalt beeinflusst wurde¹⁷.

Die Genauigkeit und Präzision konnte für die HPLC-oa-TOFMS nicht über eine Gauss-Anpassung der Messfehler beschrieben werden, da die Anzahl der insgesamt für bekannte Substanzen durchgeführten Messungen zu gering war. Die bei 76 Messungen (4 Chromatogramme, 19 Komponenten, Molekülanionen von m/z 157 bis m/z 367) bei negativer Ionisierung beobachteten Abweichungen

¹⁷Eine instrumentelle Lösung dieser Probleme bieten neuartige Interfaces, die mehrere Sprayer zur räumlich/zeitlichen Trennung von Referenzmasse und Probe nutzen [200, 201].

lagen alle unter ± 5 mmu (± 20 ppm, die relativen Fehler werden bei niedrigen Molekulargewichten größer) (s. Abb. 2.10) und entsprachen damit den für oa-TOFMS zu erwartenden Fehlerbereichen [194, 201, 214, 224]. Die Mittelwerte der absoluten Fehler (+ 0.92 mmu) und relativen Fehler (+ 3.81 ppm) deuteten auf einen leichten systematischen Fehler hin (s. Abb. 2.10) der seine Ursache möglicherweise in der Massenkalisierung des oa-TOFMS hatte.

Die Messfehler mit dem HPLC-oa-TOFMS waren mit den in der Literatur berichteten Fehlern vergleichbar [194]. Daher konnten mit dieser Methode erhobene Daten im Rahmen der integrierten Strukturaufklärung eingesetzt werden (s. Kap. 3.2.3, S. 73). Die bei bekannten Analyten festgestellten Fehler bei der Bestimmung von exakten Massen mit HPLC-Quadrupol-MS und HPLC-oa-TOFMS sind vergleichbar. Daher ist die Präzision beider Methoden sehr ähnlich. Auch bei der Bestimmung der exakten Massen von unbekanntem Analyten in Textilabwasser wurden mit beiden Methoden sehr ähnliche Werte gefunden. Die Abweichungen zwischen beiden Methoden lagen für eine Reihe von Verbindungen nicht über 3.5 mmu und damit im Bereich der Messgenauigkeiten (s. Abb. 2.11). Die beiden Methoden können folglich als äquivalent gelten.

2.4 Flüchtige Ionenpaarreagenzien

Eine Übersicht über die bei der Analytik aromatischer Sulfonate eingesetzten Methoden wie HPLC oder CE findet sich in der Einleitung (s. Kap. 1.3). Von diesen hat sich die Ionenpaarchromatographie (IPC) in der Praxis durchgesetzt, da mit IPC selbst die sehr polaren polysulfonierten Aromaten sehr gute Retentionseigenschaften aufweisen. Als Ionenpaarreagenzien (IP) werden hauptsächlich Tetraalkylammoniumsalze eingesetzt. Diese gut mit UV- oder Fluoreszenzdetektion verträglichen Reagenzien boten in Verbindung mit C18-Trennphasen eine mit herkömmlichen HPLC-Methoden vergleichbare Trenneffizienz. Zur Kopplung mit MS-Detektion waren diese nicht-flüchtigen IPs jedoch nur sehr eingeschränkt geeignet. Dies lag zum einen an dem sehr hohen chemischen Rauschen¹⁸ und der generellen Unverträglichkeit schwer flüchtiger Pufferbestandteile mit der HPLC-MS [117]. Äußerst störend wirkt sich zum anderen die starke Ionisierungssuppression durch Tetraalkylammoniumsalze bei ESIMS im negativen Modus aus [225], die besonders bei der Entwicklung von quantitativen LC-MS-Methoden nur sehr geringe IP-Konzentrationen erlaubt.

Mit der zur IPC alternativen Ionenchromatographie (IC) lassen sich im allgemeinen nur geringere Trenneffizienzen als mit RP-HPLC erreichen [42, 169]¹⁹. Daher wurde die effizientere IPC zur HPLC-MS-Analyse von aromatischen Sulfonaten häufiger eingesetzt. In der Literatur finden sich Beispiele für zwei Strate-

¹⁸z.B. durch Clusterionen aus Bromid und Tetrabutylammonium-Ionen.

¹⁹In einer neueren Arbeit wurden jedoch auch Hochleistungstrennungen aromatischer Sulfonate mit IC-MS beschrieben [108].

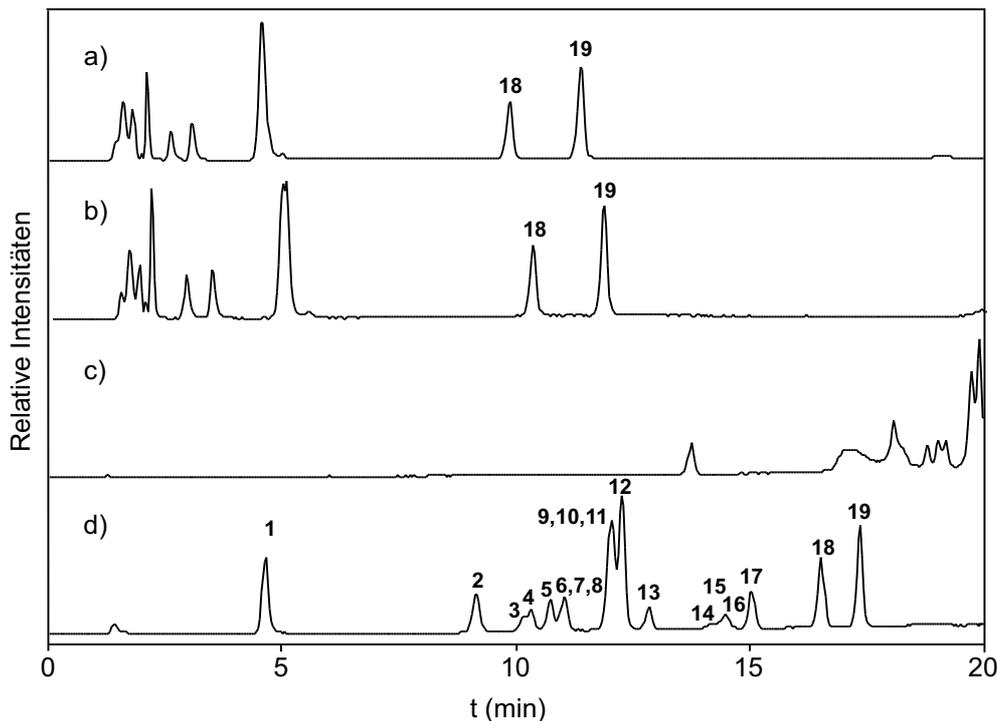


Abbildung 2.12 Chromatogramme eines Standardgemisches aromatischer Sulfonate (Zuordnung entsprechend Tab. 2.1, S. 45.) mit verschiedenen flüchtigen Ionenpaarreagenzien. **a)** TEA, **b)** DMBA und **c)** TrBA (2.5 mmol/L, 5% Methanol am Anfang des Gradienten) und **d)** TrBA (2.5 mmol/L, 30% Methanol am Anfang des Gradienten). Nur mit TrBA als Ionenpaarreagenz wiesen alle Komponenten des Standards selbst bei hohem organischen Anteil an der mobilen Phase eine ausreichende Retention auf. Trennbedingungen s. HPLC-Trennsystem 4, S. 133.

gien, die das Problem der MS-Kompatibilität schwerflüchtiger Ionenpaarreagenzien lösen sollen. Eine besteht in der Verwendung der üblichen nicht-flüchtigen IPs, die nach der Trennung z.B. mit Ionenaustauschern aus der mobilen Phase entfernt werden [96, 226]. Ein häufig beschrittener zweiter Weg ist die Verwendung von MS-kompatiblen flüchtigen IPs [61, 73]²⁰. Aus der Praxis der LC-MS-Analyse von polyanionischen Verbindungen wie Oligonukleotiden ist der Einsatz von Triethylamin (TEA) als flüchtigem IP wohlbekannt [225, 228, 229]. Dementsprechend wurde TEA z.B. in Arbeiten von Pocurull et al. [73] und Alonso et al. [60] auch als IP für die HPLC-MS aromatischer Monosulfonate verwendet. Die Anwendbarkeit von TEA stößt jedoch bei der Analyse von mehrfach sulfonierten aromatischen

²⁰Die für die Analyse einzelner Zielanalyte praktikable on-line Flüssig-Fest-Extraktion zwischen HPLC-Trennung und MS-Detektion kann mit IPC gekoppelt werden [227], ist jedoch für die in der Umweltanalytik übliche parallele Analyse mehrerer Zielanalyte unterschiedlicher Retentionszeiten ungeeignet.

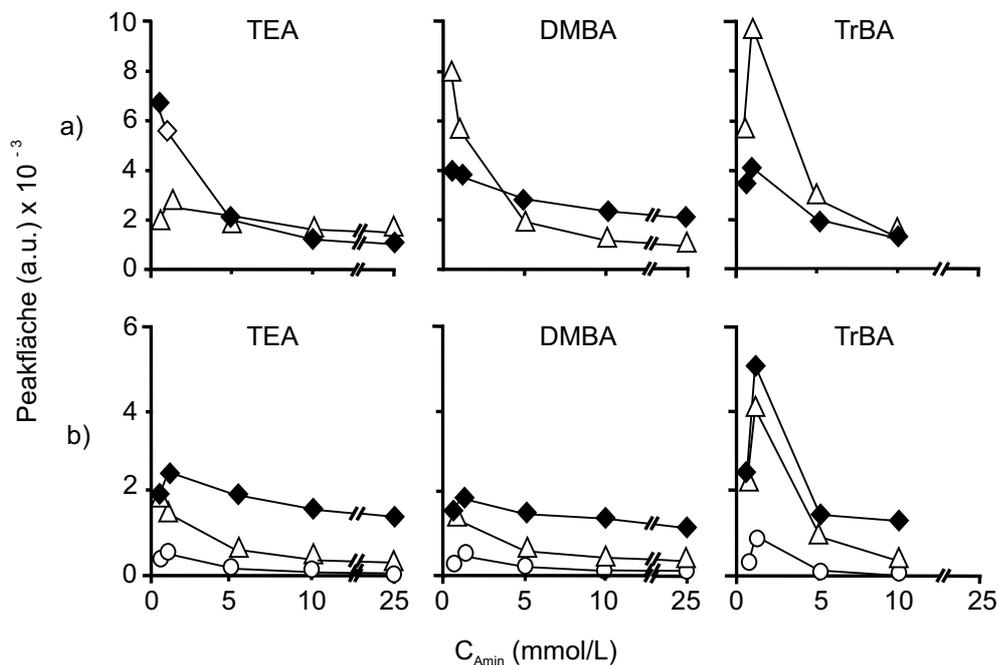


Abbildung 2.13 Abhängigkeit der massenspektrometrischen Empfindlichkeit von der IPC-Konzentration. **A** \blacklozenge Monoanion m/z 287 und \triangle Dianion m/z 143 von Naphthalin-1,5-disulfonat. **B** \blacklozenge Monoanion m/z 367, \triangle Dianion m/z 183 und \circ Trianion m/z 121 von Naphthalintrisulfonat.

Sulfonaten auf Grenzen. Hier sind für eine ausreichende Retention stärkere IPs wie das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Tributylamin (TrBA) [61] oder das von Holčapek et al. [97] vorgeschlagene Dihexylamin (DHA) notwendig. Ein genereller Nachteil der Verwendung tertiärer Amine als flüchtige IPs stellte jedoch der „Carry-over“ der IPs bei nachfolgenden Untersuchungen mit positiver Ionisierung dar [108].

Die Methodenentwicklung erforderte zunächst die Auswahl eines geeigneten flüchtigen IPs. An ein optimales IP für die LC-MS sind folgende Anforderungen zu stellen:

- Flüchtigkeit im Rahmen der üblichen Betriebsparameter (Gasströme und Interface-Temperaturen)
- Gutes Retentionsverhalten auch sehr polarer aromatischer Sulfonaten
- Gute Detektionsempfindlichkeit (geringe Ionisierungssuppression)

Es wurden die tertiären Amine Triethylamin (TEA), Dimethylbutylamin (DMBA) und Tributylamin (TrBA) untersucht. Sowohl bei der Verwendung von TEA als auch von DMBA eluieren zahlreiche der polaren Komponenten eines Testgemisches aromatischer Sulfonate in der Nähe des Totvolumen (Gradient von

10% bis 70%-Methanol). Daher sind TEA und DMBA nicht als IPs für die IPC geeignet (s. Abb. 2.12 a) und b)). Im Gegensatz dazu zeigen bei Verwendung von TrBA als IP alle Komponenten des Testgemisches ein ausgezeichnetes Retentionsverhalten (s. Abb. 2.12 c)). Es ist mit TrBA sogar möglich, den Gehalt an organischem Lösungsmittel zu Beginn des Gradienten auf 30% zu steigern (s. Abb. 2.12 d)), und damit die Empfindlichkeit der MS-Detektion zu erhöhen [230], ohne dass eine der Komponenten im Totvolumen eluiert²¹.

Tabelle 2.1 Retentionszeiten (t_R), Molekulargewichte (M_r), Cone-Spannungen (CV), Kollisionsenergien (CE) und Nachweisgrenzen (LOD) von Benzol- und Naphthalinsulfonaten.

Nr.	Substanz ¹	t_R (min)	M_r	SRM	CV/CE (V/eV)	LOD ² ($\mu\text{g/L}$)
1	Metanilsäure	4.93	173	172>80	35/24	12
2	(0/2/6)	9.36	224	223>158	43/31	8
3	(1/8/3,6)	10.38	319	318>238	46/23	27
4	(0/0/2,6)	10.81	288	287>207	46/24	9 ³
5	(0/0/1,5)	11.22	288	287>207	46/24	11 ³
6	(0/1/3,6)	11.33	304	303>223	43/21	23
7	Antrachinon-1,5-disulfonat	11.37	368	367>195	48/41	31
8	(7/0/1,3)	11.52	303	302>222	46/24	29
9	p-Toluolsulfonat	12.35	172	171>107	38/21	3
10	(0/0/2,7)	12.44	288	287>207	46/24	12
11	m-Nitrobenzolsulfonsäure	12.58	203	202>156	36/23	4
12	(0/0/1,7)	12.74	288	287>207	46/24	11
13	(0/2/3,6)	13.33	304	303>223	43/21	35
14	(0/4,5/2,7)	14.39	320	319>239	46/22	37
15	(0/0/1,3,5)(0/0/1,3,6)(0/0/1,3,7) ³	14.70	368	367>206	61/31	51
16	(7/0/1,3,5)	14.83	383	382>222	60/30	74
17	(0/0/1,6)	15.41	288	287>207	46/24	6
18	(0/0/1)	16.70	208	207>143	43/26	5
19	(0/0/2)	17.45	208	207>143	43/26	3

¹ Nomenklatur entsprechend [110] (s. a. Anh. A.9, S. 137).

² bestimmt über $S/N > 5$, nicht um Reinheit der Standards korrigiert

³ Relativer Gehalt der Isomere nicht bekannt, LOD für Summe der Isomere bestimmt.

Die Detektionsempfindlichkeit bei der IPC-ESIMS mit flüchtigen IPs wurde wesentlich von der Konzentration des IPs bestimmt. Der Einfluss der Konzentration von TEA, DMBA und TrBA auf die Ionisierungseffizienz (und damit die

²¹Trihexylamin (THA) bietet zwar potentiell noch bessere Eigenschaften bzgl. der Retention, weist aber im Wasser/Methanol-System bei etwa 60% Methanol (pH 7.5) eine Mischungslücke auf und ist daher nicht für den Gradientenbetrieb geeignet.

Detektionsempfindlichkeit) von Mono-, Di- und Trianionen von Naphthalin-1,5-disulfonat und Naphthalintrisulfonat ist in Abbildung 2.13 dargestellt. Als genereller Trend wurden, wie erwartet, fallende Ionisierungseffizienzen mit steigender IP-Konzentration beobachtet. Da die Trenneffizienz mit steigenden IP-Konzentrationen steigt [80] war die letztlich gewählte Konzentration des IPs immer ein Kompromiss zwischen optimaler Retention und optimaler Empfindlichkeit der MS-Detektion.

Es wurden darüber hinaus auch einige interessante Details sichtbar. Im Bereich von IP-Konzentrationen von 0.5 – 1 mmol/L wurde die Ionisierungseffizienz in einigen Fällen gesteigert. Am ausgeprägtesten war dieser Effekt beim Dianion von Naphthalin-1,5-disulfonat und beim Mono- und Dianion von Naphthalintrisulfonat mit TrBA als IP zu beobachten (s. Abb. 2.13 A und B). Derartige Verstärkungseffekte wurden in der Literatur auch für ESIMS-Untersuchungen von Oligonukleotiden beschrieben [180]. Ohne die Verteilung der Ladungszustände zu beeinflussen, steigerte die Zugabe von 1 mmol/L Glycin die Ionisierungseffizienz um den Faktor 1.6, während bei 50 mmol/L Glycin eine Halbierung der Ionisierungseffizienz beobachtet wurde. Der Mechanismus dieser Effekte ist unbekannt, sie können jedoch bei der Entwicklung empfindlicher HPLC-MS-Methoden eine wichtige Rolle spielen.

Weitere Einflussfaktoren wie pH-Wert und Art des organischen Bestandteils des Eluenten²² erwiesen sich als von untergeordneter Bedeutung.

Zunächst wurde eine Methode mit einer IP-Konzentration von 2.5 mmol/L TrBA verwendet. Für 20 aromatische Sulfonate wurden Nachweisgrenzen von 3 - 74 $\mu\text{g/L}$ ($S/N > 5$) erreicht [61] (s. Tab. 2.1). Die Methode eignete sich damit zur direkten Analyse von industriellen Abwässern. Die in diesen Proben auftretenden sehr hohen Salzfrachten mussten entweder durch Verdünnen der Probe oder über eine Reduktion des Injektionsvolumen kompensiert werden, um eine negative Beeinflussung des Retentionsverhaltens und der Reproduzierbarkeit zu verhindern.

Neben der Detektions-Empfindlichkeit mussten, je nach analytischer Fragestellung, auch andere Zielparameter bei der Methodenentwicklung optimiert werden. Dies machte in vielen Fällen eine individuelle Anpassung z.B. der Konzentration des IPs nötig. So wurde im Zuge der Entwicklung einer on-line SPE-Methode mit anschließender HPLC-MS/MS-Detektion die IP-Konzentration auf 1 mmol/L gesenkt, um eine weitere Verbesserung der Empfindlichkeit zu erreichen (s. u., Kap. 2.5) oder bei der Entwicklung einer auch für LC-NMR geeigneten Methode Methanol durch Acetonitril ersetzt.

Insgesamt hat sich die IPC mit flüchtigen IPs als vielseitige Methode zur Analyse aromatischer Sulfonate mit MS-Detektion erwiesen und konnte, mit we-

²²In Vorversuchen erwies sich die Empfindlichkeit einiger aromatischer Sulfonate bei Verwendung von Methanol als etwas besser als bei Verwendung von Acetonitril. Daher wurde Methanol bei quantitativen HPLC-MS-Methoden konsequent verwendet.

nigen Einschränkungen, auch in Verbindung mit NMR- und UV/VIS-Detektion verwendet werden. Zusammen mit der Untersuchung und Optimierung der massenspektrometrischen Parameter war die Entwicklung dieser Methode die Voraussetzung dafür, dass die verschiedenen analytischen Fragestellungen aus dem Bereich der qualitativen und quantitativen Analytik aromatischer Sulfonate erfolgreich bearbeitet werden konnten.

2.5 Vorsäulenanreicherung

Die mit Direktinjektion mit IP-HPLC-MS/MS erreichten Nachweisgrenzen zwischen 3 und 74 $\mu\text{g/L}$ waren zur Analyse von aromatischen Sulfonaten in industriellem Abwasser wie Textilabwasser oder Gerbereiabwasser gut geeignet. Die Konzentrationen der Zielanalyten Naphthalinmono- und -disulfonate lagen in diesen Proben im oberen $\mu\text{g/L}$ -Bereich und darüber und damit deutlich über den Nachweisgrenzen bei der Direktinjektion. Die Proben konnten sogar um den Faktor 10 verdünnt werden, um die Matrixbelastung zu reduzieren (s. Kap. 4.1.1).

In Kläranlagen-Abläufen oder Oberflächenwasser wurden im allgemeinen sehr viel geringere Konzentrationen aromatischer Sulfonate (wie z.B. Naphthalinmono- und -disulfonate) beobachtet, diese lagen im unteren $\mu\text{g/L}$ -Bereich oder darunter [53, 54, 76, 110]. Daher war zur Erfassung von aromatischen Sulfonaten in Proben aus dem Bereich Kläranlagen-Abläufe/Oberflächenwasser mit IP-HPLC-MS/MS eine Anreicherung der Analyte zwingend erforderlich. Als Standardverfahren zur Anreicherung polarer Analyte in Umweltproben hat sich in den letzten Jahren die off-line Festphasenextraktion (SPE) etabliert [39, 69]. Alternativ dazu wurden on-line Anreicherungsverfahren in zahlreichen Varianten zur Extraktion und Anreicherung von Zielanalyten in der HPLC eingesetzt. Darunter waren on-line Verfahren zur Anreicherung und MS-Detektion von Pestiziden in der aquatische Umwelt [213, 231, 232] oder zur on-line Matrix-Eliminierung bei der Analyse von Nukleotiden [181] oder Tensiden [233]. Eine sehr empfindliche und hoch selektive Erfassung von Target-Analyten stellt die on-line Kopplung von Immunoextraktion und HPLC-MS- oder HPLC-MS/MS-Verfahren [234, 235, 236] dar. Auch aromatische Sulfonate wurden mit on-line SPE-Verfahren angereichert und mit UV/VIS- und FLD-Detektion [53, 54, 71], MS-Detektion [73] und UV-Detektion [75] nachgewiesen und quantifiziert.

On-line-SPE- bzw. on-line Anreicherungsverfahren haben zwei wesentliche Vorteile gegenüber off-line Anreicherungsverfahren. Zum einen ist der manuelle Arbeitsaufwand bei der Extraktion sehr viel geringer, zum anderen kann das für eine Analyse notwendige Probenvolumen drastisch reduziert werden, da das extrahierte Material quantitativ auf die Trennsäule transferiert wird. Dies ist bei der off-line SPE aus Gründen der schwierigeren Handhabbarkeit sehr kleiner Probenvolumina kaum möglich. Diesen Vorteilen stehen die höheren Anforderungen an

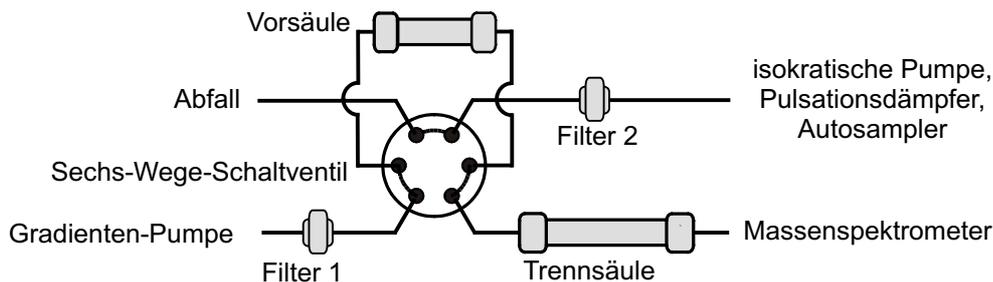


Abbildung 2.14 Schematischer Aufbau der on-line Vorsäulen-anreicherung mit IP-HPLC-MS/MS-Detektion. Der Aufbau wurde mit Standard-HPLC-Komponenten realisiert. Das Aufgabevolumen von 1000 μL wurde über sukzessive Injektion in 100 μL -Schritten (multiple-draw-Option des HP1100-Probengebers) erreicht.

die verwendete Hardware sowie im allgemeinen längere Laufzeiten pro Analyse gegenüber.

Im Folgenden wird die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode zur on-line Anreicherung von aromatischen Sulfonate mit nachfolgender Detektion über IP-HPLC-MS/MS dargestellt.

2.5.1 Durchführung der on-line Vorsäulen-anreicherung

Die on-line Kopplung von Vorsäulen-anreicherung und IP-HPLC-MS/MS wurde über einige Modifikationen und Ergänzungen der HPLC-Hardware realisiert. Es kamen Standard-HPLC-Komponenten zum Einsatz, die neben den üblichen Komponenten (Degasser, Gradientenpumpe, Probengeber und Thermostat) eine zusätzliche isokratische Pumpe, einen Pulsationsdämpfer, zwei Hochdruck-Filter²³ sowie ein sechs-Wege Säulenschaltventil umfassten (s. Abb. 2.14). Die Steuerung dieser Standard-HPLC-Komponenten erfolgte über die Software bzw. über Kurzschluss-Kontakte. Als Träger-Eluent für die Anreicherung diente 3% Methanol mit 1 mmol/L TrBA, pH = 8, die Proben wurden vor der Injektion mit Ionenpaarreagenz versetzt. Der on-line Anreicherungsschritt erfolgte auf einer Vorsäule²⁴, die über den Probengeber mit der Probenlösung beschickt wurde (zur Quantifizierung 1000 μL Injektionsvolumen). Nach Schalten des Säulenschaltventils (Position wie in Abb. 2.14) wurden die auf der Vorsäule sorbierten Analyte mittels Gradienten-Elution auf die HPLC-Trennsäule transferiert, separiert und über zwei SRM-Übergänge im MS detektiert. Weitere Angabe zu den Chromatographiebedingungen finden sich in Anhang A.6 auf S. 133 (HPLC-

²³Die Hochdruckfilter-Einheiten waren notwendig, um die Vor- und Trennsäule vor Pumpenabrieb und Schwebstoffen aus den Proben zu schützen.

²⁴Die Vorsäule enthielt C18-Material, da das bei der analytischen Säule verwendete Phenyl-Hexyl-Material bei der Verwendung in der Anreicherungssäule deutlich geringere Standzeiten aufwies.

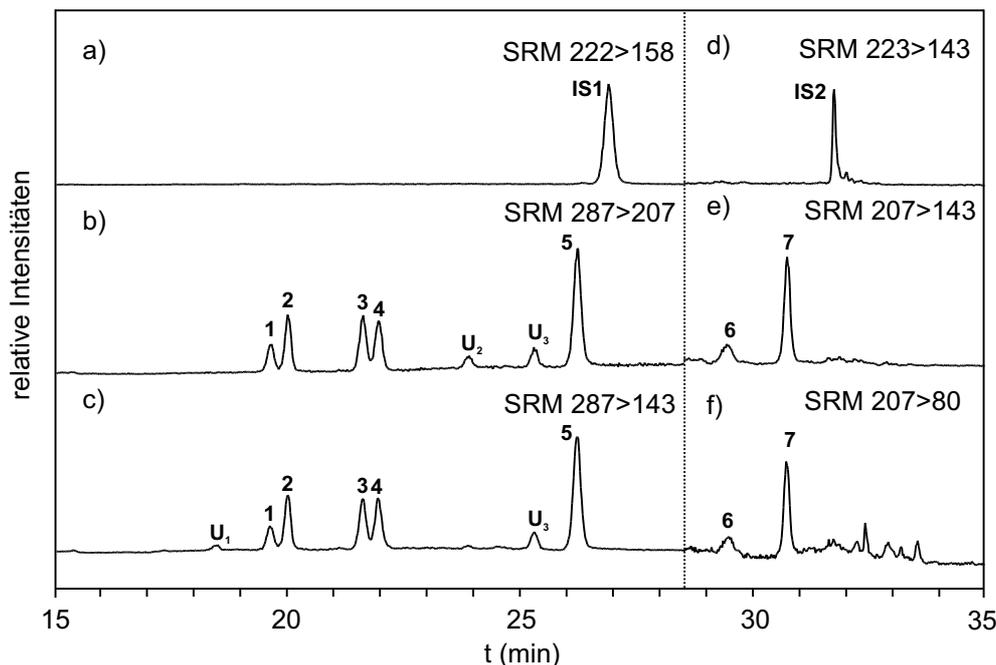


Abbildung 2.15 HPLC-MS/MS-Chromatogramm eines Oberflächenwassers (Tegeler See). **a)** und **d)** SRM-Spuren der internen Standards. **b)** und **c)** SRM Übergänge m/z 287 > m/z 207 und m/z 287 > m/z 143 zur selektiven Detektion von Naphthalindisulfonaten. **e)** und **f)** SRM-Übergänge m/z 207 > m/z 143 und m/z 207 > m/z 80 zur selektiven Detektion von Naphthalinmonosulfonaten. Trennbedingungen s. HPLC-Trennsystem 5, S. 133. (U₁-U₃: unbekannte Substanzen, 1: Naphthalin-2,6-disulfonat, 2: Naphthalin-1,5-disulfonat, 3: Naphthalin-2,7-disulfonat, 4: Naphthalin-1,6-disulfonat, 5: Naphthalin-1,7-disulfonat, 6: Naphthalin-1-sulfonat, 7: Naphthalin-2-sulfonat, IS1: 2-Aminonaphthalin-7-sulfonat, IS2: 1-Hydroxynaphthalin-8-sulfonat)

Trennsystem 5). Abbildung 2.15 zeigt einen Ausschnitt eines Chromatogramms einer Oberflächenwasser-Probe aus dem Tegeler See. Es wurden 1000 μL Probe injiziert, fünf Positionsisomere des Naphthalindisulfonats und zwei Positionsisomere des Naphthalinsulfonats wurden getrennt und selektiv detektiert. Da die Massenspektren der Positionsisomere von Naphthalindisulfonat bzw. Naphthalinsulfonat sehr ähnlich waren (s. Kap. 2.1), war zur quantitativen Bestimmung dieser Verbindungen Basislinien-Trennung anzustreben. Dies führte zu der vergleichsweise langen Gesamt-Laufzeit von 35 Minuten von Injektion zu Injektion.

2.5.2 Qualitative Kriterien zur Identifizierung

Bei der Erfassung von Naphthalinsulfonaten im ng/L -Bereich mussten qualitative Kriterien zur eindeutigen Identifizierung formuliert werden, um falsch positive Befunde zu vermeiden. Aufgrund der Komplexität der Proben sowie angesichts der

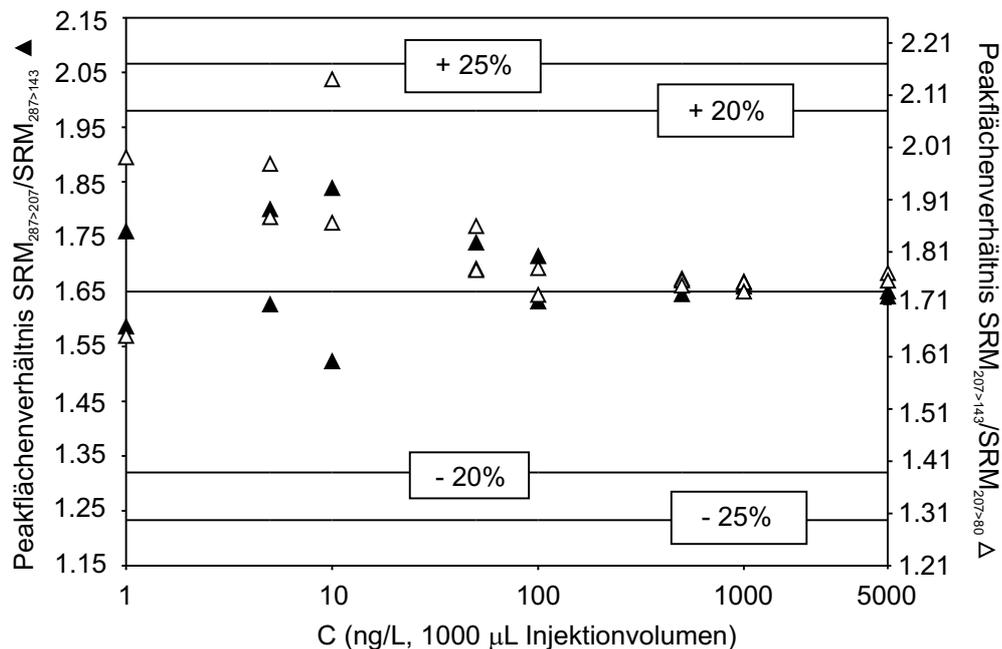


Abbildung 2.16 Bestätigung der Identifizierung über SRM-Peakflächen-Verhältnisse. Die Peakflächen-Verhältnisse der SRM-Übergänge 287>207 und 287>143 für Naphthalin-2,7-disulfonat (▲) und 207>143 und 207>80 für Naphthalin-1-sulfonat(△) wurden bei einer Konzentrationen von 5000 ng/L zu 1.65 bzw. zu 1.73 bestimmt. Die Abweichung von diesen Peakarea-Ratios blieb im Konzentrationsbereich von 1 bis 5000 ng/L (1 pg bis 5 ng absolut bei 1000 μ L Injektionsvolumen) im allgemeinen innerhalb eines $\pm 20\%$ -Bereiches, mit der zu erwartenden stärkeren Streuung im Bereich niedriger Konzentrationen [239].

sehr niedrigen Konzentrationen wurden dazu mehrere komplementäre chromatographische und massenspektrometrische Parameter herangezogen. Das Vorgehen lehnt sich an die im Bereich der Rückstandsanalytik etablierten Verfahren zur Qualitätssicherung von qualitativen Analysen an [237, 238].

Ein üblicherweise für die Identifizierung von Target-Analyten verwendeter Parameter ist die Retentionszeit. Die Retentionszeit der Analyten in der Probe wird dabei mit der eines authentischen Standards verglichen. Im Fall der on-line Vorsäulenreicherung lagen die Abweichungen der Retentionszeit von Proben und Standards innerhalb eines Proben-Batches²⁵ unter $\pm 2\%$. Bei größeren Abweichungen wurde die Zielverbindung als nicht identifiziert gewertet.

Aufgrund ihrer Selektivität ist die massenspektrometrische Detektion zur zweifelsfreien Bestätigung von Identifizierungen besonders geeignet. Trotzdem

²⁵Die Präzision der absoluten Retentionszeiten war aufgrund des häufigen Wechsels der Vorsäule von Proben-Batch zu Proben-Batch schlechter als $\pm 2\%$. Für die Identifizierung war jedoch die Übereinstimmung der Retentionszeiten in Proben und Standards maßgeblich.

sollten auch LC-MS-Daten einer kritischen Bewertung unterzogen werden. Vollständige Massenspektren (Full-Scan-Spektren) sind für die Identifizierung am aussagekräftigsten. Die Übereinstimmung der Massenspektren von Probe und Standard sollten jedoch quantitativ angegeben werden²⁶. Für die Detektion im Spurenbereich sind vollständige Massenspektren aus Empfindlichkeitsgründen ungeeignet. Nur SIM- oder SRM-Detektion bieten hier eine ausreichende Empfindlichkeit. Im allgemeinen werden zur Verifizierung der Identität mehrere Ionen (SIM) bzw. Fragmentionen (SRM) erfasst. Je nach Anwendung werden unterschiedliche Anforderungen hinsichtlich Art und Anzahl der Ionen sowie der maximal tolerierbaren Abweichungen der Intensitätsverhältnisse gestellt [240, 241, 242]. Die EU-Richtlinien zur Rückstandsanalytik [237, 238] werden z.B. in Zukunft ein Punktesystem für die Identifizierung von Spurenverunreinigungen mit massenspektrometrischen Detektionstechniken beinhalten. Für die on-line Vorsäulenanreicherung wurden zwei SRM-Übergänge pro Analyt zur Detektion gewählt²⁷. Das Intensitäts-Verhältnis der SRM-Übergänge entspricht der relativen Intensität von zwei Fragmentionen in einem Produktions-Spektrum und sollte unter konstanten Messbedingungen für Standard und Analyt identisch sein. Nur wenn das Peakflächen-Verhältnis der Proben dem der Standards entsprach wurde daher von einer eindeutigen Identifizierung ausgegangen.

Um Peakflächen-Verhältnisse von SRM-Übergängen zur Bestätigung einer Identifizierung zu nutzen, müssen die bei der Messung der Verhältnisse auftretenden Messfehler bekannt sein. Als Toleranzbereich für die Abweichungen derartiger Peakflächen-Verhältnisse wurden in Abhängigkeit von der Ionisierungs-Methode $\pm 20\%$ bis $\pm 25\%$ empfohlen [242]. In den neuen EU-Richtlinien zur Rückstandsanalytik [237, 238] werden je nach der relativen Intensität der Ionen Toleranzen zwischen $\pm 20\%$ und $\pm 50\%$ gestattet. Die für die Peakflächen-Verhältnisse der SRM-Übergänge $m/z 287 > m/z 207$ und $m/z 287 > m/z 143$ für Naphthalin-1,7-disulfonat (Peak 5, Abb. 2.15) bzw. $m/z 207 > m/z 143$ und $m/z 207 > m/z 80$ für Naphthalin-1-sulfonat (Peak 6, Abb. 2.15) festgestellten Abweichungen von den bei hohen Konzentrationen (5 ng absolut) bestimmten Peakflächen-Verhältnissen von 1.65 bzw. 1.73 sind in Abbildung 2.16 dargestellt. Die Abweichungen lagen im Bereich der $\pm 20\%$ -Spezifikation, mit einer Ausnahme bei 10 ng/L (10 pg absolut) bei Naphthalin-1-sulfonat, die innerhalb des $\pm 25\%$ -Bereiches lag. Peakflächen-Verhältnisse innerhalb des $\pm 20\%$ -Bereiches konnten demnach als positive Identifizierung gewertet werden. Die Peakflächen-Verhältnisse von fünf Positionsisomeren des Naphthalindisulfonats bewegten sich in einem engen Bereich zwischen 1.51 und 1.69. Daher konnten auch unbekannte Peaks unter Vorbehalt charakterisiert werden. So lagen z.B. die Peakflächen-Verhältnisse der unbekanntenen Peaks

²⁶Entweder über „Fit-Faktoren“ aus dem Chromatographiedatensystem oder über prozentuale Abweichungen der relativen Intensitäten. Richtwerte für die empfohlenen maximalen Abweichungen finden sich z.B. in [240].

²⁷Dies würde der minimal geforderten Anzahl von 4 Identifizierungspunkten der neuen EU-Richtlinie entsprechen.

U_1 und U_2 (Abb. 2.15 b) u. c)) mit 0.1 und 6.1 sehr weit von den für Naphthalindisulfonate beobachteten Werten. Es handelte sich daher wahrscheinlich nicht um Positionsisomere des Naphthalindisulfonats. Peak U_3 hingegen hatte ein Peakflächen-Verhältnis von 1.72 und war daher sehr wahrscheinlich ein Positionsisomer des Naphthalindisulfonats. Eine grundsätzliche Limitierung sind die bei niedrigen Konzentrationen immer mehr ins Gewicht fallenden Streuungen (s. Abb. 2.16), die sich auf generelle Probleme bei präzisen Messungen in Bereichen sehr niedriger Konzentrationen zurückführen lassen [239].

2.5.3 Quantifizierung von Naphthalinsulfonaten mit Vorsäulen-anreicherung und IP-HPLC-MS/MS

Die zwei Elemente des Verfahrens der on-line Anreicherung mit IP-HPLC-MS/MS, der Extraktionsschritt und die massenspektrometrische Detektion, beeinflussen beide gleichermaßen die Qualität der quantitativen Erfassung der aromatischen Sulfonate. Beide mussten unabhängig voneinander auf ihre Eignung für diesen Zweck hin überprüft werden.

Nachweisgrenzen

Zur Ermittlung der Nachweisgrenzen (LOD) bei einem Signal zu Rausch-Verhältnis von 5:1 wurden Chromatogramme von Standards in hochreinem Wasser verwendet. Die Nachweisgrenzen lagen, abhängig von leichten Schwankungen in der Empfindlichkeit des Massenspektrometers, im Bereich von 4 – 9 ng/L für Naphthalindisulfonate und im Bereich von 2 – 7 ng/L für Naphthalinsulfonate. Für die Naphthalinsulfonate ist anzumerken, dass Laborblindwerte von bis zu 25 ng/L auftraten, deren Quelle nicht eindeutig identifiziert wurde. Dies muss bei der Bewertung quantitativer Ergebnisse berücksichtigt werden.

Wiederfindungen bei der on-line-Vorsäulen-anreicherung

Die Extraktions-Effizienz der on-line Vorsäulen-anreicherung war ein wesentliches Kriterium zur Beurteilung der on-line Anreicherung hinsichtlich ihrer Eignung zur quantitativen Erfassung von aromatische Sulfonaten. Die Extraktions-Effizienz wird über die Wiederfindungen der Analyte bestimmt. Diese sollten sowohl für Standards in hochreinem Wasser als auch für die Analyte in der Proben-Matrix im Bereich von 80 bis 100% liegen, um zuverlässige quantitative Ergebnisse zu erhalten. Dies wurde zum einen über die Anreicherung konstanter absoluter Substanzmengen mit steigenden Aufgabevolumina, zum anderen durch Wiederfindungs-Experimente mit aufgestockten Oberflächenwasser-Proben überprüft.

Die Analyte wurden über SIM-Detektion erfasst und über das Verhältnis der Peakflächen bei den unterschiedlichen Anreicherungs-Volumina relativ quantifiziert. Die Wiederfindungen bei der Anreicherung konstanter absoluter Substanz-

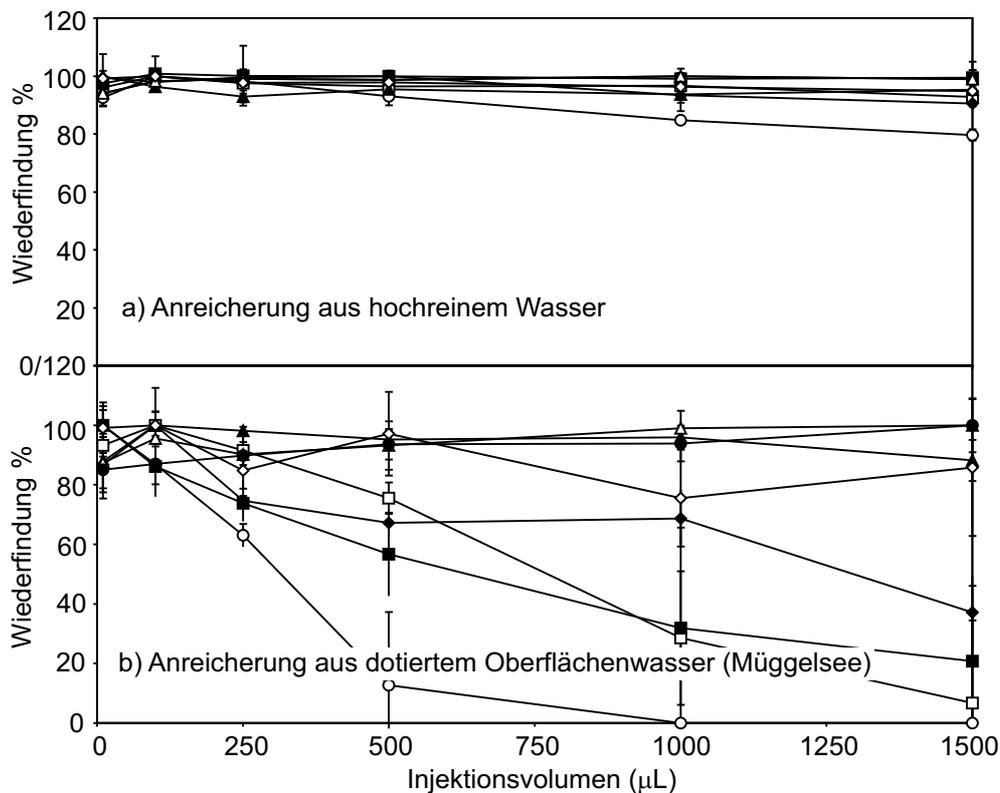


Abbildung 2.17 Durchbruchskurven aromatischer Sulfonate bei der Vorsäulenanreicherung (**Teil A**). **a)** Anreicherung aus hochreinem Wasser. **b)** Anreicherung aus Oberflächenwasser. Es wurden konstante Mengen (100 pg absolut pro Substanz) in unterschiedlichen Anreicherungs- und Injektionsvolumina untersucht. Die Auswertung erfolgte über relative Peakflächen-Verhältnisse im SIM. □: p-Hydroxybenzolsulfonat, ○: m-Aminobenzolsulfonat, ■: 1-Aminonaphthalin-5-sulfonat, ◆: 2-Hydroxynaphthalin-6-sulfonat, ▲: Benzol-1,3-disulfonat, △: Naphthalin-1,5-disulfonat, ◇: 2-Hydroxynaphthalin-3,6-disulfonat, ●: Naphthalin-2,6-disulfonat

mengen (100 pg absolut auf die Säule) mit steigendem Anreicherungs- und Injektionsvolumen sind in den Abbildungen 2.17 und 2.18 in der Form von Durchbruchskurven dargestellt. Es wurde das Verhalten von jeweils 8 aromatischen Sulfonaten in hochreinem Wasser und in aufgestocktem Oberflächenwasser einander gegenübergestellt. Es sind jeweils früh eluierende (Abb. 2.17) und spät eluierende (Abb. 2.18) Substanzen zusammengefasst²⁸. Die Extraktion aus hochreinem Wasser führte zu sehr guten Extraktions-Effizienzen für alle 16 Substanzen. Es wurden Wie-

²⁸Diese Unterteilung ist willkürlich und erfolgte aus Gründen der Übersichtlichkeit. Die Analyte eluierten im Bereich zwischen $t_R = 13.06$ min und $t_R = 33.80$ min, wobei die in Abb. 2.17 dargestellten Substanzen zwischen $t_R = 13.06$ min und $t_R = 19.55$ min und die in Abb. 2.18 dargestellten Substanzen zwischen $t_R = 22.25$ min und $t_R = 33.80$ min eluierten.

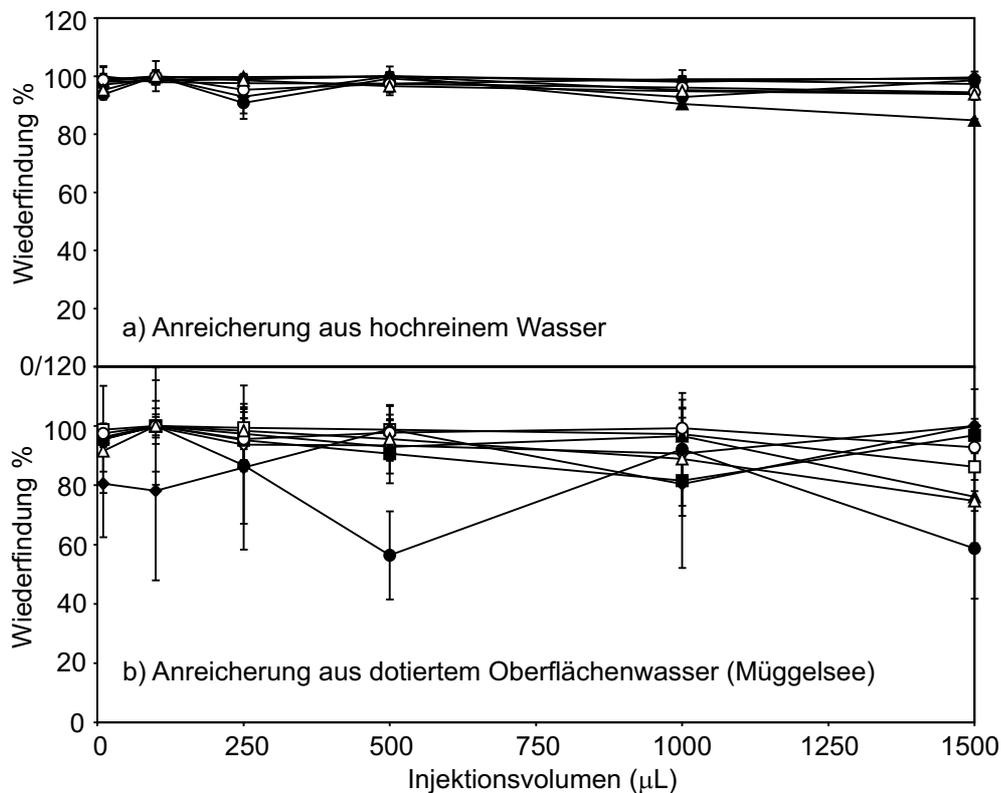


Abbildung 2.18 Durchbruchskurven aromatischer Sulfonate bei der Vorsäulenanreicherung (**Teil B**). **a)** Anreicherung aus hochreinem Wasser. **b)** Anreicherung aus Oberflächenwasser. Es wurden konstante Mengen (100 pg absolut pro Substanz) in unterschiedlichen Anreicherungs- und Injektionsvolumina untersucht. Die Auswertung erfolgte über relative Peakflächen-Verhältnisse im SIM. \diamond : Naphthalin-2,7-disulfonat, \square : 3-Nitrobenzolsulfonat, \blacksquare : p-Toluolsulfonat, \blacktriangle : 2-Aminonaphthalin-7-sulfonat, \blacklozenge : Naphthalintrisulfonat, \bullet : 7-Aminonaphthalin-1,3,6-trisulfonat, \circ : Naphthalin-1-sulfonat, \triangle : Naphthalin-2-sulfonat

derfindungen von 80 – 100% (Abb. 2.17 a) u. 2.18 a) gefunden, die mittlere Standardabweichung lag bei 2.2%.

Bei der Anreicherung konstanter absoluter Mengen (100 pg absolut auf die Säule) aus aufgestocktem Oberflächenwasser²⁹ wurden eine generell stärkere Streuung der Messwerte (mittlere Standardabweichung 9.5%) sowie ein früher Durchbruch von p-Hydroxybenzolsulfonat, m-Aminobenzolsulfonat und 1-Aminonaphthalin-5-sulfonat beobachtet (s. Abb. 2.17 b). Die on-line Vorsäu-

²⁹Für diese Experimente wurde Oberflächenwasser aus dem Müggelsee (Berlin) verwendet, das nur sehr niedrige Gehalte an aromatischen Sulfonaten aufwies (Probe Müggelsee 02.99, s. Anhang B.6, Tab. B.20, S. B.20). Dies sollte eine starke Beeinflussung durch Hintergrundwerte verhindern und trotzdem den Einfluss der Oberflächenwasser-Matrix auf die Extraktion erfassen.

Tabelle 2.2 Wiederfindungen von Naphthalinsulfonaten bei der Vorsäulenanreicherung in Prozent. 100 ng/L aufgestockt in Oberflächenwasser (Müggelsee), Anreicherungsvolumen 1000 $\mu\text{g/L}$. Blindwerte wurden subtrahiert.

Substanz	1	2	3	4	MW	σ
2,6-NSA	100.2	100.1	99.5	103.6	100.9	1.9
1,5-NSA	104.0	98.9	99.7	98.1	100.2	2.6
1,6-NSA	102.9	102.0	87.3	97.7	97.5	7.1
1,7-NSA	105.8	105.5	105.5	105.2	105.5	0.2
2,7-NSA	106.9	105.8	106.6	106.0	106.3	0.5
1-NSA	104.3	104.5	107.6	107.8	106.0	1.9
2-NSA	108.9	110.9	113.5	114.8	112.0	2.6

lenanreicherung stellte somit kein probates Verfahren zur Erfassung dieser drei Analyte in Oberflächenwasser dar. Bei den Wiederfindungen von Naphthalintrisulfonat sowie von 7-Aminonaphthalin-1,3,6-trisulfonat (Abb. 2.18 b) ließ sich aus den stark schwankenden Messwerten keine eindeutige Tendenz ablesen. Dies wurde auf den größeren Einfluss des aus der Matrix des Oberflächenwassers resultierenden chemischen Rauschens in der Nähe der Nachweisgrenze dieser Verbindungen zurückgeführt. Das Extraktions-Verhalten dieser Verbindungen konnte aufgrund der vorliegenden Daten nicht bewertet werden und sie wurden daher mit der on-line Vorsäulenanreicherung nicht untersucht.

Die Wiederfindungen für die untersuchten Naphthalinmono- und disulfonate sowie für 2-Aminonaphthalin-7-sulfonat lagen auch bei der Anreicherung aus Oberflächenwasser zwischen 85 und 100% (s. Abb. 2.17 b) u. 2.18 b). Damit konnte von einer guten Extraktions-Effizienz dieser Verbindungen ausgegangen werden. Die on-line Vorsäulenanreicherung war daher zu ihrer quantitativen Erfassung in Oberflächenwasser gut geeignet.

Für fünf Positionsisomere des Naphthalindisulfonats und zwei Positionsisomere des Naphthalinsulfonats wurden die Wiederfindungen bei der on-line Vorsäulenanreicherung in auf eine Konzentration von 100 ng/L aufgestockten Oberflächenwasser-Proben (1000 μL Injektionsvolumen) auch mit interner Kalibrierung bestimmt. Sie liegen im Bereich von 97 bis 112% (s. Tab. 2.2) und untermauern damit den über die Anreicherung konstanter absoluter Mengen erhaltenen Befund guter Extraktions-Effizienz.

Zur Überprüfung der mit interner Kalibrierung gewonnenen quantitativen Befunde wurden gleiche Proben ebenfalls mit der Standardadditionstechnik (Aufstockmethode) analysiert (s. Tab. 2.3, S. 57). Dabei wurde ein linearer Bereich von drei Größenordnungen (Aufstockkonzentrationen 0 ng/L, 10 ng/L, 100 ng/L und 1000 ng/L) beobachtet. Dies war ein Hinweis darauf, dass Durchbruchphänomene bei der on-line Anreicherung auf der Vorsäule kein Problem darstellten.

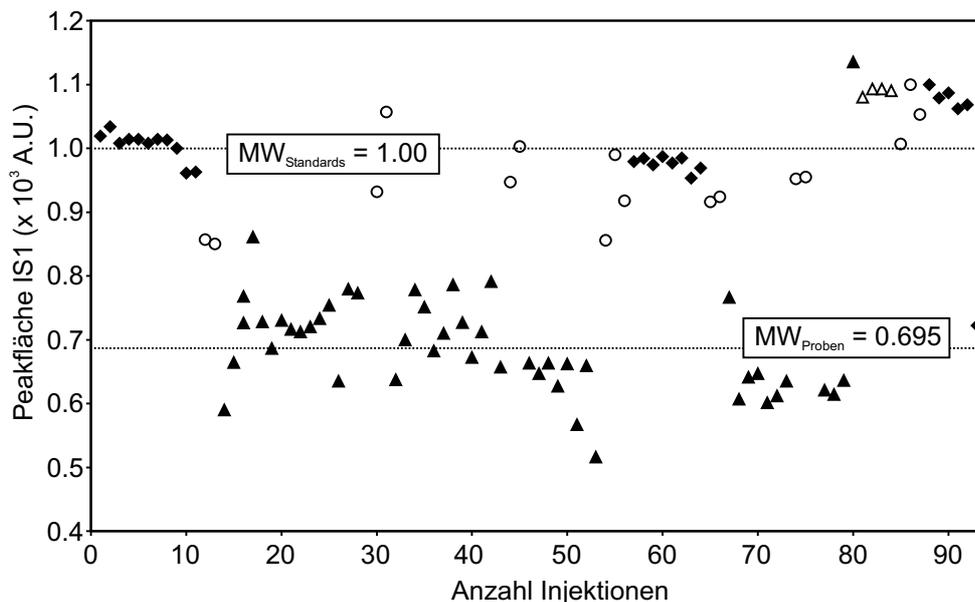


Abbildung 2.19 Peakflächen des internen Standards bei einem Sample-Batch. \blacklozenge : Standards, \circ : Blank, Kontrollproben (QC), Wasser, \blacktriangle : Proben, \blacktriangle : aufgestockte Wiederfindungs-Proben. Der Einfluss der Probenmatrix auf die Peakfläche des internen Standards ist deutlich sichtbar. Die gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen mit internem Standard und Standardaddition belegen, dass der interne Standard die Matrixeffekte kompensieren kann.

Standard-Addition zur Verifizierung der quantitativen Ergebnisse

Zur Quantifizierung der aromatischen Sulfonate wurde bei der on-line Vorsäulen-anreicherung ein Kalibrierverfahren mit externen Standards und einem internen Standard konstanter Konzentration angewandt. Der interne Standard sollte dabei Schwankungen in der Empfindlichkeit des Massenspektrometers während eines Proben-Batches auffangen sowie die Beeinflussung der Ionisierung durch die Probenmatrix (den sogenannten Matrix-Effekt³⁰) kompensieren. Das hier gewählte Kalibrierverfahren ist jedoch nicht prinzipiell geeignet, Matrix-Effekt auszugleichen. Hierzu wären nur andere Kalibrierverfahren wie z.B. die Verwendung von Standards in blindwertfreier Leermatrix³¹, die Verwendung isotonenmarkierter interner Standards oder die Standardaddition geeignet³².

³⁰Unter „Matrixeffekt“ wird die Beeinflussung des Ionisierungsverhaltens einer Verbindung durch die Proben-Matrix verstanden. Matrixeffekte können bei der quantitativen LC-MS/MS über die Unterdrückung oder Verstärkung der Ionisierung einzelner Verbindungen/Analyte dramatische Auswirkungen auf die Richtigkeit einer Analyse haben [243,244], die bis zur Unbrauchbarkeit der Ergebnisse führen können.

³¹Unter Leermatrix versteht man die Proben-Matrix ohne die Zielanalyten.

³²Eine Übersicht über die Problematik der Matrixeffekte in der quantitativen LC-MS und LC-MS/MS findet sich z.B. in [223].

Tabelle 2.3 Vergleich von interner Kalibrierung und Standard-Addition bei der on-line Vorsäulenanreicherung-IP-HPLC-MS/MS. Die Gehalte an Naphthalinmono- und -disulfonaten sind in ng/L angegeben und wurden mit interner Kalibrierung und mit Standard-Addition (Nullwert und auf 3 verschiedene Konzentrationen aufgestockte Proben) ermittelt.

Substanz	Tegeler See 05/99		Elbe, Brunsbüttel		Nordgraben 13.6.99	
	I	II	I	II	I	II
2,6-NSA	38	35 ± 11	15	49 ± 18	538	348 ± 16
1,5-NSA	98	81 ± 11	713	600 ± 111	694	367 ± 44
1,6-NSA	165	78 ± 8	40	76 ± 59	1456	1548 ± 115
1,7-NSA	84	46 ± 4	104	191 ± 42	461	266 ± 25
2,7-NSA	168	144 ± 14	266	287 ± 42	1406	815 ± 156
1-NSA	< LOD	14 ± 9	< LOD	14 ± 9	170	76 ± 42
2-NSA	25	58 ± 17	< LOD	11 ± 5	304	51 ± 21

I: Interne Kalibrierung, II: Standard-Addition ± σ

Da der interne Standard stets in konstanter Konzentration eingesetzt wurde, konnten Matrix-Effekte an den Schwankungen seiner Peakfläche erkannt werden. Da die Peakflächen des internen Standards in Oberflächenwasser um durchschnittlich 30% niedriger waren als in hochreinem Wasser (s. Abb. 2.19) musste von deutlichen Matrix-Effekten ausgegangen werden. Um also den Zeitvorteil dieses Verfahrens gegenüber Kalibrierverfahren wie der Standardaddition nutzen zu können, musste gezeigt werden, dass der interne Standard diese Matrixeffekte in den untersuchten Proben-Matrices kompensieren konnte.

Dazu wurden die quantitativen Ergebnisse der on-line Vorsäulenanreicherung mit IP-HPLC-MS/MS für einzelne Proben durch Standardadditions-Experimente abgesichert. Über den Vergleich der quantitativen Ergebnisse aus den beiden unabhängigen Kalibrierverfahren externe Kalibrierung mit einem internen Standard und Standardaddition sollte an beispielhaft ausgewählten Oberflächenwasser-Proben geprüft werden, ob die bei dieser Methode auftretenden Matrixeffekte durch die Verwendung nur eines internen Standards ausgeglichen werden bzw. in tolerablen Grenzen gehalten werden konnten. Die in Tabelle 2.3 einander gegenübergestellten Messwerte für drei Proben (Tegeler See, Elbe, Nordgraben) zeigten insgesamt eine akzeptable Übereinstimmung. Die für einige Substanzen beobachteten hohen Differenzen (z.B. 304 ng/L zu 51 ng/L für 2-NSA in der Probe des Nordgraben vom 13.6.99, s. Tab. 2.3) weisen jedoch auf die grundsätzlichen Probleme bei der Quantifizierung mit HPLC-MS-Techniken wie z.B. Matrixeffekte hin. Vor dem Hintergrund, dass im hier untersuchten Spurenbereich vor allem Tendenzen bzw. Trends im Verhalten der aromatischen Sulfonate in der aquatischen Umwelt erfasst werden sollten, konnten die aus diesen Problemen resultierenden Fehler jedoch toleriert werden.

Wenn man eine zeitraubende Quantifizierung durch Standardadditionstechniken vermeiden möchte, kann eine deutliche Verbesserung der Situation in der HPLC-MS nur durch den Einsatz von isotopenmarkierten Standards zur Kompensation der Matrixeffekte erreicht werden. Insgesamt lassen sich möglicherweise mit optischen Detektionsverfahren (z.B. HPLC-FLD) einfacher verlässliche Daten zum Verhalten von aromatischen Sulfonaten im Spurenbereich erhalten.

Die hier vorgestellten Ergebnisse belegen in Summe, dass die on-line Vorsäulen-anreicherung mit IP-HPLC-MS/MS zur Erfassung von aromatischen Sulfonaten im unteren ng/L-Bereich geeignet ist. Die mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse aus dem Bereich der Uferfiltration werden in Kapitel 4.2, S. 108, vorgestellt.

3 Strukturaufklärung mit LC-MS: Charakterisierung und Identifizierung aromatischer Sulfonate

Im nachfolgenden werden Arbeiten zur Charakterisierung und Identifizierung aromatischer Sulfonate beschrieben. Die über LC-MS und LC-MS/MS zugänglichen strukturspezifischen Informationen wurden genutzt, um qualitative Aussagen über die in verschiedenen Abbauprozessen ablaufenden Prozesse zu gewinnen. Die LC-MS- und LC-MS/MS-Methoden, deren Entwicklung Thema des Kapitels 2 war, wurden mit komplementären spektroskopischen Methoden wie UV/VIS-Spektroskopie oder NMR-Spektroskopie im Sinne der integrierten Strukturaufklärung kombiniert.

3.1 Bioabbau durch Pilzenzyme

Die lignolytischen Fähigkeiten von Weißfäulepilzen waren Anlass zahlreicher Untersuchungen mit der Zielrichtung, diese zum Abbau von refraktären, d.h. mit anderen biologischen Abbauprozessen nicht entfernbaren, Stoffen zu nutzen. Hierbei fiel ein Hauptaugenmerk auf die Entfärbung von Textilfarbstoffen wie Triphenylmethan-, Anthrachinon-, Azo- sowie Phthalocyaninfarbstoffen [245,246,247,248], deren Entfärbung bzw. Abbau in herkömmlichen Verfahren (z.B. Belebtschlamm-Verfahren [249, 250]) nicht oder nicht vollständig gelingt. Azofarbstoffe und Phthalocyaninfarbstoffe können von verschiedenen Weißfäulepilzen entfärbt und partiell mineralisiert werden [246, 247, 251, 252, 253], als Metaboliten dieser Reaktionen wurden unter anderem Sulfophenylhydroperoxide, Chinone, sulfonierte Phenole und sulfonierte aromatische Amine nachgewiesen [254, 255, 256, 257].

Die chemische Stabilität des Phthalocyanin-Grundgerüsts ist Voraussetzung für den breiten Einsatz dieser Stoffklasse in Pigmenten sowie als Redoxkatalysatoren und Textilfarbstoffe [258]. Die für den Einsatz als Textilfarbstoff notwendige Wasserlöslichkeit wird über eine Sulfonierung des Chromophors erreicht.

Die Sulfonierung, die chemische Stabilität sowie die hohen Molgewichte¹ dieser Substanzklasse resultieren in geringen Entfernbarkeiten sowohl in biologischen Verfahren [249, 250] als auch in physiko-chemischen Behandlungsschritten wie TiO₂/UV sowie Fenton- und Photo-Fenton-Verfahren [259].

Die Entfärbung von sulfonierten Phthalocyaninfarbstoffen durch Weißfäulepilze wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen demonstriert [247, 252]. Die Isolierung der lignolytischer Peroxidasen von *Phanerochaete chrysosporium* [260] und *Bjerkandera adusta* [261] durch Heinfling et al. führte zum Nachweis der in-vitro Entfärbung von Phthalocyaninfarbstoffen wie Reaktiv Blau 15 (RB15) und Reaktiv Blau 38 (RB38). Hierbei traten Unterschiede zwischen Ligninperoxidasen (LiP) und Manganperoxidasen (MnP) zu Tage: Nur erstere waren aktiv und damit bei der Entfärbung von Phthalocyaninfarbstoffen wirksam. Die Immobilisierung von *Trametes versicolor* auf verschiedenen Trägermaterialien in fixed-bed Reaktoren zur Entfärbung von Textilfarbstoffen wurde von Kapdan et al. [262] untersucht, die Entfärbungsraten erwiesen sich hierbei aber als instabil. Auch das Auftreten von Metaboliten bei der enzymatischen Entfärbung von Phthalocyaninfarbstoffen ist aus einer Arbeit von Conneely et al. [263] bekannt. Eine Identifizierung der beobachteten Metabolite, die die Beschreibung des Mechanismus der Oxidation sowie die Bewertung der Metabolite hinsichtlich ihrer biologischen Abbaubarkeit erlauben würde, stand bisher jedoch noch aus.

3.1.1 Oxidation von Azofarbstoffen und Phthalocyanin-Farbstoffen durch Pilze und Pilzenzyme

Im Folgenden wird die Charakterisierung und Identifizierung von Metaboliten der Oxidation des Azofarbstoffs Reaktiv Violett 5 (RV5) und der Phthalocyaninfarbstoffe RB15 und RB38 beschrieben. Die mikrobiologischen Arbeiten wurden von R. Opitz, R. Witzig und A. Heinfling am Fachgebiet Ökologie der Mikroorganismen der TU Berlin durchgeführt. Die enzymatische Oxidation erfolgte in Batch-Ansätzen, entweder mit Kulturen von *Bjerkandera adusta* (DSM 11310) oder mit aus *Bjerkandera adusta* isolierter MnP bzw. LiP. Details zur Anzucht der Kulturen und zur Durchführung der Oxidation wurden von Heinfling et al. [252, 261, 264] und R. Opitz [265] an anderer Stelle ausführlich beschrieben.

3.1.2 Oxidationsprodukte von Reaktiv Violett 5

Reaktiv Violett 5 (RV5) ist ein kupferhaltiger Azofarbstoff mit einem Vinylsulfonanker (s. Abb. 3.1). Die Hydrolyse von RV5 ergab die Hydroxyethylsulfon-Form von RV5 (RV5-OH, Strukturbeleg durch Massenspektrum s. Anhang B.2, Abb. B.1, S. 141). Abbildung 3.2 a) - c) zeigt Ausschnitte der DAD-Chroma-

¹Ab einem bestimmten Molekulargewicht ist ein Transport durch die Zellmembran von Mikroorganismen erschwert.

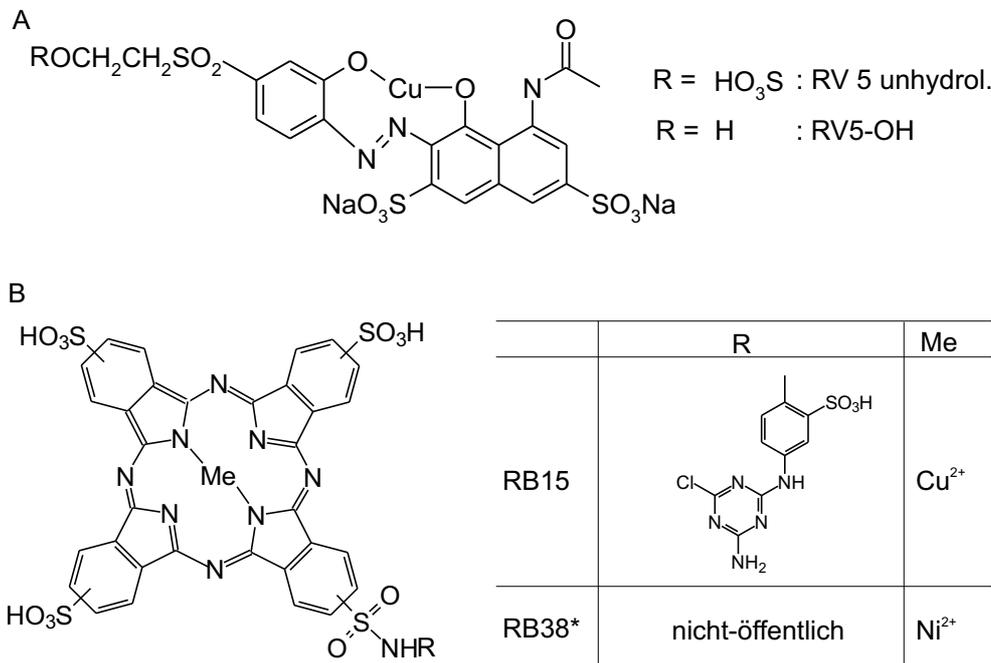


Abbildung 3.1 **A** Strukturen des Reaktivfarbstoffs Reaktiv Violett 5 (unhydrolysiert RV5 und hydrolysiert RV5-OH). **B** Strukturen der Phthalocyanin-farbstoffe Reaktiv Blau 5 (RB15) und Reaktiv Blau 38 (RB38), die als Substrate der enzymatischen Oxidation mit Pilzenzymen untersucht wurden.

*Im Fall von RB38 war die Anzahl der Sulfonsäuregruppen sowie Anzahl und Art der/des Reaktivanker/s nicht öffentlich zugänglich.

togramme (230 - 600 nm) von RV5 und RV5-OH sowie der Oxidationsprodukte von RV5-OH, die nach Hydrolyse von 100 mg/L RV5 und Inkubation mit MnP entstanden sind. Den Metaboliten RV5_{M1} und RV5_{M2} konnten Molekülanionen bei m/z 604, den Metaboliten RV5_{M3} und RV5_{M4} hingegen Molekülanionen bei m/z 602 zugewiesen werden. Die Molekülanionen der Metabolite RV5_{M2} und RV5_{M4} waren intensiv genug, um eine exakte Massenbestimmung zu erlauben. Es wurde für RV5_{M2} 604.0027 u gemessen, was einer Summenformel von C₂₀H₁₈N₃O₁₃S₃ innerhalb der Fehlergrenzen (2.7 mmu, 4.5 ppm) entspricht. Aus der exakten Masse von 601.9866 u konnte für RV5_{M4} eine Summenformel von C₂₀H₁₆N₃O₁₃S₃ (2.1 mmu, 3.4 ppm) abgeleitet werden. Der Vergleich mit der Summenformel des Molekülanions der hydrolysierten Ausgangsverbindung C₂₀H₁₆N₃O₁₂S₃Cu zeigte, dass sowohl bei RV5_{M2} als auch bei RV5_{M4} die Oxidation zum Aufbrechen des Kupferkomplexes geführt hatte. RV5_{M2} und RV5_{M4} wiesen ein zusätzliches Sauerstoff-Atom auf, RV5_{M4} darüber hinaus zwei weitere Wasserstoff-Atome. Nach diesen Befunden lag es nahe, RV5_{M2} und RV5_{M4} als reduzierte bzw. oxidierte Form eines primären Oxidationsproduktes zu deuten.

Die Produktions-Spektren aller vier Metabolite sprachen für eine Sulfonierung dieser Verbindungen (intensive (M - H - 80)⁻-Fragmente, s. Anh. B.2,

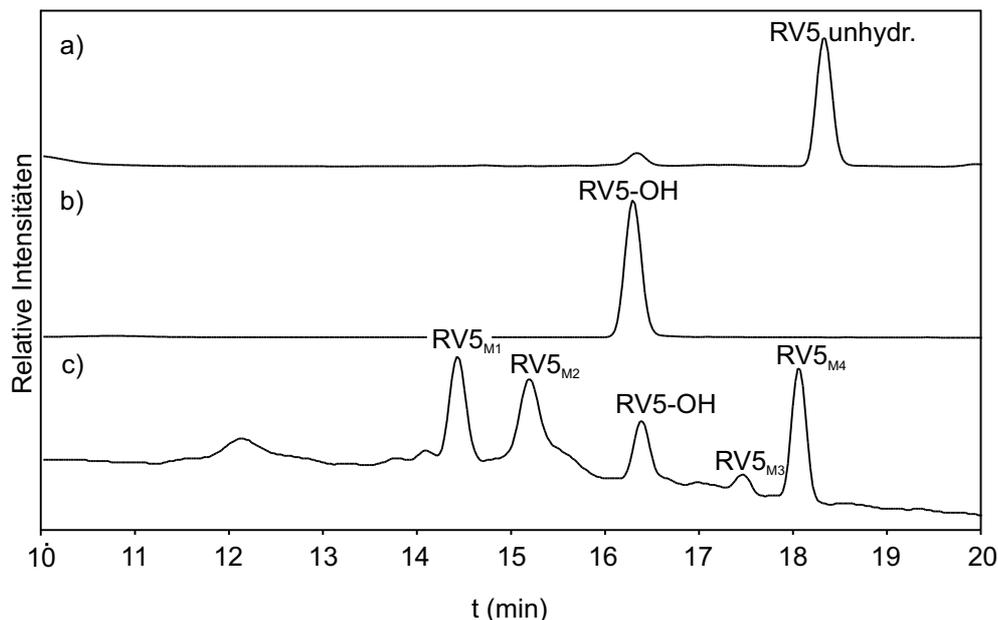


Abbildung 3.2 HPLC-DAD-Chromatogramme von von RV5 und Metaboliten. **a)** RV5 (unhydrolysiert), **b)** RV5-OH (hydrolysiert) und **c)** RV5-OH nach Umsatz mit MnP. Die parallel aufgenommenen Massenspektren belegten die Hydroxyethylsulfon-Struktur des hydrolysierten RV5-OH (s. Anh. B.2, Abb. B.1, S. 141). Die weitere Charakterisierung der Metabolite **c)** RV5_{M1} - RV5_{M4} erfolgte über UV/VIS- und Produktions-Spektren sowie über exakte Massenbestimmungen. Trennbedingungen s. HPLC-Trennsystem 6, S. 133.

Tab. B.2, S. 140). Darüber hinaus fanden sich SO₂- und CO-Verluste, die auf die Hydroxyethylsulfonyl-Gruppe und phenolische Hydroxygruppen zurückgeführt werden konnten. Die Übergänge mit einer Massendifferenz von 44 (m/z 524 \rightarrow m/z 480, m/z 308 \rightarrow m/z 264) konnten als Hinweis auf eine Carboxylfunktion (Verlust von CO₂) oder auch auf den Verlust von N₂O gedeutet werden. Aufgrund der sehr verwandten Massenspektren und Produkt-Ionen-Spektren der Metabolite RV5_{M1} und RV5_{M2} bzw. von RV5_{M3} und RV5_{M4} wurde davon ausgegangen, dass es sich bei diesen Metaboliten um Positionsisomere mit identischer Summenformel handelte.

Die geringe Veränderung der Summenformel konnte als Beleg dafür gelten, dass die Grundstruktur des Moleküls erhalten geblieben war. Die im Verlauf der Reaktion zu beobachtende Entfärbung (s. UV/VIS-Spektren der Metabolite RV5_{M1} - RV5_{M4}, Anhang B.2, Abb. B.1, S. 141) konnte nicht auf eine Spaltung der Azobridge zurückgeführt werden, da dies eine sehr viel stärkere Veränderung des Molekulargewichts und der Summenformel bewirkt hätte.

Die enzymatische Oxidation von Azofarbstoffen beginnt mit der Abstraktion eines Elektrons [254, 255, 256, 257]. Im Fall von RV5-OH gab es keine offensichtlich bevorzugte Position für diese Reaktion. Sowohl die Azogruppe, die aroma-

tischen Ringsysteme als auch das komplex gebundene Kupfer kamen hierfür in Frage. Das formal entstehende Radikalkation sollte unter den Versuchsbedingungen nicht stabil sein, sondern weiter oxidiert werden. Es sind zahlreiche Strukturen für die Metabolite denkbar, die aus Wasseranlagerungen, Umlagerungen und weitergehender Oxidation entstanden sein könnten und die mit den MS- sowie den UV-Daten im Einklang sind. In Abbildung 3.3 sind einige Vorschläge für Strukturen der Metabolite $RV5_{M1}$ - $RV5_{M4}$ abgebildet.

Unabhängig davon, welche Struktur der Metaboliten letztendlich die korrekte ist, kann aufgrund der massenspektrometrischen Daten festgehalten werden, dass die enzymatische Oxidation von $RV5\text{-OH}$ zunächst nur zu einer geringfügigen Modifikation des Ausgangsmoleküls führte. Ob diese Modifikation über

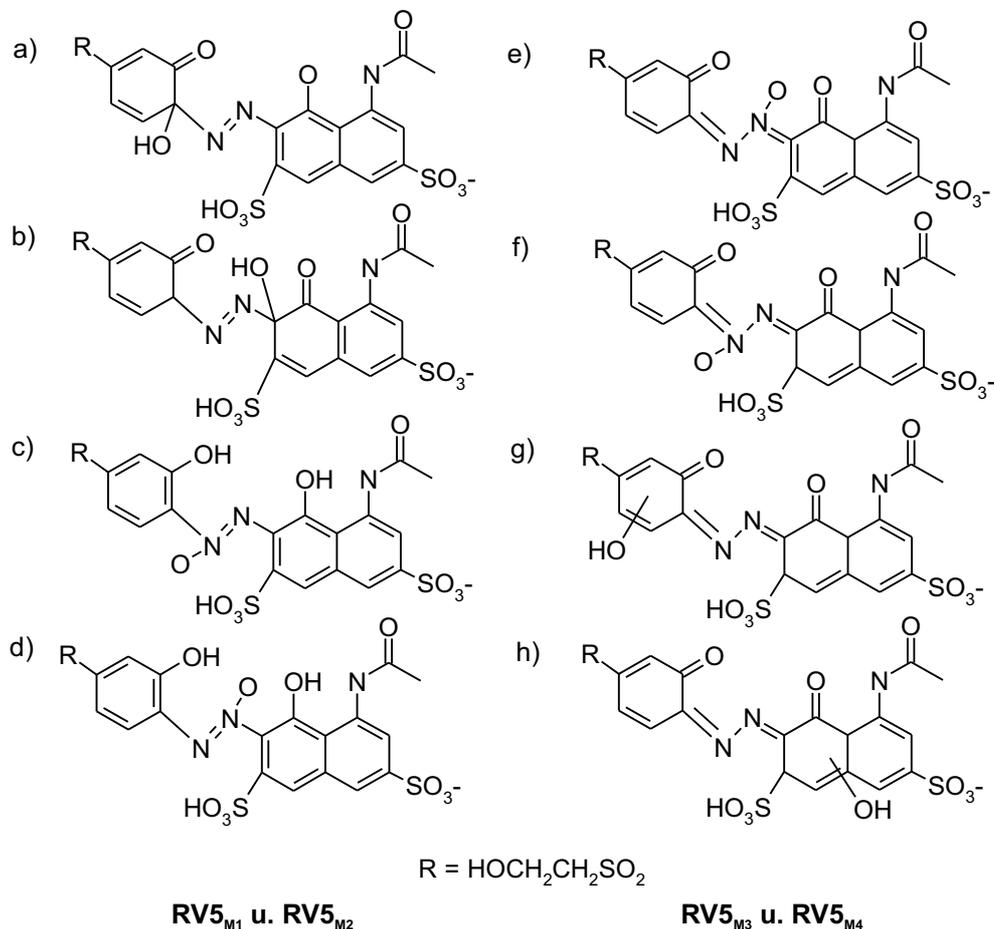


Abbildung 3.3 Mögliche Strukturen der Metabolite von $RV5\text{-OH}$. **a) - d)** $RV5_{M1}$ oder $RV5_{M2}$ (m/z 604, $C_{20}H_{18}N_3O_{13}S_3$), **e) - f)** $RV5_{M3}$ oder $RV5_{M4}$ (m/z 602, $C_{20}H_{16}N_3O_{13}S_3$). Die UV- und Produkt-Ionen-Spektren sind mit den Strukturen konsistent. Eine weitere Eingrenzung auf eine Struktur, bzw. eine Zuordnung von Spektren und Strukturen der Positionsisomere gelang nicht.

die Entfärbung hinaus auch die biologische Abbaubarkeit des Farbstoffes günstig beeinflusst wurde im Rahmen dieser Untersuchung nicht geklärt. Die Struktur-Vorschläge für die Metabolite RV5_{M1} - RV5_{M4} gaben zu dieser Vermutung jedoch keinen Anlass. Untersuchungen mit HPLC-UV [265] zeigten, dass die Metabolite RV5_{M1} - RV5_{M4} erstaunlich stabil und einer weiter gehenden Oxidation zumindest durch Pilzenzyme nicht zugänglich waren.

3.1.3 Phthalocyanine

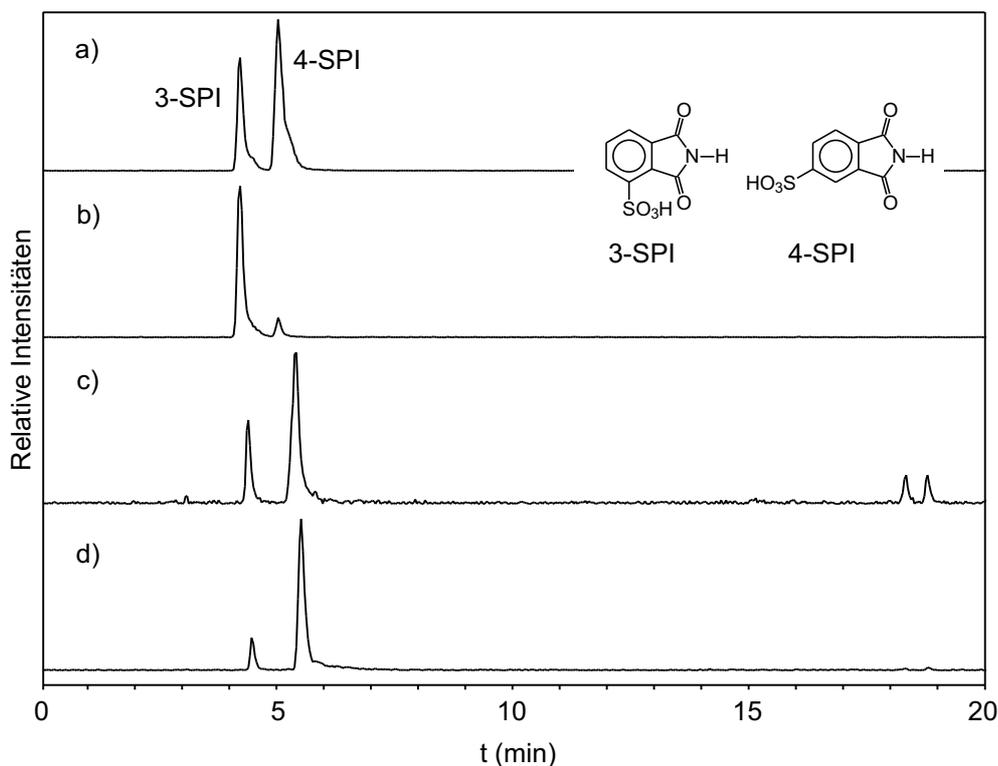


Abbildung 3.4 Sulfophthalimide als Oxidationsprodukte von RB15 und RB38. Extrahierte Ionenchromatogramme m/z 226 ($[M - H]^-$) von 3-SPI und 4-SPI. **a)** Gemisch aus 3-SPI und 4-SPI, **b)** 3-SPI, **c)** RB15 nach enzymatischen Umsatz mit MnP und **d)** RB38 nach enzymatischen Umsatz mit MnP. Trennbedingungen s. HPLC-Trennsystem 7, S. 134.

Bekannte Oxidationsprodukte der rein chemischen Oxidation von Sulfophthalocyaninen mit starken Oxidationsmitteln (HNO_3) waren die von Ali et al. [266] sowie Fischer [258] beschriebenen Sulfophthalimide. Es konnte daher vermutet werden, dass auch im Fall der enzymatischen Oxidation Sulfophthalimide gebildet werden. Die Hypothese wurde auch durch die Ergebnisse von HPLC-MS/MS-Analysen gestützt. Nach Synthese der Positionsisomeren 3-Sulfophthalimid (3-SPI) und 4-Sulfophthalimid (4-SPI) als Standardverbindungen (s. Anhang A.7,

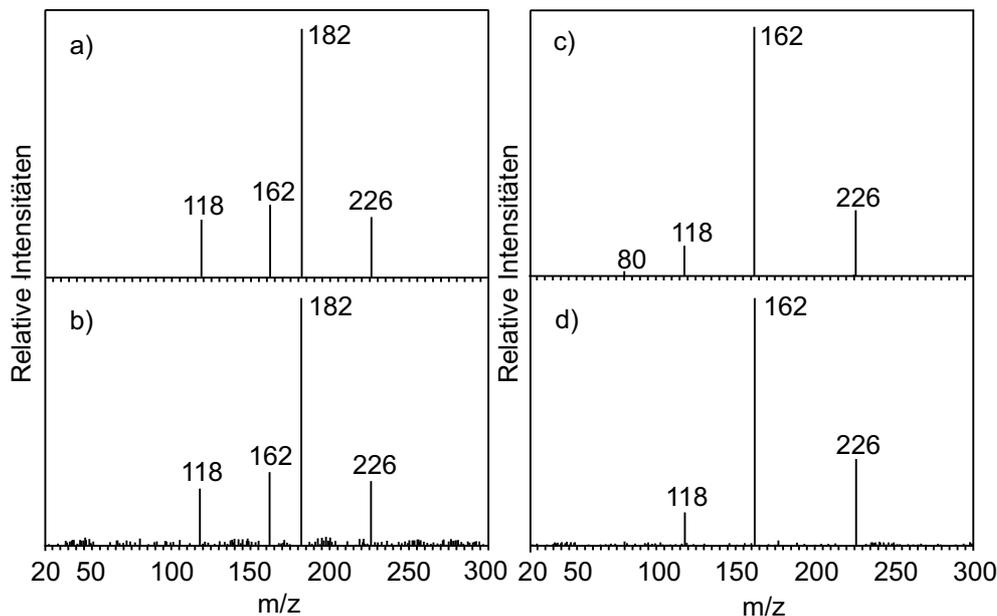


Abbildung 3.5 Produktions-Spektren der Sulfophthalimide 3-SPI und 4-SPI sowie der Oxidationsprodukte von RB15 bei 20 eV Kollisionsenergie. **a)** 3-SPI, **b)** Oxidationsprodukt 1 RB15, **c)** 4-SPI, **d)** Oxidationsprodukt 2 RB15.

S. 135, Strukturen s. Abb. 3.4) konnten dann UV- und Massenspektren sowie das chromatographische Verhalten der Standards zur Strukturaufklärung der bei der Oxidation auftretenden Metabolite herangezogen werden.

Abbildung 3.4 zeigt Chromatogramme der Sulfophthalimide sowie der Oxidationsprodukte der Sulfophthalocyaninfarbstoffe. Es sind extrahierte Ionen-Chromatogramme zur selektiven Erfassung der Molekülanionen der Sulfophthalimide (m/z 226) dargestellt. Die Chromatogramme a) und b) zeigen die Standards 3-SPI und 4-SPI im Gemisch sowie das durch fraktionierte Kristallisation isolierte 3-SPI. Ähnlich wie für ein anderes chromatographisches System beschrieben [266], eluiert 3-SPI auch hier vor dem isomeren 4-SPI. Die Hauptoxidationsprodukte von RB15 c) und RB38 d) aus dem Umsatz mit aus *Bjerkandera adusta* isolierter MnP eluieren zu vergleichbaren Retentionszeiten wie die Standardverbindungen. Die Produktions-Spektren von 3-SPI und 4-SPI waren mit den Produktions-Spektren der Farbstoffmetabolite annähernd identisch (gezeigt für RB15 in Abb. 3.5). Dabei wiesen die Produktions-Spektren von 3-SPI und 4-SPI einen interessanten Unterschied auf. Nur bei 3-SPI wurde das $[M - H - 44]^-$ -Ion bei m/z 182 beobachtet, es war bei 20 eV Kollisionsenergie sogar der Basispeak (s. Abb. 3.5 a) und b)). Dieses Fragment konnte mit einiger Wahrscheinlichkeit auf die Eliminierung von CO_2 zurückgeführt werden, da eine Eliminierung von CH_2NO ein weiteres azides H-Atom in der Nachbarschaft der Imidogruppe erfordert hätte. Dieses Ion trat bei 4-SPI nicht auf, die Fragmentierung konnte

daher auf die ortho-ständige Sulfonsäuregruppe zurückgeführt werden. In diesem Fall wurde folglich ein ortho-Effekt beobachtet. Strukturspezifische Fragmentierungen dieser Art könnten eine selektive Detektion durch SRM-Übergänge ohne vorherige chromatographische Trennung erlauben.

Die Koelution der Standardsubstanzen und der Oxidationsprodukte sowie die identischen Produktions-Spektren wurden als positive Identifizierung der Farbstoffmetabolite gewertet. Als Ergebnis der Untersuchungen konnte also festgehalten werden, dass 3-SPI und 4-SPI Produkte der enzymatischen Oxidation von Sulfophthalocyanin-Farbstoffen sind.

Da Standardsubstanzen zur Verfügung standen, konnten die Oxidationsprodukte nach der Identifizierung quantitativ erfasst werden. Die Quantifizierung wurde für RB15 mit HPLC-UV durchgeführt. Aufgrund der Struktur konnte davon ausgegangen werden, dass pro Mol Phthalocyaninfarbstoff drei Mol Sulfophthalimide und ein Mol Sulfophthalimid mit Reaktivanker gebildet werden. Bei einer Ausgangskonzentration von $16 \mu\text{molL}^{-1}$ wurden $29.4 \mu\text{molL}^{-1} \pm 2.1 \mu\text{molL}^{-1}$ Sulfophthalimide detektiert [264]. Dies entsprach einem Umsatz von 60%. Es blieb dabei unklar, ob zur Erklärung dieser Differenz ungenaue Angaben zur Reinheit des Farbstoffes (es wurde von der Herstellerangabe von 35% Farbstoffgehalt ausgegangen) oder ein unvollständiger Umsatz herangezogen werden muss.

Der weitere Abbau von 3-SPI und 4-SPI mit isolierten Pilzenzymen oder in Ansätzen mit Pilzkulturen gelang nicht. Die Frage, ob die Behandlung mit (evt. immobilisierten) Weißfäulepilzen über die Entfärbung der Phthalocyaninfarbstoffe hinaus in ein Verfahren zur Mineralisierung dieser refraktären Stoffe integriert werden kann, hängt folglich mit der Frage zusammen, ob Sulfophthalimide einer weitergehenden biologischen Behandlung (aerobe, bzw. anaerob-aerobe Behandlung) zugänglich sind².

3.2 Ozonung von Naphthalin-1,5-sulfonat

Im Gegensatz zu Phthalocyanin- und Azofarbstoffen sind Naphthalinsulfonate als vergleichsweise elektronenarme Aromaten einer Oxidation durch Pilzenzyme nicht zugänglich³.

Angesichts der auch in anderen biologischen Verfahren, wie z.B. in der anaerob/aeroben Behandlung (s. Kap. 1.2.3) zu beobachtenden Persistenz insbesondere der höher sulfonierten Vertreter dieser Substanzklasse stellen kombinierte Oxidationsverfahren [269] oder die Ozonung [270] beachtenswerte Handlungs-

²Neuere am Fachgebiet durchgeführte Arbeiten zur biologischen Abbaubarkeit von 3-SPI und 4-SPI haben hier ein differenziertes Bild ergeben [267, 268]. Während 3-SPI im aeroben Abbaueversuch nur abiotisch hydrolysiert, wird 4-SPI mineralisiert.

³So ist z.B. Naphthalin-2-sulfonat unter den für die Farbstoffentfärbung gewählten Bedingungen stabil, s. Kap. 3.1.3.

alternativen dar. Wenn bei der chemischen Oxidation biologisch abbaubare Metabolite entstehen, lassen sich über die Kombination von chemischer Oxidation und biologischer Behandlung [270,271] Kostenvorteile gegenüber der rein chemischen Oxidation erzielen.

Kombinierte Verfahren aus Ozonung und Biologie wurden erfolgreich zur Behandlung von Raffinerie- [272], Gerberei- [273, 274] und Textilabwässern [275, 276, 277, 278] eingesetzt. Im Bereich der Textilabwasserbehandlung war neben der Entfärbung [279] die Verbesserung der biologischen Abbaubarkeit der resultierenden Metabolite [280] ein wichtiges Behandlungsziel. Auch die Entfernung von oberflächenaktiven Substanzen wie Tensiden und Detergentien war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen [276, 277, 278].

Die biologische Abbaubarkeit der Ozonungsprodukte refraktärer Stoffe wie aromatischer Sulfonate ist für die Beurteilung von Kombinationsverfahren aus Ozonung und biologischer Behandlung von zentraler Bedeutung [281, 282, 283]. Die Wirtschaftlichkeit der Verfahren hängt von der zur Verbesserung der biologischen Abbaubarkeit erforderliche Ozondosis entscheidend ab.

Die biologische Abbaubarkeit der Ozonungsprodukte zahlreicher aromatischer Sulfonate wurde von Gilbert [281] anhand des BOD₅/COD-Verhältnisses und der COD- sowie DOC-Eliminierung untersucht. Im Mittel wurde bis zu einer COD-Eliminierung von ca. 40% keine Verbesserung der biologischen Abbaubarkeit (BOD₅/COD-Verhältnis < 0.2) beobachtet, ab einer COD-Eliminierung von über 65% waren die Ozonungsprodukte gut biologisch abbaubar (BOD₅/COD-Verhältnis > 0.4). Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass die initialen Ozonungsprodukte im allgemeinen schlecht biologisch abbaubar waren. Erst eine starke strukturelle Veränderung (Sauerstoffaufnahme bzw. COD-Eliminierung) führte zu einer guten biologischen Abbaubarkeit. Die chemische Struktur der Ozonungsprodukte wurde jedoch nicht ermittelt. Bei der Ozonung von p-Toluolsulfonsäure wurden Brenztrauben-, Oxal-, Essig- und Ameisensäure sowie Methylglyoxal als Endprodukte identifiziert [282]. Darüber hinaus wurde ein schwefelhaltiges Zwischenprodukt nachgewiesen, dessen Struktur mit den zur Verfügung stehenden Methoden jedoch nicht aufgeklärt werden konnte⁴.

Die Reaktion von Ozon mit aromatischen Sulfonaten führt sehr wahrscheinlich über sulfonierte Zwischenprodukte zu den oben beschriebenen Endprodukten. Da die Identifizierung von hochpolaren und schwer flüchtigen Substanzen mit GC-MS auf prinzipielle Schwierigkeiten stößt (Problem der Derivatisierung unbekannter Verbindungen, unvollständige Spektren-Bibliotheken), wurden schon früh HPLC-MS-Techniken zur Analyse derartiger Verbindungen eingesetzt, etwa bei der Identifizierung von Ozonungsprodukten der Phthalsäure [284]. In dieser Arbeit sollten im Rahmen einer integrierten Strukturanalytik neue LC-

⁴Der Nachweis erfolgte nach Methylierung der Ozonungsprodukte über schwefelselektive Detektion mit GC-FPD.

MS-Methoden zur Charakterisierung und Identifizierung der Ozonungsprodukte von Naphthalin-1,5-sulfonat eingesetzt werden.

3.2.1 Mechanismus der Ozonung

Die direkte Reaktion von Ozon mit olefinischen und aromatischen Systemen wird nach R. Criegee als eine 1,3-dipolare Cycloaddition gedeutet [285, 286]. Die Reaktion verläuft über das Primärozonid (das sogenannte Molozonid, s. Abb. 3.6 A a)) und ein 1,2,4-Trioxolan (Abb. 3.6 A c)) zu Aldehyden und Ketonen als den Endprodukten. In Wasser als partizipierendem Lösungsmittel kann ein deutlich anderes Produktspektrum auftreten als in nicht-partizipierenden Lösungsmitteln [287, 288], neben intramolekularen Zyklisierungen spielt hier die Weiteroxidation durch aus Peroxyacetalen abgespaltenes Wasserstoffperoxid (Abb. 3.6 A d)) eine Rolle. Umlagerungen des beim Zerfall des Primärozonids intermediär auftretenden Carbonyloxids (Abb. 3.6 A b)) können insbesondere bei Alkenyl- und Arylresten zu sogenannten anomalen Ozonungsprodukten führen [285, 286, 289], entsprechend Abbildung 3.6 A e) werden Ester gebildet, deren Hydrolyse Enole und Phenole ergibt. Aromaten reagieren mit Ozon ähnlich wie Alkene [285]. Die Regiochemie der Reaktion ist grenzorbital-kontrolliert [290], im Fall von Naphthalin erfolgt die Addition von Ozon an den reaktiven 1,2- und 3,4-Positionen des Naphthalinringes [285, 287, 288, 291]. Als Ozonungsprodukte in wässrigem Medium wurden cis- und trans-2-Formylzimtaldehyd sowie 1,4-Naphthochinon beschrieben [288]. Die Reaktionsprodukte in partizipierenden Lösungsmitteln wie etwa Methanol umfassen zyklische Peroxide, Phthalide und Phthalsäure [285, 287, 291].

Drei potentielle Mechanismen der Sulfateliminierung sind in Abbildung 3.6 B a) - c) dargestellt. Es sind dies die Umlagerung des Carbonyloxids zum gemischten Anhydrid mit anschließender Hydrolyse (Abb. 3.6 B a)), die Eliminierung von Sulfat aus einem Peroxyacetal (Abb. 3.6 B b)) und die Oxidation des α -Oxosulfonats zur Carbonsäure (Abb. 3.6 B c)). Die Sulfateliminierung führt bei diesen Mechanismen immer zur Carbonsäure und nicht zum Aldehyd, dies konnte bei der Strukturaufklärung zur Formulierung von Auswahlkriterien herangezogen werden.

Die indirekte Reaktion mit Ozon in Wasser, in der Regel radikalische Ozonung genannt, geht auf die Oxidationswirkung von Hydroxylradikalen zurück, die insbesondere bei höheren pH-Werten in einer komplexen Kettenreaktion aus Ozon gebildet werden [270, 292]. Bei niedrigen pH-Werten sind Reaktionen dieser Art jedoch von untergeordneter Bedeutung.

3.2.2 Batch-Ozonung von Naphthalin-1,5-disulfonat

Im Fachgebiet Verfahrenstechnik der TU Berlin wurde eine Verfahrenskombination aus Ozonung und biologischer Behandlung zur Eliminierung von biologisch nicht abbaubaren Schadstoffen erprobt. Dieses Verfahren wurde in zwei

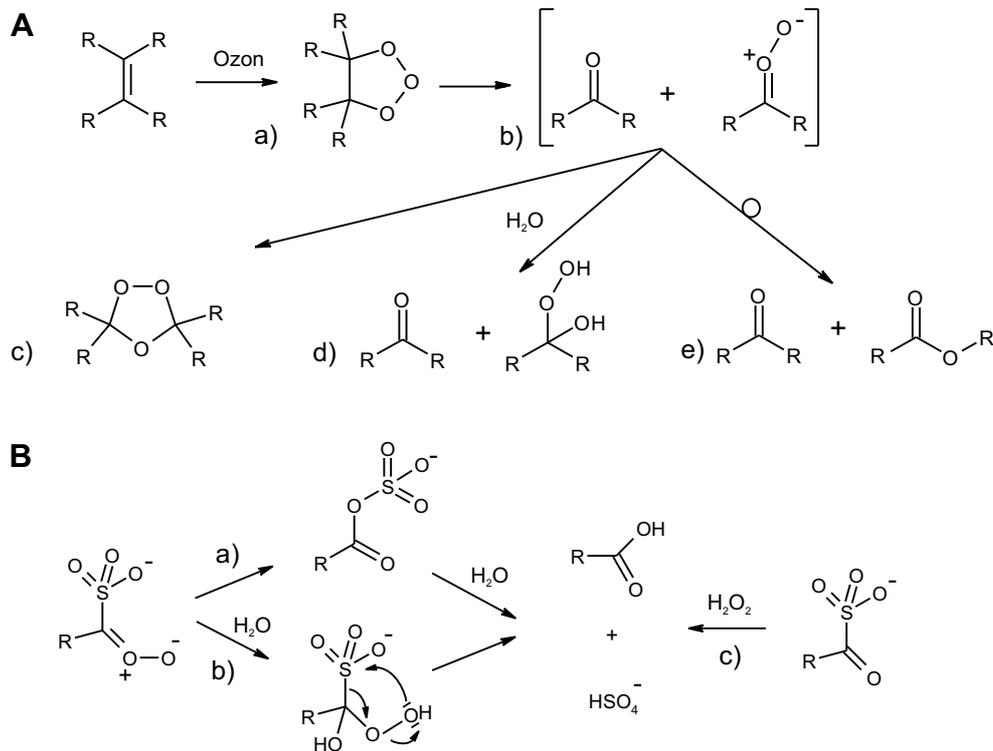


Abbildung 3.6 A Mechanismus der Ozonung. Das Primärozonid **a)** zerfällt in Carbonylverbindung und Carbonyloxid **b)**. Diese reagieren in nicht partizipierenden Lösungsmitteln zum 1,2,4-Trioxolan **c)**, in partizipierenden Lösungsmitteln unter Wasseranlagerung zu Peroxyacetalen **d)**. Anomale Ozonungsprodukte wie **e)** resultieren aus Umlagerungen des Carbonyloxids.

B Denkbare Reaktionsmechanismen der Sulfateliminierung: Umlagerung des Carbonyloxids in ein leicht hydrolysierbares gemischtes Anhydrid **a)**, Wasseranlagerung und Sulfateliminierung **b)** sowie Oxidation von α -Oxosulfonat **c)**.

semi-kontinuierlichen Laboranlagen näher untersucht [283]. Naphthalin-1,5-disulfonsäure wurde aufgrund ihrer Persistenz unter aeroben Bedingungen [57] als Modellsubstanz ausgewählt.

In begleitenden Batchversuchen sollte der Ozonbedarf zur vollständigen Mineralisierung von Naphthalin-1,5-disulfonsäure ermittelt und ein Eindruck vom Reaktionsverlauf erhalten werden. Hierzu sollte auch die Struktur von Zwischenprodukten der Ozonung ermittelt werden. Die Batchversuche wurden in einem auf 20°C thermostatisierten Glasrührkessel ohne pH-Regelung durchgeführt. Es wurde mit Naphthalinsulfonat-Konzentrationen von 450 - 850 mg/L, entsprechend 150 - 280 mg/L DOC gearbeitet. Eine Versuchsskizze sowie weitere Betriebsparameter finden sich in Anhang A.8, S. 136. Die vollständige Oxidation von Naphthalin-1,5-disulfonat erforderte 7.2 g O₃/g DOC (bzw. 1.8 mol O₃/mol DOC, 2.3 g O₃/g Sulfonsäure, 2.2 g O₃/g COD). Zur Charakterisierung und Identifizierung der Ozonungsprodukte wurden die Batchversuche mit hoher Konzentration

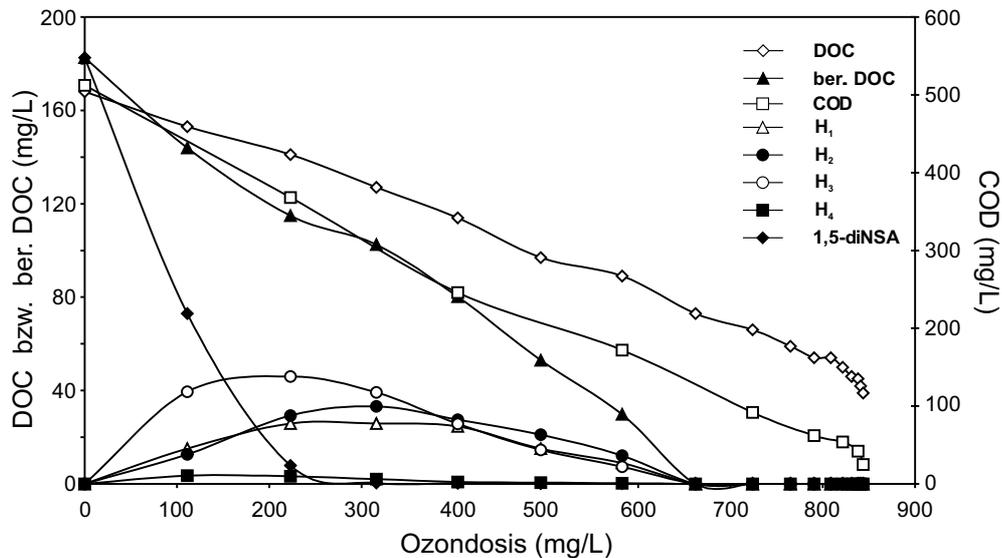


Abbildung 3.7 DOC- und COD-Eliminierung sowie Auftreten der Oxidationsprodukte in Abhängigkeit von der Ozondosis. Das Edukt wurde direkt über HPLC-UV bestimmt, die Konzentrationen der Hauptprodukte wurden in mg DOC/L über angenäherte Responsefaktoren abgeschätzt. Die Summe der Konzentrationen des Eduktes und der Hauptprodukte ist als ber. DOC angegeben (nähere Erläuterungen im Text).

gefahren (2000 mg Naphthalin-1,5-disulfonsäuretetrahydrat/L, entsprechend 660 mg DOC/L), um Problemen mit der Detektions-Empfindlichkeit zu begegnen.

Quantifizierung der Hauptozonungsprodukte mit HPLC-UV

Die Arbeiten zur Quantifizierung der Hauptozonungsprodukte von Naphthalin-1,5-disulfonat sowie zur Kinetik der Ozonung wurden am Fachgebiet Verfahrenstechnik von Dr. T. Breithaupt und K. Schön durchgeführt. Ihre Ergebnisse bilden die Grundlage der Arbeiten zur Strukturaufklärung der Ozonungsprodukte und werden daher im Folgenden kurz dargestellt.

Im UV-Chromatogramm (s. Abb. 3.8 a), S. 72) wiesen zu Beginn der Ozonung neben dem Edukt nur die Komponenten H₁ – H₄ auswertbare Signalfächen auf. Die Komponenten H₁ – H₄ wurden daher als Hauptozonungsprodukte betrachtet. Die quantitative Erfassung der Hauptozonungsprodukte gelang über eine Abschätzung ihrer Response-Faktoren. Hierzu wurde vorausgesetzt, dass zu Beginn der Ozonung die Differenz der Konzentration von DOC und Naphthalin-1,5-disulfonat (in mg DOC/L) gleich der Summe der Konzentrationen der im UV-Chromatogramm sichtbaren Komponenten sei. Diese Voraussetzung zusammen mit der angenommenen Linearität des UV-Detektors im betrachteten Konzen-

trationsbereich erlauben die Aufstellung eines linearen Gleichungssystems aus n Gleichungen der Form von Gl. 3.1⁵.

$$a \cdot \text{SIG}_{H_1} + b \cdot \text{SIG}_{H_2} + c \cdot \text{SIG}_{H_3} + d \cdot \text{SIG}_{H_4} = \text{DOC} - \text{DOC}_{\text{Edukt}} \quad (3.1)$$

Hier sind SIG_{H_i} die Signalfächen der chromatographischen Signale sowie DOC und $\text{DOC}_{\text{Edukt}}$ die Konzentrationen des Gesamt-DOC und von Naphthalin-1,5-disulfonsäure in mg DOC/L. Die Koeffizienten $a - d$ sind die Response-Faktoren der Komponenten $H_1 - H_4$. Zur Fehlerminimierung wurden Signalfächen sowie DOC - und $\text{DOC}_{\text{Edukt}}$ -Werte aus zehn unterschiedlichen Reaktionsansätzen verwendet⁶. Die Unterschiede in der Durchführung der Reaktion sowie im genauen Zeitpunkt der Entnahme der Proben sollten dabei eine lineare Unabhängigkeit der Koeffizienten und damit korrekte Werte für die Response-Faktoren garantieren. Die Response-Faktoren ergaben sich zu $a = 0.032$, $b = 0.064$, $c = 0.024$ und $d = 0.011$ und haben die Dimension $\text{mg DOC} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{Flächeneinheit}^{-1}$.

Die Komponenten $N_1 - N_8$ (s. Abb. 3.8, S. 72) ergaben bei dem Versuch, ihre zu Beginn der Ozonung noch sehr geringen Signalfächen in die Auswertung mit einzubeziehen, nur vernachlässigbare Konzentrations-Beiträge. Sie wurden daher als Nebenprodukte klassifiziert und nicht in die quantitative Auswertung mit einbezogen.

Damit gelang eine quantitative Abschätzung der Konzentrationen der Hauptozonungsprodukte in mg/L DOC. Hierzu waren keine analytischen Standards nötig. Die Response-Faktoren wurden verwendet, um die Konzentration der Hauptprodukte im Verlauf der Ozonung zu berechnen. Als ein wichtiger Parameter wurde die Summe der berechneten Konzentrationen der Hauptprodukte und von Naphthalin-1,5-disulfonsäure als „berechneter DOC“ (ber. DOC) eingeführt, die mit dem gemessenen DOC verglichen werden konnte. Eine Konzentrationsangabe in mg/L hingegen konnte erst erfolgen, als die Struktur der Hauptozonungsprodukte bekannt war.

Kinetik der Ozonung von Naphthalin-1,5-disulfonat

Die DOC- und COD-Eliminierung sowie die Bildung der Hauptozonungsprodukte in Abhängigkeit von der Ozondosis sind in Abbildung 3.7 für einen Batchversuch dargestellt. Die Summe der DOC-Konzentration von Naphthalin-1,5-disulfonat und der Hauptprodukte $H_1 - H_4$ ist als berechneter DOC (ber. DOC) wiedergegeben. Wie zu erwarten nimmt sowohl der DOC als auch der COD im Laufe der Oxidation ab, wobei das DOC/COD-Verhältnis von 0.33 auf 1.56 steigt. Die Ausgangsverbindung ist ab einer Ozondosis von ca. 250 mg/L Ozon nicht mehr

⁵Mit $n = \text{Anzahl der Proben}$ und $n \geq 4$.

⁶Das Gleichungssystem 3.1 ist damit überbestimmt, jede Probe über $n = 4$ kann als Bestätigung dienen.

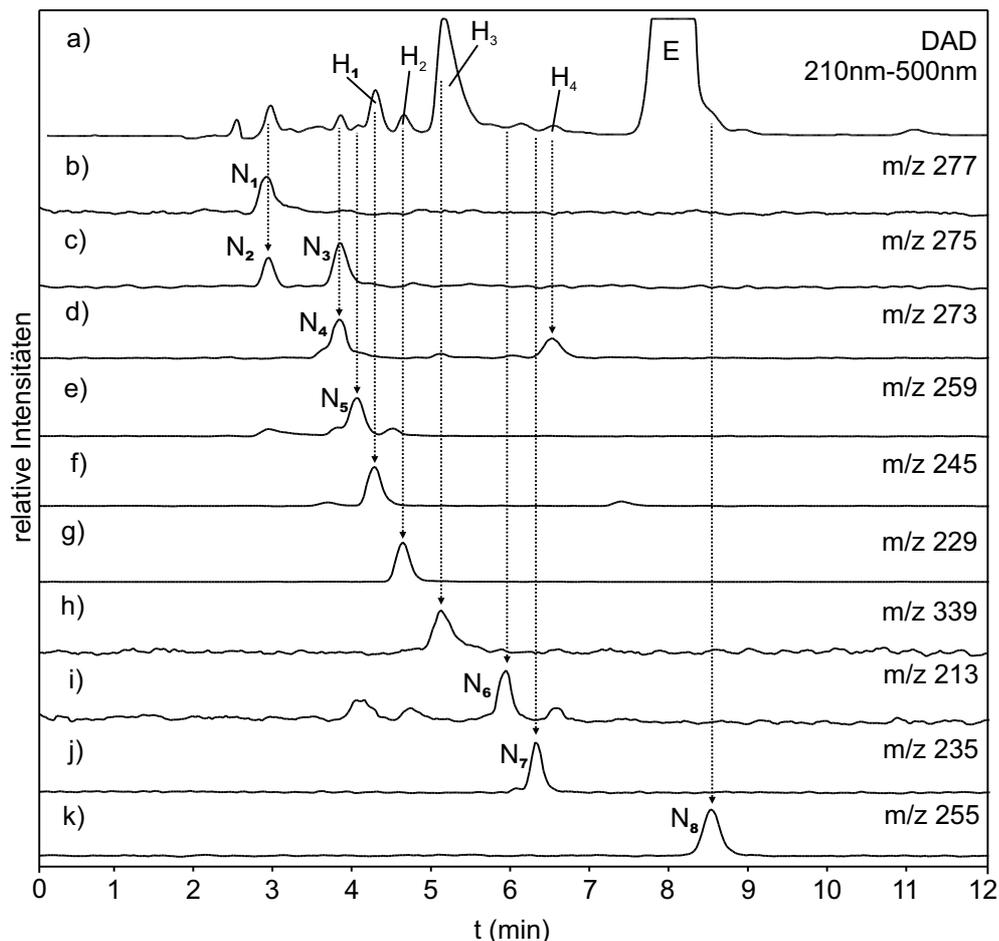


Abbildung 3.8 Isokratische HPLC-Trennung der Ozonungsprodukte von Naphthalin-1,5-disulfonat E mit schwerflüchtigem Ionenpaarreagenz (TrBA-Br). a) DAD und b) - k) extrahierte Ionenchromatogramme der Oxidationsprodukte. Trennbedingungen s. HPLC-Trennsystem 8, S. 134.

nachweisbar. Bei dieser Ozondosis ist eine DOC-Eliminierung von etwa 15% zu beobachten. Die Konzentration der Komponenten H_1 – H_4 durchläuft hier ein Maximum (s. Abb. 3.7). Die sich stetig vergrößernde Differenz zwischen DOC und berechnetem ber. DOC zeigt die Bildung weiterer Oxidationsprodukte an, die im Vergleich zu den Hauptprodukten an Bedeutung gewinnen. Als Erklärung für die Diskrepanz kamen Nebenprodukte, die erst später im Reaktionsverlauf auftraten, ebenso in Frage wie Substanzen, die durch die verwendete HPLC-UV-Methode aufgrund fehlender UV-Absorption nicht erfasst wurden.

3.2.3 Charakterisierung der Ozonungsprodukte

Erster Schritt der HPLC-MS-Untersuchungen der Ozonungsprodukte war die Trennung mit der selben isokratischen HPLC-Methode wie bei den HPLC-UV-Messungen. Hierdurch sollte eine eindeutige Zuordnung der UV-Signale zu den Massenspektren erreicht werden. Trotz der in Kapitel 2.4, S. 42, beschriebenen Probleme bei der Kopplung von Ionenpaarchromatographie mit nicht-flüchtigen Ionenpaarreagenzien und Massenspektrometrie konnte die Methode erfolgreich zur Peakzuordnung eingesetzt werden. Abbildung 3.8 a) zeigt ein Chromatogramm (Detektion mit UV-DAD) einer nach 60 Minuten Ozonungsdauer aus dem Batchreaktor entnommenen Probe. Über extrahierte Ionenchromatogramme gelang es, den im UV sichtbaren Peaks des Chromatogramms Massenspuren zuzuordnen (Abb. 3.8 b) - k)). Da die Analyse bei niedriger Cone-Voltage vorgenommen wurde, handelte es sich bei diesen Massen aller Wahrscheinlichkeit nach um Molekülionen, die Massen entsprechen also den Molekulargewichten der unbekannt Verbindungen. Den Hauptkomponenten H₁ – H₄ wurden die Massen m/z 245, m/z 229, m/z 339 und m/z 273 zugeordnet.

Die Qualität der Massenspektren der Analyte war wegen der geringen Empfindlichkeit der Methode und des durch das Ionenpaarreagenz bedingten starken chemischen Rauschens gering. Die weitere Charakterisierung der Oxidationsprodukte über exakte Massenbestimmungen, Produktionen-Spektren sowie in einigen Fällen über ¹H-NMR-Spektren wurde daher mit anderen chromatographischen Systemen durchgeführt. Bei den hierbei genutzten HPLC-Systemen kam als Ionenpaarreagenz das flüchtige Tributylamin (TrBA) zu Einsatz, mit dem sich zufriedenstellende Empfindlichkeiten und ausreichende Standzeiten der Massenspektrometer erreichen ließen. Insgesamt wurden im Rahmen der Untersuchungen vier verschiedene Chromatographiesysteme eingesetzt.

Bestimmung der Summenformeln mit HPLC-TOFMS

Die Summenformeln der Ozonungsprodukte wurden über exakte Massenbestimmungen mit einem TOF-Massenspektrometer ermittelt. In Abbildung 3.9 a) und b) sind zwei Chromatogramme der Ozonungsprodukte dargestellt. Die Ermittlung eindeutiger Summenformeln über exakte Massenbestimmungen war im vorliegenden Fall erleichtert, da die Summenformel des Eduktes bekannt war. So konnten leicht Annahmen über die minimale und maximale Anzahl der Elemente C, H, S und O getroffen werden. Die Produktionen-Spektren und die UV-Spektren enthielten weitere Anhaltspunkte⁷, die zur Einschränkung der Anzahl möglicher Summenformeln herangezogen werden konnten. Oft wurde nur

⁷Über diagnostische Fragmente in den MS/MS-Spektren ergeben sich Mindestanzahlen für einzelne Elemente, z.B. 1 S und 3 O für das Fragment m/z 80, SO₃; sind UV-Spektren vorhanden, so enthält die Substanz mindestens 3.5 Doppelbindungsequivalente (Ringe + Doppelbindungen).

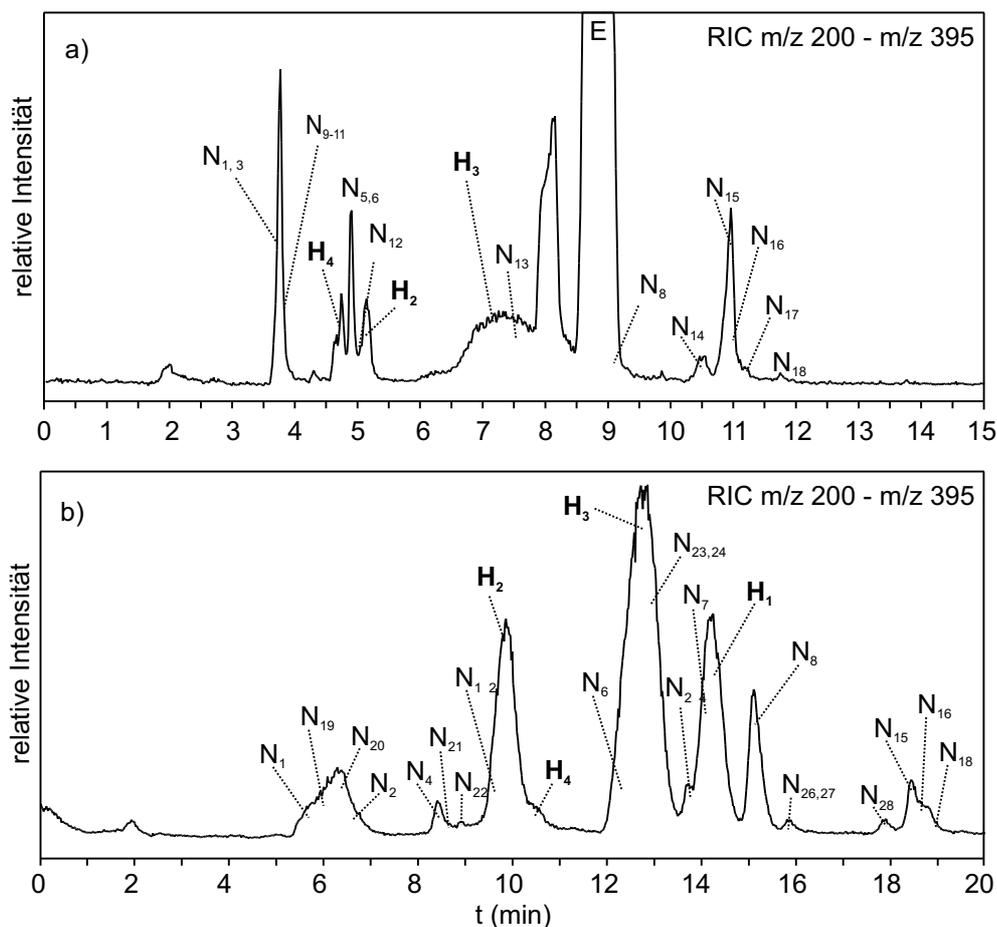


Abbildung 3.9 HPLC-TOFMS der Ozonungsprodukte. Die Bestimmung von Summenformeln gelang über exakte Massenbestimmung der Hauptprodukte $H_1 - H_4$ und der 28 Nebenprodukte ($N_1 - N_{28}$). **a)** Probe bei $t = 30$ min, Cone-Spannung 70 V, **b)** Probe bei $t = 240$ min, Cone-Spannung 30 V, Trennbedingungen s. HPLC-Systeme **9**, S. **134** (**a**) und **10**, S. **134** (**b**).

eine Elementarzusammensetzung für eine exakte Masse erhalten. In mehrdeutigen Fällen konnten über Vergleiche mit den exakten Massen von Fragmenten oftmals eindeutige Ergebnisse erzielt werden. Die eindeutig ermittelten Summenformeln der Ozonungsprodukte sind im Anhang zusammengestellt (s. Anhang **B.3.1**, Tab. **B.3**, S. **142**, und Tab. **B.4**, S. **143**). Sie umfassen neben den 4 Hauptprodukten die Summenformeln von 28 Nebenprodukten.

Identifizierung von Strukturelementen durch on-line-Messung von Produktions-Spektren und ^1H -NMR-Spektren

Von allen intensiveren Peaks wurden Produktions-Spektren mit Kollisionsenergien von 20 eV und 30 eV aufgenommen. Im Falle komplexerer Spektren oder

höherer Molekülmasse wurden auch Produktionen-Spektren intensiver Fragmentationen aufgenommen. Diese als pseudo-MSⁿ zu bezeichnende Technik [204] erleichtert dann die Interpretation der Spektren, wenn in den Produktionen-Spektren der Fragmente diagnostische Ionen auftreten, die beim eigentlichen Moleküllion fehlen. Eine Übersicht über die Produktionen-Spektren findet sich in Anhang B.3.1, Tab. B.5, S. 145, und Tab. B.6, S. 147.

HPLC-NMR-Messungen wurden mit einem Gradientensystem aus D₂O und Acetonitril mit paralleler MS-Detektion durchgeführt. Die D₂O-Phase enthielt als Ionenpaarreagenz TrBA und Essigsäure⁸. Die ¹H-NMR-Spektren wurden entweder kontinuierlich (on-flow-Betrieb) oder diskontinuierlich nach Fraktionierung in ein System von Probenschleifen (Loop-Betrieb) aufgenommen. Unter den gewählten Bedingungen kam es zur Substitution azider Protonen durch Deuteronen⁹. Aus der Massendifferenz der Massenspektren in H₂O und D₂O ergab sich dann die Anzahl azider Protonen der jeweiligen Substanz. Dies stellte eine wertvolle Strukturinformation dar [293], die sich auch in die computergestützte Spektreninterpretation integrieren ließ. Eine Zusammenstellung der ¹H-NMR-Daten findet sich in Anhang B.3.2, Tab. B.7, S. 149.

Strukturgenerator-Software für Strukturvorschläge

Die Interpretation der Daten wurde unter Einsatz von Strukturgenerator-Software durchgeführt (s. Anh. A.10, S. 137). Als Strukturgenerator (SG) wird ein topologischer Algorithmus bezeichnet, der alle zu einer Summenformel gehörigen Strukturformeln berechnet [294,295]. Aus der auch für relativ einfache Summenformeln sehr großen Anzahl möglicher Strukturformeln¹⁰ mussten dann diejenigen ermittelt werden, die sich mit den spektroskopischen Daten, den Vorstellungen über den Reaktionsmechanismus sowie allgemeinen Überlegungen zur Stabilität und Reaktivität bestimmter Strukturelemente im Einklang befanden. Diese Auswahl erfolgte über die Formulierung von Auswahlregeln, die in die Software implementiert werden konnten¹¹. So wurden alle in wässriger Lösung instabilen Strukturelemente (wie z.B. endständige Enole, geminale Dirole, Hydroperoxide u.a.) ausgeschlossen. Aufgrund des Reaktionsmechanismus waren darüber hinaus keine Strukturen möglich, bei denen neue C-C- und C-S-Bindungen gebildet worden waren. Abhängig von der spektroskopischen Datenlage konnten bestimmte Strukturelemente zwingend gefordert werden, wie z.B. eine Sulfonsäuregruppe bei Detektion des diagnostischen Fragments bei m/z 80. Am Ende dieses Prozes-

⁸Für genaue Trennbedingungen s. HPLC-Trennsystem 11, S. 134

⁹Der Austausch von Protonen ist unterschiedlich schnell und ist z.B. bei C-gebundenen Protonen sehr viel langsamer als bei O-gebundenen Protonen. Dies kann zu einer unvollständigen Substitution durch Deuteronen führen und damit zu inkorrekten Integralen in den ¹H-NMR-Spektren.

¹⁰z.B. ergibt sich für C₈H₆SO₇ eine Anzahl von > 1.4·10⁵.

¹¹Dieser Arbeitsschritt wird im Folgenden kurz als SG-Analyse bezeichnet.

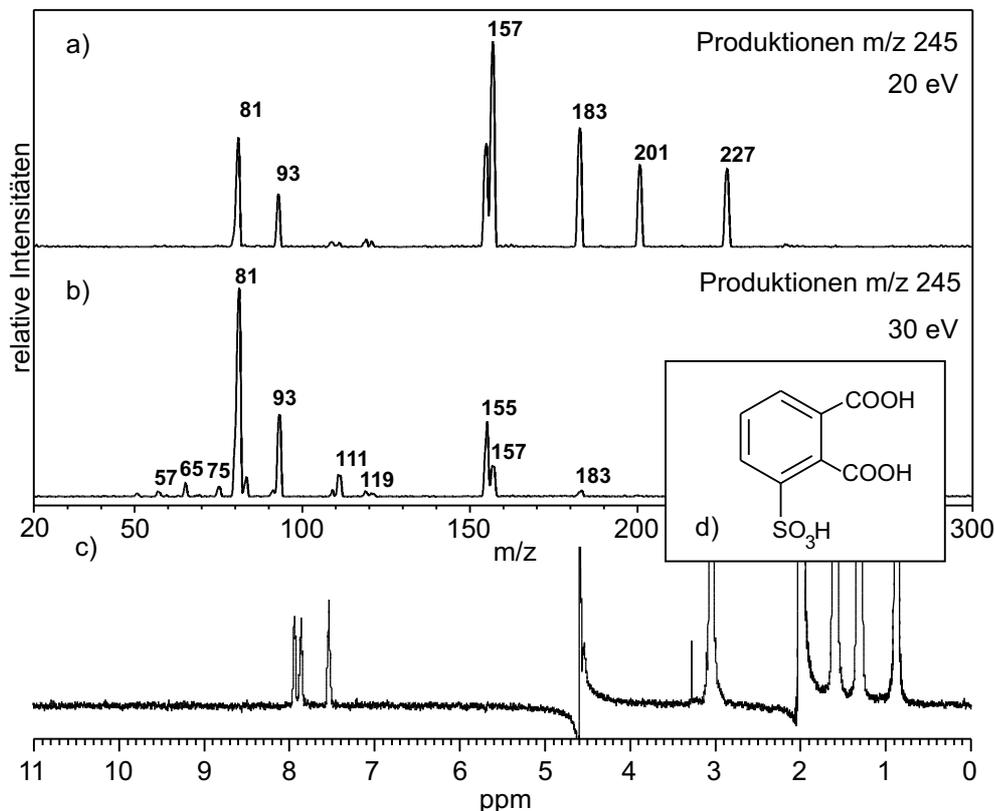


Abbildung 3.10 Identifizierung von 3-Sulfophthalsäure. Die Summenformel $C_8H_6O_7S$ wurde über TOFMS bestimmt. **a)** Produktions-Spektren bei CE 20 eV, **b)** Produktions-Spektren bei CE 30 eV, **c)** on-flow 1H -NMR. **d)** 3-Sulfophthalsäure ist der einzige Strukturvorschlag aus der Strukturgenerator-Analyse.

ses stand eine Auswahl von mehreren Strukturformeln, aus denen dann oftmals anhand der spektroskopischen Daten eine plausible Lösung ausgewählt werden konnte.

Die SG-Analyse erleichtert die Formulierung von Strukturvorschlägen bei der Strukturaufklärung wesentlich. Ein Vorteil des Strukturgenerators gegenüber der üblichen auf Erfahrung basierenden Vorgehensweise liegt darin, dass eine vollständige Lösungsmenge erhalten wird. Es werden folglich keine potentiellen Strukturvorschläge übersehen. Dies bedingt einen weiteren Vorteil. Dieser besteht darin, dass eine eindeutige Identifizierung dann erreicht ist, wenn über die SG-Analyse nur ein Strukturvorschlag erhalten wird. Man kann dann, insbesondere im Bereich niedriger Molekulargewichte den messtechnischen Aufwand reduzieren und auf spektroskopische Methoden verzichten, die redundante Daten erzeugen würden.

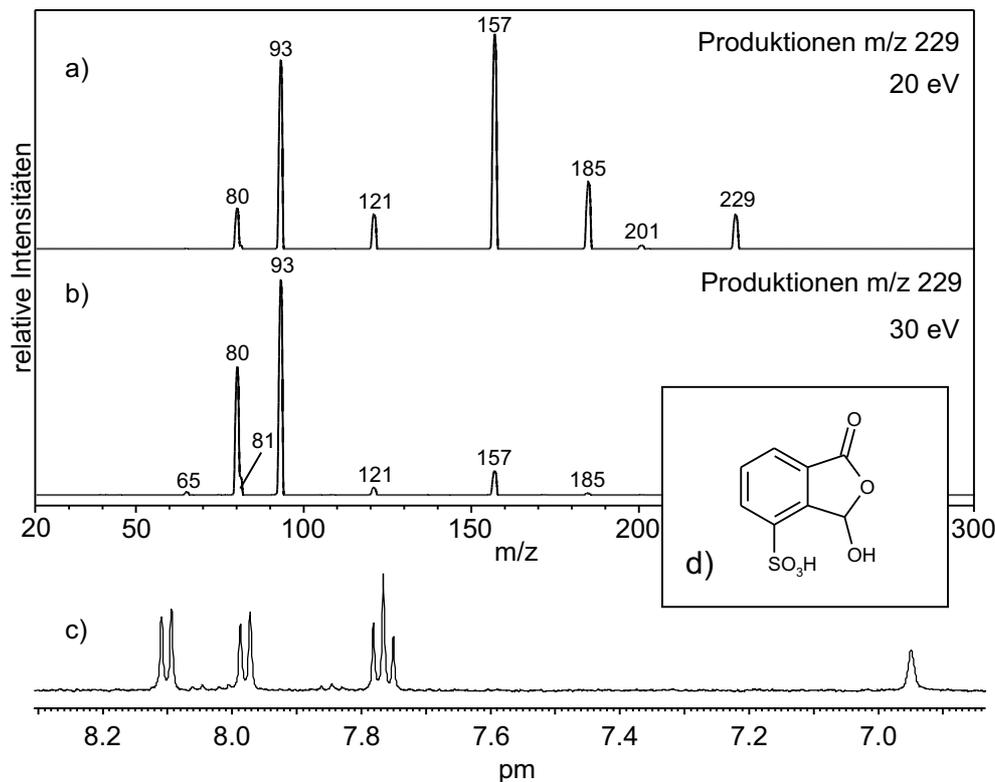


Abbildung 3.11 Identifizierung von 3-Sulfo-8-hydroxyphthalid. Die Summenformel $C_8H_6O_6S$ wurde über TOFMS bestimmt. **a)** Produktions-Spektren bei CE 20 eV, **b)** Produktions-Spektren bei CE 30 eV, **c)** on-flow 1H -NMR, **d)** 3-Sulfo-8-hydroxyphthalid. Die Struktur ist als einziger von 4 Vorschlägen der SG-Analyse vollständig mit den spektroskopischen Daten vereinbar.

Identifizierung der Hauptprodukte $H_1 - H_4$

Durch die Ergebnisse der Quantifizierung mit HPLC-UV stand fest, dass die Hauptprodukte $H_1 - H_4$ zu Beginn der Ozonung den bei weitem größten Anteil der Ozonungsprodukte stellen. Dementsprechend war die Struktur dieser Produkte von besonderem Interesse. Im Folgenden wird daher ihre Strukturaufklärung detailliert besprochen.

Produkt H_1 : 3-Sulfophthalsäure. Die Summenformel dieser Verbindung wurde zu $C_8H_6O_7S$ bestimmt. Im Produktions-Spektrum war der Verlust von H_2O , CO und CO_2 zu beobachten (s. Abb. 3.10 a) u. b)). Das Produktion bei m/z 155 entstand durch sukzessiven Verlust von H_2O , CO_2 und CO . Das Produktion bei m/z 157 belegte zusammen mit den drei Aromaten-Signalen bei 7.94 ppm, 7.85 ppm und 7.53 ppm im 1H -NMR-Spektrum (s. Abb. 3.10 b) u. c)), dass ein sulfonierter Benzolring erhalten geblieben war. Die Kopplungen der Aromaten-Protonen waren dabei nicht aufgelöst, möglicherweise weil Pro-

dukt H_1 beim pH-Wert des Eluenten nur teilweise dissoziiert war, was zu leichten Shifts der Resonanz geführt haben könnte. Die intensiven Signale des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums unterhalb 6 ppm stammen von den Lösungsmitteln Acetonitril (3.1 ppm) und HDO (4.5 ppm) sowie vom Ionenpaarreagenz TrBA (1.9 ppm, 1.6 ppm, 1.3 ppm und 0.9 ppm) und Essigsäure (ebenfalls 3.1 ppm). Die SG-Analyse ergab 3-Sulfophthalsäure als einzige Struktur, die allen Auswahlkriterien entsprach. Dieser Befund konnte durch Retentionszeit-Vergleich sowie Standardaddition mit einem authentischen Standard (Gemisch von 3- und 4-Sulfophthalsäure) verifiziert werden.

Peak H_2 : 3-Sulfo-8-hydroxyphthalid. Aus der exakten Massenbestimmung ergab sich eine Summenformel von $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_6\text{S}$. Die Produktions-Spektren zeigten CO - und CO_2 -Verluste, jedoch keinen von H_2O (Abb. 3.11 a) u. b)). Das Produktion m/z 157 ist zusammen mit dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum wiederum ein eindeutiger Hinweis auf einen sulfonierten Benzolring (Abb. 3.11 b) u. c)). Die SG-Analyse lieferte 4 Strukturvorschläge, zwei Positionsisomere von 2-Formylsulfobenzoesäure und zwei zyklische Positionsisomere von Hydroxysulfophthalid. Erstere konnten aufgrund des Singulets bei 6.95 ppm ausgeschlossen werden. Die starke Tieffeldverschiebung der Doublets bei 8.11 ppm und 7.99 ppm deutete auf die Entschirmung durch eine ortho-ständige Carboxylgruppe und eine ortho-ständige Sulfonatgruppe hin. Damit war 3-Sulfo-8-hydroxyphthalid als Struktur für dieses Oxidationsprodukt nachgewiesen. Diese Interpretation wurde auch durch das Produktion m/z 81 gestützt. Dieses Ion entsteht aufgrund eines ortho-Effekts und kann nur dann auftreten, wenn mobile H-Atome in der direkten Nachbarschaft der Sulfonatgruppe vorhanden sind. Darüber hinaus ist dieses Isomer mit dem angenommenen Reaktionsmechanismus besser kompatibel als 8-Hydroxy-6-sulfophthalid, bei dessen Bildung im Zuge der oxidativen Sulfonatabsplattung intermediär ein Aldehyd hätte auftreten müssen.

Produkt H_3 : 2-(2'-Carboxy-3'-sulfophenyl)-2-sulfoessigsäure. Produkt H_3 wurde die Masse m/z 339 und über exakte Massenbestimmung eine Summenformel von $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_{10}\text{S}_2$ zugewiesen. Es konnte aufgrund der Summenformel von einer zweifachen Sulfonierung ausgegangen werden. Die Produktions-Spektren (MS^2) des Molekülanions m/z 339 sowie die pseudo- MS^n -Spektren der Fragmente m/z 293 und m/z 229 zeigten den sukzessiven Verlust von H_2O , CO , SO_2 und SO_3 an (s. Abb. 3.12 a), b) und c)). Das Ion m/z 81 in den Produktions-Spektren von m/z 339 und m/z 293 sprach für mobile H-Atome in Nachbarschaft einer der Sulfonatgruppen (Abb. 3.12 a) und b)). Da im Produktions-Spektrum von m/z 229 (Abb. 3.12 c)) nur das Ion m/z 80, nicht aber m/z 81 beobachtet wurde, sollte sich in diesem Fragment kein mobiles H-Atom in der Nachbarschaft der verbleibenden Sulfonatgruppe befinden. Das Ion m/z 157 belegte einen einfach sulfonierten Benzolring. Bei Verwendung von D_2O als Lösungsmittel im Zuge der LC-NMR-Untersuchungen wurden über die um 3 u höhere Masse (m/z 342

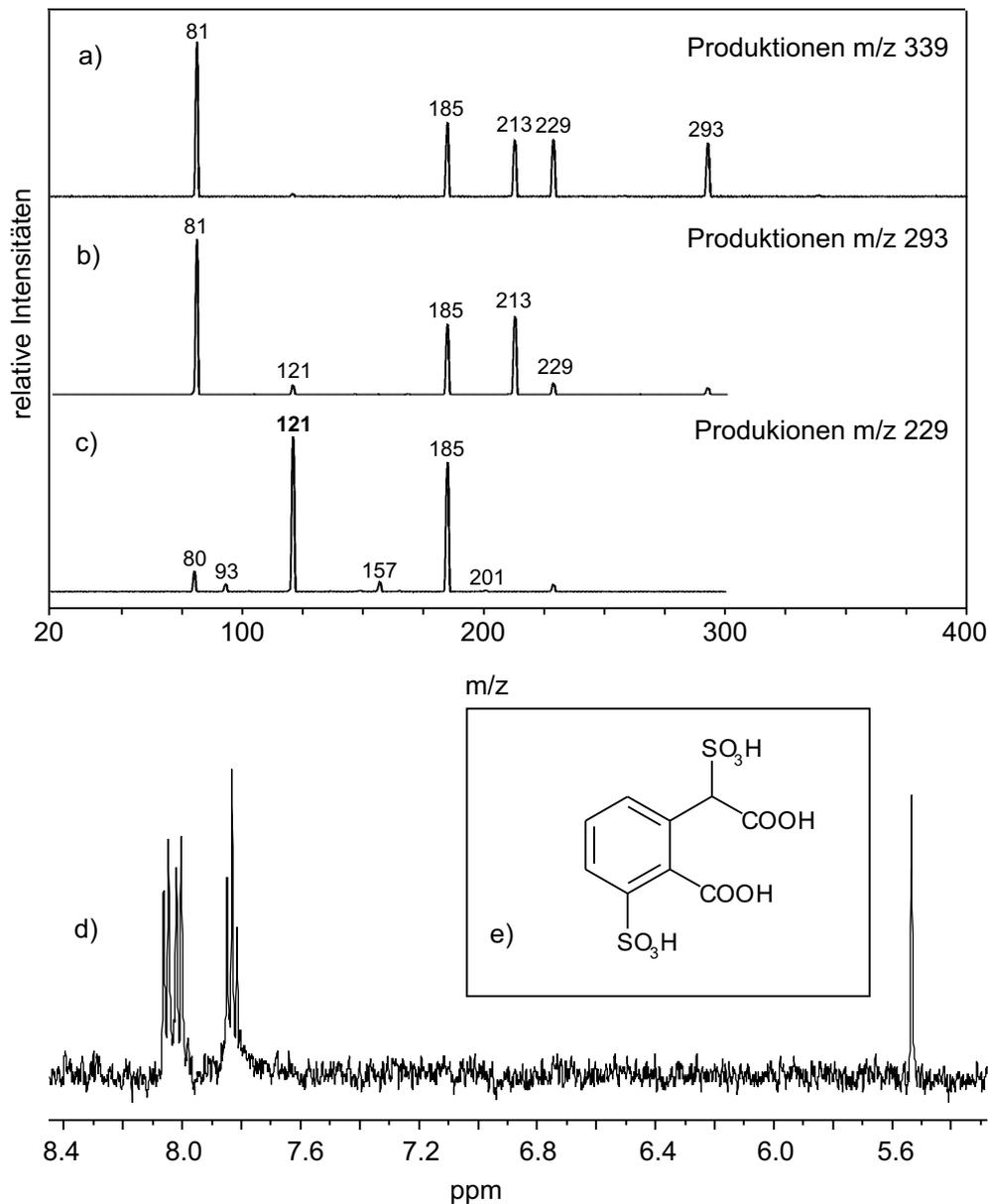


Abbildung 3.12 Identifizierung von 2-(2'-Carboxy-3'-sulfophenyl)-2-sulfoessigsäure. Die Summenformel $C_9H_8O_{10}S_2$ wurde über TOFMS bestimmt. CE bei den Produktionen-Spektren 20 eV. **a)** MS² Produktionen-Spektrum von m/z 339, **b)** pseudo-MS³ Produktionen-Spektrum von m/z 293, **c)** pseudo-MS³ Produktionen-Spektrum von m/z 229, **d)** on-flow ¹H-NMR, **e)** (2-(2'-Carboxy-3'-sulfophenyl)-2-sulfoessigsäure). Fünf weitere Strukturvorschläge des Strukturgenerators Assemble (s. Anh. B, Abb. B.2 B, S. 150) konnten aufgrund des Reaktionsmechanismus und der Anzahl der aziden Protonen ausgeschlossen werden.

gegenüber m/z 339) drei azide Protonen nachgewiesen. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abb. 3.12 d)) fanden sich drei für einen 1,2,3-substituierten Benzolring diagnostische Aromatensignale bei 8.06 ppm (Doublett), 8.02 ppm (Doublett) und 7.86 ppm (Triplett). Weiterhin wurde ein Methinproton bei 5.76 ppm (Singulett) gefunden. Die SG-Analyse unter Einbeziehung dieser Befunde ergab sechs Strukturvorschläge (s. Anh. B, Abb. B.2, S. 150), von denen nur 2-(2'-Carboxy-3'-sulfophenyl)-2-sulfoessigsäure (Abb. 3.12 e)) mit den Vorstellungen über den Reaktionsmechanismus und der Anzahl der aziden Protonen vereinbar war.

Produkt H₄: 2,3-(3-Sulfobenzo)-2-oxo-4,6-dihydroxyoxaheptan In diesem Fall bereitete schon die eindeutige Zuordnung des UV-Peaks zu einem Massenspektrum Schwierigkeiten. Sowohl das Molekülanion mit m/z 235 als auch das mit m/z 273 kamen in Frage, letzteres erschien aufgrund der Peakform etwas wahrscheinlicher. Die Summenformel dieser Verbindung war $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_7\text{S}$. In den Produktionen-Spektren des Molekülanions m/z 273 waren zwei sukzessive H_2O -Verluste (m/z 255 und m/z 237) zu beobachten. Die Produktionen m/z 243 und m/z 225 (m/z 255 - 30) zeigten den Verlust von CO und H_2CO an. Der Verlust von SO_2 (m/z 273 \rightarrow m/z 209) zusammen mit dem intensiven Fragment m/z 80 belegte die Sulfonierung dieser Verbindung. Das Produktionen-Spektrum war, besonders bei höherer Kollisionsenergie, sehr fragmentreich (s. Anh. B.3.1, Tab. B.5 und B.6, S. 145 u. 147). Dies konnte als Hinweis auf eine zyklische Verbindung gedeutet werden. Über das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnte in diesem Fall keine Aussage getroffen werden, da keine eindeutige Peakzuordnung über die Massenspektren möglich war. Die SG-Analyse der Daten ergab insgesamt 18 Strukturvorschläge. Einer davon (2,3-(3-Sulfobenzo)-2-oxo-4,6-dihydroxyoxaheptan) wurde als hypothetische Lösung dieses Strukturproblems angenommen (s. Abb. 3.13, S. 82), da diese Verbindung durch einfache Wasseranlagerung aus einer weiteren Komponente (N_8) entstanden sein konnte.

Identifizierung von Nebenprodukten

Neben den oben beschriebenen Hauptkomponenten wurden sowohl mit UV-Detektion als auch mit LC-MS eine Vielzahl weiterer Komponenten detektiert, die als Nebenprodukte klassifiziert wurden. Auch einigen von diesen Verbindungen konnten Strukturen zugewiesen werden. Dabei erfolgte die Zuweisung von Strukturen entweder aufgrund der Ergebnisse der integrierten Strukturanalyse über UV-, MS-, NMR-Spektren sowie SG-Analyse (N_1 , N_6 und N_8) oder weil die Summenformeln und MS-Spektren der Verbindungen Ozonungsprodukten entsprachen, die aufgrund des Reaktionsmechanismus erwartet wurden (N_{15} , N_{16} und N_{28}).

Produkt N₁: 3-(2-Hydroxy-6-sulfophenyl)-2,3-dihydroxypropionsäure Das Molekülanion der Masse m/z 277 hatte die Summenformel $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_8\text{S}$. Die

parallel zur LC-NMR gemessenen Massenspektren in D₂O wiesen eine Massenverschiebung des Molekülanions von m/z 277 nach m/z 281 auf, damit waren vier azide Protonen nachgewiesen. Die Fragmente m/z 259 und m/z 241 zeigten den Verlust von zwei Molekülen H₂O an. Der Verlust von SO₂ konnte dabei ebenso zu m/z 213 geführt haben, wie die CO-Eliminierung aus m/z 241. Aus m/z 213 entsteht durch Verlust von CO₂ die Produktion m/z 169. Das Ion m/z 157 wird erst bei höherer Kollisionsenergie in geringer Intensität beobachtet. Das „odd-electron“- Ion m/z 156 tritt hier deutlich hervor. Dies sprach dafür, dass neben mindestens einer Hydroxy- und einer Sulfonatgruppe entweder eine Carboxylgruppe oder eine verwandte Gruppe, die zum Verlust von CO₂ führen kann¹² vorhanden sein musste. Im ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung fanden sich im aromatischen Bereich Signale, die einem Spektrum höherer Ordnung eines ABX-Systems (s. Günther [296], S. 167) entsprachen. Es konnte folglich davon ausgegangen werden, dass ein 1,2,3-substituierter Benzolring erhalten geblieben war. Die SG-Analyse führte nur zu Strukturvorschlägen, wenn Sauerstoff als direkter Substituent am aromatischen Ring zugelassen wurde. Von zwölf Strukturvorschlägen war nur einer (3-(2-Hydroxy-6-sulfophenyl)-2,3-dihydroxypropionsäure) mit den generellen Einschränkungen vereinbar. Die Verbindung konnte man sich als aus einem anomalen Ozonungsprodukt (Wanderung des Aromaten) über Hydrolyse des Esters unter Sulfateliminierung nebst Epoxidierung und Wasseranlagerung entstanden denken. Die Komplexität dieser Abfolge von Reaktionen sollte jedoch zur endgültigen Absicherung der Ergebnisse durch weitere spektroskopische Daten untermauert werden.

Produkt N₆: 3-Sulfophthalid. Die über exakte Massenbestimmung ermittelte Summenformel des Molekülanions dieser Verbindung war C₈H₅O₅S. Im Massenspektrum wurden weiterhin über Fragmente bei m/z 169 und m/z 121 Verluste von CO₂ bzw. SO₂ und CO nachgewiesen. Im ¹H-Spektrum waren zwei Doublets bei 8.06 ppm und 8.01 ppm, ein Triplett bei 7.75 sowie ein Singulett bei 6.58 ppm sichtbar. Das Intensitätsverhältnis dieser Signale entsprach in etwa 1:1:1:2. Die SG-Analyse ergab zwei Vorschläge, 3-Sulfophthalid und 6-Sulfophthalid. Erstere Struktur war aufgrund des Tieffeld-Shifts der beiden aromatischen Doublets am wahrscheinlichsten.

Produkt N₈: 3,4-(3-Sulfobenzo)-2-oxo-6-hydroxyoxahept-5-en. Das Molekülanion m/z 255 dieser Verbindung hatte die Summenformel C₁₀H₈O₆S. Aufgrund der intensiven Fragmente m/z 237, m/z 227 und m/z 209 konnte von Hydroxy- und Carbonylfunktionen in dieser Verbindung ausgegangen werden. Eine freie Carboxylgruppe war wegen eines fehlenden [M – H – 44][–] bzw. eines analogen sekundären Fragments nicht wahrscheinlich. Das insgesamt sehr fragmentreiche Produktions-Spektrum konnte als Anhaltspunkt für ein zyklisches

¹²z.B. können Ester- und Acetalgruppen CO₂ eliminieren.

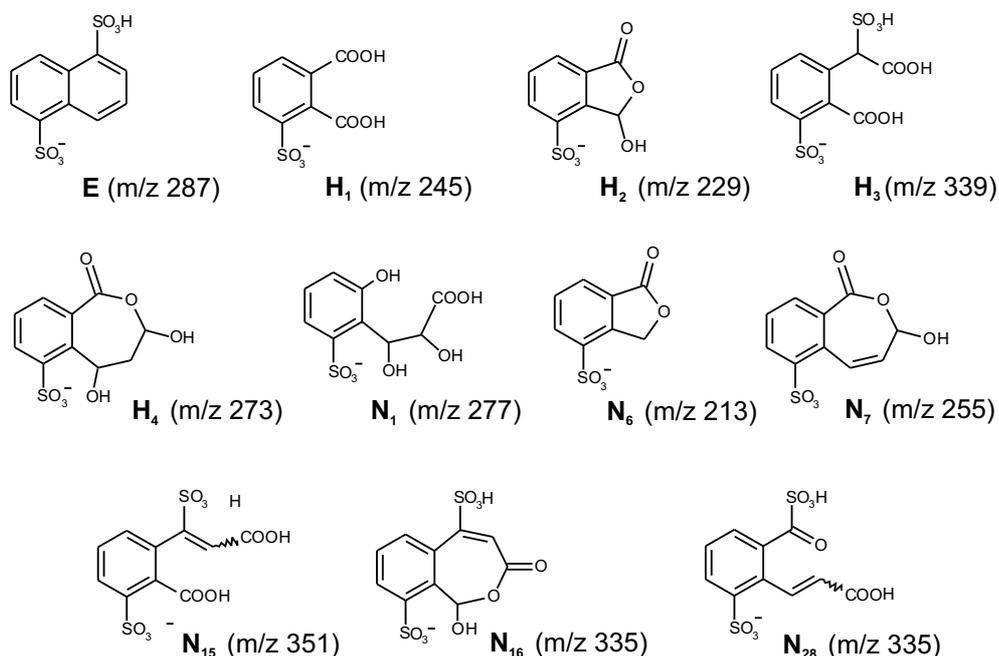


Abbildung 3.13 Strukturen des Eduktes Naphthalin-1,5-disulfonsäure und der Ozonungsprodukte. Neben den Hauptprodukten $H_1 - H_4$ treten zahlreiche Nebenkomponenten auf. Die Summenformeln von 27 Nebenprodukten konnten mit LC-TOFMS ermittelt werden. Von diesen konnte den Produkten N_1 , N_6 , N_8 , N_{15} , N_{16} und N_{28} eine Strukturformel zugewiesen werden. Die Strukturen der Ozonungsprodukte H_4 und N_1 bedürfen weiterer spektroskopischer Daten zur Absicherung der Struktur.

Molekül gewertet werden. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum war aufgrund der Koelution von mindestens drei Verbindungen komplex und nicht direkt auswertbar. Zwei Doubletts bei 8.48 ppm und 6.35 ppm wiesen eine gemeinsame Kopplungskonstante von 10.87 Hz auf, die für ein cis-Alken sprach. Diese konnten aufgrund der Signalintensität mit den Doubletts bei 8.18 ppm und 8.15 ppm sowie einem Triplet bei 7.62 ppm und einem Singulett 3.28 ppm in Verbindung gebracht werden. Die SG-Analyse der Daten führte zu 22 Strukturen, von denen alle bis auf vier (s. Anh. B, Abb. B.2, S. 150) aufgrund von Überlegungen zum Reaktionsmechanismus bzw. der Stabilität dieser Verbindungen ausgeschlossen werden konnten. Da bei der Sulfat-Eliminierung sehr wahrscheinlich eine Carboxylfunktion gebildet wird, konnte von diesen vier Strukturvorschlägen nur einer mit dem Reaktionsmechanismus in Einklang gebracht werden.

Produkte N_{15} , N_{16} und N_{28} : Erwartete Reaktionsprodukte von Naphthalin-1,5-disulfonsäure und Ozon. Bei der Oxidation von Naphthalin traten cis- und trans-2-Formylzimtaldehyd als Hauptozonungsprodukte auf (s. Kap. 3.2.1). Analoge Ozonungsprodukte konnten auch für Naphthalin-1,5-

disulfonat vermutet werden, wobei eine weitergehende Oxidation der instabilen Aldehyde zu Carbonsäuren aufgrund des Überschusses an Oxidationsmittel wahrscheinlich war.

Der primäre Angriff von Ozon erfolgt entweder an der 1,2- oder der 3,4-Position von Naphthalin-1,5-disulfonat. Der erstere Fall würde zu 2-Sulfo-6-sulfo-carbonylzimtaldehyd führen, dessen Oxidation 2-Sulfo-6-sulfo-carbonylzimtsäure (N_{28} , Abb. 3.13) ergeben würde. Zweiterer Fall ergäbe mit 2-Carboxy-3-sulfo- β -sulfozimtaldehyd und 2-Formyl-3-sulfo- β -sulfozimtsäure zwei mögliche Produkte. Ersteres konnte zu 2-Carboxy-3-sulfo- β -sulfozimtsäure (H_{15} , Abb. 3.13) weiter reagieren, letzteres zur 5,6-(3'-Sulfobenzo)-2-oxo-4-sulfooxahept-3-en (H_{16} , Abb. 3.13) zyklisieren. Zu diesen Strukturen konnten in allen drei Fällen konsistente Summenformeln und Massenspektren gefunden werden. Obwohl in diesen Fällen nicht von einem Strukturbeweis gesprochen werden kann, ist das Auftreten dieser Verbindungen bei der Ozonung aufgrund dieser massenspektrometrischen Befunde sehr wahrscheinlich. Daher wurde von einer positiven Identifizierung ausgegangen. Die Nebenprodukte N_{15} , N_{16} und N_{28} sind daher mit den Hauptkomponenten $H_1 - H_4$ sowie den Nebenprodukten N_1 , N_6 und N_8 in Abbildung 3.13 zusammengestellt.

3.2.4 Einordnung der Ergebnisse

Die hier angewandten Methoden zur integrierten Strukturaufklärung konnten erfolgreich zur Identifizierung von Ozonungsprodukten von Naphthalin-1,5-disulfonsäure eingesetzt werden. Die Hauptprodukte $H_1 - H_3$ (3-Sulfophthalsäure, 3-Sulfo-8-hydroxyphthalid und 2-(2'-Carboxy-3'sulfophenyl)-2-sulfoessigsäure) wurden eindeutig identifiziert, dem Hauptprodukt H_4 konnte eine vorläufige Struktur zugeordnet werden (2,3-(3-Sulfobenzo)-2-oxo-4,6-dihydroxyoxaheptan). Dies erlaubte die Umrechnung der Quantifizierung dieser Produkte, die zunächst über HPLC-UV- und DOC-Messungen in mg DOC/L erfolgt war, in Konzentrationen über die Formel $F_{H_i} \cdot C_{\text{mgDOC/L}} = C_{\text{mg/L}}$. Die Umrechnungsfaktoren F_{H_i} für die einzelnen Hauptprodukte wurden zu $F_{H_1} \approx 2.56$, $F_{H_2} \approx 2.40$, $F_{H_3} \approx 3.15$ und $F_{H_4} \approx 2.28$ abgeschätzt.

Daneben gelang der Nachweis einer Reihe von Substanzen, deren gemeinsames Strukturmerkmal ein sulfonierter Benzolring war. Dies deutete insgesamt darauf hin, das zunächst maximal 2 Äquivalente Ozon mit den Doppelbindungen des einen aromatischen Ringes von Naphthalin-1,5-disulfonsäure reagierten. Weitere strukturelle Modifikationen der primären Ozonungsprodukte erfolgten wahrscheinlich über Oxidation durch das bei der Reaktion freigesetzte Wasserstoffperoxid bzw. durch hydrolytische Prozesse.

Alle beobachteten Oxidationsprodukte entsprachen den anhand des klassischen Criegee-Mechanismus (s. S. 3.2.1) zu erwartenden Ringöffnungsprodukten.

Die direkte Reaktion des in die Lösung gebrachten Ozon mit dem aromatischen System ist also auch bei Naphthalin-1,5-disulfonat die bestimmende Reaktion.

Nur in einem Fall (Nebenprodukt N₇) konnte aufgrund der Summenformel C₆H₃O₈S des Molekülanions bei m/z 235 davon ausgegangen werden, dass der zweite aromatische Ring oxidiert wurde. Anhand der Massenspektren allein war hier jedoch keine eindeutige Struktur ableitbar. Für zahlreiche Nebenprodukte konnten keine Strukturvorschläge aus den spektroskopischen Daten abgeleitet werden; die über HPLC-TOFMS zugänglichen Summenformeln belegten aber in vielen Fällen, dass die Verbindungen sulfoniert waren.

Die bei der Ozonung von p-Toluolsulfonsäure nachgewiesenen Oxidationsprodukte Pyruvat, Methylglyoxal sowie Essig-, Ameisen- und Oxalsäure [282] wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht erfasst. Es konnte jedoch vermutet werden, dass die Mineralisierung von Komponenten wie N₇ über derartige Produkte führt. Das Ziel der Erzeugung von biologisch abbaubaren Oxidationsprodukten wäre dann erreicht, der Ozonverbrauch jedoch vergleichsweise hoch. Gilbert [281] beobachtete bei der Ozonung von Naphthalin-1,5-disulfonat einen Anstieg des BOD₅/COD-Verhältnisses erst nach einer COD-Eliminierung von ca. 40%, was in etwa der Aufnahme von drei Äquivalenten Ozon und damit der Modifikation des zweiten Benzolringes entspräche. Anscheinend war erst nach der Oxidation des zweiten aromatischen Systems die biologische Abbaubarkeit der Oxidationsprodukte nennenswert besser als die der Ausgangsverbindung.

Bezüglich der biologischen Abbaubarkeit der in Abbildung 3.13 dargestellten Verbindungen wurde kürzlich berichtet [268], dass 3-Sulfophthalsäure im Batchabbauversuch nicht abgebaut wird. Zu den übrigen Verbindungen liegen keine Daten vor. Beim Betrieb der zwei semi-kontinuierlichen Versuchsanlagen [283] waren vergleichsweise hohe Ozondosen nötig, um eine deutliche Steigerung der biologischen Abbaubarkeit zu induzieren. Dabei war eine eventuell auf Adaptationsphänomene zurückführbare Verbesserung der Abbauleistung über den Versuchszeitraum zu beobachten. Diese Ergebnisse sind insgesamt ein Hinweis darauf, dass zumindest ein Teil der primären Ozonungsprodukte eine nur geringe biologische Abbaubarkeit aufweist. Somit können bei der Ozonung von Naphthalin-1,5-disulfonat biologisch schwer abbaubare Verbindungen entstehen, deren toxikologisches Profil noch weitgehend unbekannt ist.

3.3 Anaerob/aerobe Behandlung von Textilabwasser – Entfärbung und Mineralisierung

Die mikrobielle Entfärbung von Azofarbstoffen durch Anaerobier ist seit langem bekannt [297, 298, 299] und das Verhalten von Azofarbstoffen im Rahmen anaerober oder kombinierter anaerob/aerober Behandlungsschritte gut untersucht [88, 249, 300, 301, 302, 303]. Auch wenn es Beispiele für die vollständige Mine-

ralisierung von einfachen Azofarbstoffen unter anaeroben Bedingungen gibt [304], wurde die Bedeutung der Frage nach der Natur und Persistenz der bei diesen Entfärbungsreaktionen auftretenden Metabolite frühzeitig erkannt. Als Metabolite wurden aromatische Amine vermutet, wobei das mutagene Potential vieler Vertreter dieser Stoffklasse Besorgnis hervorrief. Die aerobe Abbaubarkeit der bei der anaeroben Spaltung von Azofarbstoffen auftretenden Metabolite ist Bedingung für die Eignung der anaerob/aeroben Behandlung zur Mineralisierung von Azofarbstoffen. Viele Azofarbstoffe, darunter die im Textilbereich am häufigsten eingesetzten Säure- und Reaktivfarbstoffe, setzen bei der anaeroben Behandlung sulfonierte aromatische Amine frei [249, 250, 305], von denen sich viele als persistent erwiesen [250, 305, 306]. Einige dieser aromatischen Amine neigen unter aeroben Bedingungen zur Autoxidation [305, 307], das Gefährdungspotential der hierbei entstehenden Verbindungen ist im wesentlichen unbekannt. Da zudem bei der anaeroben bzw. anaerob/aeroben Behandlung von Modellabwässern [308] und einzelnen Farbstoffen [309] oftmals unbekannte Metabolite auftreten, ist die Identifizierung dieser Metabolite nach wie vor ein lohnendes Ziel.

3.3.1 Reduktion von RB5

Reaktiv Schwarz 5 (RB5) gehört zu den am häufigsten verwendeten Textilfarbstoffen überhaupt und wurde als Modellsubstanz in einem Modellabwasser eingesetzt, um das Verhalten von Azofarbstoffen in einem anaerob/aerob betriebenen Rotationsscheibenreaktor zu untersuchen. Der Reaktoraufbau wurde an anderer Stelle beschrieben [310], die Betriebsparameter entsprachen den dort zum Abbau von Reaktiv Violett 5 (RV5) verwendeten.

Das primäre Behandlungsziel, die Entfärbung von RB5 (Struktur s. Abb. 3.15), wurde in der anaeroben Reaktorstufe zunächst erreicht. Im aeroben Schritt trat jedoch eine intensive Rückfärbung des Reaktorablaufes ein. Die UV/VIS-Spektren von Zulauf und Ablauf waren sehr ähnlich, es daher war zunächst fraglich, ob die Azogruppe des Farbstoffes überhaupt gespalten worden oder ob nur eine reversible Teilreduktion des Farbstoffes erfolgt war.

Anschließende HPLC-Untersuchungen zeigten jedoch, dass der für die starke Färbung des aeroben Ablaufes verantwortliche Metabolit zwar ein sehr ähnliches UV/VIS-Spektrum (s. Abb. 3.14 a) u. b)), jedoch mit $t_R = 3.95$ min eine deutlich andere Retentionszeit aufwies als RB5 mit $t_R = 29.80$ min. Die Massenspektren von RB5 und dem Metaboliten sind einander in Abbildung 3.14 c) und d) gegenübergestellt. Das Massenspektrum von RB5 wurde von den Molekülanionen $[M - H]^-$ bei m/z 742 und $[M - 2H]^{2-}$ bei m/z 371 beherrscht. Das Massenspektrum des farbigen Metaboliten wies hingegen die Molekülanionen $[M - H]^-$ bei m/z 347 und $[M - 2H]^{2-}$ bei m/z 173 auf. Das Molekulargewicht des Metaboliten war damit deutlich geringer als das von RB5. Es konnte folglich vermutet werden, dass die Azobindungen im Zuge der anaeroben Behandlung gespalten worden waren. Als Ursache der erst im Aeroben auftretenden Restfärbung konn-

te eine Autoxidationsreaktion [307] vermutet werden, bei der das im anaeroben Schritt freigesetzte aromatische Amin zu einem chinoiden und damit farbigen Ketiminoderivat umgesetzt wurde.

Im Produktions-Spektrum des Metaboliten waren die Massen m/z 267 und m/z 187 die intensivsten Fragmente, dies sprach, gemeinsam mit dem intensiven $[M - 2H]^{2-}$ -Ion bei m/z 173 im Full-Scan Massenspektrum, für eine zweifache Sulfonierung dieser Verbindung. Mit einer über Gefriertrocknung um den Faktor 200 aufkonzentrierten Probe des Reaktorablaufes konnte außerdem eine exakte Massenbestimmung durchgeführt werden. Diese Daten waren zwar alleine nicht ausreichend, um einen Strukturbeweis für den Metaboliten zu führen, der Vergleich mit Literaturdaten erlaubte jedoch eine sehr sichere Identifizierung.

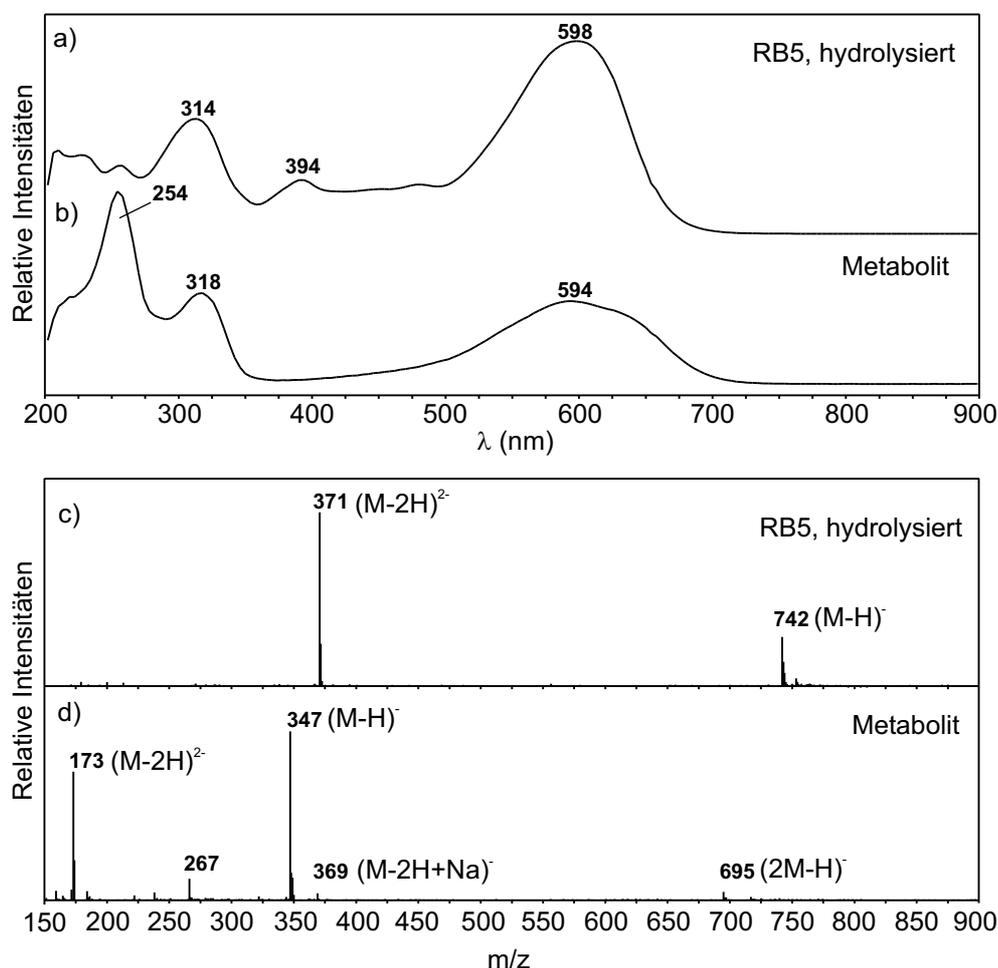


Abbildung 3.14 Identifizierung eines beim anaerob/aeroben Abbau von RB5 gebildeten Metaboliten. UV/VIS-Spektren: **a)** RB5 (hydrolysiert), **b)** Farbiger Metabolit von RB5, Massenspektren: **c)** RB5, **d)** Metabolit von RB5. (Struktur des Metaboliten s. Abb. 3.15, Chromatographiebedingungen s. HPLC-Trennsystem 12, S. 134).

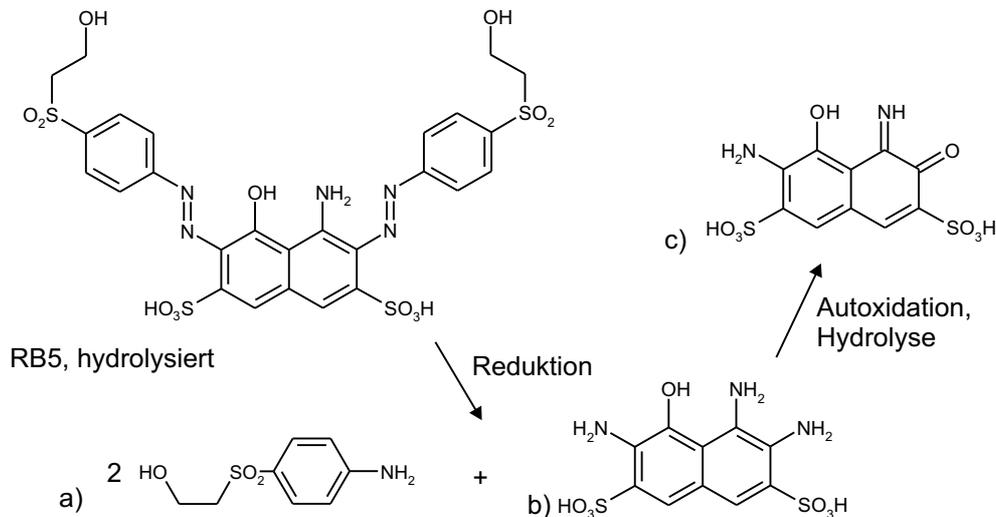


Abbildung 3.15 Struktur von Reaktiv Schwarz 5 (RB5, hydrolysiert) und vorgeschlagener Abbauweg bei der anaerob/aeroben Behandlung. Anaerobe Reduktionsprodukte: **a)** p-Aminophenyl-2-hydroxyethylsulfon, **b)** 1,2,7-Triamino-8-hydroxynaphthalin-3,6-disulfonat. Aerobes Autoxidationsprodukt: **c)** 1,2-Ketimino-7-amino-8-hydroxynaphthalin-3,6-disulfonat (intensiv blau gefärbt).

UV/VIS-Spektrum und Molmasse des Metaboliten waren identisch mit denen eines von Kudlich et al. [305, 307] beim anaerob/aeroben Abbau des Azofarbstoffs Naphtholblauschwarz 6B (NBS6B) beobachteten Metaboliten. NBS6B hat den gleichen zentralen Naphthalinring wie RB5, bei beiden dient 1-Amino-8-hydroxynaphthalin-3,6-disulfonat (H-Säure) als Synthesebaustein. Es wurde folglich davon ausgegangen, dass derselbe Reaktionsmechanismus aus reduktiver Spaltung der Azobrücken mit nachfolgender Autoxidation und Hydrolyse, der zur Bildung dieses Metaboliten beim Abbau von NBS6B geführt hatte, auch bei der anaerob/aeroben Behandlung von RB5 zur Wirkung kam (s. Abb. 3.15). Diese Interpretation wurde sowohl durch das Produktions-Spektrum als auch durch das Ergebnis der exakten Massenbestimmung gestützt. Letztere entsprach innerhalb generell akzeptierter Fehlergrenzen [187] der Summenformel C₁₀H₇N₂O₈S₂ (gemessen 346.9667, berechnet 346.9644, +2.3 mmu, +6.7 ppm). Das zweite Reduktionsprodukt p-Aminophenyl-2-hydroxyethylsulfon (Abb. 3.15 a)) konnte ebenfalls beobachtet werden [311], es unterliegt jedoch keinerlei Autoxidationsreaktionen.

Im Gegensatz zu der hier gefundenen schlechten Entfärbungsleistung beobachteten Oxspring et al. [309] eine vollständige Entfärbung in einem aeroben Filterbett mit einem immobilisierten mikrobiellen Konsortium. Die dabei auftretenden Metabolite wurden mit Kapillarelektrophorese und DAD-Detektion charakterisiert. Hierbei traten vor allem Metabolite mit Absorptionsmaxima um 400 nm auf, die bei unseren Untersuchungen nicht beobachtet wurden. Einer der da-

bei auftretenden Metabolite hatte ein ähnliches UV/VIS-Spektrum wie der von uns gefundene Metabolit, dieser trat aber nur mit untergeordneter Intensität auf. Der Grund dieser Unterschiede blieb unklar.

Man konnte nicht von einer guten aeroben Abbaubarkeit des Metaboliten ausgehen, da er im Ablauf der aeroben Stufe des Reaktors in nennenswerten Konzentrationen gefunden wurde. Diese Annahme wird auch durch Ergebnisse aus aeroben Batchabbauversuchen mit Belebtschlamm gestützt [305]. Die teilweise guten Ergebnisse, die mit anaerob/aeroben Verfahren zur Entfärbung von Azofarbstoffen gewonnen wurden [309, 310, 312], sind offensichtlich nicht auf alle Azofarbstoffe und alle Verfahrensvarianten übertragbar. Die Untersuchung sollte neben der Entfärbung immer die Frage der Metabolite behandeln, um nicht unbekannte Problemstoffe in die Umwelt einzutragen.

3.3.2 Identifizierung von Farbstoffen, Hilfsmitteln und Metaboliten in Textilabwasser

In einem zweistufigen anaerob/aeroben Rotationsscheibenreaktor [310] wurden neben Modellabwässern auch Abwasser eines Berliner Färbereibetriebes behandelt. Die Zusammensetzung des Abwassers war komplexer als die der Modellabwässer und nur wenige der eingesetzten Farbstoffe waren bekannt. Hier wurde zunächst eine möglichst umfassende Charakterisierung der Abwasserinhaltsstoffe vorgenommen, um dann die im Zuge der Behandlung entstehenden Metabolite zu charakterisieren und damit Aussagen über die im Reaktor ablaufenden Prozesse treffen zu können. Die Charakterisierung und Identifizierung unbekannter Analyte stellte besonders hohe Anforderungen an die Analytik, da aufgrund der geringen Konzentrationen, in denen diese vorlagen, nur UV/VIS-Spektroskopie und Massenspektrometrie eingesetzt werden konnten. Die hier vorgestellten Untersuchungen waren also auch als „Proof of Principle“ anzusehen, ob die im Rahmen der Methodenentwicklung erarbeiteten Detektionsschemata mit LC-UV/VIS und LC-MS/MS zur integrierten Strukturaufklärung geeignet sind.

Identifizierung von Textilabwasserinhaltsstoffen

Die im Zulauf des Rotationsscheibenreaktors detektierten Verbindungen sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Da für die hydrolysierten Farbstoffe Reaktiv Orange 16 (RO16), RB5 und Reaktiv Rot 198 (RR198) Standardverbindungen vorhanden waren, konnten diese über Vergleich der UV/VIS-, Massen- und Produktionen-Spektren sowie der Retentionszeiten eindeutig identifiziert werden. Im Fall von RO16 enthielt die käufliche Referenzverbindung nur eines der drei im Abwasser detektierten Positionsisomere. Da die Spektren dieser Isomere nahezu identisch waren, konnte hier nur in einem Fall eine endgültige Zuweisung der Struktur erfolgen. Neben diesen Farbstoffen fanden sich im Abwasser drei Verbindungen mit einem MW von 451 Da. Die UV/VIS-Spektren waren identisch mit denen

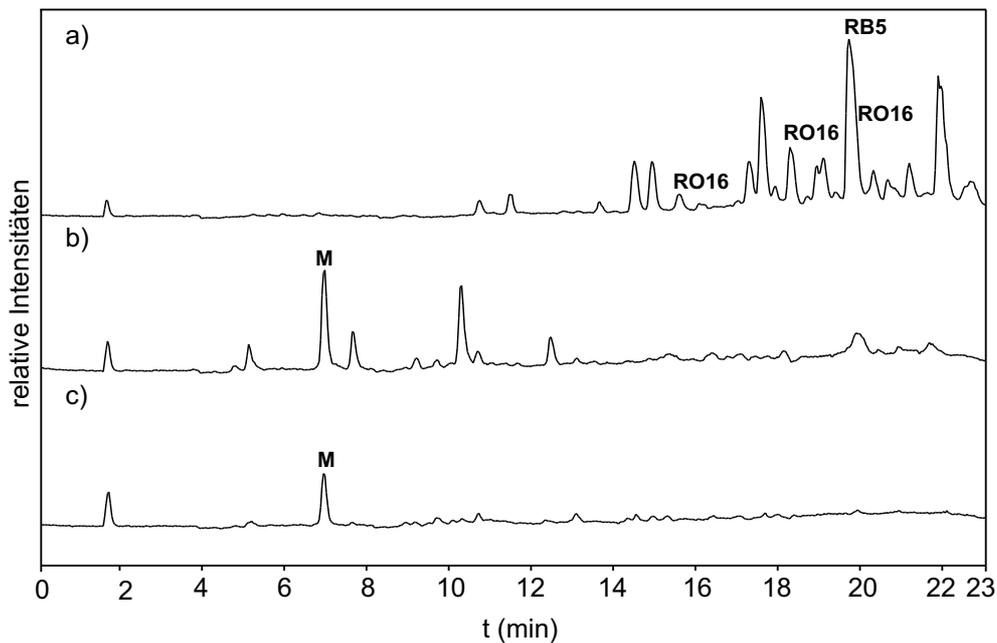


Abbildung 3.16 LC-MS Chromatogramme Textilabwasser. **a)** Zulauf Textilabwasser, **b)** anaerob behandeltes Textilabwasser, **c)** anaerob/aerob behandeltes Textilabwasser. Es wurden zahlreiche Farbstoffe über MS, exakte Massenbestimmung, MS/MS und Retentionszeitvergleich identifiziert. Im Zuge der anaeroben Behandlung treten zahlreiche Metabolite auf, von denen einige aerob nicht entfernt werden. Die Identifizierung von Peak **M** dient als Beispiel für die Möglichkeiten der integrierten Strukturaufklärung mit LC-MS und LC-MS/MS. Trennbedingungen s. HPLC-Trennsystem 12, S. 134.

der RO16-Isomere und die exakten Massen dieser Verbindungen entsprachen der von RO16 - C_2H_2O . Es wurde daher davon ausgegangen, dass es sich bei diesen Verbindungen um Desacetyl-RO16 handelte. Diese Interpretation war auch mit den Produktionen-Spektren konsistent.

Weiterhin fanden sich eine Reihe von Naphthalinsulfonaten im Zulauf des Reaktors, davon konnten sieben über exakte Massen, das Verhältnis von zwei SRM-Übergängen sowie Retentionszeitvergleich mit authentischen Standards identifiziert werden. Die Ergebnisse der quantitativen Erfassung dieser Verbindungen werden in Kapitel 4.1.1, S. 102 dargestellt. Über HPLC-FLD konnte belegt werden, dass Naphthalinsulfonat-Formaldehyd-Polymere als Hilfsmittel in dem Färbeprozess eingesetzt worden waren. Dies stellte sehr wahrscheinlich auch die Quelle der monomeren Naphthalinsulfonate dar. Eine quantitative Erfassung erfolgte aus den in Kapitel 2.2, S. 30 geschilderten Gründen nicht.

Tabelle 3.1 Textilabwasser-Inhaltsstoffe, die im Zulauf des Rotationsscheibenreaktors durch Einsatz komplementärer MS-Detektionsschemata bzw. bei polymeren Textilhilfsmitteln (SNFC) von HPLC-FLD identifiziert wurden.

Verbindung	MW	Detektion
Farbstoffe		
RO16	493	MS, Exakte Masse, MS/MS, UV/VIS, t_R
Desacetyl-RO16	451	MS, Exakte Masse, MS/MS, UV/VIS
RB5	743	MS, Exakte Masse, MS/MS, UV/VIS, t_R
RR198	797	MS, Exakte Masse, MS/MS, UV/VIS, t_R
Hilfsmittel		
Naphthalinsulfonate	208, 288	MS, (Exakte Masse), SRM, t_R
SNFC	208 - 2000	HPLC-FLD

Identifizierung eines unbekanntes Metaboliten in behandeltem Textilabwasser

Als Beispiel für die integrierte Strukturaufklärung mit HPLC-UV/VIS- und HPLC-MS-Techniken wird im Folgenden die Ableitung von Strukturvorschlägen für einen Metaboliten (Metabolit M, Abb. 3.16) dargestellt, der während des anaeroben Abbaus des Textilabwassers auftrat und in der aeroben Stufe nicht vollständig entfernt wurde. Metabolit M war eine farbige Verbindung, das UV/VIS-Spektrum wies neben intensiven Banden im UV bei 220 nm, 280 nm und 316 nm eine Schulter bei 351 nm sowie einen Peak bei 440 nm auf. Daher mussten alle Strukturvorschläge chromophore Gruppen (z.B. chinoide Strukturen, Azogruppen, konjugierte Doppelbindungssysteme) aufweisen. Eine Azogruppe als Chromophor war dabei wegen des geringen Molekulargewichts von M wenig wahrscheinlich.

Aus dem Massenspektrum von Metabolit M folgte ein Molekulargewicht von 310 Da ($[M - H]^-$ bei m/z 309). Neben dem Molekülanion wurden intensive Fragmente bei m/z 229 und m/z 187 beobachtet. Von diesen konnten exakte Massen bestimmt werden. Die Ergebnisse einer Mehrfachbestimmung der exakten Massen von m/z 309, m/z 229 und m/z 187 mit dem Quadrupol-MS sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Da das $3 \cdot \sigma$ -Konfidenzintervall der exakten Massenbestimmung auf dem Quadrupol-MS ± 4.2 mmu war, mussten alle Vorschläge für Summenformeln berücksichtigt werden, die zu Massen innerhalb dieses Intervalls gehören. Eine eindeutige Zuordnung einer Summenformel gelang dann über den Vergleich der Vorschläge für das Molekülanion und die Fragmente, sie war $C_{12}H_{10}N_2O_6S$ für das ungeladene Molekül. Von Bedeutung waren auch die exakten Massendifferenzen von m/z 309 und m/z 229 sowie von m/z 229 und m/z 187 (s. Tab. 3.2). Aus diesen ging hervor, dass bei diesen Fragmentationsreaktionen SO_3 bzw. C_2H_2O eliminiert worden waren. Damit konnte sicher von einer Sulfonierung des Metaboliten ausgegangen werden, desweiteren war die Eliminierung von Keten (C_2H_2O) ein Hinweis auf eine Acetylgruppe, die sehr wahrscheinlich N- oder O-gebunden war.

Zur Identifizierung weiterer Strukturelemente wurden Produktions-Spektren sowohl vom Molekulanion m/z 309 als auch von den Fragmenten m/z 229 und m/z 187 aufgenommen. Dies erlaubte Einblicke in die Struktur des Metaboliten M und stellte Kriterien zum Ausschluss bestimmter Strukturelemente bereit (s. Abb. 3.18 a) - e)). Weiterhin wurden über Chromatographie in einem System aus D_2O/ACN alle aziden Protonen gegen Deuteronen ausgetauscht. Die Masse des Molekulanions wurde daraufhin bei m/z 312 und die der intensiven Fragmente bei m/z 232 und m/z 190 beobachtet. Aus der Massendifferenz von 3 Da zwischen deuteriertem und nicht-deuteriertem Molekulanion des Metaboliten M ergab sich eine Anzahl von 3 aziden Protonen. Die Produktions-Spektren von m/z 312 und m/z 232 sind in Abbildung 3.18 f) und g) gezeigt, die Massenverschiebungen zwischen diesen Spektren und den Produktions-Spektren des nicht-deuterierten Metaboliten gaben wertvolle Hinweise für die Interpretation der Spektren.

Tabelle 3.2 Ermittlung der Summenformel eines Metaboliten über exakte Massenbestimmung mit dem Quadrupol-MS. Nur eine Summenformel ist mit dem Molekulanion, den Fragmenten sowie den Massendifferenzen zwischen Molekulanion und Fragmenten konsistent (fett).

Exakte Masse ($\pm\sigma$, n=5)	Information aus Isotopen-Peaks	Mögliche Summenformeln	Fehler mmu (ppm)
<i>Molekulanion (m/z 309)</i>			
309.0190 (± 0.0012)	C: 8-14 S:1-2	$C_{13}H_5N_6O_2S$ $C_{12}H_9N_2O_6S$ $C_{10}H_9N_6O_2S$ $C_9H_{13}N_2O_4S$ $C_9HN_{12}S$ $C_8H_5N_8O_2S_2$	-0.5 (-1.5) 1.0 (3.1) -3.8 (-12.4) -2.5 (-8.1) 2.2 (7.2) 3.6 (11.5)
<i>Fragment 1 (m/z 229)</i>			
229.0602 (± 0.0017)	C: 7-12 S: 0-1	$C_{12}H_9N_2O_3$ $C_9H_{13}N_2O_3S$ $C_8H_5N_8O$ $C_7H_9N_4O_5$	-1.1 (-4.8) -4.5 (-19.6) 1.6 (6.8) 2.9 (12.7)
<i>Fragment 2 (m/z 187)</i>			
187.0496 (± 0.0020)	C: 6-10 S: 0-1	$C_{10}H_7N_2O_2$	-1.2 (-6.5)
<i>Molekulanion – Fragment 1</i>			
79.9587 (± 0.0018)		SO_3	2.1 (25.7)
<i>Fragment 1 – Fragment 2</i>			
42.0106 (± 0.0030)		C_2H_2O	0.0 (0.5)

Neben den intensiven Fragmenten bei m/z 229 und m/z 187, die schon über exakte Massenbestimmungen dem Verlust von SO_3 bzw. C_2H_2O und damit einer Sulfonsäuregruppe und einer Acetylgruppe zugeordnet wurden, fielen in den Produktions-Spektren von m/z 309 Massendifferenzen von 15 Da auf (m/z 309

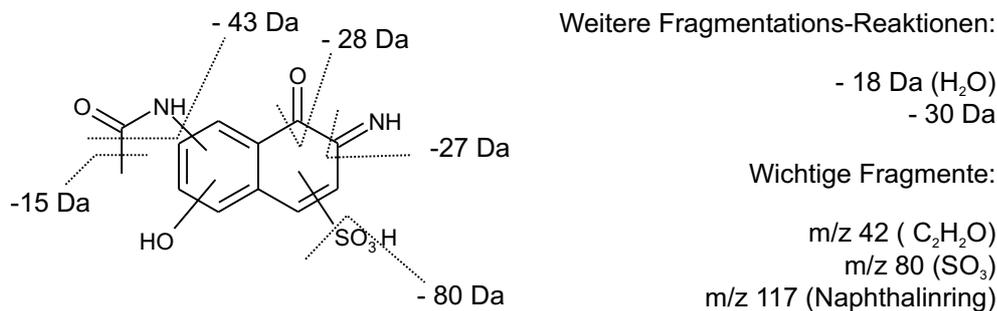


Abbildung 3.17 Strukturvorschlag für Metabolit M aus der anaeroben Behandlung von Textilabwasser. Die in den Produktionen-Spektren beobachteten Fragmentationsreaktionen sind eingezeichnet. Der Ketimino-Chromophor ist mit den spektroskopischen Daten kompatibel. Der Naphthalinring ist aufgrund des Fragmentes bei m/z 117 wahrscheinlich.

- m/z 294 und m/z 229 - m/z 214, s. Abb. 3.18 a) und b)). Mit den in der Summenformel des Metaboliten enthaltenen Elementen konnten mit CH₃ und NH zwei Elementarzusammensetzungen formuliert werden, die diese Massendifferenz ergaben. Die Massendifferenz von 15 Da fand sich in den Produktionen-Spektren des deuterierten Metaboliten wieder. Da NH nur aus aziden Gruppen (z.B. Aminogruppen oder Acetamidogruppen) eliminiert werden kann, hätte in diesem Fall eine Massendifferenz von 16 beobachtet werden müssen (Eliminierung von ND statt NH), damit war eine Methylgruppe im Metaboliten M nachgewiesen. Weitere Hinweise auf die Struktur des Metaboliten gaben die Produktionen bei m/z 211, m/z 202 und m/z 201. Das Ion bei m/z 211 fand sich sowohl im Produktionen-Spektrum von m/z 309 als auch von m/z 229 und zeigte die Eliminierung von H₂O an, ein Beleg für Hydroxyfunktionen im Metaboliten. Das Ion bei m/z 202 wies auf eine Fragmentierung hin, bei der entweder C₂H₃ oder HNC eliminiert wurde. Da in den Produktionen-Spektren der deuterierten Ionen keine Massendifferenz von 27 Da mehr auftrat, sondern nur noch eine von 28 Da, hatte offensichtlich eine Massenverschiebung um 1 Da stattgefunden. Damit ist die Abspaltung von HNC wahrscheinlicher, da die Protonen in C₂H₃ nicht azide sind und daher nicht gegen ein Deuteron ausgetauscht worden wären. Das Ion bei m/z 201 belegte die Eliminierung von CO oder C₂H₄.

In den Produktionen-Spektren von m/z 309 und m/z 229 trat ein Ion bei m/z 171 auf, das im Produktionen-Spektrum von m/z 187 fehlte (s. Abb. 3.18 b) - e). Denkbar war hier die Abspaltung von HNCO als Folgereaktion des CH₃-Verlusts aus einer Acetylaminogruppe (m/z 214 → m/z 171). Diese Interpretation wurde durch eine Massenverschiebung um 1 Da (m/z 217 → m/z 173) im Produktionen-Spektrum der deuterierten Verbindung gestützt, hier wurde DNCO statt HNCO abgespalten. Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass die Acetylgruppe N-gebunden vorliegt. Ein weiteres diagnostisches Ion fand sich bei m/z 159, es wurde wahrscheinlich über eine CO-Eliminierung aus dem Ion

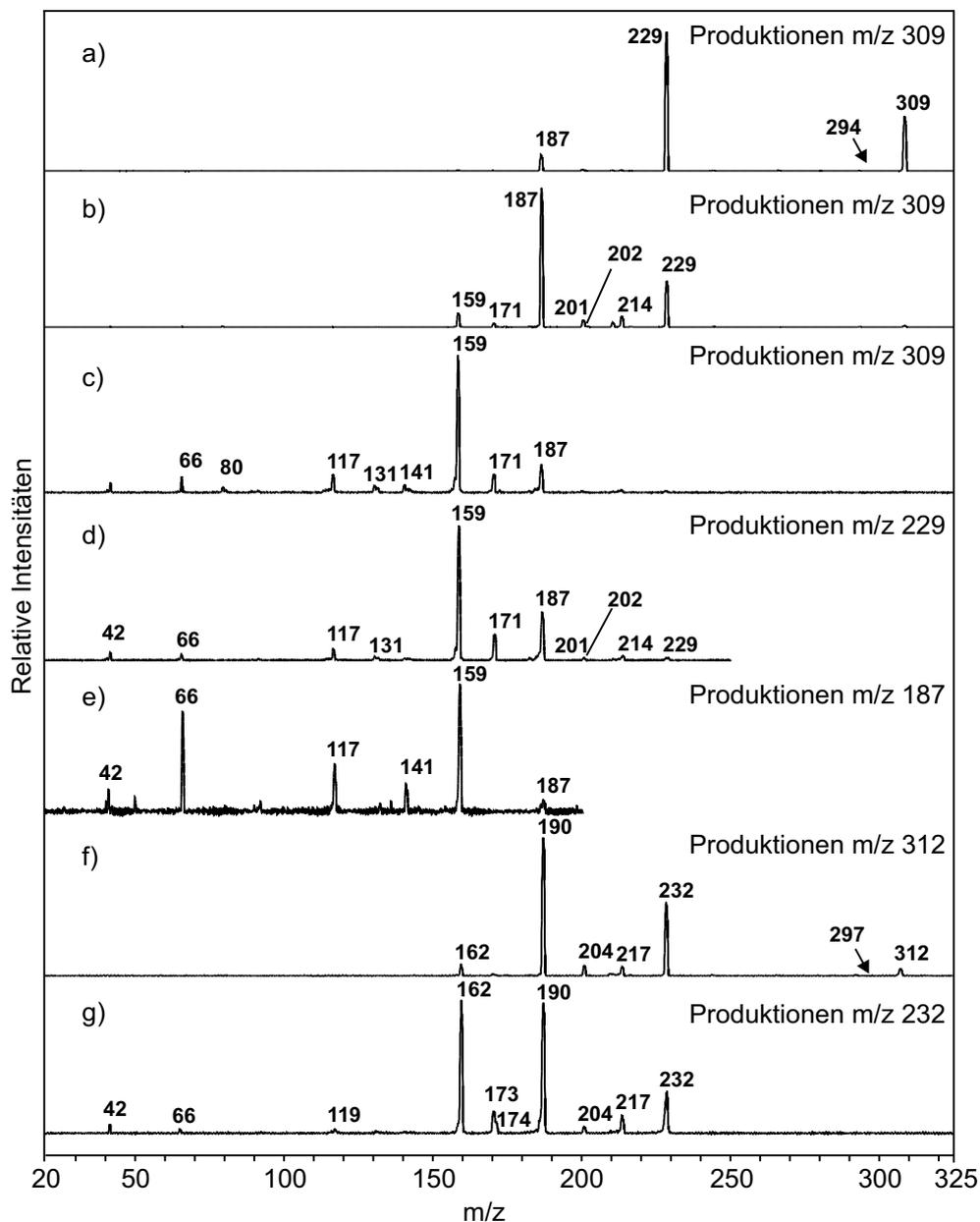


Abbildung 3.18 Produktions-Spektren eines Metaboliten, der nach anaerober Behandlung von Textilabwasser auftrat. (s. Abb. 3.16) **a) - c)** Produktions-Spektren des Molekülions bei m/z 309 bei CE 20 eV, 30 eV und 50 eV, **d)** und **e)** pseudo- MS^3 Produktions-Spektren der Fragmente bei m/z 229 und m/z 187, CE 30 eV, **f)** und **g)** Produktions-Spektren in einem Chromatographiesystem aus D_2O/ACN , CE 30 eV. Alle aziden Protonen wurden durch Deuteronen ausgetauscht. Das Molekülion wurde nun bei m/z 312, die Fragmente bei m/z 232 und m/z 190 beobachtet (Chromatographiebedingungen s. HPLC-Trennsystem 13, S. 134).

m/z 187 gebildet. CO-Eliminierungen sind häufig bei negativ geladenen hydroxylierten Aromaten und Chinonen zu beobachten, wie z.B. bei der Ringkontraktion vom Naphthol-Anion zum Benzocyclopentadienylanion (s. Kap. 2.1, S. 23). Daher wurde ein Naphthalinring als wahrscheinlichstes Grundgerüst des Metaboliten M angenommen.

Die durch die UV- und Produktionen-Spektren gewonnenen Erkenntnisse über Strukturelemente von Metabolit M wurden in die Strukturgenerator-Software implementiert. Es wurden 24 Positionsisomere eines Naphthalinsulfonats berechnet (s. Abb. 3.17). Diese Substanz wies als Chromophor eine Chinoniminogruppe auf. Alle in den Produktionen-Spektren der Verbindung auftretenden Ionen konnten mit der vorgeschlagenen Struktur in Einklang gebracht werden, wenn auch einige Ionen bei niedrigeren Massen (m/z 117, m/z 66) nur durch komplexe Umlagerungen erklärt werden konnten.

Dieses Beispiel zeigte das Potential der Verbindung von UV/VIS-Spektren mit massenspektrometrischen Methoden zur Identifizierung unbekannter Metabolite. Insbesondere die Kombination exakter Massenbestimmungen zur Herleitung von Elementarzusammensetzungen mit Produktionen-Spektren zur Identifizierung von Strukturelementen erwies sich hier als sehr leistungsfähig.

Durch die Einbindung von Strukturgenerator-Software in die Spektreninterpretation können aus den spektralen Informationen Strukturen hergeleitet werden. Obwohl dieser Ansatz die Formulierung plausibler Strukturvorschläge ermöglicht, stellt er keine Strukturbeweise zur Verfügung. Hierzu bedürfte es weiterer komplementärer strukturanalytischer Verfahren wie etwa NMR-Spektroskopie (s. Kap. 3.2.3).

3.4 Redoxmediatoren

Bei der reduktiven Spaltung von Azofarbstoffen unter anaeroben Bedingungen fällt auf, dass dieser Reaktion ein sehr großes Substanzspektrum zugänglich ist. Es reicht von unpolaren Substanzen [297] bis hin zu hochsulfonierten und damit sehr polaren [250, 299, 306] sowie polymeren [298] Vertretern dieser Substanzklasse. Als Produkte der Reduktion treten aromatische Amine auf, die sich oftmals als anaerob nicht weiter abbaubar erwiesen haben [250, 299]. Sulfonierte Reduktionsprodukte waren häufig auch unter aeroben Bedingungen persistent [306]. Als Mechanismus der Reduktion der Azogruppe (genauer Diazogruppe) wurde die Wirkung von unspezifischen, zytoplasmatischen Azoreduktasen vorgeschlagen [301]. Diese Hypothese wurde von Kudlich et al. [313] für *Pseudomonas* spp. Stamm BN6 nur teilweise bestätigt, da sie neben zytoplasmatischer auch membrangebundene Azoreduktaseaktivität nachweisen konnten. Gleichzeitig zeigte sich im Rahmen dieser Arbeiten, dass die Reduktionsraten von Azofarbstoffen durch Zugabe organischer Katalysatoren stark erhöht werden. Für diese Katalysatoren hat sich aufgrund ihrer Funktion der Begriff Redoxmediatoren eingebür-

gert [314]. Als Mechanismus der Reduktion wurde nun vermutet, dass ein membrangebundenes unspezifisches Redoxsystem Redoxmediatoren reduziert, welche dann Reduktionsequivalente zu den Azofarbstoffen transportieren. Dieser extrazelluläre Mechanismus ist imstande, auch die Reduktion von hochpolaren und polymeren Azofarbstoffen zu erklären, deren Transport über die Zellmembran mit nachfolgender Reduktion über zytoplasmatische Azoreduktasen zweifelhaft erschien. Haug et al. [300] konnten weiterhin zeigen, dass sich mit *Pseudomonas* spp. BN6¹³ nach aerober Präinkubation mit Naphthalinsulfonaten beim anaeroben Abbau des Azofarbstoffs Amaranth deutlich erhöhte Reduktionsraten erzielen lassen. Dies gab den Hinweis, dass beim aeroben Abbau von Naphthalinsulfonaten offenbar Metabolite gebildet werden, die dann die Reduktion von Azofarbstoffen katalysieren können.

Der aerobe Abbau von Naphthalin-2-sulfonat erfolgt über den initialen Angriff von Naphthalinsulfonatdioxygenase (NSADO: Naphthalenesulfonic Acid Dioxygenase) auf den sulfonierten Ring des Naphthalins [24, 26]. Es entsteht 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-sulfonat, welches durch spontane Sulfit-Eliminierung zu 1,2-Dihydroxynaphthalin zerfällt. 1,2-Dihydroxynaphthalin ist dann das Substrat der Dihydroxynaphthalindioxygenase (DHNDO), die den Naphthalinring spaltet. Das Reaktionsprodukt ist Hydroxychromencarbonsäure (bzw. deren nichtzyklisches Isomer 4-(2-Hydroxybenzol)-2-oxo-but-3-encarbonsäure), die im weiteren Verlauf zu Pyruvat und Salicylat umgesetzt wird.

Unter den Versuchsbedingungen (Phosphatpuffer pH 7.3) autooxidiert 1,2-Dihydroxynaphthalin rasch zu 1,2-Naphthochinon. Obwohl im Laufe der Untersuchungen selbst als Redoxmediator ausgeschlossen, kann es aufgrund seiner chemischen Eigenschaften und seiner Reaktivität als Vorläufer potentieller Redoxmediatoren vermutet werden. Um festzustellen, ob also 1,2-Dihydroxynaphthalin das Ausgangsprodukt dieser Redoxmediatoren ist, wurde durch Keck et al. [316] von *Sphingomonas* sp. Stamm BN6 die Mutante *Sphingomonas* sp. Stamm AKE1 hergestellt, deren DHNDO-Aktivität über Insertions-Mutagenese des *nsaC*-Gens ausgeschaltet worden war. Der Abbau von Naphthalin-2-sulfonat bleibt bei dieser Mutante auf der Stufe des 1,2-Dihydroxynaphthalins stehen und die in dieser Stufe über eine Autoxidation zu 1,2-Naphthochinon entstehenden Metabolite reichern sich folglich an. Im Folgenden wird die die in Zusammenarbeit mit der Universität Stuttgart erfolgte Identifizierung einiger dieser Metabolite des Naphthalinsulfonat-Abbaus von Stamm AKE1 beschrieben und deren Bedeutung als Redoxmediatoren diskutiert.

Abbildung 3.19 zeigt anhand von LC-MS-Chromatogrammen den zeitlichen Verlauf des Abbaus von Naphthalin-2-sulfonat (Peak C) mit *Sphingomonas* sp. Stamm AKE1. Es treten eine Reihe von Metaboliten auf, besonders intensive

¹³Auf der Basis von 16S-rRNA-Analysen erfolgte Anfang der '90er Jahre die taxonomische Neuordnung der Gattung *Pseudomonas* [315]. In die neue Gattung der Sphingomonaden wurde auch *Pseudomonas* spp. Stamm BN6 als *Sphingomonas* sp. Stamm BN6 aufgenommen.

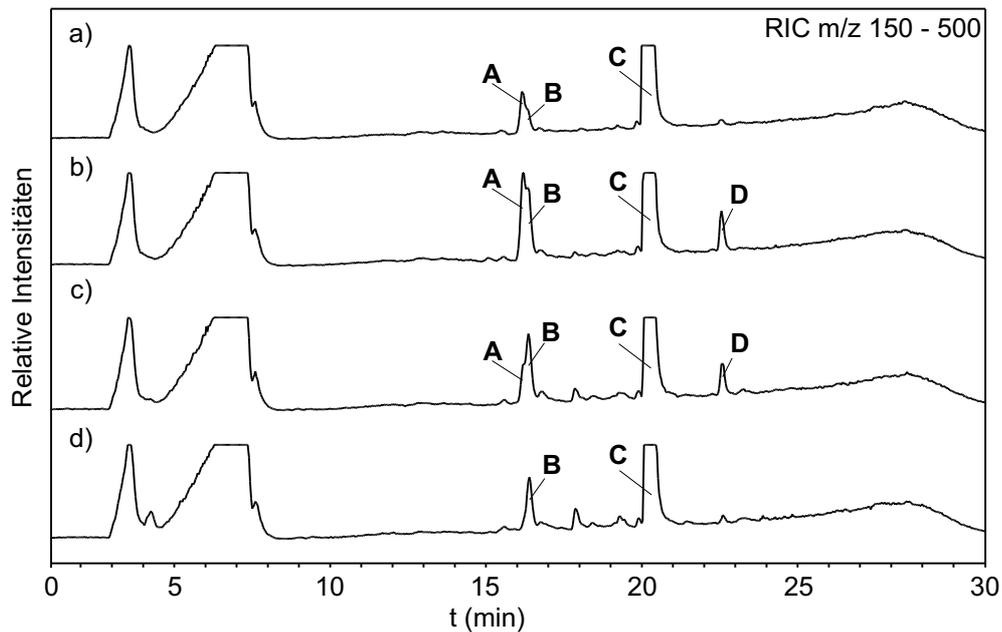


Abbildung 3.19 LC-MS-Untersuchung des Abbaus von Naphthalin-2-sulfonat durch *Sphingomonas* sp. Stamm AKE1. **a)** direkt nach Inkubation, **b)** nach 30 min, **c)** nach 150 min, **d)** nach 1000 min. **A** 1,2-Naphthochinon-4-sulfonat, **B** 2-Hydroxy-1-oxo-1,4-dihydronaphthalin-4,4-disulfonat, **C** Naphthalin-2-sulfonat, **D** unbekannter Metabolit. (MS-Bedingungen: Negativ-ESI, Scan von m/z 50- m/z 450, Chromatographiebedingungen s. HPLC-Trennsystem 14, S. 135).

Peaks finden sich bei 15.18 min (Peak A, Abbildung 3.19), 15.39 min (Peak B) und 21.55 min (Peak D). Die Massenspektren der Peaks A (m/z 173, m/z 237, m/z 239; (M+2)-Isotopenpeak 7%) und B (m/z 80, m/z 159, m/z 239, m/z 319, (M+2)-Isotopenpeak 12%) deuten auf eine einfache bzw. zweifache Sulfonierung dieser Metabolite hin. Da die Desulfonierung von Naphthalin-2-sulfonat entsprechend dem etablierten Abbauweg [24,26] auf dieser Abbaustufe schon stattgefunden haben sollte, konnten diese Ergebnisse auf zweierlei Art interpretiert werden. Entweder hatte eine erneute Sulfonierung von 1,2-Dihydroxynaphthalin bzw. 1,2-Naphthochinon durch das beim Abbau abgespaltene Sulfit unter Bildung von einfach und mehrfach sulfonierten Naphthochinonderivaten stattgefunden, oder aber es lag ein alternativer Abbauweg vor. Erstere Möglichkeit war aufgrund weiterer Ergebnisse wahrscheinlicher: Erstens führte die Inkubation mit rein chemisch mit Sulfit umgesetztem 1,2-Naphthochinon in Reduktionsversuchen zu erhöhten Reduktionsraten beim anaeroben Abbau von Azofarbstoffen. Diese waren vergleichbar mit denen durch Präinkubation mit Naphthalin-2-sulfonat erzielbaren Raten. Zweitens wurden bei der LC-MS-Untersuchung des Umsatzes von 1,2-Naphthochinon mit Sulfit genauso wie beim Abbau von Naphthalin-2-sulfonat mit *Sphingomonas* sp. Stamm AKE1 intensive Peaks bei 15.2 min und 15.4 min

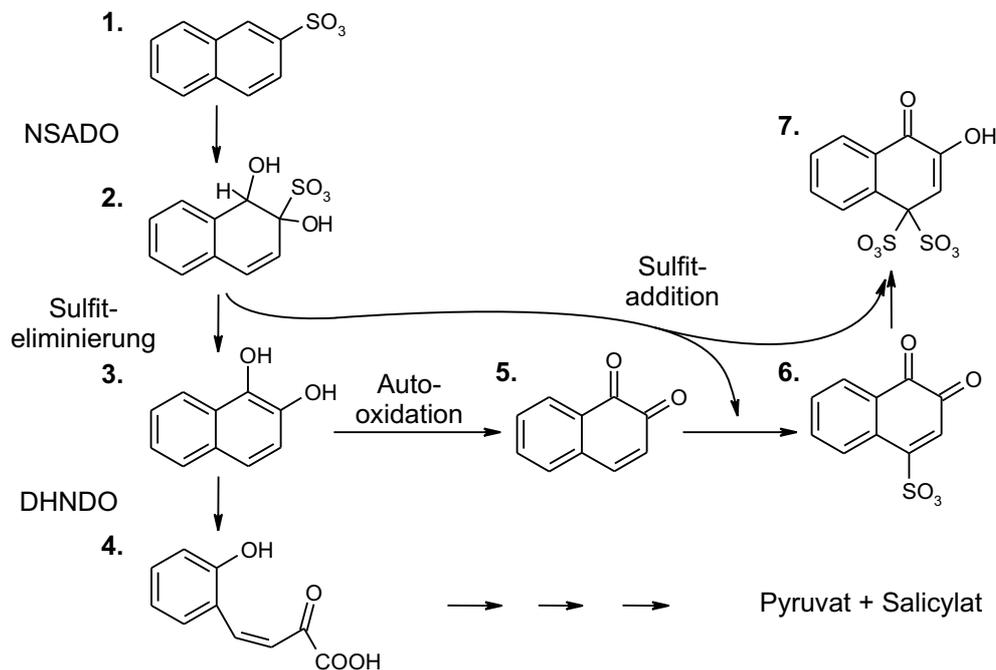


Abbildung 3.20 Abbauweg von Naphthalin-2-sulfonat. Bei *Sphingomonas* sp. Stamm AKE1 ist keine DHNDO-Aktivität vorhanden, der Metabolismus führt von 1,2-Dihydroxynaphthalin (**3.**) durch Autooxidation zu 1,2-Naphthochinon (**5.**) und dann über Sulfittaddition weiter zu 1,2-Naphthochinon-4-sulfonat (**6.**) sowie zu 2-Hydroxy-1-oxo-1,4-dihydronaphthalin-4,4-disulfonat (**7.**).

gefunden. Die Massenspektren dieser Peaks stimmten sehr gut mit denen überein, die beim biologischen Abbau von Naphthalin-2-sulfonat mit Stamm AKE1 bei diesen Retentionszeiten beobachtet wurden.

Diese Ergebnisse deuteten folglich darauf hin, dass die Peaks A und B zu Substanzen gehörten, die über eine Reaktion von 1,2-Naphthochinon mit Sulfite entstanden waren.

Durch Retentionszeitvergleich, Spektrenvergleich sowie durch Standardadditionsexperimente konnte Peak A, Abbildung 3.19 eindeutig 1,2-Naphthochinon-4-sulfonat zugeordnet werden. Damit entspricht die Reaktion der synthetischen Darstellung von 1,2-Naphthochinon-4-sulfonat durch Umsetzung von 1,2-Naphthochinon mit Sulfite [317]. Zur Identifizierung von Peak B wurde eine größere Menge 1,2-Naphthochinon mit Sulfite zur Reaktion gebracht. Aus diesem Reaktionsgemisch wurde über präparative HPLC eine Verbindung isoliert¹⁴, die ein mit Peak B identisches Massenspektrum aufwies. Mit Hilfe des Massenspektrums sowie Tandem-Massenspektren, exakter Massenbestimmung und ein- und mehrdimensionalen NMR-Spektren (s. Anh. B.8, S. 151) wurde die Substanz als 2-

¹⁴Zu den Chromatographiebedingungen s. HPLC-Trennsystem 15, S. 135.

Hydroxy-1-oxo-1,4-dihydronaphthalin-4,4-disulfonat identifiziert. Diese Substanz wurde von Asahi et al. [318] als Produkt der Reaktion von 1,2-Naphthochinon-4-sulfonat mit Sulfit beschrieben. Die Identität der isolierten Verbindung mit dem beim Abbau von Naphthalin-2-sulfonat durch *Sphingomonas* sp. Stamm AKE1 entstandenen Produkt (Peak B, Abb. 3.19) wurde ebenfalls durch Retentionszeitvergleich, Vergleich der UV- und Massenspektren sowie durch Standardadditionsexperimente demonstriert.

Peak D, Abbildung 3.19 (m/z 189, (M+2)-Isotopenpeak 8%) konnte nicht abschließend identifiziert werden. Aufgrund der Molekülmasse, des Isotopenmusters sowie eines schwachen $[M - 28 - H]^-$ -Fragmentes (CO-Abspaltung) kann ein dihydroxyliertes Derivat des Benzolsulfonats vermutet werden. Diese Substanz wurde beim rein chemischen Umsatz von 1,2-Naphthochinon mit Sulfit nicht detektiert.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.20 schematisch dargestellt. Für *Sphingomonas* sp. Stamm BN6 gilt der von Nörtemann et al. [24, 26] etablierte Abbauweg von Naphthalin-2-sulfonat. Da die Mutante *Sphingomonas* sp. Stamm AKE1 keine DHNDO-Aktivität zeigt, wird 1,2-Dihydroxynaphthalin (**3.** in Abbildung 3.20) vornehmlich autoxydiert. Damit reichern sich die Nebenprodukte 1,2-Naphthochinon-4-sulfonat (**6.**) und 2-Hydroxy-1-oxo-1,4-dihydronaphthalin-4,4-disulfonat (**7.**) an.

Sowohl 1,2-Naphthochinon-4-sulfonat als auch 2-Hydroxy-1-oxo-1,4-dihydronaphthalin-4,4-disulfonat bewirken eine Erhöhung der Reduktionsraten bei anaerober Inkubation des Azofarbstoffs Amaranth. Sie können damit die Reduktion von Azofarbstoffen katalysieren. Die Steigerung der Reduktionsraten waren jedoch im Vergleich zu den mit 1,2-Naphthochinon und Sulfit inkubierten Ansätzen geringer [316]. Es scheinen also bei der Reaktion von Naphthochinon mit Sulfit neben den identifizierten Naphthochinonderivaten weitere Substanzen zu entstehen, die ebenfalls die Reduktion von Azofarbstoffen katalysieren können. Ob die bei der Reduktion von Amaranth erzielbaren Reduktionsraten auf die additive Wirkung mehrerer Substanzen oder im wesentlichen auf eine hochaktive (und noch unbekannt) Verbindung zurückzuführen ist, bleibt nach diesen Untersuchungen offen.

3.5 Verhalten von 2-Naphthol-6-sulfonat im aeroben Batchabbaustest

Ähnliche Metabolite wie beim aeroben Umsatz von Naphthalin-2-sulfonat mit *Sphingomonas* sp. Stamm BN6 (s. Kap. 3.4) wurden im Verlauf des aeroben Abbaus von 2-Naphthol-6-sulfonat in einem modifizierten Zahn-Wellens-Test beobachtet. Nach etwa zehn Tagen trat ein stabiler Metabolit auf. Wie in Abbildung 3.21 erkennbar ist, korreliert das Auftreten dieses Metaboliten mit der

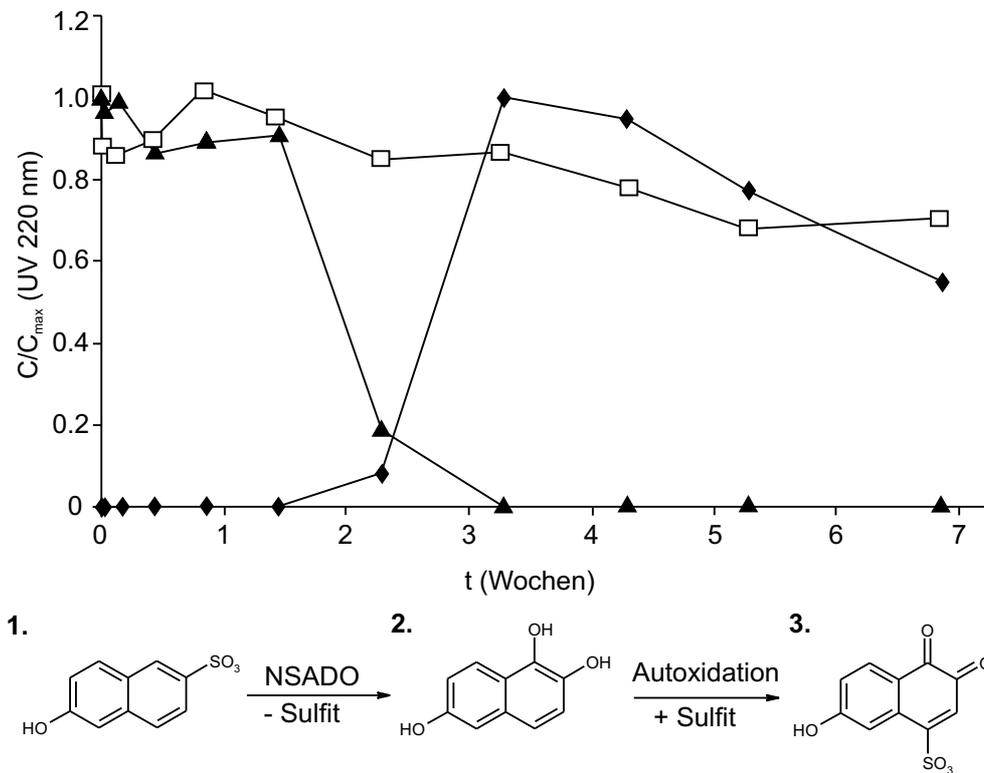


Abbildung 3.21 Batch-Abbaustest von 2-Naphthol-6-sulfonat (Modifizierter Zahn-Wellens-Test). Der Abbau wurde mit HPLC-UV (220 nm) verfolgt. Parallel zur Abnahme von 2-Naphthol-6-sulfonat (▲) tritt ein Metabolit (◆) auf, der im weiteren Verlauf nur langsam abgebaut wurde. Im vergifteten Ansatz (□) wurde kein Abbau beobachtet. Der wahrscheinliche Abbauweg von 2-Naphthol-6-sulfonat (1.) umfasst die hypothetische Zwischenstufe 2,5,6-Trihydroxynaphthalin (2.) und das durch Autoxidation und Sulfitaddition gebildete 6-Hydroxy-1,2-naphthochinon-4-sulfonat (3.). Die Daten wurden mit HPLC-UV erhoben, Chromatographiebedingungen s. HPLC-Trennsystem 16, 135.

Abnahme der Ausgangssubstanz. Gegen Ende der Versuchsdauer von 7 Wochen wurde wiederum eine leichte Abnahme des Metaboliten verzeichnet. Über Massenspektren und Produktions-Spektren im Fließinjektionsmodus wurde gezeigt, dass die Verbindung sulfoniert war (Fragmente bei m/z 189 ($[M - SO_2 - H]^-$) und m/z 80 (SO_3^-), der intensive CO-Verlust (m/z 189) sprach für einen hydroxylierten Aromaten. Die Bestimmung der exakten Masse des Metaboliten mit LC-TOFMS aus einer gefriergetrockneten Probe ergab eine der Summenformel $C_{10}H_5SO_6$ innerhalb der Messgenauigkeit entsprechende Masse. Die bei diesen Messungen ebenfalls beobachtete Verbindung mit dem Molekulargewicht 334 Da (m/z 333, Summenformel $C_{10}H_5S_2O_9$) war nur in der gefriergetrockneten Probe

präsent und deswegen wahrscheinlich ein im Zuge der Probenaufarbeitung gebildetes Artefakt.

Die Interpretation dieser Befunde war zunächst unklar. Offensichtlich war es im Zuge des aeroben Umsatzes zur Bildung eines trihydroxylierten Naphthalinsulfonats gekommen, das im weiteren Verlauf zu einer chinoiden Verbindung autoxydiert war. Der Angriff einer Oxygenase am nicht-sulfonierten Ring von 2-Naphthol-6-sulfonat stünde jedoch im Widerspruch zu dem von Nörtemann et al. [24] beschriebenen Abbauweg, der analog dem Abbau von Naphthalinmonosulfonaten eine Desulfonierung als initialen Schritt beinhaltet. Eine den konventionellen Vorstellungen über den Abbau von Naphthalinsulfonaten eher entsprechende Interpretation ist in Abbildung 3.21 dargestellt. Die Oxidation erfolgt zunächst unter Sulfiteliminierung und Freisetzung von Trihydroxynaphthalin. Anschließend erfolgt eine Autoxidation dieser Verbindung zum Naphthochinon, das dann Sulfit addiert. Dies entspricht dem in Kapitel 3.4 für die Bildung von Redoxmediatoren aus Naphthalinsulfonat beschriebenen Mechanismus.

4 Quantitative Analytik

Nachdem die Arbeiten zur Entwicklung der verschiedenen Varianten der IP-HPLC-MS/MS-Methodik in Kapitel 2.4, S. 42 erläutert wurden, sollen im Folgenden die Ergebnisse der Quantifizierung von aromatischen Sulfonaten in verschiedenen Wässern dargestellt werden. Die IP-HPLC-MS/MS wurde sowohl zur Untersuchung von Industrieabwässern, wie Textilabwasser und Gerbereiabwasser, als auch zur Analyse von Kläranlagenabläufen, Oberflächenwässern und Uferfiltraten eingesetzt. Als Zielanalyte wurden fünf disulfonierte (2,6-NSA, 1,5-NSA, 2,7-NSA, 1,6-NSA und 1,7-NSA) und zwei monosulfonierte Naphthalinsulfonate (1-NSA und 2-NSA) ausgewählt.

Das Verhalten dieser Substanzen bei der Behandlung von Industrieabwasser ist für die Bewertung der angewandten Behandlungsverfahren aus zwei Gründen von Bedeutung: Zum einen sind die ausgewählten Substanzen als sorptiv schlecht eliminierbar bekannt [12,13,14,15,16] und zumindest einige Positionisomere des Naphthalinsulfonats sind biologisch schwer abbaubar [1,25,57,55,319]. Aufgrund dieser Eigenschaften handelt es sich um potentiell refraktäre Substanzen und damit um Problemstoffe der Abwasserbehandlung. Zum anderen ist das Auftreten dieser Verbindungen sowohl in Industrieabwässern [39,69] als auch in anthropogen beeinflussten Wasserkörpern (wie z.B. urbanen Wasserkreisläufen oder bestimmten Oberflächengewässern) aus zahlreichen Publikationen bekannt [16,53,54,71,76,110]. Vor dem Hintergrund ihrer ubiquitären Verbreitung ist die Entfernung dieser Problemstoffe ein bedeutsames Ziel bei der Behandlung von Industrieabwasser. Eine Reduktion der Belastung durch potentiell refraktäre Stoffe wie Naphthalinsulfonate wird auch durch das Vorsorgeprinzip geboten.

Das Verhalten der sieben ausgewählten Naphthalinsulfonate wurde in zwei verschiedenen Industrieabwässern untersucht. Es handelte sich dabei um ein Textilabwasser, das in einem Versuchsreaktor anaerob/aerob biologisch behandelt wurde, sowie um Gerbereiabwasser, das im Rahmen der innerbetrieblichen Abwasserbehandlung in einem Membranbioreaktor aerob behandelt wurde. Die Ergebnisse sollten Auskunft über das Potential dieser Verfahren geben, schwer abbaubare Substanzen aus dem Abwasser zu eliminieren; den Substanzen kam somit auch Modellcharakter zu.

Aufgrund ihres potentiell refraktären Charakters kommt den ausgewählten Naphthalinsulfonaten auch bei der Beurteilung der Uferfiltration (UF) und der

Grundwasseranreicherung (GWA) besondere Relevanz zu. Zwar muss aufgrund ihres toxikologischen Profils [320] nicht von einer akuten Gefährdung ausgegangen werden, ihre sehr gute Wasserlöslichkeit und die damit einher gehende hohe Mobilität kann jedoch zur Akkumulation in teilweise geschlossenen Wasserkreisläufen, wie z.B. im Berliner Raum, führen. Als typische Vertreter der Substanzklasse der aromatischen Sulfonate konnte ihr Verhalten zudem beispielhaft für viele weitere Substanzen mit ähnlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften stehen.

4.1 Industrieabwasser

4.1.1 Textilabwasser

Die Wirkung einer kombinierten anaerob/aeroben Behandlung auf die Gehalte von Naphthalinsulfonaten in Textilabwasser wurde untersucht. Das Abwasser eines Berliner Färberei-Betriebes¹ wurde im Fachgebiet Verfahrenstechnik der TU Berlin in zwei nacheinander geschalteten Rotationsscheibenreaktoren sukzessive anaerob und aerob behandelt [310]. Es wurden Stichproben von Zulauf und Ablauf des anaeroben Schrittes sowie Ablauf des aeroben Schrittes genommen. Die qualitative Untersuchung dieses Abwassers wurde in Kapitel 3.3, S. 84 ff. dargestellt. Sie umfasste unter anderem Versuche zur Identifizierung von Metaboliten, die bei der anaeroben bzw. aeroben Behandlung von Azofarbstoffen gebildet wurden. Die Ergebnisse der quantitativen Erfassung von Naphthalinsulfonaten in unbehandeltem und anaerob bzw. anaerob/aerob behandeltem Abwasser werden im Folgenden diskutiert.

Wegen der sehr hohen Salzgehalte von 6 g/L Chlorid und 4 g/L Sulfat bei einem DOC von ca. 650 mg/L im unbehandeltem Abwasser traten bei der direkten Injektion von Textilabwasser-Proben in der IP-HPLC-MS Verschiebungen der Retentionszeit auf. Um diese Retentionszeitverschiebungen zu verhindern, mussten die Proben entweder 1:10 verdünnt werden oder über ein SPE-Verfahren aufgereinigt werden. Beide Ansätze führten zu vergleichbaren quantitativen Ergebnissen. Da die Zielanalyte auch in 1:10 verdünnten Proben noch sicher nachgewiesen werden konnten, wurde der Verdünnungsschritt im allgemeinen dem aufwändigeren SPE-Verfahren vorgezogen.

In Tabelle 4.1 sind die Gehalte von vier Naphthalindisulfonaten und zwei Naphthalinsulfonaten in unbehandeltem, anaerob behandeltem sowie sukzessive anaerob und aerob behandeltem Textilabwasser einander gegenübergestellt. Nur 1-NSA und 2-NSA wurden bei der anaerob/aeroben Behandlung des Textilabwasser zumindest teilweise entfernt. Die Eliminierung war jedoch mit 14% bzw. 37% gering und blieb deutlich hinter den fast vollständigen Eliminierungen dieser Verbindungen zurück, die z.B. bei der konventionellen Behandlung von durch

¹Textilfärberei Vollton, Berlin Kreuzberg.

Tabelle 4.1 Gehalte einiger mono- und disulfonierter Naphthalinsulfonate in einem Textilabwasser (Färberei Vollton, Berlin Kreuzberg). Die Behandlung erfolgte in einem Rotationsscheibenreaktor (Aufbau analog wie in [310]). Die Ergebnisse wurden anhand von Stichproben des Rohabwassers, des anaerob und des anaerob/aerob behandelten Ablaufs des Reaktors erhalten. Vor der Chromatographie wurden die Proben 1:10 verdünnt. Die Quantifizierung erfolgte mit interner Kalibrierung.

Substanz	Unbehandelt [†]	Anaerob [†]	Anaerob/Aerob [†]
2,6-NSA	51	55	59
1,5-NSA	22	25	25
2,7-NSA	388	369	370
1,7-NSA	437	413	406
1,6-NSA*	+	+	+
1-NSA	470	419	404
2-NSA	2129	1809	1337

[†] Gehalte in $\mu\text{g/L}$, + detektiert, nicht quantifiziert

* Zum Zeitpunkt der Untersuchung war keine Referenzsubstanz vorhanden, über den Vergleich mit später aufgenommenen Chromatogrammen konnte 1,6-NSA jedoch eindeutig identifiziert werden. Die Peakflächen im Zulauf entsprachen denen nach anaerober bzw. anaerob/aerober Behandlung.

industrielle Einleitungen beeinflusstem kommunalen Abwasser beobachtet wurden [39, 69]. Dies wurde auf die hohen Salzgehalte und die damit einhergehende reduzierte mikrobiologische Aktivität im aeroben Behandlungsschritt zurückgeführt. Derartige Effekte wurden für synthetische Abwässer mit unterschiedlichen Salzgehalten für mono- und disulfonierete Naphthalinsulfonate beschrieben [57].

Eine Eliminierung von Naphthalindisulfonaten wurde bei der anaerob/aeroben Behandlung nicht beobachtet. Ihre Gehalte blieben in beiden Behandlungsschritten annähernd konstant. Dies traf außer auf 2,6-NSA, 1,5-NSA, 2,7-NSA und 1,7-NSA auch auf 1,6-NSA zu, für die jedoch zum Zeitpunkt der Untersuchung noch kein geeigneter analytischer Standard vorhanden war. Der Vergleich mit zu einem späteren Zeitpunkt aufgenommenen Chromatogrammen belegte die Identifizierung dieser Verbindung. Da die Peakflächen in unbehandeltem und behandeltem Abwasser in etwa gleich waren, war ein Abbau dieser Verbindung ebenfalls auszuschließen. Auch für die Naphthalindisulfonate war ein negativer Einfluss des hohen Salzgehalts auf die Abbauleistung zu vermuten, da der aerobe Abbau für die meisten der Positionsisomere des Naphthalindisulfonats zumindest prinzipiell möglich ist [25, 39, 55, 57].

Die Entfernung von Naphthalindisulfonaten aus dem untersuchten Textilabwasser würde daher über die anaerob/aerobe Behandlung hinaus gehende Behandlungsschritte wie etwa Ozonung oder „advanced oxidation processes“ (AOPs) erfordern. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass ein aerober biologischer Abbau von Naphthalindisulfonaten durchaus sowohl in Modellsystemen als

auch im Kontext des Abwasser-Monitoring beobachtet wurde [25, 39, 55, 57]. Der fehlende Abbau aller identifizierten Positionsisomere des Naphthalindisulfonats im Fall dieses Textilabwassers belegt daher auch nicht den generellen refraktären Charakter dieser Verbindungen, sondern war vielmehr ein Hinweis darauf, dass der Abbau unter den gewählten Bedingungen nicht stattfinden kann. Der positive Effekt der Entfärbung des Textilabwassers wird also nicht von einer deutlichen Reduktion der Gehalte der Naphthalinsulfonate begleitet. Bezüglich der Naphthalinsulfonate wäre daher die Einleitung des unbehandelten Textilabwassers mit anschließender Behandlung in einer konventionellen kommunalen Kläranlage (indirekte Einleitung) möglicherweise ein ebenso erfolgversprechender Ansatz, da die Salzgehalte aufgrund der Verdünnung durch kommunales Abwasser deutlich gesenkt würden.

4.1.2 Gerbereiabwasser

Aromatische Sulfonate sind auch im Bereich der Lederherstellung wichtige Einsatzstoffe und werden als Bestandteile von Dispergiermitteln, Färbemitteln und synthetischen Gerbstoffen in zahlreichen Schritten der Lederherstellung eingesetzt. Sie sind daher als polare und potentiell refraktäre Substanzen bei der Behandlung von Gerbereiabwasser von Bedeutung. So wurden z.B. bei der Untersuchung des Verhaltens von sulfonierten Polyphenolen (SPP) bei der anaerob/aeroben Behandlung von Gerbereiabwasser in einer Pilotanlage nur geringe Eliminierungsraten beobachtet [321, 322]. In begleitend zu diesen Untersuchungen durchgeführten Batch-Abbauversuchen mit Biomasse aus der Pilotanlage wurde ein gutes Abbauverhalten von 2-NSA, jedoch keine Eliminierung von 1,5-NSA, Naphthalintrisulfonat, 1-Naphthol-4-sulfonat und 2-Naphthol-2,6-disulfonat festgestellt [321]. Zur Eliminierung dieser Verbindungen wurden dementsprechend kombinierte Verfahren wie z.B. Ozonung und biologischer Abbau empfohlen. Ein der biologischen Behandlung vorgeschalteter Ozonungsschritt erwies sich in diesem Zusammenhang auch als deutlich positiv für die Eliminierbarkeit von refraktärem DOC [273, 274].

Alternativ zu chemisch/physikalischen Vorbehandlungsschritten können zur Entfernung refraktärer Verbindungen aerobe Membranbioreaktoren eingesetzt werden. Von den bei der konventionellen aeroben Behandlung eingesetzten Reaktoren unterscheiden sich Membranbioreaktoren durch die deutlich größere Biomassendichte sowie ein sehr viel höheres Schlammalter. Letzteres ist ein potentieller Vorteil für die Behandlung von biologisch schwer abbaubaren Stoffen wie etwa Naphthalinsulfonaten, da diese Bedingungen Adaptationsphänomene bzw. die Ansiedlung spezialisierter Organismen fördern können. Möglicherweise sind die höheren Bakteriendichten auch die Ursache für ein eher katabolisches als anabolisches Stoffwechselregime der Biomasse, was die Abbauleistung bezüglich refraktärer Verbindungen deutlich verbessern könnte. Das Abbauverhalten ins-

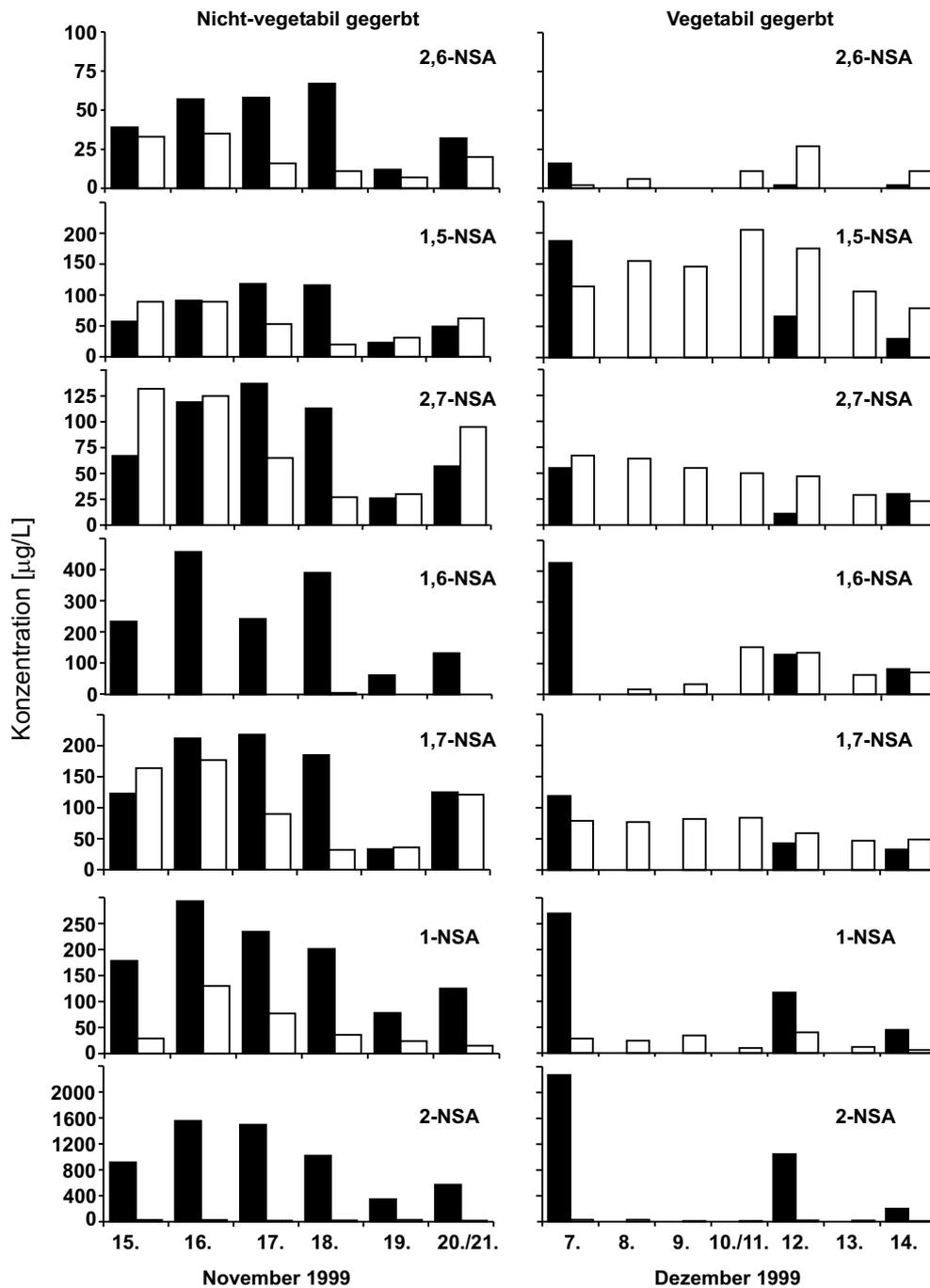


Abbildung 4.1 Naphthalinsulfonate in Gerbereiabwasser. Die Probenahmen erfolgten im November und Dezember 1999. Im November wurde mit synthetischen Gerbstoffen (nicht-vegetabil) und im Dezember mit pflanzlichen Gerbstoffen (vegetabil) gegerbt. ■: Zulaufwerte, □: Ablaufwerte. Die Zulaufproben vom 8. – 11. sowie vom 13. Dezember wurden beim Transport zerstört. Die Werte sind nicht um die hydraulische Retentionszeit korrigiert.

besondere von Naphthalindisulfonaten bei der Behandlung von Gerbereiabwasser in einem aeroben Membranbioreaktor war daher von besonderem Interesse.

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Untersuchung von Gerbereiabwasser auf Naphthalinsulfonate dargestellt. Das Gerbereiabwasser wurde in der betriebs-eigenen Kläranlage einer mittelständischen Gerberei behandelt. Der Aufbau dieser Kläranlage ist im Anhang skizziert (s. Anh. A.11, S. 137), weitere Messparametern wie DOC, Nährstoffgehalte etc. sind im Anhang tabelliert (s. Anh. B.5, S. 152 ff.). Die Kläranlage umfasst neben Flockungs- und Sedimentations-Stufen einen aeroben Membranbioreaktor. Die hydraulische Retentionszeit bzw. mittlere Verweilzeit im Membranbioreaktor wurde mit 1 bis 2 Tagen, je nach Abwasseraufkommen, angegeben. Es wurden Zu- und Ablauf des Reaktors zweier nicht aufeinander folgender Wochen beprobt. Während der ersten Probenahme (15.Nov.–20./21.Nov.1999) wurde nicht-vegetabil, d.h. unter Einsatz von synthetischen Gerbstoffen, gegerbt. Die zweite Probenahme (7.Dez.–14.Dez.1999) umfasste einen Zeitraum in dem vegetabil, d.h. unter Einsatz von pflanzlichen Gerbstoffen, gegerbt wurde.

Die Behandlung des Gerbereiabwassers führte zu einer sehr guten DOC-Eliminierung von ca. 95%². Die zur Untersuchung ausgewählten Naphthalinsulfonate konnten in den meisten der Proben nachgewiesen werden. Die Zulaufkonzentrationen lagen beispielsweise für 2-NSA bei 348 - 1555 $\mu\text{g/L}$ und für 2,6-NSA bei 12 - 67 $\mu\text{g/L}$. Da diese Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenzen in der IP-HPLC-MS/MS lagen, konnten die Proben ohne Anreicherung analysiert werden. Die Proben wurden 1:10 verdünnt und über Standardaddition quantifiziert. Diese Art der Quantifizierung erlaubte es, auch bei Zulaufproben Störungen der Chromatographie auszugleichen, die durch in den Proben enthaltene Matrix bzw. Salze hervorgerufen wurden.

Einen Überblick über die Zulauf- und Ablaufkonzentrationen der fünf Naphthalindisulfonate und zwei Naphthalinmonosulfonate im Membranbioreaktor der Kläranlage der Gerberei gibt Abbildung 4.1. Eine Zusammenstellung der Messwerte findet sich im Anhang (Anh. B.5 S. 152, Tab. B.11), dort finden sich auch die Mittelwerte von Zu- und Ablauf der jeweiligen Untersuchungszeiträume. Diese Mittelwerte wurden über F-Test und Student-t-Test miteinander verglichen. Bei einem nicht bestandenen Student-t-Test mit zweiseitiger Fragestellung wurde von einer signifikanten Konzentrationsabnahme und damit Eliminierung ausgegangen. Die folgende Diskussion stützt sich daher wesentlich auf diesen Vergleich der Mittelwerte.

Bei der nicht-vegetabilen Gerbung wurden für 1,6-NSA und 2-NSA Eliminierungen von 100% bzw. 98% beobachtet. Die Eliminierung dieser Verbindungen lag damit in einem ähnlichen Bereich wie die DOC-Eliminierung. Auch für 1-NSA

²Der Mittelwert des DOC-Gehalts lag während des ersten Probenahmezeitraums im Zulauf bei 1300 mg/L und im Ablauf bei 67 mg/L (Eliminierung 94,8%), im Zeitraum der zweiten Probenahme bei 1640 mg/L DOC im Zulauf und 94 mg/L DOC im Ablauf (Eliminierung 94,3%).

wurde eine deutliche Konzentrationsabnahme verzeichnet, die durch Vergleich der Mittelwerte von Zulauf und Ablauf zu ca. 79% abgeschätzt wurde. Bei 2,6-NSA wurde eine Eliminierung von ca. 50% beobachtet, während die bei 1,5-NSA, 2,7-NSA und 1,7-NSA festgestellten Unterschiede zwischen Zu- und Ablaufkonzentration sich im Student-t-Test als statistisch nicht signifikant erwiesen. Eine Eliminierung dieser Positionsisomere des Naphthalindisulfonats erschien somit fraglich.

Die Interpretation der Ergebnisse bei der vegetabilen Gerbung war durch den Verlust von vier Zulaufproben (7.-9.Dez. und 13.Dez.1999) erschwert³, die drei vorhandenen Zulaufproben konnten aufgrund der starken Schwankungen der Zulaufwerte nicht als repräsentative Stichproben angesehen werden. Trotzdem war die sehr gute bzw. gute Eliminierung von 1-NSA und 2-NSA offensichtlich (Abb. 4.1). 2,6-NSA und 1,6-NSA wiesen schwankende Ablaufkonzentrationen auf (2,6-NSA: $8 \pm 9 \mu\text{g/L}$, 1,6-NSA: $67 \pm 58 \mu\text{g/L}$, während die Konzentrationen von 1,5-NSA, 2,7-NSA und 1,7-NSA im Ablauf sehr viel konstanter blieben (1,5-NSA: $140 \pm 40 \mu\text{g/L}$, 2,7-NSA: $48 \pm 16 \mu\text{g/L}$, 1,7-NSA: $68 \pm 16 \mu\text{g/L}$). Die Ursache dieses unterschiedlichen Verhaltens blieb unklar. Es konnte aber zumindest im Fall von 2,6-NSA vermutet werden, dass dieser Effekt mit den im Bereich sehr niedriger Konzentrationen größeren Messungenauigkeiten zu tun hatte. Für keins der Naphthalinsulfonate konnte eine statistisch signifikante Abnahme der Konzentration im Ablauf nachgewiesen werden. Dies musste jedoch zumindest im Fall sehr großer Standardabweichungen der Zulaufproben auf die zu geringe Proben-Anzahl zurückgeführt werden. Dies führte zum Beispiel bei 1,6-NSA dazu, dass sich die Eliminierung von 68% als statistisch nicht signifikant erwies.

Insgesamt wurde bei der Behandlung von Gerbereiabwasser im Membranbioreaktor neben der Eliminierung der bekanntermaßen gut bis sehr gut abbaubaren 1-NSA und 2-NSA auch eine Eliminierung von 1,6-NSA (Reduktion von durchschnittlich $254 \pm 150 \mu\text{g/L}$ unter die Nachweisgrenze im November 1999, nicht-vegetabile Gerbung) und 2,6-NSA (Reduktion von durchschnittlich $44 \pm 20 \mu\text{g/L}$ auf $20 \pm 12 \mu\text{g/L}$ im November 1999, nicht-vegetabile Gerbung) nachgewiesen. Da eine sorptive Eliminierung nicht anzunehmen war, belegten die Ergebnisse einen biologischen Abbau dieser Positionsisomere der Naphthalindisulfonate im Membranbioreaktor. Für 1,5-NSA, 2,7-NSA und 1,7-NSA waren keine statistisch signifikanten Konzentrationsabnahmen feststellbar. Die Ergebnisse decken sich zum Teil mit anderen Untersuchungen zur biologischen Eliminierbarkeit von Naphthalindisulfonaten: So wurden bei der Untersuchung der biologischen Abbaubarkeit von Naphthalinsulfonaten in zum Teil stark salzhaltigen Modellabwässern Eliminierungsraten von 88% für 1,6-NSA und 39% für 2,6-NSA gefunden, während 1,5-NSA nicht abgebaut wurde [57]. Der Abbau von 2,6-NSA durch aerobe Mikroorganismen ist zudem in Modellsystemen mit Bakterienisolaten belegt worden [55]. In einer stark durch Industrieabwasser beeinflussten kommunalen Klär-

³Die Probengefäße wurden beim Transport zerstört.

anlage wurden 2,6-NSA, 2,7-NSA und 1,6-NSA eliminiert, während andere Positionisomere des Naphthalindisulfonats sich als nicht eliminierbar erwiesen [39,69]. Damit blieb die Leistung des Membranbioreaktors im Fall von 2,7-NSA hinter der Leistung dieser konventionellen Kläranlage zurück. Eine Eliminierung von 1,5-NSA, 2,7-NSA oder 1,7-NSA konnte nicht nachgewiesen werden.

Neben der überzeugenden Eliminierungsleistung bezüglich des DOC und der Naphthalinmonosulfonate 1-NSA und 2-NSA scheinen im Membranbioreaktor auch unter anderen Bedingungen schlecht biologisch abbaubare Substanzen wie z.B. 1,6-NSA und wahrscheinlich auch 2,6-NSA abgebaut zu werden. Allerdings lässt die Datenlage in Bezug auf die Naphthalinsulfonate bisher keine qualitativen Vorteile im Vergleich zur konventionellen anaerob-aeroben Behandlung [39,57,319] erkennen. Sowohl hier als auch unter den Bedingungen der konventionellen anaerob/aeroben Behandlung haben sich einzelne Positionisomere des Naphthalindisulfonats als persistent erwiesen.

4.2 Proben aus dem Wasserkreislauf Berlins

Im Rahmen der Zusammenarbeit innerhalb des Fachgebiets Wasserreinigung wurden Proben aus dem Wasserkreislauf Berlins mit Vorsäulenanreicherung und IP-HPLC-MS/MS auf Naphthalinsulfonate untersucht. Die Proben umfassten Kläranlagenabläufe, Oberflächenwasserproben sowie Proben aus Testbrunnen zur Überwachung der Uferfiltration bzw. Trinkwasserbrunnen des Wasserwerks Tegel. Die Untersuchungen hatten nicht das Ziel einer umfassenden Charakterisierung des Verhaltens von Naphthalinsulfonaten nach der Emission über das Klarwasser von Kläranlagen. Im Vordergrund stand die praktische Erprobung der on-line Vorsäulenanreicherung mit IP-HPLC-MS/MS an Oberflächenwasserproben und die Untersuchungen sollten die Eignung der Methode zur Spurenanalytik von polaren Stoffen in Oberflächenwasser und Grundwasser belegen. Die Erprobung wurde hauptsächlich mit Stichproben durchgeführt. Im Fall der Uferfiltration am Tegeler See standen systematisch gezogene Proben aus einem Zeitraum von sieben Monaten zur Verfügung. Damit konnten die Ergebnisse erste Einblicke in die Dimension der Belastung mit aromatischen Sulfonaten geben.

Die Konzentrationen der sieben Zielanalyte wurden im Ablauf der Kläranlage Ruhleben stichprobenartig erfasst. Weiterhin wurden Tagesgang und Wochenang im Kläranlagenablauf anhand von 2h- bzw. 24h-Mischproben untersucht. Damit waren Rückschlüsse auf übliche Gehalte an Naphthalinsulfonaten im Ablauf dieser größten Berliner Kläranlage möglich. Auch der Klarlauf der Kläranlage Berlin Schönerrinde wurde stichprobenartig untersucht. Im Hinblick auf die Problematik der Uferfiltration am Tegeler See wurden auch von den Vorflutern dieser Kläranlage (Nordgraben und Tegeler Fließ), dem Zu- und Ablauf der Phosphatelimierungsanlage/Oberflächenwasseraufbereitungsanlage (PEA/OWA) und der

Oberhavel Stichproben genommen. Zuläufe kommunaler Kläranlagen wurden nicht untersucht.

Im Rahmen des Kooperationsprojekts „Ermittlung von Uferfiltratanteilen im Stadtgebiet Berlin“ unter Leitung der FR Rohstoff- und Umweltgeologie der FU Berlin wurde eine Uferfiltrationsstrecke der Berliner Wasserbetriebe (BWB) am Ostufer des Tegeler Sees beprobt⁴. Im Zuge dieses Projektes wurden am Standort des Wasserwerks Tegel der BWB Testbrunnen angelegt. Das Wasserwerk Tegel steht bezüglich der Fördermenge an erster Stelle der Berliner Wasserwerke. Es bezieht sein Rohwasser aus oberflächennahem Grundwasser, das über Uferfiltration aus dem Tegeler See angereichert wird. Die Beprobung der Testbrunnen begann im Januar 1998. Es wurden physiko-chemische Parameter, Algentoxine, Ammonium, AOX (inklusive Differenzierung), DOC, Bor, Gadolinium, EDTA/NTA, Nitrat/Nitrit, Radon, Schwermetalle und verschiedene organische Spurenverunreinigungen erfasst [323].

Da das Wasser des Tegeler Sees stark durch geklärte Kommunalabwässer beeinflusst ist, wird durch die Gewinnung von Trinkwasser über die Uferfiltration der Wasserkreislauf an dieser Stelle geschlossen. Das Abbauverhalten bzw. die Persistenz einzelner Naphthalinsulfonate in diesem Uferfiltrationsgebiet mit indirekter Grundwasseranreicherung ist daher sowohl für die Bewertung des Umweltverhaltens von Naphthalinsulfonaten von Bedeutung als auch für die Beurteilung der Qualität von Uferfiltraten allgemein. Die Ergebnisse können darüber hinaus helfen, die Eignung von Naphthalinsulfonaten als Tracer für Kommunalabwasser bzw. eine anthropogene Beeinflussung von Grundwasser zu beurteilen. Die Erfassung von Naphthalinsulfonaten in diesen Uferfiltraten sowie im Tegeler See wird im Folgenden dargestellt.

4.2.1 Untersuchungsgebiet Tegeler See

Der Tegeler See ist mit einer Oberfläche von ca. 4 km² einer der größten Seen Berlins. Neben seinem Nutzen als Naherholungsgebiet kommt dem See eine überragende Bedeutung für die Trinkwasserversorgung Berlins zu, da das Wasserwerk Tegel durch Uferfiltration in Brunnengalerien am Seeufer sein Rohwasser gewinnt. Das Wasserwerk hat eine Maximalkapazität von 370000 m³/d und versorgt ca. 700000 Einwohner [324], 1998 lag die Fördermenge bei 137800 m³/d. Zuflüsse zum Tegeler See sind im Norden der Nordgraben und das Tegeler Fließ sowie im Westen die Oberhavel, der Abfluss ist im Süden die Havel (s. Abb. 4.2).

Der Nordgraben dient als Vorfluter der kommunalen Kläranlage Berlin Schönlinde, die mit einem Abwasseraufkommen von 85000 m³/d bis 187000 m³/d (bei Regen) eine der größten Kläranlagen Berlins ist [326]; er ist dementsprechend stark durch dieses Abwasser beeinflusst. Auch das Tegeler Fließ ist von dieser

⁴Dieses Kooperationsprojekt wurde finanziell von der Senatsverwaltung für Stadtentwicklung, Umweltschutz und Technologie Berlin gefördert [323].

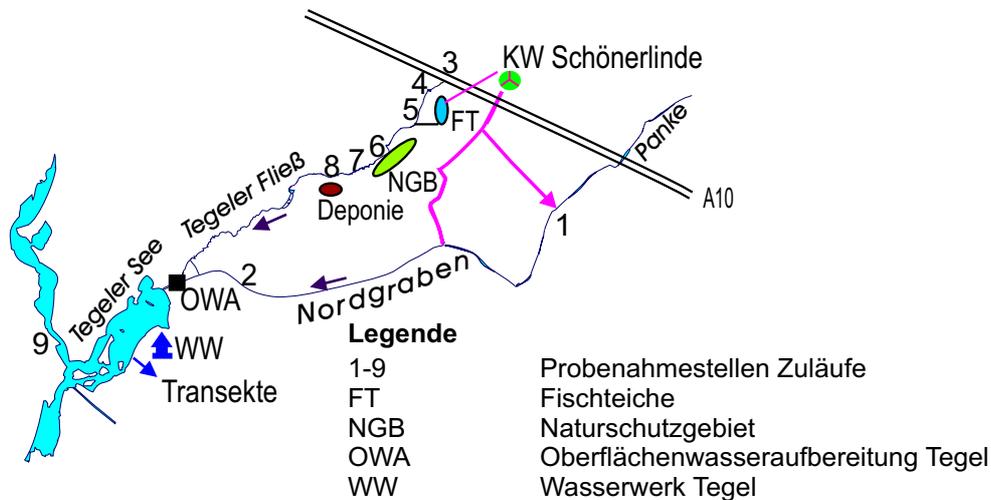


Abbildung 4.2 Untersuchungsgebiet Tegeler See mit Probenahmestellen, nach [325]. Die Zuordnung der Nummern zu den Probenahmestellen findet sich in Anhang B.6. (Tab. B.19, S. 159).

Kläranlage beeinflusst⁵. Die Eutrophierung des Sees machte Ende der 70er Jahre Sanierungsmaßnahmen nötig, die in vorübergehend installierten Tiefenbelüftern und ab 1985 im Betrieb einer Phosphateliminierungsanlage (PEA, heute Oberflächenwasseraufbereitungsanlage, OWA) bestanden. Durch den Betrieb der OWA wurde der Gesamtphosphorgehalt des gemeinsamen Zulaufs aus Nordgraben und Tegeler Fließ auf 0.02 mg/L gesenkt [327]. Die Gesamtmenge des in der OWA aufbereiteten Wassers betrug 1995 97 Mio. m³/a, 1996 85 Mio. m³/a, 1997 46 Mio. m³/a und 1998 48 Mio. m³/a (Daten der BWB, aus [326]). Seit der Einstellung der Wasserförderung aus der Oberhavel durch die OWA im Jahre 1996 ist mit einem erhöhten Klarwasseranteil im nordöstlichen Teil des Wasserkörpers des Tegeler Sees zu rechnen. Der Anteil des über die Havel in den Tegeler See gelangenden Wassers wurde mit 24 - 29% angegeben [327], er variiert jedoch in Abhängigkeit vom Zustrom über die OWA und kann einer neueren Modellrechnung zufolge deutlich höhere Werte annehmen ([326], s. Tab. 4.2). Für die Grundwasserbrunnen B12-B14 der Galerie West der BWB ergab sich dort ein Abwasseranteil von 14 - 28%.

Die Messstellen am Wasserwerk Tegel liegen an einer senkrecht zur Brunnergalerie West angeordneten Transsekte. Abbildung 4.3 zeigt einen Schnitt durch diese Transsekte (nach [325]), während Abbildung 4.4 eine Aufsicht des Transsektengebietes mit den ungefähren hydrogeologischen Bedingungen darstellt (nach [323]).

⁵Ein Teil des Ablaufs der Kläranlage gelangt in am Tegeler Fließ gelegene Fischzuchtteiche, die dann in das Tegeler Fließ entwässern.

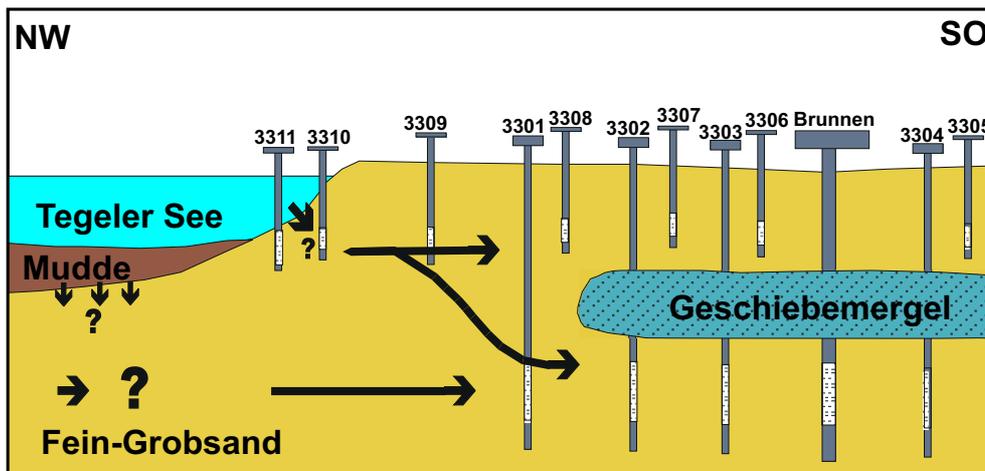


Abbildung 4.3 Schnitt entlang der Transsekte am Tegeler See mit Strömungsverhältnissen, nach [325].

Die Messbrunnen umfassten sowohl flache Testbrunnen im Bereich des nur teilweise gesättigten ersten Grundwasserleiters, als auch tiefe im Bereich des gesättigten zweiten Grundwasserleiters. Die flachen Messbrunnen 3305 – 3309 lagen zwischen 5 und 8 m tief, die seenahen Messbrunnen 3310 und 3311 hingegen in 2 - 4 m Tiefe. Das Milieu konnte hier starken Schwankungen unterliegen, was sich in O_2 -Konzentrationen von 0 bis 10 mg/L widerspiegelte. Bei starker Grundwasserförderung durch die BWB konnten diese Messstellen zudem trocken fallen. Die tiefen Messbrunnen 3301 – 3304 lagen in einer Tiefe von 20 - 23 m. Die O_2 -Konzentration lag hier zwischen 0 - 0.5 mg/L. Die Messbrunnen 3304 und 3305 lagen landseitig der Brunnengalerie West und dienten der Überwachung des nicht vom Uferfiltrat beeinflussten Hintergrundes im tiefen und flachen Grundwasserleiter. Die Grundwasserförderung erfolgt aus dem tieferen zweiten Grundwasserleiter, der vom ersten Grundwasserleiter größtenteils durch eine Geschiebemergel-Schicht getrennt ist. Die Beprobung erfolgte hier in den Rohwasserbrunnen B12 – B14.

Tabelle 4.2 Anteile von Abwasser und anderen Quellen am Wasserkörper des Tegeler Sees und seiner nördlichen Zuflüsse (nach [326]).

	Abwasser [%]	andere [%]
Nordgraben	65–88	
OWA	33–67	
Tegeler See	17–35	OWA-Wasser: 50 (Sommer > Winter)
B12–B14 Galerie West	14–28	See-Wasser: 65–83 [323]

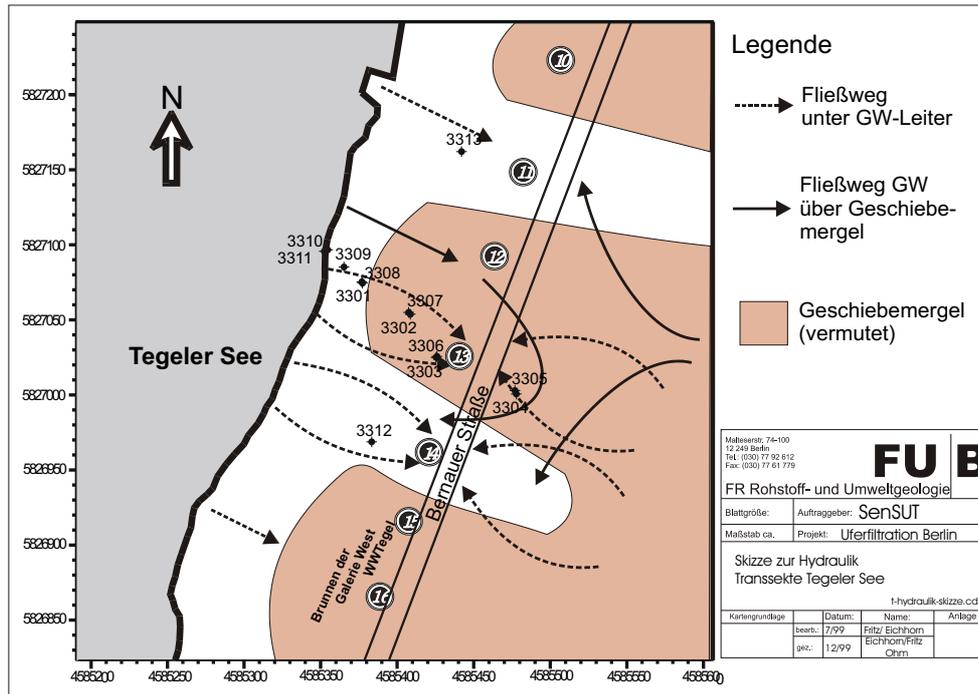


Abbildung 4.4 Transsektengebiet Tegeler See in Aufsicht. Die hydraulischen Verhältnisse wurden durch die FR Rohstoff- und Umweltgeologie (FU Berlin) ermittelt [323].

Die hydrogeologischen Gegebenheiten des Transsektengebietes sind komplex. Im Bereich der Brunnen B11 und B14 befinden sich Geschiebemergelfenster, durch die oberflächennahes Uferfiltrat in die Rohwasserbrunnen gelangen kann (s. Abb. 4.4). Oberhalb der Geschiebemergel-Schicht kann oberflächennahes Uferfiltrat die Brunnen umströmen und teilweise über Poren in den zweiten, tiefer liegenden Grundwasserleiter eindringen und damit die Brunnen erreichen. Aufgrund der zusätzlichen Abhängigkeit dieser Strömungsverhältnisse von der Fördermenge der BWB war insgesamt von sehr stark variablen Strömungsverhältnissen auszugehen.

Die Messbrunnen, die Rohwasserbrunnen B12 – B14 sowie der Tegeler See wurden von Januar bis Juni 1999 monatlich beprobt. In diesem Zeitraum führten nicht alle Messstellen zu allen Probenahme-Zeitpunkten Wasser. Einzelne Proben liegen auch vom Juli 1999 vor. Es standen so pro Messstelle ca. 4 – 6 Messwerte zur Verfügung. Darüberhinaus standen eine Reihe von Proben aus dem Bereich der Zuläufe des Tegeler Sees zur Verfügung. Es wurden Stichproben an der Kläranlage Berlin Schönerlinde, am Nordgraben und am Tegeler Fließ sowie Tagesmischproben von Zu- und Ablauf der OWA genommen.

4.2.2 Naphthalinsulfonate: Ablaufwerte von Kläranlagen sowie Vorkommen und Verhalten in Oberflächenwässern

Sowohl Naphthalinsulfonate als auch Naphthalindisulfonate wurden in sämtlichen untersuchten Oberflächenwasser-Proben aus dem Berliner Raum detektiert. Der dabei beobachtete Konzentrationsbereich reichte vom unteren ng/L-Bereich in einigen Oberflächenwässern bzw. Uferfiltratproben bis hinauf in den unteren $\mu\text{g/L}$ -Bereich in Proben des Ablaufs der beiden Berliner Kläranlagen Schönerlinde und Ruhleben. Im Folgenden wird zunächst die Belastungssituation der Kläranlage Ruhleben beschrieben. Dem schließt sich eine Darstellung der Ergebnisse von Stichproben der Kläranlage Schönerlinde, ihrer Vorfluter und des Zu- und Ablaufs der OWA an. Danach folgt eine ausführliche Darstellung des Bereichs der Uferfiltration am Tegeler See. Dabei wird das Verhalten von Naphthalinsulfonaten im partiell geschlossenen Wasserkreislauf von der Kläranlage Berlin Schönerlinde über die Zuflüsse des Tegeler Sees (Nordgraben und Tegeler Fließ) bis hin zu den Test- und Trinkwasserbrunnen an der Transekte des Wasserwerks Tegel verfolgt.

Ablaufwerte der Kläranlage Berlin Ruhleben

Eine Aufstellung aller Messwerte von Naphthalinsulfonaten im Ablauf der Kläranlage Berlin Ruhleben findet sich in Tabelle B.20 (s. Anh. B.6, S. 160 ff.). Bei Stichproben wurden für 2,6-NSA Werte zwischen 483 und 1439 ng/L, für 1,5-NSA zwischen 274 und 2857 ng/L, für 2,7-NSA zwischen 204 und 1148 ng/L, im Fall von 1,6-NSA zwischen 227 und 852 ng/L und für 1,7-NSA zwischen 324 und 1257 ng/L gemessen. Für 1-NSA und 2-NSA wurden niedrigere Werte im Bereich zwischen 0 und 138 ng/L bzw. 0 und 264 ng/L bestimmt.

Um einen möglichen Tagesgang zu erkennen wurden am Donnerstag, d. 8.7.99 über 24h in 2h-Intervallen Ablaufproben gezogen. Die Konzentrationen der Naphthalindisulfonate lagen im mittleren bis oberen ng/L-Bereich. Obwohl in den Morgenstunden (zwischen 0 – 8 Uhr) etwas höhere Konzentrationen auftraten, konnte man nicht von einem ausgeprägten Tagesgang im betrachteten Zeitraum sprechen. Die Konzentrationen der Naphthalinsulfonate 1-NSA und 2-NSA lagen durchweg im unteren ng/L-Bereich und folgten ebenfalls keinem erkennbaren Trend. Als Ursachen für dieses Verhalten wäre neben einer kontinuierlichen, nicht an die Tageszeit gebundenen Emission z.B. auch eine Nivellierung der Konzentrationen durch unterschiedliche Rohrverweilzeiten denkbar. Die Datenlage lässt hier keine Aussage zu.

Zur Identifizierung von wöchentlich auftretenden systematischen Trends im Ablauf der Kläranlage Berlin Ruhleben wurden zwischen dem 26.6.99 und dem

12.7.99 täglich 24h Mischproben gezogen⁶. Die Konzentrationen der Naphthalindisulfonate lagen hierbei ebenfalls im mittleren bis oberen ng/L-Bereich, mit der Ausnahme des 2.7.99, an dem Konzentrationen von 1045 – 1740 ng/L auftraten. Ein deutlicher wöchentlicher Trend war nicht zu beobachten. Bemerkenswert waren die sehr starken Schwankungen der Konzentrationen von 1-NSA und 2-NSA, die innerhalb 24h von Konzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze bis 1371 ng/L steigen konnten. Die Interpretation ist ohne Zulaufwerte schwierig, man kann es hier mit sehr stark schwankenden Einträgen oder aber mit einer sehr variablen Eliminierungsleistung der Kläranlage zu tun haben. Einzelne, zu anderen Probenahmedaten genommene, Stichproben bestätigten, dass die im Rahmen der Untersuchung des Tages- und Wochenganges beobachteten Konzentrationen typische Gehalte an Naphthalinsulfonaten im Klarwasser der Kläranlage Ruhleben sind. Naphthalinmono- und -disulfonate sind somit wichtige Spurenverunreinigungen. Die oben geschilderten Ergebnisse belegen einen kontinuierlichen Eintrag von Naphthalinsulfonaten in die aquatische Umwelt über Kläranlagen-Abläufe. Dieser Eintrag ist einer der Gründe für das ubiquitäre Auftreten dieser Verbindungen im Berliner Raum.

Stichproben aus dem Einzugsgebiet des Tegeler Sees

Von den wichtigsten Zuläufen des Tegeler Sees wurden Stichproben genommen, um einen Eindruck von der generellen Belastungssituation in diesem Gebiet zu erhalten. Diese Stichproben wurden zum Teil zu weit auseinander liegenden Zeitpunkten genommen, daher sind die erhaltenen Konzentrationswerte nur als orientierende Messungen zu sehen, die die Belastungssituation ungefähr widerspiegeln. Untersucht wurden Stichproben folgender Standorte (s. a. Abb. 4.2, S. 110 u. Tab. B.19, S. 159):

- Klarlauf Kläranlage Schönerlinde (24 Mischproben vom 19. und 20.5.99)
- Nordgraben (Vorfluter Kläranlage Schönerlinde, 13. und 16.6.99)
- Oberhavel (22.6.99 und 12.7.00)
- Tegeler Fließ (6 Standorte, 14.7.99)
- OWA (24 h Mischproben Zu- und Ablauf, 11. und 12.7.00)
- Tegeler See (12.7.00)

Trotz der eingeschränkten Aussagekraft von Stichproben erlaubten die Daten Aussagen über generelle Trends. Naphthalindisulfonate traten im Ablauf der Kläranlage Schönerlinde im mittleren ng/L - bis niedrigen $\mu\text{g/L}$ -Bereich (s.

⁶An einigen der geplanten Zeitpunkte schlug die Probenahme aufgrund von Problemen mit dem automatischen Probennehmer fehl.

Tab. B.20, Anh.B.6, S.160) auf, wohingegen 1-NSA und 2-NSA nur in Konzentrationen im unteren ng/L-Bereich nachgewiesen wurden. Schon bei zwei direkt nacheinander genommenen Stichproben wurden starke Konzentrationsschwankungen im Kläranlagenablauf beobachtet. Es ist folglich von einer hohen Variabilität der Konzentrationen im Kläranlagenablauf auszugehen. Im Nordgraben als Vorfluter der Kläranlage Schönerlinde fanden sich bei Stichproben im Juni 1999 alle auch im Kläranlagenablauf nachgewiesenen Naphthalinsulfonate, dabei lagen die Konzentrationen im allgemeinen niedriger als die Konzentrationen im Kläranlagenablauf vom Mai 1999. Auch von den Stichproben von Zu- und Ablauf der OWA vom 11./12.7.2000 (Tagesmischproben) konnten alle sieben Naphthalinsulfonate des Untersuchungsprogramms nachgewiesen werden. Weiterhin stimmte die am 12.7.2000 gezogene Stichprobe vom Tegeler See sehr gut mit dem See-Mittelwert überein, der im Zuge der Beprobung des Uferfiltrationsgebiets von Januar bis Juli 1999 bestimmt wurde.

In sechs Stichproben aus dem Tegeler Fließ wurden ebenfalls Naphthalinsulfonate nachgewiesen⁷(s. Abb. 4.2, S. 110). Es konnte für alle Naphthalinsulfonate im Verlauf des Tegeler Fließ ein deutlicher Anstieg festgestellt werden. Dies konnte mit der indirekten Einleitung von Abwasser der Kläranlage Schönerlinde in Zusammenhang gebracht werden, deren Klarwasser in am Tegeler Fließ gelegenen Fischzuchtteichen eine Zwischennutzung erfährt [223]. Die dort festgestellten Konzentrationen gehören zu den höchsten bei Stichproben im Berliner Raum festgestellten Werten.

Uferfiltrationsgebiet Berlin Tegel

Im Untersuchungszeitraum von Januar bis Juli 1999 wurden in den einzelnen Messbrunnen keine signifikanten jahreszeitlichen Trends⁸ der Konzentrationen von 2,6-NSA, 1,5-NSA, 2,7-NSA, 1,6-NSA, 1,7-NSA, 1-NSA und 2-NSA beobachtet. Die nachfolgende Diskussion ihres Verhaltens bezieht sich dementsprechend auf die über den Zeitraum Januar bis Juni/Juli 1999 gemittelten Werte. Eine genaue Aufstellung der Messwerte findet sich im Anhang (Tab. B.12 – B.18, Anh. B.6, S. 155 ff.)⁹.

2,6-NSA: Das Verhalten von 2,6-NSA ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Im Untersuchungszeitraum wurden durchschnittlich 84 ± 27 ng/L 2,6-NSA im Tegeler See detektiert. In den flachen, teilweise gesättigten Messstellen war eine Abnahme der Konzentration über 58 ± 28 ng/L im seenahen Messbrunnen 3311

⁷Die Probenahmestellen sind in Abb. 4.2 dargestellt, die an diesen Messpunkten gefundenen Konzentrationen sind in Tab. B.20 (s. Anh.B.6, S. 155) zusammengefasst. Eine der Proben war offensichtlich kontaminiert (Probe 1, Autobahn A10) und wurde vernachlässigt.

⁸Dies deckt sich mit den Beobachtungen bei der Analyse von aromatischen Sulfonamiden in den selben Proben, bei denen ebenfalls kein Jahresgang nachgewiesen werden konnte [223].

⁹Von den Messwerten der insgesamt 92 untersuchten Proben konnten die Messwerte von 18 Proben aufgrund von Kontaminationsproblemen bzw. Problemen mit der Chromatographie nicht verwendet werden.

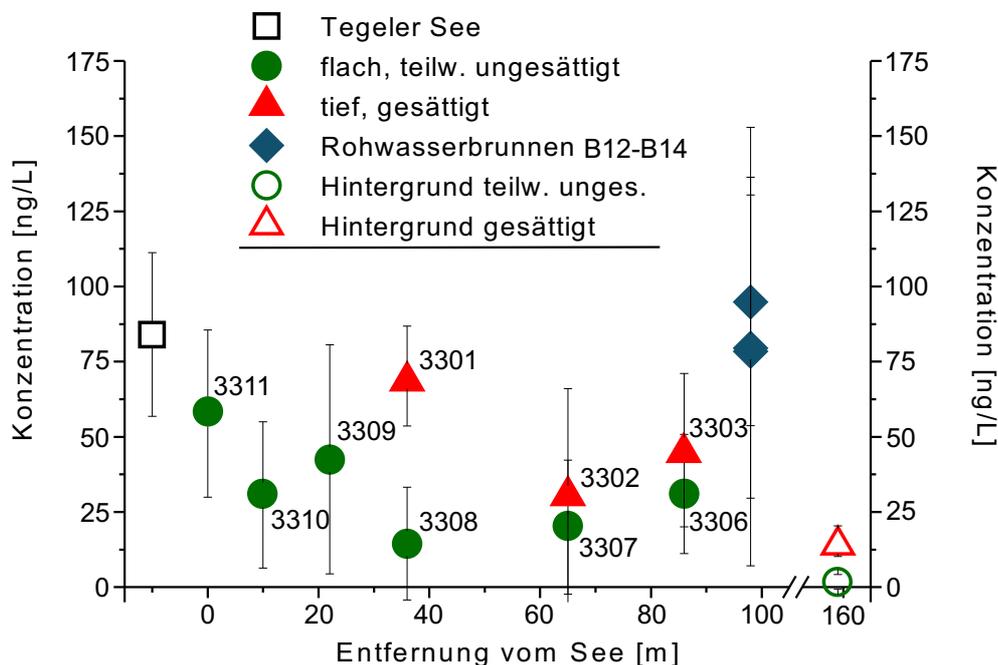


Abbildung 4.5 Verhalten von 2,6-NSA bei der Uferfiltration WW-Tegel. (Messwerte s. Tab. B.12, Anh. B.6, S. 155)

auf 15 – 31 ng/L in den Messbrunnen 3309 – 3306 zu verzeichnen. Im Fall der tieferen Messstellen im gesättigten Bereich zeigte der Brunnen 3301 nur eine geringfügig niedrigere Konzentrationen als der See, wohingegen die weiter vom Seeufer entfernt gelegenen Messstellen (3302 und 3303) eine deutlichere Konzentrationsabnahme gegenüber den Werten im See aufwiesen. Bei den Messwerten dieser Messbrunnen fiel jedoch eine starke Streuung (Standardabweichungen von 60% bis 115%) auf. Die Werte in den Trinkwasserbrunnen B12 – B14 wiesen ebenfalls vergleichsweise große Schwankungen auf (Standardabweichungen von $\pm 50\%$ bis 90%). Die mittlere Konzentration von 2,6-NSA in den Trinkwasserbrunnen lag mit 95, 80 und 68 ng/L im Bereich der Konzentration im See. Die in den Pegeln 3304 und 3305 bestimmten Hintergrundwerte lagen bei 34 ng/L im tiefen Messbrunnen (Standardabweichung $< 100\%$) des gesättigten Milieus sowie bei 8 ng/L im flachen Messbrunnen des teilweise gesättigten Milieus. Letzterer Wert lag nur wenig über der Nachweisgrenze. Die Ergebnisse zeigten eine Eliminierung von 2,6-NSA im Bereich der teilweise gesättigten flachen Testbrunnen an. Dieser Abbau im ersten Grundwasserleiter führte jedoch nicht zu einer merklichen Verringerung der Konzentration in den Trinkwasserbrunnen. Da diese Beobachtung auch bei weiteren Positionsisomeren des Naphthalindisulfonats gemacht wurden, wird sie in der zusammenfassenden Bewertung der Beobachtungen am Ende dieses Kapitels diskutiert (s. S. 122). In den tiefen Testbrunnen konnte keine Eliminierung nachgewiesen werden.

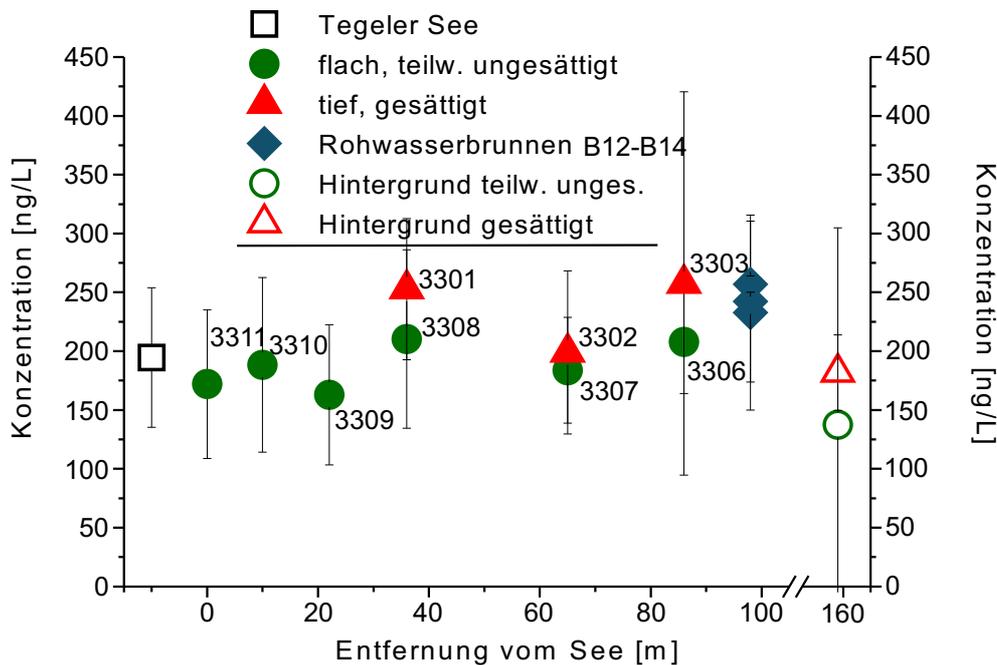


Abbildung 4.6 Verhalten von 1,5-NSA bei der Uferfiltration WW-Tegel. (Messwerte s. Tab. B.13, Anh. B.6, S. 156)

1,5-NSA: Im Fall von 1,5-NSA wurden 195 ± 60 ng/L im Tegeler See detektiert, einen Eindruck vom weiteren Verhalten dieser Verbindung bei der Uferfiltration im Gebiet Tegeler See gibt Abbildung 4.6. Die Konzentrationen in den tiefen wie in den flachen Messbrunnen blieben im Verlauf der Uferfiltration annähernd konstant. Die 1,5-NSA-Konzentrationen in den Trinkwasserbrunnen B12 - B14 unterschieden sich mit 233 – 257 ng/L nicht von den Konzentrationen im See, wobei die Standardabweichungen bei durchschnittlich ± 52 ng/L lagen. Sowohl im tiefen (Messbrunnen 3304) wie auch im flachen (Messbrunnen 3305) Hintergrund wurden etwas geringere Konzentrationen von 138 ng/L bzw. 182 ng/L beobachtet. Auffällig waren jedoch die starken Schwankungen von ± 167 ng/L (ca. ± 120 %) im flachen Messbrunnen 3305. Insgesamt konnten bei 1,5-NSA weder in den flachen, teilweise gesättigten Testbrunnen noch in den tiefen, gesättigten Testbrunnen des zweiten Grundwasserleiters Anhaltspunkte für eine Eliminierung bei der Uferfiltration gefunden werden. Die Ergebnisse legten also nahe, dass 1,5-NSA unter den Bedingungen der Uferfiltration im Untersuchungsgebiet stabil war und weder biologische noch physiko-chemische Eliminationsmechanismen wirksam waren.

2,7-NSA: Die Konzentrationen von 2,7-NSA im Tegeler See lagen im Untersuchungszeitraum bei durchschnittlich 225 ± 97 ng/L. In den flachen Testbrunnen wurde eine deutliche Abnahme der durchschnittlichen Konzentration von 2,7-NSA über 95 ng/L im seenahen Testbrunnen 3311 auf durchschnittlich 14 ng/L festgestellt (s. Abb. 4.7). Auch in den tiefen Testbrunnen wurde eine

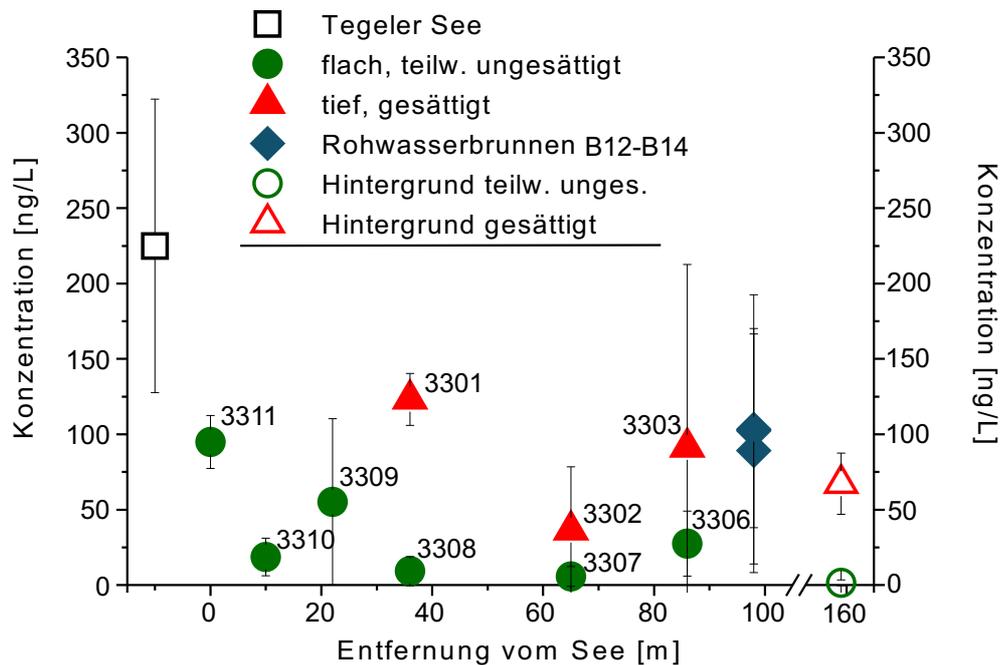


Abbildung 4.7 Verhalten von 2,7-NSA bei der Uferfiltration WW-Tegel. (Messwerte s. Tab. B.14, Anh. B.6, S. 157)

Abnahme der Konzentration von 2,7-NSA im Vergleich zur Konzentration im See beobachtet. Diese blieb jedoch mit einer durchschnittlichen Konzentration von 83 ng/L im Bereich der für den ersten seenahen Messbrunnen 3311 des ungesättigten ersten Grundwasserleiters gemessenen Konzentration von 95 ± 18 ng/L. Die Konzentrationen schwankten zudem im galerienahen Messbrunnen mit einer Standardabweichung um 130% sehr stark. Die Konzentrationen im flachen Hintergrund (Messbrunnen 3305) lagen im Bereich der Nachweisgrenze. Im tiefen, gesättigten Hintergrund (Messbrunnen 3304) wurden stärker variable Konzentrationen von 67 ± 20 ng/L gemessen. Die Trinkwasserbrunnen B12 – B14 waren mit durchschnittlich 98 ng/L 2,7-NSA belastet. Die Konzentrationen lagen also signifikant unter den Konzentrationen im Tegeler See. Die hier festgestellten Konzentrationsverläufe von 2,7-NSA wurden als deutliches Anzeichen für eine Eliminierung dieser Verbindung im Zuge der Uferfiltration im Wasserwerk Tegel gewertet. Die stärkste Konzentrationsabnahme findet dabei in den ersten Metern der Uferfiltration zwischen dem See und dem seenahen Testbrunnen 3311 statt. Die Konzentrationswerte in den flachen Testbrunnen belegen, dass im nur teilweise gesättigten Milieu eine fast vollständige Eliminierung stattfindet. In den tieferen Messbrunnen 3301 bis 3303 konnte eine Eliminierung nicht nachgewiesen werden. Aufgrund dieses Verhaltens war der biologische Abbau durch aerobe Mikroorganismen der wahrscheinliche Eliminationsmechanismus von 2,7-NSA bei der Uferfiltration. Der Ursache der relativ hohen Konzentrationen im

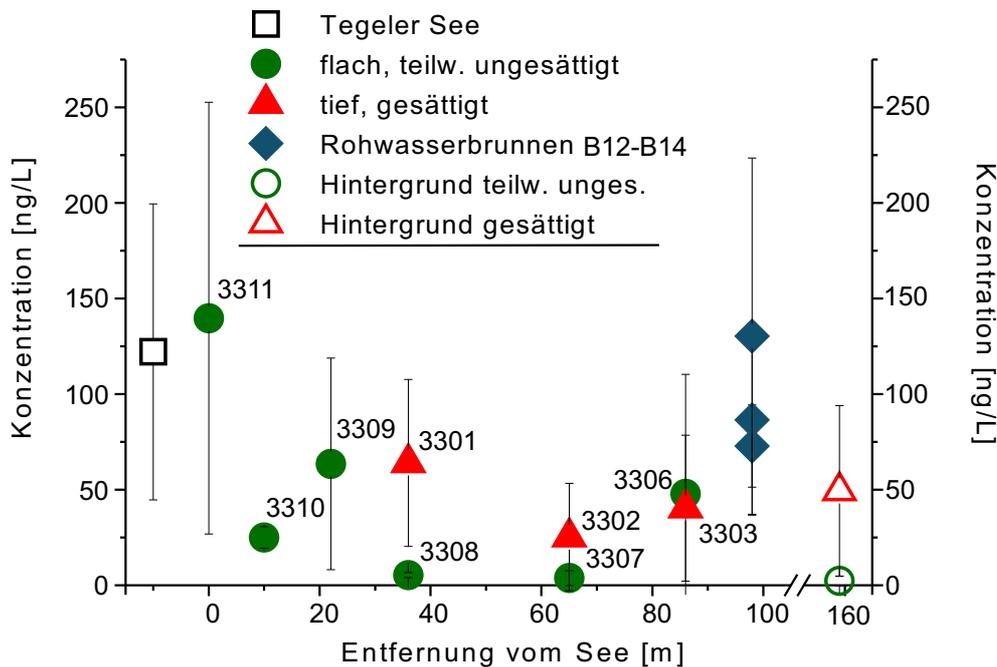


Abbildung 4.8 Verhalten von 1,6-NSA bei der Uferfiltration WW-Tegel. (Messwerte s. Tab. B.15, Anh. B.6, S. 157)

tiefen gesättigten Hintergrund (Testbrunnen 3304) konnte im Rahmen dieser Untersuchungen nicht nachgegangen werden.

1,6-NSA: Das Verhalten von 1,6-NSA im Uferfiltrationsgebiet Tegeler See ist in [Abbildung 4.8](#) dargestellt. Die See-Konzentrationen von 1,6-NSA lagen im mittleren ng/L-Bereich bei 112 ± 77 ng/L. Die Konzentration von 1,6-NSA verringerte sich im seenahen Messbrunnen 3311 nicht (140 ± 113 ng/L), ging dann aber in den weiteren flachen Messbrunnen auf Werte zwischen 55 ng/L und 2 ng/L (Bereich der Nachweisgrenze) zurück. Im seenahen tiefen Testbrunnen 3301 fanden sich mit 64 ± 44 ng/L geringfügig niedrigere Werte als im Tegeler See, die in den brunnennäheren tiefen Messbrunnen 3302 und 3303 auf Werte von 25 ± 28 ng/L und 40 ± 38 ng/L weiter abnahmen. Die Konzentrationen in den Trinkwasserbrunnen B12 – B14 unterschieden sich nicht signifikant von den Konzentrationen im See und lagen bei durchschnittlich 96 ng/L. Der flache Hintergrund in Testbrunnen 3305 war nahezu unbelastet (2 ± 3 ng/L), der tiefe Hintergrund im Messbrunnen 3304 wies eine Konzentration von 49 ng/L auf. Im Bereich der flachen Messbrunnen fand offensichtlich eine Eliminierung von 1,6-NSA statt. Ebenso wie bei 2,6-NSA und 2,7-NSA war auch hier aufgrund der höheren Werte im Bereich des zweiten tieferen Grundwasserleiters von einem aeroben biologischen Abbau auszugehen. Für eine anaerobe Abbaubarkeit im Bereich des gesättigten zweiten Grundwasserleiters fanden sich auch hier keine eindeutigen Hinweise. Deutliche Parallelen zu 2,6- und 1,7-NSA fanden sich bei den Messbrunnen im flachen bzw. tiefen Hintergrund. Während ersterer nahezu

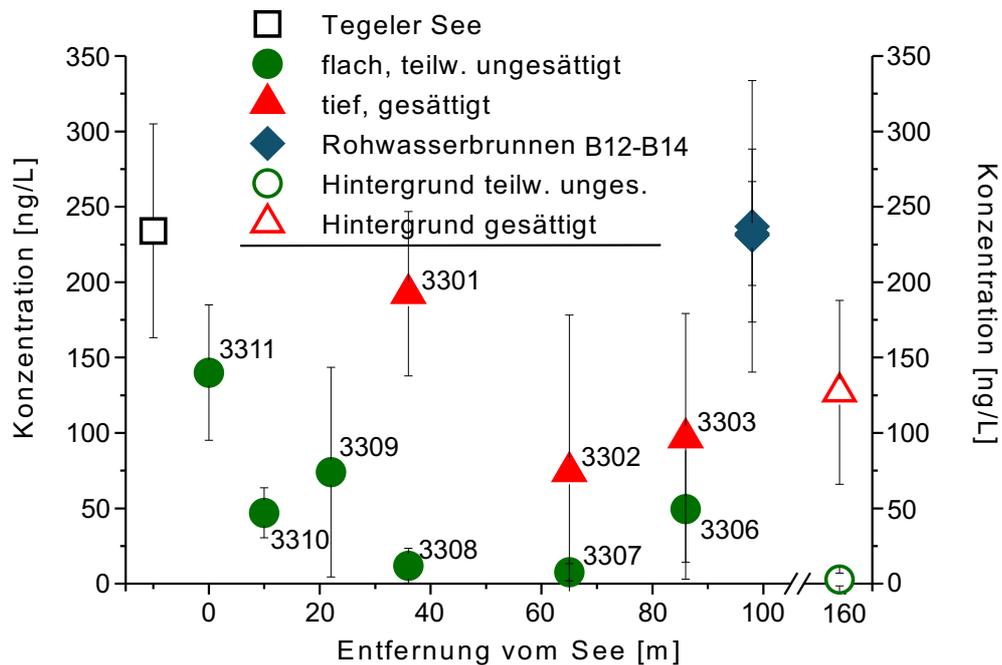


Abbildung 4.9 Verhalten von 1,7-NSA bei der Uferfiltration WW-Tegel. (Messwerte s. Tab. B.16, Anh. B.6, S. 158)

unbelastet war, fanden sich im gesättigten Messbrunnen erhöhte Werte für 1,6-NSA (s.u.).

1,7-NSA: Für 1,7-NSA wurde im Untersuchungszeitraum eine mittlere Konzentration von 234 ± 71 ng/L im Tegeler See festgestellt (Abb. 4.9). Im seenahen Testbrunnen 3311 wurde mit 140 ± 45 ng/L eine deutliche Konzentrationsabnahme beobachtet, die sich in den flachen, teilweise gesättigten Testbrunnen des ersten Grundwasserleiters fortsetzte. In den Messbrunnen 3308 und 3307 wurden nur noch Konzentrationen nahe der Nachweisgrenze (8 – 12 ng/L) gemessen. Im Gegensatz zum Verhalten von 1,7-NSA in den flachen Pegeln wurde im seenahen gesättigten Pegel 3301 nur eine sehr geringe Konzentrationsabnahme verzeichnet, die sich auf der Uferfiltrationsstrecke in den Brunnen 3302 und 3303 fortsetzte. Hier waren jedoch ebenso wie schon bei den anderen Positionsisomeren des Naphthalindisulfonates größere Konzentrationsschwankungen auffällig, die sich in großen Standardabweichungen niederschlugen. Die Konzentrationen in den Trinkwasserbrunnen lagen mit 231 – 237 ng/L im Bereich der auch für den Tegeler See festgestellten Konzentrationen. Ebenso wie für die meisten anderen Naphthalindisulfonate lagen die Hintergrundwerte im flachen Messbrunnen (3305) im Bereich der Nachweisgrenze und waren im tiefen Messbrunnen (3304) mit 127 ng/L leicht erhöht. Auch hier sprechen die Messwerte in den flachen Messbrunnen für einen aeroben Abbau von 1,7-NSA im ersten Grundwasserleiter, wobei sich ein Großteil des Abbaus im ufernahen Bereich zwischen dem See

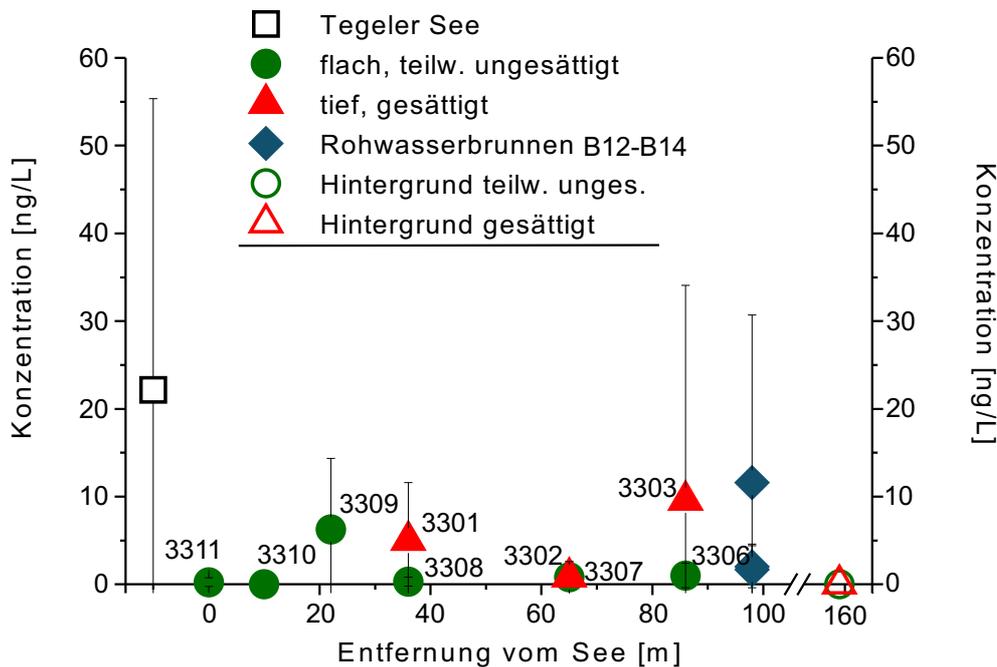


Abbildung 4.10 Verhalten von 1-NSA bei der Uferfiltration WW-Tegel. (Messwerte s. Tab. B.17, Anh. B.6, S. 158)

und den Messbrunnen 3311 und 3310 abspielte. Ein anaerober Abbau im Bereich des zweiten Grundwasserleiters war demgegenüber nicht nachweisbar.

1-NSA und 2-NSA: Das Verhalten von 1-NSA und 2-NSA bei der Uferfiltration ist in den Abbildungen 4.10 und 4.11 wiedergegeben. Die Konzentrationen dieser Verbindungen lagen bei 22 ± 33 ng/L bzw. 114 ± 194 ng/L, sie wiesen also im Gegensatz zu denen der Naphthalindisulfonate sehr starke relative Schwankungen mit Standardabweichungen von $\pm 150\%$ bzw. $\pm 179\%$ auf.

Die Konzentrationen von 1-NSA lagen im weiteren Verlauf sowohl in den meisten flachen als auch tiefen Messbrunnen unterhalb oder im Bereich der Nachweisgrenze (ca. 1-3 ng/L). In den Rohwasserbrunnen B12 – B14 wurde eine durchschnittliche Konzentration von 6 ng/L festgestellt, die statistische Signifikanz dieses Unterschieds zur Konzentration im See ist angesichts der in der Nähe der Nachweisgrenze zu erwartenden größeren Fehler jedoch nicht gegeben. 1-NSA konnte weder im flachen noch im tiefen Hintergrund nachgewiesen werden.

Auch die Konzentrationen von 2-NSA nahmen im ersten, teilweise gesättigten Grundwasserleiter von 43 ± 73 ng/L im ufernahen Messbrunnen 3311 auf Werte im Bereich der Nachweisgrenze ab. Im Bereich der tiefen Messbrunnen im gesättigten Bereich wurden etwas niedrigere Konzentrationen als im See gefunden, die jedoch wie im See stark schwankten. Die Mittelwerte der Konzentrationen in den Rohwasserbrunnen B12 – B14 betragen 74, 119 und 3 ng/L, diese an sich schon stark divergenten Werte wiesen zudem große Standardabweichungen von bis zu 200% auf. Interessant war der auf 52 ± 72 ng/L erhöhte Wert des Pe-

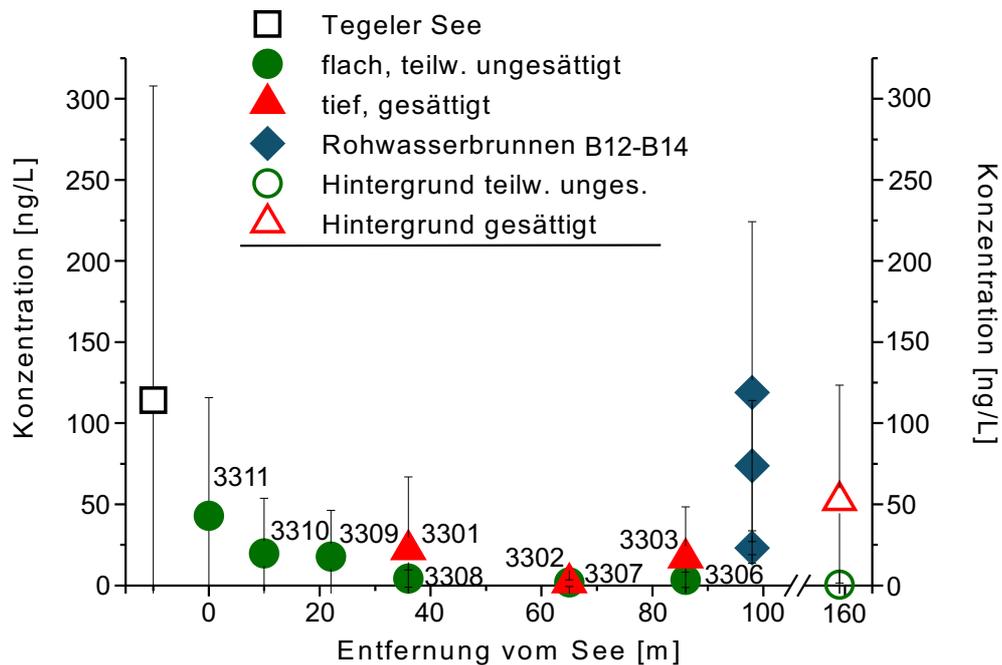


Abbildung 4.11 Verhalten von 2-NSA bei der Uferfiltration WW-Tegel. (Messwerte s. Tab. B.18, Anh. B.6, S. 159)

gels 3304 im tiefen Hintergrund, während der flache Hintergrund offensichtlich unbelastet war. Bei 1-NSA wurden in den Testbrunnen niedrigere Konzentrationen als im See gefunden. Sie lagen in der Nähe der Nachweisgrenze und folgten keinem Trend. Auch im Fall von 2-NSA konnte von einem Hinweis auf einen aeroben Abbau der Verbindung im Bereich des ersten Grundwasserleiters gesprochen werden. Die starke Variabilität der Konzentrationen im See erschwert jedoch die Interpretation insbesondere der im Bereich des tieferen zweiten Grundwasserleiters beobachteten Trends. Die etwas geringeren Werte in den Messbrunnen insgesamt können neben einem anaeroben Abbau eben auch die größere Variabilität der See-Konzentrationen widerspiegeln. Die Hintergrundwerte für 2-NSA betragen 53 ± 72 ng/L im tiefen gesättigten Hintergrund (3304) und lagen im flachen Hintergrund (3305) im Bereich der Nachweisgrenze.

Bewertung der Beobachtungen

Die Untersuchung des Verhaltens der Naphthalinsulfonate 2,6-NSA, 1,5-NSA, 2,7-NSA, 1,6-NSA, 1,7-NSA, 1-NSA und 2-NSA ergab für alle Substanzen bis auf 1,5-NSA Hinweise auf eine Eliminierung im Bereich des flachen ersten Grundwasserleiters. Berücksichtigt man die sehr geringe Sorptionsneigung von aromatischen Sulfonaten [12,13,14,15,16], so ist ein aerober biologischer Abbau dieser Naphthalinsulfonate die wahrscheinliche Ursache ihrer Eliminierung bei der Uferfiltration. Der Abbau scheint dabei im ufernahen Bereich des ersten Grundwasserleiters am

intensivsten zu sein. Dieses Verhalten kann mit der höheren biologischen Aktivität in den ersten Metern der Untergrundpassage in Zusammenhang gebracht werden. Ein ähnliches Verhalten ist im gleichen Untersuchungsgebiet bei aromatischen Sulfonamiden beobachtet [223] und auch in anderen Untersuchungsgebieten für polare Verunreinigungen in Oberflächenwasser und Grundwasser beschrieben worden [328, 329].

Nur für 1,5-NSA fehlte jeder Hinweis auf eine Eliminierung im teilweise gesättigten und tiefen gesättigten Grundwasserleiter. Die Verbindung ist vielfach als ausgesprochen schwer abbaubar beschrieben worden [39, 57] und es finden sich in der Literatur keine Hinweise auf eine aerobe oder anaerobe Abbaubarkeit. Diese fehlende biologische Abbaubarkeit ist auch sehr wahrscheinlich der Grund dafür, dass 1,5-NSA oft in höheren Konzentrationen als die anderen Positionsisomeren des Naphthalindisulfonats in Oberflächenwasser gefunden wird [53, 69, 76], obwohl 1,5-NSA in den entsprechenden Einsatzstoffen wie z.B. Dispergiemittel aber auch in Kläranlagenabläufen nur in geringeren relativen Konzentrationen auftritt [78]. Die Persistenz dieser Verbindung bei der Uferfiltration sowie der Abbau anderer Positionsisomere des Naphthalindisulfonats ist aus Untersuchungen von Uferfiltrationsstandorten an der Oberelbe [15] und am Rhein [16, 94, 329] bekannt.

Die Konzentrationen von Naphthalindisulfonaten in den Rohwasserbrunnen waren dennoch üblicherweise nicht oder nur geringfügig niedriger als die Konzentrationen im Tegeler See. Dieser Befund war angesichts der Eliminierung, die zumindest im ersten Grundwasserleiter stattfand, zunächst erstaunlich. Aufgrund der komplexen hydrogeologischen Verhältnisse ist jedoch ein Einströmen von Uferfiltrat über entsprechende Geschiebemergelfenster möglich (s. Abb. 4.3, S. 111 und Abb. 4.4, S. 112). Dies hätte zur Folge, dass Seewasser nach einer stark verkürzten Verweilzeit die Rohwasserbrunnen erreichen kann. Das Uferfiltrat wäre dann aufgrund der kürzeren Verweilzeit stärker belastet. Die im allgemeinen sehr starken Schwankungen der Konzentrationen mit Standardabweichungen bis über 100% in den Rohwasserbrunnen bilden möglicherweise diese komplexen Strömungsverhältnisse in Abhängigkeit von der Förderung über die Rohwasserbrunnen ab. Ebenfalls denkbar wäre eine zusätzliche Belastung im Bereich der Rohwasserbrunnen selbst, etwa durch Auswaschung aus dem Schalbeton. Letztendlich steht jedoch eine Klärung dieses Befundes aus; weitere Untersuchungen im Bereich der Uferfiltration des Wasserwerks Tegel sollten diese Befunde berücksichtigen.

Im Bereich des zweiten, gesättigten Grundwasserleiters wurde für alle Verbindungen außer 1,5-NSA ein ähnliches Verhalten festgestellt. Nach einer Konzentrationsabnahme im aeroben Bereich der ersten Meter der Uferfiltrationsstrecke (s. Abb. 4.3, S. 111) blieben die Konzentrationen der Naphthalinsulfonate beim Durchströmen des gesättigten zweiten Grundwasserleiters annähernd konstant. Im Gegensatz dazu wurden bei 1,5-NSA vergleichbare Konzentrationen wie im

See gefunden wurden, da 1,5-NSA auch einem Abbau in den ersten Metern der Uferfiltration nicht zugänglich war.

In den beiden Messbrunnen im Hintergrund der Rohwasserbrunnen wurden für die Naphthalinsulfonate einheitliche Trends beobachtet. Im tiefen, gesättigten Hintergrund (Messbrunnen 3304) wurden im allgemeinen leicht bis deutlich erhöhte Konzentrationen gefunden. Eine Sonderstellung nimmt 1-NSA ein, hier wurden Werte nahe der Nachweisgrenze gefunden. Der flache Hintergrund (Messbrunnen 3305) war im allgemeinen kaum belastet, es fanden sich Konzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze. Eine Ausnahme war hier wiederum 1,5-NSA. Die Konzentrationen lagen für diese Verbindung nur wenig unter den im See gefundenen. Dies ist ein weiterer deutlicher Hinweis darauf, dass 1,5-NSA im teilweise gesättigten ersten Grundwasserleiter im Gegensatz zu den anderen untersuchten Naphthalinsulfonaten nicht eliminiert wurde.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ein Abbau von Naphthalinsulfonaten bevorzugt, wenn nicht ausschließlich, unter aeroben Bedingungen stattfindet. 1,5-NSA ist als einzige der untersuchten Verbindungen als im Rahmen der Uferfiltration prinzipiell nicht entfernbar einzustufen.

5 Zusammenfassende Diskussion

Im Kapitel zur Methodenentwicklung wurden neuartige HPLC-MS-Methoden für die Analytik aromatischer Sulfonate vorgestellt. Die Anwendung dieser Methoden auf Fragestellungen aus dem Bereich der Analytik komplexer Abwässer und der Spurenanalytik in der aquatischen Umwelt war Thema der beiden Kapitel Qualitative Analytik und Quantitative Analytik. Die Bewertung der einzelnen Ergebnisse, auch in Hinblick auf die verfolgten Ziele, soll nun erfolgen. Dazu ist es hilfreich, zwischen den Ergebnissen methodischer Natur aus dem Bereich der Entwicklung von HPLC und MS-Verfahren auf der einen Seite und den Ergebnissen zum Verhalten von aromatischen Sulfonaten auf der anderen Seite zu differenzieren.

5.1 Neuartige HPLC-MS-Methoden

In der Einleitung wurde festgestellt, dass die Entwicklung von leistungsfähigen HPLC-MS-Methoden die Grundvoraussetzung für die Bearbeitung der Fragestellungen aus der qualitativen und quantitativen Analytik aromatischer Sulfonate war. Die Einführung des flüchtigen TrBA als Ionenpaarreagenz hat die Entwicklung von robusten IPC-MS-Methoden ermöglicht und für das Problem der Inkompatibilität von IPC und MS eine praktikable Lösung bereitgestellt. Die Methode bietet in Folge des guten Retentionsverhaltens auch sehr polarer mehrfach sulfonierter Aromaten deutliche Vorteile gegenüber alternativen Methoden mit schwächeren Ionenpaarreagenzien wie z.B. TEA. Sie ist ähnlich leistungsfähig wie die IC-MS mit Hochleistungschromatographiesäulen oder die IPC-MS mit Suppressoren zur Entfernung von nicht-flüchtigen Ionenpaarreagenzien. Die Retention nimmt mit steigender Konzentration an Ionenpaarreagenz zu, während die Empfindlichkeit im MS sinkt. Daher ist bei der IPC-MS stets ein Kompromiss aus optimaler Retention und optimaler Empfindlichkeit zu finden.

Die verschiedenen Positionsisomere des Naphthalindisulfonats weisen sehr ähnliche CID-Fragmentationsmuster auf. Ihre Detektion und Quantifizierung erforderte folglich eine vollständige chromatographische Trennung (Basislinientrennung). Dies stellte einmal mehr die Notwendigkeit der Verwendung von äußerst leistungsfähigen HPLC-Trennungen in der HPLC-MS unter Beweis.

Für die Spurenanalytik von Naphthalinsulfonaten in Oberflächenwasser und Uferfiltraten sind Anreicherungsschritte notwendig. Es wurde ein on-line Extraktionsverfahren entwickelt, um die Vorteile eines geringen Probenbedarfs zu nutzen und die Anzahl und Dauer der manuellen Arbeitsschritte bei der Analyse zu reduzieren. Auch hier hat sich TrBA als Ionenpaarreagenz bewährt, wenn auch die Wiederfindungen für amino- und hydroxysubstituierte Naphthalinsulfonate in Oberflächenwasser nicht ausreichend waren. Diese Verbindungen konnten nicht in das Messprogramm integriert werden.

Als grundsätzliche Probleme der HPLC-MS stellen sich die eindeutige Identifizierung und die Quantifizierung dar. Die eindeutige Identifizierung mit HPLC-MS erfordert eine ausreichende chromatographische Auflösung, um die Koelution ähnlich fragmentierender Verbindungen auszuschliessen. Weiterhin müssen mehr als ein Ion oder ein SRM-Übergang detektiert werden, um falsch positive Befunde im MS sicher ausschließen zu können. Der in dieser Arbeit gewählte Ansatz, zwei SRM-Übergänge zu detektieren und das Verhältnis ihrer Peakflächen als zusätzliche Qualitätskriterium zu verwenden, entspricht den rechtlichen Empfehlungen und hat sich bei der Analyse von Naphthalinsulfonaten bewährt.

Ein gravierendes und im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig gelöstes Problem stellen die sogenannten Matrixeffekte dar. Matrixeffekte beeinflussen die quantitativen Ergebnisse der HPLC-MS in nicht vorhersagbarer oder kontrollierbarer Weise. Die einzig sichere Methode zur Vermeidung derartiger Effekte besteht in der Verwendung von koeluiierenden, sich physikalisch-chemisch gleich verhaltenden internen Standards. Dies können ^{13}C -markierte Analoga sein, oder bei der Standardaddition die Analyte selbst. Es wurde nur die Standardaddition eingesetzt. Bei der Untersuchung von Oberflächenwasser und Uferfiltraten konnte zudem aus Zeitgründen nur an Stichproben das Ergebnis von externer Kalibrierung mit einem internen Standard mit den Ergebnissen der Standardaddition verglichen werden. Methodisch bedeutet dies, dass die Ergebnisse der externen Kalibrierung angreifbar bleiben, auch wenn einzelnen Ergebnisse durch Vergleich mit den Ergebnissen der Standardadditionstechnik plausibel gemacht werden konnten.

5.2 Integrierte Strukturaufklärung mit chromatographischen Methoden

Die HPLC-MS kann unmittelbar Informationen über die Struktur einer unbekanntes Verbindung bereitstellen. Dies konnte im Rahmen der Untersuchung des Abbaus von Azo- und Phthalocyanin-Farbstoffen mit Pilzenzymen genutzt werden, um eine Vorstellung über die hierbei entstehenden Metabolite zu gewinnen. Im Fall der Abbauprodukte von Phthalocyaninfarbstoffen konnten anhand dieser Informationen Strukturvorschläge für potentielle Metabolite erarbeitet wer-

den. Nach Synthese dieser potentiellen Metabolite konnte der Strukturbeweis über chromatographische und spektrometrische Methoden erbracht werden. Als Hauptprodukte des Abbaus von Sulfophthalocyaninfarbstoffen mit Pilzenzymen wurden 3- und 4-Sulfophthalimid (3- u. 4-SPI) identifiziert. Diese Substanzen werden von Pilzenzymen nicht weiter angegriffen und sind einer Abwasserbehandlung z.B. mit immobilisierten Weißfäulepilzen nicht zugänglich. Diese Metabolite stellen somit zumindest in Bezug auf die Abwasserbehandlung mit Weißfäulepilzen bzw. Pilzenzymen potentiell refraktäre Stoffe dar¹.

Bei der Untersuchung von Ozonungsprodukten des Naphthalin-1,5-disulfonats wurde ein prinzipiell anderer Weg beschritten. Wegen der Komplexität der Reaktion war eine Synthese potentieller Ozonungsprodukte wenig erfolgversprechend. Daher wurden komplementäre strukturanalytische Methoden wie MS und ¹H-NMR on-line zur IPC angewandt, um anhand der MS-Spektren, der über MS-Spektren zugänglichen Elementarzusammensetzungen und der ¹H-NMR-Spektren Strukturvorschläge zu erarbeiten. Die computergestützte Spektreninterpretation erlaubte es dabei, auf der Grundlage einer limitierten Menge spektraler Informationen den Ozonungsprodukten eindeutige Strukturen zuzuweisen. Die Identifizierung von wichtigen Ozonungsprodukten des Naphthalin-1,5-disulfonats war das Ergebnis dieses Vorgehens.

Die Grenzen der Strukturaufklärung mit HPLC-MS wurden an anderer Stelle offenbar. Stehen nur die über exakte Massenbestimmung zugänglichen Elementarzusammensetzung und MS/MS-Daten zur Verfügung, kann im allgemeinen nur eine Reihe von Strukturvorschlägen erarbeitet werden. Ein eindeutige Strukturzuweisung ist in diesen Fällen nicht möglich. Dies war der Fall bei dem Versuch, einige bei der anaerob/aeroben Behandlung eines Textilabwasser entstehende Metabolite zu identifizieren. Die LC-MS kann Hinweise auf die Struktur von unbekanntem Analyten geben und ist integraler Bestandteil der Strukturaufklärung. Eine vollständige und eindeutige Strukturzuweisung kann jedoch nur durch den gemeinsamen Einsatz komplementärer Techniken wie UV- und NMR-Spektroskopie sowie Massenspektrometrie gelingen. Der damit einhergehende erhöhte Schwierigkeitsgrad spiegelt sich in der vergleichsweise geringen Anzahl von Veröffentlichungen im Bereich der Strukturanalyse von unbekanntem Verbindungen im Bereich der Umweltanalytik wider.

¹Die Frage der aeroben biologischen Abbaubarkeit wurde mittlerweile im Fachgebiet bearbeitet [267, 268]. Hier scheint sich ein deutlicher Unterschied der Abbaubarkeit zwischen den Isomeren 3-SPI (nur Hydrolyse) und 4-SPI (biologischer Abbau) ergeben zu haben.

5.3 Verhalten in Industrieabwasser und bei der Uferfiltration

Naphthalinmono- und disulfonate sind aufgrund ihrer breiten Anwendung sowohl in industriellen und gewerblichen Abwässern als auch in kommunalem Abwasser, Oberflächenwasser sowie in Uferfiltraten identifiziert worden. Informationen über ihr Verhalten bei der biologischen Abwasserbehandlung und der Uferfiltration waren daher wichtig für die Einschätzung der Wirksamkeit der genannten Verfahren und damit für die Beurteilung der Umweltrelevanz dieser Verbindungen insgesamt.

Bei der Behandlung von Textilabwasser in einem Laborreaktor wurde eine nur sehr unzureichende Eliminierung von Naphthalinsulfonaten und besonders Naphthalindisulfonaten beobachtet. Wie schon in der Einleitung bemerkt, spiegelt dies jedoch nicht einen prinzipiell refraktären Charakter der Verbindungen wider, sondern reflektiert eher die sich aus den hohen Salzgehalten ergebenden Limitierungen.

Eine andere Situation lag bei der Behandlung von Gerbereiabwasser in einem Membranbioreaktor vor. Hier wurden die Naphthalinmonosulfonate mit Eliminierungsraten von über 90% entfernt. Auch Naphthalindisulfonate wurden mit zum Teil hohen Raten eliminiert. Allerdings wurde hier ein starker Einfluss des Substitutionsmusters auf die Abbaubarkeit beobachtet. Eine Überlegenheit des Membranbioreaktors beim Abbau von Naphthalinsulfonaten konnte nicht belegt werden, die abbaubaren Positionsisomere des Naphthalinsulfonats hatten sich in zumindest einem Fall auch in konventionellen Kläranlagen als abbaubar erwiesen.

Die IPC-MS mit on-line Vorsäulenanreicherung erlaubte den Nachweis und die quantitative Erfassung von Naphthalinsulfonaten in Kläranlagenabläufen, Oberflächenwasser und Uferfiltraten. In Stichproben des Klarwassers der kommunalen Kläranlagen Ruhleben und Schönerlinde sowie von Oberflächenwasser an zahlreichen Messstellen im Einzugsgebiet des Tegeler Sees im Nordwesten Berlins wurden Naphthalinsulfonate eindeutig nachgewiesen. Die Konzentrationen lagen im mittleren ng/L bis unteren $\mu\text{g/L}$ -Bereich. Die Belastung mit Naphthalinsulfonaten scheint nicht auf Punktquellen zurückführbar zu sein. Damit ist der wahrscheinliche Hintergrund der Belastung eine kontinuierliche Verwendung in unterschiedlichen Prozessen oder Produkten.

Systematische Probenahmen fanden im Uferfiltrationsgebiet des Wasserwerks Tegel über einen Zeitraum von insgesamt sieben Monaten statt. Beprobte wurden Messbrunnen entlang einer Transekte vom Seeufer bis zum Grundwasserhintergrund der Rohwasserbrunnen der Galerie West des WW Tegel. Im teilweise gesättigten Bereich wurde eine zum Teil deutliche Verringerung der Konzentrationen von Naphthalinsulfonaten beobachtet, während sich im anoxischen Bereich des zweiten Grundwasserleiters keine signifikanten Konzentrationsverringerungen gegenüber dem Tegeler See andeuteten. In den Rohwasserbrunnen fanden sich

im allgemeinen nur geringfügig niedrigere Konzentrationen von Naphthalinsulfonaten als im Tegeler See. Als Ursache für dieses Verhalten können die komplexen Strömungsverhältnisse und damit einhergehende stark verkürzte Verweilzeiten vermutet werden. Die Konzentration von Naphthalin-1,5-disulfonat blieb während der Uferfiltration sowohl unter anoxischen als auch teilweise gesättigten (aeroben) Bedingungen stabil. Bei dieser Verbindung ist auch bei einer funktionierenden Uferfiltration mit ausreichender Verweilzeit von einer Wasserwerksrelevanz auszugehen.

5.4 Ausblick

Die Verbindung von HPLC-UV/VIS-, HPLC-MS/MS- und HPLC-NMR-Techniken mit computergestützter Spektreninterpretation zur integrierten Strukturauflösung hat sich bei der Untersuchung von Ozonungsprodukten des Naphthalin-1,5-disulfonats als äußerst leistungsfähig erwiesen. Mit HPLC-UV/VIS und HPLC-MS allein konnten im Gegensatz dazu nur Strukturvorschläge erarbeitet werden. Die HPLC-Kopplung der spektroskopischen Methoden bietet bei der integrierten Strukturauflösung zwei herausragende Vorteile: zum einen können komplexe Substanzgemische direkt untersucht werden, zum anderen ist der Substanzbedarf im Vergleich zu off-line Methoden minimal. Diese Vorteile sollten insbesondere für die in der Abwasser- und Wasseranalytik häufig zu handhabenden komplexen Proben und geringen Substanzmengen Perspektiven eröffnen. Die Methode ist auf viele Problemstellungen aus dem Bereich der Identifizierung von Metaboliten, Abbau- oder Oxidationsprodukten anwendbar. Auch die schwierige und anspruchsvolle Problemstellung der Identifizierung unbekannter Verunreinigungen aus Umweltproben wie z.B. Kläranlagenabläufen oder Oberflächenwasser wird, unter Zuhilfenahme entsprechender Anreicherungsschritte, deutlich erleichtert.

Wie am Beispiel der Oxidationsprodukte des Naphthalin-1,5-disulfonats deutlich wurde, werden neuartige Substanzen identifiziert, die weder hinsichtlich ihres toxikologischen Profils noch bezüglich ihrer biologischen Abbaubarkeit charakterisiert sind. Die Identifizierung unbekannter Verbindungen kann zu neuen Fragestellungen bezüglich der toxikologischen Bewertung und der biologischen Abbaubarkeit dieser Verbindungen führen.

Die Anwendung von flüchtigen Ionenpaarreagenzien war ein wesentlicher Fortschritt für die Analytik von aromatischen Sulfonaten mit HPLC-MS/MS. Der Ansatz wurde mittlerweile in einer Reihe von Veröffentlichungen aufgegriffen. Die Frage der Anwendbarkeit der Methode für weitere in der Wasseranalytik bedeutsame polare bis anionische Verbindungen wie z.B. Komplexbildner ist dabei noch offen und muss im Einzelfall erprobt werden.

Ein grundsätzliches Problem der Anwendung der HPLC-MS/MS in der quantitativen Analytik von Abwässern und Oberflächenwasser ist die Beeinflussung

der Quantifizierung durch Matrixeffekte [330]. Die Besonderheit der Umweltanalytik – es gibt keine „Leermatrix“, d.h. unbelastete Proben mit identischer Matrix – bedingt, dass nur die Standardaddition oder die Verwendung isotope-markierter interner Standards Matrixeffekte sicher ausgleichen können. Beide Methoden sind aufgrund von experimentellen Nachteilen oder wegen der Kosten der Standards nur bedingt anwendbar. Diesen Nachteilen der quantitativen HPLC-MS/MS stehen ihre sehr großen Vorteile bezüglich der Nachweisempfindlichkeit und vor allem der außerordentlich hohen Selektivität gegenüber. Diese Vor- und Nachteile gilt es für die praktische Anwendung der HPLC-MS/MS in der Wasseranalytik gegeneinander abzuwägen [331].

A Material und Methoden

A.1 HPLC-Anlagen

Für diese Arbeit wurden HPLC-Anlagen verschiedener Hersteller genutzt, die je nach Bedarf auch modular in unterschiedlichen Konfigurationen zum Einsatz kamen:

HPLC 1: Die Anlage bestand aus einem Vakuumentgaser, einem Probengeber AS 2000A, einem Säulenofen, einer ternären Niederdruck-Gradientenpumpe L-6200A (Fa. Merck, Darmstadt) und einem Diodenarraydetektor UVD 340S (Fa. GynkoteK, Germering).

HPLC 2: Die Anlage war ein HP 1100-System bestehend aus Vakuumentgaser, binärer Hochdruck-Gradientenpumpe, Probengeber, Thermostat und UV-Detektor mit Mikrozelle (6 μL Zellvolumen) (Hewlett-Packard, Waldbronn).

HPLC 3: Es wurde ein HP 1050-System mit Vakuumentgaser, quaternärer Niederdruck-Gradientenpumpe, Probengeber, Thermostat und Vierwellenlängen UV-Detektor (Hewlett-Packard, Waldbronn) genutzt.

Fluoreszenzdetektion: Zur Fluoreszenzdetektion stand ein Fluoreszenzdetektor RF2000 (GynkoteK, Germering) zur Verfügung. Er wurde sowohl in Verbindung mit HPLC 1 als auch HPLC 2 verwendet.

Präparative HPLC: Für präparative HPLC-Trennungen wurde HPLC 1 mit einem Fraktionsammler L5200 (Merck, Darmstadt) eingesetzt.

HPLC-MS: Für die HPLC-MS stand sowohl am FG Wasserreinheit als auch bei den externen LC-TOFMS-Messungen ein HP 1100-System bestehend aus Vakuumentgaser, binärer Hochdruck-Gradientenpumpe, Probengeber, Thermostat und Diodenarray-Detektor (mit Halbmikrozelle (10 μL Zellvolumen) zur Verfügung (Hewlett-Packard, Waldbronn). Für die on-line-Vorsäulenreicherung wurde diese HPLC durch eine isokratische Pumpe Modell 4 (Knauer, Berlin), einen Pulsationsdämpfer LP 21 (Supelco, Deisenhofen) sowie Hochdruckfiltereinheiten (Upchurch durch GAT, Bremerhaven) ergänzt.

A.2 Massenspektrometer

Quadrupol MS: Es wurde ein Triple-Quadrupole Massenspektrometer (Quattro LC der Fa. Micromass, Manchester, UK) mit Z-Spray-Quelle eingesetzt. Als Desolvatations- und Spraygas wurde Stickstoff verwendet, der mit einem Stickstoffgenerator (Model 75-72, Whatman, Haverhill, USA) aus Labor-Druckluft erzeugt wurde. Für Infusionsexperimente stand eine Spritzenpumpe (Model 11, Harvard, Holliston, USA) zu Verfügung. Als Kollisionsgas diente Argon (5.0 Qualität, Messer-Grießheim, Berlin, Deutschland). Mit diesem Gerät war ein Massenbereich von 2 bis 4000 Da zugänglich, Digitalisierungsraten von 4 bis 128 Bit/Da ermöglichten sowohl schnelle Scans über größere Massenbereiche als auch exakte Massenbestimmungen.

TOFMS: Es stand ein oa-TOF Massenspektrometer (LCT der Fa. Micromass, Manchester, UK) mit Z-Spray-Quelle zur Verfügung. Bei dem Gerät handelte es sich um ein API-Massenspektrometer mit einem orthogonal angeordneten TOF-Massenanalysator mit Reflektron. Als Desolvatations- und Spraygas wurde Stickstoff verwendet, der wie beim Quadrupol MS mit einem Stickstoffgenerator (Model 75-72, Whatman, Haverhill, USA) aus Labor-Druckluft erzeugt wurde. Zur Infusion wurde eine Spritzenpumpe (Model PHD 2000, Harvard, Holliston, USA) genutzt. Der Massenbereich des MS war 2 bis 10000 Da.

A.3 Gelöster organischer Kohlenstoff (DOC)

Der gelöste organische Kohlenstoff wurde mit verschiedenen TOC-Analysatoren gemessen. Es handelte sich um Messgeräte des Typs DIMA-TOC 100 (Fa. Dimatec, Essen), LiquiTOC (Fa. Foss Heraeus, Hanau) oder HighTOC (Fa. Elementar, Hanau)

A.4 Chemischer Sauerstoffbedarf (COD)

Der COD wurde photometrisch mit einem Rundküvettest CSB 160 (Machery-Nagel, Düren), Messbereich 15-160 mg/L O₂ bestimmt.

A.5 HPLC-NMR

HPLC-NMR-Messungen wurden von Dr. M. Godejohann, Fa. Bruker, Karlsruhe, durchgeführt. Es stand ein 500 MHz Bruker Spektrospin NMR-Spektrometer mit HPLC-NMR-Messkopf zur Verfügung. Parallel zur HPLC-NMR-Messung wurden mit einem Bruker Esquire Massenspektrometer LC-MS-Messungen durchgeführt (Negativ ESI, m/z 100-m/z 1000). Chromatographiebedingungen s. HPLC-Trennsystem [11](#), S. [134](#).

A.6 HPLC-Trennsysteme

1. Hypersil ODS, 5 μm , 250 x 4 mm (Hewlett-Packard, Waldbronn), Fluss: 1 mL/min, Thermostat: 20 ° C, Eluent A: Wasser, 5 mmol TBABr, Eluent B: 30/70 Wasser/ACN, 5 mmol TBABr, binärer Gradient: von 30% B zu 100% B in 55 min, 10 min bei 100% B, zu 30% B in 10 min, Gesamtlaufzeit 75 min (s. S. 32, 33).
2. Luna Phenyl-Hexyl, 3 μm , 150 x 2 mm (Phenomenex, Aschaffenburg), Fluss: 0.2 mL/min, Thermostat: 40 ° C, Eluent A: 70/30 Wasser/MeOH, 1 mmol TrBA, 1 mmol HOAc, Eluent B: 30/70 Wasser/MeOH, 1 mmol TrBA, 1 mmol HOAc, binärer Gradient: von 0% B zu 50% B in 20 min, in 1 min zu 100% B, 2 min bei 100% B in 1 min zu 0% B, 6 min bei 0% B, Gesamtlaufzeit 30 min (s. S. 37, 39).
3. Luna RP 18(2), 3 μm , 50 x 2 mm (Phenomenex, Aschaffenburg), Fluss: 0.25 mL/min, Thermostat: 40 ° C, Eluent A: 97/3 Wasser/ACN, 1% Ameisensäure, Eluent B: 25/75 Wasser/ACN, 1% Ameisensäure, binärer Gradient: von 0% B zu 100% B in 8 min, 1 min bei 100% B, zu 0% B in 0.5 min, 5.5 min bei 0% B, Gesamtlaufzeit 15 min (s. S. 37).
4. Luna Phenyl-Hexyl, 3 μm , 150 x 2 mm (Phenomenex, Aschaffenburg), Fluss: 0.25 mL/min, Thermostat: 45 ° C, Eluent A: Wasser, 2.5 mmol TrBA, pH 8, Eluent B: 30/70 Wasser/MeOH, 2.5 mmol TrBA, pH 8, binärer Gradient: von 0% B zu 75% B in 16 min, 2 min bei 75% B, , 7 min bei 0% B, Gesamtlaufzeit 25 min (s. S. 43).
5. Anreicherungsvorsäule: Luna RP 18, 5 μm , 50 x 3.2 mm (Phenomenex, Aschaffenburg), Fluss: 1 mL/min, Eluent: 97/3 Wasser/MeOH, 1 mmol TrBA, pH 8, Trennsäule: Luna Phenyl-Hexyl, 5 μm , 250 x 2 mm (Phenomenex, Aschaffenburg), Fluss 0.25 mL/min, Thermostat: 40 ° C, Eluent A: 80/20 Wasser/MeOH, 1 mmol TrBA, 1 mmol HOAc, Eluent B: 30/70 Wasser/MeOH, 1 mmol TrBA, 1 mmol HOAc, binärer Gradient: 3 min bei 15% B, von 15% B zu 45% B in 21 min, in 3 min zu 100% B, 4 min bei 100% B, in 0.5 min zu 15% B , 4.5 min bei 15% B, Das Säulenschaltventil (s. Abb. 2.14, S. 48) wurde nach 5 min geschaltet. Gesamtlaufzeit 35 min (s. S. 49, 49).
6. Spherisorb S5 ODS2, 5 μm , 250 x 4.6 mm (Waters, Eschborn), Fluss: 1.0 mL/min, Thermostat: 20 ° C, Eluent A: Wasser, 10 mmol NH_4OAc Eluent B: 10/90 Wasser/MeOH 10 mmol NH_4OAc , binärer Gradient: 8 min 0% B, in 30 min zu 75% B, in 1 min auf 100% B, 5 min bei 100% B, in 1 min zu 0% B, 15 min bei 0% B, Gesamtlaufzeit 60 min. Diese HPLC-Trennsystem entspricht dem von R. Opitz (s. [265]) verwendeten System (s. S. 62).

7. Spherisorb S5 ODS2, 5 μm , 250 x 4.6 mm (Waters, Eschborn), Fluss: 1.0 mL/min, Thermostat: 20 °C, Eluent A: Wasser, 10 mmol NH_4OAc Eluent B: 10/90 Wasser/MeOH 10 mmol NH_4OAc , binärer Gradient: 8 min 0% B, in 8 min zu 25% B, in 2 min zu 100% B, 2 min bei 100% B, in 1 min zu 0% B, 5 min bei 0% B, Gesamtlaufzeit 26 min. Diese HPLC-Trennsystem entspricht im Bereich kurzer Retentionszeiten dem von R. Opitz [265] verwendeten System, ist im Bereich der zur Analyse von 3-SPI und 4-SPI nicht interessierenden längeren Retentionszeiten jedoch wesentlich verkürzt (s. S. 64).
8. Hypersil ODS, 5 μm , 150 x 4 mm (Knauer, Berlin), Fluss: 1.0 mL/min, Eluent: 67/33 (über Gradientenmischpumpe) von 30/70 Wasser/ACN und Wasser mit 10 mmol TBABr, isokratisch, Gesamtlaufzeit 9 min (s. S. 72).
9. Hypersil ODS, 3 μm , 150 x 3 mm (Knauer, Berlin), Fluss: 0.5 mL/min, Eluent A: Wasser, 1 mmol TrBA, 1 mmol HOAc, Eluent B: ACN, binärer Gradient: von 20% B zu 50% B in 15 min, in 1 min auf 100% B, 1 min bei 100% B, zu 20% B in 1 min, 4 min bei 20% B, Gesamtlaufzeit 22 min (s. S. 74).
10. Luna Phenyl-Hexyl, 5 μm , 250 x 2 mm (Phenomenex, Aschaffenburg), Fluss 0.25 mL/min, Thermostat: 40 °C, Eluent A: 80/20 Wasser/MeOH, 1 mmol TrBA, 1 mmol HOAc, Eluent B: 30/70, Wasser/MeOH, 1 mmol TrBA, 1 mmol HOAc, binärer Gradient: in 17 min von 20% B auf 60% B, in 1 min auf 100% B, 2 min bei 100% B, in 0.5 min auf 20% B, 4.5 min bei 20% B, Gesamtlaufzeit 25 min (s. S. 74).
11. RP Select B, 5 μm , 250 x 4 mm (Merck, Darmstadt), Fluss: 1 mL/min, Eluent A: D_2O , 1 mmol TrBA, 40 μL HOAc, Eluent B: ACN, binärer Gradient: von 15% B zu 50% B in 20 min, in 5 min auf 100% B, Gesamtlaufzeit 25 min, keine Equilibrierung, da Einzelmessung (s. S. 75).
12. Luna Phenyl-Hexyl, 3 μm , 150 x 2 mm (Phenomenex, Aschaffenburg), Fluss: 0.2 mL/min, Eluent A: 20% MeOH, 1 mmol TrBA, 40 μL HOAc, Eluent B: 80% MeOH, 1 mmol TrBA, 40 μL HOAc, binärer Gradient: von 0% B zu 80% B in 20 min, 2 min bei 100% B, 1 min bei 100% B, zu 0% B in 1 min, 6 min bei 0% B, Gesamtlaufzeit 30 min (s. S. 86, 89).
13. Luna Phenyl-Hexyl, 3 μm , 150 x 2 mm (Phenomenex, Aschaffenburg), Fluss: 0.2 mL/min, Eluent A: 10% ACN in D_2O 1 mmol TrBA, 40 μL HOAc, Eluent B: ACN, binärer Gradient: von 0% B zu 75% B in 20 min, zu 100% B in 0.1 min, 2 min bei 100% B, zu 0% B in 0.1 min, 2.8 min bei 0% B, Gesamtlaufzeit 25 min (s. S. 93).

14. Luna Phenyl-Hexyl, 3 μm , 150 x 2 mm (Phenomenex, Aschaffenburg), Fluss: 0.2 mL/min, Thermostat: 45 °C, Eluent A: 20% MeOH, 1 mmol TrBA, 40 μL HOAc, Eluent B: 70% MeOH, 1 mmol TrBA, 40 μL HOAc, binärer Gradient: von 0% B zu 100% B in 20 min, 1 min bei 100% B, zu 0% B in 1 min, 8 min bei 0% B, Gesamtlaufzeit 30 min (s. S. 96).
15. Hypersil ODS, 5 μm , 300 x 8 mm (Knauer, Berlin), Fluss: 2 mL/min, Eluent A: 5 mmol Triethylammoniumformiat, Eluent B: 80% MeOH, 5 mmol Triethylammoniumformiat, binärer Gradient: von 0% B zu 62.5% B in 20 min, zu 100% B in 1 min, 2 min bei 100% B, zu 0% B in 1 min, 6 min bei 0% B, Gesamtlaufzeit 30 min (s. S. 97).
16. Superspher RP18e, 4 μm , 200 x 2 mm (Knauer, Berlin), Fluss: 0.25 mL/min, Eluent A: 15% ACN, 5 mmol NH_4OAc , Eluent B: 80% ACN, 5 mmol NH_4OAc , binärer Gradient: von 0% B zu 50% B in 20 min, zu 80% B in 3 min, 2 min bei 80% B, zu 0% B in 1 min, 4 min bei 0% B, Gesamtlaufzeit 30 min (s. S. 99).

A.7 Synthese von 3- und 4-Sulfophthalimid

3- und 4-Sulfophthalimid wurden entsprechend einer Vorschrift von Reé [332] hergestellt. 10g 4-Sulfophthalsäure Triammoniumsalz (technisch, ca. 25% 3-Sulfophthalsäure, Aldrich, Milwaukee, USA) wurden in einem Erlenmeyerkolben auf 200°C bis zu Gewichtskonstanz erhitzt (ca. 24 h). Das graue Produkt wurde dreimal mit 50 mL Wasser extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und das Lösungsmittel wurde in einen Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in ca. 2-4 mL heißem Wasser gelöst. Zu dieser Lösung wurde Isopropanol bis zu beginnender Trübung hinzugegeben. Die Kristallisation bei -8°C ergab 6 g Rohprodukt (73% der Theorie) von 3- und 4-Sulfophthalimid. Durch fraktionierte Kristallisation aus 80/20 Isopropanol/Wasser wurden 200 mg 3-Sulfophthalimid isoliert. Die Reinheitskontrolle erfolgte über HPLC-UV, die Struktur wurde über NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie verifiziert (s. Tab. A.1).

Tabelle A.1 Spektroskopische Daten 3-Sulfophthalimid. Die NMR-Messungen wurden in d_6 -DMSO durchgeführt. MS und MS/MS bei 25 V Cone-Voltage und MS/MS bei 20 eV Kollisionsenergie.

MS, ES^- , m/z	226 [M - H] ⁻
MS/MS	226 (25), 182 (100), 162 (31), 118 (23)
¹ H-NMR [ppm]	8.1 (d, 1H), 7.85 (m, 2H)
¹³ C-NMR [ppm]	168.54, 166.28, 145.05, 134.05, 133.73, 132.95, 127.79, 123.23

A.8 Batch-Ozonung

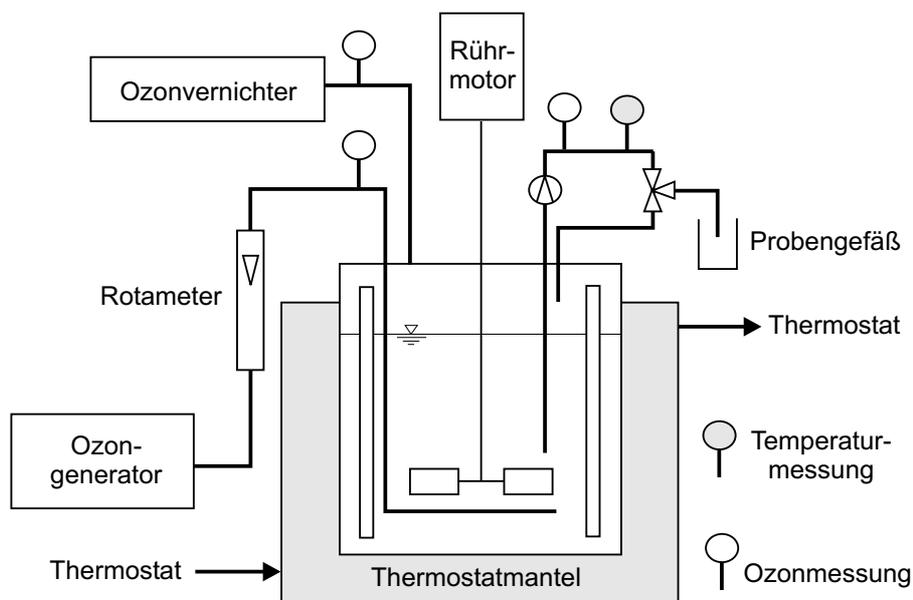


Abbildung A.1 Schematischer Versuchsaufbau der Batch-Ozonung.

Der Versuchsaufbau der Batch-Ozonung ist in Abbildung A.1 skizziert. Der Batchreaktor war ein Rührkessel aus Glas mit einem Innendurchmesser von 150 mm und einer Höhe von 200 mm. Die Temperatur des Thermostatisiermantels wurde mit einem Jelabo F25-Thermostat (Jelabo, Seelbach) geregelt. Im Reaktionsraum befand sich 50 mm über dem Boden ein sechsblättriger Scheibenrührer (Durchmesser 75 mm). Die Temperatur und die Konzentration des gelösten Ozon wurden im Bypass gemessen (Orbisphere model 3600 analyser, Neuchatel, Schweiz), über den sich zeitgesteuert Proben entnehmen ließen. Es wurde ein Ozongenerator der Fa. Sorbius (Berlin) mit einer maximalen Leistung von 1 g/h Ozon verwendet. Der Gasvolumenstrom wurde mit Hilfe eines kalibrierten Rotameters auf 14 L/h eingestellt. Die Gaszufuhr erfolgte über eine mit feinen Bohrungen versehene Edelstahlkapillare direkt unter dem Scheibenrührer. Die Zugas- und -abgaskonzentration an Ozon wurde mit zwei BMT 961 TPL Ozonmessgeräten (BMT Messtechnik, Berlin) erfasst. Das eingefüllte Reaktionsvolumen betrug stets 2.0 L. Die Datenerfassung erfolgte mit einem Daten-Logger DL 196 (Adam & Schaefer, Berlin).

A.9 Nomenklatur für Naphthalinsulfonate

Für substituierte Naphthalinsulfonate wurde zum Teil die Nomenklatur nach Kok et al. [110] verwendet. Die Substitutionsstellen 1-8 am Naphthalinring werden wie folgt entweder Amino-, Hydroxy- oder Sulfonatgruppen zugeordnet: (Aminogruppe(n)/Hydroxygruppe(n)/Sulfonatgruppe(n)). 2-Amino-1-hydroxynaphthalin-3,7-disulfonat wird dann kurz zu (2/1/3,7).

A.10 Strukturgenerator UpSol Assemble

Die Strukturgenerator-Software UpSol Assemble der Fa. Upstream Solutions GmbH, Hergiswil, Schweiz, wurde in der Version 2.0 beta 1 verwendet.

A.11 Weitere Daten Gerberei

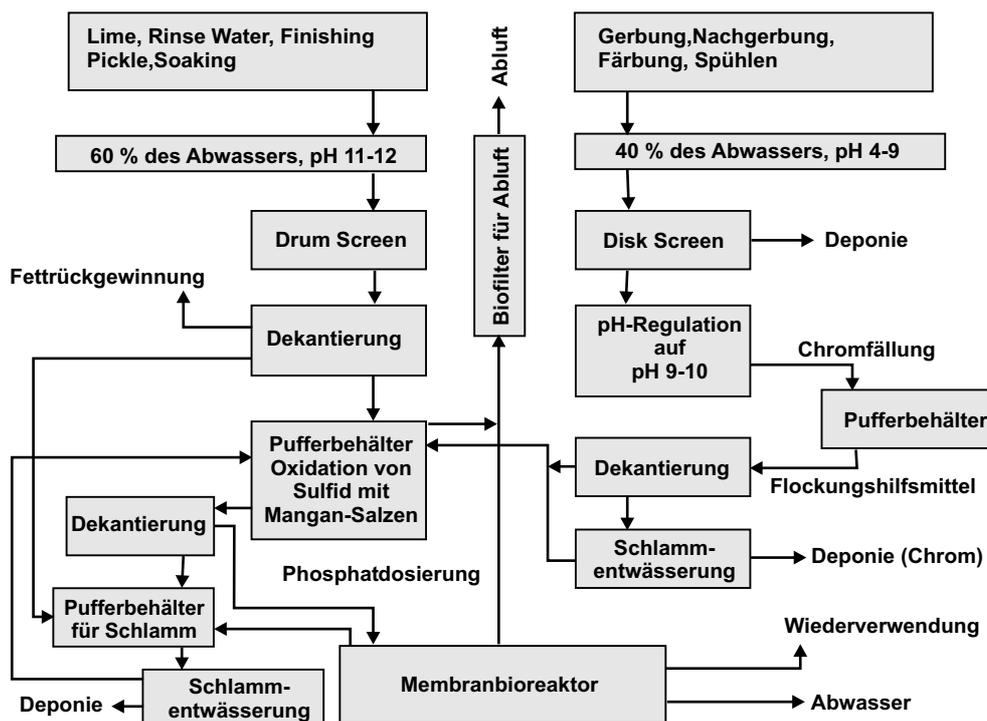


Abbildung A.2 Schematischer Aufbau der Abwasserbehandlung bei der Gerberei

Abbildung A.2 zeigt eine schematische Repräsentation der Kläranlage der Gerberei. Die Messwerte zu Summenparametern wie DOC, SAK und Leitfähigkeit sowie zu Salz- und Nährstoff-Gehalten in Zu- und Abläufen der Gerberei finden sich in Anhang B.5, S. 152.

B Daten

B.1 MS Daten Sulfonate

Tabelle B.1 Messwerte exakte Massenbestimmungen auf dem Quadrupol-MS. Bei den Ergebnissen handelt es sich um die Mittelwerte von jeweils 10 Messungen. Es wurden, außer in den gekennzeichneten Ausnahmen, 20 μL von 1mg/L Lösungen injiziert. Die Ionisierung erfolgte mit Elektrospray. Die Substanzen 1 – 12 wurden im positiven Modus ($[\text{M} + \text{H}]^+$), die Substanzen 13 – 30 im negativen Modus ($[\text{M} - \text{H}]^-$) gemessen.

Nr.	Summenformel Molekülion	theoret. Masse	MW n=10	Abweichung mmu (ppm)	$\pm \sigma$ mmu (ppm)	Maximalwert mmu (ppm)
1	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$	251.0603	251.0605	0.2 (0.9)	1.0 (4.0)	-1.6 (-6.3)
2	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2^\dagger$	256.0214	256.0225	1.1 (4.3)	1.0 (3.6)	3.0 (11.7)
3	$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$	265.0759	265.0758	-0.1 (-0.3)	1.6 (6.1)	3.0 (11.3)
4	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$	279.0916	279.0907	-0.9 (-3.1)	1.2 (4.3)	-2.7 (-9.7)
5	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$	254.0599	254.0603	0.4 (1.4)	2.2 (8.7)	4.9 (19.3)
6	$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$	301.0759	301.0772	1.3 (4.2)	2.8 (9.5)	6.6 (21.9)
7	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$	311.0815	311.0808	-0.6 (-1.9)	1.3 (4.2)	-3.3 (-10.8)
8	$\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$	315.0916	315.0915	-0.1 (-0.4)	2.5 (7.8)	-4.3 (-13.7)
9	$\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$	399.0763	399.0767	0.4 (1.0)	1.6 (4.1)	2.2 (5.5)
10	$\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{O}_{10}^\ddagger$	545.2386	545.2400	1.4 (2.7)	1.6 (2.9)	3.5 (6.4)
11	$\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{O}_{11}^\ddagger$	587.2492	587.2493	0.1 (0.2)	1.1 (1.9)	1.9 (3.3)
12	$\text{C}_{37}\text{H}_{68}\text{NO}_{13}$	734.4690	734.4679	-1.1 (-1.7)	2.5 (3.4)	-4.0 (-5.4)
13	$\text{C}_6\text{H}_6\text{NO}_3\text{S}$	172.0068	172.0068	-0.0 (-0.1)	1.5 (9.1)	4.1 (23.8)
14	$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{NO}_3\text{S}$	222.0225	222.0224	-0.1 (-0.5)	1.6 (7.0)	2.4 (10.8)
15	$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{NO}_3\text{S}$	222.0225	222.0220	-0.5 (-2.2)	1.2 (5.8)	-2.4 (-10.8)
16	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_3\text{S}$	156.9959	156.9964	0.5 (2.9)	1.6 (5.8)	2.8 (17.8)
17	$\text{C}_{10}\text{H}_7\text{O}_6\text{S}_2^\ddagger$	286.9684	286.9690	0.6 (2.0)	1.1 (3.9)	3.2 (11.2)
18	$\text{C}_{10}\text{H}_7\text{O}_6\text{S}_2^\ddagger$	286.9684	286.9682	-0.2 (-0.6)	1.3 (4.4)	2.7 (9.4)
19	$\text{C}_{10}\text{H}_7\text{O}_4\text{S}$	223.0065	223.0063	-0.2 (-0.9)	1.3 (7.0)	-2.6 (-11.7)
20	$\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_4\text{S}$	171.0116	171.0123	0.7 (4.0)	1.3 (7.6)	2.4 (14.1)
21	$\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_4\text{S}$	201.9810	201.9803	-0.7 (-3.7)	0.9 (4.5)	-1.6 (-7.9)
22	$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{NO}_3\text{S}$	222.0225	222.0220	-0.5 (-2.0)	1.1 (5.1)	-1.7 (-7.7)
23	$\text{C}_{10}\text{H}_7\text{O}_3\text{S}$	207.0116	207.0109	-0.7 (-3.4)	1.1 (5.1)	-2.4 (-11.6)
24	$\text{C}_{10}\text{H}_7\text{O}_3\text{S}$	207.0116	207.0110	-0.6 (-3.2)	1.3 (6.1)	-2.5 (-12.1)
25	$\text{C}_{10}\text{H}_7\text{O}_4\text{S}$	223.0065	223.0064	-0.1 (-0.5)	1.0 (4.5)	-2.3 (-10.3)
26	$\text{C}_{14}\text{H}_7\text{O}_5\text{S}$	287.0014	287.0019	0.5 (1.7)	1.3 (4.7)	2.6 (9.1)
27	$\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{O}_6\text{S}_2$	427.0310	427.0309	-0.1 (-0.3)	2.7 (5.0)	-4.3 (-10.1)
28	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}_2$	492.0530	492.0527	-0.3 (-0.6)	1.3 (2.7)	2.0 (4.1)

Tabelle B.1 Fortsetzung: Messwerte exakte Massenbestimmung

Nr.	Summenformel Molekülion	theoret. Masse	MW n=10	Abweichung mmu (ppm)	$\pm \sigma$ mmu (ppm)	Maximalwert mmu (ppm)
29	$C_{26}H_{24}N_5O_{13}S_4^{\ddagger}$	742.0253	742.0260	0.7 (0.9)	2.4 (3.7)	5.5 (7.4)
30	$C_{27}H_{22}N_7O_{14}S_4^{\ddagger}$	796.0108	796.0114	0.6 (0.7)	2.1 (2.8)	-3.5 (-4.4)

[†] 20 μ L von 10 mg/L Lösungen injiziert (200 ng absolut on column)
[‡] 20 μ L von 5 mg/L Lösungen injiziert (100 ng absolut on column), PPG als Kalibrant

1 Sulfadiazin; 2 Sulfathiazol; 3 Sulfamerazin; 4 Sulfamethazin; 5 Sulfamethoxazol; 6 Sulfadoxin;
7 Sulfaquinoxalin; 8 Sulfaphenazol; 9 Sulfasalazin; 10 10-Desacetylbaccatin III; 11 Baccatin III;
12 Erythromycin; 13 3-Aminobenzolsulfonat; 14 1-Aminonaphthalin-7-sulfonat; 15 1-Aminonaphthalin-5-sulfonat;
16 Benzolsulfonat; 17 Naphthalin-1,5-disulfonat; 18 Naphthalin-2,6-disulfonat;
19 1-Hydroxynaphthalin-4-sulfonat; 20 Toluol-4-sulfonat; 21 3-Nitrobenzolsulfonat;
22 1-Aminonaphthalin-8-sulfonat; 23 Naphthalin-1-sulfonat; 24 Naphthalin-2-sulfonat;
25 1-Hydroxynaphthalin-2-sulfonat; 26 Anthrachinon-2-sulfonat; 27 Methylenbis-8,8'-naphthalin-2-sulfonat;
28 RO16; 29 RB5; 30 RR198

B.2 Daten zum Abbau mit Pilzenzymen

Tabelle B.2 Produktionen der enzymatischen Oxidationsprodukte von RV5 bei 25 eV Kollisionsenergie

	t_R (min)	$(M - H)^-$	Produktionen
RV5 _{M1}	14.45	602	538, 510, 522, 494, 479, 450, 414, 388, 308, 264
RV5 _{M2}	15.22	602	522, 510, 494, 450, 414, 388, 308, 264
RV5 _{M3}	17.63	604	524, 494, 454, 415, 307, 265
RV5 _{M4}	18.15	604	524, 480, 307

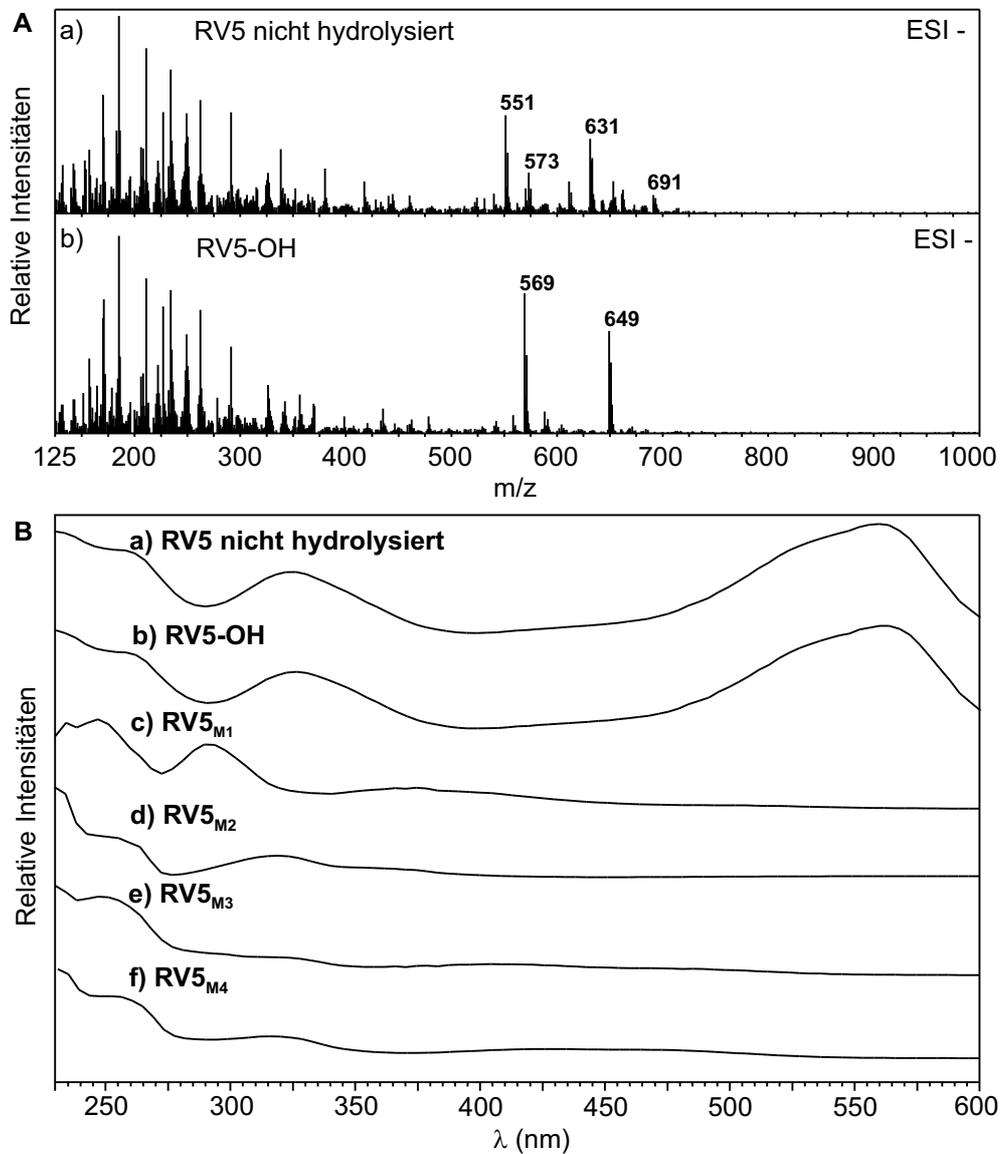


Abbildung B.1 **A** Massenspektren von Reactive Violet 5 (RV5). **a)** nicht-hydrolysiertes Farbstoff, **b)** hydrolysiertes Farbstoff. Beide Formen von RV5 enthielten Kupfer (Isotopenmuster), beim nicht-hydrolysierten Farbstoff fehlte das Molekülanion, es wurden intensive Ionen bei m/z 631 und m/z 551 ($[M - H_2SO_4 - H]^-$ und $[M - H_2SO_4 - SO_3 - H]^-$) beobachtet. Das hydrolysierte RV5 wies das erwartete Molekülanion der Hydroxyethylsulfonform bei m/z 649 ($[M - H]^-$) sowie ein intensives Fragment bei m/z 569 ($[M - SO_3 - H]^-$) auf. **B** UV/VIS-Spektren. **a)** RV5 unhydrolysiert, **b)** RV5-OH, **c)** - **f)** Metabolite RV5_{M1} - RV5_{M4}.

B.3 Ozonung

B.3.1 MS-Daten

Tabelle B.3 LC-TOFMS der Ozonungsprodukte von Naphthalin-1,5-disulfonat mit niedriger Cone-Voltage (30V)

t_R (min)	Masse	Summenformel	Fragmente mit bekannter Summenformel	
N ₁	5.61	277	C ₉ H ₉ O ₈ S	259 (-H ₂ O)
N ₁₉	6.30	291	C ₁₀ H ₁₁ O ₈ S	273 (-H ₂ O)
N ₂₀	6.30	289	C ₁₀ H ₉ O ₈ S	
N ₂	6.38	275	C ₉ H ₇ O ₈ S	257 (-H ₂ O)
N ₄	8.41	273	C ₁₀ H ₉ O ₇ S	
N ₂₁	8.90	245	C ₈ H ₅ O ₇ S	
N ₂₂	9.66	289	C ₁₀ H ₉ O ₈ S	
N ₁₂	9.78	257	C ₉ H ₅ O ₇ S	
H ₂	9.86	229	C ₈ H ₅ O ₆ S	
N ₆	12.23	213	C ₈ H ₅ O ₆ S	169 (-CO ₂)
H ₄	10.25	273	C ₁₀ H ₉ O ₇ S	213 (-C ₂ H ₄ O ₂)
H ₃	12.62	339	C ₉ H ₇ O ₁₀ S ₂	293 (-CO), (-H ₂ O) 229 (-SO ₂) 213 (-SO ₃) 277 (-CO ₂), (-H ₂ O) 259 (-SO ₃)
N ₂₃	12.86	353	C ₁₀ H ₉ O ₁₀ S ₂	293 2*(-H ₂ CO)
N ₂₄	12.86	245	C ₈ H ₅ O ₇ S	
N ₂₅	13.72	293	C ₈ H ₅ O ₈ S ₂	
N ₇	14.14	235	C ₆ H ₃ O ₈ S	191 (-CO ₂)
H ₁	14.23	245	C ₈ H ₅ O ₇ S	227 (-H ₂ O) 201 (-CO ₂)
N ₈	15.11	255	C ₁₀ H ₇ O ₆ S	
N ₂₆	15.81	271	C ₁₀ H ₇ O ₇ S	
N ₂₇	15.89	287	C ₁₀ H ₇ O ₈ S	
N ₂₈	17.89	335	C ₁₀ H ₇ O ₉ S ₂	271 (-SO ₂) 255 (-SO ₃)
N ₁₅	18.46	351	C ₁₀ H ₇ O ₁₀ S ₂	225 (-SO ₃), (-CO), (-H ₂ O)
N ₁₆	18.66	335	C ₁₀ H ₇ O ₉ S ₂	277 (-H ₂ CO), (-CO) 209 (-SO ₃), (-CO), (-H ₂ O)
N ₁₈	18.84	367	C ₁₀ H ₇ O ₁₁ S ₂	

Tabelle B.4 LC-TOFMS der Ozonungsprodukte von Naphthalin-1,5-disulfonsäure mit hoher Cone-Voltage (70 V)

t_R (min)	Masse	Summenformel	Fragmente mit bekannter Summenformel
N ₁	3.73	277 C ₉ H ₉ O ₈ S	241 (-H ₂ O) 213 (-CO) 185 (-CO) 169 (-CO ₂) 157 2*(-CO)
N ₃	3.73	275 C ₉ H ₇ O ₈ S	213 (-CO ₂) 185 (-CO) 121 (-SO ₂) 156 [C ₆ H ₄ O ₃ S]
N ₉	3.77	253 C ₁₀ H ₅ O ₆ S	197 (-CO) 157 (-CO) 121 (-SO ₂) 185 (-C ₂ O)
N ₁₀	3.77	271 C ₁₀ H ₇ O ₇ S	225 (-CO) 145 (-SO ₃) 209 (-CO ₂) 145 (-SO ₂)
N ₁₁	3.78	227 C ₁₀ H ₉ O ₇ S	156 [C ₆ H ₄ O ₃ S]
H ₄	4.74	273 C ₁₀ H ₉ O ₇ S	237 (-H ₂ O) 145 (-SO ₂) 227 (-CO) 209 (-H ₂ O) 183 (-CO ₂) 175 (-SO ₃) 225 (-H ₂ O) 199 (-CO ₂)
N ₅	4.89	259 C ₉ H ₇ O ₇ S	213 (-CO) 169 (-CO ₂)
N ₆	4.91	213 C ₈ H ₅ O ₅ S	121 (-SO ₃ , -CO)
N ₁₂	5.07	257 C ₉ H ₅ O ₇ S	121 (-SO ₂)
H ₂	5.15	229 C ₈ H ₅ O ₆ S	157 (-CO) 121 (-SO ₂)
H ₃	7.27	339 C ₉ H ₇ O ₁₀ S ₂	229 (-SO ₂) 185 (-CO ₂) 121 (-SO ₂) 213 (-SO ₃) 185 (-CO) 121 (-SO ₂)
N ₁₃	7.35	321 C ₉ H ₅ O ₉ S ₂	213 (-SO ₂) 185 (-CO) 121 (-SO ₂) 197 (-SO ₃)
N ₈	9.11	255 C ₁₀ H ₇ O ₆ S	209 (-CO) 145 (-SO ₂) 156 [C ₆ H ₄ O ₃ S]

Tabelle B.4 Fortsetzung: LC-TOFMS der Ozonierungsprodukte (70 V)

t_R (min)	Masse	Summenformel	Fragmente mit bekannter Summenformel	Summenformel
N ₁₄	10.52	211	C ₉ H ₇ O ₄ S	173 (-SO ₂)
				145 (-CO)
				227 (-CO)
N ₁₅	10.87	351	C ₁₀ H ₇ O ₁₀ S ₂	209 (-H ₂ O)
				181 (-CO)
N ₁₆	10.96	335	C ₁₀ H ₇ O ₉ S ₂	161 (-SO ₂)
				145 (-SO ₂)
N ₁₇	11.18	293	C ₈ H ₅ O ₈ S ₂	185 (-CO)
N ₁₈	11.75	367	C ₁₀ H ₇ O ₁₁ S ₂	207 (-SO ₃)
				119.2*(-CO ₂)

Tabelle B.5 Produktionen von Ozonungsprodukten von Naphthalin-1,5-disulfonat bei 20eV Kollisionsenergie

t_R (min)	$[M - H]^-$ Fragment	Produktionen (20 eV Kollisionsenergie)
N ₁	277	259, 241, 213, 197, 185, 169, 121, 105
N ₁₉	291	273, 243, 241, 215, 213, 197, 185, 169, 157, 149, 121, 105, 93, 89, 80, 77
N ₁₃	321	213, 212, 185, 184, 169, 156, 133, 121, 105, 89, 80, 77
H ₄	273	303, 289, 285, 271, 253, 243, 225, 215, 213, 199, 197, 185
N ₂₂	289	213, 212, 184, 169, 156, 121, 105, 89, 80, 77
H ₂	229	255, 243, 241, 237, 227, 225, 215, 213, 209, 201, 199, 197, 185, 183, 175, 145, 121, 119, 81, 80
N ₂₁	245	271, 257, 253, 243, 229, 213, 201, 199, 185, 169, 157, 149, 147, 121, 105, 93, 81, 80, 77
H ₃	339	239, 229, 227, 213, 201, 199, 185, 169, 157, 149, 141, 121, 105, 93, 89, 81, 80, 77
N ₂₃	353	201, 185, 157, 121, 93, 81, 80
N ₁₃	321	227, 201, 183, 157, 155, 119, 111, 93, 81
N ₂₄	245	293, 229, 213, 185, 121, 81
H ₁	245	229, 213, 185, 121, 81
N ₈	255	201, 185, 165, 157, 149, 121, 103, 93, 80
N ₂₃	353	325, 293, 275, 273, 255, 253, 241, 229, 213, 185, 121, 81
N ₁₃	321	229, 213, 185, 121, 81
N ₂₄	245	201, 185, 157, 149, 121, 103, 93, 80
H ₁	245	241, 197
N ₈	255	213, 197, 185, 181, 169, 161, 156, 149, 133, 121, 117, 105, 93, 89, 80, 77, 65
N ₂₄	245	217, 201, 173, 165, 163, 137, 121, 109, 93, 80
H ₁	245	227, 201, 183, 157, 155, 137, 121, 119, 111, 109, 93, 81
N ₈	255	253, 237, 227, 225, 213, 212, 211, 209, 199, 185, 183, 181, 173, 157, 156, 147, 145, 135, 129, 119, 81

Tabelle B.5 Fortsetzung: Produktionen bei 20eV Kollisionsenergie

	t_R (min)	$[M - H]^-$ Fragment	Produktionen (20 eV Kollisionsenergie)
N_{28}	15.37	335	255, 227, 211, 209, 183 211, 183, 147, 119, 103, 80
N_{15}	16.18	351	333, 289, 271, 269, 253, 243, 227, 225, 209, 199, 197, 183, 181, 161, 81
N_{16}	16.39	335	317, 255, 253, 237, 227, 225, 209, 183, 181, 145, 81
N_{18}	16.53	367	349, 305, 293, 287, 269, 259, 243, 241, 229, 225, 215, 213, 199, 197, 185, 161, 157, 121, 105, 81 275, 265, 249, 229, 213, 185, 121, 81 241 213, 197, 185, 177, 169, 161, 157, 149, 133, 121, 105, 93, 87, 80, 77

Tabelle B.6 Produktionen von Ozonungsprodukten von Naphthalin-1,5-disulfonat bei 30eV Kollisionsenergie

t_R (min)	$[M - H]^-$ Fragment	Produktionen (30 eV Kollisionsenergie)
N ₁	277	259, 241, 213, 212, 197, 187, 184, 169, 158, 156, 148, 133, 123, 121, 105, 95, 97, 89, 80, 77
N ₁₉	291	273, 241, 215, 212, 197, 184, 169, 156, 149, 121, 105, 97, 95, 93, 89, 80, 77
	241	213, 212, 185, 184, 169, 156, 121, 105, 93, 92, 89, 80, 77, 65
N ₁₃	321	271, 253, 243, 241, 225, 215, 213, 197, 185, 181, 161, 135, 133, 121, 117, 105, 93, 81, 80
H ₄	273	213, 212, 184, 169, 156, 121, 105, 93, 92, 89, 80, 77, 65, 59
		255, 243, 241, 238, 237, 227, 225, 215, 213, 209, 199, 197, 185, 175, 170, 161, 157, 156, 145, 135, 129, 119, 105, 93, 80
N ₂₂	289	271, 257, 253, 229, 227, 213, 201, 200, 185, 169, 157, 149, 147, 145, 135, 121, 119, 105, 93, 81, 80, 77
H ₂	229	229, 200, 185, 157, 156, 149, 121, 109, 105, 93, 92, 89, 81, 80, 77, 65
		185, 157, 121, 93, 81, 80, 65, 45
N ₂₁	245	183, 157, 155, 111, 93, 83, 81, 75, 65, 57, 51
H ₃	339	229, 213, 185, 121, 81
	293	213, 185, 157, 121, 105, 103, 93, 81
	229	185, 157, 149, 121, 93, 92, 80, 65
N ₂₃	353	293, 275, 273, 255, 229, 213, 185, 121, 105, 103, 93, 81
	293	213, 185, 121, 105, 103, 93, 81
	229	185, 157, 149, 121, 93, 92, 81, 80, 65
N ₁₃	321	213, 197, 169, 133, 105, 80, 77
	241	213, 197, 185, 169, 156, 133, 121, 117, 105, 93, 89, 80, 77, 65
N ₂₄	245	201, 173, 137, 121, 109, 93, 80
H ₁	245	201, 183, 157, 155, 137, 121, 111, 93, 91, 81, 80, 75, 65, 57, 51

Tabelle B.6 Fortsetzung: Produktionen bei 30eV Kollisionsenergie

	t_R (min)	$[M - H]^-$	Fragment	Produktionen (30 eV Kollisionsenergie)
N_8	13.88	255		237, 227, 225, 209, 199, 185, 181, 175, 173, 156, 145, 135, 129, 121, 119, 117, 101, 93, 81, 80, 77, 59, 45, 41
N_{28}	15.37	335		211, 183, 147, 119, 80
			255	211, 183, 147, 145, 119, 103, 93, 91, 80, 65
N_{15}	16.18	351		289, 253, 227, 225, 209, 199, 197, 189, 183, 181, 170, 161, 145, 135, 133, 119, 117, 81
N_{16}	16.39	335		237, 227, 225, 209, 183, 181, 145, 117, 81
N_{18}	16.53	367		293, 243, 241, 229, 225, 215, 213, 199, 197, 185, 181, 177, 170, 169, 161, 157, 156, 121, 105, 93, 81, 77
			293	213, 185, 168, 157, 121, 105, 81
			241	185, 156, 135, 121, 105, 93, 87, 80, 77

B.3.2 LC-NMR-Daten

Tabelle B.7 LC-NMR-Daten von Ozonungsprodukten. Die ^1H -NMR Resonanzen wurden nur für eindeutig zusammengehörige Signale angegeben. Die Anzahl der aziden Protonen (H_{azide}) ergab sich aus den Massendifferenzen in deuterierten und nicht-deuterierten Eluenten.

Nr.	Kürzel	t_{R} [min]	H_{azide}	^1H -NMR-Resonanzen [ppm] (Multiplizität)
1	N ₅	14.42	3	8.11 (d), 8.01 (d), 7.73 (t), 5.92 (s), 3.28 (s)
2	H ₂	16.46	1	8.11 (d), 7.99 (d), 7.77 (t), 6.95 (s)
3	H ₃	18.01	3	8.06 (d), 8.02 (d), 7.86 (t), 5.76 (s)
4	N ₆	19.30	0	8.06 (d), 8.01 (d), 7.75 (t), 6.58 (s)
5	H ₁	20.80	2	7.94 (d), 7.85 (d), 7.53 (t)
6	N ₈	21.81	1	8.48 (d), 8.18 (d), 8.16 (d), 7.62 (t), 6.56 (s)
7	E	22.70	1	8.82 (d), 8.15 (d), 7.68 (t)

B.3.3 Computergenerierte Strukturvorschläge

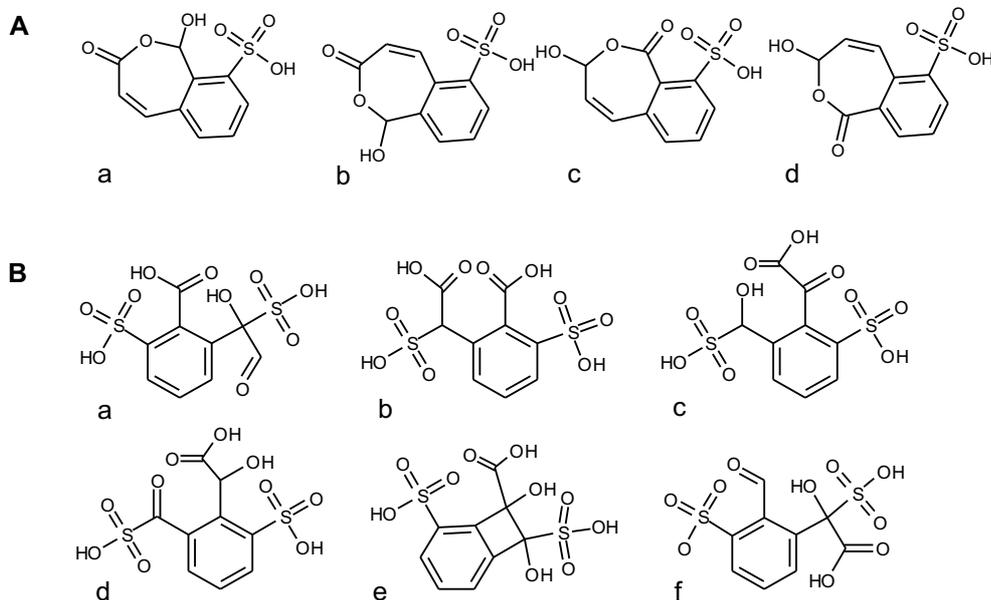
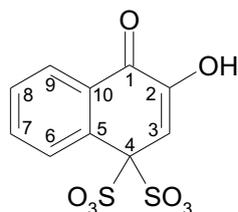


Abbildung B.2 Strukturvorschläge des Strukturgenerators N_8 und H_3 . Von 22 Strukturvorschlägen für N_8 sind nur **A a)** bis **A d)** mit den spektroskopischen Daten kompatibel, Vorschlag **d)** (2,4-(3-Sulfobenzo)-2-oxo-6-hydroxyoxahept-5-en) ist wegen des angenommenen Mechanismus der Sulfateliminierung zu bevorzugen. Von 6 Strukturvorschlägen für H_3 ist nur Vorschlag **B b)** (2-(2-Carboxy-3-sulfohenyl)-2-sulfoessigsäure mit den spektroskopischen Daten und dem angenommenen Reaktionsmechanismus konsistent (s. a. Kap. 3.2.3, S. 73).

B.4 UV-, MS- und NMR-Daten NQDSS

Tabelle B.8 UV- und Massenspektren sowie NMR-Daten von 2-Hydroxy-1-oxo-1,4-dihydronaphthalin-4,4-disulfonat



UV [nm]	268 (max.), 288 (min.), 312 (max.)
MS, ES ⁻ , <i>m/z</i>	319 ([M - H] ⁻), 239, 238, 237, 174, 173, 159, 145, 80
Exakte Masse [u]	318.9568 (berechnet für C ₁₀ H ₇ O ₈ S ₂ : 318.9582, (-1.4mmu; -4.4ppm))
¹ H-NMR [ppm]	8.34 (d, 9.5 Hz) 7.97 (d, 10.5 Hz) 7.55 (tr, 9.8 Hz) 7.45 (tr, 10.0 Hz) 6.7 (s)
¹³ C-NMR [ppm]	181.96 (C1), 149.99 (C2), 134.29 (C5), 132.85 (C7), 131.00 (C10), 129.86 (C6), 129.45 (C8), 126.71 (C9), 113.50 (C3), 80.99 (C4)
HH-, CH- and CC-Konnektivitäten wurden mit Hilfe von HH-COSY-, CH-COSY- und „long-range-coupling“-HMBC-Spektren ermittelt.	

B.5 Daten Gerbereiabwasser

Tabelle B.9 Daten Gerbereiabwasser: pH, Leitfähigkeit (σ), spektraler Absorptionskoeffizient (254nm, 280nm, 436nm und 465nm) und DOC. Die 24 h Mischproben wurden zur Analyse gesammelt nach Berlin transportiert (8°C).

Datum	pH	σ^1	SAK ₂₅₄	SAK ₂₈₀	SAK ₄₃₆	SAK ₄₆₅	DOC ²
Nicht-vegetabile Gerbung, Zulauf November 1999							
15.	9.58	13.9	390	290	0	0	1020
16.	10.21	14.1	650	390	0	0	1200
17.	10.49	11.6	820	480	10	0	1480
18.	10.57	14.2	780	460	0	0	1700
19.	10.22	14.2	730	490	0	0	1500
20./21.	8.22	14.8	440	350	0	0	920
MW	9.88	13.8	635	410	2	0	1303
σ	0.81	1.0	165	5	4	0	278
Nicht-vegetabile Gerbung, Ablauf November 1999							
15.	7.29	15.3	92	74	0	0	63
16.	7.39	15.1	97	79	2	1	67
17.	7.66	14.2	88	70	2	0	66
18.	7.96	13.8	88	68	2	1	67
19.	7.87	15.3	97	75	3	1	69
20./21.	7.56	14.5	100	80	3	1	72
MW	7.62	14.7	94	74	2	1	67
σ	0.24	0.6	5	4	1	0	3
Vegetabile Gerbung, Zulauf Dezember 1999							
07.	10.11	17.6	1004	458	14	10	1595
08.							
09.							
10.							
11./12.	10.37	16.0	937	604	33	27	1733
13.	11.15	20.6	883	20.6	15	3	1597
14.							
MW	10.54	18.1	941	524	21	15	1642
σ	0.44	1.9	50	60	9	8	65
Vegetabile Gerbung, Ablauf Dezember 1999							
07.	8.27	21.5	129	106	7	4	90
08.	8.36	20.1	125	100	6	4	87
09.	8.37	20.1	130	103	6	4	95
10.	8.42	19.1	137	104	6	4	97
11./12.	8.70	18.8	172	120	6	4	86
13.	8.32	17.2	126	99	6	4	88
14.	8.54	18.9	130	102	6	4	112

¹ in mS/cm

² in mgC/L

Tabelle B.9 Fortsetzung: Daten Gerbereiabwasser: pH, Leitfähigkeit (σ), spektraler Absorptionskoeffizient (254nm, 280nm, 436nm und 465nm) und DOC.

Datum	pH	σ^1	SAK ₂₅₄	SAK ₂₈₀	SAK ₄₃₆	SAK ₄₆₅	DOC ²
MW	8.43	19.4	136	105	6	4	94
σ	0.14	1.3	15	7	0	0	8

¹ in mS/cm
² in mgC/L

Tabelle B.10 Daten Gerbereiabwasser: Chlorid, Nitrat, Sulfat und Phosphat (in mg/L). Die 24 h Mischproben wurden zur Analyse gesammelt nach Berlin transportiert (8°C).

Datum	Chlorid	Nitrat	Sulfat	Phosphat
Nicht-vegetabile Gerbung, Zulauf November 1999				
15.	2890	74	2454	673
16.	2944	42	2564	813
17.	2112	41	2130	775
18.	2720	38	2748	703
19.	2892	40	2700	631
20./21.	2710	59	2540	631
MW	2711	49	2523	735
σ	283	13	201	71
Nicht-vegetabile Gerbung, Ablauf November 1999				
15.	3018	79	3610	20
16.	2962	60	3360	3
17.	2798	50	3486	
18.	2408	56	3592	
19.	2650	66	3922	
20./21.	2710	68	3788	51
MW	2758	63	3626	25
σ	203	9	185	20
Vegetabile Gerbung, Zulauf Dezember 1999				
07.	3695	23	2855	966
08.				
09.				
10.				
11./12.	3386	21	2367	1331
13.				
14.	5171	24	2710	1394
MW	4084	23	2644	1240
σ	779	1	205	175

Tabelle B.11 Fortsetzung: Daten Gerbereiabwasser [$\mu\text{g/L}$], MW - Mittelwert, σ - Standardabweichung, F-Test - Test auf Homogenität der Standardabweichungen¹, $t_{\text{ber.}}$ u. $t_{\text{tab.}}$ - Parameter des Student t-Test ^{2,3}

Datum	2,6-NSA	1,5-NSA	2,7-NSA	1,6-NSA	1,7-NSA	1-NSA	2-NSA
Vegetabile Gerbung, Zulauf Dezember 1999							
07.	16	187	55	427	119	270	2271
08.							
09.							
10.							
11./12.	2	66	11	129	43	117	1047
13.							
14.	2	30	30	82	33	45	201
MW	7	94	32	213	65	144	1173
σ_1	8	82	22	187	47	115	1041
Vegetabile Gerbung, Ablauf Dezember 1999							
07.	2	114	67	0	79	28	31
08.	6	155	64	16	77	24	31
09.	0	146	55	33	82	34	8
10.	11	205	50	153	84	10	10
11./12.	27	175	47	135	59	40	20
13.	0	106	29	63	47	12	19
14.	11	79	23	71	49	6	9
MW	8	150	52	67	71	25	20
σ_2	10	43	17	58	16	13	10
Vergleich Zulauf / Ablauf Dezember 1999							
F-Test	0.64	3.64	1.67	10.40	8.63	78.25	10886
F(3,7)	4.35	4.35	4.35	4.35	4.35	4.35	4.35
$t_{\text{ber.}}$	0.152	1.465	1,577	1.993	0.319	2.943	3.210
$t_{\text{tab.}}$	2.306	2.306	2.306	2.306	2.306	2.306	2.306

¹ Vergleich von $\frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2}$ mit $F(n_1, n_2)$

² $t_{\text{ber.}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sigma_{\text{gesamt}}} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$ mit $\sigma_{\text{gesamt}} = \sqrt{\frac{\sigma_1(n_1 - 1) + \sigma_2(n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}}$

³ $t_{\text{tab.}}$: tabellierte Student t-Werte für $n_1 + n_2 - 2$ Freiheitsgrade, s. z.B. S. 74 in [333]

B.6 Daten Vorsäulenanreicherung

Tabelle B.12 Daten Uferfiltration: 2,6-NSA [ng/L], MW - Mittelwert, σ - Standardabweichung

	Jan.	Feb.	März	April	Mai	Juni	Juli	MW \pm σ
3301		50	74		84	56	87	70.2 \pm 16.6

Tabelle B.12 Fortsetzung: 2,6-NSA

	Jan.	Feb.	März	April	Mai	Juni	Juli	MW \pm σ
3302	92		30	5	5	16		29.6 \pm 36.4
3303	72	43	54	1	23	65	61	45.6 \pm 25.5
3304				8	16	17	20	15.3 \pm 5.1
3305	5		2	0	0			1.8 \pm 2.4
3306	42	51	25			6		31.0 \pm 19.8
3307	36		8	51	0	5		20.0 \pm 22.3
3308	42		8		8	0		14.5 \pm 18.7
3309		52	28	90		0		42.5 \pm 38.1
3310	57		9		26			30.7 \pm 24.3
3311		89			48	36		57.7 \pm 27.8
3312			12	15		15		14.0 \pm 2.0
3313		99	37					68.0 \pm 43.8
B12	87	135	36	134	83			95.0 \pm 41.3
B13		169	68	48	56	58		79.8 \pm 50.4
B14		164	33			43		80.0 \pm 73.0
See	101	65	101	116	38	70	97	84.0 \pm 27.2

Tabelle B.13 Daten Uferfiltration: 1,5-NSA [ng/L], MW - Mittelwert, σ - Standardabweichung

	Jan.	Feb.	März	April	Mai	Juni	Juli	MW \pm σ
3301		262	265		165	240	332	252.8 \pm 60.0
3302	239		259	113	135	249		199.0 \pm 69.3
3303	300	604	210	131	138	227	193	257.6 \pm 163.0
3304				156	152	211	208	181.8 \pm 32.1
3305	385		94	42	29			137.5 \pm 167.4
3306	177	165	234			256		208.0 \pm 43.9
3307	174		194	235	112	196		182.2 \pm 45.0
3308	233		288		107	213		210.3 \pm 75.8
3309		160	224			105		163.0 \pm 59.6
3310	209		250		106			188.3 \pm 74.2
3311		138			133	245		172.0 \pm 63.3
3312			193	121		226		180.0 \pm 53.7
3313		175	253					214.0 \pm 55.2
B12	213	213	350		155			232.8 \pm 82.8
B13		293	325	192	160	241		242.2 \pm 68.4
B14		265	252			254		257.0 \pm 7.0
See	208	251	219	143	89	252	201	194.7 \pm 59.3

Tabelle B.14 Daten Uferfiltration: 2,7-NSA [ng/L], MW - Mittelwert, σ - Standardabweichung

	Jan.	Feb.	März	April	Mai	Juni	Juli	MW \pm σ
3301		103	107		132	132	142	123.2 \pm 17.2
3302	110		22	5	16	26		36.4 \pm 42.1
3303	87	353	62	0	13	25	99	91.3 \pm 121.3
3304				87	54	82	46	67.3 \pm 20.3
3305	4		2	0	0			1.5 \pm 1.9
3306	53	34	21			2		27.5 \pm 21.5
3307	10		0	4	0	15		5.3 \pm 6.6
3308	4		0		22	11		9.3 \pm 9.6
3309		27	67	127		0		55.3 \pm 55.2
3310	19		6		31			18.7 \pm 12.5
3311		113			94	78		95.0 \pm 17.5
3312			6	0		29		11.7 \pm 15.3
3313		93	82					87.5 \pm 7.8
B12	123	115	0	98	176			102.4 \pm 64.2
B13		218	0	65	60	103		89.2 \pm 80.9
B14		170	2			138		103.3 \pm 89.2
See	167	380	183	318	99	176	252	225.0 \pm 97.3

Tabelle B.15 Daten Uferfiltration: 1,6-NSA [ng/L], MW - Mittelwert, σ - Standardabweichung

	Jan.	Feb.	März	April	Mai	Juni	Juli	MW \pm σ
3301		4	79		41	120	76	64.0 \pm 43.7
3302	69		18	4	0	35		25.2 \pm 28.1
3303	60	98	44	0	3	7	70	40.3 \pm 38.2
3304				48	34	68	47	49.3 \pm 14.0
3305	5		4	0	0			2.3 \pm 2.6
3306	38	139	10			4		47.8 \pm 62.6
3307	6		9	0	0	4		3.8 \pm 3.9
3308	7		5		4	5		5.3 \pm 1.3
3309		135	57	62		0		63.5 \pm 55.3
3310	24		20		31			25.0 \pm 5.6
3311		270			75	74		139.7 \pm 112.9
3312			12	0		31		14.3 \pm 15.6
3313		106	59					82.5 \pm 33.2
B12	65	109	55	75	60			72.8 \pm 21.5
B13		86	79	53	55	159		86.4 \pm 43.1
B14		233	51			107		130.3 \pm 93.2
See	129	82	143	280	55	109	57	122.1 \pm 77.4

Tabelle B.16 Daten Uferfiltration: 1,7-NSA [ng/L], MW - Mittelwert, σ - Standardabweichung

	Jan.	Feb.	März	April	Mai	Juni	Juli	MW \pm σ
3301		206	198		102	206	250	192.4 \pm 54.5
3302	256		42	10	5	58		74.2 \pm 104.0
3303	189	160	123	0	23	11	171	96.7 \pm 82.5
3304				128	133	152	95	127.0 \pm 23.7
3305	9		2	0	0			2.8 \pm 4.3
3306	107	65	25			1		49.5 \pm 46.5
3307	12		8	4	0	14		7.6 \pm 5.7
3308	28		1		11	8		12.0 \pm 11.0
3309		39	159	98		0		74.0 \pm 69.5
3310	54		28		59			47.0 \pm 16.6
3311		190			127	103		140.0 \pm 44.9
3312			30	2		63		31.7 \pm 30.5
3313		200	217					208.5 \pm 12.0
B12	217	215	213		284			232.3 \pm 34.5
B13		218	399	164	163	241		237.0 \pm 96.7
B14		292	178			224		231.3 \pm 57.4
See	234	194	217	327	125	266	275	234.0 \pm 70.9

Tabelle B.17 Daten Uferfiltration: 1-NSA [ng/L], MW - Mittelwert, σ - Standardabweichung

	Jan.	Feb.	März	April	Mai	Juni	Juli	MW \pm σ
3301		2	6		16	0	1	5.0 \pm 6.6
3302	0		4	0	0	0		0.8 \pm 1.8
3303	0	65	2	0	0	0	0	9.6 \pm 24.5
3304			0	0	0	0	0	0.0 \pm 0.0
3305	0		0		0			0 \pm 0
3306	0	1	3			0		1.0 \pm 1.4
3307	0		4	0	0	0		0.8 \pm 1.8
3308	1		0		0	0		0.3 \pm 0.5
3309		8	0	17		0		6.3 \pm 8.1
3310	0		0		0			0.3 \pm 0.6
3311		1			0	0		0.3 \pm 0.5
3312			0	0		0		0.0 \pm 0.0
3313		2	0					1 \pm 1.4
B12	6	2	0	2	0			2.0 \pm 2.4
B13		10	3	0	0	45		11.6 \pm 19.1
B14		5	0			0		1.3 \pm 2.5
See	4		12	89	0	14	14	22.2 \pm 33.2

Tabelle B.18 Daten Uferfiltration: 2-NSA [ng/L], MW - Mittelwert, σ - Standardabweichung

	Jan.	Feb.	März	April	Mai	Juni	Juli	MW \pm σ
3301		3	5		102	0	0	22.0 \pm 44.8
3302	1		0	0	5	1		1.4 \pm 2.1
3303	1	86	0	0	23	7	0	16.7 \pm 31.7
3304			0	128	133	0	0	52.2 \pm 71.5
3305	2		0	0	0			0.5 \pm 1.0
3306	10	4	0			0		3.5 \pm 4.7
3307	0		0	2	0	7		1.8 \pm 3.0
3308	6		0		11	0		4.3 \pm 5.3
3309		11	0	60		0		17.8 \pm 28.6
3310	0		0		59			19.7 \pm 34.1
3311		2			127	0		43.0 \pm 72.8
3312			0	2		0		0.7 \pm 1.2
3313		4	0					2.0 \pm 2.8
B12	8	3	0		284			73.8 \pm 140.2
B13		11	9	164	163	248		119.0 \pm 105.3
B14		7	0			0		2.3 \pm 4
See	6		1	498	125	44	12	114.3 \pm 193.6

Tabelle B.19 Nummerierung der Probenahmestellen in Abb. 4.2, S. 110.

Nummer	Ort
1	Nordgraben, Zulauf
2	Nordgraben, Gorkistraße
3	Autobahn A10
4	Mühlenbeck, Bahnhofsstraße
5	Mönchmühle, Eschenallee
6	Naturschutzgebiet, Kalktuffgelände
7	Schildow, Schildower Straße
8	Kolonnenweg/Akazienstraße hinter Köpchensee
9	Spandau, Rustweg

Tabelle B.20 Daten KL/OFW [ng/L], MW - Mittelwert, σ - Standardabweichung

Probenahme	2,6-NSA	1,5-NSA	2,7-NSA	1,6-NSA	1,7-NSA	1-NSA	2-NSA
KW Ruhleben, Klarlauf 2h Mischproben							
8.7.99 00.00 Uhr	194	685	748	476	690	95	142
8.7.99 02.00 Uhr	227	734	849	481	723	144	155
8.7.99 04.00 Uhr	270	876	1117	568	860	84	82
8.7.99 06.00 Uhr	287	945	1258	623	973	19	0
8.7.99 08.00 Uhr	304	969	1353	701	1052	193	182
8.7.99 10.00 Uhr	175	539	566	355	551	51	50
8.7.99 12.00 Uhr	178	538	574	370	539	52	41
8.7.99 14.00 Uhr	190	587	612	388	553	30	0
8.7.99 16.00 Uhr	190	572	571	416	556	66	219
8.7.99 18.00 Uhr	185	577	604	392	573	29	0
8.7.99 20.00 Uhr	181	602	598	391	567	50	40
8.7.99 22.00 Uhr	186	608	660	412	625	48	66
Mittelwert $\pm \sigma$	214 \pm 47	686 \pm 159	793 \pm 288	464 \pm 111	689 \pm 179	72 \pm 51	81 \pm 75
KW Ruhleben, Klarlauf 24h Mischproben, Wochengang							
26.06.99	375	578	700	705	900	288	613
27.06.99	224	453	481	481	650	114	208
29.06.99	161	433	319	354	458	35	60
30.06.99	214	530	540	542	231	105	172
02.07.99	1142	1713	1045	1740	1280	100	188
03.07.99	237	1420	671	988	664	0	0
08.07.99	175	948	383	506	519	528	1371
11.07.99	141	541	453	465	602	22	6
12.07.99	197	419	318	355	471	22	86
Mittelwert $\pm \sigma$	318 \pm 316	782 \pm 478	546 \pm 232	682 \pm 442	642 \pm 301	135 \pm 171	300 \pm 442
Klarlauf Stichproben							
KW Ruhleben 08.10.98	1439	274	204	227	324	0	0

Tabelle B.20 Fortsetzung: KL/OFW [ng/L], MW - Mittelwert, σ - Standardabweichung

Probenahme	2,6-NSA	1,5-NSA	2,7-NSA	1,6-NSA	1,7-NSA	1-NSA	2-NSA
KW Ruhleben 05.05.99	503	959	1148	852	1257	40	43
KW Schönerlinde 19.05.99	483	1249	624	634	733	130	204
KW Schönerlinde 20.05.99	520	2857	1001	697	1060	138	264
Oberflächenwässer Berlin							
Oberhavel 12.7.00 ¹	135	210	69	167	225	14	40
	154	174	68	160	219	13	41
	183	242	67	162	217	15	43
Mittelwert $\pm\sigma$	157 \pm 24	209 \pm 34	68 \pm 1	163 \pm 4	220 \pm 4	14 \pm 1	41 \pm 2
OWA Zulauf 11./12.07.00 ¹	986	1535	225	2242	2763	49	81
	973	1565	223	2217	2624	50	85
	994	1387	285	2352	2591	50	81
Mittelwert $\pm\sigma$	984 \pm 11	1496 \pm 95	244 \pm 35	2270 \pm 72	2659 \pm 91	50 \pm 1	82 \pm 2
OWA Ablauf 11./12.07.00 ¹	1066	1477	625	2059	2999	119	43
	1121	1630	618	2035	2878	118	46
	1001	1459	607	1979	2863	122	48
Mittelwert $\pm\sigma$	1063 \pm 60	1522 \pm 94	617 \pm 9	2024 \pm 41	2913 \pm 75	120 \pm 2	46 \pm 3
Tegeler See 12.07.00 ¹	213	366	101	322	446	17	21
	249	311	110	338	461	18	22
	258	328	105	340	477	22	35
Mittelwert $\pm\sigma$	240 \pm 24	335 \pm 28	105 \pm 5	333 \pm 10	461 \pm 16	19 \pm 3	26 \pm 8
Nordgraben, Zulauf 13.06.99	395	591	300	1020	899	106	189
Nordgraben, Zulauf 16.06.99	123	287	194	376	399	9	0
Nordgraben Gorkistr. 06.99	146	528	192	577	673	43	3
Landwehrkanal 07/99	94	254	190	378	378	46	75
Oberhavel 22.6.99	139	457	241	451	364	0	57
Tegeler Fließ 3 ² 14.7.99	12066 ³	8766 ³	10445 ³	138	427	0	144
Tegeler Fließ 4 ² 14.7.99	328	479	24	433	78	39	177

Tabelle B.20 Fortsetzung: KL/OFW [ng/L], MW - Mittelwert, σ - Standardabweichung

Probenahme	2,6-NSA	1,5-NSA	2,7-NSA	1,6-NSA	1,7-NSA	1-NSA	2-NSA
Tegeler Fließ 5 ² 14.7.99	78	235	344	512	98	36	58
Tegeler Fließ 6 ² 14.7.99	595	2195	1321	1836	1245	31	211
Tegeler Fließ 7 ² 14.7.99	686	2598	1178	2069	1314	19	243
Tegeler Fließ 8 ² 14.7.99	1276	2574	984	2038	1135	0	180
UF-System Müggelsee, Berlin							
Müggelsee 12.98	0	270	63	0	130	61	42
Müggelsee 02.99	0	22	7	2	15	0	21
Pegel 8822 02.99	0	7	0	0	0	0	0
weitere Oberflächenwässer							
Elbe, Stade 06.98	66	10564	155	383	484	0	19
Elbe, Brunsbüttel 06.98	17	7089	172	173	478	0	28
Oder, Schwedt 08.98	185	6348	245	1571	1055	0	13

¹ Dreifachbestimmungen

² Probenahmestellen siehe Abb. 4.2, S. 110; Zuordnung s. Tab. B.19, S. 159

³ Laborkontamination durch Transportgefäß

Literaturverzeichnis

- [1] **M. A. Kertesz (1999)** Riding the sulfur cycle - metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **24** 135–175 [2](#), [4](#), [101](#)
- [2] **R. B. Herbert, F. G. Holliman (1964)** Aeruginosin B - a naturally occurring phenazinesulphonic acid. *Proc. Chem. Soc.* 19 [2](#)
- [3] **H. Schröder, J. Adam, H. Taraz, H. Budzikiewicz (1995)** Dihydroxyverdin-sulfonsäuren – Zwischenstufen bei der Biogenese? *Z. Naturforsch.* **50c** 616–621 [2](#)
- [4] **S. Bobinger, J. T. Anderson (1998)** Degradation of the petroleum components monomethylbenzothiophenes on exposure to light. *Chemosphere* **36** (12) 2569–2579 [2](#)
- [5] **S. W. Hooper**, Biodegradation of sulfonated aromatics. **G. R. Chaudhry** (Hg.) Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals, Dioscorides Press, Portland, Oregon, 1994. 169–182 [3](#)
- [6] **R. Gälli, A. Bachmann (1995)** Umweltverträglichkeit von Betonzusatzmitteln. Techn. Ber., Fachverband Schweizerischer Hersteller von Betonzusatzmitteln FSHBZ [3](#)
- [7] **J. Grütze, F. Hoffmann, U. Sewekow, A. Westerkamp (1995)** Ökotoxikologische Anforderungen an Farbstoffsortimente - Parameter für Direkt- und Reaktivfarbstoffsysteme. *Melliand Textilberichte* **10** 875–883 [3](#)
- [8] **U. Kaps, M. Kopp, K. Richter (1990)** Quantitative Untersuchungen zur Erfassung der Umweltexposition im Bereich der in der Textilindustrie eingesetzten Chemikalien. Techn. Ber., Umweltforschungsvorhaben des Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Forschungsvorhaben 106 02 061, 73 [3](#)
- [9] **W. M. G. M. v. Loon, J. J. Boon, B. d. Groot (1993)** Quantitative analysis of sulfonic acid groups in macromolecular lignosulfonic acids and

- aquatic humic substances by temperature-resolved pyrolysis-mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* **27** (12) 2387–2396 [3](#)
- [10] **R. D. Lide** (Hg.) CRC Handbook of Chemistry and Physics. CRC Press, Boca Raton, Boston, London, New York, Washington DC, 1998, 79. Aufl. [3](#)
- [11] **J. F. King**, Acidity. **S. Patai, Z. Rappoport** (Hg.) The chemistry of sulphonic acids, esters and their derivatives, Wiley, Chichester, 1991. 249–258 [3](#)
- [12] **P. Neitzel, A. Abel, W. Walther, T. Grischek, W. Nestler** (1997) Fließzeit- und teufenorientiertes Verhalten von Arylsulfonaten und IOS in Talgrundwasserleitern an der Oberelbe. *Poster, GDCh FG Wasserchemie, Jahrestagung* [4](#), [101](#), [122](#)
- [13] **C. Pelekani, V. L. Snoeyink** (1999) Competitive adsorption in natural water: role of activated carbon pore size. *Water Res.* **33** 1209–1219 [4](#), [101](#), [122](#)
- [14] **M. Ulmer** (1998) Zur Adsorption aromatischer Sulfonate an Aktivkohle. Dissertation, TU Karlsruhe [4](#), [101](#), [122](#)
- [15] **P. L. Neitzel, A. Abel, T. Grischek, W. Nestler, W. Walther** (1998) Verhalten von Arylsulfonaten bei der Uferfiltration und unter Laborbedingungen. *Vom Wasser* **90** 245–271 [4](#), [8](#), [9](#), [101](#), [122](#), [123](#)
- [16] **F. T. Lange, C. Redín, H.-J. Brauch, S. H. Eberle** (1998) Auftreten aromatischer Sulfonate in Industrieabwasser, Flußwasser, Uferfiltrat und in der Trinkwasseraufbereitung. *Vom Wasser* **90** 121–134 [4](#), [9](#), [9](#), [9](#), [9](#), [9](#), [9](#), [11](#), [30](#), [101](#), [101](#), [122](#), [123](#)
- [17] **M. A. Kertesz, A. M. Cook, T. Leisinger** (1994) Microbial metabolism of sulfur- and phosphorus-containing xenobiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* **15** 195–215 [4](#)
- [18] **A. M. Cook, H. Laue, F. Junker** (1998) Microbial desulfonation. *FEMS Microbiol. Rev.* **22** 399–419 [4](#)
- [19] **F. Junker, J. A. Field, F. Bangerter, K. Ramsteiner, H.-P. Kohler, C. L. Joannou, J. R. Mason, T. Leisinger, A. M. Cook** (1994) Oxygenation and spontaneous deamination of 2-aminobenzenesulfonic acid in *Alcaligenes* sp. strain 0-1 with subsequent meta ring cleavage and spontaneous desulphonation to 2-hydroxymuconic acid. *Biochem. J.* **300** 429–436 [6](#)

- [20] **B. J. Feigel, H.-J. Knackmuss (1988)** Bacterial catabolism of sulfanilic acid via catechol-4-sulfonic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* **55** 113–117 [6](#)
- [21] **B. J. Feigel, H.-J. Knackmuss (1993)** Synthrophic interactions during degradation of 4-aminobenzenesulfonic acid by a two species bacterial culture. *Arch. Microbiol.* **159** 124–130 [6](#)
- [22] **M. Contzen, R.-M. Wittich, H.-J. Knackmuss, A. Stolz (1996)** Degradation of benzene 1,3-disulfonate by a mixed bacterial culture. *FEMS Microbiol. Lett.* **136** 45–50 [6, 6](#)
- [23] **C. Brillon, W. Beckmann, H.-J. Knackmuss (1981)** Catabolism of naphthalenesulfonic acids by *Pseudomonas* sp. a3 and *Pseudomonas* sp. c22. *Appl. Environ. Microbiol.* **42** (1) 44–55 [6, 8](#)
- [24] **B. Nörtemann, J. Baumgarten, H. G. Rast, H.-J. Knackmuss (1986)** Bacterial communities degrading amino- and hydroxynaphthalene-2-sulfonates. *Appl. Environ. Microbiol.* **52** (5) 1192–1202 [6, 8, 95, 96, 98, 100](#)
- [25] **B. Nörtemann, H.-J. Knackmuss (1988)** Abbau sulfonierter Aromaten. *GWF: Wasser/Abwasser* **129** (1) 75–79 [6, 101, 103, 104](#)
- [26] **B. Nörtemann, A. E. Kuhm, H.-J. Knackmuss, A. Stolz (1994)** Conversion of substituted naphthalenesulfonates by *Pseudomonas* sp. BN6. *Arch. Microbiol.* **161** 320–327 [6, 95, 96, 98](#)
- [27] **B. Nörtemann, D. C. Hempel**, Application of adapted bacterial cultures for the degradation of xenobiotic compounds in industrial waste water. **A. Martin** (Hg.) *Biological degradation of wastes*, Elsevier, Amsterdam, New York, 1991. 261–279 [6](#)
- [28] **T. Ohe, T. Ohmoto, Y. Kobayashi, A. Sato, Y. Watanbe (1990)** Metabolism of naphthalenesulfonic acids by *Pseudomonas* sp. TA-2. *Agric. Biol. Chem.* **54** (3) 669–675 [6, 6](#)
- [29] **H. H. Locher, D. Zürrer, O. Höglinger, T. Leisinger, A. M. Cook (1991)** Sulphobenzoate 3,4-dioxygenase - purification and properties of a desulphonative 2-component enzyme system from *Comamonas testosteroni* T-2. *Biochem. J.* **274** 833–842 [6](#)
- [30] **R. M. Wittich, H. G. Rast, H.-J. Knackmuss (1988)** Degradation of naphthalene-2,6- and naphthalene-1,6-disulfonic acid by a *Moxarella* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** 1842–1847 [6, 6](#)

- [31] **D. Zürrer, A. M. Cook, T. Leisinger (1987)** Microbial desulfonation of substituted naphthalenesulfonic acids and benzenesulfonic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **53** (7) 1459–1463 [6](#)
- [32] **M. A. Kertesz, P. Kölbener, H. Stockinger, S. Beil, A. M. Cook (1994)** Desulfonation of linear alkylbenzenesulfonate surfactants and related compounds by bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** (7) 2296–2303 [6](#), [8](#)
- [33] **C. J. Soeder, M. Luther, H. Kneifel (1988)** Abbaupotential von Mikroalgen unter besonderer Berücksichtigung der Desulfonierung aromatischer Sulfonsäuren. *GWF: Wasser/Abwasser* **129** 82–85 [6](#)
- [34] **M. Luther, C. J. Soeder (1987)** Some naphthalene sulfonic acids as sulfur source for the green microalga, *Scenedesmus obliquus*. *Chemosphere* **16** 1565–1578 [6](#)
- [35] **J. Ruff, T. Hitzler, U. Rein, A. Ritter, A. M. Cook (1999)** Bioavailability of water-polluting sulfoaromatic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52** 446–450 [6](#)
- [36] **H. Kneifel, K. Elmendorff, E. S. C. J. Hegewald (1997)** Biotransformation of 1-naphthalenesulfonic acids by the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Arch. Microbiol.* **167** 32–37 [6](#), [6](#)
- [37] **X. Gayte, D. Fontvieille, K. J. Wilkinson (1999)** Bacterial stimulation in mixed cultures of bacteria and organic carbon from river and lake water. *Microb. Ecol.* **38** 285–295 [7](#)
- [38] **C. Brillon, W. Beckmann, M. Hellwig, H.-J. Knackmuss (1981)** Enrichment and isolation of naphthalenesulfonic acid-utilizing *Pseudomonads*. *Appl. Environ. Microbiol.* **42** (1) 39–43 [7](#)
- [39] **B. W. Altenbach (1996)** Determination of substituted benzene- and naphthalenesulphonates in waste water and their behaviour in sewage treatment. Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich. Diss. ETH No. 11 437 [7](#), [8](#), [9](#), [9](#), [11](#), [47](#), [101](#), [103](#), [103](#), [104](#), [108](#), [108](#), [123](#)
- [40] **I. Janssens, T. Tanghe, W. Verstraete (1997)** Micropollutants: A bottleneck in sustainable wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* **35** (10) 13–26 [8](#)
- [41] **T. N. P. Bosma, E. M. W. Ballemans, N. K. Hoekstra, R. A. G. te Welscher, J. G. M. M. Smeenk, G. Schraa, A. J. B. Zehnder (1996)** Biotransformation of organics in soil columns and an infiltration area. *Ground Water* **34** (1) 49–56 [8](#)

- [42] **I. S. Kim, F. I. Sasinis, D. K. Rishi, R. D. Stephens, M. A. Brown (1991)** Determination of aromatic sulfonic acids in aqueous environmental samples by anion-exchange chromatography coupled to particle beam mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **559** 177–183 [8](#), [9](#), [11](#), [11](#), [23](#), [23](#), [42](#)
- [43] **E. González-Mazo, M. Honing, D. Barceló, P. Gomez (1997)** Monitoring long-chain intermediate products from the degradation of linear alkylbenzene sulfonates in the marine environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography/ion spray mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* **31** 504–510 [8](#), [8](#), [11](#)
- [44] **T. W. Federle, N. R. Itrich (1997)** Comprehensive approach for assessing the kinetics of primary and ultimate biodegradation of chemicals in activated sludge: application to linear alkylbenzene sulfonates. *Environ. Sci. Technol.* **31** (4) 1178–1184 [8](#), [8](#)
- [45] **M. J.-F. Suter, R. Reiser, W. Giger (1996)** Differentiation of linear and branched alkylbenzenesulphonates by GC/tandem MS. *J. Mass Spectrom.* **31** (4) 357–363 [8](#), [11](#)
- [46] **J. A. Field, D. J. Miller, T. M. Field, S. B. Hawthorne, W. Giger (1992)** Quantitative determination of sulphonated aliphatic and aromatic surfactants in sewage sludge by ion-pair/supercritical fluid extraction and derivatization gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* **64** 3161–3167 [8](#), [11](#)
- [47] **R. Reiser, H. O. Toljander, W. Giger (1997)** Determination of alkylbenzenesulfonates in recent sediments by gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* **69** (23) 4923–4930 [8](#), [8](#), [11](#), [23](#)
- [48] **C. Kanz, M. Nölke, T. Fleischmann, H.-P. Köhler, W. Giger (1998)** Separation of chiral biodegradation intermediates of linear alkylbenzenesulfonates by capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **70** 913–917 [8](#), [11](#), [12](#)
- [49] **A. M. Nielsen, L. N. Britton, C. Beall, T. P. McCormick, G. L. Russel (1997)** Biodegradation of coproducts of commercial linear alkylbenzene sulfonate. *Environ. Sci. Technol.* **31** 3397–3404 [8](#)
- [50] **T. E. Ward, R. J. Larson (1989)** Biodegradation kinetics of linear alkylbenzene sulfonate in sludge-amended agricultural soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **17** 119–130 [8](#)
- [51] **R. Diekmann, B. Nörtemann, D. C. Hempel, H.-J. Knackmuss (1988)** Degradation of 6-aminonaphthalene-2-sulfonic acid by mixed cultures: Kinetic analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29** 85–88 [8](#)

- [52] **L. S. Sheldon, R. A. Hites (1978)** Organic compounds in the Delaware River. *Environ. Sci. Technol.* **12** 1188–1194 [8](#)
- [53] **F. T. Lange, M. Wenz, H.-J. Brauch (1995)** Trace-level determination of aromatic sulfonates in water by on-line ion-pair extraction/ion-pair chromatography and their behaviour in the aquatic environment. *J. High Resol. Chromatogr.* **18** (4) 243–252 [8](#), [9](#), [11](#), [11](#), [47](#), [47](#), [101](#), [123](#)
- [54] **S. Fichtner, F. T. Lange, W. Schmidt, H.-J. Brauch (1995)** Determination of aromatic sulfonates in the river Elbe by on-line ion-pair extraction and ion-pair chromatography. *Fresenius J. Anal. Chem.* **353** 57–63 [8](#), [11](#), [11](#), [47](#), [47](#), [101](#)
- [55] **R. Krull, B. Nörtemann, A. Kuhn, D. C. Hempel, H.-J. Knackmuss (1991)** Der bakterielle Abbau von 2,6-Naphthalindisulfonsäure mit immobilisierten Mikroorganismen. *GWF: Wasser/Abwasser* **132** (6) 352–354 [8](#), [101](#), [103](#), [104](#), [107](#)
- [56] **H. Pack, K. Popinga, D. C. Hempel (1994)** Einfluß binärer Schwermetallgemische auf immobilisierte Bakterien. *GWF: Wasser/Abwasser* **135** (12) 743–747 [8](#)
- [57] **R. Krull, D. C. Hempel (1994)** Biodegradation of naphthalenesulphonic acid-containing sewages in a two-stage treatment plant. *Bioprocess Engineering* **10** 229–234 [8](#), [69](#), [101](#), [103](#), [103](#), [104](#), [107](#), [108](#), [123](#)
- [58] **R. P. Schwarzenbach, W. Giger, E. Hoehn, J. K. Schneider (1983)** Behavior of organic compounds during infiltration of river water to groundwater. Field studies. *Environ. Sci. Technol.* **17** 472–479 [9](#)
- [59] **M. C. Alonso, M. Castillo, D. Barceló (1999)** Solid-phase extraction procedure of polar benzene- and naphthalenesulfonates in industrial effluents followed by unequivocal determination with ion-pair chromatography/electrospray-mass spectrometry. *Anal. Chem.* **71** (13) 2586–2593 [9](#), [11](#)
- [60] **M. C. Alonso, D. Barceló (1999)** Tracing polar benzene- and naphthalenesulfonates in untreated industrial effluents and water treatment works by ion-pair chromatography-fluorescence and electrospray-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **20** 1–21 [9](#), [11](#), [23](#), [43](#)
- [61] **T. Storm, T. Reemtsma, M. Jekel (1999)** Use of volatile amines as ion-pairing agents for the high-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of aromatic sulfonates in industrial waste water. *J. Chromatogr. A* **854** 175–1185 [9](#), [11](#), [23](#), [25](#), [43](#), [44](#), [46](#)

- [62] **T. Storm, T. Reemtsma, M. Jekel (2000)** Aromatic sulfonates in a textile waste water - analysis by high performance liquid chromatography - mass spectrometry. *Vom Wasser* **94** 161–175 [9](#), [11](#)
- [63] **M. J.-F. Suter, S. Riedicker, C. Zipper, H. P. E. Kohler, W. Giger (1997)** Polar organic compounds in landfill leachates. *Analusis* **25** (7) M23–M25 [9](#), [9](#), [11](#)
- [64] **P. M. Hancock, S. J. G. White, D. A. Catlow, P. J. Baugh, G. A. Bonwick, D. H. Davies (1997)** Determination of the mitins, sulcofuron and flucofuron, using liquid chromatography combined with negative-ion electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11** 195–20 [9](#), [9](#), [11](#)
- [65] **M. J.-F. Suter, S. Riedicker, W. Giger (1999)** Selective determination of aromatic sulfonates in landfill leachates and groundwater using microbore liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Anal. Chem.* **71** 897–904 [9](#), [9](#), [11](#), [11](#), [23](#), [25](#), [25](#), [25](#)
- [66] **S. Riedicker, M. J.-F. Suter, W. Giger (2000)** Benzene- and naphthalenesulfonates in leachates and plumes of landfills. *Wat. Res.* **34** (7) 2069–2079 [9](#), [9](#), [11](#), [11](#), [11](#), [23](#), [25](#)
- [67] **S. Riedicker, S. Ruckstuhl, M. J.-F. Suter, A. M. Cook, W. Giger (2000)** p-Toluensulfonate in landfill leachates: Leachability from foundry sands and aerobic biodegradation. *Environ. Sci. Technol.* **34** 2156–2161 [9](#), [9](#), [11](#), [23](#)
- [68] **S. Riedicker (1999)** Benzene- and naphthalenesulfonates in landfill leachates and contaminated groundwater. Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich. Diss. ETH No. 12 974 [9](#), [9](#), [11](#), [11](#)
- [69] **B. W. Altenbach, W. Giger (1995)** Determination of benzene- and naphthalenesulfonates in waste water by solid-phase extraction with graphitized carbon black and ion-pair liquid chromatography with UV-detection. *Anal. Chem.* **67** 2325–2333 [9](#), [9](#), [11](#), [47](#), [101](#), [103](#), [108](#), [123](#)
- [70] **R. Loos, J. Riu, M. C. Alonso, D. Barceló (2000)** Analysis of polar hydrophilic aromatic sulfonates in waste water treatment plants by CE/MS and LC/MS. *J. Mass Spectrom.* **35** 1197–1206 [9](#), [11](#), [11](#)
- [71] **F. T. Lange, M. Wenz, H.-J. Brauch (1994)** Trace-level detection of aromatic sulfonates in the aquatic environment by a fully automatic on-line HPLC method. *Proc. Int. Symp. Capill. Chromatogr.* **16** 317–325 [9](#), [11](#), [11](#), [47](#), [101](#)

- [72] **O. Zerbinati, M. Vincenti, S. Pittavino, M.-C. Gennaro (1997)** Fate of aromatic sulfonates in the fluvial environment. *Chemosphere* **35** (10) 2295–2305 [9](#)
- [73] **E. Pocurull, C. Aguilar, M. C. Alonso, D. Barceló, F. Borrull, R. M. Marcé (1999)** On-line solid-phase extraction-ion-pair liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the trace determination of naphthalene monosulphonates in water. *J. Chromatogr. A* **854** 187–195 [9](#), [11](#), [23](#), [25](#), [25](#), [43](#), [43](#), [47](#)
- [74] **P. Literáthy, F. László (1999)** Micropollutants in the Danube river basin. *Wat. Sci. Tech.* **40** (10) 17–26 [9](#)
- [75] **R. A. Gimeno, R. M. Marcé, F. Borrull (2001)** Determination of aromatic sulfonates in coastal water by on-line ion-pair solid phase extraction/ion-pair liquid chromatography with UV detection. *Chromatographia* **53** (1/2) 22–26 [9](#), [11](#), [20](#), [47](#)
- [76] **E. R. Brouwer, J. Slobodnik, H. Lingeman, U. A. T. Brinkman (1992)** Determination by reversed-phase ion-pair chromatography of aromatic sulfonic acids in surface water. *Analisis* **20** 121–126 [9](#), [11](#), [47](#), [101](#), [123](#)
- [77] **C. Redín (1996)** Synthese dimerer Kondensationsprodukte von 2-Naphthalinsulfonat mit Formaldehyd und deren flüssigkeitschromatographische Bestimmung in technischen Produkten, in industriellen Abwässern und im Rhein. Diplomarbeit, Universität Karlsruhe [9](#)
- [78] **C. Wolf (1999)** Untersuchungen zum chemischen Verhalten von Kondensationsstufen organischer Stoffe in aquatischen Systemen am Beispiel der sulfonierten Naphthalin-Formaldehyd-Kondensate. Dissertation, Universität Karlsruhe [9](#), [12](#), [32](#), [34](#), [123](#)
- [79] **C. Wolf, T. Storm, F.-T. Lange, T. Reemtsma, H.-J. Brauch, S. Eberle, M. Jekel (2000)** Analysis of sulfonated naphthalene-formaldehyd condensates by ion-pair chromatography and their quantitative determination from aqueous environmental samples. *Anal. Chem.* **72** 5466–5472 [9](#), [11](#), [11](#), [33](#), [34](#), [34](#)
- [80] **T. Reemtsma (1996)** Methods of analysis of polar aromatic sulfonates from aquatic environments. *J. Chromatogr. A* **733** 473–489 [10](#), [46](#)
- [81] **S. Schullerer, H.-J. Brauch, F. H. Frimmel (1990)** Bestimmung organischer Sulfonsäuren in Wasser durch Ionenpaar-Chromatographie. *Vom Wasser* **75** 83–97 [10](#), [11](#)

- [82] **J. Tolls, M. Haller, I. d. Graaf, M. A. T. C. Thijssen, D. T. H. M. Sijm (1997)** Bioconcentration of LAS: Experimental determination and extrapolation to environmental mixtures. *Environ. Sci. Technol.* **31** 3426–3431 [11](#)
- [83] **C. Vogt, K. Heining (1999)** Trace analysis of surfactants using chromatographic and electrophoretic techniques. *Fresenius J. Anal. Chem.* **363** 612–618 [11](#), [11](#)
- [84] **P. Jandera, J. Fischer, V. Staněk, M. Kucérová, P. Zvoníček (1996)** Separation of aromatic sulphonic acid dye intermediates by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **738** 201–213 [11](#), [11](#)
- [85] **S. Angelino, A. Bianco Prevot, M. C. Gennaro, E. Pramauro (1999)** Ion-interaction high-performance liquid chromatography and micellar electrokinetic capillary chromatography: Two complementary techniques for the separation of aromatic sulfonated compounds. *J. Chromatogr. A* **845** 257–271 [11](#), [11](#)
- [86] **C. Prandi, T. Venturini (1981)** Retention behavior of aromatic sulfonic acids in ion-pair reversed-phase column liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **19** 308–314 [11](#)
- [87] **P. Jandra, S. Bunceková, J. Planeta (2000)** Separation of isomeric naphthalenesulphonic acids by micro high-performance liquid chromatography with mobile phases containing cyclodextrin. *J. Chromatogr. A* **871** 139–152 [11](#)
- [88] **R. Ganesh, G. Boardman, D. Michelsen (1994)** Fate of azodyes in sludges. *Wat. Res.* **28** (6) 1367–1376 [11](#), [84](#)
- [89] **D. Groß, H. Rooß (1983)** HPLC-Untersuchung von Betonzusatzmitteln. *Betonwerk + Fertigteiltechnik* **5** 312–317 [11](#)
- [90] **R. J. Flatt, Y. F. Houst, R. Oesch, H. Hofman, J. Widmer, U. Sulser, U. Maeder, T. A. Bürge (1998)** Analysis of superplasticizers in concrete. *Analisis* **26** (2) M28–M35 [11](#)
- [91] **T. G. Miller (1985)** Characterisation of neutralized β -naphthalenesulfonic acid and formaldehyd condensates. *J. Chromatogr.* **347** 249–256 [11](#), [30](#), [30](#)
- [92] **M. Piotte, F. Bossányi, F. Perreault, C. Jolicœur (1995)** Characterization of poly(naphthalenesulfonate) salts by ion-pair chromatography and ultrafiltration. *J. Chromatogr. A* **704** 377–385 [11](#), [30](#), [30](#), [32](#)

- [93] **O. Zerbinati, G. Ostacoli, D. Gastaldi, V. Zelano (1993)** Determination and identification by high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry of twenty-three aromatic sulphonates in natural waters. *J. Chromatogr.* **640** 231–240 [11](#)
- [94] **T. P. Knepper, F. Sacher, F. T. Lange, H. J. Brauch, F. Karenbrock, O. Roerden, K. Lindner (1999)** Detection of polar organic substances relevant for drinking water. *Waste Management* **19** 77–99 [11](#), [123](#)
- [95] **A. Bruins, T. R. Covey, J. D. Henion (1987)** Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **59** 2642–2646 [11](#), [11](#), [21](#), [23](#), [23](#), [23](#), [25](#)
- [96] **G. Socher, R. Nussbaum, K. Rissler, E. Lankmayr (2001)** Analysis of sulfonated compounds by reversed-phase ion-pair chromatography - mass spectrometry with on-line removal of non-volatile tetrabutyl ammonium ion-pairing agents. *Chromatographia* **54** (1/2) 65–70 [11](#), [43](#)
- [97] **M. Holčápek, P. Jandera, P. Zderadička (2001)** High performance liquid chromatography-mass spectrometric analysis of sulfonated dyes and intermediates. *J. Chromatogr. A* **926** 175–186 [11](#), [44](#)
- [98] **C. Ràfols, D. Barceló (1997)** Determination of mono- and disulphonated azo dyes by liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **777** 177–192 [11](#)
- [99] **M. Yamada, Y. Kato, M. Nakamura, T. Yamada, T. Maitani, Y. Goda (1998)** Structural determination of unknown subsidiary colors in commercial food red nos. 2 and 102. *Chem. Pharm. Bull.* **46** (3) 494–499 [11](#)
- [100] **A. Bruins, L. O. G. Weidolf, J. D. Henion, W. L. Budde (1987)** Determination of sulfonated azo dyes by liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **59** 2647–2652 [11](#), [21](#), [23](#), [23](#)
- [101] **J. Riu, I. Schönsee, D. Barceló (1998)** Determination of sulfonated azo dyes in groundwater and industrial effluents by automated solid-phase extraction followed by capillary electrophoresis/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **33** 653–663 [11](#)
- [102] **M. A. McLean, R. B. Freas (1989)** Enhanced analysis of sulfonated azo dyes using liquid chromatography/thermospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **61** 2054–2058 [11](#), [23](#), [23](#)

- [103] **J. Yinon, T. L. Jones, L. D. Betowsky (1989)** High sensitivity thermospray ionization mass spectrometry of dyes. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **18** 445–449 [11](#)
- [104] **P. O. Edlund, E. D. Lee, J. D. Henion, W. L. Budde (1989)** The determination of sulfonated azo dyes in municipal wastewater by ion spray liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **18** 233–240 [11](#)
- [105] **A. J. Borgerding, R. A. Hites (1994)** Identification and measurement of food and cosmetic dyes in a municipal wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* **28** 1278–1284 [11](#)
- [106] **C. Crescenzi, A. Di Corcia, A. Marcomini, G. Pojana, R. Samperi (2001)** Method development for trace determination of poly(naphthalenesulfonate)-type pollutants in water by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **923** 97–105 [11](#)
- [107] **D. M. Roy, V. G., F. D. Tamás, G. Pályi, B. Bartha (1984)** Application of GPC for the analysis of the oligomer distribution of naphthalene-based superplasticizers. *Cem. Concr. Res.* **14** 439–442 [11](#)
- [108] **G. Socher, R. Nussbaum, K. Rissler, E. Lankmayr (2001)** Analysis of sulfonated compounds by ion-exchange high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **912** 53–60 [11](#), [12](#), [23](#), [42](#), [44](#)
- [109] **W. D. Pfeffer, E. S. Yeung (1991)** Electroosmotically driven electrochromatography of anions having similar electrophoretic mobilities by ion pairing. *J. Chromatogr.* **557** 125–136 [11](#), [11](#)
- [110] **S. J. Kok, E. H. M. Koster, C. Gooijer, N. H. Velthorst, U. A. T. Brinkman (1996)** Separation of twenty-one naphthalene sulphonates by means of capillary electrophoresis. *J. High Resol. Chromatogr.* **19** 99–104 [11](#), [45](#), [47](#), [101](#), [137](#)
- [111] **M. J. Cugat, F. Borrul, M. Calull (1997)** Comparative study of capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography for the separation of twelve aromatic sulphonates. *Chromatographia* **46** (3/4) 240–208 [11](#)
- [112] **J. Fischer, P. Jandera, V. Stanek (1997)** Effects of the working electrolyte (cyclodextrin type and pH) on the separation of aromatic sulphonic acids by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **772** 385–396 [11](#)

- [113] **E. Wada, T. Takayanagi, S. Motomizu (1998)** Capillary zone electrophoretic separation of aromatic anions utilizing enhanced associability with viologen cations. *Analyst* **123** 493–495 [11](#)
- [114] **K. Heinig, C. Vogt, G. Werner (1998)** Determination of linear alkylbenzenesulfonates in industrial and environmental samples by capillary electrophoresis. *Analyst* **123** 349–353 [11](#)
- [115] **P. Blatny, C.-H. Fischer, A. Rizzi, E. Kenndler (1995)** Linear polymers applied as pseudo-phases in capillary zone electrophoresis of azo compounds used as textile dyes. *J. Chromatogr. A* **717** 157–166 [11](#)
- [116] **A. J. Nitowsky, A. A. Al-Mudamgha, P. K. Chickering (1995)** Capillary electrophoretic analysis of sodium salt of naphthalenesulfonic acid formaldehyde polymer in waste water using a polyethylene glycol-coated capillary. *J. Chromatogr. A* **717** 363–370 [11](#), [12](#), [30](#)
- [117] **W. M. A. Niessen, A. P. Tinke (1995)** Liquid chromatography-mass spectrometry. General principles and instrumentation. *J. Chromatogr. A* **703** 37–57 [14](#), [20](#), [42](#)
- [118] **F. W. McLafferty**, Interpretation of mass spectra. University Science Books, Mill Valley, 1980, 3. Aufl. [13](#), [16](#), [20](#), [29](#)
- [119] **S. E. Stein, D. R. Scott (1994)** Optimization and testing of mass spectral library search algorithms for compound identification. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5** 859–866 [13](#)
- [120] **S. E. Stein (1995)** Chemical structure identification by mass spectral library searching. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **6** 644–655 [13](#)
- [121] **S. E. Stein (1999)** An integrated method for spectrum extraction and compound identification from gas chromatography/mass spectrometry data. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10** 770–781 [13](#)
- [122] **R. A. Silva-Wilkinson, L. P. Burkhard, B. R. Sheedy, G. M. DeGraeve, R. A. Lordo (1999)** A simple comparison of mass spectral search results and implications for environmental screening analysis. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **36** 109–114 [13](#)
- [123] **P. Ausloos, C. L. Clifton, S. G. Lias, A. I. Mikaya, S. E. Stein, D. V. Tchekhovskoi, D. O. Sparkman, V. Zaikin, D. Zhu (1999)** The critical evaluation of a comprehensive mass spectral library. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10** 287–299 [13](#)

- [124] **S. E. Stein (1994)** Estimating probabilities of correct identification from results of mass spectral library searches. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5** 316–323 [13](#)
- [125] **A. Mathias, A. E. Williams, D. E. Games, A. H. Jackson (1976)** Field desorption mass spectra of involatile sulphonic acids, sulphonates and dyestuff materials. *Org. Mass Spectrom.* **11** 266–270 [14](#), [23](#)
- [126] **D. M. Parees, S. D. Hanton, P. A. Cornelio Clark, D. A. Willcox (1998)** Comparison of mass spectrometric techniques for generating molecular weight information on a class of ethoxylated oligomers. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9** 282–291 [14](#), [14](#), [31](#)
- [127] **J. J. Monaghan, M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler (1982)** Fast atom bombardment mass spectra of involatile azo dyestuffs. *Org. Mass Spectrom.* **17** 569–574 [14](#), [23](#), [25](#)
- [128] **S. D. Richardson, J. M. McGuire, A. D. J. Thruston, G. L. Baughman (1992)** Structural characterization of sulfonated azo dyes using liquid chromatography secondary ion mass spectrometry/tandem mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* **27** 289–299 [14](#)
- [129] **B. van Blaar**, Ionization methods in LC-MS and LC-MS-MS (TSP, APCI, ESP and CF-FAB). **D. Barceló** (Hg.) Application of LC-MS in environmental chemistry, Elsevier, Amsterdam, 1996, Bd. 59 aus *J. Chromatogr. Series*. 1. Aufl., 71–181 [14](#), [14](#), [14](#), [14](#)
- [130] **R. B. Cole**, Electrospray ionization mass spectrometry. Fundamentals, instrumentation, and applications. Wiley-Interscience, New York, 1997, 1. Aufl. [14](#), [15](#)
- [131] **M. Karas, F. Hillenkamp (1988)** LDI of proteins with molecular weight exceeding 10000 Daltons. *Anal. Chem.* **60** (11) 2299–2301 [14](#)
- [132] **K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida (1988)** Protein and polymer analysis up to m/z 100000 by LD-TOF-MS. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2** 151–153 [14](#)
- [133] **W. Weinmann, A. Wiedemann, B. Eppinger, M. Renz, M. Svoboda (1999)** Screening for drugs in serum by electrospray ionization/collision-induced dissociation and library searching. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10** 1028–1037 [14](#)
- [134] **J. M. Hough, C. A. Haneey, R. D. Voyksner, R. D. Bereman (2000)** Evaluation of electrospray transport CID for the generation of searchable libraries. *Anal. Chem.* **72** 2265–2270 [14](#)

- [135] **P. Kebarle, L. Tang (1993)** From ions in solution to ions in the gas phase. *Anal. Chem.* **65** (22) 972A–986A [15](#)
- [136] **P. Kebarle, Y. Ho**, On the mechanism of electrospray mass spectrometry. **R. B. Cole** (Hg.) *Electrospray ionization mass spectrometry. Fundamentals, instrumentation, and applications*, Wiley-Interscience, New York, 1997. 1. Aufl., 3–63 [15](#)
- [137] **T. L. Constantopoulos, G. S. Jackson, C. G. Enke (2000)** Challenges in achieving a fundamental model for ESI. *Anal. Chim. Acta* **406** 37–52 [15](#)
- [138] **P. Kebarle, M. Peschke (2000)** On the mechanism by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. *Anal. Chim. Acta* **406** 11–35 [15](#)
- [139] **J. F. de la Mora, G. J. Van Berkel, C. G. Enke, R. B. Cole, M. Martinez-Sanchez, J. B. Fenn (2000)** Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **35** 939–952 [15](#)
- [140] **C. Collette, E. D. Pauw (1998)** Calibration of internal energy distribution of ions produced by electrospray. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12** 165–170 [15](#)
- [141] **C. G. Enke (1997)** A predictive model for matrix and analyte effects in electrospray ionization of singly-charged ionic analytes. *Anal. Chem.* **69** 4885–4893 [15](#), [15](#)
- [142] **T. L. Constantopoulos, G. S. Jackson, C. G. Enke (1999)** Effects of salt concentration on analyte response using electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10** 625–634 [15](#)
- [143] **E. de Hoffmann (1996)** Tandem mass spectrometry: a primer. *J. Mass Spectrom.* **31** (2) 129 [16](#), [16](#)
- [144] **J. C. Schwartz, A. P. Wade, C. G. Enke, R. G. Cooks (1990)** Systematic delineation of scan modes in multidimensional mass spectrometry. *Anal. Chem.* **62** 1809–1818 [16](#)
- [145] **M. L. Gross (1994)** Accurate masses for structure confirmation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5** 57 [16](#), [34](#)
- [146] **W. J. McMurray, B. N. Green, S. R. Lipsky (1966)** Fast scan high resolution mass spectrometry. *Anal. Chem.* **38** (9) 1194–1204 [16](#), [34](#), [34](#)

- [147] **A. G. Marshall, C. L. Hendrickson, G. S. Jackson (1998)** Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer. *Mass Spectrom. Rev.* **17** 1–35 [16](#)
- [148] **R. E. March (1997)** An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **32** 351–369 [16](#)
- [149] **P. S. H. Wong, R. G. Cooks (1997)** Ion trap mass spectrometry. *Current separations* **16** (3) 85–92 [16](#)
- [150] **P. Miller, M. B. Denton (1986)** The quadrupole mass filter: Basic operating concepts. *J. Chem. Educ.* **63** (7) 617–622 [18](#)
- [151] **M. Guilhaus (1995)** Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry - Physical and instrumental concepts. *J. Mass Spectrom.* **30** 1519–1532 [19](#)
- [152] **M. Guilhaus, D. Selby, V. Mlynski (2000)** Orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **19** 65–107 [20](#)
- [153] **H. R. Morris, T. Paxton, A. Dell, J. Langhorne, M. Berg, R. S. Bordoli, J. B. Hoyes, R. H. Bateman (1996)** High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10** 889–896 [20](#), [40](#)
- [154] **R. J. Cotter (1999)** The new time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **71** (13) 445A–451A [20](#)
- [155] **J. Abian (1999)** The coupling of gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **34** 157–168 [20](#)
- [156] **M. Linscheid, D. G. Westmoreland (1994)** Application of liquid chromatography-mass spectrometry. *Pure & Appl. Chem.* **66** (9) 1813–1830 [20](#)
- [157] **J. Slobodník, U. A. T. Brinkman**, LC/MS interfacing systems in environmental analysis: application to polar pesticides, Bd. 21 aus *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*. Elsevier, Amsterdam, 2000, 1. Aufl. [20](#)
- [158] **K. B. Tomer (2001)** Separation combined with mass spectrometry. *Chem. Rev.* **101** 297–328 [20](#), [21](#)
- [159] **C. Leonard, R. Sacks (1999)** Tunable-column selectivity and time-of-flight detection for high-speed GC/MS. *Anal. Chem.* **71** 5177–5184 [20](#), [35](#)

- [160] **D. Barceló**, Application of LC-MS in environmental chemistry, Bd. 59 aus *J. Chromatogr. Series*. Elsevier, Amsterdam, 1996, 1. Aufl. 21
- [161] **J. J. Monaghan, M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler (1983)** Fast atom bombardment mass spectrometry of involatile sulphonated and phosphonated azo dyestuffs. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **46** 447–450 23, 25
- [162] **S. L. Hunt, F. E. Behr, L. D. Winter, P. A. Lyon, R. L. Cerny, K. B. Tomer, M. L. Gross (1987)** Fast atom bombardment combined with tandem mass spectrometry for structural studies of substituted cyclic perfluorosulfonates. *Anal. Chem.* **59** 2653–2658 23, 25
- [163] **J. J. Monaghan, W. E. Morden (1990)** Fast atom bombardment tandem mass spectrometry screening procedure for the presence of involatile sulphonated dyestuff intermediates. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **4** (10) 436–439 23, 25
- [164] **L. K. Pannel, E. A. Sokolski, H. M. Fales (1985)** Californium-252 plasma desorption mass spectrometry of cationic, anionic and neutral dyes. *Anal. Chem.* **57** 1060–1067 23
- [165] **A. G. Sullivan, S. J. Gaskell (1997)** The analysis of polysulfonated azo dyestuffs by matrix assisted laser desorption/ionization and electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11** –809 23, 23, 30
- [166] **S. J. Gaskell (1997)** Electrospray: Principles and practice. *J. Mass Spectrom.* **32** 677–688 23
- [167] **J. A. Ballantine, D. E. Games, P. S. Slater (1997)** The use of diethylamine to determine the number of sulfonate groups present within polysulfonated alkali metal salts by electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11** 630–637 23
- [168] **M. Holcapek, P. Jandera, J. Prikryl (1999)** Analysis of sulphonated dyes and intermediates by electrospray mass spectrometry. *Dyes and Pigments* **43** 127–137 23, 23
- [169] **J. J. Conboy, J. D. Henion, M. W. Martin, J. A. Zweigenbaum (1990)** Ion chromatography/mass spectrometry for the determination of organic ammonium and sulfate compounds. *Anal. Chem.* **62** 800–807 23, 42
- [170] **M. Castillo, M. C. Alonso, J. Riu, D. Barceló (1999)** Identification of polar, ionic, and highly water soluble organic pollutants in untreated industrial wastewaters. *Environ. Sci. Technol.* **33** 1300–1306 23

- [171] **A. G. Sullivan, R. Garner, S. J. Gaskell (1998)** Structural analysis of sulfonated monoazo dyestuff intermediates by electrospray tandem mass spectrometry and matrix assisted laser desorption/ionization post source decay mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12** 1207–1215 [25](#), [25](#), [30](#)
- [172] **M. L. Gross (1992)** Charge-remote fragmentations: Method, mechanism, and application. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **118/119** 137–165 [27](#)
- [173] **R. W. Binkley, T. W. Fletcher, M. J. S. Tevesz, W. Winnik, B. Zhong (1993)** Rearrangement of aromatic sulfonate anions in the gas phase. *Org. Mass Spectrom.* **28** 769–772 [27](#)
- [174] **R. A. J. O’Hair, J. H. Bowie**, Organic negative ions: Structure, reactivity, and mechanism. **M. E. Rose** (Hg.) *Mass Spectrometry*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1989, Bd. 10 aus *Specialist Periodical Report: Mass Spectrometry*. 145–180 [27](#)
- [175] **L. Reeks, P. C. H. Eichinger, J. H. Bowie (1993)** Ortho-rearrangements of o-alkylphenoxide anions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **7** 286–287 [27](#), [29](#)
- [176] **P. C. H. Eichinger, S. Dua, J. H. Bowie (1997)** Ring cleavages of dimethylphenoxide anions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11** 1996–1998 [27](#), [27](#)
- [177] **S. Dua, J. H. Bowie (1997)** Mobility of anions within anion-neutral complexes. Cross ring hydride ion migration upon collisional activation of the para-formylbenzyloxy anion. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11** 1959–1960 [27](#), [27](#)
- [178] **T. W. Fletcher, B. Winnik, W. Winnik (1996)** Fragmentation of collisionally activated 2-, 4- and 5-methyl-3-hydroxyphenoxide anions in the gas phase. *J. Mass Spectrom.* **31** 377–382 [27](#), [27](#)
- [179] **A. A. Jeknavorian, M. A. Mabud, E. F. Barry, J. J. Litzau (1998)** Novel pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometric techniques for the characterization of chemical additives in portland cement and concrete. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **46** 85–100 [30](#)
- [180] **R. H. Griffey, H. Sasmor, M. J. Greig (1997)** Oligonucleotide charge states in negative ionization electrospray-mass spectrometry are a function of solution ammonium ion concentration. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **8** 155–160 [30](#), [46](#)

- [181] **C. G. Huber, M. R. Buchmeiser (1998)** On-line cation exchange for the suppression of adduct formation in negative-ion electrospray mass spectrometry of nucleic acids. *Anal. Chem.* **70** 5288–5295 [30](#), [47](#)
- [182] **S. M. Hunt, M. Sheil, M. Belov, P. J. Derrick (1998)** Probing the effect of cone potential in the electrospray ion source: Consequences for the determination of molecular weight distributions of synthetic polymers. *Anal. Chem.* **70** (9) 1812–1822 [31](#)
- [183] **M. W. F. Nielen (1996)** Characterization of synthetic polymers by size-exclusion chromatography/electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10** 1652–1660 [31](#)
- [184] **M. W. F. Nielen, F. A. Ab Buijtenhuijs (1999)** Polymer analysis by liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **71** 1809–1814 [31](#)
- [185] **K. Biemann, W. McMurray (1965)** Computer-aided interpretation of high resolution mass spectra. *Tetrahedron Lett.* **11** 647–653 [34](#)
- [186] **K. Biemann**, Utility of exact mass measurements. **J. A. McCloskey** (Hg.) *Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, 1990, Bd. 193. 1. Aufl., 295–305 [34](#), [34](#)
- [187] **Editors (1999)** Guidelines for authors. *J. Am. Chem. Soc.* **121** 7A–11A [34](#), [34](#), [38](#), [87](#)
- [188] **R. B. Cody, J. Tamura, B. D. Musselman (1992)** Electrospray ionization/magnetic sector mass spectrometry: Calibration, resolution, and accurate mass measurements. *Anal. Chem.* **64** 1561–1570 [34](#), [37](#)
- [189] **K. I. Burton, J. R. Everett, M. J. Newman, F. S. Pullen, D. S. Richards, A. G. Swanson (1997)** On-line liquid chromatography coupled with high field NMR and mass spectrometry (LC-NMR-MS): a new technique for drug metabolite structure elucidation. *J. Pharm. Bio. Anal.* **15** 1903–1912 [34](#)
- [190] **M. J. Haas (1999)** Fully automated exact mass measurements by high-resolution electrospray ionization on a sector instrument. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13** 381–383 [34](#)
- [191] **N. Huang, M. M. Siegel, G. H. Kruppa, F. H. Laukien (1999)** Automation of a fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer for the acquisition, analysis, and e-mailing of high-resolution exact-mass electrospray ionization mass spectral data. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10** 1166–1173 [34](#)

- [192] **R. D. Burton, K. P. Matuszak, C. H. Watson, J. R. Eyler (1999)** Exact mass measurements using a 7 tesla fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer in a good laboratory practices-regulated environment. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10** 1291–1297 [34](#)
- [193] **C.-G. Hammar, R. Hessling (1971)** Novel peak matching technique by means of a new and combined multiple ion detector-peak matcher device. *Anal. Chem.* **43** (3) 298–306 [34](#)
- [194] **K. F. Blom (1998)** Utility of peak shape analysis in determining unresolved interferences in exact mass measurements at low resolution. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9** 789–798 [34](#), [40](#), [42](#), [42](#)
- [195] **J. Roboz, J. F. Holland, M. A. McDowall, M. J. Hillmer (1988)** Accurate mass measurement in continuous flow fast atom bombardment quadrupole mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2** (4) 64–66 [34](#)
- [196] **K. F. Blom (1988)** Elemental composition from moment analyses of the low-resolution isotope pattern. *Org. Mass Spectrom.* **23** 1994–203 [34](#)
- [197] **A. N. Tyler, E. Clayton, B. N. Green (1996)** Exact mass measurement of polar organic molecules at low resolution using electrospray ionization and a quadrupole mass spectrometer. *Anal. Chem.* **68** (20) 3561–3569 [34](#), [36](#), [37](#), [38](#)
- [198] **R. Kostianen, J. Tuominen, L. Luukkanen, J. Taskinen, B. N. Green (1997)** Accurate mass measurements of some gluconuride derivatives by electrospray low resolution quadrupole mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11** 283–285 [34](#)
- [199] **D. H. Russell, R. D. Edmondson (1997)** High-resolution mass spectrometry and accurate mass measurements with emphasis on the characterization of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **32** 263–276 [34](#)
- [200] **L. Jiang, M. Moini (2000)** Development of multi-ESI-sprayer, multi-atmospheric-pressure-inlet mass spectrometry and its application to accurate mass measurement using time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **72** 20–24 [34](#), [41](#)
- [201] **C. Eckers, J.-C. Wolff, N. J. Haskins, A. B. Sage, K. Giles, R. Bateman (2000)** Accurate mass liquid chromatography/mass spectrometry on orthogonal acceleration time-of-flight mass analyzers using switching between separate sample and reference sprays. 1. Proof of concept. *Anal. Chem.* **72** 3683–3688 [34](#), [35](#), [41](#), [42](#)

- [202] **G. Hopfgartner, I. V. Chernushevich, T. Covey, J. B. Plomley, R. Bonner (1999)** Exact mass measurement of product ions for the structural elucidation of drug metabolites with a tandem quadrupole orthogonal-acceleration time of flight mass spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10** 1305–1314 [34](#), [40](#)
- [203] **W. Vetter, L. Alder, R. Palavinskas (1999)** Mass spectrometric characterization of Q1, a C₉H₃Cl₇N₂ contaminant in environmental samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13** 2118–2124 [34](#)
- [204] **J.-C. Wolff, S. Monté, N. Haskins, D. Bell (1999)** New mass spectrometric approaches to structural analysis in mixtures. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13** 1797–1802 [34](#), [75](#)
- [205] **P. J. Gates, G. C. Kearney, R. Jones, P. F. Leadlay, J. Staunton (1999)** Structural analysis studies of erythromycins by electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13** 242–246 [34](#)
- [206] **M. S. Lee, S. E. Klohr, E. H. Kerns, K. J. Volk, J. E. Leet, D. R. Schroeder, I. E. Rosenberg (1996)** The coordinated use of tandem mass spectrometry and high resolution mass spectrometry for the structure identification of the kedarcidin chromophore. *J. Mass Spectrom.* **31** 1253–1260 [34](#)
- [207] **Q. Wu (1998)** Multistage accurate mass spectrometry: A "basket in a basket" approach for structure elucidation and its application to a compound from combinatorial synthesis. *Anal. Chem.* **70** 865–872 [35](#)
- [208] **A. H. Grange, J. R. Donnelly, W. C. Brumley, S. Billets, G. W. Sovocool (1994)** Mass measurements by an accurate and sensitive selected ion recording technique. *Anal. Chem.* **66** 4416–4421 [35](#), [35](#)
- [209] **A. H. Grange, J. R. Donnelly, G. W. Sovocool, W. C. Brumley (1996)** Determination of elemental compositions from mass peak profiles of the molecular ion (M) and M+1 and M+2. *Anal. Chem.* **68** 553–560 [35](#), [35](#)
- [210] **A. H. Grange, W. C. Brumley (1997)** A mass peak profile generation model to facilitate determination of elemental compositions of ions based on exact masses and isotopic abundances. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **8** 170–182 [35](#), [35](#)
- [211] **A. H. Grange, G. W. Sovocool (1999)** Determination of elemental compositions by high resolution mass spectrometry without mass calibrants. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13** 673–686 [35](#)

- [212] **L. K. Frevel, W.-L. Lee, R. E. Tecklenburg (1998)** Diophantine mass spectrometric structure analysis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10** 231–240 [35](#)
- [213] **A. C. Hogenboom, W. M. A. Niessen, D. R. Little, U. A. T. Brinkman (1999)** Accurate mass determinations for the confirmation and identification of organic microcontaminants in surface water using on-line solid phase extraction liquid chromatography electrospray orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13** 125–133 [35](#), [35](#), [40](#), [47](#)
- [214] **M. E. Palmer, M. R. Clench, L. W. Tetler, D. R. Little (1999)** Exact mass determination of narrow electrophoretic peaks using an orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13** 256–263 [35](#), [40](#), [42](#)
- [215] **S. J. Lane, A. Pipe (1999)** A single generic microbore liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry solution for the simultaneous accurate mass determination of compounds on single beads, the decoding of dansylated orthogonal tags pertaining to compounds and accurate isotopic difference target analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13** 798–814 [35](#), [40](#), [41](#)
- [216] **L. Potterat, K. Wagner, H. Haag (2000)** Liquid chromatography-electrospray time-of-flight mass spectrometry for on-line accurate mass determination and identification of cyclodepsipeptides in a crude extract of the fungus *Metharrhizium anisopliae*. *J. Chromatogr. A* **872** 85–90 [35](#)
- [217] **P. A. Leclercq, C. A. Cramers (1998)** High-speed GC-MS. *Mass Spectrom. Rev.* **17** 37–49 [35](#)
- [218] **C. S. Hsu, M. Green (2001)** Fragment-free accurate mass measurement of complex mixture components by gas chromatography/field ionization-orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry: an unprecedented capability for mixture analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15** 236–239 [35](#)
- [219] **O. Fiehn, J. Kopka, R. N. Trethewey, L. Willmitzer (2000)** Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental composition using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chem.* **72** 3573–3580 [35](#), [38](#)
- [220] **T. Storm, C. Hartig, T. Reemtsma, M. Jekel (2001)** Exact mass measurements on-line with high-performance liquid chromatography on a quadrupole mass spectrometer. *Anal. Chem.* **73** 589–595 [35](#), [37](#)

- [221] **H. Fujiwara, R. C. Chott, R. G. Nadeau (1997)** Accurate mass determination: sensitive and volatile references for positive-ion chemical ionization and negative-ion electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11** 1547–1553 [37](#)
- [222] **T. S. Sack, R. L. Lapp, M. L. Gross, B. J. Kimble (1984)** A method for the statistical evaluation of accurate mass measurement quality. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **61** 191–213 [38](#)
- [223] **C. Hartig (2000)** Analytik, Vorkommen und Verhalten aromatischer Sulfonamide in der aquatischen Umwelt. Dissertation, Technische Universität Berlin [41](#), [56](#), [115](#), [115](#), [123](#)
- [224] **K. F. Blom (2001)** Estimating the precision of exact mass measurements on an orthogonal time-of-flight mass spectrometer. *Anal. Chem.* **73** 715–719 [42](#)
- [225] **E. Witters, W. V. Dongen, E. L. Esmans, H. A. V. Onckelen (1997)** Ion-pair chromatography - electrospray mass spectrometry for the analysis of cyclic nucleotides. *J. Chromatogr. B* **694** 55–63 [42](#), [43](#)
- [226] **K.-H. Bauer, T. P. Knepper, A. Maes, V. Schatz, M. Voihsel (1999)** Analysis of polar organic micropollutants in water with ion chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **837** 117–128 [43](#)
- [227] **R. J. Vreeken**, On-line post column liquid-solid and liquid-liquid extraction in environmental liquid chromatography-thermospray mass spectrometry. **D. Barceló** (Hg.) Application of LC-MS in environmental chemistry, Elsevier, Amsterdam, 1996, Bd. 59 aus *J. Chromatogr. Series*. 1. Aufl., 447–480 [43](#)
- [228] **A. Apffel, J. A. Chakel, S. Fischer, K. Lichtenwalter, W. S. Hancock (1997)** New procedure for the use of high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of nucleotides and oligonucleotides. *J. Chromatogr. A* **777** 3–21 [43](#)
- [229] **A. Apffel, J. A. Chakel, S. Fischer, K. Lichtenwalter, W. S. Hancock (1997)** Analysis of oligonucleotides by HPLC-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **69** 1320–1325 [43](#)
- [230] **R. Kostianen, A. P. Bruins (1996)** Effect of solvent on dynamic range in pneumatically-assisted electrospray (ion spray) mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10** 1393–1399 [45](#)

- [231] S. Sennert, D. Volmer, K. Levsen, G. Wünsch (1995) Multiresidue analysis of polar pesticides in surface and drinking water by on-line enrichment and thermospray LC-MS. *Fresenius J. Anal. Chem.* **351** 642–649 47
- [232] M. Bouzige, G. Machtalère, P. Legeay, V. Pichon, M.-C. Hennion (1999) New methodology for a selective on-line monitoring of some polar priority industrial chemicals in waste water. *Waste Management* **19** 171–180 47
- [233] M. Laikthman, J. S. Rohrer (1998) Determination of fluorochemical surfactants in acid etch baths by liquid chromatography with on-line matrix elimination. *J. Chromatogr. A* **822** 321–325 47
- [234] M. Bouzige, G. Machtalère, P. Legeay, V. Pichon, M.-C. Hennion (1999) Selective on-line immunoextraction coupled to liquid chromatography for the trace determination of benzidine, congeners and related azodyes in surface water and industrial effluents. *J. Chromatogr. A* **846** 317–329 47
- [235] K. F. Blom, B. S. Larsen, C. N. McEwenm (1999) Determining affinity-selected ligands and estimating binding affinities by on-line size exclusion chromatography/liquid chromatography mass spectrometry. *J. Comb. Chem.* **1** 82–90 47
- [236] D. W. Roberts, M. I. Churchwell, F. A. Beland, J.-L. Fang, D. R. Doerge (2001) Quantitative analysis of etheno-2'-deoxycytidine DNA adducts using on-line immunoaffinity coupled with LC/ES-MS/MS detection. *Anal. Chem.* **73** 303–309 47
- [237] Commission decision of [...] laying down performance criteria for the analytical methods to be used for certain substances and residues thereof in live animals and animal products according to Council Directive 96/23/EC. **Commission of the European Communities**. Draft SANCO/1085/2000 Rev. 2 50, 51, 51
- [238] F. André, K. K. G. De Wasch, H. F. De Brabander, S. R. Impens, L. A. M. Stolker, L. van Ginkel, R. W. Stephany, R. Schilt, D. Courtheyn, Y. Bonnaire, P. Fürst, P. Gowik, G. Kennedy, T. Kuhn, J.-P. Moretain, M. Sauer (2001) Trends in the identification of organic residues and contaminants: EC regulations under revision. *Trends Anal. Chem.* **20** (8) 435–445 50, 51, 51
- [239] W. Horwitz (1982) Evaluation of analytical methods used for the regulation of foods and drugs. *Anal. Chem.* **54** (1) 67A–76A 50, 52

- [240] **J. A. Sphon (1978)** Use of mass spectrometry for the confirmation of animal drug residues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **61** 1247–1252 [51](#), [51](#)
- [241] **S. Rizea Savu, L. Silvestro, A. Haag, F. Sörgel (1996)** A confirmatory HPLC-MS/MS method for ten synthetic corticosteroids in bovine urines. *J. Mass Spectrom.* **31** 1351–1363 [51](#)
- [242] **R. Baldwin, R. A. Bethem, R. K. Boyd, W. L. Budde, T. Cairns, R. D. Gibbons, J. D. Henion, M. A. Kaiser, D. L. Lewis, J. E. Matusik, J. A. Sphon, R. W. Stephany, R. K. Trubey (1997)** 1996 ASMS fall workshop: Limits to confirmation, quantitation, and detection. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **8** 1180–1190 [51](#), [51](#)
- [243] **D. L. Buhrman, P. I. Price, P. J. Rudewicz (1996)** Quantitation of SR27417 in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A study of ion suppression. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **7** 1099–1105 [56](#)
- [244] **D. S. Clarke, H. M. Hill, T. A. G. Noctor, D. Thomas (1996)** Matrix-related modifications of ionization in bioanalytical liquid chromatography-atmospheric pressure tandem mass spectrometry. *Pharm. Sci.* **2** 203–207 [56](#)
- [245] **A. Conneely, W. F. Smyth, G. McMullan (1999)** A study on the microbial degradation of metal phthalocyanine textile dyes by high-performance liquid chromatography and atomic absorption. *J. Porph. Phthalocyan.* **3** 552–559 [59](#)
- [246] **P. Ollikka, K. Alhonmäki, V.-M. Leppänen, T. Glimoff, T. Rajola, L. Suominen (1993)** Decolorization of azo, triphenylmethane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** 4010–4016 [59](#), [59](#)
- [247] **J. S. Knapp, P. S. Newby, L. P. Reece (1995)** Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme Microb. Technol.* **17** 664–668 [59](#), [59](#), [60](#)
- [248] **E. Rodrigues, M. A. Pickard, R. Vazquez-Duhalt (1999)** Industrial dye decolorization by laccases from lignolytic fungi. *Curr. Microbiol.* **38** 27–32 [59](#)
- [249] **G. M. Shaul, T. Holdsworth, C. R. Dempsey, K. A. Dostal (1991)** Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. *Chemosphere* **22** 107–119 [59](#), [60](#), [84](#), [85](#)

- [250] **U. Pagga, D. Brown (1986)** The degradation of dyestuffs: Part II behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. *Chemosphere* **15** 479–491 [59](#), [60](#), [85](#), [85](#), [94](#), [94](#)
- [251] **J. T. Spadaro, M. H. Gold, V. Renganathan (1992)** Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** 2397–2401 [59](#)
- [252] **A. Heinfling, M. Bergbauer, U. Szewzyk (1997)** Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48** 261–267 [59](#), [60](#), [60](#)
- [253] **A. Heinfling, M. J. Martinez, A. T. Martinez, M. Bergbauer, U. Szewzyk (1998)** Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** 2788–2793 [59](#)
- [254] **J. T. Spadaro, V. Renganathan (1994)** Peroxidase-catalyzed oxidation of azo-dyes: Mechanism of disperse yellow 3 degradation. *Arch. Biochem. Biophys.* **312** (1) 301–307 [59](#), [62](#)
- [255] **M. Chivukula, V. Renganathan (1995)** Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia orizae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (12) 4374–4377 [59](#), [62](#)
- [256] **M. Chivukula, J. T. Spadaro, V. Renganathan (1995)** Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfo-phenyl hydroperoxides. *Biochemistry* **34** 7765–7772 [59](#), [62](#)
- [257] **S. Goszczynski, A. Paszczynski, M. B. Pasti-Grigsby, R. L. Crawford, D. L. Crawford (1994)** New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *J. Bacteriol.* 1339–1347 [59](#), [62](#)
- [258] **C.-H. Fischer (1992)** Trace analysis of phthalocyanine pigments by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **592** 261–264 [59](#), [64](#)
- [259] **I. Arslan, A. I. Balcioglu (1999)** Degradation of commercial reactive dyestuffs by heterogenous and homogenous advanced processes: a comparative study. *Dyes and Pigments* **43** 95–108 [60](#)
- [260] **L. Young, J. Yu (1997)** Lignase-catalysed decolorization of synthetic dyes. *Wat. Res.* **31** (31) 1187–1193 [60](#)
- [261] **A. Heinfling, M. J. Martinez, A. T. Martinez, M. Bergbauer, U. Szewzyk (1998)** Purification and characterization of peroxidases from

- the dyes-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiol. Lett.* **165** 43–50 60, 60
- [262] **T. K. Kapdan, F. Kargi, G. McMullan, R. Marchant (2000)** Biological decolorization of textile dyestuff by *Coriolus versicolor* in a packed column reactor. *Environ. Technol.* **21** 231–236 60
- [263] **A. Conneely, W. F. Smyth, G. McMullan (1999)** Metabolism of the phthalocyanine textile dye remazol turquoise blue by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **179** 333–337 60
- [264] **A. Heinfling-Weidtmann, T. Reemtsma, T. Storm, U. Szewzyk (2001)** Sulfophthalimide as major metabolite formed from sulfonated phthalocyanine dyes by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiol. Lett.* **203** 179–183 60, 66
- [265] **R. Opitz (1999)** Transformation of Reactive Violet 5 by the White Rot Fungus *Bjerkandera adusta* : Characterization of the Metabolite Patterns. Diplomarbeit, Technische Universität Berlin 60, 64, 133, 134
- [266] **H. Ali, R. Langlois, J. R. Wagner, N. Brasseur, B. L. J. E. v. Paquette (1988)** Biological activities of phthalocyanines - X: Synthesis and analysis of sulfonated phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* **47** (5) 713–717 64, 65
- [267] **T. Reemtsma (2001)** Analysis of sulfophthalimide and some of its derivatives by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **919** 289–297 66, 127
- [268] **T. Reemtsma, J. Jakobs (2001)** Concerted chemical and microbial degradation of sulfophthalimides formed from sulfophthalocyanine dyes by white-rot fungi. *Environ. Sci. Technol.* **35** 4655–4659 66, 84, 127
- [269] **P. Schulte, A. Bayer, F. Kuhn, T. Luy, M. Volkmer (1995)** H₂O₂/O₃, H₂O₂/UV and H₂O₂/Fe²⁺ processes for the oxidation of hazardous wastes. *Ozone Sci. Eng.* **17** 119–134 66
- [270] **S. J. Masten, S. H. R. Davies (1994)** The use of ozonation to degrade organic contaminants in wastewater. *Environ. Sci. Technol.* **28** (4) 180A–184A 66, 67, 68
- [271] **R. G. Rice (1997)** Application of ozone for industrial wastewater treatment – A review. *Ozone Sci. Eng.* **18** 477–515 67
- [272] **H.-S. Shin, J.-L. Lim (1996)** Improving biodegradability of naphthalene refinery wastewater by preozonation. *J. Environ. Sci. Health A* **31** (5) 1009–1024 67

- [273] **J. C. Jochimsen, M. R. Jekel (1997)** Partial oxidation effects during the combined oxidative and biological treatment of separated streams of tannery wastewater. *Wat. Sci. Technol.* **35** 337–345 67, 104
- [274] **J. C. Jochimsen, H. Schenk, M. R. Jekel, W. Hegemann (1997)** Combined oxidative and biological treatment for separated streams of tannery wastewater. *Wat. Sci. Tech.* **36** 209–216 67, 104
- [275] **J. Perkowski, L. Kos, S. Ledakowicz (1996)** Application of ozone in textile wastewater treatment. *Ozone Sci. Eng.* **18** 73–85 67
- [276] **B. Delanghe, C. I. Mekras, N. J. D. Graham (1991)** Aqueous ozonation of surfactants: A review. *Ozone Sci. Eng.* **13** 639–673 67, 67
- [277] **F. J. Beltrán, J. F. García-Araya, P. M. Álvarez (2000)** Sodium dodecylbenzenesulfonate removal from water and wastewater. 1. Kinetics of decomposition of ozonation. *Ind. Eng. Chem. Res.* **39** 2214–2220 67, 67
- [278] **F. J. Beltrán, J. F. García-Araya, P. M. Álvarez (2000)** Sodium dodecylbenzenesulfonate removal from water and wastewater. 2. Kinetics of integrated ozone-activated sludge system. *Ind. Eng. Chem. Res.* **39** 2221–2227 67, 67
- [279] **J. Saras, M. P. Roche, M. P. Ormado, E. Gimeo, A. Puip, J. L. Ovelleiro (1998)** Treatment of wastewater resulting from dyes manufacturing with ozone and chemical coagulation. *Wat. Res.* **32** (9) 2721–2727 67
- [280] **A. Lopez, G. Ricco, G. Mascolo, G. Tiravanti, A. C. Di Pinto, R. Passino (1998)** Biodegradability enhancement of refractory pollutants by ozonation: A laboratory investigation on an azo-dyes intermediate. *Wat. Sci. Tech.* **38** 239–245 67
- [281] **F. Gilbert (1987)** Biodegradability of ozonation products as a function of COD and DOC elimination by example of substituted aromatic substances. *Wat. Res.* **21** (10) 1273–1278 67, 67, 84
- [282] **P. Joy, E. Gilbert, S. H. Eberle (1980)** A quantitative investigation of the reaction of ozone with p-toluolsulfonic acid in aqueous solution as a model compound for anionic detergents. *Wat. Res.* **14** 1509–1516 67, 67, 84
- [283] **T. Breithaupt, T. Reemtsma, M. Jekel, T. Storm, U. Wiesmann** Combined biological/chemical treatment of wastewaters for the mineralization of not biodegradable naphthalene-1,5-disulfonic acid. *Wat. Sci. Tech.*, eingereicht 67, 69, 84

- [284] **A. S. El Dine, A. Bermond, D. Rutledge, C. Ducauze (1984)** Analysis of the ozonation products of phthalic acid in water using combined high-performance liquid chromatography - mass spectrometry. *Analyst* **109** 817–821 [67](#)
- [285] **P. S. Bailey (1958)** The reaction of ozone with organic compounds. *Chem. Rev.* **58** 926–1009 [68](#), [68](#), [68](#), [68](#), [68](#)
- [286] **R. Criegee (1975)** Mechanismus der Ozonolyse. *Angew. Chem.* **87** (21) 765–771 [68](#), [68](#)
- [287] **P. S. Bailey, S. S. Bath, F. Dobinson, F. J. Garcia-Sharp, C. D. Johnson (1964)** Ozonolysis of naphthalenes. The aromatic products. *J. Org. Chem.* **29** (3) 697–702 [68](#), [68](#), [68](#)
- [288] **R. A. Larson, W. J. Garrison, K. A. Marley (1986)** Preparation and photoisomerization of 2-formylcinnamaldehyde in solution. *Tetrahedron Lett.* **27** 3987–3990 [68](#), [68](#), [68](#)
- [289] **F. Soana, M. Sturini, L. Cermenati, A. Albini (2000)** Titanium photocatalysed oxygenation of naphthalene and some of its derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 699–704 [68](#)
- [290] **I. Fleming**, Frontier orbitals and organic chemical reactions. John Wiley & Sons, New York, 1990, 1. Aufl. [68](#)
- [291] **J. J. Pappas, W. P. Keaveney, M. Berger, R. V. Rush (1968)** Directional effects of substituents on the ozonolysis of naphthalenes. Synthesis of o-phthalaldehydes. *J. Org. Chem.* **33** (2) 787–792 [68](#), [68](#)
- [292] **J. Staehelin, J. Hoigné (1985)** Decomposition of ozone in water in the presence of organic solutes acting as promoters and inhibitors of radical chain reactions. *Environ. Sci. Technol.* **19** (12) 1206–1213 [68](#)
- [293] **F. Tureček**, The use of labeled compounds. **J. S. Splitter, F. Tureček** (Hg.) Application of mass spectrometry to organic stereochemistry, VCH Publishers, Weinheim, 1994. 1. Aufl., 673–680 [75](#)
- [294] **M. E. Munk (1998)** Computer-based structure determination: Then and now. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **38** 997–1009 [75](#)
- [295] **M. Badertscher, K. Bischofberger, E. Pretsch (1997)** Isomer generators in structure elucidation. *Trends Anal. Chem.* **16** (5) 234–241 [75](#)
- [296] **H. Günther**, NMR-Spektroskopie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1992, 3. Aufl. [81](#)

- [297] **K.-T. Chung, G. E. Fulk, M. Egan (1978)** Reduction of azo dyes by intestinal anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.* **35** 558–562 [84](#), [94](#)
- [298] **J. P. Brown (1981)** Reduction of polymeric azo and nitro dyes by intestinal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **41** (5) 1283–1286 [84](#), [94](#)
- [299] **D. Brown, P. Laboureur (1983)** The degradation of dyestuffs: Part I. Primary biodegradation under anaerobic conditions. *Chemosphere* **12** (3) 397–404 [84](#), [94](#), [94](#)
- [300] **W. Haug, A. Schmid, B. Nörtemann, D. C. Hempel, A. Stolz, H.-J. Knackmuss (1991)** Mineralization of the sulfonated azo dye Mordant Yellow 3 by a 6-aminonaphthalene-2-sulfonate degrading bacterial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **177** 3144–3149 [84](#), [95](#)
- [301] **K.-T. Chung, S. E. J. Stevens, C. E. Cerniglia (1992)** Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. *Environ. Toxicol. Chem.* **12** 2121–2132 [84](#), [94](#)
- [302] **P. C. Vandevivere, R. Bianchi, W. Verstraete (1998)** Treatment and reuse of waste water from the textile wet-processing industry: Review of emerging technologies. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **72** 289–302 [84](#)
- [303] **T. Robinson, G. McMullan, R. Marchant, P. Nigam (2001)** Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Biores. Technol.* **77** 247–255 [84](#)
- [304] **E. Razo-Flores, M. Luijten, B. A. Donlon, G. Lettinga, J. A. Field (1997)** Complete biodegradation of the azo dye azosalicylate under anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* **31** (7) 2099–2103 [85](#)
- [305] **M. Kudlich (1998)** Der Abbau von Azofarbstoffen durch Mikroorganismen: Mechanismus der Reduktiven Spaltung und Charakterisierung von Reaktionsprodukten. Dissertation, Universität Stuttgart [85](#), [85](#), [85](#), [87](#), [88](#)
- [306] **D. Brown, B. Hamburger (1987)** The degradation of dyestuffs: Part III - investigation of their ultimate biodegradability. *Chemosphere* **16** 1539–1553 [85](#), [94](#), [94](#)
- [307] **M. Kudlich, M. J. Hetheridge, H.-J. Knackmuss, A. Stolz (1999)** Autooxidation reactions of different aromatic o-aminohydroxynaphthalenes that are formed during anaerobic reduction of sulfonated azo dyes. *Environ. Sci. Technol.* **33** 896–901 [85](#), [86](#), [87](#)
- [308] **C. O'Neil, A. Lopez, S. Estebves, F. R. Hawkes, D. L. Hawkes, S. Wilcox (2000)** Azo-dye degradation in an anaerobic treatment system

- operation on simulated textile effluent. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53** 249–254 [85](#)
- [309] **D. A. Oxspring, G. McMullan, W. F. Smyth, R. Marchant (1996)** Decolourisation and metabolism of the reactive textile dye, Remazol Black B, by an immobilized microbial consortium. *Biotech. Lett.* **18** (5) 527–530 [85](#), [87](#), [88](#)
- [310] **F. Sosath, J. A. Libra (1997)** Biologische Behandlung von synthetischen Abwässern mit Azofarbstoffen. *Acta hydrochim. hydrobiol.* **25** (5) 259–264 [85](#), [88](#), [88](#), [102](#), [103](#)
- [311] **T. Reemtsma, A. Putschew, M. Jekel (1999)** Industrial wastewater analysis: A toxicity-directed approach. *Waste Management* **19** 181–188 [87](#)
- [312] **P. Rajaguru, K. Kulaiselvi, M. Palanivel, V. Subburam (2000)** Biodegradation of azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54** 268–2273 [88](#)
- [313] **M. Kudlich, A. Keck, J. Klein, A. Stolz (1997)** Localization of the enzyme system involved in anaerobic reduction of azo dyes by *Sphingomonas* sp. strain BN6 and effect of artificial redox mediators on the rate of azo dye reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** (9) 3691–3694 [94](#)
- [314] **A. Keck, J. Klein, M. Kudlich, A. Stolz, H.-J. Knackmuss, R. Mattes (1997)** Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas* sp. strain BN6. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** (9) 3684–3690 [95](#)
- [315] **E. Yabuuchi, I. Yano, H. Oyaizu, Y. Hashimoto, T. Ezaki, H. Yamamoto (1990)** Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov. and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. *Microbiol. Immunol.* **34** 99–119 [95](#)
- [316] **A. Keck (2000)** Conversion of azo dyes by a redox mediator dependent mechanism which is linked to the naphthalenesulfonate degradation of *Sphingomonas* sp. strain BN6. Dissertation, Universität Stuttgart [95](#), [98](#)
- [317] **C. Grundmann**, Chinone, Teil II. Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1979, Bd. VII/3b. 4. Aufl., 144 [97](#)
- [318] **Y. Asahi, M. Tanaka, K. Shinozaki (1984)** Reaction of 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate with aliphatic amines: Structure of colored products and kinetics. *Chem. Pharm. Bull.* **32** (8) 3093–3099 [98](#)

- [319] **C. Da Canalis, R. Krull, D. C. Hempel (1992)** Bakterieller Abbau komplexer Naphthalinsulfonsäuregemische im Airlift-Schlaufenreaktor. *GWF: Wasser/Abwasser* **133** (4) 226–230 [101](#), [108](#)
- [320] **H. Greim, J. Ahlers, R. Bias, B. Broeckers, H. Hollander, H.-P. Gelbke, H.-J. Klimisch, I. Mangelsdorf, A. Paetz, N. Schön, G. Stropp, R. Vogel, C. Weber, K. Ziegler-Skylakakis, E. Bayer (1994)** Toxicity and ecotoxicity of sulfonic acids: structure - activity relationship. *Chemosphere* **28** (12) 2203–2236 [102](#)
- [321] **T. Reemtsma (1994)** Wirkung einer anaerob-aerob biologischen Behandlung auf gelöste organische Stoffe in Gerbereiabwasser - Charakterisierung, Screening, und Verhalten ausgesuchter Stoffgruppen-. Dissertation, Technische Universität Berlin [104](#), [104](#)
- [322] **T. Reemtsma, J. Jochimsen, M. Jekel (1993)** Persistence of sulfonated polyphenols in the biological treatment of industrial wastewater. *Vom Wasser* **81** 353–363 [104](#)
- [323] **ARGE Uferfiltration Berlin**, Abschlussbericht Projekt Uferfiltration Berlin. i.A. der Senatsverwaltung für Stadtentwicklung und Umweltschutz, Berlin, 1999 [109](#), [109](#), [110](#), [111](#), [112](#)
- [324] **B. Heinzmann (1998)** Improvement of the surface water quality in the Berlin region. *Water Sci. Technol.* **38** (6) 191–200 [109](#)
- [325] **S. Wischnack, M. Jekel**, Untersuchungen zu iodierten organischen Stoffen im Tegeler See und im Wasserwerk Tegel. Abschlußbericht zu einem Untersuchungsprogramm im Auftrag der Berliner Wasserbetriebe. FG Wasserreinigung, TU Berlin, 2000 [110](#), [110](#), [111](#)
- [326] **D. Ziegler (2001)** Untersuchungen zur nachhaltigen Wirkung der Uferfiltration im Wasserkreislauf Berlins. Dissertation, Technische Universität Berlin [109](#), [110](#), [110](#), [111](#)
- [327] **M. Fröhlich, K.-E. Lindenschmidt, W. Hegemann, H. Sieker (1999)** Simulation der Strömungsverhältnisse im Tegeler See. *GWF: Wasser/Abwasser* **140** 355–361 [110](#), [110](#)
- [328] **B. C. J. Zoeteman, K. Harmsen, J. B. H. J. Linders, C. F. H. Mora, W. Slooff (1980)** Persistent organic pollutants in river and ground water in the Netherlands. *Chemosphere* **9** 231–249 [123](#)
- [329] **W. Kuehn, U. Mueller (2000)** River bank filtration - an overview. *Jour. AWWA* **92** (12) 60–69 [123](#), [123](#)

-
- [330] **T. Reemtsma (2001)** The use of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in water analysis - part II: obstacles. *Trends Anal. Chem.* **20** (10) 533–542 **130**
- [331] **T. Reemtsma (2001)** The use of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in water analysis - part I: achievements. *Trends Anal. Chem.* **20** (9) 500–517 **130**
- [332] **A. Reé (1886)** Über β -Sulphophthalsäure, β -Oxyphthalsäure und β -Chlorphthalsäure. *Annalen der Chemie* **233** 216–240 **135**
- [333] **D. C. Harris**, Quantitative Chemical Analysis. W. H. Freeman and Company, New York, 1999, 5. Aufl. **155**