
Helmut Müller

Spuren- und Umweltanalytik: Probleme und Möglichkeiten*

Herrn Professor Günter Marx,
Technische Universität Chemnitz,
zum 60. Geburtstag gewidmet

1. Grundlagen und Definitionen

Die Analytik von umweltrelevanten Proben nimmt an Bedeutung zu, da umweltanalytische Daten zunehmend als Entscheidungsgrundlage für regulative Maßnahmen herangezogen werden. Für umweltrelevante Untersuchungen wird eine Vielzahl von Analyseverfahren benötigt, um die breite Palette an toxischen, kanzerogenen und mutagenen Substanzen in gasförmigen, flüssigen und festen Umweltmatrices bestimmen zu können.

In den meisten Fällen werden für die verschiedenen Umweltproben die entsprechenden Parameter per Gesetz festgelegt. Umweltanalytik dient in diesem Zusammenhang in erster Linie dazu, Richt-, Schwellen- und Grenzwerte für Schadstoffe zu überprüfen. Deshalb werden hinsichtlich der Schnelligkeit, der geforderten Nachweisgrenzen und der Genauigkeit besondere Anforderungen an die Erfassung von Schadstoffen gestellt.

Diese hohen spezifischen Ansprüche haben dazu geführt, daß sich die Umweltanalytik zu einem eigenständigen Bereich der Analytik entwickelt hat. Sie steht heute gleichberechtigt neben etablierten Gebieten wie z. B. Prozeß-, Reinststoff- und Lebensmittelanalytik sowie Vertiefungs- oder Oberflächenanalytik. Die Umweltanalytik weist allerdings Besonderheiten auf wie:

- starke Schwankung der Matrixzusammensetzung
 - es sind gasförmige, flüssige und feste Proben zu analysieren
- Korrelation mit weiteren Daten
 - meteorologische Daten (z. B. Wetterlage, Windrichtung...)
 - zeitliche Bewertung (z. B. wochentags, nachts...)

* Vortrag, gehalten vor der Klasse Naturwissenschaften der Leibniz-Sozietät am 16.10.1997

- örtliche Auflösung (z. B. Wassertiefe, Deponieoberflächen oder -inneres ...)
- Erfassung eines sehr breiten Konzentrationsbereiches
 - extreme Spurenanalyse (Mikrogramm/Gramm und kleiner)
 - Hauptbestandteilanalyse

Die **Aufgaben** der Umweltanalytik lassen sich wie folgt definieren:

Qualitative und quantitative Bestimmung von Schadstoffen in der Umwelt und die Erfassung anthropogen bedingter globaler, regionaler oder lokaler Konzentrationsänderungen natürlicher Substanzen.

Sie erfaßt damit insbesondere auch Aufgaben und Themenfelder der extremen Spurenanalytik höchst komplexer Gemische organischer Verbindungen bis zum Nachweis der Identifizierung und Quantifizierung einzelner anorganischer – oder weit häufiger – organischer Komponenten in einer Vielzahl von unterschiedlichen Matrices.

Gelangen in die Umweltkompartimente Wasser, Boden, Sedimente, Abfälle, Luft und andere toxische, kanzerogene oder mutagene Verbindungen, so resultiert daraus ein „Umweltproblem“, das einen Handlungsbedarf auslöst [1].

Die Umweltanalytik steht dadurch im Spannungsfeld verschiedener Einflußgrößen. Die nachfolgende Abbildung 1 verdeutlicht diesen Zusammenhang.

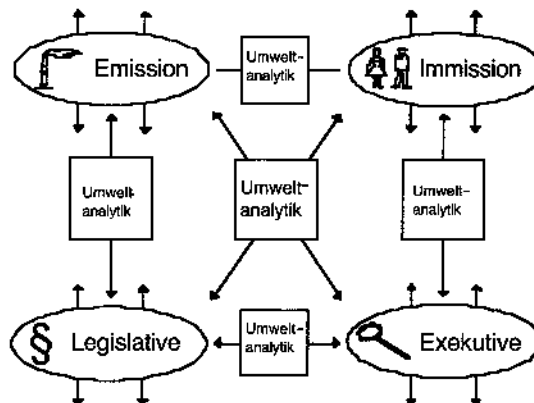


Abbildung 1: Umweltanalytik im Spannungsfeld

Mit dem modernen methodischen Potential der Analytik können heute viele Fragestellungen aufgenommen werden, die für die Chemie insgesamt neu sind, die sich im überwiegenden Maße an der Nahtstelle Chemie/Umwelt bzw., allgemeiner formuliert, Chemie/Life Science ansiedeln. Dabei sind solche Aufgaben- und Fragestellungen häufig mit der Bestimmung extremer Spurengehalte verbunden. Man teilt ein in

- Hauptbestandteile, 100 – 1%
- Nebenbestandteile, 1 – 0,01%
- Spurengehalte, $< 10^{-2}\%$
- extreme Spurengehalte, $< 10^{-4}\%$ ($10^{-4}\%$ entsprechen 1 ppm).

Bestimmungen im Bereich kleiner $10^{-4}\%$ gehören heute zu den alltäglichen Aufgaben der Analytiker und insbesondere der Umweltanalytiker. Hauptproblem dieser extremen Spurenanalyse ist die Absicherung der Richtigkeit von Analyseergebnissen. Die Ergebnisabsicherung soll dazu dienen, daß man zuverlässige Resultate einer bestimmten Meßgröße X erhält, die man in einer Analysenprobe bestimmt hat.

Die **Zuverlässigkeit** hat aber wenigstens zwei Komponenten: Präzision und Richtigkeit.

Die statistische Bewertung der Präzision analytischer Verfahren bereitet in der Regel keine Probleme. Der Ausweis der Richtigkeit einer Analyse von Realproben stellt sich als fundamentales Problem dar. Dies ergibt sich sichtbar aus dem definierten **Ziel einer Analyse**:

... ist die Ermittlung eines hypothetischen wahren Wertes. Der wahre Wert ist nicht bestimmbar; man möchte den Wert bestimmen, der dem wahren Wert möglichst nahe kommt.

Richtig ist ein Ergebnis bzw. ein Verfahren dann, wenn es die Gehalte von als richtig vereinbarten Referenzproben korrekt wiedergibt.

Analytische Methoden müssen unabhängig von Zeit, Ort und Bearbeiter zu richtigen analytischen Ergebnissen führen. Deshalb haben Aspekte der Qualitätssicherung analytischer Daten eine vorrangige Bedeutung. Zur Zeit wird ein international wirkendes System der Analytischen Qualitätssicherung (AQS) bzw. des Analytischen Qualitätsmanagements (AQM) entwickelt und über entsprechende Regelwerte und Normen (ISO 25, EN 45001 u.a.m.) verbindlich eingeführt. Diese Qualitätssicherungsaspekte werden inzwischen von der chemischen Großindustrie und

selbständigen analytischen Routinelaboratorien als marktregulierendes Element akzeptiert und weitgehend in Form einer Akkreditierung umgesetzt.

Parallel zur AQS wurden analytische Qualitätskriterien festgelegt, die zu einer Vergleichbarkeit (Comparability) von Analyseergebnissen führen sollen. Danach kann Vergleichbarkeit erreicht werden durch Rückführbarkeit (Traceability) von Ergebnissen auf nationale oder internationale Standards. Ein so erzielt qualitativ hochwertiges Analyseergebnis muß im Rahmen einer AQS eindeutig der entsprechenden Probe zugeordnet werden können. Die Validierung (Validation) bleibt die zentrale Aufgabe bei der Entwicklung eines Analysenverfahrens.

Die **Validierung** ist der Nachweis und die Dokumentation der Zuverlässigkeit einer Methode. Der Prozeß der Validierung im Labor wird in verschiedene Ebenen durchgeführt, wie Abbildung 2 zeigt.

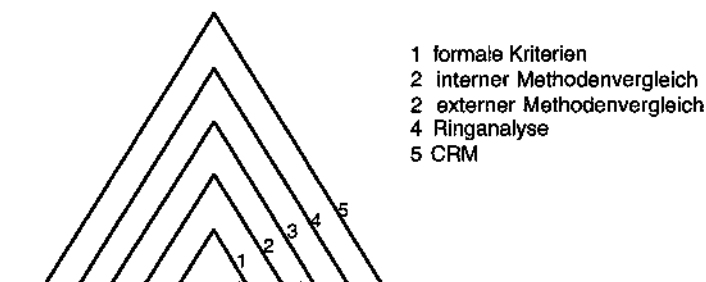


Abbildung 2: Ebenen der Validierung

Die Ebenen Ringversuch und CRM (zertifiziertes Referenzmaterial) nehmen dafür an Bedeutung zu.

Modernen Spurenanalyse ist charakterisiert durch zwei unterschiedliche Strategien, die sich stärker physikalisch oder chemisch orientieren [2]:

- Anwendung instrumenteller Direktmethoden
- Entwicklung und Einsatz chemisch-analytischer Verbundverfahren

Bei den instrumentellen Direktmethoden wird die Probe nach einer Probenahme und möglichen Probepräparation direkt analysiert. Eine mathematische Korrektur von Matrixeffekten ist in einzelnen Fällen (Röntgenfluoreszenzanalyse, RFA) möglich.

Zur Kompensation von systematischen Fehlern sind CRMs mit matrixähnlicher Zusammensetzung notwendig (siehe Abbildung 3, rechte Seite).

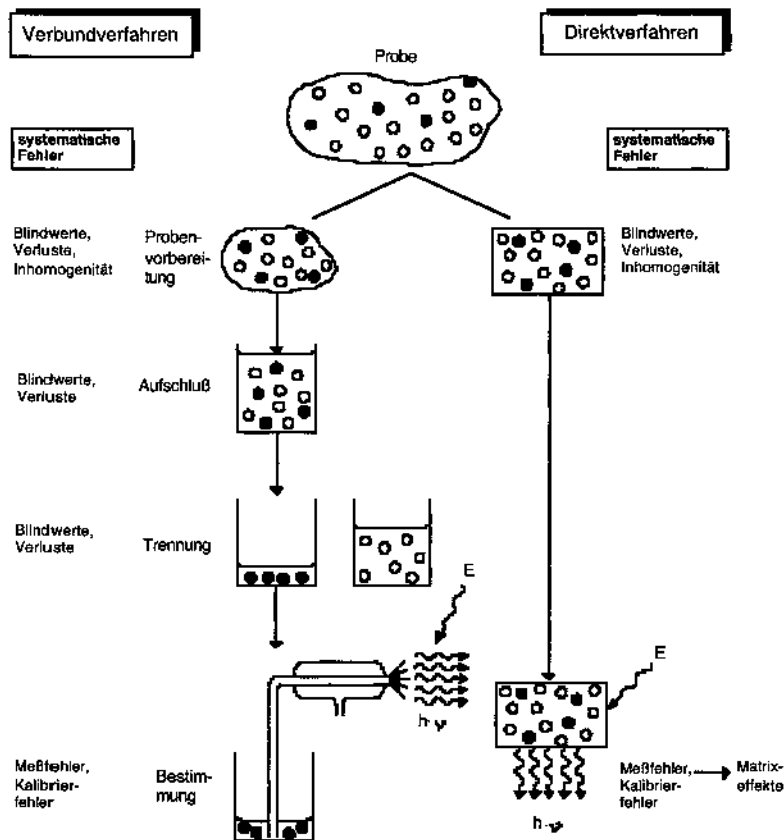


Abbildung 3: Vergleich von Verbund- und Direktverfahren

Bei den Verbundverfahren erfolgt nach dem Aufschluß der Probe eine Matrix (oder Spur)-Abtrennung. Die Kalibrierung wird dann relativ einfach, da der Analyt isoliert vorliegt. Der Vorteil der leichteren Kalibrierung wird erarbeitet zu Lasten von blindwertbeitragenden Operationsschritten (siehe Abbildung 3, linke Seite). Die moderne Spurenanalytik nutzt beide

Möglichkeiten. Für eine mobile Umweltanalytik [2,3] werden verstärkt instrumentelle Direktverfahren eingesetzt.

Die herkömmliche Analytik läßt nur Aussagen über die in einer Probe vorhandenen Gesamtgehalte von Elementen auf der einen Seite und von organischen Verbindungen auf der anderen Seite zu. Auf eine Differenzierung der Gesamtgehalte in einzelnen Spezies wird oft bewußt verzichtet. Erst die Verknüpfung der anorganischen und der organischen Analytik, einschließlich der Verwendung von Trennoperationen, ermöglicht detaillierte Aussagen über das tatsächliche Vorliegen von Elementen in ihrer Matrix. Unter **Spezies** sind sämtliche physikalischen und chemischen Zustands- und Bindungsformen eines Elements zu verstehen, die in Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen auftreten können. Speziell für die **Elementspeziesanalytik** [4] werden Kopplungstechniken [5] entwickelt und eingesetzt.

2. Biologische und biochemische Testverfahren in der Wasseranalytik

Biologische Testverfahren

Anhaltende Umweltbelastung und die Verknappung nutzbarer Ressourcen machen ein kritisches Überprüfen der menschlichen Aktivitäten notwendig. Das Wasser steht dabei als unersetzliches Lebensmittel auf dem Prüfstand.

Das schnelle Erkennen von Schadstoffen in Wässern steht deshalb häufig im Mittelpunkt der Umweltanalytik. Aus kosten- und zeitökonomischen Gründen werden dafür oft **Screening-Verfahren** gewählt. Solche Screening-Tests haben die Aufgabe zu erfüllen, Ja/Nein-Entscheidungen über das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit eines Stoffes ab einem vorgegebenen Konzentrationsbereich sicher festzustellen. Ihr Stellenwert ist darin begründet, daß mit geringem Kosten- und Zeitaufwand der Umfang der im Labor durchzuführenden Analysen verringert werden kann [3].

Der verbreitetste und bekannteste Screening-Test ist der Prüfröhrchentest auf Atemalkohol: Aus einer Vielzahl von Autofahrern will man diejenigen Fahrer (möglichst sicher) herausfinden, bei denen eine Über-

schreitung des Grenzwertes (in der BRD ab April 1998 0,5 Promille) vorliegt. Dann erfolgt eine weitere Analyse mit gerichtsfesten Analysemethoden.

Solche Screening-Testverfahren finden verstärkt Anwendung auch in der Umweltanalytik. Eine besondere Bedeutung haben dabei biologische Tests (Biotests). Als **Biotest** werden Analysemethoden bezeichnet, die lebende Organismen in definierter Art und Zahl einsetzen, um dann deren Reaktion auf eine Umweltprobe anhand einer ihrer Lebensäußerungen meßbar zu machen.

Solche Tests werden im Bereich des Gewässerschutzes zur Beurteilung von Einzelstoffen, zur Überwachung von komplex zusammengesetzten Abwassergemischen und zur Überwachung von Oberflächengewässern mit großem Erfolg eingesetzt. Denn im Gewässerschutz werden Verfahren benötigt, in denen viele Proben

- in vertretbarer Zeit
- mit reproduzierbarem Ergebnis
- mit vertretbaren Kosten

mit mehr oder wenig gegebener Übertragbarkeit auf die Verhältnisse in Gewässern untersucht werden können [6].

Biotests nutzen den Tatbestand aus, daß Lebewesen Leistungen hinsichtlich z. B. Nachweisvermögen und Selektivität erbringen, von der die moderne Analysetechnik z. Z. sehr weit entfernt ist.

- Die Nase eines Spürhundes ist hunderttausenfach empfindlicher als die menschliche; der Einsatz von Spürhunden für Drogen ist allgemein bekannt
- Meereskrabben haben die Fähigkeit, weniger als 0,1 Mikrogramm Substanzmenge wahrzunehmen, um sich zielgerichtet auf die Nahrung zuzubewegen
- Bereits 10^{-13} g des Sexuallockstoffes Bombykol je Liter Luft genügen bei Schmetterlingen, um die männlichen Sexualpartner zu stimulieren; dabei wirkt der Sexuallockstoff hochspezifisch, so daß die Nachricht von Konkurrenten und Fremden nicht „mitgehört“ werden kann.

Für die praktische Umsetzung von Biotests müssen die Versuchsparameter wie pH-Wert, Temperatur, Reaktionsmedium u. a. streng festgelegt und standardisierte Testorganismen verwendet werden. Aquatische Organismen stehen bei der ökotoxikologischen Bewertung stark im Vordergrund. Durchgesetzt hat sich, Vertreter von vier trophischen Ebenen zu untersuchen. Dies sind

- Bakterien als Vertreter der Primärdestruenten,
- Algen als Vertreter der Primärproduzenten,
- Daphnien als Vertreter der Primärkonsumenten und
- Fische als Vertreter der Sekundärkonsumenten.

Die Durchführung solcher biologischer Wirkungstests legen zunehmend genormte Vorschriften (z. B. DIN) fest. In Tabelle 1 sind die derzeit für die Überwachungsanalytik von Wasser/Abwasser zur Verfügung stehenden Biotests zusammengestellt.

Tabelle 1: Abwasserrelevante Biotests (nach Link)

Name	Fischttest	Algentest	Daphnientest	Leucht- bakterientest
DIN 38412 Teil	31	33	30	34
Testorganismus	Goldorfe	Grünalge	Wasserfloh	Leucht- bakterien
repräsentativ für	Fische	Pflanzen	Wirbellose	Bakterien
Meßprinzip/ -kriterium	Überleben aller 3 Testfische	Zellvermehrung über Chlorophyll- Fluoreszenz	sichtbare Strudel- bewegung	Biolumi- neszenz
Testzeit	48 h	48h	24 h	30 min
besondere Anforderungen	Fütterung, Haltung, Klimatisierung	Sterilität für Stammhaltung und Vorkultur, Fluoreszenz- meßgerät	standardisierte Anzucht, Klimatisierung	temperierte Inku- bationseinheit, Luminometer

Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich ist, sind für die wichtigsten Organismengruppen aus der Nahrungskette der Fließgewässer Testverfahren vorhanden. Der weitere Einsatz wird sich in der Richtung entwickeln, die mit

dem Leuchtbakterintest eingeschlagen wurde: Schnelle Verfahren, die weitgehend reproduzierbar, zunehmend automatisierter und objektiviert gestaltet werden können.

Biotests werden definitorisch abgegrenzt von Enzym- und Zellkulturentest, auf die folgend eingegangen werden soll.

Biochemische Testverfahren

Unter biochemischen Verfahren wollen wir die analytische Verwendung von Substanzen und Gemischen verstehen, die in den Organismen vorkommen und dort Funktionen ausüben. Das trifft sowohl auf Enzyme („Biokatalysatoren“) als auch auf Immunoglobuline (Antikörper) zu.

Antikörper

Grundlagen dieser Methode sind Antigen-Antikörper-Reaktionen. Die Medizin verwendet Antikörper häufig zur Analytik, zunehmend auch die (Umwelt)-Analytik. Antikörper werden von Organismen für bestimmte Fremdmoleküle gebildet, an denen diese dann ankoppeln und dadurch unschädlich werden.

Die meisten dieser Test laufen nach dem Elisa-Prinzip (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ab: Der Probe wird zunächst eine bestimmte Menge an der gesuchten Substanz zugegeben, die aber einen „Marker“ trägt. Das sind meist angekoppelte Enzyme, deren Substratreaktion dann zur meist photometrischen Indikation ausgenutzt wird. In dieses Gemisch aus realen und künstlichen Schadstoffgehalten werden die Antikörper gegeben, um welche die Schadstoffe dann konkurrieren. Nach einem Waschschrift werden die gekoppelten Markerenzyme zur Reaktion gebracht. Das meßbare Signal ist groß, wenn wenig originaler Schadstoff in der Probe war und klein, wenn die Probe stark belastet war. Mit Standards ist eine Quantifizierung möglich.

Die Nutzung biochemischer Analytik unter Verwendung immunochemischer Methoden befindet sich in stürmischer Entwicklung und kann im Rahmen dieses Vortrages nur andeutungsweise vorgestellt werden.

Enzyme

Die zweite Gruppe der analytisch genutzten Biochemikalien sind die Enzyme. Sie fördern bestimmte Reaktionen in den Zellen durch katalytische Prozesse. Dazu geht ein Stoff (Substrat) mit dem Enzym eine Übergangsverbindung ein, die für den energetischen Verlauf einer Reaktion sehr günstig ist, so daß langsame Reaktionen schneller und manche erst ermöglicht werden. Diese Funktion macht die Enzyme aber auch sehr empfindlich auf Störungen von „außen“. Solche „Störungen“ können analytisch ausgewertet werden:

Enzyme können durch spezielle Hemmstoffe (Inhibitoren) in ihrer Aktivität beeinträchtigt werden. Auf dieser Basis ist der Nachweis und partiell die Bestimmung einiger im Umweltbereich relevanter Schadstoffe möglich, da diese die Aktivität ausgewählter Enzyme hemmen. Diese **Enzymhemmung** verbindet oder verzögert die Umsetzung des Substrates oder die Bildung des Endproduktes. Ein konzentrationsproportionales Meßsignal wird damit in eindeutiger Weise beeinflusst. Für die praktische Durchführung eines Enzymhemmtests wird die zu untersuchende Wasserprobe mit einer bestimmten Konzentration eines Enzympräparates mit definierter Aktivität versetzt. Das entsprechende Substrat und unter Umständen einige für den Ablauf der Reaktion notwendigen Cofaktoren werden in der optimalen Konzentration zugegeben, um die katalysierte Reaktion unter günstigen Bedingungen durchzuführen. Nach einer definierten Inkubationszeit unter kontrollierten stabilen Testbedingungen wird die Enzymaktivität bestimmt. Hemmeffekte werden meßbar, indem die Enzymaktivität in dem Testansatz mit den Ergebnissen eines parallel verlaufenden Ansatzes (Kontrollansatz) unter ebenfalls optimalen, aber nicht-hemmenden Bedingungen, verglichen wird. Für das Kontrollsystem eignet sich natürliches nicht kontaminiertes Wasser. Beispiele für Enzymhemmtests zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2: Beispiele für Enzymhemmtests

Bezeichnung	Acetylcholinesterase Hemmtest	Urease Hemmtest	Acetaldehyddehydrogenase Hemmtest
Prinzip	Hemmung der enzymatischen Umsetzung von Acetylcholin durch Phosphorsäureester und insektizide Carbamate	Hemmung der enzymatischen Umsetzung von Harnstoff durch Schwermetalle und Pestizide	Hemmung der enzymatischen Umsetzung von Acetaldehyd durch Fungizide
Durchführung	photometrischer, potentiometrischer oder amperometrischer Test mit gelöster oder immobilisierter Acetylcholinesterase, Meßzeiten ≥ 10 Minuten	Änderung des pH-Wertes mit gelöster oder immobilisierter Urease, Meßzeiten ≥ 10 Minuten	photometrischer Test mit gelöster Aldehyddehydrogenase, Direktmessung nach 30 Minuten Inkubationszeit
Wirkmechanismus	1	2	3
1	$\text{Acetyl(thio)cholin} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{AChE}} (\text{Thio})\text{Cholin} + \text{Hac}$ <p style="text-align: center;">↑ Schadstoff (Organophosphat- und Carbamatpestizide)</p>		
2	$\text{Harnstoff} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{AChE}} 2 \text{NH}_3 + \text{CO}$ <p style="text-align: center;">↑ Schadstoff (Schwermetalle, Pestizide)</p>		
3	$\text{Acetaldehyd} + \text{NAD} \xrightarrow{\text{AChE}} \text{NADH} + \text{Hac}$ <p style="text-align: center;">↑ Schadstoff (Zineb, Maneb, Thiram)</p>		

Zum Screening von Organophosphat- und Carbamat-Pestiziden in Wasser wurde bereits Anfang der siebziger Jahre ein Test auf der Basis der Acetylcholinesterase (AChE)-Hemmung beschrieben (siehe auch Tabelle 2). Die Hemmreaktion beruht auf einer Phosphorylierung bzw. Carbamoylierung der Aminosäure Serin im aktiven Zentrum des Enzyms AChE. Die Substratreaktion enthält die enzymatische Hydrolyse von Acetylcholin zu Essigsäure und Cholin und kann z. B. über die Messung der zeitlichen Veränderungen des pH-Wertes kontrolliert werden.

Solche Enzymhemmtests können im batch-Modus oder im flow-Modus erfolgen. Besonders im Hinblick auf eine streng kontrollierte und weitgehend automatisierte Durchführung solcher Tests setzen sich Fließverfahren immer stärker durch. In solche Verfahren sind computergesteuert die notwendigen Kontrollmessungen (unkontaminierte Probe), die Schadstoffanreicherungs- und Spülschritte sowie die Bestimmung des Desaktivierungsgrades von Enzymen durch Substratinjektion ebenso integriert wie die Möglichkeit der Signalbearbeitung und der statistischen Kontrolle.

Enzymtests unter Fließbedingungen werden unter Nutzung von Enzymreaktoren und verstärkt zukunftsorientiert von Biosensoren durchgeführt.

Von **Biosensoren** spricht man, wenn zum Analytnachweis oder zur Analytbestimmung biologische Prinzipien angewendet werden. Sie beruhen auf der direkten Kopplung biologisch aktiver Systeme (Rezeptoren) wie Enzyme, Antikörper, Zellkulturen und Mikroorganismen mit Signalwandlern (Transducern). Die Rezeptoren bewirken die spezifische Erkennung und Umwandlung von Analytmolekülen, die Transducer erzeugen aus einem chemischen oder physikalischen Signal das elektrische Ausgangssignal des Sensors. Abbildung 4 zeigt den prinzipiellen Aufbau eines solchen Biosensors.

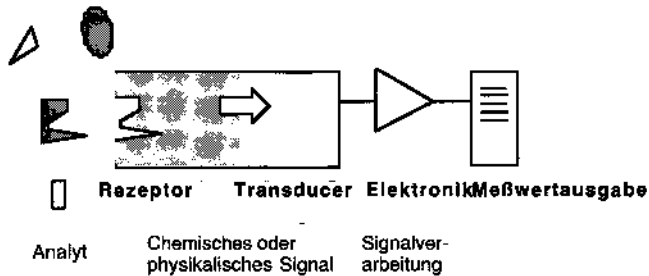


Abbildung 4: Aufbau von Biosensoren

Der Transducer liefert das konzentrationsproportionale Signal, das computerkompatibel gestaltet werden kann. Einen Überblick über die angewendeten Detektionsmethoden beim Einsatz von Biosensoren zeigt Abbildung 5.

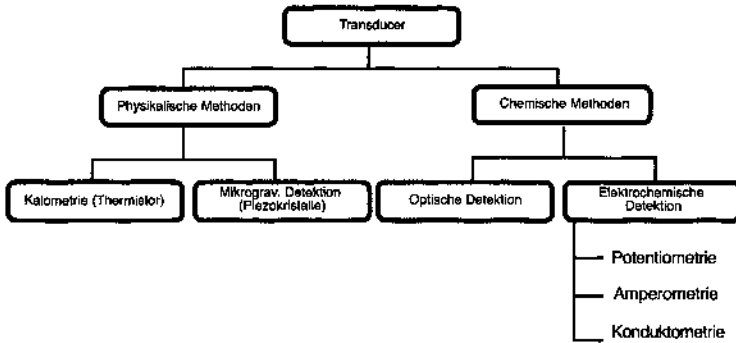


Abbildung 5: Detektionsprinzipien bei der Verwendung von Biosensoren

Biosensoren verbinden die Sensitivität eines physikalisch-chemischen Meßprinzips mit der Selektivität eines biochemischen Systems. Damit können z. B. speziell in der Trinkwasserkontrolle pestizidkontaminierte Proben durch Screeningverfahren erkannt werden, bevor sie einer aufwendigen Analytik unterzogen werden. Die Stellung solcher Screeningverfahren bei der Analytik von Pflanzenschutzmitteln unter Anwendung von Pestizidbiosensoren, die auf Enzymhemmreaktionen beruhen, zeigt Abbildung 6.

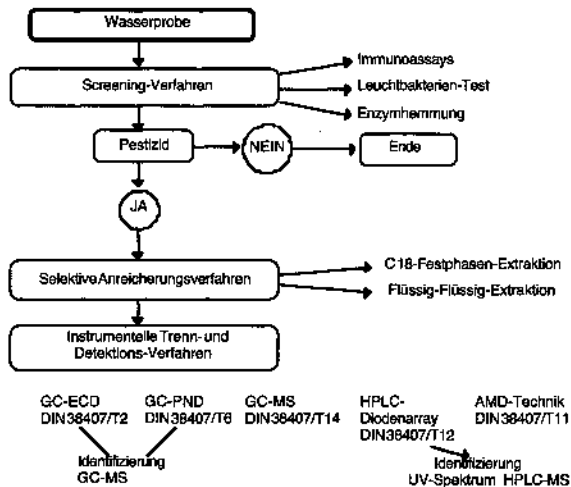


Abbildung 6: Stellung von Screening-Tests in der Pestizidanalytik

Präparation von Biosensoren, genutzt für Enzymhemmtests [7]

Der erste Entwicklungsschritt besteht in der Immobilisierung der Enzyme auf dem Transducer-Element durch:

- kovalente Bindung der Enzyme an eine derivatisierte wasserunlösliche Matrix des Transducers
- Adsorption der Enzyme an der wasserunlöslichen Matrix auf dem Transducer
- Einfluß der Enzyme in wasserunlösliche Polymermatrizes

Es besteht auch die Möglichkeit, das bioaktive System getrennt zu präparieren (separate Membran) und anschließend auf dem Transducer aufzubringen. Nach der Immobilisierung der Biokomponente erfolgt die Kombination des Sensors mit weiteren Modulen (z. B. Referenzelektroden, Meßverstärker) zum Meßsystem.

Bestimmung von Pestizidspuren in Wasserproben

Pestizide spielen in der Landwirtschaft, im Forstwesen, im Vorratsschutz, im Haushalt sowie in der Human- und Veterinärhygiene zur Bekämpfung von Schadstofforganismen auch heute noch eine so große Rolle, daß sie aus unserem Kulturleben nicht wegzudenken sind. Ohne diese Mittel wären Ernährung und Gesundheit der ständig wachsenden Bevölkerung stark bedroht.

Auf dem EU-Markt sind über 100.000 Stoffe zugelassen, von denen ca. 1.000 industrielle Bedeutung haben und zugleich umweltgefährdend sind. Dazu gehören in hohem Maße auch die Pestizide. Der Begriff „Pestizide“ schließt alle Stoffe ein, die gegen Mikroorganismen, Pflanzen und Tiere angewendet werden.

Ihre Abbauege (Metabolisierung) sind z. T. bekannt, und die zielgerichtete Ausbringung kann bei fachgerechter Durchführung kaum Gefahren für die Umwelt bringen. Aber der unsachgemäße Gebrauch, Havarien oder Gesetzesüberschreitungen erfordern ebenso große Aufmerksamkeit wie der unkontrollierte Übergang der Pestizide in angrenzende Umweltmedien oder die Anreicherung von Abbauprodukten.

Der Grenzwert für Pestizide im Trinkwasser wurde in der BRD auf 0,1 µg/l für die Einzelsubstanz und 0,5 µg/l für die Summe der Einzelsubstanzen festgelegt. Die Kontrolle dieser Grenzwerte stellt auch heute noch eine analytische Herausforderung dar, insbesondere auch wegen der großen Vielfalt von Pestizid-Substanzgruppen und der daraus resultierenden Einzelpestizide.

Die Nachweisvermögen der meisten analytischen Methoden haben ihre Grenzwerte weit über diesen Bereich. Deshalb sind (zeitaufwendige) Anreicherungsprozeduren notwendig, vorzugsweise und zunehmend die Festphasenextraktion (SPE). Kombiniert mit der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), der Gaschromatographie (GC) und in neuerer Zeit auch mit der Kapillarzonenelektrophorese (KZE; dargestellt im nachfolgenden Teil) werden Pestizide in Wasserproben bestimmt.

Ringversuche haben deutlich gemacht, daß man mit relativen Standardabweichungen der Bestimmungen von über 50% rechnen muß. Für die geforderten Konzentrationsbereiche ist dies völlig normal und verdeutlicht die Problematik der Verwendung analytischer Daten (der extremen Spurenanalyse) zur Entscheidung von Grenzwertüberschreitungen. Eine flächendeckende Analytik von Wasser, Boden, Luft und Lebensmitteln bezüglich der Pestizide ist unumgänglich. Biotests und Summenparameterbestimmungen werden dafür zunehmend eingesetzt.

Die biologischen bzw. biochemischen Verfahren zeigen einen summarischen Effekt der Verbindung auf eine biologische Spezies und widerspiegeln damit den natürlichen Umstand, daß ökologische Systeme und Lebewesen auf alle Einflüsse summarisch reagieren und auch synergetische und antagonistische Effekte erfaßt werden können.

Eigene Arbeiten zur Bestimmung von Pestizidspuren in Wasserproben beschritten folgenden Weg: Nutzung von Halbleiterbauelementen (pH-sensitive Feldeffekttransistoren, ISFET) als Transducerelemente, Abscheidung von strukturierten Enzymmembranen auf dem Transducer mittels Photopolymerisation und Kombination zu einem computergesteuerten Durchflußsystem (FAV, Fließverfahren). Ein solches Fließsystem zur automatisierten Bestimmung von Pestiziden (dargestellt am Beispiel der Carbofuranbestimmung) mittels Enzyminhibition zeigt Abbildung 7.

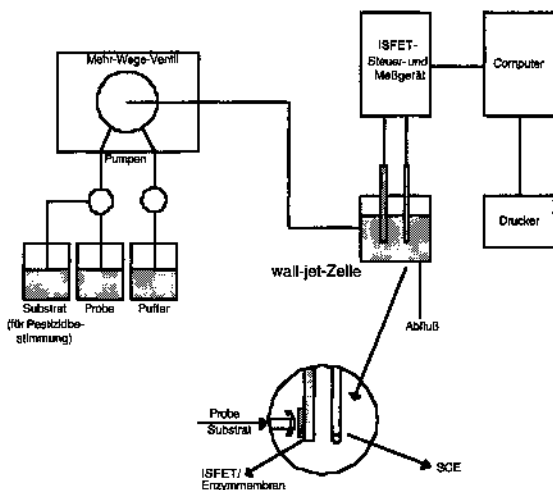


Abbildung 7: Einbindung einer Ureaseelektrode in ein Fließsystem zur Harnstoffbestimmung/Pestizidbestimmung

Wird der Sensor (Enzymmembran) in einer solchen Apparatur der Einwirkung von Carbofuran in einer Wasserprobe ausgesetzt, zeigt sich eine ausgeprägte Deaktivierung (wie Abbildung 8 zeigt), die quantifizierbar ist ($\Delta = A_0 - A$).

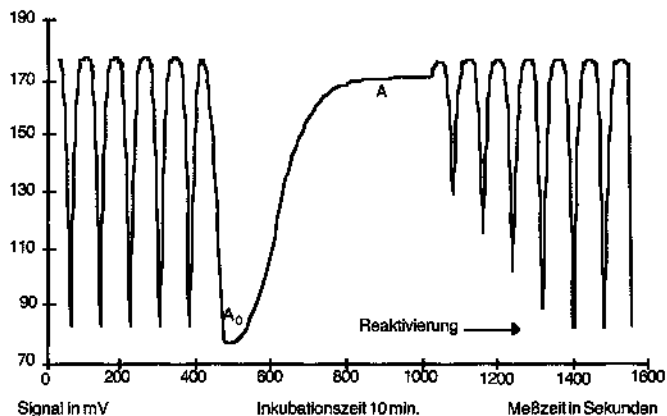


Abbildung 8: Hemmung eines Urease-Sensors mit $1 \mu\text{g/l}$ Carbofuran

Interessant ist insbesondere, daß eine vollständige Reaktivierung durch ein starkes Nucleophil (TMB, substituiertes Dioxim) möglich ist. Damit sind auch unter Fließbedingungen Zykluswiederholungen durchführbar.

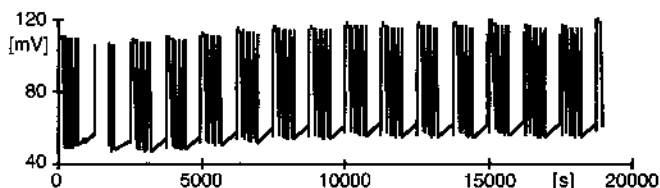


Abbildung 9: Dauereinsatz eines Sensors mit Hemmung durch 0,1 µg/l Carbofuran

Dargestellt in Abbildung 9 sind 14 Zyklen zur Carbofuranbestimmung in Wasser mit 0,1 µg/l innerhalb von sechs Stunden. Eine statistische Bewertung der Signale, dargestellt in Abbildung 10, zeigt die hohe Reproduzierbarkeit sowohl der Aktivitätsbestimmung als auch des Signals nach der Hemmung unter Langzeitbedingungen.

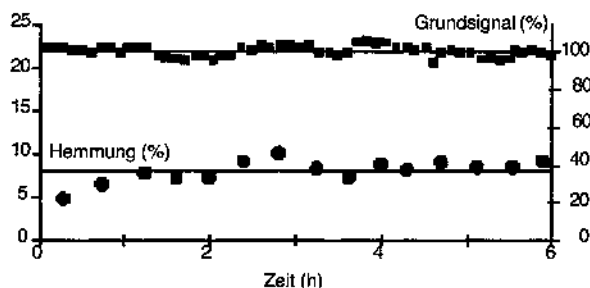


Abbildung 10: Statistische Auswirkung des Dauerexperiments mit Hemmung

Leider ließen sich die guten Resultate nicht auf die Bestimmung weiterer Pestizide übertragen. Damit war auch eine Nutzung als echte Summenparameterbestimmungsmethode nicht möglich.

Erfolgversprechende Ergebnisse wurden bei Hemmwirkungen unterschiedlicher Pestizide auf das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) erhal-

ten, wobei AChE verschiedener Provenienz (Zitteraal, Pferd, Rind) in einem Sensor-Array-System unter Einbeziehung chemometrischer Auswertemethoden zur Anwendung kamen.

3. Bestimmung von Pestiziden in Wasserproben mittels Kapillarzonenelektrophorese

Während Enzym- und Immunoassays für Screening-Tests angewendet werden, dominieren gegenwärtig zur Trennung und Bestimmung von Pestiziden chromatographische Methoden (HPLC, GC).

Als eine leistungsfähige Alternative zu den chromatographischen Verfahren etabliert sich zunehmend die Elektrophorese. In Form der Kapillarzonenelektrophorese (KZE) steht eine Fließmethode zur Verfügung, die als echte Mikromethode (Probemenge im nl-Bereich), bei geringem Eluentenverbrauch und kurzen Trennzeiten ein noch nicht ausgeschöpftes Anwendungspotential aufweist. Applikationsbegrenzend ist vor allem die nicht ausreichende Konzentrationsempfindlichkeit bei Einsatz der vorherrschenden optischen Detektionsmethode. Deshalb sind analytische Anwendungen der KZE auf z. B. Wasserproben zur Bestimmung von Pestiziden im geforderten Erfassungsbereich der Grenzwerte nur unter Einbeziehung leistungstarker Anreicherungstechniken möglich.

Die Kopplung der KZE mit der Massenspektrometrie und Elektrospray sollte zukünftig eine nachweisstarke Detektionstechnik darstellen, um echte Spurenanalytik ohne aufwendige Anreicherungsschritte betreiben zu können.

Fließanalysenverfahren (FAV)

Den nach dem Fließprinzip arbeitenden Analysatoren ist gemeinsam, daß kontinuierlich eine Transportlösung durch das System gefördert und sequentiell Probe in eine Transportleitung eingeschleust wird. Das Probensegment wird am Durchflußdetektor vorbeigeführt und erzeugt ein konzentrationsproportionales Signal. Auf dem Weg von der Probeneinführung bis zum Detektor können chemische Reaktionen zwischen den Analyten und Reagenzien, die sich in der Transportlösung befinden oder an fixier-

ten Punkten in das System eingeführt werden, stattfinden. Zu den Systemen, die nach diesem Prinzip arbeiten, sind prinzipiell einzuordnen:

- die Flüssigkeitschromatographie, insbesondere als HPLC
- die kontinuierliche Durchflußsysteme mit Luftsegmentierung (CFA)
- die Fließinjektionssysteme (FIA)
- die Kapillaronenelektrophorese (KZE) oder (CZE)

Gemeinsamkeiten und Besonderheiten der Methoden HPLC, CFA, FIA und KZE sind in Form von Fließschemata in Abbildung 11 ausgewiesen.

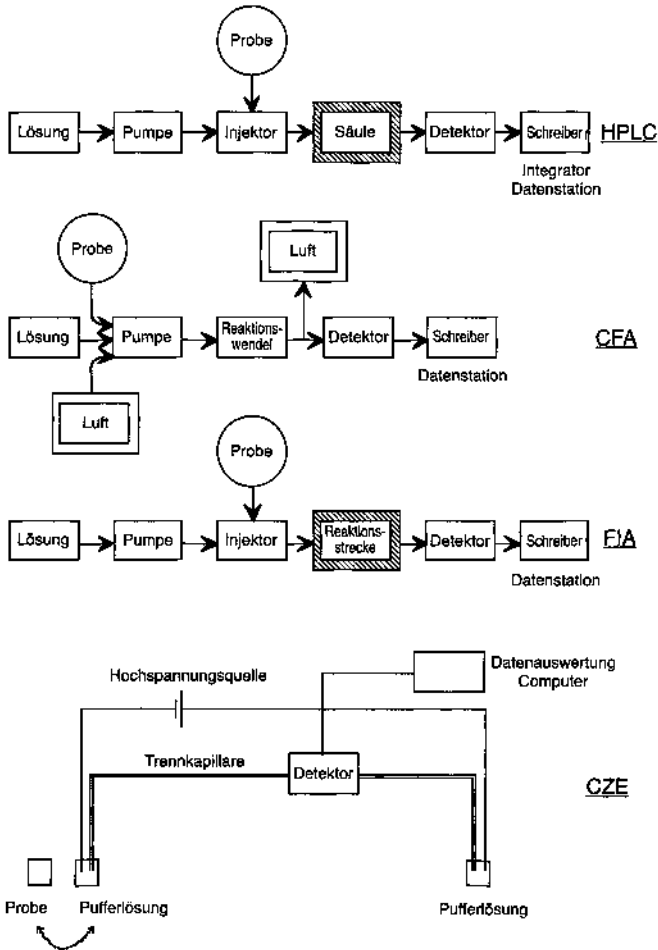


Abbildung 11: Fließschemata HPLC, CFA, FIA und CZE

FIA und CFA automatisieren naßchemische Bestimmungsmethoden und sind somit zur Bearbeitung großer Probenserien mit hoher Analysenfrequenz (bis ca. 100 Proben pro Stunde) geeignet.

Kapillarelektrophoretische Trennung und Bestimmung von Pestiziden

Der Begriff Kapillarelektrophorese umfaßt die Vielzahl elektrophoretischer Trenntechniken, die in engen Röhren durchgeführt werden. Die einfachste und gleichzeitig meistverwendete kapillarelektrophoretische Technik ist die Kapillaronenelektrophorese. Bei der KZE erfolgt die Trennung geladener Probenmoleküle, die die mit Pufferlösung gefüllten Kapillaren ungehindert durchwandern, in verschiedene Probezonen aufgrund elektrophoretischer Mobilitätsunterschiede. Ungeladene Probemoleküle können mittels der Technik der Micellaren Elektrokinetischen Chromatographie (MEKC) getrennt werden. Diese 1984 von TERABE eingeführte Technik nutzt die Tatsache, das organische (neutrale) Moleküle durch Zugabe eines geeigneten Micellbildners (z. B. Tensid) zur Pufferlösung geladene Micellen bilden, die einer elektrophoretischen Trennung zugänglich sind. Durch die Zugabe von Tensiden zum Puffer bei einer Konzentration oberhalb der kritischen Micellkonzentration (CMC) liegt neben der wäßrigen Pufferphase eine weitere, pseudo-stationäre Micellphase vor. Am häufigsten wird SDS (Natrium-Dodecylsulfat) eingesetzt. Die SDC-Micellen tragen negative Ladung und wandern bei Anlegen eines elektrischen Feldes

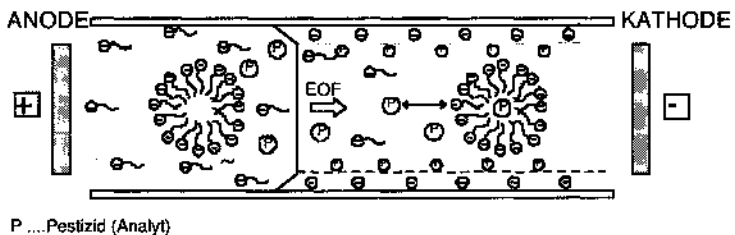
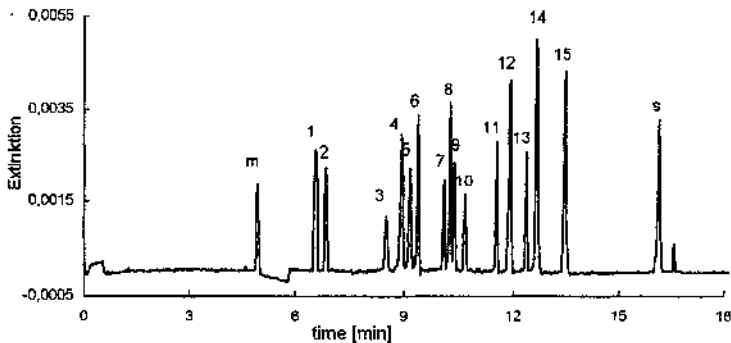


Abbildung 12: Trennmechanismus in der MEKC

Der Grad der Wechselwirkung der einzelnen Analytmoleküle mit SDS unterscheidet sich je nach der dem Molekül inhärenten Hydrophobie. Daraus resultiert für unterschiedliche Analytmoleküle (z. B. Pestizidmoleküle) eine unterschiedliche Aufenthaltsdauer in den Micellen sowie die Verteilung zwischen wäßriger Puffer- und pseudo-stationärer Phase.

Halten sich die Analytmoleküle im Puffer auf, werden sie mit dem elektromotischen Fluß (EOF) transportiert, halten sie sich in den Micellen auf, bewegen sie sich elektrophoretisch mit der Micelle. Die effektive Mobilität neutraler Proben (z. B. Pestizidmoleküle) ergibt sich aus der Summe beider Beiträge und ist schematisch in Abbildung 12 dargestellt.

Eigene Arbeiten [8] schlossen Untersuchungen zur Auswahl der geeigneten Trennbedingungen (Zugspannung, Kapillardurchmesser, Pufferkonzentration und -zusammensetzung, Micellbildner ...) und nachfolgend zu anwendbaren Anreicherungs-schritten ein.



Peakzuordnung:

1...2,4-D	5...Simazin	9...Atrazin	13...Parathionethyl
2...2,4,5-T	6...Protham	10...Diuron	14...Chlorpheavinphos
3...Propoxur	7...Monuron	11...Parathionmethyl	15...Propazin
4...Carbofuran	8...Desmetryn	12...Terbutylazin	

m ...Methanol (Marker für Migrationszeit des EOF)

s ...Sudan III (Marker für Migrationszeit der Micelle)

Abbildung 13: Pestizidbestimmung mittels KZE

Abbildung 13 zeigt eine Trennung von 15 Pestiziden (Carbamate, phosphororganische Verbindungen, Harnstoffe, Triazine, Phenoxy-carbonsäuren).

Eine von den Normvorschriften (DIN) geforderte Identifizierung der getrennten Pestizide kann über die (gut reproduzierbaren) Migrationszeiten erfolgen. Diese Zuordnung ist im Sinne einer rechtlichen Verwertung (Grenzwertproblematik) nicht aussagekräftig genug. Zur eindeutigen Identifizierung ist eine weitere Methode erforderlich, die Strukturdaten liefert. Zusätzliche Informationen vermitteln die UV-Absorptionsspektren der Pestizide. Mit Hilfe eines fast-scanning-Detektors wurden deshalb die UV-Spektren direkt während der KZE-Analyse im Echtzeitmodus aufgenommen und mit Spektren aus der eigenen Bibliothek bzw. der Literatur verglichen.

Die quantitative Auswertung erbrachte berechnete Nachweisgrenzen für die ausgewählten Pestizide zwischen 100–500 µg/l bei Arbeitsbereichen von 250–2000 µg/l.

Für die Untersuchung von Realproben im gesetzlich geforderten unteren µg/l-Bereich ergibt sich die Forderung nach einer Probenaufkonzentrierung um den Faktor 1.000, besser 10.000. Als Anreicherungs-methode der Wahl erwies sich die Festphasenextraktion (SPE) unter Nutzung von ausgewählten speziellen RP-Phasen. Die berechneten Nachweisgrenzen nach SPE liegen dann bei 1 mg/l und sind damit für eine Real-Wasseranalytik immer noch nicht ausreichend.

Die Erhöhung der zur SPE eingesetzten Probenmenge von 250 ml auf 1000 ml oder mehr verbessert die Nachweisgrenzen aber gleichzeitig erhöht sich der Zeitaufwand drastisch (ca. 3–6 Stunden). Aus diesem Grund bietet sich die Kopplung der Festphasenextraktion mit einer zweiten Konzentrierungstechnik an. Dazu wurde die Anwendbarkeit der kapillarspezifischen Konzentrierung als „Sample Stacking“ getestet. Die Konzentrierung der Analyten an der Phasengrenze Probe-Puffer infolge Feldstärkedifferenz wird über die Injektion „großer“ Probevolumina (z. B. 100 ml) und Variation der Zugspannung realisiert. Es wird zusätzlich eine 30-fache Aufkonzentrierung erreicht. Dieser Konzentrierungsfaktor ermöglicht es, den Anreicherungs-faktor der SPE durch Reduzierung des Ausgangs-Probevolumens zu erniedrigen und damit den Zeitbedarf zu senken. Für das gesamte Analysenverfahren, bestehend aus einer Zwei-Stufen-Konzentrierung (z. B. 250-fache Anreicherung mittels SPE von 125 ml Probe und 30-fache Kapillarkonzentrierung) sowie MEKC-Trennung und Bestimmung, ist dann ein Zeitaufwand von nur 2 Stunden nötig. Die Nach-

weisgrenzen des Gesamtverfahrens wurden zwischen $0,01 \mu\text{g/l}$ (Propazin) und $0,08 \mu\text{g/l}$ (Diuran) bei relativen Standardabweichungen kleiner 30% bestimmt.

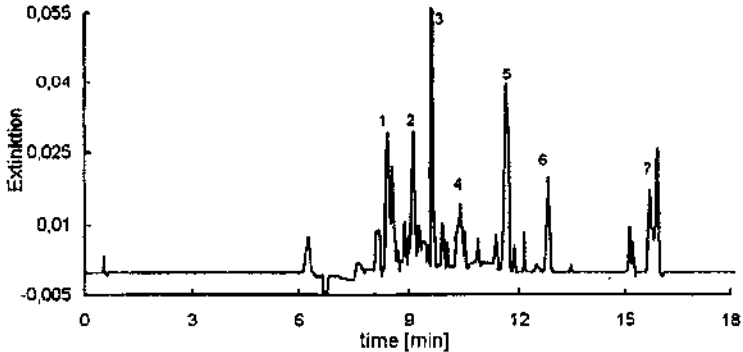


Abbildung 14: Elektropherogramm von Saale-Wasser

Die Methode wurde auf die Untersuchung von Fließgewässer-Proben angewendet. Abbildung 14 zeigt ein Elektropherogramm einer Saalewasser-Probe mit den identifizierten Peaks (fast-scanning-Detektor) 3...Atrazin, 5...Terbutylazin, 2...Triazin, 1,4,6 und 7...Phenole, 6...Nitrophenol. Die anderen Peaks konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Eine Quantifizierung ergab z.B. für Atrazin einen Gehalt von $1,4 \pm 0,5 \mu\text{g/l}$, für Terbutylazin von $0,8 \pm 0,2 \mu\text{g/l}$.

Damit steht mit der KZE eine weitere Möglichkeit zur Pestizidtrennung und -bestimmung zur Verfügung, die nach starker Anreicherung einen Beitrag zur schwierigen Pestizidproblematik leisten kann. Einen Durchbruchsprung der CE (KZE) in der analytischen Praxis kann man aber erst erwarten, wenn nachweisstärkere Detektionsprinzipien technisch realisiert werden.

4. Entwicklungstrend in der Umweltanalytik

Zukünftige Aufgaben und Entwicklungsstrategien lassen sich wie folgt thesenhaft zusammenfassen:

- Spuren- und Elementspeziesanalytik anorganischer und organischer Verbindungen in umweltrelevanten Materialien (ausgewählt PAHS, PCBS, PCDD/ PCDF)
- Ausarbeitung optimierter Strategien zur Probenahme und Probenvorbereitung
- Früherkennung von Belastungstrends
 - screening tests
 - fingerprint-Analytik
 - Sensorik
 - Mustererkennung
 - Bioindikatoren
- Qualitätssicherung umweltanalytischer Daten (Ringversuch, Referenzmaterialien)
- Grenzwerte \longrightarrow justifiable analytische Bestimmbarkeit
- Umweltanalytik \longleftrightarrow Umweltchemie
 - Akkumulation
 - Metabolisierung
 - Abbau

Abstract

The study of our environment includes a very broad range of subjects (nonliving media, living compartments and other). The task of environmental analysis consists of the qualitative and quantitative determination of contaminants in the environment and the detection of anthropogenically induced global, regional, or even local changes in the concentration of natural substances. In practice very often environmental problems are connected with problems of trace or ultratrace analysis. Such analysis requires a high degree of accuracy and precision.

Modern trace analysis uses instrumental direct methods or chemical-

analytical compound methods (hybride techniques). Modern developments in the field of environmental analysis are demonstrated:

- use of enzyme membranes (in biosensors) incorporated urease or acetylcholinesterase for the determination of pesticides (inhibition effect)
- pesticide analysis by micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC)

At the end of the lecture strategies, tasks and developments in the field of environmental analytical chemistry for the future are given.

Literatur

- [1] H. Hein, W. Kunze, Umweltanalytik, VCH, Weinheim 1994
- [2] H. Müller, H. Zwanziger, J. Flachowsky, Trace Analysis, pp. 95–110, In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. 5, Weinheim 1994
- [3] G. Schwedt, Mobile Umweltanalytik, Vogel Verlag, Würzburg 1995
- [4] G. Schwedt, Elementspeziesanalytik, Chemie in unserer Zeit 31 (1997) 183–189
- [5] L. Dunemann, J. Begerow, Kopplungstechniken zur Elementspeziesanalytik, VCH, Weinheim 1995
- [6] Senatskommission für Wasserforschung der DFG, Gewässergütekriterien, VCH, Weinheim 1996
- [7] H. Müller, A. Zürn, Pestizidanalytik in Wasserproben, Teil 1: Biologische und biochemische Tests
Teil 2: Biosensoren für Enzymhemmtests, CLB Chemie in Labor und Biotechnik 45 (1994) 298–302; 45 (1994) 350–353
- [8] H. Süße, H. Müller, Pesticide analysis by micellar electrokinetic capillary chromatography J. of Chromatography A 730 (1996) 337–343