

**Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von  
Arzneimittelwirkstoffen in Oberflächenwasser  
mittels LC-MS/MS**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

**DOCTOR RERUM NATURALIUM**

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II – Chemie und Physik  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vom staatlich geprüften Diplomlebensmittelchemiker

Herrn Daniel Kern

geboren am 10. April 1977 in Oelsnitz/Vogtl.

Gutachter

Prof. Dr. Wilhelm Lorenz

Prof. Dr. Gerrit Schüürmann

Tag der Verteidigung

12.04.2007

**urn:nbn:de:gbv:3-000011665**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011665>]

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2002 bis September 2006 unter der Leitung von Prof. Dr. W. Lorenz am Institut für Lebensmittel- und Umweltchemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Halle (Saale) angefertigt.

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof Dr. W. Lorenz für das interessante Thema und die Möglichkeit, die Arbeit am Institut für Lebensmittelchemie und Umweltchemie durchführen zu können. Herrn Dr. Sorkau und Herrn Dr. Mörke danke ich für die lehrreichen Gespräche. Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern des Arbeitskreises für die Unterstützung und die Fachdiskussionen.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Wolf bedanken, der ständig bereit war, meine Fragen bezüglich der Analytik zu beantworten. Bei meinen Freunden bedanke ich mich für die Ablenkung vom Alltagsstress. Darüber hinaus danke ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Abschließend danke ich den wichtigsten Menschen in meinem Leben: Meinen Eltern danke ich für die Finanzierung meiner Ausbildung und die immerwährende Unterstützung. Bedanken möchte ich mich auch bei meiner gesamten Familie für die Wünsche und die Anteilnahme im Verlauf dieser Arbeit. Besonderer Dank gilt meiner Lebensgefährtin Dorit Naas, da sie auch in turbulenten Zeiten ein wichtiger Rückhalt war.

## Kurzfassung

Seit dem Nachweis von Clofibrinsäure in vielen aquatischen Systemen um Berlin Anfang der 90er Jahre ist die Anzahl der nachgewiesenen Arzneimittelrückstände kontinuierlich gestiegen. Dieser Arzneimitteleintrag in die Umwelt führte sowohl in aquatischen als auch in nichtaquatischen Systemen zu schweren Schädigungen der Fauna. Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine Methode zur Bestimmung von 16 wichtigen Arzneimittelwirkstoffen aus den Gruppen der Analgetika, der Lipidsenker, der Hormone, der Psychopharmaka und der Phosphodiesterase-Typ5-Hemmer mittels LC-MS/MS entwickelt. Zur Kompensation von Matrixeffekten und Verlusten bei der Aufarbeitung wurde für die Quantifizierung bei der negativen Ionisation  $^{37}\text{Cl}$ -markiertes Chloramphenicol und bei der positiven Ionisation deuteriertes Diazepam verwendet. So konnte für 13 von 16 Analyten eine Bestimmungsgrenze unterhalb des Schwellenwertes für die ökotoxikologische Bewertung von 10 ng/L erreicht werden.

Mit der entwickelten Methode wurden Proben aus der Saale und Seen um Halle vermessen. Hierbei konnte bestätigt werden, dass Carbamazepin (Medianwert 202,5 ng/L) und Diclofenac (Medianwert 166,9 ng/L) an vielen Stellen der Saale nachgewiesen wurden und der Abwasserpfad die wichtigste Eintragsquelle für Arzneimittelwirkstoffe in die Umwelt darstellt.

## Abstract

The number of pharmaceutical residues found in aquatic systems has been increasing since the detection of Clofibrin acid around Berlin at the beginning of the 1990s. This enter into the environment led to heavy fauna damage in aquatic as well as in non-aquatic systems. An LC-MS/MS method to determine 16 important pharmaceuticals belonging to analgetics, antilipidemic drugs, hormones, psychotropics, phosphodiesterase-typ5-inhibitors was developed in this thesis.  $^{37}\text{Cl}$ -marked Chloramphenicol and deuterated Diazepam were used for quantification in negative and positive mode respectively, to compensate for matrix effects and loss during sample preparation. So a limit of quantification below the threshold for ecotoxicological assessment of 10 ng/L was achieved for 13 out of 16 analytes.

Samples from the river Saale and lakes around Halle were quantified with the method. It was confirmed that, Carbamazepin (median 202.5 ng/L) and Diclofenac (median 166.9 ng/L) are found at various points in the aquatic environment of the Saale and that the wastewater path is the most important source for contamination with pharmaceutical residues.

## Abkürzungsverzeichnis

Neben den Abkürzungen der Deutschen Rechtschreibung laut Duden, Internationaler Einheiten und den Symbolen der chemischen Elemente des Periodensystems wurden folgende Abkürzungen verwendet:

AMG	Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz)
AMGVwV	allgemeine Verwaltungsvorschrift zur Durchführung des AMG
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>
API	<i>atmospheric pressure ionization</i>
APPI	<i>atmospheric pressure photo ionization</i>
ARGE Elbe	Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe
AU	Flächeneinheit
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BG	Bestimmungsgrenze
CAD	Kollisionsgas
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHMP	<i>committee for medicinal products for human use</i>
CRM	<i>charged-residue model</i>
DAD	Diodenarraydetektor
DP	<i>declustering potential</i>
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
EP	<i>entrance potential</i>
ESI	Elektrosprayionisation
FC	<i>faraday cup</i>
GC	Gaschromatographie
HDL	<i>high density lipoproteins</i>
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
ICP	induktiv gekoppeltes Plasma
IKSR	Internationale Kommission zum Schutz des Rheins
IS	interner Standard
k. A.	keine Angabe
LC	Flüssigchromatographie

---

LDL	<i>low density lipoproteins</i>
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption ionization</i>
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
NG	Nachweisgrenze
PEC	<i>predicted environmental concentration</i>
PNEC	<i>predicted no effect concentration</i>
PTFE	Polytetrafluorethylen
RPLC	<i>reversed phase liquid chromatography</i>
SDA	Standardaddition
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SIDT	<i>single ion in droplet theory</i>
SPE	Festphasenextraktion
TOF	Flugzeitanalysator
VLDL	<i>very low density lipoproteins</i>
WR	Wiederfindungsrate
ZNS	zentrales Nervensystem

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>GRUNDLAGEN</b>	<b>7</b>
2.1	ARZNEIMITTELWIRKSTOFFE	7
2.1.1	<i>Einführung</i>	7
2.1.2	<i>Eintragspfade</i>	8
2.1.3	<i>Rechtliche Grundlagen</i>	10
2.1.4	<i>Überwachung und Risikoeinschätzung</i>	11
2.1.5	<i>Einteilung und Verwendung</i>	14
2.1.5.1	<i>Analgetisch wirksame Substanzen</i>	14
2.1.5.2	<i>Lipidblutspiegel senkende Mittel</i>	15
2.1.5.3	<i>Hormone</i>	16
2.1.5.4	<i>Psychopharmaka</i>	17
2.1.5.5	<i>Antiepileptika</i>	19
2.1.5.6	<i>Phosphodiesterase- Typ5-Hemmer</i>	19
2.1.6	<i>Eingesetzte Arzneimittelwirkstoffe</i>	19
2.2	ANALYTISCHE GRUNDLAGEN	21
2.2.1	<i>Flüssigchromatographie</i>	21
2.2.2	<i>Massenspektrometrie</i>	22
2.2.2.1	<i>Terminologie</i>	22
2.2.2.2	<i>Ionenquelle</i>	23
2.2.2.3	<i>Massenanalysator</i>	31
2.2.2.4	<i>Detektor</i>	34
2.2.3	<i>Festphasenextraktion</i>	36
<b>3</b>	<b>GERÄTE UND CHEMIKALIEN</b>	<b>38</b>
3.1	CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	38
3.2	STANDARDSUBSTANZEN	39
3.3	GERÄTE	40
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>41</b>
4.1	ERSTELLEN DER MASSENSPEKTROMETRIEMETHODE	41
4.1.1	<i>Begriffserklärung</i>	41
4.1.2	<i>Methodenerstellung</i>	41
4.1.3	<i>Ionisationsmodus</i>	46
4.1.4	<i>Quellenvergleich</i>	48
4.1.5	<i>Massenspektrometriemethode</i>	49

---

4.2	ENTWICKLUNG DER HPLC-METHODE	50
4.2.1	<i>Vorversuche</i>	50
4.2.2	<i>Chromatographische Trennung</i>	54
4.2.3	<i>Optimierung der Intensität</i>	57
4.2.4	<i>Optimierte HPLC-Methode</i>	61
4.3	ENTWICKLUNG DER FESTPHASENEXTRAKTIONSMETHODE	61
4.3.1	<i>Adsorption an Kunststoffen</i>	62
4.3.2	<i>Einengen der Eluate und Aufnahme der Rückstände</i>	64
4.3.3	<i>Festphasenextraktion</i>	70
4.3.3.1	<i>Aufbau der Apparatur</i>	70
4.3.3.2	<i>Vergleich der Festphasenmaterialien</i>	70
4.3.4	<i>Optimierung der Festphasenextraktion</i>	72
4.4	WEITERFÜHRENDE BETRACHTUNGEN ZU MATRIXEINFLÜSSEN	77
4.5	QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER ANALYTEN	82
4.5.1	<i>Voraussetzungen</i>	82
4.5.2	<i>Interner Standard</i>	83
4.5.3	<i>Aufstellen der Kalibriergeraden</i>	87
4.5.4	<i>Standardaddition</i>	91
<b>5</b>	<b>UNTERSUCHUNG VON OBERFLÄCHENGEWÄSSERN</b>	<b>96</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>105</b>
<b>7</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>107</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>109</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>114</b>
<b>10</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>117</b>
<b>ANHANG I</b>		<b>I</b>
<b>ANHANG II</b>		<b>XIII</b>
<b>ANHANG III</b>		<b>XX</b>
<b>ANHANG IV</b>		<b>XXIV</b>
<b>ANHANG V</b>		<b>XXVII</b>
<b>ANHANG VI</b>		<b>XXIX</b>
<b>ANHANG VII</b>		<b>XXX</b>
<b>ANHANG VIII</b>		<b>XXXI</b>
<b>ANHANG IX</b>		<b>XXXII</b>

# 1 Einleitung

Wasser ist – und wird es wohl auch immer bleiben – eine der Grundvoraussetzungen für das irdische Leben. Nur wo es in ausreichenden Mengen vorkommt, ist auch eine Entwicklung des Lebens möglich. Daher liegt es auf der Hand, dass wir alles unternehmen müssen, diesen Rohstoff in seiner ursprünglichen Qualität zu bewahren.

Mit Zunahme der industriellen Entwicklung und mit dem Anstieg der Bevölkerung nahm die Belastung der Wasserressourcen immer weiter zu. Um die Qualität des Trinkwassers zu schützen, wurden vom Gesetzgeber verschiedene Verordnungen erlassen. So sind z. B. in der Trinkwasserverordnung vom 21. Mai 2001 viele Schadstoffe mit Höchstmengen aufgeführt und Qualitätskriterien festgelegt. Allerdings sucht man Regelungen zu Arzneimitteln in diesen Verordnungen vergebens. Lange Zeit dachte man bei Risiken im Zusammenhang mit Arzneimitteln lediglich an die Nebenwirkungen. Aber negative Auswirkungen auf die Lebewesen sowohl in aquatischen [1, 2] als auch nichtaquatischen Systemen (Massensterben von Geiern in Asien durch Diclofenac [3]) führten zu einem Umdenken. Vor allem da schon durch den bestimmungsgemäßen Gebrauch von Arzneimitteln diese oder ihre Metabolite über die Ausscheidungen in die Abwassersysteme gelangen. Werden sie dort nur unvollständig abgebaut oder zurückgehalten, setzt sich ihr Weg über die Vorfluter in die Oberflächenwässer oder teilweise ins Grundwasser fort [4, 5].

Schon zu Beginn der 90er Jahre rückten die Arzneimittelrückstände mit dem Nachweis von Clofibrinsäure in vielen aquatischen Systemen um Berlin [6] in den Blickpunkt der Öffentlichkeit und der Wissenschaft. Seither wurde viel getan, um den bisherigen Eintrag abzuschätzen und gesetzliche Regelungen für die Sicherheit der Umwelt zu treffen [7, 8].

Ziel dieser Dissertation ist es, mittels LC-MS/MS eine empfindliche Methode zu entwickeln, um ausgewählte Arzneimittelrückstände im Wasser zu bestimmen. Darüber hinaus sollte besonderes Augenmerk auf die Untersuchung und Optimierung methodenspezifischer Parameter gelegt werden. Ein weiterer Schwerpunkt ist die Erweiterung dieser Methode mit Steroidhormonen ohne den Aufwand bei der Probenaufarbeitung zu erhöhen.

Mit der entwickelten Methode sollen Wasserproben aus der Saale und verschiedenen Seen im Umkreis von Halle/Saale vermessen und die Haupteintragspunkte eingegrenzt werden.

## 2 Grundlagen

### 2.1 *Arzneimittelwirkstoffe*

#### 2.1.1 Einführung

Die Entdeckung und Entwicklung von Arzneimitteln ist einer der bedeutenden Schritte der Menschen auf dem Weg zur heutigen Zivilisation. So fand man Hinweise, dass schon in der jüngeren Steinzeit vor etwa 13.000 Jahren Heilpflanzen eingesetzt wurden. Aus der griechisch-römischen Zeit sind Überlieferungen bekannt, in denen verschiedene Heilpflanzen und Gifte beschrieben werden. Im Mittelalter und in der Neuzeit gewinnt die Anwendung sowohl von Heilpflanzen als auch von giftigen Substanzen zur Linderung und Bekämpfung von Krankheiten immer mehr an Bedeutung [18]. Vor allem Paracelsus war einer der Wegbereiter für die Anwendung alchemistischer Präparate.

Ab dem 19. Jahrhundert wurde der bekannte Arzneimittelschatz auf die Stoffe reduziert, die nach damaligen Erkenntnissen eine gesicherte Wirkung aufwiesen. Durch die Verbesserung der chemischen Kenntnisse konnten aus den Naturstoffen immer häufiger die eigentlichen Wirkstoffe isoliert und angewendet, sowie auch in immer bedeutenderem Maße neue Wirkstoffe synthetisiert werden [18]. Ein weiterer Durchbruch war die Erkenntnis, dass von Mikroorganismen gebildete Wirkstoffe wie das Penicillin, erfolgreich gegen viele Krankheiten eingesetzt werden können [19].

Mit der Entdeckung und Synthese immer neuerer Wirkstoffe, der Zunahme der allgemeinen Lebenserwartung und dem teilweise damit verbundenen Bevölkerungswachstum nahm auch der Einsatz von Arzneimitteln stetig zu. Nach Schätzungen der IMS Health AG von 2002 wurden in Deutschland 1999 etwa 28.878 Tonnen, im Jahr 2000 32.573 Tonnen und 2001 37.915 Tonnen Arzneimittel verkauft.

Die unumstritten positiven Einflüsse von Arzneimitteln hatten zur Folge, dass Probleme nur im Bereich möglicher Nebenwirkungen im Organismus und der Kosten für die Forschung gesucht wurden. Der Verbleib dieser Stoffe erweckte dagegen lange Zeit kein großes Interesse. Erst das Auftreten adverser Effekte bei männlichen Fischen wie z.B. die Zwitterbildung oder die Feminisierung der Keimdrüsengänge [20] oder Schädigungen anderer Wasserlebewesen sowie das Vorkommen von Clofibrinsäure in vielen aquatischen Systemen [6] führte ein Umdenken herbei. Seit dem wurden in Ländern wie Deutschland [17], Österreich [21], Italien [22], Kanada [23], Schweden [24], Finnland

[25] und den USA [26] bis zu 80 Arzneimittelwirkstoffe, Drogen und ihre Metabolite im Wasser nachgewiesen [27].

### 2.1.2 Eintragspfade

Arzneimittelrückstände werden als neuartige organische Kontaminanten (engl. *new emerging contaminants*) bezeichnet und sind heute in kommunalen Abwässern, in vielen Oberflächengewässern und vereinzelt in Spuren auch im Grund- und Trinkwasser zu finden [28]. Auf Grund der vielseitigen Anwendung und der Tatsache, dass die Wirkstoffe verschiedensten Stoffklassen angehören, ist ein breites Spektrum an Eintragspfaden in die Umwelt zu erwarten. Eine Auswahl ist in Abb. 1 dargestellt.

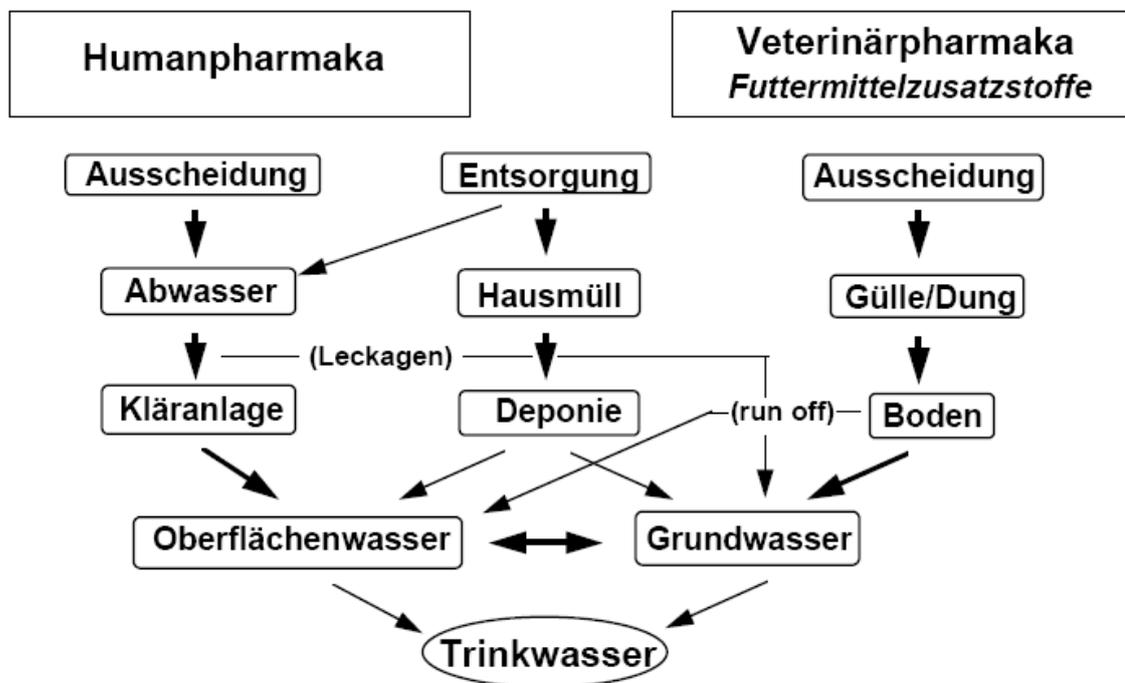


Abb. 1: Arzneimitteleintrag in die Umwelt nach Ternes et al. [9]

Veterinärpharmaka gelangen über die Ausscheidungen der Tiere in die Gülle und werden so direkt auf die Felder aufgebracht. Durch Versickern oder Abspülen bei Regen gelangen sie ins Oberflächenwasser oder ins Grundwasser. Da Veterinärpharmaka kein Bestandteil dieser Arbeit sind, soll an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen werden.

Als Haupteintragspfad für Humanpharmaka sind die kommunalen Abwässer zu sehen [28]. Diese setzen sich aus den menschlichen Ausscheidungen nach bestimmungsgemäßem Gebrauch sowohl in den Krankenhäusern als auch im privaten Haushalt zusammen.

men. Kontrovers wird dagegen der Eintrag über die Entsorgung unverbraucher Arzneimittel diskutiert. Während Heberer et al. [28] diesen als „von untergeordneter Bedeutung“ bezeichnet, kommt ihm nach Ternes [9] eine größere Bedeutung zu. Nachgewiesen ist die Kontamination des Sickerwassers von Mülldeponien mit Arzneimittelrückständen [29]. Nach derzeitiger Rechtslage gehören unverbrauchte Arzneimittel nicht zum besonders überwachungsbedürftigen Müll (Sondermüll) und dürfen über den Hausmüll entsorgt werden. Ohne eine Änderung der rechtlichen Voraussetzungen ist dieser Eintragspfad nicht zu verhindern. Allerdings könnte die Aufklärung der Bevölkerung, die Abdichtung der Deponien oder die vermehrte Müllverbrennung die fortschreitende Kontamination verringern.

Auf Grund einer fehlenden zentralen Registrierung der verkauften Arzneimittel kann der tatsächliche Verbrauch nur abgeschätzt werden. Das Umweltbundesamt berechnete für das Jahr 2000 29.000 Tonnen an verkauften Arzneimitteln [16]. Eine Abschätzung der Arzneimittelverteilung auf unterschiedliche Indikationsgruppen ist in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1: Verbrauchsmengen ausgewählter Arzneistoffe in der Bundesrepublik Deutschland im Jahre 1999, Abschätzung auf Grundlage der Verbrauchsmengen des Bundeslandes Brandenburg, Auszug aus [16]**

Indikationsgruppe	Verbrauch pro Jahr	Wichtigster Abgabeweg
Analgetika	1.100 t	Selbstmedikation
Desinfektionsmittel	625 t	Krankenhäuser
Hustenlöser	330 t	Selbstmedikation
Antidiabetika	266 t	Verordnungen
Betablocker	96 t	Verordnungen
Sedativa, Psychopharmaka, Antiepileptika	20 t	Verordnungen und Krankenhäuser

Eine Berechnung auf Grundlage von Verkaufszahlen einzelner Präparate ergab, dass im Jahr 2000 mit den zwanzig meistverkauften Medikamenten die in Tabelle 2 dargestellten Wirkstoffe abgegeben wurden [16]. Hinzu kommt die in den Krankenhäusern verbrauchte Menge.

**Tabelle 2: Abgegebene Wirkstoffmenge im Jahr 2000 nach [16]**

<b>Wirkstoff</b>	<b>Menge</b>
Acetylsalicylsäure	590 t
Acetylcystein	326 t
Paracetamol	240 t
Diclofenac	44 t
Ibuprofen	31 t
Ambroxol	9,1 t
Dexpanthenol	1,9 t
Xylometazolin	0,3 t

Aus allen dargestellten Werten ist zu erkennen, dass Arzneimittel jährlich in relativ großen Mengen in die Umwelt gelangen. In Verbindung mit dem häufig unvollständigen Abbau in den Kläranlagen [9] ist die Verbreitung dieser Stoffe sowohl im kommunalen Abwasser, als auch im Oberflächen- und Grundwasser weiterhin zu erwarten [30, 31, 32, 33].

### **2.1.3 Rechtliche Grundlagen**

Schon 1965 wurde mit der Richtlinie 65/65/EWG vom 26. Januar 1965 zur Angleichung von Rechts- und Verwaltungsvorschriften von Arzneyspezialitäten der Grundstein für ein europaweites Zulassungsverfahren für Human- und Veterinärmedizin gelegt. Allerdings war in dieser Zeit die Umweltbewertung neu zugelassener Arzneimittel kein Bestandteil dieses Verfahrens. Aufgenommen wurde diese erst mit den Richtlinien 90/676/EWG vom 13. Dezember 1990 für Tierarzneimittel und 93/39/EWG vom 14. Juni 1993 für Humanarzneimittel. Diese Rechtsvorschriften und ihre Änderungen wurden schließlich in den Richtlinien 2001/83/EG vom 6. November 2001 und 2001/82/EG vom 6. November 2001 zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Human- bzw. Tierarzneimittel und der Verordnung (EWG) Nr. 726/2004 vom 31. März 2004 zur Festlegung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Genehmigung und Überwachung von Human- und Tierarzneimitteln und zur Errichtung einer Europäischen Arzneimittel-Agentur zusammengefasst. Die Richtlinien wurden sukzessive mit dem deut-

schen Arzneimittelgesetz (AMG) in deutsches Recht umgesetzt, so dass es für die Zulassung (mit Ausnahme nach Artikel 3 Verordnung (EWG) Nr. 726/2004) und den Vertrieb von Arzneimitteln in Deutschland maßgebend ist. Neben der allgemeinen Verwaltungsvorschrift (AMGVwV) wurden verschiedene Betriebsverordnungen für pharmazeutische Unternehmer, Apotheken und für den Großhandel erlassen.

Für die Zulassung eines Arzneimittels für den Verkehr in der EU werden vom Gesetzgeber 3 Wege vorgeschrieben. Das zentrale Verfahren über die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) nach Verordnung (EWG) Nr. 726/2004, das dezentrale Verfahren, bei dem die Zulassung eines Arzneimittels, die in einem anderen Land der EU erteilt wurde, ausgeweitet wird sowie das nationale Verfahren bei dem die zuständige Bundesoberbehörde die Zulassung erteilt. Dies ist gemäß § 77 Abs. 1 AMG mit Ausnahme der unter § 77 Abs. 2 und 3 AMG fallenden Arzneimittel das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. Im AMG sind weiterhin die für das Zulassungsverfahren einzureichenden Unterlagen aufgeführt. In § 22 Abs. 3c AMG heißt es unter anderem „Ferner sind Unterlagen vorzulegen, mit denen eine Bewertung möglicher Umweltrisiken vorgenommen wird ...“. Für Tierarzneimittel sind entsprechend § 23 Abs. 1 Nr. 3 AMG zusätzlich „Ergebnisse der Prüfungen zur Bewertung möglicher Umweltrisiken ...“ anzugeben. Dieser Unterschied zwischen Human- und Tierarzneimittel setzt sich auch in den weiterführenden Forderungen bei der Prüfung der Umweltrisiken fort. Während für Humanarzneimittel die Durchführung dieser Prüfung nicht explizit vorgegeben wird, ist sie für Tierarzneimittel im Anhang I Titel I Teil 3 Kapitel 1 Nr. 5 der Richtlinie 2001/82/EG unter Ökotoxizität relativ genau definiert. Dies bedingt, dass trotz der Verankerung der Beachtung von Umweltrisiken der Humanarzneimittel im europäischen Recht, die Ökotoxizität auf Grund mangelnder einheitlich geregelter Durchführungsbestimmungen weiterhin nicht den angestrebten Stellenwert bei den Zulassungsverfahren einnimmt. Darüber hinaus kann die Zulassung eines Arzneimittels nicht infolge von Umweltrisiken nach § 25 Abs. 2 AMG versagt, sondern nur in Zusammenarbeit mit dem Umweltbundesamt gemäß § 28 AMG mit Auflagen verbunden werden. Obwohl bei den rechtlichen Regelungen noch Verbesserungsbedarf besteht, ist die Auseinandersetzung mit der Problematik zu erkennen.

#### **2.1.4 Überwachung und Risikoeinschätzung**

Mit dem Nachweis von Arzneistoffen im Trinkwasser wurde eine öffentliche Debatte über die Sicherheit der Wasserversorgung ausgelöst. In der Presse waren Schlagzeilen

wie „Die Männlichkeit ist in Gefahr“ (KÖLNER STADT-ANZEIGER, 1995), „Die Pille im Brunnen“ (DER SPIEGEL, 1996) oder „Die Apotheke im Wasserhahn“ (SÜDDEUTSCHE ZEITUNG, 1998) zu lesen. Obwohl die nachgewiesenen Gehalte deutlich unterhalb der therapeutischen Dosen der Medikamente liegen und Arzneimittelwirkstoffe zu den humantoxikologisch am besten untersuchten Stoffen gehören, ist die umwelttoxikologische Wirkung auf Grund der permanenten Belastung relativ unbekannt. Gerade in den letzten Jahren wurden immer wieder Fälle bekannt, in denen durch Arzneimittel teilweise große ökologische Schäden verursacht wurden. 2005 stellte das Geiersterben in Asien den vorläufigen Höhepunkt negativer Einflüsse von Arzneimittelwirkstoffen in der Umwelt dar. Geier verhindern die Ausbreitung von Infektionen und Krankheiten, indem sie Aas und schwache Tiere fressen. Diesen Umstand nutzen auch die Menschen in Teilen Asiens und lassen verendete Rinder für die Geier zurück. Ein Teil dieser Rinder wurde jedoch mit dem Antirheumatikum Diclofenac behandelt, das bei Geiern schwere Nierenschädigungen verursacht [34]. Seit dem ist man bemüht, die letzten Bestände der Geier dieser Region in Gefangenschaft zu stabilisieren. Teilweise werden Arzneimittel auch bewusst für die Bekämpfung verschiedener Tierarten benutzt. So werden Baumschlangen mit Paracetamol, Tauben mit Antiepileptika und Frösche mit Blutverdünnern vergiftet [34]. Auch dadurch wird eine Verbreitung von Arzneimitteln in der Umwelt forciert.

Durch den Druck der Öffentlichkeit und auf Grund oben genannter Effekte hat die 53. Umweltministerkonferenz beschlossen „im Rahmen von Untersuchungsprogrammen des Bundes und der Länder einjährig ab Sommer 2000 das Auftreten von Arzneistoffen aus der Verwendung von Human- und Tierarzneimitteln sowie pharmakologisch wirksamen Futtermittelzusatzstoffen festzustellen, um ein möglichst repräsentatives Bild der Umweltbelastung durch diese Stoffe zu erhalten.“ [17]. Dafür wurden bundesweit eine Vielzahl an Untersuchungen an Kläranlagenzu- und -abläufen sowie an Klärschlamm, Oberflächenwässern und Grundwässern durchgeführt. Diese Daten müssen ständig aktualisiert und erweitert werden. Darüber hinaus wird die Erforschung der Auswirkungen von Arzneimittelwirkstoffen auf den menschlichen und tierischen Organismus in Langzeitstudien auch in nichtpharmakologischer Umgebung intensiviert.

Um eine Belastung der Umwelt zu vermeiden wurde schon 1995 mit der Erarbeitung eines Leitfadens für die Bewertung des Umweltrisikos von Arzneimitteln begonnen. Auf diese Weise sollte sowohl für die Antragsteller als auch für die Zulassungsbehörden die Risikoabschätzung für neu zugelassene Arzneimittel transparenter gestaltet werden.

Auf Grund der unterschiedlichen Interessen der beteiligten Parteien und der fehlenden Übereinstimmung mit bestehenden Regelungen für Chemikalien und Pflanzenschutzmitteln kam es zu starker Kritik an den ersten Entwürfen. Anfang 2005 wurde erneut eine überarbeitete Version zur öffentlichen Kommentierung freigegeben. Durch das *committee for medicinal products for human use* (CHMP) der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) wurde der Leitfaden am 01.06.2006 veröffentlicht. Er tritt am 01.12.2006 in Kraft und sieht die Beurteilung des Umweltrisikos eines Wirkstoffes in zwei Stufen vor. In Stufe I wird der Eintrag des Wirkstoffes und seiner Metabolite anhand des Ausscheidungsprofiles oder synergistischer Effekte abgeschätzt. Auf Grundlage der Marktdurchdringung, des erwarteten jährlichen Verbrauchs und der Abbaubarkeit wird die erwartete Umweltkonzentration berechnet (engl. *predicted environmental concentration*, PEC). Liegt die berechnete Konzentration unter 0,01 µg/L und gibt es keine weiteren Bedenken, wird die Substanz als umwelttoxikologisch unbedenklich eingestuft. Liegt sie darüber tritt Phase II in Kraft. Diese Phase wird in Stufe A und Stufe B unterteilt. In Stufe A werden alle verfügbaren physikalisch-chemischen und pharmakologisch-toxikologischen Daten sowie Studien über Toxikokinetik, Bioakkumulation, biologische Abbaubarkeit und Persistenz herangezogen. Anhand dieser Werte wird die erwartete Konzentration ohne negativen Effekt (engl. *predicted no effect concentration*, PNEC) berechnet. Ist das Verhältnis PEC/PNEC für Oberflächenwasser, für Grundwasser und für Tests mit Mikroorganismen kleiner eins und besteht keine Akkumulationsgefahr, kann die Bewertung an dieser Stelle beendet werden, sonst wird zu Stufe B übergegangen. Hier werden vertiefende Studien über spezifische Effekte an Mikroorganismen, Bioakkumulation sowie Eintrags- und Metabolisierungspfade durchgeführt. Zusätzlich wird der PEC durch weitere Untersuchungen verfeinert. Kann die Umweltgefährdung auch in dieser Stufe nicht ausgeschlossen werden, ist eine Genehmigung unter strengen Auflagen bzw. mit spezieller Kennzeichnung vorgesehen. Diese Leitlinien gelten für die Zulassung neuer Arzneimittel, während Altarzneimittel davon nicht betroffen sind.

Neben den Untersuchungen auf Langzeitwirkungen von Arzneimittelwirkstoffen in nichtpharmakologischer Umgebung ist gemäß § 22 Absatz 2 Nr. 5 AMG für die Zulassung eines Arzneimittels ein auch über die Zulassung hinaus reichendes Pharmakovigilanz-System vorgeschrieben. Dieses System dient dem Sammeln und Weiterleiten von Daten über seltene oder unerwünschte Wirkungen oder Wechselwirkungen, die nach Jahren der Anwendung eines Arzneimittels auch in Zusammenhang mit neuen Entwick-

lungen in der medizinischen Wissenschaft erstmals auftreten. Notwendig wird dies, da die Erprobung eines Arzneimittels bis zur erstmaligen Zulassung nur an einer begrenzten Menge speziell ausgewählter Personen durchgeführt wird.

### **2.1.5 Einteilung und Verwendung**

Arzneimittelwirkstoffe stellen sowohl aus chemischer als auch aus pharmazeutischer Sicht eine extrem umfangreiche und vielfältige Stoffgruppe dar. Eine Möglichkeit der Einteilung ist die ATC-Klassifizierung (anatomisch-therapeutisch-chemische Klassifizierung) der *World Health Organisation* [35]. Hierbei werden die Substanzen in 5 Ebenen eingestuft. Ebene 1 beschreibt das anatomische System, auf das das Medikament einwirkt und umfasst 14 Hauptgruppen. Die Ebenen 2 und 3 beschreiben den therapeutischen Einsatz, wobei Ebene 2 die therapeutischen und Ebene 3 die pharmakologischen Hauptgruppen enthält. In Ebene 4 befinden sich die chemisch-therapeutischen Untergruppen und in Ebene 5 schließlich die Wirkstoffe.

Ein anderer Weg wird in der Roten Liste®, eine der wichtigsten Referenzen für Arzneimittelwirkstoffe und Fertigarzneimittel verfolgt. Auch hier erfolgt die Einteilung in verschiedenen Ebenen allerdings basiert diese auf 83 Wirkstoffgruppen.

Die Rote Liste® ist ein Arzneimittelverzeichnis, in dem in kurzer Form Informationen zu deutschen und europäischen Arzneimitteln aufgeführt sind und die regelmäßig aktualisiert wird (derzeitiger Stand: Januar 2006).

Es sind 8.829 Präparate von 478 pharmazeutischen Unternehmen aufgeführt, die wiederum in chemisch definierte Präparate, pflanzliche Präparate, enzym-, organ- und/oder mikroorganismenhaltige Präparate und Homöopathika unterteilt sind. Diese Präparate enthalten derzeit 2.321 Wirkstoffe, die auf die oben erwähnten 83 Wirkstoffgruppen aufgeteilt sind, wobei jede Gruppe nochmals in Untergruppen gegliedert ist.

Auf Grund der Vielzahl an Daten können die folgenden Darstellungen nur eine Auswahl der Systematik und allgemeine Wirkweisen aufzeigen.

#### **2.1.5.1 Analgetisch wirksame Substanzen**

Der auslösende Reiz für das Schmerzempfinden sind Gewebeschäden oder Störungen des Gewebestoffwechsels. Der Organismus reagiert darauf mit einer Veränderung der Ionenkonzentration und der Synthese von Mediatorsubstanzen. Diese wiederum bewirken eine Stimulierung von Schmerzrezeptoren, welche den Schmerz in Form von elek-

trischen Impulsen über das Rückenmark zum Großhirn leiten, wo er wahrgenommen wird [36].

Auf Grund seiner schmerzlindernden und euphorisierenden Wirkung wird Opium schon seit mehr als 6.000 Jahren als kultisches und medizinisches Mittel eingesetzt.

Mit der Entdeckung des Morphins als Hauptwirkstoff des Opiums im Jahr 1804 begann die Suche nach neuen analgetisch wirksamen (schmerzstillenden) Mitteln. Morphin greift einerseits in die Schmerzerlebnissphäre des Stirnhirns ein, beeinflusst darüber hinaus aber auch das gesamte Zentralnervensystem. In höheren Dosen führt die Morphineinnahme allerdings zum Tod oder bei längerer Exposition zur Sucht. Es wurde daher versucht, andere Mittel mit den analgetischen Eigenschaften des Morphins aber ohne dessen schädliche Nebenwirkungen zu synthetisieren. Die für die verschiedenen Wirkungen verantwortlichen Strukturelemente wurden weitestgehend aufgeklärt und konnten gezielt verändert werden. Auf diese Weise kam es zur Entwicklung einer größeren Anzahl von Morphinabkömmlingen. Eine vollständige Trennung der analgetischen Wirkung und der Sucht erzeugenden Eigenschaften konnte noch nicht erreicht werden. Darüber hinaus wurden bei der systematischen Suche nach weiteren zentral angreifenden Mitteln weitere Wirkstoffe gefunden, die nicht auf der Morphinstruktur basieren [37]. Somit können Analgetika in 2 Gruppen unterteilt werden. Einerseits in morphinartig wirksame Analgetika (stark wirksame Analgetika) die am Zentralnervensystem angreifen und andererseits schwach bis mittelstark wirksame Analgetika, die vorwiegend peripher angreifen. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Stoffen handelt es sich um nichtsteroidale Analgetika (Antirheumatika), die in die zweite Gruppe einzuordnen sind. Sie weisen meist analgetische (schmerzstillende), antipyretische (fiebersenkende) und antiphlogistische (entzündungshemmende) Wirkungen auf, die überwiegend auf die Hemmung der Biosynthese der Prostaglandine der E-Gruppe zurückzuführen sind. Diese sind wichtige Mediatoren des Schmerz- und Entzündungsgeschehens und werden in-vivo aus der Arachidonsäure gebildet. Diese Synthese verläuft über ein komplexes enzymatisches System mit verschiedenen Angriffspunkten. Eine wesentliche Aufgabe ist die Hemmung der Cyclooxygenase, die die Bildung eines besonders reaktiven Zwischenproduktes katalysiert [36].

### **2.1.5.2 Lipidblutspiegel senkende Mittel**

Erhöhte Konzentrationen einzelner Blutlipidfraktionen werden als Hyperlipidämie bezeichnet. Sie sind entweder genetisch bedingt oder treten infolge einer Grundkrankheit

sowie falscher Ernährung auf. Epidemiologische Untersuchungen zeigten, dass die Erhöhung bestimmter Blutlipidfraktionen mit dem vermehrten Auftreten einer Arteriosklerose positiv korrelierte. Basierend auf diesen Untersuchungen stellt die Hyperlipidämie einen Risikofaktor für die Entstehung koronarer Herzkrankheiten und des Herzinfarktes dar, die in hoch entwickelten Industriestaaten eine der häufigsten Todesursachen sind. Im Zusammenhang mit Arteriosklerose spielen die Lipidproteinfraktionen im Blut unterschiedliche Rollen. Chylomikronen transportieren die mit der Nahrung aufgenommenen (exogenen) Triglyceride und sind zu groß, um in die Arterienwand einzuwandern. Ihr atherogenes Potential ist daher gering. VLDL-Partikel (engl. *very low density lipoproteins*) transportieren in der Leber gebildete (endogene) Triglyceride und können in die Gefäßwände eindringen. Ihr atherogenes Potential ist daher als hoch einzustufen. Die LDL-Partikel (engl. *low density lipoproteins*) werden aus den VLDL-Partikeln gebildet, weisen den höchsten Cholesteringehalt auf und besitzen das höchste atherogene Potential. HDL-Partikel (engl. *high density lipoproteins*) sind in der Lage, intrazelluläres Cholesterin abzutransportieren und können daher als Schutzfaktor der Gefäßwand interpretiert werden [36]. Grundsätzlicher Ansatz bei einer antilipidämischen Therapie sind diätetische Maßnahmen wie die Reduzierung der Cholesterin- und Triglyceridzufuhr bzw. die Behandlung der Grundkrankheit. Nur unter ungünstigen Umständen werden antilipidämische Substanzen (Lipidsenker) verabreicht. Diese können unter pharmakotherapeutischen Gesichtspunkten in drei Gruppen eingeteilt werden [36]. Clofibrate und ihre Derivate senken durch Eingriff in Stoffwechselfvorgänge hauptsächlich den Triglycerid- aber auch den Cholesterinspiegel. Die D-konfigurierten Schilddrüsenhormone bewirken durch eine vermehrte Oxidation und Ausscheidung eine Verringerung des Cholesterinspiegels, während dies mit Colestyramin und  $\beta$ -Sitosterin durch Beeinflussung der gastrointestinalen Resorptionsvorgänge erreicht wird.

### 2.1.5.3 Hormone

Im Organismus der höheren Tiere und des Menschen regulieren komplexe Systeme das Zusammenwirken der Organe und das Stoffwechselgleichgewicht der Zellen. Neben der Regulation durch motorische und vegetative Nerven ist die chemische Steuerung durch das hormonelle System von entscheidender Bedeutung. Hormone werden von speziellen Organen gebildet und direkt in die Blutbahn abgegeben. Sie sind gekennzeichnet durch eine sehr spezifische und hohe Wirksamkeit. Darüber hinaus sind sie funktionsspezi-

fisch, aber nicht artspezifisch. Das heißt, Hormone sind auf einen anderen artverwandten Organismus übertragbar und üben dort die gleiche Funktion aus. Früher wurden auf Grund fehlender Möglichkeiten zur Isolation der Hormone die gesamten Organe oder Extrakte verarbeitet und die Wirksamkeit als biologische Wirkeinheiten angegeben. Dem Ziel der reproduzierbaren und der spezifisch veränderbaren Wirksamkeit kam man mit der Verbesserung der Extraktionsverfahren und der Entwicklung synthetischer Hormone näher.

Hormone lassen sich entweder nach dem Ort ihrer Bildung (Drüsenhormone, Neurohormone, Gewebshormone) oder nach ihrer Struktur (Peptidhormone, Steroidhormone, Aminosäurederivate, Fettsäurederivate) einteilen und entfalten ihre Wirkung durch die Bindung an spezifischen Rezeptoren [36]. Die Wirkweise besteht auf der einen Seite aus einem universellen in der Zellmembran lokalisierten Effektorsystem und auf der anderen Seite in der Aktivierung verschiedener Genaktivitäten [36].

#### **2.1.5.4 Psychopharmaka**

Psychopharmaka sind den Schlaf und die Psyche beeinflussende Stoffe. Sie können in folgende Gruppen eingeteilt werden, wobei die Übergänge zum Teil fließend sind [36].

- Tranquillantien
- Neuroleptika
- Antidepressiva
- Psychostimulantien
- Psychotomimetika

Tranquillantien und Neuroleptika üben eine dämpfende Wirkung auf das zentrale Nervensystem (ZNS) aus, wohingegen Antidepressiva, Psychostimulantien und Psychotomimetika hauptsächlich erregende Eigenschaften aufweisen.

#### ***Tranquillantien***

Arzneimittelwirkstoffe mit angstlösender (anxiolytischer), beruhigender (sedierender) und im Regelfall muskelrelaxierender Wirkung werden unter dem Begriff Tranquillantien zusammengefasst. Die bedeutendsten Vertreter findet man in der Gruppe der 1,4-Benzodiazepine.

### ***Neuroleptika***

Die Gruppe der Neuroleptika zeichnet sich durch eine im affektiven Bereich dämpfende Wirkung aus, die das Bewusstsein nicht wesentlich beeinflusst. Sie werden zur Behandlung von Psychosen eingesetzt. Im Wesentlichen besitzen sie sedierende, antipsychotische und in niedrigen Dosierungen anxiolytische Wirkung. Neben den erwünschten Effekten können auch Beeinflussungen der Motorik und des vegetativen Nervensystems als Nebenwirkungen auftreten.

### ***Antidepressiva***

Antidepressiva weisen antriebssteigernde, depressionslösende und anxiolytische Eigenschaften auf. Sie werden vor allem zur Behandlung von Affektpsychosen verwendet. Die wichtigsten Vertreter gehören zur Gruppe der trizyklischen Antidepressiva, wobei auch hier unterschiedliche Typen bekannt sind. Sie unterscheiden sich in der Stärke der antriebssteigernden bzw. psychomotorisch dämpfenden Wirkung. Begleiterscheinungen werden vor allem durch die Beeinflussung des vegetativen Nervensystems deutlich.

### ***Psychostimulantien***

Psychostimulantien (Psychotonika) stimulieren das zentrale Nervensystem und erhöhen die psychische und physische Aktivität. Im Vergleich zu den Antidepressiva fehlen ihnen die antipsychotischen Eigenschaften. Der bekannteste Vertreter ist das Amphetamin.

### ***Psychotomimetika***

Psychotomimetika beeinflussen das Wahrnehmungsvermögen für die reale Umwelt. Neben Halluzinationen erlebt man auch den Raum und die Zeit in anderer Art und Weise. Auf Grund der Missbrauchsgefahr, der geringen therapeutischen Wirkung und dem damit verbundenen Fehlen einer zwingenden Indikation dürfen Psychotomimetika nicht verordnet werden.

### **2.1.5.5 Antiepileptika**

„Unter dem Begriff Epilepsie werden chronische Anfallsleiden zusammengefasst, die durch kurze Perioden des Bewusstseinsverlusts oder der Bewusstseinstäubung gekennzeichnet sind und die meist mit motorischen Störungen einhergehen.“ [36] Diese Anfälle haben ihre Ursache in den exzessiven Entladungen der Neuronen bestimmter Gehirnregionen. Antiepileptika (Antikonvulsiva) führen zur Erhöhung der Krampfschwelle wodurch eine Unterdrückung der Anfälle oder eine Verringerung der Anfallshäufigkeit erreicht werden kann.

### **2.1.5.6 Phosphodiesterase- Typ5-Hemmer**

Um eine Erektion zu erreichen wird unter anderem im *Corpus Cavernosum* (Schwellkörper) Stickstoffmonoxid freigesetzt, was zur gesteigerten Bildung von Cyclo-guanosinmonophosphat (cGMP) führt. Die darauf zurückzuführende leichte Muskelentspannung und das einströmende Blut rufen eine Erektion hervor. Durch das Enzym Phosphodiesterase Typ5 wird der cGMP-Spiegel gesenkt. Phosphodiesterase-Typ5-Hemmer verringern die Aktivität des Enzyms und tragen somit zum Erhalt der Erektion bei. Neben dem Wirkstoff Sildenafil (Viagra®) weisen auch Tadalafil (Cialis®) und Vardenafil (Levitra®) diese Wirkung auf.

### **2.1.6 Eingesetzte Arzneimittelwirkstoffe**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Arzneimittelwirkstoffe zur Methodenerstellung ausgewählt. Die Auswahl soll unterschiedliche Wirkstoffgruppen repräsentieren und die Relevanz dieser Stoffe auf Grund bereits veröffentlichter Befunde widerspiegeln.

Tabelle 3: Eingesetzte Arzneimittelwirkstoffe

Wirkstoff	CAS-Nummer	Einsatzgebiet	Wirkung
Amitriptylin	50-48-6	Antidepressivum	Antriebssteigernde und anxiolytische Eigenschaften
Bezafibrat	41859-67-0	Lipidsenker	Beeinflusst die Blutfettfraktionen
Carbamazepin	298-46-4	Antiepileptikum	Verringerung epileptischer Anfälle
Diazepam	439-14-5	Tranquillant	Anxiolytische, hypnotische und muskelrelaxierende Wirkung
Diclofenac	15307-86-5	nichtsteroidales Antirheumatikum	Analgetische, antipyretische und antiphlogistische Wirkung
17 $\beta$ -Estradiol	50-28-2	natürliches Steroidhormon	Veränderung der Geschlechtsmerkmale
Estron	53-16-7	natürliches Steroidhormon	Veränderung der Geschlechtsmerkmale
17 $\alpha$ -Ethinylestradiol	57-63-6	künstliches Steroidhormon	Hormonale Empfängnisverhütung
Fenoprofen	31879-05-7	nichtsteroidales Antirheumatikum	Analgetische, antipyretische und antiphlogistische Wirkung
Gemfibrozil	25812-30-0	Lipidsenker	Beeinflusst die Blutfettfraktionen
Ibuprofen	15687-27-1	nichtsteroidales Antirheumatikum	Analgetische, antipyretische und antiphlogistische Wirkung
Naproxen	22204-53-1	nichtsteroidales Antirheumatikum	Analgetische, antipyretische und antiphlogistische Wirkung
Opipramol	315-72-0	Antidepressivum	Antriebssteigernde und anxiolytische Eigenschaften
Paracetamol	103-90-2	Analgetikum	Analgetische und antipyretische Wirkung
Phenazon	60-80-0	Analgetikum	Analgetische und antipyretische Wirkung
Sildenafil	139755-83-2	Phosphodiesterase-Typ5-Hemmer	Aufrechterhaltung der Erektion

Die physiko-chemischen Eigenschaften und der Wirkmechanismus sind in Anhang I dargestellt. Die Methodenentwicklung für die Stoffe Amitriptylin, Carbamazepin, Diazepam, Opipramol Phenazon und Sildenafil wurde im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt [38].

## 2.2 Analytische Grundlagen

### 2.2.1 Flüssigchromatographie

Die Flüssigchromatographie (engl. *liquid chromatography*, LC) ist ein Teilgebiet der Chromatographie und bezeichnet die Trennung von Stoffgemischen an einer stationären und einer flüssigen mobilen Phase. Sie wird in Flachbett- (Papier- und Dünnschichtchromatographie) und Säulenchromatographie eingeteilt. Letztere unterteilt sich in Niederdruck- und Hochdruckflüssigchromatographie. Auf Grund ihrer weiten Anwendungsmöglichkeiten sowohl im analytischen als auch im präparativen Bereich kommt in den meisten Fällen die Hochdruckflüssigchromatographie (engl. *high pressure liquid chromatography*, HPLC) zum Einsatz. Hierbei wird ein Edelstahlzylinder mit der stationären Phase, welche aus porösen sphärischen oder gebrochenen Materialien besteht, gleichmäßig gepackt und die mobile Phase unter hohem Druck hindurch geleitet [39]. An der Grenzfläche zwischen der mobilen und der stationären Phase kommt es infolge unterschiedlicher Wechselwirkungen der Analyten zu einer Auftrennung der Stoffgemische.

Weiterhin unterscheidet man zwischen Normalphasen- und Umkehrphasenflüssigchromatographie. Bei der Normalphasenflüssigchromatographie kommen Kieselgel oder Aluminiumoxid als stationäre Phase zum Einsatz. Als mobile Phase dienen unpolare Flüssigkeiten wie Alkane bzw. gering polare wie Tetrahydrofuran oder Chloroform. Die Normalphasenflüssigchromatographie ist besonders zur Trennung von unterschiedlich substituierten, sonst aber sehr ähnlichen Stoffen geeignet, kaum dagegen zur Trennung von Homologen.

Bei der Umkehrphasenflüssigchromatographie (engl. *reversed phase liquid chromatography*, RPLC) wird organisch substituiertes Kieselgel als stationäre Phase verwendet. Dazu setzt man extrem reines synthetisches Kieselgel häufig mit Alkyldimethylchlorosilanen um und ersetzt so die polaren Silanolgruppen auf der Oberfläche durch Alkylketten. Auf Grund sterischer Einschränkungen werden nicht alle Silanolgruppen gebunden und es entstehen Stellen hoher Polarität, die bei hochpolaren Analyten zu abweichenden Retentionsmechanismen und damit zu Problemen führen können. Um dies weitestgehend zu vermeiden, erfolgt anschließend eine Umsetzung z. B. mit Trimethylchlorosilan („*endcapping*“), wodurch die restlichen freien Silanolgruppen methyliert werden. Neben der Polarität der stationären Phase stellen die Porengröße (im All-

gemeinen 70 bis 300 Å) und der Teilchendurchmesser (im Allgemeinen 2-10 µm) weitere Einflussfaktoren dar.

Typische Eluenten sind Methanol, Acetonitril, Tetrahydrofuran und ihre Gemische mit Wasser unter Zusatz von Modifiern. Wird die Zusammensetzung des Eluents während der Messung nicht verändert, spricht man von isokratischer Elution. Dabei tritt bekanntermaßen das Problem auf, dass es bei sehr stark retardierten Analyten zu einer Peakverbreiterung kommt. Um diesen Effekt zu minimieren gibt es drei Möglichkeiten, den Ablauf des Chromatogramms zu verändern. Zum einen sind dies der Fluss- und der Temperaturgradient und zum anderen der Eluensgradient, wobei die ersten beiden eine untergeordnete Rolle spielen [39]. Als Detektoren der Flüssigchromatographie werden der UV-Detektor, der Diodenarraydetektor, der Fluoreszenzdetektor und das Massenspektrometer eingesetzt.

## 2.2.2 Massenspektrometrie

### 2.2.2.1 Terminologie

Die Massenspektrometrie (MS) kommt in einem weiten Anwendungsbereich zum Einsatz. Während die Strukturaufklärung selbst komplizierter Naturstoffe zur weiten Verbreitung der MS führte, ist sie heute auch aus der quantitativen Analytik nicht mehr wegzudenken. In Abb. 2 ist das verwendete Massenspektrometer API 2000 dargestellt.

Die Aufgaben eines Massenspektrometers sind die Erzeugung eines Strahls gasförmiger Ionen, die Auftrennung dieser nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis und die Aufzeichnung der Ionen. Es resultiert ein Massenspektrum aus dem abgelesen werden kann, in welchen Verhältnissen Ionen welcher Masse gebildet



Abb. 2: API 2000 von Applied Biosystems

wurden. Dies ermöglicht bei Einzelsubstanzen Rückschlüsse auf die Struktur der Substanz und bei Mischungen quantitative und, nach vorheriger Trennung, qualitative Aussagen. Die Bezeichnungen Massenspektrometer und Massenspektroskop werden heute

synonym verwendet, während Massenspektrograph nicht mehr zum Einsatz kommt. Als überholt gelten die Definitionen dieser drei Begriffe gemäß den IUPAC-Empfehlungen [14].

Massenspektrometer bestehen im Wesentlichen aus der Ionenquelle, dem Analysator und dem Detektor, auf die in den nächsten Abschnitten näher eingegangen werden soll.

### 2.2.2.2 Ionenquelle

Zur Bildung von Ionen aus neutralen Teilchen muss ihnen Energie zugeführt werden. Diese Energiezufuhr kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Bei Kopplung mit der Gaschromatographie ist die Elektronenstoßionisation weit verbreitet. Hierbei werden die Analyten zur Entstehung von Kationen mit Elektronen beschossen. In Abwandlung dieser Quelle wird bei der chemischen Ionisation erst ein im großen Überschuss zugegebenes Reaktantgas ionisiert, das anschließend seine Ladung an die Analyten weitergibt. Eine weitere Möglichkeit der Ionisation ist die direkte Zufuhr von Energie in Form von Licht (Photo- und Laser-Ionisation) oder die Ionisation im starken inhomogenen elektrischen Feld. Immer mehr an Bedeutung gewinnt die Oberflächenionisation (Desorptionsverfahren). Hierbei wird die Probe auf einer festen Oberfläche immobilisiert, mit Licht oder energiereichen Partikeln beschossen oder einem starken elektrischen Feld ausgesetzt. Ein dafür sehr bekanntes Verfahren ist die *matrix-assisted laser desorption ionization* (MALDI). Im Gegensatz zu den bisher genannten Ionisationsarten, die ein Vakuum erfordern, gibt es Verfahren die unter Atmosphärendruck ablaufen und daher als *atmospheric pressure ionization* (API) bezeichnet werden. Zum Einsatz kommen diese vor allem gekoppelt mit der Flüssigchromatographie, da hier eine große Menge an Lösungsmittel beseitigt werden muss, ohne das Vakuum im Massenspektrometer zu verschlechtern. Dies wird durch verschiedene Sprayverfahren realisiert. Bei diesen Ionisationsarten wird der Eluentenstrom versprüht, das Lösungsmittel mittels Stickstoff verdampft und die Ionen durch ein elektrisches Feld in Richtung Massenanalysator beschleunigt. Als weitere Ionisationsart soll das induktiv gekoppelte Plasma (ICP) zur Bestimmung von Elementen in unterschiedlichen Matrices erwähnt werden. Im Folgenden werden die für das verwendete API 2000 verfügbaren Ionenquellen erläutert.

### ***Elektro- oder Ionenspray***

Das Prinzip des Elektrosprays ist bereits seit dem 19. Jahrhundert bekannt und beschreibt die Dispersion einer Flüssigkeit in viele kleine geladene Tröpfchen mit Hilfe eines elektrostatischen Feldes [10]. Jedoch erst in den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde diese Technik in Verbindung mit einem Quadrupolmassenanalysator von der Arbeitsgruppe J. Fenn an der Universität Yale sowie von der Arbeitsgruppe M. Alexandrow an der Universität von Leningrad eingesetzt [40, 41, 10]. Die Tröpfchenbildung erfolgt beim Elektrospray ausschließlich durch Versprühen des Eluentenstroms unter Anlegen eines elektrischen Feldes [14]. Dies funktioniert bis zu Flussraten von 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  sehr gut. Bei Flussraten die darüber hinausgehen, wird das Versprühen durch einen beheizten Stickstoffstrom unterstützt.

Der Transfer von gelösten Ionen in die Gasphase ist ein endergonischer Prozess, der große Mengen Energie erfordert. Ungeachtet dessen wird bei der Elektrosprayionisation (ESI) nur wenig Energie auf die Ionen übertragen. Vielmehr werden die in Abhängigkeit vom pH-Wert in der Lösung vorhandenen Ionen (protonierte oder deprotonierte Analytmoleküle) im elektrischen Feld durch Desolvatisierung in die Gasphase überführt [10]. In Abb. 3 sind die makroskopischen und in Abb. 4 die mikroskopischen Vorgänge für eine positive Ionisation dargestellt. Beim Austreten des Eluentenstroms aus der Stahlkapillare werden die negativ geladenen Ionen zur Kapillarwand (Anode) hingezogen und dort entladen. Die positiv geladenen Ionen dagegen reichern sich an der Oberfläche der Tropfen an. Die Ausbildung des Taylor-Konus ist auf die Wechselwirkung der Oberflächenspannung mit dem elektrischen Feld zurückzuführen. An der Spitze des Taylor-Konus bildet sich ein wenige Mikrometer dickes Flüssigkeitsfilament. Wird dieses Filament instabil, zerfällt es in Tröpfchen mit einem Durchmesser im unteren Mikrometerbereich. Da die negativ geladenen Ionen entfernt wurden, weisen die Tröpfchen eine positive Nettoladung und eine sehr hohe Ladungsdichte auf. Sie bewegen sich daher nahe an der Stabilitätsgrenze (Rayleigh-Limit), welche durch die Abstoßungskräfte gleich geladener Teilchen (Coulombkraft) und die Oberflächenspannung bestimmt wird. Durch die weitere Verdunstung von Lösungsmittel wird der Tröpfchendurchmesser bei gleicher Ladungsmenge immer kleiner und die Ladungsdichte dementsprechend größer. Wenn die abstoßende Coulombkraft die Oberflächenspannung übersteigt kommt es zu einer Coulomb-Explosion. Die Tröpfchen zerfallen in kleinere Tröpfchen mit nur wenigen Nanometern Durchmesser.

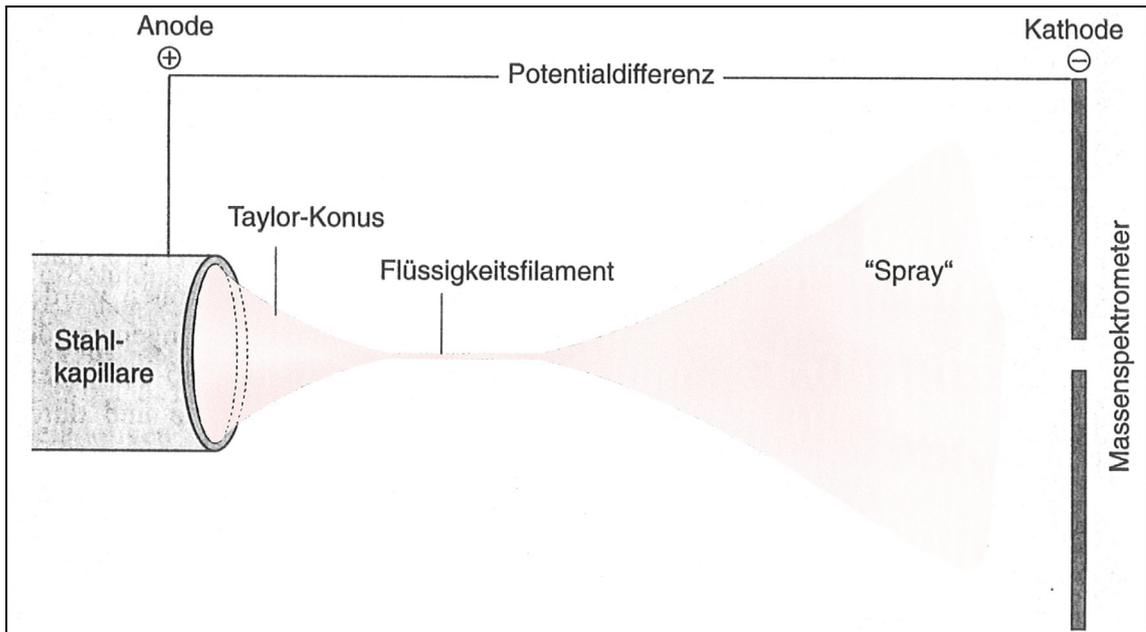


Abb. 3: Schematische Darstellung des makroskopischen ESI-Prozesses [10]

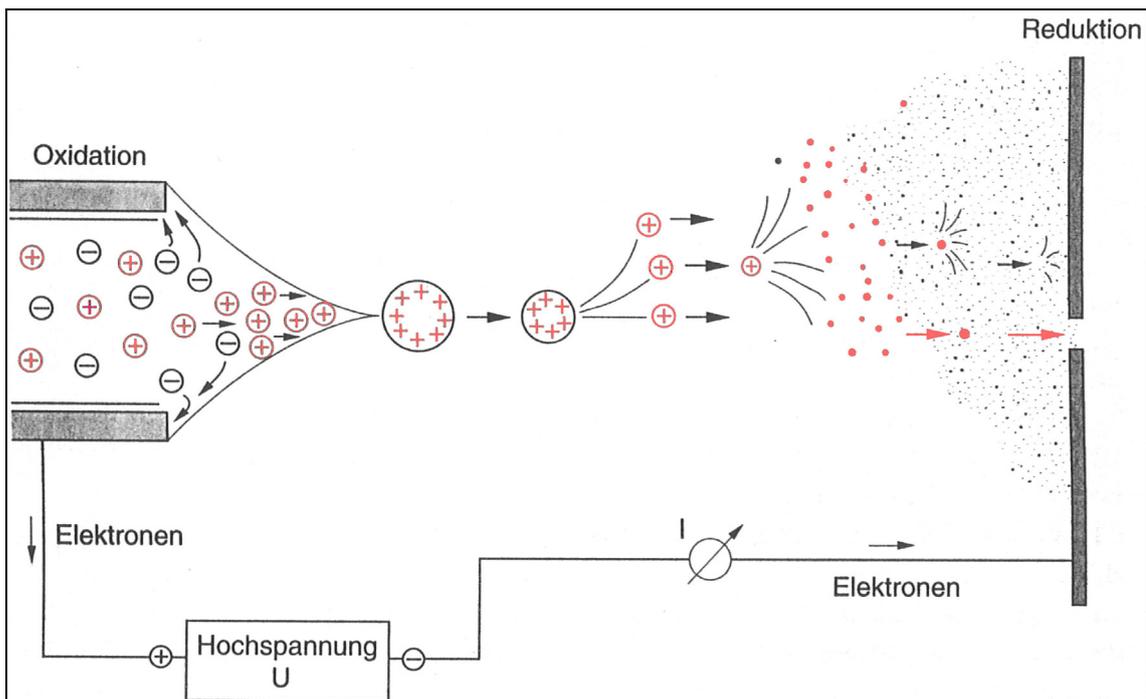


Abb. 4: Schematische Darstellung des mikroskopischen ESI-Prozesses [10]

An dieser Stelle werden zwei Theorien für die Freisetzung der Ionen in die Gasphase diskutiert. Das ursprünglich von Dole entwickelte Modell des geladenen Rückstandes (engl. *charged-residue model*, CRM), welches später von Röllgen mit der SIDT (engl. *single ion in droplet theory*) unterstützt wurde, geht davon aus, dass nach einer Reihe von Coulomb-Explosionen sehr kleine Tröpfchen ( $\sim 1$  nm) gebildet werden, die nur

noch ein Analyt ionen enthalten. Durch Kollision mit Stickstoffmolekülen wird dieses Ion anschließend freigesetzt. Die zweite Theorie ist das von Iribane und Thomson vorgeschlagene Ionenemissionsmodell (engl. *ion evaporation model*, IEM). Dieses geht von einer kontinuierlichen Emission von Analytionen aus instabilen Tröpfchen mit einem Durchmesser von etwa 8 nm aus. Der Ionenstrom wird durch die ständige Verdampfung des Lösungsmittels aufrechterhalten. Es gibt eine Reihe von praktischen Beobachtungen die sich leichter mit dem einen oder dem anderen Modell erklären lassen. Die in der Literatur diskutierten Mechanismen und die praktischen Erfahrungen führten zu der in Abb. 5 dargestellten Einteilung der Einsatzgebiete der Ionenquellen des API 2000. Die Tatsache, dass diese Einteilung in der Praxis nicht immer zutreffend ist, zeigt, dass noch nicht alle während der Ionisation ablaufenden Prozesse erforscht sind.

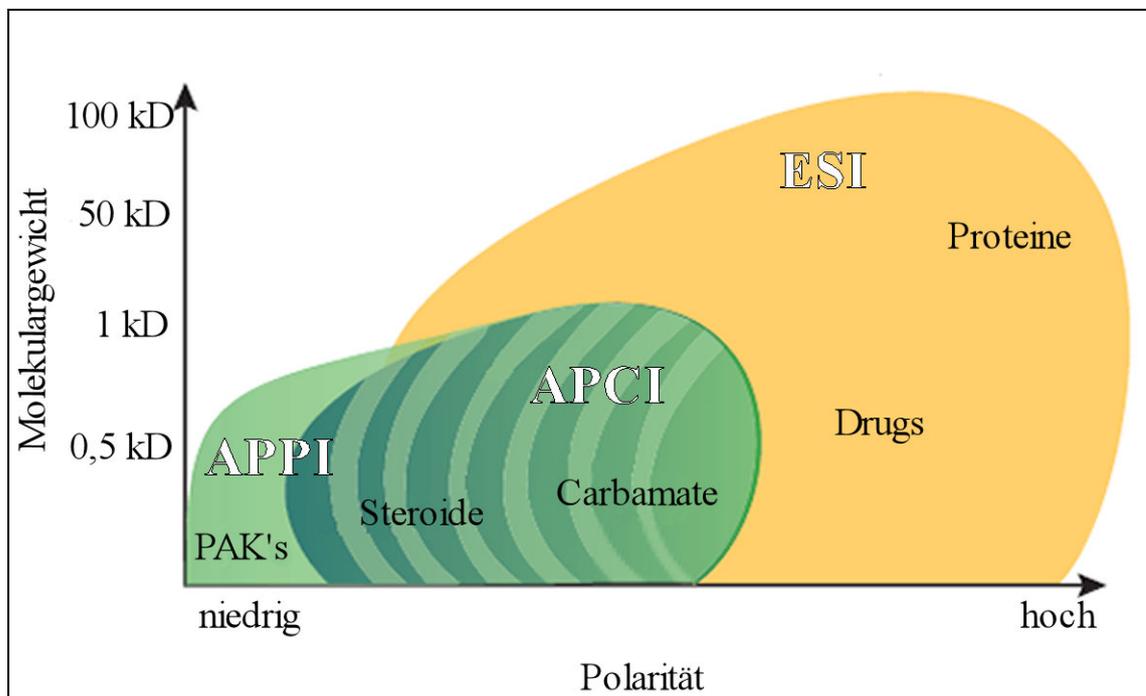


Abb. 5: Einsatzgebiete der Ionenquellen des API 2000 (ESI–Elektrosprayionisation; APCI–atmospheric pressure chemical ionization; APPI–atmospheric pressure photo ionization)

Bei der ESI werden energetisch gesehen so genannte „kalte Ionen“ gebildet, da durch die Verdampfung des Lösungsmittels den Ionen Energie entzogen wird [10]. Sie ist daher eine relativ schonende Ionisationsmethode. Im Gegensatz zu den folgenden Ionisationsarten werden keine zusätzlichen Ionen gebildet, sondern nur die bereits in Lösung vorhandenen in die Gasphase überführt. Aus diesem Grund ist die ESI sehr vom pH-Wert des Eluenten abhängig. Hauptsächlich erhält man dementsprechend Ionen mit den Massen  $M+1$  oder  $M-1$  (Quasimolekül-Ionen). Darüber hinaus können mit Matrixkom-

ponenten (Alkalimetalle, Chlorid) Addukte gebildet werden. Für eine zusätzliche Ionisation im elektrischen Feld wären deutlich höhere Spannungen notwendig. Dieser Effekt kommt unter speziellen Bedingungen auch beim Elektrospray vor, wenn elektrische Entladungen an der Kapillare auftreten (*corona discharge*). Diese sind allerdings unerwünscht, da nicht reproduzierbare Fragmentierungen auftreten können. Ein Vorteil der ESI ist, dass Makromoleküle unter Ausbildung von Mehrfachladungen unfragmentiert in die Gasphase überführt werden können, während es bei der APCI und der APPI zur Spaltung dieser Ionen kommt. So ist die ESI zum Beispiel für die Proteinanalytik geeignet.

Die ESI kann ab Flussraten von  $5 \mu\text{L}/\text{min}$  eingesetzt werden. Bei Zuhilfenahme des orthogonal angeordneten Heißluftföns ist eine Rate von  $1 \text{ ml}/\text{min}$  möglich. Abb. 6 zeigt die verwendete Elektrospray-Ionenquelle.



Abb. 6: Elektrospray-Ionenquelle für das API 2000

### ***Chemische Ionisation***

Bei der *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI) wird der HPLC-Eluent über eine Edelstahlkapillare in eine auf bis zu  $550 \text{ }^\circ\text{C}$  erhitzte Quarzkapillare gesprüht. Dies führt zu einer schnellen Verdampfung des Lösungsmittels. Um eine thermische Zersetzung der Analyten an der Kapillarwand zu vermeiden, wird die Edelstahlkapillare von außen mit einem Zerstäubergas und die Quarzkapillare von innen mit einem Hilfgas umspült. Auf diese Weise wird die verdampfte Probe in Richtung Koronaentladungsnadel transportiert. Dieser Prozess ist in Abb. 7 dargestellt.

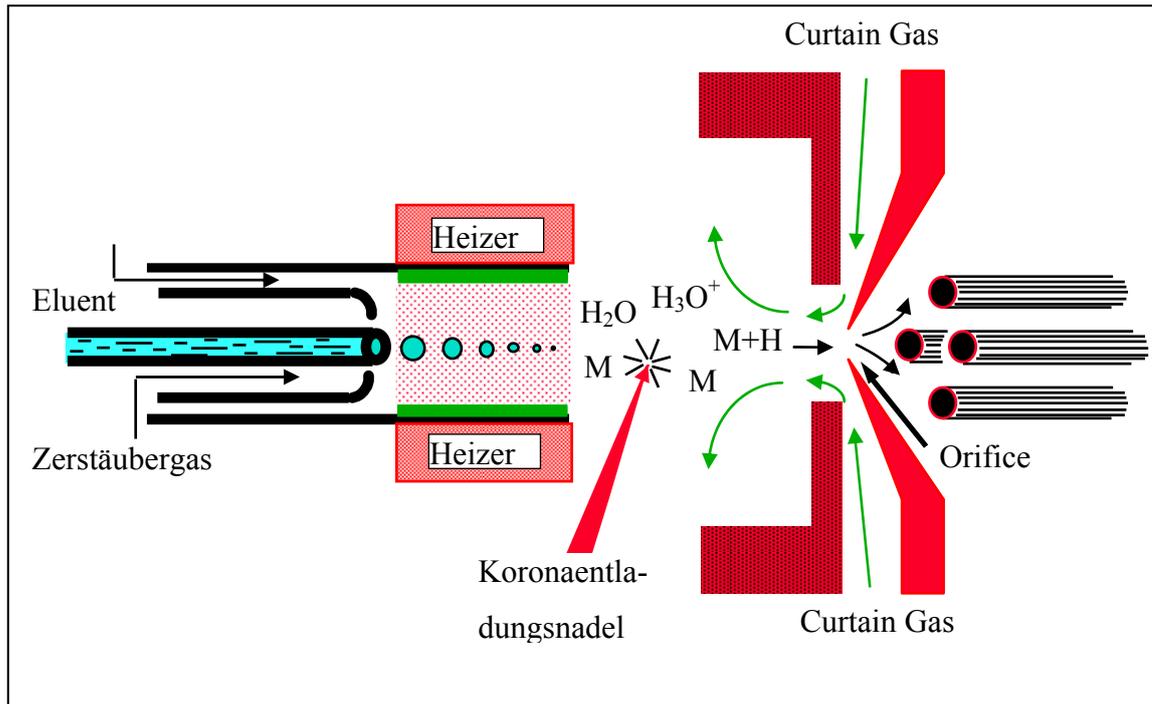


Abb. 7: Ionisation bei der APCI [11]

In der näheren Umgebung der Koronaentladungsnadel entstehen bei einem Strom von bis zu  $6 \mu\text{A}$  die Primärionen. Von Huertas und Fontane [42] wurde gezeigt, dass diese hauptsächlich  $\text{N}_2^{\bullet+}$ ,  $\text{O}_2^{\bullet+}$  und  $\text{NO}^+$  sind. Diese Ionen entstehen durch Kollision mit Elektronen, die an der Koronaentladungsnadel emittiert werden. Obwohl NO in sauberer Luft nur in sehr geringen Mengen vorkommt, wird unter diesen Bedingungen eine Anreicherung beobachtet. Von diesen Ionen werden wiederum Lösungsmittelmoleküle ionisiert. Durch Kollision mit den Analyten kommt es zu einem Protonen- oder Elektronentransfer und damit zur Bildung der Analytionen. Durch Zugabe eines Modifiers zum Eluenten kann die Bildung von Ionen beeinflusst werden. So bewirken zum Beispiel Acetat- ionen eine vermehrte Bildung von negativ geladenen (zum Beispiel Abspaltung eines Pro-



Abb. 8: APCI für das API 2000

tons) und Ammoniumionen eine vermehrte Bildung von positiv geladenen Analytionen (zum Beispiel Anlagerung eines Protons).

Auch die APCI ist eine relativ schonende Methode, allerdings ist die thermische Belastung höher als bei der ESI. Unpolare Substanzen können mit der APCI meist besser ionisiert werden. Weiterhin reagiert die APCI weniger empfindlich auf Matrixbelastungen. Allerdings ist eine Flussrate von mindestens 0,2 mL/min notwendig, die aber bis zu 2 ml/min gesteigert werden kann. Abb. 8 (Seite 28) zeigt die verwendete Ionenquelle für die chemische Ionisation.

### ***Photoionisation***

Die *atmospheric pressure photo ionization* (APPI) stellt für das API 2000 die Ionenquelle mit der höchsten Energieübertragung dar. Dementsprechend ist es möglich auch sehr unpolare Moleküle zu ionisieren (vgl. Abb. 5). Vergleichbar mit der APCI wird der Eluent über eine Edelstahlkapillare in ein beheiztes Quarzrohr gesprüht und mittels eines Hilfsgases in Richtung Ionisationszone transportiert. Zusätzlich wird ein Dopant kontinuierlich mit 5-15 % des Eluentenflusses in die Quarzkapillare infundiert. Die Ionisation wird durch eine Kryptonentladungslampe ( $h\nu = 10 \text{ eV}$ ) realisiert. Der Aufbau der APPI ist in Abb. 9 dargestellt.

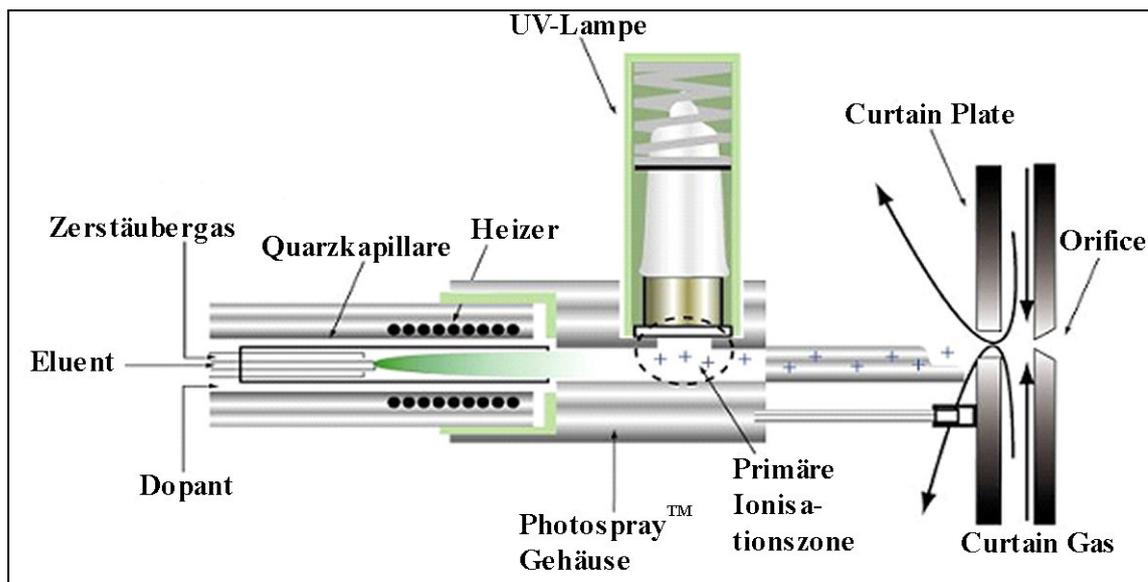


Abb. 9: Aufbau der APPI [12]

Die Bildung von Ionen durch elektromagnetische Strahlung hängt einerseits von der Energie der Strahlung und andererseits vom Ionisationspotential der chemischen Verbindung ab. So haben viele kleinere Moleküle Ionisationspotentiale unter 10 eV, während diese bei den üblichen Lösungsmitteln der Flüssigchromatographie darüber liegen. Daher kann mit der verwendeten Kryptonentladungslampe eine Diskriminierung der Lösungsmittelmoleküle zu Gunsten der Dopant- und Analytmoleküle erreicht werden. Toluol ist das in der Praxis am häufigsten eingesetzte Dopant, da es ein niedriges Ionisationspotential von 8,8 eV aufweist und in der Praxis die besten Ergebnisse liefert.

Bei der Bildung der Analytionen geht man von zwei wesentlichen Prozessen aus, dem *charge transfer process* (Abb. 10) und dem *solvent transfer process* (Abb. 11).

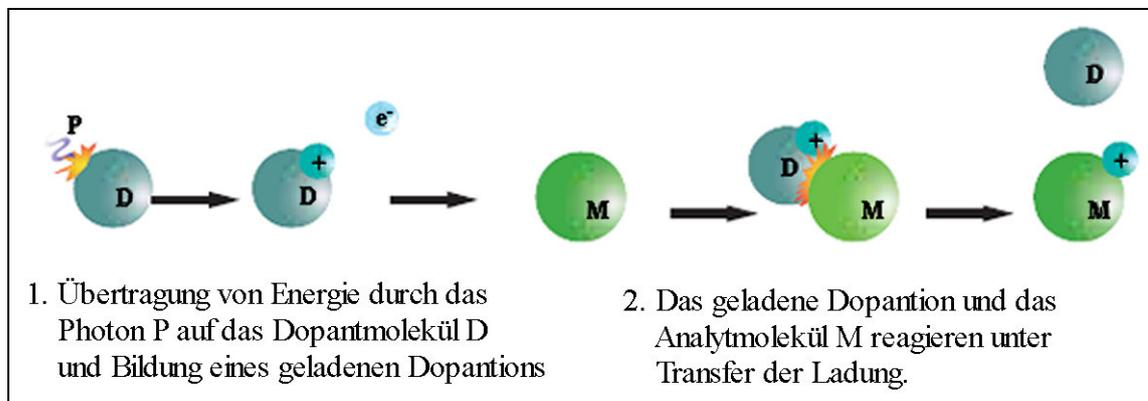


Abb. 10: *Charge transfer process* bei der APPI [12]

Beim *charge transfer process* werden durch die Energie des UV-Lichts Dopantmoleküle ionisiert. Anschließend wird die Ladung bei Kollisionen mit den Analytmolekülen auf diese übertragen. Bei Analyten mit niedrigem Ionisationspotential und geringer Protonenaffinität wird häufig diese Ionisation beobachtet.

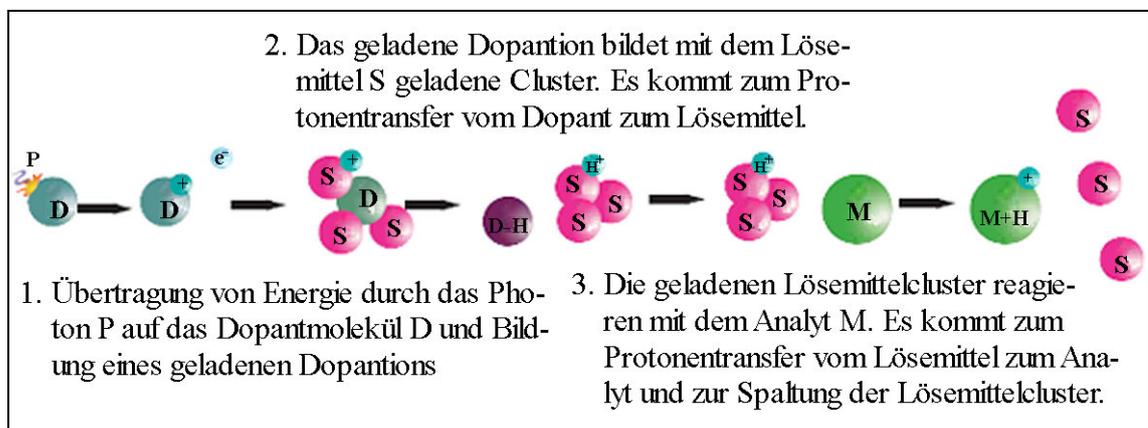


Abb. 11: *Solvent transfer process* bei der APPI [12]

Auch beim *solvent transfer process* werden durch das UV-Licht Dopantionen gebildet. Allerdings kommt es hier zu einem Protonentransfer auf die Lösungsmittelionen und zur Clusterbildung. Abschließend werden die Protonen auf die Analytmoleküle übertragen und die Lösungsmittelcluster aufgelöst. Die ungeladenen Lösungsmittelmoleküle werden entfernt und die Ionen zum Massenanalysator transportiert.

### 2.2.2.3 Massenanalysator

Während die Ionisation unter Atmosphärendruck stattfindet, ist im Massenanalysator ein Vakuum von  $1,0 \cdot 10^{-6}$  bis  $3,0 \cdot 10^{-6}$  kPa notwendig. Der Übergang wird durch ein spezielles Interface realisiert. Um die gebildeten Ionen nach ihren Massen zu trennen, müssen sie zuerst beschleunigt werden. Dafür werden die Ionen durch ein schwaches elektrisches Feld aus der Ionenquelle entfernt und im Anschluss daran durch ein Potentialgefälle weiter beschleunigt. Durch Eintrittsöffnungen des Analysators wird ein enger Bereich des Ionenstrahls selektiert und durch elektrostatische Felder fokussiert. Die Geschwindigkeit der Ionen hängt von ihrer Masse, ihrer Ladung und der Beschleunigungsspannung ab. Zur Trennung der Ionen unterschiedlicher Massen kommen verschiedene Prinzipien zum Einsatz. In Magnetfeldgeräten erfolgt diese nach ihrem Verhältnis Masse zu Ladung in einem Magnetfeld, wobei die Ionen auf unterschiedliche Bahnradien gezwungen werden. Flugzeitanalysatoren (engl. *time of fly*, TOF) nutzen die Tatsache, dass schwerere Ionen langsamer und leichtere Ionen schneller fliegen. Sie werden daher nacheinander registriert und die Massen berechnet. TOF-Analysatoren arbeiten gepulst und werden häufig mit der MALDI gekoppelt.

Ein weiterer Analysator ist die Ionenfalle (engl. *ion-trap*). Hier werden die Ionen durch elektrische Felder auf berechenbaren stabilen Bahnen gehalten. Durch Veränderung der Spannungen werden Ionen einer bestimmten Masse destabilisiert und registriert. Durch kontinuierliche Veränderung der Spannung und sequentielles Registrieren der destabilisierten Ionen wird ein Massenspektrum erhalten. Ionenfallen arbeiten ebenfalls gepulst, da immer nur eine bestimmte Anzahl an Ionen verarbeitet werden kann. Es ist weiterhin möglich bestimmte Ionen in der Falle zu isolieren und durch Erhöhung der Geschwindigkeit eine Fragmentierung zu erreichen. Auf diese Weise können höhere Zerfallsspektren erhalten werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Quadrupol als Massenanalysator verwendet. Dieser besteht aus vier parallel angeordneten Stäben zwischen denen jeweils eine Wechsel- und eine Gleichspannung anliegen. Gegenüberliegende Stäbe haben die gleiche Polari-

tät der Gleichspannung und die gleiche Phase der Wechselspannung. Ein Quadrupolanalysator ist schematisch in Abb. 12 dargestellt.

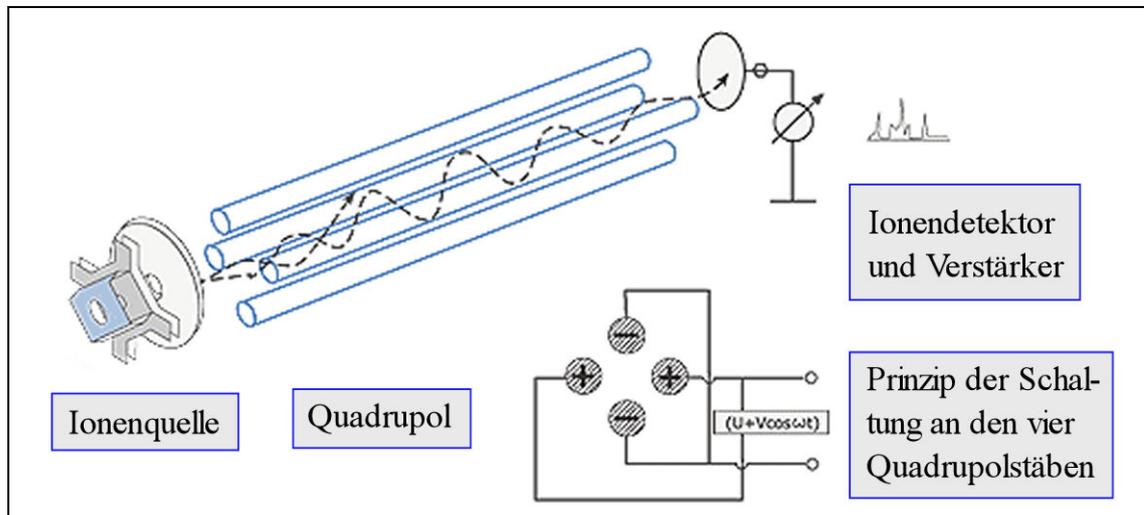


Abb. 12: Arbeitsprinzip eines Quadrupols [13]

Durch die Variation der Wechsel- und der Gleichspannung wird erreicht, dass nur Ionen mit einem bestimmten Masse-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ -Verhältnis) den Quadrupol passieren können. Alle anderen Ionen werden auf ihrer Bahn destabilisiert und an den Quadrupolstäben entladen. Auf diese Weise passieren alle Ionen mit einem  $m/z$  im ausgewählten Messbereich sequentiell den Quadrupol.

In modernen Geräten werden häufig mehrere Analysatoren gekoppelt angewandt. So ist die Kopplung von Quadrupol und Ionenfalle (Q-Trap), Quadrupol und Flugzeitanalysator (Q-TOF) oder mehrerer Quadrupole weit verbreitet. Der in dieser Arbeit verwendete Triplequadrupol ist aus 3 Quadrupolen (Q1 bis Q3) aufgebaut, wobei Q1 und Q3 voll funktionsfähige Quadrupole sind, während Q2 nur mit einer Wechselspannung versorgt wird und hauptsächlich als Kollisionszelle für die weitere Fragmentierung dient. Zusätzlich wird hier der Ionenstrom fokussiert. Der schematische Aufbau eines Triplequadrupol ist in Abb. 13 dargestellt.

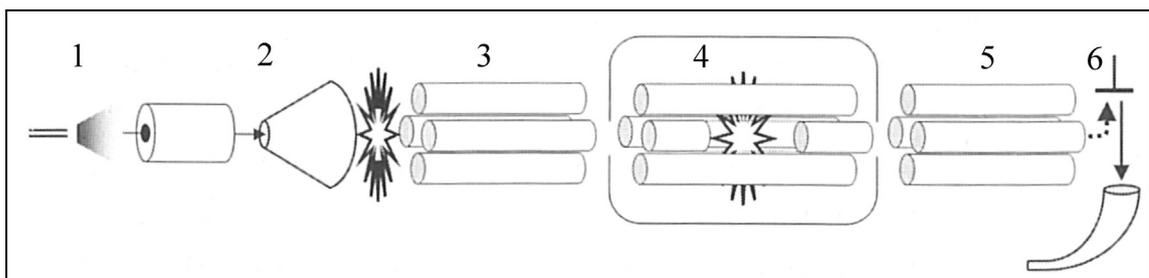


Abb. 13: ESI-Triplequad-Massenspektrometer. (1) Ionisation, (2) Fokussierung, (3) erster Quadrupol, (4) zweiter Quadrupol, (5) dritter Quadrupol, (6) Detektion und Auswertung [14]

Es gibt verschiedene Modi, in denen ein solches Gerät betrieben werden kann. Die fünf wichtigsten sollen mit Hilfe von Abb. 14 erläutert werden.

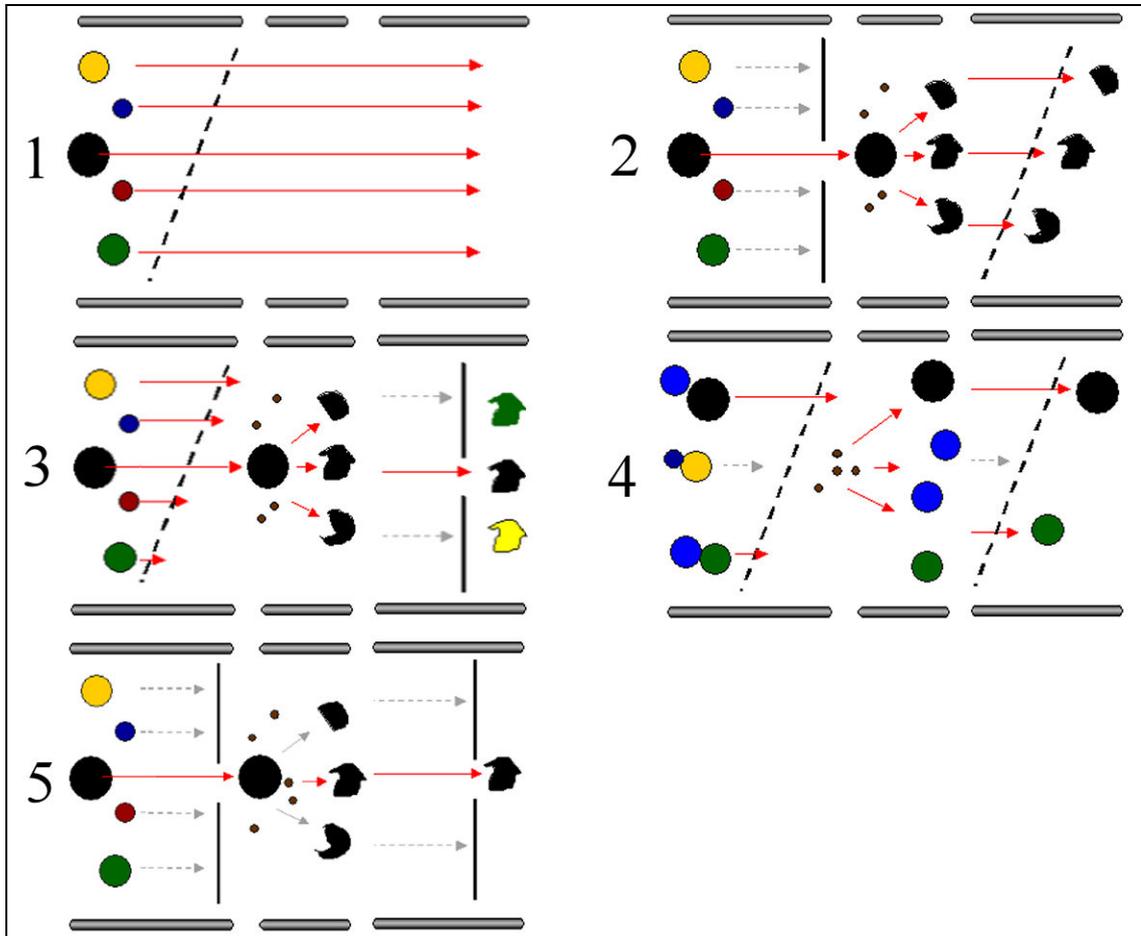


Abb. 14: Ausgewählte Analysenmodi eines Triplequad-Massenspektrometers. (1) Scan-Modus, (2) Fragment-Ionenanalyse, (3) Vorläuferionenanalyse, (4) Neutralverlustanalyse, (5) MRM [12]

Modus 1 ist der Scan-Modus. Hier wird Q1 so gesteuert, dass ihn in einem bestimmten Intervall sequenziell Ionen aller  $m/z$ -Verhältnisse eines festgelegten Bereiches passieren können (scannen). Q2 und Q3 dienen lediglich der Fokussierung und Weiterleitung. In diesem Modus wird ein Massenspektrum erhalten. Der zweite Modus ist die Fragment-Ionenanalyse. Hierbei wird Q1 auf ein bestimmtes  $m/z$ -Verhältnis eingestellt, die passierenden Ionen im Q2 fragmentiert und das nach Q3 resultierende Massenspektrum aufgenommen. Beim dritten Modus handelt es sich um die Vorläuferionenanalyse. Hierbei wird Q3 auf ein bestimmtes  $m/z$ -Verhältnis eingestellt während Q1 über einen bestimmten Bereich scannt. Die passierenden Ionen werden im Q2 fragmentiert. Dieser Modus wird für die Analyse von Substanzklassen verwendet, die unter gegebenen Bedingungen das gleiche Fragment erzeugen. Der vierte Modus ist die Neutralverlustanalyse. Sowohl Q1 als auch Q3 scannen synchron, allerdings ist Q3 um einen bestimmten

Betrag (z. B. 18 für  $\text{H}_2\text{O}$ ) zurückversetzt. Somit lassen sich Ionen nachweisen, die das gleiche Neutralteilchen abspalten. Der fünfte Modus kommt bei der Quantifizierung zum Einsatz. Hierbei wird Q1 auf ein bestimmtes  $m/z$ -Verhältnis (Produkt-Ion) und Q3 auf das eines Fragmentes (Fragment-Ion) eingestellt (engl. *multiple reaction monitoring*, MRM). Im Q2 erfolgt die Fragmentierung des Produkt-Ions. Aufgenommen wird das entsprechende Signal des Fragment-Ions. Auf diese Weise kann eine hohe Selektivität und ein deutlich besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis erreicht werden. Dies führt zu einer im Vergleich zum Scan-Modus erheblich gesteigerten Empfindlichkeit. In der vorliegenden Arbeit konnte nur mit dem MRM-Modus eine ausreichende Empfindlichkeit erreicht werden, weshalb für die Quantifizierung ausschließlich dieser zum Einsatz kam. Neben diesen Analysemodi gibt es noch weitere, die allerdings in der Praxis eine untergeordnete Rolle spielen.

Nach der Trennung der Ionen müssen diese von einem Detektor registriert bzw. in ein Signal umgewandelt werden. Auf ausgewählte Detektoren wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

#### 2.2.2.4 Detektor

Bei Sektorfeldgeräten unterscheidet man drei Arten der Registrierung. Zum einen befindet sich am Ausgang des Analysators eine Fotoplatte, auf die die Ionen in Abhängigkeit zu ihren Flugradialen an unterschiedlichen Stellen auftreffen und die Fotoplatte „belichten“. Zum anderen können am Ausgang des Analysators mehrere Auffänger verteilt sein, die jeweils nur Ionen eines bestimmten  $m/z$ -Verhältnisses registrieren. Die dritte Möglichkeit ist der Sekundärelektronenvervielfacher (SEV). Man unterscheidet zwischen kontinuierlich und diskontinuierlich arbeitenden SEV (siehe Abb. 15). Letzterer besteht aus sequentiell versetzt angeordneten Dynoden (22 Dynoden beim API 2000). Auftreffende Ionen schlagen aus der ersten Dynode (Konversionsdynode) Elektronen heraus, welche zur nächsten Dynode beschleunigt werden und aus dieser wiederum Elektronen herausschlagen. Es kommt zu einer kaskadenartigen Verstärkung der Elektronenzahl die registriert werden kann. Der kontinuierlich arbeitende SEV hat die Form eines Trinkhornes, wobei die Elektronen aus der Wandung herausgeschlagen werden.

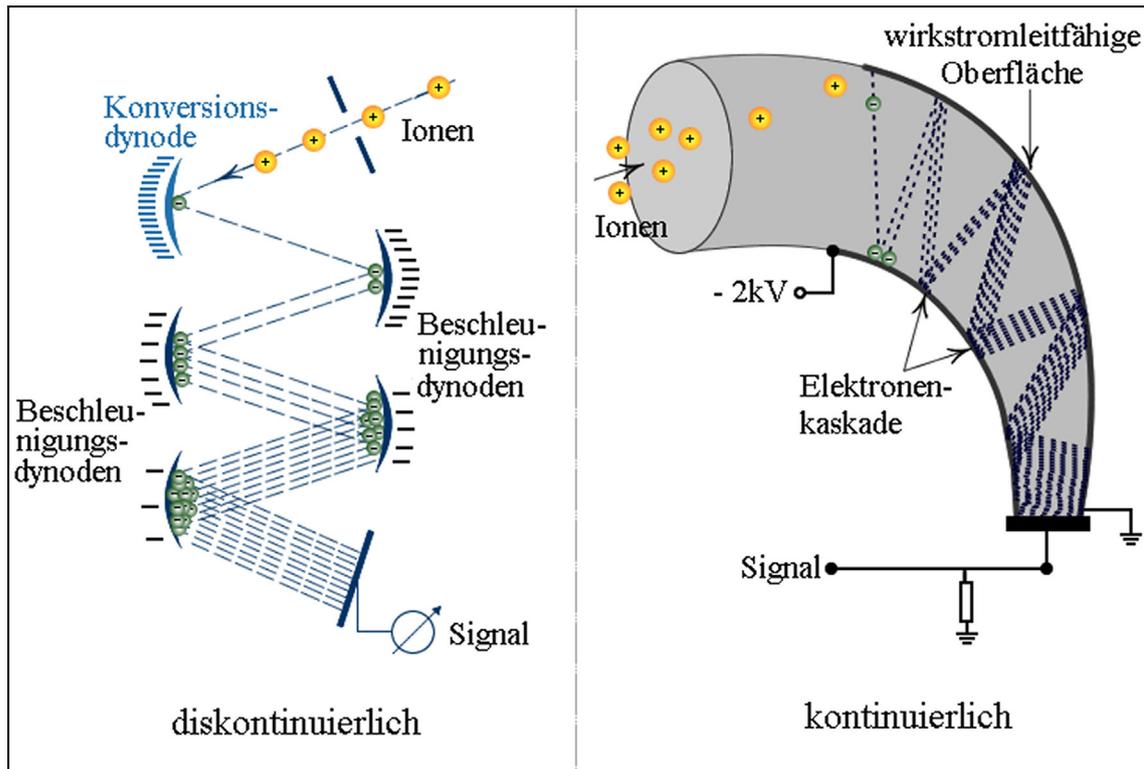


Abb. 15: Aufbau eines kontinuierlichen und diskontinuierlichen SEV (mit freundlicher Genehmigung des FIZ CHEMIE Berlin) [15]

Ein Nachteil des SEV ist die langsame Veränderung der Oberfläche der Dynoden und damit die Verringerung der Signalstärke. Weiterhin reagiert der SEV gegenüber langsameren und schwereren Ionen weniger empfindlich. Da die Ionen nach Passage der Quadrupole eine relativ geringe Geschwindigkeit haben, müssen sie durch eine zusätzliche Dynode in Richtung SEV beschleunigt werden. Ein weniger verbreiteter Detektor ist der Faraday-Auffänger (FC, *faraday cup*). Er weist eine geringere Empfindlichkeit und eine höhere Reaktionszeit als der SEV auf. Allerdings reagiert er weniger massenselektiv. In teureren Geräten kommt der Szintillationsdetektor zum Einsatz. Die Ionen, die den Massenanalysator verlassen, prallen auf eine Konversionsdynode und schlagen aus dieser Elektronen heraus. Diese werden auf eine Szintillationsscheibe beschleunigt aus der sie wiederum Photonen freisetzen, welche mit einem Photomultiplier registriert werden. Der Szintillationsdetektor zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit, geringes Rauschen, hohe Geschwindigkeit und eine hohe Lebenserwartung, aber auch durch einen hohen Preis aus.

Die erhaltenen Signale werden bei allen Detektoren über einen Computer und die entsprechende Software ausgewertet.

Die Massenspektrometrie stellt eine hochspezifische, schnelle und empfindliche Analysemethode dar, mit der gleichzeitig eine Vielzahl an Informationen (Struktur, Konzen-

tration) erhalten werden kann. Ein Nachteil der Massenspektrometrie ist neben dem hohen Preis ihre Störanfälligkeit gegenüber Matrixkomponenten wie Salze, Proteine oder Tenside [43, 44]. In den zu analysierenden Umweltproben sind diese Stoffe jedoch oft in erheblichen Mengen vorhanden. Eine Möglichkeit diese Komponenten abzutrennen stellt die Festphasenextraktion dar.

### 2.2.3 Festphasenextraktion

Mit Hilfe der Festphasenextraktion (engl. *solid-phase-extraction*, SPE) können die zu untersuchenden Analyten bei der Probenaufarbeitung isoliert, aufkonzentriert, gereinigt oder das Lösungsmittel ausgetauscht werden. Sie stellt eine kostengünstige Alternative zur Flüssig-Flüssig-Extraktion (engl. *liquid-liquid-extraction*, LLE) dar, da diese eine schwer zu automatisierende und auf Grund des hohen Verbrauchs reiner Lösungsmittel sehr kostenintensive Methode ist.

Zu den Vorteilen der SPE gehören geringe Anschaffungskosten, relativ kurze Prozesszeiten, geringerer Lösungsmittelverbrauch und eine einfache Handhabung. Allerdings sind die Eigenschaften der Oberflächen der Festphasen, von denen das Sorptionsverhalten der Analyten abhängt, noch nicht vollständig reproduzierbar wohingegen die Eigenschaften der Lösungsmittel bei der LLE meist vergleichbar sind.

Allgemein teilt man die Festphasen in verschiedene Gruppen ein. Zum einen in die Normalphasen basierend auf anorganischen Oxiden. Häufig eingesetzt werden Kieselgel, Aluminiumoxid, Florisil (synthetisches Magnesiumsilikat) und Kieselgur. Auf Kieselgel basierende siloxangebundene Sorbentien können in einem großen Bindungsdichtebereich, mit unterschiedlichen Porengrößen und verschiedenen funktionellen Gruppen produziert werden. Die Herstellung erfolgt meist durch die Reaktion von Kieselgel mit mono- oder trifunktionellen Silanen. Die resultierenden Unterschiede in Größe und Beschaffenheit der Oberfläche erlauben die Isolation einer großen Anzahl von Stoffen angefangen mit kleinen Molekülen, über langkettige Alkane bis hin zu Makromolekülen.

Eine andere Gruppe stellen die Umkehrphasen, basierend auf organisch modifizierten Kieselgelen mit unterschiedlichem Endcapping, dar. Dabei beeinflusst die Art der Modifikation ebenso wie bei den analytischen Trennsäulen die Wechselwirkung mit der Probe. Von wachsender Bedeutung sind Sorbentien auf Basis von porösen Polymeren. Diese besitzen auf Grund einer enormen Anzahl an Quervernetzungen eine sehr große Oberfläche. Durch Einfügen von polaren funktionellen Gruppen wie Acetyl- oder Sulfonatgruppen kann die Spezifität dieser Polymere weiter verändert werden. Die verwen-

dete Oasis® HLB-Kartusche (engl. *hydrophilic-lipophilic balance*) der Firma Waters basiert auf dem großporigen Polymer von Divinylbenzol und N-Vinylpyrrolidon. Sie ist vollständig mit Wasser benetzbar und für Analyten unterschiedlicher Struktur geeignet. Die vierte Gruppe bilden die Ionenaustauscher. Von Bedeutung sind hier die einfach oder mehrfach geladenen funktionellen Gruppen, die mit unterschiedlichen Trägermaterialien verbunden sind. Diese Phasen retardieren vor allem ionische Verbindungen. Seit einigen Jahren sind auch Kombinationen von z. B. unpolaren Sorbentien und Ionenaustauscherfunktionen kommerziell erhältlich. Dadurch kann das Spektrum der möglichen Einsatzgebiete weiter ausgedehnt werden.

## 3 Geräte und Chemikalien

### 3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton, für die HPLC	Merck, D-64271 Darmstadt
Acetonitril, Chromanorm HPLC Gradient Grade	VWR, D-64295 Darmstadt
t-Butylmethylether, p.a.	Merck, D-64271 Darmstadt
Dichlormethan, p.a. ACS	Fluka, D-30918 Seelze
Essigsäureethylester, Rotisolv Pestilyse	Roth, D-76185 Karlsruhe
n-Hexan, Pestanal für Rückstandanalyse	Fluka, D-30918 Seelze
Methanol, gradient Grade	Fisher Scientific, D-58239 Schwerte
Reinstwasser, Purelab UHQ PS	ELGA, D-56235 Ransbach-Baumbach
Tetrahydrofuran, p.a. ACS	Fluka, D-30918 Seelze
Toluol, für Rückstandsanalyse	Acros, B-2440 Geel
Ameisensäure, p.a.	Merck, D-64271 Darmstadt
Ammoniaklösung, 32 %ig, RECTAPUR	VWR, D-64295 Darmstadt
Triethylamin, p.a.	Fluka, D-30918 Seelze
Diethanolamin, p.a.	Merck, D-64271 Darmstadt
Natriumphosphat, p.a.	VWR, D-64295 Darmstadt

Ammoniakalisches Methanol: Einleitung von  $\text{NH}_3$  in Methanol bis zur Sättigung

Tabelle 5: Verwendete Festphasen

Festphasenkartuschen	Hersteller
Chromabond C18, 1000 mg, 6 mL	Macherey-Nagel, D-52313 Düren
Chromabond EASY, 200 mg, 6 mL	Macherey-Nagel, D-52313 Düren
Chromabond EASY, 100 mg, 1 mL	Macherey-Nagel, D-52313 Düren
Chromabond HR-P, 500 mg, 3 mL	Macherey-Nagel, D-52313 Düren
Chromabond HR-P, 100 mg, 1 mL	Macherey-Nagel, D-52313 Düren
Chromabond C18ec, 1000 mg, 6 mL	Macherey-Nagel, D-52313 Düren
Focus, 50 mg, 6 mL	Varian, D-64289 Darmstadt
Strata-X, 33 $\mu\text{m}$ , 30 mg, 1 mL	Phenomenex, D-63741 Aschaffenburg
Strata C18-U, 100 mg, 1 mL	Phenomenex, D-63741 Aschaffenburg
Strata C18-T, 100 mg, 1 mL	Phenomenex, D-63741 Aschaffenburg
Strata C18-M, 1000 mg, 6 mL	Phenomenex, D-63741 Aschaffenburg

<b>Festphasenkartuschen</b>	<b>Hersteller</b>
Strata C18-E, 1000 mg, 6 mL	Phenomenex, D-63741 Aschaffenburg
Oasis HLB, 3 mL, 60 mg	Waters Corporation, D-65760 Eschborn
Oasis MAX, 3 mL, 60 mg	Waters Corporation, D-65760 Eschborn
Oasis MCX, 3 mL, 60 mg	Waters Corporation, D-65760 Eschborn
Oasis WAX, 3 mL, 60 mg	Waters Corporation, D-65760 Eschborn
Oasis WCX, 3 mL, 60 mg	Waters Corporation, D-65760 Eschborn

### 3.2 Standardsubstanzen

Tabelle 6: Standardsubstanzen

<b>Analyt</b>	<b>Hersteller</b>
Amitriptylin, 99 %	LGC Promochem, D- 46485 Wesel
Carbamazepin, 98 %	Sigma Aldrich, D-89555 Steinheim
Diazepam, 99 %	LGC Promochem, D- 46485 Wesel
Diazepam-d <sub>5</sub> , 99%	LGC Promochem, D- 46485 Wesel
Diclofenac-Na, 99,5 %	Dr. Ehrendorfer GmbH, D-86199 Augsburg
Estradiol, 98 %	Sigma Aldrich, D-89555 Steinheim
Estron, 99 %	Riedel de Haën, D-30926 Seelze
Ethinylestradiol, 98 %	Sigma Aldrich, D-89555 Steinheim
Ibuprofen, 99,5 %	Dr. Ehrendorfer GmbH, D-86199 Augsburg
Fenopropfen-Ca, 94%	Sigma Aldrich, D-89555 Steinheim
Gemfibrozil, 99 %	Sigma Aldrich, D-89555 Steinheim
Bezafibrat, 99 %	Sigma Aldrich, D-89555 Steinheim
Phenazon, 99 %	Fluka, D-30918 Seelze
Monensin sodium salt hydrate, 98,5 %	Dr. Ehrendorfer GmbH, D-86199 Augsburg
Naproxen, 98 %	Fluka, D-30918 Seelze
Chloramphenicol- <sup>37</sup> Cl <sub>2</sub> , 99,9 %	RIVM, NL-3720 BA Bilthoven
Salbutamol-d <sub>4</sub> , 94 %	RIVM, NL-3720 BA Bilthoven
Dimetridazol-d <sub>3</sub> , 93 %	RIVM, NL-3720 BA Bilthoven
Sulphamidin-d <sub>4</sub> , 96 %	RIVM, NL-3720 BA Bilthoven
Sildenafil-Zitrat, 50 mg Filmtablette	Pfizer GmbH, D-76139 Karlsruhe
Opipramol, 98 %	Sigma Aldrich, D-89555 Steinheim
Paracetamol, 99,5 %	Dr. Ehrendorfer GmbH, D-86199 Augsburg
Paracetamol-d <sub>4</sub> , 99 %	LGC Promochem, D- 46485 Wesel

Wenn als Standardsubstanz nur das Salz zur Verfügung stand, beziehen sich alle Angaben zur Masse oder Konzentration auf das erhältliche Salz.

**Tabelle 7: Eingesetzte HPLC-Säulen**

HPLC-Säulen	Hersteller
Reprosil-Pur 120 C18-ODS3 100x2.0 mm , 5µm	Trentec Analystechnik, D-70829 Gerlingen
Reprosil-Pur 120 C18-AQ 100x2.0 mm , 5µm	
Reprosil-Pur 120 C18-AQ 150x4.0 mm , 5µm	
Lichrosphere 60 RP SelectB 100x2.0 mm , 5µm	
Reprosil-Pur 120 C4 100x2.0 mm, 5µm	
Reprosil-Pur 120 NH <sub>2</sub> 100x2.0; 5 µm	

### 3.3 Geräte

- Agilent HPLC 1100 mit:
  - Autosampler G1329A
  - Binäre Pumpe G1312A
  - VWD G1314A
- Massenspektrometer API2000 von Applied Biosystems
- Rotationsverdampfer Laborota 4002 digital von Heidolph
  - Rotacool
  - Rotavac servo
- Analysenwaage Explorer von Ohaus
- SPE-Einheit spe-12G von J. T. Baker
- Vakuum Controller ILMVAC VCZ 324
- Mikroliterspritzen 10 µL, 100 µL, 1000 µL (Firma ILS)
- Eppendorfpipetten 1000 µL
- Ultraschallbad Sonorex RK100H

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Erstellen der Massenspektrometriemethode

#### 4.1.1 Begriffserklärung

Bei der Arbeit mit einem Massenspektrometer ist die Kenntnis der genauen Massen der zu untersuchenden Analyten eine Grundvoraussetzung, um den Scanbereich einzugrenzen und die Spektren interpretieren zu können. In der analytischen Chemie versteht man unter der Molmasse ( $M$ ) bzw. dem Molgewicht die Summe der gemäß dem natürlichen Vorkommen der Isotope gewichteten Atommassen der in einer Verbindung enthaltenen Elemente. Da mit der Massenspektrometrie eine Isotopenunterscheidung möglich ist, erhält man im Massenspektrum ein Isotopenmuster. Das höchste Signal stellt dabei die Molmasse mit der wahrscheinlichsten natürlichen Isotopenzusammensetzung dar. Diese massenspektrometrische Molmasse ( $M^*$ ) kann in Abhängigkeit von den enthaltenen Elementen von der gewichteten Molmasse abweichen. Als Beispiel soll das Kokzidiostatikum Narasin mit der Summenformel  $C_{43}H_{72}O_{11}$  herangezogen werden. Die gewichtete Molmasse beträgt 765,05 g/Mol während die massenspektrometrische Molmasse bei 764,00 g/Mol liegt. Da in der Literatur im Allgemeinen mit den gewichteten Molmassen gearbeitet wird, wird sich auch im Rahmen dieser Arbeit darauf bezogen. Ungeachtet dessen bezieht sich die Angabe  $M\pm 1$  für den Molpeak immer auf das Masse-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) der massenspektrometrischen Molmasse. Der Begriff Molpeak bezeichnet das Signal, welches durch das Molekül selbst erzeugt wird und bei der ESI je nach Polarität z. B. bei  $m/z$   $M+1$  oder  $M-1$  liegt. Im Fall von Narasin findet man bei positiver Ionisation den Molpeak bei  $m/z$  765. Als Produkt-Ion wird das im Q1 und als Fragment-Ion das im Q3 eingestellte Masse-Ladungs-Verhältnis bezeichnet.

#### 4.1.2 Methodenerstellung

Wie bereits in Kapitel 2.2.2.2 (Seite 23) dargestellt, gibt es 3 verschiedene Ionisationsquellen für das API 2000. Wegen der polaren Natur der meisten zu untersuchenden Analyten und dem voraussichtlich relativ weiten Anwendungsspektrum wurde für diese Untersuchungen das Elektrospray als Ionenquelle verwendet.

Um mittels *multiple reaction monitoring* (MRM) quantifizieren zu können, ist es notwendig, charakteristische Fragmente der Analyten zu bestimmen und die Reproduzier-

barkeit der Ionisation sicher zu stellen. Weiterhin müssen die Fokussierungs- und Beschleunigungsspannungen im Verlauf des Ionenpfades im Massenspektrometer optimiert werden. Für diesen Zweck bietet die Software die Möglichkeit einer automatischen Optimierung. Während der Analyt kontinuierlich über die eingebaute Spritzenpumpe direkt in die Ionenquelle infundiert wird, optimiert die Software über die eingegebene Molmasse die Spannungen des ersten Quadrupols auf ein maximales Signal für das Produkt-Ion und bestimmt anschließend geeignete Fragmente für die Quantifizierung. In weiteren Schritten werden die gerätespezifischen Parameter angepasst, um die bestmögliche Intensität der Fragmente zu erhalten.

Alle dargestellten Spektren wurden während des ersten Fragment-Ionenscans bei der automatischen Optimierung erhalten und wurden mit folgenden Parametern aufgenommen (1 bis 4 mg/L Methanol/Wasser 90/10 (v/v), 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ):

Spannung [V]:	5500 bzw. -4500
Temperatur:	Interface-Temperatur
Curtaingas [kPa]:	207
Gas 1 [kPa]:	276
Gas 2 [kPa]:	0
Kollisionsgas [kPa]:	55

Durch die schonende Ionisation im Elektrospray dient in vielen Fällen das Molekülion (Molpeak) als Produkt-Ion. Bei einigen Verbindungen ist jedoch das Signal des Molpeaks sehr schwach, da sich stabile Addukte mit Lösungsmittel- oder Matrixkomponenten bilden, die dann als Produkt-Ion verwendet werden müssen. Beispiele für Natrium- und Ammoniumaddukte sind in Abb. 16 und Abb. 17 anhand der Kokzidiostatika (Tierarzneimittel) Salinomycin und Maduramycin dargestellt. Die Verwendung von Addukten für die Quantifizierung ist allerdings nicht unproblematisch. Da es sich bei deren Bildung um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, ist sie von der Matrixzusammensetzung abhängig. Um darauf beruhende Intensitätsschwankungen zu verhindern, ist es notwendig, immer in der gleichen Matrix zu messen oder das HPLC-Fließmittel in der Form zu modifizieren, dass der Matrixeinfluss zu vernachlässigen ist.

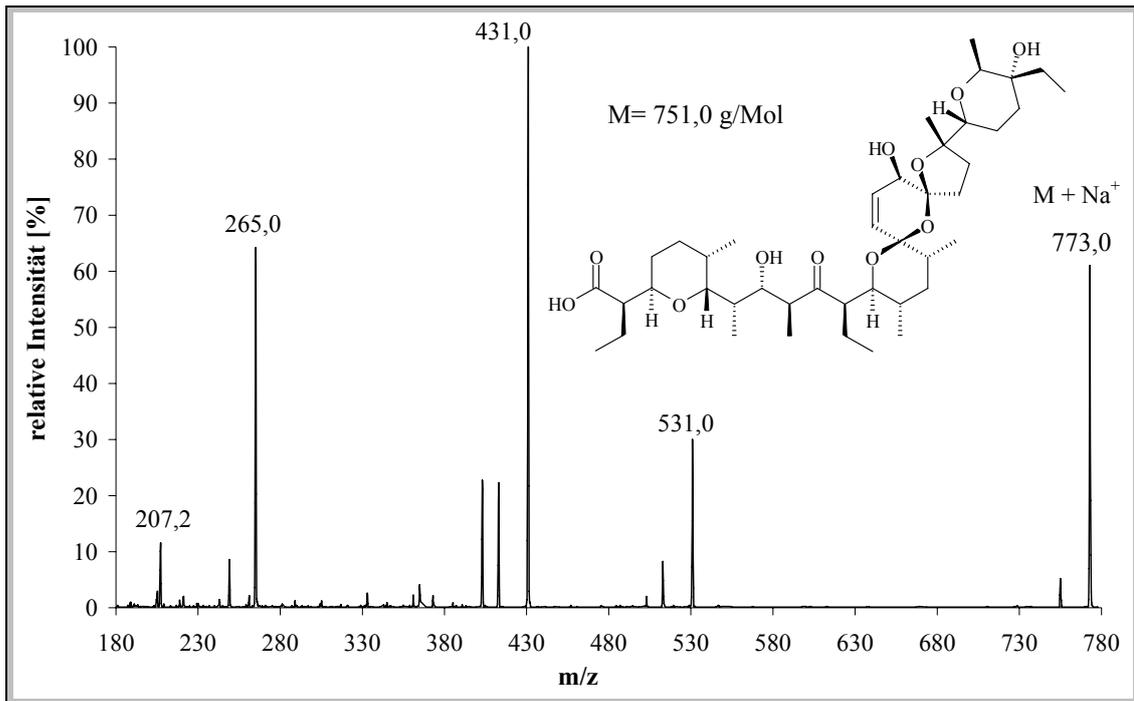


Abb. 16: Massenspektrum von Salinomycin als Natriumaddukt aufgenommen mit positiver Ionisation

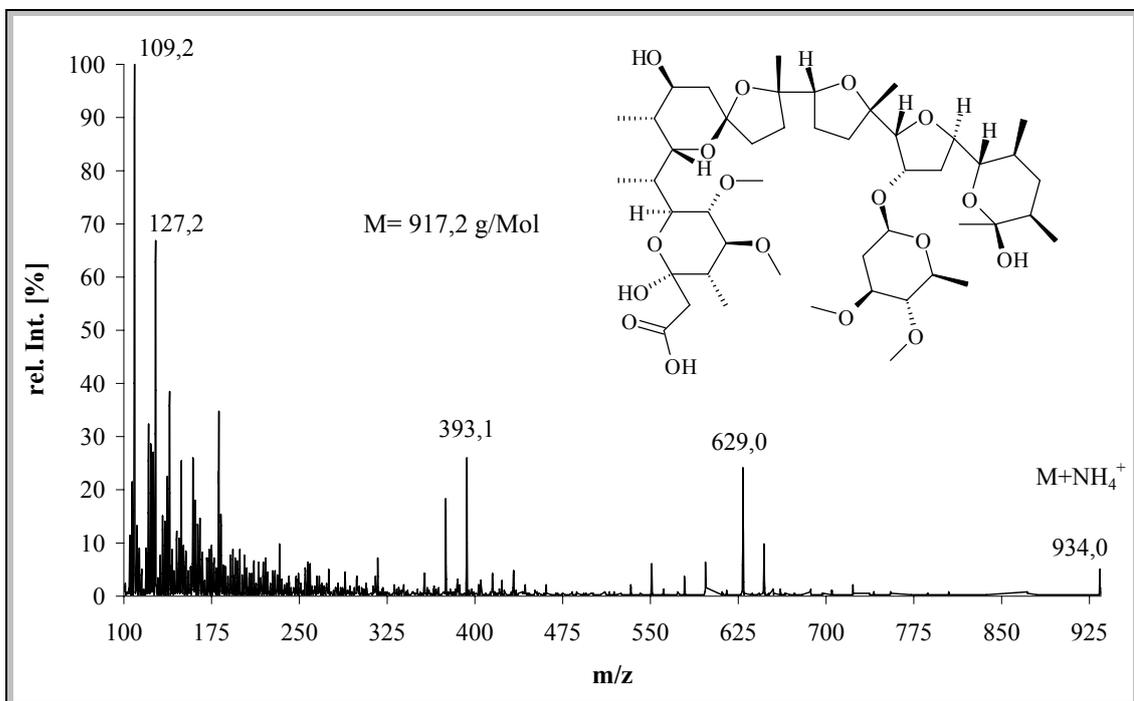


Abb. 17: Massenspektrum von Maduramycin als Ammoniumaddukt aufgenommen mit positiver Ionisation

Ammonium- und Natriumaddukte sind vor allem bei positiver Ionisation von Bedeutung. Bei der negativen Ionisation muss auch mit Chloridaddukten gerechnet werden, die aber von untergeordneter Bedeutung sind.

Um die Sicherheit der qualitativen Aussage zu erhöhen, sollte neben dem Quantifier auch mindestens ein Qualifier gemessen werden. Darauf wird in Kapitel 4.5.1 (Seite 82) näher eingegangen. Das Verhältnis der Peakflächen dieser Fragmente dient dabei als Qualitätskriterium. Im Gegensatz zu den relativ fragmentreichen Massenspektren bei der Kopplung mit der Gaschromatographie ergeben sich bei Kopplung mit der Flüssigchromatographie teilweise nur wenige auswertbare Fragmente. Besonders deutlich wird dies bei der negativen Ionisation. Als Beispiele wurden die Spektren von Estron und Paracetamol, aufgenommen mit negativer Ionisation (Abb. 18, Abb. 19), sowie im Gegensatz dazu von Paracetamol, aufgenommen mit positiver Ionisation (Abb. 20), ausgewählt.

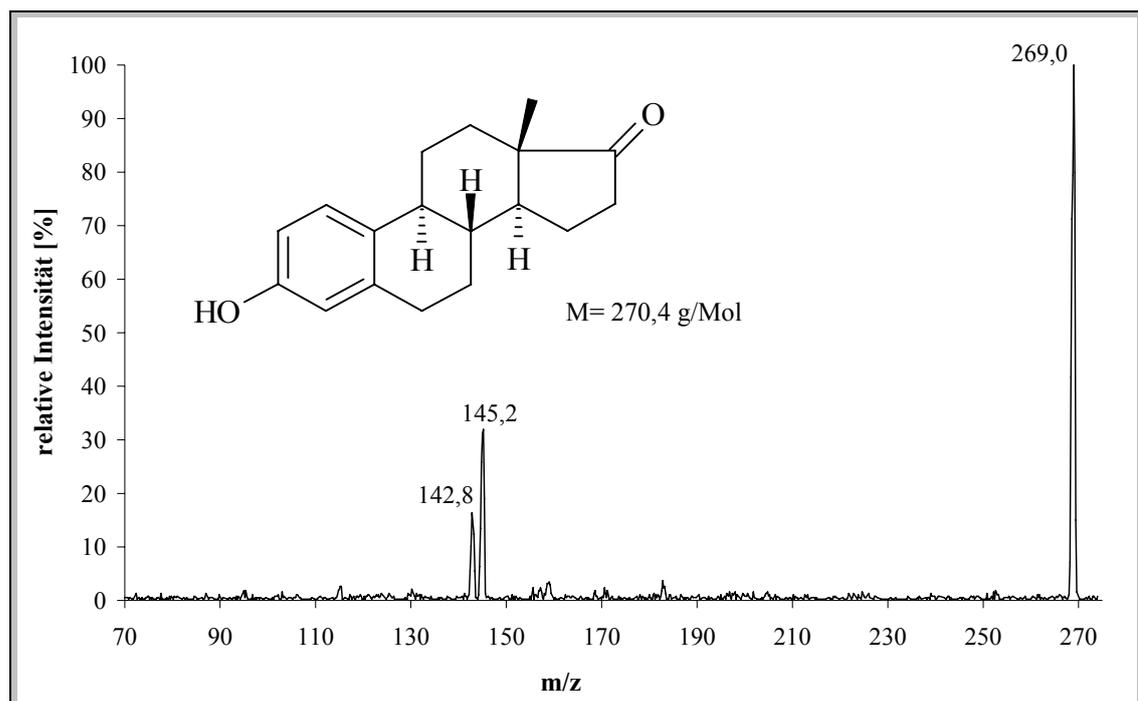


Abb. 18: Massenspektrum von Estron aufgenommen mit negativer Ionisation

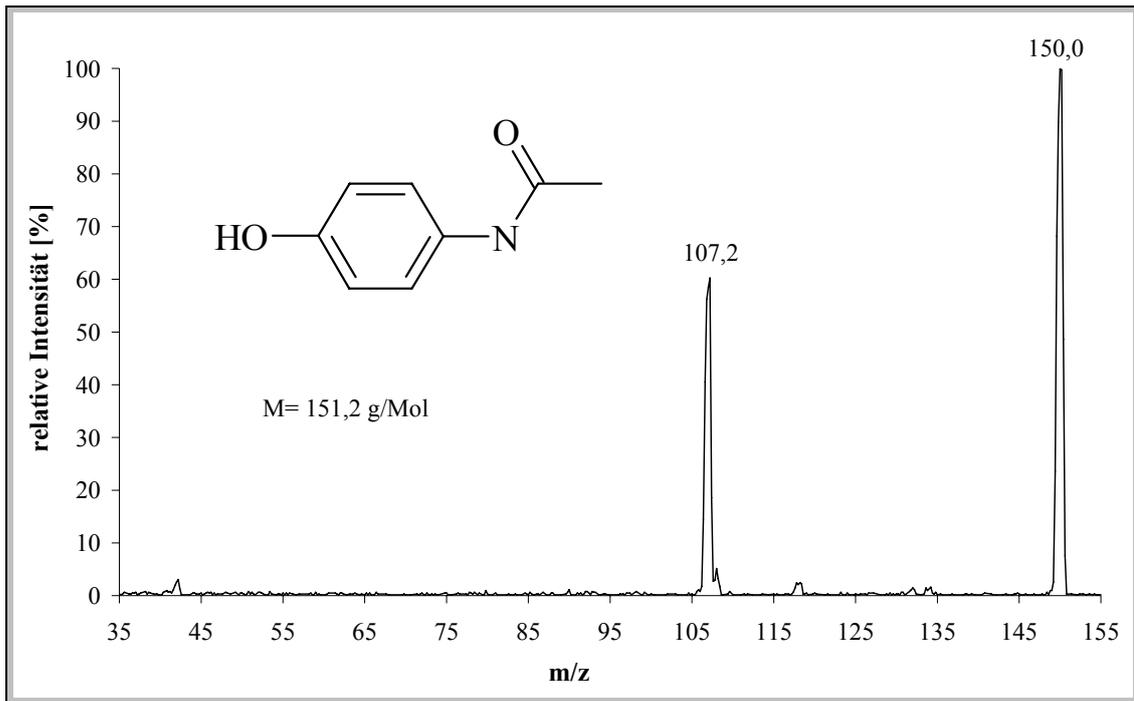


Abb. 19: Massenspektrum von Paracetamol aufgenommen mit negativer Ionisation

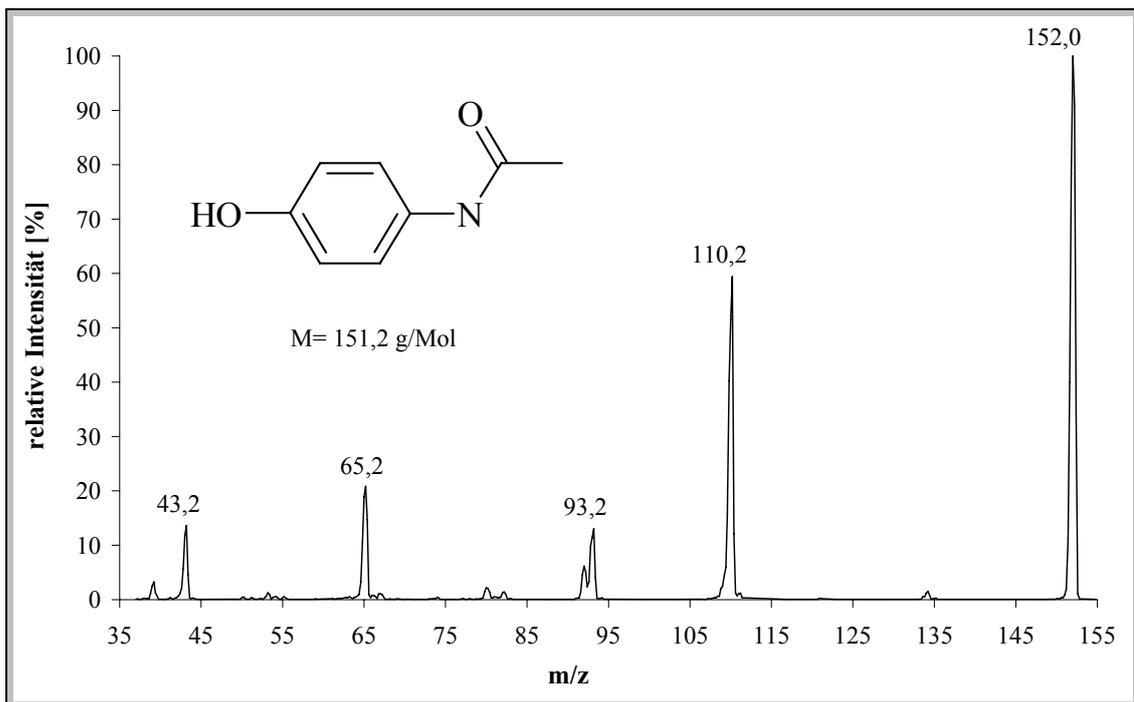


Abb. 20: Massenspektrum von Paracetamol aufgenommen mit positiver Ionisation

In Abb. 21 ist am Beispiel von Bezafibrat zu erkennen, dass Analyten mit mehreren funktionellen Gruppen in eine deutlich höhere Anzahl geladener Fragmente zerfallen als z. B. das Steroid Estron. Die Energie in der Kollisionszelle reicht nicht aus, um das Steroidgrundgerüst in eine ähnliche Anzahl geladener Fragmente zu zerschlagen. Dement-

sprechend hoch ist die Intensität des Molpeaks des Steroids ( $m/z$  269,0) im Vergleich zu den Fragmenten.

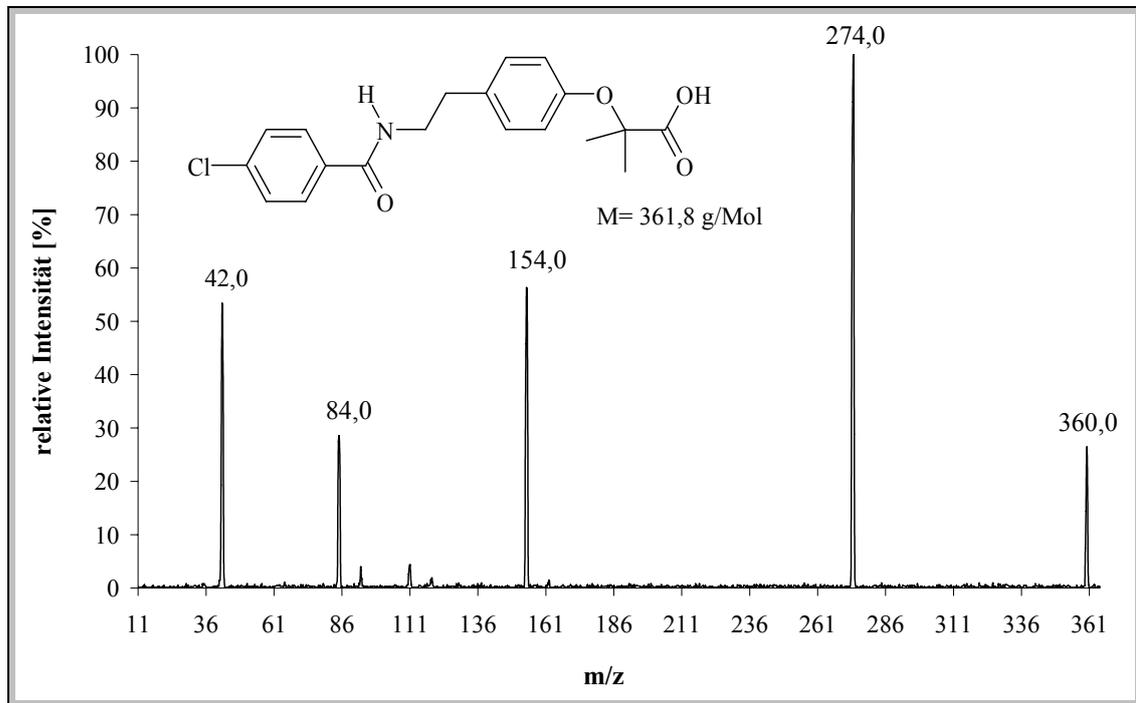


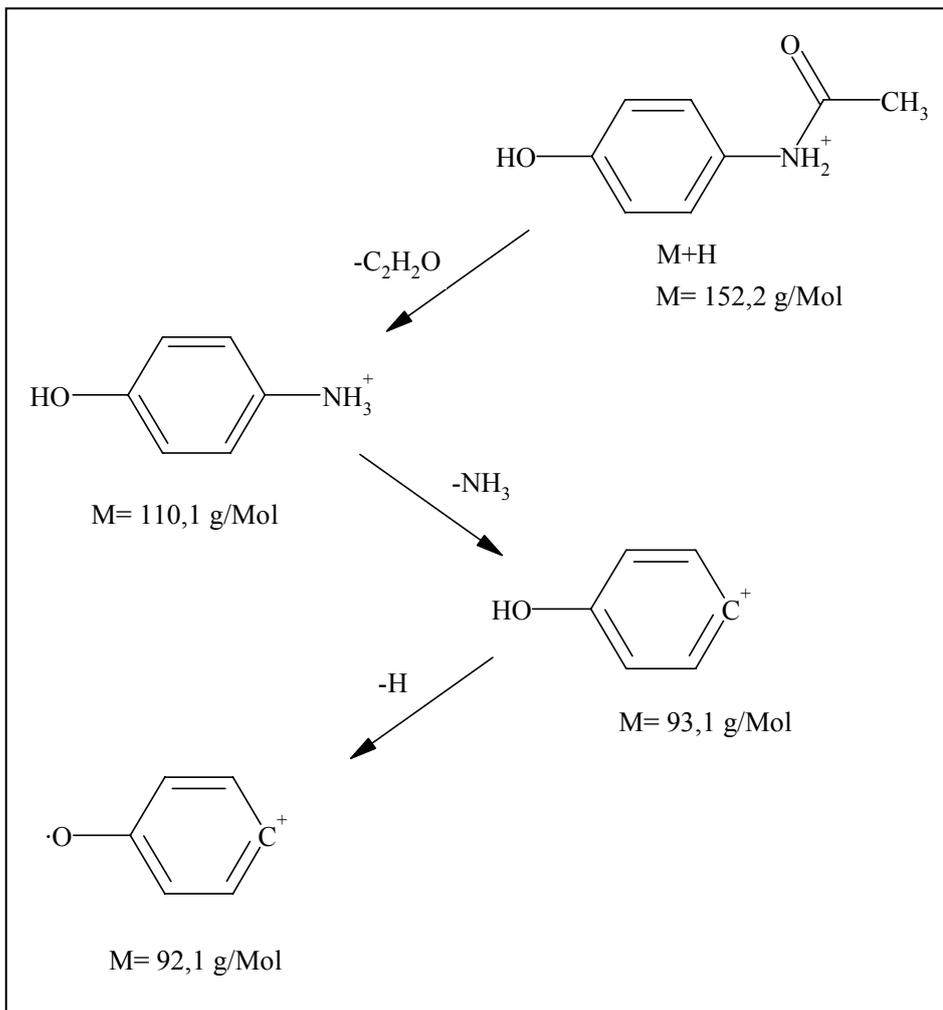
Abb. 21: Massenspektrum von Bezafibrat aufgenommen mit negativer Ionisation

Auf diese Weise wurden für alle Analyten die geeigneten Parameter (Spannungen im Verlauf des Ionenpfades) ermittelt und in einer gemeinsamen Multimethode zusammengefasst. Die Spektren weiterer Analyten sind in Anhang II aufgeführt.

#### 4.1.3 Ionisationsmodus

Die Ionenquellen der LC-MS/MS erlauben sowohl eine positive als auch eine negative Ionisation, wobei der geeignete Modus von der Struktur der Analyten und den Bedingungen abhängt. Bei der Elektrosprayionisation haben die schon in Lösung befindlichen Ionen eine deutlich größere Bedeutung, als bei den anderen Ionenquellen, weshalb hier der pH-Wert eine große Rolle spielt. Da es sich bei den meisten Analyten um organische Säuren handelt, lieferte erwartungsgemäß die negative Ionisation die höchsten Intensitäten, während bei positiver Ionisation unter den oben genannten Bedingungen keine Signale erhalten werden konnten. Die Struktur der Steroide weist neben dem relativ unpolaren Grundgerüst nur wenige ionisierbare funktionelle Gruppen auf. Die Ionisierbarkeit nimmt dabei von Estron über Estradiol bis hin zum Ethinylestradiol ab. Unab-

hängig davon konnte auch hier mit der negativen Ionisation deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden. Im Unterschied dazu ließ sich Paracetamol sowohl negativ als auch positiv ionisieren, wobei die positive Ionisation die höheren Intensitäten lieferte. Dies ist auf die, im Gegensatz zur Hydroxygruppe, leichter ionisierbare Aminogruppe zurückzuführen. Darüber hinaus ist Paracetamol mit einem pKs-Wert von 9,5 so schwach sauer, dass es auch im basischen Milieu protoniert vorliegt. Zusätzlich lassen sich sowohl die Hydroxygruppe als auch die Ketofunktion protonieren. Ein möglicher Fragmentierungsweg von Paracetamol bei positiver Ionisation ist in Abb. 22 dargestellt.



**Abb. 22: Mögliche Fragmentierung von Paracetamol bei positiver Ionisation mittels des MS-Fragmenters von ACD-Labs**

Bei der negativen Ionisation kommt es dagegen fast ausschließlich zur Spaltung der Amidbindung und damit nur zu einem Fragment. Für die Quantifizierung muss daher die positive Ionisation verwendet werden.

#### 4.1.4 Quellenvergleich

Wie bereits in Kapitel 2.2.2.2 (Seite 23) dargestellt, ist es mit dem API 2000 möglich, drei verschiedene Ionenquellen einzusetzen. Die Elektrosprayionisation (ESI) wird im Allgemeinen für sehr polare und leicht zu ionisierende Verbindungen, die Chemische Ionisation (APCI) für polare bis mittelpolare Stoffe sowie die Photoionisation (APPI) für unpolare Analyten eingesetzt. Analog zu anderen Veröffentlichungen konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass diese Einteilung nicht für alle Stoffe uneingeschränkt übernommen werden kann. Darüber hinaus schwankt die Empfindlichkeit für bestimmte Analyten in Abhängigkeit vom jeweiligen Gerät.

Für den Vergleich der Quellen wurden jeweils die Position der Kapillare und das Methanol-Wasser-Verhältnis des Eluenten optimiert. Die MS/MS-Parameter wurden aus der zuvor entwickelten Methode entnommen. Auf Grund der unterschiedlichen Ionisationsprinzipien mussten die Quellenparameter für jede Ionenquelle ermittelt werden. Diese sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

**Tabelle 8: Parameter beim Vergleich der Ionenquellen**

Parameter	ESI	APCI	APPI
Spannung [V]	-4500	-3	-1650
Temperatur [°C]	350	420	500
Gas 1 [kPa]	345	414	414
Gas 2 [kPa]	448	345	345
Dopant/Modifier	-	Ammoniumformiat	Toluol (20 µL/min)
Eluent	ammoniakalisches Methanol	ammoniakalisches Methanol	ammoniakalisches Methanol
Flussrate [mL/min]	0,2	0,4	0,2

Erwartungsgemäß zeigten die organischen Säuren mit der ESI die höchsten Intensitäten, während diese bei den anderen Ionisationsarten bis zu 90 % geringer ausfielen. Es konnte demnach bestätigt werden, dass die ESI für leicht ionisierbare polare Verbindungen in Bezug auf die Intensität die besten Ergebnisse liefert. Entgegen verschiedener Literaturangaben wurden mit der ESI auch bei den Steroiden die höchsten Intensitäten erreicht. Obwohl dies der in Kapitel 2.2.2.2 (Seite 23) dargestellten Polaritätseinteilung der Ionenquellen widerspricht, wurde diese Tatsache im Rahmen verschiedener Fach-

vorträge bestätigt. Abweichend von den anderen Analyten konnte bei Paracetamol mit der APPI die höchsten Intensitäten erzielt werden, während die Signale bei der ESI um 20 % niedriger waren. Auch dieses Ergebnis zeigt, dass einerseits noch nicht alle bei der Ionisation ablaufenden Prozesse aufgeklärt sind und andererseits das Polaritätsmodell nur als sehr allgemeine Orientierungshilfe verwendet werden kann. Zusammenfassend konnten mit der ESI, mit Ausnahme von Paracetamol, die höchsten Intensitäten erreicht werden, während die APCI immer die geringsten Signale lieferte. Da die APPI nicht dauerhaft zur Verfügung stand, erfolgte die Methodenentwicklung auf Basis der ESI.

#### 4.1.5 Massenspektrometriemethode

In Tabelle 9 sind die MS/MS-Parameter der optimierten MS-Methode dargestellt. Weitere Parameter befinden sich im Anhang III.

**Tabelle 9: MS/MS-Einstellungen der optimierten Methode**

Parameter Analyt	Produkt- Ion [m/z]	Fragment- Ion 1 [m/z]	Fragment- Ion 2 [m/z]	Declustering Potential [V]	Collision Energie [V]	
					1	2
Bezafibrat	360,2	154,0	274,0	-20	-37	-21
Chloramphenicol- <sup>37</sup> Cl <sub>2</sub>	325,1	152,0	259,0	-11	-22	-14
Diclofenac	294,2	249,9	214,0	-10	-15	-26
Estradiol	271,0	145,0	183,0	-55	-50	-50
Estron	269,0	145,0	143,0	-31	-50	-69
Ethinylestradiol	295,0	145,0	143,0	-30	-51	-72
Fenoprofen	241,0	93,0	197,0	-10	-50	-10
Gemfibrozil	249,0	121,0	127,0	-4	-18	-14
Ibuprofen	205,0	159,0	161,0	-10	-8	-8
Naproxen	229,0	170,0	169,0	-5	-19	-34

## 4.2 *Entwicklung der HPLC-Methode*

### 4.2.1 **Vorversuche**

Obwohl das in der HPLC verwendete Lösungsmittel keinen erkennbaren Einfluss auf die Fragmentierung der Analyten hat, spielt es bei der Ionisation eine entscheidende Rolle. Bei sehr hohen Anteilen unpolarer Lösungsmittel wie Acetonitril sind im Elektrospray zu wenige Ladungsträger vorhanden, wodurch die Ionisation der Analyten verringert wird, was somit zu Lasten der Empfindlichkeit geht. Zu große Mengen an Wasser als polarem und schwer flüchtigem Lösungsmittel führen dagegen zu einem instabilen Spray, was zu deutlichen Intensitätsschwankungen führt. Weiterhin begünstigen Zusätze zum Lösungsmittel die Ionisation zusätzlich, da sie den Protonierungsgrad der Analyten beeinflussen. So werden Ameisen- oder Essigsäure häufig bei positiver Ionisation und Ammoniak oder Triethylamin bei negativer Ionisation eingesetzt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Vorgaben trotz ihrer weiten Verbreitung sehr stark von den jeweiligen Bedingungen und den untersuchten Analyten abhängig sind und eine Verallgemeinerung nicht ohne weiteres möglich ist.

Im Folgenden wird hauptsächlich auf die Entwicklung der Methode mit negativer Ionisation eingegangen, da die Entwicklung der Methode mit positiver Ionisation im Rahmen einer Diplomarbeit erfolgte [38]. Zuerst wurde überprüft, welchen Einfluss die unterschiedliche Zusammensetzung des HPLC-Eluenten auf die Intensität der erhaltenen Signale hat. Die in der Literatur am häufigsten verwendeten Lösungsmittel im Zusammenhang mit der MS sind Acetonitril, Methanol und Wasser. Da viele in der Routine eingesetzte HPLC-Methoden mit UV- oder Fluoreszenzdetektoren entwickelt wurden, nimmt Acetonitril in der Flüssigchromatographie noch immer eine dominierende Rolle ein, da es im Vergleich zu Methanol häufig eine bessere Trennung und schärfere Peaks mit sich bringt. Ein Großteil der speziell für die LC/MS entwickelten Methoden verwendet dagegen Methanol. Zu Beginn wurden daher diese Lösungsmittel in Bezug auf die resultierenden Intensitäten untersucht. Dafür kam die in Kapitel 4.1 erstellte MS-Methode zum Einsatz, wobei jeweils für Acetonitril und Methanol die Quellenparameter (Temperatur, Gas 1/2) auf ein maximales Signal für Bezafibrat eingestellt wurden. In Abb. 23 ist die Abhängigkeit der Intensität des Analytsignals vom Verhältnis Acetonitril/Wasser und in Abb. 24 vom Verhältnis Methanol/Wasser dargestellt. Um der Übersichtlichkeit der Darstellungen gerecht zu werden, wurde jeweils nur eine Auswahl repräsentativer Analyten aufgeführt. Auf Grund der unterschiedlichen Intensitäten ent-

spricht das jeweils höchste Signal eines Analyten dem Wert 100, während die anderen Signale darauf bezogen wurden.

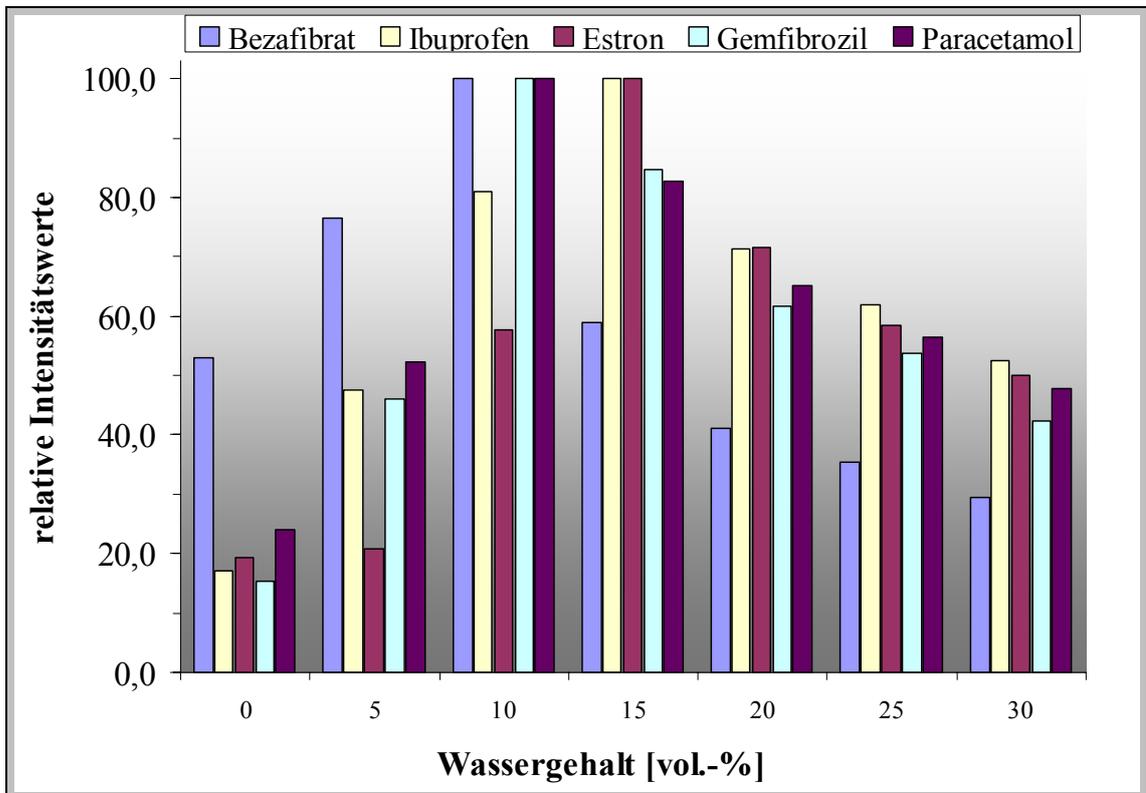


Abb. 23: Abhängigkeit der Intensität vom Wassergehalt in Acetonitril

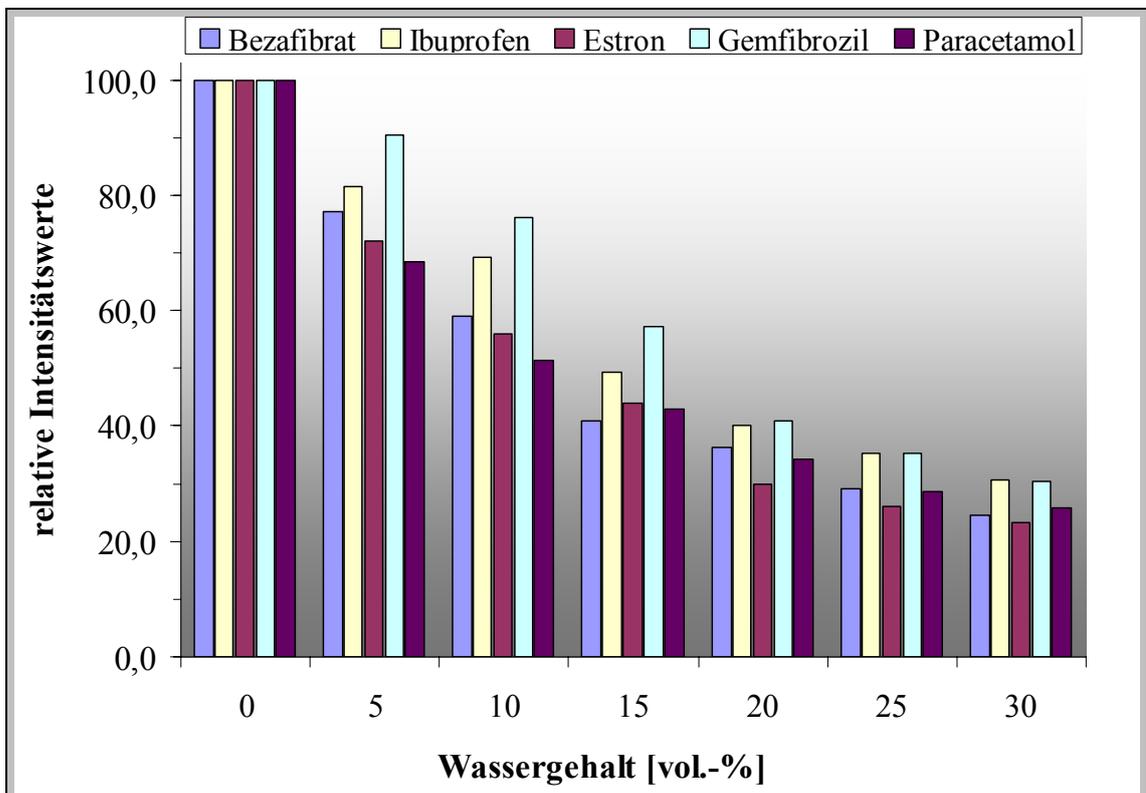


Abb. 24: Abhängigkeit der Intensität vom Wassergehalt in Methanol

Auf Grund der geringen Polarität von Acetonitril fallen die Intensitäten bei geringen Wassergehalten erwartungsgemäß sehr stark ab. In Abhängigkeit von der Struktur und der Ionisierbarkeit der Substanzen liegen die Optima zwischen 10 und 15 % Wasser in Acetonitril. Methanol weist im Vergleich zu Acetonitril eine deutlich höhere Polarität auf, so dass alle Analyten ihre maximale Intensität schon bei Wassergehalten unter 5 % erreichen. Da Paracetamol sowohl negativ als auch positiv gut ionisierbar ist, wurde an dieser Stelle untersucht, ob sich bei unterschiedlicher Ionisation eine andere Abhängigkeit von der Laufmittelzusammensetzung ergibt. Das Ergebnis ist in Abb. 25 dargestellt. Gleiche Höhen bedeuten auch in diesem Fall nicht zwangsläufig identische Intensitäten, da die Werte auf das Maximum normiert und beide Ionisationsarten getrennt betrachtet wurden. Absolut werden mit der positiven Ionisation deutlich höhere Intensitäten erreicht.

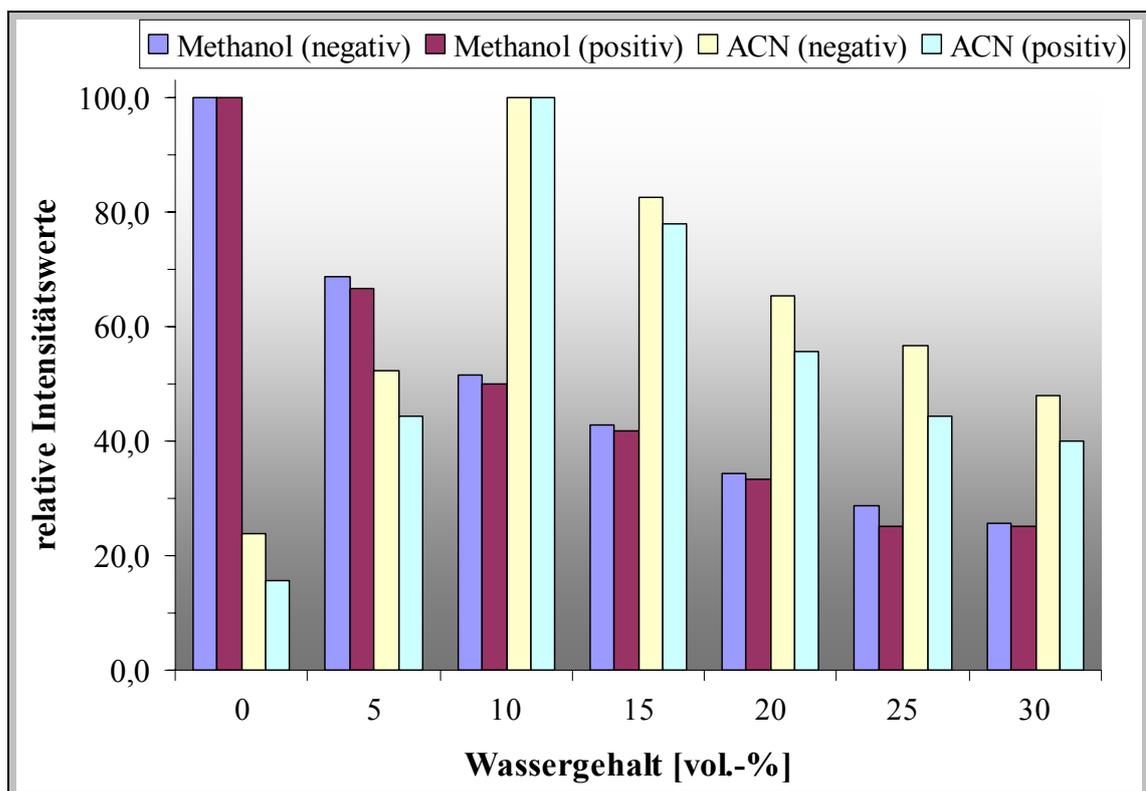


Abb. 25: Abhängigkeit der Intensität des Paracetamolsignals vom Wassergehalt bei negativer und positiver Ionisation (ACN: Acetonitril)

Variiert man den Wassergehalt und lässt alle anderen Parameter konstant, wird die Ionisation in erster Linie von der Anzahl der Ladungsträger und der Stabilität des Sprays beeinflusst. Das Ergebnis zeigt, dass die Abhängigkeit von Wasser bei beiden Ionisationsmodi identisch ist. Dementsprechend können die optimierten Bedingungen für die

negative Ionisation von Paracetamol perspektivisch auf die positive Ionisation übertragen werden, da diese bessere Intensitäten liefert.

Der letzte Vorversuch sollte den Einfluss des pH-Wertes auf die Signalintensität verdeutlichen. Da die Analyten bei der Elektrosprayionisation schon in geladener Form vorliegen müssen [10], sind für saure Verbindungen die höchsten Intensitäten im basischen Milieu zu erwarten, bei basischen Verbindungen dementsprechend im sauren. Die untersuchten Steroide zeigen auf Grund ihrer Struktur weder ein ausgeprägtes saures noch basisches Verhalten, weshalb kein bedeutender Einfluss des pH-Wertes auf die Intensität zu erwarten ist. Im folgenden Versuch wurden die Analyten (0,5 – 2 mg/L) mittels T-Stück bei 10 µL in den Eluentenfluss (200 µL/min; Acetonitril/Puffer (Ammoniumformiat)) infundiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 26 dargestellt.

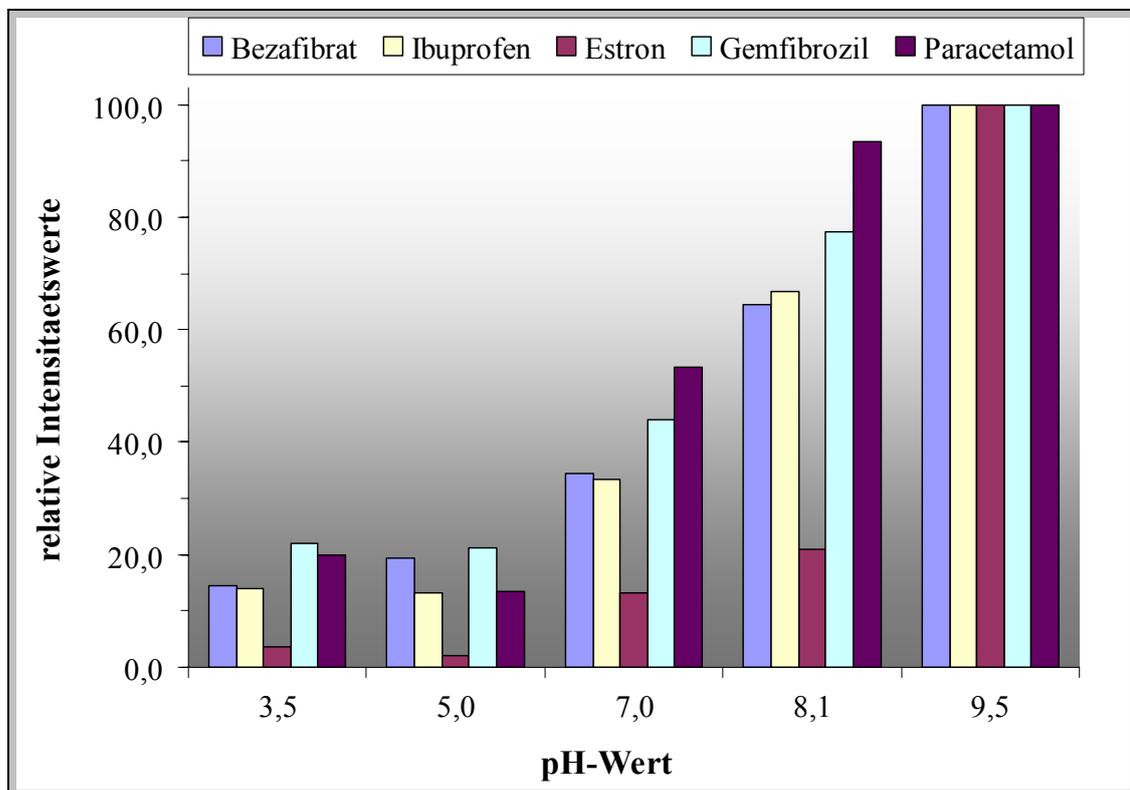


Abb. 26: Abhängigkeit der Intensität vom pH-Wert

Erwartungsgemäß erhöhte sich die Intensität für die sauren Analyten mit steigendem pH-Wert deutlich. Ein signifikanter Unterschied ergab sich jedoch bei den Steroiden. So waren diese bei pH-Werten unter 7 bei den verwendeten Konzentrationen praktisch nicht mehr nachzuweisen, so dass im weiteren Verlauf der Versuche vor Erreichen der Ionenquelle ein pH-Wert über 7 eingestellt werden musste.

### 4.2.2 Chromatographische Trennung

Nach dem grundsätzlichen Verhalten der Analyten in Bezug auf die Lösungsmittelzusammensetzung und den pH-Wert wurden die Trennleistung und die daraus resultierenden Intensitäten der zur Verfügung stehenden HPLC-Säulen Reprosil-Pur C18-AQ (C18AQ), Reprosil-Pur C18-ODS3 (C18ODS), Reprosil-Pur C4 (RPC4), Reprosil-Pur NH<sub>2</sub> (RPNH<sub>2</sub>) sowie Lichrospher 60 RP SelectB (SelectB) untersucht. Die in Abb. 27 dargestellten Chromatogramme wurden bei den pH-Werten 3 und 8 sowie mittels reinen Methanols aufgenommen. Die pH-Wert-Einstellung erfolgte mit Ammoniak und Ameisensäure.

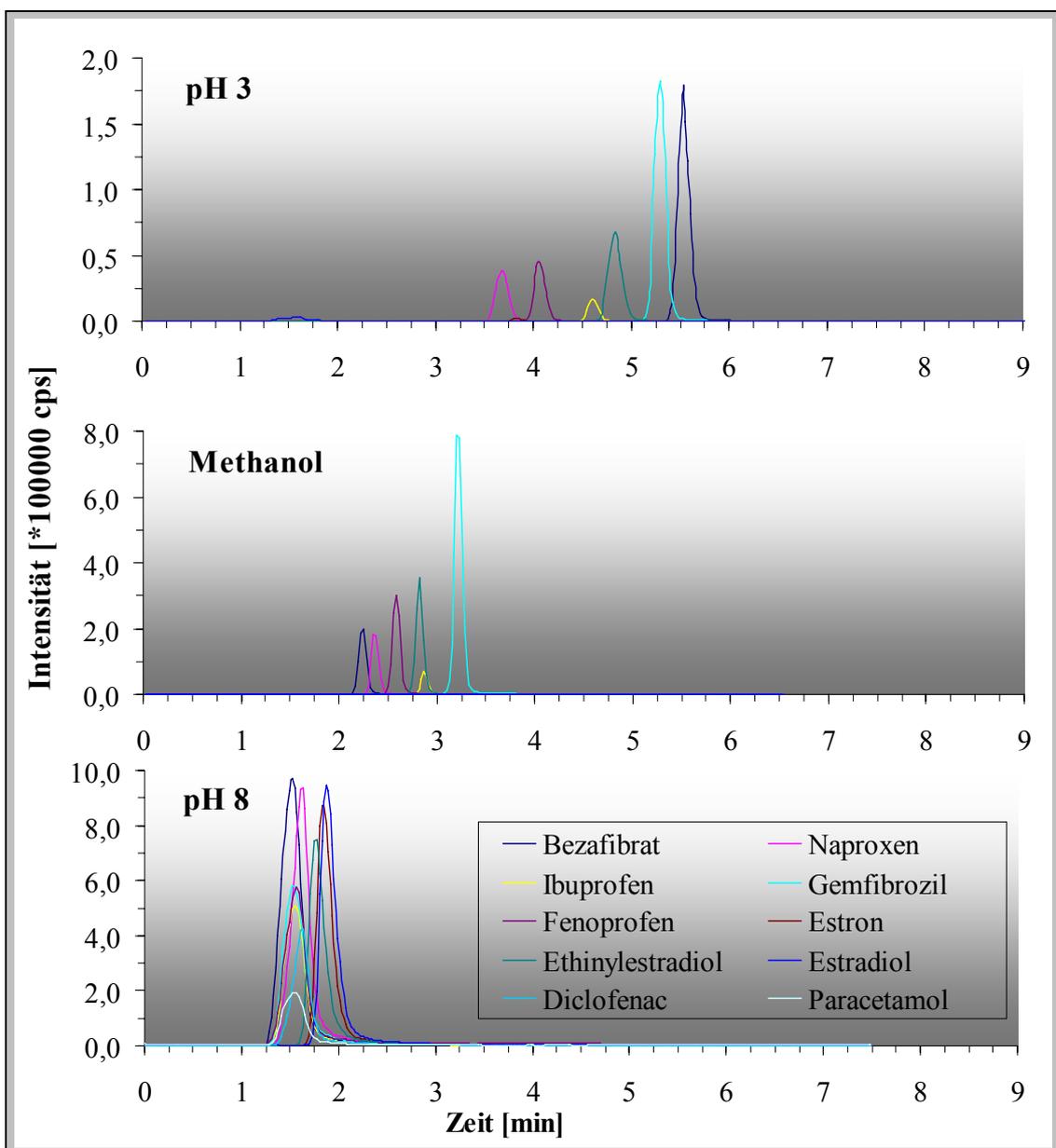


Abb. 27: Chromatogramme eines Mischstandards bei pH 3 und 8 sowie reinem Methanol

Die Chromatogramme wurden mit einem Mischstandard (Analytkonzentration 2 bis 3 mg/L in Methanol) bei einer Flussrate von 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 20 °C Säulenofentemperatur, der Trennsäule C18AQ und den optimierten Massenspektrometrieparametern aus Kapitel 4.1.5 aufgenommen. Wie anhand der Chromatogramme zu erkennen ist, war es nicht möglich, für die Steroide bei pH-Werten unter 7 auswertbare Signale zu erhalten. Auch die Intensitäten der anderen Analyten verringerten sich bei kleineren pH-Werten deutlich. Dem gegenüber konnten bei pH 8 auch bei den Steroiden hohe Intensitäten erzielt werden, jedoch verschlechterte sich die Retention signifikant. Daraus resultierte die weitere Überlegung, wie sich eine ausreichende Retention bei optimaler Intensität der Signale erreichen lässt. Da eine ausreichende Trennleistung der HPLC-Säulen nur im sauren Milieu möglich ist, ergab sich die Notwendigkeit den pH-Wert *post column* zu erhöhen. Dafür wurden über ein T-Stück verschiedene Basen infundiert. Zum Einsatz kamen Ammoniak, Triethylamin und Diethanolamin. Um das Eluentenvolumen auf Grund von Verdünnungseffekten nicht unnötig zu vergrößern wurden die reinen Substanzen bzw. konzentrierte Ammoniaklösung eingesetzt. Da es sich beim verwendeten Eluenten um ein Puffersystem (Ammoniumformiat, pH 3) handelt, musste die notwendige Infusionsgeschwindigkeit der Spritzenpumpe für den jeweiligen Zusatz ermittelt werden. Im Vergleich mit der verwendeten Ameisensäure ( $\text{pK}_s = 3,7$ ) handelt es sich bei Ammoniak ( $\text{pK}_b = 4,8$ ) und Diethanolamin ( $\text{pK}_b = 5,1$ ) um schwache Basen bzw. im Fall von Triethylamin ( $\text{pK}_b = 3,3$ ) um eine geringfügig stärkere Base. Dementsprechend sind Infusionsgeschwindigkeiten von bis zu 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  notwendig, um einen pH-Wert von 8 zu erhalten. Stärkere anorganische Basen können nicht eingesetzt werden, da sie zur Kristallisation an der Edelstahlkapillare führen. Geeignete Substanzen müssen ohne Salzbildung verdampfbar und möglichst ohne suppressiven Einfluss auf die Ionisation sein. Tatsächlich konkurrieren auch die Zusätze um die im Elektrospray vorhandenen Ladungsträger, so dass eine Erhöhung der Infusionsgeschwindigkeit ab einer bestimmten Konzentration zu einer Verschlechterung der Intensität führt. Die Empfindlichkeit bei Verwendung eines basischen Eluenten konnte mit dieser Technik nicht erreicht werden. Die Suppressionseffekte bei Erhöhung der Basenkonzentration sollen in Abb. 28 am Beispiel der Ammoniakkonzentration verdeutlicht werden. Für die Messung wurde ein Mischstandard (0,5 bis 1 mg/L in Methanol) mit 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  mittels T-Stück in den Eluent (Acetonitril/Ammoniumformiatpuffer pH 9 85:15 bei 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) infundiert. Um möglichst hohe Intensitäten zu erhalten wurde der pH-Wert 9 beibehalten und die Pufferkonzentration schrittweise erhöht.

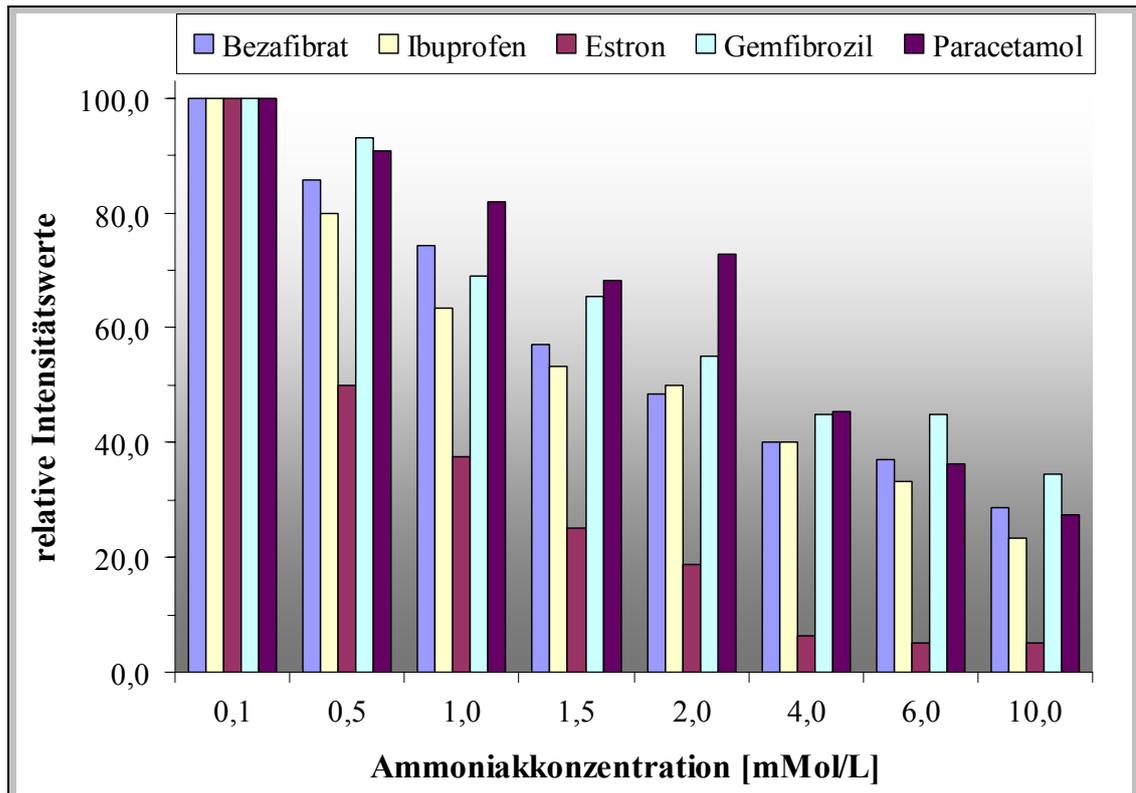


Abb. 28: Einfluss der Ammoniakkonzentration auf die Intensität

In Abb. 28 ist zu erkennen, dass höhere Basenkonzentrationen schnell zu einer Intensitätsabnahme führen. Insgesamt zeigen diese Versuche, dass durch Infusion der ausgewählten Basen keine ausreichende Erhöhung des pH-Wertes ohne Verringerung der Intensität zu erzielen ist.

Von anderen Arbeitsgruppen wurde auch das Splitten des Eluenten *post column* und die Verringerung der Pufferkonzentration durch Verdünnung untersucht. Parallel dazu sollte eine Erhöhung des pH-Wertes durch Basenzusatz erreicht werden. Jedoch resultiert aus dem Verdünnungseffekt eine Intensitätsverschlechterung, so dass mit einem API 2000 die erwünschte Bestimmungsgrenze anschließend nicht mehr oder nur mit erhöhtem Aufwand (zum Beispiel höhere Anreicherung) zu erzielen ist. Weiterhin wurde der Zusatz oberflächenaktiver Substanzen diskutiert. Im Allgemeinen versucht man die Kontamination der Geräte mit solchen Stoffen zu vermeiden, so dass Versuche in diese Richtung durchaus mit Risiken verbunden sind.

Da die *post column* Infusion keine zufrieden stellenden Ergebnisse lieferte, wird im Folgenden im alkalischen Milieu gearbeitet, auch wenn dies zu Lasten der Trennung der Analyten geht. Unter Verwendung eines Massenspektrometers und der erwarteten Konzentrationen spielt die Trennung der Analyten auf Grund der diskreten Massenspuren nur eine untergeordnete Rolle. Die Co-Elution ist sogar vorteilhaft, wenn nicht für jeden

Analyten ein eigener interner Standard zur Verfügung steht. Als problematisch kann sich jedoch die unvollständige Abtrennung von Matrixbestandteilen erweisen.

### 4.2.3 Optimierung der Intensität

Beim Vergleich von Acetonitril und Methanol konnte unter den bis dahin jeweils optimalen Bedingungen mit Methanol für fast alle Analyten die besseren Intensitäten erzielt werden. Darüber hinaus waren die Schwankungen der Signale unter den Analyten deutlich geringer, so dass bei der Verwendung von Methanol als Kompromisslösung bei keinem der Analyten ein deutlich schlechteres Ergebnis resultierte. Aus diesen Gründen wurde bei den weiteren Versuchen Methanol als Referenzlaufmittel eingesetzt. Insofern nichts anderes angegeben ist, wurde mit einem Standardmix von 0,5 bis 1 mg/L, mit den in Kapitel 4.1.5 dargestellten MS-Parametern und einer Flussrate von 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  gearbeitet. Neben der Veränderung des pH-Wertes bietet der Zusatz von Modifiern die Möglichkeit, die Intensitäten zu beeinflussen. Ursachen dafür sind die Veränderung des Dampfdruckes des Lösungsmittels und damit der Einfluss auf die Verdampfung in der Ionenquelle, die Veränderung der Ladungsverteilung auf der Tröpfchenoberfläche oder die Bindung von Matrixmolekülen. In Abb. 29 ist der Einfluss einiger Lösungsmittel auf die Signalintensität dargestellt.

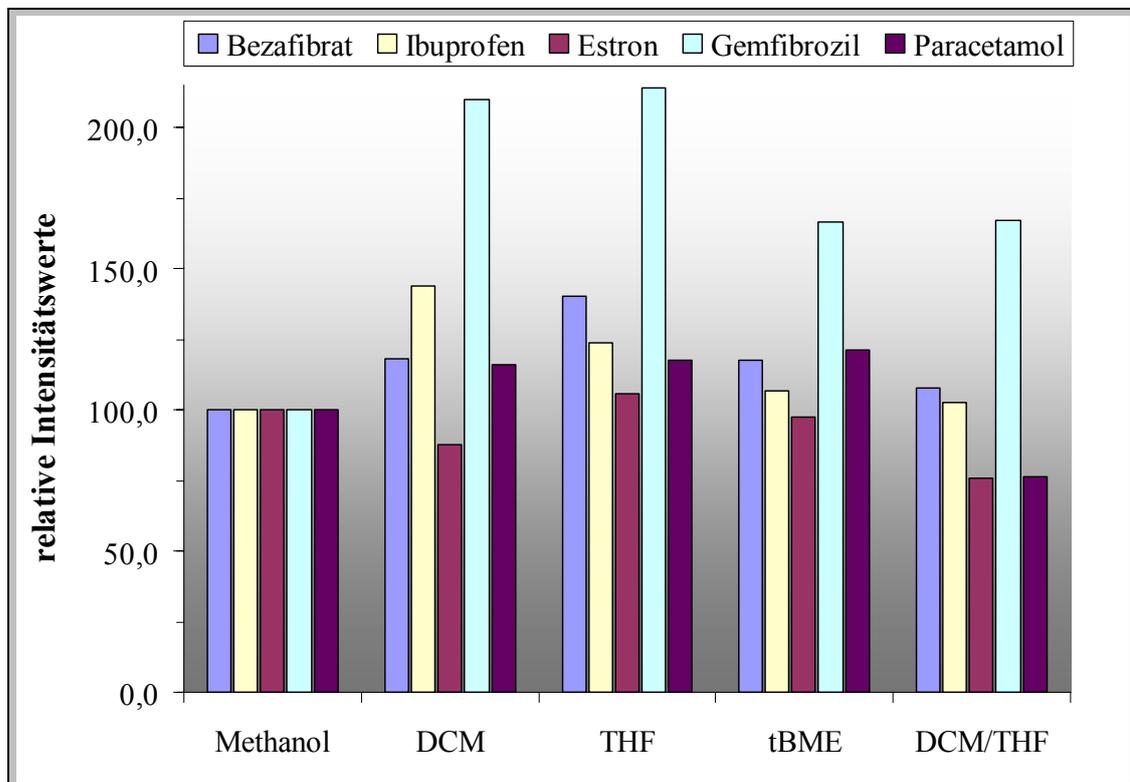


Abb. 29: Einfluss von Lösungsmittelzusätzen (1 %) zum Eluenten im Vergleich zu reinem Methanol (DCM: Dichlormethan; THF: Tetrahydrofuran; tBME: tert-Butylmethylether)

Durch den Zusatz von Modifiern konnten die Intensitäten mit Ausnahme der Steroide gesteigert werden. Wie jedoch schon an der Kombination von Dichlormethan mit Tetrahydrofuran zu erkennen ist, sind die Intensitätssteigerungen nicht kumulativ. Darüber hinaus konnten diese hohen Intensitäten nicht bei allen Bedingungen reproduziert werden. Vor allem bei längeren Standzeiten der Eluenten kam es zu einem deutlichen Intensitätsabfall. Da dies aber im Rahmen von umfangreichen Messserien nicht zu vermeiden ist, wurde auf den Zusatz dieser Modifier verzichtet. Allerdings besteht hier die Möglichkeit, die Bestimmungsgrenze der Methode weiter zu verringern. Die Retention der Analyten konnte im Rahmen der zugesetzten Modifizermengen nicht verbessert werden. Neben der Zusammensetzung des Eluenten haben auch die Fließgeschwindigkeit und die Ionenquellentemperatur einen Einfluss auf die Intensitäten. Die Temperatur der Ionenquelle ist im Unterschied zu den stoffabhängigen Spannungen im Verlauf des Ionenpfades in erster Linie vom Laufmittel und damit auch von der Fließgeschwindigkeit abhängig. Daher sollen diese Parameter im Zusammenhang betrachtet werden.

In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der Fließgeschwindigkeit eine Verringerung der Signalsuppression zur Folge hat [45]. Bei sehr kleinen Volumenströmen (etwa 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) zeigen Massenspektrometer ein masseabhängiges Verhalten [46], während bei größeren Volumenströmen (über 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) ein konzentrationsabhängiges Verhalten auftritt [47]. Dies ist damit zu erklären, dass bei sehr kleinen Volumenströmen die Ionisation nicht den restriktiven Faktor darstellt und somit praktisch alle Analytmoleküle ionisiert werden. Daher steigt das Signal mit zunehmendem Volumenstrom an. Bei höheren Volumenströmen erhöht sich einerseits die Zufuhr von Lösungsmittel- und Matrixkomponenten und andererseits der Radius der im Elektrospray gebildeten Tröpfchen. Letzteres führt naturgemäß zu einem kleineren Oberfläche-Volumen-Verhältnis. Daher steht für den Kontakt der Ladungsträger mit der Oberfläche weniger Platz zur Verfügung. Beide Aspekte zusammen führen zu einem Mangel an Ladungsträgern, wodurch weniger gut zu ionisierende Verbindungen gegenüber leicht zu ionisierenden diskriminiert werden. Zusätzlich führt die Vergrößerung der Tröpfchen zu einer Verlangsamung der Verdampfung, was allerdings durch eine Erhöhung der Quelltemperatur ausgeglichen werden kann. Dies zieht allerdings auch nach sich, dass höher siedende wässrige Eluenten deutlich höhere Temperaturen benötigen als Lösungsmittel wie Methanol. Zu hohe Temperaturen können allerdings auch zur thermischen Zersetzung labiler Analyten führen. In Abb. 30 und Abb. 31 ist der Einfluss der Flussrate und der Quelltemperatur auf die Signalintensität dargestellt.

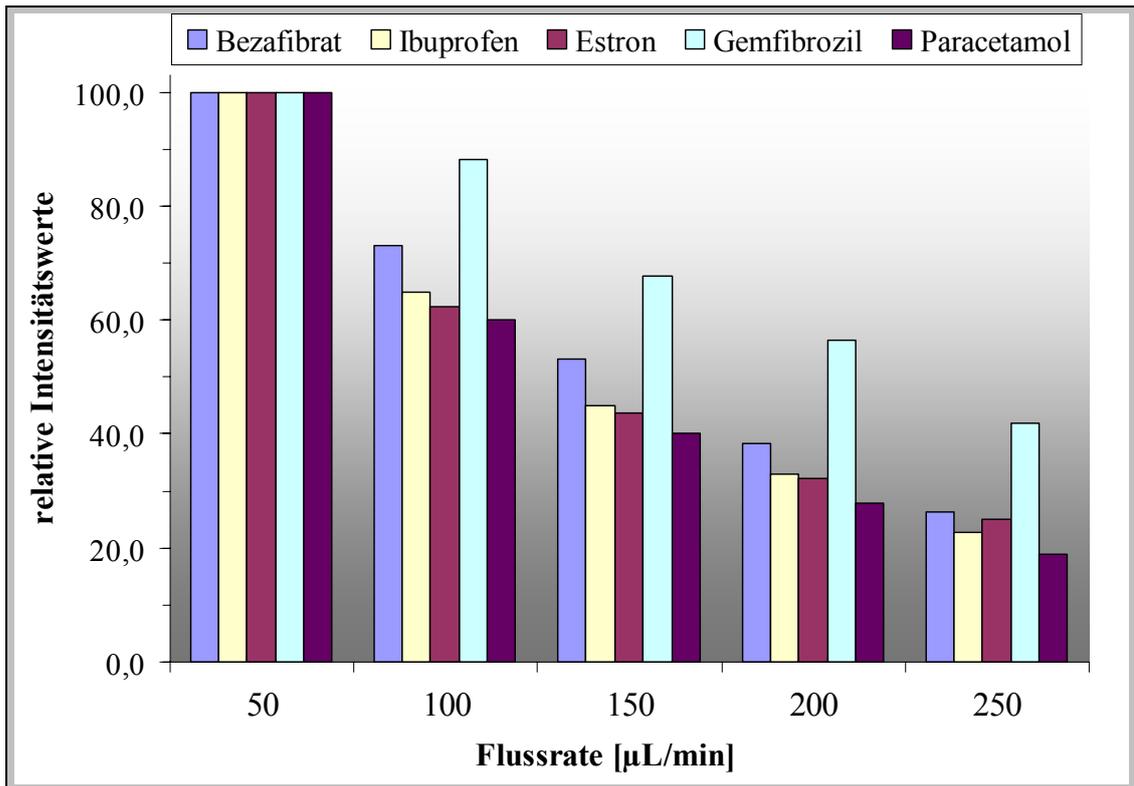


Abb. 30: Einfluss der Flussrate auf die Intensität bei einer Quelltemperatur von 400 °C

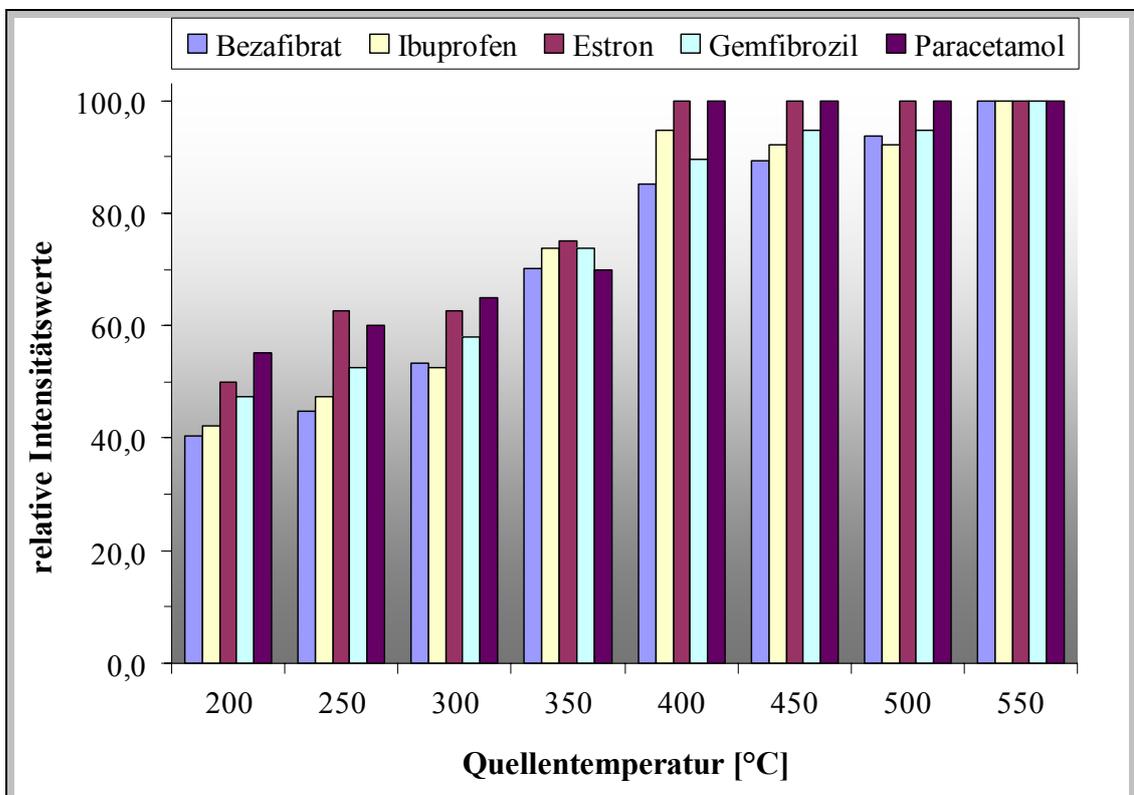


Abb. 31: Einfluss der Quelltemperatur auf die Intensität bei einer Flussrate von 100  $\mu\text{L}/\text{min}$

Wie in Abb. 30 verdeutlicht wird, zeigt die Elektrosprayionquelle für die untersuchten Analyten eine sehr starke Volumenstromabhängigkeit. Die zuvor diskutierten Einflüsse gewinnen mit zunehmender Flussrate an Bedeutung und führen somit zu einer Verringerung der Intensität. Andererseits hat eine Flussrate von 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  eine starke Peakverbreiterung zur Folge. Dementsprechend stellte eine Flussrate von 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  einen akzeptablen Kompromiss dar. In der Literatur wurde der Ionenquelle bei analytischen Untersuchungen an vergleichbarer Matrix bei negativer Ionisation 90  $\mu\text{L}/\text{min}$  zugeführt [46].

Die Abb. 31 zeigt, dass die Intensität bei einer Quellentemperatur von 400 bis 450  $^{\circ}\text{C}$  ein Plateau erreicht. Prinzipiell ist bei den Stoffen Gemfibrozil und Ibuprofen auch bei Temperaturen von 500 und 550  $^{\circ}\text{C}$  eine Steigerung zu erkennen, allerdings ist das Spray instabil, was sich durch hohe Störpeaks bemerkbar macht. Um die thermische Belastung gering zu halten und ein stabiles Spray zu gewährleisten, wurde eine Quellentemperatur von 400  $^{\circ}\text{C}$  als Kompromisslösung gewählt.

Ein weiterer Parameter, wenn auch mit geringerem Einfluss, ist die Temperatur der Trennsäule. Es lassen sich keine allgemein gültigen Regeln für die Beeinflussung der Trennleistung durch die Temperatur aufstellen, jedoch ist sowohl eine Verbesserung als auch eine Verschlechterung möglich [48]. Eine Erhöhung der Temperatur kann mit Problemen verbunden sein, da viele Gleichgewichte temperaturabhängig sind. Weiterhin steigt der Dampfdruck des Eluenten und es kann zu Blasen im System kommen, die sowohl die Trennleistung als auch die Stabilität des Elektrosprays beeinflussen. Bei den Untersuchungen konnte bei den meisten Analyten im Bereich von 10 bis 25  $^{\circ}\text{C}$  eine Steigerung von 5 bis 10 % und im Bereich von 30 bis 50  $^{\circ}\text{C}$  noch einmal von 5 bis 10 % erreicht werden. Diese Verbesserung der Intensität ist nicht direkt auf die Temperaturerhöhung, sondern auf darauf basierende Wechselwirkungen zurück zu führen. So sind die meisten Ionengleichgewichte in chromatographischen Systemen temperaturabhängig [48]. Der beschleunigte Stoffaustausch zwischen der stationären und der mobilen Phase führt auf Grund der Viskositätserniedrigung zur Vergrößerung der Peakhöhe. Damit ist in der HPLC mit UV- oder Fluoreszenzdetektion eine Erhöhung der Empfindlichkeit, verbunden mit einer Senkung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze, zu erzielen. Eine Temperaturerhöhung führte bei dem verwendeten Versuchsaufbau zu einer weiteren Verschlechterung der Trennung und der Retention, so dass die Temperierung der Säule auf 20  $^{\circ}\text{C}$  beibehalten wurde.

#### 4.2.4 Optimierte HPLC-Methode

Für die optimierte HPLC-Methode wurden folgende Parameter ermittelt:

Vorsäule:	Reposil-Pur C18-AQ 10x2 mm
Säule:	Reposil-Pur C18-AQ 100x2 mm
Säulentemperatur:	20 °C
Autosamplertemperatur:	20 °C
Eluent:	Methanol/ammoniakalisches Methanol 50:3
Flussrate:	100 µL/min
Lauflänge:	10 min

#### Quellenparameter

Quellentemperatur:	400 °C
Gas 1:	345 kPa
Gas 2:	448 kPa

### 4.3 Entwicklung der Festphasenextraktionsmethode

Die Festphasenextraktion (SPE) stellt eine kostengünstige und zeitsparende Methode zur Probenvorbereitung dar und wird zur Anreicherung von Analyten beim gleichzeitigen Entfernen von störenden Begleitstoffen (Matrix) eingesetzt. Dabei wird zwischen zwei Grundprinzipien unterschieden: Der Sorption der Analyten an der Festphase und der Sorption der Matrix an der Festphase. Allerdings ist nur mit der zuerst genannten Methode eine direkte Anreicherung der Analyten möglich. Für die in dieser Arbeit entwickelten Messmethode soll diese Art der Probenvorbereitung vor allem zur Abtrennung der Matrix genutzt und auf Grund der zu erwartenden geringen Konzentrationen eine Anreicherung der Analyten erzielt werden. Das größte Problem ist die strukturelle Vielfalt der Analyten, angefangen von kationischen Gruppen über unpolare Abschnitte bis hin zu anionischen Substituenten. Es musste somit ein möglichst universell einsetzbares Festphasenmaterial gefunden werden. Zum Einsatz kamen C18-Materialien mit polarem und unpolarem *endcapping* sowie auf Polymeren basierende Festphasen. In Tabelle 10 sind die eingesetzten Festphasen, ihre Materialien und die daraus resultierende Polarität dargestellt.

**Tabelle 10: Eingesetzte Festphasenmaterialien und die Polarität**

Name	Material und Polarität
Chromabond C18	C18 ohne <i>endcapping</i> , unpolar
Chromabond EASY	Polystyrol-Divinylbenzol-Polymer, unpolar und polar
Chromabond HR-P	Polystyrol-Divinylbenzol-Polymer, unpolar
Chromabond C18ec	C18 mit <i>endcapping</i> , unpolar
Focus	Polystyrol-Divinylbenzol-Polymer, unpolar und polar
Strata-X	Polystyrol-Divinylbenzol-Polymer, unpolar bis mittelpolar
Strata C18-U	C18 ohne <i>endcapping</i> , unpolar
Strata C18-T	C18 mit <i>endcapping</i> , unpolar
Strata C18-M	C18 ohne <i>endcapping</i> , unpolar
Strata C18-E	C18 mit <i>endcapping</i> , unpolar
Oasis HLB	m-Divinylbenzol & N-Vinylpyrrolidon Copolymer, unpolar bis mittelpolar
Oasis MAX	Mixed Mode Anionenaustauscher, polare und unpolare Anteile
Oasis MCX	Mixed Mode Kationenaustauscher, polare und unpolare Anteile
Oasis WAX	Mixed Mode Anionenaustauscher (schwach) , polare und unpolare Anteile
Oasis WCX	Mixed Mode Kationenaustauscher (schwach) , polare und unpolare Anteile

### 4.3.1 Adsorption an Kunststoffen

Da Kolbenhubpipetten mit Einmalspitzen auf Grund ihrer zeitsparenden Handhabung in der Routineanalytik weit verbreitet sind, sollte an dieser Stelle überprüft werden, inwiefern sie bei den vorliegenden Aufgaben geeignet sind. Zu überprüfen war dabei die Adsorptionsneigung der Analyten an der Kunststoffoberfläche der Einmalspitzen. Zusätzlich wurden die vorhandenen PTFE-Membranfilter auf Adsorption der Analyten untersucht. Dafür wurde ein Mischstandard mit 0,15 bis 0,52 mg/L Analyt in Methanol auf unterschiedliche Weise behandelt:

- Versuch 1: Spülen einer Einmalspitze bis 1 mL Füllhöhe
- Versuch 2: zweimaliges Spülen einer Einmalspitze bis 1 mL Füllhöhe
- Versuch 3: fünfmaliges Spülen einer Einmalspitze bis 1 mL Füllhöhe
- Versuch 4: Spülen der gesamten Einmalspitzen
- Versuch 5: Filtration durch einen PTFE Membranfilter mit 10 mm Durchmesser
- Versuch 6: Filtration durch einen PTFE Membranfilter mit 15 mm Durchmesser
- Versuch 7: Vergleichsstandard in Methanol

Die Ergebnisse sind auszugsweise in Abb. 32 dargestellt. Um die Ausführungen übersichtlich zu gestalten, werden in diesem Kapitel alle Ergebnisse beispielhaft für Bezafibrat, Ibuprofen, Paracetamol, Ibuprofen und Gemfibrozil dargestellt.

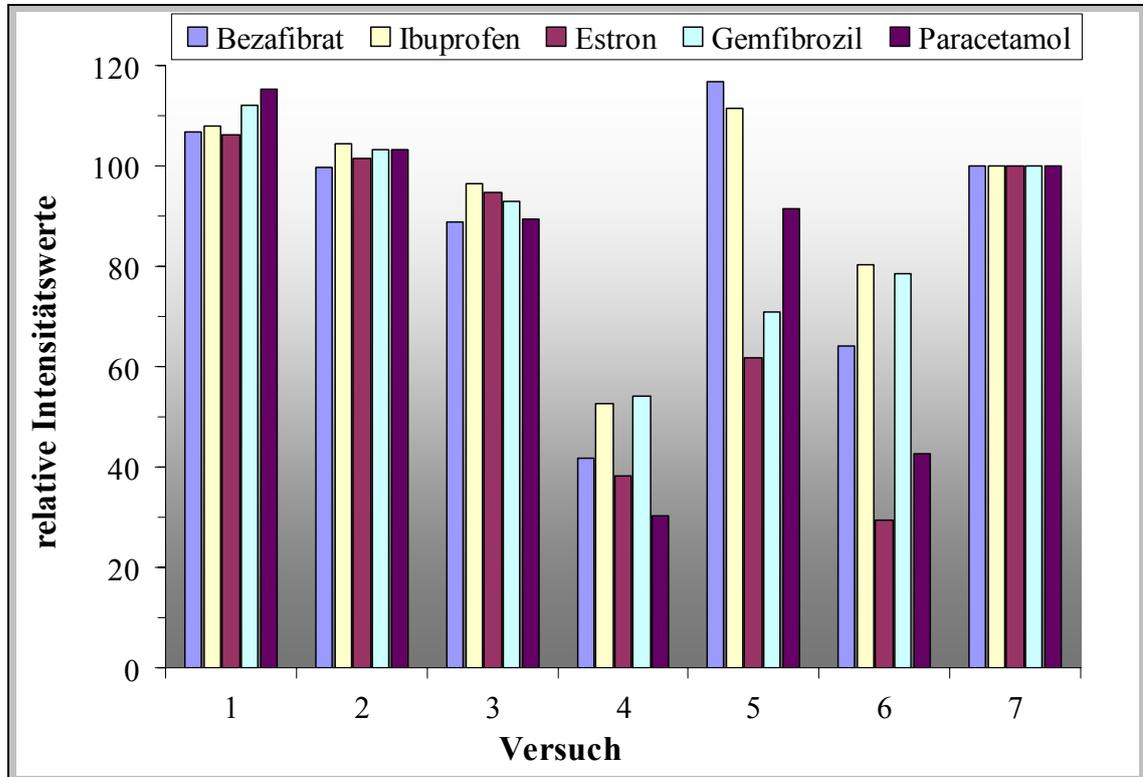


Abb. 32: Auszug der Ergebnisse der Adsorptionsversuche

In Abb. 32 wie auch in allen weiteren Diagrammen in diesem Kapitel erhält die Referenz (hier der Mixstandard in Methanol) den Wert 100 während alle anderen Werte darauf bezogen werden, wobei höhere Werte ein besseres Ergebnis darstellen. In Abb. 32 auftretende Werte über 100 sind vor allem auf die Verdunstung des Methanols bei den Versuchen zurückzuführen und bleiben bei der Auswertung unbeachtet. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass bei Einmalspitzen offenbar nur bis zu einer bestimmten Höhe eine Behandlung der Oberflächen durchgeführt wurde, während es darüber hinaus zu Reaktionen mit den Analyten kommt. Dementsprechend ist an dieser Stelle sowohl mit Verlusten, als auch mit Verschleppungen zu rechnen. Auch die PTFE-Filter führen zu einer starken Adsorption. Diese beschränkt sich dabei nicht nur auf die Steroide, sondern ist auch bei Säuren mit unpolaren Teilstrukturen wie Gemfibrozil zu beobachten. Ein Teil der zu untersuchenden Substanzen weisen ein deutliches Bestreben zur Adsorption an Kunststoffoberflächen auf, weshalb im weiteren Verlauf der Arbeit der Kontakt mit

diesen Materialien auf ein Minimum beschränkt wurde. Daher kommen im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich Mikroliterspritzen aus Glas zum Einsatz.

### **4.3.2 Einengen der Eluate und Aufnahme der Rückstände**

Das nach der SPE erhaltene Eluat muss anschließend auf ein definiertes Volumen reduziert werden. Obwohl es automatisierte Verfahren für diesen Arbeitsschritt gibt, ist das Einengen und anschließende Aufnehmen in einer definierten Lösungsmittelmenge immer noch die gebräuchlichste Arbeitsweise. An dieser Stelle sollte überprüft werden, wie sich die Substanzen beim Einengen verhalten und welches Lösungsmittel sich am besten eignet. Dafür wurden Mischstandards von 0,15 bis 0,52 mg/L in Methanol hergestellt und davon je 5 mL in einem 10 mL Spitzkolben eingeengt.

Zu Beginn wurde getestet, welchen Einfluss die Temperatur des Wasserbades hat und ob das Einengen mittels Argonstrom zu besseren Ergebnissen führt. Das Vakuum beim Abrotieren betrug 80 mbar und die Rotationsgeschwindigkeit des Spitzkolbens 125 U/min. Die Aufnahme des Rückstandes erfolgte in 200 µL Methanol. Die Resultate sind auszugsweise in Abb. 33 dargestellt.

Anschließend wurde der Versuch wiederholt und der Standard bei 80 mbar und 125 U/min für 10 bzw. 30 min einrotiert. Bei einem weiteren Spitzkolben mit einer Markierung bei 200 µL erfolgt das Einrotieren des 5 mL Standards bis zum Erreichen dieser Markierung. Ein vierter Standard wurde 10 min einrotiert und anschließend für 10 min unter einem Argonstrom getrocknet. Die Trocknungsrückstände wurden ebenfalls in 200 µL Methanol aufgenommen. Die Ergebnisse sind auszugsweise in Abb. 34 dargestellt.

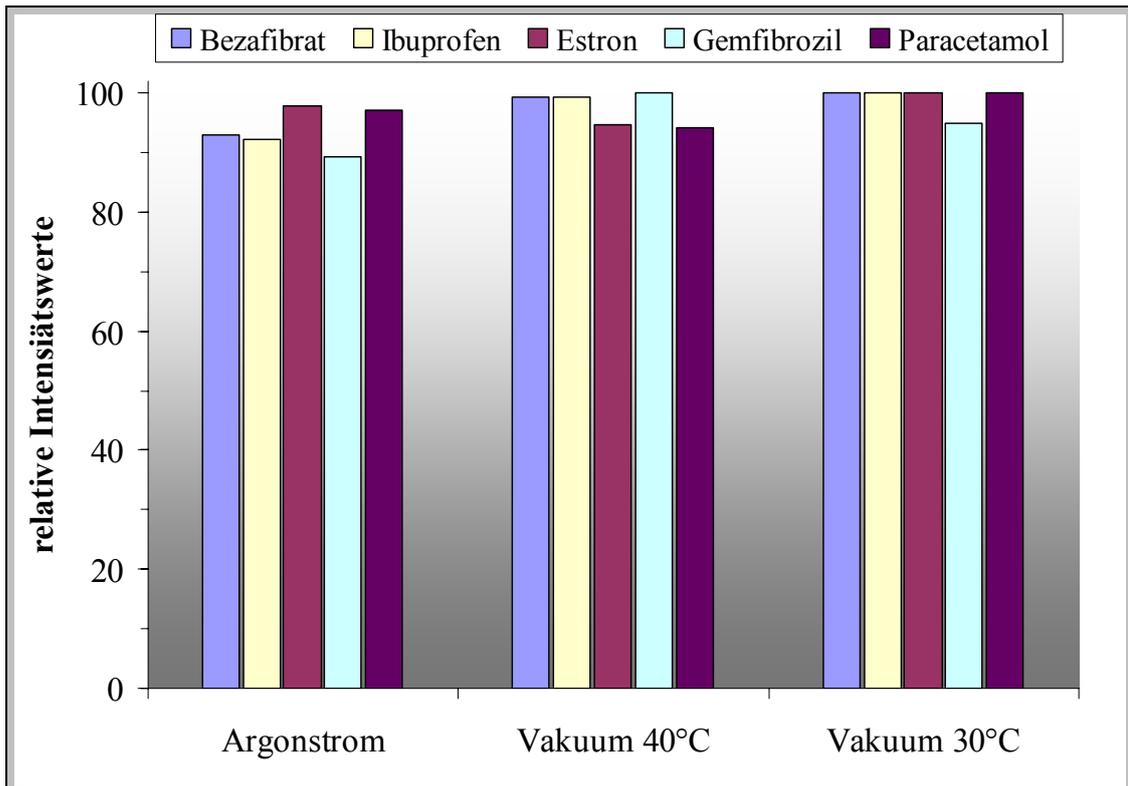


Abb. 33: Einfluss der Temperatur beim Abrotieren und Abblasen unter Argonstrom

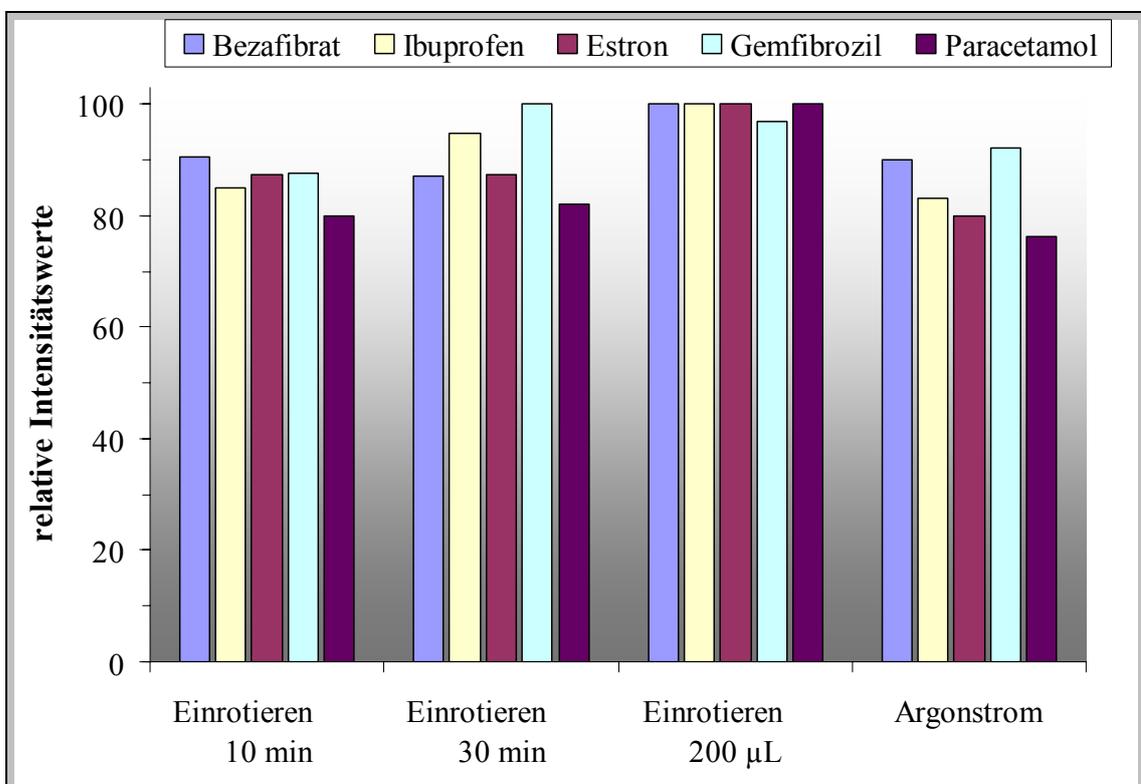


Abb. 34: Verhalten der Analyten beim Einrotieren

Es ist zu erkennen, dass die Temperatur beim Einrotieren nur einen geringen Einfluss hat, allerdings ist eine Abnahme der Signale zu erkennen. Auch das Abblasen des Lösungsmittels mit Argon führte zu keiner signifikanten Verbesserung der Wiederfindung. Darüber hinaus dauert es länger und ist deutlich kostenintensiver. Das Trocknen des Rückstandes nach dem Einrotieren unter Argonstrom führte ebenfalls nicht zu einer Verbesserung der Wiederfindung. Die besten Ergebnisse konnten beim Einrotieren bis zu einem Rückstand von 200  $\mu\text{L}$  erreicht werden. Allerdings kam es bei späteren Tests an Festphasen mit wässrigen Proben teilweise zu Wasserresten im Eluat. Da Wasser einen höheren Siedepunkt als Methanol aufweist, reichert es sich im 200  $\mu\text{L}$  Rückstand an. Wie schon in Kapitel 4.2 (Seite 50) erläutert, führt Wasser zu einer deutlichen Verschlechterung der Empfindlichkeit, so dass das Eluat trotz der etwas schlechteren Ergebnisse bis zur Trockne eingengt werden muss. Hierbei zeigte die Verlängerung der Rotationszeit von 10 auf 30 min bei einigen Stoffen eine geringfügige Verbesserung der Intensitäten. Allerdings stand dieser Empfindlichkeitsgewinn in keinem Verhältnis zur Analysendauer. Es stellt jedoch eine Möglichkeit dar, die Nachweisgrenze dieser Methode perspektivisch zu verringern. Im Endeffekt reichen 10 min aus, um 5 mL Methanol unter den verwendeten Bedingungen bei 30 °C einzurotieren, so dass die folgenden Versuche unter diesen Bedingungen durchgeführt wurden.

Nachdem die Trocknungsrückstände bisher in Methanol aufgenommen wurden, sollte im Folgenden der Einfluss von Zusätzen zum Methanol untersucht werden. Getestet wurden 0,1 % Ameisensäure, 0,1 % Ammoniak und 5 % Wasser. Die Ergebnisse sind auszugsweise in Abb. 35 dargestellt. Darüber hinaus wurden auch verschiedene andere Lösungsmittel auf ihre Eignung zum Aufnehmen des Rückstandes überprüft. Die Auswertung erfolgte mittels HPLC, wobei die Ergebnisse generell von zwei unterschiedlichen Faktoren abhängig sind: Einerseits von der Löslichkeit des Rückstandes im jeweiligen Lösungsmittel und andererseits dessen Einfluss auf die HPLC. So führte das Lösen des Rückstandes in Aceton, iso-Propanol und Butanol zu Doppelpeaks sowie stark verbreiterten oder verwackelten Peaks. Ein weiteres Problem ist die Flüchtigkeit verschiedener Lösungsmittel wie Hexan oder tert-Butylmethylether, durch die es zur unbeabsichtigten Aufkonzentrierung bei den Aufarbeitungsschritten und im Autosampler kam. Die Ergebnisse sind in Auszügen in Abb. 36 dargestellt.

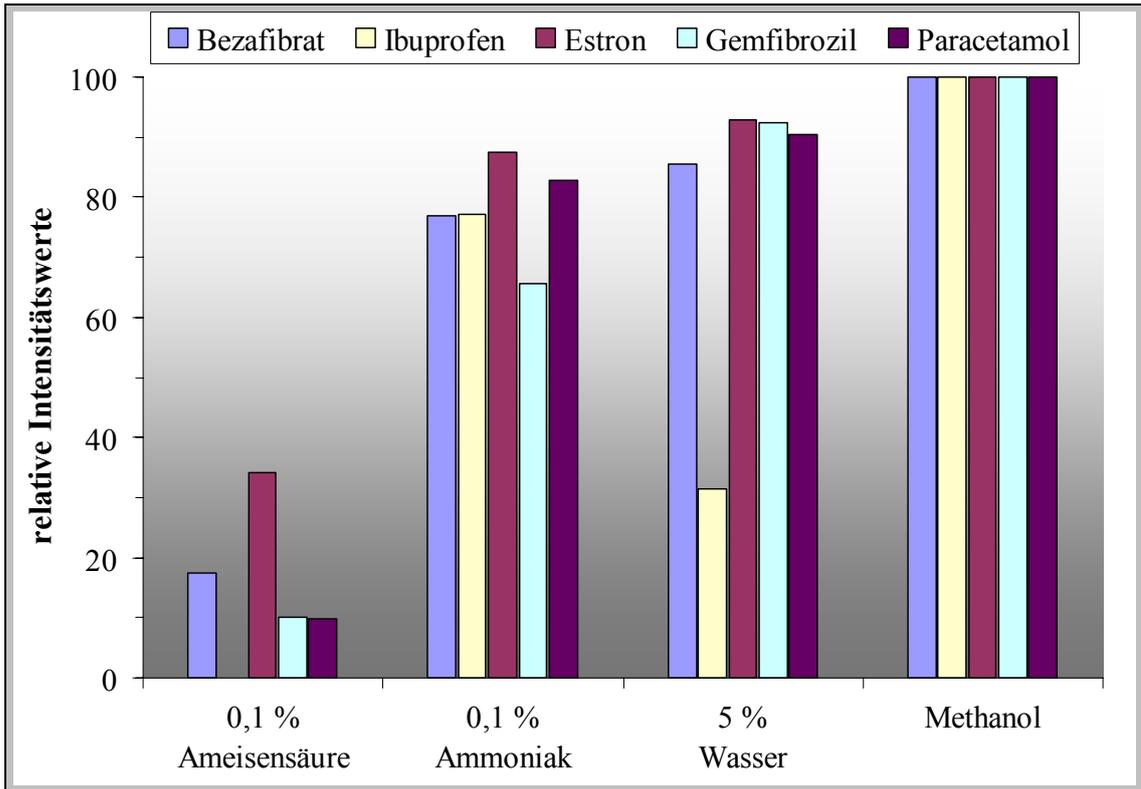


Abb. 35: Einfluss von Zusätzen zu Methanol beim Aufnehmen des Rückstandes

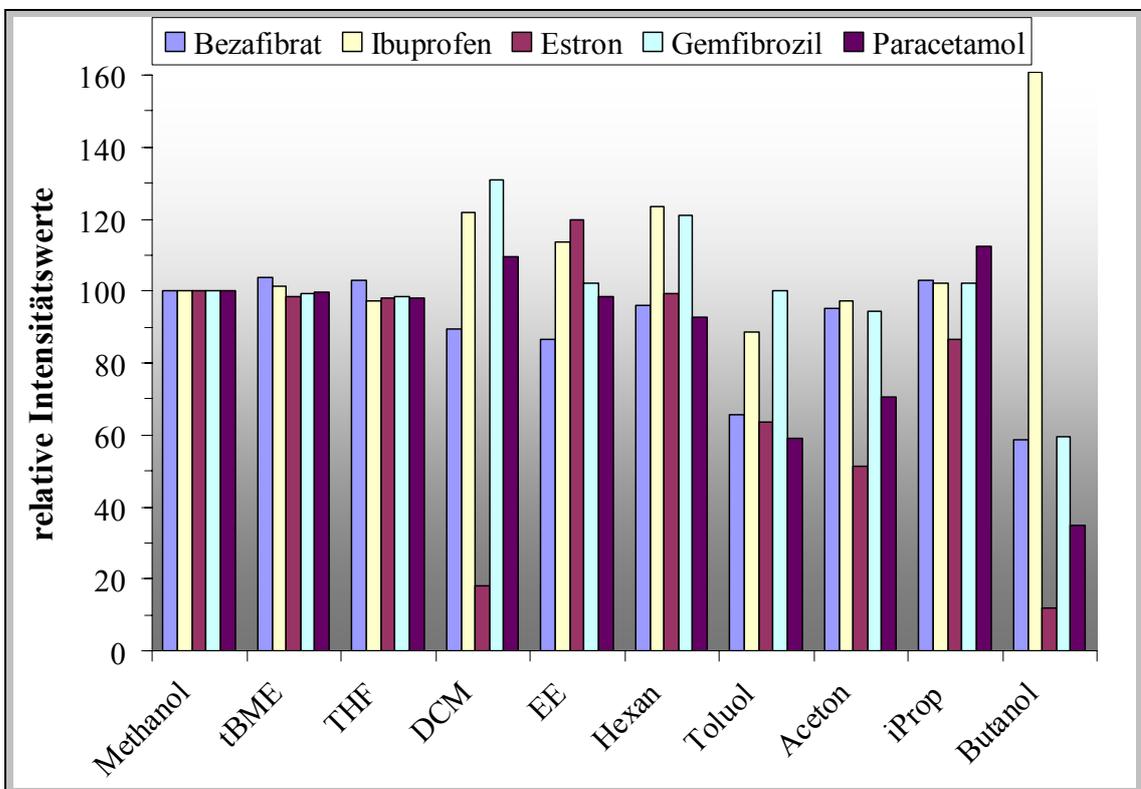
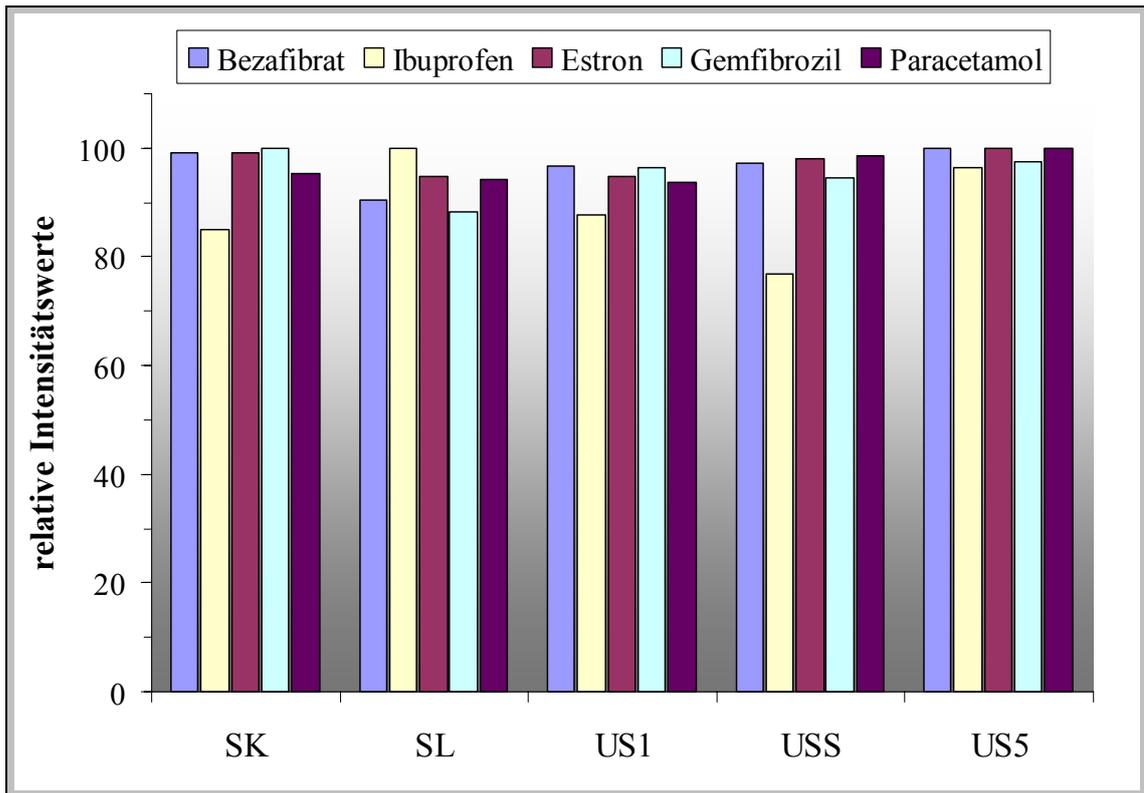


Abb. 36: Test von weiteren Lösungsmitteln beim Aufnehmen des Rückstandes (tBME: tert-Butylmethylether; THF: Tetrahydrofuran; DCM: Dichlormethan; EE: Essigester; iProp: iso-Propanol)

Die Zusätze von Ammoniak, Ameisensäure oder Wasser verschlechterten die Intensitäten zum Teil erheblich, so dass diese im Folgenden nicht weiter verfolgt wurden. Interessant sind dagegen die teilweise deutlichen Unterschiede der Lösungsmiteleigenschaften in Bezug auf die einzelnen Substanzen. So führte Butanol gegenüber Methanol zu einer 60 %igen Steigerung des Ibuprofensignals, während die anderen Analyten deutlich schlechtere Werte zeigen. Dies kann auf die bessere Löslichkeit von Ibuprofen in Butanol, auf die Beeinflussung der chromatographischen Bedingungen oder auf eine Signalverstärkung bei der Ionisation zurückgeführt werden. Mit Methanol vergleichbare Ergebnisse lieferten Hexan, Essigester, tert-Butylmethylether und Tetrahydrofuran. Da der zuvor optimierte HPLC-Eluent auf Methanol basiert und negative Wechselwirkungen daher ausgeschlossen werden können, wird Methanol auch weiterhin zum Aufnehmen des Rotationsrückstandes verwendet.

Um einen kristallinen Feststoff in Lösung zu bringen ist man einerseits bemüht dessen Oberfläche so groß wie möglich zu halten und andererseits versucht man eine intensive Benetzung der Kristalle zu erreichen. Letzteres kann durch Rühren oder Schwenken realisiert werden. Im routinemäßigen Laborbetrieb wird in den meisten Fällen ein Ultraschallbad eingesetzt. Das Prinzip des Ultraschallbades beruht auf der Kavitation. So nennt man die Bildung von Bläschen in Flüssigkeiten auf Grund hoher Druckschwankungen. Diese Bläschen fallen sofort wieder in sich zusammen, wobei enorme Kräfte frei werden können. Ultraschall ist wegen der hochfrequenten Schwingungen in der Lage, diese Druckunterschiede zu erzeugen. Allerdings ist noch nicht geklärt, ob sich diese frei werdenden Kräfte bis in den molekularen Bereich erstrecken können. Sicher ist, dass bestimmte Strukturen hochmolekularer Verbindungen durch die mechanische Belastung beschädigt werden können. Ungeachtet dessen stellt das Ultraschallbad in der Routine eines der wirksamsten Hilfsmittel dar, Feststoffe in Lösung zu bringen. Daher soll an dieser Stelle untersucht werden, wie sich die Dauer der Ultraschallbehandlung auf die Analyten auswirkt und ob einfaches Schwenken ähnliche Ergebnisse liefert. Dafür wurde der Rückstand jeweils unter sehr kurzem (SK) bzw. ausgiebigem (SL) Schwenken und unter Behandlung im Ultraschallbad für 1,5 min (US1) bzw. 5 min (US5) aufgenommen. Darüber hinaus wurden beide Methoden gekoppelt, indem nach 1,5 min Ultraschall kurz geschwenkt wurde. Die Resultate sind auszugsweise in Abb. 37 dargestellt.



**Abb. 37:** Rückstandsaufnahme mit und ohne Ultraschall (SK: kurzes Schwenken; SL: langes Schwenken; US1: 1,5 min Ultraschallbad; USS: 1,5 min Ultraschallbad mit Schwenken; US5: 5 min Ultraschallbad)

Offenbar sind die Analyten so gut in Methanol löslich, dass es keiner nennenswerten Energiezufuhr bedarf, um sie in Lösung zu bringen. Allerdings ergab sich bei Untersuchungen mit erhöhter Matrix, dass sich diese im oberen Teil des Spitzkolbens ablagerte und nur durch das Schwenken gelöst werden konnte. Auch wenn in diesen Matrixablagerungen geringe Analytmengen adsorbiert sind, führte das Lösen dieser nicht zu einer Steigerung der Intensität, da sich im Gegenzug der Matrixeinfluss noch stärker erhöhte. Auch wenn die daraus resultierenden Suppressionen durch den internen Standard kompensiert werden, erwies es sich als geeigneter, diese Matrixbestandteile nicht zu lösen. Somit kam nur die Behandlung im Ultraschallbad in Frage. Wie in Abb. 37 ersichtlich, lieferte diese bei einer Dauer von fünf Minuten für alle Analyten die besten Ergebnisse. Bei den folgenden Vergleichen der Festphasenmaterialien wurden die Eluate bei 30 °C, 80 mbar und 125 U/min einrotiert, die Rückstände mit Methanol aufgenommen und fünf Minuten im Ultraschallbad behandelt.

### 4.3.3 Festphasenextraktion

#### 4.3.3.1 Aufbau der Apparatur

Um die gewünschten Bestimmungsgrenzen zu erreichen, ist für die Messung der ausgewählten Arzneimittel mit dem API 2000 ein Mindestanreicherungsfaktor von etwa 500 notwendig. Um mit praktikablen Probemengen in einer angemessenen Zeit die Probenaufarbeitung durchführen zu können, müssen 100 mL Probe extrahiert und in 200  $\mu$ L Methanol aufgenommen werden. Sowohl bei Aufsätzen für die Festphasenkartuschen als auch bei Automatisierung des Verfahrens kommt die Probe mit zusätzlichen Oberflächen in Berührung. Wie zu Beginn des Kapitels dargestellt, kann es bei Kontakt der Analyten mit Kunststoff zu Adsorptionseffekten kommen. Daher wurden die Festphasenkartuschen über einen Teflonschlauch mit der SPE-Kammer verbunden und direkt in das Probengefäß gegeben. Die Probe kommt daher nur mit der Kartusche in Berührung. Das extrahierte Wasser kann in der SPE-Kammer aufgefangen werden. Anschließend wird die Festphase 60 min unter einem Argonstrom getrocknet. Das Unterschreiten dieser Zeit führte teilweise zu störenden Wasserrückständen im Eluat. Anschließend wurde direkt in die Spitzkolben eluiert, um Kontaminationen über die SPE-Kammer zu vermeiden. Mit dem Eluat wurde wie in Abschnitt 4.3.2 (Seite 64) dargestellt verfahren.

#### 4.3.3.2 Vergleich der Festphasenmaterialien

Da die Festphasenextraktion noch immer das am häufigsten eingesetzte Aufarbeitungsverfahren in der Rückstandsanalytik darstellt, ist auch das Angebot an Festphasenmaterialien dementsprechend umfangreich. So lässt sich für fast jeden Analyten eine geeignete Festphase finden. Schwieriger gestaltet sich die Aufgabe, wenn man wie in dieser Arbeit ein universell einsetzbares Material benötigt. Mit den getesteten Festphasen wurde ein breites Polaritätsspektrum angefangen von unpolaren C18-Phasen mit und ohne *endcapping* über Polymerphasen mit gemischter Polarität bis hin zu Ionenaustauscherphasen abgedeckt. Es wurde für alle Materialien der Einfluss des pH-Wertes im Säuren, im Neutralen und im Basischen getestet. Da es sich um vergleichende Darstellungen handelt, wurde wie in allen folgenden Abbildungen die höchste Intensität für jeden Stoff als Bezugspunkt verwendet. Für die Versuche wurden gespikete Proben (30 bis 130 ng/L) aus entionisiertem Wasser, Trinkwasser und Saalewasser hergestellt. Die Konditionierung der Festphasen erfolgt mit Methanol und entionisiertem Wasser (pH-

Wert entsprechend der Probe) und die anschließende Extraktion mit 1-2 Tropfen pro Sekunde unter Vakuum. Die jeweiligen Ergebnisse wurden ausgewertet und das Gesamtbild in Auszügen in Abb. 38 dargestellt.

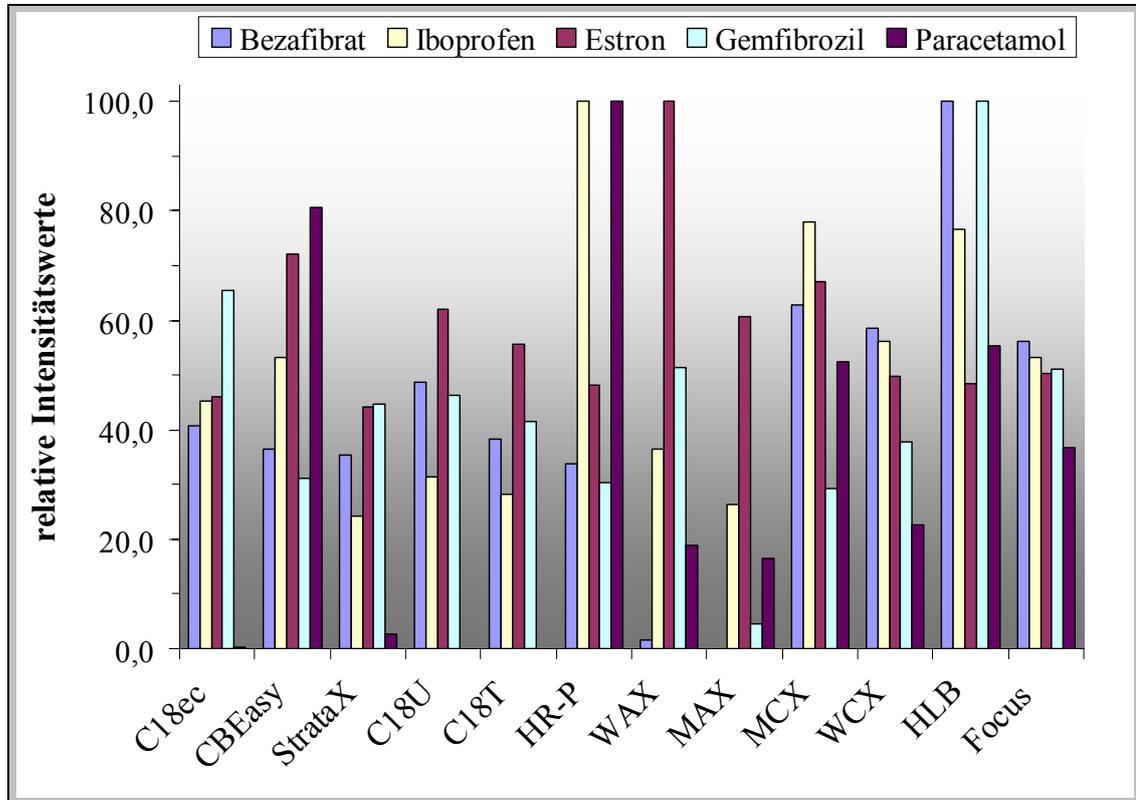


Abb. 38: Vergleich der Festphasenmaterialien

Wie in Abb. 38 zu erkennen ist, gibt es keine Festphase die für alle Stoffe gleichermaßen geeignet ist. So konnten mit der unpolaren HR-P-Säule sehr gute Ergebnisse für Paracetamol und Ibuprofen und mit dem schwachen mixed-Mode Anionenaustauscher (WAX) sehr gute Ergebnisse für die Steroide erzielt werden. Allerdings zeigten diese Materialien bei Stoffen wie Gemfibrozil, Bezafibrat und Diclofenac deutliche Schwächen. Ein verhältnismäßig einheitliches Bild ergab sich für die Festphasensäule von Varian (Focus), allerdings fiel sie bei allen Stoffen hinter die HLB-Säule zurück. Mit dieser konnten nicht nur für Bezafibrat, Gemfibrozil, Diclofenac, Fenoprofen und Naproxen die besten Ergebnisse erreicht werden, sie stellte auch für die anderen Stoffe eine gute Kompromisslösung dar. Dementsprechend wurde die HLB-Säule für die weiteren Optimierungsschritte verwendet.

#### 4.3.4 Optimierung der Festphasenextraktion

Die Stärke der Wechselwirkung zwischen den Analyten und dem Festphasenmaterial hängt von verschiedenen Faktoren ab. Den entscheidenden Einfluss haben das Lösungsmittel und der pH-Wert. Da es sich bei den zu untersuchenden Proben um Oberflächenwasser handelt, kann nur im wässrigen Milieu gearbeitet werden. Der pH-Wert der Lösung bestimmt, ob die Verbindung in ionischer Form oder ungeladen vorliegt und hat damit bedeutenden Einfluss auf ihre Polarität. So liegen die sauren Analyten bei niedrigen pH-Werten protoniert vor, wodurch der Einfluss der unpolaren Abschnitte sehr stark zunimmt. Im Gegensatz dazu führen die deprotonierten Säuregruppen im basischen Bereich zu einer Steigerung der Polarität. Auf Grund der niedrigen Säure- bzw. Basekonstanten von Ameisensäure und Ammoniak sowie der hohen Pufferkapazität der zu untersuchenden Proben waren, um den gewünschten pH-Wert zu erreichen, so hohe Mengen an Zusätzen notwendig, dass es zu Matrixeinflüssen und Verdrängungseffekten an den Festphasen kam. Daher wurde für die pH-Werteinstellung Salzsäure bzw. Natronlauge verwendet. Für die Untersuchung wurden je 100 mL Leitungswasser mit 30 bis 130 ng/L Analyt gespikt, auf den gewünschten pH-Wert eingestellt und mit 1-2 Tropfen pro Sekunde unter Vakuum mittels HLB-Säule extrahiert. Die Ergebnisse sind auszugsweise in Abb. 39 dargestellt.

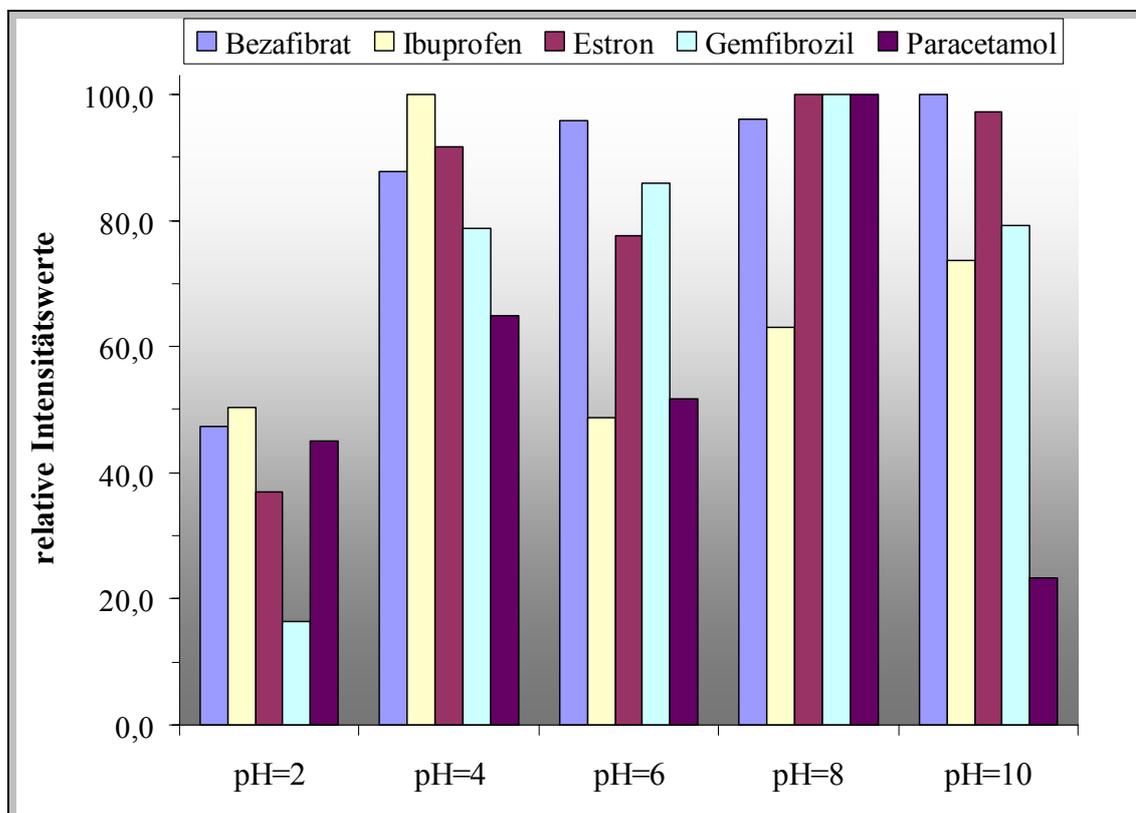


Abb. 39: Einfluss des pH-Wertes auf die Festphasenextraktion

Erwartungsgemäß kommt es bei extremen Bedingungen (pH 2 und 10) bei einem Teil der Analyten zu deutlichen Verlusten bei der Extraktion, was auf einen möglichen Abbau der Verbindungen schließen lässt. Unerwartet ist dagegen, dass auch die sauren Verbindungen mit Ausnahme von Ibuprofen bei niedrigen pH-Werten keine besseren Ergebnisse zeigen. Da auch die Möglichkeit besteht, dass die Analyten so fest an die Festphase gebunden sind, dass sie mit Methanol nur unzureichend eluiert werden können, wird bei den anschließenden Versuchen sowohl im basischen als auch im sauren Milieu gearbeitet.

Das Spülen der Festphase nach Extraktion der Probe stellt eine weitere Möglichkeit dar, unerwünschte Matrixbestandteile abzutrennen. Allerdings setzt dies voraus, dass sich diese von den Analyten unterscheiden. Da es sich bei den zu untersuchenden Stoffen um ein weites Spektrum an Substanzklassen handelt, werden an dieser Stelle vor allem Salze eliminiert. Mit dem Zusatz von Methanol können zwar viele organische Verbindungen eluiert werden, aber es besteht die Gefahr auch einen Teil der Analyten zu eluieren. Wie in Abb. 40 zu erkennen ist, scheint das bei Paracetamol der Fall zu sein.

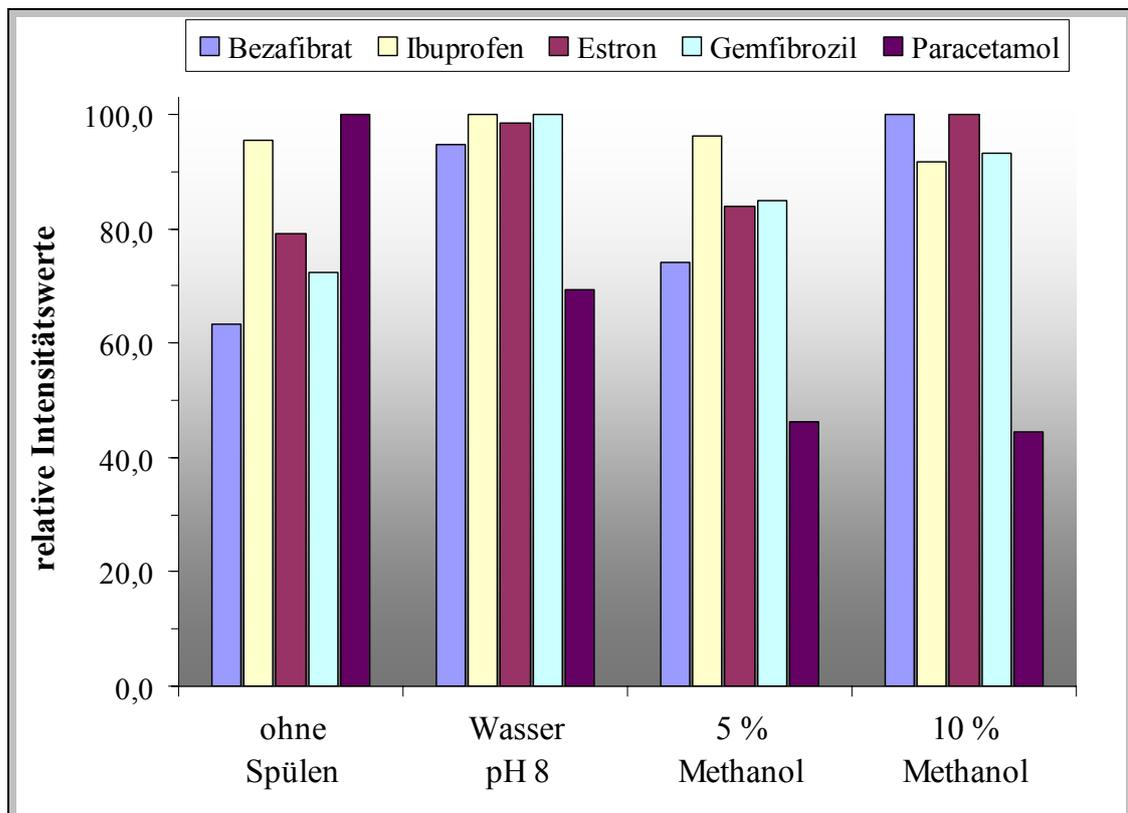


Abb. 40: Einfluss verschiedener Spülmethoden auf die Intensität

So führte das Spülen mit 10 % Methanol bei vielen Substanzen zu etwas besseren Werten, aber bei Paracetamol und Phenazon verschlechterten sie sich um bis zu 55 %. Das Spülen mit entionisiertem Wasser bei pH 8 stellte somit den besten Kompromiss dar.

Ein weiterer wesentlicher Parameter ist die Wahl des Elutionsmittels. Wie bereits erwähnt, besteht die Möglichkeit, dass die Elutionskraft von Methanol nicht ausreicht, um die Wechselwirkungen der Analyten mit der stationären Phase zu überwinden. Dies erreicht man entweder durch die Zugabe von Säuren oder Basen oder durch ein Lösungsmittel mit anderer Polarität. Da es sich bei Methanol um ein sehr polares Lösungsmittel handelt, sollten vor allem unpolare Verbindungen getestet werden. Bei der Auswahl der Lösungsmittel muss darauf geachtet werden, dass die Analyten darin löslich sind und dass keine Nebenreaktionen zum Beispiel beim Einengen zu erwarten sind. Ein Auszug der Ergebnisse für Hexan, tert-Butylmethylether (tBME), Tetrahydrofuran (THF), Aceton und Essigester ist im Vergleich zu Methanol in Abb. 41 dargestellt. Dabei wurde die Festphase jeweils mit 1 mL Methanol benetzt und anschließend mit 3 mL des jeweiligen Lösungsmittels eluiert.

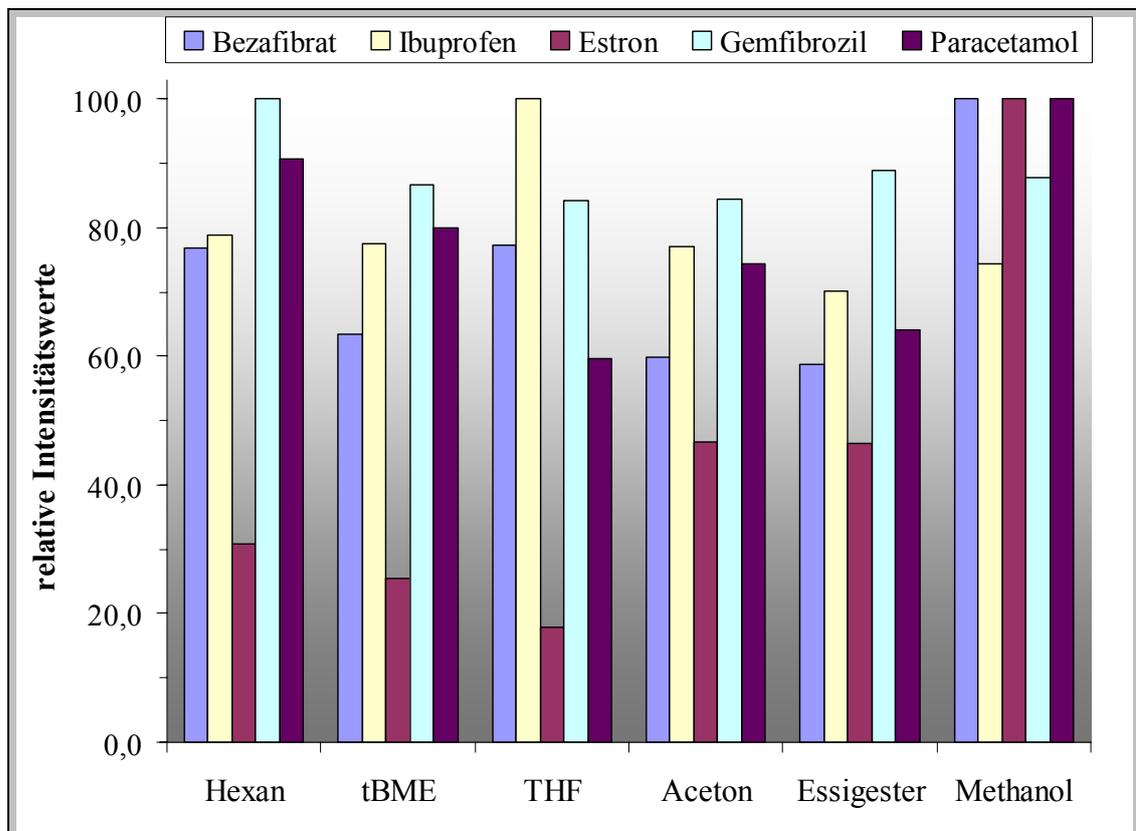


Abb. 41: Vergleich verschiedener Elutionsmittel bei der Festphasenextraktion (tBME: tert-Butylmethylether; THF: Tetrahydrofuran)

Erwartungsgemäß ist keines der Lösungsmittel für alle Stoffe gleichermaßen geeignet. Bemerkenswert ist an dieser Stelle, dass sehr unpolare Verbindungen wie Hexan, tert-Butylmethylether oder Tetrahydrofuran für die Elution der Steroide (hier am Beispiel des Estrons) deutlich weniger geeignet sind als Methanol. Da die Steroide in Methanol gut löslich sind, werden diese möglicherweise eluiert, während sehr unpolare Matrixbestandteile auf der Festphase verbleiben. Durch die unpolaren Lösungsmittel werden dagegen die Analyten und ein Großteil der Matrix eluiert und sorgen so für eine höhere Beeinflussung der Ionisation. Dies könnte auch der Grund sein, warum die Kombination mehrerer Lösungsmittel keine signifikant besseren Ergebnisse brachte. Da auch weiterhin bei pH 3 deutlich schlechtere Resultate erzielt wurden als bei pH 8, wurde letzterer für die weiteren Messungen verwendet.

Mit der Variation der Elutionsmittel konnte gegenüber Methanol keine Verbesserung der Resultate erreicht werden, so dass im Folgenden der Einfluss des pH-Wertes auf die Elutionswirkung von Methanol untersucht wurde. Die pH-Werteinstellung erfolgte mittels Salzsäure und Ammoniak. Da beide Substanzen nur als wässrige Lösungen erhältlich waren, enthielt das Eluat in jedem Fall geringe Mengen an Wasser. Auf Grund der unterschiedlichen Siedepunkte von Wasser und Methanol führte der Zusatz von Salzsäure beim Abrotieren zu einem sehr sauren wässrigen Rückstand, der erst nach längerer Zeit verdunstete. Ähnliche Effekte konnten auch bei der Verwendung organischer Säuren beobachtet werden, wobei hier der Rückstand nicht wässrig war, sondern es sich um die Säure selbst handelte. In jedem Fall kam es zu einer Verfärbung des Rückstandes und zu deutlich geringeren Wiederfindungsraten. Bei der Verwendung von Ammoniak traten diese Probleme insofern nicht auf, dass dieser schon vor dem Methanol abrotiert werden konnte. Der wässrige Rückstand blieb allerdings auch hier zurück und konnte mit der verwendeten Apparatur nur unter erhöhtem Zeitaufwand abrotiert werden. Mit einem anderen Versuchsaufbau wären hier sicherlich umfangreichere Messungen möglich gewesen. Erst nachdem im späteren Verlauf der Arbeit mit ammoniakalischem Methanol gearbeitet wurde, konnten die Probleme mit wässrigen Rückständen beim Abrotieren beseitigt werden. Die Ergebnisse bei unterschiedlichem Zusatz von Ammoniaklösung sind in Abb. 42 dargestellt.

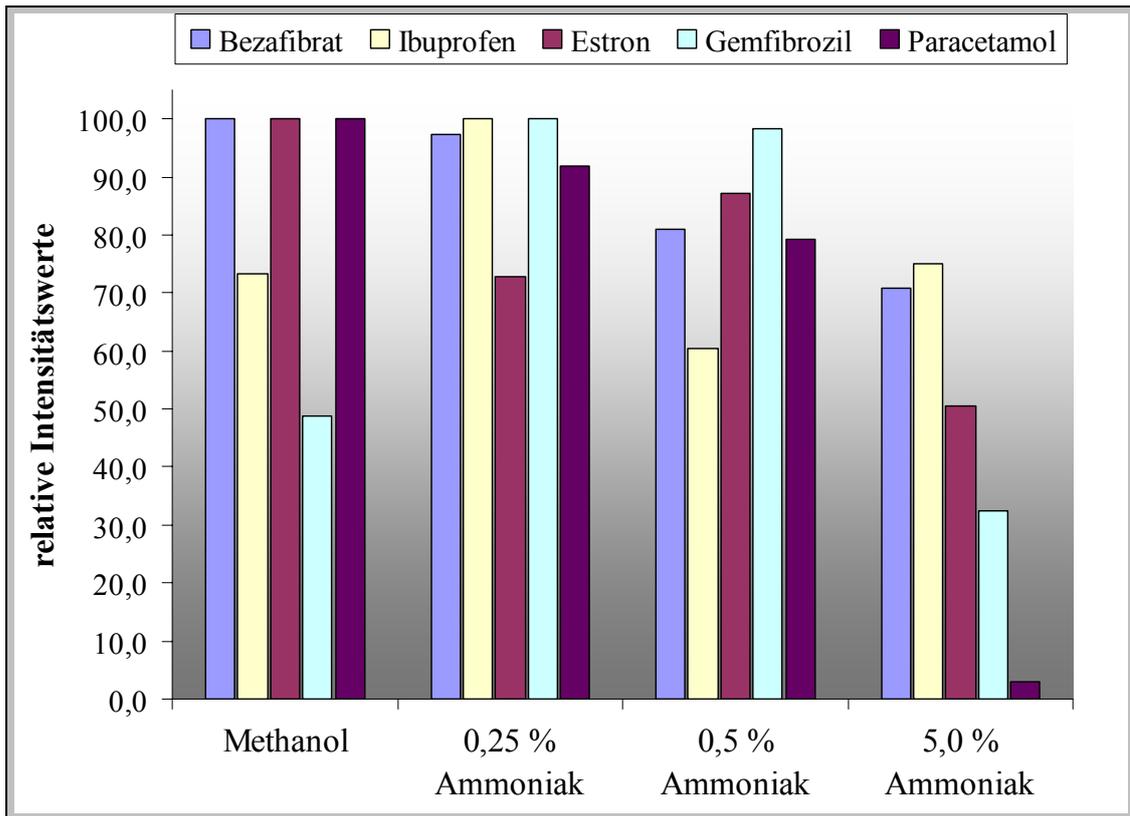


Abb. 42: Einfluss von Ammoniak auf die Elutionswirkung

Bei Zusatz von wässriger Ammoniaklösung kam es schon ab 0,5 % zu deutlichen Intensitätsverlusten, so dass hier auf den Zusatz verzichtet wurde. Beim späteren Einsatz von ammoniakalischem Methanol konnten deutlich höhere Wiederfindungsraten erzielt werden, so dass dieser im Folgenden für die Elution verwendet wurde.

Basierend auf den Untersuchungen ergab sich folgende SPE-Methode:

- 100 mL Probe mit NaOH-Lösung auf pH 8 einstellen.
- HLB-Kartusche mit 3 mL Methanol und 3 mL entionisiertem Wasser (pH 8) konditionieren
- Probe unter Vakuum bei 1-2 Tropfen pro Sekunde extrahieren
- Festphase mit 3 mL entionisiertem Wasser (pH 8) spülen
- Festphase 1 Stunde unterm Argonstrom trocknen
- Eluieren mit 1 mL Methanol und 5 x 1 mL ammoniakalischem Methanol
- bei 30 °C Wasserbadtemperatur bis zur Trockne (10 min) einrotieren
- Rückstand mit 200 µL Methanol und 5-minütiger Ultraschallbehandlung aufnehmen

#### 4.4 Weiterführende Betrachtungen zu Matrixeinflüssen

Bei den bisherigen Betrachtungen spielte der Einfluss der Matrix in Bezug auf die Vorgänge in der Ionenquelle immer wieder eine entscheidende Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit konnten unterschiedliche Matrices auf ihre diesbezüglichen Eigenschaften (Suppression, Verstärkung, Adduktbildung) hin untersucht werden. Hierfür wurden Verdünnungsreihen von schwarzem Tee, Früchtetee, Saalewasser und Trinkwasser hergestellt. Diese wurden mit einem Mischstandard dotiert (0,05 bis 0,13 mg/L) und mit der optimierten Methode vermessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 43 dargestellt.

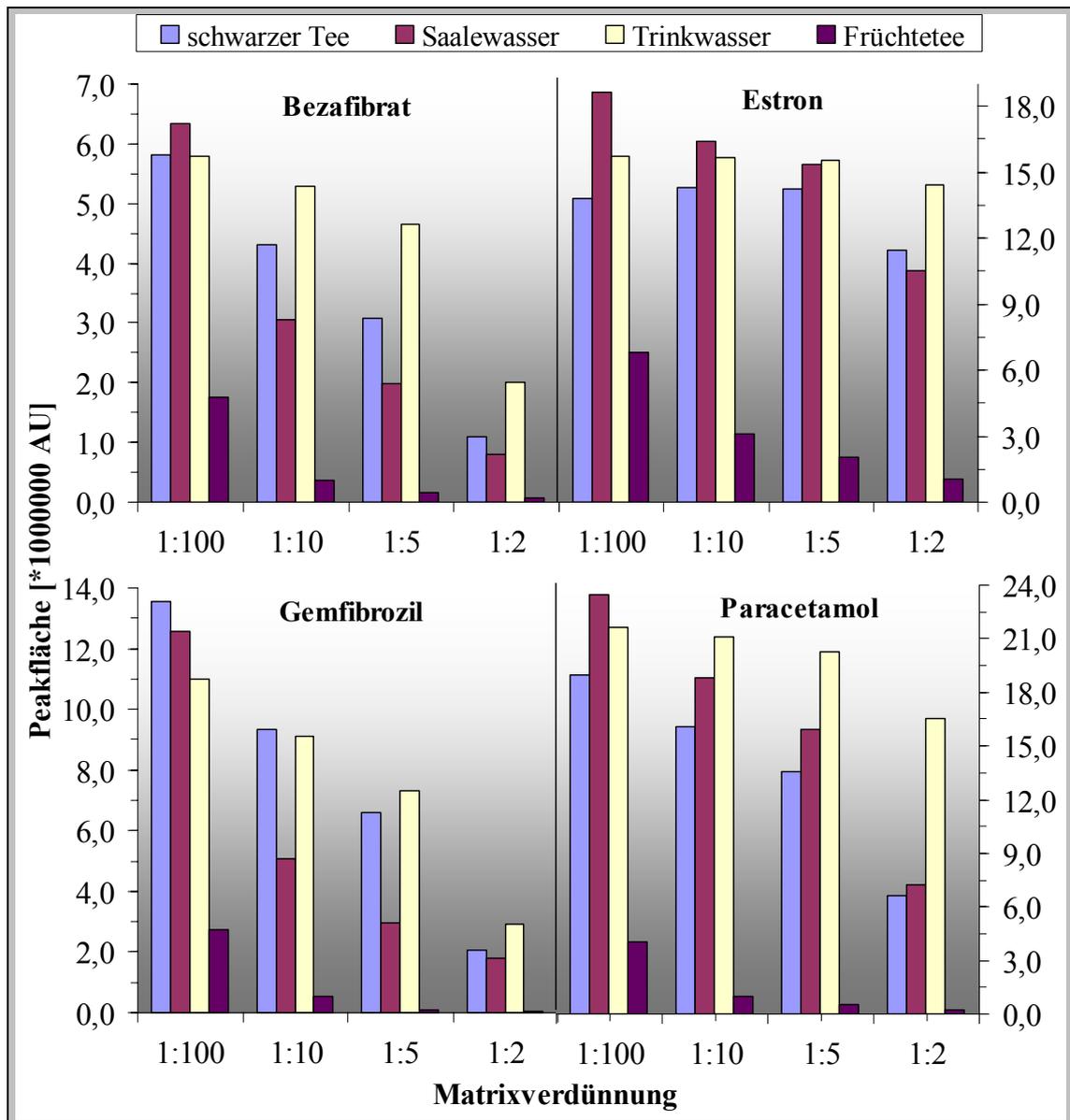
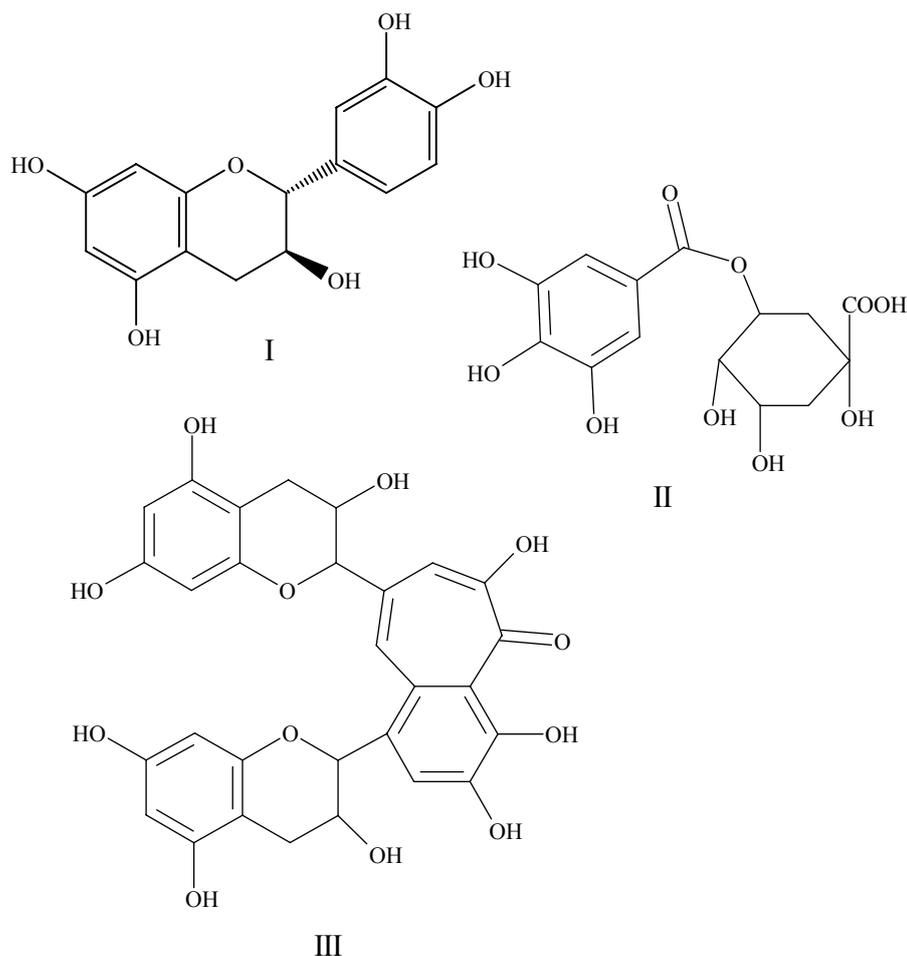


Abb. 43: Suppressionseffekte in verschiedenen Matrices

Die Matrices schwarzer Tee sowie Saale- und Trinkwasser verhalten sich bei der Verdünnung 1:100 ähnlich, während geringere Verdünnungsstufen teilweise deutliche Unterschiede zeigen. Früchtetee bewirkte hingegen bei allen Stoffen starke Intensitätsverluste. Bemerkenswert ist, dass die Intensität sehr polarer Verbindungen wie die Säuren Bezafibrat und Gemfibrozil eine größere Matrixabhängigkeit zeigt als die unpolaren Stoffe wie Paracetamol oder Estron. Bei letzterem konnte nur für die geringste Verdünnungsstufe bei schwarzem Tee, Saalewasser und Früchtetee ein Intensitätsrückgang beobachtet werden. Dieses Verhalten war auch bei den anderen Steroiden Estradiol und Ethinylestradiol zu beobachten. Da diese auf Grund ihrer Struktur für die Ionisation eine höhere Energiezufuhr benötigen und dementsprechend bei der Elektrosprayionisation auch ohne Matrix geringere Ionisationsraten aufweisen, macht sich die Konkurrenz um die Ladungsträger erst bei höheren Matrixbelastungen negativ bemerkbar. Es ist weiterhin möglich, dass hier zwei gegenläufige Effekte zu beobachten sind. Einerseits eine Verstärkung des Analytsignals durch bestimmte Matrixbestandteile und andererseits Suppressionseffekte, die erst bei höheren Matrixkonzentrationen verstärkt auftreten.

Die Ursache für die unterschiedlichen Einflüsse der einzelnen Matrices liegt in deren Zusammensetzung begründet. Von Bedeutung sind dabei sowohl die organischen als auch die anorganischen Bestandteile [49]. Letztere führen in höheren Konzentrationen zur Verschlechterung der Ionisation und zur Kristallisation an der Edelstahlkapillare, was zur Verstopfung der Ionenquelle führen kann. Da sich die anorganischen Salze während der Festphasenextraktion leichter entfernen lassen und die organischen Verbindungen in größeren Mengen enthalten sind, soll auf letztere an dieser Stelle näher eingegangen werden. Ein wesentlicher Bestandteil der organischen Inhaltsstoffe von Saale- und Trinkwasser sind die Huminstoffe. Das sind durch postmortale Abbauprozesse gebildete meist polymere organische Verbindungen mit undefinierter regional unterschiedlicher Zusammensetzung [50]. Sie zeichnen sich durch große Mengen funktioneller Gruppen sowie einer hohen spezifischen Oberfläche aus und spielen beim Stofftransport in der Lithosphäre eine bedeutende Rolle. Eine quantitativ bedeutende Gruppe der Huminstoffe sind die Huminsäuren [51]. Auf Grund ihrer vielen ionisierbaren funktionellen Gruppen liegen sie in Lösung als Polyanion vor. Sie stehen daher bei negativer Ionisation mit den Analyten in direkter Konkurrenz um die vorhandenen Ladungsträger. Eine gegenseitige Beeinflussung ist daher vorhersehbar. Dagegen sind phenolische Verbindungen der organische Hauptbestandteil von schwarzem Tee. Hierbei handelt es sich um eine viele Stoffklassen umfassende Gruppe von Verbindungen.

Grundstrukturen sind die Gallussäure und die Catechine [52]. Während im grünen Tee vorwiegend Flavanole (Catechinderivate, Abb. 44) vorkommen, findet man im schwarzen Tee hauptsächlich Theaflavine (Abb. 44) und Thearubigene [53]. Da Theogallin (Abb. 44) nur im Tee vorkommt und mit der Teequalität korreliert ist, nimmt dieser Stoff unter den restlichen Phenolen eine Sonderstellung ein. Phenolische Verbindungen zeichnen sich durch eine große Anzahl an Hydroxygruppen aus und beeinflussen damit sowohl die positive als auch die negative Ionisation.



**Abb. 44: Wichtige Polyphenole im Tee (I - Catechin; II - Theogallin; III - Theaflavin)**

Teeähnliche Getränke wie Früchtetee und Rooibos-Tee enthalten dagegen geringere Mengen an phenolischen Verbindungen [54]. Hier ist verstärkt mit Kohlenhydraten und organischen Säuren zu rechnen [55]. Vor allem die organischen Säuren stellen eine direkte Konkurrenz der hier untersuchten Analyten dar. Darauf lassen sich wahrscheinlich auch die gegenüber den anderen Matrices deutlich schlechteren Intensitäten zurückführen.

Anhand dieser Ausführungen ist zu erkennen, dass unterschiedliche Matrices auch bedeutende Unterschiede im Ionisationsverhalten der Analyten verursachen. Es ist daher mit verhältnismäßigem Aufwand nicht möglich, allgemeingültige Formeln zur mathematischen Kompensation der Matrixeffekte aufzustellen. Eine Abtrennung der Matrix durch chromatographische Verfahren (Probenaufarbeitung und HPLC) sowie die Kompensation der Matrixeinflüsse durch geeignete Quantifizierungsverfahren sind daher unumgänglich. Eine häufig angewandte Methode und oft als das Mittel der Wahl bezeichnet, ist der Einsatz der isotope markierten Spezies der Analyten als internen Standard. Im Rahmen der Untersuchung von Carnitin und seiner Acylester in Geflügelfutter und Geflügelproben konnte der Einsatz der deuterierten Spezies als internen Standard für die Quantifizierung untersucht werden [56]. Ein wesentlicher Punkt beim Einsatz isotope markierter Analyten als internen Standard ist die Isotopenreinheit. Diese sollte bei erwarteten Konzentrationen an der Nachweis- und Bestimmungsgrenze über 98 % liegen, um darauf basierende falsch-positive Ergebnisse zu verhindern. Bei der Messung von Carnitin in praktisch matrixfreien Proben konnte sowohl eine Co-Elution als auch eine sehr gute Korrelation der Analyten und ihrer jeweiligen deuterierten Spezies beobachtet werden. Bei sehr matrixbelasteten Proben kann es dagegen trotz der hohen Selektivität der MS/MS zu Störpeaks kommen. Über den Qualifier und den internen Standard ist zwar eine Identifizierung mit hoher Sicherheit möglich, aber die Quantifizierung kann gestört werden. Bei der Verwendung eines nicht co-eluierenden internen Standards können Peaks nur noch über den Qualifier zugeordnet werden. Die Quantifizierung ist in diesem Fall natürlich ebenfalls gestört. Die Verwendung von isotope markierten Analyten stellt somit sowohl für die Quantifizierung als auch für die Qualifizierung die sicherere Methode dar, obwohl auch hier nicht alle Matrixeinflüsse kompensiert werden können.

Unabhängig davon ist die Überführung der Analyten von der Probe in die Messlösung der Arbeitsschritt mit entscheidender Beeinflussung der späteren Matrixbelastung. Während wässrige Proben entweder für die Messung oder die Festphasenextraktion direkt eingesetzt werden können, ist bei festen oder sehr viskosen Proben eine vorherige Extraktion mit einem Lösungsmittel notwendig. Dieses richtet sich in erster Linie nach den Analyten und gegebenenfalls nach der Matrix. Bei der Extraktion von Carnitin und seinen Acylestern aus Tierfutter und Gewebeproben erwies sich ein Gemisch aus Methanol und Wasser (1:2 v/v) als am geeignetsten [56]. Im Rahmen einer Diplomarbeit wurden darüber hinaus Kokzidiostatika in Eiern bestimmt [57]. Hier kam als Extraktionsmittel

Acetonitril zum Einsatz. Das Problem der Extraktionsmethoden mit organischen Lösungsmitteln ist ihre geringe Selektivität. So wird neben den Analyten auch ein großer Teil der Matrix gelöst. Dementsprechend sind die Anforderungen an die chromatographischen Trennmethode bei Matrices wie Gewebeprobe oder Lebensmittelprobe deutlich höher als bei wässrigen Proben. Insbesondere bei der Bestimmung von Carnitin und seiner Acylester konnte auf Grund mehrerer interner Standards auf die Co-Elution verzichtet und eine bessere Abtrennung der Matrix erreicht werden.

Neben der Beeinflussung der Analyten durch die Matrix, ist auch der Einfluss der Analyten untereinander zu berücksichtigen. Wie bereits angedeutet, können trotz der hohen Selektivität der MS/MS auf den jeweiligen Massenspuren Störpeaks auftreten. So wurde bei Vorträgen auf verschiedenen Workshops die Möglichkeit in Erwägung gezogen, dass beim parallelen Messen vieler Analyten einzelne Verbindungen auf der Massenspur anderer Analyten Störpeaks erzeugen. Dies kann vor allem bei strukturell ähnlichen Verbindungen wie den Steroiden eine Rolle spielen, jedoch auch bei Stoffen mit ähnlichen Massen wie Diclofenac und Ethinylestradiol. Darüber hinaus wurde auch die Reinheit der verwendeten Standards überprüft. Für diese Messungen wurden Standards der einzelnen Substanzen mit 0,8 – 2,5 mg/L in Methanol gelöst und mit der Multimehode vermessen. Anschließend wurden jeweils alle Massenspuren ausgewertet. Erwartungsgemäß konnte im Ethinylestradiolstandard sowohl Estradiol als auch Estron und im Estronstandard nur Estradiol nachgewiesen werden. Im Estradiolstandard konnte dagegen weder für Estron noch für Ethinylestradiol ein Signal erhalten werden. Jedoch lagen die Intensitäten der Verunreinigungen im Fall von Ethinylestradiol bei maximal 1,1 % und im Fall von Estron bei 0,6 % der Peakfläche. Unerwartet war dagegen die Verunreinigung von Ibuprofen mit Gemfibrozil (1,1 % der Peakfläche). Da diese weder mit der Struktur noch mit gemeinsamen Fragmenten zu erklären ist, handelt es sich um eine Verschleppung bei der Herstellung des Standards. Die vollständigen Ergebnisse sind in Anhang VII dargestellt. Auf Grund der geringen Intensitäten der Störpeaks können diese vernachlässigt und die Massenspuren im Zusammenhang mit den Analyten selbst als störungsfrei bezeichnet werden.

## 4.5 *Quantitative Bestimmung der Analyten*

### 4.5.1 Voraussetzungen

Für die Erstellung einer quantitativen Analysenmethode sowie die Durchführung quantitativer Messungen wurden zahlreiche allgemeine Vorschriften im Rahmen der *good laboratory praxis* (GLP) festgelegt. Da die Bestimmung von Humanpharmaka erst in den letzten Jahren an Bedeutung gewann, existieren noch keine für dieses Problem spezifische Anforderungen an die Beschaffenheit einer solchen Methode. Anders sieht es bei der Untersuchung auf Tierarzneimittel aus. In der Richtlinie 96/23/EG Kontrollmaßnahmen hinsichtlich bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen werden Kontrollmaßnahmen für bestimmte Stoffe und Rückstandsgruppen erlassen. In der Entscheidung 2002/657/EG zu dieser Richtlinie wurden spezifische Anforderungen an Analyseverfahren festgelegt. Obwohl noch keine Grenzwerte für die zu untersuchenden Stoffe existieren und die Gesundheitsgefährdung für viele Stoffe noch umfassender untersucht werden muss, soll sich die Analysemethode an diesen Kriterien orientieren.

Ein wesentliches Kriterium ist die Spezifität, also die Fähigkeit einer Methode zwischen dem Analyten und anderer Matrixbestandteile zu unterscheiden und dementsprechend falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse zu verhindern. Um der unterschiedlichen Spezifität massenspektrometrischer Verfahren Rechnung zu tragen, wurden Identifizierungspunkte festgelegt. So zählt jedes Produkt-Ion in der niedrig auflösenden Massenspektrometrie als ein und die dazu gehörigen Fragment-Ionen jeweils als 1,5 Identifizierungspunkte. Für eine als ausreichend angesehene Spezifität sind mindestens drei Identifizierungspunkte vorgeschrieben. Mit zwei Fragment-Ionen (Quantifier und Qualifier) und dem dazugehörigen Produkt-Ion werden vier Identifizierungspunkte erreicht.

Ein weiteres Kriterium ist die Richtigkeit des Ergebnisses. Ist ein zertifizierter Referenzstandard nicht erhältlich, kann sie durch wiederholte Messung von dotierten Proben (Wiederfindung) überprüft werden. Darauf soll in Abschnitt 4.5.3 (Seite 87) näher eingegangen werden. Wie schon in Kapitel 4.2 (Seite 50) dargestellt, beeinflusst die Probenmatrix einerseits die Ionisation in der Ionenquelle, andererseits aber auch die chromatographischen Bedingungen. Da man diese Störungen in den meisten Fällen nicht eliminieren kann, versucht man sie auf verschiedene Art und Weise zu kompensieren. Eine sehr häufig angewandte Methode ist der Einsatz eines internen Standards (IS).

### 4.5.2 Interner Standard

Bei einem internen Standard (IS) handelt es sich um einen Stoff, der in der Probe nicht vorkommt und sich in Hinblick auf die analytischen Eigenschaften wie der zu untersuchende Analyt verhält. Auf Grund der enormen Vielfalt organischer Verbindungen ist es mit einem großen Aufwand verbunden, einen geeigneten internen Standard zu finden. Basierend auf der Struktur der zu untersuchenden Analyten musste es sich um eine organische Säure mit einer Molmasse von 150 g/mol bis 300 g/mol handeln. Aus diesem Grund wurden Salicylsäure, Gluconsäure, Benzoesäure, 1,3,5 - Benzol-tricarbonsäure und Weinsäure getestet. Die Strukturen sind in Anhang I dargestellt. Um die zugesetzte Menge des internen Standards wegen möglicher Matrixstörungen so gering wie möglich zu halten, wurde die Empfindlichkeit der Methode auf diese Analyten ermittelt. In Tabelle 11 ist der Vergleich der Stoffe bei direkter Infusion mit 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  und den aufgeführten Konzentrationen dargestellt.

Tabelle 11: Vergleich der Signalintensitäten der internen Standards

Interner Standard	Produkt-Ion [m/z]	Fragment-Ion [m/z]	Intensität [cps]	Konzentration [mg/L]
Benzoessäure	120,8	76,8	115000	0,58
Gluconsäure	195,0	118,7	14300	0,45
Salicylsäure	136,9	93,1	531480	0,10
1,3,5-Benzol-tricarbonsäure	208,9	164,7	114500	0,58
Weinsäure	148,9	87,0	148000	5,00

Salicylsäure erzeugt mit Abstand das höchste Signal. Trotz der relativ geringen Molmassen von 138,1 g/Mol für Salicylsäure und 121,12 g/Mol für Benzoesäure kamen sie neben 1,3,5 - Benzoltricarbonsäure bei den weiteren Versuchen zum Einsatz. Gluconsäure und Weinsäure kamen wegen der zu geringen Intensität nicht in Frage. Da man auf Grund der Spezifität der MS die Peaks im Allgemeinen zuordnen kann, ist die Hauptaufgabe des internen Standards die Kompensation der Einflüsse auf die Ionisation. Es bot sich daher die Möglichkeit an, diesen *post column* über die interne Spritzenpumpe zu infundieren [58]. Auf diese Weise erhält man ein konstantes Signal, das durch die Matrixbeeinflussung verstärkt oder abgeschwächt wird. Die Peakfläche bzw. -höhe

des Analyten und das erhaltene Signal des internen Standards wurden anschließend ins Verhältnis gesetzt. Die Abb. 45 zeigt ein Chromatogramm eines Mischstandards (0,5-1 mg/L) unter Infusion des internen Standards (Salicylsäure; 0,02 mg/L in Methanol bei 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ ).

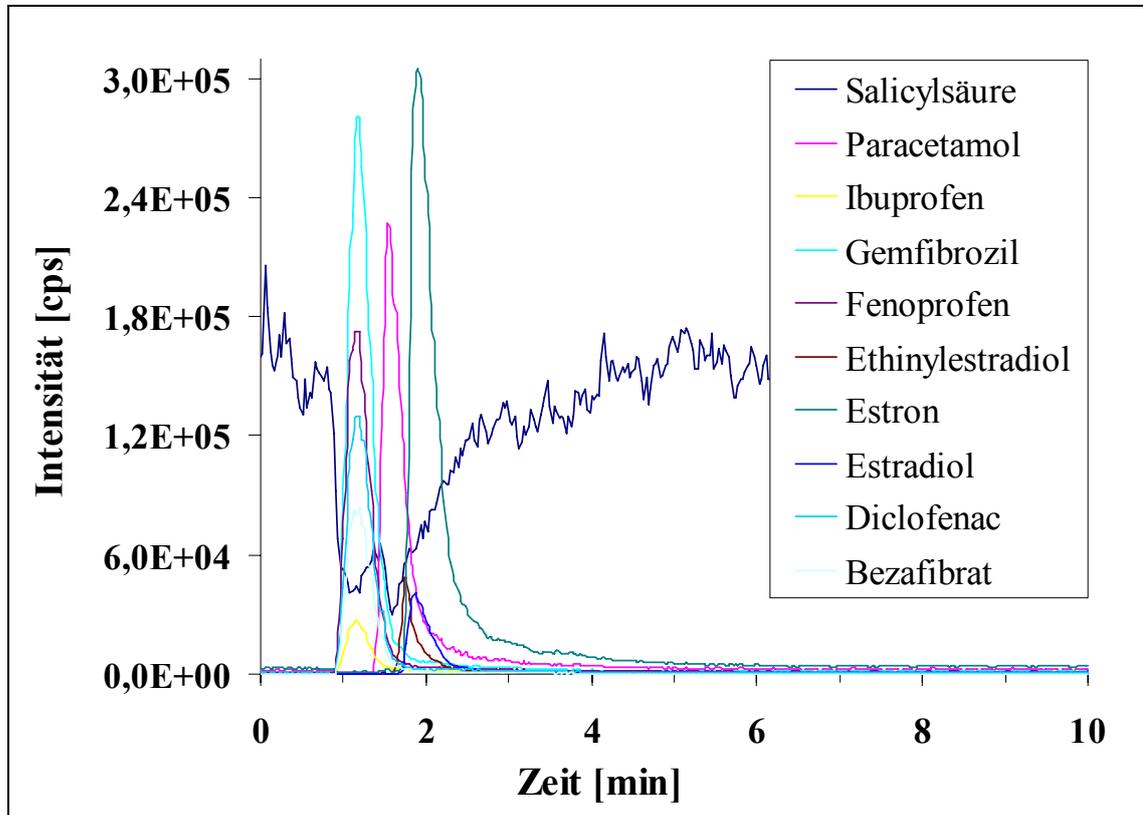


Abb. 45: Chromatogramm eines Mischstandards (0,5-1 mg/L) mit Infusion von Salicylsäure (0,02 mg/L bei 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ )

In Abb. 46 bis Abb. 48 sind die Ergebnisse anhand einer Kalibrierung mit Diclofenac und Salicylsäure (20  $\mu\text{g}/\text{L}$  in Methanol bei 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) als internen Standard dargestellt. Bei Infusion des internen Standards zeigte der Mandel-Test für die meisten Analyten bei einer quadratischen Kalibrierfunktion eine signifikant bessere Anpassung als bei einer linearen Kalibrierfunktion. Auch das Verhältnis Peakfläche zur Intensität des internen Standards zeigte erwartungsgemäß keinen linearen Zusammenhang. Die beste lineare Annäherung konnte mit dem Verhältnis aus Peakhöhe zur Intensität des internen Standards erzielt werden. Allerdings war auch hier die quadratische Regressionsfunktion signifikant besser als die lineare.

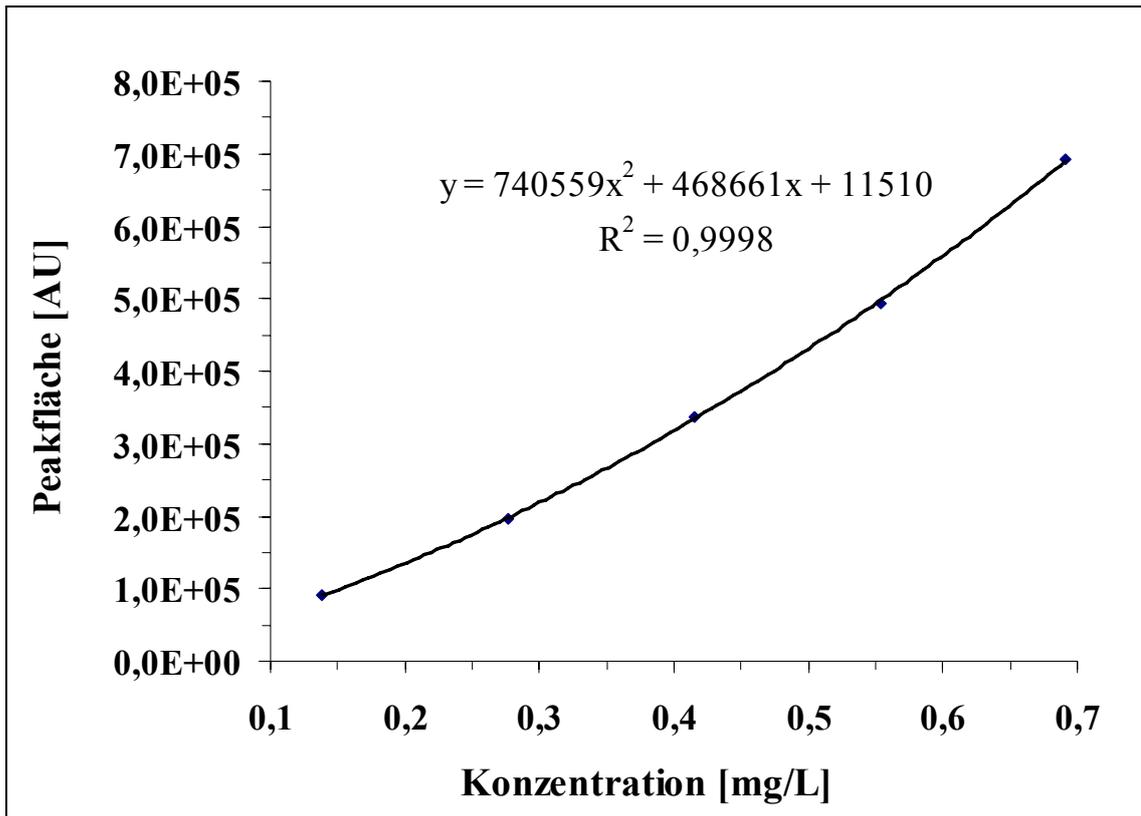


Abb. 46: Kalibrierfunktion über die Peakfläche am Beispiel von Diclofenac

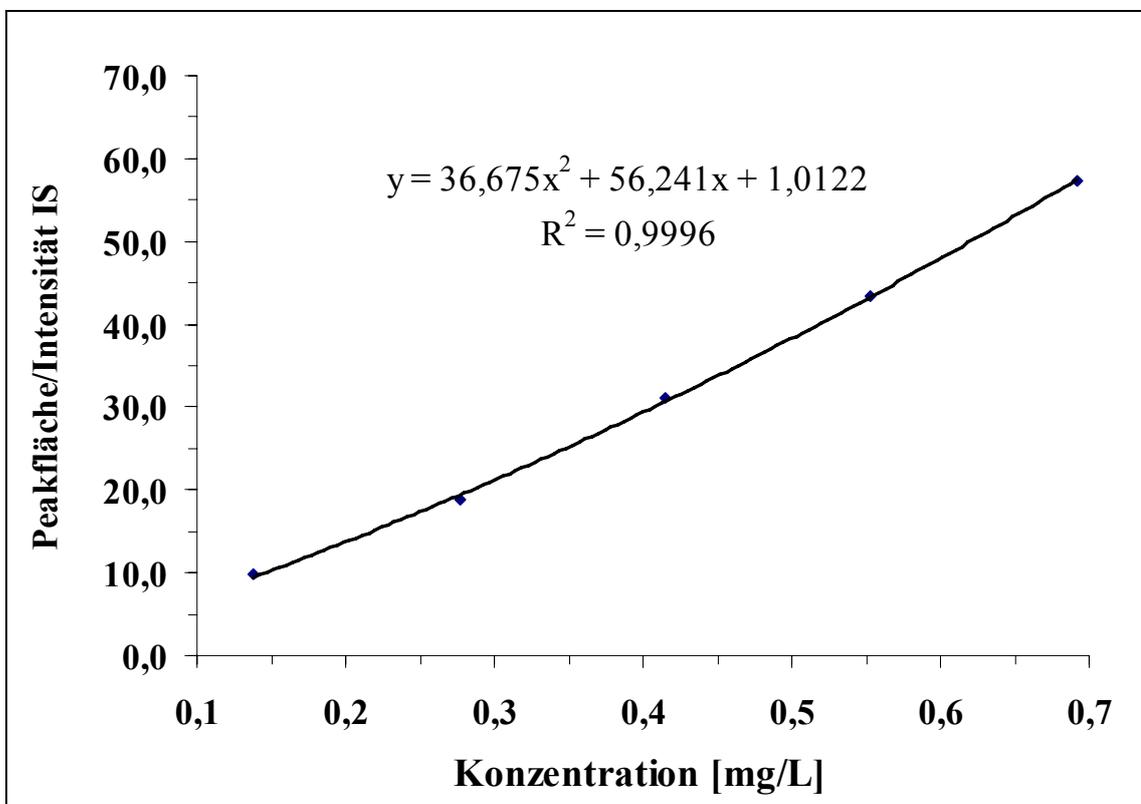


Abb. 47: Kalibrierfunktion über das Verhältnis der Peakfläche zur Intensität des IS am Beispiel von Diclofenac

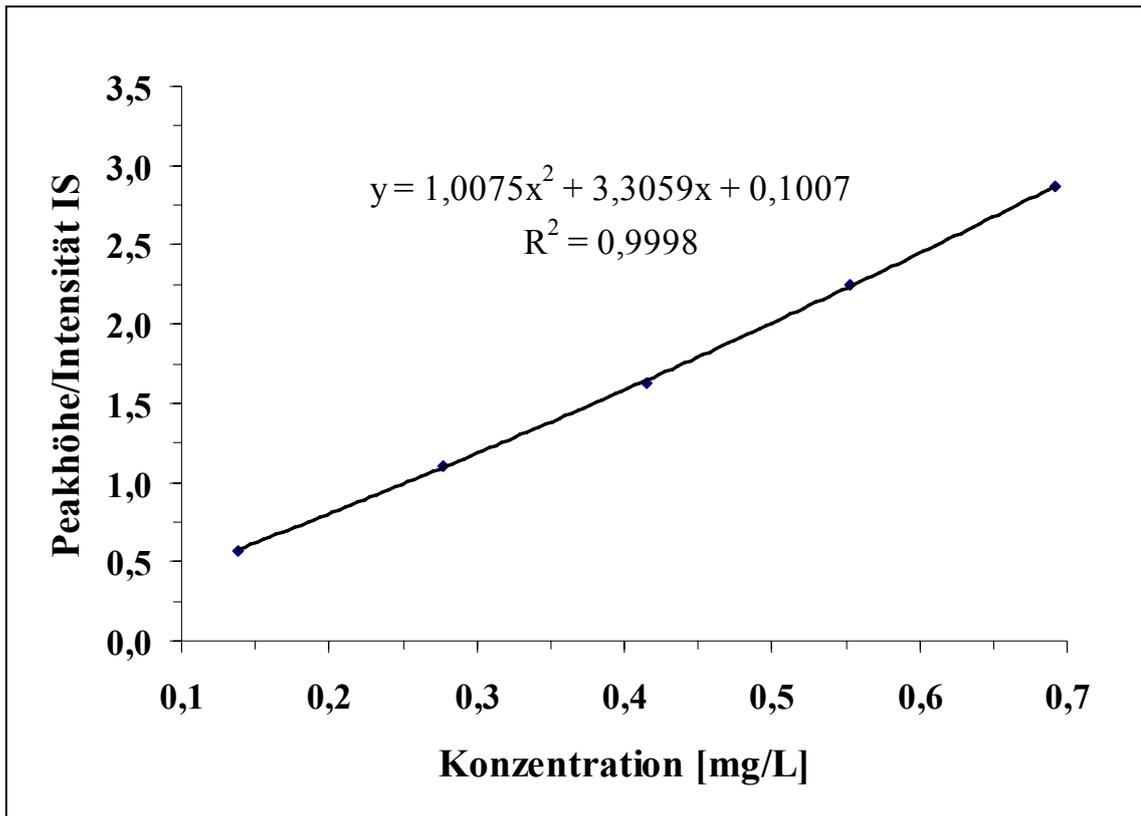


Abb. 48: Kalibrierfunktion über das Verhältnis der Peakhöhe zur Intensität des IS am Beispiel von Diclofenac

Ein zusätzlicher Nachteil der Quantifizierung über die Peakhöhe ist die Fehleranfälligkeit, da es z. B. schon durch die Alterung der Säule zu anderen Ergebnissen kommt. Da die Messsignale in der MS statistischen Schwankungen unterliegen und demzufolge mittels geeigneter Software geglättet werden müssen (*smoothing*), ist die Auswertung der Peakhöhe nicht praktikabel. Dementsprechend wurde von der Infusion des internen Standards *post column* Abstand genommen.

Im Allgemeinen erfolgt der Einsatz eines internen Standards über die Dotierung der Probe oder der Messlösung. In Verbindung mit der MS werden die isotonenmarkierten Spezies des jeweiligen Analyten bevorzugt, da diese nahezu identische Eigenschaften im Bezug auf die Chromatographie und die Ionisation aufweisen [59]. Zwar gibt es auch hier Diskriminierungserscheinungen, allerdings sind diese häufig zu vernachlässigen. Ein größeres Problem stellt die Verfügbarkeit dieser Stoffe dar. Von den Analyten waren zwar alle als deuterierte oder  $^{13}\text{C}$ -markierte Verbindung erhältlich, allerdings konnte aus finanziellen Gründen nur deuteriertes Diazepam und deuteriertes Paracetamol erworben werden. Darüber hinaus wurden noch  $^{37}\text{Cl}_2$ -markiertes Chloramphenicol sowie deuteriertes Salbutamol, Dimetridazol und Sulphadimidin getestet. Die Strukturformeln

sind in Anhang I dargestellt. Im Rahmen umfangreicher Wiederfindungs- und Kalibrierungsversuche zeigten bei negativer Ionisation Chloramphenicol- $^{37}\text{Cl}_2$  und bei positiver Ionisation Diazepam- $\text{d}_5$  die besten Ergebnisse, während die anderen Verbindungen keine zufrieden stellenden Resultate ermöglichten. Bemerkenswert ist, dass auch deuteriertes Paracetamol als interner Standard für Paracetamol bei allen Kalibrierungen deutlich schlechtere Korrelationen ergab als Diazepam- $\text{d}_5$ . Das spricht dafür, dass sich beide Verbindungen unterschiedlich verhalten und sei es nur im Bezug auf die Stabilität. Im Rahmen der Untersuchungen zeigte sich weiterhin, dass sich die internen Standards auch bei der Anreicherung anders verhalten als die Analyten und es somit keinen Sinn macht, sie vorher zuzugeben. Außerdem steigen der Aufwand und die Kosten überproportional an, wenn jede Kalibrierstufe komplett mit Festphasenextraktion durchgeführt werden müsste. Darüber hinaus sollten ohnehin die HPLC und die Ionisation die Hauptkompensationspunkte der internen Standards sein und die Wiederfindung der Festphasenextraktion separat überprüft werden. Basierend auf diesen Untersuchungen wurde im Folgenden mit Diazepam- $\text{d}_5$  und Chloramphenicol- $^{37}\text{Cl}_2$  als interne Standards gearbeitet und die Messlösungen mit diesen Verbindungen dotiert.

### 4.5.3 Aufstellen der Kalibriergeraden

Bei der Massenspektrometrie führt die Anwendung des physikalischen Messprinzips nicht direkt zum Analysenergebnis. Das erhaltene physikalische Messsignal (Intensität bzw. Peakfläche) muss erst über die zuvor bei der Kalibrierung empirisch ermittelten Verfahrenskennndaten in das Analysenergebnis umgerechnet werden [60].

Jede Kalibrierung gilt nur für einen festgelegten Arbeitsbereich. Auf Grund der aktuellen Rechtslage gibt es keinen Grenzwert, der die untere Grenze des Bereichs bestimmt. Allerdings liegt die Schwellenkonzentration für die ökotoxikologische Bewertung von Arzneimittelwirkstoffen in der Umwelt bei 10 ng/L [61]. Auf Grund dieses geringen Wertes sollte die untere Arbeitsbereichsgrenze abhängig von den gerätetechnischen Gegebenheiten bestimmt werden. Auch die obere Arbeitsbereichsgrenze ließ sich wegen der zu erwartenden hohen Konzentrationsunterschiede (<10 ng/L bis 2000 ng/L) nicht von Anfang an festlegen. Dementsprechend musste der lineare Bereich überprüft und der Arbeitsbereich infolgedessen angepasst und gegebenenfalls geteilt werden. Es zeigte sich, dass mit Hilfe des internen Standards bei allen Analyten ein linearer Bereich von über zwei Zehnerpotenzen erreicht werden konnte. Allerdings sollte der Schwerpunkt der Kalibriergerade in der Nähe der zu erwartenden Messwerte liegen. Unter Beachtung

der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen [8, 17] waren einerseits Konzentrationen im unteren und andererseits im oberen Arbeitsbereich zu erwarten. Da die absolute Unpräzision mit steigenden Werten zunimmt, wurde der Arbeitsbereich geteilt und zwei Kalibriergeraden erstellt.

Wie schon mehrfach dargestellt, hat die Matrix einen entscheidenden Einfluss auf das resultierende Messsignal. Deshalb sollte die Kalibrierung optimalerweise in der Probenmatrix durchgeführt werden. Auf Grund der Vielfalt der zu untersuchenden Proben ist dies natürlich in der Praxis nicht zu realisieren. In der vorliegenden Arbeit wurde daher mit einer matrixangepassten Kalibrierung gearbeitet. Dafür musste eine Matrix gefunden werden, die einerseits frei von Analyten ist und andererseits mit den Proben vergleichbare Eigenschaften aufweist. Schon die Freiheit der Matrix von den Analyten erwies sich als problematisch. Sowohl die eigentliche Matrix Oberflächenwasser als auch z. B. Leitungswasser wiesen in jedem Fall geringe Analytmengen auf. Beim Vergleich verschiedener Matrices erwies sich Mineralwasser als nahezu unbelastet, so dass es als Matrix zum Einsatz kam.

Für die Kalibrierung werden sechs Mal 100 mL Mineralwasser über je eine Festphase gezogen, einrotiert und in je 300  $\mu$ L Methanol aufgenommen. Anschließend werden 200  $\mu$ L der Matrix mit dem internen Standard und den Analyten dotiert und vermessen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt. Die Konzentrationen wurden unter Berücksichtigung der Anreicherung (Faktor 500) auf die Probe berechnet. Die Kenndaten der Kalibrierung im oberen Arbeitsbereich sind in Anhang VIII und die Kalibriergeraden im unteren Arbeitsbereich in Anhang IX dargestellt.

**Tabelle 12: Kenndaten der Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich nach DIN 32645 (P=0,95; k=3)**

	NG [ng/L]	BG [ng/L]	rel. Rest- streuung	Rel. Verfah- rensstandard- abweichung	Kalibriergerade
Bezafibrat	1,6	6,2	1,8	1,8	$y = 0,0302x + 0,0082$
Diclofenac	1,2	4,6	1,1	1,2	$y = 0,0140x + 0,0633$
17 $\beta$ -Estradiol	7,1	26,8	3,4	3,1	$y = 0,0049x - 0,0475$
Estron	0,7	2,6	1,3	1,2	$y = 0,0223x - 0,0429$
17 $\alpha$ -Ethinyl- estradiol	17,5	66,1	2,3	2,3	$y = 0,0012x + 0,0013$
Fenopropfen	1,3	4,8	1,3	1,3	$y = 0,0152x - 0,0040$
Gemfibrozil	0,8	3,0	1,4	1,5	$y = 0,0535x + 0,0252$
Ibuprofen	6,8	25,6	2,4	2,4	$y = 0,0069x - 0,0023$
Naproxen	2,4	9,2	1,0	1,0	$y = 0,0176x - 0,0115$
Amitriptylin	0,1	0,5	1,6	1,6	$y = 0,2810x + 0,0193$
Carbamazepin	0,4	1,5	3,6	3,6	$y = 0,1790x + 0,0592$
Diazepam	1,5	5,7	1,5	1,5	$y = 0,0613x - 0,0542$
Opipramol	0,4	1,5	5,6	5,6	$y = 0,4138x - 0,0987$
Paracetamol	1,8	6,7	2,0	2,0	$y = 0,0256x + 0,0496$
Phenazon	0,3	1,0	3,2	3,2	$y = 0,1161x + 0,0111$
Sildenafil	1,9	7,3	1,2	1,2	$y = 0,0120x + 0,0022$

Auf Grund der abweichenden Matrix sollte anschließend die Eignung dieser Kalibrierung für Messungen in anderen ähnlichen Matrices überprüft werden. Dazu wurden jeweils 6 Proben Trinkwasser und Oberflächenwasser mit den Analyten gespikelt, aufgearbeitet und vermessen. In Tabelle 13 sind die mittleren Wiederfindungsraten (WR) und die Konzentrationen im Vergleich zu gespiktem Mineralwasser dargestellt. In Anhang IV sind die kompletten Daten aufgeführt.

Tabelle 13: Wiederfindungsraten (WR) in verschiedenen Matrices

Analyt	Mineralwasser		Trinkwasser		Saalewasser	
	ng/L	WR [%]	ng/L	WR [%]	ng/L	WR [%]
Amitriptylin	3,0	94,9	30,0	94,3	65,0	94,0
Bezafibrat	23,0	93,0	68,9	88,8	67,4	78,5
Carbamazepin	3,0	93,2	30,0	90,8	175,0	86,6
Diazepam	30,0	96,7	50,0	92,3	100,0	85,2
Diclofenac	17,7	105,8	53,1	94,7	344,2	90,2
17 $\beta$ -Estradiol	40,6	85,3	101,5	82,7	513,8	79,7
Estron	14,1	75,2	28,1	89,6	54,6	89,6
17 $\alpha$ -Ethinylestradiol	74,1	77,5	444,4	89,4	500,0	116,8
Fenoprofen	20,0	88,6	60,0	88,5	67,5	72,9
Gemfibrozil	13,9	92,8	40,7	88,5	20,6	81,9
Ibuprofen	42,2	95,4	163,0	92,0	185,0	86,3
Naproxen	48,3	94,5	163,0	93,4	79,2	84,8
Opipramol	3,0	96,3	30,0	104,2	60,0	82,6
Paracetamol	30,0	65,7	60,0	62,3	75,0	58,5
Phenazon	3,0	96,8	30,0	89,1	65,0	84,3
Sildenafil	40,0	104,5	60,0	106,4	100,0	97,4

Der Matrixeinfluss führt bei Oberflächenwasser bei den meisten Analyten zu einer Verschlechterung der Wiederfindungsraten. Ungeachtet dessen liegen die Werte im Bereich der Richtigkeit von quantitativen Methoden im Bereich unter 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  gemäß der Entscheidung 2002/657/EG von -50 bis + 20 %. Im Rahmen der Untersuchungen von zahlreichen Messungen an Oberflächenwässern kam es bei einigen Massenspuren zu Matrixpeaks und erhöhtem Untergrund. Um die relative Ergebnissunsicherheit zu verringern, wurde die Bestimmungsgrenze für alle Analyten bei denen diese durch die Berechnung nach DIN 32645 unter 5 ng/L lag auf 5 ng/L festgelegt.

#### 4.5.4 Standardaddition

Die Quantifizierung kann neben der externen Kalibrierung auch über die Standardaddition (SDA) erfolgen. Hierbei werden der zu untersuchenden Probe oder Messlösung definierte Mengen an Analyt zugegeben und sequentiell vermessen. Die erhaltenen Messwerte werden gegen die resultierende Konzentration aufgetragen. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse gibt den negativen Wert der Konzentration der Probe an. Dies soll in Abb. 49 am Beispiel von Ibuprofen verdeutlicht werden. Hierfür wurden einer Probe mit einer Ibuprofenkonzentration von 20 µg/L in fünf Schritten bis auf 72 µg/L aufgestockt.

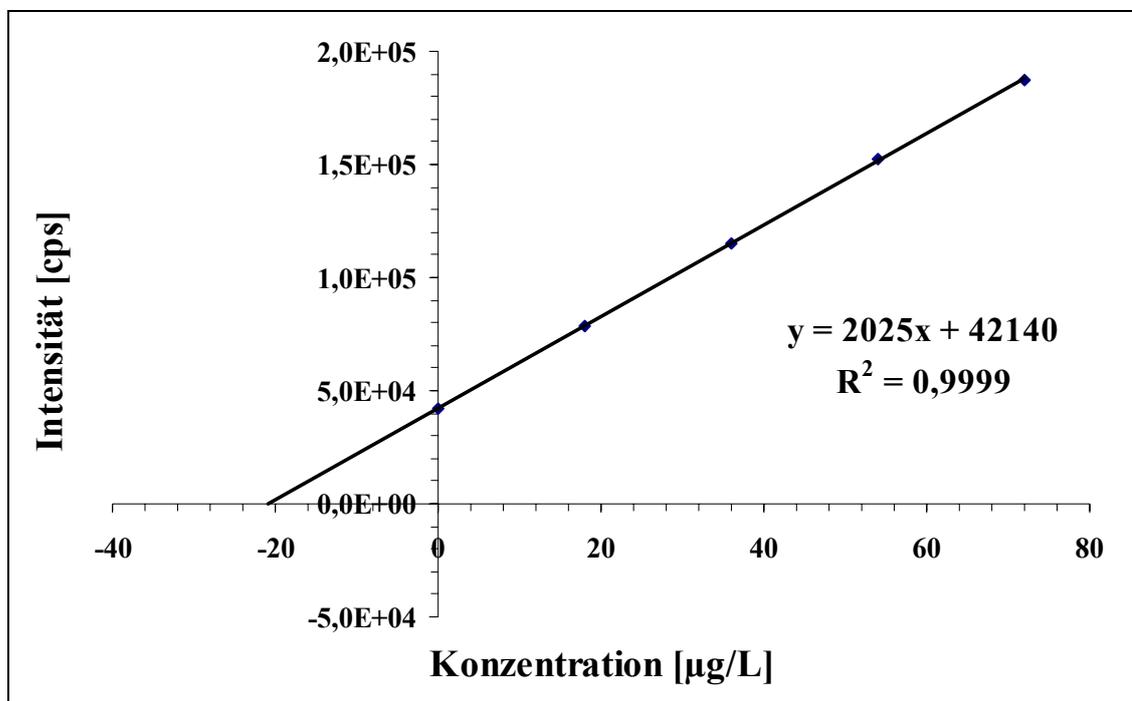


Abb. 49: Manuelle Standardaddition (Ibuprofen 20 µg/L)

Der Vorteil dieser Methode ist die direkte Messung in der Matrix. Sie stellt daher eine Möglichkeit dar, störende Einflüsse durch variierende Matrixzusammensetzung zu erkennen. Der Nachteil ist die höhere Analysendauer bzw. der erhöhte Aufwand bei der Probenaufarbeitung und die benötigte Probenmenge. Weiterhin ist die Standardaddition nur schwer in die Qualitätssicherung zu integrieren. Sie wird vor allem zur Ermittlung der Präzision eines Verfahrens eingesetzt, ist jedoch kein Bestandteil der DIN 32645 als Grundlage für die Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Diese Parameter müssen über eine externe Kalibriergerade berechnet werden. Die Standardaddition darf nur innerhalb des linearen Bereichs der Kalibrierfunktion angewandt werden.

Da bei der Entwicklung dieser Methode mit unterschiedlichen Matrices gerechnet werden musste, sollte die Standardaddition als Absicherung der externen Kalibrierung dienen. Allerdings konnte dies auf Grund des enormen Arbeitsaufwands und der Kosten sowie der geringen Menge Messlösung nach der Anreicherung nicht in der oben beschriebenen Form realisiert werden. Es musste daher eine Möglichkeit gefunden werden, die Messlösung trotz des geringen Volumens aufzustocken. Dies konnte durch Programmierung des verwendeten Autosamplers realisiert werden. Dieser wurde in der Form eingestellt, dass er jeweils 10  $\mu\text{L}$  der Probe und 1-5  $\mu\text{L}$  eines Standards aufnimmt und injiziert. Als Beispiel ist in Abb. 50 eine Probe mit 20  $\mu\text{g/L}$  Ibuprofen, vermessen mit automatisierter Standardaddition, dargestellt.

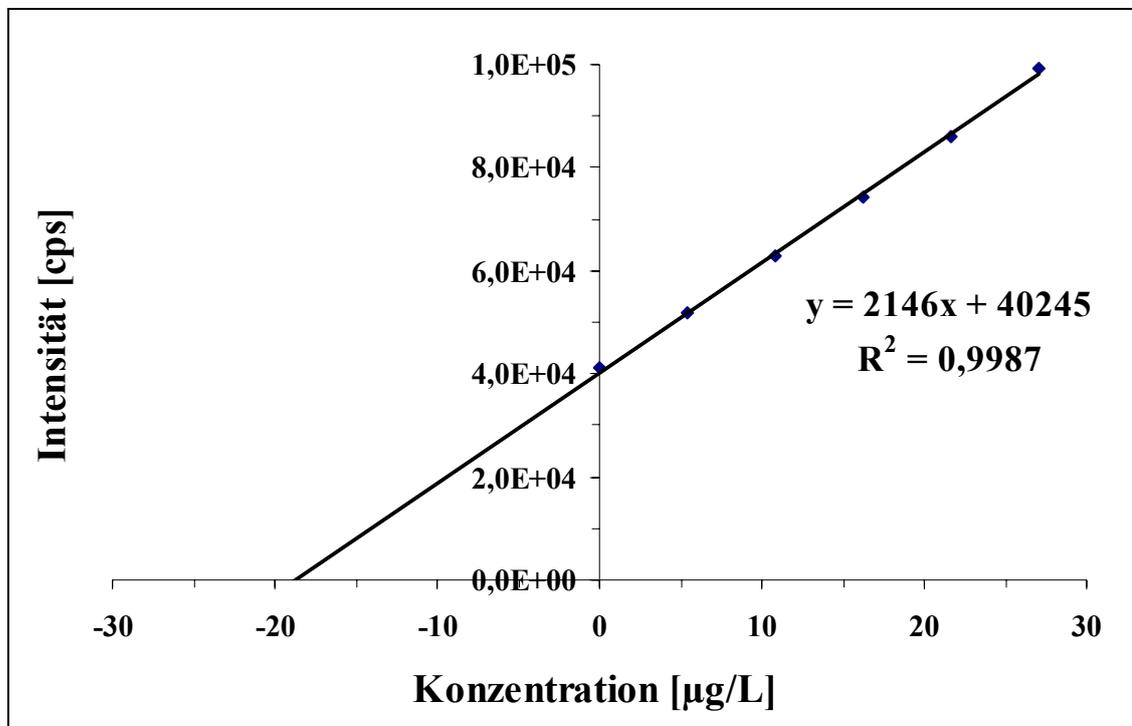


Abb. 50: Standardaddition mit dem Autosampler (Ibuprofen 20  $\mu\text{g/L}$ )

Auf Grund der geringen Volumina und der fehlenden Durchmischung des Standards und der Probe in der Probenschleife wurde in den meisten Fällen ein schlechteres Bestimmtheitsmaß der linearen Regression als bei der manuellen Standardaddition erreicht. In Tabelle 14 werden die Ergebnisse der manuellen und der automatischen Standardaddition gegenüber gestellt.

**Tabelle 14: Wiederfindung bei manueller und automatischer Standardaddition (SDA)**

<b>Analyt</b>	<b>Soll-Konzentration [µg/L]</b>	<b>manuelle SDA [µg/L]</b>	<b>automatische SDA [µg/L]</b>
Bezafibrat	20	21	19
Diclofenac	20	23	21
Estradiol	70	76	67
Estron	70	77	68
Ethinylestradiol	70	73	74
Fenoprofen	20	22	27
Gemfibrozil	15	17	17
Ibuprofen	20	21	19
Naproxen	20	22	22
Paracetamol	50	54	54

Die Standardaddition stellt somit eine geeignete und leicht zu automatisierende Methode zur Überprüfung der Ergebnisse dar. Allerdings verlängert sich die Analysenzeit je nach verwendeter HPLC-Methode erheblich.

Mit dem ständigen Wechsel zwischen Probe und Standard erhöht sich die Gefahr der Verschleppung der Analyten in die nächste Probe. Diese hängt stark vom eingesetzten Autosampler und den Analyten ab. Um eine solche Verschleppung auszuschließen wurde eine Messserie mit 100 Messungen durchgeführt. Dabei wurde jeweils der Standard injiziert und anschließend zwei Mal Methanol. Die intensivsten Verschleppungen wurden bei Bezafibrat und Fenoprofen festgestellt. In Abb. 51 bis Abb. 53 ist die Entwicklung der gemessenen Intensitäten dieser Analyten im Methanolvial dargestellt.

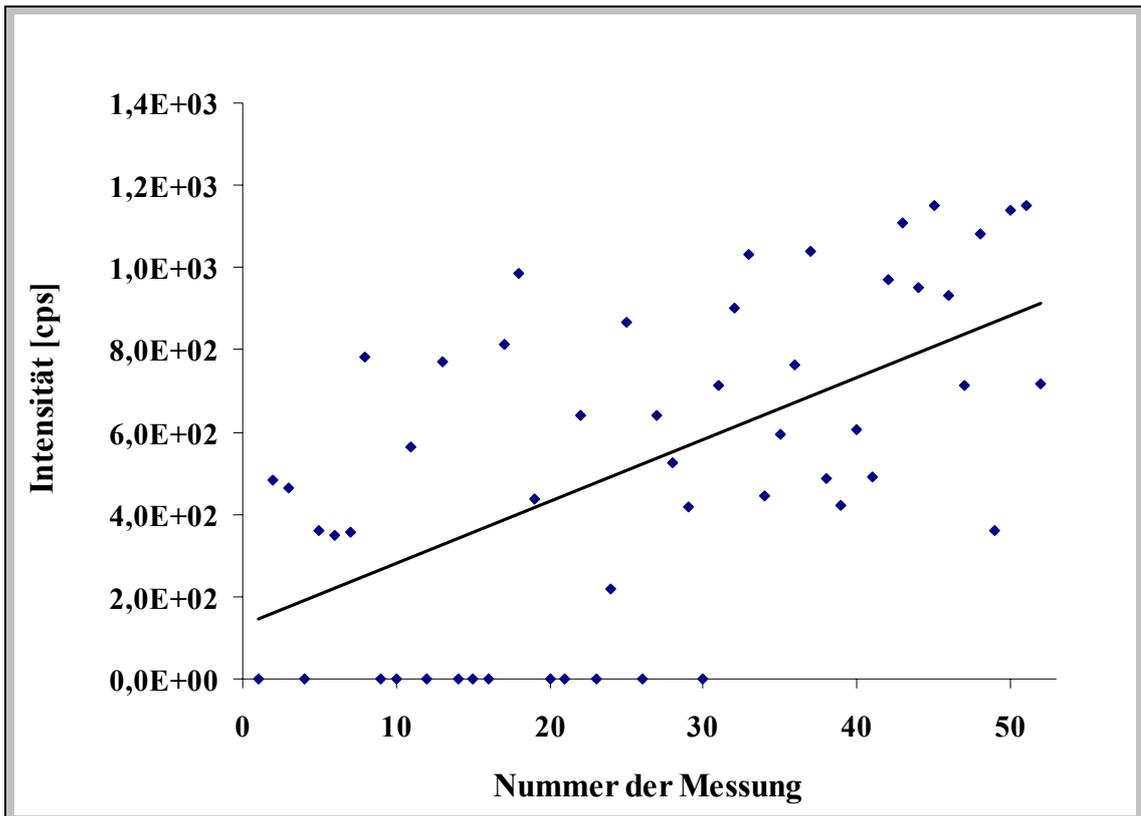


Abb. 51: Entwicklung der Intensität des Bezafibratsignals bei der Standardaddition (100 Injektionen) im Methanolleerwert

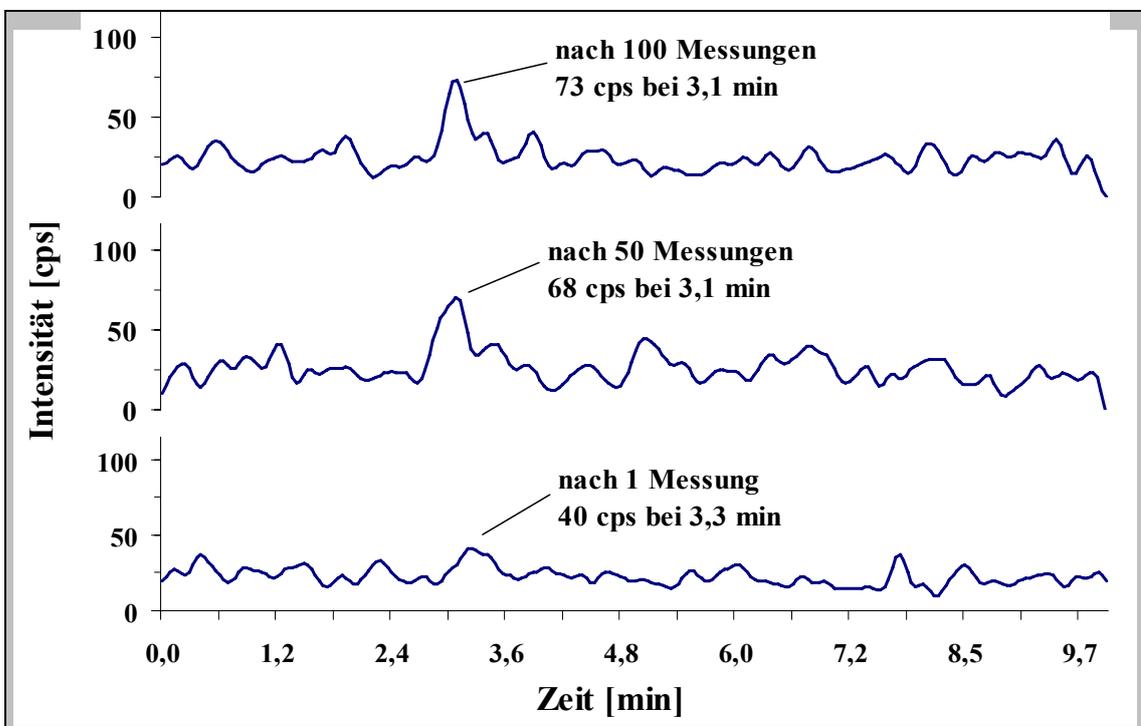


Abb. 52: Chromatogramme zur Entwicklung der Intensität des Bezafibratsignals bei der Standardaddition (100 Injektionen) im Methanolleerwert

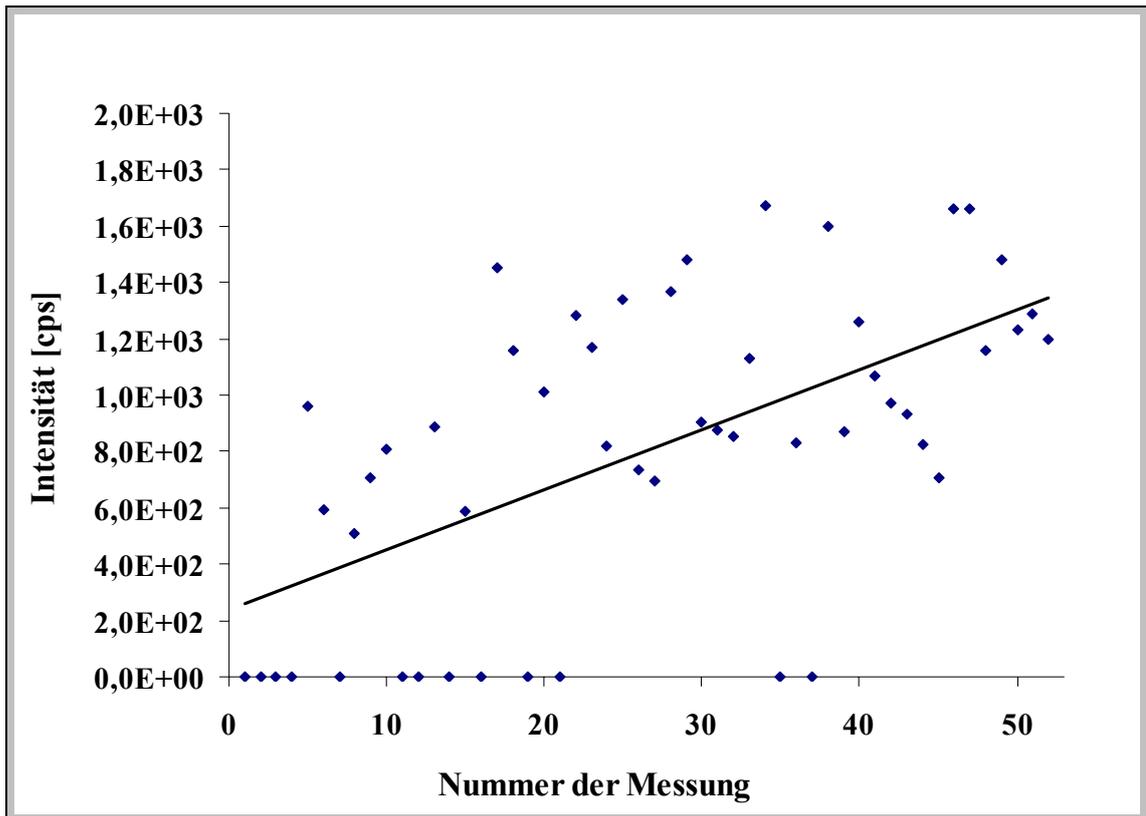


Abb. 53: Entwicklung der Intensität des Fenoprofensignals bei der Standardaddition (100 Injektionen) im Methanolleerwert

Aus den oben dargestellten Abbildungen wird ersichtlich, dass ein Trend in der Signalentwicklung zu erkennen ist, allerdings liegt die Intensität auch nach 100 Messungen um eine Zehnerpotenz unter der des kleinsten Standards. Darüber hinaus wird jedes Vial bei der Quantifizierung mittels Standardaddition in der Regel lediglich fünf Mal vermessen. Auf Grund der geringen Intensität kann auch eine Verschleppung in die nächste Probe gegenüber dem Grundrauschen vernachlässigt werden. Dementsprechend ist die automatisierte Standardaddition mit der vorhandenen Gerätekonfiguration eine praktikable Kontrollmethode.

## 5 Untersuchung von Oberflächengewässern

In einem Sonderbericht der Arbeitsgemeinschaft zur Reinhaltung der Elbe [16] wurden in den Jahren 1998 bis 2000 Arzneimittelrückstände in Elbe, Saale und den Nebenflüssen bestimmt, wobei nur fünf Proben auf das Einzugsgebiet Halle entfielen. Im Rahmen dieser Messungen wiesen Diclofenac und Carbamazepin mit 184 ng/L und 167 ng/L die höchsten Medianwerte auf. Allerdings konnten auch Phenazon und Ibuprofen in mehr als der Hälfte der Proben nachgewiesen werden. Auch im Bericht des Bund/Länderausschusses für Chemikaliensicherheit [17] konnte in Oberflächengewässern Diclofenac und Carbamazepin in mehr als der Hälfte der Proben bestimmt werden. Dagegen lagen die Konzentrationen für Estradiol, Estron, Ethinylestradiol und Diazepam bei mehr als 98 % der Proben unterhalb der Bestimmungsgrenzen (1 ng/L für Steroide bzw. 50 ng/L für Diazepam). Darüber hinaus konnten in Kläranlagenabläufen viele Arzneimittelwirkstoffe im µg/L-Bereich bestimmt werden.

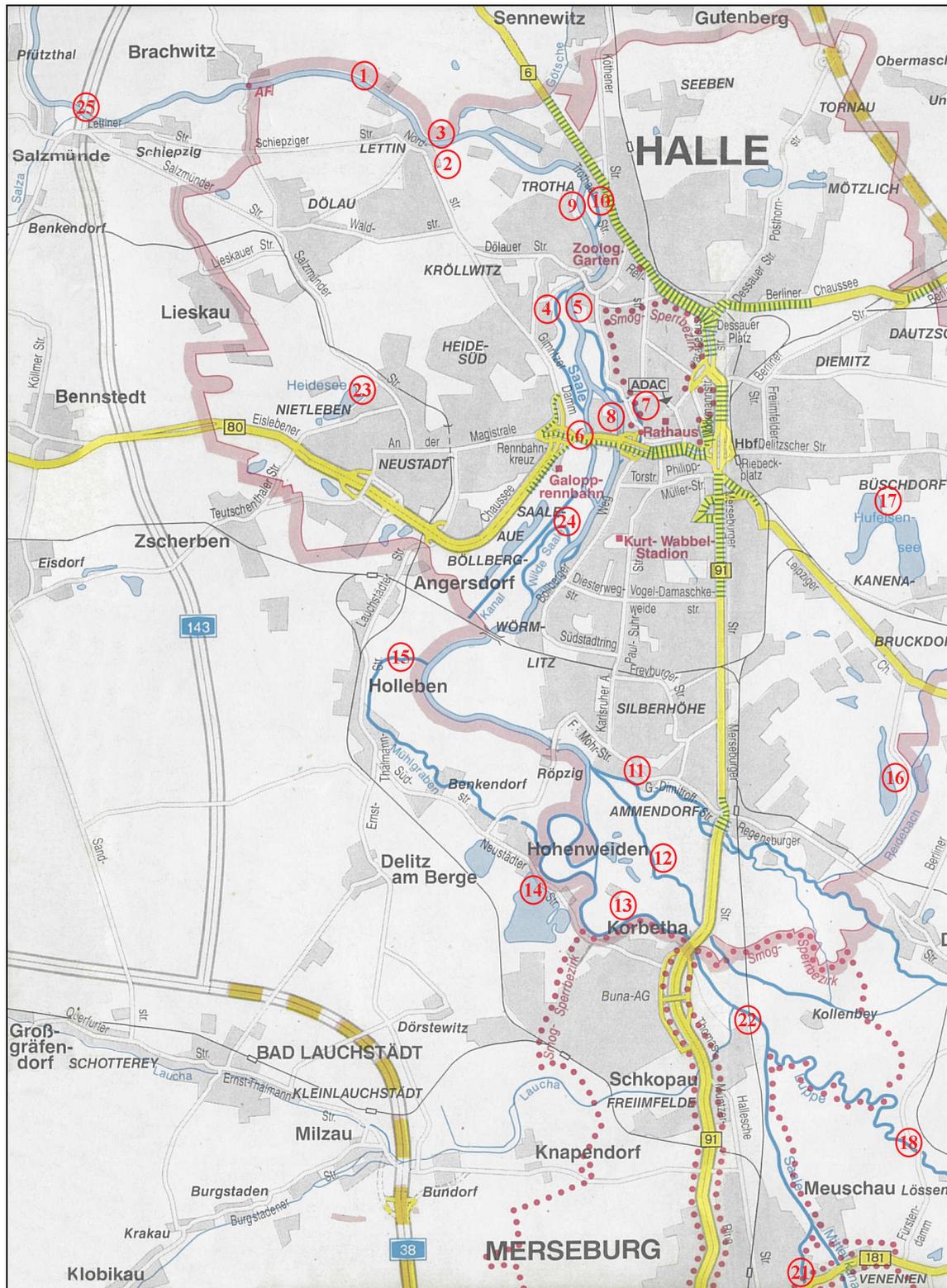
Durch gezielte Probenahme an verschiedenen Stellen der Saale, ihrer Nebenflüsse und größerer Seen im Einzugsbereich der Stadt Halle sollten die Konzentrationen ausgewählter Arzneimittelrückstände mit der zuvor erstellten Methode bestimmt und mit Hilfe dieser Daten ein Profil des Arzneimitteleintrags und die Arzneimittelfracht ermittelt werden. Zusätzlich wurde in jeder Probe der DOC (engl. *dissolved organic carbon*) bestimmt. Dieser stellt einen Summenparameter dar, der die Belastung des Wassers mit organischen Substanzen wie z. B. Huminstoffe erfasst. Er sagt jedoch nichts über die Art und Menge der im Wasser vorliegenden Verbindungen aus [62].

Die Probenahmestellen wurden so gewählt, dass sowohl die Belastung über die Nebenflüsse als auch Verdünnungs- oder Abbaueffekte deutlich gemacht werden können. Außerdem sollten sich mögliche Einflüsse von Kläranlagen und Kleingartenanlagen sowie von unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten paralleler Nebenarme abschätzen lassen. Die Probenahmestellen sind in Tabelle 15 und zur Verdeutlichung in Abb. 54 dargestellt. Die Proben wurden stichprobenartig genommen, innerhalb von 24 Stunden nach der Probenahme aufgearbeitet, vermessen und in dieser Zeit bei 4 °C gelagert. Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Im Bereich der Bestimmungsgrenze liegt die Schwankungsbreite der Doppelbestimmung bei ±15 %, bei höheren Werten bei ±10 %.

Tabelle 15: Bezeichnung der Probenahmestellen

Nummer	Ort	pH-Wert	Temperatur [°C]	Probenahme
Probe 1	Lettin	7,82	23,0	26.06.2006
Probe 2	Hechtgraben; Saalezufluss Lettin	7,40	17,4	26.06.2006
Probe 3	Kläranlageneinleitung Lettin (Saale km 86)	7,83	19,1	26.06.2006
Probe 4	Wilde Saale; Ernst-Grube-Straße	7,88	23,0	26.06.2006
Probe 5	Saale (km 91)	7,63	22,7	26.06.2006
Probe 6	Elisabeth-Saale (EVH-Zentrum)	7,80	23,2	26.06.2006
Probe 7	Mühlpforte	7,87	23,2	26.06.2006
Probe 8	Saale; Sophienhafen	7,80	23,2	26.06.2006
Probe 9	Saale; hinter Wehr Kröllwitz/Trotha	8,00	23,8	26.06.2006
Probe 10	Wehr Trotha	7,94	24,0	26.06.2006
Probe 11	Weißer Elster; Mündung in die Saale	7,83	24,2	26.06.2006
Probe 12	Stilles Wasser	7,83	23,4	27.06.2006
Probe 13	Saale (km 106)	7,80	23,3	27.06.2006
Probe 14	Rattmansdorfer See	8,15	25,2	27.06.2006
Probe 15	Mühlgraben; Holleben	7,40	-	27.06.2006
Probe 16	Osendorfer See	7,98	25,0	27.06.2006
Probe 17	Hufeisensee	7,89	24,3	27.06.2006
Probe 18	Luppe	7,47	24,5	27.06.2006
Probe 19	Saale; Bad Dürrenberg (km 126)	7,47	24,5	27.06.2006
Probe 20	Saale; Leuna (Am Stadtpark)	7,88	22,5	27.06.2006
Probe 21	Saale; Merseburg (Bootshaus)	7,77	23,0	27.06.2006
Probe 22	Saale; Schkopau (km 109)	7,67	23,0	27.06.2006
Probe 23	Heidensee	7,69	-	27.06.2006
Probe 24	Wilde Saale (Rabeninsel)	7,82	-	27.06.2006
Probe 25	Saale (Salzmünde)	7,75	21,0	28.06.2006
Probe 26	Saale (Trebitz)	7,66	24,0	28.06.2006
Probe 27	Saale; vor Alsleben (km 32)	7,65	23,5	28.06.2006

Die Proben 26 und 27 befinden sich nördlich des Kartenausschnittes saaleabwärts und die Proben 19 und 20 südlich saaleaufwärts.



©Mit freundlicher Genehmigung der CartoTravel Verlag GmbH & Co. KG entnommen aus dem Stadtplan Halle/Saale

Abb. 54: Probenahmestellen im Bereich Halle/Saale

In Abb. 55 ist das Konzentrationsprofil für Bezafibrat, Paracetamol, Ibuprofen, Carbamazepin, Phenazon und Diclofenac dargestellt. Die Proben 14, 16, 17 und 23 wurden den umliegenden Seen entnommen, während die grau dargestellten Proben die Saalezuflüsse darstellen. Die kompletten Ergebnisse sind in Anhang V aufgeführt.

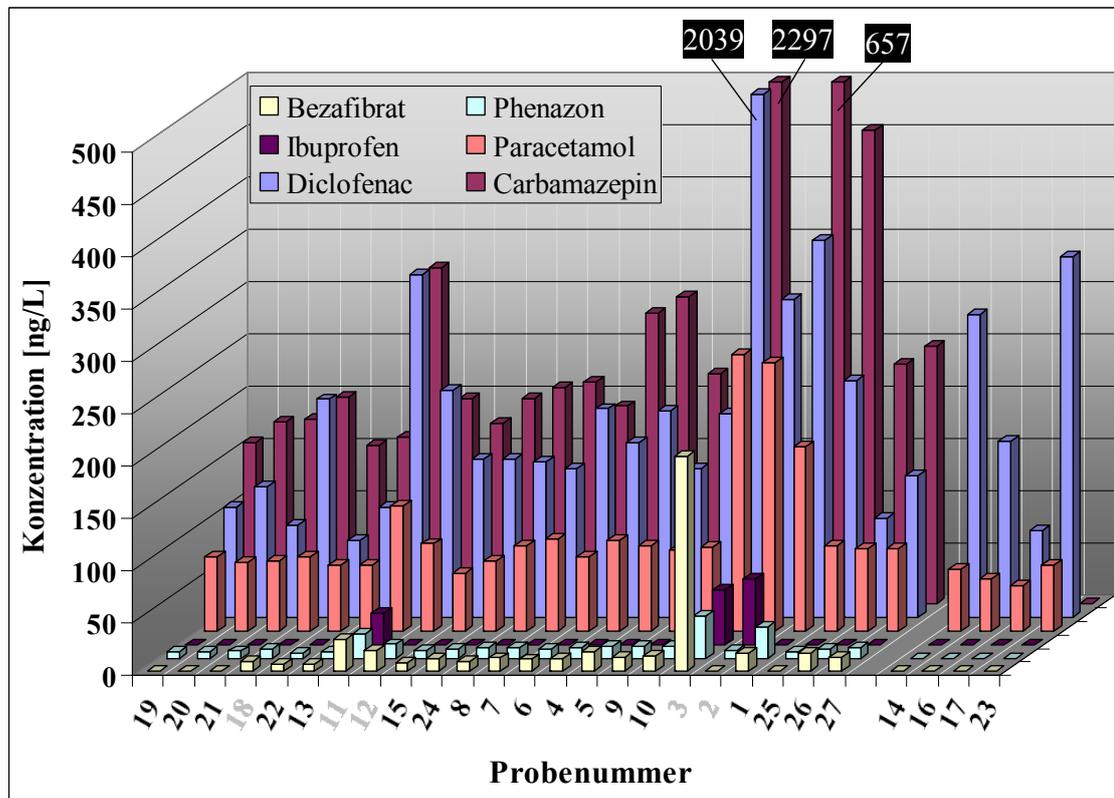


Abb. 55: Konzentrationen ausgewählter Arzneimittelwirkstoffe in der Saale und ihrer Zuflüsse (grau) von Bad Dürrenberg (19) bis Alsleben (27)

Im Rahmen dieser Probenserie konnte das nahezu ubiquitäre Vorkommen von Carbamazepin (Medianwert 202,5 ng/L) und Diclofenac (Medianwert 166,9 ng/L) in Flüssen belegt werden. Aber auch Paracetamol wurde mit einem Medianwert von 77,3 ng/L in allen Proben bestimmt. Weiterhin zeigten Nebenflüsse wie Weiße Elster (Probe 11), Luppe (Probe 18) oder Stilles Wasser (Probe 12) deutlich höhere Belastungen als die Saale selbst. Die hohen Belastungen der Weißen Elster sind vor allem auf die Kläranlage Leipzig-Rosenthal (500.000 Einwohnerwerte) aber auch auf die Kläranlagen Plauen und Gera (über 100.000 Einwohnerwerte) zurückzuführen [16]. Trotz der stark differierenden Abflusswerte und dem damit verbundenen Verdünnungseffekt ist ein deutlicher Eintrag in die Saale vor allem bei Stoffen wie Bezafibrat, Paracetamol oder Phenazon (Probe 13 bis Probe 8 Steigerung von 30-80 %) zu erkennen. Im Stadtbereich Halle konnten dagegen keine signifikanten Schwankungen der Konzentrationen der einzelnen

Arzneimittelwirkstoffe nachgewiesen werden, was für einen geringen direkten Abwasereintrag in die Saale spricht. In einem Teil der parallel fließenden Seitenarme der Saale (Proben 6, 7 und 8) konnte kein Trend zu höheren oder niedrigeren Werten beobachtet werden, während im Verlauf des Mühlgrabens (Probe 15) eine Erhöhung der Konzentrationen der Wirkstoffe nachgewiesen wurde, was durchaus mit den anliegenden Grundstücken und dem damit verbundenen Eintrag zu erklären ist. In Probe 4 als einen weiteren Seitenarm der Saale ist dagegen eine deutliche Verringerung der Konzentration gegenüber dem Hauptarm (Probe 5) zu erkennen. Dem entsprechend kann hier von einem Abbau der Wirkstoffe bzw. der Elimination durch Adsorption an Partikeln und anschließender Sedimentation auf Grund der niedrigeren Fließgeschwindigkeit ausgegangen werden.

Für das Abbauverhalten speziell in unterschiedlichen Fließgewässern existieren derzeit noch keine umfassenden Untersuchungen, allerdings wurde die Elimination verschiedener Arzneimittelrückstände bei der Klärwerkspassage bereits von mehreren Arbeitsgruppen ermittelt (Tabelle 16).

**Tabelle 16: Elimination und biologische Abbaubarkeit verschiedener Arzneimittelwirkstoffe bei der Klärwerkspassage (k. A. - keine Angaben)**

Arzneimittelwirkstoff	Elimination		Abbaubarkeit [16]
Diclofenac	69 %	[63]	sehr gering
Ibuprofen	58-90 %	[64]	gut
	75 %	[65]	
	96 %	[66]	
Carbamazepin	0-7 %	[63]	kein Abbau
Paracetamol	>99 %	[64]	sehr gut
Bezafibrat	75 %	[63]	k.A.
	50 %	[65]	
Phenazon	33 %	[63]	k.A.
Naproxen	66 %	[63]	sehr gering
	78 %	[65]	
Gemfibrozil	69 %	[64]	k.A.
	46 %	[65]	

Mit Elimination ist an dieser Stelle die Verringerung der Konzentration eines Arzneimittelwirkstoffes beim Passieren der Kläranlage durch Adsorption und/oder Abbau gemeint, da jeweils nur die Konzentrationen vor und nach der Reinigung untersucht wur-

den. Da die Angaben über die biologische Abbaubarkeit in Kläranlagen ermittelt wurden, sind sie in dieser Form nur tendenziell auf Fließgewässer übertragbar [67]. Allgemein werden Arzneimittel als schwer oder nicht abbaubar eingestuft und gelten daher in Gewässern als persistent [16, 20]. Eine Verringerung der Konzentrationen ist vor allem auf Verdünnungseffekte durch weniger belastete Zuflüsse oder Adsorptionsvorgänge zurück zu führen. Eine Ausnahme bei den untersuchten Substanzen bilden Paracetamol und Ibuprofen. Auf Grund ihrer deutlich besseren Abbaubarkeit (vgl. Tabelle 16) sind die ermittelten Konzentrationen trotz der deutlich höheren Verkaufsmengen vergleichsweise gering [16]. Dies macht deutlich, dass in weiterführenden Untersuchungen verstärkt die Metabolite einbezogen werden müssen [68].

Die ähnliche Persistenz der Arzneimittelwirkstoffe erklärt die Tatsache, dass trotz unterschiedlicher Konzentrationen der untersuchten Substanzen ihr Verteilungsmuster im Längsverlauf der Saale relativ konstant ist. Abweichend hierzu zeigt Carbamazepin mit Ausnahme der Mündungen höher belasteter Nebenflüsse einen kontinuierlichen Anstieg der Konzentration, was mit seiner sehr hohen Persistenz korreliert.

Ein abweichendes Verteilungsmuster unter den Fließgewässern wiesen stark mit Abwasser belastete Abschnitte wie die Weiße Elster (Probe 11) und der Kläranlagenabfluss Halle Nord (Probe 3) sowie der Hechtgraben (Probe 2) auf. Dieser führt im Norden von Halle entlang zahlreicher Kleingärten und Randbezirke und enthält überdurchschnittlich hohe Konzentrationen an rezeptfreien häufig angewandten Arzneimittelwirkstoffen wie Paracetamol (257 ng/L), Ibuprofen (63 ng/L) und Diclofenac (305 ng/L), während die Belastung mit dem rezeptpflichtigen Carbamazepin (58 ng/L) deutlich geringer ausfiel. Diese Ergebnisse sprechen für einen erhöhten Eintrag von Abwässern z. B. aus privaten Kläranlagen oder der direkten Einleitung. Der sehr starke Eintrag von organischen Verunreinigungen wird zusätzlich durch den höchsten DOC-Wert der untersuchten Fließgewässer von 17 mg/L bestätigt. Eine Gegenüberstellung der DOC-Werte und der Summe der untersuchten Arzneimittelwirkstoffe ist in Abb. 56 dargestellt.

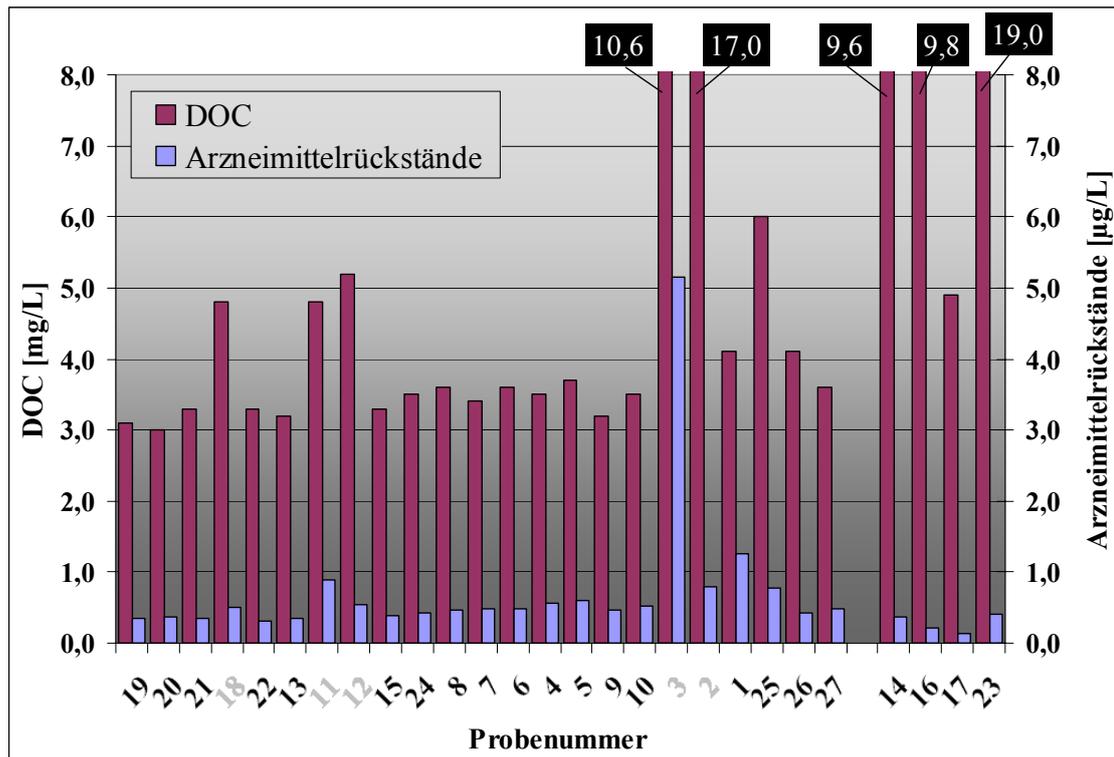


Abb. 56: Gegenüberstellung der Arzneimittelbelastung mit dem DOC

Bezug nehmend auf die DOC-Werte kann die Saale noch als gering belastet eingestuft werden. So liegen die DOC-Werte für die Elbe bei Magdeburg bei 5 mg/L [69] und für den Rhein bei Koblenz bei 3 mg/L [70]. Allerdings weisen Proben mit erhöhter Arzneimittelbelastung auch eine höhere Belastung mit organischen Verbindungen auf. Besonders deutlich wird dies wie bereits erwähnt beim Hechtgraben und beim Kläranlagenabfluss Halle Nord (Proben 2 und 3). Ein anderes Bild ergibt sich bei den untersuchten Seen. Hier konnte trotz meist sehr hoher DOC-Konzentration nur Paracetamol und Diclofenac bestimmt werden, was für einen geringen Abwassereintrag spricht. Obwohl die untersuchten Gewässer als Badeseen genutzt werden, ist der Eintrag durch die Badegäste in dieser Größenordnung nicht zu erwarten, v. a. da der Hufeisensee (Probe 17) trotz intensiver Nutzung (Badensee, Campingplatz, Wassersport) relativ gering belastet ist. Eine Ursache für das abweichende Verteilungsmuster und damit für den Eintrag konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden.

Die höchsten Wirkstoffkonzentrationen der analysierten Proben wurden im Abfluss der Kläranlage Halle Nord gemessen. Diese wurde 1998 in Betrieb genommen und reinigt das Abwasser von ca. 260.000 Menschen in und um Halle. Dies entspricht einer Trockenwetterleistung von ca. 45.000 m<sup>3</sup>/Tag bzw. einer Mischkanalleistung von bis zu 80.000-90.000 m<sup>3</sup>/Tag (Summe aus Abwasser und Regenwasser). Der Abwasserweg

besteht aus der mehrfachen mechanischen Reinigung, der Denitrifikation, der Nitrifikation sowie der chemischen und biologischen Phosphorelimination. Die Reinigungsleistung der Anlage wird regelmäßig gemäß der Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer (Abwasserverordnung) im Abwasserlabor überprüft. Auf Grund fehlender gesetzlicher Vorgaben sind Arzneimittelwirkstoffe kein Bestandteil dieser routinemäßigen Kontrollen. Konzentrationen von 2,3 µg/L für Carbamazepin und 2,0 µg/L für Diclofenac bestätigen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen in Abläufen vergleichbarer Kläranlagen [16, 17, 21] und machen die Notwendigkeit einer regelmäßigen Überprüfung auf Arzneimittelrückstände deutlich. In Tabelle 17 sind die berechneten Wirkstofffrachten für die Saale (98,9 m<sup>3</sup>/s mittlerer Abfluss am Pegel Trotha), die Weiße Elster (25,3 m<sup>3</sup>/s mittlerer Abfluss an der Mündung) sowie die Kläranlage Halle Nord (Trockenwetterleistung 0,52 m<sup>3</sup>/s) im Vergleich mit dem Verkauf der Wirkstoffe 2001 (nach Intercontinental Marketing Services Health AG und Umweltbundesamt) dargestellt. Der Verkauf der restlichen Wirkstoffe ist in Anhang VI aufgeführt.

**Tabelle 17: Berechnete Fracht<sup>1</sup> der Saale, der Weißen Elster und der Kläranlage Halle Nord für ausgewählte Arzneimittelwirkstoffe im Vergleich zur Verkaufsmenge von 2001 [17]**

	Saale [g/Tag]	Weiße Elster [g/Tag]	Kläranlage [g/Tag]	Verkaufsmenge [kg/a]
Diclofenac	1.216,6	716,2	91,8	85.801
Carbamazepin	1.883,4	703,5	103,4	87.605
Paracetamol	660,3	260,9	11,9	654.418 <sup>2</sup>
Bezafibrat	116,3	66,6	9,3	33.476
Phenazon	93,7	50,8	1,8	24.843
Ibuprofen	-	66,0	2,3	344.885

<sup>1</sup>Sämtliche Werte haben Stichprobencharakter, wobei die Mittelwerte herangezogen wurden.

<sup>2</sup>Verkaufsmenge 1999

Es ist zu erkennen, dass sowohl die Weiße Elster als auch die Kläranlage Halle Nord trotz der geringen Abflusswerte einen signifikanten Beitrag zur Arzneimittelbelastung der Saale leisten. Im Vergleich zur Verkaufsmenge (Tabelle 17) ist die ermittelte Fracht in der Saale allerdings verhältnismäßig gering. Bedenkt man jedoch, dass nur ein Teil der Arzneimittel tatsächlich ins Abwasser gelangen und die Saale einer der kleineren deutschen Flüsse ist, geben die Werte weiterhin Anlass zur Besorgnis.

Abschließend werden die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse denen der Arbeitsgemeinschaft zur Reinhaltung der Elbe (ARGE Elbe) gegenüber gestellt (Tabelle 18).

**Tabelle 18: Gegenüberstellung der Ergebnisse der ARGE Elbe mit den eigenen Untersuchungen**

Probenahme- stelle	Carbamazepin [ng/L]		Diclofenac [ng/L]		Fenoprofen [ng/L]		Phenazon [ng/L]	
	[16]	aktuell	[16]	aktuell	[16]	aktuell	[16]	aktuell
Merseburg	62	177	104	88	< 1	< 5	12	7
Planena	- <sup>1</sup>	160	110	105	< 1	6	19	6
Weißer Elster	717	322	349	327	1	12	79	23
Kröllwitz	106	210	230	196	2	7	45	12
Wettin	167	454	237	225	4	< 5	14	6
Alsleben	75	250	178	135	1	< 1	50	10

<sup>1</sup>keine Messwert vorhanden

Es ist zu erkennen, dass sich keine allgemein gültige Aussage über eine Erhöhung oder Verringerung der Wirkstoffkonzentrationen treffen lässt. So waren die Konzentrationen bei Carbamazepin meist höher und bei Phenazon niedriger als vor 6 Jahren. Diclofenac wies dagegen genauso wie Fenoprofen kaum Veränderungen auf. Allerdings soll an dieser Stelle noch einmal auf den Stichprobencharakter der Messungen hingewiesen werden. Die Konzentrationen variieren in bestimmten Grenzen in Abhängigkeit von der Wassermenge, den Temperaturen und der Einsatzmenge (z. B. Grippewellen). Darüber hinaus wurden die aktuellen Proben im Juni und die Vergleichproben der ARGE Elbe im November gezogen. Trotz dieser Einschränkungen kann im Rahmen dieser Arbeit der Konzentrationsverlauf der Substanzen (Tabelle 18) im Längsprofil der Saale bestätigt werden. Das lässt darauf schließen, dass sich die bedeutenden Eintragspfade sowie die Verteilungswege nicht verändert haben.

## 6 Zusammenfassung

Seit dem Nachweis von Clofibrinsäure in vielen aquatischen Systemen um Berlin Anfang der 90er Jahre ist die Anzahl der nachgewiesenen Arzneimittelrückstände kontinuierlich gestiegen. Dieser Arzneimiteleintrag in die Umwelt führte sowohl in aquatischen als auch in nichtaquatischen Systemen zu schweren Schädigungen der Fauna [71]. Andererseits wird mittlerweile das Vorkommen einer Reihe von Arzneimittelwirkstoffen wie Carbamazepin und Diclofenac als ubiquitär angesehen. Obwohl das öffentliche Interesse in den letzten Jahren deutlich gestiegen ist und die rechtlichen Grundlagen zur ökotoxikologischen Bewertung von Arzneimitteln stetig verbessert wurden, gibt es noch einen erheblichen Bedarf bei der Erforschung der Abbauwege und dem Einfluss auf die Umwelt.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden 16 wichtige Arzneimittelwirkstoffe unterschiedlicher Wirkstoffklassen und Strukturen ausgewählt. Hierbei kamen Vertreter der Analgetika, der Lipidsenker, der Hormone, der Psychopharmaka und der Phosphodiesterase-Typ5-Hemmer zum Einsatz. Chemisch betrachtet, handelte es sich um organische Säuren, basische und stickstoffhaltige Verbindungen sowie Steroide. Somit wurden eine Vielzahl unterschiedlicher Strukturen und Polaritäten in der Methodenentwicklung berücksichtigt.

Für die Analytik von Arzneimittelrückständen standen die LC-MS/MS und die GC-MS zur Verfügung [72, 73]. Obwohl mittels GC-MS bei einigen Stoffen geringere Bestimmungsgrenzen zu erreichen sind, können die meisten Arzneimittelrückstände erst nach Derivatisierung bestimmt werden, während mit der LC-MS/MS eine direkte Messung möglich ist [74, 75]. Da ein zusätzlicher Derivatisierungsschritt sowohl den Zeit- als auch den Kostenaufwand erhöht und darüber hinaus eine zusätzliche Fehlerquelle darstellt, kam die LC-MS/MS als Analysenmethode zum Einsatz.

Derzeit gibt es keine standardisierte Methode für die Bestimmung von Arzneimittelwirkstoffen, weshalb viele unterschiedliche Strategien verfolgt werden [76, 77]. So wird einerseits häufig die positive Ionisation und andererseits die APCI bevorzugt [78]. Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass mit dem zur Verfügung stehenden Massenspektrometer die ESI die besten Ergebnisse liefert. Allerdings war es wegen der Strukturvielfalt der zu untersuchenden Verbindungen notwendig eine Methode mit negativer und eine zweite mit positiver Ionisation zu erstellen. Zu diesem Zweck wurden die Massenspektren aller Analyten aufgenommen und die stoffspezifischen Parameter des Massenspektrometers optimiert.

Da bei den zu untersuchenden Proben erhöhte Matrixbelastungen und Analytkonzentrationen im unteren bis mittleren ng/L-Bereich zu erwarten sind, kam die Festphasenextraktion zur Entfernung störender Komponenten und zur Anreicherung der Analyten zum Einsatz. Für diesen Zweck wurden 15 unterschiedliche Festphasenmaterialien untersucht, wobei das OASIS® HLB-Polymer den besten Kompromiss lieferte. Unter Verwendung dieser Festphasenkartusche wurden die weiteren Schritte der SPE optimiert.

Zur Kompensation von Matrixeffekten und Verlusten bei der Aufarbeitung wurde für die Quantifizierung bei der negativen Ionisation <sup>37</sup>Cl-markiertes Chloramphenicol und bei der positiven Ionisation deuteriertes Diazepam verwendet. So konnte für 13 von 16 Analyten eine Bestimmungsgrenze unterhalb des Schwellenwertes für die ökotoxikologische Bewertung von 10 ng/L erreicht werden.

Anhand der untersuchten Proben wurde bestätigt, dass Carbamazepin (Medianwert 202,5 ng/L) und Diclofenac (Medianwert 166,9 ng/L) an vielen Stellen der Saale enthalten sind und dass der Abwasserpfad die wichtigste Eintragsquelle für Arzneimittelwirkstoffe in die Umwelt darstellt. Innerhalb der Stadt Halle (Saale) ist jedoch kein Eintrag dieser Stoffe, zum Beispiel durch defekte Kanalisationssysteme oder direkten Eintrag von nicht an die Kanalisation angeschlossenen Gebäuden nachweisbar. Kleine Seitenarme können jedoch infolge des direkten Abwassereintrags zum Beispiel in Kleingartenanlagen eine erhöhte Arzneimittelbelastung aufweisen.

## 7 Ausblick

Da einerseits Arzneimittelwirkstoffe in vielen Oberflächengewässern inzwischen als ubiquitär gelten und andererseits jüngste Medienberichte zeigen, dass auch Trinkwasser in Einzelfällen nicht frei von diesen Stoffen ist, bedarf es in absehbarer Zeit einer Reglementierung seitens des Gesetzgebers. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine gesetzlichen Grenzwerte für Arzneimittelwirkstoffe in Trinkwasser sondern nur allgemeine Leitwerte. Hierbei werden toxikologisch nicht oder nur teilweise bewertbare Stoffe in vier Gruppen eingeteilt. Als vorläufige Leitwerte wurden in Abhängigkeit von der Datenbasis 0,1 bis 3 µg/L festgelegt. Gemäß dem toxikologischen Erfahrungswissen des UBA und internationaler Bewerter wurde bisher für keinen trinkwassergängigen Stoff lebenslang gesundheitlich duldbare Höchstkonzentrationen von deutlich unter 0,1 ng/L abgeleitet [79]. Unabhängig davon wird in den §§ 4 und 6 der Trinkwasserverordnung reines Wasser ohne Gesundheitsgefährdung und mit einem Minimum an chemischen Verunreinigungen gefordert, allerdings bezieht sich die Trinkwasserverordnung auf die „allgemein anerkannten Regeln der Technik bei vertretbarem Aufwand“. Weiterhin ist bei sämtlichen Betrachtungen zu Arzneimittelwirkstoffen zu berücksichtigen, dass in vielen Fällen keine Langzeitstudien bei täglicher Exposition vorliegen und eine Gesundheitsgefährdung somit nicht ausgeschlossen werden kann. Erst wenn eine ausreichende Datenmenge zur Verfügung steht, kann auch der Begriff „vertretbarer Aufwand“ zur Anwendung kommen. Schließlich steigt dieser proportional mit dem toxikologischen Potential der jeweiligen Substanz.

Neben den eigentlichen Arzneimittelwirkstoffen spielen auch deren Metabolite eine wichtige Rolle. Diese entstehen zum einen im menschlichen Körper und zum anderen bei der Kläranlagenpassage. Darüber hinaus ist die Wirkung vieler Metabolite nicht vollständig geklärt, vor allem weil Metabolisierungen wie Acetylierung oder Veresterung in-vivo wieder gespalten werden können. Da auch das Adsorptionsverhalten und die Abbauege dieser Stoffe in vielen Fällen ungeklärt sind, müssen sie bei der Trinkwasseraufbereitung berücksichtigt werden.

Neben physikalischen Verfahren wie Filtration und Flockung erfolgt die Entfernung organischer Verunreinigungen bei der Trinkwasseraufbereitung durch Oxidation [80]. Hierbei stehen unter anderem Ozon, Wasserstoffperoxid, Kaliumpermanganat, UV-Strahlung, Chlordioxid oder Luftsauerstoff zur Verfügung, wobei die Ozonierung zunehmend an Bedeutung gewinnt [81, 33]. Dabei sind eine vollständige Oxidation der organischen Verunreinigungen bzw. die Erhöhung der biologischen Abbaubarkeit von

Huminstoffen, die Entfernung von Eisen und Mangan sowie die Abtötung von Mikroorganismen möglich [82]. Nachteile dieser Technik sind einerseits die Kosten und andererseits die Entstehung unerwünschter Nebenprodukte [83]. So kann zum Beispiel bei Anwesenheit von Bromid Bromat gebildet werden. Darüber hinaus können auch bei unvollständiger Oxidation organischer Verbindungen durch ungenügende Ozonzugabe unerwünschte Reaktionsprodukte entstehen. Auf Grund der Vielschichtigkeit der verwendeten Rohwässer ist eine detaillierte Aufklärung dieser Verbindungen nur mit großem Aufwand zu realisieren. Diese teilweise unbekanntes Reaktionsprodukte und die große Anzahl an Metaboliten erschweren die analytische Erfassung der Arzneimittelwirkstoffe deutlich. Darüber hinaus ist die Belastung mit nur einem Arzneimittelwirkstoff relativ unwahrscheinlich, vielmehr wird es sich in den meisten Fällen um ein Gemisch mit unterschiedlichen Einflüssen auf die Umwelt und den Mensch handeln.

Insgesamt betrachtet ist es fraglich, ob Grenzwerte für die einzelnen Substanzen der Komplexität des Problems gerecht werden. Einerseits können auf diese Weise die Metabolite nur mit hohem Forschungsaufwand integriert werden und andererseits bekämpft man auf diese Weise nur die Symptome. Vielmehr müssen die Ursachen erkannt und reformiert werden. Neben einer umwelttoxikologischen Untersuchung bereits im Handel befindlicher „Altarzneimittel“ muss auch ein Umdenken bei der Verschreibung bzw. der Anwendung und vor Allem bei der Entsorgung von Arzneimitteln stattfinden. So ist es heute technisch möglich, den Urin von Krankenhauspatienten abzutrennen und separat zu behandeln. Allerdings ist das mit einem hohen finanziellen Aufwand verbunden. Dies trifft auch auf die nachträgliche Bewertung von „Altarzneimitteln“ zu, weshalb es an dieser Stelle zu deutlichen Interessenkonflikten zwischen der Pharmaindustrie und dem Umweltschutz kommt. Auch die weiterführende Sensibilisierung der Bevölkerung könnte den Arzneimitteleintrag verringern. Allerdings erscheint es schwierig, den Patienten den Kauf einer kleineren Packung zu empfehlen, wenn die größere nur unwesentlich teurer ist.

Die Ergebnisse dieser Dissertation und anderer Arbeiten machen deutlich, dass der Eintrag von Arzneimittelwirkstoffen in die Umwelt mittelfristig verringert werden muss. Dies könnte durch eine Veränderung der Abgabe von Arzneimitteln an den Verbraucher und durch eine Erhöhung der Eliminationsraten während der Klärwerkspassage erreicht werden. Allerdings muss für beide Ansätze die Datenbasis deutlich erweitert werden.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] Higashitani, T.; Tamamoto, H.; Takahashi, A.; Tanaka, H.; Study of estrogenic effects on carp (*Cyprinus carpio*) exposed to sewage treatment plant effluents; *Water Sci Technol*; 2003; 47(9): 93-100.
- [2] Auterhoff, Harry; Kovar, Karl-Artur; *Identifizierung von Arzneistoffen*; Stuttgart: Wiss. Verlagsges., 1981.
- [3] Koschorreck, Jan; Lehmann, Simone; Naulin, Andreas; *Arzneimittel in der Umwelt - zu Risiken und Nebenwirkungen fragen sie das Umweltbundesamt*; Dessau: 2005.
- [4] Hirsch, R.; Ternes, T.A.; Haberer, K.; Kratz, K.-L.; Nachweis von Betablockern und Bronchospasmolytika in der aquatischen Umwelt; *Vom Wasser*; 1996; 87: 263-274.
- [5] Kümmerer, Klaus; *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects, and risks : with 51 tables*; Berlin [u.a.]: Springer, 2001.
- [6] Stan, Hans-Jürgen; Heberer, Thomas; Linkerhägner, Manfred; Occurrence of Clofibric Acid in the Aquatic System - Is the Use in Human Medical Care the Source of the Contamination of Surface Ground and Drinking Water?; *Vom Wasser*; 1994; 83(S. 57-68).
- [7] Stumpf, M.; Ternes, T.A.; Haberer, K.; Baumann, W.; Nachweis von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Kläranlagen und Fließwässern; *Vom Wasser*; 1996; 87: 251-261.
- [8] Tixier, Celine; Singer, Heinz P.; Oellers, Sjeff; Muller, Stephan R.; Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters; *Environ Sci Technol*; 2003; 37(6): 1061-8.
- [9] Ternes, T.; *Abbau und Verhalten von Pharmaka in aquatischen Systemen*; Berlin: Wasserforschung e.V., 2000.
- [10] Lottspeich, Friedrich; Zorbas, Haralabos; *Bioanalytik*; Heidelberg [u.a.]: Spektrum, Akad. Verl., 1998.
- [11] Perkin-Elmer Sciex Instruments; *API 2000*; 1998.
- [12] Applied Biosystems; *Produkt Bulletin LC/MS*; 2002.
- [13] InProcess Instruments GmbH; *Quadrupol Mass Spectrometer*; .
- [14] Budzikiewicz, Herbert; Schäfer, A., I., Mathias; *Massenspektrometrie Eine Einführung*; Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005.
- [15] FIZ CHEMIE Berlin; *Detektoren für die Massenspektrometrie*; 2005.
- [16] Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe der Länder Brandenburg - Hamburg - Mecklenburg-Vorpommern - Niedersachsen - Sachsen - Sachsen-Anhalt - Schleswig-Holstein; *Arzneistoffe in Elbe und Saale*; Hamburg [u.a.], 2003.
- [17] BLAC; *Arzneimittel in der Umwelt Auswertung der Untersuchungsergebnisse*; Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit, 2003.
- [18] Müller-Jahncke, Wolf-Dieter; Friedrich, Christoph; Daemrich, Arthur; Geschichte der Arzneimitteltherapie; *Isis Chicago*; 1998; Ill., Bd. 89(1): 120.

- [19] Kuhlen, Franz-Josef; Historisches zum Thema Schmerz und Schmerztherapie; *Pharmazie in unserer Zeit*; 2002; 31(1): 13-22.
- [20] Bolz, U; Kuch, B.; Metzger, J.W.; Körner, W; Eintrag/Austrag-Bilanzierung der estrogenen Gesamtaktivität in Kläranlagen mit unterschiedlicher technischer Ausstattung mittels eines Bioassays; *Vom Wasser*; 2002; 98: 81-90.
- [21] Gans, O.; Sattelberger, R.; Scharf, S.; Ausgewählte Arzneimittelwirkstoffe in Zu- und Abläufen kommunaler österreichischer Kläranlagen; *Vom Wasser*; 2002; 98: 165-176.
- [22] Andreozzi, Roberto; Caprio, Vincenzo; Ciniglia, Claudia; de Champdore, Marcela; Lo Giudice, Roberto; Marotta, Raffaele; Zuccato, Ettore; Antibiotics in the environment: occurrence in Italian STPs, fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin; *Environ Sci Technol*; 2004; 38(24): 6832-8.
- [23] Servos, M. R.; Bennie, D. T.; Burnison, B. K.; Jurkovic, A.; McInnis, R.; Neheli, T.; Schnell, A.; Seto, P.; Smyth, S. A.; Ternes, T. A.; Distribution of estrogens, 17beta-estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants; *Sci Total Environ*; 2005; 336(1-3): 155-70.
- [24] Bendz, David; Paxeus, Nicklas A.; Ginn, Timothy R.; Loge, Frank J.; Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden; *J Hazard Mater*; 2005; 122(3): 195-204.
- [25] Lindqvist, Niina; Tuhkanen, Tuula; Kronberg, Leif; Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters; *Water Research*; 2005; 39: 2219-2228.
- [26] Boyd, Glen R.; Reemtsma, Helge; Grimm, Deborah A.; Mitra, Siddhartha; Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada; *Sci Total Environ*; 2003; 311(1-3): 135-49.
- [27] Heberer, Thomas; Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data; *Toxicol Lett*; 2002; 131(1-2): 5-17.
- [28] Heberer, Thomas; Zühlke, Sebastian; Fanck, Britta; WASSER- UMWELTANALYTIK - SPECIAL - Arzneimittelrückstände in der aquatischen Umwelt; *Laborpraxis / MED*; 2004; 28(3): 16-21.
- [29] Sattelberger, R.; Umweltbundesamt Österreich, ; Arzneimittelrückstände in der Umwelt Österreichs R-162; 1999;.
- [30] Jürgens, Monika D.; Holthaus, Karlijn I. E.; Johnson, Andrew C.; Smith, Jennifer J. L.; Hetheridge, Malcom; Williams, Richard J.; The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers; *Environ Toxicol Chem*; 2002; 21(3): 480-8.
- [31] Hegemann, Werner; Busch, Kerstin; *Untersuchungen zum Abbau endokrin wirksamer Substanzen in Kläranlagen*; Berlin: Wasserforschung e.V., 2000.
- [32] Mc Ardell, Christa S.; Molnar, Eva; Suter, Marc J. F.; Giger, Walter; Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the Glatt Valley watershed, Switzerland; *Environ Sci Technol*; 2003; 37(24): 5479-86.
- [33] Huber, Marc M.; Korhonen, Susanna; Ternes, Thomas A.; von Gunten, Urs; Oxidation of pharmaceuticals during water treatment with chlorine dioxide; *Water Res*; 2005; 39(15): 3607-17.

- [34] Koschorreck, Jan; *Umweltsicherheit von Arzneimitteln - ein lang unterschätztes Problem*; Dessau: 2005.
- [35] Schneider, Detlev; Richling, Frank; *Checkliste Arzneimittel A - Z: 27 Tabellen*; New York: Thieme, 2002.
- [36] Schunack, Walter; Mayer, Klaus; Haake, Manfred; *Arzneistoffe: Lehrbuch d. pharmazeut. Chemie*; Braunschweig [u.a.]: Vieweg, 1984.
- [37] Hager, Hermann [Begr.]; List, Paul Heinz; *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis: für Apotheker, Arzneimittelhersteller, Ärzte u. Medizinalbeamte*; New York: Springer, 1967.
- [38] Gerlach, Jana; Kern, Daniel; *Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Arzneimittelwirkstoffen mittels LC-MS/MS*; Halle (Saale): 2006.
- [39] Aced, Gabi; Möckel, Hermann J.; *Liquidchromatographie Apparative, theoretische und methodische Grundlagen der HPLC*; Weinheim; New York; Basel; Cambridge: VCH, 1991.
- [40] Whitehouse, C. M.; Dreyer, R. N.; Yamashita, M.; Fenn, J. B.; Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules; *Science*; 1989; 246(4926): 64-71.
- [41] Fenn, J.B.; Mann, M.; Meng, C.K.; Wong, S.F.; Whitehouse, C.M.; Electrospray Ionization-Principles and Practice; *Mass Spectrometry Reviews*; 1990; 9(1): 37-70.
- [42] Perkin-Elmer Sciex Instruments; *Manual APCI*; 1999.
- [43] Nelson, Michael D.; Dolan, John W.; Columns - LC TROUBLESHOOTING - Ion Suppression in LC-MS-MS -- A Case Study - This month's column examines a case in which ion suppression compromised method performance in LC-tandem MS and shows how the strategy for eliminating ion suppression differs li; *LC*; 2002; GC Europe, Bd. 15(2): 73-79.
- [44] Choi, B. K.; Hercules, D. M.; Gusev, A. I.; LC-MS/MS signal suppression effects in the analysis of pesticides in complex environmental matrices; *Fresenius J Anal Chem*; 2001; 369(3-4): 370-7.
- [45] Gangl, E.T.; Annan, M.; Spooner, N.; Vouros, P.; Reduction of Signal Suppression Effects in ESI-MS Using a Nanosplitting Device; *Analytical chemistry*; 2001; 73(23): 5635-5644.
- [46] Klöpfer, Achim; *Analyse von Benzothiazolen und Untersuchungen zu deren Auftreten und mikrobiellem Abbau in aquatischen Proben*; Berlin, Techn. Univ., Diss, 2005.
- [47] Hopfgartner, G.; Bean, K.; Henion, J.; Henry, R.; Ion spray mass spectrometric detection for liquid chromatography: a concentration- or a mass-flow-sensitive device?; *Journal of chromatography*; 1993; 647(1): 51-62.
- [48] Meyer, Veronika; *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*; Salzburg: Sauerländer, 1992.
- [49] Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M.; Matrix Effect in Quantitative LC/MS/MS Analyses of Biological Fluids; *Analytical Chemistry*; 1998; (70): 882-889.

- [50] Korte, Friedhelm; Bahadir, Müfit; *Lehrbuch der ökologischen Chemie: Grundlagen und Konzepte für die ökologische Beurteilung von Chemikalien*; Stuttgart [u.a.]: Thieme, 1992.
- [51] Bliefert, Claus; *Umweltchemie*; Weinheim [u.a.]: Wiley-VCH, 1997.
- [52] Poeschel; *Warenkunde und Technologie der Gärungsgewerbe, der Riechstoffe, organischen Säuren und.*; Stuttgart: Poeschel, 1929.
- [53] Belitz, Hans-Dieter; Grosch, Werner; *Lehrbuch der Lebensmittelchemie: mit über 500 Tabellen*; Berlin [u.a.]: Springer, 1992.
- [54] Morton, Julia F.; Rooibos Tea, *Aspalathus linearis*, a Caffeineless, Low-Tannin Beverage; *Economic Botany*; 1983; 37(2): 164-173.
- [55] Benk, Erich; Zur Kenntnis teeähnlicher Erzeugnisse. In: Acker, L., (Hg); *Handbuch der Lebensmittelchemie*; 1968: pp. 160-162.
- [56] Mehlhorn, Katrin; *Untersuchungen zum Einsatz von Carnitin beim Geflügel*; Halle, Univ., Landw. Fak., Diss., 2006.
- [57] Abb, Magdalena; *Entwicklung einer LC/MS/MS-Methode zur Bestimmung ausgewählter Polyether-Antibiotika in Hühnereiern*; Halle (Saale): 2006.
- [58] Choi, B. K.; Gusev, Arkady I.; Hercules, D. M.; Postcolumn Introduction of an Internal Standard for Quantitative LC-MS Analysis; *Analytical Chemistry*; 1999; 71: 4107-4110.
- [59] Stokvis, E.; Rosing, H.; López-Lázaro, L.; Schellens, J. H. M.; Beijnen, J. H.; Switching from an analogous to a stable isotopically labeled internal standard for the LC-MS/MS quantitation of the novel anticancer drug Kahalalide F significantly improves assay performance; *Biomedical Chromatography*; 2004; 18: 400-402.
- [60] Funk, Werner; Dammann, Vera; Donnevert, Gerhild; *Qualitätssicherung in der analytischen Chemie*; Weinheim [u.a.]: VCH, 1992.
- [61] Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP); *Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use*; London: 2006.
- [62] Höll, Karl; *Wasser: Nutzung im Kreislauf, Hygiene, Analyse und Bewertung*; Berlin [u.a.]: de Gruyter, 2002.
- [63] Ternes T.A.; Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers; *Water Research*; 1998; 32(11): 3245-3260.
- [64] Ternes Thomas A.; *Nachweis und Screening von Arzneimittelrückständen, Diagnostika und Antiseptika in der aquatischen Umwelt: Abschlußbericht*; Wiesbaden, 1999.
- [65] Stumpf, M.; Ternes, T. A.; Wilken, R. D.; Rodrigues, S. V.; Baumann, W.; Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil; *Sci Total Environ*; 1999; 225(1-2): 135-41.
- [66] Robakowski, Heike; *Arzneimittelrückstände und endokrin wirkende Stoffe in der aquatischen Umwelt: Literaturrecherche*; Mannheim: LfU c/o JVA Mannheim, Druckerei, 2000.
- [67] Carballa, Marta; Omil, Francisco; Lema, Juan M.; Llompert, Maria; Garcia-Jares, Carmen; Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant; *Water Res*; 2004; 38(12): 2918-26.

- [68] Ternes, Thomas A.; Hirsch, Roman; Mueller, Jutta; Haberer, Klaus; Methods for the determination of neutral drugs as well as betablockers and beta2-sympathomimetics in aqueous matrices; *Fresenius Journal of analytical chemistry*; 1998; (362): 329-340.
- [69] ARGE Elbe; *Wassergütedaten der Elbe*; 2004.
- [70] Internationale Kommission zum Schutz des Rheins; *Gewässergütedaten des IKSR für den Rhein*; 2003.
- [71] Kloas, W.; *Endokrin wirksame Substanzen Eine Gefahr für aquatische Systeme*; Berlin: Wasserforschung e.V., 2000.
- [72] Möhle, E.; Horvath, S.; Merz, W.; Metzger, J.W.; *Bestimmung von schwer abbaubaren organischen Verbindungen im Abwasser - Identifizierung von Arzneimittelrückständen*; 1999.
- [73] Miao, Xia-Sheng; Koenig, Brenda G.; Metcalfe, Chris D.; Analysis of acidic drugs in the effluence of sewage treatment plants usind liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry; *Journal of chromatography A*; 2002; (952): 139-147.
- [74] Sacher, F.; Lochow, E.; Bethmnn, D.; Brauch, H.J.; Vorkommen von Arzneimittelwirkstoffen in Oberflächenwässern; *Vom Wasser*; 1998; 90: 233-243.
- [75] Schullerer, S.; Spengler, P.; Metzger, J.W.; Einfluss unterschiedlicher Reinigungstechniken in der Abwasserbehandlung auf die Konzentration von östrogenen im Abwasser; *Vom Wasser*; 2002; 98: 65-80.
- [76] Holtey-Weber, R.I.; Färber, H.A.; Schöler, H.F.; On-Line-Silylierung zur Analytik von endokrin wirksamen Substanzen in Wasser mittels GC-MS/MS; *Vom Wasser*; 1999; 92: 1-9.
- [77] Lim, C.-K.; Lord, G.; Current Developments in LC-MS for Pharmaceutical Analysis; *Biol. Pharm. Bull.*; 2002; 25(5): 547-557.
- [78] Zühlke, Sebastian; *Verhalten von Phenazonderivaten, Carbamazepin und östrogenen Steroiden während verschiedener Verfahren der Wasseraufbereitung*; Berlin, Techn. Univ., Diss, 2004.
- [79] Grohmann, Andreas; Aurand, Karl; *Die Trinkwasserverordnung: Einführung und Erläuterungen für Wasserversorgungsunternehmen und Überwachungsbehörden*; Berlin: E. Schmidt, 2003.
- [80] Heinzmann; *Wasseraufbereitung und Abwasserbehandlung durch die Berliner Wasserbetriebe*; Berliner Wasser Betriebe, 2000.
- [81] Andreozzi, Roberto; Caprio, Vincenzo; Marotta, Raffaele; Radovnikovic, Anita; Ozonation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV treatment of clofibrac acid in water: a kinetic investigation; *J Hazard Mater*; 2003; 103(3): 233-46.
- [82] Huber, Marc M.; Canonica, Silvio; Park, Gun-Young; von Gunten, Urs; Oxidation of pharmaceuticals during ozonation and advanced oxidation processes; *Environ Sci Technol*; 2003; 37(5): 1016-24.
- [83] Hütter, Leonhard A.; *Wasser und Wasseruntersuchung: Methodik, Theorie und Praxis chemischer, chemisch-physikalischer, biologischer und bakteriologischer Untersuchungsverfahren*; Frankfurt am Main [u.a.]: Salle [u.a.], 1992.

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Arzneimittleintrag in die Umwelt nach Ternes et al. [9]	8
Abb. 2:	API 2000 von Applied Biosystems	22
Abb. 3:	Schematische Darstellung des makroskopischen ESI-Prozesses [10]	25
Abb. 4:	Schematische Darstellung des mikroskopischen ESI-Prozesses [10]	25
Abb. 5:	Einsatzgebiete der Ionenquellen des API 2000	26
Abb. 6:	Elektrospray-Ionenquelle für das API 2000	27
Abb. 7:	Ionisation bei der APCI [11]	28
Abb. 8:	APCI für das API 2000	28
Abb. 9:	Aufbau der APPI [12]	29
Abb. 10:	<i>Charge transfer process</i> bei der APPI [12]	30
Abb. 11:	<i>Solvent transfer process</i> bei der APPI [12]	30
Abb. 12:	Arbeitsprinzip eines Quadrupols [13]	32
Abb. 13:	ESI-Triplequad-Massenspektrometer	32
Abb. 14:	Ausgewählte Analysenmodi eines Triplequad-Massenspektrometers	33
Abb. 15:	Aufbau eines kontinuierlichen und diskontinuierlichen SEV	35
Abb. 16:	Massenspektrum von Salinomycin als Natriumaddukt	43
Abb. 17:	Massenspektrum von Maduramycin als Ammoniumaddukt	43
Abb. 18:	Massenspektrum von Estron aufgenommen mit negativer Ionisation	44
Abb. 19:	Massenspektrum von Paracetamol aufgenommen mit negativer Ionisation	45
Abb. 20:	Massenspektrum von Paracetamol aufgenommen mit positiver Ionisation	45
Abb. 21:	Massenspektrum von Bezafibrat aufgenommen mit negativer Ionisation	46
Abb. 22:	Mögliche Fragmentierung von Paracetamol bei positiver Ionisation	47
Abb. 23:	Abhängigkeit der Intensität vom Wassergehalt in Acetonitril	51
Abb. 24:	Abhängigkeit der Intensität vom Wassergehalt in Methanol	51
Abb. 25:	Abhängigkeit der Intensität des Paracetamolsignals vom Wassergehalt	52
Abb. 26:	Abhängigkeit der Intensität vom pH-Wert	53
Abb. 27:	Chromatogramme eines Mischstandards bei pH 3 und 8 sowie reinem Methanol	54
Abb. 28:	Einfluss der Ammoniakkonzentration auf die Intensität	56
Abb. 29:	Einfluss von Lösungsmittelzusätzen (1 %) zum Eluenten	57
Abb. 30:	Einfluss der Flussrate auf die Intensität bei einer Quellentemperatur von 400 °C	59
Abb. 31:	Einfluss der Quellentemperatur auf die Intensität bei einer Flussrate von 100 µL/min	59
Abb. 32:	Auszug der Ergebnisse der Adsorptionsversuche	63
Abb. 33:	Einfluss der Temperatur beim Abrotieren und Abblasen unter Argonstrom	65
Abb. 34:	Verhalten der Analyten beim Einrotieren	65
Abb. 35:	Einfluss von Zusätzen zu Methanol beim Aufnehmen des Rückstandes	67
Abb. 36:	Test von weiteren Lösungsmitteln beim Aufnehmen des Rückstandes	67
Abb. 37:	Rückstandsaufnahme mit und ohne Ultraschall	69
Abb. 38:	Vergleich der Festphasenmaterialien	71
Abb. 39:	Einfluss des pH-Wertes auf die Festphasenextraktion	72

---

Abb. 40:	Einfluss verschiedener Spülmethode	73
Abb. 41:	Vergleich verschiedener Elutionsmittel bei der Festphasenextraktion	74
Abb. 42:	Einfluss von Ammoniak auf die Elutionswirkung	76
Abb. 43:	Suppressionseffekte in verschiedenen Matrices	77
Abb. 44:	Wichtige Polyphenole im Tee (I - Catechin; II - Theogallin; III - Theaflavin)	79
Abb. 45:	Chromatogramm eines Mischstandards (0,5-1 mg/L) mit Infusion von Salicylsäure	84
Abb. 46:	Kalibrierfunktion über die Peakfläche am Beispiel von Diclofenac	85
Abb. 47:	Kalibrierfunktion über das Verhältnis der Peakfläche zur Intensität des IS	85
Abb. 48:	Kalibrierfunktion über das Verhältnis der Peakhöhe zur Intensität des IS	86
Abb. 49:	Manuelle Standardaddition (Ibuprofen 20 µg/L)	91
Abb. 50:	Standardaddition mit dem Autosampler (Ibuprofen 20 µg/L)	92
Abb. 51:	Entwicklung der Intensität des Bezafibratsignals bei der Standardaddition	94
Abb. 52:	Chromatogramme zur Entwicklung der Intensität des Bezafibratsignals	94
Abb. 53:	Entwicklung der Intensität des Fenoprofensignals bei der Standardaddition	95
Abb. 54:	Probenahmestellen im Bereich Halle/Saale	98
Abb. 55:	Konzentrationen ausgewählter Arzneimittelwirkstoffe in der Saale und ihrer Zuflüsse	99
Abb. 56:	Gegenüberstellung der Arzneimittelbelastung mit dem DOC	102
Abb. 57:	Spektrum von Amitriptylin bei positiver Ionisation	XIII
Abb. 58:	Spektrum von Carbamazepin bei positiver Ionisation	XIII
Abb. 59:	Spektrum von Diazepam bei positiver Ionisation	XIV
Abb. 60:	Spektrum von Diclofenac bei negativer Ionisation	XIV
Abb. 61:	Spektrum von Estradiol bei negativer Ionisation	XV
Abb. 62:	Spektrum von Ethinylestradiol bei negativer Ionisation	XV
Abb. 63:	Spektrum von Fenoprofen bei negativer Ionisation	XVI
Abb. 64:	Spektrum von Gemfibrozil bei negativer Ionisation	XVI
Abb. 65:	Spektrum von Ibuprofen bei negativer Ionisation	XVII
Abb. 66:	Spektrum von Naproxen bei negativer Ionisation	XVII
Abb. 67:	Spektrum von Naproxen bei positiver Ionisation	XVIII
Abb. 68:	Spektrum von Opipramol bei positiver Ionisation	XVIII
Abb. 69:	Spektrum von Phenazon bei positiver Ionisation	XIX
Abb. 70:	Spektrum von Sildenafil bei positiver Ionisation	XIX
Abb. 71:	Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Amitriptylin	XXXII
Abb. 72:	Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Bezafibrat	XXXII
Abb. 73:	Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Carbamazepin	XXXIII
Abb. 74:	Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Diazepam	XXXIII
Abb. 75:	Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Diclofenac	XXXIV
Abb. 76:	Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Estradiol	XXXIV
Abb. 77:	Kalibrierung Estron	XXXV
Abb. 78:	Kalibrierung Ethinylestradiol	XXXV
Abb. 79:	Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Fenoprofen	XXXVI
Abb. 80:	Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Gemfibrozil	XXXVI

---

Abb. 81:	Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Ibuprofen	_____	XXXVII
Abb. 82:	Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Naproxen	_____	XXXVII
Abb. 83:	Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Opipramol	_____	XXXVIII
Abb. 84:	Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Paracetamol	_____	XXXVIII
Abb. 85:	Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Phenazon	_____	XXXIX
Abb. 86:	Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Sildenafil	_____	XXXIX

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verbrauchsmengen ausgewählter Arzneistoffe in der Bundesrepublik Deutschland	9
Tabelle 2:	Abgegebene Wirkstoffmenge im Jahr 2000 nach [16]	10
Tabelle 3:	Eingesetzte Arzneimittelwirkstoffe	20
Tabelle 4:	Verwendete Chemikalien	38
Tabelle 5:	Verwendete Festphasen	38
Tabelle 6:	Standardsubstanzen	39
Tabelle 7:	Eingesetzte HPLC-Säulen	40
Tabelle 8:	Parameter beim Vergleich der Ionenquellen	48
Tabelle 9:	MS/MS-Einstellungen der optimierten Methode	49
Tabelle 10:	Eingesetzte Festphasenmaterialien und die Polarität	62
Tabelle 11:	Vergleich der Signalintensitäten der internen Standards	83
Tabelle 12:	Kenndaten der Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich nach DIN 32645	89
Tabelle 13:	Wiederfindungsraten (WR) in verschiedenen Matrices	90
Tabelle 14:	Wiederfindung bei manueller und automatischer Standardaddition (SDA)	93
Tabelle 15:	Bezeichnung der Probenahmestellen	97
Tabelle 16:	Elimination und biologische Abbaubarkeit verschiedener Arzneimittelwirkstoffe	100
Tabelle 17:	Berechnete Fracht <sup>1</sup> der Saale, der Weißen Elster und der Kläranlage Halle Nord	103
Tabelle 18:	Gegenüberstellung der Ergebnisse	104
Tabelle 19:	Fragmente bei der positiven Ionisation	XXI
Tabelle 20:	MS-Parameter bei positiver Ionisation in Volt (QF - Quantifier; QL - Qualifier)	XXI
Tabelle 21:	Fragmente bei der negativen Ionisation	XXII
Tabelle 22:	MS-Parameter bei negativer Ionisation in Volt (QF - Quantifier; QL - Qualifier)	XXIII
Tabelle 23:	Vergleich der Wiederfindungsraten in Mineralwasser	XXIV
Tabelle 24:	Vergleich der Wiederfindungsraten in Trinkwasser	XXV
Tabelle 25:	Vergleich der Wiederfindungsraten in Saalewasser	XXVI
Tabelle 26:	Gehalt an ausgewählten Wirkstoffen Teil 1	XXVII
Tabelle 27:	Gehalt an ausgewählten Wirkstoffen Teil 2	XXVIII
Tabelle 28:	Verkaufsmenge der untersuchten Arzneimittelwirkstoffe [17]	XXIX
Tabelle 29:	Reinheit der Standardsubstanzen Teil 1 [%]	XXX
Tabelle 30:	Reinheit der Standardsubstanzen Teil 2 [%]	XXX
Tabelle 31:	Kenndaten der Kalibrierung im oberen Arbeitsbereich nach DIN 32645	XXXI

## Anhang I

### Analyten [37, 2]

#### *Amitriptylin*

Arzneimittel: Novoprotect®; Amineurin®

CAS-Nummer: 50-48-6

Summenformel:  $C_{20}H_{23}N$

Molare Masse: 277,4 g/Mol

Eigenschaften: weißes kristallines Pulver

Smp: 195-198 °C

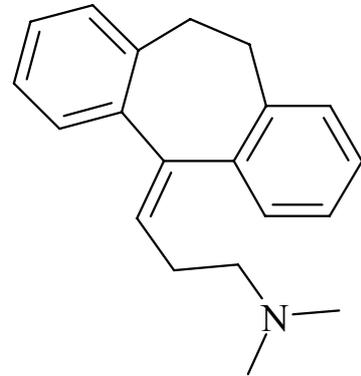
Indikation: depressives Syndrom, chronische Schmerzen

Kontraindikation: nicht nach Myocardinfarkt und bei Krampfleiden

Wirkung: Hemmung der präsynaptischen Noradrenalin- und der Serotinaufnahme

Dosierung: 50 bis 150 mg/Tag in zwei oder drei Dosen

Toxizität: bei Überdosierung Verwirrtheit, Hyperreflexie, zentrale Krämpfe



#### *Bezafibrat*

CAS-Nummer: 41859-67-0

Summenformel:  $C_{19}H_{20}ClNO_4$

Molare Masse: 361,8 g/Mol

Eigenschaften: weißes Pulver

Smp: 155-156 °C

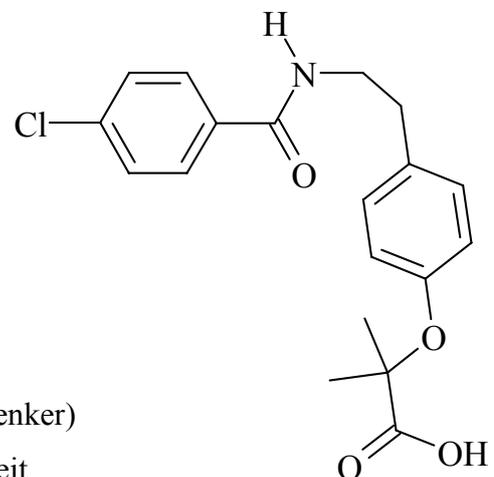
Indikation: bei Hyperlipidämie (Lipidsenker)

Kontraindikation: Schwangerschaft und Stillzeit

Wirkung: Steigerung der Aktivität der Lipoproteinase, Hemmung der hepatischen VLDL-Freisetzung und Cholesterinbildung, Senkung des Gehaltes an Triglyzeriden (10-25 %), Cholesterin (5-15 %) und erhöht den HDL-Spiegel (high density lipoprotein, 50 %).

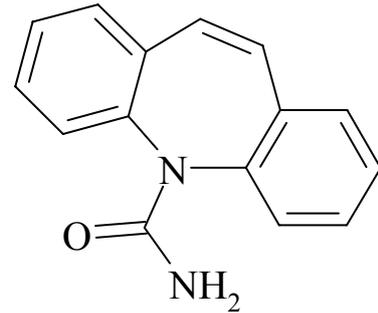
Dosierung: 3 x 200 mg/Tag

Toxizität: Gastrointestinale Störungen als Nebenwirkung. Geringe akute Toxizität.

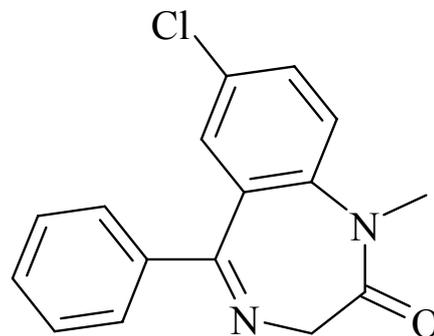


**Carbamazepin**

Arzneimittel:	Sirtal®, Tegretal®
CAS-Nummer:	298-46-4
Summenformel:	$C_{15}H_{12}N_2O$
Molare Masse:	236,2 g/Mol
Eigenschaften:	gelblichweißes kristallines Pulver Smp: 189-193 °C
Indikation:	bei allen Formen der Epilepsie
Kontraindikation:	Vorsicht bei Patienten mit Leberfunktionsstörungen
Wirkung:	Hemmung neuronaler Membranpotentiale
Dosierung:	Erwachsene 800 – 1200 mg in zwei bis vier Einzeldosen
Toxizität:	starke Müdigkeit, Dysarthrie, Übelkeit, Atemdepression

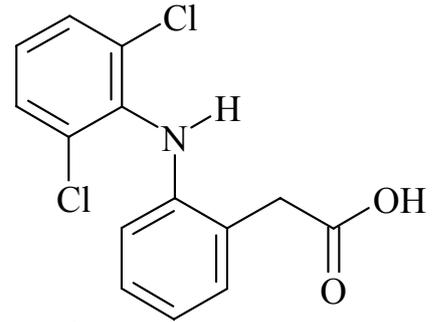
**Diazepam**

Arzneimittel:	Valium®, Faustan®
CAS-Nummer:	439-14-5
Summenformel:	$C_{16}H_{13}ClN_2O$
Molare Masse:	284,7 g/Mol Smp: 130 °C, pKs = 3,4
Indikation:	akute und chronische Spannungs-, Erregungs- und Angstzustände
Kontraindikation:	keine Anwendung bei bekannter Überempfindlichkeit
Wirkung:	Bindung am Benzodiazepinrezeptor und damit Verstärkung der auf GABA basierenden Hemmmechanismen des Zentralnervensystems
Dosierung:	4 bis 5 später 10 mg/Tag
Toxizität:	zentralnervöse Dämpfung von Benommenheit bis zu komatösen Zuständen



**Diclofenac**

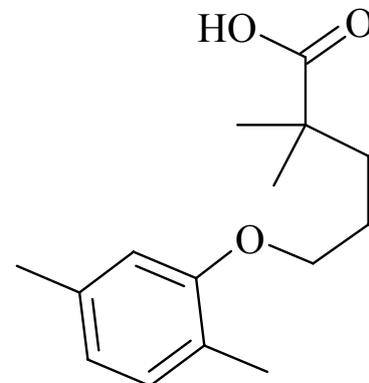
Arzneimittel:	Rhumalgan®, Volraman® Voltaren®, Voltarol®
CAS-Nummer:	15307-86-5
Summenformel:	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> NNaO <sub>2</sub>
Molare Masse:	318,1 g/Mol
Eigenschaften:	gelbbeiges Pulver, schwach hygroskopisch Smp: 156-157 °C



Indikation:	bei akutem Gichtanfall, rheumatischen Beschwerden, Schmerzen infolge Traumata, bei akuter und chronische Arthritis und entzündlich-rheumatischen Wirbelsäulenleiden.
Kontraindikation:	Schwangerschaft und Stillzeit, Kinder
Wirkung:	nicht-steroidales Antirheumatikum, entzündungshemmende, analgetische und antipyretische Eigenschaften, Hemmung der Prostaglandinsynthese und der mikrosomalen, membrangebundenen Cyclooxygenasen, einer der wirksamsten Cyclooxygenaseinhibitoren.
Dosierung:	2 bis 3 x 25 bis 150 mg/Tag
Toxizität:	zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen auf viele Organsysteme, In Einzelfällen chronische Toxizität

**Gemfibrozil**

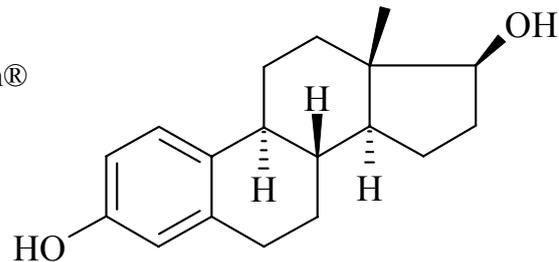
Arzneimittel:	Jezil®, Lobid®, Lopid®
CAS-Nummer:	25812-30-0
Summenformel:	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>
Molare Masse:	250,3 g/Mol
Eigenschaften:	weißer, wachsartiger Feststoff Smp: 58-61 °C
Indikation:	Hyperlipidämie
Kontraindikation:	Leberfunktionsstörungen, Schwangerschaft und Stillzeit



Wirkung:	Lipidsenker, Aktivierung lipolytischer Enzyme ( <i>lipoproteinlipase</i> ), Senkung der Gehalte an Triglyzeriden (50 %), Cholesterin (5-15 %), LDL ( <i>low density lipoprotein</i> , 0-11 %) und Erhöhung des HDL-Spiegels ( <i>high density lipoprotein</i> , 0-120 %).
Dosierung:	900 mg/Tag
Toxizität:	Gastrointestinale Störungen als Nebenwirkung.

### ***17-β-Estradiol***

Arzneimittel:	Novofem®, Femoston®
CAS-Nummer:	50-28-2
Summenformel:	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
Molare Masse:	272,4 g/Mol
Eigenschaften:	weißes Pulver
	Smp: 173-179 °C



Indikation:	klinisch wichtigstes und biologisch wirksamstes Estrogen, Hormonsubstitution bei Estrogenmangelsymptomen bei Frauen und Menstruationsbeschwerden
Kontraindikation:	schwere Leberschäden
Wirkung:	natürliches Steroidhormon, Ausbildung und Wachstum der Geschlechtsorgane, zyklische Veränderungen, Einfluss auf Leberstoffwechsel, Senkung des peripheren Gefäßwiderstandes, Retention von Wasser und NaCl, gesteigerte Bildung von Serotoninrezeptoren
Dosierung:	2 mg/Tag
Toxizität:	sehr geringe akute und chronische Toxizität.

**Estron**

Synonyme: 1,3,5-estratrien-3-ol-17-one

CAS-Nummer: 53-16-7

Summenformel:  $C_{18}H_{22}O_2$

Molare Masse: 270,4 g/Mol

Eigenschaften: weißes Pulver

Smp: 254,4-256 °C

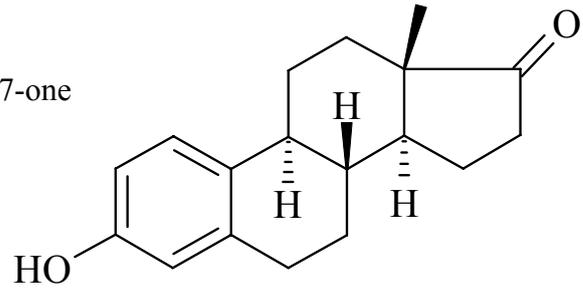
Indikation: natürliches Hormon, geringe klinische Anwendung

Kontraindikation: schwere Leberschäden

Wirkung: natürliches Steroidhormon

Dosierung: bei Impotenz 0,1 bis 5 mg/Tag

Toxizität: sehr geringe akute und chronische Toxizität.

**17- $\alpha$ -Ethinylestradiol**

Arzneimittel: Yasmin®, Evra®

CAS-Nummer: 57-63-6

Summenformel:  $C_{20}H_{24}O_2$

Molare Masse: 296,4 g/Mol

Eigenschaften: weißes Pulver

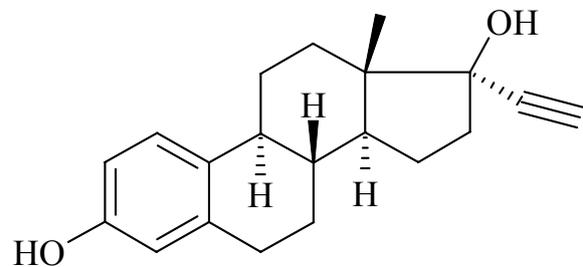
Smp: 182-184 °C

Dosierung: 30-50  $\mu$ g/Tag

Indikation: wichtigste Substanz bei der oralen und hormonalen Empfängnisverhütung (Kontrazeption)

Wirkung: künstliches Steroidhormon

Toxizität: sehr geringe akute und chronische Toxizität.



**Fenoprofen**

Arzneimittel: Fenpron®, Nalfon®, Progesic®

CAS-Nummer: 31879-05-7

Summenformel:  $C_{15}H_{14}O_3$ 

Molare Masse: 242,3 g/Mol

Eigenschaften: zähflüssiges Öl

Sdp: 168-171 °C; pK<sub>s</sub>=7,3

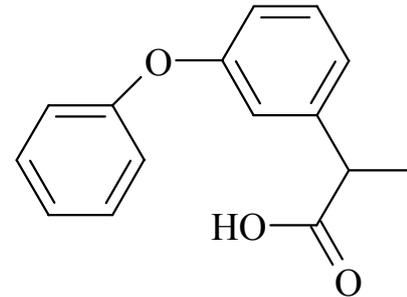
Indikation: bei chronischer Polyarthrit und verwandter rheumatischer Erkrankungen

Kontraindikation: Schwangerschaft und Stillzeit

Wirkung: nicht-steroidales Antirheumatikum, entzündungshemmende, analgetische und antipyretische Eigenschaften, Hemmung der mikrosomalen, membrangebundenen Cyclooxygenasen, 2 Enantiomere, bei überwiegender biologischer Aktivität der S-Form, auf Grund der antioxidativen Wirkung und der Radikalfängereigenschaft antiphlogistische Wirkung

Dosierung: 3x300 bis 600 mg/Tag

Toxizität: zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen auf viele Organsysteme

**Ibuprofen**

Arzneimittel: Dolormin®, IbuHEXAL®

CAS-Nummer: 15687-27-1

Summenformel:  $C_{13}H_{18}O_2$ 

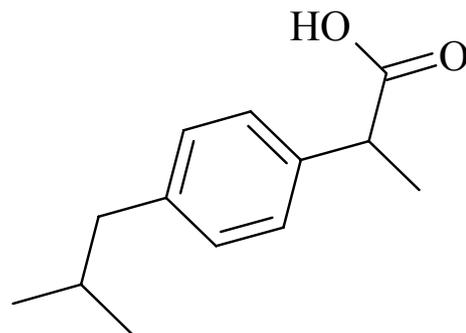
Molare Masse: 206,3 g/Mol

Eigenschaften: weißes Pulver

Smp: 75-78 °C; pK<sub>s</sub>=4,4

Indikation: mittlere bis leichte Schmerzzustände oder bei degenerativen und entzündlichen Gelenkerkrankungen, akutem Gichtanfall, Migräneanfall, Fieber

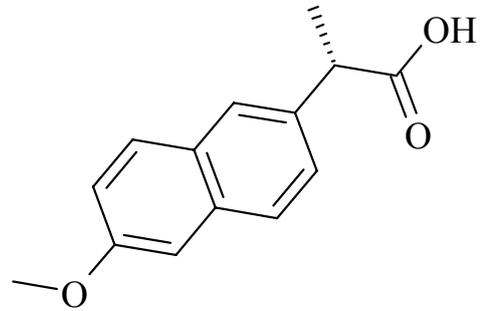
Kontraindikation: stark eingeschränkte Leber-, Nieren- oder Herzfunktion, Schwangerschaft und Stillzeit



Wirkung:	nicht-steroidales Antirheumatikum, 2 Enantiomere bei überwiegender biologischer Aktivität der S-Form mit spezifischer Umwandlung der R-Form, Hemmung der Prostaglandinsynthese und der mikrosomalen, membrangebundenen Cyclooxygenasen, analgetische, antiphlogistische und antipyretische Eigenschaften
Dosierung:	Selbstmedikation (Tabletten bis 1000 mg)
Toxizität:	zentralnervöse Störungen bei Überdosierung, zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen auf viele Organsysteme

### ***Naproxen***

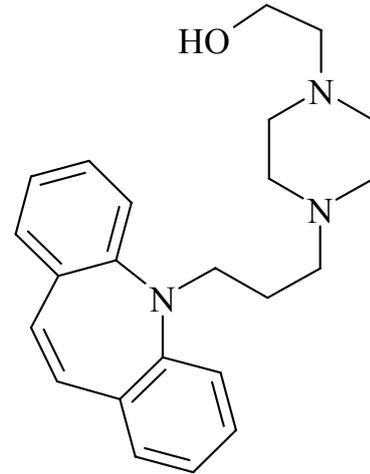
Arzneimittel:	Aleve®, Proxen®
CAS-Nummer:	22204-53-1
Summenformel:	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>
Molare Masse:	230,3 g/Mol
Eigenschaften:	weißes Pulver
	Smp: 154-158 °C; pKs = 4,2



Indikation:	Schmerzen aller Art, bei degenerativen und entzündlichen Gelenkerkrankungen, Migräneanfall, Zephalgien, akutem Gichtanfall, Fieber
Kontraindikation:	vorgeschädigte Nieren, Herzinsuffizienz, schwere Leberfunktionsstörungen, Asthmabronchiale
Wirkung:	nicht-steroidales Antirheumatikum, 2 Enantiomere bei überwiegender biologischer Aktivität der S-Form, Hemmung der Prostaglandinsynthese und der mikrosomalen, membrangebundenen Cyclooxygenasen, antiphlogistische, analgetische und antipyretische Eigenschaften
Dosierung:	maximal 1250 mg auf 1 bis 3 Tagesdosen verteilt
Toxizität:	unerwünschte Nebenwirkungen auf viele Organsysteme

**Opipramol**

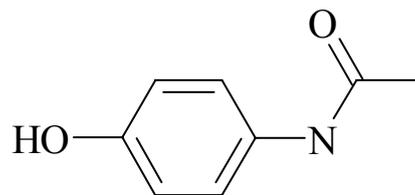
Arzneimittel:	Insidon®, Opipram®
CAS-Nummer:	315-72-0
Summenformel:	C <sub>23</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O
Molare Masse:	363,5 g/Mol
Eigenschaften:	kristallin
	Smp: 100-102 °C, pKs = 3,8



Indikation:	Depressionen
Kontraindikation:	gut verträglich mit geringer Nebenwirkungsrate
Wirkung:	selektiver Sigma-Rezeptor-Ligand des Opiatrezeptors, Herabsetzung der Ströme des spannungsabhängigen Calciumkanals, Verhinderung der Steigerung der cGMP-Konzentration des Kleinhirns
Dosierung:	150 mg/Tag
Toxizität:	ventrikuläre Tachyarrhythmien bei akuter Vergiftung

**Paracetamol**

Arzneimittel:	Buscopan®, Grippostad® Thomapyrin®
CAS-Nummer:	103-90-2
Summenformel:	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>
Molare Masse:	151,2 g/Mol
Eigenschaften:	weißes kristallines Pulver
	Smp: 168-172 °C; pKs=9,5

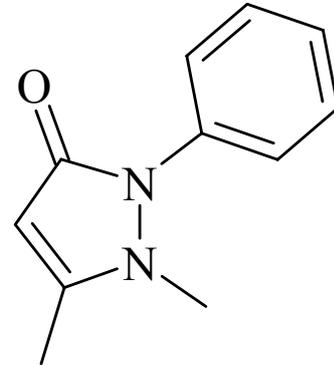


Einteilung:	Analgetikum, Anilinderivat
Indikation:	Schmerzen aller Art, Fiebersenkung, akuter Migräneanfall
Kontraindikation:	Nieren- und Leberschäden, angeborener vermehrter Bilirubingehalt des Blutes (Meulengracht-Krankheit)
Wirkung:	Hemmung der Prostaglandinsynthese, kaum Hemmung der Cyclooxygenase und daher kaum antiphlogistische Eigenschaften, deutliche analgetische und antipyretische Wirkungen, Mechanismus nicht abschließend geklärt

Dosierung: 10-15 mg/kg KG bis 50 mg/kg KG maximale Tagesgesamtdosis  
 Toxizität: Lebertoxisch durch Bildung von N-Acetyl-p-benzochinonimin bei hohen Dosen oder Einnahme kleiner Dosen und gleichzeitigem Alkoholkonsum.

### ***Phenazon***

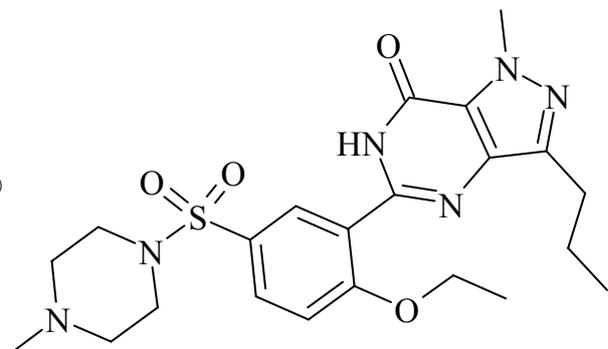
Arzneimittel: Migränin®, Otagan®  
 CAS-Nummer: 60-80-0  
 Summenformel: C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O  
 Molare Masse: 188,2 g/Mol  
 Eigenschaften: tafelförmige, farblose Kristalle  
 Smp: 109-113 °C; pKs=1,5



Indikation: leichte bis mäßig starke Schmerzen und Fieber  
 Kontraindikation: Überempfindlichkeit und Stoffwechselerkrankungen, Schwangerschaft und Stillzeit  
 Wirkung: Verschiedene Ansätze für Wirkweise, teilweise antiphlogistische Eigenschaften durch Hemmung der Prostaglandinsynthese und Veränderungen durch gebildete Pyrazole, deutliche analgetische und antipyretische Wirkung  
 Dosierung: 500-1000 mg pro Einnahme bis maximal 4000 mg pro Tag  
 Toxizität: relativ sicher auf Grund langjähriger Erfahrung, bei Überdosierung zentralnervöse Störungen

### ***Sildenafil***

Arzneimittel: Viagra®, Revatio®  
 CAS-Nummer: 139755-83-2  
 Summenformel: C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S  
 Molare Masse: 474,6 g/Mol  
 Eigenschaften: kristallines Pulver  
 Smp: 187 – 189 °C, pKs = 8,7  
 Indikation: Erektionsstörung des Mannes



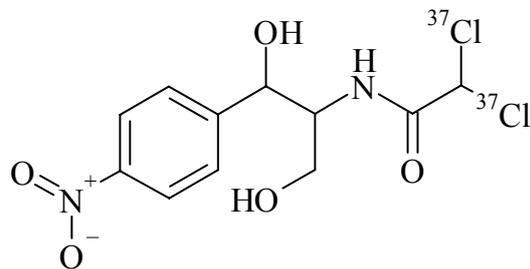
Kontraindikation:	Grunderkrankungen wie Hypotonie, Dehydratation oder schwere Einschränkung der autonomen Blutdruckkontrolle
Wirkung:	Hemmung der Phosphodiesterase
Dosierung:	50 – 100 mg pro Anwendung
Toxizität:	Verstärkung der Wirkung organischer Nitroverbindungen

### *Interne Standards*

#### ***Chloramphenicol-<sup>37</sup>Cl<sub>2</sub>***

Summenformel: C<sub>11</sub>H<sub>12</sub><sup>37</sup>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

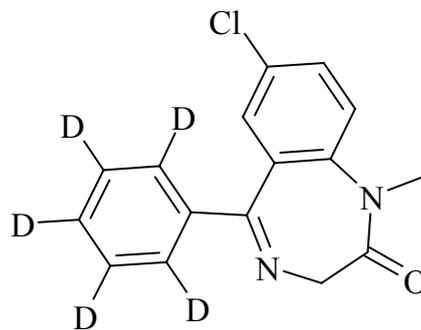
Molare Masse: 326,2 g/Mol



#### ***Diazepam-d<sub>5</sub>***

Summenformel: C<sub>16</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>2</sub>OD<sub>5</sub>

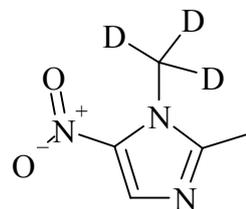
Molare Masse: 289,8 g/Mol



#### ***Dimetridazol-d<sub>3</sub>***

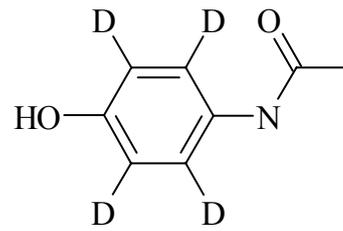
Summenformel: C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>D<sub>3</sub>

Molare Masse: 144,2 g/Mol

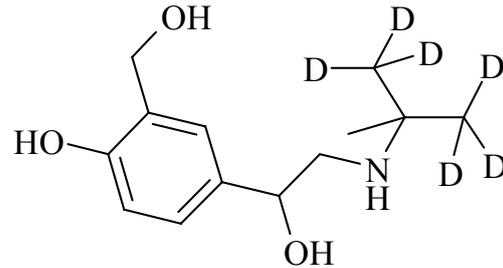


***Paracetamol-d<sub>4</sub>***Summenformel:  $C_8H_5NO_2D_4$ 

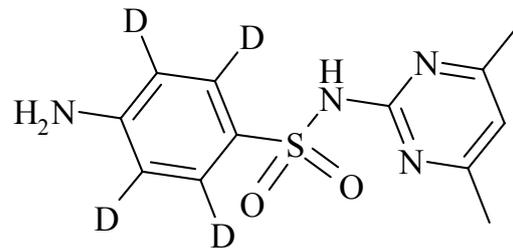
Molare Masse: 155,2 g/Mol

***Salbutamol-d<sub>6</sub>***Summenformel:  $C_{13}H_{15}NO_3D_6$ 

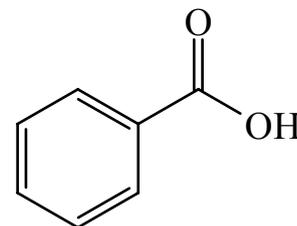
Molare Masse: 245,4 g/Mol

***Sulphadimidin-d<sub>4</sub>***Summenformel:  $C_{12}H_{10}N_4O_2SD_4$ 

Molare Masse: 282,4 g/Mol

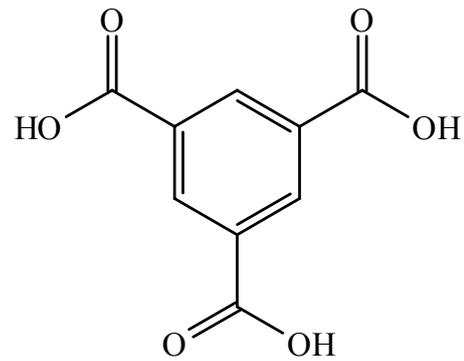
***Benzoessäure***Summenformel:  $C_7H_6O_2$ 

Molare Masse: 122,1 g/Mol

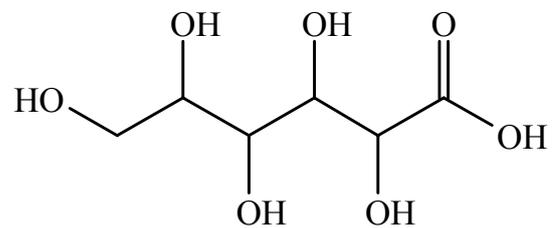


**1,3,5- Benzoltricarbonsäure**Summenformel:  $C_9H_6O_6$ 

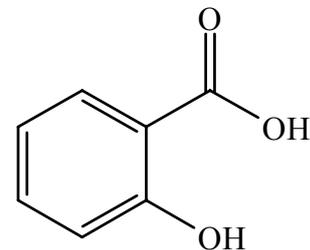
Molare Masse: 210,1 g/Mol

**Gluconsäure**Summenformel:  $C_6H_{12}O_7$ 

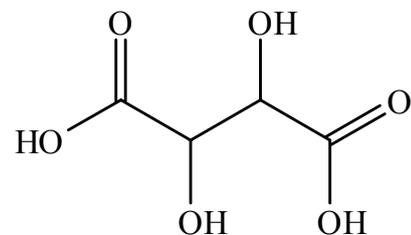
Molare Masse: 196,2 g/Mol

**Salicylsäure**Summenformel:  $C_7H_6O_3$ 

Molare Masse: 138,1 g/Mol

**Weinsäure**Summenformel:  $C_4H_6O_6$ 

Molare Masse: 150,1 g/Mol



## Anhang II

### Spektren der Analyten

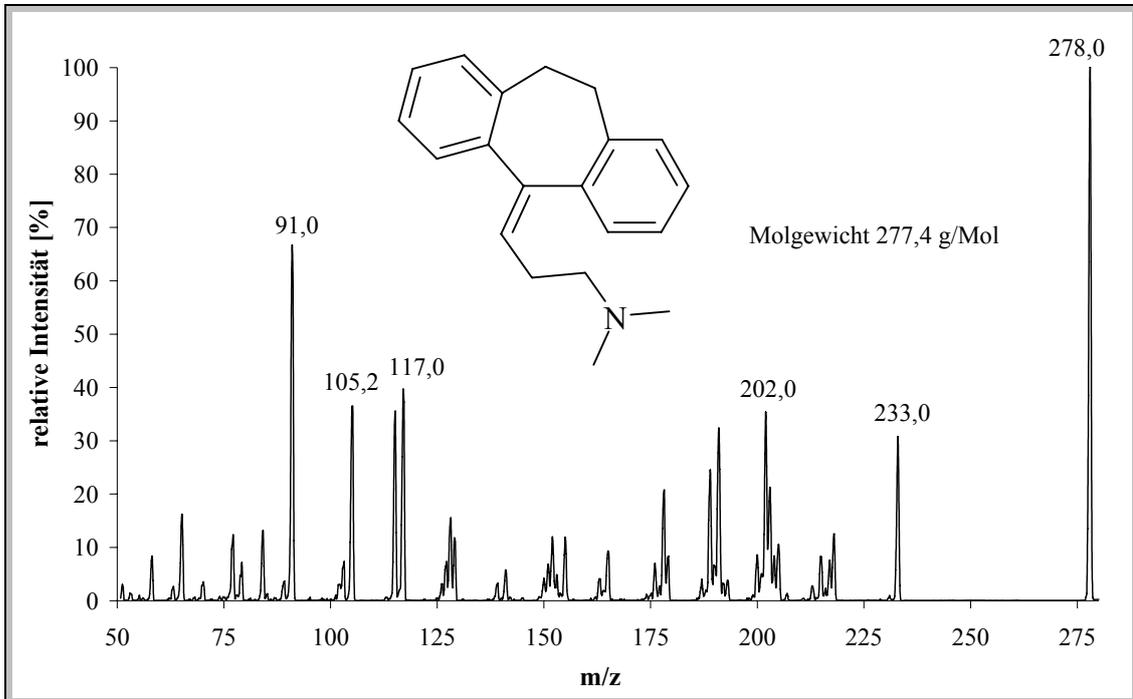


Abb. 57: Spektrum von Amitriptylin bei positiver Ionisation

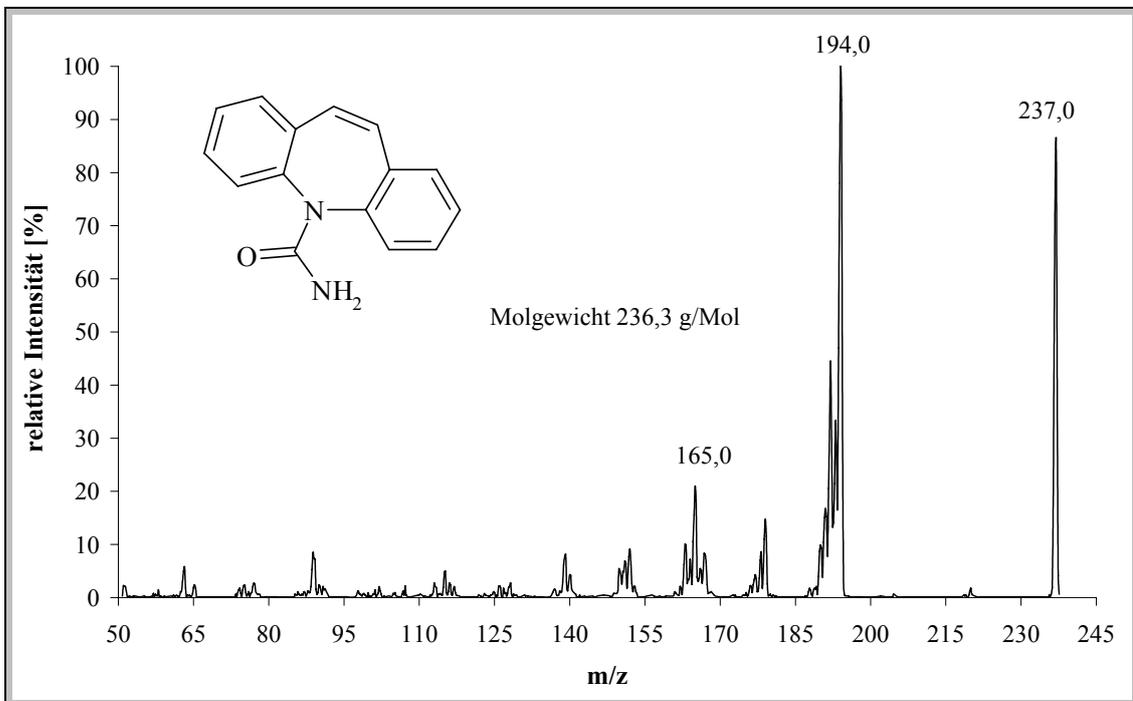


Abb. 58: Spektrum von Carbamazepin bei positiver Ionisation

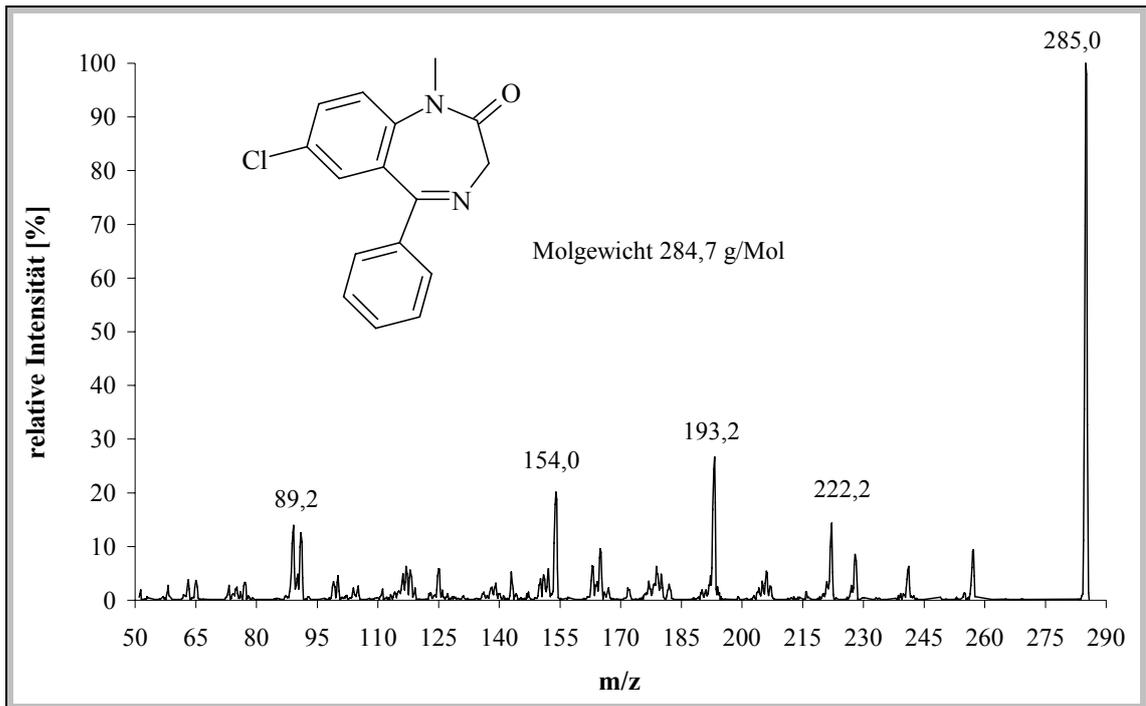


Abb. 59: Spektrum von Diazepam bei positiver Ionisation

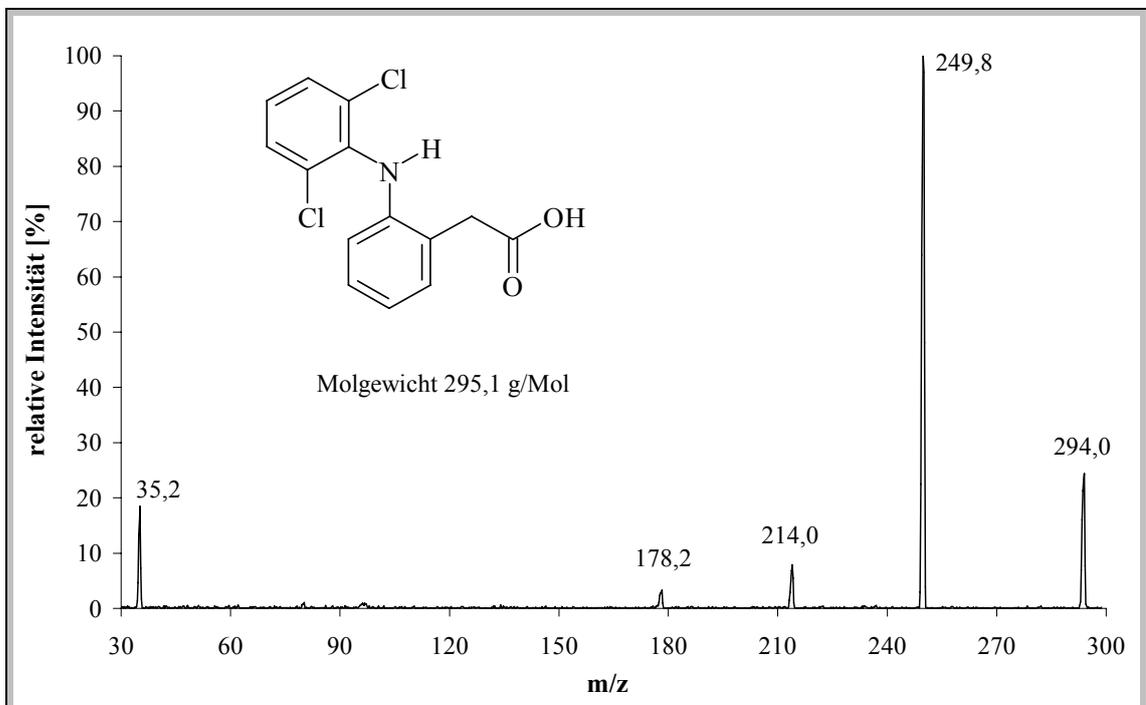


Abb. 60: Spektrum von Diclofenac bei negativer Ionisation

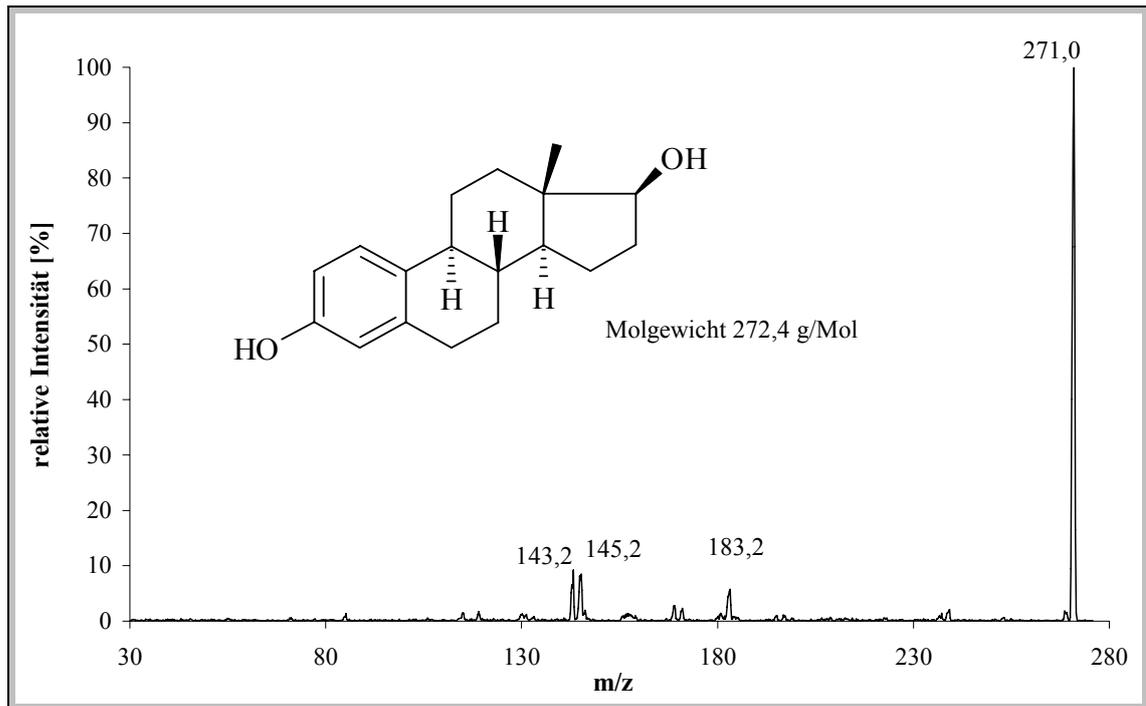


Abb. 61: Spektrum von Estradiol bei negativer Ionisation

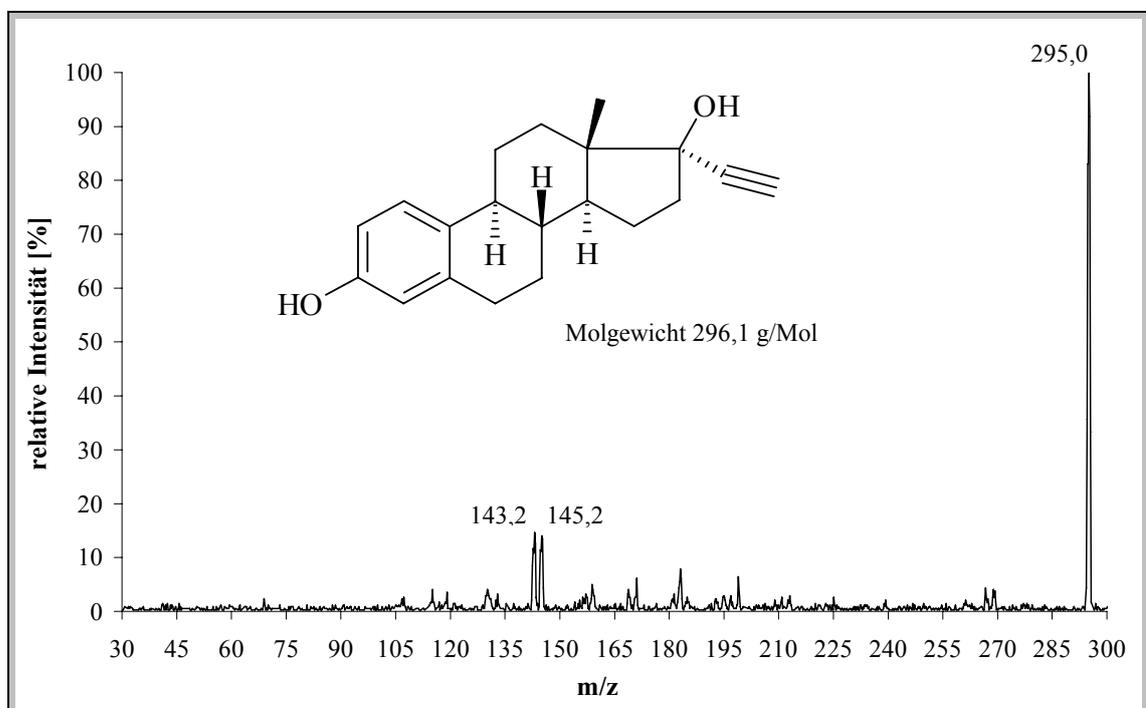


Abb. 62: Spektrum von Ethinylestradiol bei negativer Ionisation

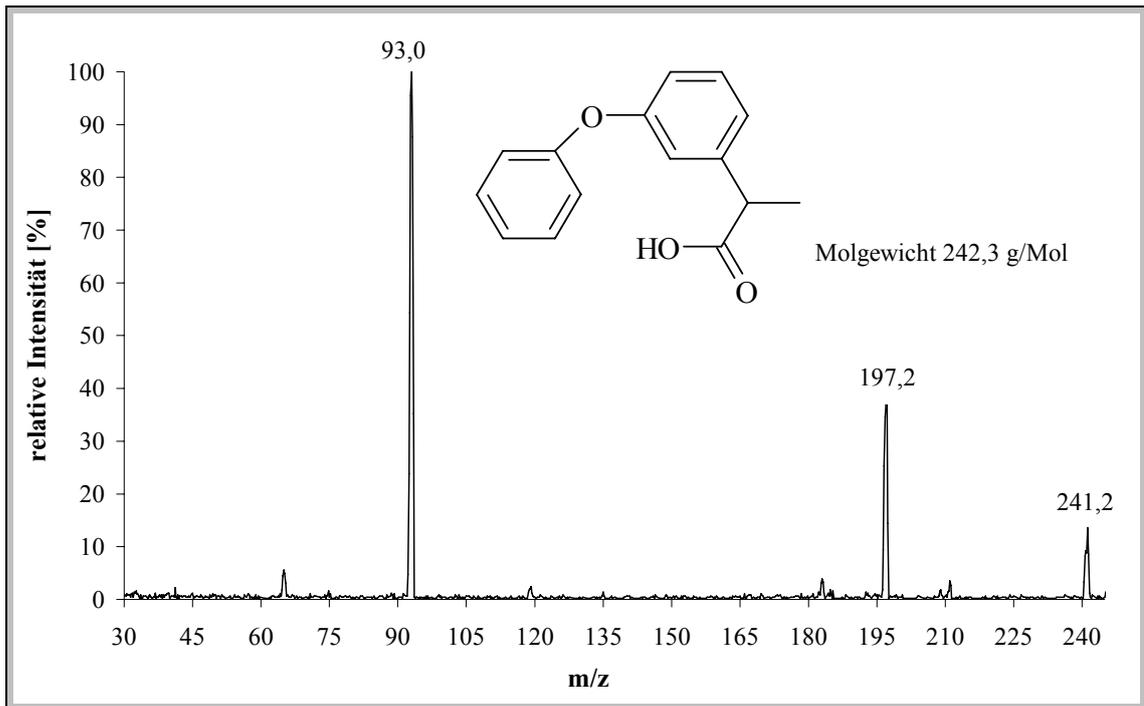


Abb. 63: Spektrum von Fenoprofen bei negativer Ionisation

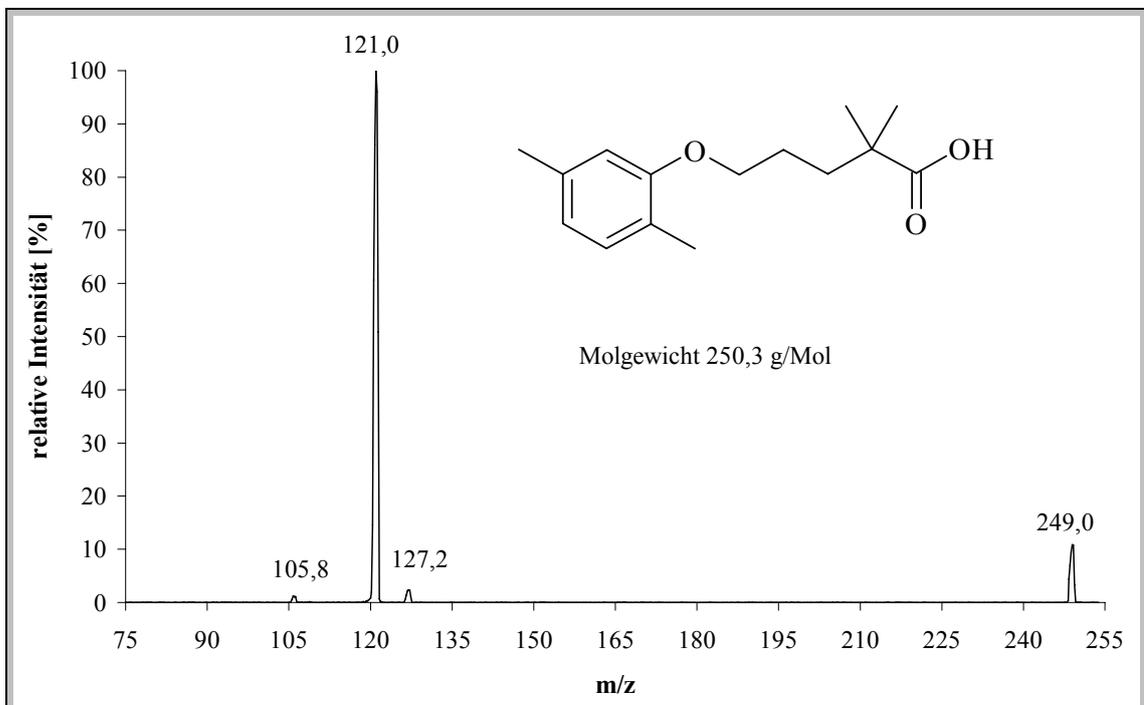


Abb. 64: Spektrum von Gemfibrozil bei negativer Ionisation

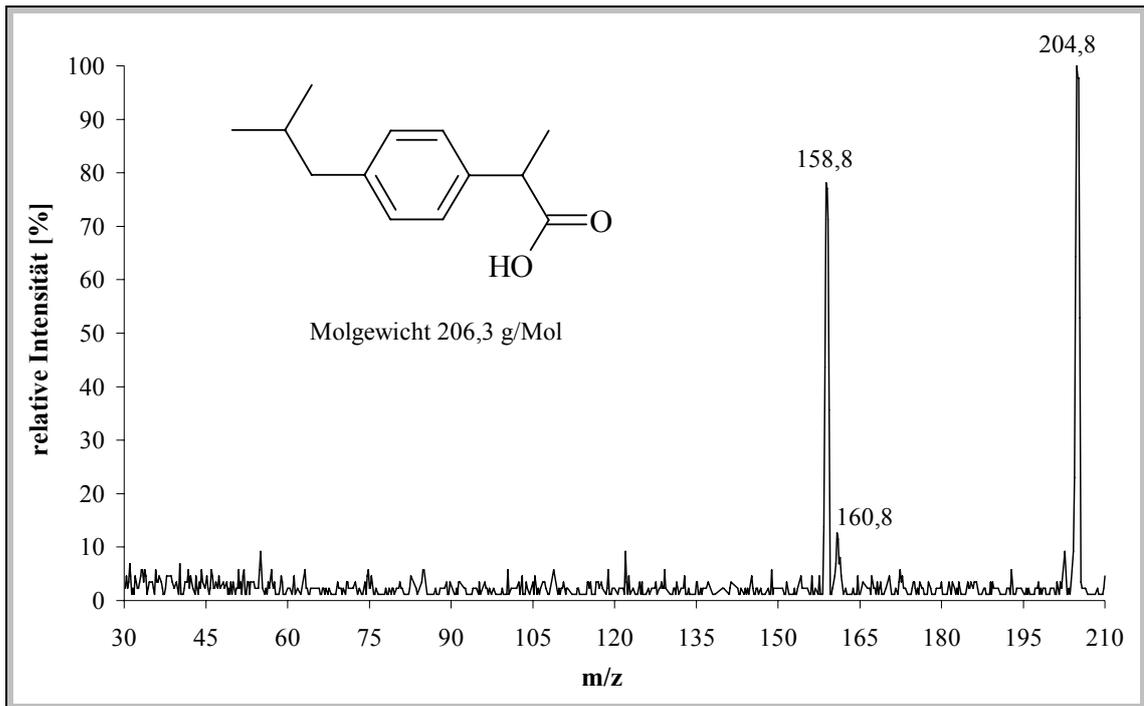


Abb. 65: Spektrum von Ibuprofen bei negativer Ionisation

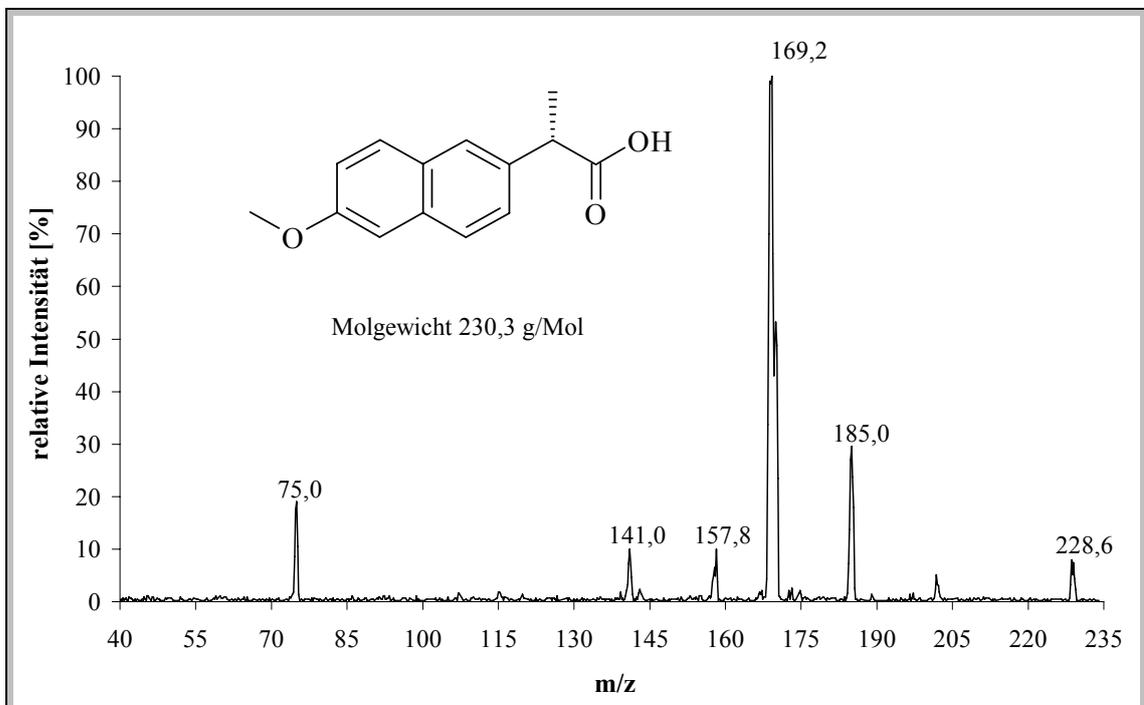


Abb. 66: Spektrum von Naproxen bei negativer Ionisation

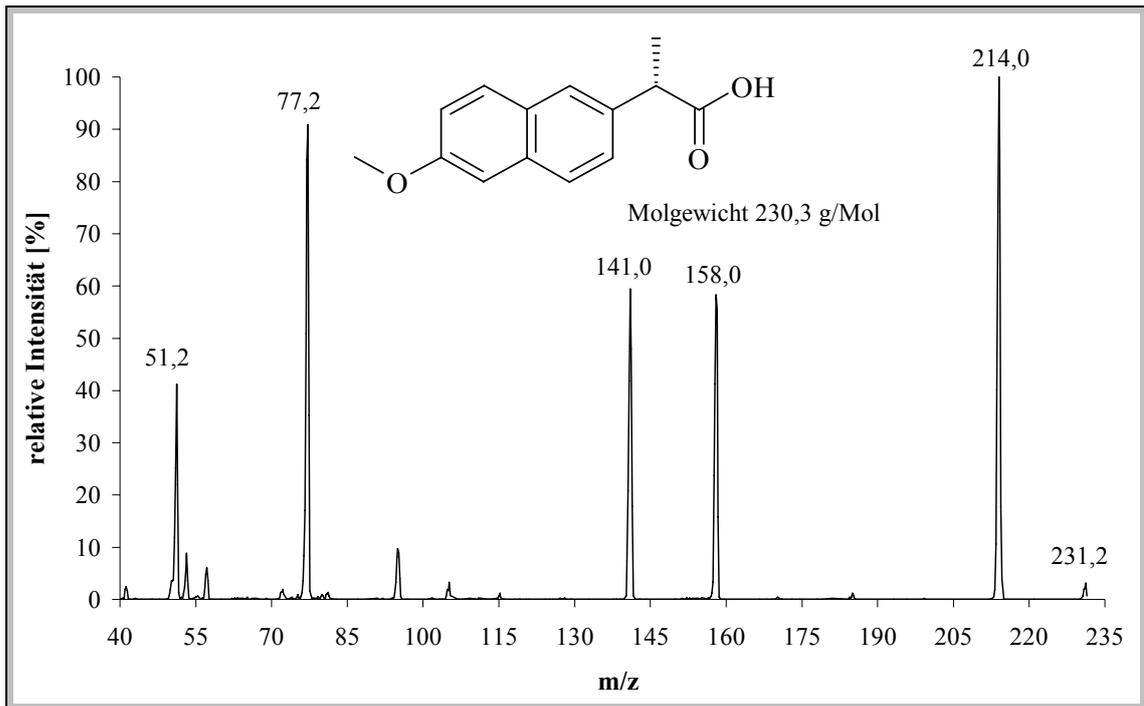


Abb. 67: Spektrum von Naproxen bei positiver Ionisation

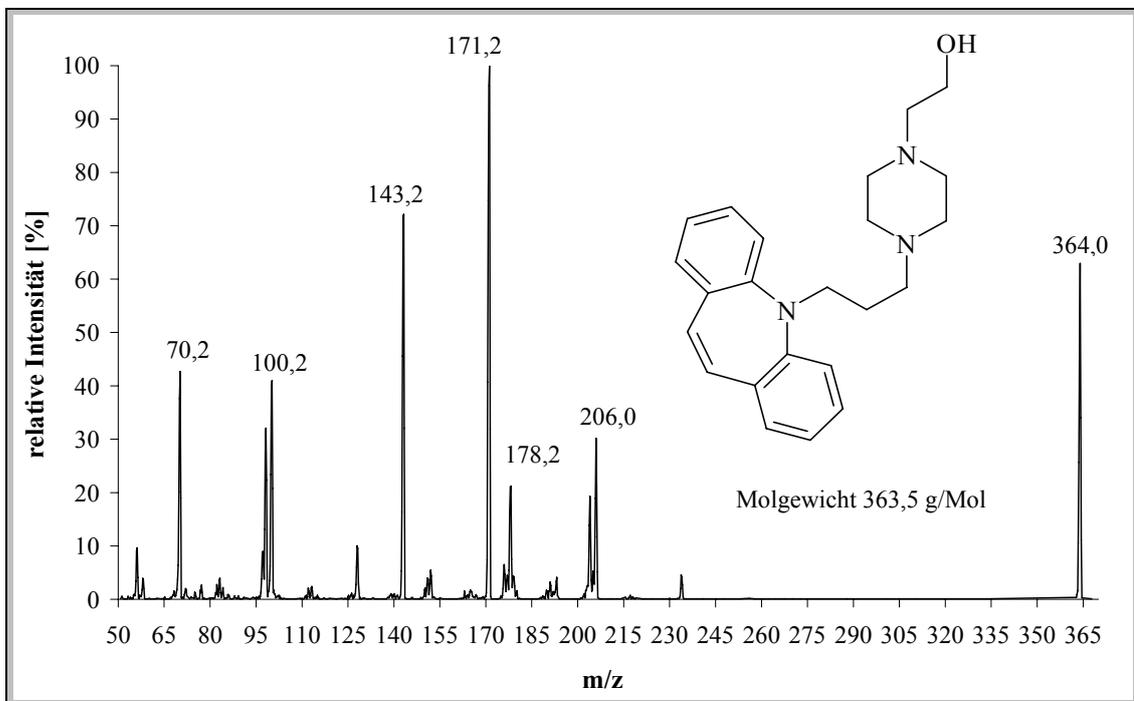


Abb. 68: Spektrum von Opipramol bei positiver Ionisation

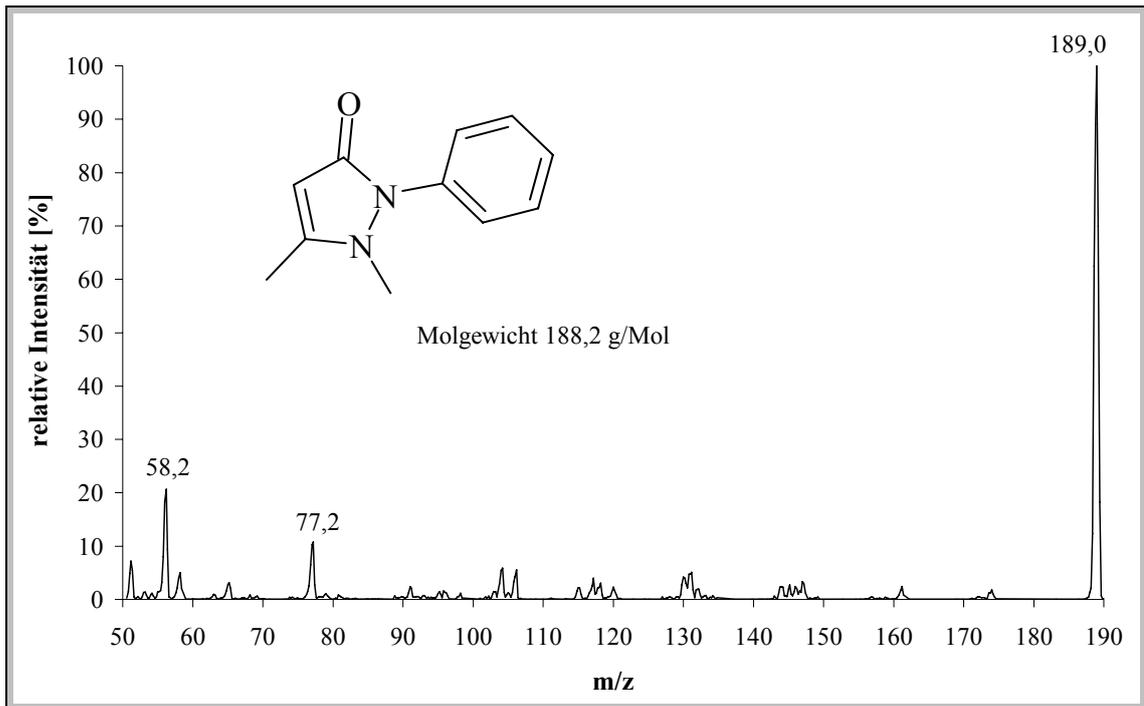


Abb. 69: Spektrum von Phenazon bei positiver Ionisation

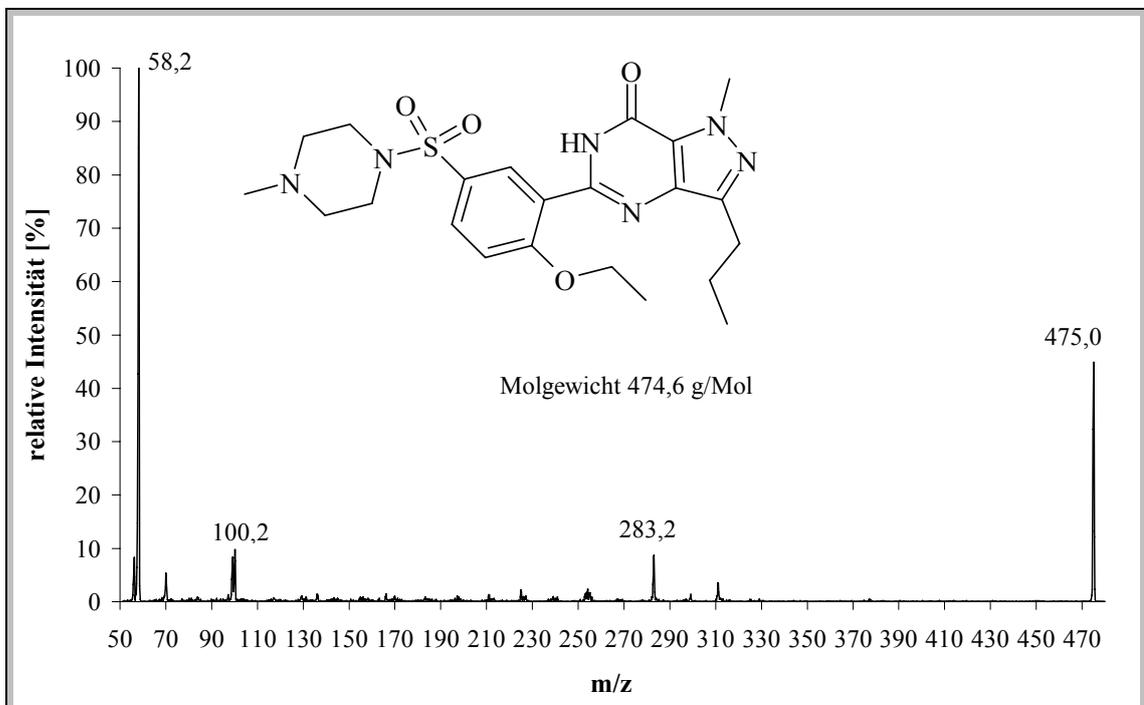


Abb. 70: Spektrum von Sildenafil bei positiver Ionisation

## Anhang III

### *HPLC-Parameter*

Vorsäule:	Reprosil-Pur C18-AQ; 5 µm; 10x2 mm
Säule:	Reprosil-Pur C18-AQ; 5 µm; 100x2 mm
Flussrate:	100 µL/min
Analysendauer:	15 min
Laufmittel:	A: Methanol/ammoniakalisches Methanol 50:3 (v/v) B: Methanol
Positive Ionisation:	25 % A und 75 % B
Negative Ionisation:	45 % A und 55 % B
Injektionsvolumen:	10 µL
Autosamplertemperatur:	20 °C
Säulentemperatur:	20 °C

### *positive Ionisation*

#### *Quellenparameter*

Ionisation:	Elektrospray
Spannung:	5500 V
Curtaingas:	207 kPa
Temperatur:	400 °C
Gas 1:	345 kPa
Gas 2:	345 kPa
Kollisionsgas:	69 kPa

***Fragmente*****Tabelle 19: Fragmente bei der positiven Ionisation**

	<b>Produkt-Ion [m/z]</b>	<b>Quantifier [m/z]</b>	<b>Qualifier [m/z]</b>	<b>Dwell Time [msec]</b>
Amitriptylin	278,1	91,1	117,1	150
Carbamazepin	237,0	194,0	164,0	150
Diazepam	285,0	154,0	193,1	150
Diazepam-d <sub>5</sub>	290,1	198,1	154,0	150
Opipramol	364,1	171,1	143,1	150
Paracetamol	152,1	110,2	65,0	150
Phenazon	189,1	56,2	77,2	150
Sildenafil	475,8	58,0	100,0	150

***MS-Parameter*****Tabelle 20: MS-Parameter bei positiver Ionisation in Volt (QF - Quantifier; QL - Qualifier)**

	<i>Declustering Potential</i>	<i>Entrance Potential</i>	<i>Collision Cell Entrance Po- tential</i>	<i>Collision Energie</i>		<i>Collision Cell Exit Potential</i>	
				QF	QL	QF	QL
Amitriptylin	26	12	20	35	31	2	4
Carbamazepin	41	8	14	25	57	6	4
Diazepam	26	10	16	37	45	4	6
Diazepam-d <sub>5</sub>	46	9	20	43	39	6	4
Opipramol	21	9	18	29	39	6	4
Paracetamol	60	10	10	23	41	4	6
Phenazon	30	11	16	47	57	0	4
Sildenafil	76	7	22	79	41	0	4

***negative Ionisation******Quellenparameter***

Ionisation:	Elektrospray
Spannung:	-4500 V
Curtaingas:	207 kPa
Temperatur:	400 °C
Gas 1:	345 kPa
Gas 2:	345 kPa
Kollisionsgas:	55 kPa

***Fragmente*****Tabelle 21: Fragmente bei der negativen Ionisation**

	<b>Produkt-Ion [m/z]</b>	<b>Quantifier [m/z]</b>	<b>Qualifier [m/z]</b>	<b>Dwell Time [msec]</b>
Bezafibrat	360,2	154,0	274,0	100
Chloramphenicol- <sup>37</sup> Cl <sub>2</sub>	325,1	152,0	259,0	100
Diclofenac	294,2	249,9	214,0	100
Estradiol	271,0	145,0	183,0	100
Estron	269,0	145,0	143,0	100
Ethinylestradiol	295,0	145,0	143,0	100
Fenoprofen	241,0	93,0	197,0	100
Gemfibrozil	249,0	121,0	127,0	100
Ibuprofen	205,0	159,0	161,0	100
Naproxen	229,0	170,0	169,0	100

***MS-Parameter*****Tabelle 22: MS-Parameter bei negativer Ionisation in Volt (QF - Quantifier; QL - Qualifier)**

	<i>Declustering Potential</i>	<i>Entrance Potential</i>	<i>Collision Cell Entrance Potential</i>	<i>Collision Energie</i>		<i>Collision Cell Exit Potential</i>	
				QF	QL	QF	QL
Bezafibrat	-20	-7	-23	-37	-21	-31	-47
Chloramphenicol- <sup>37</sup> Cl <sub>2</sub>	-11	-9	-16	-22	-14	-32	-47
Diclofenac	-10	-5	-22	-15	-26	-46	-41
Estradiol	-55	-8	-20	-50	-50	-30	-34
Estron	-31	-10	-20	-50	-69	-28	-27
Ethinylestradiol	-30	-11	-21	-51	-72	-28	-27
Fenopropfen	-10	-4	-17	-50	-10	-18	-37
Gemfibrozil	-4	-4	-21	-18	-14	-25	-23
Ibuprofen	-10	-3	-12	-8	-8	-36	-31
Naproxen	-5	-2	-15	-19	-34	-33	-33

## Anhang IV

**Tabelle 23: Vergleich der Wiederfindungsraten bei externer Kalibrierung und Standardaddition in Mineralwasser (95 % Sicherheit; MWFR- mittlere Wiederfindungsrate; VI- Vertrauensintervall)**

	Konzentration [ng/L]	MWFR [%]	VI [%]	MWFR [%]	VI [%]
		externe Kalibrierung		Standardaddition	
Amitriptylin	3,0	94,9	4,5	100,8	7,8
Bezafibrat	23,0	93,0	3,9	99,3	5,7
Carbamazepin	3,0	93,2	6,9	105,0	6,9
Diazepam	30,0	96,7	5,5	101,5	12,8
Diclofenac	17,7	105,8	3,3	100,3	7,0
Estradiol	40,6	85,3	6,6	85,6	3,9
Estron	14,1	75,2	6,5	69,7	5,5
Ethinylestradiol	74,1	77,5	7,0	142,3	4,0
Fenopfen	20,0	88,6	2,9	107,7	6,3
Gemfibrozil	13,9	92,8	3,6	96,8	8,6
Ibuprofen	42,2	95,4	5,7	96,7	4,9
Naproxen	48,3	94,5	3,9	101,0	4,6
Opipramol	3,0	96,3	3,2	99,4	4,8
Paracetamol	30,0	65,7	6,1	75,1	7,8
Phenazon	3,0	96,8	3,6	107,7	4,3
Sildenafil	40,0	104,5	9,8	95,6	11,4

**Tabelle 24: Vergleich der Wiederfindungsraten bei externer Kalibrierung und Standardaddition in Trinkwasser (95 % Sicherheit; MWFR- mittlere Wiederfindungsrate; VI- Vertrauensintervall)**

	Konzentration [ng/L]	MWFR [%]	VI [%]	MWFR [%]	VI [%]
		externe Kalibrierung		Standardaddition	
Amitriptylin	30,0	94,3	7,5	92,8	6,4
Bezafibrat	68,9	88,8	4,7	92,3	4,4
Carbamazepin	30,0	90,8	1,4	99,7	8,2
Diazepam	50,0	92,3	6,4	107,1	6,1
Diclofenac	53,1	94,7	7,9	84,5	5,5
Estradiol	101,5	82,7	6,3	81,9	3,5
Estron	28,1	89,6	7,5	92,1	6,7
Ethinylestradiol	444,4	89,4	6,1	93,2	7,0
Fenopropfen	60,0	88,5	4,1	91,3	5,4
Gemfibrozil	40,7	88,5	5,4	92,2	5,1
Ibuprofen	163,0	92,0	6,3	88,0	5,0
Naproxen	163,0	93,4	6,6	93,9	5,8
Opipramol	30,0	104,2	7,5	90,0	8,9
Paracetamol	60,0	62,3	4,6	71,3	4,2
Phenazon	30,0	89,1	7,2	83,2	6,9
Sildenafil	60,0	106,4	7,8	88,1	4,2

**Tabelle 25: Vergleich der Wiederfindungsraten bei externer Kalibrierung und Standardaddition in Saalewasser (95 % Sicherheit; MWFR- mittlere Wiederfindungsrate; VI- Vertrauensintervall)**

	Konzentration [ng/L]	MWFR [%]	VI [%]	MWFR [%]	VI [%]
		externe Kalibrierung		Standardaddition	
Amitriptylin	65,0	94,0	8,2	116,0	12,0
Bezafibrat	67,4	78,5	3,3	88,2	5,7
Carbamazepin	175,0	86,6	2,9	92,0	11,5
Diazepam	100,0	85,2	3,5	101,9	13,7
Diclofenac	344,2	90,2	5,3	80,8	6,2
Estradiol	513,8	79,7	2,2	77,3	3,1
Estron	54,6	89,6	3,4	100,5	5,5
Ethinylestradiol	500,0	116,8	3,1	111,1	7,2
Fenoprofen	67,5	72,9	3,1	74,5	19,4
Gemfibrozil	20,6	81,9	6,4	80,6	5,8
Ibuprofen	185,0	86,3	6,0	81,7	10,4
Naproxen	79,2	84,8	5,7	89,8	9,8
Opipramol	60,0	82,6	9,3	92,1	7,7
Paracetamol	75,0	58,5	6,3	69,7	6,3
Phenazon	65,0	84,3	5,1	83,4	11,1
Sildenafil	100,0	97,4	7,8	112,0	8,6

## Anhang V

**Tabelle 26: Gehalt an ausgewählten Wirkstoffen Teil 1 (alle Angaben in ng/L; NG: Nachweisgrenze; BG: Bestimmungsgrenze)**

	Amitriptylin	Bezafibrat	Carbamacepin	Diazepam	Diclofenac	Fenoprofen
Probe 1	<BG	17,5	657,3	8,5	361,4	<BG
Probe 2	<NG	<BG	58,1	6,2	304,5	73,1
Probe 3	31,6	206,4	2296,9	13,3	2039,3	95,7
Probe 4	<BG	11,9	278,9	<NG	166,9	<BG
Probe 5	<BG	19,0	293,8	<BG	197,8	<BG
Probe 6	<BG	11,6	189,5	<BG	199,7	5,7
Probe 7	<BG	12,9	212,2	<BG	142,4	6,1
Probe 8	<BG	9,8	206,7	<BG	149,3	5,6
Probe 9	<BG	13,6	220,4	<BG	142,4	6,1
Probe 10	<BG	14,8	209,7	<NG	195,7	6,6
Probe 11	<BG	30,5	321,8	<NG	327,6	11,9
Probe 12	<BG	20,2	197,2	<BG	217,8	12,6
Probe 13	<BG	7,6	159,8	<BG	105,1	5,7
Probe 14	<NG	<NG	6,7	<NG	290,5	<BG
Probe 15	<BG	8,5	173,0	<NG	151,2	<BG
Probe 16	<NG	<BG	<NG	<NG	168,3	<BG
Probe 17	<NG	<NG	<BG	<NG	83,6	<BG
Probe 18	<NG	9,6	198,3	<NG	208,9	7,0
Probe 19	<BG	<BG	155,1	<NG	105,5	5,3
Probe 20	<BG	<BG	174,6	<NG	125,1	<BG
Probe 21	<BG	<NG	177,4	<NG	88,5	<BG
Probe 22	<BG	7,5	152,2	<NG	73,7	<BG
Probe 23	<NG	<BG	<NG	<NG	345,1	<NG
Probe 24	<BG	12,6	197,2	<BG	151,1	<BG
Probe 25	<BG	<BG	453,7	<BG	226,3	<BG
Probe 26	<BG	17,5	229,4	<BG	94,8	<NG
Probe 27	<BG	14,1	246,2	<NG	135,4	<NG

**Tabelle 27: Gehalt an ausgewählten Wirkstoffen Teil 2 (alle Angaben in ng/L; NG: Nachweisgrenze; BG: Bestimmungsgrenze)**

	<b>Gemfibrozil</b>	<b>Ibuprofen</b>	<b>Naproxen</b>	<b>Opipramol</b>	<b>Paracetamol</b>	<b>Phenazon</b>
Probe 1	<BG	<BG	14,9	<NG	176,1	30,2
Probe 2	21,6	62,7	<BG	<NG	256,6	6,7
Probe 3	28,3	52,0	92,9	<NG	264,4	40,7
Probe 4	<BG	<BG	<BG	<NG	87,0	10,5
Probe 5	<BG	<BG	<BG	<NG	81,2	11,8
Probe 6	<BG	<BG	<BG	<NG	71,0	8,8
Probe 7	<BG	<BG	12,9	<NG	88,5	10,1
Probe 8	<BG	<BG	<BG	<BG	82,0	9,6
Probe 9	<BG	<BG	<BG	<NG	77,3	11,0
Probe 10	<BG	<BG	9,9	<NG	79,7	11,8
Probe 11	6,2	30,2	22,1	<NG	119,3	23,2
Probe 12	7,3	<BG	<BG	<NG	83,5	13,3
Probe 13	<NG	<BG	<BG	<BG	63,2	5,4
Probe 14	6,2	<BG	<BG	<NG	59,5	<BG
Probe 15	<BG	<BG	<BG	<NG	54,7	6,8
Probe 16	<BG	<BG	<BG	<NG	49,8	<BG
Probe 17	<BG	<NG	<NG	<NG	43,9	<BG
Probe 18	<BG	<BG	<BG	<NG	71,1	9,1
Probe 19	<BG	<BG	<BG	<NG	71,1	5,7
Probe 20	<BG	<BG	<BG	<NG	66,1	6,4
Probe 21	<BG	<BG	<BG	<NG	67,1	6,7
Probe 22	<BG	<BG	<NG	<NG	63,5	5,2
Probe 23	5,8	<NG	<NG	<NG	63,6	<BG
Probe 24	<BG	<BG	<BG	<NG	66,8	8,1
Probe 25	<BG	<BG	<BG	<NG	81,7	5,6
Probe 26	<BG	<BG	<BG	<NG	79,0	8,9
Probe 27	<BG	<BG	<BG	<NG	79,1	9,5

Estradiol, Ethinylestradiol, Estron und Sildenafil konnte in keiner Probe nachgewiesen werden.

## Anhang VI

Tabelle 28: Verkaufsmenge der untersuchten Arzneimittelwirkstoffe [17]

Wirkstoff	Verkaufsmenge 1996 [kg/Jahr]	Verkaufsmenge 1999 [kg/Jahr]	Verkaufsmenge 2001 [kg/Jahr]
Paracetamol	-	654418	-
Ibuprofen	182322	259846	344885
Carbamazepin	77950	86923	87605
Diclofenac	69874	81787	85801
Bezafibrat	44926	36585	33476
Phenazon	39020	29632	24843
Amitriptylin	-	7360	-
Gemfibrozil	13493	7301	5244
Opipramol	-	6000	-
Naproxen	6769	5452	5060
Estradiol	1029	1106 (1998)	1098
Ethinylestradiol	48	48 (1998)	47,5
Estron	0,2	0 (1998)	-
Diazepam	1149	-	1107
Fenoprofen	-	-	-
Sildenafil	-	-	-

## Anhang VII

Tabelle 29: Reinheit der Standardsubstanzen Teil 1 [%]

<b>Verunreinigung Standard</b>	<b>Bezafibrat</b>	<b>Diclofenac</b>	<b>Estradiol</b>	<b>Estron</b>	<b>Ethinyl- estradiol</b>
Bezafibrat	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diclofenac	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00
Estradiol	0,00	0,00	99,99	0,00	0,00
Estron	0,00	0,00	0,55	99,45	0,00
Ethinylestradiol	0,00	0,00	0,19	0,43	99,38
Fenopropfen	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Gemfibrozil	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ibuprofen	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00
Naproxen	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00
Paracetamol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabelle 30: Reinheit der Standardsubstanzen Teil 2 [%]

<b>Verunreinigung Analyt</b>	<b>Fenopropfen</b>	<b>Gemfibrozil</b>	<b>Ibuprofen</b>	<b>Naproxen</b>	<b>Paracetamol</b>
Bezafibrat	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diclofenac	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Estradiol	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
Estron	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ethinylestradiol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Fenopropfen	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Gemfibrozil	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00
Ibuprofen	0,00	1,14	98,80	0,00	0,00
Naproxen	0,00	0,00	0,00	99,98	0,00
Paracetamol	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00

## Anhang VIII

**Tabelle 31: Kenndaten der Kalibrierung im oberen Arbeitsbereich nach DIN 32645 (P=0,95; k=3)**

	NG [ng/L]	BG [ng/L]	rel. Rest- streuung [%]	rel. Verfah- rensstandard- abweichung [%]	Kalibriergerade
Bezafibrat	6,8	25,5	1,4	1,4	$y = 0,0298x + 0,0085$
Diclofenac	5,0	18,8	1,3	1,3	$y = 0,0141x + 0,0591$
β-Estradiol	62,9	232,0	2,9	2,9	$y = 0,0051x + 0,0320$
Fenopropfen	4,0	15,3	1,0	1,0	$y = 0,0154x - 0,0014$
Gemfibrozil	2,5	9,5	1,5	1,5	$y = 0,0543x + 0,0076$
Ibuprofen	14,5	54,5	1,2	1,3	$y = 0,0068x + 0,0238$
Naproxen	9,8	36,8	1,4	1,4	$y = 0,0176x + 0,0068$
Amitriptylin	5,4	20,5	1,3	1,3	$y = 0,2798x - 0,0930$
Carbamacepin	8,5	32,0	1,0	1,0	$y = 0,1562x - 0,2824$
Diazepam	1,9	1,9	0,4	0,4	$y = 0,0606x - 0,0306$
Opipramol	3,5	13,3	0,8	0,8	$y = 0,4079x + 0,0445$
Paracetamol	4,8	18,0	1,1	1,1	$y = 0,0252x + 0,0189$
Phenazon	7,2	26,8	1,7	1,7	$y = 0,1193x - 0,1462$
Sildenafil	3,6	13,7	0,9	0,9	$y = 0,0120x - 0,0257$

## Anhang IX

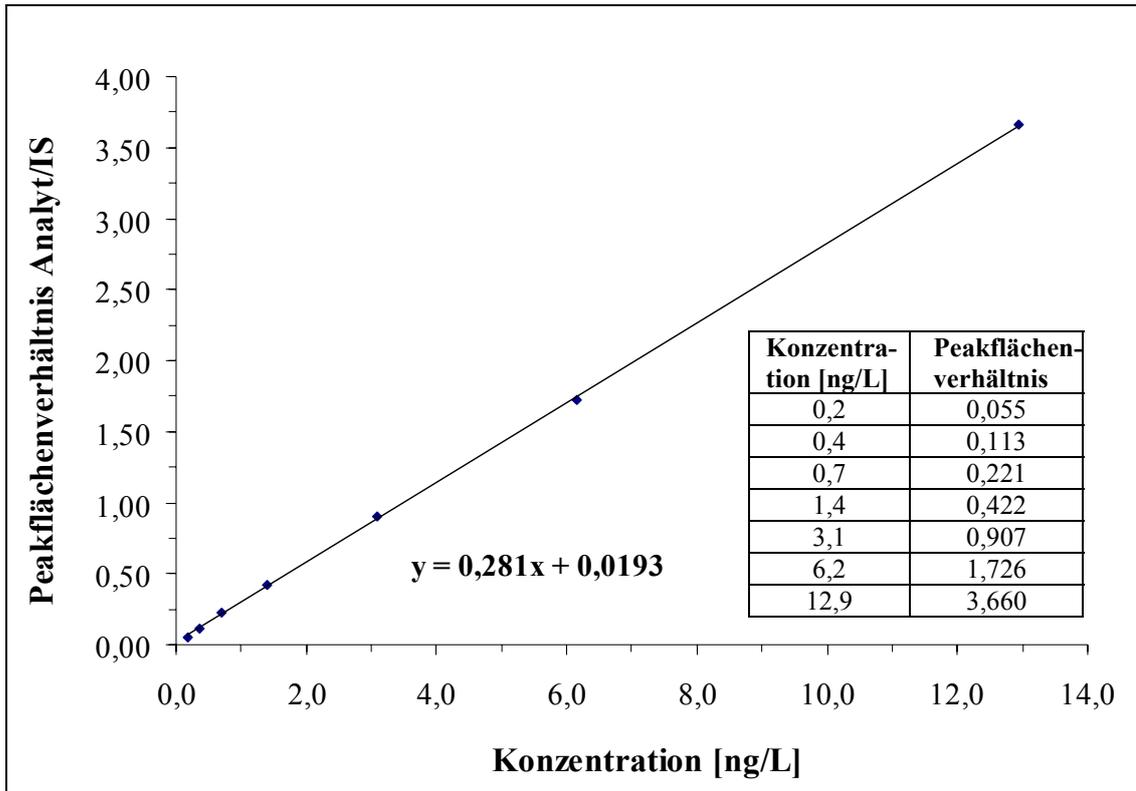


Abb. 71: Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Amitriptylin

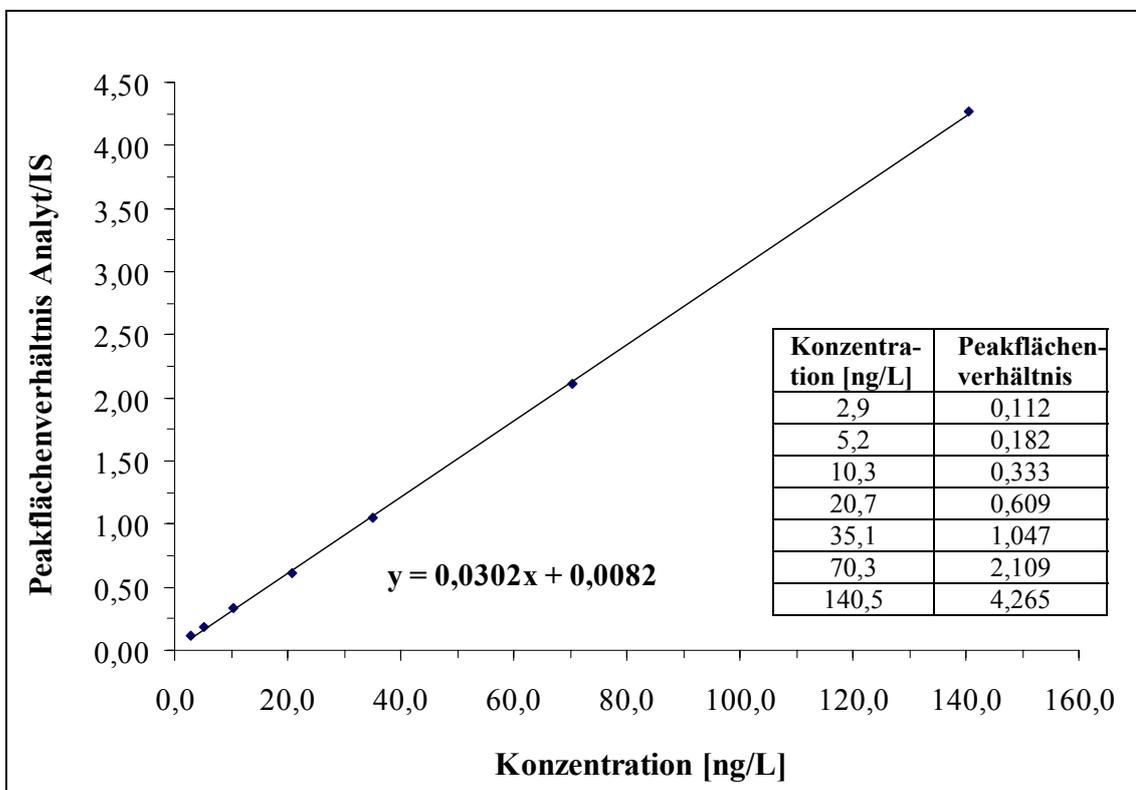


Abb. 72: Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Bezafibrat

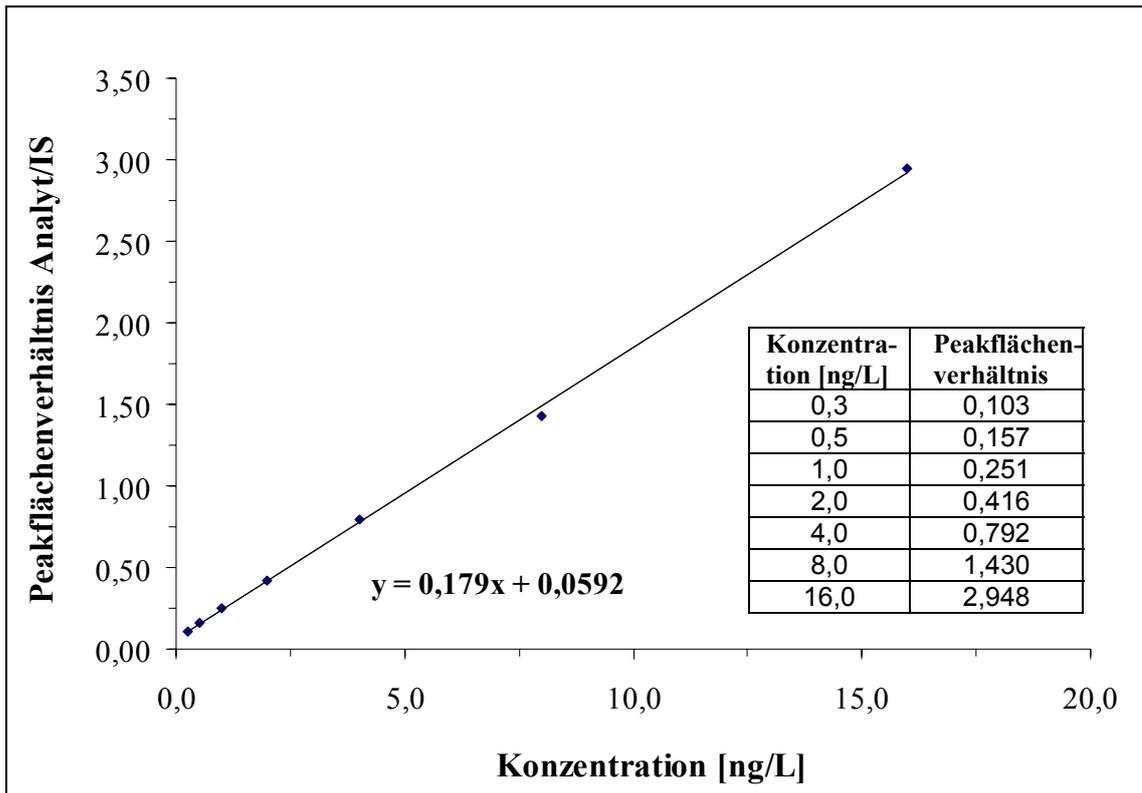


Abb. 73: Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Carbamazepin

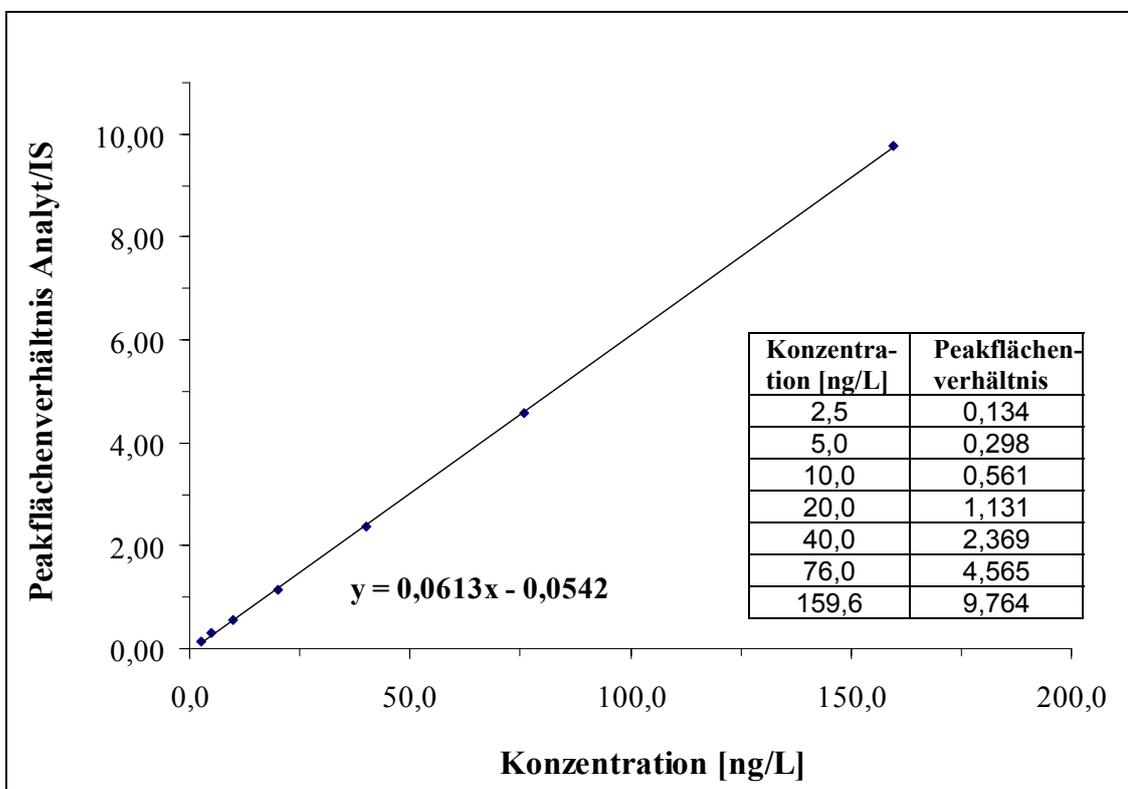


Abb. 74: Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Diazepam

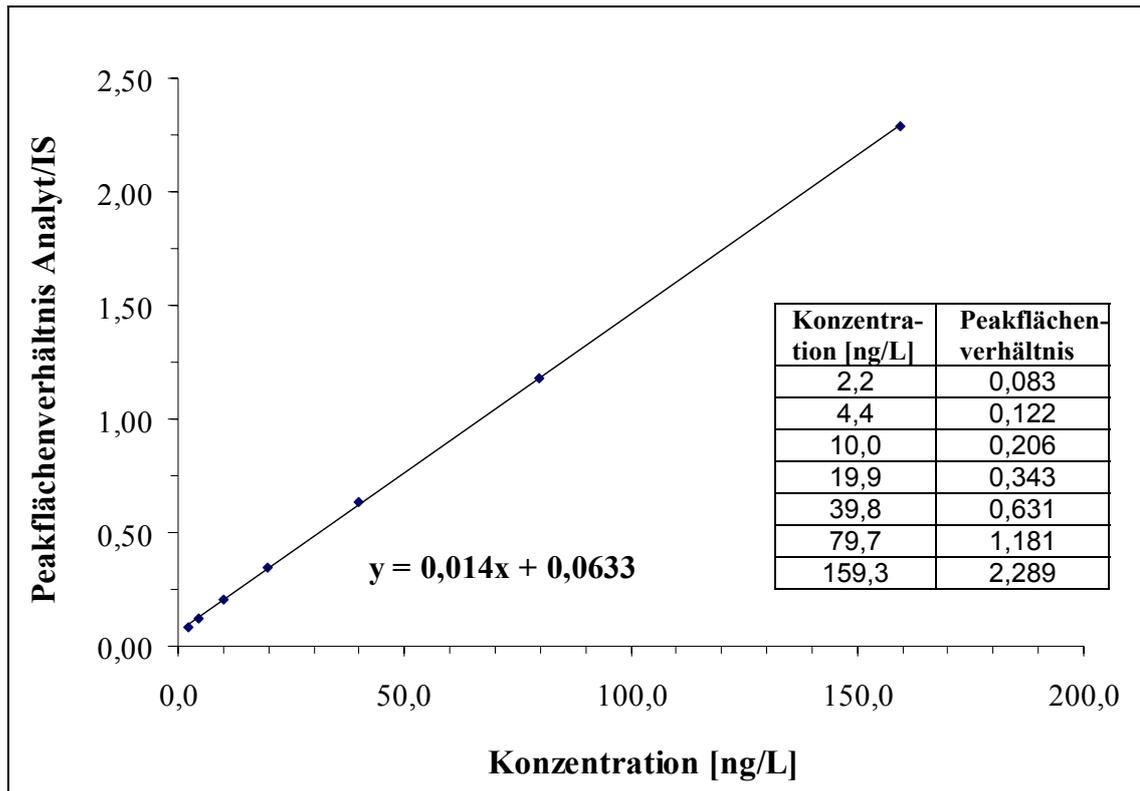


Abb. 75: Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Diclofenac

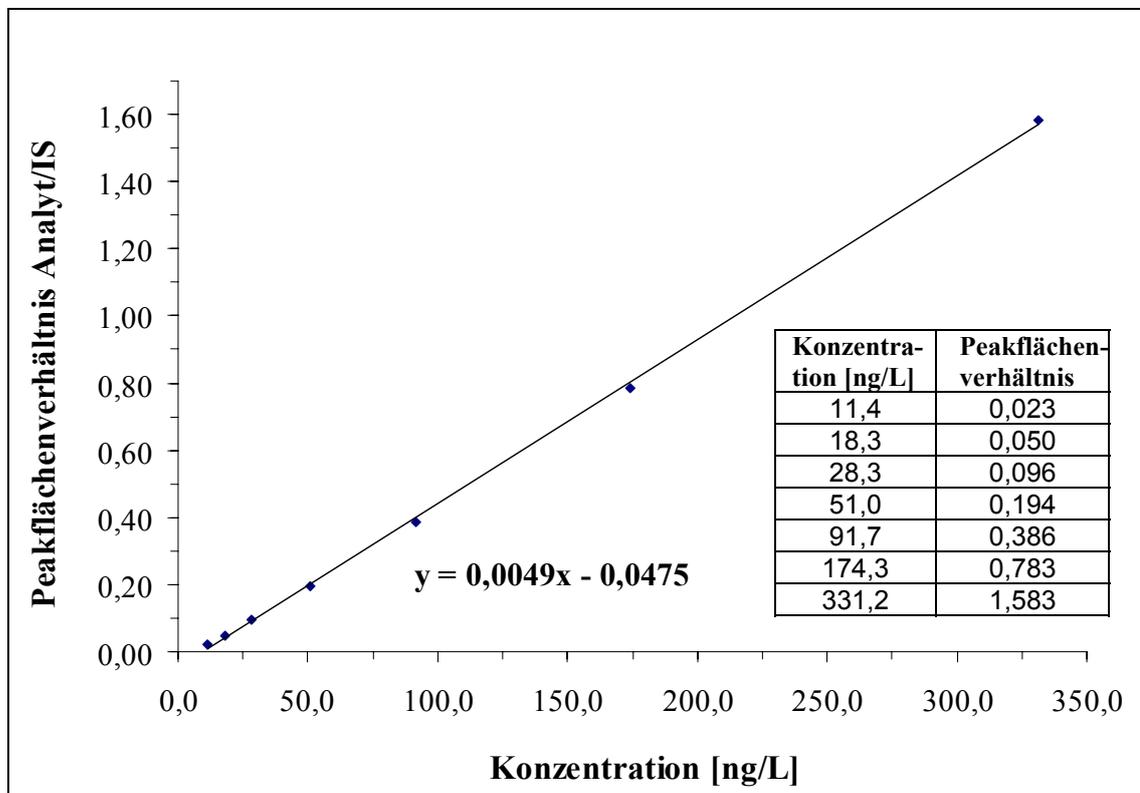


Abb. 76: Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Estradiol

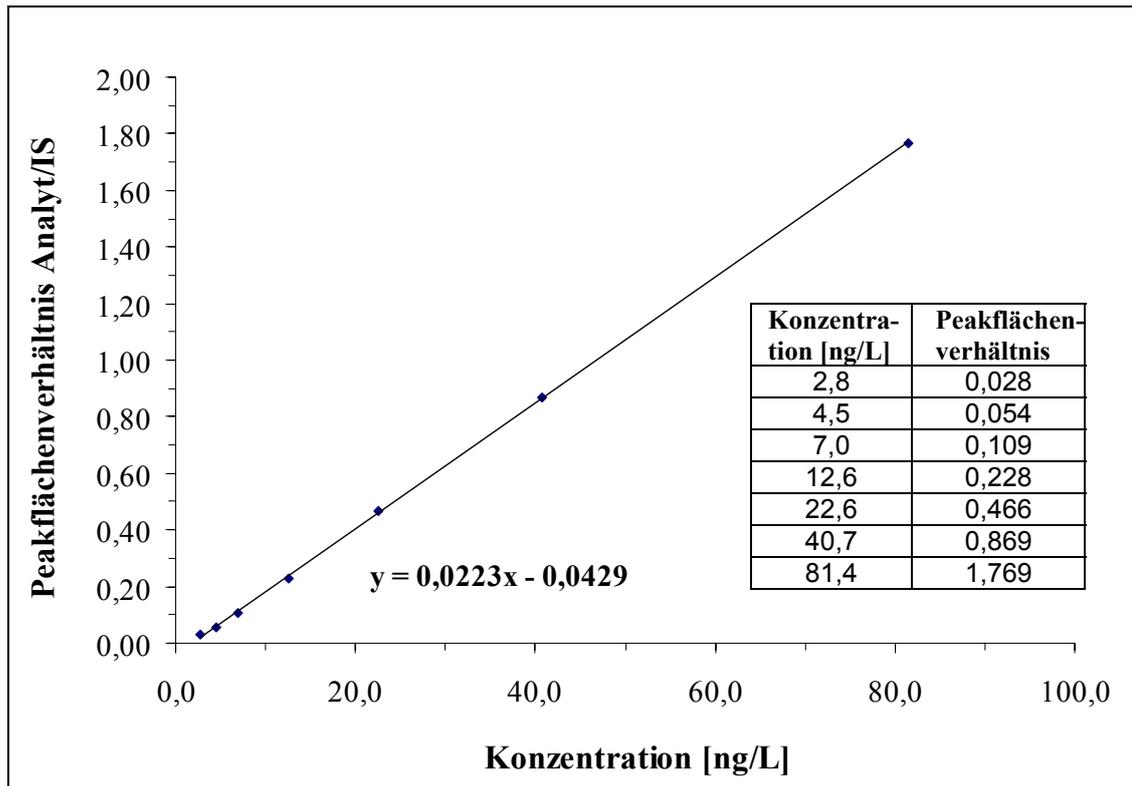


Abb. 77: Kalibrierung Estron

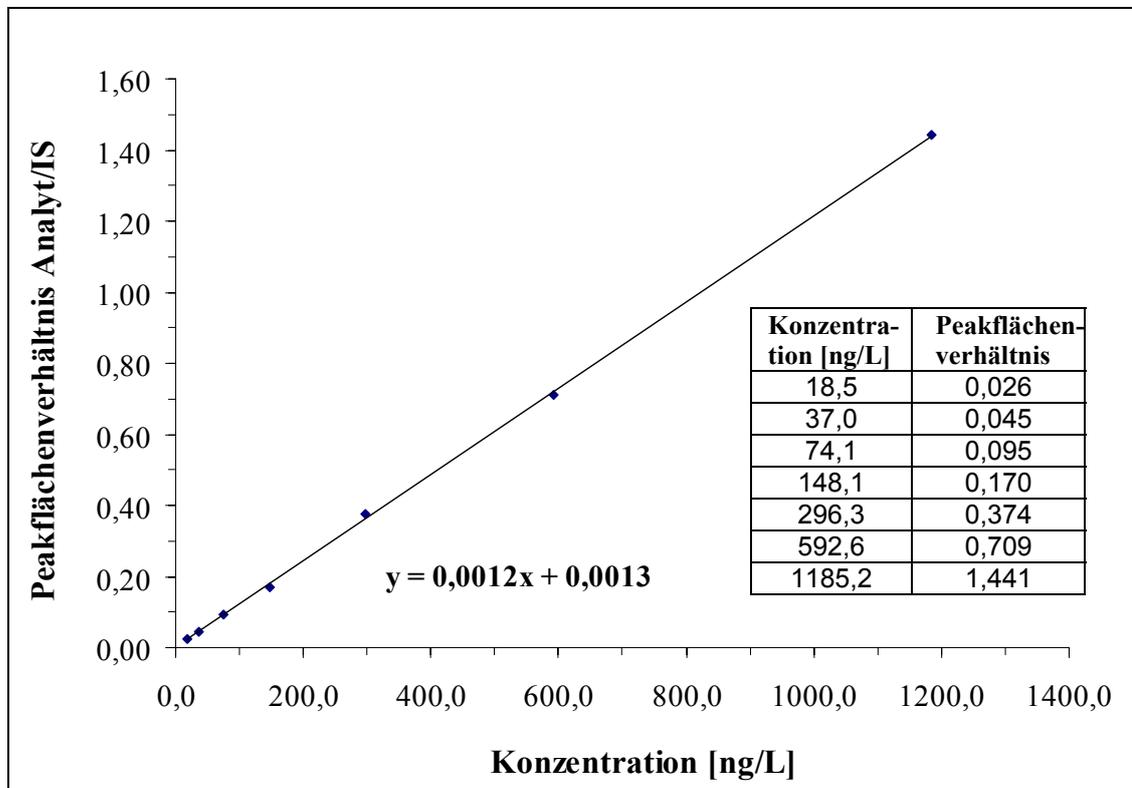


Abb. 78: Kalibrierung Ethinylestradiol

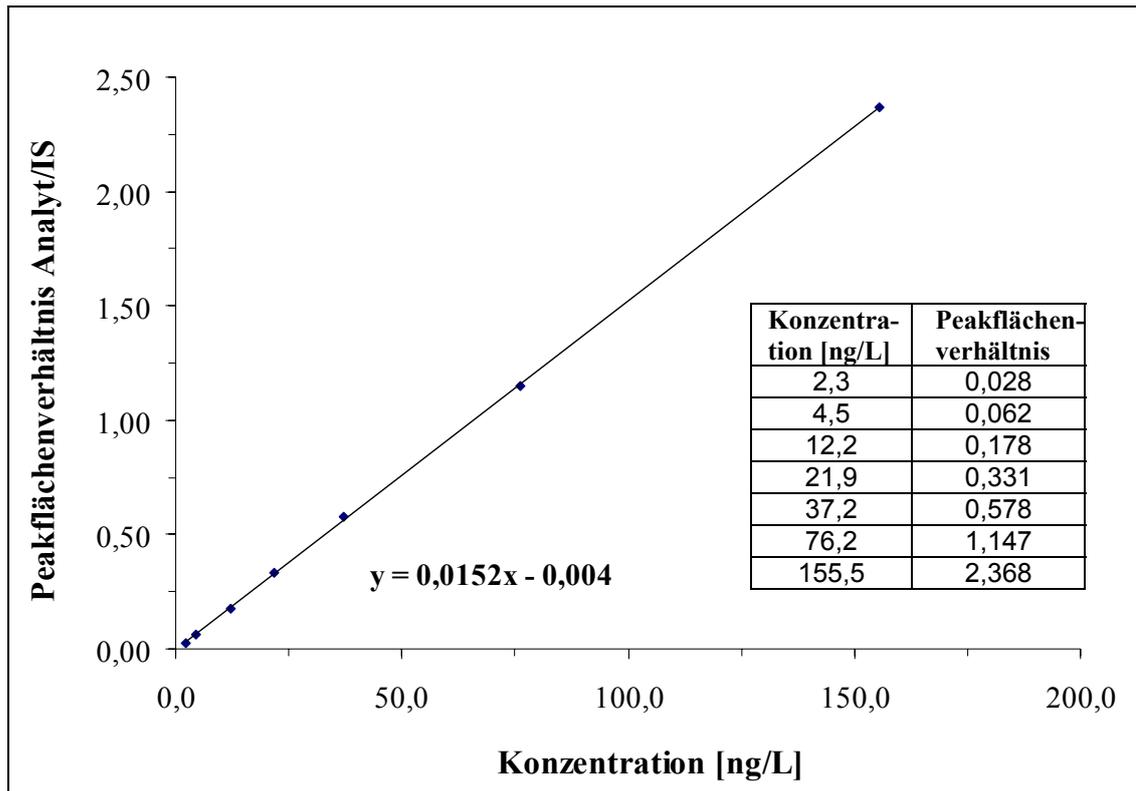


Abb. 79: Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Fenoprofen

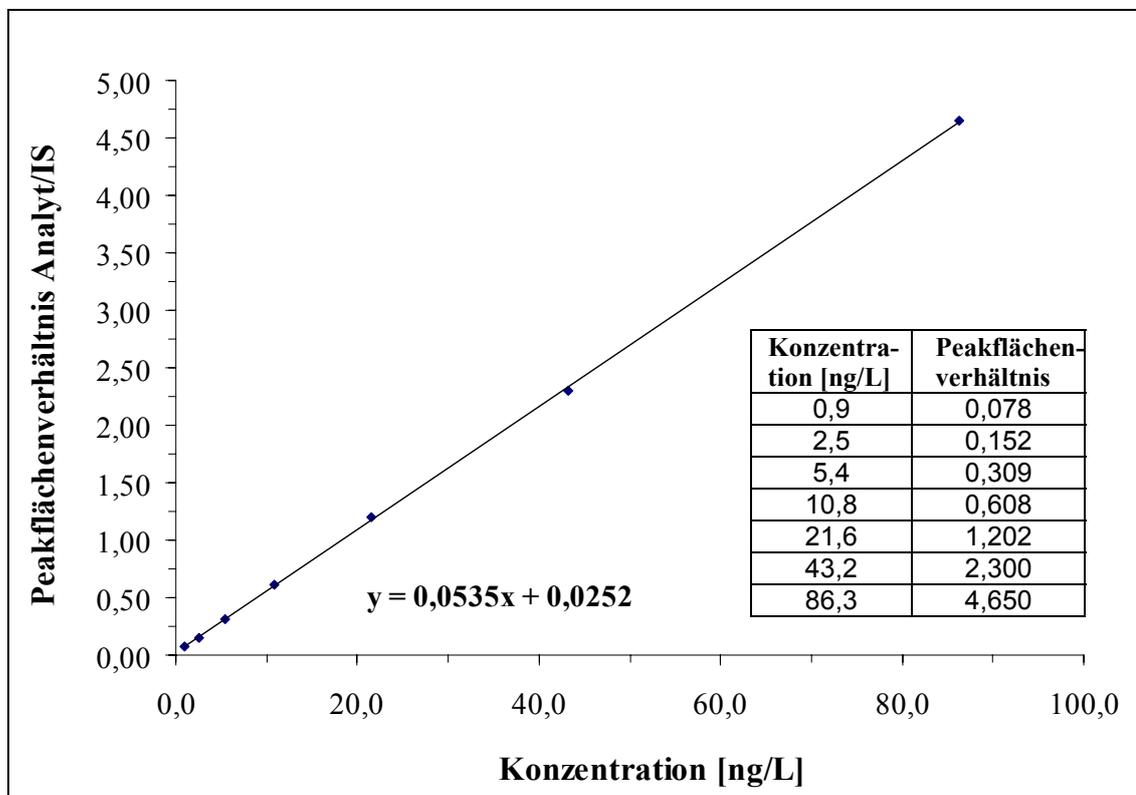


Abb. 80: Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Gemfibrozil

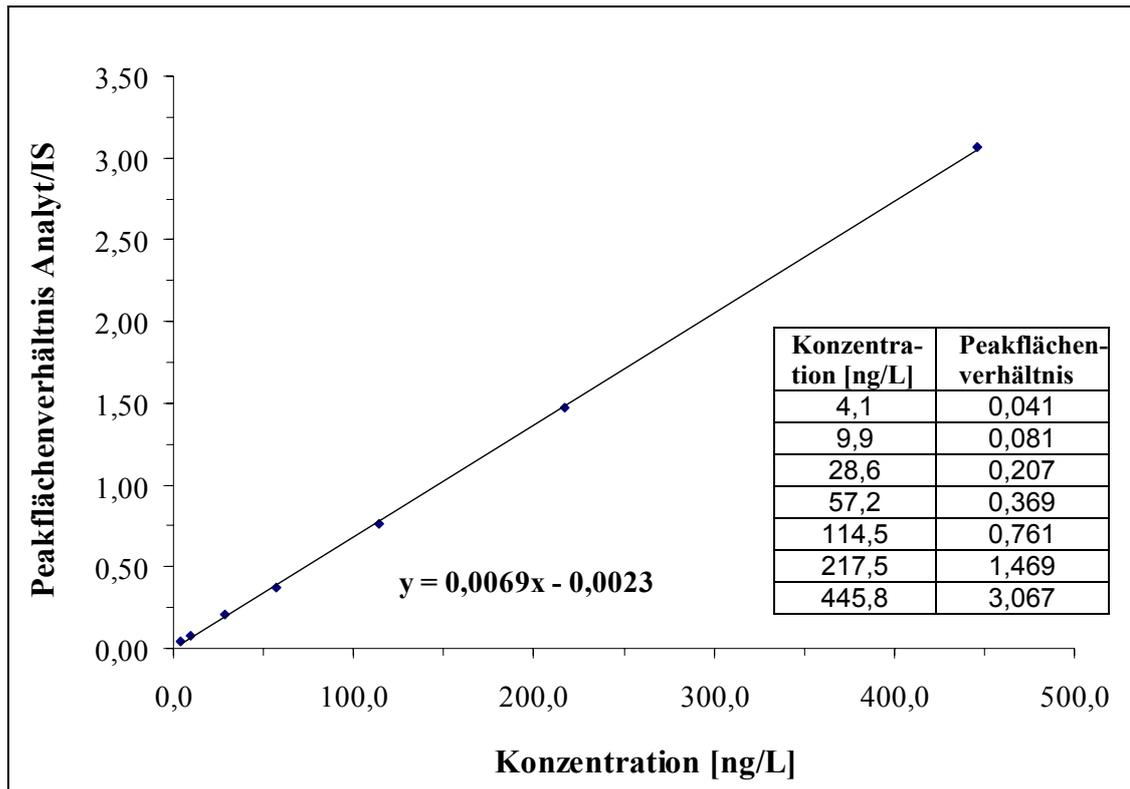


Abb. 81: Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Ibuprofen

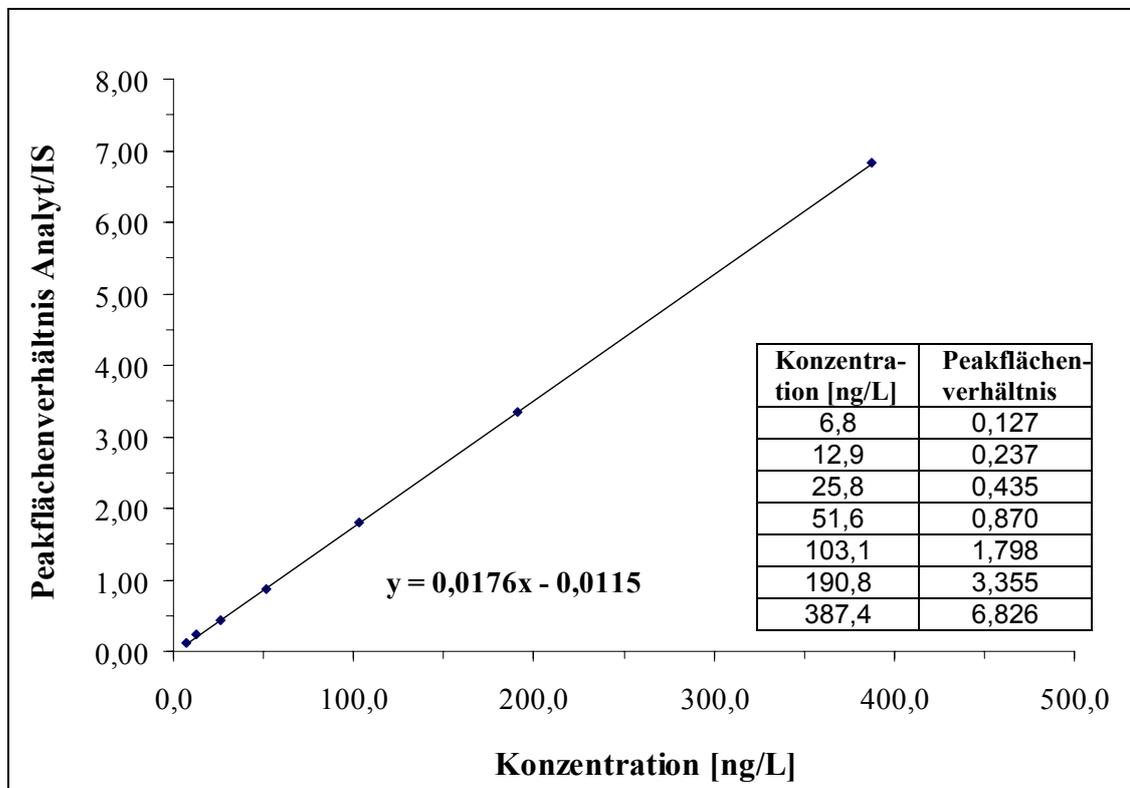


Abb. 82: Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Naproxen

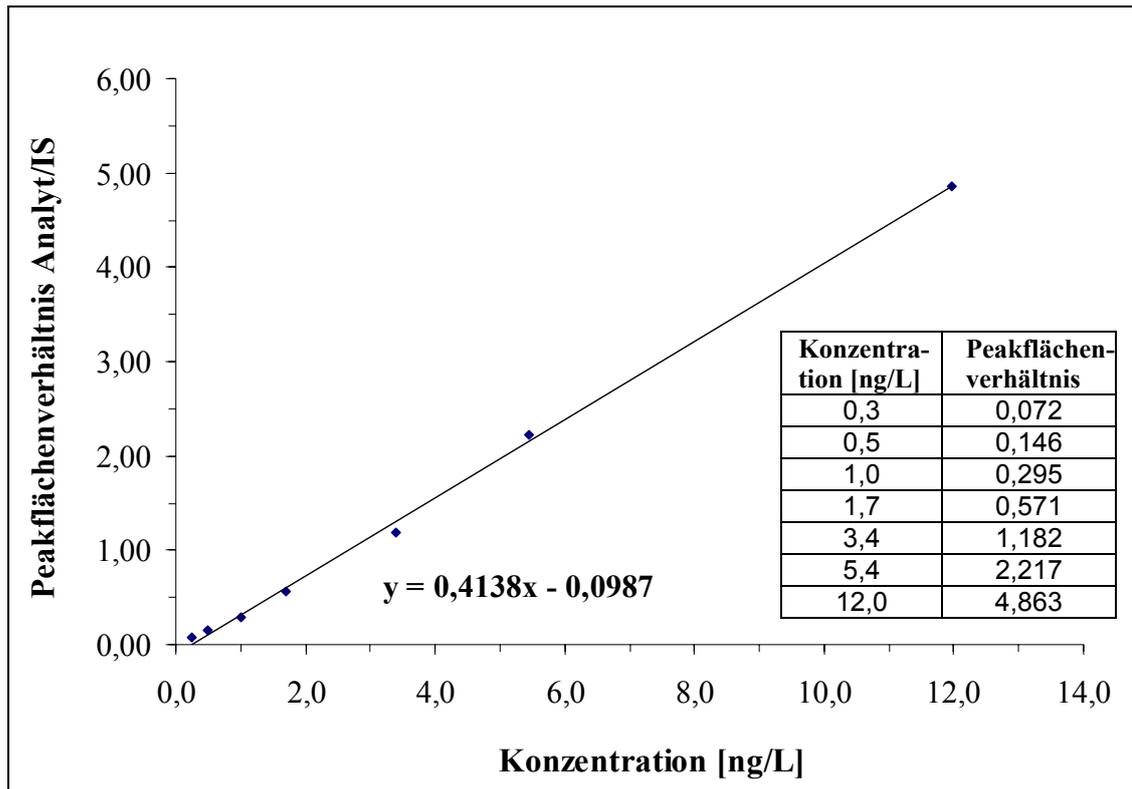


Abb. 83: Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Opipramol

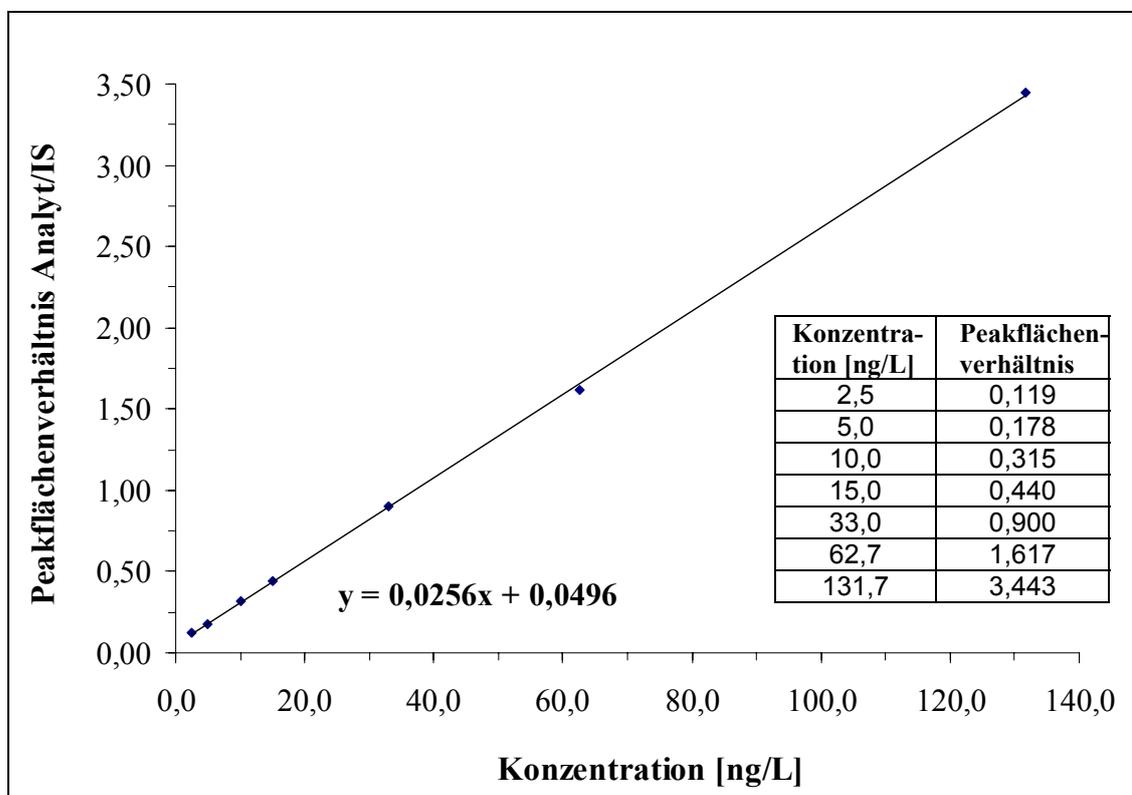


Abb. 84: Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Paracetamol

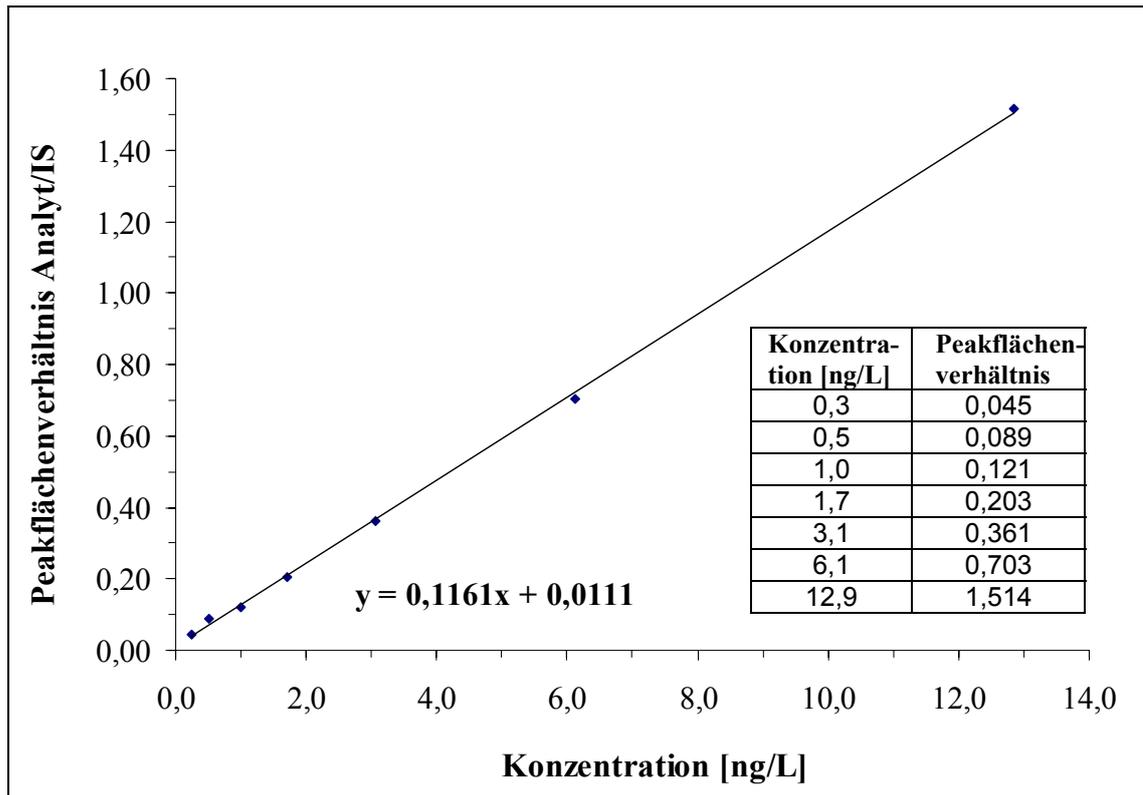


Abb. 85: Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Phenazon

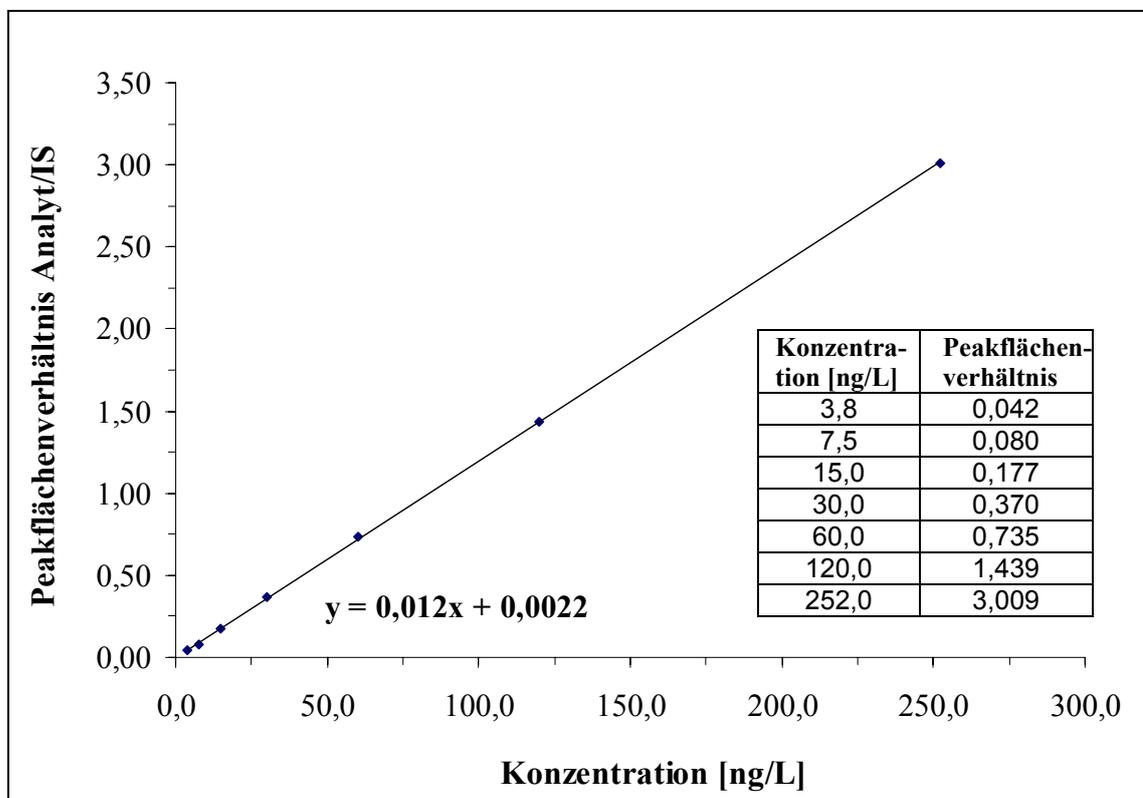


Abb. 86: Kalibrierung im unteren Arbeitsbereich für Sildenafil

# **Erklärung**

Ich erkläre an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind.

Daniel Kern

## **Publikationen**

R. Zhdanov, A. Muranov, N. Strazhevskaya, A. Shmyrina, S. Batrakov, L. Istratova, A. Kubatiev, A. Mulyukin, G. El-Registan, A. Kraus, D. Kern und W. Lorenz: Structural lipidomics of chromatin and nucleoid DNA-bound lipids and their role in chromatin assembly. 1<sup>st</sup> Symposium of Transregio 5: Chromatin: Assembly and Inheritance of Functional States, 9 – 11 October 2003

## **Poster**

35. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2006 an der TU-Dresden

- Entwicklung einer LC/MS/MS-Methode zum Nachweis von Polyether-Antibiotika in Hühnereiern  
Magdalena Abb, Daniel Kern und Wilhelm Lorenz

Jahrestagung der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie der GDCh 2006 an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

- Nachweis ausgewählter Arzneimittelwirkstoffe mit Hilfe von LC/MS/MS  
Jana Gerlach, Daniel Kern und Wilhelm Lorenz

# Curriculum Vitae

## Daniel Kern

Geburtsdatum: 10. April 1977 in Oelsnitz/V.  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Schulbildung:

1983 – 1992 Oberschule Bad Elster  
1992 – 1995 Gymnasium Oelsnitz/V. mit Abschluss Abitur

## Wehrdienst:

10/1995 – 7/1996 Grundwehrdienst Gera

## Akademischer und beruflicher Werdegang

10/1996 – 10/2001 Studium der Lebensmittelchemie in Dresden mit dem Diplom und dem 1. Staatsexamen als Abschluss  
11/2000 – 7/2001 Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Thema: „Bestimmung von Dimethylsulfid und Dimethyldisulfid mittels Headspace-GC-MS und Anreicherung über Festphasenmikroextraktion“  
9/2001 – 8/2002 2. Staatsexamen im Landesamt für Verbraucherschutz, Halle  
Abschluss: staatlich geprüfter Diplomlebensmittelchemiker  
10/2002 – 9/2006 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Lebensmittelchemie und Umweltchemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit abschließender Anfertigung einer Dissertation zum Thema „Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Arzneimittelwirkstoffen in Oberflächenwasser mittels LC-MS/MS“  
10/2006 – dato wissenschaftlicher Mitarbeiter der Universität Halle-Wittenberg Institut für Chemie