

Entwicklung innovativer Probevorbereitungstechniken zur Bestimmung neuer Spurenkontaminanten in wässrigen Proben und Aufklärung ihrer Abbauprodukte

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

> von Diplomchemikerin Franziska Lange

geboren am 19. September 1979 in Leipzig

Gutachter:

Prof. Dr. Wilhelm Lorenz Dr. habil. Peter Popp

Tag der Verteidigung: 06.09.2007

urn:nbn:de:gbv:3-000012838 [http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000012838]

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2003 bis März 2007 unter der Leitung von Frau Dr. M. Möder am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung, UFZ Leipzig GmbH, Department Analytik und Herrn Prof. Dr. W. Lorenz am Institut für Lebensmittel- und Umweltchemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg angefertigt.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wilhelm Lorenz für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit, die Arbeit am Helmholtzzentrum für Umweltforschung UFZ Leipzig GmbH durchführen zu können und Herrn Dr. habil. Peter Popp für sein stetes Interesse am Fortschreiten der Arbeit und seinen Bemühungen als Gutachter.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Monika Möder, die durch ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung in praktischen und theoretischen Fragen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Frau Dipl.-Ing. Steffi Schrader möchte ich danken für eine Vielzahl praktischer Tipps und ein stets offenes Ohr.

Herrn Dr. habil. Peter Kuschk und seinen Mitarbeitern möchte ich danken für die Zusammenarbeit bei den Langzeitversuchen. Herrn Prof. Dr. Clemens von Sonntag und seinen Mitarbeitern möchte ich danken für die Durchführung verschiedener Oxidationsversuche. Für die damit in Verbindung stehenden Toxizitätstests danke ich Herrn Dr. Herrmann Heipieper und seinen Mitarbeitern.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Kollegen der Arbeitsgruppe Organische Analytik des Helmholtzzentrums für Umweltforschung UFZ Leipzig GmbH bedanken, die durch die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis und ihre ständige Bereitschaft zur Diskussion einen wichtigen Beitrag geleistet haben.

All meinen Freunden danke ich für die schöne gemeinsame Zeit, Ablenkung vom Alltag und aufbauende Worte in weniger erfolgreichen Stunden.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, deren Unterstützung, nicht nur in finanzieller Hinsicht, mich all die Jahre durch mein Studium begleitet hat.

Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Analyse anthropogener Umweltschadstoffe, den PPCPs (*engl.* pharmaceuticals and personal care products, Arzneimittel und Körperpflegeprodukte), aus wässrigen Proben. Hierbei kommen lösemittelreduzierte Probenvorbereitungstechniken zum Einsatz, die in der "Green Chemistry" zunehmend herkömmliche, weniger umweltfreundliche Methoden ersetzen könnten. Im Rahmen der Dissertation wurden 21 PPCPs verschiedenster Stoffklassen betrachtet, die in ihren chemischen Eigenschaften stark variieren. Es wurden Lipidsenker, Antiphlogistika, ß-Blocker, ein Antiepileptikum, ein synthetisches Östrogen, synthetische Moschusduftstoffe und Schadstoffe industrieller Herkunft untersucht.

Der erste Teil der Arbeit beschreibt die Entwicklung zweier Verfahren zur schnellen und kostengünstigen, vor allem aber umweltbewussten, da lösemittelreduzierten Aufkonzentration der Zielanalyten zur späteren Detektion in Kopplung mit der LC-MS/MS: eine online-SPE-HPLC-MS/MS und eine miniaturisierte membranunterstützte Extraktion (Mini-MASE, *engl.* membrane assisted solvent extraction) gekoppelt an die LC-MS/MS. Zur Abschätzung der Leistungsfähigkeit der neuen Probenvorbereitungstechniken wurde eine Vergleichsmethode basierend auf der herkömmlichen Verfahrensweise mit SPE und anschließender GC-MS bzw. Derivatisierung und GC-MS erarbeitet. Die drei Methoden ermöglichen die Detektion der Zielanalyten im relevanten unteren ng/L-Bereich. Durch die Analyse von unterschiedlichen Wasserproben konnte die Anwendbarkeit der neuen Techniken bestätigt werden. Ein ubiquitäres Auftreten des Antiepileptikums Carbamazepin wurde beobachtet.

Der zweite Teil der Arbeit zeigt verschiedene Möglichkeiten, biologische und chemische Abbauprozesse in der Natur und der Klärwerkspassage zu simulieren. Es konnten exemplarisch mehrere Metabolite der Arzneimittel Carbamazepin, Clarithromycin und Metoprolol massenspektrometrisch identifiziert werden.

Abstract

The present work describes the determination of anthropogenic environmental pollutants the so-called pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water samples. Solvent reduced techniques were used, which have the potential to replace less environmental friendly methods for a "Green Chemistry" in the future. 21 PPCPs among them lipid lowering agents, antiphlogistics, ß-blocker, an antiepileptic drug, a synthetically hormone, synthetically musk fragrances and pollutants with industrial origin all possessing different chemical properties were involved in the study.

The first part of the work describes the development and application of two fast and cheap pre-concentration techniques: (i) online-SPE-HPLC-MS/MS and (ii) miniaturized membrane assisted solvent extraction (Mini-MASE) also linked to LC-MS/MS. Methods based on conventional techniques (SPE and GC-MS as well as SPE, derivatisation and GC-MS) were run in parallel for comparison of the performance. All three methods allow the determination of the analytes in the relevant ng/L-level. The analysis of different real water samples showed the applicability of the newly invented techniques. Thereby the ubiquitous appearance of carbamazepine was observed.

The second part of the work examines different possibilities to simulate biological and chemical degradation of PPCPs in nature and in sewage plant treatment. New metabolites of the pharmaceuticals carbamazepine, clarithromycin and metoprolol were identified.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Es wurden neben den Abkürzungen der Deutschen Rechtschreibung laut Duden, den Symbolen der chemischen Elemente des Periodensystems und den internationalen Einheiten folgende Abkürzungen verwendet:

ACN	Acetonitril
AF	Anreicherungsfaktor
APCI	athmospheric pressure chemical ionisation – chemische Ionisierung unter
	Atmosphärendruck
APPI	athmospheric pressure photo ionisation – photochemische Ionisierung
	unter Atmosphärendruck
BG	Bestimmungsgrenze
BSB ₅	biologischer Sauerstoffbedarf in 5 Tagen
c	Konzentration
CE	collision energy – Kollisionsenergie
CI	chemische Ionisierung
DOC	disolves organic carbon – gelöster organischer Kohlenstoff
DP	declustering potential
EC ₅₀	effect concentration – Konzentration, bei der 50 % der Testorganismen
	einen bestimmten Effekt zeigen
ECD	electron capture detector – Elektroneneinfangdetektor
EE	Ethylacetat, Essigester
EI	electron impact - Elektronenstoß
EPA	environmental protection agency – amerikanische Umweltbehörde
ESI	electron spray ionisation – Elektronensprayionisation
EU	Europäische Union
FS	fullscan – nichtselektiver Aufnahmemodus in der GC-MS und HPLC-MS
GC	Gaschromatographie
HPLC	high pressure liquid chromatography – Hochdruckflüssig-
	chromatographie
IE	Ionisierungsenergie
LDPE	low density polyethylene – Polyethylen mit niedriger Dichte
LLE	liquid-liquid-extraction – Flüssig-Flüssig-Extraktion

LM	Lösemittel
LPME	liquid phase micro extraction – Flüssigphasenmikroextraktion
LVI	Large Volume Injection – Injektion großer Volumina
m	Masse
MASE	membrane assisted solvent extraction – membranunterstützte
	Lösemittelextraktion
МеОН	Methanol
MMLLE	microporous membrane liquid liquid extraction
MPS	multi purpose sampler – multifunktionaler Autosampler
MRM	multiple reaction monitoring – selektiver Aufnahmemodus in der
	HPLC/MS
MS	Massenspektrometrie
MSD	massenselektiver Detektor
MW	molecular weight – molekulare Masse
m/z	Verhältnis Masse/Ladung
NCI	negative chemische Ionisierung
NWG	Nachweisgrenze
РАН	polyaromatic hydrocarbons – polyaromatische Kohlenwasserstoffe
PE	Polyethylen
PEC	predicted environmental concentration - vorhergesagte Umweltkonzen-
	tration
PFBBr	Pentafluorbenzylbromid
PNEC	predicted no-effect concentration – vorhergesagte Konzentration, bei der
	kein Effekt auftritt
PP	Polypropylen
ppb	parts per billion
PPCPs	pharmaceuticals and personal care products – Arzneimittel und Körper-
	pflegemittel
ppt	parts per trillion
PVC	Polyvinylchlorid
R	recovery – Wiederfindung
RP	reversed phase – Umkehrphase
RSD	relative standard deviation - relative Standardabweichung
RT	retention time – Retentionszeit

SBSE	stir bar sorptive extraction
SIM	single ion monitoring – selektiver Aufnahmemodus in der GC-MS und
	HPLC-MS
SLM	supported liquid membrane
SPE	solid phase extraction – Festphasenextraktion
SPME	solid phase micro extraction – Festphasenmikroextraktion
TIC	total ion current – Totalionenstrom
UFZ	Helmholtzzentrum für Umweltforschung, UFZ Leipzig GmbH
V	Volumen
VWD	variable wavelength detector – variabler Wellenlängendetektor

1		EINLEITUNG		1
2		ALLO	GEMEINER TEIL	3
	2.1	Pharm	MAZEUTISCHE RESTSTOFFE UND ANDERE PROBLEMSTOFFE URBANEN EINFLUSSES IN DE	R
		UMWE	ELT UND DEREN SPURENANALYSE	3
	2.2	Huma	NPHARMAKA MIT BESONDEREM FOKUS	5
	2.	.2.1	Carbamazepin	6
	2.	.2.2	<i>Clarithromycin</i>	8
	2.	.2.3	Metoprolol	9
	2.3	Probe	ENVORBEREITUNG	9
	2.	.3.1	Extraktionsmethoden – erschöpfende vs. Gleichgewichtsmethoden	9
		2.3.1.1	Flüssig-Flüssig-Extraction (LLE)	11
		2.3.1.2	Festphasenextraktion (SPE)	11
		2.3.1.3	Festphasenmikroextraktion (SPME)	12
	2.	.3.2	Membranen	12
		2.3.2.1	Grundlagen	12
		2.3.2.2	Membranvermittelte Flüssig-Flüssig-Extraktion	14
		2.3.2.3	Membranunterstützte Lösungsmittelextraktion	15
	2.4	TRENN	n- und Detektionstechniken – Quantifizierung und Identifikation der	
		Probi	emstoffe und ihrer Metaboliten	16
	2.	.4.1	Die Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS)	17
	2.	.4.2	Das Prinzip der Chemischen Ionisation in der GC-MS	18
	2.	.4.3	Die Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung (HPLC-MS)	19
	2.	.4.4	Die Funktionsweise der APPI-Ouelle	20
	2.	.4.5	~ Die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)	21
		2.4.5.1	O1 Full Scan	
		2.4.5.2	Product Ion Scan	23
		2.4.5.3	Precursor Ion Scan	23
		2.4.5.4	Constant Neutral Loss	24
		2.4.5.5	Selected Ion Monitoring (SIM)	24
		2.4.5.6	Multiple Reaction Monitoring (MRM)	25
	2.	.4.6	Der Einsatz von Derivatisierungen in der GC und HPLC	25
	2.5	OXIDA	TIONSPROZESSE ZUM ABBAU PROBLEMATISCHER VERBINDUNGEN	27
	2.	.5.1	Ozonierung	27
	2.	.5.2	Oxidation mit FENTON'S Reagenz	28
3		EXPE	RIMENTELLER TEIL	29
	3.1	GEDÄ	re .	29
	2.1 2	1 1	GC-MS	20 20
	э. 2	1.1		29
	3.	.1.2 Ver		29
3.2 VERWENDETE CHEMIKALIEN			ENDETE CHEMIKALIEN	31
	3.3	PROBE	EN	31

	3.	3.1	Probenvorbereitung der Vergleichsmethode	32
			SPE	32
			Cleanup	32
			Derivatisierung	32
	3.	3.2	Probenvorbereitung der online-SPE-HPLC-MS/MS	33
	3.	3.3	Probenvorbereitung der Mini-MASE	33
	3.4	Onlin	ve-SPE-HPLC-MS/MS – Aufbau und verwendetes Material	33
	3.5	HALB	AUTOMATISIERTE MEMBRANUNTERSTÜTZTE EXTRAKTION (MINI-MASE) –	
		Arbe	ITSSCHRITTE UND APPARATUR	34
	3.6	BESTI	MMUNG DER ANALYTISCHEN PARAMETER	34
			Nachweisgrenze (NWG)	34
			Relative Standardabweichung (RSD)	34
			Anreicherungsfaktor (AF)	35
	3.7	VERSU	UCHE ZUM BIOLOGISCHEN ABBAU VON CARBAMAZEPIN	35
	3.8	Снем	ISCHE OXIDATION VON CARBAMAZEPIN MIT FENTON'S REAGENZ	37
	3.9	Ozon	IERUNG VON CLARITHROMYCIN UND METOPROLOL	37
	3.10	Umse	TZUNG VON ALDEHYDEN UND KETONEN MIT DINITROPHENYL-HYDRAZIN (DNPH) ZU DE	EN
		ENTSP	RECHENDEN HYDRAZONEN	38
1		FDC	EDNICSE IND DISKUSSION	20
4		ENG	EDNISSE UND DISKUSSION	37
	4.1	BESTI	MMUNG PHARMAZEUTISCHER RESTSTOFFE IN WÄSSERN	39
	4.	1.1	Vergleichsmethode	39
	4.	1.2	Neue Anreicherungsmethoden	. 46
		4.1.2.1	Online-SPE-HPLC-MS/MS	46
			Chromatographie	47
			Lösemittelvolumen	48
			Probevolumen	49
			Anreicherungsgeschwindigkeit	50
			Nachweisgrenze, Wiederfindung.	51
		4122	Membranunterstützte Analutanreicherung	52 54
		4.1.2.2	Aufhau einer membranunterstützten Extraktionsanparatur	54
			Folienmaterial	5 1
			Aussalzeffekt	56
			Anreicherungsfaktoren	57
			pH-Wert-Abhängigkeit des Anreicherungsfaktors	58
			Temperaturabhängigkeit des Anreicherungsfaktors	59
			Optimierung der Extraktionsdauer, Präzision der Nicht-GGW-Methode	59
	4.	1.3	Realproben	62
		4.1.3.1	online-SPE-LC-MS/MS	62
		4.1.3.2	2 Mini-MASE	64
	4.	1.4	Photoionisation – ein neues Interface zur Atmosphärendruckionisation in der LC-MS.	66
		4.1.4.1	Dopantauswahl	67

	4.1.4.2	2 Dopantmenge	68
	4.1.4.3	3 Laufmittelzusammensetzung	68
	4.1.4.4	4 Matrixeinfluss	69
	4.1.4.5	5 Vergleich der Elektrosprayionisation und der Atmosphärendruck-photoionisation in der	
		LC-MS/MS der relevanten Verbindungen	71
2	1.2 Ident	IFIKATION VON METABOLITEN/UMSETZUNGSPRODUKTEN DER PHARMAZEUTISCHEN	
	RESTS	STOFFE	73
	4.2.1	Carbamazepin – Produkte des biologischen Abbaus	74
	4.2.2	Carbamazepin – Produkte des chemisch oxidativen Abbaus (FENTON'S Reaktion)	76
	4.2.3	Ozonierung	85
	4.2.3.1	Ozonierung von Clarithromycin	86
		Clarithromycin – Produkte der Ozonierung	87
	4.2.3.2	2 Ozonierung von Metoprolol	91
		Metoprolol – Produkte der Ozonierung	93
5	ZUSA	AMMENFASSUNG UND AUSBLICK	98
6	LITE	RATURVERZEICHNIS	100
AB	BILDUNG	SVERZEICHNIS	105
ТА	BELLENV	/ERZEICHNIS	108
AN	HANG		I

1 Einleitung

Mit steigendem Umweltbewusstsein und zunehmender Kenntnis der Toxizität von Umweltchemikalien erhöht sich das Probenaufkommen für Monitoringzwecke und damit steigen auch die Anforderungen an die eingesetzten Probenvorbereitungs- und Analysetechniken. Für zahlreiche Substanzgruppen wie Pestizide und Chlororganika existieren Richt- bzw. Grenzwerte zum Schutz der Natur und des Menschen. Diese Grenzwerte erfordern die Detektion der Schadstoffe im Spuren- und Ultraspurenbereich.

Mit dem Nachweis der Clofibrinsäure, einem Metabolit des Blutfettsenkers Clofibrat, im Berliner Oberflächenwasser 1994 wurde der Focus von Chemikern und Ökotoxikologen auf eine neue Substanzgruppe geleitet – Xenobiotika zu denen unter anderem Arzneimittel sowie deren Reststoffe gehören. Die amerikanische Umweltbehörde US EPA bezeichnet diese Gruppe von Schadstoffen auch als PPCPs (*engl.* pharmaceuticals and personal care products). Der Haupteintrag der PPCPs in die Umwelt erfolgt in erster Linie über Ausscheidungen von Mensch und Tier nach Anwendung der Wirkstoffe zur Behandlung und Vorbeugung von Krankheiten. Weitere bioaktive Verbindungen, wie z. B. Additive in Haushaltsprodukten oder Kosmetika gelangen über den Abwasserpfad in die aquatische Umwelt. Aufgrund ungenügenden Rückhalts in den Kläranlagen können die PPCPs in Oberflächengewässer gelangen und dort auf aquatische Organismen wirken. Der Kreislauf zum Menschen kann sich schließen, wenn besonders resistente Verbindungen auch bei der Trinkwassergewinnung nicht entfernt werden können.

Grenzwerte für Arzneimittelrückstände in Trinkwasser existieren bisher nicht. Der Eintrag und das Auftreten dieser Stoffe muss trotzdem vorsorgend verfolgt werden, um Schäden für Mensch und Umwelt abschätzen zu können und gegebenenfalls rechtzeitig Regelungen zum Schutz von Mensch und Umwelt zu treffen.

Aufgrund ihrer vorwiegend hohen Polarität stellen die oben genannten Schadstoffe besondere Anforderungen an die Analytik. Etablierte Methoden, die die Detektion in wässrigen Proben ermöglichen, sind die Flüssig-Flüssig-Extraktion und die Festphasenextraktion. Die bei diesen Verfahren eingesetzten hohen Lösemittelmengen sind mit dem zuvor erworbenen bzw. gestiegenen Umweltbewusstsein nicht zu vereinbaren. Überdies beinhalten sie zeitaufwändige Prozesse mit einer Vielzahl an Arbeitsschritten, bei denen zahlreiche Fehlerquellen existieren und Analytverluste auftreten können. Mikroextraktionen hingegen arbeiten lösemittelfrei oder mit nur geringen Lösemittelmengen, sind schnell und geben dabei die Möglichkeit zur Automatisierung. Derartige Techniken, die dem Bereich "green analytical chemistry" zugeordnet werden, gewinnen zunehmend an Bedeutung.

Ziel der Arbeit soll es sein, bestehende Modelle der Mikroextraktion zur unkomplizierten und schnellen Bestimmung von Schadstoffen in Wässern auf die neuartigen Kontaminanten der pharmazeutischen Reststoffe anzuwenden. Dazu soll die membranunterstützte Lösemittelextraktion (*engl.* membrane assisted solvent extraction, MASE) zum Einsatz kommen. Die Möglichkeit der Verwendung verschiedener Extraktionsmaterialien, Membranen und Festphasen soll untersucht und die erarbeiteten Methoden anschließend auf Anwendbarkeit für Realproben getestet werden.

Im zweiten Teil der Arbeit soll durch biologische und chemische Abbauprozesse, die dem Klärprozess nachempfundenen sind, die Metabolisierung ausgewählter Arzneimittel detaillierter betrachtet und entstehende Produkte massenspektrometrisch identifiziert werden.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Pharmazeutische Reststoffe und andere Problemstoffe urbanen Einflusses in der Umwelt und deren Spurenanalyse

Eine Umweltverschmutzung durch bioaktive Verbindungen wurde bereits Ende der 1970er Jahre sichtbar [Richardson 1985]. Seit Mitte der 1990er Jahre, als Clofibrinsäure, ein aktiver Metabolit des Lipidsenkers Clofibrat, erstmals im Berliner Oberflächenwasser gefunden wurde [Stan 1994], ist auch die Öffentlichkeit in Deutschland sensibilisiert für die Problematik der Xenobiotika in der Umwelt. Als Xenobiotika in der aquatischen Umwelt gelten unter anderem Arzneimittel und deren Rückstände, hormonaktive Verbindungen (engl. endocrine disrupting compounds, EDCs), sowie Stoffe aus Körperpflege und Hygiene und deren Metabolite. Vor allem die weit verbreiteten Lipidsenker (Bezafibrat, 33 t 2001 [BLAC 2003], Clofibrat, Gemfibrozil, Fenofibrat,), beta-Blocker (Metoprolol, 93 t 2001 [BLAC 2003], Propranolol), Antiphlogistika/Analgetika (Diclofenac 86 t 2001 [BLAC 2003], Ibuprofen, Phenazon, Naproxen, Indometacin), das Antiepileptikum Carbamazepin und das Antibiotikum Erythromycin sollen aufgrund ihrer Verwendungshäufigkeit und hohen eingesetzten absoluten Menge Bestandteil der Forschung dieser Arbeit sein. Weiterhin werden EDCs industrieller Herkunft (technisches Nonylphenol, Bisphenol A) und ein synthetisches Hormon (Ethinylestradiol) sowie die derzeit am häufigsten eingesetzten synthetischen Moschusduftstoffe (Galaxolid und Tonalid), die in Produkten des täglichen Bedarfs wie Waschmittel und Seife Verwendung finden, betrachtet.

Arzneistoffe werden als hochaktive Stoffe eingesetzt – ihre Wirksamkeit ist breit gefächert und richtet sich im Allgemeinen gegen pathogene Bakterien, Protozoen, Würmer und Insekten. Antibiotika und Antiparasitika beeinflussen den Stoffwechsel und/oder verändern das hormonelle Gleichgewicht. Sie können die Signalübertragung in einem Organismus modulieren oder töten als Zytostatika schnell wachsende entartete Zellen ab. Dass Humanpharmaka unerwünschte Nebenwirkungen beim Patienten hervorrufen können, ist bekannt. Dass jedoch ebenso Effekte auf Flora und Fauna auftreten können, wenn Arzneistoffe in die Umwelt gelangen, ist aufgrund ihrer biologischen Aktivität nicht nur denkbar, sondern wahrscheinlich.

Als Beispiel soll hier der rapide Populationsrückgang mehrerer Geierarten in Indien und Pakistan angeführt werden [Oaks 2004]. Der Geier hat in der Region eine große kulturelle und religiöse Bedeutung (Religion der Parsen). Als Aasfresser spielen sie jedoch eine ebenso wichtige Rolle bei der Vorbeugung und Eindämmung von Infektionskrankheiten. Ausgelöst wurde das Massensterben der Vögel, das fast zur Ausrottung einiger Arten führte, durch den Entzündungshemmer Diclofenac. Der Wirkstoff, der Rindern bei Entzündungskrankheiten verabreicht wird, führt bei Geiern, die behandelte Tiere fressen, jedoch zu akutem Nierenversagen. Die Rettung der Arten ist auch Dank der Naturschutzorganisation Birdlife International in Sicht, denn mittlerweile wurde die Anwendung von Diclofenac in der Tierzüchtung in Indien gesetzlich verboten. In Zuchtzentren soll der Fortbestand der betroffenen Arten

Das Beispiel der indischen Geier zeigt, wie Xenobiotika indirekt der Natur nachhaltig schaden können. Hauptsächlich erfolgt der Eintrag von bioaktiven Stoffen in die Umwelt über die Haushalte auf natürlichem Ausscheidungs- bzw. Abwasserweg, in geringem Maß auch über die Entsorgung im Abfallpfad. Nur die Klärsysteme der neuesten Generation sind mit Technologien ausgestattet, die polare Verbindungen der oben genannten Schadstoffgruppe aus dem Abwasser filtern. Gelingt dies nicht, erfolgt der Eintrag über den Kläranlagenauslauf ins Oberflächenwasser. Hohe Wasserlöslichkeit und die Resistenz gegenüber biotischem und abiotischem Abbau können dazu führen, dass verschiedene Substanzen als Spurenkontaminanten auch im Grundwasser wiedergefunden werden. Der Kreislauf schließt sich, wenn einzelne besonders resistente Stoffe wie Carbamazepin im Trinkwasser auftauchen, welches aus Uferfiltrat oder aus Grundwasser gewonnen wurde [Ternes 2001].

Ein Teil der betreffenden Verbindungen hat ein bekanntes Risikopotenzial. Hierzu zählen z. B. die östrogenen Effekte, die EDCs auf das Hormonsystem aquatischer Organismen ausüben [Phillips 1999; Propper 2005; Mills 2005] oder die Inhibierung der MRX-Transporter des Multi-Xenobiotic-Resistance (MRX) Mechanismus in *Mytilus californianu*, einer Meeresmuschel, durch die synthetischen Moschusduftstoffe Tonalid und Galaxolid [Luckenbach 2004]. Für den Großteil der Schadstoffklasse ist das Gefahrenpotenzial noch unbekannt, allerdings kann ein Risiko, das von einer Dauerbelastung mit niedrigen Konzentrationen der Xenobiotika ausgeht, nicht ausgeschlossen werden. Ein Monitoring zur Abschätzung potentieller Gefährdungen von Mensch und Umwelt durch Xenobiotika ist damit der erste Schritt für einen nachhaltigen Umweltschutz.

Die Herausforderung eines solchen Monitorings aus analytisch chemischer Sicht stellt sich durch die erfahrungsgemäß niedrigen Schadstoffkonzentrationen, die detektiert werden müssen, die auftretenden Störeffekte durch Matrixeinflüsse und die für die instrumentelle Analytik ungünstige chemische Beschaffenheit der meisten dieser Verbindungen. Die Konzentrationen der Zielanalyten liegen im Spuren- und Ultraspurenbereich (ppb und ppt), so dass die Nachweisgrenzen der Analysegeräte nicht ausreichend sind und die Probenvorbereitung zum entscheidenden Faktor für verwertbare Analyseergebnisse wird. Da es sich bei Realproben zumeist um ein Gemisch verschiedener Substanzklassen handelt, muss eine Multikomponentenmethode gefunden werden, die einen großen Bereich polarer, neutraler und basischer Analyte mit der geringsten Anzahl unterschiedlicher Arbeitsschritte erlaubt. Eine Tabelle mit den Strukturen und ausgewählten Eigenschaften der betrachteten Verbindungen ist im Anhang zu finden (Tabelle 14).

In der Wasseranalytik im Spurenbereich ist die sehr zeitaufwändige und kostenintensive Festphasenextraktion weit verbreitet. Mithilfe von unterschiedlichen Membranverfahren als innovative Probenvorbereitungstechniken konnten für einige Substanzgruppen (z. B. Organophosphorpestizide, Chlorphenole) Alternativen gefunden werden (siehe Abschnitt 2.3.2.3), die kostengünstig und vor allem mit weniger Zeitaufwand zuverlässige Ergebnisse erzielen. Nur schnelle, preiswerte Analysemethoden ermöglichen großflächige Screeninguntersuchungen, um Verbleib, Verhalten und Schicksal der Stoffe in der aquatischen Umwelt zu betrachten.

Das Spektrum der Analyten potenziert sich, betrachtet man deren Metabolismus in Lebewesen bzw. den chemischen und biologischen Abbau in Kläranlagen und aquatischer Umwelt. Diese überaus vielfältigen Umsetzungsreaktionen begründen die Notwendigkeit die Risikoabschätzung auf die entstandenen Metabolite zu erweitern, wofür die Detektion und Identifikation der gebildeten Produkte Voraussetzung ist.

2.2 Humanpharmaka mit besonderem Fokus

Die Humanpharmaka Carbamazepin, Clarithromycin und Metoprolol werden in diesem Abschnitt näher betrachtet, da sie als Beispielsubstanzen eingesetzt wurden, um das Verhalten dieser Stoffe bei chemischem und biologischem Abbau zu betrachten.

2.2.1 Carbamazepin



Abbildung 1: Strukturformel Carbamazepin

Carbamazepin (Abbildung 1) ist ein Antiepileptikum. Weitere häufig eingesetzte Vertreter der Antiepileptika/Antikonvulsiva sind Phenytoin, Valproat, Diazepam und Clonazepam. Carbamazepin wird hauptsächlich in der Leber verwertet und dort zu 10,11-Epoxicarbamazepin und anderen Produkten metabolisiert [van Rooyen 2002]. Carbamazepin vermindert zur Vermeidung und Abschwächung epileptischer Anfälle die Leitfähigkeit spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle. Nebenwirkungen sind u. a. Schwindelgefühl, Benommenheit, Sehstörungen, Nystagmus, Ataxie, Herzrhythmusstörungen und Nierenfunktionsstörungen. Die verschriebene Verbrauchsmenge für Carbamazepin in Deutschland lag im Jahr 2001 bei 87,6 t [BLAC 2003], dabei entspricht die definierte Tagesdosis (*engl.* defined daily dose, DDD) DDD = 1 g [WHO 2006].

Carbamazepin gilt als sehr persistent in der Umwelt [Löffler 2005] und passiert zu einem Großteil die kommunale Kläranlage. Die Eliminierungsrate ist mit 7 % sehr gering [Ternes 1998]. Zur Einstufung der ökotoxikologischen Relevanz des Carbamazepins wurden von Cleuvers Toxizitätstests mit Algentests und akutem Daphnientest durchgeführt. Die EC_{50} -Werte¹ lagen bei 85 mg/L bzw. 157 mg/L [Cleuvers 2002]. Substanzen mit einem EC_{50} zwischen 10 und 100 mg/L werden laut EU als "schädlich für Wasserorganismen" (R52) eingestuft. Zur Klassifizierung gelten die R-Sätze. Da Carbamazepin als schwer abbaubar gilt [Heberer 2002], kommt der Zusatz "kann in Gewässern längerfristig schädliche Auswirkungen haben" (R53) hinzu. Eine korrekte Einstufung wäre demnach R52/53. Zur Abschätzung der Gefährdung der Umwelt wird weiterhin das Verhältnis zwischen PEC- und PNEC-Wert² eingesetzt.

¹ EC₅₀-Wert ... *eng.* effect concentration, Effektkonzentration; Bsp. Daphnientest: die Konzentration, bei der 50 % der Testorganismen Bewegungsunfähigkeit zeigen

² PEC_{OG}-Wert ... *engl.* predicted environmental concentration, kalkulierte Konzentration des Wirkstoffes im Oberflächengewässer, Berechnung nach EU Draft Guideline III/5504/94:

Übersteigt dieser Quotient den Wert 1, so wird von einem Umweltrisiko ausgegangen und es ist eine weitere Prüfung notwendig [Apel 2005]. Verwendet man für die Berechnung des PEC/PNEC-Wertes für Carbamazepin den von Ternes gefundenen Medianwert von 250 ng/L [Ternes 1998], ergibt sich ein Quotient von 0,003. Demnach besteht keine akute Gefährdung der Umwelt. In der gleichen Studie wird gezeigt, dass Carbamazepin ubiquitär im Kompartiment Wasser auftritt. Die Detektion des Medikaments im Rheinuferfiltrat (90 Perzentil: 360 μ g/L) [Sacher 1998] beweist die unvollständige Eliminierung bei der Bodenpassage und ist Ursache für die Wiederfindung von Carbamazepin im Trinkwasser, das aus den Uferfiltraten gewonnen wurde. Medianwerte für Carbamazepinkonzentrationen in Kläranlagenabläufen liegen bei 2,1 μ g/L, in Oberflächenwässern bei 0,25 μ g/L. Die im Trinkwasser gefundene Konzentration lag bei 30 ng/L [Ternes 2000].

$PEC[g/L] = \frac{A \cdot (100 - E)}{365 \cdot P \cdot V \cdot D \cdot 100}$

- A ... Verbrauch in kg/a
- E ... Elimination in %
- P ... Anzahl der Einwohner
- V ... Abwasservolumen pro Einwohner in m3/d (default: 200 L/(Einwohner Tag)
- D ... Verdünnungsfaktor mit Oberflächenwasser (default: 10)

 $PNEC_{aquat}$ -Wert ... *engl.* predicted no-effect concentration, Konzentration, bei der im aquatischen Bereich keine Effekte erwartet werden; Gewinnung aus ökotoxikologischen Tests

Der Quotient aus PEC und PNEC charakterisiert das Risiko eines Stoffes für die Umwelt. Bei PEC/PNEC < 1 liegt kein Risiko für die Umwelt vor. Bei PEC/PNEC > 1 werden eingehendere Untersuchungen notwendig. Auflagen zum Umweltschutz werden eingesetzt, wenn das Medikament verwendet wird.

(2.1)



Abbildung 2: Strukturformel Clarithromycin

Clarithromycin (Abbildung 2) ist ein makrolidisches Antibiotikum. Weitere Antibiotika dieser Gruppe sind Erythromycin und Roxithromycin. Sie werden bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten wie Diphtherie, Scharlach oder Keuchhusten, die durch Pneumokokken, Staphylokokken und Streptokokken ausgelöst werden, eingesetzt. Außerdem hemmen sie das Wachstum von Legionellen. Interessanterweise variiert die Verschreibung der einzelnen makrolidischen Antibiotika stark von Land zu Land. Clarithromycin wird in der Schweiz, Österreich und Frankreich zehnmal häufiger als in Deutschland eingesetzt. Erythromycin wird häufig in Großbritannien (1200 mg pro Person pro Jahr), aber kaum in der Schweiz (24 mg pro Person pro Jahr) [McArdell 2003] verschrieben. Die Gesamtsumme makrolidischer Antibiotika, die 1995 in Deutschland eingesetzt wurden, betrug 8,3 – 28,6 t [Hirsch 1999]. Die Ausscheidungsraten des nicht metabolisierten Clarithromycin sind mit mehr als 60 % hoch [Hirsch 1999]. Herkömmliche Abwasserbehandlungsanlagen sind nicht dafür ausgelegt Antibiotika vollständig zu eliminieren. In Kläranlagenausläufen konnten Clarithromycinkonzentrationen zwischen 57 und 330 ng/L detektiert werden [McArdell 2003]. Eine viel versprechende Möglichkeit, die Menge an in Oberflächenwasser eingeleitete Antibiotika zu reduzieren, ist die Nachbehandlung des Klärwerksauslaufes mit Ozon [Huber 2003; Huber 2004; Huber 2005; Ternes 2003].

2.2.3 Metoprolol



Abbildung 3: Strukturformel Metoprolol

Metoprolol (Abbildung 3) gehört zur Gruppe der selektiven beta-1-Adrenozeptorenblocker (ß-Blocker). Weitere ß-Blocker sind Propranolol, Sotalol und Atenolol. Diese werden eingesetzt zur Behandlung von Bluthochdruck, Arteriosklerose (koronare Herzkrankheit), bei Herzrhythmusstörungen und zur Akutbehandlung des Herzinfarktes. Durch die Besetzung der beta-Rezeptoren wird die Wirkung von Adrenalin am Herzen verhindert, der Herzschlag wird weniger kraftvoll und langsamer, der Blutdruck sinkt und es werden weniger Energie und Sauerstoff verbraucht.

Bei einer Verschreibungsmenge von 93 t/a in Deutschland im Jahr 2001 [BLAC 2003] ist der Eintrag in die Klärwerke hoch, ein großer Anteil des eingeleiteten Metoprolols wird aber hier auch umgesetzt (86 %, [Ternes 1998]). Trotzdem konnten in einer Studie in 38 von 45 Flusswasserproben Metoprolol mit einem Medianwert von 0,45 µg/L detektiert werden [Ternes 1998]. Das ins Oberflächenwasser eingeleitete Metoprolol gilt als toxisch für aquatische Organismen [Cleuvers 2005].

2.3 Probenvorbereitung

2.3.1 Extraktionsmethoden – erschöpfende vs. Gleichgewichtsmethoden

In der instrumentellen analytischen Chemie ist die Probenvorbereitung der wichtigste Schritt der Gesamtanalyse. Die wenigsten Proben können aufgrund von Matrixbeschaffenheit und vorliegender Konzentration direkt vermessen werden. Somit ist die Aufarbeitung essenziell, aber nicht selten mit vielen Fehlerquellen verbunden. Ziele der Probenvorbereitung sind Abtrennung von störenden Matrixbestandteilen und Einstellen der optimalen Analytkonzentration. Dies verbessert die Selektivität und Richtigkeit der Analyse. Die Richtigkeit kann gesteigert werden, wenn durch gute Reproduzierbarkeit einer Messung zufällige Fehler ausgeschlossen werden können. Die Anforderungen an moderne Probenvorbereitungstechniken sind hoch. Sie sollten möglichst schnell, preiswert und einfach zu handhaben sein, dabei aber die geforderte Richtigkeit zeigen. Idealerweise sollte die Möglichkeit zur Automatisierung des Verfahrens bestehen. Lösemittelfreie bzw. –sparende Methoden gewinnen hierbei mit steigendem Umweltbewusstsein zunehmend an Bedeutung.

Eine Vielzahl von Probenvorbereitungstechniken mit unterschiedlichem Fokus und variierendem Aufwand ist bekannt. Entscheidend bei der Wahl der geeigneten Technik sind drei Komponenten: Die Probe (physikalische Eigenschaften), die Matrix (Menge und Art) und das im Anschluss eingesetzte Analyseverfahren [Major 2003].

Bei der Extraktion unterscheidet man zwischen erschöpfenden und Gleichgewichtsmethoden. Bei der erschöpfenden Extraktion werden die Analyten vollständig aus der Probe in das Lösemittel überführt. Dies kann mithilfe großer Lösemittelvolumina und Mehrfachextraktionen statisch oder dynamisch in Gegenstromanlagen geschehen. Anwendung findet die erschöpfende Extraktion bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion (*engl.* liquid-liquid-extraction, LLE), der Festphasenextraktion (*engl.* solid phase extraction, SPE) oder der Soxhletmethode. Ausbeute und Geschwindigkeit der Extraktion kann erhöht werden durch Modifikation von Randbedingungen wie Erhöhung von Temperatur und Druck. Die beschleunigte Lösemittelextraktion (*engl.* accelerated solvent extraction, ASE) macht sich dies zunutze.

Verfahren, deren Grundprinzip auf dem Einstellen eines Gleichgewichtes (GGW) beruht, benötigen im Gegensatz zu den erschöpfenden Methoden eine Kalibrierung des Gesamtsystems. Werden Gemische unterschiedlicher Analyten betrachtet, kann die Zeit bis zum Erreichen des GGW von Verbindung zu Verbindung stark variieren. Deshalb wird bei den nicht-erschöpfenden Methoden nach strengem Zeitprotokoll gearbeitet, dadurch wird die GGW-Einstellung normiert. Vorteil der GGW-Methoden ist die Möglichkeit zur Minimierung von Probe- und Lösemittelmenge und die damit verbundene Möglichkeit zur Miniaturisierung der Apparatur. Etablierte Verfahren nicht-erschöpfender Extraktionsmethoden sind die Festphasenmikroextraktion (*engl.* solid phase micro extraction, SPME), die Stabextraktion (*engl.* stir bar sorptive extraction, SBSE) und die Headspace-Methode. Im Anhang sind die physikalischen Grundsätze zu Verteilungsgleichgewichten detailliert dargestellt.

2.3.1.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE)

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion ist eines der ältesten Trennverfahren. Um 1800 war bereits bekannt, dass sich Eisenverbindungen mit Ether ausschütteln lassen. Die Verteilung eines Analyten auf zwei nicht mischbare Phasen ist die Grundlage der LLE. Die optimale Extraktionsausbeute wird durch die Wahl des geeigneten Lösemittels und dessen Volumens sowie durch den pH-Wert und die Temperatur erzielt. Zusätzlich kann die Zugabe von Alkalisalzen (NaCl, Na₂SO₄), die in der Probenmatrix gut löslich sind, bei der Extraktion hilfreich sein. Der dadurch erreichte Aussalzeffekt verringert die Größe der Hydrathülle und verschiebt das Lösungsgleichgewicht hin zur nichtionisierten Form des Substrats, wodurch dieses für organische Lösemittel löslich, sprich extrahierbar wird. Der Aussalzeffekt verstärkt sich mit zunehmender Polarität des Analyten.

Die LLE hat einen hohen Verbrauch an toxischen Lösemitteln und ist schwer zu automatisieren. Probleme können durch die Entstehung von Emulsionen und Schäumen auftreten.

2.3.1.2 Festphasenextraktion (SPE)

Die Aufkonzentration der Analyten erfolgt durch Anreicherung an einer festen Phase, während die flüssige Probe an dieser vorbeigeleitet wird. Die Extraktion beruht auf Oberflächenwechselwirkung von Analyt und Adsorbens (Physisorption und Chemisorption). Das feste Sorbens ist lose gepackt in Kartuschen oder auf einem Trägermaterial aufgebracht (Discs). Die Analyten werden nach Anreicherung aus dem gesamten Probevolumen durch geringe Mengen eines geeigneten Lösemittels von der festen Phase desorbiert.

Die Methode gilt mit zahlreichen Arbeitsschritten (Konditionieren, Anreichern, Trocknen, Eluieren, Einengen, ...) als zeit- und arbeitsaufwendig und beinhaltet aufgrund der vielen Vorgänge einige Fehlerquellen. Automatisierte und gekoppelte Verfahren können aufgrund apparativer Einschränkungen meist nicht mit den für die Ultraspuren benötigten großen Probemengen ($V \ge 1$ L) betrieben werden.

2.3.1.3 Festphasenmikroextraktion (SPME)

Die SPME ist eine Gleichgewichtsmethode. Sie wurde zuerst 1989 von Belardi und Pawliszyn [Belardi 1989] beschrieben. Etabliert hat sich die Methode erst im Jahr 2005 mit einer DIN-Vorschrift vom Dezember 2005 zur Analyse von Pflanzenschutzmitteln, Bioziden und deren Abbauprodukten in Trinkwasser nach DIN 38407-34.

Das Extraktionsmodul besteht aus einer Kanüle. In der Nadel ist auf ein Trägermaterial das Sorbtionsmaterial aufgebracht, das somit ein- und ausgefahren werden kann. Als extrahierende Phasen stehen verschiedene Polymermaterialien (Polyacrylat, Polydimethylsiloxan), Divinylbenzen, Carboxen und Carbowax in unterschiedlichen Filmdicken (7 – 100 μ m) und Mischungen zur Verfügung.

Die Extraktion kann bei nicht volatilen Analyten durch Eintauchen des Sorptionsmaterials in die flüssige Probe oder bei flüchtigen Analyten durch Exposition der Faser in den über der Probe befindlichen Gasraum erfolgen. Die Anreicherung beruht auf der Absorption der Analyten im Sorptionsmaterial. Die Desorption kann thermisch im heißen Injektor des Gaschromatographen (GC) oder bei der Kopplung mit Hochleistungsflüssigchromatographie (*engl.* high performance liquid chromatography, HPLC) durch Lösemittel in einer Probenschleife geschehen.

Die SPME benötigt nur kleine Probevolumina und kann in Verbindung mit der Gaschromatographie lösemittelfrei betrieben werden. Die Matrixabtrennung ist gut, was den Einsatz in stark matrixbelasteten Proben, wie beispielsweise Lebensmitteln, ermöglicht (Triazine in der Tomate [Lord 2004]). Die Methodik ist einfach und zeitsparend gegenüber SPE und LLE. Durch die Verwendung automatischer Probegeber (z. B. CombiPal) können Effizienz und Zeitaufwand optimiert werden. Im Vergleich zu erschöpfenden Methoden, bei denen mit großen Probevolumina gearbeitet wird, ist die Sensitivität der SPME geringer. Da die SPME schwer mit der HPLC zu koppeln ist, kam sie in dieser Arbeit wenig zum Einsatz.

2.3.2 Membranen

2.3.2.1 Grundlagen

Die Auftrennung von Stoffgemischen ist in Medizin, Industrie und Forschung notwenig. Klassische Methoden der Trennung von Gemischen sind Kristallisation und Destillation. Hierbei kommt es zu einer Änderung des Aggregatzustandes der zu betrachtenden Stoffe. Wenn jedoch der Aggregatzustand nicht verändert werden darf, wie z. B. bei der Blutdialyse, gilt die Trennung an Membranen als eine interessante Alternative.

Im Trennprozess stellt die Membran eine physische Barriere dar, die Bereiche unterschiedlicher Konzentrationen der Teilchen abgrenzt und nur für bestimmte Arten von Teilchen durchlässig ist. Der Stofftransport dieser Teilchen durch die Membran wird durch unterschiedliche Triebkräfte realisiert. Hierzu dienen Konzentrationsgradienten, pH-Gradienten, Druck, elektrisches Potenzial oder die Temperatur. Die Trennung von Gemischen, also die Anreichung einer Komponente in einer der Phasen, wird erreicht, wenn die Membran nur selektiv Durchlass gewährt. Abbildung 4 gibt die Trennung eines Stoffgemisches an einer Membran schematisch wider.



Abbildung 4: Das Schema zeigt den selektiven Stofftransport durch eine Membran.

Zur Herstellung von Membranen werden synthetische und natürliche Polymere (Polypropylen, PP, Polyethylen, PE, Polyvinylchlorid, PVC, Zellulose) oder anorganische Materialien (Keramiken, Palladium, Aluminiumoxid) verwendet. Man unterscheidet zwischen porösen und unporösen Membranen wobei ein Porendurchmesser von 20 Å als Grenzwert zwischen porös und unporös gilt [Staude 1992]. Bei porösen Membranen beruht das Prinzip der Trennung auf dem Größenausschlussverfahren. Die Poren der Membran sind zwar größer als die membranbildenden Moleküle, aber immer noch klein genug, um hochmolekulare Verbindungen ausschließen zu können. Ein Beispiel für die Stofftrennung an porösen Membranen ist die Filtration. Unporöse Membranen bestehen aus Polymeren oder einer Flüssigkeit, wobei die höhere Flexibilität und schnellere Diffusion durch die flüssigen Membranen der besseren Haltbarkeit der Polymermaterialien gegenüber steht. Als flüssige Membranen werden unterschiedliche, schwer verdampfbare Lösemittel verwendet [Müller 2003; Rasmussen 2004], die mit Wasser nicht mischbar sein dürfen, gut in den Poren der porösen Membran immobilisiert werden und die gewünschte Selektivität bei der Extraktion aufweisen. Im Anhang sind die theoretischen Betrachtungen zu Thermodynamik und Kinetik beim Stofftransport durch unporöse Membranen detailliert beschrieben.

2.3.2.2 Membranvermittelte Flüssig-Flüssig-Extraktion

Jönsson und Matthiason [Jönsson 1999a; Jönsson 1999b] entwickelten das auf dem Prinzip von Melcher [Melcher 1990] und Audunsson [Audunsson 1986] basierende Prinzip der Lösemittelunterstützten Membranextraktion (engl. Supported Liquid Membrane Extraction, SLM). Hierbei ist eine organische Phase als Grenzschicht zwischen zwei wässrigen Phasen platziert. Für die praktische Handhabung ist die organische Phase, vorzugsweise ein schwer verdampfbares Lösemittel (n-Undecan, Dihexylether, n-Octanol), in den Poren eines Trägermaterials (mikroporöses PP, PE) aufgetragen. Die Triebkraft der Extraktion bildet ein angelegter pH-Gradient zwischen Donor- und Akzeptorphase. Zur Anreicherung basischer Verbindungen wird der basischen Donorlösung eine saure Akzeptorlösung gegenüber gestellt. Nach dem Übergang aus der Membran in die saure Phase ist der Rücktransport des zuvor ungeladenen basischen Analyten aufgrund der Protonierung behindert. Die Gleichgewichtseinstellung ist damit stark zur Akzeptorlösung verschoben und hohe Extraktionsausbeuten können erzielt werden. In umgekehrter Weise ist auch die Anreicherung saurer Analyten möglich, Vorraussetzung ist allein die Ionisierbarkeit der Substanzen.

Handelt es sich um unpolare organische Analyten, ist der Einsatz der Flüssig-Flüssig-Extraktion an Mikroporösen Membranen (*engl.* Microporous Membrane Liquid Liquid Extraction, MMLLE) zweckmäßiger. Bei der zuerst von Jönsson und Matthiason [Jönsson 1999a] verwendeten Technik wird anstatt der wässrigen Donorphase ein organisches Lösemittel verwendet. Je nach verwendeter Analysetechnik und Detektionsmethode können Akzeptorphase und Flüssigmembran, die wie bei der SLM in den Poren eines mikroporösen Materials aufgebracht ist, identisch oder verschieden sein. Die miniaturisierte Version der MMLLE ist die Flüssigphasenmikroextraktion (*engl.* Liquid Phase Micro Extraction, LPME). Diese Methode wurde etabliert von Rasmussen und Pedersen-Bjergaard [Rasmussen 2000] und findet hauptsächlich Anwendung in der klinischen Chemie zur Bestimmung von Pharmaka in komplexen Proben (Blut, Urin). Bei dieser Anwendung liegen die Konzentrationen der zu detektierenden Substanzen nicht im Spurenbereich, weshalb vorwiegend Kapillarelektrophorese/MS als Analysensystem eingesetzt wird, wodurch sich die Wahl des Lösungsmittels vereinfacht. Für die Bestimmung geringer Konzentrationen kommen HPLC/MS- und GC/MS-Systeme zum Einsatz, dies beschränkt die Wahl des Lösemittels der Akzeptorphase und/oder Flüssigmembran. Es müssen die Mischbarkeit mit dem Eluenten der HPLC bzw. die Verdampfbarkeit im Injektor des GC gewährleistet sein.

2.3.2.3 Membranunterstützte Lösungsmittelextraktion

Die membranunterstützte Lösungsmittelextraktion (*engl.* Membrane Assisted Solvent Extraction, MASE) wurde 2001 von Hauser [Hauser 2001] erstmals erwähnt. Sie basiert auf der LLE, wobei die zwei Phasen durch eine unporöse Membran getrennt werden. Es werden geringe Mengen an organischen Lösemitteln eingesetzt. Das Verhältnis Probe/Extraktionsmittel liegt bei rund 100/1 v/v.

In den ersten Versuchen wurde eine Folie als Flachbettmembran zwischen zwei Phasen gebracht [Hauser 2001] und anschließend die Extrakte mit einer Spritze entnommen und in ein GC-MS-System injiziert. Das Verfahren wurde zur Bestimmung von Chlororganika in wässrigen Proben eingesetzt.

Eine Weiterentwicklung in Zusammenarbeit mit der Firma Gerstel (Mühlheim an der Ruhr, Deutschland) ermöglichte 2002 die Vereinfachung des Moduls. Dazu wurde die Folie zu einem Beutel mit einem Fassungsvermögen von ca. 750 µL verschweißt und mit einer speziellen Vorrichtung in einem 20 mL Headspace-Vial befestigt. Das Headspace-Vial enthielt 15 mL Probe, die als Donorphase vorlagen und der Membranbeutel 500 µL n-Hexan als Akzeptorphase [Hauser 2002]. Die Detektion erfolgte wiederum durch manuelles Entfernen des Extraktes mit einer Spritze und Injektion in ein GC-MS-System. Eine Optimierung wurde für Triazine, Hexachlorcyclohexane und Phenanthren durchgeführt.

Unter Verwendung eines CombiPal Autosamplers (Gerstel) und der Large-Volume-Injektion (LVI) konnte der oben beschriebene Ablauf teilweise automatisiert werden [Schellin 2006]. Nach dem manuellen Befüllen des Vials mit Probe und Einsetzen des Membranbeutels inkl. Verschließen des Vials werden die verbleibenden Schritte (Befüllen des Beutels mit Akzeptorphase, Temperieren und Rühren, LVI) durch den Autosampler übernommen. Diese halbautomatisierte MASE mit LVI wurde eingesetzt zur Detektion von polychlorierten Biphenylen, Organophosphorpestiziden, Phenolen und Chlorphenolen aus Wässern.

Der deutlichste Vorteil der verschiedenen Mikroextraktionsmethoden gegenüber der LLE und der SPE ist die gute Abtrennung von Matrix [Kuuranne 2003]. Weiterhin ist auch der verminderte Zeitaufwand und die Möglichkeit mehrere Proben parallel zu bearbeiten relevant. Der niedrige Preis des mikroporösen Polymermaterials erlaubt die Einmal-Verwendung und bewahrt somit vor Recoveryfehlern. Dem steht entgegen, dass einsatzbereite Module nur für wenige Anwendungen kommerziell erworben werden können. Die Fa. Gerstel bietet ein Setup zur MASE mit PP-Beuteln mit einer Wandstärke von 30 µm und ca. 1 mL Volumen an. Für spezielle Applikationen bedarf es nach wie vor der manuellen Herstellung der Folienbeutel.

2.4 Trenn- und Detektionstechniken – Quantifizierung und Identifikation der Problemstoffe und ihrer Metaboliten

Zur Bestimmung komplexer organischer Gemische, wie sie in Wasserproben vorliegen, ist, je nach Detektionsart, eine zuverlässige Auftrennung unumgänglich. Die in der organischen Analytik meist verbreiteten Methoden sind hierbei die Gaschromatographie (GC) und die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC). Die GC wird zur Analyse von Molekülen mit einer Molmasse bis ca. 550 g/mol eingesetzt. Die Verbindungen müssen verdampfbar und thermostabil sein. Für thermolabile, schwer flüchtige oder polare Stoffe kommt die HPLC zum Einsatz. Sie ermöglicht zusätzlich die Trennung hochmolekularer Verbindungen. Die Trennleistung basiert auf unterschiedlich gearteten Wechselwirkungen der Analyten mit stationärer und mobiler Phase. Unter der Vielzahl der Detektoren, die mit den jeweiligen Trennverfahren gekoppelt werden können, werden für die weiteren Ausführungen lediglich die Massenspektrometer näher beschrieben, da diese in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich zum Einsatz kamen.

2.4.1 Die Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS)

Massenselektive Detektoren (MSD) ermöglichen sowohl eine sensitive Detektion bekannter Zielanalyte als auch die Identifikation unbekannter Verbindungen in komplexen Gemischen.

Nach der Trennung im GC gelangen die Analyten über die Transferline in die Ionenquelle des MSD, wo durch Elektronenstoßionisation (*engl.* electron impact, EI) oder Chemische Ionisation (CI) Ionen erzeugt werden. Die am häufigsten verwendete Ionisationsart ist die Elektronenstoßionisation. Hierbei entstehen aus dem Analyt durch den Beschuss mit Elektronen (70 eV) typische Molekülfragmente. Die EI-Ionisation gilt als energiereiche, "harte" Ionisation. Eine energieärmere, "weiche" Form der Ionisation stellt die chemische Ionisation dar. Hierbei wird ein Reaktandgas ionisiert. Die dabei entstehenden thermischen Elektronen ermöglichen die Ionisation der Analyten. Ergebnis ist eine schwächere Fragmentierung im Vergleich zur Ionisation durch Elektronenstoß. Die Funktionsweise der Negativen Chemischen Ionisation (NCI) ist beispielhaft für die chemische Ionisation in Abschnitt 2.4.2 gezeigt. Die Ionisation erfolgt im Plasma.

Die entstandenen Molekülfragmente werden im Massenanalysator entsprechend ihrem beruht Masse-Ladungs-Verhältnis getrennt. Die Trennung der Ionen auf unterschiedlichen physikalischen Prinzipien: (a) Ionenstrahlen können in elektrischen oder magnetischen Feldern abgelenkt werden (Sektorfeldgeräte); (b) Ionen unterschiedlicher Masse können in elektrischen Wechselfeldern gefiltert werden (Quadrupole, Ionenfallen, Cyclotronresonanz-Analysatoren) oder (c) die Ionen werden getrennt durch unterschiedlich lange Flugzeiten im feldfreien Raum (Flugzeit-Analysatoren). Am häufigsten kommen Quadrupole als Massenanalysatoren zum Einsatz. Sollen unbekannte Verbindungen identifiziert werden, wird das Masse-Ladungs-Verhältnis in einem weiten Massenbereich gescannt (Scan-Mode). Anhand des für jede Verbindung typischen Fragmentierungsmusters kann daraufhin mithilfe von Spektrenbibliotheken meist eine Zuordnung erfolgen. Ist die quantitative Analyse bekannter Substanzen gefordert, werden nur einzelne Ionenspuren (*engl.* Single Ion Monitoring, SIM) aufgenommen. Die Aufnahme im SIM-Mode ermöglicht eine wesentlich sensitivere Aufnahme im Vergleich zum Scan-Mode.

2.4.2 Das Prinzip der Chemischen Ionisation in der GC-MS

Die Ionisation erfolgt mithilfe eines großen Überschusses an Reaktandgas, das infolge seiner Ionisation langsame, sog. thermische Elektronen, liefert. Als Reaktandgas werden üblicherweise Methan oder Ammoniak eingesetzt, es kann aber z. B. auch Isobutan, Wasserstoff oder Kohlenwasserstoffe verwendet werden. Da die Ionisation durch eine chemische Reaktion erfolgt, spricht man von einer sanften Ionisation, die weniger Fragmentierungen als die Elektronenstoßionisation zur Folge hat. Als Quasimolekülion entstehen im positiven Mode durch Protonentransfer [M+H]⁺-Ionen und im negativen Mode aufgrund von Elektroneneinfangprozessen M⁻-Ionen.

Ionisation des Reaktandgases und Erzeugung thermischer Elektronen:

$$CH_4 + e_{schnell} \rightarrow CH_4^{++} + 2 e_{thermisch}$$
 (2.2)

Elektroneneinfangprozess des Analytmoleküls:

$$M + e_{\text{thermisch}} \rightarrow M^{-}$$
 (2.3)

Die NCI wird hauptsächlich verwendet für die Detektion von mit Halogenen substituierten Analyten wie PCBs und Dioxine oder in Verbindung mit Derivatisierungsreaktionen, die Gruppen mit dem Potenzial zur Aufnahme von Elektronen in das Molekül einführen. In dieser Arbeit wurde die Umsetzung von polaren Gruppen (Hydroxyl-, Carboxyl-) mit Pentafluorbenzylbromid (PFBBr) zu Pentafluorbenzylderivaten nach Nakamura et al. [Nakamura 2000; Nakamura 2001] eingesetzt. Abbildung 5 zeigt den Reaktionsmechanismus eines Alkohols mit PFBBr.



Abbildung 5: Reaktion von polaren Gruppen mit PFBBr. Im Beispiel ist die Umsetzung eines Alkohols gezeigt.

2.4.3 Die Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung (HPLC-MS)

Wie schon bei der GC-MS beschrieben, gelangen die Analyten nach der Trennung auch hier direkt in die Ionenquelle. Während bei der GC-MS die Ionisation im Vakuum geschieht, wird in der HPLC-MS unter Atmosphärendruck ionisiert. Erst im Massenanalysator liegt Hochvakuum an. Die räumliche Trennung von Ionisation und Massendetektion ist notwendig, um die hohen Lösemittelflüsse in der HPLC (0,1 bis 2 mL/min) realisieren zu können.

Drei unterschiedliche Ionisationsarten sind bekannt. Am weitesten verbreitet ist die Elektronensprayionisation (ESI). Die Analyten in der flüssigen Phase werden bei hohem Druck und hoher Temperatur über eine Spraynadel zu kleinen, mehrfach geladenen Tröpfchen versprüht, da an dieser Nadel Hochspannung anliegt. Ein parallel eingeleitetes Gas, das Nebulizergas, unterstützt die Bildung der geladenen Tröpfchen. Durch die Verdampfung des Lösungsmittels steigt das elektrische Feld und aufgrund der erfolgten Ladungsverdichtung in den Tröpfchen können die Ionen an die Oberfläche treten, bis schließlich eine Coulomb-Explosion die Ionen freisetzt. Das Curtaingas unterstützt die Desolvation der Ionen. Die gebildeten Ionen gelangen über das Orifice in den Massenanalysator. Bevorzugt entstehen, je nach angelegter Spannung und Modus, einfach protonierte bzw. deprotonierte Molekülionen ([M+H]⁺, ([M-H]⁻). Die mögliche Bildung von Addukten kann die Analyse erschweren, da z. B. ([M+Na]⁺-Ionen auch bei starker Energiezufuhr kaum fragmentieren. Durch die gezielte Zugabe von Salzen zum Laufmittel (z. B. Ammoniumacetat) kann die Ionisationsausbeute gesteigert werden.

Weitere Ionisationstechniken in der Kopplung mit LC sind die Chemische Ionisation unter Atmosphärenruck (APCI) und die relativ neue Technik der Atmosphärendruckphotoionisation (APPI). Die Funktionsweise der APPI ist in Abschnitt 2.4.4 näher erläutert.

2.4.4 Die Funktionsweise der APPI-Quelle

Bruins et al. entwickelten 2000 die Atmosphärendruckphotoionisation (APPI) als neue Ionisationsmethode in der LC-MS zur sensitiven Detektion verschiedener Stoffgruppen [Robb 2000]. Generell ist das Anwendungsspektrum dem der APCI-Ionisation ähnlich, wohingegen deutlich höhere Sensitivität erzielt werden kann (Abbildung 6).



Abbildung 6 Einsatzspektren der unterschiedlichen Ionisationsarten APPI, API und ESI. Die Abbildung ist verändert nach [Fiedler 2004].

Die APPI gilt als weiche Ionisationsmethode. Die Ionisation findet in der Gasphase statt. Dazu muss zunächst das Laufmittel verdampft werden. Die Ionisationsenergie (IE) liefert eine Kr-Entladungslampe (10 eV). Moleküle mit einer IE kleiner als die der Entladungslampe können auf verschiedene Weise angeregt werden, Moleküle mit einer IE größer als 10 eV (z. B. die Bestandteile der Luft N₂, H₂O, O₂) werden nicht angeregt.

Photoanregung
$$AB + h\nu \rightarrow AB^*$$
 (2.4)

Ionisation $AB^* \rightarrow AB^{*+} + e^-$ (2.5)

Da die Ionisationsrate der Analyten auf Grund der umgebenden Lösungsmittelmoleküle statistisch gesehen sehr klein ist, wird ein Zusatzstoff (Dopant) im Überschuss zugegeben. Dieser Dopant ist photoionisierbar und dient als Ladungsüberträger zwischen Photonen und Analyt, indem er mit dem Analyt über Ladungsaustausch oder Protonentransfer reagiert.

Photoionisation
$$D + hv \rightarrow D^* \rightarrow D^{*+} + e^-$$
 (2.6)

Reaktion als Intermediat $D^{++} + AB \rightarrow D + AB^{++}$ (2.7)

Daraus resultierend werden in den MS-Spektren Molekülionen (M^{++}) und protonierte Molekülionen gefunden ($[M+H]^{++}$). Typische Dopants sind Toluol (IE = 8,83 eV) und Aceton (IE = 9,70 eV). Die APPI findet hauptsächlich Verwendung bei der Ionisation von Molekülen, die aufgrund ihrer Struktur zur Protonenaufnahme nicht oder nur geringfügig dazu in der Lage sind (z. B. Anthracen) [Raffaelli 2003]. Der Aufbau der APPI-Quelle ist in Abbildung 7 dargestellt.



Abbildung 7: Schematische Darstellung der APPI-Quelle. Die Abbildung ist verändert nach [Bos 2006].

2.4.5 Die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

Die Tandem-Massenspektrometrie mit Triple-Quadrupole-Geräten gilt als eine der leistungsfähigsten analytischen Instrumente. Einerseits können strukturelle Informationen der Analyten erhalten werden, andererseits kann aus komplexen Gemischen eine Einzelsubstanz auch mit geringer Konzentration bestimmt werden. Damit ist sie prädestiniert für den Einsatz in Metabolitenidentifizierung und Spurenanalytik.

Ein MS/MS besteht aus zwei hintereinander geschalteten Massenspektrometern (MS), die durch eine Stoßkammer miteinander verbunden sind. Aus der ionisierten Probe (alle Ionisationsarten sind möglich) wird im ersten MS (Q1) ein Ion mit besonderem Interesse gefiltert und in die Stoßkammer gelenkt. Dort wird seine kinetische Energie teilweise in Vibrationsenergie umgewandelt und durch Kollisionen mit Gasmolekülen eines Inertgases in der Stoßzelle kommt es zur weiteren Fragmentierung. Diese Massen werden im zweiten MS (Q3) aufgetrennt und analysiert (MS II). Dieses Prinzip ist schematisch in Abbildung 8 gezeigt.



Abbildung 8: Prinzip des Tandemmassenspektrometers. Die Abbildung ist verändert nach [Hesse 2005]

Als Hilfsmittel zur strukturellen Aufklärung stehen "Q1 Full Scan", "Product Ion Scan", "Precursor Ion Scan" und "Constant Neutral Loss" und zur sensitiven Quantifizierung "Selected Ion Monitoring (SIM)" und "Multiple Reaction Monitoring (MRM)" zur Verfügung. Im Folgenden sind die oben genannten Modi kurz erläutert und mithilfe von Abbildungen beschrieben. Die Abbildungen 9 bis 14 sind verändert nach [Applied Biosystems].

2.4.5.1 Q1 Full Scan

Das erste Massenspektrometer (Q1) wird als einfacher Massenanalysator eingesetzt. Die Massen werden aufgetrennt und analysiert, während über einen breiten Bereich von Massen gescannt wird (z. B. m/z 100 bis 600). Ergebnis ist ein Spektrum der in der

Probe vorhandenen Massen. Der Q1 Full Scan kommt zur Identifizierung von Molekülionen zum Einsatz.



Abbildung 9: Schematische Darstellung des Q1 Full Scan

2.4.5.2 Product Ion Scan

Q1 wird auf eine bestimmte Masse fixiert. Dieses Ion wird in der Stoßzelle fragmentiert. Das zweite Massenspektrometer (Q3) scannt über einen bestimmten Massebereich und trennt und analysiert die Fragmente. Der Product Ion Scan gibt Strukturinformationen und ist ein Zwischenschritt bei der Entwicklung einer quantitativen Methode.



Abbildung 10: Schematische Darstellung des Poduct Ion Scan

2.4.5.3 Precursor Ion Scan

Q3 wird auf eine Masse fixiert. Q1 scannt einen bestimmten Massebereich. Diese Kombination ermöglicht die Identifikation des Ursprungs eines bestimmten Produkt-Ions. Bei der Metabolitenidentifizierung können so z. B. verschiedene Metaboliten mit demselben Product Ion bestimmt werden.



Abbildung 11: Schematische Darstellung des Precursor Ion Scan

2.4.5.4 Constant Neutral Loss

Q1 und Q3 scannen über bestimmte Massenbereiche, allerdings mit einer festen Differenz zueinander. Das Spektrum zeigt, welche Ionen neutrale Teilchen mit der Q1-Q3-Differenz abgeben. Der Constant Neutral Loss ist eine Ergänzung zum Precursor Ion Scan und unterstützt bei der Identifikation ähnlicher Metabolite.



Abbildung 12: Schematische Darstellung des Constant Neutral Loss

2.4.5.5 Selected Ion Monitoring (SIM)

Eine einzelne Masse wird vom Q1 aufgenommen. Das SIM kann zur Quantifizierung oder Optimierung des Q1 für ein späteres MRM eingesetzt werden.



Abbildung 13: Schematische Darstellung des Selected Ion Monitoring

2.4.5.6 Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Es wird ein bestimmter Übergang von Precursor Ion zu Product Ion aufgenommen. Das MRM ermöglicht das maximale Signal-Rausch-Verhältnis der Analyten und wird somit primär für die Quantifizierung verwendet. Eine Vielzahl von Übergängen kann gleichzeitig gemessen werden.



Abbildung 14: Schematische Darstellung des Multiple Reaction Monitoring

2.4.6 Der Einsatz von Derivatisierungen in der GC und HPLC

Als Derivatisierung bezeichnet man allgemein die Umsetzung des Analyten mit einem Reagenz zur Modifizierung der chemischen und physikalischen Eigenschaften. In vielen Fällen ist sie notwendig und vor allem in der Spurenanalytik unerlässlich.

Man unterscheidet drei Anwendungsgebiete der Derivatisierungen. Zum einen wird die Derivatisierung eingesetzt, um Moleküle, welche nicht geeignet sind für gaschromatographische Analysen aufgrund von schlechter Flüchtigkeit in dieser Eigenschaft zu modifizieren. Durch gezielte Substitution der problematischen Funktion im Molekül wird die Flüchtigkeit der Verbindung erhöht und damit ein besseres chromatographisches Ergebnis erzielt. Hierfür werden hauptsächlich die verschiedenen Methoden der Silylierung von Hydroxy- und Carboxygruppen eingesetzt. Weiterhin wird die Derivatisierung verwendet, um die Empfindlichkeit der Detektion der Analyten zu erhöhen, wie z. B. durch die Einführung halogenhaltiger Substituenten in das Molekül bei der Verwendung von Elektroneneinfangdetektoren (*engl.* electron capture detector, ECD) oder durch negative chemische Ionisation (NCI, siehe Abschnitt 2.4.2) in der GC-MS bzw. Einführung UV-aktiver Gruppen für die HPLC-UV-Detektion. Ein dritter Anwendungsbereich der Derivatisierung ist in der qualitativen Analyse organischer Verbindungen zu sehen, die während der Aufklärung von Metaboliten gebildet durch biologischen und chemischen Abbau zum Einsatz kommt. Als Bsp. ist hier die Umsetzung von Aldehyden und Ketonen mit Dinitrophenylhydrazin (DNPH) zu farbigen Hydrazonen zu nennen. Vorschrift und Reaktionsgleichung sind in Abschnitt 3.10 zu finden.
2.5 Oxidationsprozesse zum Abbau problematischer Verbindungen

In der Regel besteht eine konventionelle Kläranlage aus drei Reinigungsstufen: (1) der mechanischen Reinigung zur Entfernung von groben Stoffen, (2) der biologischen Reinigung durch Mikroorganismen im Belebtschlamm-Verfahren und (3) der chemischen Ausfällung von Phosphat. Als vierte Stufe kann ein Sandfilter angeschlossen sein. Seit ca. 10 Jahren werden außerdem in der kommunalen Abwasserreinigung Membranfilter eingesetzt.

Wie oben beschrieben ist die Eliminationskraft dieser herkömmlichen Kläranlagen für einige der betrachteten Verbindungen limitiert [Ternes 1998]. Zum weiteren Abbau können deshalb verschiedene zusätzliche Prozesse vor- oder nachgeschaltet werden. Eine große Rolle spielen hier Oxidationsprozesse wie die Ozonierung und der Einsatz von H₂O₂. Im Folgenden sind diese zwei Möglichkeiten des verstärkten Abbaus kurz erläutert.

2.5.1 Ozonierung

Die Aufbereitung von Wasser zur Entfernung von Mikroverunreinigungen durch Ozonierung ist eine Technik, die in der Trinkwasseraufbereitung bereits etabliert ist und mehr und mehr in der Abwasseraufbereitung an Bedeutung gewinnt. Die Verteilung des Ozons im belasteten Abwasser geschieht meist durch Begasung. Die Ozonierung ist teurer aber umweltfreundlicher als die außerdem in der Wasseraufbereitung eingesetzte Chlorung.

Die Mikroverunreinigungen werden durch Ozon oxidiert und sehr rasch abgebaut. Mit dieser effektiven Methode wurden bereits gute Erfolge bei der Entfernung von recht persistenten Verbindungen wie z. B. Carbamazepin aus Abwasser erreicht [Ternes 2004]. Aus diesem Grunde wurde die Ozonierung auch für den Abbau eines Antibiotikums, Clarithromycin, sowie eines β -Blockers, Metoprolol, getestet. Detaillierte Ausführungen zu den einzelnen Reaktionsmechanismen sind in Abschnitt 4.2.3 zu finden.

2.5.2 Oxidation mit FENTON'S Reagenz

FENTON'S Reagenz setzt sich zusammen aus Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und einem Fe(II)-Salz. Die Fe(II)-Ionen katalysieren in saurer Lösung die Bildung von Hydroxyl-Radikalen aus H_2O_2 . Bei einem Redoxpotenzial von + 2,85 V gelten die Hydroxyl-Radikale als sehr starkes Oxidationsmittel. Sie lagern sich bevorzugt an Doppelbindungen an oder abstrahieren ein H-Atom. Radikalische Substitutionsreaktionen an Aromaten sind bekannt.

vereinfachtes Reaktionsschema der Radikalkettenreaktion:

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^-$$
(2.8)

$$OH' + RH \rightarrow H_2O + R'$$
 (2.9)

$$R^{\bullet} + Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+} + Produkt \qquad \text{Regeneration des Fe(II)} \qquad (2.10)$$
$$OH^{\bullet} + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^{-} \qquad (2.11)$$
$$2 R^{\bullet} \rightarrow Produkt (Dimer) \qquad (2.12)$$

$$R' + Fe^{2+} + H^+ \to Fe^{3+} + RH$$
 (2.13)

Der Einsatz von FENTON'S Reagenz als Nachklärstufe ist beschränkt, da für bestimmte Verbindungen erst bei sehr niedrigem pH-Wert (< 3) die gewünschten Reaktionen ablaufen. Das macht einen Einsatz nicht praktikabel oder ist mit enormer Kostensteigerung (Neutralisation des Ablaufes) verbunden [Ternes 2006]. In dieser Arbeit wurde die Oxidation mit FENTON'S Reagenz unterstützend bei der Identifikation von Metaboliten des biologischen Abbaus von Carbamazepin eingesetzt.

3 Experimenteller Teil

3.1 Geräte

3.1.1 GC-MS

Die Untersuchungen wurden an Gaschromatographen vom Typ HP 6890 vorgenommen, an die massenselektive Detektoren (MSD) des Typs HP 5973 gekoppelt sind (Agilent Technologies, Waldbronn). Es kamen zwei Geräte mit unterschiedlichen Ionenquellen zum Einsatz (Elektronenstoßionisation, chemische Ionisation mit CH₄ als Reaktandgas). Die Gaschromatographen waren mit HP 5MS-Kapillarsäulen (30 m x 0,25 mm ID, Filmdicke 0,25 µm; Agilent Technologies, Waldbronn) bestückt. Die Injektion erfolgte stets splitlos vorwiegend durch Autosampler. Es wurde 1 µL injiziert. Die Injektortemperatur betrug 280°C. Die Temperaturen von Transferline und Ionenquelle betrugen bei der Elektronenstoßionisation 280°C und 230°C bzw. bei der NCI 280°C und 125°C. Als Trägergas wurde Helium verwendet bei konstantem Fluss von 1 mL/min. Das Reaktandgas Methan hatte einen konstanten Fluss von 2,5 mL/min. Folgende Temperaturprogramme wurden zur Trennung eingesetzt (Tabelle 1):

 Methode	Temperaturprogramm des Säulenofens	MSD FS		
EI-1	50°C (1 min) – 10 K/min bis 280°C – 280°C (6 min)	FS		
EI-2	50°C (1 min) – 10 K/min bis 280°C – 280°C (6 min)	SIM		
NCI-1	60°C (1 min) – 10 K/min bis 280°C – 280°C (15 min)	SIM		

 Tabelle 1:
 Temperaturprogramme und MSD-Einstellungen in der GC-MS

Die verwendeten Target- und Qualifierionen sind im Anhang aufgelistet.

3.1.2 HPLC-MS/MS

Für die HPLC-MS/MS-Analysen wurde eine HPLC 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn) mit binärer Pumpe und wellenlängenselektivem Detektor (*eng.* variable wavelength detector, VWD) verwendet. Es wurden je 5 µL injiziert. Der Säulenofen kam nicht zum Einsatz. Daran gekoppelt war ein Triple Quadrupol API 2000 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Zur Ionisation wurden die Elektrosprayionenquelle und

die Photoionenquelle eingesetzt. Als Trennsäulen kamen eine AQUA C18 5 μ m 30 x 2,0 mm und eine LUNA C8 5 μ m 20 x 2,0 mm (beide Phenomenex, Torrance USA), versehen mit den passenden column guards, zum Einsatz. Die verwendeten Laufmittel und Gradienten sind in Tabelle 2 (ESI) und Tabelle 3 (APPI) aufgeführt.

Tubene 2. In the Monthly Methoden unter Verwendung der Ebi Quene					
Methode	Laufmittel A	Laufmittel B	Fluss [µL/min]	Gradient	MS/MS
ESI-1	Wasser	МеОН	200	200 isokratisch 5 % A	
ESI-2	Wasser	МеОН	200	200 isokratisch 5 % A MR	
ESI-3	Wasser	МеОН	300	0 min: 100 % A 2 min: 57 % A 13 min: 57 % A 14 min: 100 % A 19 min: 100 % A	Scan pos.
ESI-4	ACN	МеОН	200	isokratisch 5 % A	Scan pos.
ESI-5	Wasser	МеОН	200	isokratisch 57 % A	Scan pos.
ESI-6	Wasser	МеОН	200	isokratisch 57 % A	Scan neg.

 Tabelle 2:
 HPLC-MS/MS-Methoden unter Verwendung der ESI-Quelle

 Tabelle 3:
 HPLC-MS/MS-Methoden unter Verwendung der APPI-Quelle

Methode	Laufmittel A	Laufmittel B	Fluss [µL/min]	Gradient	MS/MS
APPI-1	Wasser	MeOH	200	isokratisch 20 % A	MRM pos.
APPI-2	Wasser	МеОН	200	isokratisch 20 % A	MRM neg.
APPI-3	Wasser	МеОН	200	isokratisch 20 % A	Scan

Bei der Verwendung der APPI-Quelle wurde als Dopant isokratisch 20 µL/min Aceton oder Toluol mit der zum API2000 gehörenden separaten Spritzenpumpe zugegeben.

3.2 Verwendete Chemikalien

Die verwendeten Lösemittel (ChromaSolv und LiChroSolv) n-Hexan, Methanol, Ethylacetat, Aceton und Toluol wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen. Bidestilliertes Wasser wurde in einer Metalldestille gewonnen. Die Referenzsubstanzen Bisphenol A (BPA, Merck); Tonalide[®], Galaxolide[®], Paracetamol, Gemfibrozil, Fenofibrinsäure, Fenofibrat, Indometacin (LGC Promochem); Clofibrinsäure, Carbamazepin, Propranolol, Metoprolol, Erythromycin[®], Bezafibrat, Ibuprofen, Naproxen, Diclofenac (ICN Biomedicals); Phenol, 17α-Ethinylestradiol (EE2), β-Sitosterol, t-Nonylphenol (t-NP, Sigma-Aldrich); Coffein und Phenazon (Fluka) wurden in der höchstmöglichen Reinheit erworben. Für Derivatisierungen kamen zum Einsatz: Pentafluorbenzylbromid und BSTFA (Supelco). Als interne Standards wurden verwendet BPA-d₁₄ (synthetisiert an der Universität Leipzig), 4n-Nonylphenol, Carbamazepin-d₁₀ (Dr. Ehrenstorfer GmbH) und Estradioldiacetat (ICN Biomedicals).

Aus den Reinsubstanzen wurden Stammlösungen in MeOH hergestellt. Die Lagerung dieser Lösungen erfolgte im Kühlschrank bei 4°C. Zur Herstellung von Standardlösungen wurden entsprechende Aliquoten in bidestilliertem Wasser gelöst. Zur Bestimmung des Matrixeinflusses wurden die entsprechenden Aliquoten in den jeweiligen Modellwässern gelöst. Wässrige Lösungen wurden nicht gelagert.

Modelabwasser wurde hergestellt angelehnt an DIN 38412 T24. Es beinhaltet als Matrix u. a. Casein, Fleischextrakt, Harnstoff und K_2HPO_4 bei einem DOC von 125 mg/L und einem BSB₅ von 195 mg/L. Huminsäure (Fa. Roth) wurde in Wasser gelöst.

3.3 Proben

Verwendet wurden hauptsächlich Proben von Grund- und Oberflächenwasser aus dem Raum Halle/Leipzig. Für Vergleichsuntersuchungen mit einem Labor in Koblenz wurden einige Proben aus dem Rhein bestimmt. Zur Untersuchung von Trinkwasser wurde Leitungswasser aus dem UFZ Leipzig, der Messe München, Enkering (Kleinstadt in Bayern), Rüdersdorf (Kleinstadt bei Berlin) und Göhren (Rügen) untersucht. Die Proben wurden in 1L-Glasflaschen transportiert und bei 4°C im Dunkeln vor der Analyse nicht länger als drei Tage aufbewahrt.

3.3.1 Probenvorbereitung der Vergleichsmethode

SPE

1 Liter der Wasserprobe wurde filtriert (GF 52, Schleicher und Schuell, Whatman[®], Dassel) und mit H₂SO₄ auf pH = 3 angesäuert. Je 100 ng interner Standard (4n-NP, BPA-d₁₄, Estradioldiacetat) wurden zudotiert. Die SPE-Kartuschen (Version A: OASIS[®]HLB (200 mg, 5 mL, Waters, Eschborn; Version B: selbstgepackte Glaskartuschen, 500 mg LiChrolut C18 + 200 mg LiChrolut EN, getrennt durch PTFE Fritten, Merck) wurden konditioniert mit 6 mL MeOH und 6 mL bidestilliertem Wasser. Die Probenaufgabe erfolgte bei einem Fluss von ca. 5 mL/min. Nach erfolgter Anreicherung wurde das Material mindestens 2 h im Inertgasstrom getrocknet. Die Elution erfolgte mit 2 x 6 mL MeOH. Die Eluate wurden vereinigt und bis auf ein Restvolumen von ca. 200 µL im TurboVap II (Zymark, Rüsselsheim) verdampft.

Cleanup

Zur Abtrennung von Matrix erfolgte ein cleanup-Schritt an Silicagel (500 mg, konditioniert mit 5 mL n-Hexan/Aceton, 65/35; v/v). Das daraus erhaltene Eluat (10 mL n-Hexan/Aceton 65/35; v/v) wurde bis auf 200 μ L eingedampft (TurboVap II) und dann im GC-MS analysiert.

Derivatisierung

Die Derivatisierung der polaren Gruppen ist angelehnt an Nakamura et al. [Nakamura 2001]: Die SPE-Eluate wurden bis zur Trockne eingedampft und in 1 mL Aceton wieder aufgenommen. Nach Zugabe von 100 μ L 10 %iger wässriger K₂CO₃ und 100 μ L einer 5 %igen PFBBr-Reagenzlösung in Aceton betrug die Reaktionszeit 1 h bei 60°C. Nach dem Abkühlen wurde 1 mL n-Hexan zugegeben und gut geschüttelt. Nach dem Waschen mit 0,5 mL bidestilliertem Wasser wurde die organische Phase abgetrennt, über Na₂SO₄ getrocknet und auf 200 μ L gebracht.

3.3.2 Probenvorbereitung der online-SPE-HPLC-MS/MS

Die Wasserproben wurden filtriert (0,45 μ m, Qualilab, Merck und 0,1 μ m, Cellulose Nitrate Membrane Filters, Whatman[®], Maidstone, England).

3.3.3 Probenvorbereitung der Mini-MASE

Die Probe wurde entsprechend dem Versuchsansatz mit NaCl zum Aussalzen und/oder NaOH_{verd.} bzw. H₂SO_{4verd.} zur Einstellung des pH versetzt. Die Kontrolle des pH-Wertes erfolgte mit Uniteststreifen (Merck). Wurde die Methode der Standardaddition eingesetzt, wurde der pH-Wert für alle vier Proben einer Messreihe gemeinsam eingestellt und erst anschließend die je 6 mL auf die Probevials verteilt und die entsprechende Menge Standard addiert.

3.4 Online-SPE-HPLC-MS/MS – Aufbau und verwendetes Material

Als SPE-Material wurden kommerziell erhältliche Extraction Discs mit einem Korkbohrer (Durchmesser: 12 mm) auf die benötigte Größe zugeschnitten. Zwei verschiedene Materialien kamen zum Einsatz: C18 Material (ENVITM-18DSK, Supelco) und ein SDB-RPS Copolymer (SDB-RPS, 3M EMPORETM). Als Halterung für das Disc-Material wurde ein CIM disk Holder (BIA Separation, Ljubljana, Slowenien) verwendet. Es wurden 20-100 mL der Probe mittels einer separaten HPLC-Pumpe (Kontron Instruments, 322 pump system, Neufahrn, Deutschland) bei einem Fluss von 1-4 mL/min durch das SPE-Material gepumpt. Zur Entfernung wasserlöslicher Matrixbestandteile wurden anschließend 2 mL bidestilliertes Wasser über die Kartusche geleitet. Die Anreicherungs- und Elutionsschritte sind automatisiert über ein 2-Wege-6-Positionen-Ventil. Die Elution erfolgte mit 0,4 mL MeOH/Wasser (80/20) aus dem HPLC-System. Das Eluat wurde direkt in das HPLC-MS/MS System übertragen. Nach der Elution wurde die Kartusche gespült mit 3 mL MeOH. Eine Kartusche kann je nach Matrixbelastung der Proben bis zu 30 Mal verwendet werden. Neu eingesetztes SPE-Material wurde konditioniert mit 5 mL MeOH. Eine schematische Darstellung der online-SPE-HPLC-MS/MS zeigt Abbildung 21.

3.5 Halbautomatisierte membranunterstützte Extraktion (Mini-MASE) – Arbeitsschritte und Apparatur

Zur halbautomatisierten membranunterstützten Extraktion wurden 6 mL Probe in das Probengefäß gegeben. In die Probelösung wurde ein Extraktionsmodul gehängt, das aus einem handgeschweißten Folienbeutel (Folienschweißgerät: Sealboy 236, Fa. Audion Electro, Weesp, Holland), der mit Draht an einem Edelstahltrichter (gefertigt in der Werkstatt des UFZ Leipzig) befestigt ist, besteht. In diesen Beutel aus LDPE mit einer Wandstärke von ca. 50 µm und den Maßen 18 x 5 mm wurde das Lösemittel pipettiert. Während der Extraktion wurde die Lösung auf einer Rührplatte bei Raumtemperatur oder temperiert im Wasserbad bei 500 rpm gerührt. Nach erfolgter Extraktion wurde das Vial mit Probe und Membranmodul in den Autosampler des HPLC-MS/MS-Systems gestellt. Die Injektion erfolgte direkt aus der Versuchsanordnung. Sehr kurze Analysezeiten ermöglichten die Mehrfachinjektion ohne Umfüllen der Extrakte in andere Vials. Einen Querschnitt der Apparatur zur membranunterstützten Anreicherung zeigt Abbildung 28.

3.6 Bestimmung der analytischen Parameter

Nachweisgrenze (NWG)

Die Nachweisgrenze wurde bestimmt aus dem Verhältnis von Signal und Rauschen nach folgender Formel:

$$NWG = 3\frac{S}{N}$$
(3.1)

S ... engl. signal – Signal

N ... engl. noise – Rauschen

Relative Standardabweichung (RSD)

Die relative Standardabweichung wurde bestimmt aus mindestens sechs voneinander unabhängigen Proben.

Anreicherungsfaktor (AF)

Zur Bestimmung der Anreicherungsfaktoren wurden Standardlösungen mit den Konzentrationen, die bei 100 % Extraktion vorliegen würden, vermessen und die erhaltenen Peakflächen mit denen der eigentlichen Extraktion verglichen. Der maximale Anreicherungsfaktor errechnet sich aus dem Volumenverhältnis Probelösung zu Lösemittelphase:

$$AF_{\max} = \frac{V_{\text{Probe}}}{V_{LM}}$$
(3.2)

3.7 Versuche zum biologischen Abbau von Carbamazepin

Untersucht wurde der biologische Abbau des Antiepileptikums Carbamazepin. Die Versuche wurden unter aeroben und anaeroben Bedingungen sowie in Pflanzentöpfen durchgeführt. Die Pflanztöpfe waren mit Flatterbinsen (*juncus effusus*) bestückt. Den biologischen Grundstock lieferten zwei unterschiedliche Schlämme mit Mischkulturen (Belebtschlammanlage im Klärwerk Delitzsch, Saale), die in getrennten Ansätzen eingesetzt wurden. Zusätzlich wurde der Einfluss von Phenol (Co-Metabolismus) untersucht. Das Phenol wurde regelmäßig nachdosiert. Die Ansätze hatten 0,5 L (Pflanzen) bzw. 1 L (Schlämme) Grundmedium und 5 mg/L Ausgangskonzentration an Carbamazepin. Die Pflanztöpfe standen offen im Phytotechnikum³, die aeroben Gefäße waren lose bedeckt, um Eindringen von Fremdkörpern und die Verdunstung gering zu halten. Die anaeroben Gefäße waren luftdicht verschlossen worden. Die Probenahme erfolgte hier stets unter Stickstoffatmosphäre. Die Gefäße für die Ansätze 1 bis 12 waren 2 L-Braunglasflaschen, die mit Tüchern bedeckt waren, um Abbau durch UV-Strahlung ausschließen zu können. Es existierten Nullproben zur Kontrolle. Die Zusammensetzungen der einzelnen Varianten sind in Tabelle 4 aufgezeigt.

³ Phytotechnikum ... Gewächshaus auf dem Dach eines Gebäudes des UFZ-Leipzig, in dem 365 Tage im Jahr ein mitteleuropäischer Sommertag mithilfe von Klimaanlagen und Lichttechnik simuliert wird.

Grundmedium: Leitungswasser 1 ml/L Spurensalzlösung 5 mg/L Ammonium 5 mg/L Phosphat pH auf 7,0 eingestellt

Die Analyse der Proben wurde nach Extraktion mit Essigester (10 mL Probe, 2 x 2 mL EE, 10 min Schüttler bei 200 rpm, Trocknen über Na_2SO_4 , Einengen auf 1 mL) mittels GC-MS durchgeführt bzw. auch durch Direktinjektion der filtrierten (0,1 µm) Proben ins HPLC-MS/MS.

Variante	Schlamm	Schlamm [ml/L]	Phenol [mg/L]	Carbamazepin [mg/L]	Medium
1	Saale	50	0	5	aerob
2	Saale	50	50	5	aerob
3	Saale	50	0	0	aerob
4	Delitzsch	50	0	5	aerob
5	Delitzsch	50	50	5	aerob
6	Delitzsch	50	0	0	aerob
7	Saale	200	0	5	anaerob
8	Saale	200	50	5	anaerob
9	Saale	200	0	0	anaerob
10	Delitzsch	200	0	5	anaerob
11	Delitzsch	200	50	5	anaerob
12	Delitzsch	200	0	0	anaerob
13	0	0	0	5	Pflanze
14	0	0	0	0	Pflanze

 Tabelle 4:
 Varianten des biologischen Abbauversuches mit Carbamazepin

Delitzsch ... Schlamm aus der Belebschlammanlage in Delitzsch

Saale ... Saaleschlamm

3.8 Chemische Oxidation von Carbamazepin mit FENTON'S Reagenz

Eine wässrige Carbamazepinlösung $(1 \ \mu g/20 \ mL)$ wurde mit Essigsäure auf pH = 3 angesäuert. Der Katalysator Fe²⁺ wurde in Form einer wässrigen FeCl₂-Lösung (5 mg/mL) zugegeben (35 μ L). Die Reaktion wurde gestartet durch die Zugabe von 1 mL 30 %igem H₂O₂. Das Reaktionsgefäß wurde verschlossen und gelegentlich geschüttelt.

Die Analyse der Metaboliten geschah nach Extraktion mit Essigester mittels GC-MS (Methode: EI-1) oder direkt aus wässriger Lösung mit HPLC-MS/MS (Methode: ESI-3).

Zur Verfolgung der Reaktionskinetik wurde 1 mL des oben beschriebenen Ansatzes in ein 1,5 mL Vial gegeben und in den ersten fünf Stunden der Reaktion aller 20 min mit HPLC-MS/MS detektiert. Danach wurde in größeren Abständen aufgezeichnet. Die Reaktion wurde 72 h verfolgt.

3.9 Ozonierung von Clarithromycin und Metoprolol

Die Ozonierungen der Problemstoffe wurden durchgeführt von Dr. Myint M. Sein an der Universität Essen-Duisburg, Fachgebiet Instrumentelle Analytik.

Ozon wurde mit einem dioxygen-fed ozonator (Philoz 04, Philaqua, Gladbeck) erzeugt. Standardlösungen ($c = 3 \cdot 10^{-4}$ M) von Clarithromycin und Metoprolol wurden in destilliertem Wasser (Milli-Q, Millipore) hergestellt. Die Produkte wurden analysiert nach dem Vermischen der Standardlösungen mit Ozonlösung und Rühren bei Raumtemperatur.

Weiterhin wurde umgesetztes Metoprolol mit Dinitrophenylhydrazin versetzt (siehe Abschnitt 3.10). Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden durchgeführt unter der Verwendung der HPLC-MS/MS. Es kamen zum Einsatz die Methoden ESI-4 und APPI-3 (Clarithromycin) und ESI-5 und ESI-6 (Metoprolol).

3.10 Umsetzung von Aldehyden und Ketonen mit Dinitrophenylhydrazin (DNPH) zu den entsprechenden Hydrazonen

Die Umsetzung erfolgte laut einer Vorschrift aus dem Organikum. Zu 0,4 g DNPH wurden 2 mL H_2SO_4 konz. gegeben. Unter Schütteln wurden anschließend 3 mL bidestilliertes Wasser tropfenweise hinzu gegeben. Zuletzt wurde die Lösung mit 10 mL 95 %igem Ethanol versetzt.

Zu 1 mL der frisch hergestellten DNPH-Lösung wurde unter Schütteln die wässrige Probelösung gegeben. Der orangerote Niederschlag wurde abfiltriert und aus Essigester umkristallisiert. Die Reaktionsgleichung zur Bildung von Hydrazonen aus Carbonylverbindungen mit DNPH ist in Abbildung 15 dargestellt.



Abbildung 15: Reaktionsmechanismus zur Bildung von Hydrazonen aus Carbonylverbindungen mit DNPH

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Bestimmung pharmazeutischer Reststoffe in Wässern

4.1.1 Vergleichsmethode

Eine Vergleichsmethode auf Basis von etablierten Standardverfahren musste für die Zielanalyten entwickelt werden, um die Leistungsfähigkeit der neu entwickelten Anreicherungsverfahren (Abschnitt 4.1.2) erkennen zu können. Die Vergleichsmethode setzt sich zusammen aus den klassischen Probevorbereitungstechniken der organischen Spurenanalytik. Die filtrierte Probe wird durch Festphasenextraktion aufkonzentriert. Eine Aufreinigung des Extraktes wird an Silicagel vorgenommen (cleanup). Neutrale Zielanalyten werden anschließend durch GC-MS im EI-Modus quantifiziert. Zur Bestimmung der polaren Analyten wird eine Derivatisierung mit PFBBr durchgeführt und die Produkte wurden anschließend im GC-MS im NCI-Mode vermessen. Der Ablauf der Vergleichsmethode und die zu bestimmenden Zielanalyten sind in Abbildung 16 aufgezeigt.

Die Vergleichsmethode ist eine sehr sensitive Methode. Dies spiegelt sich besonders in den Nachweisgrenzen (NWG) der derivatisierten sauren Analyten wider. Die Nachweisgrenzen der umgesetzten Verbindungen liegen zwischen 0,01 ng/L (Clofibrinsäure, Ibuprofen) und 0,2 ng/L (EE). Als Ausnahme liegt das t-NP mit 25 ng/L deutlich darüber. Ursache dafür sind die relativ hohen Blindwerte des t-NP, dessen über 100 Einzelisomere immer als Gruppe ausgewertet werden. Das t-NP zeigt im Chromatogramm ein typisches Isomerenmuster (Abbildung 17). Die Nachweisgrenzen der underivatisierten Analyten liegen zwischen 0,2 ng/L (Galaxolid, Tonalid) und 10 ng/L (Phenazon, ß-Sitosterol). Die hohe NWG des Phenazons ist auf die besonders schlechte Wiederfindung (1 %) zurückzuführen. Ein Grund für die deutlich besseren NWG der derivatisierten Verbindungen ist die fast vollständige Ausblendung störender Matrix im NCI-Mode. Nur Matrix, die chemisch ionisiert werden kann, wirkt hier störend. Durch Elektronenstoß als energiereiche Ionisierung können dagegen wesentlich mehr Matrixkomponenten ionisiert werden.

Die NWG für Carbamazepin kann verbessert werden, wenn die Injektortemperatur von 280°C auf 220°C herabgesetzt wird, um den Zerfall von Carbamazepin zu Iminostilben

zu reduzieren. Der Zerfall ist temperaturabhängig. Das Absenken der Injektortemperatur ist jedoch nur zweckmäßig, wenn Einzelanalysen für Carbamazepin durchgeführt werden. Bei Analysen von Gemischen muss 280°C als Injektortemperatur gewählt werden, damit die vollständige Verdampfung aller Analyten gewährleistet ist. Eine Zusammenstellung der Nachweisgrenzen der Vergleichsmethode ist in Tabelle 5 zu finden.

Die Quantifizierung erfolgt für t-NP, BPA und EE2 über interne Standards (4n-NP, BPA-d₁₄, Estradioldiacetat), die vor der Festphasenanreicherung zu den wässrigen Proben gegeben werden und für die restlichen Analyten durch externe Kalibrierung.



Abbildung 16: Arbeitsschritte der Vergleichsmethode als Ablaufschema

	NWG EI [ng/L]	NWG NCI [ng/L]	Reproduzier- barkeit RSD [%]	Recovery [%] LiChrolut EN/C18
Galaxolid	0,2	-	15 *	71 *
Tonalid	0,2	-	13 *	70 *
Coffein	1	-	17 *	5 *
Carbamazepin	2	-	31 *	6 *
Phenazon	10	-	69 *	1 *
Bisphenol A		0,05	18 *	76 *
17α-Ethinylestradiol		0,2	10 *	90 *
techn. Nonylphenol		25	15 *	82 *
Clofibrinsäure	-	0,01	17 *	62 *
Ibuprofen	-	0,01	19 *	88 *
Gemfibrozil	-	0,04	11 *	85 *
Naproxen	-	0,05	10 *	78 *
Diclofenac	-	0,06	10 *	15 *
Bezafibrat	-	0,2	12 *	91 *

Tabelle 5:Nachweisgrenzen und weitere analytische Kenngrößen der Vergleichsmethode bei
einer Anreicherung von 1 L wässriger Probe mit SPE an LiChrolut EN/C18

* ... (n = 5) [Braun 2006]

Die gaschromatographische Trennung der Gemische ist in Abbildung 17 und Abbildung 18 gezeigt. Tetrachlornaphtalin (TCIN) dient als Standard zur Überwachung der Gerätefunktionsstabilität und wird vor der Injektion zum aufbereiteten Extrakt gegeben. Die Chromatogramme zeigen, dass die einzelnen Substanzen vorwiegend gut voneinander getrennt werden konnten. Scharfe Peaks ermöglichen die Quantifizierung über Peakflächen im SIM-Modus. Qualifier-Ionen werden eingesetzt zur eindeutigen Identifizierung in Realproben. Die Analysenzeit der Trennung beträgt 30 min (GC-EI-MS) bzw. 36 min (GC-NCI-MS).



Abbildung 17: Chromatogramm eines Standardmixes der neutralen Analyten in n-Hexan, der einer Konzentration von 50 ng/L bei einer Anreicherung von 1 L Wasserprobe entspricht. Es handelt sich um ein GC-MS-Chromatogramm mit Elektronenstoßionisation.



Abbildung 18: Chromatogramm eines Standardmixes der derivatisierten polaren Analyten in n-Hexan, der einer Konzentration von 10 ng/L bei einer Anreicherung von 1 L Wasserprobe entspricht. Es handelt sich um ein GC-MS-Chromatogramm mit negativer chemischer Ionisierung.

Zur Festphasenanreicherung der polaren Analyten wurden verschiedene kommerziell erhältliche Adsorptionsmaterialien getestet. Die Materialien und ihre Eigenschaften sind in Tabelle 6 zusammengetragen. Die Ergebnisse des Kartuschenvergleiches sind in Abbildung 19 dargestellt.

Handelsname	Material	Anwendung
Supelco DSC-CN	monomerisch gebundenes	Umkehr- oder Normalphase
	Cyanopropyl (7 % C),	• erlaubt schnelle Elution stark polarer
—Śi—(CH ₂) ₃ CN	endcapped	Verbindungen, die auf polaren Sorbentien zu
		stark festgehalten werden
Supelco DSC-18Lt	monomerisch gebundenes	• erhöht die Retention mäßig polarer
	C_{18} (11 % C), endcapped	Verbindungen
—Śi—(CH ₂) ₁₇ CH ₃		• für sehr große Moleküle geeignet
		• ermöglicht die Elution mit schwachen
		organischen Lösemitteln, schwäche Retention
		als DSC-C18
Supelco DSC-Ph	monomerisch gebundenes	• für sehr große Moleküle geeignet
	Phenyl (7 % C),	• ermöglicht die Elution mit schwachen
i — si — ki — ki — ki — ki — ki — ki — k	endcapped	organischen Lösemitteln
		• der aromatische Ring ermöglicht selektive
		Retention
Waters OASIS HLB	polymerisch, hydrophile	simultane Bestimmung von polaren und
(Struktur siehe	(N-Vinylpirollidon) und	unpolaren Analyten
Anhang	lipophile (Divinylbenzen)	
Annang)	Endgruppen	
phenomenex	polymerisch,	für polare und unpolare Analyten geeignet
STRATA-X	oberflächenmodifiziertes	
\ n /==>	Styroldivenylbenzol	
Chromabond EASY	polymerisch,	empfohlen für Antibiotika, Pharmazeutika,
	Polystyroldivinylbenzol	Pestizide

 Tabelle 6:
 Zusammenstellung der Eigenschaften der getesteten Festphasen

Die Waters OASIS HLB zeigt durchgehend die besten Wiederfindungen mit deutlicher Differenz zu allen weiteren. Die Waters OASIS HLB (HLB: hydrophylic-lipophilic balanced sorbent) besteht aus einer neuartigen Umkehrphase, die für die Anreicherung aller Verbindungen geeignet ist. Es besteht aus einem polymeren Sorbens, das besetzt ist mit einem ausbalancierten Verhältnis von hydrophilem N-Vinylpirollidon und lipophilem Divinylbenzen.

Das Elutionsverhalten der Zielanalyten ist an den Waters OASIS HLB sehr gut, wie der Vergleich mit der Chromabond EASY (ebenfalls ein Styroldivenylbenzol) zeigt (Abbildung 20). Mit sehr geringen Lösemittelmengen (1 - 2 mL MeOH) kann eine nahezu komplette Elution erreicht werden, während die Darstellung vermuten lässt, dass nach der zweiten Elution der Chromabond EASY die Elution der Analyten (außer Ibuprofen) noch nicht vollständig ist.



Abbildung 19: Vergleich verschiedener kommerziell erhältlicher SPE-Kartuschen. Getestet wurden folgende Modelle: Supelco DCS-CN 100 mg (CN), Supelco DSC-18Lt 100 mg (18Lt), Supelco DSC-Ph 100 mg (Ph), Waters OASIS HLB 200 mg (OASIS), phenomenex STRATA 60 mg (Strata) und Chromabond EASY 500 mg (EASY)



Abbildung 20: Vergleich der Elutionsprofile der Chromabond EASY (EASY) und der Waters OASIS HLB (OASIS). Es wurden zwei Mal eluiert (I, II) und diese Eluate separat umgesetzt und analysiert. Eluiert wurde laut Herstellervorschriften mit je 6 mL ACN und 6 mL MeOH (EASY) bzw. 1-2 mL MeOH.

Ein weiterer Vorteil der Waters OASIS HLB ist die kommerzielle Fertigung in Glaskartuschen. Glas als Kartuschenmaterial reduziert mögliche BPA und t-NP-Kontaminationen aus Plastikstoffen. Des Weiteren zeigen Glasoberflächen geringere adsorptive Eigenschaften gegenüber den Analyten.

Soll die simultane Bestimmung der neutralen und der sauren Verbindungen erfolgen, müssten theoretisch zwei Liter Probe separat angereichert werden, da der pH-Wert der Lösung entscheidend für die Adsorption am Extraktionsmaterial ist. Die Extraktion der neutralen Verbindungen ist optimal bei einem neutralen pH-Wert, während die sauren Analyten die beste Anreicherung bei pH-Werten um 2-3 (eingestellt mit H₂SO₄) zeigen.

Bei der simultanen Analyse von sauren und neutralen Verbindungen aus einer Probe hat sich die Verwendung von selbstgepackten Glaskartuschen, die mit zwei verschiedenen Materialien bestückt sind, bewährt [Braun 2006]. Verwendet wird eine Kombination aus einer Umkehrphase LiChrolut C18 und einem Sorbens LiChrolut EN, das speziell für die Anreicherung semi-polarer und polarer Analyten geeignet ist. Die Herstellung der Kartuschen ist in Abschnitt 3.3.1 beschrieben.

Stichprobenartig wurde der Filterrückstand der Wasserprobe durch Lösemittelextraktion (Ultraschall) auf das Vorhandensein der Zielanalyten untersucht. Dabei konnten Spuren der am stärksten lipophilen Verbindungen (Galaxolid, Tonalid) der betrachteten Verbindungen detektiert werden. Diese Anteile waren aber sehr gering (<< 1 ng/Liter Probe). Polare Analyten konnten an den Schwebstoffen nicht detektiert werden, was in Einklang steht mit den Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten dieser Verbindungen.

Die auf den Filtern detektierten Mengen wurden für weitere Betrachtungen nicht berücksichtigt. Einerseits war nur die tatsächlich in der wässrigen Phase auftretende Konzentration von Interesse, andererseits ist der Anteil der Schwebstoffe in den Wasserproben stark abhängig von den Probenahmen. Der Filterschritt selbst ist aber notwenig, da es sonst zum Verstopfen der Poren des Sorbensmaterials und der PTFE-Fritten kommen kann und damit eine weitere Anreicherung an derselben Kartusche nicht möglich ist.

4.1.2 Neue Anreicherungsmethoden

4.1.2.1 Online-SPE-HPLC-MS/MS

Das Ziel einer online-SPE-HPLC-MS/MS Methodenentwicklung bestand einerseits darin, die schnelle Bestimmung von Verbindungen zu ermöglichen, die mittels GC nicht untersucht werden können, zum anderen sollte die zeitaufwendige, mehrstufige Probenvorbereitungsprozedur (Abschnitt 3.3.1) ersetzt werden. Die direkte Anbindung an die LC-MS/MS Analyse minimiert die Analytverluste, die bei einzelnen Probevorbereitungsschritten der offline Festphasenextraktion, wie z. B. Probe überführen oder Einengen, auftreten können. Eine online Prozedur reduziert somit Methodenfehler und erhöht die Reproduzierbarkeit einer Analyse. Weiterhin kann eine große Anzahl Proben mit geringem Laboraufwand vermessen werden. Eine besondere Herausforderung stellt dabei die zuverlässige Detektion der Analyten im relevanten Konzentrationsbereich dar. Für die Analyse ist eine verhältnismäßig geringe Probenmenge von 10 - 100 mL, je nach zu erwartender Konzentration und Verschmutzung, notwendig.

Teilschritte des Verfahrens sind automatisiert über ein 2-Wege-10-Positionen-Ventil. Abbildung 21 zeigt schematisch die Anordnung der Komponenten im System. Die Gesamtanalysezeit von 100 mL Probevolumen liegt mit weniger als 1 h deutlich unter der der Vergleichsmethode. Dadurch ist der Einsatz von Standardadditionsverfahren als sichere Quantifizierungsmethode für stark matrixbehaftete Wässer weniger zeitraubend. Im Folgenden sind beispielhaft die Ergebnisse für die nicht GC-gängigen Pharmaka Metoprolol, Propranolol, Erythromycin und Fenofibrat und für die urbanen Marker Carbamazepin, Coffein und Tonalid dargestellt. "SDB" bezeichnet die SDB-RPS von 3MTM EmporeTM, "ENVI" bezeichnet die ENVITM-18 DSK von Supelco. Als Ionisierung in der LC-MS/MS wurde die APPI verwendet, um auch weniger polare Komponenten wie die polyzyklischen Moschusriechstoffe analysieren zu können. Müssen vorwiegend polare Analyte bestimmt werden, ist auch die Kombination mit ESI möglich (siehe Abschnitt 4.1.4).



Abbildung 21: Schematische Darstellung der online-SPE-HPLC-MS/MS

Chromatographie

Abbildung 22 zeigt den verwendeten CIM disk holder und eine ENVI Disc in der eingesetzten Größe. Ein Chromatogramm ist in Abbildung 23 zu sehen. Wie die Ergebnisse der SPE Disc Elutionsversuche zeigten, werden die ausgewählten Analyten nicht gleichzeitig vom Sorbens desorbiert. Der Elutionsprozess selbst hat somit schon chromatographischen Charakter.

Diese doppelte Chromatographie (Elution von der Disc und Trennung auf der HPLC-Säule LUNA C8) zeigt eine für die MS/MS-Analyse hinreichende Trennung der Analyten im Gemisch. Die Peaks sind ausreichend schmal für eine Quantifizierung über die Bestimmung der Peakflächen. Das Tailing bei Metoprolol und Propranolol ist auf die Beschaffenheit der Analyten zurückzuführen. Starke Wechselwirkungen insbesondere mit der C8-Phase der Trennsäule erschweren die Elution. Ein erhöhter Anteil von MeOH in der Elutionsphase wäre hier von Vorteil, jedoch sollte der Wasseranteil für eine Atmosphärendruckphotoionisation bei 20 % liegen (siehe Abschnitt 4.1.4).





Abbildung 22: CIM disk holder der Fa. BIA Separations und das eingesetzte SPE-Material (ENVI) als Disc in der verwendeten Größe



Abbildung 23: Ionenspurenchromatogramme eines wässrigen Standards mit Konzentrationen der Analyten von jeweils 100 ng/L. Angereichert wurde online mit einer SPE-Disc: ENVI aus einem Probevolumen von 20 mL mit einem Fluss von 3 mL/min. Die Intensitäten der Einzelspuren wurden auf 100 % normiert.

Zunächst wurden die Anreicherungsgeschwindigkeit, das Probevolumen und die Elutionskraft (benötigtes Lösemittelvolumen) des HPLC-Laufmittels getestet. Die Zusammensetzung des Laufmittels ist MeOH/Wasser 80/20 (v/v), wie bei der Optimierung der APPI-Bedingungen in Abschnitt 4.1.4 näher erläutert.

Lösemittelvolumen

Zur Bestimmung des benötigten Elutionsvolumens wurde ein Elutionsprofil aufgenommen. Dazu wurden 50 μ L Fraktionen des Eluats gesammelt und anschließend einzeln quantifiziert. Die resultierende Elutionszeit beträgt 2 min, d. h. bei einem Fluss des Laufmittels von 200 μ L/min sind insgesamt 400 μ L Lösemittel zur vollständigen Elution der Analyten vom SPE-Material ausreichend. Diese Zeit wird außerdem genutzt, um die separate Pumpe, die zur Probeaufgabe eingesetzt wird, mit MeOH zu spülen. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 24 zu sehen.



Abbildung 24: Elutionsprofile der relevanten Verbindungen. Es wurden jeweils Fraktionen von 50 μL gesammelt und separat mit HPLC-MS/MS analysiert. Die Anreicherung wurde zuvor an einer SDB vorgenommen. Ab Fraktion 9 wurden keine bzw. nur sehr geringe Signale detektiert.

Probevolumen

In Abbildung 25 ist die Auswirkung unterschiedlicher Probevolumina auf die gemessenen Konzentrationen dargestellt. Bei einer erschöpfenden Extraktion wie der SPE sollte bei ausreichender Sorbenskapazität, das Probevolumen aus dem angereichert wird, nur geringen Einfluss auf die Wiederfindung haben. Für die Anreicherung der meisten Analyten erwies sich die Wiederfindung als reproduzierbar im Fehlerbereichen zwischen \pm 5 und 16 % auch bei Änderung des Probevolumens (zwischen 10 und 60 mL). Im Fall von Fenofibrat bzw. Carbamazepin wurden tendenziell mit zunehmendem Probevolumen geringere Wiederfindungen erreicht. Diese Befunde deuten auf einen Durchbruch dieser Verbindungen durch die SPE Disc hin. Die geringe Betthöhe des Sorbens auf der Disc führt vermutlich zu einem Durchbrechen von schwerer retardierbaren Analyten und es kommt zu Analytverlusten.

Aus diesen Resultaten kann abgeleitet werden, dass richtige, reproduzierbare und vergleichbare Quantifizierungen nur auf der Basis identischer Probevolumina durchgeführt werden können. Das Probevolumen muss demnach je nach zu erwartender Konzentration für eine gesamte Messreihe angepasst werden. Für wenig belastete Wässer (Grundwasser, Trinkwasser) sind Probevolumen ab 50 mL ratsam, während bei Oberflächengewässern auch 20 mL ausreichend sein können. Das Verhältnis zwischen

Volumenminimierung zur Matrixelimination und Erreichen der Bestimmungsgrenze ist hierbei zu berücksichtigen.



Abbildung 25: Einfluss des Probevolumens auf die Wiederfindung. Angereichert wurden je 2 ng absolut an einer SDB bei einem Fluss von 1 mL/min.

Anreicherungsgeschwindigkeit

Der Einfluss der Anreicherungsgeschwindigkeit auf die Wiederfindung und Reproduzierbarkeit ist gering. Außer für Fenofibrat und Carbamazepin liegen die Abweichungen unter 10 % (Abbildung 26). Für die genannten Verbindungen vergrößert sich die Fläche bei erhöhter Anreicherungsgeschwindigkeit. Es wird angenommen, dass die chromatographischen Prozesse bei höheren Beladungsflüssen weniger zum Tragen kommen und Durchbrüche der Analyten vermieden werden.

Die maximale Anreicherungsgeschwindigkeit kann damit eingesetzt werden. Die Belastbarkeitsgrenze des Systems liegt bei 4 mL/min. Bei höheren Flüssen ist der Druck im System zu hoch und am CIM disk holder sind Undichtigkeiten zu beobachten. Die Halterungen sind aus Kunststoff und nicht für den Einsatz unter hohem Druck konzipiert. Ein Nachbau aus Edelstahl könnte hier evtl. noch höhere Flussraten ermöglichen, wenn dies erforderlich werden sollte.



Abbildung 26: Einfluss der Anreicherungsgeschwindigkeit auf die Wiederfindung. Angereichert wurden je 20 mL einer Standardlösung mit der Konzentration 100 ng/L an einer SDB.

Nachweisgrenze, Wiederfindung

Die Nachweisgrenzen liegen zwischen 1 ng/L (Fenofibrat, ENVI und SDB) und 50 ng/L (Coffein, SDB) und damit im umweltrelevanten Konzentrationsbereich. Beide Sorbentien ENVI und SDB zeigen vergleichbare Werte für Nachweisgrenzen und Wiederfindungen. Die niedrige Nachweisgrenze des Fenofibrats trotz schlechter Wiederfindungen ist auf die effektive Ionisierung des Moleküls durch Photoionisation (zwei aromatische Ringe als Anregungszentren) und der daraus resultierenden guten Signalintensität zu erklären. Besonders gute Wiederfindungen zeigt die SDB Disc für Metoprolol und Propranolol ($\approx 100 \%$). Die Werte der Wiederfindungen, die über 100 % liegen, sind auf Messungenauigkeiten und Blindwerte zurückzuführen. Die einzelnen Daten sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Für weitere Versuche wurde bevorzugt die SDB Disc eingesetzt, da damit höhere Wiederfindungsraten für die relevanten, nicht GC-gängigen Verbindungen erhalten wurden. Außerdem erleichtert die größere mechanische Stabilität der SDB Disc deren Handhabung wesentlich.

mussi igen Stuntuur uitssungen						
Analyt	NWG ENVI [ng/L, V = 20 mL]	NWG SDB [ng/L, V = 20 mL]	Wiederfindung ENVI [%, 500 ng/L]	Wiederfindung SDB [%, 500 ng/L]		
Metoprolol	4	5	100	101		
Propranolol	4	2	79	100		
Erythromycin	10	10	70	95		
Fenofibrat	1	1	51	86		
Carbamazepin	4	5	110	92		
Coffein	10	50	118	78		
Tonalid	5	2	67	96		

Tabelle 7:Nachweisgrenzen und Wiederfindungsraten der online-SPE-HPLC-MS/MS aus
wässrigen Standardlösungen

Linearität der online-Anreicherung, Reproduzierbarkeit

In Abbildung 27 ist die Linearität der Anreicherung an Beispielen dargestellt. Die relativen Standardabweichungen (n = 6) liegen zwischen 13 % und 23 % bei einer Konzentration der Probelösung von 100 ng/L. Bei einer Konzentration von 500 ng/L liegen die relativen Standardabweichungen um 10 %. Die Reproduzierbarkeiten und die linearen Bereiche sind in Tabelle 8 angegeben. Für die Bestimmung des linearen Bereiches wurden Proben zwischen 1 und 2.000 ng/L vermessen. Für Carbamazepin und Fenofibrat zeigt die Regressionsgerade einen quadratischen Verlauf im oberen Konzentrationsbereich. Die anderen Analyten zeigen im vermessenen Bereich einen linearen Anstieg der Gerade.



Abbildung 27: Linearität der Anreicherung im unteren Konzentrationsbereich aus wässrigen Standardlösung an der SDB

Tabelle 8:	Reproduzierbarkeiten und lineare Bereiche für die online-SPE-HPLC-MS/MS der
	ausgewählten Analyten aus wässriger Standardlösungen mittels SDB-Disc

Analyt	Reproduzierbarkeit RSD [%, n = 6, c = 100 ng/L, 3 mL/min]	linearer Bereich [ng/L]		
Metoprolol	15,0	5 - 2000		
Propranolol	13,5	2 - 2000		
Erythromycin	13,7	10 - 2000		
Fenofibrat	13,1	1 – 1000		
Carbamazepin	21,8	5 - 1500		
Coffein	14,1	50 - 2000		
Tonalid	16,0	2 - 2000		

Die oben beschriebene Methode ist leistungsstark hinsichtlich des niedrigen eingesetzten Probevolumens. Grund hierfür ist, dass bei einer online Methode mit erschöpfender Extraktion im Idealfall keine Analytverluste auftreten. Unter Annahme einer 100 %igen Desorption von der Disc stehen die Analyten quantitativ der Analyse zur Verfügung, im Gegensatz zu offline SPE-Methoden, wo immer nur ein Aliquot der Gesamtprobe untersucht werden kann. Dieser verlustfreie Übergang der Analyten von der Probe zum Analyseninstrument birgt aber auch das Problem, dass die kompletten Matrixbestandteile mit in das Massenspektrometer gelangen und hier die Ionisation der Analyten stören (siehe Abschnitt 4.1.4.4). Untersuchungen stark Matrix belasteter Proben wie z. B. Rohabwässer oder Deponieabwässer mit online-SPE-HPLC-MS/MS erfordern noch zusätzlichen Aufwand zur guten HPLC Abtrennung der Matrixbestandteile. Turbulent Flow HPLC wäre dazu evtl. eine Möglichkeit, die aber im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet wurde.

Die Verwendung der online-SPE-HPLC-MS/MS-Methode ist damit besser geeignet für die Untersuchung weniger matrix-belasteter Proben wie Grund- oder Trinkwasser. Eine Quantifizierung ist bei diesen Proben auch über eine externe Kalibrierung möglich, wenn keine isotopenmarkierten Referenzmaterialien als interner Standard zur Verfügung stehen. Für eine zuverlässige Analytquantifizierung in stark matrixbehafteter Probe ist die Standardaddition die Methode der Wahl, mit der der Einfluss der Matrix korrigiert werden kann.

Eine ungenügende Matrixentfernung während der Probenvorbereitung kann die Quantifizierung der Zielanalyten ziemlich behindern oder gar unmöglich machen. Um die Matrixprobleme weiter zu minimieren, wurde eine weitere Probeanreicherungstechnik, die membranunterstützte Extraktion (MASE), erprobt.

4.1.2.2 Membranunterstützte Analytanreicherung

Aufbau einer membranunterstützten Extraktionsapparatur

Die membranunterstützte Anreicherung wurde getestet, um in Kombination mit der LC-MS/MS ein schnelles und teilweise automatisierbares Verfahren zu erreichen, das mit geringem personellen Aufwand einen hohen Probendurchsatz erlaubt, dabei aber trotzdem leistungsstark für die Spurenanalytik ist und zuverlässige Ergebnisse liefert. Ausgehend von den apparativen Vorarbeiten von Einsle et al. [Einsle 2006] und Schellin [Schellin 2006] wurde das Membranextraktionssystem an den Autosampler der Agilent 1100 Series angepasst (Abbildung 28). Damit verbunden war eine Minimierung des ursprünglichen Aufbaus, so dass Standard Autosamplervials mit Volumen von 8 mL für die membranunterstützte Extraktion eingesetzt werden können. Das verwendete System erlaubt den Einsatz von maximal 5 mL Probe und 50 – 150 μ L Extraktionsmittel. Letztendlich erwiesen sich 100 μ L als optimale Menge für eine Extraktion. Als Extraktionsmittel wurden Chloroform, Methanol, Essigester, n-Pentan, n-Octanol und Dihexylether getestet, wobei nach folgenden Eigenschaften ausgewählt wurde:

- Gute Löseeigenschaften f
 ür die Analyten, d. h. eine hohe Affinit
 ät der Analyten zur organischen Extraktionsphase bestimmt wesentlich die Effizienz der Anreicherung.
- Geringer Dampfdruck des Extraktionsmittels ist von Vorteil, um die Verdampfung während der Extraktionszeit zu minimieren und die Reproduzierbarkeit des Extraktionsprozesses zu garantieren.
- Geringe Wasserlöslichkeit soll eine Diffusion des Extraktionsmittels in die wässrige Phase vermeiden. Dadurch kann das Verteilungsgleichgewicht der Analyten beeinflusst werden und sich die Extraktionsausbeuten verringern.
- Nicht zuletzt darf das organische Extraktionsmittel die Polymermembran nicht angreifen.
- Das Extraktionsmittel muss an die nachfolgende Analysenmethode (HPLC-MS/MS) angepasst sein.

Insgesamt zeigte Chloroform die besten Eigenschaften hinsichtlich Extraktionskraft und Inertheit gegenüber der verwendeten Polyethylenmembran. Es ist sehr schlecht wasserlöslich, wodurch eine Diffusion in die wässrige Probenphase ausgeschlossen wird. Des Weiteren waren die Verluste von Chloroform während der Extraktionszeit relativ gering und vor allem reproduzierbar. Bezüglich der Umweltverträglichkeit des CHCl₃ als chloriertes Lösemittel ist zu bedenken, dass die Toxizität unbestritten ist, jedoch die hier eingesetzten Mengen (100 µL pro Analyse) gegenüber den herkömmlichen LLEs (1 - 100 mL/Analyse) vernachlässigbar klein sind. Höhersiedende Lösemittel (n-Pentan, n-Octanol, Dihexylether), die ebenfalls ein stabiles Lösemittelvolumen gewährleisten würden, sind nicht oder nicht ausreichend mischbar mit der mobilen Phase der HPLC (MeOH/Wasser, 95/5). Zur Detektion wurde die LC-MS/MS mit Elektronensprayionisation im positiven und negativen Mode eingesetzt.



Abbildung 28: Schematische Darstellung der Mini-MASE. Die Angaben der Größen sind in mm.

Folienmaterial

Die Wahl des Folienmaterials fiel nach dem Test von acht verschiedenen im Handel als Frühstücks- oder Gefrierbeutel erhältlicher Folien (alle low density polyethylene, LDPE) auf die Gefrierbeutel 3 L der Marke AS Schlecker, PE-LD,. Die Folien zeigten untereinander kaum signifikante Abweichung in der Handhabbarkeit, beim Schweißen und den Wiederfindungsraten, so dass auch jede andere Sorte hätte eingesetzt werden können. Weiterhin wurden LDPE-Folien (als Schlauch mit \emptyset 5 cm erhältlich) mit bekannter Schichtdicke von (30 µm) getestet. Trotz evtl. leichterer Handhabung beim Schweißen wurde aber von deren Benutzung abgesehen, da Verunreinigungen der Folie die folgenden Analysen störten. Somit wurden umfangreiche Reinigungsprozesse vor jeder Extraktion erforderlich. Die für Lebensmittelzwecke hergestellten Folienmaterialien sind schon vom Hersteller gründlich vorgereinigt und zeigten keine störenden Komponenten in den Analysen.

Aussalzeffekt

Besonders bei Metoprolol ist eine verbesserte Extraktion zu verzeichnen, wenn aus einer mit Kochsalz gesättigten Lösung extrahiert wird. Es kann davon ausgegangen werden, dass die erhöhte Ionenstärke der Probelösung das Verteilungsgleichgewicht zugunsten der organischen Phase verschiebt und dadurch die Extraktionsausbeute erhöht. Der Anreicherungsfaktor steigt um 50 %. Bei den anderen Verbindungen ist der Einfluss weniger stark (Erhöhung um ca. 20 %). Die Literatur beschreibt ebenfalls den positiven Effekt von NaCl-Zugabe auf die Extraktion von polaren Analyten, allerdings bei der Festphasenmikroextraktion [Eisert 1995].

Trotz der Vorteile der Salzzugabe musste in der praktischen Anwendung in Kombination mit LC-MS/MS auf Salzzugabe verzichtet werden. Es bestand die Gefahr, dass bei möglichen Undichtigkeiten der Membran Salzlösung in den Extrakt gelangt, die beim Injizieren in das LC-MS/MS-System zu beträchtlichen Gerätestörungen führt. In diesem Fall muss das Gerät belüftet und das Orifice von allen Salzpartikeln gereinigt werden. Außerdem werden im Ionisationsprozess durch zusätzliche Na-Ionen, unreproduzierbare Mengen an intensiven Adduktionen gebildet, die zur Intensitätsminderungen der eigentlichen Analytsignale führen und eine Auswertung erschweren bzw. sogar unmöglich machen.

Ist das Aussalzen aufgrund sehr niedrig zu detektierender Konzentrationen unbedingt erforderlich, so sollte auf die Automatisierung verzichtet werden und der Extrakt mit einer Pipette/Spritze in ein anderes Vial umgefüllt werden. Eine Verunreinigung des organischen Extraktes mit wässriger Probelösung kann dann durch Phasentrennung optisch geprüft werden.

Anreicherungsfaktoren

Das Phasenverhältnis zwischen dem Probevolumen und der Extraktionsmittelmenge bestimmt neben anderen Größen, wie z. B. dem Verteilungsgleichgewicht der Analyten, die Anreicherungseffizienz. Die eingesetzte Lösemittelmenge von 100 μ L verbleibt nicht komplett im LDPE-Beutel (Bag) bedingt durch Verdunstung, Verteilung und Sorption im Membranmaterial. Die Menge des tatsächlich im Bag nach einer Stunde Anreicherungszeit verbleibenden Chloroforms beträgt bei Raumtemperatur 50,4 ± 7,0 μ L (n = 7). Daraus ergibt sich ein maximaler Anreicherungsfaktor AF_{max} = 99 bei der eingesetzten Probemenge von V_{Probe} = 5 mL.

$$AF_{\max} = \frac{V_{\text{Probe}}}{V_{\text{Extraktionsmittel}}} = \frac{5000\,\mu L}{50,4\,\mu L} = \underline{99} \tag{4.1}$$

pH-Wert-Abhängigkeit des Anreicherungsfaktors

Der Extraktionsprozess ist stark pH-Wert-abhängig. Anreicherungsversuche bei verschiedenen pH-Werten (3; 7; 8,5; 10; 12) der Probelösung haben gezeigt, dass unterschiedliche Analyten mit stark verschiedenen funktionellen Gruppen mit dem vorliegenden System nicht gemeinsam in einem Schritt extrahiert werden können. Resultierend aus diesen Versuchen ergeben sich zwei Teilschritte, die die Extraktion von β -Blockern (Metoprolol, Propranolol) aus alkalischer Probelösung und Säuren wie Ibuprofen, Naproxen, Diclofenac, Indometacin, Gemfibrozil aus saurer Probelösung ermöglichen. Die Anreicherung von Carbamazepin, Phenazon, Coffein, Fenofibrinsäure, Bezafibrat und Erythromycin im Konzentrationsbereich von < 100 ng/L war mit den erhaltenen Anreicherungsfaktoren von < 10 mit der Mini-MASE nicht erfolgreich. Für diese Verbindungen ist der Einsatz der Mini-MASE nur sinnvoll, wenn höhere Konzentrationen der Analyten (> 2 µg/L) neben komplexer Matrix vorliegen (z. B. Klärwerkszuläufe). Hierbei kann die Mini-MASE zur Abtrennung der störenden Begleitkomponenten sehr effektiv eingesetzt werden.

Die Säuren zeigten die größten Anreicherungsfaktoren bei einem pH-Wert der Probelösung von 3 (eingestellt mit $H_2SO_{4 verd.}$). Die β -Blocker hatten bei einem pH-Wert von 10 (eingestellt mit 2 M NaOH) die größten Anreicherungsfaktoren (Abbildung 29 und Tabelle 9). Bei einem pH-Wert von 12 ändert sich das Elutionsprofil und die Peaks zeigen starkes Tailing. Dies könnte ein Zeichen für Instabilität des Folienmaterials gegenüber stark alkalischen Lösungen sein. Ein Vergleich der Anreicherungsfaktoren bei unterschiedlichen pH-Werten ist in Abbildung 29 zu sehen. Die Werte der Anreicherungsfaktoren aller Verbindungen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.



Abbildung 29: Anreicherungsfaktoren der β-Blocker Metoprolol und Propranolol bei unterschiedlichen basischen pH-Werten. Bei einem pH-Wert von ≤ 7 fand keine Anreicherung statt.

Temperaturabhängigkeit des Anreicherungsfaktors

Die Gleichgewichtseinstellung ist wie im Anhang beschrieben temperaturabhängig. Bei allen Verbindungen ist eine Erhöhung der Extraktionsausbeute zu beobachten, wenn bei 50°C im Wasserbad anstatt bei Raumtemperatur angereichert wird. Die Erhöhung liegt durchschnittlich bei 50 % und wird auf die verbesserte Diffusion der Analyten zur und durch die Membran hindurch zurückgeführt.

In der Praxis gestaltete sich eine Optimierung der Extraktion bei erhöhter Temperatur nicht einfach. Trotz Fixierung des Bags mit Draht an der Metallführung lösten sich einige der Membranbags bei höheren Extraktionstemperaturen von der Metallführung. Vermutlich bedingten die höheren Temperaturen ein Dehnen der LDPE-Folie, so dass die Membranfixierung nicht mehr gewährleistet war. Dieser Teil der Methodenentwicklung muss verbessert werden und erfordert weitere Optimierungsschritte sowohl hinsichtlich der verwendeten Hardware als auch der Entwicklung geeigneter Automatisierungssoftware (zeitsparende Verschachtelung der Extraktions- und Analyseschritte).

Optimierung der Extraktionsdauer, Präzision der Nicht-GGW-Methode

Abbildung 30 zeigt, dass auch nach 90 min Extraktion das Verteilungsgleichgewicht der β -Blocker noch nicht erreicht ist. Um die Methode aber für die Serienanalytik einsetzbar zu machen, wurde, wie auch schon in früheren Arbeiten [Schellin 2006], eine Extraktionszeit von 60 min als praktikabel festgelegt. Wird in einem strengen Zeitmanagement gearbeitet, d. h. werden exakt die Extraktionszeiten eingehalten, kann trotz noch nicht erfolgter Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes, eine gute Genauigkeit der Methode erreicht werden. Das zeigt sich in den Standardabweichungen der Gesamtmethode. Diese liegen bei 6,8 % (Propranolol, n = 6, 200 ng/L) und 17,4 % (Metoprolol, n = 6, 200 ng/L).

Analyt	NWG [ng/L]	pH-Wert	AF (bei 1 μg/L)	linearer Bereich [ng/L]	R ² des linearen Bereichs
Propranolol	< 25	10	54	25 - 1.000	0,9996
Metoprolol	< 25	10	10	25 - 1.000	0,9783
Carbamazepin		10	< 10		
Phenazon		10	< 10		
Ibuprofen	50	3	39	50 - 1.000	0,9929
Naproxen	50	3	20	50 - 1.000	0,9833
Diclofenac	50	3	29	50 - 1.000	0,9772
Indometacin	50	3	23	50 - 1.000	0,9415
Gemfibrozil	50	3	34	50 - 1.000	0,9733

Tabelle 9:Leistungsparameter der Mini-MASE



Abbildung 30: Zeitabhängigkeit der Anreicherung der ß-Blocker

Getrennt nach den Substanzgruppen ß-Blocker und Pharmakasäuren wird in Abbildung 31 und Abbildung 32 die gute Linearität der Kalibriergeraden für die Mini-MASE gekoppelt mit HPLC-MS/MS demonstriert, die über einen Konzentrationsbereich von zwei Größenordnungen verläuft. Die Nachweisgrenzen der Gesamtmethode liegen in Konzentrationsbereichen, die für eine Umweltbelastung von Wässern, speziell von Abwässern, realistisch sind.



Abbildung 31: Linearität der Anreicherung der Mini-MASE für die ß-Blocker Metoprolol und Propranolol



Abbildung 32: Linearität der Anreicherung der Mini-MASE für Pharmasäuren an den Beispielen Ibuprofen und Indometacin

4.1.3 Realproben

4.1.3.1 online-SPE-LC-MS/MS

Carbamazepin im Trinkwasser

Mit der Analyse von Trinkwasser aus Enkering (Bayern), Göhren (Rügen), Halle, Leipzig, München, Rüdersdorf und Schildow (bei Berlin) wurde der Einsatz der online-SPE-HPLC-MS/MS für wenig belastete Proben getestet. Es wurden je zweimal 50 mL und zweimal 100 mL Probe angereichert. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden jeweils separat ein bzw. zwei Liter desselben Wassers mit der Vergleichsmethode durch SPE und GC-EI-MS analysiert.

Die Wässer waren bis auf das Leipziger Trinkwasser alle frei von einer Belastung mit den untersuchten Stoffen. Im Leipziger Wasser wurde das Antiepileptikum Carbamazepin detektiert. Die Standardaddition ergab eine Konzentration von 35 ng/L. Die Vergleichsmethode mit offline SPE und GC-EI-MS ergab hierfür 32 ng/L. Das Auftreten von Carbamazepin in Trinkwasser wurde zuvor auch schon von Ternes [Ternes 2001] in vergleichbarer Größenordnung beobachtet. Abbildung 33 zeigt das Chromatogramm der online-SPE-HPLC-MS/MS für Carbamazepin.



Abbildung 33: Chromatogramm Leipziger Trinkwasser, MRM von Carbamazepin, n.n. ... nicht nachgewiesen, * [Ternes 2001]
Belastungen des Flüsse Ohre, Uchte und Jeetze (Sachsen-Anhalt)

Als weiteres Beispiel für die Verwendung der online-SPE-HPLC-MS/MS sollen die Ergebnisse aus den Oberflächengewässern Ohre, Uchte und Jeetze in Sachsen-Anhalt genannt werden. Auch hier wurde zur Konzentrationsbestimmung die Standardaddition verwendet und die Gehalte durch Extrapolation auf die x-Achse bestimmt. Als Beispiele sind in Abbildung 34 die Graphen der Standardaddition für Metoprolol und Carbamazepin in Probe 1 (Ohre, Kläranlageneinleitung bei Calvörde) dargestellt. Tabelle 10 zeigt die gesamten Messwerte der Zielanalyten, die mit der online-SPE-HPLC-MS/MS detektiert werden können.

Die im Vergleich zu anderen Oberflächengewässern sehr hohen Gehalte des Antiepileptikums Carbamazepin sind auf das im Einzugsgebiet liegende Sozialpsychiatrische Zentrum mit Fachkrankenhaus in Uchtspringe und Außenstellen in Salzwedel und Stendal zu erklären. Fenofibrat und Erythromycin wurden in keiner Probe detektiert. An den Proben der Uchte am und unterhalb des Kläranlagenzulaufes ist gut die Kläranlage als Eintragspfad der pharmazeutischen Reststoffe in das Gewässer und die darauf folgende Vermischung und damit eine Konzentrationsverminderung zu beobachten.



Abbildung 34: Standardaddition für Metoprolol und Carbamazepin für eine Probe der Ohre bei Calvörde an der Stelle der Kläranlageneinleitung

Fluss Ort	Meto- prolol	Propra- nolol	Phena- zon	Feno- fibrat	Carba- mazepin	Erythro- mycin	Coffein
Ohre Calvörde KA	620	60	70	n.n.	1 170	n.n.	3 540
Uchte Stendal KA	1 420	41	194	n.n.	2 420	n.n.	1 887
Uchte Stendal uh	550	48	186	n.n.	1 950	n.n.	1 816
Jeetze Salzwedel KA	620	30	60	n.n.	2 180	n.n.	960

 Tabelle 10:
 Messwerte der Oberflächengewässer in Sachsen-Anhalt, online-SPE-LC-MS/MS mit Standardaddition, Konzentrationen in [ng/L]

KA ... am Kläranlagenauslauf

uh ... unterhalb des KA

4.1.3.2 Mini-MASE

Grundwasserprobe aus Halle

Die Verwendung der Mini-MASE kann am Beispiel einer Grundwasserprobe gezeigt werden. Es konnte Carbamazepin als einziger der Zielanalyten der eingesetzten Mini-MASE in der Probe detektiert werden. Unter Verwendung der Standardaddition (Abbildung 35) ergab sich eine Konzentration von 58 ng/L. Die parallel dazu durchgeführte Vergleichsmethode mit offline SPE und GC-EI-MS ergab 21,5 ng/L. Der geringere Wert der offline-Methode ist auf die schlechtere Matrixabtrennung und Verluste während der zahlreichen Arbeitsschritte zurückzuführen. Tabelle 11 zeigt ausgewählte Messwerte der verschiedenen Methoden im Vergleich. Mit der Vergleichsmethode konnten weiterhin Galaxolid (21,4 ng/L), Tonalid (8,3 ng/L), t-NP und BPA in der Grundwasserprobe detektiert werden.



Abbildung 35: Grundwasserprobe Halle, Standardaddition

 Tabelle 11:
 Messwerte der Vergleichsmethode und der Mini-MASE, Konzentrationen in [ng/L]

	Carbamazepin	Coffein	Phenazon	
offline SPE	21.5	nn	nn	
GC-EI-MS	21,5	11.11.	11.11.	
Mini-MASE	58.4	nn	n n	
LC-MS/MS	50,7	11.11.	11.11.	

Laborvergleich

Mit einem Labor in Koblenz wurde ein Laborvergleich durchgeführt, um die Leistungsstärke der eingesetzten Methoden zu ermitteln. Das Vergleichslabor arbeitet mit offline-SPE und anschließender Analyse mittels LC-MS/MS. Es wurden unbehandelte und gespikte Proben untersucht. Exemplarisch soll für die Mini-MASE das Ergebnis einer ungespikten Oberflächenwasserprobe (Probe Leipzig II) dargestellt werden. Die Standardaddition (Abbildung 36) ergab eine Konzentration an Carbamazepin von 219 ng/L und liegt damit genau zwischen den Ergebnissen der beiden Vergleichsmethoden (offline SPE GC-EI-MS 266 ng/L, offline SPE LC-MS/MS 182 ng/L). An diesem Beispiel wird deutlich, dass die neue Technik der Mini-MASE in Kombination mit LC-MS/MS durchaus einsetzbar ist für die Analyse von PPCPs in belasteten Wasserproben. Es wird aber auch deutlich, dass die Ultraspurenanalytik stets

mit größeren Fehlern behaftet ist, als Analysen im ppb-Bereich. In Tabelle 12 sind die Ergebnisse für Carbamazepin der drei Methoden aufgelistet.



Abbildung 36: Oberflächenwasser der Probe Leipzig II, Laborvergleich, Standardaddition für Carbamazepin, Mini-MASE

Methode	Carbamazepin	
offline SPE GC-EI-MS	266	
offline SPE LC-MS/MS	182	
Mini-MASE LC-MS/MS	219	

Tabelle 12:	Messwerte der drei Methoden im	Vergleich	[ng/L]
		a	

Bei der Analyse dieser und weiterer Realproben konnte ein ubiquitäres Auftreten von Carbamazepin beobachtet werden. EE2 und Fenofibrat wurden in keiner Probe detektiert.

4.1.4 Photoionisation – ein neues Interface zur Atmosphärendruckionisation in der LC-MS

Die Sprayionisierungstechniken in der LC-MS wie ESI und APCI wurden entwickelt, um thermisch labile und stark polare Analyte analysieren zu können. Müssen wenig oder unpolare Verbindungen wie z. B. PAH nachgewiesen werden, so war das mit LC-MS kaum möglich, bis ein neues Interface zur Photoionisation von UV-sensitiven Analyten von Bruins et al. [Robb 2000] entwickelt wurde. In dieser Arbeit stand als Photoionisationsquelle eine Krypton–Lampe (10 eV) zur Verfügung. Von besonderem Interesse war der Leistungsvergleich dieser neuen Ionisierungstechnik mit ESI-MS, der häufig eingesetzten Methode zur Bestimmung für polare Pharmaka.

Die Untersuchungen wurden weiterhin durchgeführt, um Möglichkeiten zur Ionisierung von semi-polaren und unpolaren Analyten zu finden, die kaum mit Elektrospray ionisiert werden können. Aufgrund von Übersichtlichkeit und Datenmenge sind die Ergebnisse nur für ausgewählte Verbindungen wie Metoprolol, Propranolol, Erythromycin und Fenofibrat sowie für die urbanen Marker Carbamazepin, Coffein und Tonalid im positiven Photoionisationsmodus dargestellt.

4.1.4.1 Dopantauswahl

Das Dopant spielt als Ladungsüberträger in der Photoionisierung eine wesentliche Rolle. Die am weitesten verbreiteten Dopants sind Toluol und Aceton mit Ionisierungspotentialen von 8,8 eV und 9,7 eV sind sie leicht ionisierbar und können die Ladung weiter auf z. B. Wassermoleküle vom HPLC-Eluenten oder direkt auf die Analyte (z. B. PAHs) übertragen.

In Abbildung 37 ist der unterschiedliche unterstützende Einfluss von Aceton und Toluol als Dopant dargestellt. Mit Ausnahme von Tonalid verläuft die Ionisierung in Gegenwart von Aceton effektiver. Für die folgenden Untersuchungen wurde demzufolge Aceton als Dopant eingesetzt. Die Dopant-freie APPI zeigt bei den untersuchten Verbindungen keine bzw. sehr geringe Signale.

Die Auswahl des geeigneten Dopants ist stark von der Art des Zielanalyten abhängig. Bei der Testung der APPI-Quelle zur Ionisation unterschiedlicher Stoffgruppen zeigte sich bei Fluoranthen, Phenantren und Anthracen eine um 10 (Anthracen) bzw. 80 fache (Fluoranthen, Phenantren) Erhöhung der Peakfläche bei der Zugabe von Toluol als Dopant gegenüber Aceton. Insgesamt gehören die PAH mit ihren aromatischen konjugierten Systemen als chromophore Gruppen zu den sehr gut photoionisierbaren Verbindungen.



Abbildung 37: Vergleich von Aceton und Toluol als Dopant bei einem Fluss von 20 μL/min und bei 200 μL/min Fluss des HPLC-Laufmittels

4.1.4.2 Dopantmenge

Zur eingesetzten Menge des Dopants empfiehlt der Hersteller einen Fluss in der Größenordnung von 1/10 des Laufmittels. Das Dopant wird über eine separate Spritzenpumpe direkt in die Quelle zudotiert (siehe Abbildung 7). Untersucht wurde bei 200 μ L/min HPLC-Laufmittel der Dopantfluss von 10, 20, 30 und 50 μ l/min. Es konnte kein Einfluss der Dopantmenge beobachtet werden. Folglich wurde für weitere Versuche der empfohlene Wert von 1/10, also 20 μ L/min Dopantfluss bei 200 μ L/min Laufmittel, verwendet.

4.1.4.3 Laufmittelzusammensetzung

Die Laufmittelzusammensetzung zeigt unterschiedlichen Einfluss auf die Ionisierung (Abbildung 38). Während bei Fenofibrat ein deutlicher Intensitätsabfall bei steigendem Wasseranteil zu verzeichnen ist, zeigen Metoprolol und Propranolol kaum Unterschiede bei variierendem Wasseranteil des Laufmittels. Carbamazepin, Erythromycin und Tonalid zeigen bei erhöhtem Wasseranteil eine Intensitätserhöhung. Mit steigendem Wasseranteil verbessert sich die Trennung. Die Überlappung der einzelnen Peaks wird vermindert und die Suppression der Analyten untereinander verringert. In den weiteren Versuchen wurde die Laufmittelzusammensetzung MeOH/Wasser 80/20 v/v gewählt,

da hier die Verbindungen am besten getrennt wurden. Bei einem Verhältnis MeOH/Wasser 70/30 v/v zeigen vor allem Metoprolol und Propranolol aufgrund der größten Wechselwirkung mit der stationären Phase starkes Tailing. Die Elutionskraft ist bei 70 % MeOH zu gering. Erythromycin, das eine wesentlich schwächere Signalintensität als die restlichen Verbindungen zeigt, ist nur bei MeOH/Wasser 80/20 v/v mit ausreichender Signalstärke sichtbar, da es bei größerer Überlappung der Peaks durch Ionensuppression sonst nahezu vollständig verschwindet.

Auf die Verwendung eines Laufmittelgradienten, um noch bessere Trennung zu erreichen, wurde in Hinblick auf die Verwendung mit der online-SPE-HPLC-MS/MS verzichtet, die aufgrund der Automatisierung keine langen Äquilibrierungsschritte erlaubt. Weiterhin ist beim Einsatz eines Tandemmassenspektrometers die Auftrennung der einzelnen Peaks nicht in dem Maße entscheidend, wie bei einem Singlequadrupol. Durch die Verwendung von spezifischen Übergängen (MRMs) ist die Zuordnung der Signale eindeutig und die Matrixabtrennung und damit die Sensitivität des Detektors ausreichend auch bei einer teilweisen Überlappung der einzelnen Peaks.



Abbildung 38: Einfluss der Laufmittelzusammensetzung auf die Signalintensität. Untersucht wurden verschiedene Verhältnis von MeOH/Wasser v/v.

4.1.4.4 Matrixeinfluss

Wie bei der Elektrosprayionisation auch hat die umgebende Matrix erheblichen Einfluss auf die Photoionisation. Da die Matrix in der Regel gegenüber der zu detektierenden Verbindung in großem Überschuss vorhanden ist, muss sie vorher z. B. durch Extraktion abgetrennt werden oder mithilfe von Laufmittelgradienten zu einer anderen Zeit eluieren als der Analyt. Ist eine solche Abtrennung nicht möglich, wenn z. B. bei Screeningversuchen zeitaufwendige Extraktionen nicht durchführbar sind und die unbehandelte Probe direkt vermessen werden soll, muss die auftretende Ionensuppression beachtet werden.

Zur Erhebung quantitativer Daten sollte hier auf die Methode der Standardaddition zurückgegriffen werden oder wenn möglich, eine externe Kalibrierung in matrixähnlicher Lösung durchgeführt werden. Abbildung 39 und Abbildung 40 zeigen die Unterschiede, die bei der Injektion gleicher absoluter Mengen an Analyten aus den unterschiedlichen Lösungen resultieren. Es wird deutlich, dass bei der negativen APPI der Einfluss der vorhandenen Matrix noch größer ist als bei der positiven APPI. Vor allem das Flusswasser der Saale (UHH 14) beeinträchtigt die negative Ionisation der Analyten, was auf einen hohen Salzgehalt (ca. 500 mg/L, Leitfähigkeit 2000 μ S/cm, pH = 8,4) der Probe zurückgeführt werden könnte.



Abbildung 39: Matrixeinfluss auf die positive Photoionisation. Die verschiedenen Matrizes sind Methanol (MeOH), bidestilliertes Wasser (bidest. Wasser), Saalewasser an der Messstelle UHH14 (Saale UHH14) und verdünntes Modellabwasser (Abwasser 1:100). Die Werte sind normiert auf MeOH = 100 %. Das Modellabwasser wurde 1:100 mit Leitungswasser verdünnt.



Abbildung 40: Matrixeinfluss auf die negative Photoionisation. Die verschiedenen Matrizes sind Methanol (MeOH), bidestilliertes Wasser (bidest. Wasser), Saalewasser an der Messstelle UHH14 (Saale UHH14), verdünntes Modellabwasser (Abwasser 1:100) und eine Huminsäure in Wasser (10 mg/L). Die Werte sind normiert auf MeOH = 100 %. Das Modellabwasser wurde 1:100 mit Leitungswasser verdünnt.

4.1.4.5 Vergleich der Elektrosprayionisation und der Atmosphärendruckphotoionisation in der LC-MS/MS der relevanten Verbindungen

In Tabelle 13 ist ein Vergleich der Nachweisgrenzen für Elektrosprayionisation und Atmosphärendruckphotoionisation aufgezeigt. Es ist auffällig, dass bei einer Ausnahme (Fenofibrat), stets die ESI niedrigere Nachweisgrenzen aufweist als die APPI. Dem gegenüber steht die Möglichkeit der Ionisation von zwei Analyten (Coffein, Tonalid) mit APPI, die mit ESI nicht gelungen war. Damit wurde gezeigt, dass – für die betrachteten Analyten – die ESI als leistungsstarke Ionisation weiterhin zum Einsatz kommen sollte, bei der Analyse durch Elektrospray schwierig oder nicht zu ionisierender Verbindungen die APPI aber durchaus als praktikable Alternative verwendet werden kann. Die APPI bereichert damit die LC-MS/MS und trägt zu einer Erweiterung des Analytspektrums bei.

Analyt	APPI + [µg/L]	ESI + [µg/L]	
Coffein	1,2	nicht detektierbar	
Carbamazepin	0,7	0,5	
Erythromycin	10	0,25	
Fenofibrat	0,3	0,5	
Metoprolol	0,8	0,25	
Propranolol	1,1	0,25	
Tonalid	8,3	nicht detektierbar	

 Tabelle 13:
 Vergleich der unterschiedlichen Ionisierungsarten anhand der Nachweisgrenzen des Gerätes

4.2 Identifikation von Metaboliten/Umsetzungsprodukten der pharmazeutischen Reststoffe

Die meisten Untersuchungen zur Umweltbelastung durch pharmazeutische Reststoffe beziehen sich nur auf die Bestimmung der ursprünglichen Wirkstoffe, die als Medikamente verabreicht werden. Nach Verabreichung werden jedoch nur Teile der Wirkstoffe unverändert ausgeschieden. Wie pharmakokinetische Studien gezeigt haben, liegen die Ausscheidungsraten für die ausgewählten Wirkstoffe zwischen 1 % (Ibuprofen) und 70 % (Diclofenac) und sind stark wirkstoffabhängig. [LfU, 2004].

Die entstandenen Stoffwechselprodukte sind nicht immer vollständig bekannt und werden bisher wenig ins Umweltmonitoring einbezogen. Ausnahmen sind Clofibrinsäure, Fenofibrinsäure oder t-Nonylphenole, die alle bereits Metabolite der ursprünglich eingesetzten Wirkstoffe (Clofibrat, Fenofibrat) bzw. technischen Produkte (Nonylphenolpolyethoxylate) sind. Die Produkte, die aus mikrobiologischen und chemischen Abbauprozessen in der Umwelt und der Kläranlage gebildet werden, sind kaum bekannt, ebenso die daraus resultierenden ökologischen oder gesundheitlichen Risiken. Um die möglichen Metabolite in Umweltproben identifizieren zu können, müssen Struktur und Bildungskinetik bekannt sein. Aus diesem Grunde wurden in diese Arbeit Abbauversuche für ausgewählte Pharmaka mit einbezogen, um schließlich die relevanten Metabolite in die entwickelten Meßmethoden mit einzubeziehen. Carbamazepin, bekannt als ein sehr persistenter Wirkstoff gegen Epilepsie (siehe Abschnitt 2.2.1), der ubiquitär auftritt, Clarithromycin, ein Vertreter der makrozyklischen Antibiotika und Metoprolol, ein Stoff aus der Gruppe der β-Blocker, wurden näher untersucht.

In chemischen und biologischen Experimenten wurde versucht, Carbamazepin abzubauen und die Strukturen der Metabolite aufzuklären. Da sowohl oxidative als auch reduktive Abbauprozesse in Frage kommen, wurden beide Möglichkeiten des Abbaus untersucht. Die biologischen Abbauversuche wurden über einen Zeitraum von 18 Monaten unter aeroben und anaeroben Bedingungen durchgeführt (siehe Abschnitt 3.7).

Durch FENTON'S Reaktion kann in einer einfachen Form der oxidative Abbau von Carbamazepin in wässriger Lösung simuliert werden. Für Clarithromycin und Metoprolol wurde die durch Ozonolyse initiierte Metabolisierung betrachtet.

4.2.1 Carbamazepin – Produkte des biologischen Abbaus

Der Versuch des biologischen Abbaus von Carbamazepin erfolgt wie im Abschnitt 3.7 beschrieben mit zwei verschiedenen biologischen Grundstöcken. Weiterhin sollte der evtl. auftretende co-metabolische Abbau von Carbamazepin bei Phenolpräsenz in der Reaktionslösung betrachtet werden. In regelmäßigen Abständen wurden den Reaktoren wässrige Lösungen entnommen und deren Extrakte mittels GC-MS und LC-MS untersucht.

Als in der GC-MS deutlich sichtbarer Metabolit tritt eine Verbindung mit m/z 207 auf. Hierbei handelt es sich um einen Carbamazepin-Abkömmling mit einer Keto- oder Aldehydgruppe im Molekül, der im folgenden Kapitel unter 4.2.2 beschrieben wird. Identifiziert wurde weiterhin das als karzinogen geltende Acridin. Das gefundene Iminostilben kann sowohl durch Hydrolyse des Carbamazepins als auch durch dessen thermische Zersetzung im 280°C heißen Injektor des GC entstanden sein. Welcher Prozess zur Bildung des Iminostilbens hauptsächlich beiträgt, konnte mit diesen Untersuchungen nicht festgestellt werden. Wie die später durchgeführten LC-MS Untersuchungen zeigten, sind geringe Mengen Iminostilben als Verunreinigungen im Carbamazepin Standard enthalten (siehe Abschnitt 4.2.2.). Abbildung 41 zeigt ein Chromatogramm der gaschromatographischen Analyse des Essigsäureethylester-Extraktes von V1 (Schlamm aus der Saale, aerobe Bedingungen) nach rund zwölf Monaten mit den identifizierten Metaboliten.



Abbildung 41: Das Chromatogramm zeigt den GC-EI-MS Fullscan des Versuches V1 (Schlamm aus der Saale, aerobe Bedingungen) nach rund zwölf Monaten. Carbamazepin hat die RT 13,19 min. Identifizierte Abbauprodukte sind Acridin (RT 10,34 min), Iminostilben (RT 11,24 min) und der Carbamazepin-Abkömmling mit einer Carbonylgruppe und den typischen Massen m/z 207 und m/z 179 im Spektrum. Das Phthalat ist eine Verunreinigung, die z. B. bei der Extraktion eingetragen werden kann, wenn Kunststoffsepta verwendet werden.

Eine exakte quantitative Aussage zum Abbau des Carbamazepins unter den verschiedenen Bedingungen ist nicht möglich. Der Versuchsaufbau gewährleistete leider keine gleichmäßige Verdunstung aller Ansätze. Somit können nur allgemeine Aussagen getroffen werden. Zur Bestimmung von Abbauraten muss der Versuch mit einem verbesserten Aufbau wiederholt werden.

Generell lässt sich sagen, dass in allen Reaktoren eine Verringerung der Konzentration des Carbamazepins beobachtet werden konnte. Nach zehn Monaten Reaktionszeit war die verbliebene Menge an Carbamazepin im Ansatz mit den Binsen am geringsten und in den anaeroben Ansätzen am höchsten. Markante Unterschiede zwischen den Reaktoren mit gleichen Randbedingungen aber unterschiedlichen biologischen Grundstöcken waren nicht zu erkennen. Jedoch konnte beobachtet werden, dass die Zugabe von Phenol positiv auf die Abbaurate wirkt.

Anschließend wurde nach dem offensichtlich am häufigsten auftretenden Metaboliten mit m/z 207 und m/z 179 (Carbonylverbindung) und dem Acridin (m/z 179) in Realproben gesucht. Abbildung 42 zeigt beispielhaft die Ionenspuren für m/z 179 und m/z 207 extrahiert aus einem Fullscan des SPE-Extraktes einer Probe der Saale (Probenahmestelle: Peissnitzinsel) vom 01.08.2005. Die Retentionszeiten der gefundenen Verbindungen stimmen sehr gut mit denen des Extrakts von V1 (Schlamm aus der Saale, aerobe Bedingungen) überein. Die Peakflächen sind im hier dargestellten Chromatogramm einer Fullscan Analyse sehr gering und die ermittelten Konzentrationen liegen nah an der NWG der Methode. Da die Nachweisstärke von Fullscan-Analysen quantitativ gesehen gegenüber SIM-Analysen sehr schwach ist, wurden zusätzlich SIM-Analysen durchgeführt. Diese SIM-Messungen bestätigten das Auftreten beider Verbindungen eindeutig.

Die Identität von Acridin wurde außerdem durch Spektren- und Retentionszeitenvergleich mit einer Standardlösung bewiesen. Es muss davon ausgegangen werden, dass Carbamazepin nicht der einzige Ursprung für die Bildung von Acridin ist.



Abbildung 42: Das Chromatogramm zeigt die Ionenspuren m/z 179 und m/z 207 des Fullscan eines SPE-Extraktes der Saale (Peissnitzinsel) vom 01.08.2005. Bei der RT 10,34 min der Spur m/z 179 wird Acridin detektiert. Die Peaks bei je RT 11,71 min stehen für den Metaboliten mit Carbonylgruppe.

4.2.2 Carbamazepin – Produkte des chemisch oxidativen Abbaus (FENTON'S Reaktion)

Zur Identifikation möglicher Oxidationsprodukte wurde eine FENTON'S Reaktion durchgeführt (Abschnitt 3.8). Die Detektion wurde vorwiegend direkt aus der wässrigen Reaktionslösung mittels HPLC-ESI-MS vorgenommen. Zur Detektion weniger polarer Abbauprodukte wurde die GC-EI-MS nach Extraktion mit Essigester eingesetzt.

Das Fullscan-Chromatogramm der FENTON'S Reaktion nach 72 h zeigt eine Vielzahl von Abbauprodukten (Abbildung 43). Der überwiegende Teil eluiert früher als Carbamazepin (RT 9,60 min). Nachfolgend ist die Identifizierung einiger dieser Produkte beschrieben. Es konnten nicht allen Peaks Strukturen zugeordnet werden.



Abbildung 43: Das Chromatogramm zeigt den Fullscan der FENTON'S Reaktion von Carbamazepin nach 72 h.

Es war auffällig, dass ein Großteil der entstandenen Metabolite im Massenspektrum jeweils ein intensives Ion bei m/z 210 zeigte. Ob diese Ionen tatsächlich Quasimolekülionen darstellen oder nur Fragmentionen größerer Moleküle sind, kann mittels eines Precursor Ion Scans festgestellt werden. Abbildung 44 a) zeigt den TIC des Precursor Ion Scans zu m/z 210. In Abbildung 44 b) bis f) sind zu den fünf auftretenden Peaks die Spektren und Strukturvorschläge gegeben.



Abbildung 44: In Bild a) ist das TIC des Precursor Ion Scans von m/z 210 gezeigt. Bilder b) bis f) zeigen die erhaltenen Spektren und Strukturvorschläge.

Wie die Spektren des Precursor Ion Scans in Abbildung 44 zeigen, stellt das Ion bei m/z 210 nur in einem Fall (Komponente bei RT 8,81 min) ein Quasimolekülion dar. Bei

allen anderen Produkten handelt es sich beim Ion m/z 210 um ein Fragmention, das aus verschiedenen Vorläuferionen (m/z 253 und m/z 271) gebildet wird. Über die Positionen der Hydroxygruppen in den Molekülen kann allein anhand der Massenspektren keine Aussage gemacht werden. Dazu könnten nur NMR-Spektren der isolierten Produkte helfen, da von einen Gemisch strukturell sehr ähnlicher Produkte mit vergleichbaren Konzentrationen im ng-µg/mL Bereich nur schwer Konfigurationsdaten zu erhalten sind. Die Massedifferenz zwischen m/z 271 und m/z 253 (18 amu) weist auf die Abspaltung von Wasser aus dem Dihydroxid hin, die Massedifferenz von 61 amu zwischen m/z 271 und 210 entspricht einer Eliminierung von Wasser und NHCO (Abbildung 44 b)).

Die Massedifferenz von 43 amu zwischen m/z 253 und m/z 210 (Abbildung 44 c) bis e)) deutet auf die Abspaltung der Aminocarbonylgruppe (NHCO) hin, eine für Carbamazepin typische Fragmentierung. Carbamazepin mit einem Quasimolekülionpeak bei m/z 237 fragmentiert zu Iminostilben m/z 194 ebenfalls unter Eliminierung von NHCO (siehe Tabelle 21 im Anhang).

Das 10,11-Dihydroxy-10,11-dihydrocarbamazepin (Abbildung 44 b)) ist auch als Verunreinigung in der Ausgangschemikalie, aber in geringerem Umfang als hier detektiert.

Um die Struktur des Ions bei m/z 210 weiter aufzuklären, wurde eine Produktionenanalyse durchgeführt. Auf diese kann man schrittweise den massenspektrometrischen Zerfall eines Ions und damit seine Struktur untersuchen.

Das TIC des Product Ion Scans von m/z 210 zeigt fünf Peaks bei RT 6,77 min, 7,15 min, 7,82 min, 8,22 min und 8,79 min (Abbildung 45 links). Alle fünf Peaks zeigen dasselbe Massenspektrum mit einem Ion bei m/z 180,2 als dominantes Bruchstück (Abbildung 45). Die Verhältnisse der Ionenintensitäten von m/z 180 ([Methyl-Anilin+H]⁺) und dem Ausgangsion bei m/z 210 unterscheiden sich, d. h. bei der eingesetzten Stoßenergie (collision energy, CE) von 30 eV sind die Verbindungen unterschiedlich stabil. Die Massendifferenz 30 amu zwischen m/z 210 und m/z 180 (Abbildung 45) entspricht der CO-Abspaltung und Eliminierung von 2 H zum stabilen Acridin.

Damit deuten die Spektren auf die Anwesenheit von 10,11-Dihydro-10,11-Dihydroxycarbamazepin (RT 6,77 min), mindestens drei verschiedener Hydroxycarbamazepinen (RT 7,17 min, 7,86 min und 8,21 min) und Hydroxyiminostilben (RT 8,81 min) hin.



Abbildung 45: Die Abbildung zeigt den unterschiedlich starken Zerfall der Abbauprodukte mit m/z 210 im Molekül im Product Ion Scan m/z 210 bei einer CE von 30 eV. Es sind beispielhaft die Spektren der Peaks zu den Retentionszeiten 6,77 min, 7,15 min und 8,79 min angegeben.

Bedenklich ist das Auftreten des toxischen Intermediats Acridin. Dieses gilt als karzinogen und führt außerdem beim Menschen zu Hautreizungen. Im Chromatogramm der Probe nach 70 h Reaktionszeit (Abbildung 46) bei RT 15,52 min lässt sich klar ein Auftreten von Acridin beobachten. Die stetige Zunahme ist in Abbildung 48 deutlich. Weiterhin zeigt Abbildung 48 die Zunahme von zwei anderen identifizierten Metaboliten im Beobachtungszeitraum. Während ein hydroxyliertes Carbamazepin schon bei der ersten Messung nach 20 min zu erkennen ist (RT 7,04 min), wird Acridin (RT 15,52 min) erst nach 16 Stunden sichtbar, also in Mengen oberhalb der NWG (ca. 5 ng/mL) detektierbar. Abbildung 48 zeigt grafisch die Zu- und Abnahme der einzelnen Umsetzungsprodukte. Während Acridin und das Hydroxyiminostilben exponentiell zunehmen, ist der Zuwachs des hydroxylierten Carbamazepins nur logarithmisch, was darauf hinweist, dass das Hydroxyiminostilben aus dem hydroxylierten Carbamazepins entstehen könnte.

Ob das Hydroxyiminostilben ein Produkt der Oxidation von Carbamazepin oder der Oxidation des in der Ausgangschemikalie schon vorhandenen Iminostilbens ist, kann auf diesem Weg nicht geklärt werden. Hierzu sind Untersuchungen mit markierten Substanzen nötig.

Zur eindeutigen Zuordnung des toxischen Acridins wurde ein Spektren- und Retentionszeitenvergleich mit einer Standardlösung durchgeführt. Sowohl in der GC-MS als auch in der LC-MS/MS konnte es zweifelsfrei identifiziert werden. In der Ausgangsstandardlösung von Carbamazepin hingegen wurde kein Acridin gefunden, d. h. es ist im Gegensatz zu Iminostilben nicht oder nur in nicht detektierbaren Spuren in der Ausgangschemikalie vorhanden.



Zeit [min]

Abbildung 46: Massenspur m/z 180,2 aus dem TIC der Reaktion von Carbamazepin mit FENTON'S Reagenz nach 70 h Reaktionsdauer. Die identifizierten Peaks sind bei RT 7,04 min ein hydroxyliertes Carbamazepin, bei RT 8,75 min ein hydroxyliertes Iminostilben und bei RT 15,52 min Acridin.



Abbildung 47: Zunahme von drei identifizierten Metaboliten im zeitlichen Verlauf der Reaktion von Carbamazepin mit FENTON'S Reagenz. Aufgetragen sind die Peakflächen für m/z 180 zur RT 15,52 min (Acridin), m/z 253 zur RT 7,12 min (Hydroxycarbamazepin) und m/z 210 zur RT 8,60 min (Hydroxyiminostilben) gegen die Reaktionszeit.



Abbildung 48: Metabolitenentwicklung der Reaktion von Carbamazepin mit FENTON'S Reagenz im zeitlichen Verlauf. Dargestellt ist die Ionenspur m/z 180,2, die aus dem Fullscan entnommen wurde.

Das Abbauprodukt bei RT 4,44 min (Abbildung 43) zeigt als Quasimolekülion m/z 224. Diese Massenspur ist in Abbildung 49 links einzeln dargestellt. In der Abbildung 49 rechts ist das MS/MS-Spektrum von m/z 224 zu dieser Retentionszeit abgebildet. Die 28er Abspaltung weist auf einen CO-Austritt hin. Eine weitere Abspaltung führt zum Ion bei m/z 180 und ergibt wieder das stabile Acridin. Die frühe Retention weist auf hohe Polarität des Metaboliten hin. Abgeleitete Strukturvorschläge sind in Abbildung 49 rechts zu sehen.



Abbildung 49: Im Bild links ist die Ionenspur m/z 224 des TICs der Reaktion von Carbamazepin und FENTON'S Reagenz gezeigt. Das MS/MS Experiment zeigt das im Bild rechts abgebildete Spektrum zur RT 4,42 min.

Weiterhin soll ein Metabolit bei RT 8,26 min (Abbildung 43) betrachtet werden. Abbildung 50 links zeigt die Ionenspur m/z 226, die dominant im Spektrum des TIC zu der angegeben Retentionszeit auftritt. In Abbildung 50 rechts ist das Produktionenspektrum von m/z 226 zur angegeben Retentionszeit gezeigt.

Dieser Metabolit könnte als Vorstufe für den Metaboliten aus Abbildung 49 gelten, da das hier vorhandene Hydroxid weiter zum Aldehyd bzw. Keton oxidiert werden kann. Die Abspaltung einer OH-Gruppierung ist an der Massedifferenz von 17 amu (m/z 226 zu m/z 209) zu erkennen. Eine CO-Eliminierung ist ein Hinweis für die Anwesenheit einer phenolischen Hydroxygruppe (m/z 226 zu m/z 198). Das Ion bei m/z 196 wird vermutlich durch Abspaltung von CH-OH gebildet (Abbildung 50 rechts). Auch bei diesem Metabolit ist die Acridin-Struktur mit dem Ion m/z 180 im Produktionenspektrum enthalten.



Abbildung 50: Im Bild links ist die Ionenspur m/z 226 des TICs der Reaktion von Carbamazepin und FENTON'S Reagenz gezeigt. Das MS/MS-Experiment zeigt das im Bild rechts abgebildete Spektrum zur RT 8,26 min.

Ein weiterer Metabolit konnte mittels GC-MS detektiert werden (Abbildung 51). Das Massenspektrum zeigt die Ionen m/z 207 und m/z 179.

Die Massendifferenz von 28 amu steht für eine CO-Abspaltung zum stabilen Acridin. Der Quasimolekülionpeak weist auf einen Metaboliten mit dem Molekulargewicht von 207 hin (Abbildung 52).



Abbildung 51: Fullscan-Chromatogramm (GC-MS) der Reaktion von Carbamazepin mit FENTON'S Reagenz. Bei RT 11,71 min handelt es sich um das Abbauprodukt mit einer Carbonylgruppe. Die Phthalate sind Verunreinigungen, die durch die LLE eingetragen werden.



Abbildung 52: Massenspektrum eines durch GC-MS detektierten Abbauproduktes der Reaktion von Carbamazepin und FENTON'S Reagenz

Hierbei kommen nur Carbonylverbindungen, die vermutlich Produkte der fortgeschrittenen Oxidation der zuvor gebildeten Hydroxide sind, in Frage. In Abbildung 53 sind Acridin-9-carboxaldehyd und zwei mögliche Iminochinone dargestellt.



Abbildung 53: Strukturvorschläge zu einem weiteren Metaboliten

Um die vorgeschlagenen Metabolitstrukturen zu bestätigen wurde versucht, die Moleküle mit vermuteten Ketogruppen geeignet zu derivatisieren. So wurde der Essigesterextrakt der Reaktionslösung mit Dinitrophenylhydrazon (DNPH) umgesetzt. Aldehyde und Ketone bilden verschieden farbige Hydrazone, die ausgefällt und abgetrennt werden können. Die Reaktionsgleichung ist in Abbildung 54 am Beispiel eines Iminochinons dargestellt. Der orange bis rote Niederschlag wurde abfiltriert und aus Ethanol umkristallisiert. Es waren orange Nadeln und dunkelrote Plättchen entstanden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich dabei auch um das Ausgangsprodukt DNPH handelt.



Abbildung 54: Die Reaktion zeigt die Hydrazonbildung mit DNPH zum Nachweis von Carbonylverbindungen am Beispiel eines Iminochinons.

Im Chromatogramm des roten Niederschlages gelöst in MeOH ist ein Peak sichtbar. Die LC-MS/MS-Analyse zeigt mit m/z 388 das [M+H]⁺ des erwarteten Hydrazons (Abbildung 55). Das MS/MS-Experiment bestätigt durch den Abgang von 182 amu den Austritt der Dinitrophenyl-N-Gruppe.



Abbildung 55: Produktionenspektrum des DNP-Derivates eines Abbauproduktes der Reaktion von Carbamazepin mit FENTON'S Reagenz, das eine Carbonylgruppe enthält

Die Bestätigung der oben genannten Ergebnisse mittels ¹H-NMR konnte nicht durchgeführt werden, da die gebildete Menge Hydrazon nicht ausreichend für eine NMR-Messung war.

4.2.3 Ozonierung

Die Aufbereitung von Wasser zur Entfernung von Mikroverunreinigungen durch Ozonierung ist eine Technik, die in der Trinkwasseraufbereitung bereits etabliert ist und zunehmend in der Abwasseraufbereitung an Bedeutung gewinnt. Die Verteilung des Ozons im belasteten Abwasser geschieht meist durch Begasung. Die Ozonierung ist teurer aber umweltfreundlicher als die in der Wasseraufbereitung weit verbreitet eingesetzte Chlorung. Die Mikroverunreinigungen werden durch Ozon oxidiert und sehr rasch abgebaut. Mit dieser effektiven Methode wurden bereits gute Erfolge bei der Entfernung von recht persistenten Verbindungen wie z. B. Carbamazepin aus Abwasser erreicht [Ternes 2004]. Aus diesem Grunde wurde die Ozonierung auch für den Abbau eines Antibiotikums, Clarithromycin, sowie eines β-Blockers, Metoprolol, getestet.

4.2.3.1 Ozonierung von Clarithromycin

Clarithromycin wurde als Beispielsubstanz für die Klasse der makrozyklischen Antibiotika ausgewählt. Weitere Verbindungen dieser Klasse sind Roxithromycin und Erythromycin. Ein typisches Strukturmerkmal dieser Verbindungen ist die Dimethylaminogruppe an einem der Kohlenhydratreste (Abbildung 56, blau gekennzeichnet). An dieser Stelle greift bevorzugt das Ozon an, wie aus Arbeiten zur Oxidation von tertiären Aminen bekannt ist.



Abbildung 56: Strukturformeln der makrozyklischen Antibiotika Erythromycin, Clarithromycin und Roxithromycin, variierende Strukturmerkmale sind grün markiert, die Dimethylaminogruppe (Stelle des Ozonangriffs) ist blau markiert

Untersuchungen zur Ozonierung tertiärer Amine von Muñoz und von Sonntag [Muñoz 2000; Muñoz 2001] stellten fest, dass sich im ersten Schritt Ozon an das freie Elektronenpaar des Stickstoffes addiert und dabei ein Ammoniumozonid-Zwitterion (4.2) bildet (Abbildung 57). Dieses Zwitterion kann auf zwei verschiedenen Wegen weiter reagieren: Entweder es tritt O₂ aus und das N-oxid wird gebildet, (4.3) oder das Zwitterion dissoziiert in das Ozonidradikalanion und das Aminradikalkation (4.4). Aufgrund von Spinerhaltungsregeln [Muñoz, 2001] tritt der Sauerstoff als Singulettsauerstoff (${}^{1}O_{2}\Delta_{g}$) aus. Im vorliegenden Modellsystem dominiert die Reaktion 2 (90 %), da das Ozonidradikalanion nur bei hohem pH stabil ist. Bei pH-Werten nahe 7 wird es schnell durch Wasser protoniert und zerfällt dann weiter in O₂ und ·OH (4.5). Das Aminradikalkation deprotoniert am α -Kohlenstoff (4.6). An das daraus resultierende Radikal wird O₂ addiert (4.7). Aus dem entstandenen Peroxylradikal wird Superoxid

 (O_2^{-}) eliminiert (4.8). Die Hydrolyse des Iminiumions ergibt das sekundäre Amin und ein Aldehyd (4.9). In Abbildung 57 sind die beschriebenen Reaktionsschritte dargestellt.



Abbildung 57: Reaktionsschema zum Angriff von Ozon an ein tertiäres Amin

Clarithromycin – Produkte der Ozonierung

In der Arbeit von Lange et al. [Lange 2006] wurde die pH-Abhängigkeit der Reaktion getestet, die Kinetik bestimmt, Metaboliten identifiziert und diese auf ihre Toxizität untersucht. An dieser Stelle soll ausschließlich auf die Identifizierung der Metaboliten eingegangen werden.

Wie oben beschrieben, sind die zu erwartenden Metaboliten das Clarithromycin-N-Oxid und das demethylierte Clarithromycin (Abbildung 58).



Abbildung 58: Strukturformeln der zu erwartenden Hauptmetabolite Clarithromycin-N-oxid und das demethylierte Clarithromycin

Die Identifizierung wurde mit APPI (Dopant: Toluol) und ESI jeweils im positiven Mode durchgeführt. Es konnten identische Ergebnisse erzielt werden. Dargestellt sind die Ergebnisse der Atmosphärendruck-Photoionisation.

Das Spektrum von Clarithromycin (MW: 747) zeigt deutlich ein Pseudomolekülion $[M + H]^+$ bei m/z = 748. Ein Fragment ist bei m/z = 590 zu finden. Der Austritt von 158 weist auf die Abspaltung von Desosamin hin. Dieses selbst ist als m/z = 158 im Spektrum zu sehen. Weiterhin ist das Natriumaddukt $[M + 23]^+$ bei m/z = 770 erkennbar. Das Spektrum ist in Abbildung 59 gezeigt.



Abbildung 59: Spektrum des Clarithromycins

Die Umsetzung des Clarithromycins wurde bei unterschiedlichen Ozonkonzentrationen verfolgt. Probe B wurde mit einem moderaten Anteil an Ozon umgesetzt (20 mL 43 mg/L Clarithromycin in Wasser + 2,5 mL O₃-gesättigtes Wasser) während zu Probe C ein deutlicher Überschuss an Ozon gegeben wurde (20 mL 43 mg/L Clarithromycin in Wasser + 6 mL O₃-gesättigtes Wasser).

Abbildung 60 zeigt ein Fullscan Spektrum der Probe B. Die Trennung ist nicht gut, trotzdem lassen sich die beiden Metabolite anhand ihrer unterschiedlichen Pseudomolekülionen identifizieren. Nicht umgesetztes Clarithromycin bildet den Hauptanteil des LC-Peaks mit einer Retentionszeit von RT 2,27 min. Die kleine Schulter bei RT 2,01 min repräsentiert das Clarithromycin-N-oxid (Spektrum siehe Abbildung 60 rechts). Das dazugehörige Pseudomolekülion $[M + H]^+$ ist bei m/z = 764 zu finden und das Hauptfragment (m/z = 606) entsteht durch den Austritt von Desosamin. Das Clarithromycin-N-oxid eluiert etwas früher als das Clarithromycin. Das demethylierte Clarithromycin eluiert zeitgleich mit dem Clarithromycin und ist ob des großen Überschusses an Clarithromycin nicht einzeln darstellbar. Sein Pseudomolekülion $[M + H]^+$ ist bei m/z = 734 sichtbar und das Hauptfragment (m/z = 576) entsteht, wie auch bei Clarithromycin und dem Clarithromycin-N-oxid, durch den Austritt von Desosamin. MS/MS-Experimente haben das Auftreten und die Fragmentierung der beiden Metaboliten bestätigt. Ein Spektrum des demethylierten Clarithromycins ist in Abbildung 61 rechts zu sehen.

Da das Clarithromycin-N-oxid gegenüber dem demethylierten Clarithromycin kaum mit Ozon weiter reagiert, ist es in größerem Maße in der Mischung vorhanden. Die Menge des umgesetzten Clarithromycins ist gering.



Abbildung 60: Gezeigt ist im Bild links ein Fullscan der Probe B (moderate Menge Ozon). Rechts ist das Spektrum des Metaboliten bei RT 2,01 min (Clarithromycin-N-oxid) abgebildet. Der dominante Peak bei RT 2,27 min ist Clarithromycin. Unter dem Clarithromycinsignal liegt außerdem das demethylierte Clarithromycin (734 → 576).

Betrachtet man die Probe C, bei der Ozon im Überschuss im System vorliegt, fällt zuerst auf, dass kaum noch Clarithromycin zu finden ist. Auch beim Fullscan dieser Probe ist die Trennung nicht optimal (Abbildung 61 links), das Massenspektrum zeigt vier Verbindungen: einen kleinen Rest Clarithromycin (m/z = 748 \rightarrow m/z = 590), die schon in Probe B nachgewiesenen Metaboliten Clarithromycin-N-oxid (m/z = 764 \rightarrow m/z = 606) und demethyliertes Clarithromycin (m/z = 734 \rightarrow m/z = 576) und eine vierte Verbindung mit dem Pseudomolekülion [M + H]⁺ bei m/z = 706, also einer Molekülmasse von 705. Das größte Fragment entsteht wie bei den drei anderen Verbindungen ebenfalls durch den Austritt des Desosamins zu m/z = 548. Diese Verbindung konnte jedoch noch nicht aufgeklärt werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um ein Nebenprodukt oder eine Verunreinigung aus der Clarithromycin-Herstellung handelt, die nicht sichtbar war, solange das Clarithromycin selbst und der Hauptmetabolit Clarithromycin-N-oxid in großem Überschuss vorlagen.

Die Fragmentierungswege der einzelnen Verbindungen wurden in Product Ion Scans geklärt. Ihre Zuordnung ist in Abbildung 61 rechts im Spektrum durch Pfeile vorgenommen worden.

Das demethylierte Clarithromycin selbst reagiert mit Ozon weiter und ist deshalb auch in Probe C in einer kleineren Menge als das Clarithromycin-N-oxid zu finden. Das Clarithromycin konnte bei Ozonüberschuss fast vollständig umgesetzt werden. Für die gesamte Bilanzierung siehe [Lange 2006].



Abbildung 61: Links ist ein Fullscan der Probe C (Ozonüberschuss) gezeigt. Rechts im Bild ist ein Spektrum bei RT 1,66 min aufgenommen. Die Verbindungen sind aufgrund schlechter chromatographischer Trennung überlagert. Im Spektrum sind zu erkennen: Clarithromycin-N-oxid, das demethyliertes Clarithromycin und eine unbekannte Verbindung. Es ist kaum noch Clarithromycin vorhanden.

Wegen der strukturellen Gemeinsamkeiten können die für Clarithromycin gewonnenen Ergebnisse auch auf die Antibiotika Roxithromycin und Erythromycin übertragen werden. Als ein weiteres Beispiel für die Eignung der Ozonierung für den Abbau der hier untersuchten pharmazeutischen Reststoffe diente der β-Blocker Metoprolol.

4.2.3.2 Ozonierung von Metoprolol

In saurer und neutraler Lösung wird Ozon hauptsächlich am aromatischen Ring addiert. Arbeitet man jedoch im neutralem pH-Bereich, ist die Aminogruppe nahezu vollständig protoniert (99,9 %) und reagiert kaum mit Ozon. Im basischen Medium, wenn der Stickstoff als freies Amin vorliegt, reagiert er sehr schnell mit Ozon. Der Ozonangriff wird bei pH-Werten > 7 damit hauptsächlich am Stickstoff stattfinden.

Reaktionen bei pH 7

Das elektrophile Ozon addiert an den Ring in ortho- oder para-Stellung zur elektronenliefernden Etherfunktion (4.10) (Abbildung 62). Daraus entsteht das CRIEGEE-Ozonid (1,2,3-Trioxolan) [Criegee 1975] (4.11). Durch dessen Hydrolyse entstehen im Molekül eine Aldehydfunktion und ein α -Hydroxyhydroperoxid (4.12). Wird hieraus H₂O₂ eliminiert, so wird ein Muconaldehydderivat gebildet (4.13). Aldehyde zeigen die Tendenz, in wässriger Lösung hydriert vorzuliegen.



Abbildung 62: Angriff des Ozons am Ring des Metoprolols bei pH = 7 unter Bildung eines Muconaldehyd Derivats

Wenn nach der Ozonaddition (4.10) anstatt des Ringschlusses ein O_2 abgespalten wird (4.14), kann es zur Bildung eines Cyclohexadienons kommen (4.15). Aus diesem entsteht durch Neuordnung ein Phenol (4.16). Auch die Bildung eines Epoxids wäre möglich (4.17). Diese Reaktionen sind in Abbildung 63 gezeigt.



Abbildung 63: Angriff des Ozons am Ring des Metoprolols bei pH = 7 unter Bildung eines Phenols

Weiterhin kann das Intermediat nach der Ozonaddition (4.10) in ein Ozonidradikalanion und ein aromatisches Etherradikalkation (4.18) zerfallen (Abbildung 64). Bei der Reaktion mit Wasser bildet sich aus dem letzteren ein Hemiazetal (4.19). Dieses zerfällt in ein Amin und ein vom Cyclohexanon abgeleitetes Radikal (4.20). Durch die Reaktion mit Sauerstoff kann als eines der Produkte das entsprechende ortho-Chinon entstehen (4.21). Durch die Bildung des Ozonidradikalanions wird die Bildung von ·OH ermöglicht (4.22).



Abbildung 64: Zerfall des durch Ozonaddition entstandenen Intermediates in ein Amin und ein vom Cyclohexanon abgeleitetes Radikal

$$O_3^{-} + H_2O \rightarrow OH + O_2 + OH^{-}$$

$$(4.22)$$

Metoprolol – Produkte der Ozonierung

Metoprolol wurde eingesetzt als Beispielsubstanz für die Klasse der β-Blocker. Verwandte Verbindungen sind Atenolol, Propranolol und Sotalol. Die vier Verbindungen haben als gemeinsame Struktureinheit eine CH(OH)-CH₂-NH-(iso-C₃H₇)-Gruppe die teilweise über eine Ätherbrücke am aromatischen Ring gebunden ist (Abbildung 65). Der Phenylrest gilt als Angriffspunkt für das Ozon. Die für Metoprolol gewonnenen Ergebnisse der Ozonierung können vermutlich auch auf die verwandten β-Blocker Atenolol, Propranolol und Sotalol übertragen werden.



Abbildung 65: Strukturformeln der ß-Blocker

Die Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion zu ermitteln und sich bildende Metabolite zu identifizieren. Im Folgenden wird nur auf die Identifizierung der Abbauprodukte eingegangen. Eine Zusammenfassung der gesamten Ergebnisse ist zur Veröffentlichung in Vorbereitung.

Wie oben dargestellt, greift das Ozon je nach pH-Wert der Lösung an unterschiedlichen Stellen im Molekül an. Im Klärprozess liegt der pH-Wert des Abwassers in der Regel im Bereich von 6 – 8, da außerhalb dieses Bereiches die meisten Mikroorganismen der biologischen Klärstufe geschädigt werden [Wasserwissen]. Damit sind hier für die praktische Anwendung nur die Aussagen für den Angriff am Ring von Bedeutung. Metoprolol zeigt im Spektrum den Quasimolekülionenpeak $[M + H]^+$ bei m/z = 268 und ein Fragment bei m/z = 116. Die Fragmentierung ist in Abbildung 66 gezeigt.



Abbildung 66: Spektrum von Metoprolol

Im Chromatogramm der Probe 6 (mmol O₃/mmol Metoprolol = 1) sind neben nicht umgesetztem Metoprolol (RT 2,81 min) fünf weitere Peaks zu finden, die früher eluieren und dementsprechend stärker polar sind als Metoprolol (Abbildung 67). Bei RT 1,52 min eluiert der vom Metoprolol abgeleitete Muconaldehyd ($[M + H]^+$ bei m/z = 300). Das dazu gehörige Muconaldehyd-Monohydrat eluiert bei RT 0,60 min ($[M + H]^+$ bei m/z = 318). Mit $[M + H]^+$ bei m/z = 134 erscheint bei RT 0,87 min das Amin, welches in Reaktion 4.20 (Abbildung 64) entsteht. Die Verbindung, die bei RT 1,26 min mit $[M + H]^+$ bei m/z = 274 eluiert und in nicht zu vernachlässigendem Umfang auftritt, ist bislang nicht identifiziert. Precursor Ion Scans haben ergeben, dass es sich bei m/z = 274 eindeutig um das Quasimolekülion handelt. Die Product Ion Scans der oben genannten Verbindungen und die zugeordneten Strukturen sind in Abbildung 68 dargestellt.



Abbildung 67: Ionenspuren der einzelnen Metabolite aus einer Fullscanprobe von ozonisiertem Metoprolol

In Abbildung 67 rechts ist die Massenspur m/z 284 aufgezeigt. Die Intensitäten dieser beiden Peaks sind um zwei Größenordnungen niedriger als die der anderen Metaboliten. Hierbei handelt es sich vermutlich einmal um das nur kurzlebige Phenol des Metoprolols. Der andere Peak könnte aus einem weiteren Phenolderivat oder dem entsprechenden Epoxid herrühren (Reaktion 4.16 und 4.17, Abbildung 63). Die Product Ion Scans sind ähnlich, aber nicht identisch (Abbildung 69).



Abbildung 68: Product Ion Scans der Metaboliten, die bei der Ozonierung von Metoprolol entstehen: a) Muconaldehyd des Metoprolols, b) Monohydrat des Muconaldehyds, c) nicht identifizierter Metabolit, d) Amin



Abbildung 69: Zwei Product Ion Scans der Metaboliten mit m/z = 284. Die Retentionszeiten sind RT 1,36 min und RT 2,16 min.

Die Existenz des Muconaldehyds wurde durch Derivatisierung bestätigt. Die ozonisierte Probe wurde mit DNPH umgesetzt. Das resultierende Derivat hat das Molekülgewicht 659, wenn beide Ketogruppen umgesetzt werden (Abbildung 70).



Abbildung 70: Umsetzung des entstandenen Muconaldehyds von Metoprolol mit DNPH

Im Chromatogramm der derivatisierten Probe hat der Peak bei RT 10,51 min mit m/z = 658 im ESI neg. das entsprechende zu erwartende Quasimolekülion [M - H]⁻. Chromatogramm und Spektrum sind in Abbildung 71 gezeigt. Das Fragment m/z = 182 ist typisch für DNP-Derivate. Es stellt die Dinitrophenylamin-Gruppe dar.



Abbildung 71: Fullscan des DNP-Derivates des Muconaldehyds. Im Bild rechts ist das erwartete Spektrum bei RT 10,51 min aufgeführt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Analyse anthropogener Umweltschadstoffe, den PPCPs (*engl.* pharmaceuticals and personal care products, Arzneimittel und Körperpflegeprodukte) aus wässrigen Proben. Hierbei kommen lösemittelreduzierte Probenvorbereitungstechniken zum Einsatz, die das Potenzial haben in der "Green Chemistry" zunehmend herkömmliche, weniger umweltfreundliche Methoden zu ersetzen.

Im Rahmen der Dissertation wurden PPCPs verschiedenster Stoffklassen betrachtet, die in ihren chemischen Eigenschaften stark variieren (organische Säuren, basische und stickstoffhaltige Verbindungen). Es wurden u. a. Lipidsenker, Antiphlogistika, ß-Blocker, ein Antiepileptikum, ein synthetisches Östrogen und synthetische Moschusduftstoffe untersucht. Zur Abschätzung der Leistungsfähigkeit der neuen Probenvorbereitungstechniken wurde eine Vergleichsmethode basierend auf der herkömmlichen Verfahrensweise mit zeit- und kostenaufwändiger SPE und anschließender GC-MS bzw. Derivatisierung und GC-MS erarbeitet. Diese Methode ermöglicht die Detektion der Zielanalyte im unteren ng/L Bereich bzw. für die derivatisierten Säuren unter Verwendung der GC-MS mit negativer chemischer Ionisierung auch < 1 ng/L.

Der erste Teil der Arbeit beschreibt die Entwicklung zweier Verfahren zur schnellen und kostengünstigen, vor allem aber umweltbewussten, da lösemittelreduzierten Aufkonzentration der Zielanalyten zur späteren Detektion in Kopplung mit der LC-MS/MS. Die sog. online-SPE-HPLC-MS/MS ist ein über ein Zwei-Wege-Ventil teilweise automatisiertes Verfahren, bei dem durch den Rückhalt der Analyten auf einem in einem Loop angebrachten Festphasenmaterial und anschließender Elution mit HPLC-Laufmittel die Analyten in das MS/MS transferiert werden. Da es sich um eine Absolutmethode handelt, können bei geringen Probemengen (20 - 100 mL) Nachweisgrenzen im unteren ng/L-Bereich erzielt werden. Die stark verringerte Analysenzeit (< 1 h) gegenüber der SPE erlaubt die Absicherung der Ergebnisse durch den Einsatz der Methode der Standardaddition. Dieses Verfahren wurde hauptsächlich zur Detektion nicht GC-gängiger Verbindungen wie den ß-Blockern Metoprolol und Propranolol eingesetzt. Weiterhin wurde im Zusammenhang mit der online-SPE-HPLC-MS/MS der Einsatz der Atmosphärendruckphotoionisierung (APPI) als neue Ionisierungstechnik in
der LC-MS/MS getestet. Dabei wurde festgestellt, dass diese im Vergleich mit der Elektrosprayionisation (ESI) eine Alternative darstellt, wenn weniger polare Analyten bestimmt werden sollen. Demnach konnten zwei Verbindungen mit APPI detektiert werden (Coffein, Tonalid), die mit ESI nicht detektierbar waren. Die Nachweisgrenzen der ESI sind geringfügig besser als die der APPI.

Das zweite Verfahren ist eine an die LC-MS/MS angepasste Variante der von Hauser [Hauser 2002] zuerst verwendeten MASE (*engl.* membrane assisted solvent extraction, membranunterstützte Lösemittelextraktion). Hierbei dient als Grenzschicht zwischen wässriger Probenphase und Lösemittelphase eine LDPE-Membran (LDPE – Low Density Polyethylene). Diese Extraktionsprozesse zeigen eine starke pH-Abhängigkeit, sodass nicht das gesamte Analytspektrum mit einer Analyse bestimmt werden kann. Die Nachweisgrenzen liegen über denen der Vergleichsmethode, wobei eine gute Matrixabtrennung erzielt werden kann. Die kurze Dauer und teilweise Automatisierung erlaubt den Einsatz der Standardaddition zur Absicherung der Analyseergebnisse. Unter der Verwendung eines Multipurpose Samplers (MPS 2, Fa. Gerstel) könnte dieses Verfahren auch vollständig automatisiert werden, wie es für die Kombination mit GC-MS schon gelungen ist.

Die Analyse von Realproben zeigt die Anwendbarkeit der neuen Probenvorbereitungstechniken in der Praxis. Es ist ein ubiquitäres Auftreten von Carbamazepin festzustellen. Der Abwasserpfad kann als Haupteintragsweg für PPCPs bezeichnet werden.

Der zweite Teil der Arbeit zeigt verschiedene Möglichkeiten, biologische und chemische Abbauprozesse in der Natur und der Klärwerkspassage zu simulieren, um Abbauprodukte identifizieren zu können und gegebenenfalls auf veränderte Toxizität zu überprüfen. Es konnten Metabolite der Arzneimittel Carbamazepin, Clarithromycin und Metoprolol massenspektrometrisch identifiziert werden. Für zweifelsfreie Ergebnisse sollten sich hier Versuche mit markierten Verbindungen oder synthetisierten Standards anschließen.

Durch die Aufklärung einiger Metaboliten ausgewählter Arzneimittel kann für zukünftige Analysen das Analytspektrum um potentiell gefährliche Produkte erweitert werden und damit die Problematik der Arzneimittelreststoffe umfassender betrachtet werden.

6 Literaturverzeichnis

- Apel P, Koschorreck J (2005) EU-Leitfaden für die Umweltbewertung von Humanarzneimitteln, UBA Text, 29/05
- Applied Biosystems, User Manual API2000
- ARGE Elbe (2003) Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe, Arzneistoffe in Elbe und Saale, http://www.arge-elbe.de/wge/Download/Berichte/03Arzn.pdf
- Audunsson G (1986) Aqueous/aqueous extraction by means of a liquid membrane for sample cleanup and preconcentration of amines in a flow system. Analytical Chemistry 58:2714
- Balk F, Ford RA (1999) Environmental risk assessment for the polycyclic musks AHTN and HHCB in the EU: I. Fate and exposure assessment. Toxicology Letters 111:57-79
- Belardi RP, Pawliszyn JB (1989) Application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. Water pollution research journal of Canada 24
- BLAC (2003) Arzneimittel in der Umwelt Auswertung der Untersuchungsergebnisse, BLAC, Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit
- Bos SJ, Leeuwen SMv, Karst U (2006) From fundamentals to applications: recent developments in atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry 384:85–99
- Braun P (2006) Entwicklung und Erprobung spurenanalytischer Methoden zum Nachweis von ausgewählten endokrin aktiven Verbindungen und pharmazeutischen Reststoffen in Wasserproben. Dissertation. Universität Leipzig.
- Cleuvers M (2002) Aquatische Ökotoxikologie ausgewählter Arzneimittel Algentest und akuter Daphnientest. UWSF – Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie 14:85-89
- Cleuvers M (2005) Initial risk assessment for three ß-blockers found in the aquatic environment. Chemosphere 59:199
- Criegee R (1975) Mechanismus der Ozonolyse. Angewandte Chemie 21:765-771
- Einsle T, Paschke H, Bruns K, Schrader S, Popp P, Möder M (2006) Membraneassisted liquid–liquid extraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry for determination of selected polycyclic musk compounds and drugs in water samples. Journal of Chromatography A 1124:196-204
- Eisert R, Levsen K (1995) Determination of Pesticides in Aqueous Samples by Solid-Phase Microextraction In-Line Coupled to Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 6:1119-1130
- Fiedler GM, Ceglarek U, Lembcke J, Baumann S, Leichtle A, Thiery A (2004) Anwendungsgebiete der Massenspektrometrie in der Klinischen Chemie und Laboratoriumsmedizin. Journal of Laboratory Medicine 28:185-194

- Hauser B, Popp P (2001) Membrane-assisted solvent extraction of organochlorine compounds in combination with large volume injection-GC/ECD. Journal of Separation Science 24:551
- Hauser B, Popp P, Kleine-Benne E (2002) Membrane-assisted solvent extraction of triazines and other semi-volatile contaminants directly coupled to large-volume injection–gas chromatography–mass spectrometric detection. Journal of Chromatography A 963:27-36
- Heberer T (2002) Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. Toxicology Letters 131:5-17
- Hesse M, Meier H, Zeeh B (2005) Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie, Thieme
- Hirsch R, Ternes T, Haberer K, Kratz K-L (1999) Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. The Science of The Total Environment 225:109
- Huber MM, Canonica S, Park GY, Von Gunten U (2003) Oxidation of pharmaceuticals during ozonation and advanced oxidation processes. Environmental Science and Technology 37:1016
- Huber MM, Ternes TA, Von Gunten U (2004) Removal of estrogenic activity and formation of oxidation products during ozonation of 17α-ethinylestradiol. Environmental Science and Technology 38:5177
- Huber MM, Göbel A, Joss A, Hermann N, Löffler D, McArdell CS, Ried A, Siegrist H, Ternes TA, Von Gunten U (2005) Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: A pilot study. Environmental Science and Technology 39:4290
- Jönsson JA, Mathiasson L (1999a) Liquid membrane extraction in analytical sample preparation. I. Principles. TrAC Trends in Analytical Chemistry 18:318
- Jönsson JA, Mathiasson L (1999b) Liquid membrane extraction in analytical sample preparation. II. Applications. TrAC Trends in Analytical Chemistry 18:325
- Kuuranne T, Kotiaho T, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE, Leinonen A, Westwood S, Kostiainen R (2003) Feasiblity of a liquid-phase microextraction sample clean-up and liquid chromatographic/mass spectrometric screening method for selected anabolic steroid glucuronides in biological samples. Journal of Mass Spectrometry 38:16
- La Guardia MJ, Hale RC, Harvey E, Mainor TM (2001) Alkylphenol Ethoxylate Degradation Products in Land-Applied Sewage Sludge (Biosolids). Environmental Science and Technology 35:4798-4804
- Lange F, Cornelissen S, Kubac D, Sein MM, von Sonntag J, Hannich CB, Golloch A, Heipieper HJ, Möder M, von Sonntag C (2006) Degradation of macrolide antibiotics by ozone: a mechanistic case study with clarithromycin. Chemosphere 65:17-23
- LfU (2004) Bayrisches Landesamt für Umwelt, Arzneimittel in der Umwelt, F+E Vorhaben 2000-2002, 73e04010049, Schlussbericht

- Löffler D, Römbke J, Meller M, Ternes TA (2005) Environmental fate of pharmaceuticals in water/sediment systems. Environmental Science and Technology 39:5209
- Lord HL, Möder M, Popp P, Pawliszyn JB (2004) In vivo study of triazine herbicides in plants by SPME. Analyst 129:107
- Luckenbach T (2004) Fatal attraction: Synthetic musk fragrances compromise multixenobiotic defense systems in mussels. Marine Environmental Research 58:215
- Major RE (2003) Trends in Sample Preparation. LC-GC Europe 16:71
- McArdell CS, Molnar E, Suter MJF, Giger W (2003) Occurrence and Fate of Macrolide Antibiotics in Wastewater Treatment Plants and in the Glatt Valley Watershed, Switzerland. Environmental Science and Technology 37:5479
- Melcher RG, Morabito PL (1990) Membrane/gas chromatographic system for automated extraction and determination of trace organics in aqueous samples. Analytical Chemistry 62:2183
- Miege C, Favier M, Brosse C, Canler J-P, Coquery M (2005) Concentrations and Fluxes of Betablockers in Effluents of Wastewater Treatment Plants from the Lyon Area (France). Proceedings of the 1st EMCO workshop. http://www.cid.csic.es/emco/Proceedings.pdf
- Mills LJ, Chichester C (2005) Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? Science of the Total Environment 343:1
- Müller S, Möder M, Schrader S, Popp P (2003) Semi-automated hollow-fibre membrane extraction, a novel enrichment technique for the determination of biologically active compounds in water samples. Journal of Chromatography A 985:99
- Muñoz F, von Sonntag C (2000) The reactions of ozone with tertiary amines including the complexing agents nitrilotriacetic acid (NTA) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in aqueous solution. Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 2:2029
- Muñoz F, Mvula E, Braslavsky SE, Von Sonntag C (2001) Singlet dioxygen formation in ozone reactions in aqueous solution. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2:1109
- Nakamura S, Takino M, Daishima S (2000) Determination of chlorophenols, bisphenol A and 17?-estradiol by gas chromatography/negative-ion chemical-ionization mass spectrometry. Bunseki Kagaku 49:181
- Nakamura S, Hwee Sian T, Daishima S (2001) Determination of estrogens in river water by gas chromatography-negative-ion chemical-ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography A 919:275
- Oaks JL, Gilbert M, Virani MZ, Watson RT, Meteyer CU, Rideout BA, Shivaprasad HL, Ahmed S, Chaudhry MJI, Arshad M, Mahmood S, Ali A, Khan AA (2004) Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. Nature 427:630

Organikum, Ed. Becker HGO, Berger W, Domschke G, 2004, WILEY-VCH, Weinheim

- Phillips B, Harrison P (1999) Ed. Hester RE Harrison RM Endocrine disrupting chemicals, Issues in Environmental Science and Technology, The Royal Society of Chemistry, 12:1-19
- Pratt KF, Pawliszyn J (1992) Gas extraction kinetics of volatile organic species from water with a hollow fiber membrane. Analytical Chemistry 64:2101
- Propper CR (2005) The Study of Endocrine-Disrupting Compounds: Past Approaches and New Directions. Integrative and Comparative Biology 45:194-200
- Raffaelli A, Saba A (2003) Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. Mass Spectrometry Reviews 22:318
- Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S, Krogh M, Grefslie Ugland H, Grønhaug T (2000) Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A 873:3
- Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S (2004) Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. TrAC Trends in Analytical Chemistry 23:1
- Richardson ML, Bowron JM (1985) The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. Journal of Pharmacy and Pharmacology 37:1
- Ricking M, Schwarzbauer J, Franke S (2003) Molecular markers of anthropogenic activity in sediments of the Havel and Spree Rivers (Germany). Water Research 37:2607
- Robb DB, Covey TR, Bruins AP (2000) Atmospheric pressure photoionization: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. Analytical Chemistry 72:3653
- Sacher F, Lochow E, Bethmann D, Brauch HJ (1998) Vorkommen von Arzneimittelwirkstoffen in Oberflächenwässern. Vom Wasser 90:233-243
- Schellin M (2006) Entwicklung und Anwendung neuer Techniken zur Extraktion organischer Kontaminanten aus verschiedenen Matrizes. Dissertation. Universität Leipzig
- Stan H-J, Heberer T, Linkerhäger M (1994) Vorkommen von Clofibrinsäure in aquatischen System: Führt die therapeutische Anwendung zu einer Belastung von Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser? Vom Wasser:57-68
- Staude E (1992) Membranen und Membranprozesse, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Ternes TA (1998) Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. Water Research 32:3245
- Ternes TA, Hirsch R (2000) Occurrence and behavior of X-ray contrast media in sewage facilities and the aquatic environment. Environmental Science and Technology 34:2741-2748
- Ternes T (2001) Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues. 39-54

- Ternes TA, Stüber J, Herrmann N, McDowell D, Ried A, Kampmann M, Teiser B (2003) Ozonation: A tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? Water Research 37:1976
- Ternes TA (2004) EU Projekt POSEIDON, Abschlussbericht
- Ternes TA (2006) persönliche Kommunikation
- van Rooyen GF, Badenhorst D, Swart KJ, Hundt HKL, Scanes T, Hundt AF (2002) Determination of carbamazepine and carbamazepine 10, 11-epoxide in human plasma by tandem liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionisation. Journal of Chromatography B 769:1-7
- Wasserwissen, Institut für Umweltverfahrenstechnik Universität Bremen, Lexikon, http://www.wasser-wissen.de
- WHO (2006) Collaborating Centre for Drug Statistics Methology, http://www.whocc.no/atcddd/

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Strukturformel Carbamazepin	6
Abbildung 2:	Strukturformel Clarithromycin	8
Abbildung 3:	Strukturformel Metoprolol	9
Abbildung 4:	Das Schema zeigt den selektiven Stofftransport durch eine Membran	13
Abbildung 5:	Reaktion von polaren Gruppen mit PFBBr. Im Beispiel ist die Umsetzung eines	
	Alkohols gezeigt.	19
Abbildung 6	Einsatzspektren der unterschiedlichen Ionisationsarten APPI, API und ESI. Die	
	Abbildung ist verändert nach [Fiedler 2004].	20
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der APPI-Quelle. Die Abbildung ist verändert nach	
	[Bos 2006]	21
Abbildung 8:	Prinzip des Tandemmassenspektrometers. Die Abbildung ist verändert nach [Hes	sse
	2005]	22
Abbildung 9:	Schematische Darstellung des Q1 Full Scan	23
Abbildung 10:	Schematische Darstellung des Poduct Ion Scan	23
Abbildung 11:	Schematische Darstellung des Precursor Ion Scan	24
Abbildung 12:	Schematische Darstellung des Constant Neutral Loss	24
Abbildung 13:	Schematische Darstellung des Selected Ion Monitoring	24
Abbildung 14:	Schematische Darstellung des Multiple Reaction Monitoring	25
Abbildung 15:	Reaktionsmechanismus zur Bildung von Hydrazonen aus Carbonylverbindungen	n mit
	DNPH	38
Abbildung 16:	Arbeitsschritte der Vergleichsmethode als Ablaufschema	40
Abbildung 17:	Chromatogramm eines Standardmixes der neutralen Analyten in n-Hexan, der ei	ner
	Konzentration von 50 ng/L bei einer Anreicherung von 1 L Wasserprobe entsprie	cht.
	Es handelt sich um ein GC-MS-Chromatogramm mit Elektronen-stoßionisation.	42
Abbildung 18:	Chromatogramm eines Standardmixes der derivatisierten polaren Analyten in	
	n-Hexan, der einer Konzentration von 10 ng/L bei einer Anreicherung von 1 L	
	Wasserprobe entspricht. Es handelt sich um ein GC-MS-Chromatogramm mit	
	negativer chemischer Ionisierung.	42
Abbildung 19:	Vergleich verschiedener kommerziell erhältlicher SPE-Kartuschen. Getestet wur	den
	folgende Modelle: Supelco DCS-CN 100 mg (CN), Supelco DSC-18Lt 100 mg	
	(18Lt), Supelco DSC-Ph 100 mg (Ph), Waters OASIS HLB 200 mg (OASIS),	
	phenomenex STRATA 60 mg (Strata) und Chromabond EASY 500 mg (EASY).	44
Abbildung 20:	Vergleich der Elutionsprofile der Chromabond EASY (EASY) und der Waters C	DASIS
	HLB (OASIS). Es wurden zwei Mal eluiert (I, II) und diese Eluate separat umger	setzt
	und analysiert. Eluiert wurde laut Herstellervorschriften mit je 6 mL ACN und 6	mL
	MeOH (EASY) bzw. 1-2 mL MeOH.	44
Abbildung 21:	Schematische Darstellung der online-SPE-HPLC-MS/MS	47
Abbildung 22:	CIM disk holder der Fa. BIA Separations und das eingesetzte SPE-Material (EN	VI)
	als Disc in der verwendeten Größe.	47
Abbildung 23:	Ionenspurenchromatogramme eines wässrigen Standards mit Konzentrationen de	er
	Analyten von jeweils 100 ng/L. Angereichert wurde online mit einer SPE-Disc:]	ENVI
	aus einem Probevolumen von 20 mL mit einem Fluss von 3 mL/min. Die Intensi	itäten
	der Einzelspuren wurden auf 100 % normiert	48
Abbildung 24:	Elutionsprofile der relevanten Verbindungen. Es wurden jeweils Fraktionen von	
	50 μL gesammelt und separat mit HPLC-MS/MS analysiert. Die Anreicherung w	vurde
	zuvor an einer SDB vorgenommen. Ab Fraktion 9 wurden keine bzw. nur sehr ge	eringe
	Signale detektiert.	49
Abbildung 25:	Einfluss des Probevolumens auf die Wiederfindung. Angereichert wurden je 2 ng	g
	absolut an einer SDB bei einem Fluss von 1 mL/min	50
Abbildung 26:	Einfluss der Anreicherungsgeschwindigkeit auf die Wiederfindung. Angereicher	t
	wurden je 20 mL einer Standardlösung mit der Konzentration 100 ng/L an einer	SDB.
		51
Abbildung 27:	Linearität der Anreicherung im unteren Konzentrationsbereich aus wässrigen	_ ~
A11.11. •••	Standardlösung an der SDB.	53
Abbildung 28:	Schematische Darstellung der Mini-MASE. Die Angaben der Größen sind in mn	n 56

Abbildung 29:	Anreicherungsfaktoren der β -Blocker Metoprolol und Propranolol bei unterschiedlichen basischen pH-Werten. Bei einem pH-Wert von ≤ 7 fand keine
Abbildung 20.	Anreicherung statt
Abbildung 21:	Lingerität der Anreicherung der Mini MASE für die 8 Pleaker Meterrelel und
Abbildung 51.	Dropropolol 61
Abbildung 32:	Linearität der Anreicherung der Mini-MASE für Pharmasäuren an den Beispielen Ibuprofen und Indometacin
Abbildung 33:	Chromatogramm Leipziger Trinkwasser, MRM von Carbamazepin, n.n nicht nachgewiesen, * [Ternes 2001]
Abbildung 34:	Standardaddition für Metoprolol und Carbamazepin für eine Probe der Ohre bei Calvörde an der Stelle der Kläranlageneinleitung
Abbildung 35:	Grundwasserprobe Halle, Standardaddition
Abbildung 36:	Oberflächenwasser der Probe Leipzig II, Laborvergleich, Standardaddition für
	Carbamazepin, Mini-MASE
Abbildung 37:	Vergleich von Aceton und Toluol als Dopant bei einem Fluss von 20 μL/min und bei 200 μL/min Fluss des HPLC-Laufmittels
Abbildung 38:	Einfluss der Laufmittelzusammensetzung auf die Signalintensität. Untersucht wurden verschiedene Verhältnis von MeOH/Wasser v/v
Abbildung 39:	Matrixeinfluss auf die positive Photoionisation. Die verschiedenen Matrizes sind
	Methanol (MeOH), bidestilliertes Wasser (bidest. Wasser), Saalewasser an der
	Messstelle UHH14 (Saale UHH14) und verdünntes Modellabwasser (Abwasser
	1:100). Die Werte sind normiert auf MeOH = 100 %. Das Modellabwasser wurde
	1:100 mit Leitungswasser verdünnt
Abbildung 40:	Matrixeinfluss auf die negative Photoionisation. Die verschiedenen Matrizes sind
	Methanol (MeOH), bidestilliertes Wasser (bidest. Wasser), Saalewasser an der
	Messstelle UHH14 (Saale UHH14), verdünntes Modellabwasser (Abwasser 1:100)
	und eine Huminsäure in Wasser (10 mg/L). Die Werte sind normiert auf
411.11 41	MeOH = 100 %. Das Modellabwasser wurde 1:100 mit Leitungswasser verdunnt /1
Abbildung 41:	Das Chromatogramm zeigt den GC-EI-MS Fullscan des Versuches VI (Schlamm aus
	der Saale, aerobe Bedingungen) nach rund zwolf Monaten. Carbamazepin hat die KI
	(DT 11.24 min) und der Cerkemagenin Ablehemmling mit einer Cerkenvilgrunne und
	(KT 11,24 mm) und der Carbamazepin-Adkomming mit einer Carbonyigruppe und den twischen Messen m/z 207 und m/z 170 im Speltrum. Des Phthelet ist eine
	Verunreinigung die z B bei der Extraktion eingetragen werden kann wenn
	Kunststoffsenta verwendet werden 74
Abbildung 42.	Das Chromatogramm zeigt die Ionenspuren m/z 179 und m/z 207 des Fullscan eines
roondung 42.	SPE-Extraktes der Saale (Peissnitzinsel) vom 01 08 2005 Bei der RT 10 34 min der
	Spur m/z 179 wird Acridin detektiert. Die Peaks bei ie RT 11 71 min stehen für den
	Metaboliten mit Carbonylgruppe
Abbildung 43:	Das Chromatogramm zeigt den Fullscan der FENTON'S Reaktion von Carbamazepin
C C	nach 72 h
Abbildung 44:	In Bild a) ist das TIC des Precursor Ion Scans von m/z 210 gezeigt. Bilder b) bis f)
	zeigen die erhaltenen Spektren und Strukturvorschläge
Abbildung 45:	Die Abbildung zeigt den unterschiedlich starken Zerfall der Abbauprodukte mit
	m/z 210 im Molekül im Product Ion Scan m/z 210 bei einer CE von 30 eV. Es sind
	beispielhaft die Spektren der Peaks zu den Retentionszeiten 6,77 min, 7,15 min und
	8,79 min angegeben
Abbildung 46:	Massenspur m/z 180,2 aus dem TIC der Reaktion von Carbamazepin mit FENTON'S
	Reagenz nach 70 h Reaktionsdauer. Die identifizierten Peaks sind bei RT 7,04 min ein
	hydroxyliertes Carbamazepin, bei RT 8,75 min ein hydroxyliertes Iminostilben und
A 1.1.1.1.1	bei RT 15,52 min Acridin
Abbildung 47:	Zunanme von drei identifizierten Metaboliten im zeitlichen Verlauf der Reaktion von
	Carbamazepin mit FENION S Keagenz. Aufgetragen sind die Peakflachen für m/z 180 zur DT 15.52 min (Apridin) m/z 252 zur DT 7.12 min (Hudromannehensonenin) m.d.
	zui Ki 13,32 mm (Achum), m/z 235 zur Ki 7,12 mm (Hydroxycarbamazepin) und m/z 210 zur DT 8,60 mm (Hydroxymminostilbon) gagan die Daaltiongesit
Abbildung 19.	Metabolitementwicklung der Reaktion von Carbamazonin mit EDUTOM's Descenz im
Abblidulig 40.	zeitlichen Verlauf Dargestellt ist die Ionenspur m/z 180.2 die aus dem Fullsoon
	entnommen wurde

Abbildung 49:	Im Bild links ist die Ionenspur m/z 224 des TICs der Reaktion von Carbamazepin und FENTON'S Reagenz gezeigt. Das MS/MS Experiment zeigt das im Bild rechts abgebildete Spektrum zur RT 4 42 min 81
Abbildung 50:	Im Bild links ist die Ionenspur m/z 226 des TICs der Reaktion von Carbamazepin und FENTON'S Reagenz gezeigt. Das MS/MS-Experiment zeigt das im Bild rechts
Abbildung 51:	abgebildete Spektrum zur RT 8,26 min
	Carbonylgruppe. Die Phthalate sind Verunreinigungen, die durch die LLE eingetragen werden 83
Abbildung 52:	Massenspektrum eines durch GC-MS detektierten Abbauproduktes der Reaktion von Carbamazepin und FENTON'S Reagenz
Abbildung 53:	Strukturvorschläge zu einem weiteren Metaboliten
Abbildung 54:	Die Reaktion zeigt die Hydrazonbildung mit DNPH zum Nachweis von
	Carbonylverbindungen am Beisniel eines Iminochinons 84
Abbildung 55:	Produktionenspektrum des DNP-Derivates eines Abbauproduktes der Reaktion von
411.11 50	Carbamazepin mit FENTON S Reagenz, das eine Carbonyigruppe entnait
Abbildung 56:	Strukturformeln der makrozyklischen Antibiotika Erythromycin, Clarithromycin und
	Roxithromycin, variierende Strukturmerkmale sind grün markiert, die
	Dimethylaminogruppe (Stelle des Ozonangriffs) ist blau markiert
Abbildung 57:	Reaktionsschema zum Angriff von Ozon an ein tertiäres Amin
Abbildung 58:	Strukturformeln der zu erwartenden Hauptmetabolite Clarithromycin-N-oxid und das demethylierte Clarithromycin
Abbildung 59:	Spektrum des Clarithromycins
Abbildung 60:	Gezeigt ist im Bild links ein Fullscan der Probe B (moderate Menge Ozon). Rechts ist das Spektrum des Metaboliten bei RT 2,01 min (Clarithromyin-N-oxid) abgebildet.
	Der dominante Peak bei RT 2,27 min ist Clarithromycin. Unter dem
	Clarithromycinsignal liegt außerdem das demethylierte Carithromycin (734 \rightarrow 576).
Abbildung 61:	Links ist ein Fullscan der Probe C (Ozonüberschuss) gezeigt. Rechts im Bild ist ein Spektrum bei RT 1,66 min aufgenommen. Die Verbindungen sind aufgrund schlechter chromatographischer Trennung überlagert. Im Spektrum sind zu erkennen: Clarithromycin-N-oxid, das demethyliertes Clarithromycin und eine unbekannte Varbindung. Es ist kaum noch Clarithromycin vorbanden
Abbildung 62:	Angriff des Ozons am Ring des Metoprolols bei pH = 7 unter Bildung eines
Abbildung 63:	Angriff des Ozons am Ring des Metoprolols bei pH = 7 unter Bildung eines Phenols 92
Abbildung 64:	Zerfall des durch Ozonaddition entstandenen Intermediates in ein Amin und ein vom
Abbildung (5.	Cyclonexanon adgetenetes Raukai
Abbildung 05.	Suukturionnen der D-Diocker
Abbildung 66:	Spektrum von Metoproioi
Abbildung 67:	Ionenspuren der einzelnen Metabolite aus einer Fullscanprobe von ozonisiertem Metoprolol
Abbildung 68:	Product Ion Scans der Metaboliten, die bei der Ozonierung von Metoprolol entstehen: a) Muconadehyd des Metoprolols, b) Monohydrat des Muconaldehyds, c) nicht identifizierter Metabolit. d) Amin
Abbildung 69:	Zwei Product Ion Scans der Metaboliten mit $m/z = 284$. Die Retentionszeiten sind RT 1 36 min und RT 2 16 min 96
Abbildung 70.	Umsetzung des entstandenen Muconaldehvs von Metoprolol mit DNPH 07
Abbildung 71:	Fullscan des DNP-Derivates des Muconaldehyds. Im Bild rechts ist das erwartete
A h h i l dame - 70	Spektrum der Krilluger OASIS III Die der Feilberger Geschleter der Feilberger Aussister in 197
Abbildung /2:	SITUKIUF DET FESTPHASE OASIS HLB DET FA. WATERS, GRAfik [WWW.WATERS.COM]X

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Temperaturprogramme und MSD-Einstellungen in der GC-MS.	29
Tabelle 2:	HPLC-MS/MS-Methoden unter Verwendung der ESI-Quelle	30
Tabelle 3:	HPLC-MS/MS-Methoden unter Verwendung der APPI-Quelle	30
Tabelle 4:	Varianten des biologischen Abbauversuches mit Carbamazepin	36
Tabelle 5:	Nachweisgrenzen und weitere analytische Kenngrößen der Vergleichsmethode t	bei
	einer Anreicherung von 1 L wässriger Probe mit SPE an LiChrolut EN/C18	41
Tabelle 6:	Zusammenstellung der Eigenschaften der getesteten Festphasen	43
Tabelle 7:	Nachweisgrenzen und Wiederfindungsraten der online-SPE-HPLC-MS/MS aus	
	wässrigen Standardlösungen	52
Tabelle 8:	Reproduzierbarkeiten und lineare Bereiche für die online-SPE-HPLC-MS/MS d	er
	ausgewählten Analyten aus wässriger Standardlösungen mittels SDB-Disc	53
Tabelle 9:	Leistungsparameter der Mini-MASE	60
Tabelle 10:	Messwerte der Oberflächengewässer in Sachsen-Anhalt, online-SPE-LC-MS/MS	S mit
	Standardaddition, Konzentrationen in [ng/L]	64
Tabelle 11:	Messwerte der Vergleichsmethode und der Mini-MASE, Konzentrationen in [ng	g/L]65
Tabelle 12:	Messwerte der drei Methoden im Vergleich [ng/L]	66
Tabelle 13:	Vergleich der unterschiedlichen Ionisierungsarten anhand der Nachweisgrenzen	des
	Gerätes	72
Tabelle 14:	Betrachtete Verbindungen und ausgewählte Eigenschaften	V
Tabelle 15:	Ionen und MS-Parameter LC-MS/MS APPI positiv	VII
Tabelle 16:	Ionen und MS-Parameter LC-MS/MS APPI negativ	VIII
Tabelle 17:	Ionen und MS-Parameter LC-MS/MS ESI positiv	VIII
Tabelle 18:	Ionen und MS-Parameter LC-MS/MS ESI negativ	VIII
Tabelle 19:	Ionen GC-NCI-MS	IX
Tabelle 20:	Ionen GC-EI-MS	IX
Tabelle 21:	ausgewählte Massenspektren der betrachteten Analyten	X

Anhang

Thermodynamik und Kinetik beim Stofftransport durch unporöse Membranen

Betrachtet man die Verteilung eines Analyten zwischen zwei flüssigen Phasen (I, II), kann dies durch den NERNST'schen Verteilungssatz beschrieben werden. Beim Erreichen des Gleichgewichts gilt:

$$K_{I/II} = \frac{a_I}{a_{II}} = \frac{c_I}{c_{II}} = \frac{m_I}{m_{II}} \cdot \frac{V_{II}}{V_I}$$
(A.1)

K ... Verteilungskoeffizient

a ... Aktivität

c ... Konzentration

m ... Masse

V ... Volumen

Der Verteilungskoeffizient ist abhängig von Temperatur, Druck und pH-Wert.

Bei der Verteilung eines Analyten zwischen zwei Phasen, die durch eine unporöse Membran getrennt sind, muss zusätzlich die Verteilung zwischen Analyt und Membran betrachtet werden. Die unporöse Membran kann als dichte Schicht bezeichnet werden, in der sich unterschiedliche Stoffe unterschiedlich stark lösen. Sie lösen sich im Membranmaterial und passieren es aufgrund des angelegten Gradienten durch Diffusion. Man kann damit von einem 3-Phasen-System sprechen, welches durch folgende Gleichungen beschrieben werden kann:

$$K_{Membran/Donor} = \frac{c_{Membran}}{c_{Donor}}$$
(A.2)

$$K_{Akzeptor/Membran} = \frac{c_{Akzeptor}}{c_{Membran}}$$
(A.3)

$$K_{Akzeptor/Donor} = \frac{c_{Akzeptor}}{c_{Donor}} = K_{Akzeptor/Membran} \cdot K_{Membran/Donor}$$
(A.4)

K ... Verteilungskoeffizient

c ... Konzentration

Laut Massenerhaltungsgesetz gilt:

$$n^{0} = n_{Donor} + n_{Membran} + n_{Akzeptor} = c^{0} \cdot V_{Donor} = c_{Donor} \cdot V_{Donor} + c_{Membran} \cdot V_{Membran} + c_{Akzeptor} \cdot V_{Akzeptor}$$

(A.5)

- n ... Stoffmenge in der jeweiligen Phase unter Gleichgewichtsbedingungen
- n⁰... Stoffmenge in der Donorphase vor der Extraktion
- c ... Konzentration in der jeweiligen Phase unter Gleichgewichtsbedingungen
- c⁰... Konzentration in der Donorphase vor der Extraktion
- V ... Volumen

Aus den Gleichungen (A.2) bis (A.5) ergibt sich folgender Zusammenhang zur Abhängigkeit der Anreicherung eines Stoffes in der/die Akzeptorphase:

$$n_{Akzeptor} = \frac{K_{Akzeptor/Donor} \cdot V_{Akzeptor} \cdot c^{0} \cdot V_{Donor}}{K_{Akzeptor/Donor} \cdot V_{Akzeptor} + K_{Membran/Donor} \cdot V_{Membran} + V_{Donor}}$$
(A.6)

Eine effektive Anreicherung in der Akzeptorphase kann somit nur erreicht werden, wenn die Verteilungskoeffizienten $K_{Membran/Donor}$ und $K_{Akzeptor/Membran}$ möglichst groß sind. Sind diese Verteilungskoeffizienten bekannt, kann die Extraktionsausbeute

$$Extractions ausbeute = \frac{n_{Akzeptor}}{n^0}$$
(A.7)

bestimmt werden. Der Anreicherungsfaktor ergibt sich wie folgt:

$$Anreicherungsfaktor = \frac{c_{Akzeptor}}{c^0}$$
(A.8)

Die kinetischen Aspekte der Membranextraktion werden durch verschiedene Diffusionsprozesse geprägt und können damit durch die FICK'schen Gesetze beschrieben werden. Das 1. FICK'sche Gesetz stellt die Diffusionsgeschwindigkeit dar:

$$J_i = -D\frac{\delta c_i}{\delta x} \tag{A.9}$$

 $J_i \ldots$ diffuser Stofftransport der Komponente i [mol/(cm·s)]

D ... Diffusionskoeffizient [cm²/s]

δc_i... Konzentrationsgradient der Komponente i [mol/cm³]

δx ... Diffusionsstrecke

Das 2. FICK'sche Gesetz beschreibt die zeitliche Änderung des Konzentrationsprofils:

$$\frac{\delta c(x,t)}{\delta t} = D \frac{\delta^2 c(x,t)}{dx^2}$$
(A.10)

c(x,t) ... Konzentration zur Zeit t am Ort x

Um die Membranextraktion effektiv zu nutzen, müssen die sie beeinflussenden Parameter der einzelnen Schritte des Übergangs durch die Barriere optimiert werden. Im Folgenden sind die einzelnen Vorgänge und deren physikalische Zusammenhänge beschrieben. Unter Berücksichtigung der Vorgänge an Grenzschichten sind fünf Prozesse am Übergang beteiligt:

- Stofftransport aus der Donorlösung in die Grenzschicht
- Sorption in die Membran
- Diffusion durch die Membran
- Desorption aus der Membran in die Grenzschicht
- Stofftransport aus der Grenzschicht in die Akzeptorphase

Schritt 3, die Diffusion durch die Membran, ist der langsamste und damit geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Der in Gleichung (A.9) genannte Diffusionskoeffizient ist eine Materialkonstante und kann durch eine der ARHENIUS-Gleichung entsprechenden Beziehung dargestellt werden:

$$D = D_0 \cdot e^{-E_a/RT} \tag{A.11}$$

- E_a ... Aktivierungsenergie [J]
- R ... universelle Gaskonstante [R = $8,31451 \text{ J/(K \cdot mol)}$]
- T ... Temperatur [K]

Hierbei ist die starke Temperaturabhängigkeit deutlich. Da die Aktivierungsenergie positiv ist, steigt die Diffusion bei steigender Temperatur. Die Sorption in die Membran dauert umso länger, je stärker die Grenzschicht ausgeprägt ist. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt [Pratt 1992], dass durch starkes Rühren die Grenzschicht minimal gehalten werden kann und damit dieser Widerstand reduziert wird. Wie oben erwähnt geschieht die Diffusion durch das Lösen der Analyten im Membranmaterial. Für die Löslichkeit eines Analyten im Membranmaterial gilt die Beziehung:

$$c_{iMembran} = c_i \cdot S$$
 (A.12)
 $c_{iMembran} \dots$ Konzentration des Stoffes i in der Membran
S ... Löslichkeitskoeffizient, dimensionslos

Die folgende Gleichung weist auf die Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit hin:

$$S = S_0 \cdot e^{-\Delta H / RT}$$
(A.13)

$$\Delta H \dots L \ddot{o} sungs enthalpie$$

Es handelt sich beim Lösen eines Analyten in organischem Material um eine exotherme Reaktion, d. h. bei steigender Temperatur nimmt im Gegensatz zur Diffusion die Löslichkeit ab. Der Stoffstrom beträgt somit unter Berücksichtigung von Diffusion und Löslichkeit aber unter Vernachlässigung der Widerstände an den Grenzschichten:

$$J_{i} = -\frac{D \cdot S \cdot (c_{iDonor} - c_{iAkzeptor})}{L}$$
(A.14)

L ... Dicke der Membran [cm]

Name	Struktur	Verwendung	MW	CAS-Nr.	log K _{ow}
17α-Ethinyl- estradiol	ОН НОСН	synthetisches Östrogen	296,41	57-63-6	3,67 ¹⁾
Bezafibrat		Lipidsenker	361,82	41859-67-0	4,25 ¹⁾
Bisphenol A (BPA)	но-Он	Xenoestrogen	228,29	80-05-7	3,32 ³⁾
Carbamazepin	H ₂ N O	Antiepileptikum	236,27	298-46-4	2,45 1)
Clarithromycin		Antibiotikum	747,96	81103-11-9	k.A.
Clofibrinsäure		Metabolit des Lipidsenkers Clofibrat	214,65	882-09-7	2,57 ¹⁾
Coffein		Psychostimulans (Analeptikum)	194,19	58-08-2	-0,07 4)
Diclofenac-Na		Antiphlogistikum	318,13	15307-86-5	1,10 ¹⁾
Erythromycin		Antibiotikum	733,94	114-07-8	3,06 ¹⁾

 Tabelle 14:
 Betrachtete Verbindungen und ausgewählte Eigenschaften

Name	Struktur	Verwendung	MW	CAS-Nr.	log K _{ow}
Fenofibrat		Lipidsenker	360,84	49562-28-9	5,19 ¹⁾
Fenofibrinsäure	HO O CI	Metabolit des Lipidsenkers Fenofibrat	318,76	42017-89-0	2,90 ¹⁾
Galoxolide [®] (HHCB)		synthetischer Moschusduftstoff	258,41	1222-05-5	5,9 ⁵⁾
Gemfibrozil	ОСОСН	Lipidsenker	250,34	25812-30-0	3,90 ¹⁾
Ibuprofen		Antiphlogistikum	206,28	15687-27-1	3,97 ¹⁾
Indometacin		Antiphlogistikum	357,79	53-86-1	4,27 ¹⁾
Metoprolol	OH H	beta-Blocker	267,37	37350-58-6	1,88 1)
Naproxen	OH	Antiphlogistikum	230,26	22204-53-1	3,18 ¹⁾
Phenazon (= Antipyrin)	o Z Z	Antiphlogistikum	188,23	60-80-0	0,46 ¹⁾
Propranolol	O OH H	beta-Blocker	259,35	525-66-6	2,75 ⁶⁾

Name	Struktur	Verwendung	MW	CAS-Nr.	log K _{OW}
Sitosterol	HO CH ₃	Phytoestrogen	414,71	83-46-5 83-47-6	9,65 ⁶⁾
technisches 4-Nonylphenol (t-NP)	C ₉ H ₁₉ OH	Xenoestrogen	220,35	25154-52-3	4,48 ²⁾
Tonalide [®] (AHTN)		synthetischer Moschusduftstoff	258,41	15323-35-0 1506-02-1 21145-77-7	5,7 ⁵⁾

k.A. ... keine Angaben

- 1) [ARGE Elbe 2003]
- 2) [La Guardia 2001]
- 3) Sicherheitsdatenblatt Merck KGaA Bisphenol A
- 4) Sicherheitsdatenblatt Merck KGaA Coffein
- 5) [Balk 1999]
- 6) [Miege 2005]

	Product-Ion	Quantifier	CE	DP	Qualifier	CE	DP
Metoprolol	268,2	116,1	60	30	191,1	60	30
Propranolol	260,1	116,1	60	30	183,1	30	30
Erythromycin	734,4	576,0	30	50	158,0	40	50
Fenofibrat	361,2	233,1	20	60	139,1	30	50
Carbamazepin	237,2	194,3	15	60	179,2	50	50
Phenazon	189,1	104,0	30	60	77,0	50	50
Phenazon-d ₃	192,1	104,1	50	30	77,0	50	40
Coffein	195,2	138,0	30	50	110,0	30	50
Paracetamol	152,2	110,9	20	60	93,2	30	50
Tonalid	259,2	175,0	30	60	119,0	50	50
Galaxolid	257,3	187,2	35	60	227,2	40	50

 Tabelle 15:
 Ionen und MS-Parameter LC-MS/MS APPI positiv

Tablie 10: Tohen and MS-Tarameter LC-MS/MS ATT inegativ							
	Product-Ion	Quantifier	CE	DP			
Bezafibrat	360,3	274,1	-20	-20			
Diclofenac	293,9	249,9	-5	-20			
Clofibrinsäure	212,9	126,8	-10	-10			
Fenofibrinsäure	317,0	230,7	-10	-10			
Indometacin	312,0	296,8	-30	-10			
Ibuprofen	205,0	161,0	-10	-10			

 Tabelle 16:
 Ionen und MS-Parameter LC-MS/MS APPI negativ

 Tabelle 17:
 Ionen und MS-Parameter LC-MS/MS ESI positiv

	Product-Ion	Quantifier	CE	DP	Qualifier	CE	DP
Metoprolol	268,2	116,1	30	25	191,1	25	25
Propranolol	260,1	116,1	30	30	183,1	25	30
Erythromycin	734,4	576,0	30	25	158,0	40	25
Carbamazepin	237,2	194,3	25	50	179,2	40	50
Carbamazepin-d ₁₀	247,2	204,2	30	35			
Phenazon	189,1	104,0	40	50	77,0	40	50
Coffein	195,2	138,0	25	25	110,0	30	15

Tabelle 18: Ionen und MS-Parameter LC-MS/MS ESI negativ

	Product-Ion	Quantifier	CE	DP	Qualifier	CE	DP
Clofibrinsäure	213,2	127,0	-20	-20	85,0	-20	-20
Ibuprofen	205,1	161,2	-20	-20			
Bezafibrat	360,1	273,9	-20	-20	154,3	-50	-20
Gemfibrozil	249,2	120,9	-30	-30	120,9 → 106,2	-30	-30
Naproxen	229,2	169,3	-50	-20			
Diclofenac	294,3	250,5	-20	-20	214,0	-20	-20
Fenofibrinsäure	317,0	230,8	-20	-20	230,8 → 92,0	-50	-50
Indometacin	356,0	312,2	-20	-20	282,4	-40	-20

Tabelle 19: Tolle	I GC-NCI-MS	r
	Quantifier	Qualifier
Clofibrinsäure	213,1	215,1
Gemfibrozil	249,2	250,2
Ibuprofen	205,2	206,2
t-Nonylphenol	219,0	220,2
4n-Nonylphenol	219,0	220,2
Naproxen	229,1	230,1
Fenofibrinsäure	317,0	319,0
Diclofenac	456,0	458,0
BPA-d ₁₄	418,2	419,2
BPA	407,1	408,1
Ethinylestradiol	295,2	296,2
Estradioldiacetat	313,2	314,2
Indometacin	356,1	358,1
Bezafibrat	360,1	362,1
TCIN	265,9	-

Tabelle 19:Ionen GC-NCI-MS

Tabelle 20: Ionen GC-EI-MS

	Quantifier	Qualifier
t-Nonylphenol	135,1	107,0
4n-Nonylphenol	107,0	220,2
BPA	213,1	228,1
BPA-d ₁₄	222,1	239,2
Ethinylestradiol	213,1	228,1
Estradioldiacetat	314,2	356,2
ß-Sitosterol	414	396

	Quantifier	Qualifier
Galaxolid	258	243
Tonalid	258	243
Coffein	194	109
Phenazon	188	96
Carbamazepin	193	236
Tetrachlornaphtalin	265,9	



Abbildung 72: Struktur der Festphase OASIS HLB der Fa. Waters, Grafik [www.waters.com]



Tabelle 21: ausgewählte Massenspektren der betrachteten Analyten









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.

Franziska Lange

Publikationen

Monika Möder and Franziska Lange, Membrane-Assisted Liquid-Liquid Extraction Trace Analysis of Pharmaceutical Compounds in Aquatic Environments, LCGC Europe, LCE Feb07 (2007) 97-103

F. Lange, S. Cornelissen, D. Kubac, M. M. Sein, J. v. Sonntag, C. B. Hannich, A. Golloch, H. J. Heipieper, M. Möder, C. v. Sonntag, Degradation of macrolide antibiotics by ozone: a mechanistic case study with clarithromycin, Chemosphere 65 (2006) 17-23

F. Lange, W. Lorenz, S. Schrader and M. Möder, Combination of multi-component methods for ultra-trace determination of neutral and acidic pharmaceutical residues and endocrine disrupting compounds in water, Proceedings of NGWA 4th International Conference on Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Chemicals in Water, Minneapolis USA, Oktober 2004, 95-106

J. Baldamus, M. L. Cole, U. Helmstedt, E.-M. Hey-Hawkins, C. Jones, P. C. Junk, F. Lange and N. A. Smithies, Synthesis and structural study of a lithium complex of 6-methyl-2-(trimethylsilylamino)pyridine and its use in the formation of some lanthanoid complexes, Journal of Organometallic Chemistry, Volume 665, 1-2 (2003) 33-42

Vorträge

F. Lange, P. Braun, S. Schrader, M. Möder, W. Lorenz, Determination of endocrine disrupting compounds and pharmaceutical residues at ppt level by solid phase extraction, derivatization with pentafluorobenzyl bromide and gas chromato-graphy/negative chemical ionization mass spectrometry, ExTech06, York UK, Februar 2006

F. Lange, Trace determination of pharmaceutical residues in water by on-line SPE coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry, 16. Doktorandenseminar der Fachgruppe "Separation Science" in der GDCh, Hohenroda, Januar 2006

F. Lange, S. Schrader, M. Möder, Spurenbestimmung von pharmazeutischen Reststoffen und endokrin wirksamen Verbindungen in Wasserproben mittels online-SPE-LC-APPI-MS/MS, Applied Biosystems Anwenderseminar, Berlin, April 2005

F. Lange, S. Schrader, M. Möder, W. Lorenz, Combination of multi-component methods for ultra-trace determination of neutral and acidic pharmaceutical residues and endocrine disrupting compounds in water, NGWA 4th International Conference on Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Chemicals in Water Minneapolis USA, Oktober 2004

F. Lange, S. Schrader, M. Möder, W. Lorenz, Trace detection of pharmaceutical residues in water by on-line SPE-disc enrichment coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry, ExTech04, Leipzig, September 2004

Poster

T. Einsle, H. Paschke, S. Schrader, F. Lange, M. Möder, Membrane assisted liquidliquid extraction of selected polycyclic musk compounds and drugs from water samples, ExTech06, York UK, Februar 2006

H. Paschke, F. Lange, S. Schrader, M. Möder, W. Lorenz, Atmospheric Pressure Photoionization (APPI)-MS-MS coupled with membrane assisted extraction for determination of pharmaceutical and endocrine disrupting compounds, Jahrestagung der DGMS, Rostock, März 2005

F. Lange, P. Braun, S. Müller, S. Schrader, M. Möder, Negative Chemische Ionisations-Massenspektrometrie zur sensitiven Bestimmung pharmazeutischer Reststoffe in Oberflächenwasser, Jahrestagung der DGMS, Leipzig, März 2004

Curriculum Vitae

Franziska Lange

Geburtsdatum:	19. September 1979 in Leipzig
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung

1986 - 1992	Ernst-Grube-Oberschule Leipzig
1992 – 1998	FABrockhaus-Schule, Gymnasium, Leipzig
	Abschluss: Abitur

Akademischer und beruflicher Werdegang

10/1998 - 04/2003	Chemiestudium an der Universität Leipzig, Umweltchemie als
	Spezialisierung im Hauptfach, Abschluss: Diplomchemikerin
	(Umweltchemie)
11/2002 - 04/2003	Diplomarbeit am Helmholtzzentrum für Umweltforschung UFZ
	Leipzig GmbH, Department Bioremediation mit dem Titel:
	"Verhalten von cis-1,2-Dichlorethen und Monochlorbenzol im
	Modellsystem für Pflanzenkläranlagen (constructed wetlands)"
07/2003 - 10/2003	wissenschaftliche Hilfskraft am Helmholtzzentrum für
	Umweltforschung UFZ Leipzig GmbH, Department Bioreme-
	diation
11/2003 - 10/2006	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Lebensmittel- und
	Umweltchemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenb.
	Anfertigung einer Dissertation zum Thema "Bestimmung polarer
	Umweltkontaminaten in Wässern" in Zusammenarbeit mit dem
	Helmholtzzentrum für Umweltforschung UFZ Leipzig GmbH,
	Department Analytik
11/2006	wissenschaftliche Hilfskraft am Helmholtzzentrum für Umwelt-
	forschung UFZ Leipzig GmbH, Department Hydrogeologie
12/2006 - 03/2007	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Lebensmittel- und
	Umweltchemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenb.
seit 04/2007	wissenschaftliche Hilfskraft am Helmholtzzentrum für Umwelt-
	forschung UFZ Leipzig GmbH, Department Hydrogeologie