

DISSERTATION

**Untersuchungen zum Vorkommen von Arzneimittelwirkstoffen
und deren Humanmetaboliten in der aquatischen Umwelt**

Institut für Umweltforschung **INFU**

Autorin:

Dele Stülten

Betreuer:

Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Michael Spiteller

Univ.-Prof. Dr. Rehage

Abgabedatum:

2009

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind.

Dele Stülten

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder sind zur Veröffentlichung vorgesehen.

Artikel

STÜLTEN, D.; LAMSHÖFT, M.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M.: Isolation and characterization of a new human urinary metabolite of diclofenac applying LC-NMR-MS and high resolution mass analyses. In: J. Pharm. Biomed. Anal. 47 (2008), S. 371-376.

STÜLTEN, D.; ZÜHLKE, S.; LAMSHÖFT, M.; SPITELLER, M.: Occurrence of diclofenac and selected metabolites in sewage effluents. In: Sci. Total Environ. 405 (2008), S. 310-316.

Poster

STÜLTEN, D.; ZÜHLKE, S.; LAMSHÖFT, M.; SPITELLER, M.: Abwasserrelevanz der Biotransformationsprodukte des Arzneimittels Diclofenac. Poster auf der Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft „Wasser 2008“, 28. - 30. April 2008 in Trier.

Vorträge

ZÜHLKE, S.; LAMSHÖFT, M.; STÜLTEN, D.; SPITELLER, M.: Identification and determination of environmental relevant biotransformation products of diclofenac. Vortrag auf der internationalen Konferenz des EU-Projektes KNAPPE „Pharmaceutical Products in the Environment: Trends Towards Lowering Occurrence and Impact“, 19.-20.02.08 in Nîmes, Frankreich.

WAS MAN MESSEN KANN, DAS EXISTIERT AUCH.

Max Planck (1858 - 1947)

Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Michael Spiteller danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die von ihm gewährte Unterstützung, die Geduld und die Freiheiten während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Rehage möchte ich für die Übernahme des Koreferates meinen Dank aussprechen.

Herrn Dr. Sebastian Zühlke sowie Herrn Dr. Marc Lamshöft möchte ich für die stetige Hilfestellung und Betreuung danken.

Des weiteren gilt mein Dank dem gesamten Laborpersonal und den weiteren Mitarbeitern des Instituts für ihre weitreichende Unterstützung, darunter vor allem Gabriele Harges, Silke „Richter“ und Jürgen Storp sowie Erika Herstell.

Für die Bereitstellung verschiedener Proben möchte ich mich bei den Herren Prof. Dr. Schwarz (Klinikum Dortmund), Dr. Bauer (Knappschaftskrankenhaus Dortmund), Dr. Hinkerohe (Knappschaftskrankenhaus Bochum) sowie Dr. Reinbold (Westfälische Klinik Dortmund) bedanken.

Außerdem sehr hilfreich waren die Herren Dipl.-Ing. A. Lagojda und D. Kühne (Bayer CropScience AG) bzw. M. Gartmann (AG Biomolekulare NMR, Universität Bochum) durch die Durchführung der LC-NMR-MS-Messungen bzw. der quantitativen NMR-Messungen. Dafür ein herzliches Dankeschön!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Ziel der Arbeit	1
1.1	Arzneimittel in der aquatischen Umwelt	1
1.2	Ziel der Arbeit	2
2	Grundlagen	3
2.1	Pharmazeutika	3
2.2	Pharmazeutische Wirkstoffe in der aquatischen Umwelt	6
2.2.1	Pharmazeutische Wirkstoffe in der Kläranlage	7
2.2.2	Pharmazeutische Wirkstoffe im Oberflächenwasser	8
2.2.3	Pharmazeutische Wirkstoffe in Grundwasser und Trinkwasser	10
2.3	Metabolismus von Arzneimitteln im Menschen	11
2.4	Ausgewählte umweltrelevante Metaboliten	12
2.4.1	Metaboliten der Fibrate (Clofibrinsäure)	14
2.4.2	Metaboliten des Ibuprofen	15
2.4.3	Metaboliten von Phenazon, Propyphenazon, Metamizol und DMAA	16
2.4.4	Metaboliten des Carbamazepin	17
2.5	Wirkstoffe dieser Arbeit	18
2.5.1	Carbamazepin	19
2.5.2	Paracetamol	19
2.5.3	Diclofenac	19
2.5.4	Aceclofenac	21
2.6	Untersuchungsmethoden und -geräte	22
2.6.1	Probenvorbereitung	22
2.6.2	Chromatographie	23
2.6.3	Spektrometrie	23

3	Wirkstoffauswahl und Herangehensweise	33
3.1	Auswahl der zu untersuchenden Wirkstoffe	33
3.2	Herangehensweise	34
4	Material und Methoden	36
4.1	Verwendete Chemikalien	36
4.2	Standardsubstanzen	37
4.3	Herstellung von Kalibrierstandards	37
4.4	Sonstige Materialien	38
4.4.1	Extraktion und Aufkonzentrierung	38
4.4.2	Analytik	38
4.5	Geräte	38
4.5.1	Vorbereitung	38
4.5.2	Chromatographisch-analytische Geräte	39
4.6	Probenahme	40
4.6.1	Gewinnung von Urinproben	40
4.6.2	Abwasser aus verschiedenen Klärwerken	40
4.7	Extraktion und Aufkonzentrierung	41
4.7.1	Extraktion und Aufkonzentrierung von Urin	41
4.7.2	Extraktion und Aufkonzentrierung von Abwasserproben	42
4.7.3	Laufmittelfernung aus den Fraktionen der präparativen HPLC	43
4.8	Chromatographie	44
4.8.1	Analytische Verfahren	44
4.8.2	Präparative Verfahren	46
4.9	Detektion	48
4.9.1	Massenspektrometrische Untersuchungen	48
4.9.2	Hochauflösende Massenspektrometrie	49
4.9.3	Nuklearmagnetische Resonanzspektroskopie	50
4.9.4	Quantitative Nuklearmagnetische Resonanzspektrometrie	51
5	Ergebnisse und Diskussion	52
5.1	Erkennung umweltrelevanter Metaboliten aus Urinproben	52

5.1.1	Carbamazepin	52
5.1.2	Diclofenac	69
5.1.3	Paracetamol	79
5.2	Isolierung der Diclofenac-Metaboliten aus Urin mittels präparativer Flüssigkeitschromatographie	85
5.2.1	Gradiententrennung	86
5.2.2	Isokratische Trennung mit Methanol oder Acetonitril	88
5.3	Identifizierung und Quantifizierung der Diclofenac-Metaboliten	90
5.3.1	HPLC-hochauflösende Massenspektrometrie	90
5.3.2	LC-MS-SPE-NMR	91
5.3.3	Quantitative NMR-Spektrometrie	95
5.3.4	Bestätigung der isolierten Verbindungen im Urin	95
5.4	Methodenoptimierung	95
5.4.1	Anforderungen an eine quantitative Messmethode	96
5.4.2	Optimierung von massenspektrometrischer Analyse und Chromatographie	99
5.4.3	Vergleich von SPE-Materialien	102
5.4.4	Kalibrierung, Wiederholbarkeit, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	103
5.4.5	Bestimmung der Wiederfindungsraten in verschiedenen Matrices	103
5.5	Nachweis von Diclofenac und seinen Metaboliten in Abwasserproben	104
5.5.1	Langzeitbeprobung verschiedener Klärwerke	104
5.5.2	Verhalten der Analyten innerhalb des Klärwerks	111
6	Zusammenfassung	112
	Literaturverzeichnis	115
	Anhang	II
A	Umweltverträglichkeitsprüfung	II
A.1	Zweck	II
A.2	Untersuchte Organismen	III
A.3	Ermittlung von vergleichbaren Werten	IV

B Übersicht über den Metabolismus einiger Arzneimittel	VI
B.1 Schmerzmittel	VI
B.1.1 Acetylsalicylsäure	VI
B.1.2 Aceclofenac	VII
B.1.3 Ibuprofen	VII
B.1.4 Pyrazolinone	VIII
B.2 Fibrate	XI
C Messungen	XII
C.1 Erkennung umweltrelevanter Metaboliten aus Urinproben	XII
C.1.1 Carbamazepin	XII
C.1.2 Diclofenac	XLIX
C.1.3 Paracetamol	LXXII
C.2 NMR-Messungen (HMBC) von DF und seinen Metaboliten	LXXXIII
C.2.1 DF	LXXXIII
C.2.2 4'-OHD	LXXXIV
C.2.3 5-OHD	LXXXIV
C.2.4 4'-OHDD	LXXXV
C.3 Nachweis von Diclofenac und seinen Metaboliten in verschiedenen Abwasserproben	LXXXVI
C.3.1 KW1	LXXXVI
C.3.2 KW2	LXXXVI
C.3.3 KW3	LXXXVII
C.3.4 KW4	LXXXVII
C.3.5 KW5	LXXXVIII
C.3.6 KW6	LXXXVIII
C.3.7 KW7	LXXXIX
C.3.8 KW8	LXXXIX

Abbildungsverzeichnis

2.1	Potentielle Eintragswege von Human- und Veterinärpharmaka sowie Futtermittelzusatzstoffen in die aquatische Umwelt	6
2.2	Schema einer APCI-Quelle	25
2.3	Funktionsweise der linearen Ionenfalle	27
2.4	Funktionsschema LTQ Orbitrap	28
3.1	Schematische Herangehensweise	35
4.1	Schema des KW4 mit Probenahmestellen	42
4.2	Aufbau der verwendeten HPLC-MS-SPE-NMR-Anlage	50
5.1	Einige Metaboliten von CBZ	53
5.2	APCI-Fullscan-Spektrum eines CBZ-Standards	54
5.3	Produktionenscan eines CBZ-Standards	54
5.4	MS- sowie UV-Chromatogramme des U_CBZ1-Urineluates (APCI)	55
5.5	MS- sowie UV-Chromatogramme des U_CBZ1-Urineluates (ESI)	56
5.6	Full scan-Spektren des U_CBZ1-Urineluates bei der RT von 17,6 min (APCI)	56
5.7	Full scan-Spektren des U_CBZ1-Urineluates bei der RT von 17,6 min (ESI)	57
5.8	Full scan-Spektren des U_CBZ1-Urineluates bei der RT von 12,3 min (APCI)	58
5.9	Full scan-Spektren des U_CBZ1-Urineluates bei der RT von 12,3 min (ESI)	58
5.10	Full scan-Spektren des U_CBZ1-Urineluates bei der Retentionszeit von 11,8 min (APCI)	59
5.11	Full scan-Spektren des U_CBZ1-Urineluates bei der Retentionszeit von 11,8 min (ESI)	59
5.12	Produktionenspektren des Ions mit m/z 271 bei der RT von 12,3 min	60
5.13	Produktionenspektren des Ions mit m/z 253 bei der RT von 12,3 min	61

5.14	Produktionenspektren des Ions mit m/z 208 bei der RT von 12,3 min	62
5.15	Produktionenspektren des Ions mit m/z 447 bei der RT von 11,8 min	63
5.16	Produktionenspektren des Ions mit m/z 253 bei der RT von 11,8 min	63
5.17	Produktionenspektren des Ions mit m/z 208 bei der RT von 11,8 min	64
5.18	MRM-Chromatogramme von Urin- und Klarwassereluaten bei der RT von 12,3 min	67
5.19	MRM-Chromatogramme von Urin- und Klarwassereluaten bei der RT von 14,4 min und 14,8 min	67
5.20	MRM-Chromatogramme von Urin- und Klarwassereluaten bei den RT von 14,5 min bzw. 14,9 min	68
5.21	Diclofenac und seine Derivate	69
5.22	APCI-full scan-Spektrum eines Diclofenac-Standards	70
5.23	APCI-Produktionenspektren eines Diclofenac-Standards	71
5.24	MS-Chromatogramme des Urineluates U_DF1	72
5.25	Full scan-Spektren des Urineluates U_DF1 bei der RT von 22,2 min	73
5.26	Full scan-Spektren des Urineluates U_DF1 bei der RT von 20,5 min	74
5.27	Produktionenspektren des Ions mit m/z 312 bzw. 310 bei der RT von 20,5 min . . .	75
5.28	MRM-Chromatogramme von Urin- und Klarwassereluaten bei der RT von 22,2 min	77
5.29	MRM-Chromatogramme von Urin- und Klarwassereluaten bei der RT von 20,6 min	78
5.30	Metabolismus von Paracetamol	79
5.31	Full scan-Spektrum eines Paracetamol-Standards	80
5.32	Produktionenspektren eines Paracetamol-Standards	80
5.33	MS- und UV-Chromatogramme des Urineluates U_PCM1	81
5.34	APCI-full scan-Spektrum des Urineluates U_PCM1 bei der RT von 7,2 min	81
5.35	APCI-full scan-Spektrum des Urineluates U_PCM1 bei der RT von 8,0 min	82
5.36	Produktionenspektren des Ions mit m/z 152 bei der RT von 8,0 min	82
5.37	APCI-full scan-Spektrum des Urineluates U_PCM1 bei der RT von 8,9 min	83
5.38	Produktionenspektren des Ions mit m/z 313 bei der RT von 8,9 min	84
5.39	Schema der präparativen Trennung der Urinprobe U_DF4	86
5.40	UV-Chromatogramme (254 nm) der Gradiententrennungen des Urinprobeneluates U_DF4	87
5.41	UV-Chromatogramme der isokratischen Auftrennungen von Urinprobeneluaten . .	89

5.42 Positive HRMS-Messungen von 4'-OHDD	90
5.43 Fragmentierungsmuster von 4'-OHDD	92
5.44 HMBC-Spektrum von 4'-OHDD	93
5.45 HMBC-Spektrum von 4'-OHD	94
5.46 HMBC-Spektrum von 5-OHD	94
5.47 Nachweis der DF-Metaboliten im Urineluat U_DF4	96
5.48 Nachweis- und Bestimmungsgrenze	97
5.49 Mecoprop	98
5.50 Vergleich der Chromatogramme und des OHD-SRM-Überganges bei Einsatz verschiedener Säulentypen	100
5.51 Vergleich des OHD-SRM-Überganges bei verschiedenen Zusammensetzungen der isokratischen Stufe des Gradientenprogrammes	101
5.52 MRM-Chromatogramm des Eluates einer Realprobe	101
5.53 Vergleich der SPE-Materialien bei drei pH-Werten	102
5.54 Boxplots der Ergebnisse der „Abwasseranalyse“	105
5.55 Konzentrationsverlauf von DF und seinen Metaboliten in KW3	106
5.56 Boxplots der DF-Konzentrationen in den verschiedenen Klärwerken	107
5.57 Boxplots der 4'-OHD-Konzentrationen in den verschiedenen Klärwerken	108
5.58 Boxplots der 5-OHD-Konzentrationen in den verschiedenen Klärwerken	108
5.59 Boxplots der 4'-OHDD-Konzentrationen in den verschiedenen Klärwerken	109
5.60 Konzentrationen von DF und seinen Metaboliten innerhalb eines zweistufigen Belebtschlamm-Klärwerks	111

Tabellenverzeichnis

2.1	Übersicht über die zehn am häufigsten verordneten Arzneimittelwirkstoffe in Deutschland 2006	5
2.2	Übersicht über die zehn nach Packungen am häufigsten verkauften Arzneimittelwirkstoffe in Deutschland 2001	5
2.3	Mittlere Konzentrationen einiger Wirkstoffe in geklärtem Abwasser	9
2.4	Konzentrationen einiger Wirkstoffe in Kläranlagen in der Literatur	9
2.5	Konzentrationen einiger Wirkstoffe in Oberflächengewässern in der Literatur	10
2.6	Phase-I-Reaktionen in der Biotransformation von Arzneimitteln	12
2.7	Phase-II-Reaktionen von Arzneimitteln und charakteristische Merkmale in der Massenspektrometrie	13
2.8	Clofibrinsäurekonzentrationen in der Literatur	14
2.9	Konzentrationen der untersuchten Ibuprofenmetaboliten in der Literatur	16
2.10	Konzentrationen der umweltrelevanten Metaboliten von Phenazon, Propyphenazon, Metamizol und DMAA in der Literatur	17
2.11	Analysemodi in der Massenspektrometrie	29
4.1	Probenbezeichnungen	40
4.2	Eigenschaften der beprobten Klärwerke (KW)	41
4.3	Pufferzugaben für die Optimierung der SPE-Methode	43
4.4	Gradientenprogramm der HPLC zum „Urinproben-“ sowie „Abwasserscreening“, abhängig vom Ionisierungstyp	44
4.5	Gradientenprogramm der HPLC zur analytischen Bestimmung von Diclofenac und seinen Metaboliten	45
4.6	Gradientenprogramm für die HPLC-MS-NMR-Messung	45
4.7	Gradientenprogramm für die HPLC – HRMS ⁿ -Messung	46

4.8	Gradientenprogramm der ersten Gradiententrennung (A) in der präparativen HPLC	46
4.9	Gradientenprogramm der zweiten Gradiententrennung (B) in der präparativen HPLC	47
4.10	MRM-Bedingungen für das Screening von Wasserproben aus Klärwerken	49
5.1	MRM-Übergänge für das CBZ-Abwasserscreening	65
5.2	Ergebnisse des MRM-CBZ-Realprobenscreenings	66
5.3	Vorläufige MRM-Übergänge für das DF-Abwasserscreening	76
5.4	Vorläufige MRM-Übergänge für das PCM-Abwasserscreening	85
5.5	Instrumentelle und methodische Nachweis- (NG) und Bestimmungsgrenzen (BG) .	103
5.6	Wiederfindungsraten von DF und seinen Metaboliten in den verschiedenen Matrices	104
A.1	Endpunkte in Toxizitätsbestimmungen	III
A.2	Einige Referenzorganismen aus der Umweltverträglichkeitsprüfung	IV

Abkürzungsverzeichnis

a. u.	arbitrary units - gerätespezifische Einheit
ABC	N-Acetyl-p-benzochinonimin
AF	Aceclofenac
AGC	automatic gain control
AMDOPH	1-Acetyl-1-methyl-2-dimethyloxamoyl-2-phenylhydrazid
APCI	atmospheric pressure ionisation
ASS	Acetylsalicylsäure
BG	Bestimmungsgrenze
CBZ	Carbamazepin
CBZE	Carbamazepin-10,11-epoxid
CID	collision induced dissociation
COSY	correlation spectroscopy
COX	Cyclooxygenase
δ	chemische Verschiebung
DF	Diclofenac
DHC	10,11-Dihydrocarbamazepin
DiOHD	Dihydroxy-Diclofenac
DMAA	Dimethylaminoantipyrin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMeA	European Medicines Agency – Europäische Arzneimittelagentur
ESI	electrospray ionisation
FA	Formic Acid - Ameisensäure
FFT	fast fourier transformation – schnelle Fourier Transformation
FID	free induction decay – freier Induktionszerfall
FS	Fullscan
GKV	Gesetzliche Krankenversicherung
GlcA	Glucuronid

HMBC	heteronuclear multiple bond coherence
HPLC	high performance liquid chromatography – Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPLC-MS	high performance liquid chromatography-mass spectrometry – Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
HRMS	high resolution mass spectrometry – hochauflösende Massenspektrometrie
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
IS	Interner Standard
KE	Kollisionsenergie
KW	Klärwerk
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry – Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
LT	linear ion trap – Lineare Ionenfalle
Max.	Maximalwert
Med.	Median
Min.	Minimalwert
Mit.	Mittelwert
MRM	multiple reaction monitoring
NaOH	Natriumhydroxid
NG	Nachweisgrenze
NL	neutral loss
NMR	nuclear magnetic resonance spectroscopy – Kernspinresonanzspektroskopie
NSAID	non steroidal anti inflammatory drugs – nicht steroidale Antirheumatika
OH-CBZ	Hydroxycarbamazepin
(OH) ₂ -DHC	trans-10,11-Dihydro-10,11-dihydroxycarbamazepin
OH-PCMS	Hydroxy-Paracetamolsulfat
OHAF	Hydroxyaceclofenac
OHD	Hydroxydiclofenac
OMe-PCMS	Methoxy-Paracetamolsulfat
PCM	Paracetamol
PCMS	Paracetamolsulfat
PEC	predicted environmental concentration
PIS	product ion scan
PNEC	predicted no effect concentration
PQD	pulsed q collision induced dissociation

PreIS	precursor ion scan
RF	radio frequency – hochfrequente Wechselspannung
S/N	signal to noise ratio – Signal-Rausch-Verhältnis
SA	Schlammalter
SIM	selected ion monitoring
SPE	solid phase extraction – Festphasenextraktion
SRM	selected reaction monitoring
SS	Salicylsäure
TIC	Totalionenstrom-Chromatogramm
TMS	Tetramethylsilan
TSQ	triple stage quadrupol
UVP	Umweltverträglichkeitsprüfung
WFR	Wiederfindungsrate
WHO	World Health Organization

Kapitel 1

Einleitung und Ziel der Arbeit

Die Menge der allein in Deutschland produzierten Arzneimittel (Human- und Tierpharmaka) beträgt über 30 000 t jährlich. Unter den am häufigsten verordneten Wirkstoffen sind vor allem solche, die ständig eingenommen werden müssen. Die größten Gruppen, die dazugehören, sind die Mittel gegen Schmerzen, Erkältungskrankheiten oder stressbedingte Erkrankungen. Viele Arzneimittel werden jedoch auch ohne Verschreibungen verkauft. Auch bei den Produktions- oder Verkaufsmengen stehen die Schmerzmittel sowie die Mittel gegen Erkältungskrankheiten mit an oberster Stelle. Über die Ausscheidungen des Patienten, aber auch über die Lagerung bzw. unsachgemäße Entsorgung der Präparate können diese Wirkstoffe in die Umwelt gelangen.

1.1 Arzneimittel in der aquatischen Umwelt

Seit Mitte der 1970er Jahre wurde eine zunehmende Anzahl von Arzneimittelwirkstoffen in verschiedenen Umweltproben wie Abwasser, Oberflächen- oder auch Grund- und Trinkwasser ermittelt. Zu den in den höchsten Konzentrationen vorkommenden Wirkstoffen gehörten hauptsächlich Schmerzmittel. Die ermittelten Werte lagen im Abwasser meist im $\mu\text{g}/\text{l}$ -Bereich, im Oberflächenwasser im ng/l -Bereich. Die zunehmende Zahl der detektierten Stoffe ist dabei vor allem auf die instrumentelle Entwicklung der Analytik zurückzuführen, die zu einer stetigen Verringerung der Nachweisgrenzen dieser Substanzen führte. Aber auch die zunehmende Sensibilisierung für den Eintrag von Xenobiotika in die Umwelt spielte eine Rolle.

Im Körper werden die Wirkstoffe zu meist polareren Metaboliten umgesetzt, welche ebenfalls ausgeschieden werden können. Darunter sind vor allem die ein- oder zweifach hydroxylierten Wirkstoffe, Oxidationsprodukte oder Verbindungen mit Glucuronsäure (Glucuronide) sowie Schwefelsäure (Sulfate), die sogenannten Konjugate. Durch den polareren Charakter sind die Metaboliten oft besser wasserlöslich als der entsprechende Wirkstoff.

Eine der ersten Substanzen aus dem pharmazeutischen Bereich, die in Umweltproben gefunden wurde, war Clofibrinsäure, der Metabolit einiger Wirkstoffe aus der Gruppe der Fibrate. In wenigen Fällen wurden inzwischen auch andere Arzneimittelmetaboliten untersucht. So sind einige Metaboliten der Wirkstoffe Acetylsalicylsäure (ASS), Ibuprofen, Carbamazepin (CBZ) und der Gruppe der Pyrazolone (z. B. von Phenazon, Propyphenazon, Dimethylaminoantipyrin (DMAA) oder Metamizol) in verschiedenen wässrigen Proben bis hin zu Trinkwasser detektierbar (vgl. Abschnitt 2.4).

1.2 Ziel der Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit war es, anhand einiger Wirkstoffe eine Methode zu finden, mit deren Hilfe abgeschätzt werden kann, ob ein Wirkstoff persistente Metaboliten hervorbringt bzw. selbst persistent ist.

Dafür wurde zunächst der Urin von Patienten, die mit dem entsprechenden Wirkstoff behandelt worden waren, auf den Wirkstoff und dessen humane Stoffwechselprodukte (Metaboliten) sowie andere strukturverwandte Verbindungen massenspektrometrisch untersucht. Dies geschah vor allem über Fragmente, die für die entsprechende Substanz charakteristisch sind. Eine über die Fragmente entwickelte Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS) Methode diente der spezifischen Erkennung der gefundenen Metaboliten. Unter Verwendung dieser Methode konnte daraufhin das Vorkommen des Wirkstoffs und seiner Derivate in Zu- und Ablauf einer deutschen Kläranlage untersucht werden.

Um diese Vorgehensweise zu bestätigen, wurde zunächst CBZ verwendet; ein Wirkstoff, dessen Metaboliten schon als umweltrelevant bekannt wurden. Daraufhin konnte diese Methode an den Wirkstoffen Diclofenac und Paracetamol überprüft werden, für die noch keine umweltrelevanten Metaboliten bekannt waren.

Ein weiteres Ziel war es, die dadurch als umweltrelevant eingestuften Derivate (kein offensichtlicher Abbau in der Kläranlage) mittels präparativer HPLC zu isolieren, um Standards zu erhalten. Mit diesen wurde der Nachweis und die Quantifizierung in Abwasserproben aus verschiedenen deutschen Kläranlagen zur Bestätigung der Umweltrelevanz möglich. Außerdem sollte durch weitergehende Untersuchungen die Identität der Metaboliten bestätigt werden. Eine Beschreibung der Herangehensweise sowie der Auswahl der untersuchten Wirkstoffe erfolgt in Kapitel 3.

Kapitel 2

Grundlagen

Zuerst soll in diesem Abschnitt ein Einblick in die Verwendung und den Metabolismus von Arzneimitteln sowie in bereits veröffentlichte Untersuchungsergebnisse über das Vorkommen von Wirkstoffen und Metaboliten in der Umwelt gegeben werden. Daran schließt die Erläuterung der verwendeten Untersuchungsmethoden und -geräte an.

2.1 Pharmazeutika

Im Jahr 2004 wurden in Deutschland durch die gesetzlichen Krankenversicherungen (GKV) 22 Milliarden € für Arzneimittel ausgegeben (Schwabe und Paffrath, 2006). Mit den frei verkäuflichen Medikamenten waren es 2004 insgesamt fast 33 Milliarden € und im Jahre 2005 über 35 Milliarden €. Dies entsprach jeweils über 1 500 Millionen Packungseinheiten, davon knapp 690 Millionen von Ärzten verschriebenen Packungen (BAH, 2005, 2006). Die Anzahl der insgesamt zugelassenen Arzneimittel betrug im Jahr 2005 knapp 40 000 (Schwabe und Paffrath, 2006), die Produktionsmengen in Deutschland belaufen sich jährlich ca. auf 29 000 t Humanarzneimittel. zuzüglich 2 300 t Tierarzneien (Blech, 2005, Seite 94). Die World Health Organization (WHO) hält lediglich 330 Wirkstoffe für unentbehrlich. Mit ihnen ließen sich der Großteil der übertragbaren und nicht-übertragbaren Krankheiten heilen, wobei sie in funktionierenden Gesundheitssystemen jederzeit und in ausreichenden Dosen der entsprechenden Qualität und zu bezahlbaren Preisen verfügbar seien (World Health Organization WHO, 2007). Zur Zeit enthält das Arzneimittelverzeichnis für Deutschland knapp 2400 verschiedene Wirkstoffe; in Europa sind sogar mehr als 3000 Wirkstoffe zugelassen (Rote Liste, 2007; Zwiener, 2007).

In den Statistiken der GKV oder ähnlicher Institutionen werden meistens die führenden Arzneimittel nach Umsatz oder Verschreibungen angegeben. Für diese Arbeit sind jedoch vor allem die

Mengen der Wirkstoffe interessant, die in Umlauf kommen, um zu sehen, ob die Wirkstoffe überhaupt in messbaren Konzentrationen in der Umwelt vorkommen können.

Da die umsatzstärksten Arzneien meistens auch die teuersten Wirkstoffe enthalten, diese aber deswegen nicht unbedingt oft verwendet werden, ist hier zunächst die Menge der Verordnungen interessant. In Deutschland gibt es dabei unter den 2006 am häufigsten verordneten zehn Wirkstoffen (Tabelle 2.1) vor allem solche, die ständig eingenommen werden müssen, wie das Schilddrüsenhormon L-Thyroxin oder das Protein Insulin, wenn ein chronischer Mangel bei Patienten behandelt werden muss. Eine weitaus größere Gruppe stellen die Mittel gegen Schmerzen und Entzündungen sowie gegen Erkältungskrankheiten dar. Auffallend oft sind auch Mittel gegen stressbedingte Erkrankungen vorhanden, wie Blutdrucksenker (z. B. die so genannten β -Rezeptoren-Blocker) oder Mittel gegen Magenerkrankungen. Auch Blutfett senkende Medikamente werden sehr häufig verordnet, der Hauptwirkstoff hierbei ist Simvastatin (Rote Liste, 2007; Glaeske und Janhsen, 2006, Tabelle 7).

Allerdings zeigt die Anzahl der Verordnungen noch nicht, wieviel Wirkstoff wirklich in den Umlauf kommt. Zusätzlich werden viele Arzneimittel in Selbstmedikation verwendet. Mangels relevanter Veröffentlichungen über die tatsächlichen Verbrauchsmengen von Humanarzneimitteln (Rohweder, 2003; Fent u. a., 2006) kann nur über die Anzahl der verkauften Packungen versucht werden, auf die Wirkstoffe zu schließen, die in den größten Mengen verwendet werden. Leider werden auch diese Daten selten veröffentlicht.

Zu den am häufigsten verkauften Arzneimitteln in Deutschland 2001 (Tabelle 2.2) gehören vor allem die schon bekannten Schmerzmittel mit Wirkstoffen wie Acetylsalicylsäure (ASS), Paracetamol (PCM), Diclofenac (DF) oder Ibuprofen (Rote Liste, 2007; Glaeske und Janhsen, 2003, Tabelle 2.4). Auch diverse Mittel gegen Erkältungskrankheiten gehören dazu. Deren Wirkstoffe sind vor allem Xylometazolin (ein Schnupfenmittel), Acetylcystein oder Ambroxol.

Der Arzneimittelmarkt ist immer Schwankungen unterworfen, sei es z. B. durch die sich ändernden Verschreibungsgewohnheiten der Ärzte, Markteinführungen neuer Medikamente oder z. B. durch Änderungen in den Regelungen des Gesundheitswesens.

Weiterhin sollte berücksichtigt werden, dass einige Wirkstoffe (z. B. das synthetische Steroidhormon 17α -Ethinylestradiol, EE2) schon in sehr geringen Konzentrationen hochwirksam sind oder eine hohe Persistenz aufweisen (Fent u. a., 2006). Schon in den 1960er Jahren wurde dieses am Beispiel einiger organischer Pflanzen- und Insektenschutzmittel¹ weltweit bekannt gemacht (Carson, 1962, Seite 13ff.). Einige lagern sich in den Fettschichten des Körpers von Menschen und Tieren ein und können dadurch zu Leber- oder Nervenschäden, Unfruchtbarkeit und anderen Schäden führen.

¹z. B. chlorierte Kohlenwasserstoffe wie DDT, Aldrin oder Endrin bzw. Phosphorsäureester wie Parathion oder Malathion

Tabelle 2.1: Übersicht über die zehn am häufigsten verordneten Arzneimittelwirkstoffe in Deutschland 2006 (Rote Liste, 2007; Glaeske und Janhsen, 2006, Tab. 7).

Wirkstoff	Präparatebeispiele	Anwendungsgebiet	Tsd. Verordn.
Levothyroxin	L-Tyroxin Henning [®] , Thyronajod [®] , Euthyrox [®] , L-Thyrox-Hexal [®] , Jodthyrox [®] etc.	Schilddrüsenunterfunktion	279
Diclofenac (DF)	Voltaren [®] , Diclofenac-ratiopharm [®] , Diclac [®] , Diclo KD [®] , Diclo 1A Pharma etc.	Schmerzen, Entzündungen	252
Ibuprofen	Nurofen [®] , IbuHEXAL [®] , Ibuprofen AL, Ibuprofen STADA [®] , Ibu-ratiopharm [®] , Dolormin [®] etc.	Schmerzen, Entzündungen, Fieber	212
Metoprolol	MetoHEXAL [®] , Beloc [®] , Metoprolol-ratiopharm [®] , Metoprolol-STADA [®] etc.	Bluthochdruck, Herzprobleme, Migräne	150
Omeprazol	Omeprazol [®] , Omeprazol-ratiopharm [®] , Omeprazol-STADA [®] etc.	Magengeschwüre, Refluxkrankheit	142
Xylometazolin	Nasenspray-/Gel-ratiopharm, Otriven [®] , Nasic (K) [®] , Olynth [®] etc.	Schnupfen	131
Insulin	Actrapid [®] , Lantus [®] , Humalog [®] , Novo-Rapid [®] , Protaphane [®] , Actraphane [®] etc.	Diabetes	102
Simvastatin	SimvaHEXAL [®] , Simvastatin-ratiopharm [®] , Simvabeta [®] , Simvastatin-STADA [®] etc.	zur Cholesterinsenkung	100
Metamizol	Novaminsulfon-ratiopharm [®] , Novalgin [®] , Novaminsulfon-Lichtenstein, MetamizolHEXAL [®] etc.	Schmerzen, Fieber	97
Ambroxol	Spasmo- (K)/Mucosolvan [®] , Ambroxol AL, Ambroxol-ratiopharm [®] etc.	Asthma, Bronchitis	89

Verordn.: Verordnungen; K: Kombinationspräparat

Tabelle 2.2: Übersicht über die zehn nach Packungen am häufigsten verkauften Arzneimittelwirkstoffe in Deutschland 2001 (Rote Liste, 2007; Glaeske und Janhsen, 2003, Tabelle 2.4).

Wirkstoff	Präparatebeispiele	Anwendungsgebiet	Mio. Pkg
Acetylsalicylsäure (ASS)	Thomapyrin (K) [®] , Aspirin [®] , ASS-ratiopharm [®] , Dolomo (K) [®] , ASS-HEXAL [®] etc.	Schmerzen, Entzündungen, Fieber, Durchblutungsstörungen	55
Xylometazolin	Nasenspray-/Gel-ratiopharm [®] , Otriven [®] , Nasic (K) [®] , Olynth [®] etc.	Schnupfen	38
Paracetamol (PCM)	Paracetamol-ratiopharm [®] , Thomapyrin (K) [®] , Dolomo (K) [®] , Paracetamol AL [®] etc.	Schmerzen, Fieber	34
Diclofenac (DF)	Voltaren [®] , Diclofenac-ratiopharm [®] , Diclac [®] , Diclo KD [®] , Diclo 1A Pharma etc.	Schmerzen, Entzündungen	21
Acetylcystein	ACC [®] , NAC-ratiopharm [®] , Flumucil [®]	Erkältungskrankheiten (Schleimlöser)	20
Koffein	Thomapyrin (K) [®] , Dolomo (K) [®]	(Wirkungsverstärkung bei Mitteln gegen) Schmerzen	16
Dexpanthenol	Bepanthen [®] , Corneregel [®] , nasic [®]	Wundheilung	14
Ibuprofen	Nurofen [®] , IbuHEXAL [®] , Ibuprofen AL, Dolormin [®] etc.	Schmerzen, Entzündungen, Fieber	9
Ambroxol	Spasmo- (K) [®] /Mucosolvan [®] , Ambroxol AL, Ambroxol-ratiopharm [®] etc.	Erkältungskrankheiten (Schleimlöser)	8
Levothyroxin	L-Tyroxin Henning [®] , Thyronajod [®] , Euthyrox [®] , L-Thyrox-Hexal [®] , Jodthyrox [®] etc.	Schilddrüsenunterfunktion	7

Pkg: Packungen; K: Kombinationspräparat

2.2 Pharmazeutische Wirkstoffe in der aquatischen Umwelt

Der größte Teil der von Menschen, aber auch von Tieren ausgeschiedenen Pharmazeutika sowie ihrer Metaboliten gelangt durch bestimmungsgemäßen Gebrauch, ein anderer ungenutzt in das Abwassersystem (Fent u. a., 2006). Bei mangelndem Abbau in den Kläranlagen erreichen sie die aquatische Umwelt (Abbildung 2.1) (Ternes, 2000). Außerdem kommt es zum Eintrag durch unversiegelte Lagerung von Abfall aus Krankenhäusern oder Arzneimittelproduktionen bzw. durch die Applikation von Gülle oder Abwasser auf Felder (Wiegel u. a., 2004; Fent u. a., 2006). Über analytische Funde in verschiedenen Proben wie Ab-, Oberflächen- oder Grundwasser bzw. auch Klärschlamm oder Gülle, die auf etwa 100 pharmazeutische Wirkstoffe getestet wurden, sind Berichte erhältlich (Zwiener, 2007).

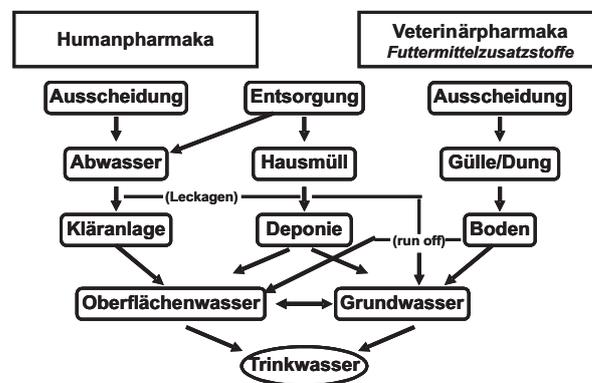


Abbildung 2.1: Potentielle Eintragswege von Human- und Veterinärpharmaka sowie Futtermittelzusatzstoffen in die aquatische Umwelt (entsprechend Ternes, 2000).

Verschiedene nicht steroidale Antirheumatika² (NSAID, von engl.: „non steroidal anti inflammatory drugs“), Lipidregulatoren, β -Blocker, Clofibrinsäure oder auch Carbamazepin (CBZ) haben sich dabei als stark in der Umwelt vertreten herausgestellt (Halling-Sørensen u. a., 1998; Heberer u. a., 1998; Daughton und Ternes, 1999; Ternes, 2001; Kümmerer, 2001; Heberer, 2002a; Richardson, 2004; Zwiener, 2007). In den Kläranlagen kann es durch Mikroorganismen zur Dekonjugation vorhandener Metaboliten (vgl. 2.3 auf Seite 11) zu den entsprechenden Wirkstoffen bzw. Metaboliten kommen, wodurch sich deren Konzentrationen während der Passage des Klärwerks nicht nur verringern, sondern auch erhöhen können (Stumpf u. a., 1998; Hao u. a., 2007).

Der Eintrag der verschiedenen Substanzen in die Umwelt ist von ökotoxikologischer Relevanz (Fent u. a., 2006), wie schon das Beispiel DF zeigt (vgl. Abschnitt 2.5.3 auf Seite 20). Immer mehr Substanzen wurden inzwischen ökotoxikologischen Tests unterzogen (z. B. für die UVP, vgl. Abschnitt A auf Seite II). Es wird jedoch kaum über Langzeitstudien berichtet, obwohl viele aquatische Organismen ihr ganzes Leben diesen Substanzen ausgesetzt sein können. Dabei wurde festgestellt,

²Sie werden nichtsteroidal genannt, um sie von den Glucocorticoiden (Steroidhormonen) abzugrenzen (Gentili, 2007)

dass sich die toxische Wirkung der Einzelstoffe in Gemischen noch verstärken kann (Cleuvers, 2003, 2004).

Auch auf die Gesetzgebung haben diese Gefahren mehr und mehr Einfluss genommen. Die Umsetzung der Richtlinie 92/32/EWG zur siebten Änderung der Chemikalienrichtlinie 67/548/EWG erfolgte in Deutschland mit der 2. Novellierung des Chemikaliengesetzes vom 29. Juli 1994 (BGBl. I, S. 1703). Das Chemikaliengesetz legt fest, welche physikalisch-chemischen, toxikologischen und ökotoxikologischen Daten ein Anmelder der Anmeldestelle in Deutschland mitzuteilen hat. Anhand dieser Daten werden die Stoffe auf möglicherweise von ihnen ausgehende Gefahren bewertet (Umweltbundesamt, 2007) (vgl. Anhang A). Im Dezember 2006 verabschiedeten das Europäische Parlament und der Rat die Verordnung Nr. 1907/2006 (REACH-Verordnung) zur Zulassung von Chemikalien, in der unter anderem auch die Untersuchung der Auswirkungen der Abbau- und/oder Umwandlungsprodukte von chemischen Stoffen auf die Umwelt (bei bestimmungsgemäßem Gebrauch) gefordert wird (Europäisches Parlament, Rat, 2006). Die Verordnung ist am 1. Juni 2007 in Kraft getreten, und wurde mit der Neufassung des Chemikaliengesetzes 2008 (BGBl. I, S. 1146) in Deutschland umgesetzt, jedoch sind einige Artikel bzw. Teile noch ausgesetzt.

Einige der wichtigsten Funde von Arzneimittelwirkstoffen in der aquatischen Umwelt werden in den folgenden Abschnitten näher genannt.

2.2.1 Pharmazeutische Wirkstoffe in der Kläranlage

Durch die Produktion vieler Arzneimittel und deren ständige Einnahme werden diese auch relativ konstant in die Klärwerke eingebracht (Fent u. a., 2006). Durch die geringe Flüchtigkeit der Pharmazeutika sind für sie dort im allgemeinen zwei Eliminierungswege wichtig: die Adsorption an suspendierte Partikel (Klärschlamm) und der Abbau durch Mikroorganismen (Biodegradation). Die Adsorption hängt dabei stark von hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen der Arzneimittel mit den Partikeln und auch den Mikroorganismen ab. Bei neutralem pH-Wert liegen saure Verbindungen (wie z. B. viele NSAID oder Clofibrinsäure) als negative Ionen vor. Ihre Adsorption ist daher gehemmt; sie werden eher durch Biodegradation entfernt. Außerdem spielen die Verweilzeit in dem Klärwerk (KW) sowie das Schlammalter (SA) eine Rolle, wodurch sich die Mikroorganismen besser oder schlechter an die Substanzen adaptieren können.

CBZ bzw. DF werden von den Mikroorganismen im Klärschlamm teilweise kaum abgebaut (durchschnittliche Abbauquote in der betrachteten Kläranlage 7 - 8 % bzw. 17 %), Dimethylaminoantipyrin (DMAA), Phenazon bzw. Propyphenazon (38 %, 33-43 % bzw. 64 %) eher schlecht, Bezafibrat bzw. ASS dagegen relativ (83 % bzw. 81 %) und Ibuprofen bzw. Salicylsäure (SS) sehr gut (90 % bzw. 88 %) (Ternes, 1998; Heberer, 2002b). Die Werte sind jedoch außer von den oben beschriebe-

nen Faktoren auch von der Art der Abwasserbehandlung, von den Temperaturen und vom Wetter abhängig und schwanken, besonders zwischen verschiedenen Kläranlagen. So kann DF in einer Frankfurter Kläranlage auch relativ gut abgebaut werden (69%).

Fent u. a. (2006) erstellten eine Übersicht über einige in den Jahren 1998 bis 2005 veröffentlichte Artikel über das Vorkommen von Pharmazeutika (vgl. Tabelle 2.3). Unter den in Klärwerksabläufen am häufigsten im $\mu\text{g/l}$ -Bereich ihrer Konzentrationen vertretenen Stoffe sind Naproxen, SS, Ibuprofen, DF, Bezafibrat und CBZ. Über Maximalwerte (Max.) für diesen Bereich wird jedoch auch für ASS und Fenofibrat berichtet. Mediane bzw. Mittelwerte (Med. bzw. Mit.) im oberen ng/l -Bereich der Konzentrationen wurden bei Fenofibrat gefunden. Im unteren ng/l -Bereich der Konzentrationen waren Med. bzw. Mit. von ASS, Phenazon und PCM vertreten.

Einzelne gefundene Werte verschiedener untersuchter Wirkstoffe sind in Tabelle 2.4 angegeben. Es fällt auf, dass die medianen CBZ-Konzentrationen in Deutschland sogar noch höher sind als in den oben angegebenen Bereichen (POSEIDON, 2006). PCM dagegen wird vollständig abgebaut, was jedoch an einer UV-Behandlung in der untersuchten Kläranlage liegen kann (Roberts und Thomas, 2006).

Obwohl (S)-Ibuprofen vom Menschen vermehrt ausgeschieden wird, kommt es in der Kläranlage zu einem bevorzugten Abbau dieses Enantiomers. Demzufolge betrug laut einer Arbeit von Buser u. a. (1999) das S/R-Enantiomerenverhältnis vor der Behandlung in der Kläranlage 5,5-8, danach nur noch 0,9-2.

2.2.2 Pharmazeutische Wirkstoffe im Oberflächenwasser

Durch die schlechten Abbauraten einiger Wirkstoffe in den Kläranlagen werden sie mit den Abläufen in die Oberflächengewässer eingetragen und sind dort zum Teil noch detektierbar (Scheytt u. a., 2000; Wiegel u. a., 2004). Ein anderer Weg ist der Eintrag durch Produktionsrückstände der Industrie. Biologischer Abbau findet in Oberflächengewässern kaum noch statt, viel eher Photodegradation an der Wasseroberfläche (Fent u. a., 2006).

Bei dem Betrachten der in den Jahren 1998 bis 2005 veröffentlichten Daten über das Vorkommen der Arzneimittel im Oberflächenwasser waren noch einige Med. oder Mit. in Konzentrationen des unteren ng/l -Bereichs vertreten (SS, DF, Naproxen, PCM, Phenazon, Bezafibrat und CBZ), für ASS wurde ein Max. von etwa $0,3 \mu\text{g/l}$ veröffentlicht, und Ibuprofen zeigte sogar bis zu $1 \mu\text{g/l}$ (Fent u. a., 2006). Die Max. blieben jedoch unter $10 \mu\text{g/l}$. Einige gefundene Werte der untersuchten Wirkstoffe sind in Tabelle 2.5 angegeben. Hier fällt auf, dass für DF ein Max. von $15 \mu\text{g/l}$ detektiert wurde (Jux u. a., 2002).

Tabelle 2.3: Mittlere Konzentrationen einiger Wirkstoffe in geklärtem Abwasser (Fent u. a., 2006).

Name	Konzentrationen [$\mu\text{g/l}$]		
	Median	Mittelwert	Maximalwert
Naproxen	> 0,01 - > 10	> 0,1 - > 1	40
Salicylsäure (SS)	ca. 5		60
Ibuprofen	> 0,01 - > 1		> 80 (mehrere)
Diclofenac (DF)	> 0,1 - ca. 1	> 0,01 - > 1	> 5
Bezafibrat	> 0,1 - ca. 1	> 0,1 - ca. 1	ca. 10 (mehrere)
CBZ	> 0,5 - > 1		> 6 (mehrere)
Fenofibrat	> 0,1 - ca. 0,3		> 0,03 - ca. 1
Acetylsalicylsäure (ASS)	ca. 0,03		> 1
Phenazon	ca. 0,1	ca. 0,1	> 0,1 - ca. 0,5
Paracetamol (PCM)	0,11		

Tabelle 2.4: Konzentrationen einiger Wirkstoffe in Kläranlagen in der Literatur

Wirkstoff	Median-/ Maximal-Konzentration [$\mu\text{g/l}$] in		aus/ Bemerkungen
	Zulauf	Ablauf	
ASS		0,22 / 1,5	Ternes, 1998; 49 deutsche Klärwerke
PCM	6,9 / 70	< BG	Roberts und Thomas, 2006; 1 Kläranlage über 1 d (n = 3), Howdon, England
DF	3,0 / 7,1	2,5 / 4,7	Heberer, 2002; 3 Kläranlagen, n = 10 - 27, Berlin
	3,5 / 28	0,81 / 2,1	POSEIDON, 2006; Deutschland
	1,0 / 1,0	0,29 / 0,60	Roberts und Thomas, 2006; 1 Kläranlage über 1 d (n = 3), Howdon, England
Ibuprofen	28 /	3,0 / 4,2	Roberts und Thomas, 2006; 1 Kläranlage über 1 d (n = 3), Howdon, England
	5,0 / 14	0,37 / 3,4	POSEIDON, 2006; Deutschland
		0,34 / 1,9	Stumpf u. a., 1998; 10 verschiedene deutsche Kläranlagenabläufe über 1 d
	4,3 (Mit.)	2,0 (Mit.)	1 Kläranlage in Frankfurt über 5 d
		0,027 / 0,43	Gross u. a., 2004
Phenazon	0,35 / 0,45	0,33 / 0,41	Zuehlke u. a., 2004; Berlin (n = 12)
Propyphenazon	0,12 / 0,18	0,13 / 0,17	Zuehlke u. a., 2004; Berlin (n = 12)
DMAA	< BG	< BG	Zuehlke u. a., 2004; Berlin (n = 12)
Clofibrat		< BG	Ternes, 1998; 20 deutsche Klärwerke
Bezafibrat	4,9 / 7,5	2,2 / 4,6	POSEIDON, 2006; Deutschland
Gemfibrozil		0,4 / 1,5	Ternes, 1998; 49 deutsche Klärwerke
CBZ	2,2 / 3,0	2,1 / 6,3	POSEIDON, 2006; Deutschland
	1,5 / 2,0	1,7 / 2,1	Zuehlke u. a., 2004; Berlin (n = 12)
	0,37 (Mit.)	0,43 (Mit.)	Miao und Metcalfe, 2003

Mit.: Mittelwert, n: Anzahl Proben; BG: Bestimmungsgrenze

Tabelle 2.5: Konzentrationen einiger Wirkstoffe in Oberflächengewässern in der Literatur

Wirkstoff	Ursprung	Konzentration (Med. / Max.) [µg/l]	aus
ASS	22 Fließgewässer, n = 43	n. d. / 0,34	Ternes, 1998
DF	Flusswasser, Deutschland	0,15 / 1,2	POSEIDON, 2006
	n = 29, Berlin	0,060/ 0,96	Heberer u. a., 1998
	n = 27, Köln	< BG / 15	Jux u. a., 2002
	Fluss Thyne, England	< BG	Roberts und Thomas, 2006
Ibuprofen	Fluss Thyne, England	0,31 / 2,4	Roberts und Thomas, 2006
	Flusswasser, Deutschland	0,070/ 0,53	POSEIDON, 2006
	12 Fließgewässer, Deutschland	0,020/ 1,6	Stumpf u. a., 1998
Phenazon	Fluss Santa Ana, USA	0,065/ 0,25	Gross, 2004
	Zulauf einer Oberflächenwasser- behandlungsanlage, n = 13, Berlin	0,26 / 0,5	Zuehlke, 2004
	3 deutsche Fließgewässer	0,027/ 0,064	Reupert und Brausen, 2003
Propy- phenazon	Zulauf einer Oberflächenwasser- behandlungsanlage, n = 13, Berlin	0,09 / 0,14	Zuehlke, 2004
Bezafibrat	Flusswasser, Deutschland	0,35 / 3,1	POSEIDON, 2006
Gemfibrozil	22 Fließgewässer, n = 43	0,052/ 0,51	Ternes, 1998
	3 deutsche Fließgewässer	0,061/ 0,16	Reupert und Brausen, 2003
CBZ	Zulauf einer Oberflächenwasser- behandlungsanlage, n = 13, Berlin	0,57 / 1,3	Zuehlke, 2004
	Flusswasser, Deutschland	0,25 / 1,1	POSEIDON, 2006
	Fluss Otonabee, n = 3, Kanada	0,0007 (Mit.)	Miao und Metcalfe, 2003

Med.: Median, Mit.: Mittelwert, Max.: Maximalwert; n.d.: nicht detektierbar; n: Anzahl Proben

2.2.3 Pharmazeutische Wirkstoffe in Grundwasser und Trinkwasser

Durch das Versickern von Wasser sowie Uferfiltration o. ä. können Arzneimittelrückstände bis in das Grundwasser gelangen (Heberer, 2002b; Wiegel u. a., 2004). Dieser Eintrag tritt verstärkt durch Lecks im Abwassersystem oder in der Nähe unversiegelter Lagerung von Abfall aus Krankenhäusern bzw. Arzneimittelproduktionen auf.

Heberer u. a. (1997) detektierten im Grundwasserbrunnen eines Berliner Trinkwasserwerks maximale Konzentrationen von 1,5 µg/l für Propyphenazon, 1,3 µg/l für Phenazon, 0,38 µg/l für DF und 0,20 µg/l für Ibuprofen (Heberer, 2002b).

Zur Produktion von sauberem Trinkwasser haben sich Flockung (z. B. mit Eisen(III)-Salzen), Ozonisierung, Aktivkohlefiltrierung oder weitergehende Oxidationsprozesse als effizient für die Eliminierung von organischen Verunreinigungen herausgestellt (Fent u. a., 2006). DF und CBZ ließen sich durch Ozonisierung eliminieren (Ternes u. a., 2002)³. Es wäre jedoch zu überprüfen, in wie weit der teilweise erhebliche Aufwand gerechtfertigt ist, z. B. indem mehr (chronische) Toxizitätstests durchgeführt werden.

In je 99 Proben aus dem Zulauf (Grundwasser) und Ablauf einer Trinkwasseraufbereitungsanlage wurde das Vorkommen von Propyphenazon, Phenazon und DMAA untersucht. Für die Konzen-

³In diesem Versuch wurde Klarwasser behandelt.

tration von Propyphenazon bzw. Phenazon ergab sich eine gute Abnahme in den Medianen (von 0,88 $\mu\text{g}/\text{l}$ auf 0,09 $\mu\text{g}/\text{l}$ bzw. von 2,8 $\mu\text{g}/\text{l}$ auf 0,30 $\mu\text{g}/\text{l}$, Abbau > 90 % bzw. 89 %) mittels der durchgeführten Filtrationen. DMAA wurde dagegen nicht quantifizierbar nachgewiesen (Zuehlke u. a., 2007).

2.3 Metabolismus von Arzneimitteln im Menschen

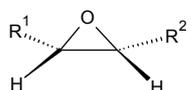
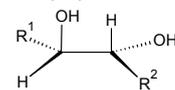
Die meisten Arzneimittel werden eingenommen (orale Verabreichung) bzw. äußerlich (topisch; z. B. als Salbe über die Haut), über den Darm (rektal), über die Schleimhäute oder durch Injektion (z. B. in den Muskel – intramuskulär) verabreicht. Nach der Freisetzung aus der Darreichungsform (LIBERATION) werden sie mehr oder weniger effektiv bzw. schnell in das Blutssystem aufgenommen (RE- BZW. ADSORPTION) und mit dem Blut in die verschiedenen Organe und Körpersysteme transportiert (DISTRIBUTION), an den verschiedenen Zellen angelagert (oder sie diffundieren hinein), eventuell dort angereichert und im Allgemeinen größtenteils verstoffwechselt (METABOLISMUS). Diese Biotransformation von Arzneimitteln erfolgt in ein bis zwei Schritten. In der ersten Phase wird die Struktur des im Allgemeinen eher lipophilen Stoffes verändert (es werden funktionelle Gruppen eingefügt), wodurch in der zweiten Phase wasserlösliche Moleküle angekoppelt (konjugiert) werden können. Dies führt zur Ausscheidung (EXKRETION) der nun polareren Metaboliten, aber auch der ursprünglichen Wirkstoffe über die Nieren im Urin (renal) oder über die Galle in den Faeces (biliär).

Zu den so genannten *Phase-I-Reaktionen* gehören vor allem die Hydroxylierungen, die Oxidation (an Kohlenstoff zu Aldehyden, Ketonen und Säuren, an Stickstoff oder an Schwefel z. B. zu Thiolen), die Desalkylierung (an Stickstoff, Sauerstoff oder Schwefel), oxidative Ringschlüsse bzw. -öffnungen oder die Aromatisierung von Hydroaromaten (Tabelle 2.6).

Sind die entsprechenden funktionellen Gruppen schon im Ursprungsmolekül vorhanden, kann dieses auch direkt über eine der *Phase-II-Reaktionen* umgewandelt werden. Zu diesen Reaktionen zählen im Menschen vor allem die Veresterung mit Glucuronsäure (vor allem Phenole, längerketige Alkohole, Carboxyle, 1,3-Dicarbonyle, Hydroxyamine, Amine und Thiole) oder Schwefelsäure (Steroide, Katecholamine, Serotonin, Bilirubin, Darmfäulnisprodukte wie Indol, Phenol oder Kresol, phenolische OH-Gruppen etc.) (Beyer, 1990; Levsen u. a., 2005).

Eine Übersicht über die Phase-II-Metaboliten in Tieren und Pflanzen inklusive der Massenveränderung in der Spektroskopie gibt Tabelle 2.7 (Levsen u. a., 2005).

Tabelle 2.6: Phase-I-Reaktionen in der Biotransformation von Arzneimitteln (Beyer, 1990)

Reaktion an	Strukturtyp Edukt	Zu /Ab-gang von	Strukturtyp Zwischenprodukt	Zu /Ab-gang von	Endprodukt
OXIDATION AN C-ATOMEN					
Aromatische Ringe	R-Ph			OH/H	R-Ph-OH
Aliphatische Ketten	R-Ph-CH ₃ R-(CH ₂) ₃ -CH ₂ -CH ₃			OH/H /2H	R-Ph-CH ₂ OH R-(CH ₂) ₂ -CH=CH-CH ₃
Alkohole	R ¹ -CHOH-R ²	(R ² = H:) /H	(R ² = H:) R ¹ -CO-R ²	/2H (R ² = H:) /H	R ¹ -CO-OH
Amine (prim.)	R ¹ -CH ₂ -NH ₂	OH/H	[R ¹ -CH(OH)-NH ₂]	/NH ₃	R ¹ -CHO
Amine (sek., tert.)	R ¹ -N(R ²)-CH ₃	OH/H	[R ¹ -N(R ²)-CH ₂ OH]	/HCHO	R ¹ -N(R ²)-H
Ether	R-O-CH ₃	OH/H	[R-O-CH ₂ OH]	/HCHO	R-OH
OXIDATION AN HETEROATOMEN					
Amine (prim., sek.)	R ¹ -C ₆ H ₄ -NR ₂ -H			OH/H	R ¹ -C ₆ H ₄ -NR ₂ -OH
Amine (tert.)	R-N(CH ₃) ₂			O	R-N(=O)(CH ₃) ₂
Sulfide (Thioether)	R-S-CH ₃	O	R-SO-CH ₃	O	R-SO ₂ -CH ₃
REDUKTION					
Aldehyde/ Ketone	R ¹ -C(=O)-R ² (Aldehyd: R ² = H)			H ₂ O	R ¹ -CH(-OH)-R ²
Nitroverbindungen	R-NO ₂	/O → 2H	R-N=O → R-N(OH)H	2H/H ₂ O	R-NH ₂
Azoverbindungen	R ¹ -N=N-R ²	2H	R ¹ -NH-NH-R ²	2H	R ¹ -NH ₂ + H ₂ N-R ²
Disulfide	R ¹ -S-S-R ²			2H	R ¹ -SH + HS-R ²
HYDROLYSE					
Ester	R ¹ -CO-OR ²			H ₂ O	R ¹ -COOH + HO-R ²
Säureamide	R ¹ -CO-N(R ²)R ³			H ₂ O	R ¹ -COOH + HN(R ²)R ³
Arenoxide/ Epoxide				H ₂ O	

2.4 Ausgewählte umweltrelevante Metaboliten

Die meisten Untersuchungen beziehen sich auf die pharmazeutischen Wirkstoffe der Arzneien. Nur in wenigen ist auch das Vorkommen von durch menschliche oder tierische Organismen entstandenen Metaboliten dieser Wirkstoffe verfolgt worden. Dies war oft nur bei Metaboliten möglich, die von der chemischen oder pharmazeutischen Industrie verkauft oder zur Verfügung gestellt wurden (vgl. z. B. Stumpf u. a., 1998; Miao und Metcalfe, 2003; Wiegel u. a., 2004; Radjenovic u. a., 2007). Dabei waren oft die Konzentrationen der Hauptmetaboliten in der Umwelt höher als die des Wirkstoffs (Stumpf u. a., 1998; Miao und Metcalfe, 2003; Wiegel u. a., 2004; Zuehlke u. a., 2004; Radjenovic u. a., 2007). Einige Untersuchungen haben gezeigt, dass die enzymatische Spaltung der Phase-II-Metaboliten unter der Freisetzung der entsprechenden Phase-I-Metaboliten bzw. Wirkstoffe unter Umweltbedingungen – z. B. durch die fäkalen Bakterien *E. Coli* – zu einem Auftreten letzterer Verbindungen führen kann (Stumpf u. a., 1998; Hao u. a., 2007).

Tabelle 2.7: Phase-II-Reaktionen von Arzneimitteln und charakteristische Merkmale in der Massenspektrometrie (Levsen u. a., 2005)

Konjugation von/ Reaktion (mit)	Substituent	Massenverschiebung (Da) nach		Charakteristische neutrale Fragmente	zugehörige (neutrale) Massendifferenzen ausgehend von	
		H-Substitution	Cl-Substitution		[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
Methylierung	CH ₃	14		Methylradikal	15	
Acetylierung	COCH ₃	42		Keten	42	
Glycin (Gly)	Glycyl	57		Gly CO+H ₂ O	75 46	
Sulfat	SO ₃ H	80	46	SO ₂	64	64
	(O)SO ₃ H	80 (96)		SO ₃	80	80
				SO ₂	64	
Cystein (Cys)	Cysteinyll	119	85	SO ₃	80	80
				Cys	121	121
				Alanin	89	
				Ameisensäure (FA)	46	
N-Acetylcystein	N-Acetylcysteinyll	161	127	Ammoniak	17	
				N-Acetylcystein	163	163
				N-Acetyl	129	129
				Acetamid	59	
				Keten	42	
Glucose (Glc)	Glucosidyl	162		AnhydroGlc	162	
Cys-Gly	Glycysteinyll	176	142	Glc	180 ²	
				CysGly	178	176
				AlaGly ¹	146	144
				Gly	75	
Glucuronsäure (GlcA)	Glucuronidyl	176		NH ₃	17	
				AnhydroGlcA	176	176
				GlcA	194 ²	
GlcNAc	N-Acetylglucosaminyl	203		AnhydroGlcNAc	203	203
γ-Glu-Cys	γ-Glycysteinyll	248	214	GlcNAc	221 ²	
				N-(γ-Glutamyliminopropion)säure	216	216
				Glutamin	146	
				Anhydroglutaminsäure	129	129
Malonyl-Glc	Malonylglucosidyl	248		Anhydromalonyl-Glc	248	
				CO ₂	44	
				MalonylGlc	266	
Glutathion (Glu-Cys-Gly; GSH)	Glutathionyl	305	271	GSH	307	306
				γ-GluAlaGly ¹	275	
				γ-GluAlaGly-2H ¹	273	273
				Glutamin	146	
				Anhydroglutaminsäure	129	
				Glycin	75	
GlcGlc		324				
Acetyl-GlcGlc		366				
Malonyl-GlcGlc		410				

¹ durch Spaltung der Bindung zwischen Schwefel und Methylrest im Cystein entstanden² bei Konjugaten mit benzylischer oder acyclischer Bindung

Daher ist die Untersuchung der verschiedenen Proben von Abwasser bis Grundwasser auf die Arzneimittelmetaboliten zusätzlich zu dem eigentlichen Wirkstoff von besonderer Relevanz.

Auch bei dem Betrachten der ökotoxikologischen Auswirkungen von Arzneimitteln wie z. B. der Umweltverträglichkeitsprüfung (vgl. Anhang A) sollten daher die Metaboliten eine größere Rolle spielen. Zumal die verschiedenen Substanzen im Gewässer einen additiven Toxizitätseffekt hervorrufen können (Cleuvers, 2003, 2004).

Die nachfolgenden Abschnitte enthalten eine Übersicht über die wichtigsten Funde von Humanmetaboliten in den verschiedenen Wassertypen.

2.4.1 Metaboliten der Fibrate (Clofibrinsäure)

Die Clofibrinsäure, der Hauptmetabolit der Fibrate (strukturverwandte Wirkstoffe aus der Gruppe der Blutfettsenker, siehe Anhang B.2), war einer der ersten Arzneimittel-Metaboliten, die in der aquatischen Umwelt seit Mitte der 1970er Jahre detektiert wurden (Hignite und Azarnoff, 1977; Buser u. a., 1998; Tixier u. a., 2003; Wiegel u. a., 2004; Fent u. a., 2006). Sie wird in Kläranlagen nur zu etwa 50% abgebaut (Ternes, 1998). In einer Übersicht über die Veröffentlichungen der Jahre 1998 bis 2005 wurden für Klärwerksabläufe folgende Werte angegeben: Med. >0,03 µg/l bis etwa 0,05 µg/l; Max. >0,03 µg/l bis >1 µg/l (Fent u. a., 2006). In Oberflächenwasser waren es Med. und Max. im Konzentrationsbereich von etwa 0,03 µg/l bis etwa 0,1 µg/l (Max. bis etwa 0,5 µg/l). Einige weitere Werte gemessener Clofibrinsäurekonzentrationen sind in Tabelle 2.8 angegeben.

Tabelle 2.8: Clofibrinsäurekonzentrationen in der Literatur

Medium	Konzentration (Med. / Max.) [µg/l]	aus/ Bemerkungen
Zulauf Kläranlage	0,46 (Mit.) / 0,95 (Berlin)	Heberer, 2002
Ablauf Kläranlage	0,57	Winkler u. a., 2001
	0,48 (Mit.) / 0,73 (Berlin)	Heberer, 2002
	0,23 / 0,68	Ferrari u. a., 2003; europäische Kläranlagen (n = 7)
	n. d. / 0,68	Andreozzi u. a., 2003; Europa
Oberflächenwasser	0,049	Winkler u. a., 2001; Elbe
	0,07 / 0,27	Stumpf u. a., 1998; deutsche Fließgewässer (n = 12)
	0,001 - 0,009 (Schweizer Seen)	Buser u. a., 1998
	0,0005 - 0,0078 (Nordsee)	
Grundwasser	0,012 / 0,17	Heberer, 2002; Berliner Trinkwasserwerke (n = 14)

Med.: Median, Mit.: Mittelwert, Max.: Maximalwert; n. d.: nicht detektierbar; n: Anzahl Proben

In Deutschland wurden im Ablauf von Kläranlagen vergleichsweise hohe Konzentrationen um $0,5 \mu\text{g/l}$ nachgewiesen (Heberer, 2002b; Winkler u. a., 2001). Bei Betrachtung der Mittelwerte in den drei Berliner Anlagen fällt auf, dass die Clofibrinsäure hier nicht abgebaut wird (Heberer, 2002b). Nach Berieselung von Berliner Feldern mit Abwasser⁴ wurden dementsprechend noch immer deutliche Clofibrinsäurekonzentrationen (Median im Beaufschlagungswasser: $1,3 \mu\text{g/l}$) im Oberflächenwasser (Median: $0,14 \mu\text{g/l}$) und Grundwasser (Median über der ersten vertikal nicht durchlässigen Schicht: $0,020 \mu\text{g/l}$) nahe der Berieselung festgestellt, die sich jedoch in den weiteren Erdschichten durch die Filtrationswirkung sowie horizontalen Abstrom bis auf Werte unterhalb der Nachweisgrenze verringerten (Scheytt u. a., 2000). Heberer u. a. (1997) detektierten im Grundwasserbrunnen eines Berliner Trinkwasserwerks maximale Konzentrationen von $7,3 \mu\text{g/l}$. Wie in Abschnitt 2.2.3 auf Seite 10 bereits erwähnt, werden verschiedene Verfahren zur Trinkwasseraufbereitung angewendet, jedoch erwies sich Clofibrinsäure als persistent gegenüber Ausfällung mit Eisen(III)chlorid und anschließende Ozonisierung oder Aktivkohlefiltrierung (Ternes u. a., 2002)⁵.

Wirkungen der Clofibrinsäure

Verschiedene Untersuchungen brachten EC_{50} -Werte von 145 mg/l in *D. subspicatus*, 72 mg/l in *D. magna* (Cleuvers, 2003), 75 mg/l in *D. magna*, $>200 \text{ mg/l}$ in *C. dubia* (Ferrari u. a., 2003), 92 mg/l in *V. fischeri* (Ferrari u. a., 2003), 13 mg/l in *L. minor* (Cleuvers, 2003) hervor, welche Clofibrinsäure maximal als schädlich einstufen lassen.

Für die Riskobewertung geben Hanisch u. a. (2004) das PEC/PNEC-Verhältnis von Clofibrinsäure im Land Brandenburg mit 1,8 an. Das bedeutet (vgl. Anhang A), dass diese Werte zur Besorgnis Anlass geben und weitere Maßnahmen eingeleitet werden sollten.

2.4.2 Metaboliten des Ibuprofen

Ibuprofen, 2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]propansäure, hat entzündungshemmende, schmerzstillende und antipyretische Eigenschaften und gehört zu den zehn meist verkauften Medikamentenwirkstoffen in Deutschland (Rote Liste, 2007; Glaeske und Janhsen, 2003, Tab 2.4). Es wird als Racemat eingesetzt, im Körper aber vor allem als S-Enantiomer umgesetzt. Das R-Enantiomer wird dagegen racematisiert (Rudy u. a., 1990; Tan u. a., 1997).

Die fast vollständige Phase-I-Metabolisierung von Ibuprofen (siehe Anhang B.1.3) findet im Menschen vor allem an der Isopropyl-Seitenkette statt, wodurch hauptsächlich 2-Hydroxy- und 3-Carboxyibuprofen gebildet werden (Pettersen u. a., 1978). In kleineren Mengen entstehen außerdem

⁴Dies geschieht vor allem bei Überlastung der Klärwerke.

⁵In diesem Versuch wurde Klarwasser behandelt.

1-Hydroxyibuprofen, 3-Hydroxyibuprofen sowie die kettenverkürzte 4-(1-Hydroxy-1-oxopropan-2-yl)benzoesäure. Durch den racemischen Charakter des Ibuprofen entstehen von dem 3-Carboxy-metaboliten vier Diastereomere, bevorzugt SS'- (16,5 %) und SR'-3-Carboxy-Ibuprofen (14,6 %) (Rudy u. a., 1990; Tan u. a., 1997). Ibuprofen wird biologisch zu 96 - 97 % in 2-Hydroxyibuprofen und 1-Hydroxyibuprofen umgewandelt (Kometabolismus), allerdings nur, wenn ausreichend andere C-Quellen⁶ vorhanden sind (Quintana u. a., 2005).

Die Konzentrationen von Hydroxy- und Carboxyibuprofen in wässrigen Proben wurden ebenfalls untersucht, einige Werte sind in Tabelle 2.9 angegeben. Es fällt auf, dass die Konzentration von Hydroxyibuprofen die des Wirkstoffs selbst übersteigt. Auch die Konzentrationen von Carboxyibuprofen sind entsprechend der renalen Ausscheidung (vgl. Abschnitt 2.4.2) im Zulauf der Kläranlage höher als die des Ibuprofens. Carboxyibuprofen wird in der Kläranlage – im Gegensatz zum Hydroxymetaboliten – sehr gut abgebaut (Stumpf u. a., 1998; Gross u. a., 2004). So lässt sich in Oberflächengewässern noch eine hohe Hydroxyibuprofenkonzentration (Med. 0,34 µg/l in verschiedenen deutschen Fließgewässern) feststellen, jedoch kaum Carboxyibuprofen (Stumpf u. a., 1998).

Tabelle 2.9: Konzentrationen der untersuchten Ibuprofenmetaboliten in der Literatur

Medium	Konzentration (Med. / Max.) [µg/l]		aus/ Bemerkungen
	OH-Ibuprofen	COOH-Ibuprofen	
Zulauf KW	6,7 (Mit.)	8,9 (Mit.)	Stumpf et al., 1998, 1 KW in Frankfurt, 5 d
Ablauf KW	5,6 (Mit.)	<1 (Mit.)	Stumpf et al., 1998, 1 KW in Frankfurt, 5 d
	0,92 / 6,0	0,14 / 0,26	Stumpf et al., 1998, 10 deutsche KW
	0,033/ 0,52	0 / 0,008	Gross, 2004, 4 KW, n = 6, Los Angeles, USA
Oberflächenwasser	0,34 / 1,0	0,02 / 0,03	Stumpf et al., 1998, deutsche Fließgewässer (n = 12)
	0,037/ 0,10	0,014/ 0,032	Weigel, 2004, n = 6 (Elbe)
	18 (Max.)	0,0095 (Max.)	n = 1 (Außenalster), Hamburg
	0,070/ 0,87		Gross, 2004, Los Angeles, USA

Med.: Median, Max.: Maximalwert, Mit.: Mittelwert, KW: Klärwerk, n: Anzahl Proben

2.4.3 Metaboliten von Phenazon, Propyphenazon, Metamizol und DMAA

Phenazon, Propyphenazon, Metamizol und DMAA sind in der Gruppe der Pyrazolon-Derivate enthalten und ebenfalls NSAID. Diese wirken, indem sie reversibel oder irreversibel eine oder beide Formen des Enzyms Cyclooxygenase (COX-1 und COX-2) hemmen, welche für die Synthese von Prostaglandin zuständig sind (Fent u. a., 2006; Gentili, 2007). Die Pyrazolone haben durch ihre Strukturverwandtschaft auch ähnliche oder sogar gleiche Metaboliten (siehe Anhang B.1.4), deren Befunde in wässrigen Proben in Tabelle 2.10 dargestellt sind. Auch hier sind die Konzentrationen

⁶Hier Milchpulver

Tabelle 2.10: Konzentrationen der umweltrelevanten Metaboliten von Phenazon, Propyphenazon, Metamizol und DMAA in der Literatur

Medium	Konzentration (Med. / Max.) [$\mu\text{g/l}$]						aus/ Bemerkungen
	PDP	DP	AAA	FAA	AMPH	AMDOPH	
Zulauf Klär- anlage	0,02 / 0,04		6,7 / 8,8	1,3 / 1,9	0,11 / 0,15	0,55 / 0,71	Zuehlke, 2004, Berlin (n = 12)
Ablauf Klär- anlage	0,02 / 0,03		5,3 / 7,0	1,4 / 2,0	0,11 / 0,19	0,60 / 0,73	Zuehlke, 2004, Berlin (n = 12)
Ober- flächen- wasser	n. d.	0,03 / 0,07	0,63 / 0,83	0,32 / 0,67	0,04 / 0,15	0,27 / 0,39	Zuehlke, 2004, Zulaufproben einer Trinkwasseraufbereitungsanlage (n = 13) Wiegel und Wanke, 2004, Elbe 2000 Schmidt und Brockmeyer (2002), Elbe 1999
Grund- wasser	0,007 /	0,28 /	0,12 /	0,05 /	0,14 /	0,56/	Zuehlke, 2007, Zulaufproben einer Trinkwasseraufbereitungsanlage (n = 99)
Trink- wasser	n. d.	0,06 / 0,11	0,47 / 1,01	0,30 / 0,51	0,05 / 0,13	0,27 / 0,35	Zuehlke, 2004, Ablaufproben einer Trinkwasseraufbereitungsanlage (n = 13)
	0,015 /	1,0 /	n. d.	n. d.	0,12 /	0,55 /	Zuehlke, 2007, Ablaufproben einer Trinkwasseraufbereitungsanlage (n = 99)

Med.: Median, Max.: Maximalwert, n. d.: nicht detektierbar; n: Anzahl Proben,
 AAA: Acetylaminoantipyrin, FAA: Formylaminoantipyrin, AMPH: 1-Acetyl-1-methyl-phenylhydrazid,
 AMDOPH: 1-Acetyl-1-methyl-2-dimethyloxamoyl-2-phenylhydrazid

der Metaboliten (z. B. Acetylaminoantipyrin, AAA, und Formylaminoantipyrin, FAA) im Zu- und Ablauf der Klär- oder Trinkwasseraufbereitungsanlagen höher als die Summe der Konzentrationen der ursprünglichen Wirkstoffe (Phenazon oder DMAA), was jedoch an den Ähnlichkeiten in der Struktur liegen kann (Metamizol wurde nicht analysiert, könnte jedoch auch diese Metaboliten hervorbringen). Es fällt auf, dass die Passage der Klär- oder Aufbereitungsanlagen in Berlin für die meisten Metaboliten nicht zu einer Verringerung ihrer Konzentrationen führt (Zuehlke u. a., 2004, 2007). Dies muss nicht an schlechter Biodegradation liegen, da die Metaboliten in der Kläranlage oder bei der Trinkwasseraufbereitung auch durch die Biodegradation einiger Wirkstoffe oder Glucuronide nachgebildet werden können; genauere Modelluntersuchungen mit Einzelsubstanzen lassen darauf schließen, dass nur das durch Biodegradation aus DMAA entstehende 1-Acetyl-1-methyl-2-dimethyloxamoyl-2-phenylhydrazid (AMDOPH) mikrobiell kaum weiter abgebaut wird. Durch die Trinkwasseraufbereitung werden die Konzentrationen aller Metaboliten jedoch auf für den Menschen unbedenkliche Konzentrationen gebracht (Zuehlke u. a., 2007).

2.4.4 Metaboliten des Carbamazepin

Das Anti-Epileptikum CBZ (Benzo[b][1]benzazepin-11-carboxamid; siehe Abbildung 5.1) findet seit den frühen 1960er Jahren Verwendung und hat sich in diesem Therapiebereich als Mittel der Wahl etabliert (Miao und Metcalfe, 2003). Außerdem wird es bei Schizophrenie oder zur

Vorbeugung bei der Bipolaren Störung (manisch-depressive Erkrankung) eingesetzt. Es wirkt auf das zentrale Nervensystem, indem es die Neuronenaktivität durch Blockieren der Natriumkanäle verringert (Fent u. a., 2006).

CBZ wird durch Epoxidierung, Hydroxylierung, Umlagerung/Ringkontraktion, Hydrolyse und Glucuronidierung zu über 30 verschiedenen Human-Metaboliten umgewandelt (vgl. Abbildung 5.1). Maximal 3 % der Dosis werden vom Menschen renal und ca. 15 % biliär als CBZ wieder ausgeschieden, was auf eine unvollständige Resorption schließen lässt.

Unter den renal gebildeten Metaboliten befanden sich vor allem das an der Doppelbindung des inneren Ringes zweifach hydroxylierte trans-10,11-Dihydro-10,11-dihydroxy-CBZ (35 %, 10,11-(OH)₂-DHC), 1-Hydroxy-CBZ (1-OH-CBZ), 2-Hydroxy-CBZ (2,9 %, 2-OH-CBZ), 3-Hydroxy-CBZ (4,0 %, 3-OH-CBZ), CBZ-10,11-epoxid (0,9 %, CBZE), verschiedene Di- und Trihydroxide (entstanden aus Zwischenstufen wie dem 1,2-Epoxid, dem 2,3-Epoxid und dem 1,4-Epoxid von CBZ), 2-Hydroxyiminostilben sowie die nach einer Ringkontraktion entstehenden Verbindungen 9-(Hydroxymethyl)acridin-10(9H)-carboxamid (3,2 %), 9-Hydroxymethylacridin, 9-Methylacridin, Acridin-9-carbaldehyd, Acridin und Acridon. Mit den Faeces wurden etwa 5 % der Dosis als Metaboliten ausgeschieden (Beyer, 1990; Bernus u. a., 1995; Roth und Fenner, 2000).

Fünf der Metaboliten des CBZ wurden im Zu- und Ablauf einer Kläranlage in Peterborough, Kanada, nachgewiesen (Miao und Metcalfe, 2003). Die gemessenen Konzentrationen betragen im Mittel 1,6 µg/l, 0,12 µg/l, 0,095 µg/l, 0,047 µg/l bzw. 0,0085 µg/l (10,11-(OH)₂-DHC, 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ, CBZE bzw. 10-OH-DHC) im Zulauf und 1,3 µg/l, 0,13 µg/l, 0,10 µg/l, 0,052 µg/l bzw. 0,0093 µg/l (10,11-(OH)₂-DHC, 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ, CBZE bzw. 10-OH-DHC) im Ablauf. Die Konzentrationen aller Metaboliten außer (10,11-(OH)₂-DHC stiegen während der Passage an oder blieben gleich hoch. Da (10,11-(OH)₂-DHC jedoch in den höchsten Konzentrationen vorlag, wurde er dennoch im Wasser des Flusses Otonabee (Kanada) gefunden (0,0022 µg/l). Der Metabolit 2-OH-CBZ scheint noch persistenter zu sein als CBZ selbst, da er in höheren Konzentrationen im Ab- und Oberflächenwasser vorkommt.

2.5 Wirkstoffe dieser Arbeit

Im Folgenden soll auf einige Eigenschaften der im Verlauf dieser Arbeit betrachteten Arzneimittel näher eingegangen werden.

2.5.1 Carbamazepin

Über die Persistenz von CBZ und seinen Metaboliten in der aquatischen Umwelt wurde bereits in dem vorangegangenen Abschnitt 2.4.4 berichtet. In Toxizitätsbestimmungen (siehe Anhang A) wurden die folgenden EC₅₀-Werte für CBZ ermittelt: 0,16 - 0,28 mg/l in *C. riparius*; 26 mg/l in *L. minor*; 74 mg/l in *D. subspicatus* (Cleuvers, 2003), >100 mg/l in *D. magna* (Ferrari u. a., 2004), 78 mg/l in *C. dubia* und <81 mg/l in *V. fischeri* (Ferrari u. a., 2004). Dies deutet entsprechend der Richtlinie 93/67/EWG (Europäische Kommission (1993)) einerseits eine sehr giftige Wirkung auf das Moos *C. riparius*, andererseits für die meisten anderen Organismen eine gesundheitsschädliche Wirkung an.

2.5.2 Paracetamol

Ein weltweit sehr häufig angewandtes Schmerzmittel ist PCM (N-(4-Hydroxyphenyl)-acetamid) (Roth und Fenner, 2000). Es gehört zu den NSAID und wirkt fiebersenkend.

Nach Gabe von PCM werden weniger als 2% der Dosis unverändert renal ausgeschieden (Beyer, 1990; Roth und Fenner, 2000). Die Metabolisierung des PCM (siehe Abbildung 5.30) verläuft hauptsächlich über Konjugation oder Oxidationswege. Von den im Urin gefundenen Verbindungen sind 59,0% 4-Glucuronidoacetanilid (Paracetamolglucuronid, PCM-GlcA), 29,4% liegen als Paracetamolsulfat (PCMS) vor. Weitere identifizierte Metaboliten sind S-(5-Acetamid-2-glucuronosido-phenyl)cystein (3,3%), 2-MethoxyPCMS (2-OMe-PCMS; 3,0%) 2-Methoxy-PCM-GlcA (2-OMe-PCM-GlcA; 2,4%) und 2-HydroxyPCMS (2-OH-PCMS; 2,2%). Durch Dehydrierung des PCM im Körper entsteht N-Acetyl-p-benzochinonimin (ABC) als reaktives Zwischenprodukt.

Wird das ABC in der Leber nicht durch Thiolgruppen enthaltende Substrate wie z. B. Glutathion (siehe auch Tabelle 2.7) abgefangen, kann es unter kovalenter Fixierung mit nukleophilen Gruppen in Proteinen reagieren (Beyer, 1990; Roth und Fenner, 2000). Dies führt zu einem Absterben von Leberzellen. Auch die Niere kann geschädigt werden.

2.5.3 Diclofenac

DF (2-[2-[(2,6-Dichlorphenyl)-amino]-phenyl]-essigsäure) ist ein COX-Inhibitor mit schmerzstillendem und entzündungshemmendem Effekt. Es wird sowohl verschreibungspflichtig als auch freiverkäuflich verwendet. Die Anwendung erfolgt hauptsächlich oral (ca. zwei Drittel) oder topisch (ca. ein Drittel) (Schrey und Wilhelm, 1999).

Der Metabolismus von DF im Menschen (Abbildung 5.21) ist abhängig von der Art der Aufnahme im Körper. Sawchuk u. a. (1995) stellten fest, dass bei oraler Einnahme von DF folgende Meta-

boliten und Konjugate (hauptsächlich Glucuronide und Sulfate) gebildet werden: Hauptmetabolit 4'-Hydroxy-DF (4'-OHD, 16,0% der renalen Ausscheidung), 3'-Hydroxy-DF (3'-OHD, 2,0%), 5-Hydroxy-DF (5-OHD, 6,1%), 3'-Hydroxy-4'-methoxy DF (3'-OH-4'-OMeD, < 0,01%). Außerdem werden noch 6,2% des Wirkstoffs (inklusive der Konjugate) ausgeschieden. Bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion werden zusammen weniger als 1% der Dosis als 3'-OHD, 5-OHD, 3'-OH-4'-OMeD oder DF abgesondert (Sawchuk u. a., 1995).

In einer anderen Untersuchung fanden Schneider und Degen (1981) im Urin nach oraler Gabe von DF zusätzlich 9,4% des Metaboliten 4',5-DihydroxyDF (4',5-DiOHD). Bei intramuskulärer Gabe von DF analysierten sie 6,5% des Wirkstoffs, 18,1% 4'-OHD, 8,2% 5-OHD, 1,4% 3'-OHD und 15,4% 4',5-DiOHD in Urinproben (inklusive Konjugaten). Riess u. a. (1978) stellten fest, dass im Menschen maximal 42% der Dosis über die Galle ausgeschieden werden, vor allem als 4'-OHD (10 - 20%) und 5-OHD (5 - 10%, beide inklusive der Konjugate). DF und seine Konjugate wurden zu weniger als 5% biliär abgesondert.

Bei dem Auftragen einer Salbe oder eines Gels mit DF als Wirkstoff auf die Haut wurden – verglichen mit oraler Einnahme – nur 6% der Dosis in den Körper aufgenommen. Der Rest wurde später mit den Salbenrückständen abgewaschen (Schrey und Wilhelm, 1999).

Beim längeren Aussetzen einer wässrigen Lösung von DF⁷ in Sonnenlicht bildete sich hauptsächlich durch Wasserabspaltung aus DF sein Lactam, aber es entstanden auch verschiedene andere Verbindungen wie 2-Chloro- oder 2,6-Dichlorodiphenylamin-Derivate bzw. 8-Hydroxy- oder 8-Chloro-carbazol-Derivate (Bartels und von Tümpling, 2007). Die Lactame von DF (Abbildung 5.21) und seinen Metaboliten bildeten sich auch bei der Behandlung im stark basischen oder sauren Milieu (Schneider und Degen, 1981; Stierlin und Faigle, 1979; Reddersen und Heberer, 2003a).

Toxizität von Diclofenac

Beim Menschen wurde durch die Einnahme von Diclofenac in Einzelfällen eine Schädigung der Leber hervorgerufen, die teilweise durch ein Absetzen des Medikaments, teilweise nur durch Leber-Transplantation behandelt werden konnte. Es ist auch schon zu Todesfällen durch Leberversagen gekommen (O'Connor u. a., 2003). Außerdem wurde bei Einnahme von NSAID über ein erhöhtes Auftreten von Herzinfarkten berichtet (Helin-Salmivaara u. a., 2006; McGettigan und Henry, 2006).

Aber nicht nur der Mensch wurde geschädigt. Seit den 1990er Jahren kam es zu einem Rückgang um mehr als 95% einiger Gänsegeier-Populationen in Indien, angefangen mit denen des Bengal-

⁷Bei dieser Arbeit ist zu beachten, dass die Konzentration von Diclofenac im Versuchsansatz mit 22-50 µg/l deutlich höher ist als in Oberflächengewässern bis dato maximal gemessen wurde (vgl. Abschnitt 2.2.2 auf Seite 8). Außerdem wurden die Proben bei pH 2 mit SPE aufgereinigt.

geiers⁸ (Oaks u. a., 2004; Green u. a., 2004; Taggart u. a., 2007). Später wurde das Phänomen auch beim Indischen Geier⁹ und beim Schmalschnabelgeier¹⁰ bekannt. Dies führte zu einer Aufnahme dieser Vögel in die Liste gefährdeter Tiere von BirdLife International. Die Tiere hatten verendetes Vieh gefressen, das vorher mit DF behandelt worden war. Das DF führte bei den Geiern schließlich zum Tod durch Nierenversagen und Harnsäureeinlagerungen in den inneren Organen.

Untersuchungen über die Umweltverträglichkeit (vgl. Abschnitt A zur UVP) von DF wurden an Algen, Krustentieren, Fischen, Bakterien und Pflanzen durchgeführt. In jungen japanischen Medaka-Fischen stellten Hong u. a. (2007) einen LC10-Wert (96 h) von 8 mg/l für DF fest. Sie untersuchten die Expression verschiedener Biomarker-Gene (Indikatoren für die Biotransformation z. B. aquatischer Schadstoffe, für die Genotoxizität sowie für Effekte auf das Hormon- und Fortpflanzungssystem) in Leber, Darm und Kiemen der Fische. Eine signifikante Genexpression und somit Anzeichen für akute toxische Effekte traten schon bei einer für Oberflächengewässer realistischen Konzentration von 1 µg/l auf. Cleuvers (2003) ermittelte einen EC50-Wert von 8 mg/l für *L. minor*, in *V. fischeri* betrug er 11,5 mg/l (Ferrari u. a., 2003). Für Algen wurden EC50-Werte von 56 - 72 mg/l in *D. subspicatus* (Cleuvers, 2003, 2004), 26 mg/l bzw. 68 mg/l in *D. magna* (Cleuvers, 2004, 2003) und 22,7 mg/l in *C. dubia* (Cleuvers, 2004) gefunden. Diese Messungen zeigen bereits für die Einzelsubstanz eine starke Gefährdung der verschiedenen Organismen in realistischen Konzentrationsbereichen und somit eine hohe Bedenklichkeit gegenüber DF in der Umwelt. Zusätzlich zeigte DF einen kombinatorischen Effekt mit Ibuprofen auf Wasserflöhe¹¹, das heißt, die Wirkungen beider Stoffe zusammen sind stärker als die Summe der Wirkungen der Einzelsubstanzen (Cleuvers, 2003).

2.5.4 Aceclofenac

Ein Strukturverwandter – die acetylierte Form – des Diclofenac ist das Aceclofenac (AF), 2-[2-[2-[(2',6'-Dichlorophenyl)-amino]-phenyl]-acetyl-oxyessigsäure. Es gehört folglich ebenfalls zu der Gruppe der NSAID.

Von einer verabreichten Dosis AF werden renal etwa zwei Drittel vor allem in Form konjugierter Metaboliten (Hauptmetabolit 4'-HydroxyAF – 4'-OHAF –, DF, 4'-OHD sowie zahlreiche Metaboliten) oder unverändert (1 %) ausgeschieden (Almirall GmbH, 2007). In einer anderen Arbeit fanden Bort u. a. (1996) in menschlichem Urin anteilig 4,1 % AF, 75 % 4'-OHAF (davon 30 % als Konjugat), 1,6 % DF (davon 92 % als Konjugat) und 20 % 4'-OHD (davon 80 % als Konjugat), insgesamt wurden ca. 70 - 80 % der Dosis mit dem Urin ausgeschieden.

⁸*Gyps Bengalensis*

⁹*Gyps Indicus*

¹⁰*Gyps Tenuirostris*

¹¹*D. magna* Strauss

2.6 Untersuchungsmethoden und -geräte

In diesem Abschnitt werden die theoretischen Hintergründe der verwendeten Methoden und Geräte genauer erläutert.

2.6.1 Probenvorbereitung

Zu den vorbereitenden Schritten gehören (Romera u. a., 1996; Weigel u. a., 2004; Hao u. a., 2007):

1. Zentrifugieren: Dieses Verfahren wird vor allem zur Abtrennung von Feststoffen bzw. Proteinen (z. B. bei Urinproben und anderen biologischen Proben) benutzt, um ein Blockieren der im späteren Schritt verwendeten Extraktionsmaterialien zu verhindern.
2. Filtrieren: Dieses Verfahren wird ebenfalls zur Abtrennung verwendet, vor allem bei nicht ausreichender Zentrifugation (z. B. bei Schwebstoffen in Abwasserproben).
3. pH-Einstellung: Je nach Analyt muss der pH-Wert der zu extrahierenden Probe angepasst werden, um eine optimale Extraktion zu erreichen.
4. Festphasenextraktion (solid phase extraction – SPE): Die Festphasenextraktion wird zur Aufreinigung der Analyten sowie auch zur Aufkonzentration eingesetzt. Es ist eine Flüssig-Fest-Extraktion. Der zu isolierende Analyt (das Isolat) wird dabei an der Festphasenoberfläche (dem Sorbens) adsorbiert und später durch Verwendung eines stärkeren Lösungsmittels (dem Eluenten) wieder eluiert. Während der Anreicherung sollen idealerweise die störenden Bestandteile (die Matrix) das Sorbens passieren und somit abgetrennt werden.

Für die Extraktion wässriger Proben in der Umweltanalytik ist die SPE oft das Mittel der Wahl zur Abtrennung der Matrix und Aufkonzentration der Analyten – idealerweise auf Konzentrationen oberhalb ihrer Nachweis- oder Bestimmungsgrenze (vgl. Abschnitt 5.4.1). Je nach Probensystem werden vielfältige Sorbens-Materialien in standardisierten Kartuschen eingesetzt, darunter C18-Material, das durch Octadecylketten oberflächenmodifiziertes Kieselgel enthält (die durch Einführung anderer funktioneller Gruppen für bestimmte Substanzklassen spezialisiert werden können) oder seit Mitte der Neunziger Jahre auch funktionalisierte Polymere, die oft eine bessere Retention für (kleine) Substanzen einer hohen Polarität liefern (Ternes, 1998; León-González und Pérez-Arribas, 2000; Ternes, 2001; Reddersen und Heberer, 2003b; Weigel u. a., 2004). Diese Polymere basieren vorwiegend auf quer verbundenen Polystyren-divinylbenzen-Polymeren, die sich im Grad der Vernetzung, der Porosität und der Oberfläche unterscheiden können, was auch die Retention der Analyten beeinflusst (Weigel u. a., 2004). Sie werden inzwischen auch mit verschiedenen eingebundenen funktionellen Gruppen angeboten.

2.6.2 Chromatographie

Um Probengemische zu untersuchen (analytisch) oder Einzelsubstanzen daraus (zurück) zu gewinnen (präparativ), werden chromatographische Methoden verwendet. Grundsätzlich wird dabei das Gemisch in einer mobilen Phase (Gas, Flüssigkeit oder überkritisches Fluid) gelöst und über eine stationäre Phase (Sorbens) geführt (vgl. Abschnitt 2.6.1) (Skoog und Leary, 1996). Die unterschiedlich starken Wechselwirkungen zwischen dem Sorbens und der mobilen Phase (Eluent) führen zur Trennung der einzelnen Komponenten. Bei schwachen Wechselwirkungen gelangen sie schneller durch das Material, bei starken Wechselwirkungen werden sie zurückgehalten (Retention) und brauchen für die gleiche Strecke länger. Je öfter verschiedene Komponenten dabei mit dem Sorbens in Kontakt kommen, desto besser werden sie getrennt. Die über eine Säule oder eine andere Oberfläche fixierte stationäre Phase kann fest oder flüssig sein. Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist die am häufigsten verwendete analytische Trenntechnik. In der Umweltanalytik kommt oft die Umkehrphasenchromatographie („Reversed Phase Chromatography“, RP) zum Einsatz, bei der eher unpolare Sorbentien und polare Eluenten verwendet werden. Bei einfachen Flüssigkeitsgemischen reicht es oft aus, wenn das Gemisch mittels eines Injektionsystems (heute vor allem Autosampler) in einen in zeitlich gleichförmig (isokratisch) zusammengesetzten Eluenten eingebracht und über eine das Sorbens enthaltende Chromatographiesäule aufgetrennt wird (Skoog und Leary, 1996). Für eine schnellere Analytik sowie bessere Peakformen wird häufig die Gradiententrennung gewählt, bei der die Lösungsmittelverhältnisse im Verlauf der Chromatographie zum stärkeren Eluent hin verändert werden. Zur Analyse der Gemische wird an den Eluentenstrom ein Detektor (vgl. Abschnitt 2.6.3) angeschlossen.

Bei größeren Mengen dient die Arbeit mit größeren Säulensystemen und einem Fraktionssammler dem Abtrennen der Einzelsubstanzen und der späteren Isolierung aus dem Lösungsmittel (präparative HPLC).

2.6.3 Spektrometrie

Zur Detektion der Analyten werden die vielfältigsten Methoden eingesetzt. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten näher erläutert. Für die Umweltanalytik wird seit Mitte der Neunziger Jahre vermehrt die Kopplung der HPLC an die Massenspektrometrie (MS) angewandt (Cahill u. a., 2004; Hao u. a., 2007; Gentili, 2007). Dabei werden zur Unterdrückung von Matrixeffekten oft Puffer eingesetzt, die jedoch eine Schwächung des Signals hervorrufen können. Der Vorteil gegenüber der zum selben Zweck vorher fast ausschließlich genutzten GC liegt in der einfacheren Probenaufbereitung, z. B. durch die Möglichkeit, polare Substanzen in Spuren ohne vorherige Derivatisierung messen zu können (Fent u. a., 2006; Gentili, 2007). Saure Wirkstoffe

werden dabei meistens im negativen, neutrale und basische Substanzen im positiven Ionisierungsmodus gemessen (Hao u. a., 2007). Zur Strukturaufklärung von Substanzen kommt zusätzlich die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) zum Einsatz. In der präparativen HPLC wird die Detektion der zu trennenden Stoffe vor allem über das UV/VIS-Spektrum durchgeführt.

2.6.3.1 Massenspektrometrie

In einem Massenspektrometer werden die durch das Einlass-System (z. B. die Kopplung zwischen GC oder HPLC und MS) eingebrachten Moleküle in der Quelle ionisiert (Skoog und Leary, 1996). Die anschließende Trennung der entstandenen Ionen im Massenanalysator entsprechend ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses (m/z) mit verschiedenen Methoden ermöglicht die Umwandlung in ein elektronisches Signal. Die Erzeugung der Ionen geschieht noch unter Atmosphärendruck, wogegen zur Vermeidung von Stößen die nachfolgenden Bereiche mittels Hochvakuumumpfen evakuiert werden.

Die hier in der HPLC eingesetzten Bereiche sind im Folgenden genauer erklärt.

Ionenquelle

Durch das Arbeiten mit der „atmospheric pressure chemical ionization“ (APCI) bzw. der „electrospray ionization“ (ESI) in der HPLC-MS sind auch polare und massereiche, d. h. schlecht in die Gasphase überführbare Moleküle ionisierbar und es kann mit wässrigen Lösungen direkt gearbeitet werden.

Bei der APCI (Abbildung 2.2) wird der Eluentenstrom aus der HPLC, der die Analyten enthält, mit einer Koronaentladung (ca. 5 kV) zwischen einer Nadel und der Gegenelektrode (s. o.) in ein Plasma überführt. Darin werden zunächst aus Lösungsmittelbestandteilen und Puffer Ionen gebildet, die dann wiederum die Analyten ionisieren. Bei der ESI-Quelle wird die Lösung durch eine Kapillare geführt, wobei die Aufladung durch Anlegen einer hohen Spannung (2-10 kV) erfolgt (Yamashita und Fenn, 1984). Die Ladung führt durch die abstoßenden Kräfte zur Dispersion der Flüssigkeit (Vernebelung).

Durch einen konzentrisch um die Kapillare geführten Inertgasstrom werden die entstehenden Tropfen weiter verteilt und die abdampfenden Lösungsmittelmoleküle abgeführt. Idealerweise zerstäubt die Flüssigkeit immer weiter, bis nur ein Molekül des Analyten in einem Tropfen verbleibt und durch die starke Aufkonzentration die Ladung übernimmt. Die Ionisierung geschieht also in der flüssigen Phase. Durch eine Öffnung in der Gegenelektrode (z. B. direkt einer Transferkapillare, die den atmosphärischen Druckbereich vom Vakuumbereich trennt) können dann die entstandenen Ionen in den Analysator überführt werden.

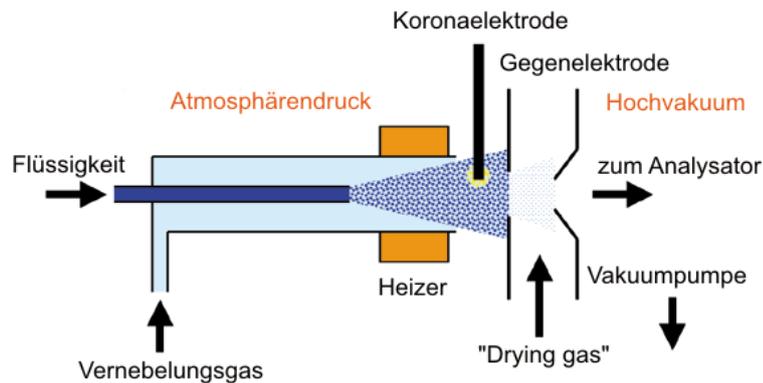


Abbildung 2.2: Schema einer APCI-Quelle

Als Kapillare wird heute zunehmend Edelstahl eingesetzt, da die bisher vor allem genutzten „fused silica“ Kapillaren dazu neigen, die Analyten zurückzuhalten, was zu einer ungünstigen Peakverbreiterung führen kann. In der Metallkapillare wird dies vermieden (Pfeifer und Spiteller, 2001).

Durch die indirekte Ionisierung im Lösungsmittel ist die ESI eine mildere Methode als die APCI. Bei letzterer kann die „harte“ Ionisierung zur Dissoziation der Analyten (Fragmentbildung) schon in der Quelle führen. Außerdem sind bei der APCI höhere Lösungsmittelmengen, also auch höhere Flussraten, notwendig, um ein konstantes Plasma zu erzeugen.

In beiden Prozessen werden durch die Anlagerung bzw. Abspaltung von geladenen Wasserstoffionen oder anderen Ionen (Addukte mit Lösungsmittelbestandteilen bzw. Puffer; NH_4OAc , Na^+ etc.) quasimolekulare Ionen wie $[\text{M}+\text{H}]^+$ oder $[\text{M}-\text{H}]^-$ (M entspricht dem Molekül des Analyten) gebildet. Wenn Inhaltsstoffe aus der Matrix der Proben Ladungen abfangen, kann es zur Signal-suppression führen (Matrixeffekt) (Metcalf u. a., 2003); dieses geschieht durch die hohe Aufkonzentrierung um einiges stärker in der ESI-Quelle (Yamashita und Fenn, 1984; Gentili, 2007; Hao u. a., 2007). Es kann auch zur Anlagerung mehrerer Ladungen kommen.

Massenanalysator

Die Massentrennung erfolgt oft mit Hilfe von Quadrupolen (Skoog und Leary, 1996), bei denen vier Stabelektroden parallel zueinander angeordnet sind. Als Linsensystem zur Fokussierung des Ionenstrahls sind den Massenfiltern unter anderem ebenfalls Quadrupole vorgeschaltet, die jedoch die Ionen nicht trennen. An den jeweils gegenüberliegenden Stabelektroden des Quadrupols wird dieselbe, an benachbarten Elektroden eine entgegengesetzte Gleichspannung angelegt, die von einer ebenso verteilten hochfrequenten Wechsellspannung (RF) überlagert ist. Je nach m/z können die an einer Öffnung eintretenden Ionen innerhalb des entstehenden elektromagnetischen Feldes

das Quadrupol nur in einem bestimmten Spannungsbereich auf einer stabilen Wellenbahn passieren. Bei Anlegen einer höheren Spannung (RF) wird ihre Bahn instabil, was zur Ablenkung der Ionen entweder gegen eine der Elektroden oder seitlich aus dem Quadrupol heraus (in das Vakuum) und somit zur Trennung entsprechend m/z führt. Neben Quadrupolen gibt es auch Oktapole (acht Elektroden) oder andere Multipole. Außerdem wird der Querschnitt der Elektroden heutzutage immer mehr angepasst, um ein möglichst homogenes Feld aufzubauen.

Ein weiterer Massenanalysator ist die lineare Ionenfalle („linear (ion) trap“; LT) (hier wurde das LTQ Orbitrap MS verwendet (Thermo Electron Corporation, 2005)). In der Ionenfalle werden die Ionen eines bestimmten Masse-Ladungs-Verhältnisses ebenfalls in einem durch Quadrupole erzeugten elektrischen Feld eingefangen. Bei der LTQ sind noch zwei weitere kurze Quadrupole (quasi als Elektroden quer zur Flugrichtung) dazugeschaltet, um die Ionen dazwischen in der Falle zu halten (Thermo Electron Corporation, 2005). Auch hier werden die Ionen aus dem Feld herausgeschleudert, wenn eine spezifische Spannung erreicht ist. Durch die zusätzlichen Quadrupole wird der senkrechte Austritt bevorzugt, die Detektion erfolgt somit senkrecht zur Ionenfalle auf zwei Seiten (Abbildung 2.3, die begrenzenden Quadrupole werden nicht gezeigt). Durch Einlassen eines Inertgases, des so genannten Kollisionsgases (z. B. Stickstoff, Argon oder Helium) können die Ionen durch Stöße angeregt werden. Die zusätzliche Energie wird in Zerfallsreaktionen umgesetzt und Fragmentationen entstehen. Das ganze System wird mittels der „automatic gain control“ (AGC) geregelt. Es ist ein diskontinuierliches System, da die Selektion des ursprünglichen Ions („parent ion“), die Anregung und die Selektion des entstandenen Fragmentions („product ion“) nacheinander in derselben Zelle durchgeführt werden. Die AGC steuert mittels eines Schnellscans, bei dem die Anzahl der Ionen ermittelt wird, wie lange das Linsensystem Ionen in die Ionenfalle einlassen muss. Würden alle Ionen eingelassen, käme es zur vermehrten Kollision, wobei die Ionen abgebremst werden und ihre Bahn verlassen. Außerdem könnte es zur unerwünschten Fragmentbildung kommen. Die in der Ionenfalle entstandenen Fragmente können selektiv detektiert oder einzeln zu weiteren Fragmentierungen (im SRM bzw. MRM Modus, vgl. Tabelle 2.11) angeregt werden. Eine Aneinanderreihung von Massentrennungen nennt man vereinfacht MS^n Experimente. Das n entspricht dabei der Anzahl von Trennungen, die aufeinander folgen. Bei der verwendeten LTQ Orbitrap ist über die Software eine datenabhängige Steuerung aktivierbar. Diese führt in einer automatischen Aneinanderreihung Fullscan-Spektren und weitere MS^n -Spektren der jeweils erscheinenden Hauptfragmente durch.

Die bisher beschriebenen Massenfilter sind niedrigauflösend. Für die hochaufgelöste Massenspektrometrie wird in dieser Arbeit eine „Orbitrap“ als Massenfilter eingesetzt (das LTQ Orbitrap MS; siehe Abschnitt 4.5). Es trennt die Ionen in einem elektrostatischen Feld (Makarov u. a., 2006). Zentrifugalkräfte halten sie hierbei auf orbitalen Bahnen um die axiale Elektrode und die elek-

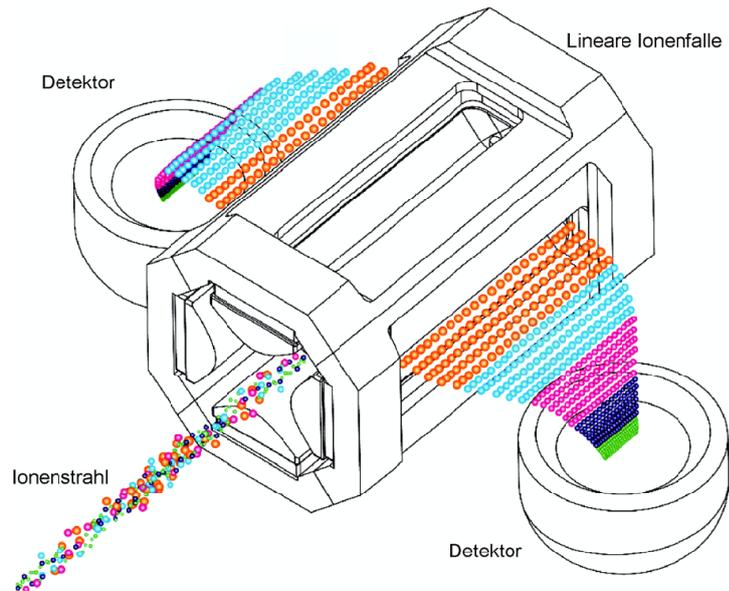


Abbildung 2.3: Funktionsweise der linearen Ionenfalle.

Mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific unter leichter Veränderung entnommen aus (Thermo Electron Corporation, 2005).

trischen Kräfte regen sie durch die spezielle Form der Elektroden zur Schwingung entlang der Elektrode an, bis sie sich schließlich in diskreten Kreisbahnen stabilisieren. Daraufhin wird die Ermittlung des korrespondierenden Masse-Ladungs-Verhältnisses durch die Analyse eines in Sekundärelektroden induzierten Bildstroms mittels schneller Fourier Transformation (FFT) möglich. In die Orbitrap werden die Ionen erst eingelassen, wenn sie ihre Anregungsenergie verloren und sich stabile Fragmente ausgebildet haben, damit die Detektion in Hochofölsung nicht erschwert wird.

Das LTQ Orbitrap MS ist ein Hybrid aus LTQ und Orbitrap (Abbildung 2.4). Für die Anregung zur Fragmentierung können die klassische „collision induced dissociation“ (CID) oder die neu entwickelte „pulsed q collision induced dissociation“ (PQD) Verwendung finden. Bei der CID werden die Ionen im RF-Feld konstant, bei der PQD dagegen mit gepulstem Feld stärker angeregt, erhalten also eine höhere kinetische Energie für Stöße. Bei der PQD wird dann auf ein sehr schwaches RF-Feld reduziert, um auch die kleineren Fragmente sichtbar zu machen, die in einem kontinuierlichen Feld durch ihre steigende kinetische Energie sonst zu schnell verloren gehen (Thermo Electron Corporation, 2006; Schwartz u. a., 2002). Damit die Orbitrap gut aufgelöste Spektren liefern kann, ist ihr eine mit AGC gesteuerte „C-Trap“ (nach ihrer Form benannt) zur Sammlung einer ausreichenden Anzahl von Ionen vorgeschaltet. Sie schickt die Ionen daraufhin mit einem RF-Impuls fokussierend senkrecht zur bisherigen Flugrichtung in die Orbitrap.

In den so genannten Tandemmassenspektrometern oder MS/MS-Geräten sind zwei Massenfilter

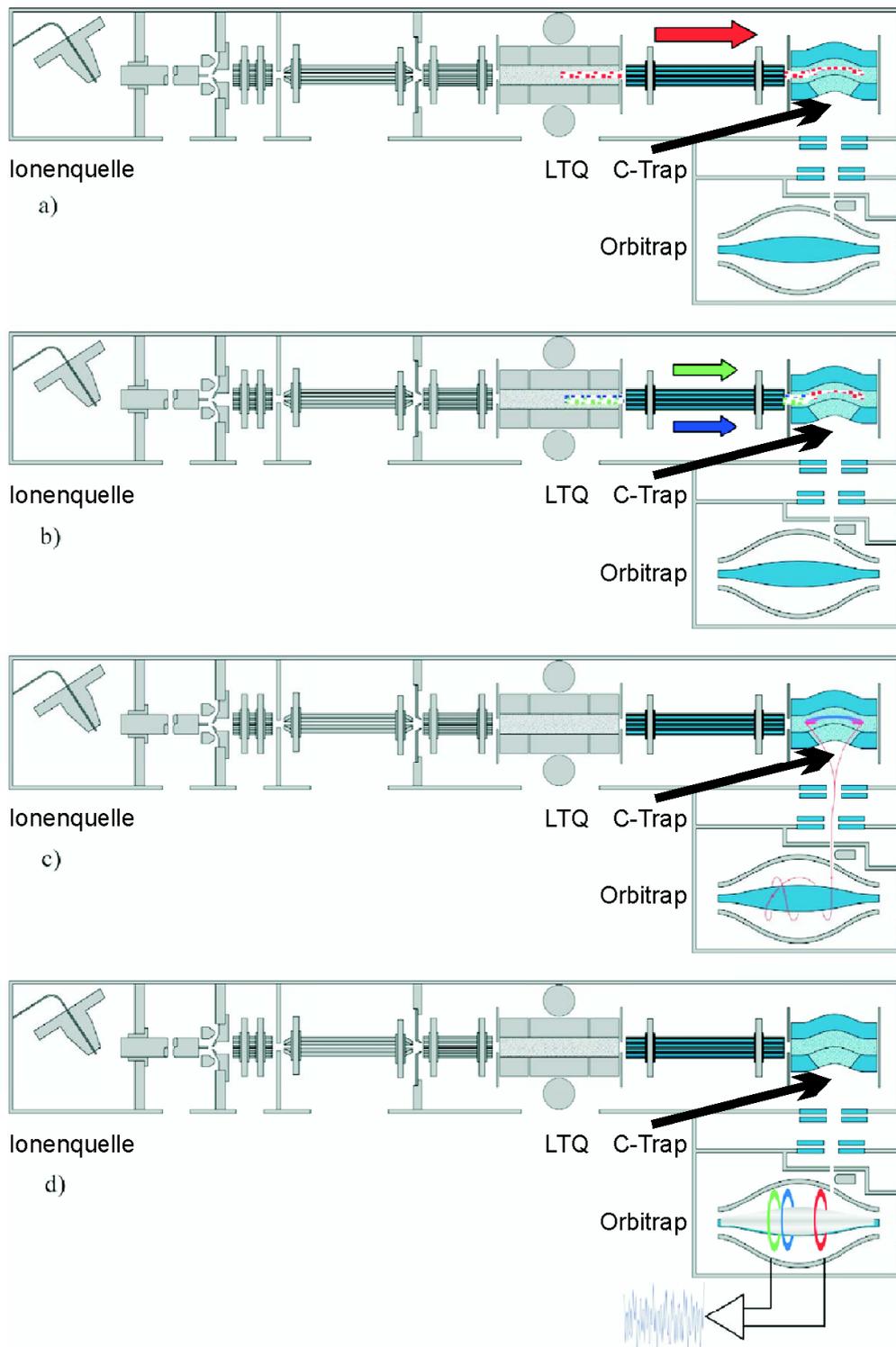


Abbildung 2.4: Funktionsschema eines LTQ Orbitrap Massenspektrometers.

a) Überführung einzelner oder b) mehrerer Ionen aus der LTQ in die „C-Trap“, wo sie eingefangen werden, c) gepulste Injektion der gemischten Ionen in die Orbitrap, d) Detektion der Ionen in der Orbitrap.

Mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific unter leichter Veränderung entnommen aus (Makarov u. a., 2005).

Tabelle 2.11: Analysemodi in der Massenspektrometrie

Bezeichnung	Abkürzung	Q1	Q2	Q3
Fullscan	FS	Selektion eines m/z-Bereichs	evakuiert	Durchlass
Selected Ion Monitoring	SIM	Selektion eines einzelnen m/z	evakuiert	Durchlass
Product Ion Scan	PIS	Selektion eines einzelnen m/z	mit Kollisionsgas gefüllt	Selektion eines m/z-Bereichs
Precursor Ion Scan	PreIS	Selektion eines m/z-Bereichs	mit Kollisionsgas gefüllt	Selektion eines einzelnen m/z
Neutral Loss	NL	Selektion eines m/z-Bereichs	mit Kollisionsgas gefüllt	Selektion eines m/z-Bereichs, der um die Masse des gesuchten Neutralteilchens verringert ist
Selected Reaction Monitoring	SRM	Selektion eines einzelnen m/z	mit Kollisionsgas gefüllt	Selektion eines einzelnen m/z
Multiple Reaction Monitoring	MRM	Selektion eines einzelnen m/z, gefolgt von weiteren Selektionen einzelner m/z	mit Kollisionsgas gefüllt	Selektion eines einzelnen m/z, gefolgt von weiteren Selektionen einzelner m/z

und dazwischen die so genannte Kollisionszelle zeitlich (z. B. in der linearen Ionenfalle) oder räumlich (z. B. im „triple stage quadrupol“; TSQ) aneinander gekoppelt, um Fragmentierungen zu studieren. Im TSQ (in dieser Arbeit verwendet: TSQ Quantum und TSQ 7000) sind es drei Quadrupole (Q_1 bis Q_3). In den zweiten Quadrupol, der während der Messungen nicht als Massenfilter eingesetzt, sondern auf Durchlass geschaltet wird, kann das Kollisionsgas eingelassen werden. So kommt es bei der Passage des Q_2 durch Stöße mit den Gasteilchen zur Erhöhung der inneren Energie des ursprünglichen Ions („parent ion“) und zum spezifischen Zerfall in oft mehrere kleinere Fragmentationen („product ions“). Auch neutrale Teilchen spalten sich eventuell dabei ab, die jedoch später nicht direkt detektiert werden können, da nur eine Steuerung der Ionen möglich ist. Die Analysemodi unterscheiden sich danach, welche Ionen durch die anderen beiden Quadrupole selektiert werden bzw. ob mit oder ohne Kollisionsgas gearbeitet wird (Tabelle 2.11).

Detektor

Für die Detektion der Ionen werden im Allgemeinen Sekundärelektronenvervielfältiger verwendet. Die Ionen schlagen beim Auftreffen auf die Oberfläche Elektronen aus dieser heraus. Diese Elektronen schlagen dann in einer Kaskade weitere Elektronen aus der häufig trichterförmigen Oberfläche, so dass schließlich ein deutlich messbares Elektrosignal entsteht, das von der Software aufgezeichnet werden kann.

Die ursprüngliche Substanz kann bei dieser Art der Detektion nicht wiedergewonnen werden, weswegen die Massenspektrometrie ein rein analytisches System ist.

2.6.3.2 Kernresonanzspektroskopie

Moleküle, die Atome mit spintragenden Kernen (und daraus resultierenden magnetischen Momenten) enthalten, sind in der Kernresonanzspektroskopie (NMR) analysierbar. Bringt man diese Substanzen in ein äußeres Magnetfeld ein, richten sich die magnetischen Momente entsprechend ihrer Quantenmechanik in bestimmte Orientierungen aus. Die verschiedenen Zustände besitzen dabei auch unterschiedliche Energieniveaus. Durch Einstrahlung gepulster elektromagnetischer Wellen einer bestimmten Radiofrequenz können Übergänge zwischen den Energieniveaus der Kerne ausgelöst und über ihr schwaches magnetisches Wechselfeld (Freier Induktionszerfall, FID) gemessen und nach Fourier-Transformation den Frequenzen im NMR-Spektrum zugeordnet werden. Das Magnetfeld im Kern wird dadurch beeinflusst, dass die Elektronen in der Hülle ein dem äußeren Magnetfeld entgegengesetztes magnetisches Feld erzeugen.

Die Energieniveaus hängen also von der näheren Umgebung des Atomkerns ab. Außerdem beeinflussen benachbarte magnetische Momente den Kern. Es kann zur Aufspaltung eines Energieniveaus in mehrere unterschiedliche kommen, abhängig von der Anzahl der möglichen Zustände des benachbarten Kerns (Kopplung). Den Abstand zwischen den aufgespaltenen Signalen (in Hz) nennt man Kopplungskonstante, den Unterschied zwischen der Frequenz, die den „nackten“ Kern anregt, im Gegensatz zu der Frequenz zur Anregung eines Kerns in einer definierten molekularen Umgebung die chemische Verschiebung δ . Sie wird in ppm angegeben.

Für chemisch sehr ähnliche Umgebungen sind die Werte der Verschiebung im selben Bereich. Um die Spektren vergleichen zu können, werden sie auf einen externen Standard (meistens Tetramethylsilan, TMS) oder die bekannte Verschiebung des Lösungsmittels bzw. einer zugesetzten Substanz (interne Standards) bezogen. Das Lösungsmittel muss möglichst vollständig deuteriert sein, damit seine Eigensignale die des Analyten nicht unterdrücken. Um messbare Signale zu erreichen, werden ca. 1 bis 10 mg Reinsubstanz¹² benötigt, je nach betrachtetem Kern. Um die Empfindlichkeit der Spektren zu verbessern, wird z. B. eine Addition multipler Spektren durchgeführt. Jedes hinzu addierte Spektrum hat somit die Verringerung des Grundrauschens zur Folge.

Bei Messungen mit zwei nacheinander wechselnden RF-Impulsen können die Messergebnisse auf diese beiden Frequenzen hin Fourier-transformiert werden, und es entsteht ein zweidimensionales (2D) NMR-Spektrum, in dem miteinander koppelnde Kerne direkt sichtbar sind. Je nach Methode ist es möglich, gleichartige (z. B. in der „correlation spectroscopy“, COSY) oder unterschiedliche Kerne (z. B. in der „heteronuclear single quantum coherence“, HSQC, bzw. „heteronuclear multiple bond coherence“, HMBC) zu betrachten. Außerdem kann zwischen direkt (z. B. COSY, HSQC) und entfernt miteinander koppelnden Kernen (z. B. HMBC) unterschieden werden.

¹²in ca. 0,75 ml Lösung

Das größte Problem in der HPLC-NMR stellt die Menge des Analyten in der Lösung dar. Um diese zu erhöhen, kommt die SPE als aufkonzentrierendes Element zwischen Chromatographie und NMR zum Einsatz (Corcoran und Spraul, 2003). Die Chromatographie kann so mit herkömmlichen Lösungsmitteln arbeiten, während in der SPE mit deutlich geringeren Mengen an deuterierten Eluenten gearbeitet wird. Durch kleinere Probenköpfe können auch kleinere Volumina rauscharme Signale hervorbringen.

Gibt man der Messprobe im $^1\text{H-NMR}$ eine definierte Menge (Masse) eines internen Standards (IS) zu, der keine Signalüberlappung mit dem Analyten hervorruft, können auch quantitative NMR-Messungen durchgeführt werden (Skoog und Leary, 1996). Dabei wird ein Protonen-Integral des Analyten unter Berücksichtigung der jeweiligen Protonenanzahl auf eine Integralfläche des IS bezogen und die korrespondierende Analytmasse berechnet:

$$m_A = \frac{I_A \cdot M_A \cdot m_{IS} \cdot n_{IS}}{I_{IS} \cdot M_{IS} \cdot n_A}$$

wobei gilt:

m : Masse

M : Molekulargewicht

I : Integral des Protonensignals

n : Anzahl der Protonen

A : Analyt

IS : interner Standard

Die NMR-Spektroskopie verändert die Analyten nicht dauerhaft, weswegen diese nach der Messung zurückgewonnen und z. B. als Standardlösung verwendet werden können.

2.6.3.3 UV/VIS-Spektroskopie

In einem Molekül beginnen die Atome durch Aufnahme von Energie zu schwingen oder zu rotieren (Skoog und Leary, 1996). Aber auch die Anregung von Valenzelektronen auf nicht besetzte höhere Orbitale ist möglich. Diese Übergänge kann man durch Bestrahlung mit sichtbarer (VIS, von engl. „visible“, Wellenlänge λ ca. 400 nm bis 800 nm) oder ultravioletter (UV, λ ca. 1 nm bis 400 nm) Strahlung auslösen. Im UV/VIS-Spektrometer wird eine Wellenlänge von ca. 200 nm bis 800 nm eingesetzt, da Licht kleinerer Wellenlängen ionisierend wirkt. Durch die verstärkte Absorption der Strahlung mit einer zum Elektronenübergang passenden Frequenz ist die Messung der Abnahme der Intensität eingestrahelter Strahlung in diesem Bereich möglich (Absorptionsmaximum). Da-

bei kann es für eine bestrahlte Substanz auch mehrere Absorptionsmaxima geben. Wird Licht im sichtbaren Frequenzbereich absorbiert, so wird die Substanz als farbig wahrgenommen. Die Farbe entspricht der Komplementärfarbe (Summe der verbleibenden Strahlung) zu der absorbierten Frequenz. Die Stärke der Absorption ist dabei proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe. Leider ist die UV/VIS-Spektroskopie nicht besonders spezifisch, da ähnliche Strukturen auch ähnliche Absorptionsmaxima aufweisen.

Kapitel 3

Wirkstoffauswahl und Herangehensweise

Der folgende Abschnitt erklärt die Auswahl der Wirkstoffe sowie das Vorgehen bei den Untersuchungen dieser Arbeit.

3.1 Auswahl der zu untersuchenden Wirkstoffe

Da für die Zwecke dieser Arbeit die Metaboliten in messbaren Konzentrationen im Abwasser vorkommen sollten, sind hier vor allem die der meist verwendeten Arzneimittelwirkstoffe interessant. Bei dem Betrachten der am häufigsten verordneten bzw. verkauften Arzneimittelwirkstoffe (Tabellen 2.1 und 2.2) fallen vor allem die Schmerzmittel (z. B. ASS, PCM, DF, Ibuprofen) ins Auge. Außerdem sind Xylometazolin oder Levothyroxin (ein Hormon zur Behandlung der Schilddrüsenunterfunktion) darin enthalten (vgl. Kapitel 2.1 auf Seite 3).

Einige dieser Substanzen erscheinen für diese Untersuchung dennoch als nicht geeignet:

- ASS wurde schon sehr gut untersucht, seine Metaboliten werden – trotz teilweise hoher Konzentrationen im Zulauf – in der Kläranlage vollständig abgebaut, nur Salicylsäure wird gefunden, die jedoch auch aus anderen Quellen stammen kann (Ternes u. a., 1998; Fent u. a., 2006).
- Der Metabolismus sowie die Umweltrelevanz von Ibuprofen sind nahezu vollständig bekannt (vgl. Abschnitt 2.4.2), so dass keine neuen Erkenntnisse erwartet werden können.
- Xylometazolin ist keinem Metabolismus unterworfen, da es nicht vom Körper aufgenommen wird (Documed AG, 2008, Präparat Xylo-Mepha).

- Levothyroxin ist ein naturidentisches Schilddrüsenhormon, das zum natürlich vorkommenden Liothyronin (T3) umgesetzt, und daher eine Abbaubarkeit in der Umwelt vorausgesetzt wird (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) 2008, Stichwort Levothyroxin).

Somit sollen die Wirkstoffe DF und PCM auf umweltrelevante Metaboliten im humanen Metabolismus untersucht werden; zunächst aber das in Oberflächengewässern ebenfalls häufig detektierte CBZ. Da bereits persistente Metaboliten bekannt sind und der Wirkstoff zahlreiche andere – in Umweltproben noch nicht untersuchte – Metaboliten hervorbringt, dient dieser Wirkstoff gleichzeitig der Überprüfung der im Folgenden beschriebenen Methode.

3.2 Herangehensweise

Diese Arbeit beschäftigte sich mit dem Vorkommen von Metaboliten einiger in großen Mengen verwendeter Wirkstoffe in der Umwelt. Die Stoffwechselprodukte von Arzneimitteln sind jedoch oft nur von den Pharmafirmen selbst bestimmt worden und selten kommerziell als Reinsubstanzen erhältlich (Stumpf u. a., 1998). Ziel war daher, durch die Analyse von Urinproben eine Methodik zu entwickeln, mit der das Vorkommen möglichst aller Metaboliten in der aquatischen Umwelt (Klärwerksabläufe) qualitativ bestimmbar wäre. Relevante Metaboliten sollen daraufhin als Reinsubstanzen für analytische Standards zur Quantifizierung isoliert werden.

Die Herangehensweise gliedert sich in mehrere Schritte (siehe Abbildung 3.1).

Urinproben der mit den entsprechenden Wirkstoffen behandelten Patienten wurden zunächst mittels Festphasenextraktion (SPE) aufgereinigt sowie aufkonzentriert. Mit dem so erhaltenen Konzentrat erfolgte ein Screening auf die entsprechenden Wirkstoffe sowie der typischen Metaboliten mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS).

Dabei wurden die um typische Massen verschobenen Ionen in Fullscanspektren betrachtet (vgl. Tabelle 2.7). So hatte ein hydroxylierter Metabolit z. B. eine um 16 Einheiten größere Masse als der entsprechende Wirkstoff. Außerdem wurden Produktionenscans (PIS) auf typische Fragmente überprüft, die entweder denen der Wirkstoffe gleichen oder durch typische Massenverschiebungen (z.B. ebenfalls $m/z +16$ für hydroxylierte Verbindungen) davon ableitbar sind. Schließlich erfolgte die Analyse intensiver Peaks (im massenspektrometrischen Fullscan-Chromatogramm) im Vergleich zu unbelastetem Blindurin („Urinscreening“).

Den so ermittelten potentiellen Metaboliten konnten bestimmte Massenübergänge zugeordnet werden. Die daraufhin erstellte vorläufige¹ Messmethode für die postulierten Metaboliten und die

¹Die Methodik kann an dieser Stelle nur optimiert werden, wenn schon ausreichend Probe vorhanden ist, sollte aber vor einer Quantifizierung mit Reinsubstanzen überprüft werden.

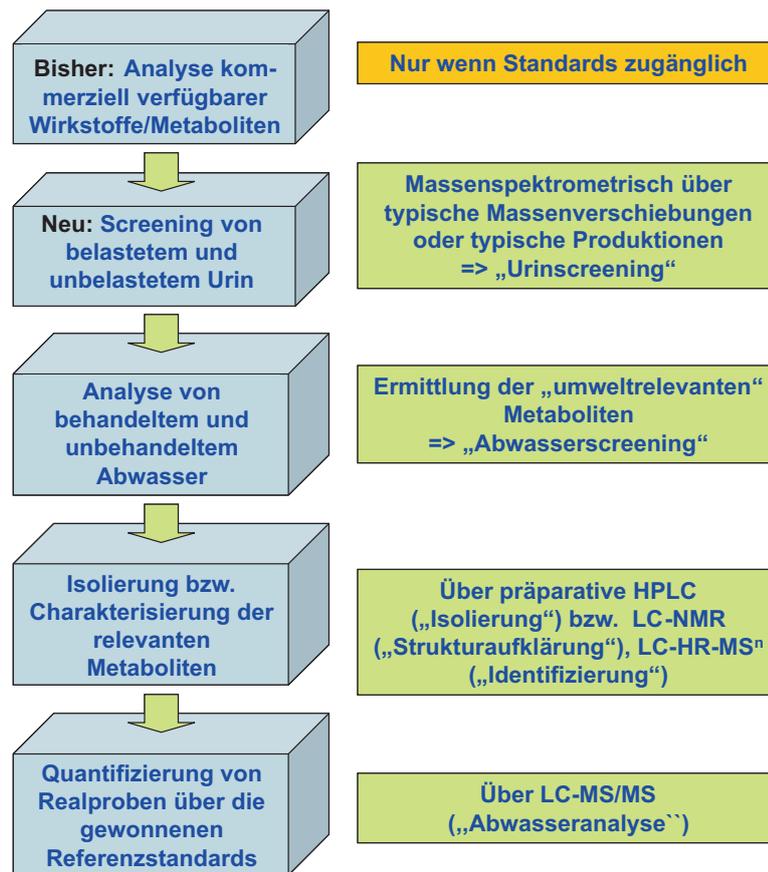


Abbildung 3.1: Schematische Herangehensweise

Durchführung eines Einzelscreenings von Abwasser mit dieser Methode diente der Überprüfung der Umweltrelevanz der entsprechenden potentiellen Metaboliten („Abwasserscreening“).

Wurden mit dieser Methode umweltrelevante Metaboliten erkannt, erfolgte deren Abtrennung („Isolierung“) mittels präparativer HPLC, um reine Standardsubstanzen zu erhalten, wobei die zugehörigen Fraktionen über die HPLC-MS („Fraktionsanalyse“) ermittelt wurden. Parallel fand die Charakterisierung der Metaboliten mittels hochauflösender (HPLC-) MS (high resolution mass spectrometry, HRMS; „Identifizierung“) bzw. HPLC-NMR-MS oder externer NMR („Strukturaufklärung“) aus einzelnen Fraktionen der Trennung statt.

Die HRMS brachte dabei die elementare Zusammensetzung der Wirkstoffe bzw. Metaboliten sowie von deren Fragmenten, die während der Messung erzeugt wurden, hervor. Auf diese Weise konnten erste Hinweise auf die Struktur erhalten werden. Genauere Informationen dazu lieferten die NMR-Messungen, durch die die Positionierung einzelner Strukturelemente zueinander deutlich wird.

Es folgte schließlich die Erstellung einer optimierten Messmethode für die Quantifizierung von Wasserproben aus verschiedenen deutschen Klärwerken in Bezug auf diese Metaboliten zur Bestätigung von deren Umweltrelevanz („Abwasseranalyse“).

Kapitel 4

Material und Methoden

Um die im Verlauf dieser Arbeit verwendeten Methoden besser zuordnen zu können, erhalten die einzelnen Abschnitte folgende Bezeichnungen (vgl. Abschnitt 3.2 auf Seite 34):

- „Urinscreening“ für die allgemeine Untersuchung von Urinprobeneluat auf Arzneimittel-metaboliten im full scan-Modus
- „Abwasserscreening“ für die Erstellung und Anwendung einer vorläufigen MRM-Methode, um aus den vorher detektierten Metaboliten diejenigen hervorzuheben, die Umweltrelevanz zeigen
- „Identifizierung“ für die Charakterisierung der gefundenen Metaboliten mittels HRMS
- „Strukturaufklärung“ für die Messungen der Metaboliten mittels LC-MS-NMR
- „Isolierung“ der relevanten Metaboliten aus Urin mittels präparativer HPLC
- „Fraktionsanalyse“ für die Analyse der Fraktionen aus der präparativen Chromatographie
- „Abwasseranalyse“ für die Erstellung und Anwendung einer optimierten MRM-Methode für die Analyse der vorher isolierten und identifizierten Metaboliten in Abwasserproben.

4.1 Verwendete Chemikalien

Acetonitril, Methanol (Baker, Deventer, Niederlande) sowie Ameisensäure (formic acid, FA), Zitronensäure, Essigsäure und Ammoniumacetat (Merck, Darmstadt) waren von analytischer Reinheit. Auch Natriumhydroxid (NaOH, $\geq 97\%$) wurde bei Merck bezogen.

Die Herstellung von Millipore-Wasser („Milli-Q Reagent Water“-Anlage) und bidestilliertem Wasser (Destillationsanlage) erfolgte im Labor. Das Millipore-Wasser wurde durch Zugabe von 1 mM Zitronensäure und 22 mM NaOH auf pH 6,4 eingestellt.

Das in der Spektrometrie verwendete Argon bzw. Helium lieferte Air Liquide, Düsseldorf; es hatte eine Reinheit von $\geq 99,999$ Vol. %. Das dort ebenfalls verwendete Stickstoffgas wurde im Labor aus Druckluft selbst erzeugt (Stickstoffgenerator, InMaTec).

Methanol-d₄ (Merck, Darmstadt) hatte den Standard Uvasol (99,8 %) und DMSO (Fluka, Buchs, Schweiz) eine Reinheit von 99,5 %.

4.2 Standardsubstanzen

Die Bereitstellung von CBZ (Reinheit > 98 %) erfolgte durch Sandoz Pharmaceuticals GmbH (Geringen), die von DF-Na (99,3 %) durch Kraemer & Martin Pharma Handels-GmbH (Krefeld). PCM (100,0 %) stellte Total (München) zur Verfügung. Aceclofenac (99,3 %) wurde von Almirall (Ismaning) und Mecoprop-d₃ von Ehrenstorfer (Augsburg) bezogen.

Die Stammlösungen der einzelnen Arzneimittelwirkstoffe bzw. deren Metaboliten wurden in einer Konzentration von 0,3 mg/l (4'-OHD, mit einem Konzentrationsanteil von 18,5 % 4'-OHDD, vgl. 5.3.3 auf Seite 95), 0,4 mg/l (4'-OHDD, vgl. 5.3.3 auf Seite 95) bzw. 1 mg/l (alle anderen Substanzen) je nach Löslichkeit in Methanol (4'-OHD, 4'-OHDD) bzw. Isopropanol (CBZ, DF, AF und PCM) angesetzt und bei 4 °C gelagert.

4.3 Herstellung von Kalibrierstandards

Die zur quantitativen Bestimmung notwendigen Kalibrierstandards wurden durch Verdünnen der Stammlösungen mit Wasser hergestellt, so dass ein Endvolumen von 500 μ l resultierte. Zu jedem Standard wurden vorher 0,5 μ g des internen Standards Mecoprop-d₃ (100 μ l einer 5 mg/l-Lösung) zugefügt. Die verwendeten Konzentrationen waren 0,050 mg/l, 0,0075 mg/l, 0,10 mg/l, 0,25 mg/l, 0,50 mg/l, 0,7 mg/l, 1,0 mg/l, 3,0 mg/l, 5,0 mg/l sowie für die Messung der Proben von ungeklärtem Abwasser zusätzlich 8,0 mg/l.

4.4 Sonstige Materialien

4.4.1 Extraktion und Aufkonzentrierung

Die Filtrierung der Proben geschah mit Faltenfiltern (595^{1/2}, Whatman/Schleicher & Schuell, Dassel). Die folgenden SPE-Kartuschen dienten der Aufreinigung und Aufkonzentration der Proben:

- PolarPlus: BakerBond PolarPlus (Baker, Griesheim), C18-oberflächenmodifiziertes Kieselgel (C18), 1 000 mg bzw. 2 000 mg, 6 ml
- Strata-X: Strata-X (Phenomenex, Aschaffenburg), oberflächenmodifiziertes Styrol(divinylbenzen)polymer, 200 mg, 6 ml
- Hysphere: Hysphere Resin GP (Spark, Emmen, Niederlande), oberflächenmodifiziertes Poly-(divinylbenzen)polymer, 10 - 12 μm , 10 · 1 mm.

4.4.2 Analytik

Die folgenden HPLC-Säulen fanden Verwendung:

- Synergy Fusion (Phenomenex, Aschaffenburg), C18, polar eingebettet, 4 μm , 150 · 2 mm
- Sunfire (Waters, Milford, USA), C18, 5 μm , 19 · 15 mm
- Alltima C18 (Alltech Associates, Deerfield, USA), C18, 5 μm , 250 · 10 mm
- Nucleodur Gravity (Macherey & Nagel, Düren), C18, 5 μm , 250 · 2 mm
- Nucleodur Sphinx RP (Macherey & Nagel, Düren), C18, 5 μm , 250 · 2 mm.

4.5 Geräte

Im Folgenden sind die benutzten Geräte sowie deren unveränderte Parameter genannt. Veränderliche Parameter werden in den einzelnen Methoden beschrieben.

4.5.1 Vorbereitung

- Zentrifuge Avanti J-25 (Beckman Coulter, Krefeld)
- Rotationsverdampfer Laborota 4001 (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach)
- Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz)

- Destillationsapparatur für bidestilliertes Wasser (Eigenbau aus Quarzglas)
- Milli-Q Reagent Water-Anlage für die Reinstwasserherstellung (Millipore, Schwalbach)
- Stickstoffgenerator (IMT-SN 1750, InMaTec)

4.5.2 Chromatographisch-analytische Geräte

Analytische LC-Systeme:

- Surveyor System (Thermo Finnigan, USA) mit Pumpe, Autosampler und PDA-Detektor
- Ultimate 3000 μ -HPLC-System (Dionex Softron, Germering) mit Pumpe, Flussmanager, Autosampler und UV-Detektor
- HP 1100 System (Agilent Technologies, Böblingen) mit einem G1367A Autosampler und einem G1314A VWD Detektor (Detektion bei 254 nm). Als Säule wurde die Nucleodur Gravity bei 40 °C eingesetzt.

Semi-/Präparative LC-Systeme:

- Gilson System (Gilson, Middleton, USA) mit einer Pumpe Typ 322, einem UV/VIS Detektor Typ 152 und einem Fraktionensammler Typ 204
- Dionex System (Dionex Softron, Germering) mit einer Gynkotech Pumpe, einem UV340S DAD-Detektor, der Chromeleon 6.00 (Build 435) Software und, daran gekoppelt, einem Foxy Jr. Fraktionensammler (ISCO, Lincoln, USA).

Massenspektrometer:

- TSQ Quantum Ultra AM (Finnigan, Engelsbach)
- TSQ 7000 (Finnigan MAT, Bremen)
- LTQ Orbitrap (Thermo Electron, Dreieich)
- Esquire 3000 Plus (Bruker BioSciences Corp., Bremen).

NMR-Geräte:

- AV 600 (Bruker BioSciences Corp., Bremen): 600 MHz
- DRX 600 (Bruker BioSciences Corp., Bremen): 600 MHz.

4.6 Probenahme

Bei der Probenahme und -behandlung muss zwischen den Urinproben und den Proben aus den Klärwerken unterschieden werden.

4.6.1 Gewinnung von Urinproben

Die für das erste analytische Screening verwendeten Urinproben (U_B1, U_CBZ1 und U_PCM1) wurden aus den Knappschaftskrankenhäusern Dortmund und Bochum bezogen und hatten ein Volumen von 10 - 40 ml.

Das Klinikum Dortmund stellte den Urin für die präparative Aufreinigung (U_DF2 und U_DF3) zur Verfügung. Den Patienten war eine jeweilige Diclofenac-Dosis von 50 - 150 mg/d verabreicht und der Harn über einen Zeitraum von 24 - 48 h gesammelt worden. Außerdem wurde dieses Medikament von gesunden Personen (U_DF1 – von dieser Person stammt auch U_B2 – und U_DF4) in Dosen von 50 - 75 mg/d eingenommen, der Urin aller Probanden – soweit dies möglich war – in dunklen Gefäßen gesammelt, bei 4 - 7 °C gelagert und schnellstmöglich weiterverarbeitet. Die Probe U_DF1 wurde ebenfalls für das erste analytische Screening verwendet. Eine Übersicht über die verwendeten Urinproben ist in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Tabelle 4.1: Probenbezeichnungen

Probenname	eingenommenes Medikament	enthaltener Wirkstoff	Volumen [ml]	pH-Wert
U_B1	-	-	9,5	5,5
U_B2	-	-	28	
U_CBZ1	Tegretol	Carbamazepin	38	7,0
U_DF1	Diclofenac-ratiopharm	Diclofenac	290	k. A.
U_PAR1	Paracetamol-ratiopharm	Paracetamol	12	k. A.
U_DF2	Diclofenac-ratiopharm, Heparin, Kaptohexal, Beloc, Allopurinol	Diclofenac, Heparin, Captopril/ Hydrochlorothiazid, Metoprolol, Allopurinol	1 200	k. A.
U_DF3	Diclofenac-ratiopharm	Diclofenac	3 200	k. A.
U_DF4	Diclo-K	Diclofenac	8 550	6,2

k.A.: keine Angabe möglich

4.6.2 Abwasser aus verschiedenen Klärwerken

Es erfolgte jeweils eine Einzelprobenahme von ca. einem Liter aus dem Zu- und Ablauf des Klärwerks (KW) 4, um das „Abwasserscreening“ durchzuführen (Tabelle 4.2). In acht verschiedenen deutschen Klärwerken wurden für die „Abwasseranalyse“ in den Zeiträumen vom 2. April bis zum 5. April 2005 (KW4), vom 19. April bis zum 15. Juni 2007 (KW1 - KW3, KW5 - KW8) und vom 23. August bis zum 25. September 2007 (KW3, KW5, KW7) Proben der KW-Abläufe genommen. Es

waren Mischproben, die über einen Tag (KW4), drei (KW1 - KW3, KW5 - KW8) bzw. sieben Tage (KW3 ab August 2007) gesammelt und in Einliter-Glasflaschen abgefüllt wurden.

Für KW4 wurden zusätzlich Proben des Zulaufs, des Ablaufs der Zwischenklärung sowie des Ablaufs der Nachklärung (vor der letzten Filtrationsstufe; siehe Abbildung 4.1) genommen. Die Proben wurden sofort gekühlt und abtransportiert. Die Abwasserproben wurden bis zur Extraktion bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (KW4) bzw. $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (alle anderen) gelagert. Die Charakteristika der Klärwerke sind in Tabelle 4.2 wiedergegeben.

Tabelle 4.2: Eigenschaften der beprobten Klärwerke (KW)

KW	Bundesland	Anzahl Proben	EWG [Tsd.]	SA [d] (ca.)	Art der Behandlung
KW1	Mecklenburg-Vorpommern	10	k. A.	k. A.	k. A.
KW2	Nordrhein-Westfalen	7	21	52	Belebung, einstufig
KW3	Sachsen	14	50	11	Belebung, einstufig
KW4	Nordrhein-Westfalen	4	1 500	24	Belebung, zweistufig
KW5	Nordrhein-Westfalen	13	14	23	Belebung, zweistufig
KW6	Hessen	11	25	> 35	Stabilisierung, einstufig
KW7	Bayern	8	26	10	Belebung, einstufig
KW8	Bayern	5	13,5	30	Belebung, einstufig

EWG: Einwohnergleichwerte, SA: Schlammalter, k.A.: keine Angabe möglich

4.7 Extraktion und Aufkonzentrierung

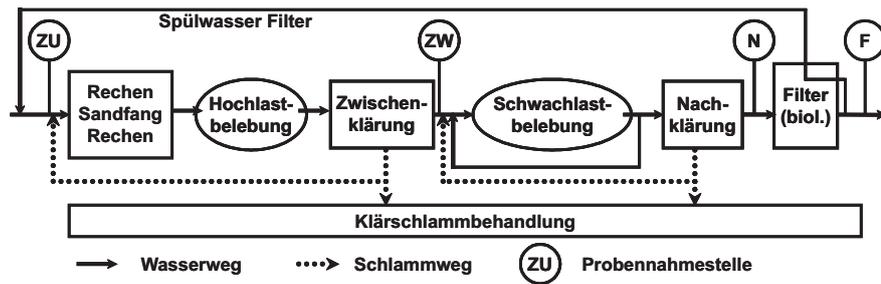
Die Extraktion der Proben erfolgte nach der jeweiligen Probenvorbereitung – abhängig von der Probenart – mit den nachfolgend dargestellten Methoden.

4.7.1 Extraktion und Aufkonzentrierung von Urin

Nach der Zentrifugation der Urinproben für das „Urinscreening“ und die „Isolierung“ über 10 Minuten bei 10 000 rpm (15 000 g) erfolgte die Extraktion des Überstands in Portionen von maximal 100 ml mit PolarPlus SPE-Kartuschen (1 000 mg). Diese wurden vorher mit $3 \cdot 2\text{ ml}$ Methanol und $3 \cdot 2\text{ ml}$ Millipore-Wasser konditioniert, nach der Perkolation des Urins mit $2 \cdot 2\text{ ml}$ Millipore-Wasser gewaschen und im Wasserstrahlvakuum 30 min getrocknet. Die Elution fand mit $3 \cdot 1\text{ ml}$ Methanol statt. Bei großen Mengen ($> 1\text{ 000 ml}$) fanden 2 000 mg-SPE-Kartuschen (max. 200 ml Harn pro Kartusche) unter Verdopplung der Menge aller verwendeten Lösungsmittel Anwendung.

Die Eluate der Proben für das „Urinscreening“ (siehe Abschnitt 5.1 auf Seite 52) wurden in einem leichten Stickstoffstrom fast zur Trockne eingengt und auf ein Endvolumen von 1 ml gebracht¹.

¹mit 200 μl MeCN + Wasser



Zu: Zulauf, Zw: Ablauf Zwischenklärung; N: Ablauf Nachklärung; F: Ablauf Filter

Abbildung 4.1: Schema des KW4 mit Probenahmestellen

Die Eluate für die „Isolierung“ (siehe Abschnitt 5.2 auf Seite 85) wurden in einem leichten Stickstoffstrom bis auf wenige Milliliter reduziert, Teilproben einer Urinprobe wieder vereinigt und mit Methanol auf ein Gesamtvolumen von ca. 10 ml aufgefüllt.

Die Lagerung aller Eluate bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei 4 °C.

4.7.2 Extraktion und Aufkonzentrierung von Abwasserproben

Für die Aufarbeitung der Abwasserproben fanden verschiedene Verfahren sowohl für aufgestockte (Methodenentwicklung) als auch die zu quantifizierenden Proben („Abwasseranalyse“) Anwendung. Stoffe, die zum Blockieren der SPE-Kartuschen führen könnten, wurden für die verschiedenen Abwasserproben durch Filtration über Faltenfilter abgetrennt.

4.7.2.1 Methodenentwicklung „Abwasseranalyse“

Vergleich von SPE-Materialien

Eine Mischprobe von Ablaufproben aus KW4 erhielt in Portionen von 250 ml je 0,50 µg (100 µl einer 5,0 mg/l-Lösung) des IS Mecoprop-d3. Nach Einstellen des gewünschten pH-Werts (Pufferzugabe siehe Tabelle 4.3) wurden die Filtrate mit einem Standardmix (mit je 125 ng Diclofenac, 4'-OHD, 4'-OHDD und Aceclofenac) versetzt, durchmischt und einzeln mit PolarPlus SPE-Kartuschen (1 000 mg) oder Strata X-Kartuschen extrahiert. Deren Konditionierung erfolgte vorher mit je zwei Säulenfüllungen (PolarPlus: 5 ml, Strata-X: 6 ml) Methanol und zwei Säulenfüllungen Millipore-Wasser (bei entsprechendem pH-Wert). An die Perkolation der Filtrate mit etwa 10 ml/min schlossen das Waschen der Kartuschen mit zwei Säulenfüllungen Millipore-Wasser (pH-Wert angepasst), 15 min Trocknen im Wasserstrahl-Vakuum und Elution mit 3 · 2 ml Methanol an.

Die Eluate der Abwasserproben wurden in einem leichten Stickstoffstrom bis auf etwa 200 µl eingengt und bis zur LC/MS-Messung (siehe Abschnitt 5.1) bei 4 °C gelagert. Vor der Messung wurden die Proben mit bidestilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von ca. 500 µl gebracht.

Tabelle 4.3: Pufferzugaben für die Optimierung der SPE-Methode

pH-Wert	Puffersystem	Zugabe von
2,0	phosphorsauer (H ₃ PO ₄)	1 ml Phosphorsäure
4,8	essigsauer	0,5 ml Essigsäure
6,4	zitronensauer	0,2 ml Zitronensäure (1M)
7,0	phosphorsauer (H ₂ PO ₄ ⁻)	0,02 ml Phosphorsäure (halbkonzentriert)

Bestimmung der Wiederfindungsraten in verschiedenen Wassertypen

Die Mischproben je eines Wassertyps erhielten nach Filtration in Portionen von 250 ml je 50 ng des IS Mecoprop-d3 (je 100 µl einer 5 mg/l-Stammlösung). Nach Einstellen des zitronensauren pH-Wertes wurden die Filtrate (je 6) bis auf die Blindproben (je 2) mit einem Standardmix (mit 600 ng 4-OHD, 120 ng 4'-OHDD, 1 100 ng DF und 225 ng Aceclofenac in 100 µl der Lösung) versetzt, durchmischt und einzeln mit PolarPlus SPE-Kartuschen (1 000 mg) unter denselben weiteren Verfahrensschritten wie für den Vergleich der SPE-Materialien extrahiert.

Der Vergleich der Extrakte aus den Abwasserproben erfolgte über drei Standardproben, die je 600 ng 4-OHD, 120 ng 4'-OHDD, 1 100 ng DF und 225 ng Aceclofenac sowie den IS (50 ng) in 500 µl bidestilliertem Wasser enthielten, aber dem Extraktionsverfahren nicht ausgesetzt worden waren.

4.7.2.2 „Abwasseranalyse“

Die Filtrate der verschiedenen Abwasserproben wurden in Portionen von 250 ml durch Zugabe von 250 µl einer 1 M Zitronensäurelösung auf pH 6,4 gebracht, mit 0,50 µg des IS Mecoprop-d3 vermischt und einzeln mit BakerBond PolarPlus SPE-Kartuschen (1 000 mg) extrahiert. Diese wurden vorher mit je 2 · 5 ml Methanol und 2 · 5 ml Millipore-Wasser (pH 6,4) konditioniert. Nach der Perkolation der Filtrate mit etwa 10 ml/min wurden die Kartuschen mit 2 · 5 ml Millipore-Wasser (pH 6,4) gewaschen und 15 Minuten im Wasserstrahl-Vakuum getrocknet. Die Elution erfolgte mit 3 · 2 ml Methanol.

Dem Einengen der Eluate der Abwasserproben in einem leichten Stickstoffstrom bis auf etwa 200 µl folgte die Lagerung bis zur Messung bei 4 °C. Vor der Messung wurden die Proben mit bidestilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von ca. 500 µl gebracht.

4.7.3 Laufmittelentfernung aus den Fraktionen der präparativen HPLC

Die getrennt gesammelten Fraktionen aus der „Isolierung“ wurden am Rotationsverdampfer vom Eluenten befreit. Die Badtemperatur betrug dabei 40 °C. Das System wurde bis zu einem Druck von höchstens 19 mbar evakuiert, um die Proben weitestgehend von dem Wasser zu befreien. Zur

vollständigen Trocknung konnten die Proben nach dem Einfrieren bei -20°C abschließend in der Gefriertrocknung behandelt werden.

4.8 Chromatographie

Es fanden sowohl für die analytische als auch für die präparative Chromatographie unterschiedliche Verfahren auf mehreren Systemen Anwendung bei teilweiser Ankopplung an die später erläuterten Spektroskopie-Verfahren.

4.8.1 Analytische Verfahren

In den verschiedenen Teilbereichen dieser Arbeit wurden die analytischen Verfahren mehrfach angepasst. In den folgenden Abschnitten sind die einzelnen Bereiche genauer beschrieben.

4.8.1.1 „Urinscreening“ und „Abwasserscreening“

Das „Urinscreening“ sowie das „Abwasserscreening“ wurden mit der Surveyor-Anlage, gekoppelt an das TSQ Quantum Massenspektrometer, durchgeführt. Als Säule fand die Synergy Fusion Verwendung. Der Fluss betrug $0,3\text{ ml/min}$ für APCI-Messungen bzw. $0,2\text{ ml/min}$ für ESI-Messungen. Das Laufmittel bestand aus Wasser, dem $0,1\%$ FA zugefügt (Eluent A), und Acetonitril, dem $0,1\%$ FA zugefügt worden waren (Eluent B). Dabei entsprach der in Tabelle 4.4 dargestellte Gradient der jeweiligen Messmethode.

Tabelle 4.4: Gradientenprogramm der HPLC zum „Urinproben-“ sowie „Abwasserscreening“, abhängig vom Ionisierungstyp (Fluss: $0,3\text{ ml/min}$ bei APCI bzw. $0,2\text{ ml/min}$ bei ESI)

Zeit (APCI) [min]	Zeit (ESI) [min]	Eluent A [%]
0 - 3	0 - 4	100
3 - 6	4 - 7	100 - 85
6 - 19	7 - 25	85 - 60
19 - 22	25 - 27	60 - 0
22 - 26	27 - 32	0
26 - 27	32 - 32,5	0 - 100
27 - 34	32,5 - 40	100

4.8.1.2 „Fraktionsanalyse“ und „Abwasseranalyse“

Die „Fraktionsanalyse“ sowie die „Abwasseranalyse“ wurden an einem LC-MS-System, bestehend aus der Surveyor-Anlage gekoppelt an das TSQ 7000 Massenspektrometer, durchgeführt.

Die Trennung erfolgte mit der Nucleodur-Sphinx-RP-Säule bei einem Fluss von $0,2\text{ ml/min}$. Die mobile Phase bestand aus bidestilliertem Wasser, dem $0,1\%$ FA zugefügt worden waren (Eluent A)

und aus Acetonitril mit einem Zusatz von 0,1 % FA (Eluent B). Dabei war das in Tabelle 4.5 angegebene Gradienten-Programm im Einsatz.

Tabelle 4.5: Gradientenprogramm der HPLC zur analytischen Bestimmung von Diclofenac und seinen Metaboliten (Fluss: 0,2 ml/min)

Zeit [min]	Eluent A [%]
0 - 5	80 - 55
5 - 30	55
30 - 32	55 - 45
32 - 46	45 - 35
46 - 47	35 - 0
47 - 50	0
50 - 50,5	0 - 80
50,5 - 60	80

4.8.1.3 „Strukturaufklärung“

Bei der „Strukturaufklärung“ per HPLC-MS-NMR fand das Agilent HP 1000-System Anwendung. Die Probe wurde in 0,3 ml Acetonitril/Wasser (70:30, v/v) gelöst. Das Injektionsvolumen betrug 0,020 ml, der Säulenofen war auf 40 °C eingestellt. Die Trennung erfolgte auf der Nucleodur-C18-Säule mit den Eluenten Wasser (+ 0,1 % FA, Eluent A) und Acetonitril (+ 0,1 % FA, Eluent B) mit dem in Tabelle 4.6 angegebenen Gradienten bei einem Fluss von 0,2 ml/min.

Tabelle 4.6: Gradientenprogramm für die HPLC-MS-NMR-Messung (Fluss: 0,2 ml/min)

Zeit [min]	Eluent A [%]
0 - 1	80 - 60
1 - 34	60 - 40
34 - 35	40 - 5
35 - 39	5
39 - 39,2	5 - 80
39,2 - 56	80

4.8.1.4 „Charakterisierung“

Für die „Charakterisierung“ (HPLC-HRMSⁿ) wurde das Dionex Ultimate 3000 μ -HPLC-System ($\lambda = 254$ nm, Injektionsvolumen 1 μ l) mit der Gemini-Säule eingesetzt. Die Laufmittel waren mit 0,1 % FA versetztes bidestilliertes Wasser (Eluent A) und ebenfalls mit 0,1 % FA versetztes Acetonitril (Eluent B), bei einem Fluss von 4 μ l/min. Dabei fand der in Tabelle 4.7 angegebene Gradient Verwendung.

Tabelle 4.7: Gradientenprogramm für die HPLC – HRMSⁿ-Messung (Fluss: 4 μ l/min)

Zeit [min]	Eluent A [%]
0 - 1	95 - 55
1 - 13	55 - 30
13 - 15	30 - 0
15 - 20	0
20 - 20,2	0 - 95
20,2 - 29	95

4.8.2 Präparative Verfahren

Die Abtrennung der interessanten Metaboliten aus dem SPE-Eluat des Urins erfolgte in vier Schritten mittels HPLC. Dabei kamen sowohl ein präparatives (Gradiententrennung) als auch ein semi-präparatives LC-System (isokratische Trennung) zum Einsatz. Die einzelnen Fraktionen wurden jeweils getrocknet und vor dem nächsten Trennungsschritt in einem – den Anfangsbedingungen möglichst ähnlichen – Lösungsmittelgemisch wieder aufgenommen (zunächst in der organischen Phase, um die Lösung zu verbessern).

Die Gradiententrennung wurde auf dem Gilson-System mittels der Sunfire-C18-Säule bei einer Wellenlänge von $\lambda = 254$ nm bei einem Fluss von 14 ml/min und durch Kollektion einer Fraktion alle zwei Minuten durchgeführt. Die mobile Phase bestand aus Millipore-Wasser, dem 0,1 % FA zugefügt worden waren (Eluent A), und aus destilliertem Methanol mit einem Zusatz von 0,1 % FA (Eluent B).

Die erste Trennung (A) erfolgte mittels des in Tabelle 4.8, die Zweite (B) mittels des in Tabelle 4.9 angegebenen Gradienten-Programms.

Tabelle 4.8: Gradientenprogramm der ersten Gradiententrennung (A) in der präparativen HPLC (Fluss 14 ml/min)

Zeit [min]	Eluent A [%]
0 - 3	100
3 - 15	100 - 60
15 - 25	60 - 0
25 - 30	0
30 - 33	0 - 100
33 - 37	100

Tabelle 4.9: Gradientenprogramm der zweiten Gradiententrennung (B) in der präparativen HPLC (Fluss 14 ml/min)

Zeit [min]	Eluent A [%]
0 - 4	50
4 - 30	50 - 0
30 - 40	0
40 - 42	0 - 50
42 - 50	50

Die isokratische Trennung wurde auf dem Dionex LC-System bei einer Wellenlänge von $\lambda = 254$ nm mit automatischer Fraktionssammlung über die Steigung im Chromatogramm durchgeführt. Die Separation geschah hier mittels der Alltima-Säule.

Die erste isokratische Trennung (C) erfolgte mit Millipore-Wasser unter Zufügung von 0,1 % FA (Eluent A) und destilliertem Methanol mit einem Zusatz von 0,1 % FA (Eluent B) in einem Verhältnis von 45:55 (v/v) bei einem Fluss von 4 ml/min.

In der zweiten isokratischen Trennung (D) bestand die mobile Phase aus Millipore-Wasser, dem 0,1 % FA zugefügt worden waren (Eluent A) und aus Acetonitril mit einem Zusatz von 0,1 % FA (Eluent B) in einem Verhältnis von 65:35 (v/v). Der Fluss betrug ebenfalls 4 ml/min.

4.9 Detektion

Die qualitative und quantitative Bestimmung der Urinproben-Eluate („Urinscreening“), der Abwasserproben („Abwasserscreening“ und „Abwasseranalyse“) und der einzelnen Fraktionen aus der präparativen Chromatographie („Fraktionsanalyse“) erfolgte durch massenspektrometrische (MS) Untersuchungen. Zur „Identifizierung“ sowie zur „Strukturaufklärung“ der isolierten Diclofenac-Metaboliten fanden außerdem die Verfahren der hochauflösenden Massenspektrometrie (HRMS) sowie der Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) Verwendung. Die Bestimmung der Masse der aufgereinigten Diclofenac-Metaboliten für die Standardlösungen geschah durch quantitative NMR-Spektroskopie.

4.9.1 Massenspektrometrische Untersuchungen

Die an die Flüssigkeitschromatographie gekoppelte Massenspektrometrie (HPLC-MS) erfolgte an zwei verschiedenen Systemen mit dem TSQ Quantum oder dem TSQ 7000 Massenspektrometer. Beide waren an Surveyor HPLC-Anlagen gekoppelt.

4.9.1.1 „Urinscreening“ und „Abwasserscreening“

Für das „Urinscreening“ und das „Abwasserscreening“ kam das TSQ Quantum Massenspektrometer zur Anwendung. Das Kollisionsgas für Fraktionierungen war Argon (0,13 Pa). Für die APCI-Messungen erfolgte die Ionisierung bei einer Quellentemperatur von 450 °C und einer Kapillartemperatur von 190 °C mittels Stickstoff (mit 47 gerätespezifischen Einheiten – „arbitrary units“, a. u. –, als Hilfsgas 6 a. u.) in positivem und negativem Modus durch eine angelegte Spannung von 5 kV. Für die ESI-Messungen wurde der Druck des Trockengases auf 36 a. u. verringert und kein Hilfsgas verwendet, die Kapillartemperatur dagegen auf 250 °C erhöht. Die Ionisierung wurde ebenfalls durch Anlegen von 5 kV (positiver und negativer Modus) erreicht. Für die Optimierung der anderen Parameter kam das automatische „tuning“ (für APCI bzw. ESI) zur Anwendung. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Xcalibur (Version 2.0, Finnigan).

4.9.1.2 „Fraktionsanalyse“ und „Abwasseranalyse“

Die „Fraktionsanalyse“ und die „Abwasseranalyse“ wurden an dem TSQ 7000 Massenspektrometer durchgeführt. Die „Fraktionsanalyse“ erfolgte massenspektrometrisch im negativen ESI Fullscan-Modus (Massenbereich: m/z 100 - 800) durch das Aufzeichnen eines Totalionenstrom-Chromatogramms (TIC). Die Ionisierung wurde durch eine Spannung von 3 kV sowie mittels Stickstoff (450 kPa) und einer Kapillartemperatur von 260 °C erreicht. Für den Nachweis von Diclofenac,

Tabelle 4.10: MRM-Bedingungen für das Screening von Wasserproben aus Klärwerken

Analyt	SRM 1 [M + FA - H] ⁻ → quantifier (<i>m/z</i>)	Kollisions- energie	SRM 2 [M + FA - H] ⁻ → qualifier (<i>m/z</i>)	Kollisions- energie
5-OHD ^a	356 → 310	-12.0 ^a	356 → 266	-21.5 ^a
4'-OHD	356 → 310	-12.0	356 → 266	-21.5
4'-OHDD	338 → 292	-14.5	338 → 256	-32.5
DF	294 ^b → 250	-16.5	294 ^b → 214	-24.5
AF	352 → 75	-16.0	352 → 250	-25.0
IS	262 → 216	-12.5	262 → 144	-25.5

^a nicht mit analytischem Standard optimiert, aber durch die Strukturähnlichkeit als gleichwertig zu 4'-OHD betrachtet

^b [M + H]⁺

den Hydroxydiclofenac-Isomeren bzw. 4'-OHDD in den präparativen Fraktionen kam die Selektion der Massenspuren (Ionen mit *m/z* 293,84; 309,82 bzw. 291,82) aus dem TIC unter der Berücksichtigung der Elutionsreihenfolge zur Anwendung. Die Messung in der „Abwasseranalyse“ erfolgte entsprechend, es wurde jedoch im MRM-Modus gemessen, dessen Konditionen in Tabelle 4.10 angegeben sind. Das Kollisionsgas war Argon (0,27 Pa). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Xcalibur (Version 1.3, Finnigan).

4.9.2 Hochauflösende Massenspektrometrie

Zur Identifizierung der Metaboliten kam das LTQ Orbitrap Massenspektrometer mit ESI im FT-Modus (Detektion über die Orbitrap) zum Einsatz. Die Chromatographie dazu wurde an dem Dionex Ultimate 3000 μ -HPLC-System durchgeführt.

Die Arbeiten erfolgten bei einer Kapillartemperatur von 250 °C und einer Spannung von 5 kV mit Stickstoff als Trockengas (6 a. u.) und Helium als Kollisionsgas. Das Massenspektrometer arbeitete in positivem wie negativem ESI-Modus mit einem Massenbereich im full scan-Modus von (*m/z*) 100 bis 1000 – bei einer nominellen Massenauflösung von 60 000 bei *m/z* 400 – und einer „scan rate“ von 1 Hz. Die AGC ermöglichte die Aufnahme hochaufgelöster Massenspektren – im positiven Modus bei einer Abweichung von maximal 2 ppm durch Verwendung einer internen „lock mass“ (Bis-(2-ethylhexyl-)phthalat, *m/z* = 391,284286) – sowie automatische Scanevents wie die Fragmentierung eines der Hauptsignale aus einem vorherigen Scanevent. Die Fragmentierungen im PIS wurden sowohl im CID-Modus (bei 25 - 30 % *m/z*-normalisierter Kollisionsenergie, KE) als auch im PQD-Modus (bei 35 % *m/z*-normalisierter KE) durchgeführt. Bei zu geringer Ionenintensität war eine Fraktionierung bereits in der Quelle bei einer Energie von ± 25 eV möglich. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Xcalibur (Version 2.0, Finnigan).

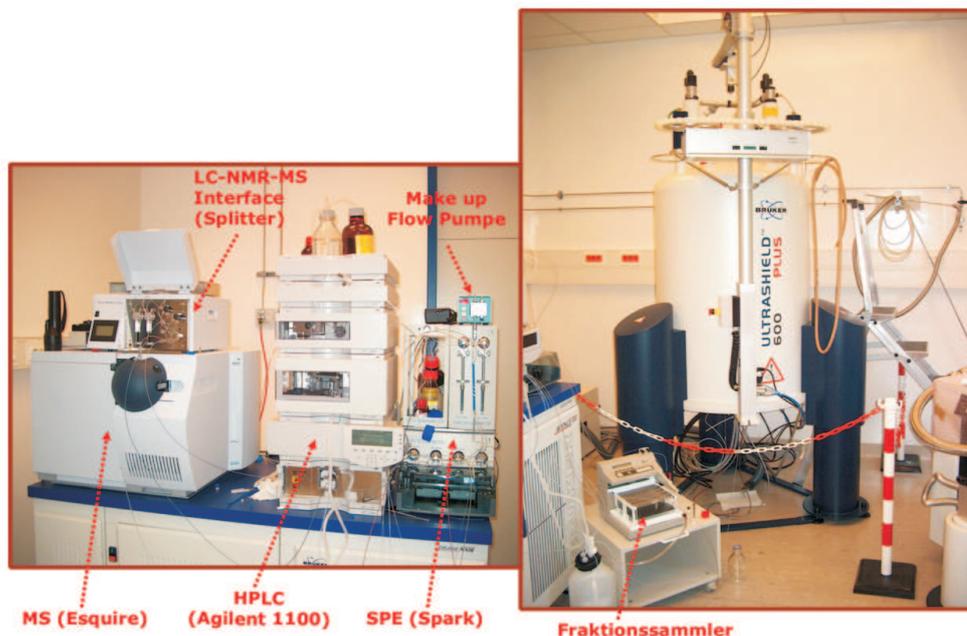


Abbildung 4.2: Aufbau der verwendeten HPLC-MS-SPE-NMR-Anlage

4.9.3 Nuklearmagnetische Resonanzspektroskopie

Für die „Strukturaufklärung“ der Diclofenac-Metaboliten fand das Agilent-LC-System Anwendung, das zwischen System und UV-Detektor mit einem Split von 1:20 an das Esquire 3000 Plus MS-System gekoppelt war. Der Auslass des Detektors war an die Prospekt2 SPE-Einheit (Spark, AJ Emmen, Holland) angeschlossen, deren Eluent direkt in das AV600 NMR-Spektrometer geleitet wurde (Abbildung 4.2).

Die Messung am Esquire 3000 Plus geschah im positiven ESI-full scan-Modus mit einem Scanbereich von (m/z) 50 bis 1000, einer maximalen „aquisition time“ von 200 ms, einer Kapillarspannung von 94 V (HV: 4,5 kV) und einer Trockengas-Temperatur von 250 °C.

Für einen Peak mit einem gewünschten m/z -Signal erfolgte dessen Abtrennung auf der Hysphere SPE-Kartusche, die Trocknung derselben in einem Stickstoffstrom (30 min) sowie die Elution mit 300 μ l Methanol- d_4 .

Mit den so erhaltenen Lösungen war die Aufnahme von ^1H -, ^1H - ^1H -COSY-, HMQC- und HMBC-Spektren über Standardprozeduren bei 298 K auf einem 3 mm-Probenkopf mittels der TopSpin 1.3 Software (Bruker) möglich.

4.9.4 Quantitative Nuklearmagnetische Resonanzspektrometrie

Die Ermittlung der Menge der isolierten Diclofenac-Metaboliten 4'-OHD und 4'-OHDD erfolgte durch quantitative ^1H -NMR-Messungen mit DMSO als IS. Durch Zugabe von $5,35\ \mu\text{l}$ (entspricht einer Menge von $5,88\ \text{mg}$) DMSO zu jeder NMR-Messlösung (Substanz in d_4 -Methanol) konnten die Integrale der Protonen des IS (bei $\delta = 2,63$, 6 H) und des jeweiligen Analyten (bei $\delta = 6,23$, 1 H, für 4'-OHD und bei $\delta = 6,42$, 1 H, für 4'-OHDD) direkt aufeinander bezogen und der Gehalt des Analyten gemäß Abschnitt 2.6.3.2 auf Seite 30 bestimmt werden. Durch Auffüllen der NMR-Lösung auf ein definiertes Volumen ergab sich die Konzentration der Analyten in der Stammlösung.

Kapitel 5

Ergebnisse und Diskussion

Die im „Urinscreening“ erkannten Metaboliten dienten zur Ermittlung der Umweltrelevanz im „Abwasserscreening“. Die positiv getesteten Metaboliten wurden mittels HRMS („Identifizierung“) und HPLC-NMR-MS („Strukturaufklärung“) charakterisiert und durch präparative HPLC „isoliert“. Schließlich folgte die „Abwasseranalyse“ auf die Konzentrationen dieser Metaboliten und des entsprechenden Wirkstoffs.

5.1 Erkennung umweltrelevanter Metaboliten aus Urinproben

Im „Urinscreening“ erfolgte die Untersuchung verschiedener Urinproben auf das Vorkommen von Metaboliten der entsprechenden Wirkstoffe. Der untersuchte Urin war von Patienten, die zuvor CBZ, DF bzw. PCM eingenommen hatten. Es erfolgte ein Vergleich der Ergebnisse mit Blindurin (U_B1 bzw. U_B2), das heißt mit Urin einer Person, die keine Medikamente eingenommen hatte.

Zentrifugation und SPE dienten der Erstellung eines Urin-Konzentrates (1 ml) für FS-, PIS- und MRM-Messungen. Auf das Vorhandensein der so ermittelten Metaboliten wurde daraufhin das SPE-Konzentrat¹ einer Einzelprobe (Zu- und Ablauf) aus Klärwerk KW4 überprüft.

5.1.1 Carbamazepin

Der erste untersuchte Wirkstoff, CBZ, diente vor allem der Erprobung der Methode. Für ihn sind schon persistente Metaboliten ermittelt worden (Miao und Metcalfe, 2003). Dabei erfolgte die Untersuchung jedoch nur auf fünf der zahlreichen Metaboliten des CBZ (Abbildung 5.1). Die hier eingesetzte Methodik, um ohne Standards umweltrelevante Metaboliten zu ermitteln, wird im Folgenden beispielhaft beschrieben.

¹mit der gleichen Probenvorbereitung

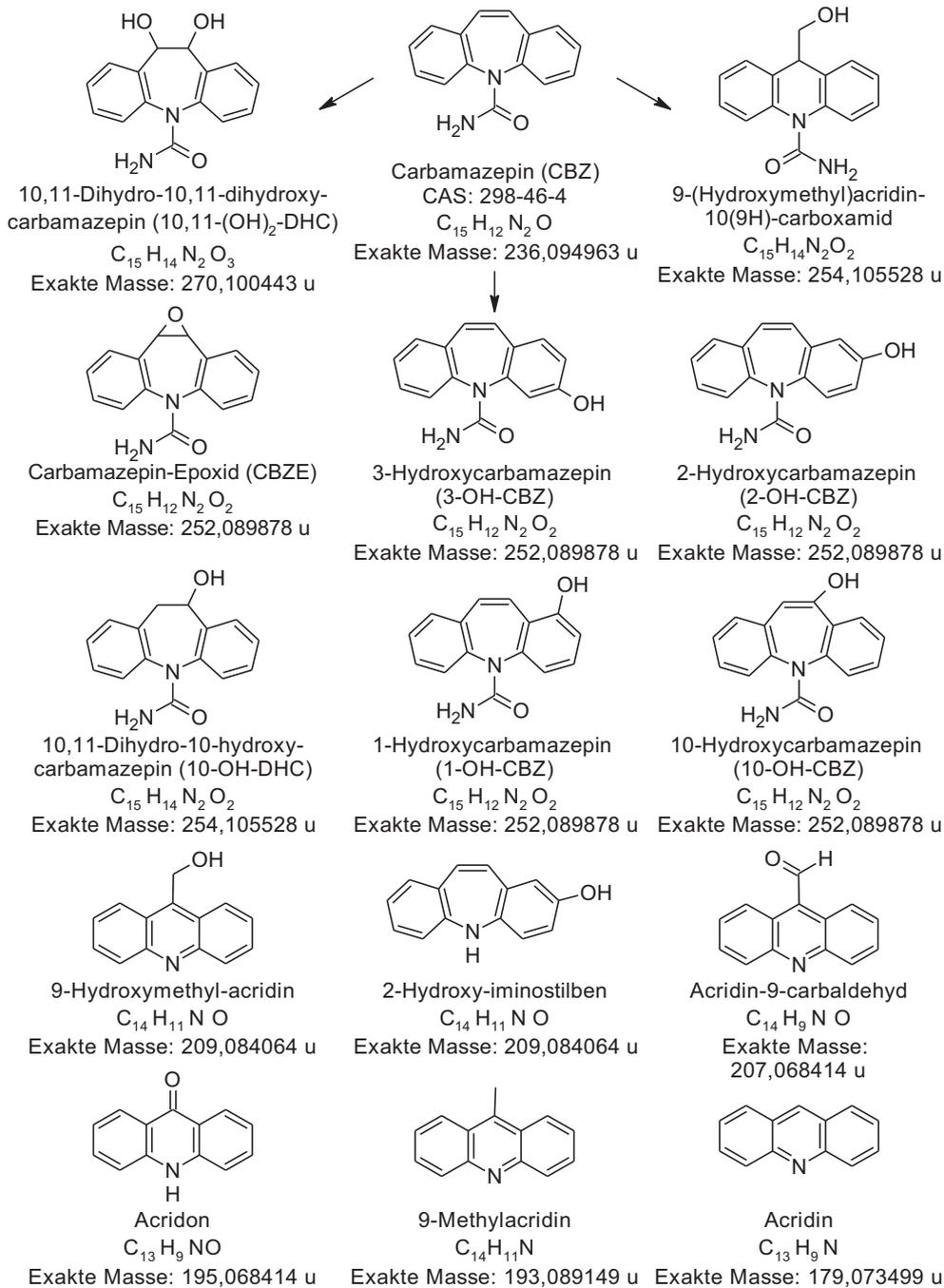


Abbildung 5.1: Einige Metaboliten von CBZ

Zunächst wurde ein CBZ-Standard im positiven APCI-Modus sowohl im full scan als auch im PIS bei verschiedenen Kollisionsenergien (KE) vermessen, um das Massenspektrum und die spezifischen Fragmente zu ermitteln.

Im full scan-Spektrum war deutlich zu sehen (Abbildung 5.2), dass schon bei geringen KE das quasi-Molekularion (m/z 237) deutlich kleiner ist als das ebenfalls zu sehende Fragment mit m/z 194, welches durch Abspaltung der Carbamidgruppe als Isocyanäure $HN=CO$ und Ringver-

kleinerung entsteht. Die Abspaltung der Methylgruppe, von Methanimin $\text{HN}=\text{CH}_2$ beziehungsweise von C_2H_2 daraus führte zu den im PIS zu beobachtenden Fragmenten mit m/z 179, 165 bzw. 152 (Abbildung 5.3)².

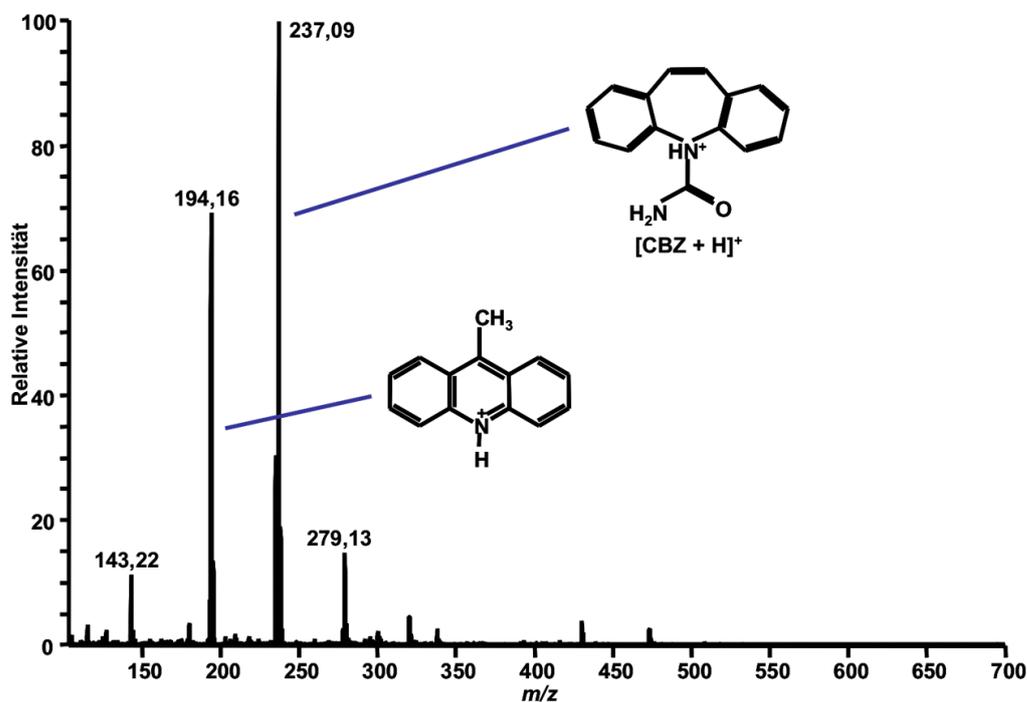


Abbildung 5.2: APCI-Fullscan-Spektrum eines CBZ-Standards

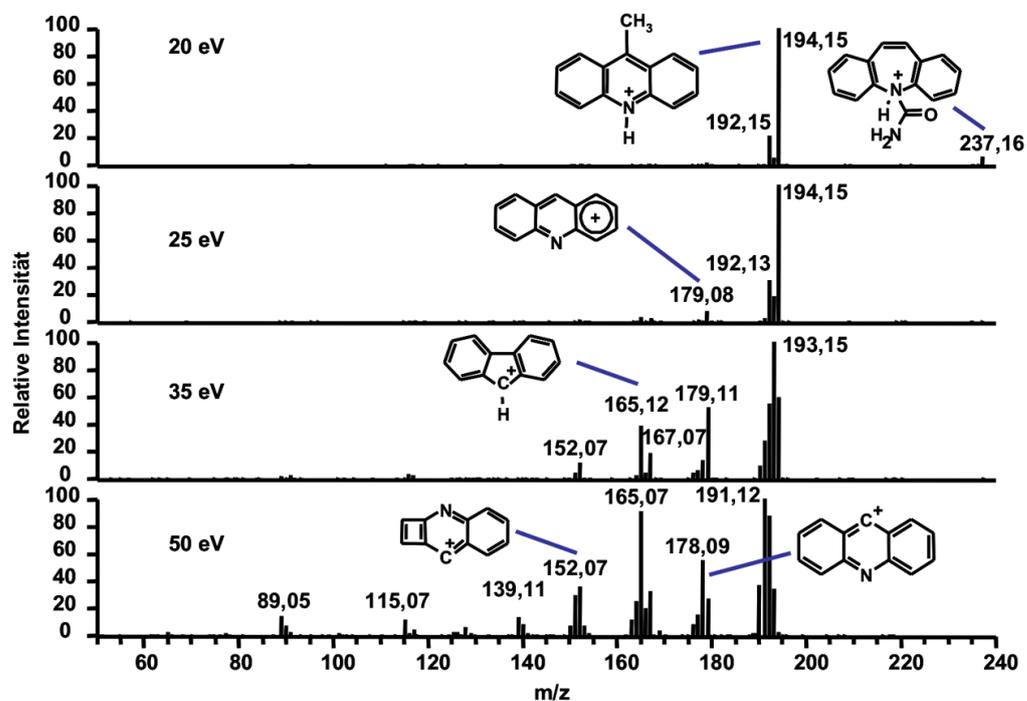


Abbildung 5.3: Produktionscan eines CBZ-Standards bei verschiedenen Kollisionsenergien mit postulierten Fragmenten

²Die in dieser Arbeit postulierten Fragmente zu CBZ und seinen Metaboliten wurden teilweise analog Doll (2004) bzw. Petrovic und Barceló (2007) entwickelt.

5.1.1.1 Erkennung potentieller CBZ-Metaboliten

Die Untersuchungen auf umweltrelevante CBZ-Metaboliten erfolgten mittels des Urinprobeneluates U_CBZ1. Dazu wurde ein allgemeiner Gradientenlauf gewählt. Die Abbildungen 5.4 und 5.5 zeigen die durch HPLC-MS im positiven APCI (zur Unterdrückung von Matrixeffekten) bzw. ESI full scan Modus (Massenbereich m/z 50 - 700) erhaltenen Totalionenstrom- (TIC) und die entsprechenden UV-Chromatogramme (bei $\lambda = 254$ nm). Der Vergleich mit der Messung des Standards führt zu der Zuordnung des Peaks bei 17,6 min zu CBZ (Abbildungen 5.6 und 5.7).³

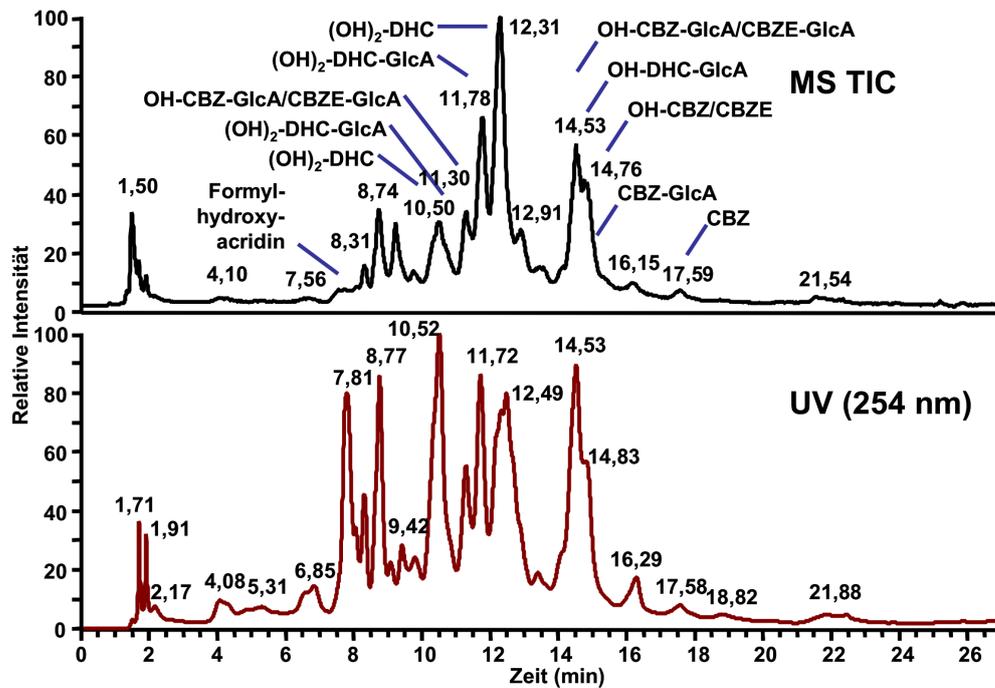


Abbildung 5.4: MS- sowie UV-Chromatogramme des U_CBZ1-Urineluates mit postulierten Metaboliten (APCI)

³In diesem Abschnitt gelten im Folgenden alle Retentionszeiten, wenn nicht anders angegeben, für APCI-Messungen. Dies dient der leichteren Wiedererkennung potentieller Metaboliten, auch wenn die Zeiten in ESI-Messungen durch den geringeren Fluss verlängert werden.

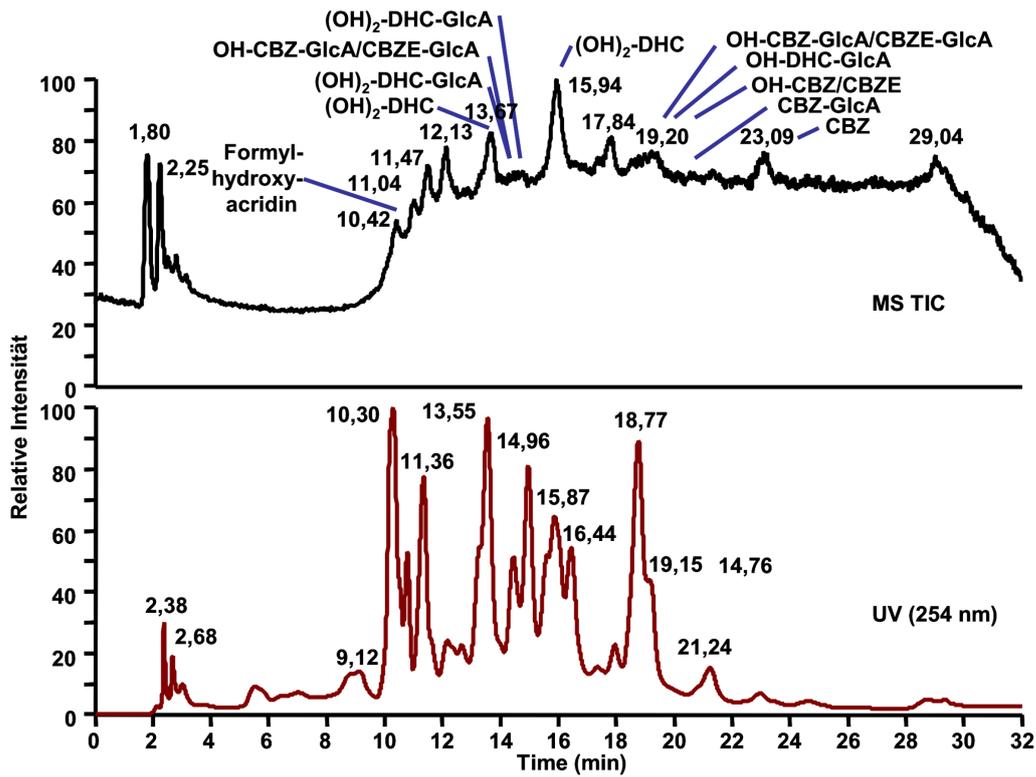


Abbildung 5.5: MS- sowie UV-Chromatogramme des U_CBZ1-Urineluates mit postulierten Metaboliten (ESI)

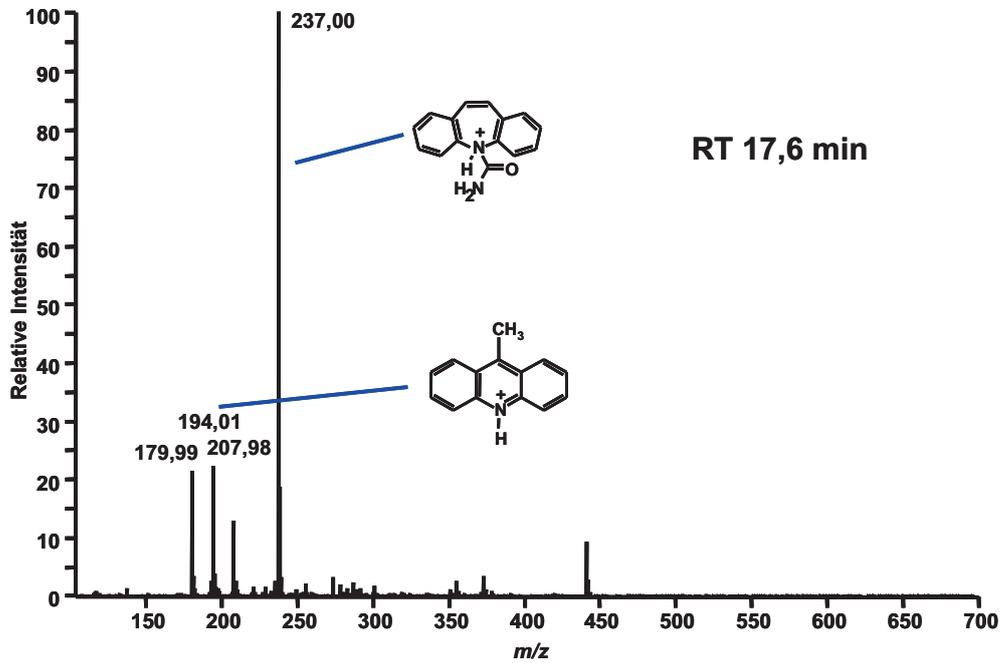


Abbildung 5.6: Full scan-Spektren des U_CBZ1-Urineluates und postuliert Fragmente bei der RT von 17,6 min (APCI)

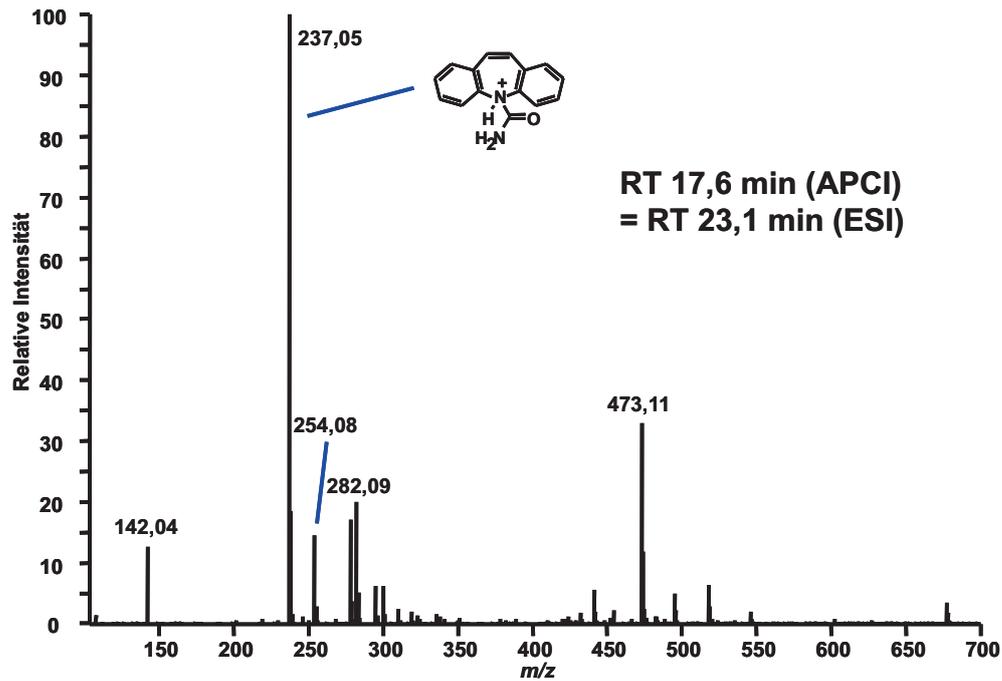


Abbildung 5.7: Full scan-Spektren des U_CBZ1-Urineluates und postulierte Fragmente bei der RT von 17,6 min (ESI)

Die zusätzlichen Fragmente mit m/z 208 bzw. 180 können durch andere Fragmentierungen in der Quelle (durch eine veränderte Matrixzusammensetzung bei der Messung der Urinprobe im Gegensatz zu dem Standard in reinem Lösungsmittel) entstanden sein oder aber durch Überlagerung mit einer strukturähnlichen Substanz. In der ESI-Quelle kam es hier zur Dimerisierung des CBZ (m/z 473). Die full scan-Spektren der beiden Hauptpeaks bei 12,3 min und 11,8 min sind in den Abbildungen 5.8 bis 5.11 dargestellt.

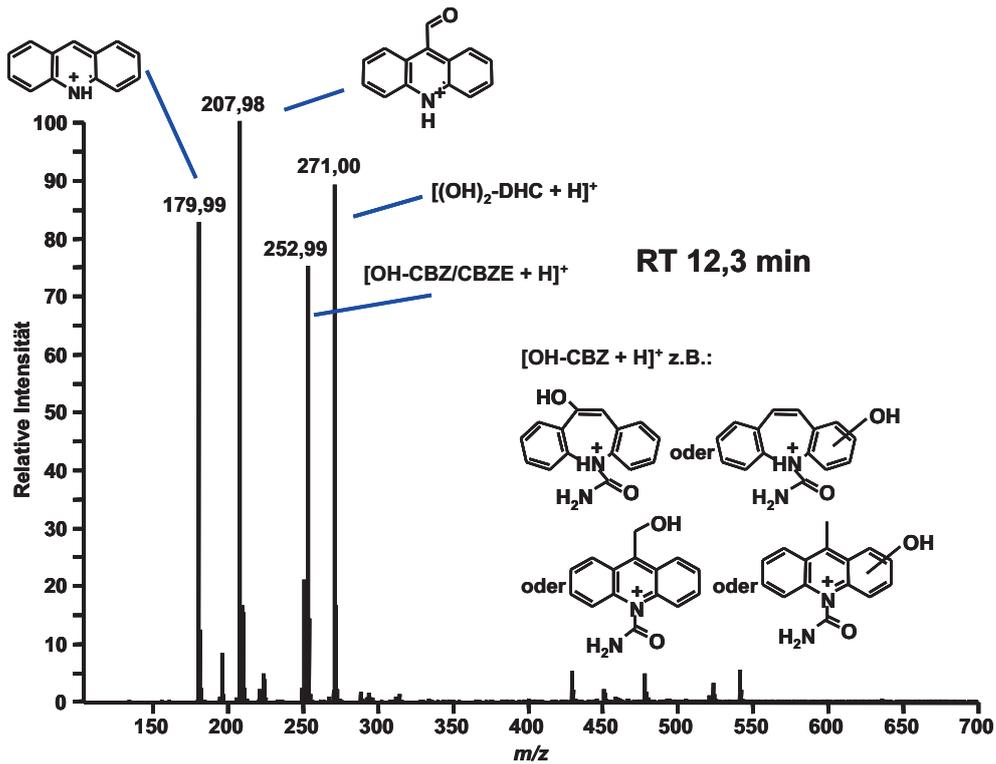


Abbildung 5.8: Full scan-Spektren des U_CBZ1-Urineluates und postulierte Fragmente bei der RT von 12,3 min (APCI)

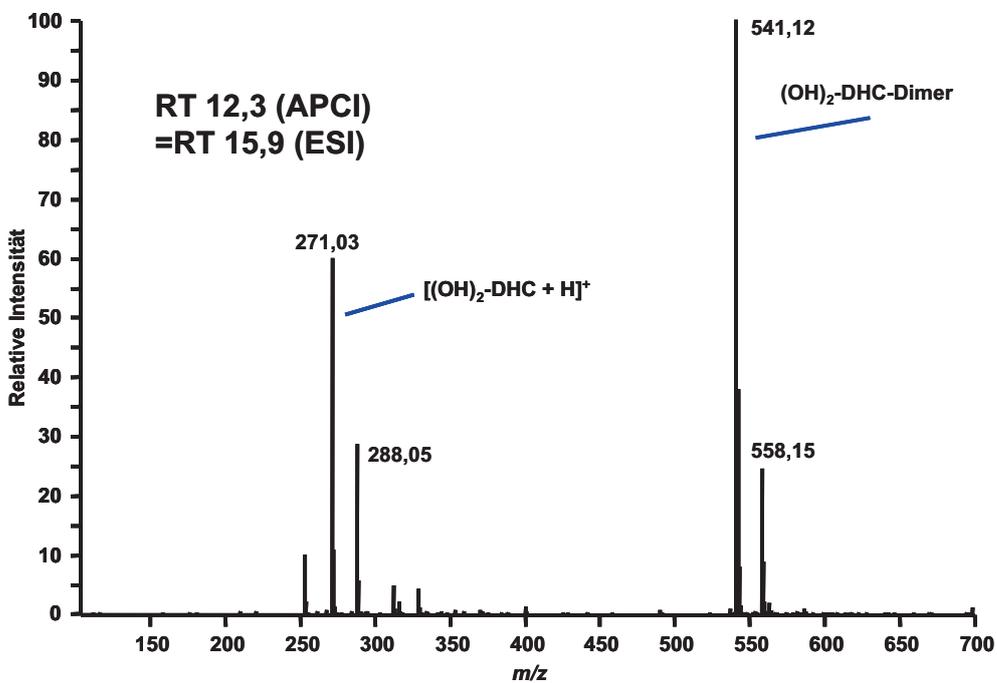


Abbildung 5.9: Full scan-Spektren des U_CBZ1-Urineluates und postulierte Fragmente bei der RT von 12,3 min (ESI)

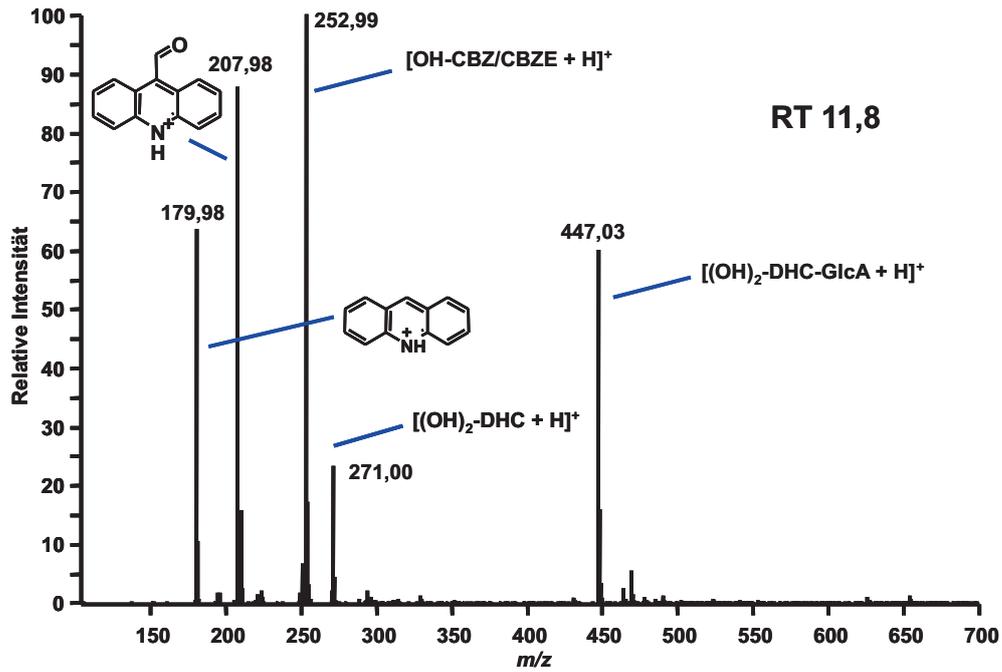


Abbildung 5.10: Full scan-Spektren des U_CBZ1-Urineluates bei der Retentionszeit von 11,8 min mit postulierten Fragmenten (APCI)

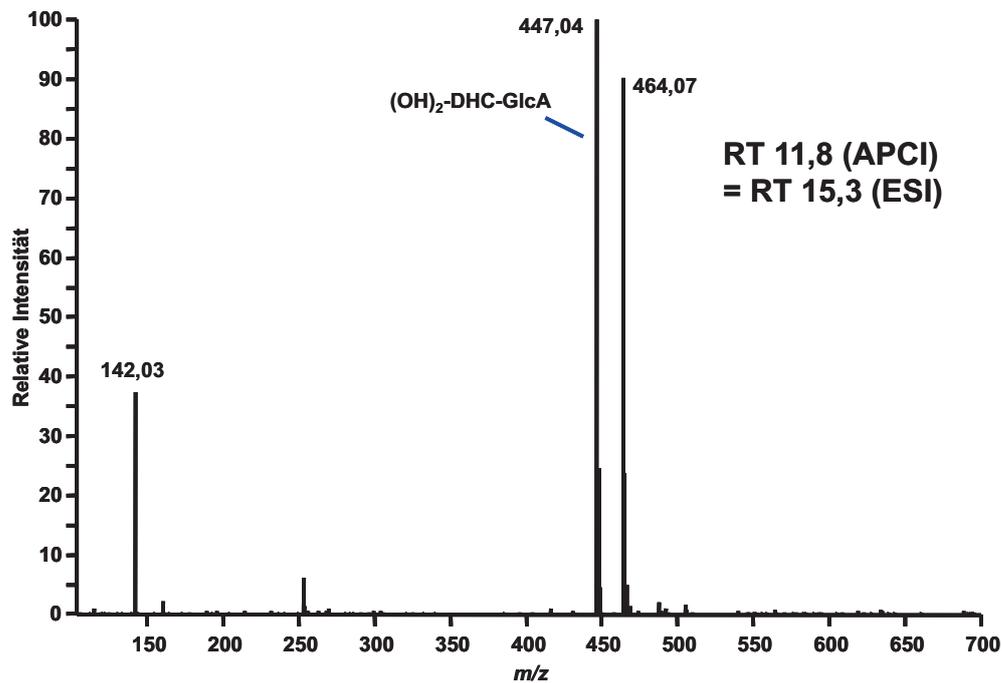


Abbildung 5.11: Full scan-Spektren des U_CBZ1-Urineluates bei der Retentionszeit von 11,8 min mit postulierten Fragmenten (ESI)

Der Peak bei 12,3 min entsprach vermutlich $[\text{OH}]_2\text{-CBZ}+\text{H}]^+$ mit m/z 271⁴, da im ESI-Spektrum nur dieses Ion (sowie ein in ESI-Spektren unter diesen Bedingungen oft auftretendes Adduktion mit einer um m/z 17 höheren Masse als $[\text{M}+\text{H}]^+$) und sein Dimer zu sehen waren. Dabei ist zu beachten, dass die in den APCI-Spektren aufgetretenen Ionen sowohl Quasimolekularionen ($[\text{M}+\text{H}]^+$ bzw. $[\text{M}+\text{Na}]^+$ etc.) als auch primäre, in der APCI-Quelle entstandene Fragmente sein konnten. Somit könnte dieser Peak weitere koeluiierende Substanzen mit ähnlichen Strukturen enthalten haben.

Aus diesem Grund werden die möglichen Metaboliten-Ionen durch die Durchführung von PIS bei verschiedenen KE auf ein CBZ-ähnliches (und eventuell teilweise durch insertierte oder eliminierte Gruppen massenverschobenes) Fragmentationsmuster sowie die intensivsten Fragmentationen für das MRM überprüft. In den PIS-Spektren zu m/z 271 bei dieser RT (Abbildung 5.12) entstehen bei geringen KE ebenfalls Ionen mit m/z 253, 208 (außerdem – wesentlich intensiver – 210) und 180.

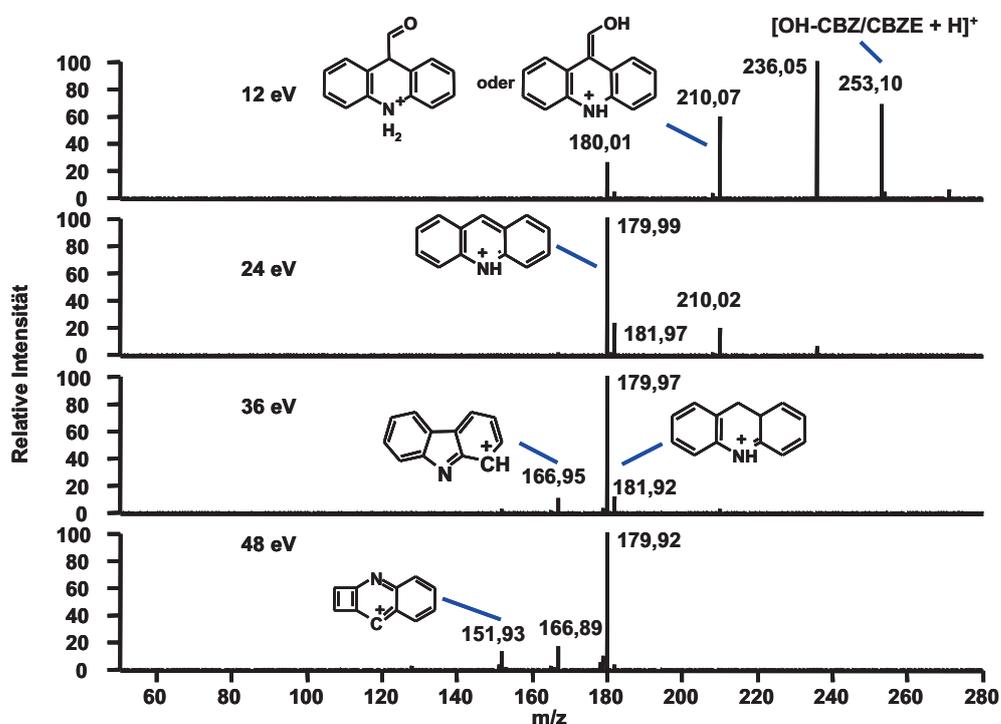


Abbildung 5.12: Produktionenspektren des Ions mit m/z 271 bei der RT von 12,3 min und verschiedenen KE mit postulierten Fragmenten

Das Ion mit m/z 253 entsteht durch Dehydroxylierung, das mit m/z 210 durch zusätzliche Abspaltung der Carbamidgruppe. Das Ion mit m/z 208 entspricht vermutlich dem ringverkürzten 9-Formylacridinium, das zum Acridinium (m/z 180) weiterfragmentiert. Dies spräche dafür, dass eine der Hydroxygruppen des $(\text{OH})_2\text{-DHC}$ am Siebenring positioniert ist. Es kommt demnach durch die schnelle Abspaltung der Hydroxygruppe zu ähnlichen Fragmenten wie für CBZ.

⁴Um den Textfluss zu vereinfachen, gilt die Angabe potentieller Metaboliten in der Einzahl hier immer gleichzeitig für eventuell koeluiierende Isomere.

Durch Matrixeffekte sind eventuell nicht alle (theoretisch möglichen) Quasimolekularionen im ESI-Spektrum sichtbar. Verbindungen wie Formylacridin oder Acridin sind zu diesen RT im Chromatogramm aber noch nicht zu erwarten, da sie deutlich unpolarer sind, als die hydroxylierten Formen des CBZ. Die PIS-Spektren des Ions mit m/z 253 (Abbildung 5.13) enthalten größtenteils die gleichen Ionen wie die PIS-Spektren des Quasimolekularions.

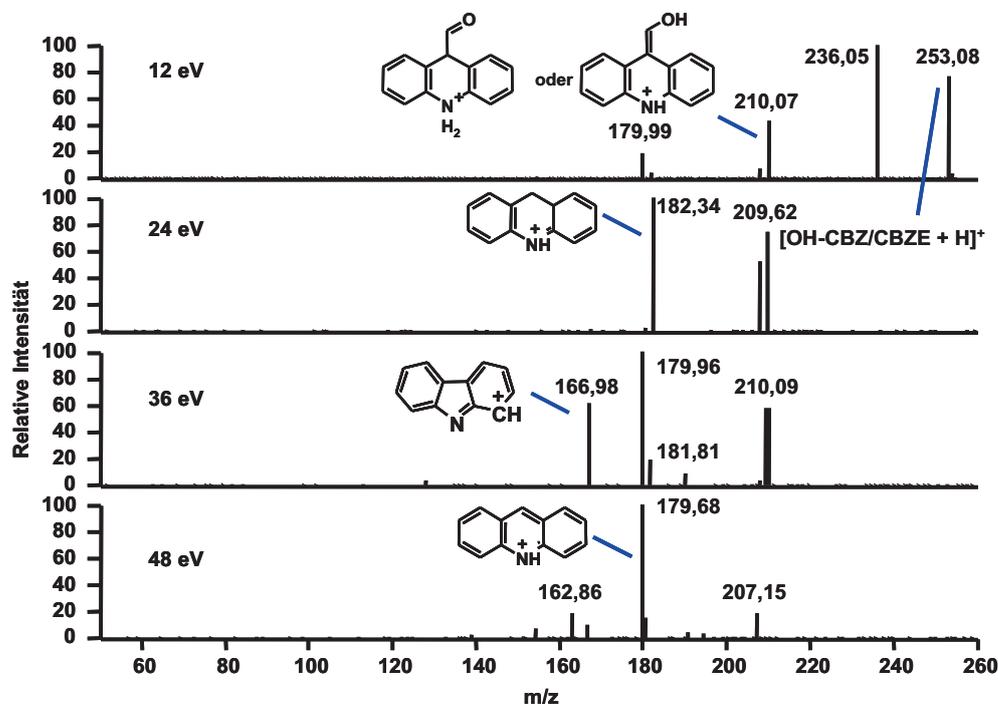


Abbildung 5.13: Produktionspektren des Ions mit m/z 253 bei der RT von 12,3 min und verschiedenen KE mit postulierten Fragmenten

Hier entsteht jedoch ein intensiveres Signal für m/z 208, was dessen Vorkommen im full scan-Spektrum weiter erklären könnte. Die PIS-Spektren dieses Ions (Abbildung 5.14) zeigen dieselben Fragmente, die schon in den vorherigen Spektren zu sehen waren, nur ist nach einer weiteren Abspaltung von C_2H_2 ein Fragment mit m/z 127 dazugekommen. Die Existenz weiterer koeluerender Substanzen ist demnach nicht auszuschließen.

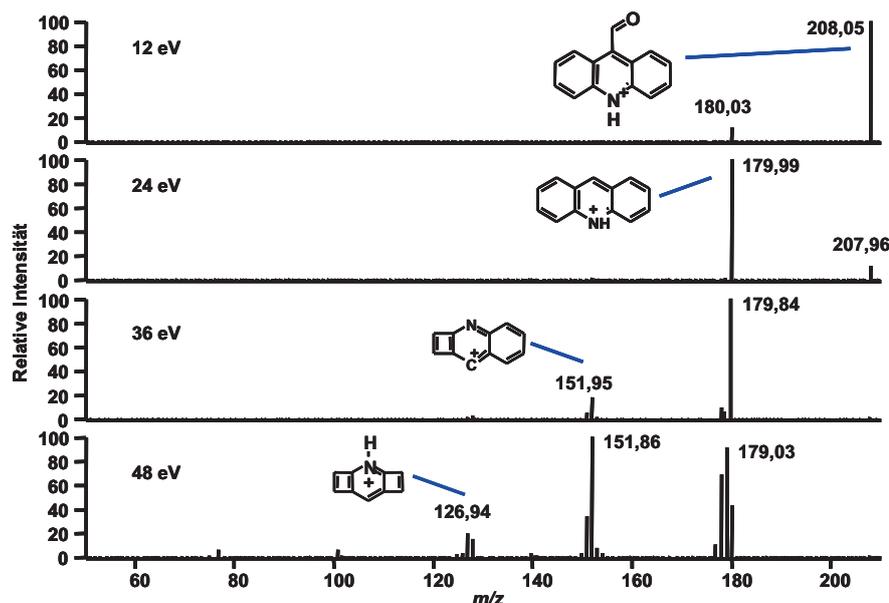


Abbildung 5.14: Produktionspektren des Ions mit m/z 208 bei der RT von 12,3 min und verschiedenen KE mit postulierten Fragmenten

Für das „Abwasserscreening“ wird zur Unterdrückung des Matrixeffektes mit APCI gearbeitet. Außerdem kann so für strukturverwandte Verbindungen auf dieselben Fragmente zurückgegriffen werden. Für diese Substanz (RT 12,3 min) erfolgt dafür die Verwendung der MRM-Übergänge des Ions mit m/z 271 auf das Fragment m/z 180 (KE: -36 eV), des Quellenfragmentes m/z 253 auf das Fragment m/z 236 (-12 eV) sowie des in der Quelle entstandenen Fragmentes m/z 208 auf das Fragment m/z 180 (-24 eV).

Der Peak bei 11,8 min zeigt im ESI-full scan-Spektrum (Abbildung 5.11) ebenfalls nur ein $[M+H]^+$ -Ion, vermutlich von $(OH)_2$ -DHC-GlcA (m/z 447). Dies wird durch die postulierten Fragmente m/z 271 ($[(OH)_2\text{-DHC} + H]^+$ nach Abgang des für Glucuronide typischen Fragments mit einer Masse von 176 u), m/z 253 ($[OH\text{-CBZ bzw. CBZE} + H]^+$), m/z 208 (9-Formylacridinium), m/z 210 (9-Hydroxymethylacridinium) und m/z 180 (Acridinium) gestützt, die sich schon in der APCI-Quelle (Abbildung 5.10) bilden, aber auch in den PIS-Spektren (Abbildungen 5.15 bis 5.17) zu sehen sind.

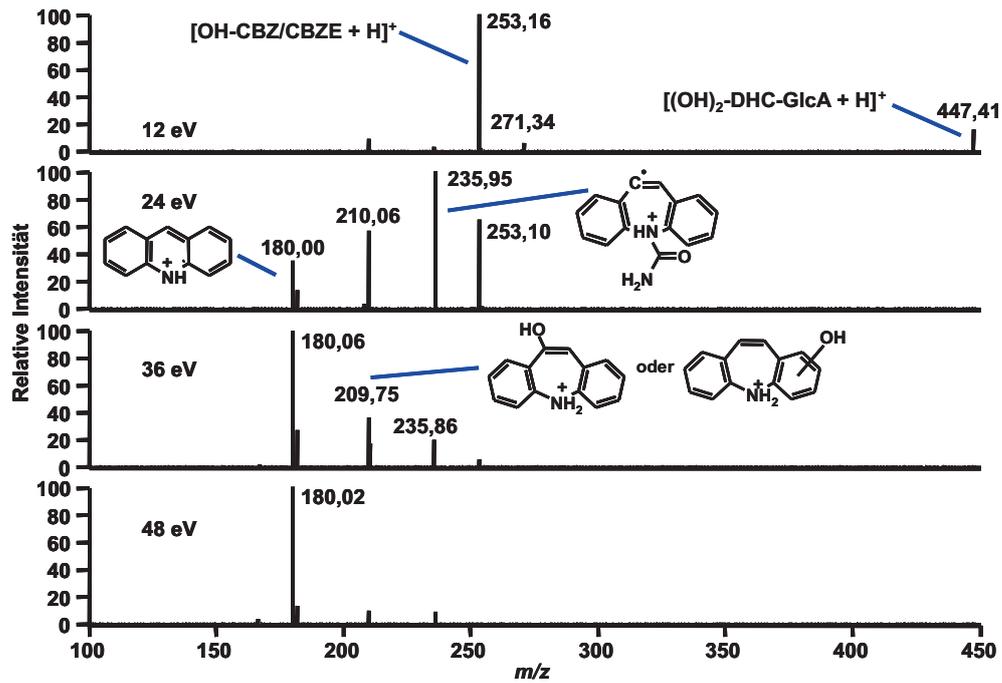


Abbildung 5.15: Produktionspektren des Ions mit m/z 447 bei der RT von 11,8 min und verschiedenen KE mit postulierten Fragmenten

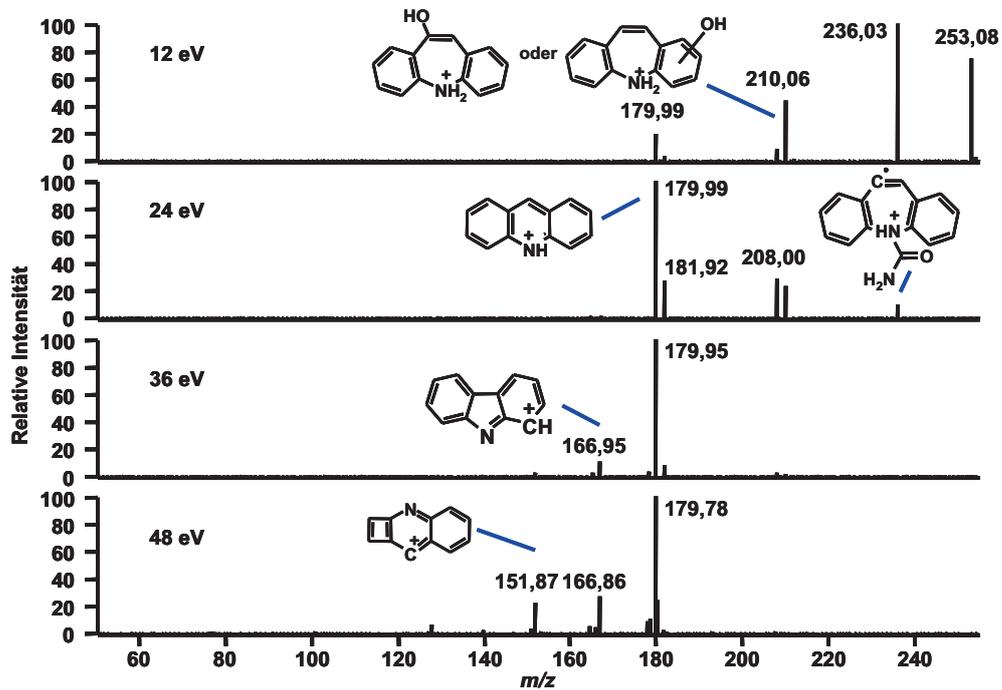


Abbildung 5.16: Produktionspektren des Ions mit m/z 253 bei der RT von 11,8 min und verschiedenen KE mit postulierten Fragmenten

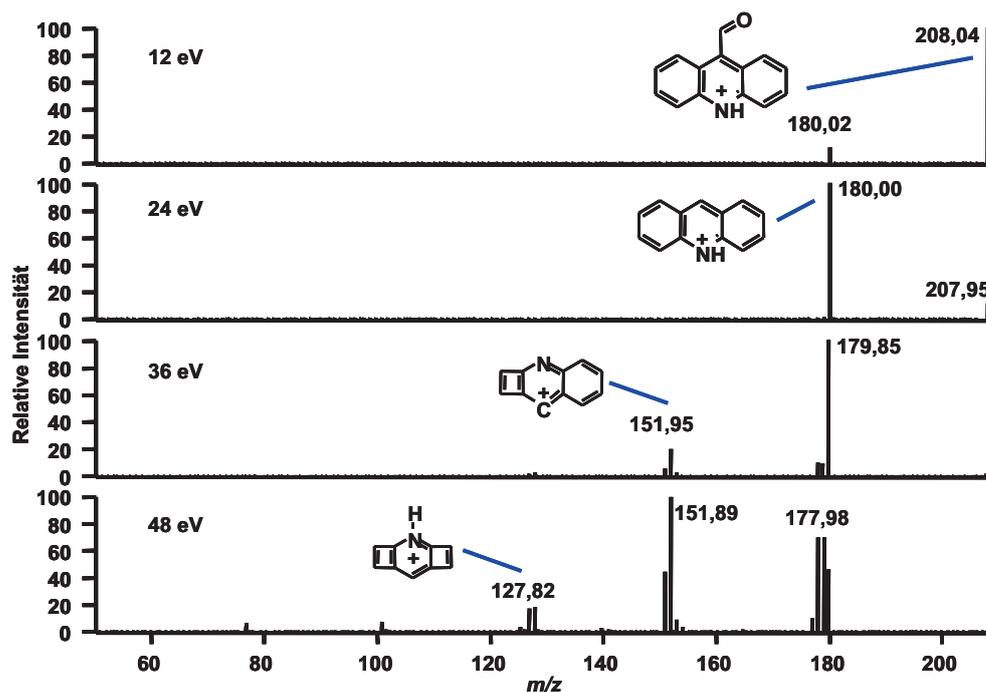


Abbildung 5.17: Produktionspektren des Ions mit m/z 208 bei der RT von 11,8 min und verschiedenen KE mit postulierten Fragmenten

Anhand der PIS-Spektren der kleineren Quellen-Fragmente ist die Strukturähnlichkeit der Metaboliten untereinander bzw. auch die zu CBZ gut zu erkennen, da wieder die gleichen Fragmente entstehen. Für die MRM-Übergänge finden für diesen Metaboliten die Quellenfragmente mit m/z 208 (mit dem Fragment m/z 180 bei -24 eV KE) bzw. m/z 253 (zu m/z 236, -12 eV) Verwendung.

Aber aus den zahlreichen aus der Literatur (siehe Abschnitt 2.5.1 auf Seite 19) bekannten CBZ-Metaboliten bzw. den in Tabelle 2.7 auf Seite 13 aufgelisteten entsprechenden Konjugat-Typen können anhand ihrer full scan- und PIS-Spektren eine hohe Zahl an Metaboliten vermutet werden (siehe Spektren in Anhang C.1.1). Außerdem wurde der mögliche Metabolit Formylhydroxyacridin zu dem UV-intensiven Peak bei RT 7,8 min mit m/z 224 gefunden. Dabei erfolgt die Unterscheidung zwischen Quellenfragmenten und Quasimolekularionen ebenfalls durch den Vergleich mit ESI-Spektren. Durch den leicht modifizierten Gradienten im ESI-Lauf kommt es teilweise zu veränderten Signalreihenfolgen. Es darf jedoch nicht vergessen werden, dass ein fehlendes Ion im ESI-full scan-Spektrum auch durch Matrix-Effekte unterdrückt worden sein könnte, denn das ESI-Chromatogramm (Abbildung 5.5 auf Seite 56) zeigt insgesamt deutlich weniger intensive Signale. Eine Übersicht über die zugeordneten Metaboliten sowie die ermittelten möglichen MRM-Übergänge ist im folgenden Abschnitt gegeben.

5.1.1.2 Erstellung einer vorläufigen MRM-Messmethode und „Abwasserscreening“

Über die PIS-Spektren konnten je mindestens zwei Hauptfragmente und eine jeweils zugehörige (möglichst optimale) KE zu einem Precursor-Ion eines potentiellen Metaboliten zugewiesen werden (Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: MRM-Übergänge für das CBZ-Abwasserscreening

RT [min]	möglicher Metabolit	m/z für [M+H] ⁺	m/z für Precursor	Produkt-ion 1	KE 1 [eV]	Produkt-ion 2	KE 2 [eV]
7,8	Formylhydroxyacridin	224	224	196	-24	167	-36
10,5	(OH) ₂ -DHC	271	253	210	-24	167	-36
10,7	(OH) ₂ -DHC-GlcA	447	196	167	-36	115	-48
10,8	OH-OMe-CBZ-GlcA	459	208	152	-36	190	-24
11,3	OH-CBZ-GlcA bzw. CBZE-GlcA	429	208	180	-24	152	-36
11,8	(OH) ₂ -DHC-GlcA	447	253	180	-36	236	-12
			208	180	-24	152	-36
12,3	(OH) ₂ -DHC	271	271	180	-36	236	-12
			253	236	-12	180	-36
			208	180	-24	152	-36
12,9	(OH) ₂ -CBZ-GlcA	445	208	180	-24	152	-36
14,4	OH-CBZ-GlcA bzw. CBZE-GlcA	429	208	180	-24	152	-36
			253	210	-24	236	-12
14,5	OH-DHC-GlcA	431	194	179	-36	152	-36
14,8	OH-CBZ bzw. CBZE	253	253	180	-36	210	-24
14,9	CBZ-GlcA	413	194	179	-36	152	-36
17,6	CBZ	237	194	179	-36	152	-36

Diese Methode wurde daraufhin mittels Vergleich der Messungen eines Blindurin-Eluates mit einer CBZ-Probe überprüft. Da bei allen Messungen möglichst wenig Probe verbraucht werden sollte, wurden bei der Messung Zeitfenster eingesetzt und möglichst MRM-Übergänge gewählt, die für mehrere nicht koeluiierende Metaboliten verwendbar waren.

Das anschließende Screening der Abwasserproben aus KW4 mittels dieser MRM-Methode⁵ führte zu Signalen von sechs potentiellen CBZ-Metaboliten im Zu- und Ablauf des KW (Tabelle 5.2) wie sie teilweise schon erwartet werden konnten (Miao und Metcalfe, 2003).

⁵Eine Veränderung am Aufbau des Instruments führte zu einer Verkürzung der Retentionszeiten um etwa 0,3 min

Tabelle 5.2: Ergebnisse des MRM-CBZ-Realprobenscreenings

RT [min]	möglicher Metabolit	m/z für $[M+H]^+$	m/z für Precursor	Abwasserzulauf	Abwasserablauf
7,8	Formylhydroxyacridin	224	224	-	-
10,5	(OH) ₂ -DHC	271	253	-	-
10,7	(OH) ₂ -DHC-GlcA	447	196	detektiert	detektiert ^a
10,8	OH-OMe-CBZ-GlcA	459	208	-	-
11,3	OH-CBZ-GlcA bzw. CBZE-GlcA	429	208	-	-
11,8	(OH) ₂ -DHC-GlcA	447	253	- ^b	-
			208	- ^b	-
12,3	(OH) ₂ -DHC	271	271	detektiert	detektiert ^c
			253	detektiert	detektiert
			208	detektiert	detektiert
12,9	(OH) ₂ -CBZ-GlcA	445	208	-	-
14,4	OH-CBZ-GlcA bzw. CBZE-GlcA	429	208	detektiert	detektiert
			253	detektiert	detektiert
14,5	OH-DHC-GlcA	431	194	detektiert	-
14,8	OH-CBZ bzw. CBZE	253	253	detektiert	detektiert
14,9	CBZ-GlcA	413	194	detektiert	detektiert
17,6	CBZ	237	194	detektiert	detektiert

^a nach Aufkonzentrieren der Messprobe auf ca. 1/3 des Volumens

^b ein schwaches Signal aus der MRM-Messung konnte durch PIS nicht bestätigt werden

^c nur eine Spur, die andere ist schwach

Ein Metabolit war nur im Zulauf der KA detektierbar. Um die Detektion relativ schwacher Signale abzusichern, erfolgte die Messung mit einem weiter aufkonzentrierten Klarwassereluat⁶ bzw. die Kontrolle der damit aufgenommenen PIS-Spektren. Als Beispiel für die Detektion sind in den Abbildungen 5.18 bis 5.20 die MRM-Chromatogramme für die Ionen mit m/z 271 (RT 12,3 min, (OH)₂-DHC), m/z 254 (RT 14,4 min bzw. 14,8 min, OH-CBZ-GlcA/CBZE-GlcA bzw. OH-CBZ/CBZE) und m/z 194 (RT 14,5 min bzw. 14,9 min, OH-DHC-GlcA bzw. CBZ-GlcA) dargestellt.

Wie bereits von Miao und Metcalfe (2003) beschrieben, ist (OH)₂-DHC in einer hohen Konzentration in den Abwasserproben enthalten (dort > 1 500 ng/l im Zulauf und > 1 300 ng/l im Ablauf eines Klärwerks) und bringt ein sehr deutliches Signal hervor. Genauere Aussagen über die Mengen der vorkommenden Metaboliten sind an dieser Stelle jedoch nicht möglich, da die Signalstärke bzw. der Einfluss der verschiedenen Matrices nicht ohne Messung mit einem quantitativen Standard und Bestimmung der Wiederfindungsraten (WFR) ermittelbar ist. Weitere MRM-Chromatogramme befinden sich im Anhang C.1.1 auf Seite XII.

⁶Das Volumen wurde auf ca. ein Drittel verringert

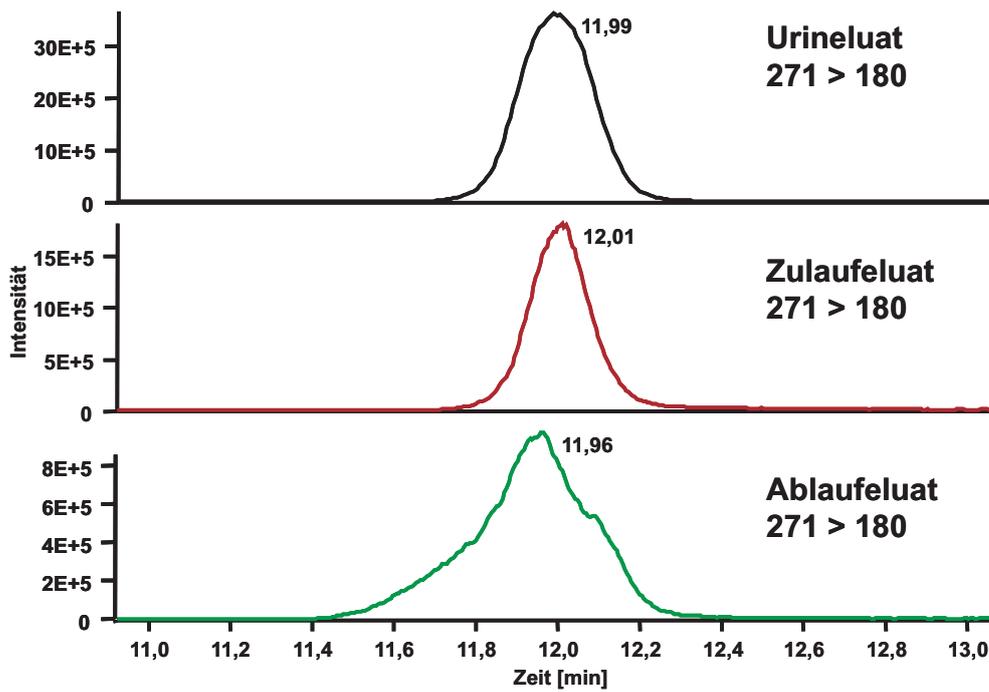


Abbildung 5.18: MRM-Chromatogramme von Urin- und Klarwassereluat als Überprüfung auf das Vorkommen von (OH)₂-DHC bei der RT von 12,3 min (eine Veränderung am Aufbau des Instruments führte zu einer Verkürzung der Retentionszeiten um etwa 0,3 min)

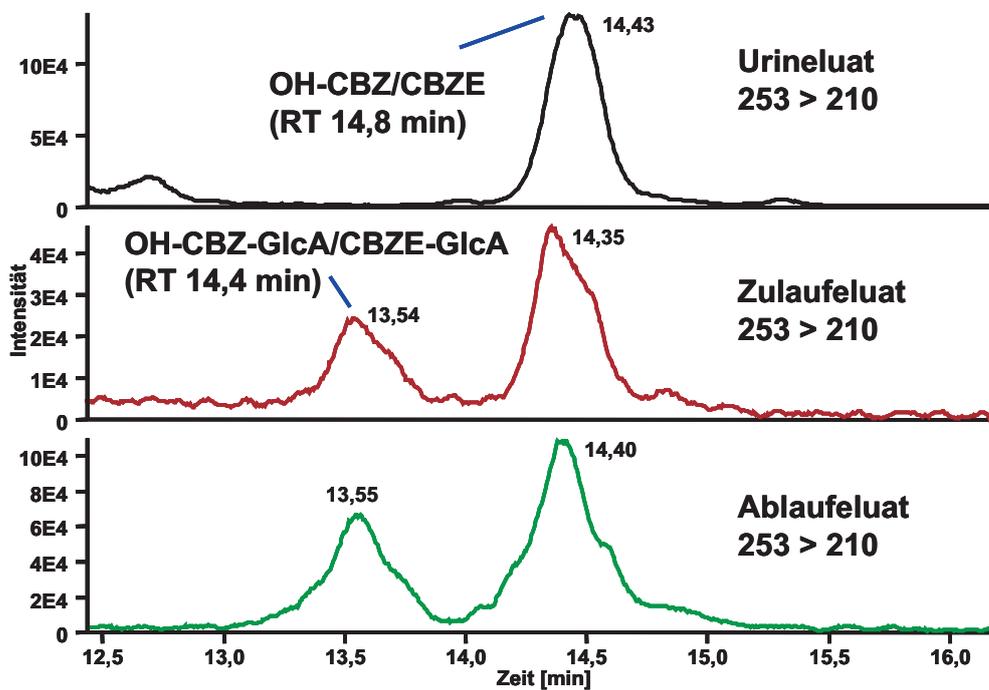


Abbildung 5.19: MRM-Chromatogramme von Urin- und Klarwassereluat als Überprüfung auf das Vorkommen von OH-CBZ-GlcA/CBZE-GlcA bzw. OH-CBZ/CBZE bei der RT von 14,4 min bzw. 14,8 min (eine Veränderung am Aufbau des Instruments führte zu einer Verkürzung der Retentionszeiten um etwa 0,3 min)

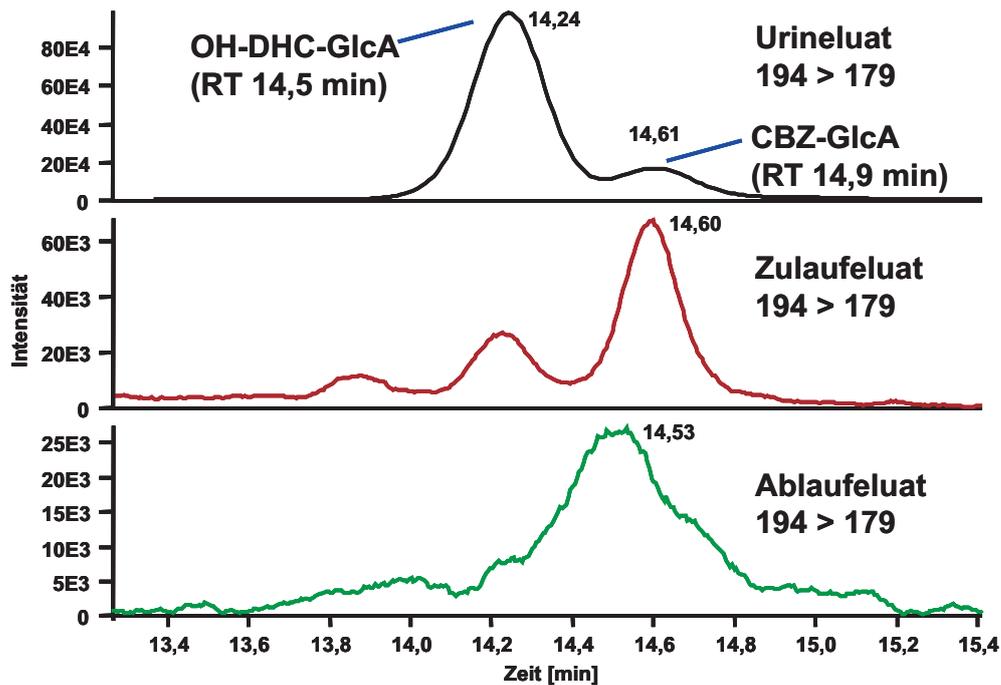


Abbildung 5.20: MRM-Chromatogramme von Urin- und Klarwassereluat als Überprüfung auf das Vorkommen von OH-DHC-GlcA bzw. CBZ-GlcA bei den RT von 14,5 min bzw. 14,9 min (eine Veränderung am Aufbau des Instruments führte zu einer Verkürzung der Retentionszeiten um etwa 0,3 min)

Da hier ohne einen starken Puffer gearbeitet wurde, um vor allem im full scan-Modus möglichst eindeutige und leicht erkennbare Metaboliten-Signale zu erhalten, ist das Signal im Ablauf des Klärwerks darin zeitlich etwas verschoben und verbreitert (durch chromatographische Effekte). Das Signal von OH-CBZ-GlcA/CBZE-GlcA ist weniger deutlich, aber sowohl das Signal des Zulauf- als auch das des Ablaufeluates sind relativ gesehen intensiver als das in dem Urineluat. Das Gucuronid scheint während der Passage durch das Abwasser nachgebildet zu werden. Die SRM-Übergänge für m/z 194 deuten an, dass OH-DHC-GlcA in dem Klärwerk abgebaut wird, wogegen CBZ-GlcA im Ablauf deutlich detektiert werden kann.

Zusätzlich zu dem bereits in Abläufen von Klärwerken detektierten CBZ und seinen hydroxylierten Metaboliten (vgl. Abschnitt 2.4.4) konnten vermutlich auch die Glucuronide einiger dieser Verbindungen nicht innerhalb des Klärwerks abgebaut werden. Es wurden jedoch keine neuen Phase-I-Metaboliten erkannt, die relevant wären. Dennoch kann gesagt werden, dass durch diese Methode die Erkennung der umweltrelevanten Metaboliten (OH)₂-DHC, OH-CBZ bzw. CBZE und CBZ selbst sowie einiger Glucuronide möglich war. Der Metabolit 10-OH-DHC, der zuvor in Abwasser detektiert worden war (Miao und Metcalfe, 2003), konnte durch diese Messungen nicht erfasst werden. Dies muss jedoch nicht zwingend an der Methodik liegen, da individuelle Unterschiede in der Metabolisierung bei verschiedenen Patienten auftreten können. Es kann hier keine Aussage darüber getroffen werden, ob alle bisher in Umweltproben detektierten Isomere des OH-CBZ bzw. das CBZE

auch durch diese Methode erfasst wurden. Dafür wäre es notwendig, die entsprechenden Metaboliten anschließend aus dem Urin zu separieren und weiter zu charakterisieren. Da dies jedoch keine entscheidenden neuen Erkenntnisse bringen würde, erscheint dieser Schritt hier zu kostenintensiv, um ihn durchzuführen. Dennoch war der hier vorgestellte Ansatz zur Ermittlung umweltrelevanter Wirkstoffe und Metaboliten erfolgreich. Diese allgemeine Herangehensweise fand im Folgenden für weitere Wirkstoffe Anwendung.

5.1.2 Diclofenac

Über das Vorkommen der Metaboliten bzw. Derivate des DF (vgl. Abschnitt 2.5.3 bzw. Abbildung 5.21) in der aquatischen Umwelt war bis dato nichts bekannt. Die Anwendung der vorgestellten Methode erfolgte daher für diesen Wirkstoff.

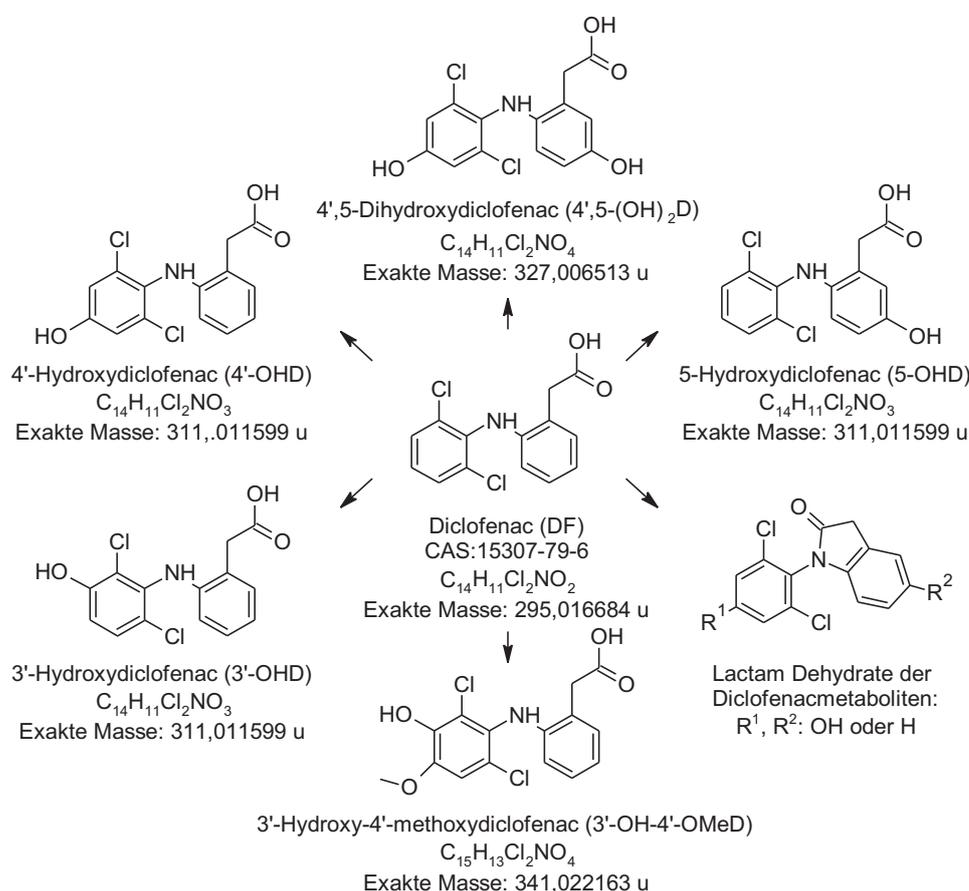


Abbildung 5.21: Diclofenac und seine Derivate

Das APCI-full scan-Spektrum eines DF-Standards ist in Abbildung 5.22 dargestellt. In der Vergrößerung ist deutlich das typische Isotopenmuster für Ionen zu erkennen, die zwei Chloratome enthalten. Schon in der Quelle entsteht ein Fragmentation mit m/z 278 durch die Kondensation zum

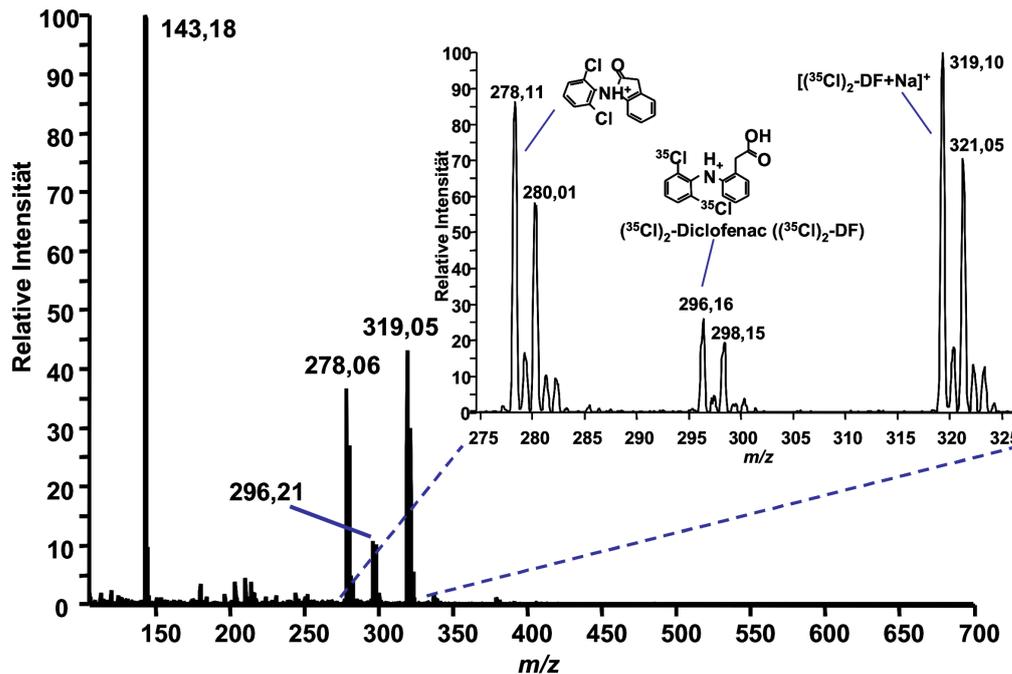


Abbildung 5.22: APCI-full scan-Spektrum eines Diclofenac-Standards

DF-Lactam⁷. Außerdem ist das Signal des Natrium-Adduktes deutlich (als Standard diente das DF-Natriumsalz). Es weist jedoch nicht die erwartete Masse von m/z 318 auf, sondern m/z 319. Ein anderes Ion ist an dieser Stelle jedoch nicht wahrscheinlich. In den positiven und negativen PIS-Spektren (Abbildung 5.23) sind die postulierten Fragmente enthalten; es kommt zu einer fortgeführten Abspaltung von Chlor (teilweise unter Ringschluss), der Carboxylgruppe, von Stickstoff (im positiven PIS) oder Kohlenstoff-Fragmenten.

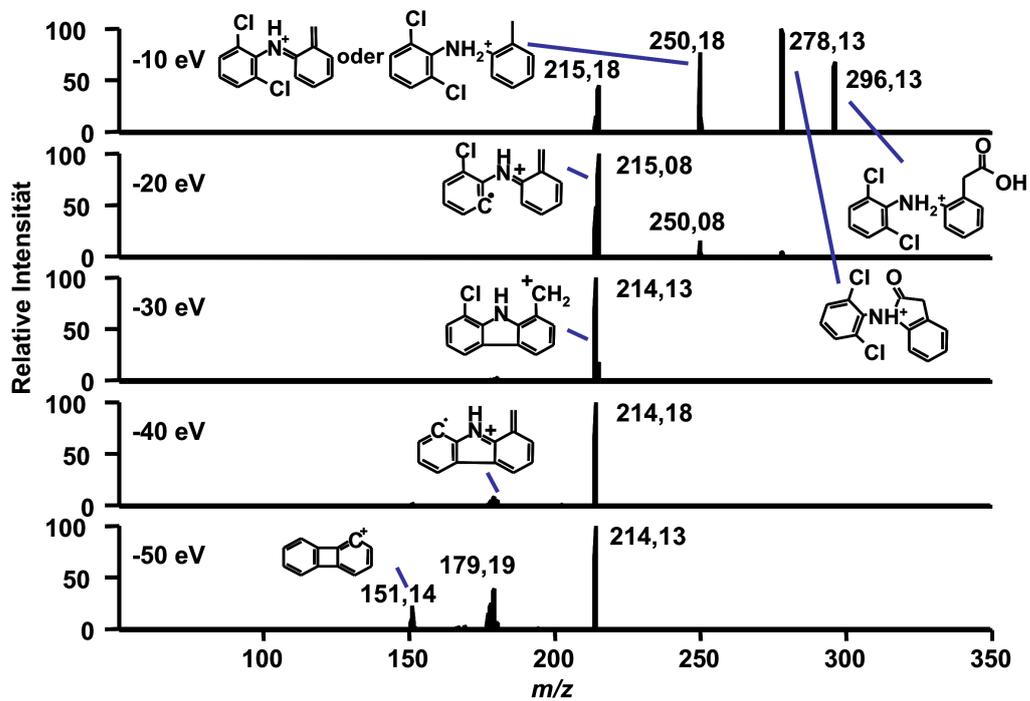
Für die Untersuchung der Metaboliten des DF wurde das Urineluat U_DF1 verwendet. Die MS-Chromatogramme der APCI- und ESI-Messung dieser Probe sind in Abbildung 5.24 dargestellt.

Durch den sauren Charakter des DF sind sowohl positive als auch negative Messungen möglich. Auch hier ist allgemein eine geringere Intensität der Signale in der ESI-Messung zu beobachten. Sowohl für APCI als auch ESI sind jedoch nur wenige Peaks zu erkennen, was auf eine schlechte Ionisierbarkeit der in den Urineluaten enthaltenen Substanzen unter diesen Bedingungen schließen lässt.

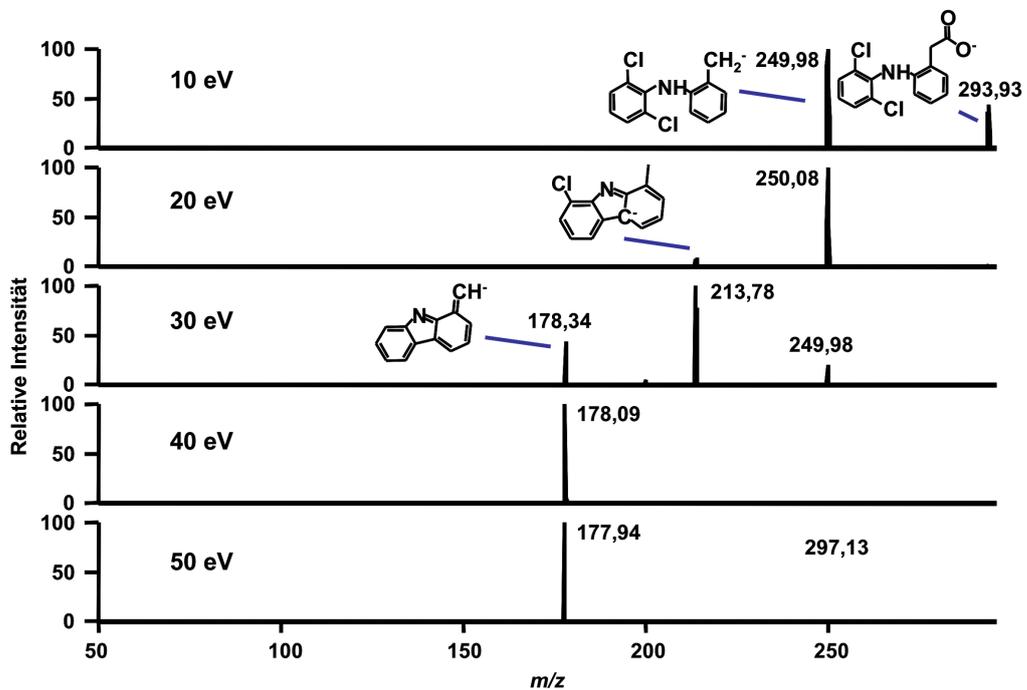
Das Signal bei RT 22,2 min⁸ gehört zu DF (Abbildung 5.25), es ist allerdings relativ schwach und schwer vom Rauschen zu separieren. Es ist jedoch zu erkennen, dass bei negativer Ionisierung unter diesen Bedingungen Ameisensäure(FA)-Addukte mit einer um m/z 46 erhöhten Masse gebildet werden.

⁷Postulierte Fragmente für DF und seine Metaboliten entstanden in Anlehnung an (Galmier u. a., 2005; Pérez-Estrada u. a., 2005; Bartels und von Tümpling, 2007; Petrovic und Barceló, 2007)

⁸Auch in diesem Abschnitt gelten im Folgenden alle Retentionszeiten, wenn nicht anders angegeben, für APCI-Messungen. Dies dient der leichteren Wiedererkennung potentieller Metaboliten, auch wenn die Zeiten in ESI-Messungen durch den geringeren Fluss verlängert werden.

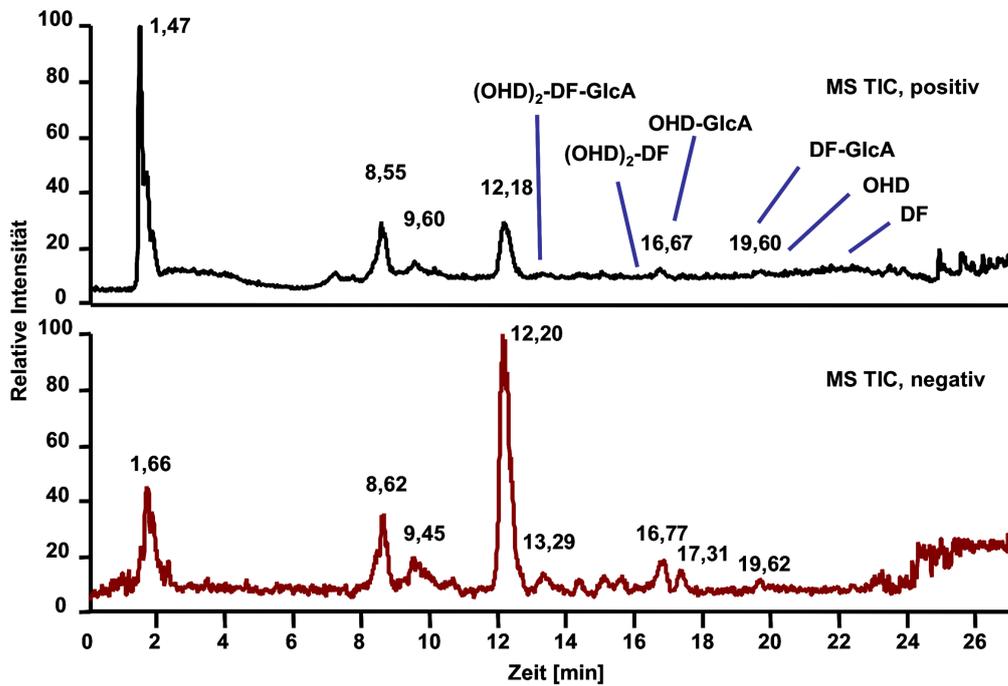


(a) positive Ionisierung

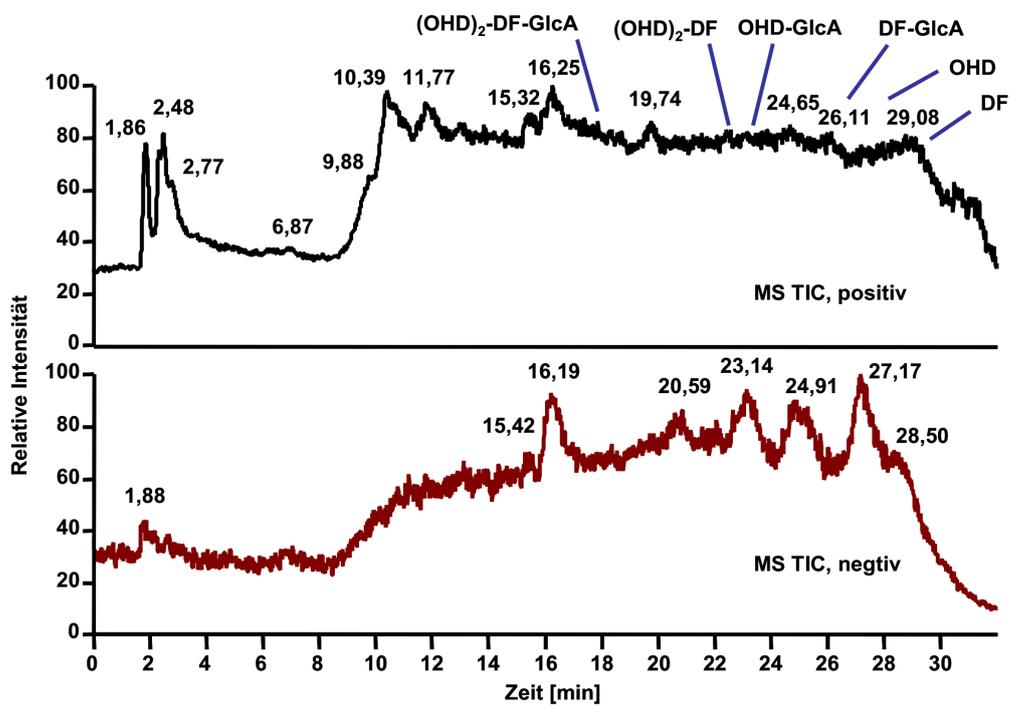


(b) negative Ionisierung

Abbildung 5.23: APCI-Produktionenspektren eines Diclofenac-Standards mit postulierten Fragmenten



(a) APCI



(b) ESI

Abbildung 5.24: MS-Chromatogramme des Urineluates U_DF1 mit postulierten Metaboliten

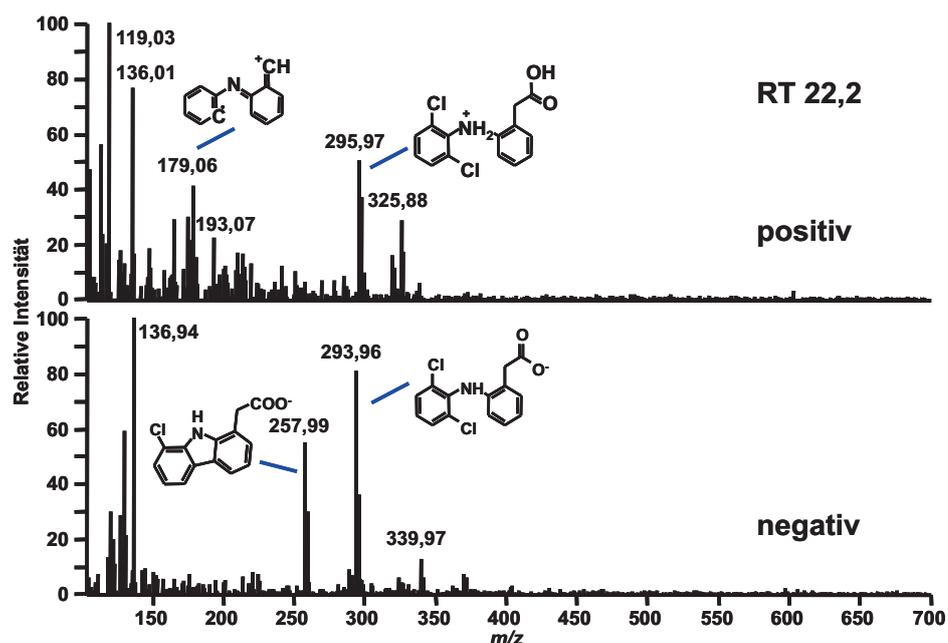


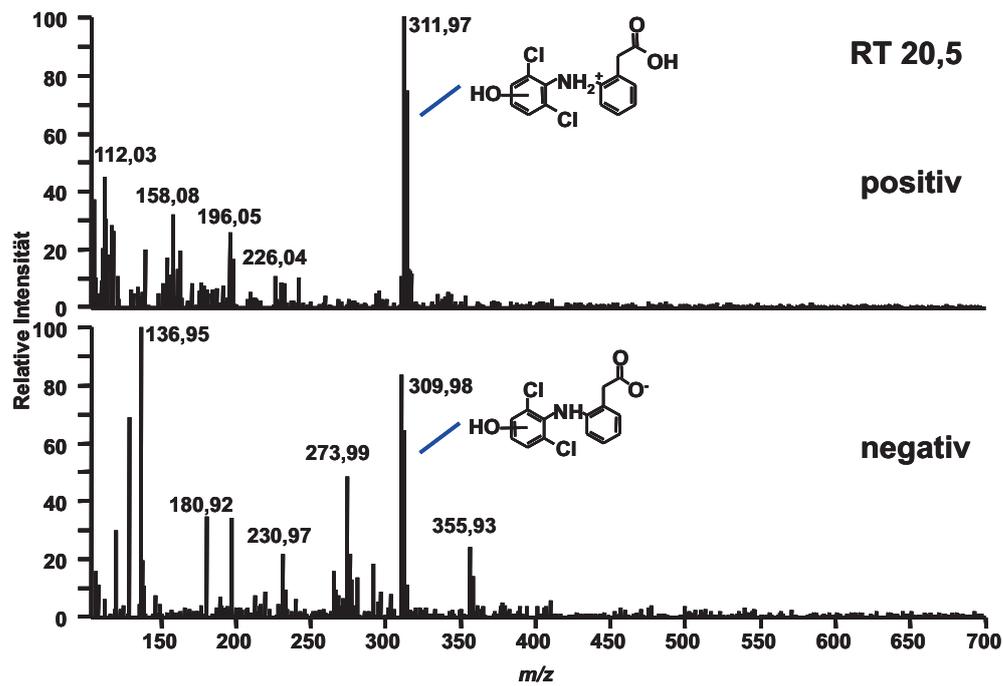
Abbildung 5.25: Full scan-Spektren des Urineluates U_DF1 bei der RT von 22,2 min (DF) mit postulierten Fragmenten

Mit der schon vorgestellten Vorgehensweise konnten fünf Metabolitentypen des DF zugeordnet werden: das Glucuronid von DF (DF-GlcA, m/z 472 bzw. 470, RT 19,6 min), OHD (m/z 312 bzw. 310, RT 20,6 min), OHD-GlcA (m/z 488 bzw. 466, RT 16,8 min), $(OH)_2$ -DF (m/z 328 in positiver Messung, RT 16,1 min) und $(OH)_2$ -DF-GlcA (m/z 504 bzw. 502, RT 13,2 min). Dabei ist zu bedenken, dass auch immer mehrere Isomere sowie strukturverwandte Substanzen koeluiieren können. Als Beispiel sind in Abbildung 5.26 die full scan-Spektren für die RT 20,5 min (OHD) angegeben. Es fällt wieder das FA-Addukt mit m/z 356 in der negativen Messung auf. Weitere Spektren befinden sich in Anhang C.1.2.

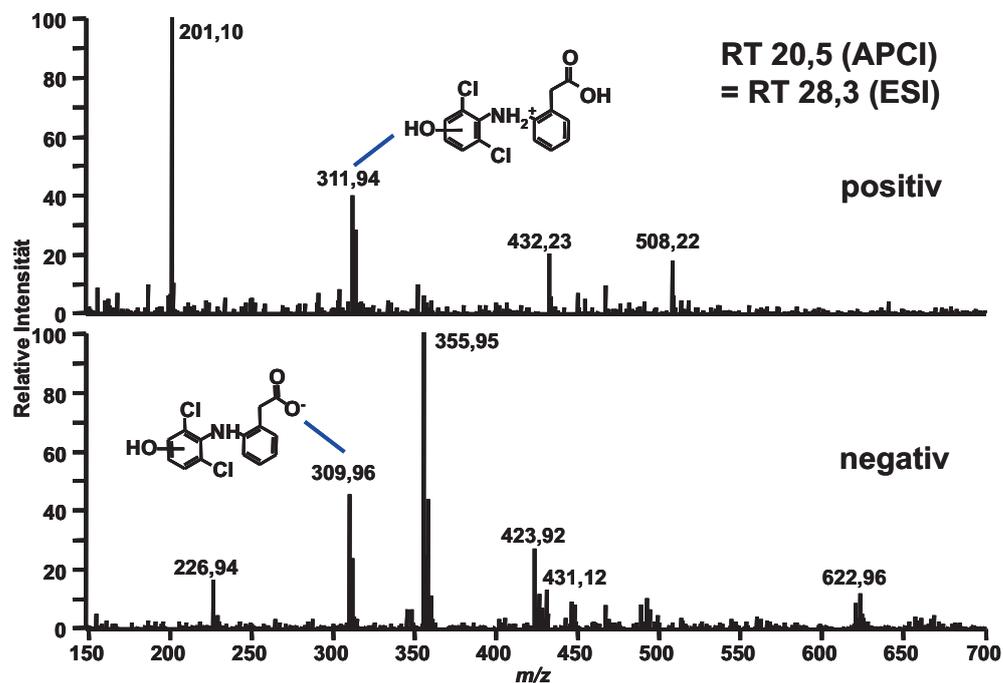
Der Vergleich der Produktionspektren zu m/z 312 bei 20,5 min (Abbildung 5.27) im positiven und negativen Modus zu denen von DF zeigt die Addition der Hydroxylgruppe ($m/z + 16$). Weitere PIS-Spektren befinden sich in Anhang C.1.2.

Der Hauptpeak ist sowohl bei positiver als auch bei negativer Ionisierung bei einer RT von 12,2 min zu sehen. Er kommt jedoch auch im Eluat des Blindurins vor, ebenso wie die Peaks bei 8,6 min und 17,3 min, weswegen diese Peaks als nicht DF-zugehörig betrachtet werden.

Es zeigt sich daher, daß mit der vorgestellten Methode trotz geringer Signalintensitäten mehrere Metaboliten des DF erkennbar waren. Die vermuteten Metaboliten konnten in eine positive und eine negative MRM-Messmethode integriert werden, deren Parameter in Tabelle 5.3 angegeben sind.

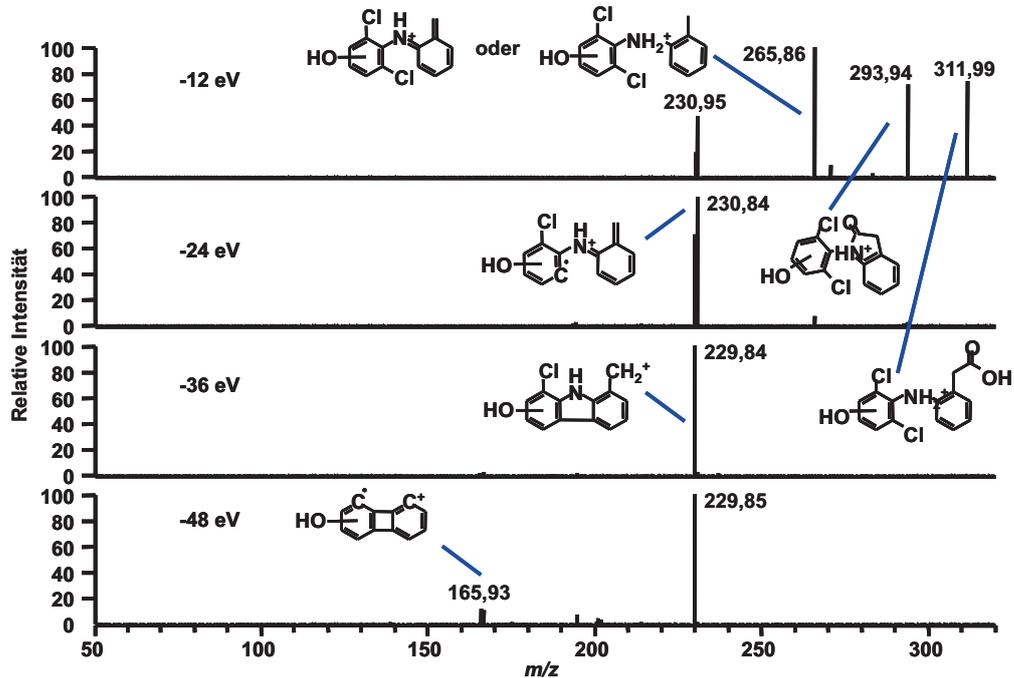


(a) APCI

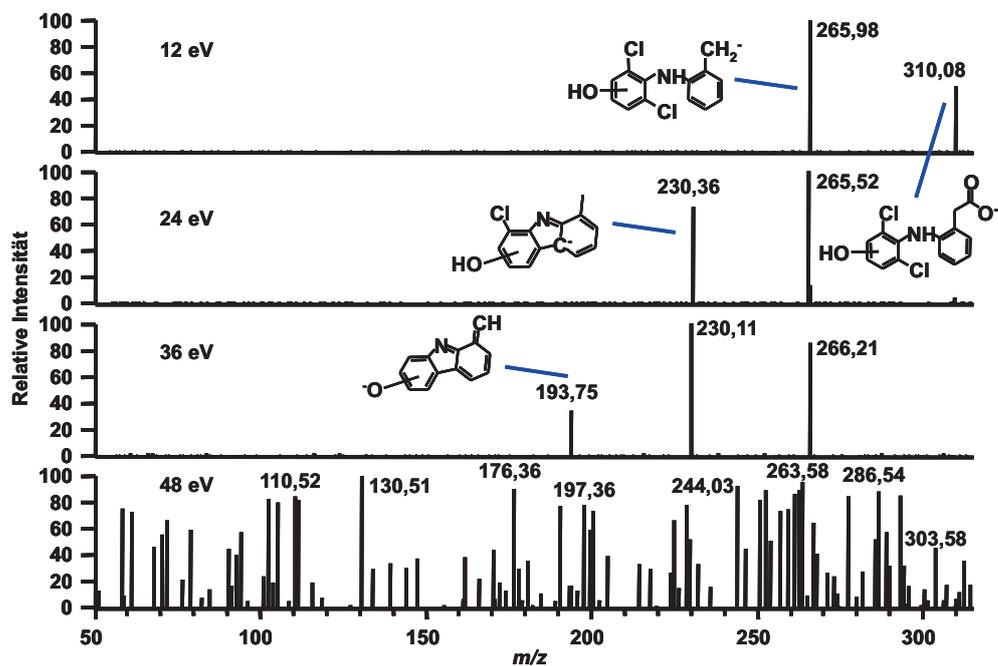


(b) ESI

Abbildung 5.26: Full scan-Spektren des Urineluates U_DF1 bei der RT von 20,5 min. Für eine bessere Übersichtlichkeit erfolgte für die postulierten Fragmente nur die Darstellung der Hydroxygruppen an einem Sechsring; sie können jedoch ebenfalls am anderen Sechsring positioniert sein.



(a) Positive Messung



(b) Negative Messung

Abbildung 5.27: Produktionspektren des Ions mit m/z 312 bzw. 310 bei der RT von 20,5 min und verschiedenen Kollisionsenergien mit postulierten Fragmenten. Für eine bessere Übersichtlichkeit erfolgte für die postulierten Fragmente nur die Darstellung der Hydroxygruppen an einem Sechsring; sie können jedoch ebenfalls am anderen Sechsring positioniert sein.

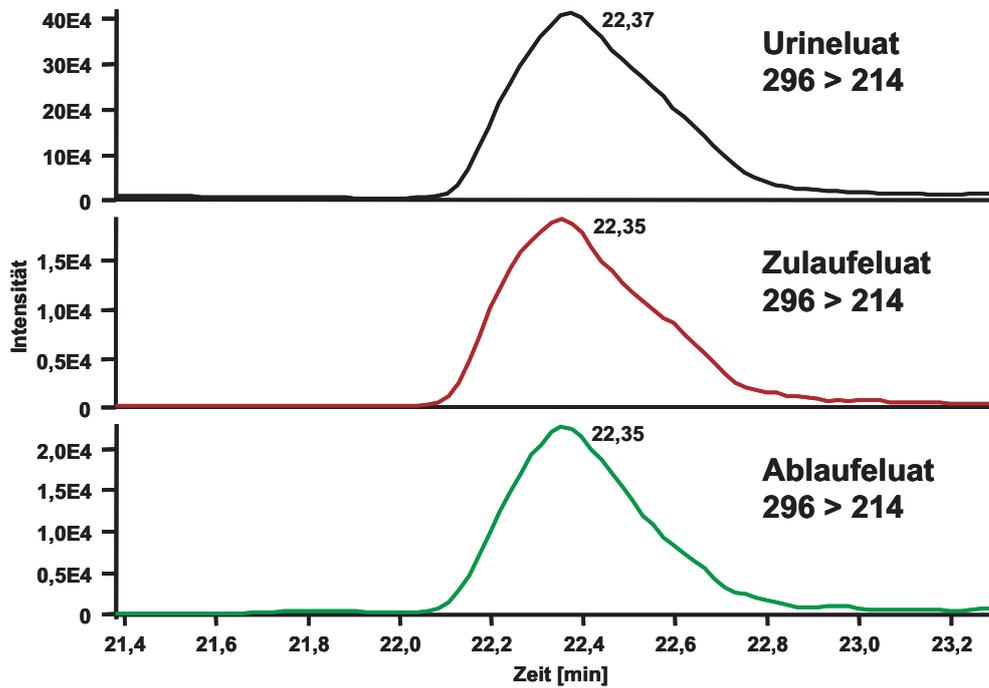
Tabelle 5.3: Vorläufige MRM-Übergänge für das DF-Abwasserscreening

RT [min]	möglicher Metabolit	Pos./ neg.	m/z für $[M+H]^+$	Pre-cursor	Produktion 1	KE 1 [eV]	Produktion 2	KE 2 [eV]
13,2	(OH) ₂ -DF-GlcA	pos.	504	370	246	-36	247	-24
		pos.		504	246	-48	247	-36
16,1	(OH) ₂ -DF	pos.	328	328	246	-36	247	-24
16,8	OHD-GlcA	pos.	488	312	230	-36	231	-24
		pos.		488	230	-48	470	-12
		neg.	486	310	266	12	230	24
		neg.		356	310	12	266	24
19,6	DF-GlcA	pos.	472	296	214	-36	215	-24
		pos.		472	214	-48	454	-12
		neg.	470	294	250	12	214	24
		neg.		258	214	12	178	24
20,6	OHD	pos.	312	312	230	-36	231	-24
		neg.	310	310	266	12	310	24
		neg.		274	230	12	166	36
22,2	DF	pos.	296	296	214	-36	215	-24
		neg.	294	294	250	12	214	24

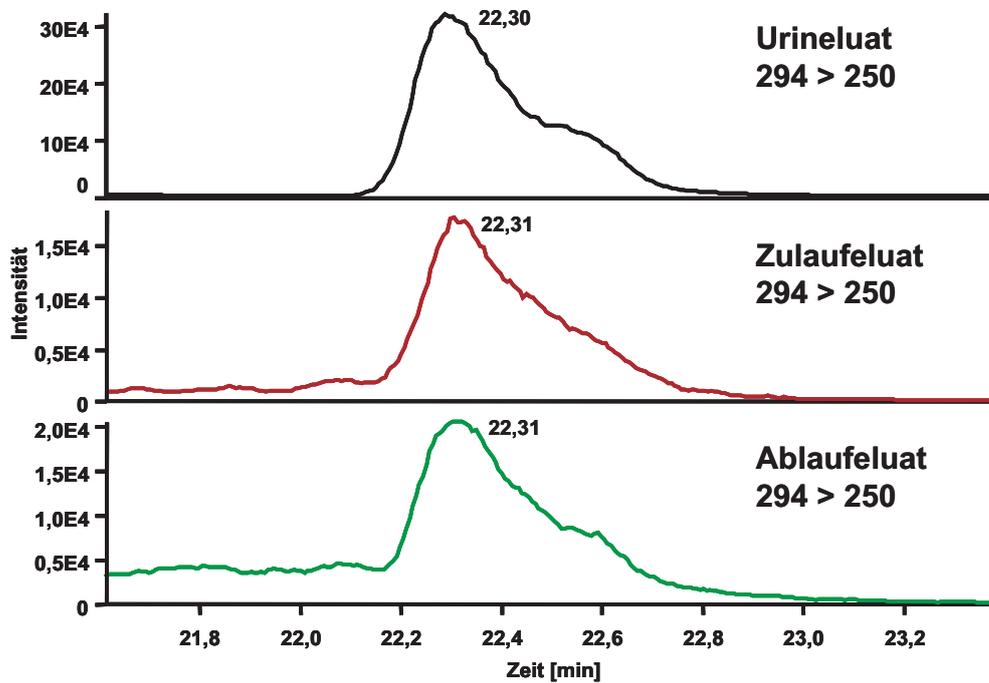
Das Vorkommen in Eluaten aus Zu- und Ablauf des KW4 ergab sich damit für den Metabolitentyp OHD sowie – wie erwartet – für DF. Die MRM-Chromatogramme sind in den Abbildungen 5.28 und 5.29 dargestellt.

Die Signalintensität scheint für OHD höher zu sein als für DF. Ob dies an einer höheren Konzentration liegt oder in der Struktur des Metaboliten begründet ist, kann hier nicht geklärt werden. Weitere Chromatogramme befinden sich in Anhang C.1.2. Für (OH)₂-DF (RT 16,1 min) ist für den Ablauf des Klärwerks kein Signal vorhanden, und es ist auch für den Zulauf nicht eindeutig. In der Urinprobe war es nicht möglich, Spektren im negativen Modus zu erlangen, das PIS-Fragmentemuster in der positiven Messung (siehe Anhang C.1.2) ist jedoch deutlich DF-verwandt – unter Addition von zwei Hydroxygruppen ($m/z +32$). Es ist zu vermuten, dass die weiteren Metaboliten schon innerhalb des Abwassersystems abgebaut werden.

Zur Abtrennung der als relevant erkannten DF-Metaboliten (unter den humanen Metaboliten befinden sich mehrere Isomere, außerdem sind koeluiierende strukturverwandte Substanzen möglich) dient die Behandlung von Urinprobeneluaten aus DF-Patientenharn mittels präparativer HPLC (siehe Abschnitt 5.2). Daran schließt sich nach der Identifizierung und Charakterisierung der Metaboliten (siehe Abschnitt 5.3) die Analyse von Abwasserproben bezüglich des Vorkommens dieser Metaboliten an (siehe Abschnitt 5.5).

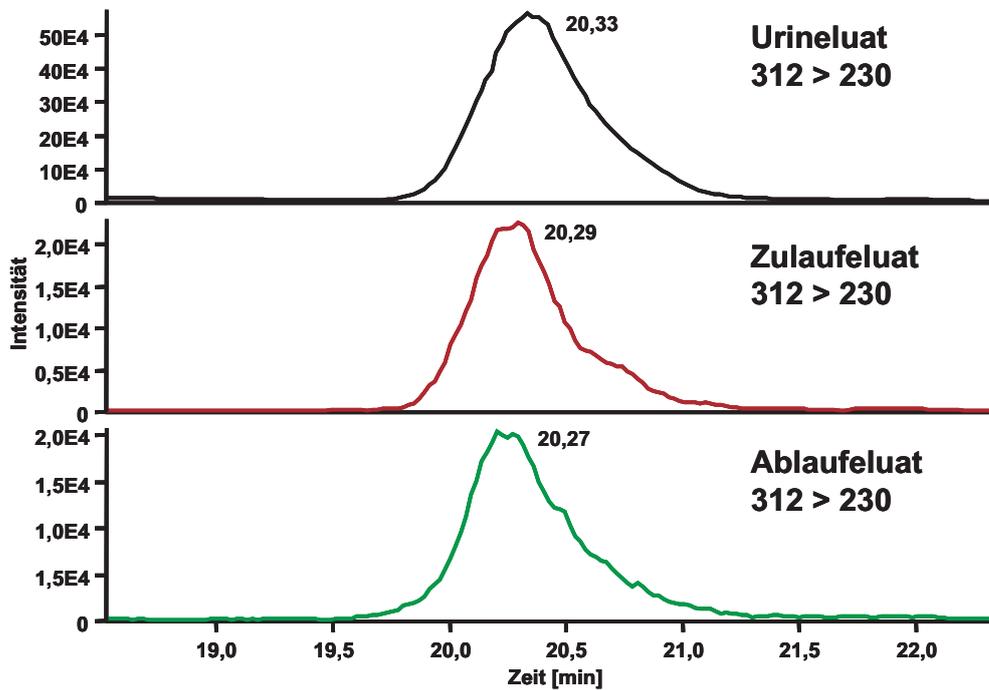


(a) positive Messung

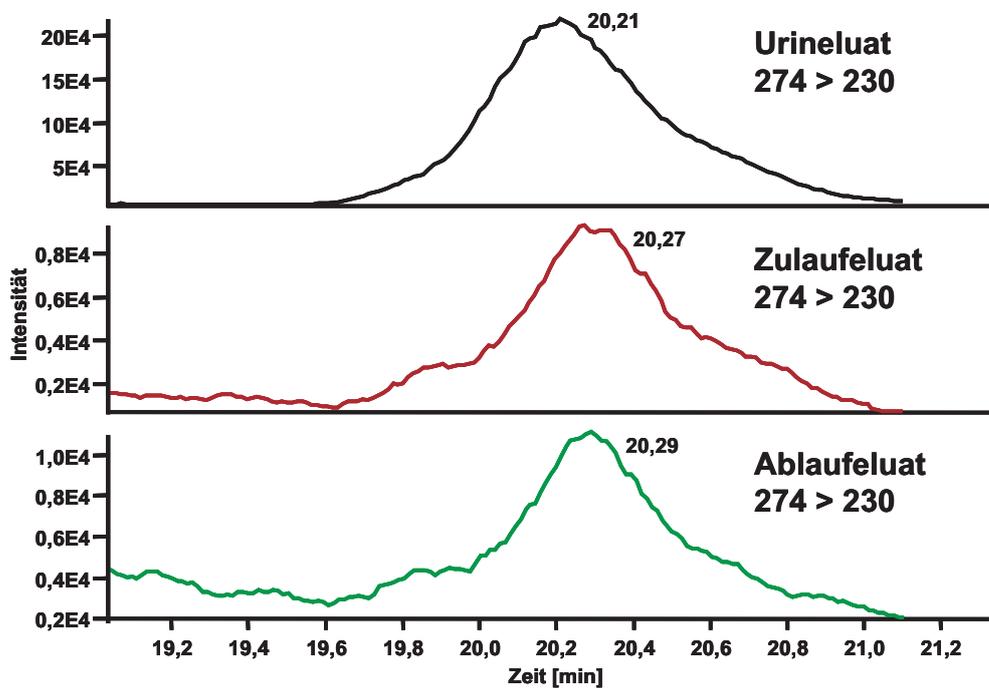


(b) negative Messung

Abbildung 5.28: MRM-Chromatogramme von Urin- und Klarwassereluaten als Überprüfung auf das Vorkommen von DF bei der RT von 22,2 min



(a) positive Messung



(b) negative Messung

Abbildung 5.29: MRM-Chromatogramme von Urin- und Klarwassereleuten als Überprüfung auf das Vorkommen von OHD bei der RT von 20,6 min

5.1.3 Paracetamol

Auch für die Metaboliten des PCM (s. a. Abschnitt 2.5.2 bzw. Abbildung 5.30) ist keine Umweltrelevanz bekannt. Das APCI-full scan-Spektrum von PCM zeigt das Quasimolekularion mit m/z 152, ein Addukt mit m/z +41 und das um die Acetylgruppe verkleinerte Fragment mit m/z 110 (Abbildung 5.31). In den PIS-Spektren spaltet PCM mit steigender KE stückweise die Acetylgruppe als Keten, Ammoniak oder CO ab, wie in Abbildung 5.32 deutlich wird. Die im full scan-Spektrum außerdem erscheinenden Ionen mit m/z 84 und m/z 102 stammen aus dem Lösungsmittel, sie treten in allen Fullscan-Spektren mit Isopropanol auf.

Die Untersuchung des Urinprobeneluates U_PCM1 zeigte bis auf den Peak bei einer Retentionszeit von 9,0 min nur Signale im positiven Modus (Abbildung 5.33)⁹. Das Signal des PCM war bei einer RT von 7,2 min zu finden.

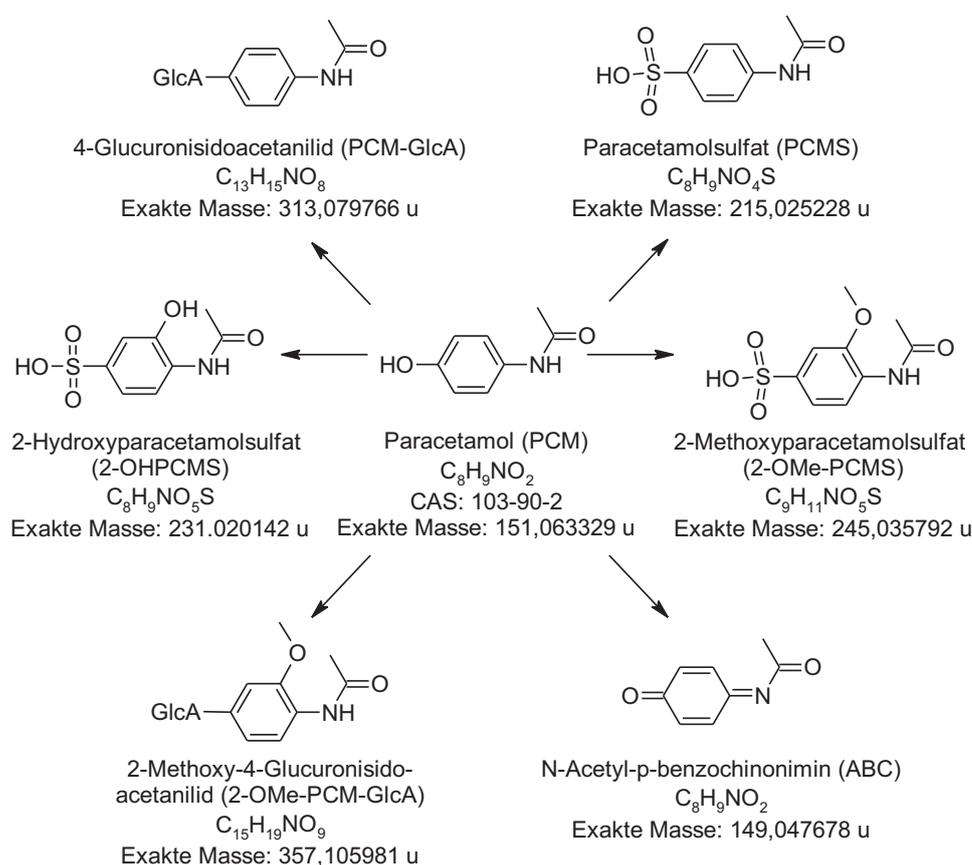


Abbildung 5.30: Metabolismus von Paracetamol

⁹Für diese Probe wurden keine ESI-Messungen mehr durchgeführt, da sie nach der Untersuchung des Abwassers nicht mehr als nötig betrachtet wurden.

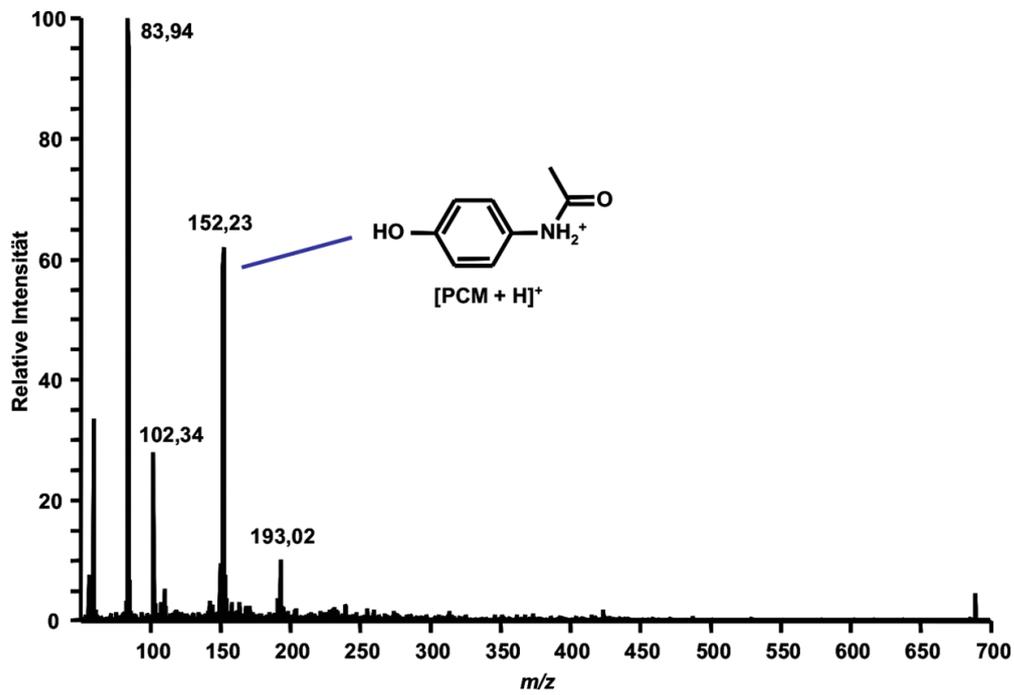


Abbildung 5.31: Full scan-Spektrum eines Paracetamol-Standards

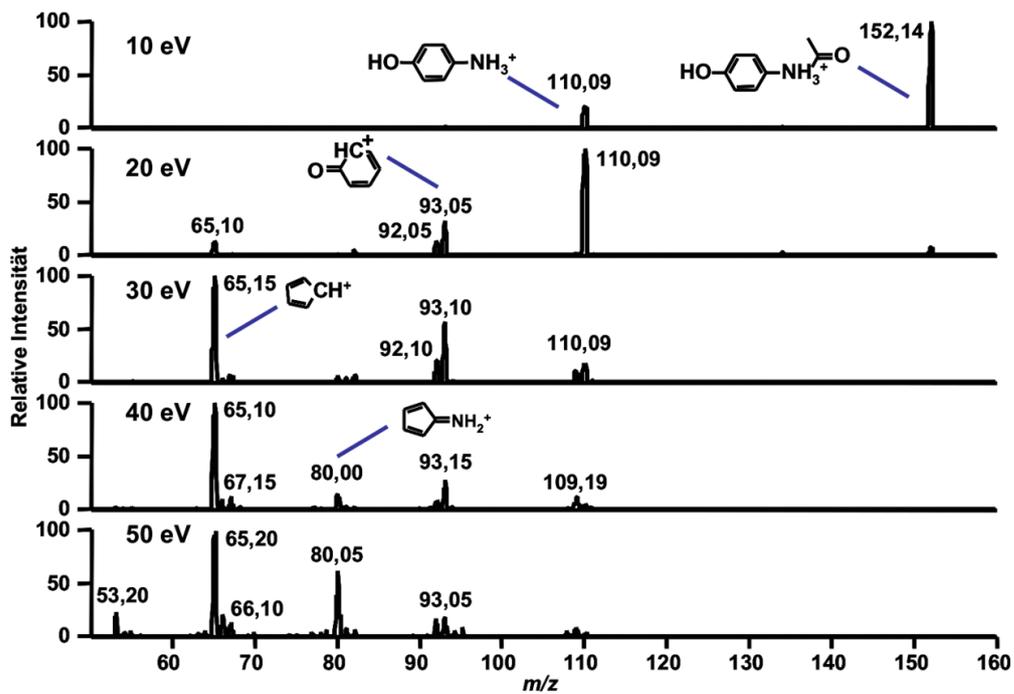


Abbildung 5.32: Produktionenspektren eines Paracetamol-Standards bei verschiedenen Kollisionsenergien mit postulierten Fragmenten

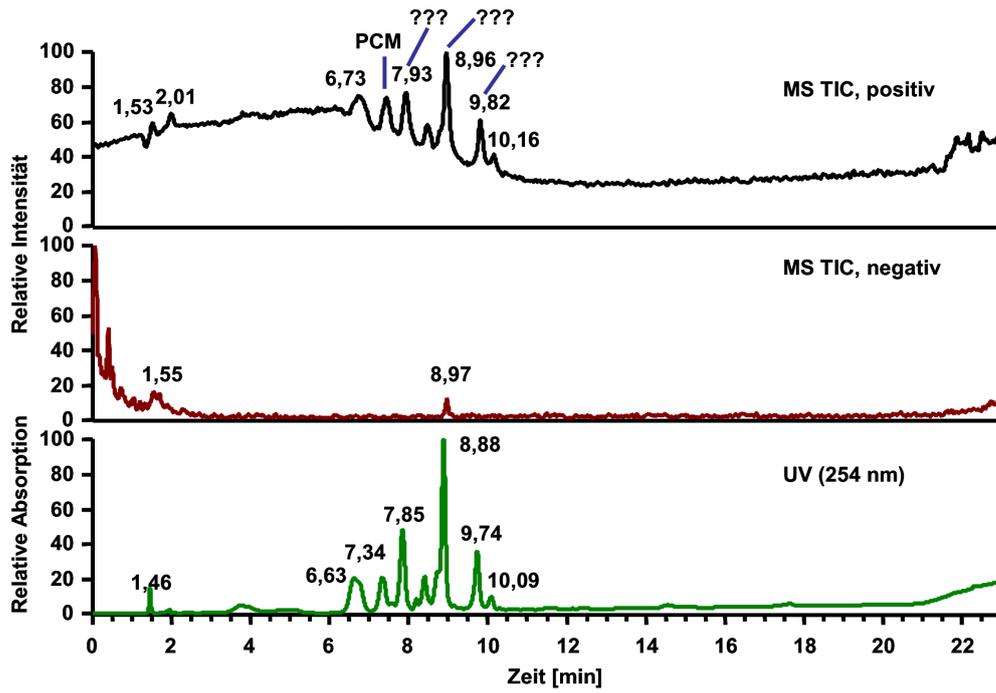


Abbildung 5.33: MS- und UV-Chromatogramme des Urineluates U_PCM1 mit unbekannt Metaboliten

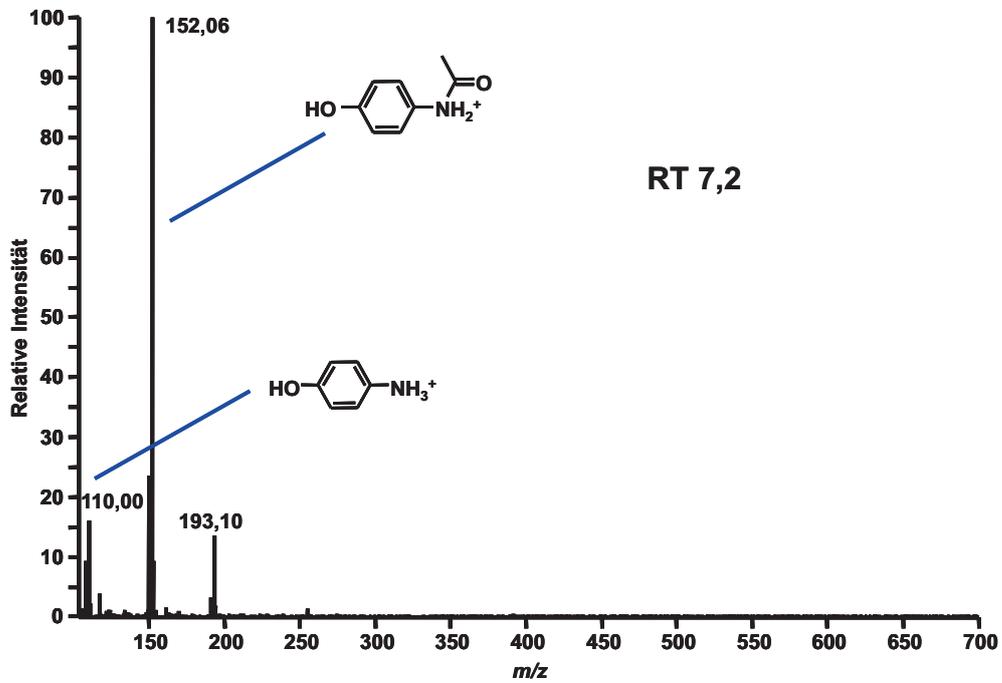


Abbildung 5.34: APCI-full scan-Spektrum des Urineluates U_PCM1 bei der RT von 7,2 min mit postulierten Fragmenten

Im full scan-Spektrum des Peaks mit der RT von 8,0 min (Abbildung 5.35) ist ebenfalls ein Quasimolekularion mit m/z 152 zu sehen. Die zugehörigen PIS-Spektren sind in Abbildung 5.36 wiedergegeben. Sie zeigen die gleichen Fragmentierungsmuster wie PCM. Die stärkere Retention läßt jedoch auf eine weniger polare Verbindung schließen.

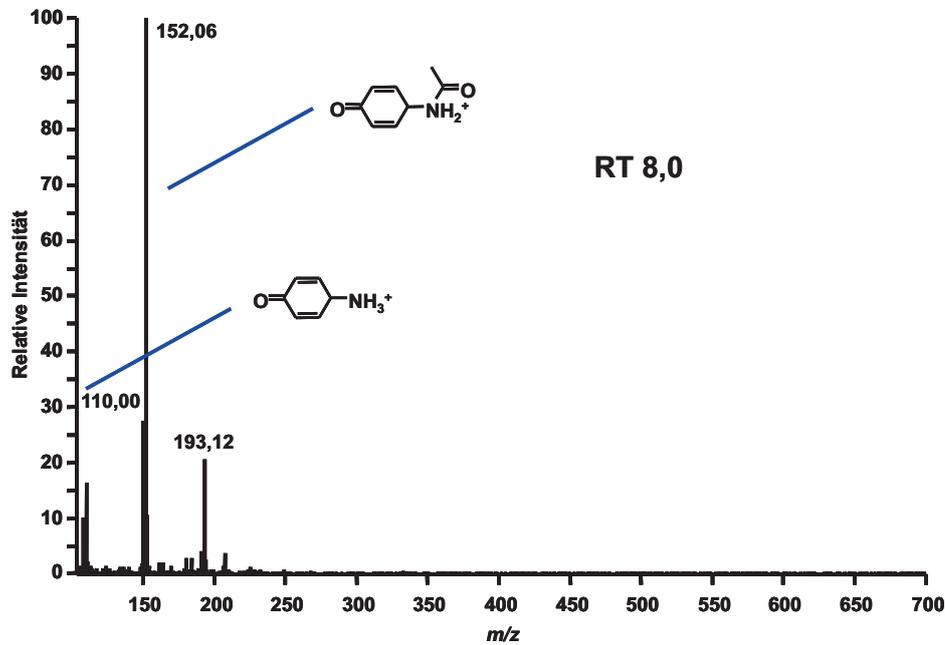


Abbildung 5.35: APCI-full scan-Spektrum des Urineluates U_PCM1 bei der RT von 8,0 min mit postulierten Fragmenten

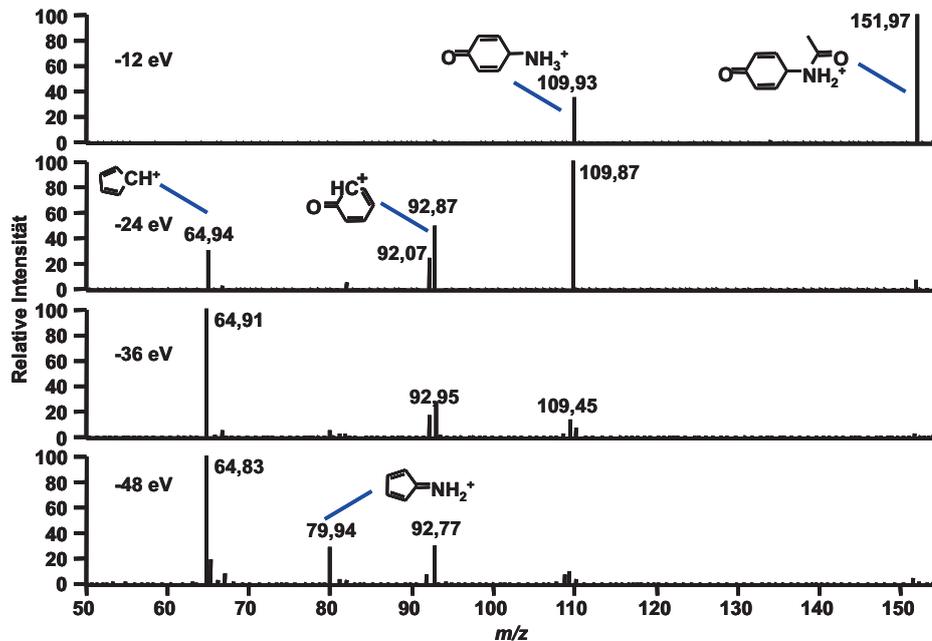


Abbildung 5.36: Produktionenspektren des Ions mit m/z 152 bei der RT von 8,0 min und verschiedenen Kollisionsenergien mit postulierten Fragmenten

Der Hauptpeak ist sowohl bei positiver als auch bei negativer Ionisierung bei einer RT von 8,9 min zu sehen. Das full scan-Spektrum (Abbildung 5.37) enthält das Quasimolekularion mit m/z 313 bzw. 311. Das Auftreten eines Ions mit m/z 152 deutet auf ein PCM-Derivat hin. Die zugehörigen PIS-Spektren zeigt Abbildung 5.38. Die darin erscheinenden Ionen sind jedoch nicht einfach mit denen des PCM vergleichbar. Andererseits erbrachte der PIS zum Ion mit m/z 152 auch bei dieser RT ein typisches Spektrum. Daher wurden die negativen SRM-Übergänge zu m/z 311 dieses möglichen Metaboliten mit in die MRM-Methode (Tabelle 5.4) aufgenommen .

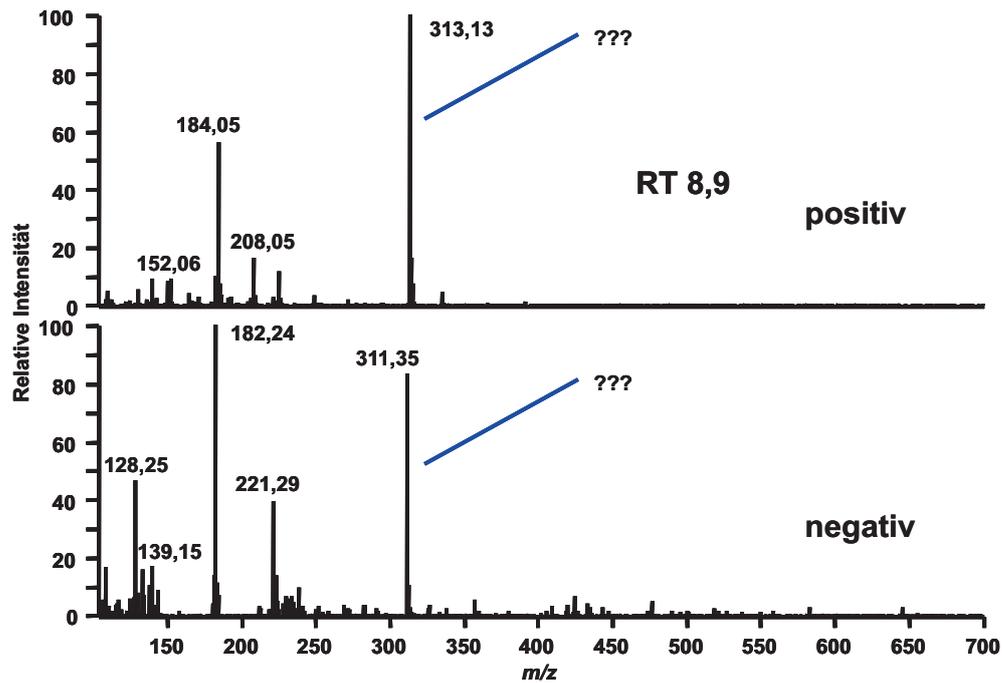
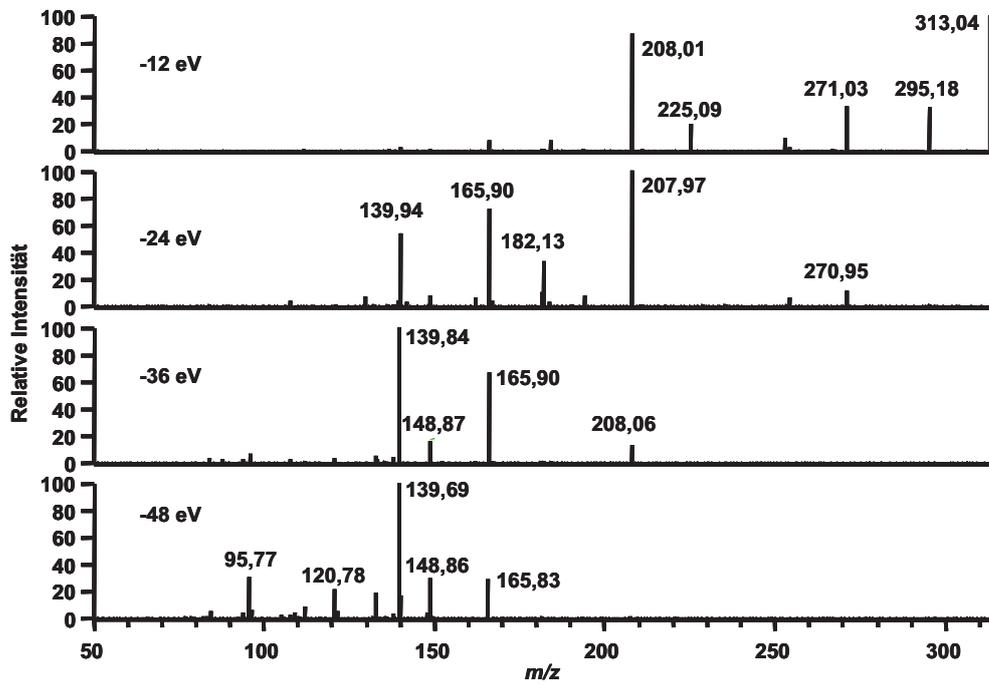
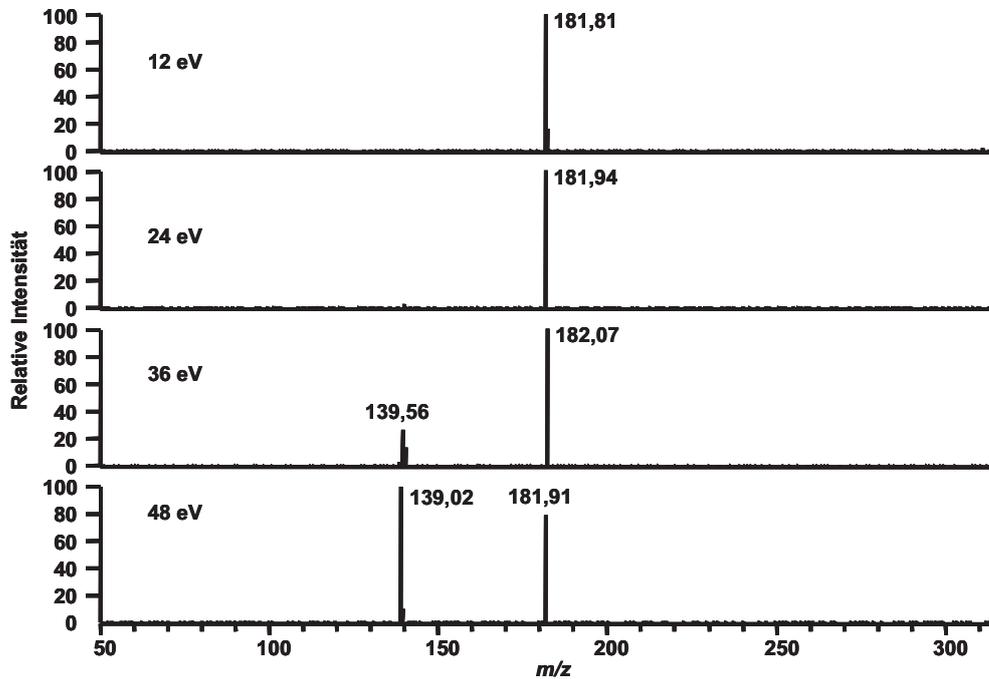


Abbildung 5.37: APCI-full scan-Spektrum des Urineluates U_PCM1 bei der RT von 8,9 min



(a) Positive Messung



(b) Negative Messung

Abbildung 5.38: Produktionenspektren des Ions mit m/z 313 bei der RT von 8,9 min und verschiedenen KE

Tabelle 5.4: Vorläufige MRM-Übergänge für das PCM-Abwasserscreening

RT [min]	möglicher Metabolit	Pos./ neg.	m/z für Basispeak	Pre-cursor	Produktion 1	KE 1 [eV]	Produktion 2	KE 2 [eV]
7,2	PCM	pos.	152	152	110	-12	65	-36
8,0	unbekannt	pos.	152	152	110	-12	93	-24
8,9	unbekannt	pos.	313	152	110	-12	93	-24
		neg.	311	311	182	12	140	36
		neg.		182	139	24	138	36
9,9	unbekannt	pos.	239	239	198	-12	108	-24

Ein weiterer möglicher Metabolit eluierte bei RT 9,9 min mit m/z 239 (positiv). Seine SRM-Übergänge wurden ebenfalls in die MRM-Methode integriert. Die weiteren Spektren befinden sich in Anhang C.1.3. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Wirkstoffen eluierte PCM vor seinen Metaboliten, was auf eine höhere Polarität des Wirkstoffes als die seiner Metaboliten schließen lässt. Das Vorkommen im Zulauf von KW4 konnte für alle untersuchten potentiellen Metaboliten bestätigt werden. Im Ablauf wurden jedoch keine umweltrelevanten Metaboliten detektiert. Die genaue Klärung, um welche Substanzen es sich handelt, wird hier demnach als nicht relevant erachtet. Dennoch hat die Untersuchung zu CBZ und DF gezeigt, dass auch ohne die vollständige Aufklärung des Metabolismus eines Wirkstoffes über diese Methodik umweltrelevante Metaboliten erkennbar sind. Ein über einzelne Pharmafirmen zu beziehender Standard ist somit nicht mehr zwingend notwendig und die Ermittlung der Umweltrelevanz erfolgt unabhängig von der Industrie.

5.2 Isolierung der Diclofenac-Metaboliten aus Urin mittels präparativer Flüssigkeitschromatographie

Zur Abtrennung der interessanten (isomeren) DF-Metaboliten in vier Schritten (A-D) mittels HPLC dienten die SPE-Eluatete von insgesamt 10 l Urin (U_DF2 bis U_DF4). Die ersten beiden Trennungen (A und B) auf einem präparativen System zeichneten sich durch einen schnellen bzw. einen langsameren Gradienten aus. Diese dienten vor allem zur Abtrennung von sehr polaren Stoffen aus der Urinmatrix sowie der Vortrennung. Es folgten zwei Trennungen (C und D) mit isokratischen Eluentenverhältnissen auf einem semi-präparativen System. Durch die Verwendung verschiedener organischer Phasen (Methanol in Trennung C und Acetonitril in Trennung D) gelang die Separation ähnlicher Metaboliten. Zur Verfolgung der Metaboliten wurden die verschiedenen Fraktionen mittels HPLC-MS analysiert. Anschließend wurde mit den jeweils relevanten Fraktionen im nächsten Schritt fortgefahren. Im Folgenden soll die Trennung anhand der Urinprobe U_DF4 (Abbildung 5.39) dargestellt werden.

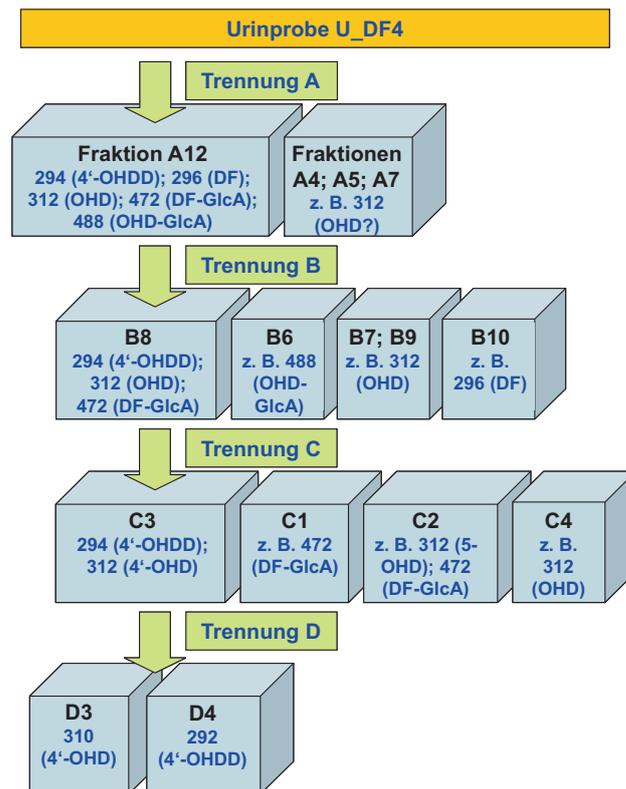


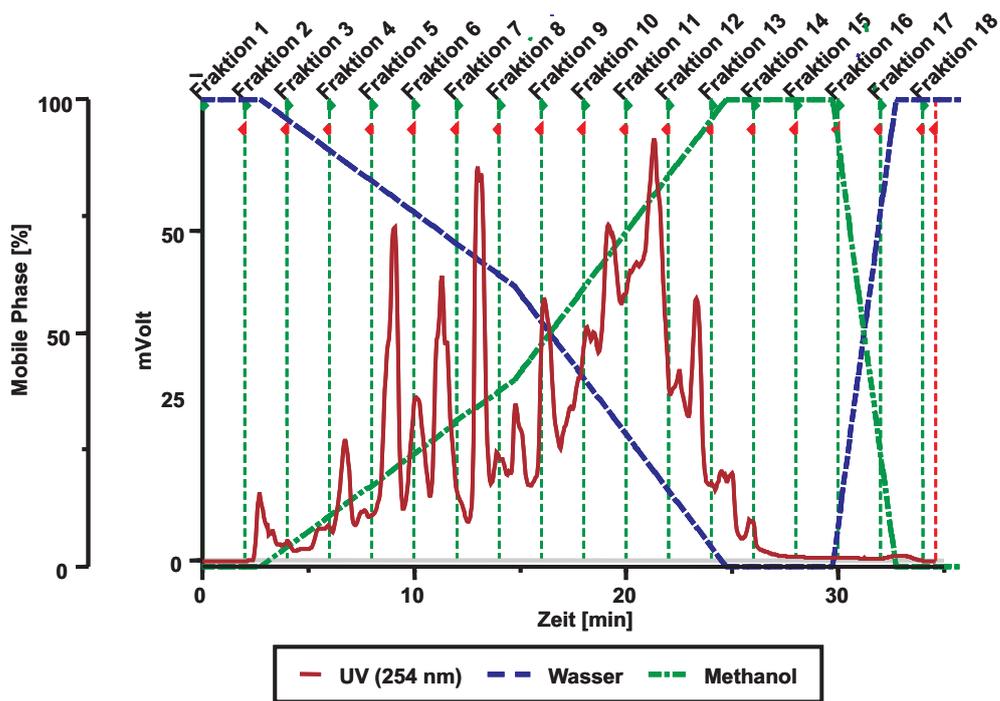
Abbildung 5.39: Schema der präparativen Trennung der Urinprobe U_DF4 mit den m/z der über HPLC-MS im full scan analysierten positiven Ionen und potentiellen Metaboliten

5.2.1 Gradiententrennung

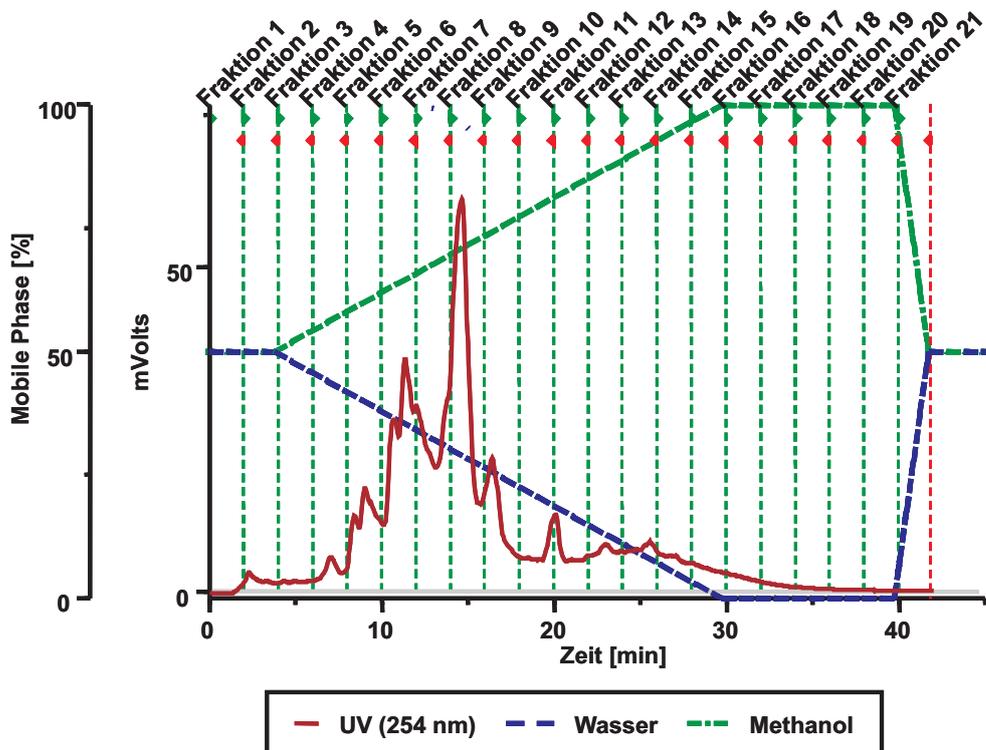
Ein Chromatogramm zu Schritt A ist in Abbildung 5.40 (a) wiedergegeben. Der Gradient ist wie in den „Screening“-Messungen dazu gedacht, polarere Substanzen zunächst abzutrennen. Über die gesamte Messung gibt es keinen basisgetrennten Peak, was auf eine Vielzahl von Substanzen mit unterschiedlicher Polarität hindeutet. Ab einer Retentionszeit von etwa 13 min überlagern sich zahlreiche Substanzen völlig, darunter auch die DF-Metaboliten. Die Elution von DF und seinen Metaboliten wurde mittels ESI-full scan-MS-Messungen überprüft¹⁰. Die Detektion der Masse m/z 312 (im positiven Modus, vermutlich OHD) war in den Fraktionen A4, A5, A7 und A12 möglich, die umweltrelevanten OHD-Metaboliten (mit entsprechender Retentionszeit im analytischen Chromatogramm) in der Fraktion A12 von 22 bis 24 min. DF eluierte ebenfalls in der Fraktion A12 ebenso wie die zugehörigen Glucuronide.

Eine weitere Auftrennung der Fraktion A12 mit einem langsameren Gradienten (Schritt B) erbrachte das Chromatogramm in Abbildung 5.40 (b). Auch hier koeluierten noch mehrere Verbindungen, vor allem im Bereich von etwa 8 bis 18 min. Darunter befindet sich auch das Signal der OHD-Metaboliten. Über die analytische Kontrolle konnten die zugehörigen Fraktionen B7 bis B9

¹⁰Es wurde im Fullscan gemessen (um auch die Abtrennung der übrigen Substanzen überprüfen zu können) und auf die Quasimolekularionen $[M+H]^+$ oder $[M-H]^-$ der Metaboliten überprüft (vgl. Abschnitt 4.9.1).



(a) Schritt A



(b) Schritt B

Abbildung 5.40: UV-Chromatogramme (254 nm) der Gradiententrennungen des Urinprobeneluates U_DF4. Zusätzlich gezeigt werden der Verlauf der Gradienten als prozentuale Zusammensetzung des Laufmittels sowie die gesammelten Fraktionen.

ermittelt werden, wobei die Hauptmenge in Fraktion B8 lag. Auch DF-GlcA war in dieser Fraktion enthalten. Sie wurde in Schritt C weiter aufgetrennt sowie in der HPLC-NMR-MS-Messung analysiert. In Fraktion B6 war die Detektion der Massen der OHD-Glucuronide, in Fraktion B10 die von DF möglich.

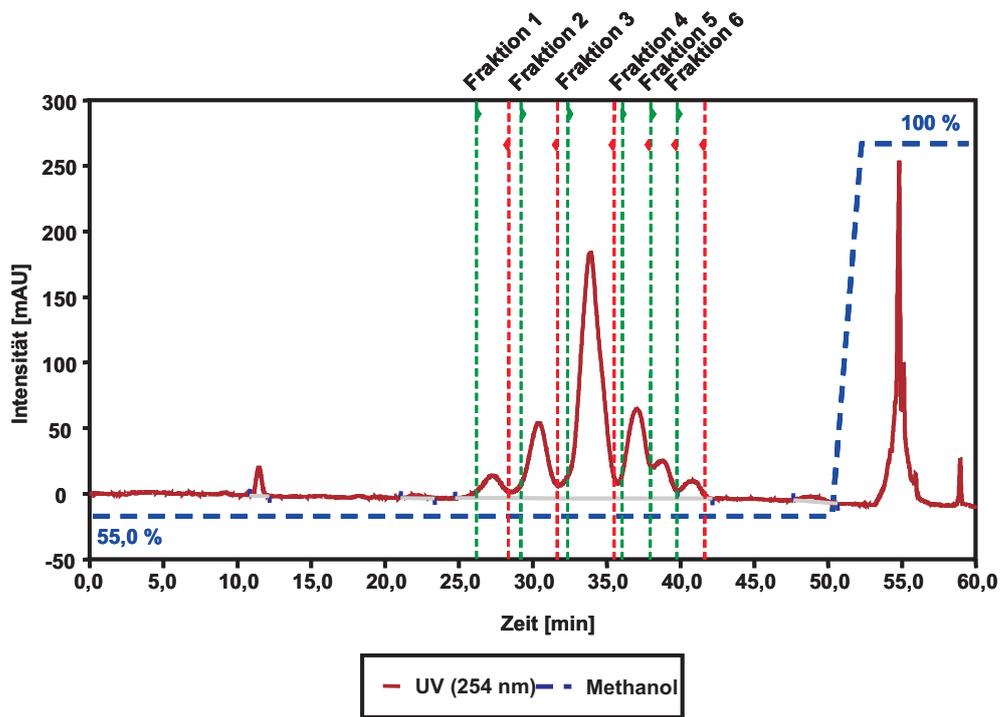
5.2.2 Isokratische Trennung mit Methanol oder Acetonitril

Die isokratische Trennung der Fraktion B8 (Trennung C) zeigt, dass dort noch mindestens sechs Verbindungen enthalten sind. In Abbildung 5.41 (a) ist das zugehörige UV-Chromatogramm für das Eluat von U_DF4 zu sehen. Das umweltrelevante OHD war in den Fraktionen C2 (von 27 bis 29 min), C3 (von 30 bis 33 min) und C4 (von 34 bis 36 min) enthalten, der Hauptanteil in Fraktion C3. In den Fraktionen C1 und C2 war außerdem die Detektion von m/z 472 (DF-GlcA) möglich. Die Fraktion C3 wurde in den HPLC-HRMS-Messungen (Abschnitt 5.3.1) verwendet.

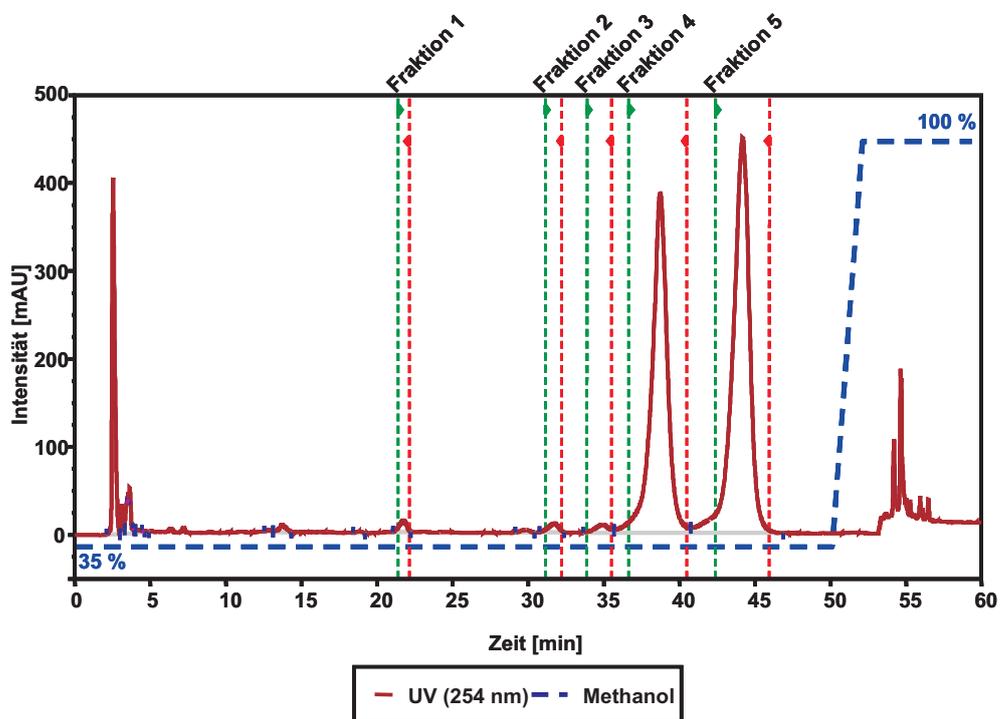
Nach Wechsel der organischen Phase von Methanol auf Acetonitril in Trennung D wurden aus einem Gemisch der Fraktion C3 aus der gerade beschriebenen Trennung sowie der entsprechenden Fraktion aus der Trennung C des Urineluates U_DF3 zwei Peaks bei RT 38 bis 40 min (mit m/z 312; D4) bzw. 43 bis 45 min (m/z 294; D5) erhalten. Diese wurden, wie im Folgenden beschrieben, über NMR und HRMS-Messungen charakterisiert und als 4'-OHD sowie dessen dehydratisiertes Lactam 4'-OHDD identifiziert.

Das Lactam war in den vorherigen analytischen Messungen nicht von 4'-OHD abgetrennt worden, sondern von dessen Fragment mit m/z 294 kaschiert. Dennoch konnte es mit der vorliegenden Methode isoliert und trotz des geringen Anteils am Metabolismus des DF erfasst werden. Mit Hilfe der aus Trennung C bekannten Massen sowie der Ergebnisse der HPLC-NMR-MS-Messungen (Abschnitt 5.3.2) zur Fraktion aus U_DF1 (entsprechend B8 bei U_DF4) ist die Zuordnung der Fraktion C2 zu 5-OHD möglich. Leider war die Menge der 5-OHD enthaltenden Fraktion nicht groß genug für eine Isolierung dieses Isomers.

Nach Trocknung der HPLC-Fraktion für die NMR-Messung mit deuteriertem Lösungsmittel konnte bei der 4'-OHD-enthaltenden Fraktion D4 eine zunehmende Verunreinigung mit 4'-OHDD festgestellt werden. Diese bildet sich vermutlich bei der Trocknung im Rotationsverdampfer trotz der milden Bedingungen. Um sicherzustellen, dass diese Verbindung nicht nur durch die Trocknung der 4'-OHD-enthaltenden Fraktionen entstanden ist, wurde eine Vergleichsmessung eines Urineluates durchgeführt (Abschnitt 5.3.4).



(a) Schritt C



(b) Schritt D

Abbildung 5.41: UV-Chromatogramme der isokratischen Auftrennungen des Urinprobeneluates U_DF4 bzw. des Gemisches der Eluate U_DF3 und U_DF4

5.3 Identifizierung und Quantifizierung der Diclofenac-Metaboliten

Die aus den ersten Analysen vorgeschlagenen Metaboliten wurden durch HRMS sowie LC-NMR-MS genauer charakterisiert.

5.3.1 HPLC-hochauflösende Massenspektrometrie

Durch die HRMS kann die genaue Elementzusammensetzung bestimmt werden. Hierzu diente Fraktion C3 aus der präparativen HPLC. Sie wurde in positivem und negativem Modus MS^n -Messungen unterzogen. Aus diesen Spektren sind spezifische Fragmentierungsmuster erkennbar. Dies entspricht teilweise den für die Photolyse von DF vorgeschlagenen Strukturen bzw. dem für DF vorgeschlagenen Mechanismus der Fragmentierung nach einem Ringschluss zum Lactam unter Addition der OH-Gruppe (Pérez-Estrada u. a., 2005; Galmier u. a., 2005; Bartels und von Tümpeling, 2007; Petrovic und Barceló, 2007).

Ein Beispiel für ein solches Fragmentierungsmuster ist in Abbildung 5.42 gegeben.

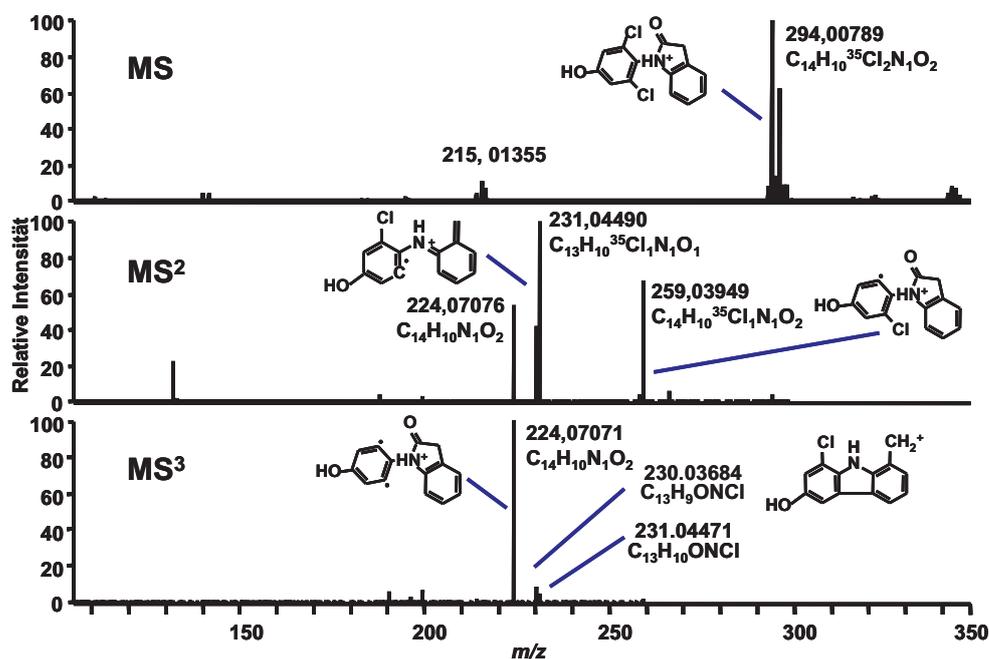


Abbildung 5.42: Positive HRMS-Messungen im MS, MS² (m/z 294 →) und MS³ (m/z 294 → m/z 259 →) Modus von 4'-OHDD mit postulierten Fragmenten

Im positiven ESI-Modus zeigt das full scan-Spektrum von 4'-OHDD das Quasimolekularion bei m/z 294,00789, dem eine Summenformel von $C_{14}H_9Cl_2NO_2$ zugeordnet werden kann. Die erste Fragmentierung (MS²) führte zum schon bekannten Ion mit m/z 231,04490. Die Summenformel bestätigt einen Verlust von CO und Cl. Außerdem entstanden Fragmente mit m/z 259,03949 (Ab-

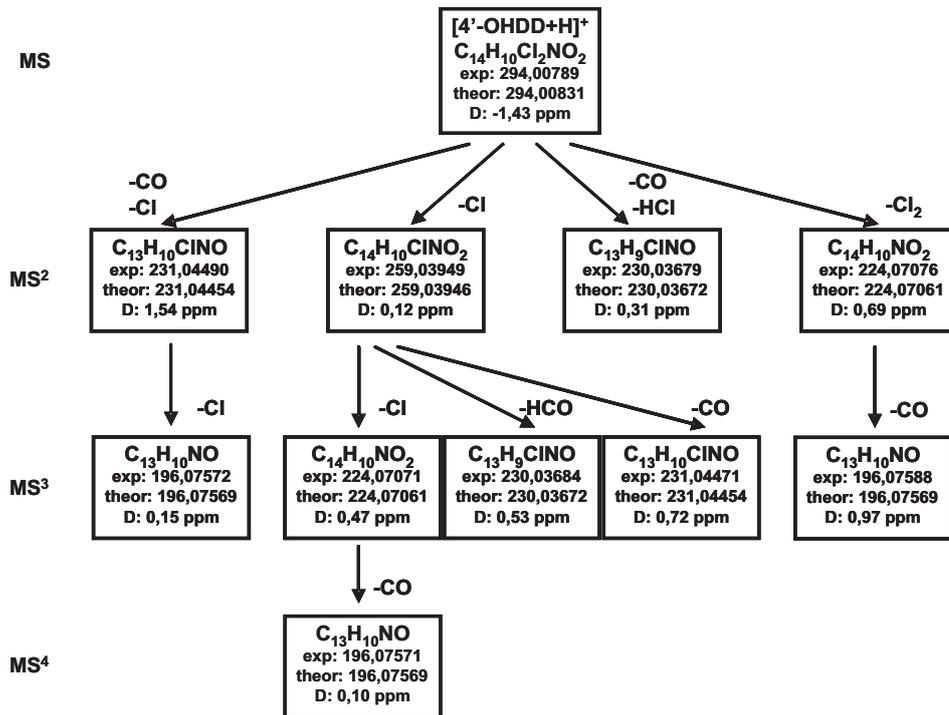
gang von Cl); 224,07076 (-Cl₂) und 230,03679 (-CO und HCl). Ein MS³-Scan von m/z 259,03949 lieferte die Ionen mit m/z 224,07071 (-Cl); 230,03684 (-HCO) und 231,04471 (-CO).

Das vollständige Fragmentierungsschema für die positive und negative Messung von 4'-OHDD ist in Abbildung 5.43 wiedergegeben.

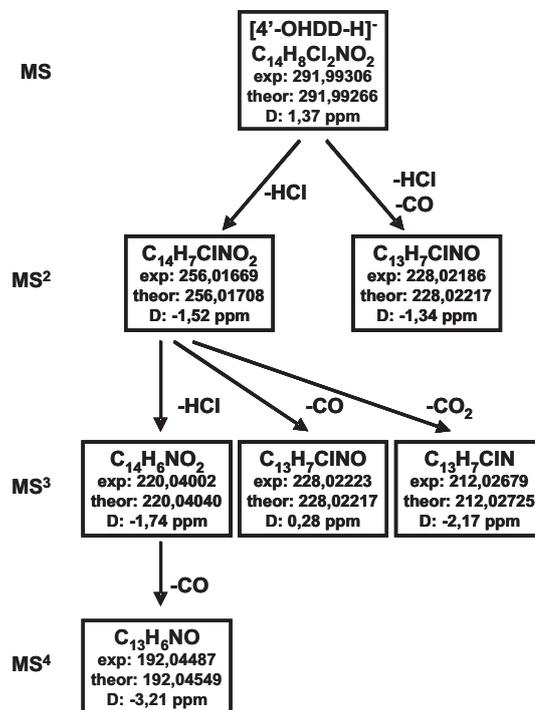
5.3.2 LC-MS-SPE-NMR

Ein LC-MS-SPE-NMR-Experiment der Fraktion B8 aus der präparativen Trennung der zuvor vereinigten Eluate U_DF1 und U_DF2 führte zur Abtrennung von DF-Metaboliten enthaltenden Fraktionen. Dabei erfolgte die Trennung über die Beobachtung der positiv gemessenen ESI-MS-Ionen mit m/z 312 (OHD, von 13,2 bis 14,5 Minuten) bzw. m/z 294 (4'-OHDD, von 16,4 bis 17,1 Minuten). Die weitere Aufreinigung der die jeweilige Masse enthaltenden Fraktion über online-SPE ermöglichte die Aufnahme der entsprechenden NMR-Spektren nach Elution mit deuteriertem Lösungsmittel.

Die Abtrennung von m/z 294 resultierte in einer Einzelsubstanz, was im ¹H-NMR-Spektrum sehr deutlich zu erkennen ist. Deren Struktur konnte durch die zweidimensionalen Messungen bestimmt werden. Die HMQC- und HMBC-Spektren (z. B. Abbildung 5.44) zeigten ähnliche Korrelationen wie bei DF, jedoch fiel eine starke Veränderung im Bereich der Carbonylfunktion von 181 ppm für DF zu 176,44 ppm (C-15) im OHD-Spektrum auf. Dies ließ – in Kombination mit der aus Abschnitt 5.3.1 bekannten Summenformel für diesen Metaboliten – auf eine Lactamstruktur, das ¹H-¹H-COSY-Spektrum auf zwei getrennte aromatische Ringsysteme schliessen. Im HMQC-Spektrum wurde deutlich, dass die Protonen nahe des Lactamringes bei 6,42 ppm (H-13; mit einer Kopplung an C-13 bei 110,62 ppm), 7,08 ppm (H-11; Kopplung an C-11 bei 124,48 ppm) und 7,33 ppm (H-10; C-10 bei 126,21 ppm) zu sehen waren.



(a) Positive Messung



(b) Negative Messung

Abbildung 5.43: Fragmentierungsmuster von 4'-OHDD (exp.: experimentell; theor.: theoretisch; D: Differenz).

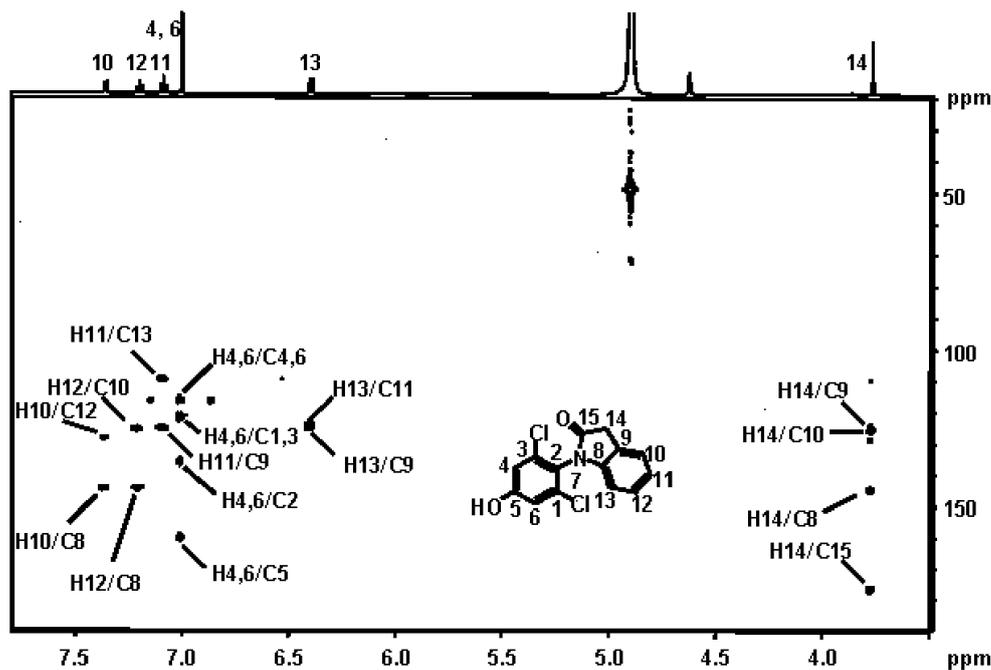


Abbildung 5.44: HMBC-Spektrum von 4'-OHDD

Im HMBC-Spektrum wurden die Signale der symmetrischen Protonen des zweiten aromatischen Ringes bei 6,99 ppm deutlich. Sie koppelten mit einem oxidierten Kohlenstoff an Position C5 bei 160,85 ppm. Die Protonen der CH₂-Gruppe bei 3,72 ppm (zugehörig zu C-14 bei 35,34 ppm) koppelten mit dem Carbonyl-Kohlenstoffatom des charakteristischen Lactamsystems (C-15). Schließlich diente die Kopplung der symmetrischen Protonen H-4,6 sowie H-14 der Zuordnung der chemischen Verschiebungen von C-1,3 (121,02 ppm), C-2 (136,60 ppm), C-5 (160,85 ppm), C-9 (124,48 ppm) und C-8 (145,26 ppm).

Die Position der Hydroxyfunktion konnte somit auf 4' festgelegt und der Metabolit als 4'-OHDD identifiziert werden.

Die Abtrennung von *m/z* 312 aus Fraktion B8 der präparativen HPLC führte dagegen zu NMR-Spektren, die eindeutig zwei verschiedene Substanzen zeigten. Vor allem die HMBC-Messungen (Abbildungen 5.45 und 5.46) führten durch die unterschiedlichen Verschiebungen für die beiden Ringsysteme zur Identifizierung von 5-OHD und 4'-OHD, ein weiteres OHD-Isomer war nicht zu erkennen.

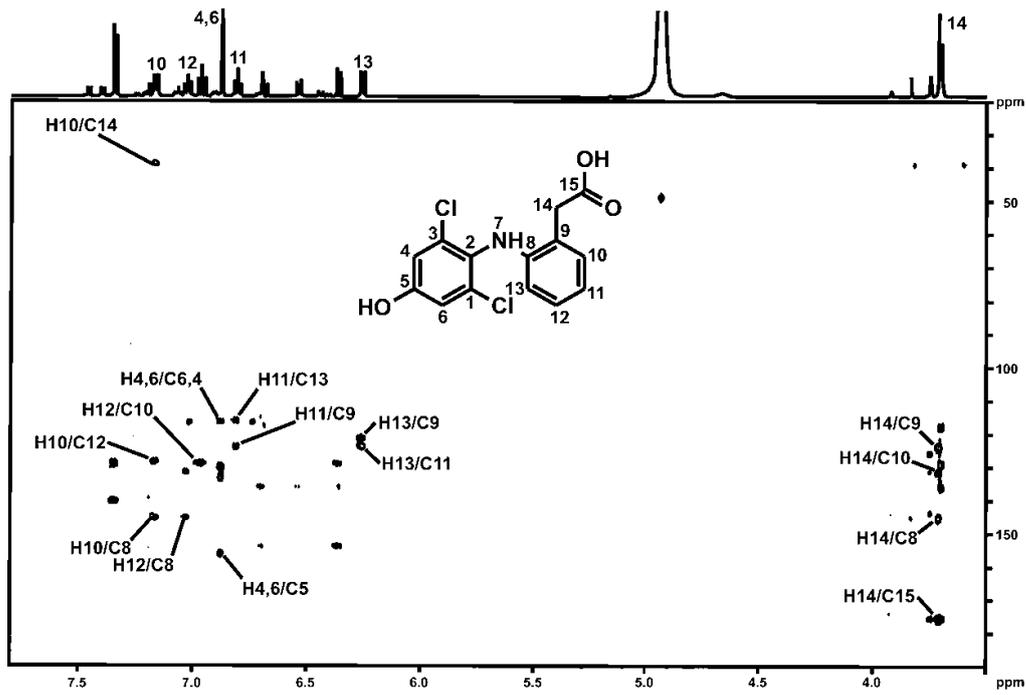


Abbildung 5.45: HMBC-Spektrum von 4'-OHD

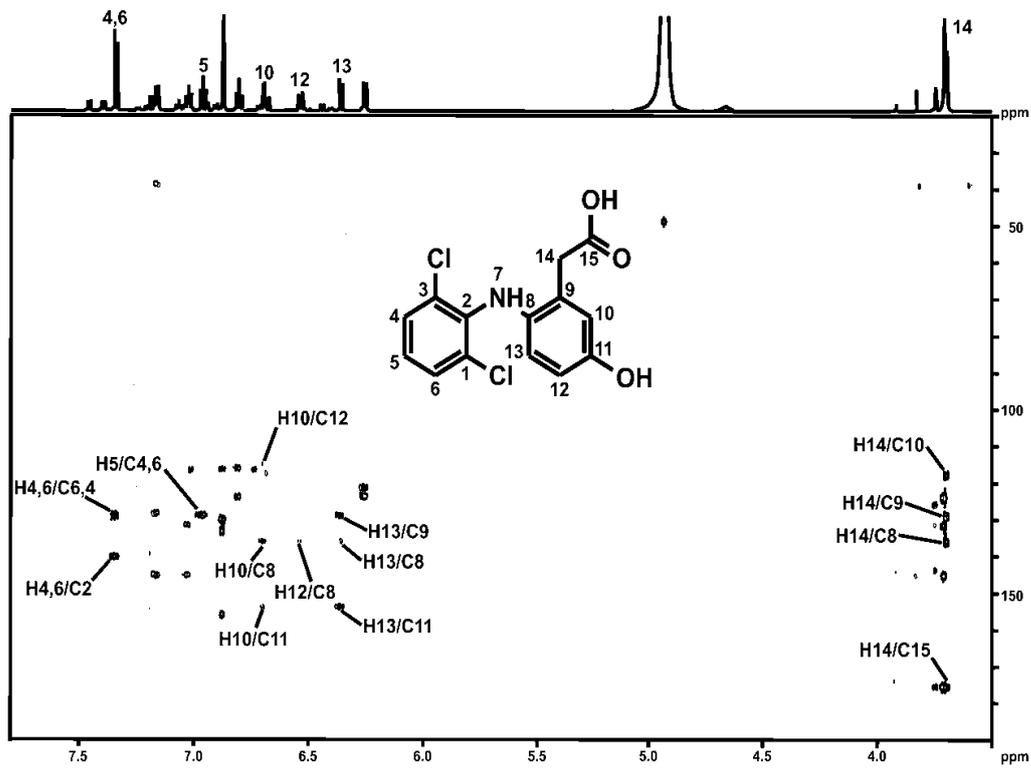


Abbildung 5.46: HMBC-Spektrum von 5-OHD

5.3.3 Quantitative NMR-Spektrometrie

Um die genauen Mengen der isolierten Metaboliten für die Standardlösungen bestimmen zu können, erfolgte eine quantitative NMR-Spektroskopie der getrockneten Fraktionen mit deuteriertem Methanol, dem jeweils eine definierte Menge DMSO als IS zugesetzt war. Über die Signale des IS wurde, wie in Abschnitt 2.6.3.2 auf Seite 30 beschrieben, ein absoluter Gehalt von 1,47 mg 4'-OHD und 1,92 mg 4'-OHDD ermittelt. Durch Auffüllen der NMR-Proben auf 5 ml – für quantitative Standards – resultierten Konzentrationen von 294 mg/l 4'-OHD bzw. 384 mg/l 4'-OHDD. Jedoch war in dem 4'-OHD-Standard das Lactam noch zu 18,5 % enthalten (w/w; durch Kondensation wie in Abschnitt 5.2.2 auf Seite 88 beschrieben). Ein Mischstandard von jeweils 1 ml der quantitativen Standards enthielt demnach 294 μ g 4'-OHD und 440 μ g 4'-OHDD. Durch Messung von DF-Urineluaten mit der in Abschnitt 5.4.2 auf Seite 99 entwickelten MRM-Methode (siehe im folgenden Abschnitt) wurde der Beweis erbracht, dass es sich bei 4-OHDD um einen echten DF-Metaboliten handelt.

5.3.4 Bestätigung der isolierten Verbindungen im Urin

Zum Nachweis der Existenz aller Metaboliten diente die Messung von Urinprobeneluaten mittels der in Abschnitt 5.4.2 beschriebenen MRM-Methode (Abbildung 5.47). Ein Vergleich der Mengen von DF und seinen Metaboliten soll außerdem einen Eindruck vermitteln, wieviel Anteil einer Dosis von jedem Metaboliten ausgeschieden wird. Die Mengen wurden nach der Isolierung und Quantifizierung der Metaboliten in den Urinprobeneluaten U_DF3 und U_DF4 mittels einer Kalibrierung bestimmt und (da weder Wiederfindungsraten in Urin bestimmt wurden noch die Konzentrationen in den Urineluaten vergleichbar waren) relativ zueinander betrachtet.

Der Vergleich zu den in der Literatur genannten Anteilen der Dosis ergibt sich ungefähr durch das Gleichsetzen der Konzentration von 4-OHD mit dem von Sawchuk u. a. (1995) ermittelten Wert von 16 % der Dosis. Daraus folgen als Anteil an der renalen Exkretion für 5-OHD 5,6 % ($\pm 0,4$ %), für 4'-OHDD 2,7 % ($\pm 1,1$ %) und für DF 8,4 % ($\pm 1,3$ %) der Dosis.

5.4 Methodenoptimierung

Die Anforderungen an eine quantitative Messmethode sind im folgenden Abschnitt erläutert. Für optimale Ergebnisse aller Analyten in der „Abwasseranalyse“ musste zunächst die beste HPLC-MS-Messmethode ermittelt sowie eine möglichst vollständige Aufreinigung der Abwasserproben gefunden werden. Die so ermittelte Methode wurde daraufhin auf die genannten Anforderungen hin überprüft.

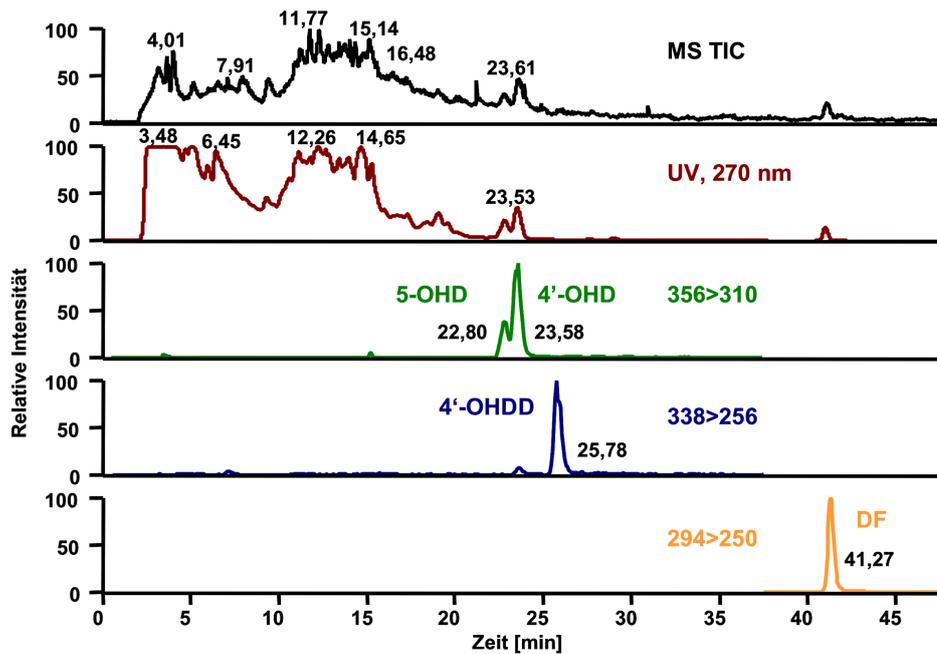


Abbildung 5.47: Nachweis der DF-Metaboliten im Urineluat U_DF4

5.4.1 Anforderungen an eine quantitative Messmethode

Um eine Substanz eindeutig identifizieren zu können, sollte die analytische Methode gewisse Kriterien erfüllen, wie sie z. B. in der Europäischen Richtlinie 2002/657/CE (über die Analyse von Rückständen in Erzeugnissen tierischen Ursprungs) festgelegt wurden (Europäische Kommission, 2002). Für die Verwendung von TSQ-Geräten heißt das, dass zwei SRM-Übergänge für jede Substanz festgelegt werden müssen (das entspricht 4 so genannten Identifizierungspunkten, der minimal nötigen Summe für die in dieser Richtlinie betrachteten Substanzklassen). Die für die Rückstandsanalytik von Pestiziden in Deutschland gültige Leitlinie SANCO/825/00 „Guidance document on residue analytical methods“ (Rev. 7 vom 17.03.2004) fordert bestätigende Methoden wie GC-MS, HPLC-MSMS oder HPLC-DAD („Diode array detector“, UV-Spektrum) (Directorate General Health and Consumer Protection, 2004). Für die GC-MS im SIM-Modus sind dabei ausdrücklich drei spezifische Fragmentationen genannt, jedoch nicht für die HPLC-MSMS. Für Arzneimittel gibt es derzeit keine besonderen Regelungen.

Zur Ermittlung der Menge einer vermessenen Substanz in einer Probe, wird die Fläche des zugehörigen Signals aus dem Detektor durch Integration des Bereichs, der oberhalb der so genannten Basislinie liegt, bestimmt. Die Basislinie entspricht dem mittleren Rauschen (N vom englischen „noise“) beim Messen eines Blindwertes (z. B. das gleiche Lösungsmittel ohne Analyt). Im Normalfall entspricht das einer gedachten Linie zwischen den Bereichen um das Signal herum. Die Fläche des Signals ist im Allgemeinen proportional zu der Menge des Analyten in der Probe, also der Konzentration.

5.4.1.1 Kalibrierung

Zur genauen Konzentrationsbestimmung eines Analyten wird im Allgemeinen eine Kalibrationsreihe aus mehreren bekannten Konzentrationen des Analyten in einem der Probe möglichst ähnlichen Lösungsmittel erstellt. Durch das Auftragen der Peakfläche über der Konzentration lässt sich der so genannte Kalibrationsgraph ermitteln. Er sollte linear sein, so dass dann für jede Probe die Konzentration des Analyten einfach daraus abgelesen bzw. berechnet werden kann.

5.4.1.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Um über den Nachweis einer Substanz in einer Probe Sicherheit zu gewähren, wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen eingeführt (Abbildung 5.48). Mit sinkenden Konzentrationen des Analyten wird auch dessen Signal S kleiner. Irgendwann ist eine Unterscheidung vom Grundrauschen N bzw. dessen mittlerer Schwankung, der Basislinie, nicht mehr möglich.

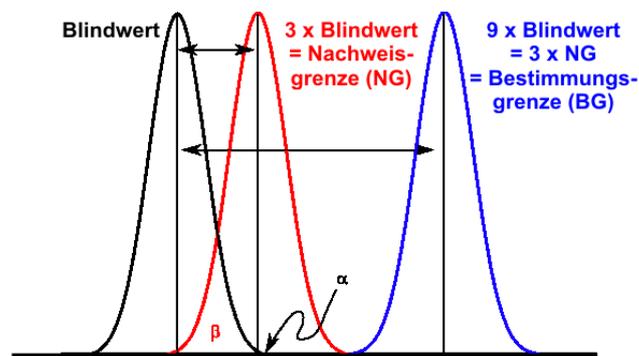


Abbildung 5.48: Nachweis- und Bestimmungsgrenze; α = Wahrscheinlichkeit für einen falsch positiven Befund, β = Wahrscheinlichkeit für einen falsch negativen Befund

Um dennoch Klarheit über die zuverlässige Detektion eines Analyten zu schaffen, wird die Nachweisgrenze (NG) angegeben (Arbeitsausschuss Chemische Terminologie (AchT), 1994; Skoog und Leary, 1996). Für sie wird die Summe aus dem Grundrauschen und der dreifachen Standardabweichung des Grundrauschens über der Basislinie (dreifaches Signal-Rausch-Verhältnis, S/N) gebildet. Dieses Verfahren entspricht in der DIN 32 645 der Schnellschätzung über die Leerwertmethode mit der relativen Ergebnisunsicherheit ($1/k$) für $k = 3$.

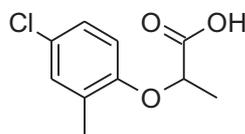
Für zuverlässige Aussagen über die Menge eines vermessenen Analyten wurde die Bestimmungsgrenze (BG) eingeführt (Arbeitsausschuss Chemische Terminologie (AchT), 1994; Skoog und Leary, 1996; UBA05, 1998). Sie entspricht dem dreifachen Wert der NG, also dem neunfachen S/N .

5.4.1.3 Interner Standard

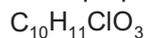
Da es in der Massenspektrometrie zu einer Signalunterdrückung durch Matrixeffekte kommen kann und während der gesamten Probenbehandlung Verluste auftreten können, wurde ein Interner Standard (IS) benutzt (Skoog und Leary, 1996). Dieser ist im Idealfall das mehrfach deuterierte oder isotoopenmarkierte Äquivalent des Analyten, das sich folglich chemisch äquivalent verhält (Hao u. a., 2007). Ein Masseunterschied von mehr als zwei Massen ist dabei von Vorteil, um die Detektion nicht durch das Vorkommen natürlicher Isotope zu beeinflussen.

In der quantitativen Analyse wird der IS in gleicher Menge allen Proben und Kalibrierstandards zugegeben, um die erhaltenen Integralfächen durch die des internen Standards zu normieren. Im optimalen Fall können so Fehler wie z. B. Verluste durch die Probenvorbereitung (systematisch) oder Messfehler durch Schwankungen der Geräteparameter (zufällig) korrigiert werden (Hallbach, 2006).

Der IS in der vorliegenden Arbeit ist Mecoprop-d₃.¹¹ Mecoprop, Methylchlorophenoxypropionsäure, ist ein Chlorphenoxy-Herbizid (Abbildung 5.49). Leider war es nicht möglich, isotoopenmarkiertes DF zu verwenden. Jedoch wurde Mecoprop-d₃ schon als IS für DF und andere Pharmazeutika eingesetzt (Öllers u. a., 2001).



Mecoprop



CAS: 93-65-2 bzw. 7085-19-0

Exakte Masse: 214,039672 u

Abbildung 5.49: Mecoprop

5.4.1.4 Wiederfindungsrate

Die Bestimmung der Wiederfindungsrate (WFR) dient der Angabe des Verlustes eines Analyten im Verlauf der Probenvorbereitung und Messung. Dafür werden mehrere gleiche Proben mit einer definierten Menge der Analyten versetzt sowie zum Vergleich die undotierte Probe mehrfach als Blindwert angesetzt. Der Durchführung der kompletten Methodik mit allen Proben sowie mehreren reinen Standards, die möglichst in der gleichen Matrix verdünnt wurden, folgt deren Analyse.

¹¹Die Isotopenmarkierung ist am Ring lokalisiert

Der gemittelte Messwert der Proben wird – abzüglich des gemittelten Blindwertes – in Bezug zu dem gemittelten Messwert der Standards gesetzt, um die Wiederfindungsrate zu erhalten:

$$\text{WFR} = \frac{A_P - A_B}{A_S} \cdot 100$$

wobei gilt:

WFR : Wiederfindungsrate
A : gemittelte Peakfläche
P : aufgestockte Probe
B : Blindwertprobe
S : Standard

5.4.2 Optimierung von massenspektrometrischer Analyse und Chromatographie

Für die Analyse der in der präparativen HPLC erhaltenen Fraktionen wurden verschiedenen Ionisierungsmethoden überprüft. Aufgrund des hohen Fragmentierungsgrades bei der APCI sowie der stärkeren Hintergrundsignale bei positiven Messungen erfolgten die weiteren Analysen mittels negativer ESI. Zunächst wurden die Kollisionsenergien der SRM-Übergänge der Metaboliten sowie von DF und AF¹² mittels Injektion über eine Spritzenpumpe in die ESI-Quelle optimiert. Die so ermittelten Werte sind in Tabelle 4.10 auf Seite 49 wiedergegeben.

Durch Anwendung dieser MRM-Methode bei Messungen des Urineluates U_DF3 wurde versucht, Chromatographie-Bedingungen mit getrennt detektierbaren OHD-Metaboliten zu ermitteln. Eine isokratische Phase innerhalb des Gradientenprogrammes sollte dieses ermöglichen. Zunächst konnte ein Vergleich des bisherigen wässrigen Eluenten mit einer 1 mM Ammoniumacetat enthaltenden Phase, wie schon von Nebot u. a. (2007) verwendet, unter Addition von 0,1 % FA zeigen, dass kein Intensitätsverlust auftritt. Die Zugabe des Puffers diene der Stabilisierung der Retentionszeiten, z. B. in den später untersuchten Abwasserproben. Dennoch kommt es je nach Matrix zu Verschiebungen. In der analytischen Untersuchung zeigte sich kein Unterschied zwischen Acetonitril und Methanol als organische Phase.

Aus Abbildung 5.50 wird ersichtlich, dass trotz des Einsatzes unterschiedlicher Säulentypen (A: Fusion, B: Luna und C: Sphinx) bei 75 % Acetonitril (+ 0,1 % FA) : 25 % 1 mM Ammoniumacetat

¹²Der DF-verbundene Wirkstoff wurde hier für das Screening mit aufgenommen, da er zur Konzentration der Metaboliten mit beitragen könnte. Außerdem erfolgte die Übertragung der Methode von 4-OHD auf den Hydroxymetaboliten des AF, um auch dessen Anwesenheit in Abwasserproben überprüfen zu können.

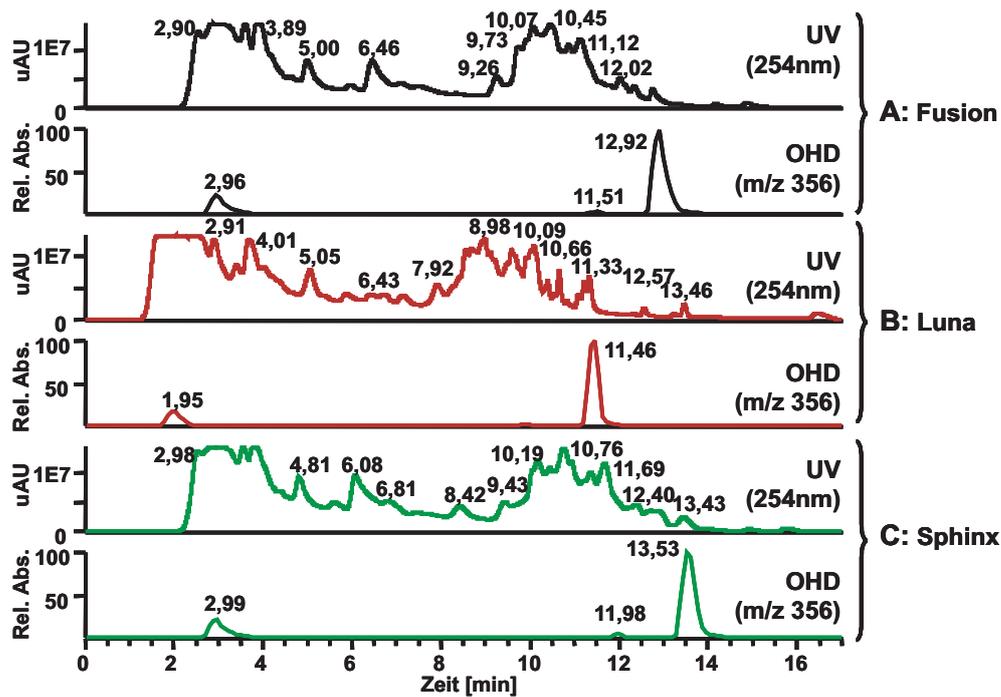


Abbildung 5.50: Vergleich der Chromatogramme und des OHD-SRM-Überganges (m/z 356 \rightarrow 310, 12 eV) bei Einsatz verschiedener Säulentypen. Eluenten A: Wasser + 1 mM Ammoniumacetat + 0,1 % FA, B: Acetonitril + 0,1 % FA; Isokratische Stufe bei 75 % B

(+ 0,1 % FA) in der isokratischen Phase keine Trennung der OHD-Isomere möglich war. Eine Variation der Zusammensetzung der Eluenten in dieser Phase führte weder für die Fusion- noch für die Luna-Säule (beide 15 cm lang) zum Erfolg. Die Beobachtung einer Aufspaltung des OHD-Peaks war jedoch auf der längeren Sphinx-Säule (25 cm) ab einem geringeren Organikanteil der mobilen Phase im isokratischen Bereich von etwa 50 % möglich, eine quantifizierbare Trennung bei 45 % organischer Phase zu beobachten (Abbildung 5.51). Bei dieser Zusammensetzung eluieren die Isomere bei Retentionszeiten von 27,6 min und 28,7 min. Die Trennung ist für eine Eluentenzusammensetzung mit 40 % organischer Phase zwar deutlicher, jedoch noch nicht vollständig. Da sich außerdem die Peaks durch die längere Verweilzeit im System immer mehr verbreitern, wurde für die späteren Messungen eine isokratische Phase mit 45 % Organik gewählt.

Aceclofenac bringt durch ein in der ESI-Quelle entstehendes DF-Fragment für dessen SRM-Übergang mit m/z 294 \rightarrow 214 ein falsch-positives Signal hervor. Eine weitere isokratische Phase innerhalb des Gradientenprogrammes dient einer Vermeidung der Koelution beider Verbindungen. Eine Überprüfung dessen erfolgte sowohl mittels Einzel- als auch eines Mischstandards der Analyten. Das Chromatogramm einer Klarwassereluat-Messung (ohne AF) ist in Abbildung 5.52 dargestellt, es zeigt die Anwendbarkeit der Messmethode. Die in Abwasser gegenüber dem Standard veränderten Retentionszeiten von 26 min, 29 min und 44 min für 4' -OHD, 4' -OHDD und DF wurden durch die Versuche zur Bestimmung der Wiederfindungsraten (siehe Abschnitt 5.4.5) bestätigt.

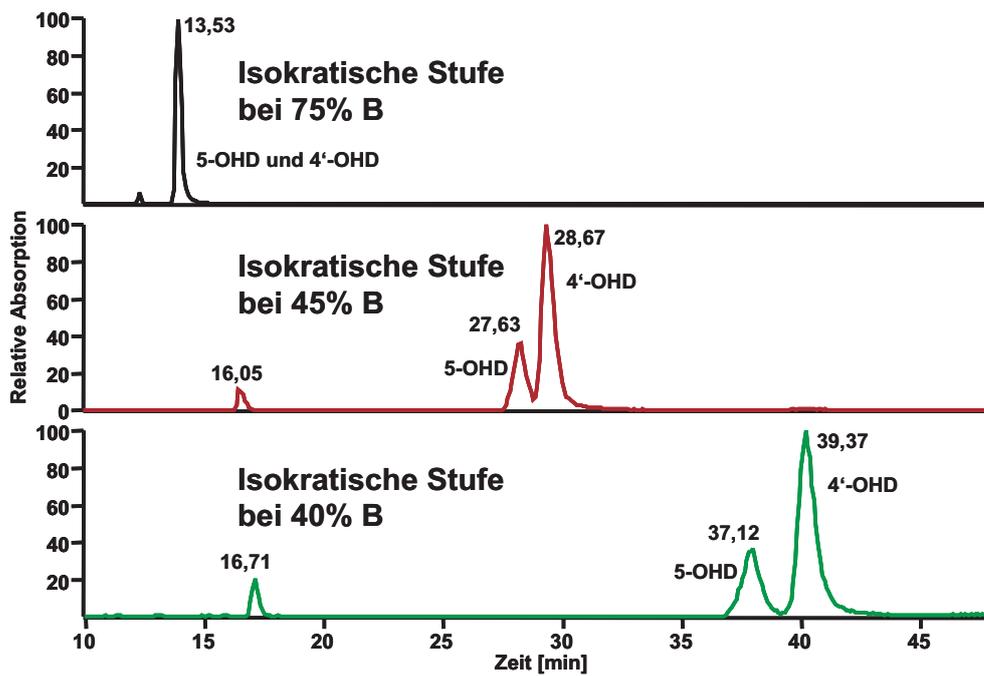


Abbildung 5.51: Vergleich des OHD-SRM-Überganges (m/z 356 \rightarrow 310, 12 eV) bei verschiedenen Zusammensetzungen der isokratischen Stufe des Gradientenprogrammes auf der Sphinx-Säule

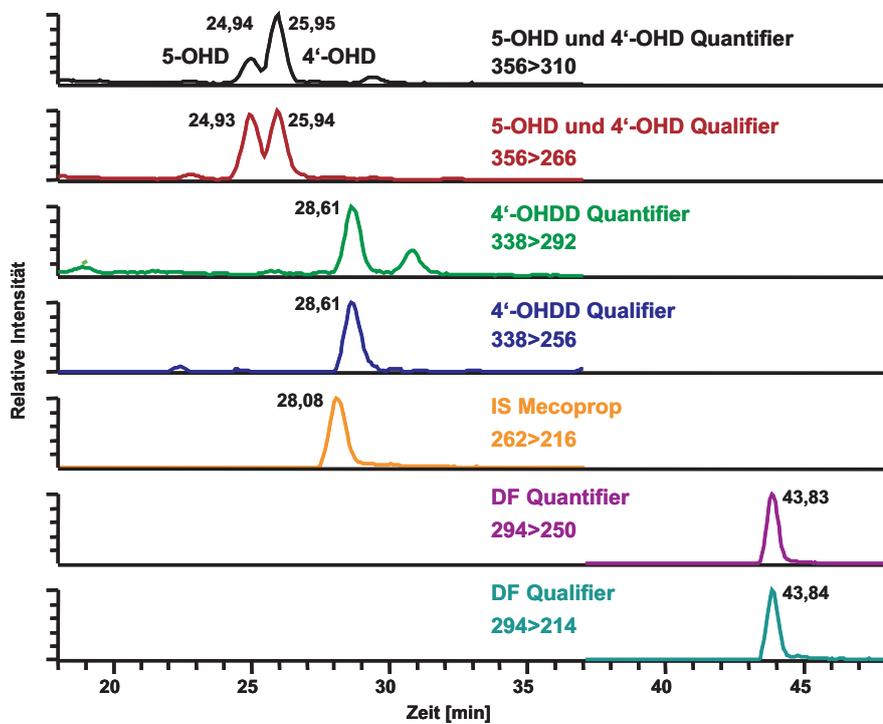


Abbildung 5.52: MRM-Chromatogramm des Eluates einer Realprobe (Klärwerksablauf aus KW3)

5.4.3 Vergleich von SPE-Materialien

Um die Probenaufreinigung für DF und seine Metaboliten zu optimieren, wurde ein Vergleichsversuch mit zwei verschiedenen SPE-Kartuschen durchgeführt, PolarPlus und Strata X. Das C18-Material PolarPlus hat sich für Arzneimittelwirkstoffe sowie deren polare Metaboliten bereits bewährt (Reddersen und Heberer, 2003b). Für polare Substanzen haben sich jedoch oft die neueren Polymerphasen als retentionsstärker herausgestellt (Weigel u. a., 2004). Das C18-Material der PolarPlus-Kartusche sollte – zusätzlich zum Rückhalt der polaren Metaboliten mit den eingebauten polaren Gruppen – auch das etwas unpolare DF erfassen. Allerdings zeigte ein Vergleich von PolarPlus zu Strata X bei pH 2,5 für DF eine bessere Retention auf letzterem Sorbenstyp (Debska u. a., 2005).

In Versuchen mit dotiertem Milliporewasser erfolgte daher der Vergleich zwischen der Extraktion von PolarPlus- mit Strata-X-Material bei drei verschiedenen pH-Werten (Doppelbestimmung mit Internem Standard; siehe Abbildung 5.53).

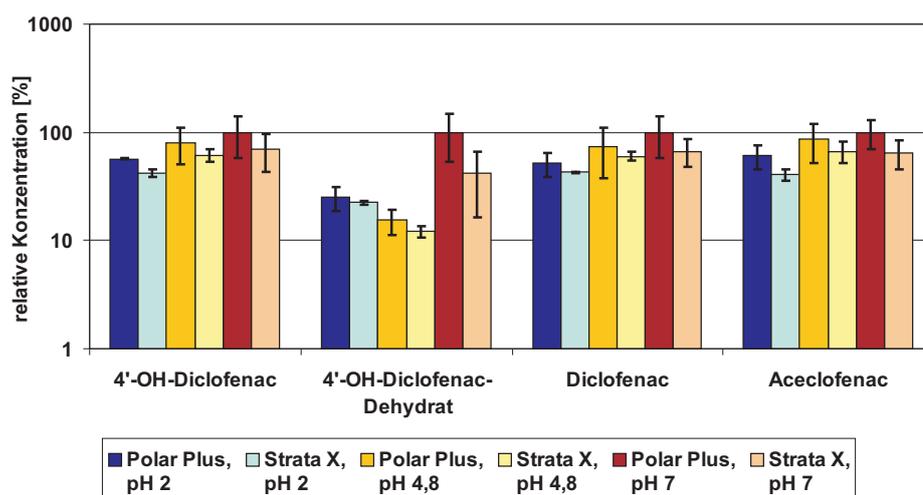


Abbildung 5.53: Vergleich der SPE-Materialien bei drei pH-Werten; Angabe von relativen Konzentrationen für jeden Analyten

Die mit PolarPlus extrahierten Proben zeigten im Gegensatz zu den Ergebnissen von Debska u. a. (2005) bei allen pH-Werten höhere Konzentrationen als die über das Strata-X-Material aufgereinigten Proben. Der pH-Wert 7 stellte sich dabei von allen als am effektivsten heraus, vor allem für den bisher unbekannt Metaboliten 4-OHDD. Da die Einstellung dieses pH-Wertes für verschiedene Ablaufproben und dadurch das Signal des IS Mecoprop etwas ungleichmäßig waren, hat im weiteren Verlauf der Untersuchungen das PolarPlus-Material mit einem Puffersystem mit etwas niedrigerem pH – zitronensauer bei pH 6,4 – Einsatz gefunden. Ein anderer IS (idealerweise isotonenmarkiertes DF) stand jedoch nicht zur Verfügung.

5.4.4 Kalibrierung, Wiederholbarkeit, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Messung von Standards bekannter Konzentrationen von AF, DF und seinen Metaboliten sowie die Ermittlung der Flächenintegrale des jeweiligen Peaks diente der Erstellung von Kalibriergeraden. Sie waren linear im Bereich von der BG bis zu $1 \mu\text{g/l}$ für die DF-Metaboliten und AF bzw. bis $5 \mu\text{g/l}$ für DF. Der Regressionskoeffizient als Maß für die Linearität war $\geq 0,992$.

Die Genauigkeit der Messung wurde durch wiederholte Messung eines Standards sowie eines Eluates und Ermittlung des Variationskoeffizienten überprüft. Dieser lag bei zehnfacher Injektion für alle Analyten außer AF unter 10 %; für AF betrug er 13 %.

Durch einen Mix-Standard aller Analyten erfolgte die Anwendung obiger Messmethode zur Ermittlung der instrumentellen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Analyten (Tabelle 5.5). Da es keine unbelasteten Matrixproben gab, wurde diese Bestimmung durch Verdünnung in Millipore-Wasser durchgeführt. Die Grenzen der Methode (für die Analyse verschiedener Abwasserproben) wurden dabei durch Einbeziehen der Konzentrationsänderungen während der Probenvorbereitung sowie der jeweiligen Reinheiten der Standards festgelegt. Es fällt auf, dass die BG für alle Analyten im gleichen Bereich liegen, außer für AF, wo der Wert 7,5mal höher liegt.

Grenze	Typ	5-OHD	4'-OHD	4'-OHDD	DF	AF
NG [$\mu\text{g/l}$]	instrumentell	10	10	10	10	75
	Methode	0,020	0,020	0,023	0,018	0,15
BG [$\mu\text{g/l}$]	instrumentell	30	30	30	30	225
	Methode	0,059	0,059	0,069	0,055	0,45

Tabelle 5.5: Instrumentelle und methodische Nachweis- (NG) und Bestimmungsgrenzen (BG) für DF, seine Metaboliten sowie AF

5.4.5 Bestimmung der Wiederfindungsraten in verschiedenen Matrices

Für die Ermittlung der WFR kamen filtrierte Mischproben der entsprechenden Matrices (Probenahmestellen entsprechend Abbildung 4.1 auf Seite 42) aus KW4 zum Einsatz. Eine vorherige Prüfung mit dotiertem Milliporewasser zeigte keine relevanten Verluste in der Menge der Analyten durch das Filtrieren. Auch durch zurückgehaltene Partikel sind keine Konzentrationsverluste $> 1 \%$ zu erwarten (Neboš u. a., 2007). Fünf Ansätze wurden mit einer Analyt-Konzentration versetzt, die mindestens doppelt so hoch war wie die in einer vorher vermessenen undotierten einzelnen Matrixprobe. Als Vergleich zu den dotierten Mischproben dienten je zwei nicht aufgestockte Portionen derselben Mischprobe (Blindproben) und drei Standards in Milliporewasser, die der SPE-Prozedur nicht unterzogen wurden.

Die Ergebnisse der Bestimmung der WFR gemäß Abschnitt 5.4.1.4 sind in Tabelle 5.6 angegeben. Die WFR für den Ablauf des Filters aus KW4 wurde für alle KW-Ablaufproben verwendet. Für jeden

Analyten war eine deutliche Abnahme der WFR in den ungeklärten Zulaufproben zu beobachten, was vermutlich verstärkt durch Matrixeffekte zustande kam. In der vorherigen Einzelmessung eines Ablaufeluates konnte kein AF detektiert werden. Es wurde daher in Höhe der BG zudotiert. Für die postulierten Hydroxy-AF-Metaboliten konnten mit den berechneten SRM-Übergängen ebenfalls keine Signale gemessen werden.

Zur Abwasseranalyse von AF und seinen Hydroxymetaboliten ist die entwickelte Methode insgesamt nicht geeignet (zu hohe BG, zu hohe Variationskoeffizienten und zu geringe WFR vor allem in Zulaufproben); dies wurde aufgrund der geringen Verwendung von AF aber als nicht relevant erachtet.

Tabelle 5.6: Wiederfindungsraten \pm Variationskoeffizient [%] von DF und seinen Metaboliten in den verschiedenen Matrices (n = 5)

Analyt	Wiederfindungsrate \pm Variationkoeffizient [%] bezogen auf die Matrix			
	Zulauf	Ablauf Zwischenklärung	Ablauf Nachklärung	Ablauf Filter
4'-OHD	50,9 \pm 2,8	54,9 \pm 4,5	63,1 \pm 2,3	66,2 \pm 1,5
4'-OHDD	39,0 \pm 1,1	44,7 \pm 2,5	66,0 \pm 4,2	62,3 \pm 4,7
DF	44,0 \pm 6,9	44,2 \pm 3,1	80,4 \pm 1,6	80,8 \pm 2,1
AF	20,8 \pm 22,9	22,1 \pm 13,9	72,3 \pm 7,6	65,0 \pm 8,3

5.5 Nachweis von Diclofenac und seinen Metaboliten in Abwasserproben

Mit der erstellten Methode konnte das Vorkommen von DF und seiner Metaboliten sowohl in acht über Deutschland verteilten Klärwerken als auch innerhalb einzelner Stufen eines Klärwerks untersucht werden.

5.5.1 Langzeitbeobachtung verschiedener Klärwerke

Die Anwendung der hier entwickelten Methode (vgl. Abbildung 5.52) ermöglichte die Analyse der Konzentrationen von DF und seinen Metaboliten in den Abläufen von acht über ganz Deutschland verteilten Klärwerken. Die BG von AF ist zu hoch, um quantitative Aussagen über dessen Vorkommen in den jeweiligen Proben zu treffen; es wurde jedoch im Gegensatz zu seinem Hydroxy-Metaboliten in einigen Proben detektiert.

Die Darstellung großer Stichprobenmengen erfolgt in der Statistik oft in sogenannten „Boxplots“. In der Box befinden sich dabei 50 % der Daten, der sie teilende Strich stellt den Median (Med.) dar. Oben und unten an der Box befinden sich die sogenannten Whisker. Ihre Länge beträgt maximal das 1,5-fache der Boxgröße, wird jedoch vom Extremwert der Messwerte innerhalb dieser Spanne begrenzt. Alle Daten außerhalb der Whisker sind Ausreißer und werden separat eingetragen.

Angegeben werden die unteren und oberen Quartile (Streuung der Messwerte; entsprechend dem 0,25- bzw. 0,75-Quantil) durch das Rechteck, der Med. (0,5-Quantil) durch die darin befindliche horizontale Linie sowie die Minima (Min.) und Maxima (Max.) durch die Begrenzungsmarker der Whisker, Ausreißer ($> 1,5$ facher Interquartilsabstand) durch Kreise und oft auch die Anzahl der Proben über der BG.

Die Konzentrationen von DF und seinen Metaboliten in den Abläufen aller vermessenen Klärwerke sind in den Boxplots der Abbildung 5.54 wiedergegeben. Die Detektion der Analyten war in allen KW oberhalb der NG möglich, außer für AF (und seine Hydroxy-Metaboliten) bzw. für 5-OHD im Falle des KW4. Ein weites Vorkommen der DF-Metaboliten in Abläufen von Klärwerken und somit ihr Eindringen in die aquatische Umwelt wurde somit **zum ersten Mal bestätigt**.

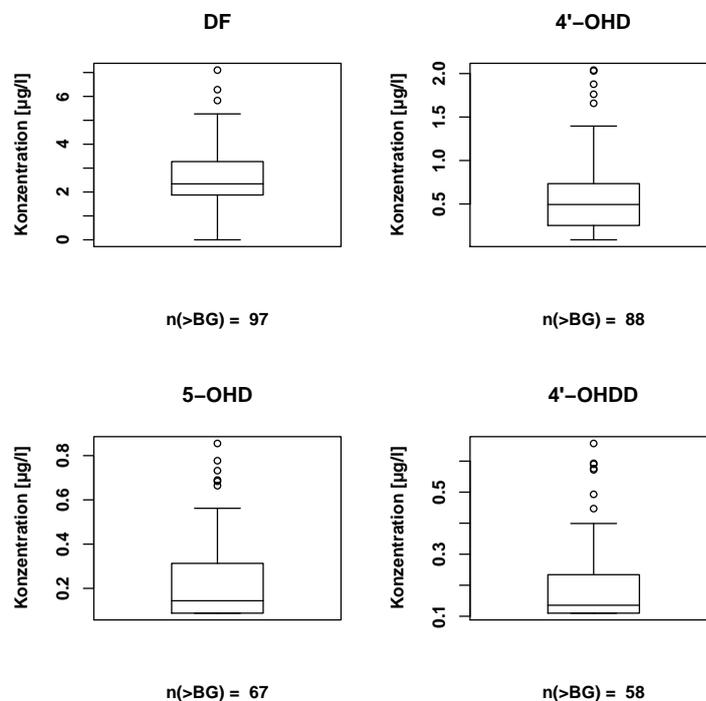


Abbildung 5.54: Boxplots der Ergebnisse der „Abwasseranalyse“ von Abläufen acht verschiedener deutscher Klärwerke, $n = 98$

Die Med. (Max.) der einzelnen Analyten-Konzentrationen betragen jeweils $2,3 \mu\text{g/l}$ ($7,1 \mu\text{g/l}$), $0,49 \mu\text{g/l}$ ($2,0 \mu\text{g/l}$), $0,14 \mu\text{g/l}$ ($0,86 \mu\text{g/l}$) und $0,14 \mu\text{g/l}$ ($0,66 \mu\text{g/l}$) für DF, 4-OHD, 5-OHD und 4'-OHDD, wobei die Max. als Ausreißer anzusehen sind. Die Min. liegen für alle Analyten unterhalb der BG, bei DF nur für eine einzelne Messung.

Die nächsthöhere gemessene Konzentration von DF liegt schon bei $0,75 \mu\text{g/l}$. Die hier gemessenen DF-Konzentrationen stimmen gut mit den vorher für Deutschland veröffentlichten überein (Andreozzi u. a., 2003; POSEIDON, 2006; Radjenovic u. a., 2007). Im Gegensatz zu den Metaboliten einiger anderer Wirkstoffe (Stumpf u. a., 1998; Miao und Metcalfe, 2003; Wiegel u. a., 2004; Rad-

jenovic u. a., 2007) sind die Konzentrationen hier nicht höher als die von DF. Sie liegen jedoch zumindest für 4-OHD in ähnlichen Konzentrationsbereichen (vgl. Abschnitt 2.4 auf Seite 12).

In Abbildung 5.55 ist beispielhaft der Verlauf der Analyten-Konzentrationen in KW 3 von Mitte April bis Anfang Juni 2007 dargestellt. In diesem Klärwerk traten Med. (Max.) der einzelnen Konzentrationen von jeweils $3,4 \mu\text{g/l}$ ($5,1 \mu\text{g/l}$), $0,30 \mu\text{g/l}$ ($0,66 \mu\text{g/l}$), $0,42 \mu\text{g/l}$ ($0,86 \mu\text{g/l}$) und $0,30 \mu\text{g/l}$ ($0,66 \mu\text{g/l}$) für DF, 4-OHD, 5-OHD und 4'-OHDD auf (vgl. Boxplot in Anhang C.3).

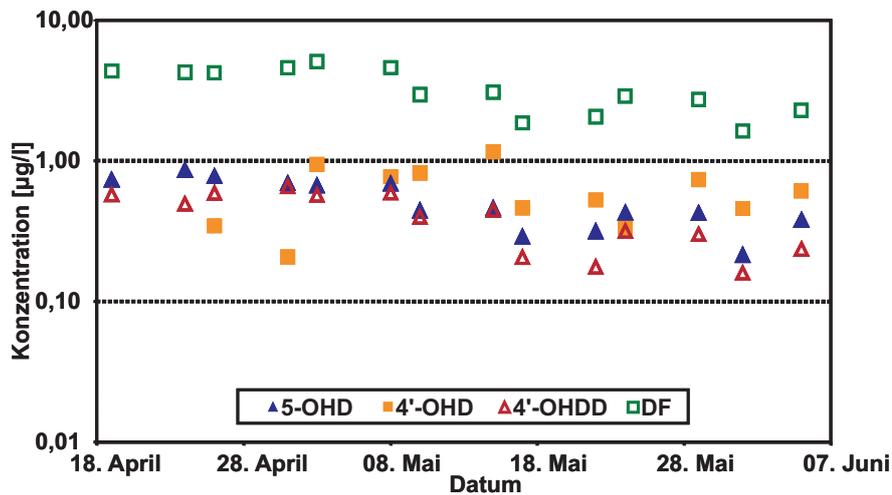


Abbildung 5.55: Konzentrationsverlauf von DF und seinen Metaboliten in Klärwerksabläufen (KW3, April bis Juni 2007)

Die Zeit bis Anfang Mai entsprach einer Trockenwetterperiode. Mit dem daran anschließenden Regenwetter ist eine Abnahme der Konzentrationen von DF, 5-OHD und 4'-OHDD zu beobachten, die vermutlich aus Verdünnungseffekten resultiert. Für 4'-OHD sind diese Effekte nicht so deutlich ausgeprägt. Ob Regenwetter eher zu Verdünnungseffekten oder aber auch zu erhöhten Analytenkonzentrationen führt, kann für jeden Analyten individuell verschieden sein (Tixier u. a., 2003). Auch in den anderen Klärwerken sind derartige Verdünnungseffekte in Regenperioden beobachtbar.

Innerhalb der verschiedenen Klärwerke kam DF in Med.-Konzentrationen von $1,3 \mu\text{g/l}$ (KW8) bis $5,0 \mu\text{g/l}$ (KW1) vor (siehe Abbildung 5.56). Die nächsthöhere Med.-Konzentration stammte aus KW3 mit $3,4 \mu\text{g/l}$. Die meisten Med. lagen im Bereich von $2,0 \mu\text{g/l}$ bis $2,5 \mu\text{g/l}$. Ein Max. von $7,1 \mu\text{g/l}$ wurde in KW1 gemessen, gehörte jedoch zu den Ausreißern; die meisten Werte lagen unter $4,0 \mu\text{g/l}$. Die hohen Konzentrationen für KW1 und KW3 könnten aus den Abwässern einiger Krankenhäuser resultieren, die in der Nähe der Klärwerke liegen.

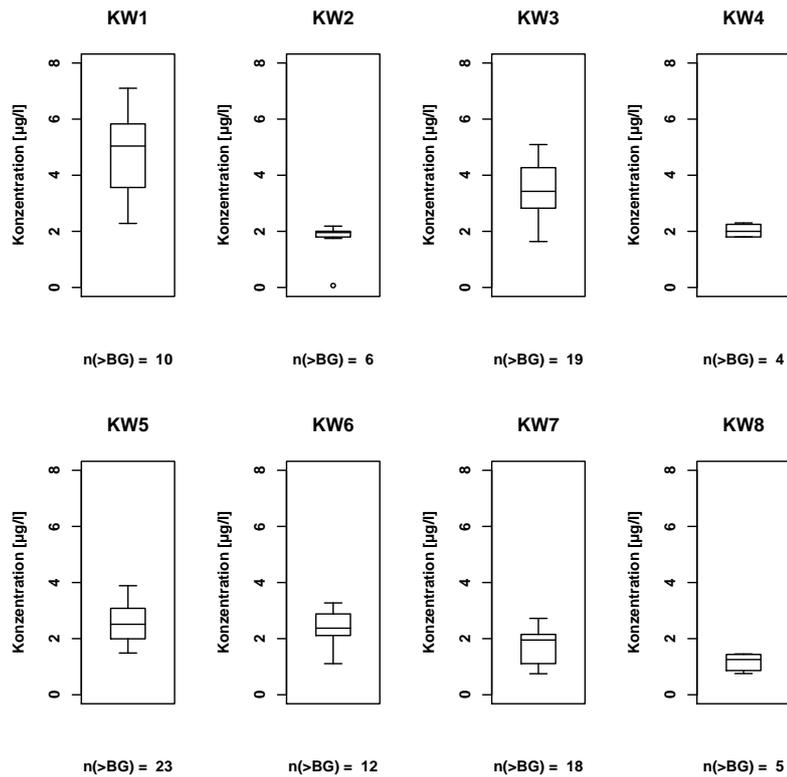


Abbildung 5.56: Boxplots der DF-Konzentrationen in den verschiedenen Klärwerken, n: 10 (KW1), 7 (KW2), 19 (KW3), 4 (KW4), 23 (KW5), 12 (KW6), 18 (KW7) bzw. 5 (KW8)

Die größte Max.-Konzentration des Metaboliten 4'-OHD befand sich in KW1 ($2,0 \mu\text{g/l}$; siehe Abbildung 5.57). Die Med.-Konzentrationen lagen bei Werten von $0,17 \mu\text{g/l}$ in KW4 bis zu $1,3 \mu\text{g/l}$ in KW1. 5-OHD kam in der höchsten Max.-Konzentration von $0,86 \mu\text{g/l}$ in KW3 vor (Abbildung 5.58). Seine Med.-Konzentrationen betrug weniger als die BG (in KW4, wo es nicht detektiert wurde, sowie in KW2 und KW8) bis $0,42 \mu\text{g/l}$ (KW3). Dass 5-OHD nicht in KW4 detektiert wurde, könnte an dem hohen Einwohnergleichwert (EWG) in Kombination mit einem relativ hohen Schlammalter (SA) in KW4 liegen (vgl. Tabelle 4.2 auf Seite 41). Dadurch könnte es zu einer hohen Adaption der in diesem KW vorkommenden Mikroorganismen an 5-OHD gekommen sein. **Der neuentdeckte Metabolit 4'-OHDD** kam ebenfalls in KW3 in der höchsten Maximalkonzentration vor ($0,66 \mu\text{g/l}$). Seine Mediankonzentrationen lagen im Bereich von unterhalb der BG in KW7 bis $0,30 \mu\text{g/l}$ in KW3. Die Medianwerte aller Metaboliten zeigten wesentlich deutlichere Schwankungen als die von DF selbst. Aber auch die Verhältnisse der Konzentrationen innerhalb eines Klärwerks waren nicht einheitlich.

So war die DF-Konzentration in KW4 zum Beispiel um einiges höher als die der Metaboliten. Dies könnte durch eine verstärkte topische Anwendung (über die Haut) von DF in dieser Region (das Einzugsgebiet ist eher städtisch) hervorgerufen worden sein. Wie Schrey und Wilhelm (1999) berichteten, wurden dabei nur 6 % einer Dosis aufgenommen, der Rest unverändert von der Haut

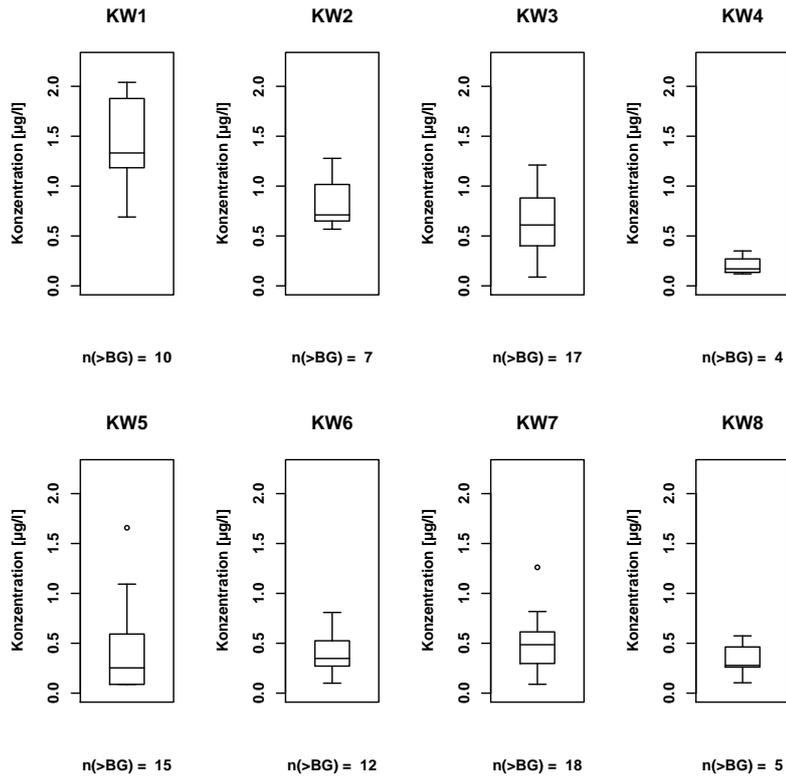


Abbildung 5.57: Boxplots der 4'-OHD-Konzentrationen in den verschiedenen Klärwerken, n: 10 (KW1), 7 (KW2), 19 (KW3), 4 (KW4), 23 (KW5), 12 (KW6), 18 (KW7) bzw. 5 (KW8)

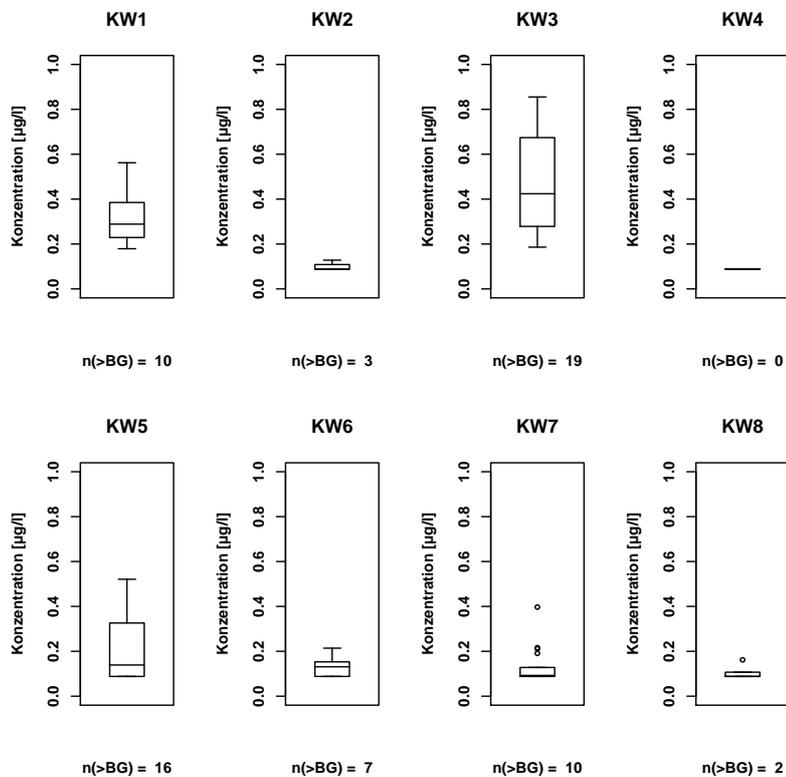


Abbildung 5.58: Boxplots der 5-OHD-Konzentrationen in den verschiedenen Klärwerken, n: 10 (KW1), 7 (KW2), 19 (KW3), 4 (KW4), 23 (KW5), 12 (KW6), 18 (KW7) bzw. 5 (KW8)

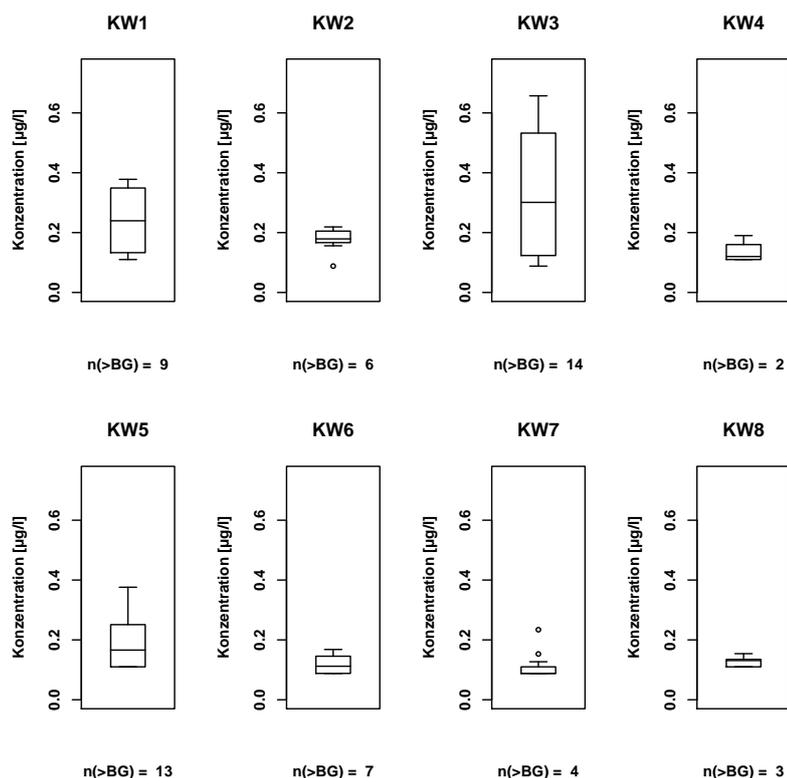


Abbildung 5.59: Boxplots der 4'-OHDD-Konzentrationen in den verschiedenen Klärwerken, n: 10 (KW1), 7 (KW2), 19 (KW3), 4 (KW4), 23 (KW5), 12 (KW6), 18 (KW7) bzw. 5 (KW8)

abgewaschen und erreichte so das Abwasser. Somit konnten die Metaboliten nur in geringerem Maße gebildet werden, als es bei oraler Gabe geschieht. In KW2 dagegen war ein geringerer Unterschied in den Konzentrationen von DF und seinem Hauptmetaboliten 4'-OHD festzustellen. In der Nähe dieses KWs liegt eine orthopädische Klinik. In diesen Einrichtungen ist eine orale Gabe von DF die Regel. Aber auch die Verhältnisse der Metaboliten untereinander sind uneinheitlich.

Betrachtet man den Anteil aller Metabolitenkonzentrationen an der DF-Konzentration¹³, trat dieser im Bereich von 16 % in KW4 bis 53 % in KW8 auf. In einigen Einzelproben sind die Metaboliten sogar in maximalen Konzentrationen von über 80 % der DF-Konzentration vorgekommen. Dabei hatte der Hauptmetabolit 4'-OHD – wie nicht anders zu erwarten – den größten Anteil. Er kam in Anteilen von 8,6 % in KW4 bis 44 % in KW2 an der DF-Konzentration vor. Die Anteile der beiden anderen Metaboliten an der DF-Konzentration waren insgesamt vergleichbar. Für 5-OHD lagen sie im Bereich von 5,6 % (KW2) bis 15 % (KW3), für 4'-OHDD bei 4,9 % (KW6) bis 12 % (KW8).

Diese Schwankungen können außerdem durch unterschiedlich adaptierte Mikroorganismen hervorgerufen worden sein, die den einen oder anderen Stoff bevorzugt umsetzen oder auch aus den entsprechenden Phase-II-Metaboliten wieder freisetzen (Halling-Sørensen u. a., 1998; Stumpf u. a., 1998; Hao u. a., 2007). Genauer wird in Abschnitt 5.5.2 untersucht. Es könnte sein, dass der rela-

¹³Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Berechnung der Anteile in diesem Abschnitt als Mediane der prozentualen Anteile der Einzelproben > BG für jedes KW.

tiv geringe Metaboliten-Anteil in KW4 bis KW6 sich durch hohe EWG (für KW4) bzw. einen anderen Behandlungstypen (zweistufige Belebung in KW5 und einstufige Stabilisierung in KW6) erklären lässt. Ebenso wäre ein Zusammenhang zwischen den hohen Metabolitenanteilen in KW2 und KW8 mit dem SA denkbar. Ein eindeutiger Einfluss von SA, EWG oder auch dem Behandlungstypen des Klärwerks ist aus diesen Ergebnissen jedoch nicht ableitbar. Wahrscheinlich haben diese Faktoren vor allem in der Kombination einen Einfluss auf den Abbau der verschiedenen DF-Metaboliten (sei es aus Phase-I oder Phase-II des humanen Stoffwechsels).

Anhand der Konzentrationsanteile der Metaboliten lassen sich Vermutungen über deren Vorkommen im Oberflächenwasser anstellen. In verschiedenen deutschen Flüssen wurden DF-Konzentrationen im Bereich von $0,15 \mu\text{g/l}$ gemessen (POSEIDON, 2006). Mit den hier ermittelten Anteilen entspräche das Metabolitenkonzentrationen von $0,013 \mu\text{g/l}$ bis $0,066 \mu\text{g/l}$ für 4'-OHD, $0,0084 \mu\text{g/l}$ bis $0,023 \mu\text{g/l}$ für 5-OHD und $0,0074 \mu\text{g/l}$ bis $0,018 \mu\text{g/l}$ für 4'-OHDD. Im schlimmsten Fall (entsprechend einer DF-Konzentration von $15 \mu\text{g/l}$, wie von Jux u. a. (2002) beschrieben) wären Konzentrationen von $1,3 \mu\text{g/l}$ bis $6,6 \mu\text{g/l}$ für 4'-OHD, $0,84 \mu\text{g/l}$ bis $2,3 \mu\text{g/l}$ für 5-OHD und $0,74 \mu\text{g/l}$ bis $1,8 \mu\text{g/l}$ für 4'-OHDD denkbar. Auch diese Werte liegen teilweise im selben Bereich wie die der Metaboliten anderer Wirkstoffe. Jedoch ist hier ein unterschiedliches Verhalten der einzelnen Stoffe im Oberflächenwasser und folglich ein Abweichen der Konzentrationen möglich.

Der kontinuierliche Eintrag von DF und seinen strukturverwandten Metaboliten ist vor allem im Hinblick auf die toxikologischen Eigenschaften von DF sowie seiner Humanmetaboliten sehr bedenklich (Helfgott u. a., 1990; Bort u. a., 1998; O'Connor u. a., 2003; Green u. a., 2004; Oaks u. a., 2004; Helin-Salmivaara u. a., 2006; McGettigan und Henry, 2006; Hong u. a., 2007; Taggart u. a., 2007; Triebkorn u. a., 2007, vgl. Abschnitt 2.5.3 auf Seite 20). Nicht nur die Effekte, die DF auf Menschen und Geier hat, sondern vor allem solche auf aquatische Organismen (Cleuvers, 2002; Ferrari u. a., 2003, 2004; Hong u. a., 2007; Triebkorn u. a., 2007) – besonders falls die von Cleuvers (2003) beobachteten zusätzlichen kombinatorischen Effekte mit anderen Wirkstoffen auftreten – lassen eine Aufnahme der DF-Metaboliten in die bereits eingerichteten Überwachungsprogramme sowie toxikologische Studien als dringend notwendig erscheinen.

Durch die Umweltrelevanz der Metaboliten wird die Optimierung ihrer Aufreinigung interessant. Für zukünftige Standards sollte dies zu einer besseren Ausbeute führen. Alternativ ist eine Synthese von 4'-OHD oder 5-OHD denkbar. Komplizierte Synthesen wurden bereits veröffentlicht (Kenny u. a., 2004). Sie haben jedoch eher niedrige Totalausbeuten ($< 20\%$ für 4'-OHD bzw. 45% für 5-OHD). Interessanter wäre zum Beispiel eine enzymatische Umwandlung (mit einer Monooxygenase) aus DF. Der Metabolit 4'-OHDD könnte, wie bereits beschrieben, aus 4'-OHD durch Dehydrierung (z. B. durch saure oder basische Behandlung analog Schneider und Degen, 1981; Stierlin und Faigle, 1979; Reddersen und Heberer, 2003a) erhalten werden.

5.5.2 Verhalten der Analyten innerhalb des Klärwerks

Die Untersuchung von Wasserproben aus verschiedenen Bereichen des in Abbildung 4.1 auf Seite 42 schematisch dargestellten Klärwerks KW4 soll dazu dienen, das Verhalten der Arzneimittelmetaboliten sowie von DF zu beobachten. Die erhaltenen Ergebnisse werden in Abbildung 5.60 dargestellt.

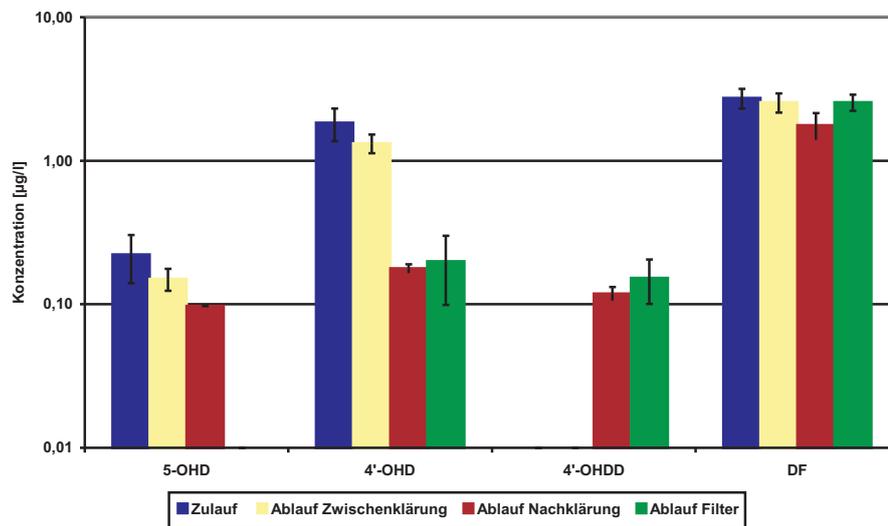


Abbildung 5.60: Konzentrationen von DF und seinen Metaboliten innerhalb eines zweistufigen Belebtschlamm-Klärwerks mit Biofilter (KW4, n=4) im April 2005 (Schema des Klärwerks siehe Abbildung 4.1 auf Seite 42)

Dabei sinken die Konzentrationen der Analyten außer 4'-OHDD im Verlauf von Zulauf zum Ablauf der Zwischenklärung (nach der Hochlastbelebungsstufe) und Nachklärung (nach der Schwachlastbelebung mit Denitrifikation/Nitrifikation). Vor allem für 4-OHD wird eine starke Abnahme der Konzentration während der zweiten Belebungsstufe deutlich. Dagegen steigt die Konzentration von 4'-OHDD erst an dieser Stelle auf einen messbaren Wert an. Bis auf die Konzentration von 5-OHD, welches im Ablauf des Filters nicht mehr detektiert werden konnte, steigen die Konzentrationen aller Analyten im Ablauf des Filters wieder an. Dies liegt vermutlich daran, dass es ein biologischer Filter ist¹⁴. Mikroorganismen können Phase-II-Metaboliten wieder in die Phase-I-Metaboliten und Glucuronsäure spalten (Halling-Sørensen u. a., 1998; Stumpf u. a., 1998; Hao u. a., 2007). Für DF führt das zu Konzentrationen im Ablauf des Klärwerks, die fast so hoch sind wie die im Zulauf. Die messbare Konzentrationsabnahme (zwischen Zulauf und Ablauf des Filters) liegt hier bei nur 6,5%. Für 5-OHD und 4'-OHD betragen die Werte der Abbauraten > 91% und 89%. Allerdings wurden auch in Abläufen der in Abschnitt 5.5 untersuchten Klärwerke höhere Konzentrationen von 5-OHD gefunden.

¹⁴Sandfilter werden bei nicht zu starkem Durchfluss von einem Biofilm überzogen

Kapitel 6

Zusammenfassung

Der ständige Eintrag von Arzneimitteln über die Abwasserwege in die aquatische Umwelt führte in der Vergangenheit bereits zur Detektion einiger persistenter Wirkstoffe in Oberflächen-, Grund- oder sogar behandeltem Trinkwasser. Doch viele Humanmetaboliten werden in höheren Konzentrationen ausgeschieden als ihre entsprechenden Wirkstoffe. Nur in wenigen Fällen wurde bisher untersucht, ob auch diese Metaboliten die Abwasserbehandlung unverändert überstehen. Dazu wurde vor allem auf die wenigen im Handel erhältlichen oder durch Pharmafirmen beziehbaren Stoffwechselprodukte zurückgegriffen.

In dieser Arbeit wurde zunächst eine Methode entwickelt, um auch ohne schwer verfügbare Standards aus Patientenurin Informationen über potentiell umweltrelevante Metaboliten zu erhalten. Als Modellwirkstoff für die Methode diente Carbamazepin (CBZ). Der durch Festphasenextraktion (SPE) aufgereinigte und aufkonzentrierte Patientenurin wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS) untersucht. Dabei erfolgte die Einordnung potentieller Metaboliten von CBZ über ihren gegenüber CBZ charakteristischen Massenunterschied bzw. ihre relevante Konzentration im Urin. Auf diese Weise wurden für CBZ 13 Signale (inklusive des Wirkstoffs) entdeckt, für die daraufhin jeweils zwei Massenübergänge in eine Analysenmethode aufgenommen wurden.

Die Untersuchung von SPE-behandelten Zu- und Ablaufproben eines Klärwerks (KW) mittels dieser Methode führte daraufhin zur Detektion von sechs potentiellen Metaboliten sowie CBZ in Zu- und Ablauf. Eine weitere Verbindung war ausschließlich im Zulauf detektierbar.

Bei den nicht in diesem KW abgebauten Verbindungen handelt es sich wahrscheinlich um die schon vorher als umweltrelevant bekanntgewordenen hydroxylierten Metaboliten von CBZ sowie deren Glucuronide. Eine Isolierung dieser Verbindungen wurde daraufhin nicht mehr durchgeführt.

Die Untersuchung des Urins von PCM einnehmenden Patienten nach derselben Methode führte zwar zu drei möglichen Metaboliten, die auch im Zulauf des KW detektiert werden konnten. Jedoch lässt die Abwesenheit im Ablauf des KW auf eine vollständige Abbaubarkeit dieser Stoffwechselprodukte schließen.

Die Urinprobeneluatate zum Wirkstoff Diclofenac (DF) ermöglichten die Zuordnung von 6 Signalen zu DF und seinen Metaboliten, von denen sich anscheinend alle außer DF und seine hydroxylierten Metaboliten innerhalb des KWs abbauen lassen. Die Ergebnisse aller Wirkstoffe zeigen, dass die Untersuchung des Patientenurins eine gut funktionierende Methode zur Ermittlung umweltrelevanter Metaboliten ist. Der Einsatz der präparativen HPLC sowie der semi-präparativen HPLC führte zur Isolierung der umweltrelevanten Metaboliten 4'-Hydroxy-DF (4'-OHD) und seines dehydratisierten Lactams (4'-OHDD). Die strukturelle Identifikation der Metaboliten sowie eines weiteren OHD-Isomers (5-OHD) war mittels HPLC-NMR-MS möglich. Eine genauere Charakterisierung des als neuen Metaboliten nachgewiesenen 4'-OHDD erfolgte mittels HPLC gekoppelt an hochaufgelöste MS.

Durch die quantitativen NMR-Messungen mit den isolierten Metaboliten waren 4-OHD und 4'-OHDD als Standards für die folgende Quantifizierung der Konzentrationen von DF und seinen Metaboliten in verschiedenen deutschen KW-Abläufen verwendbar. Letztere fand nach Optimierung der Aufreinigung sowie der HPLC-MSMS-Methode statt.

DF und seine Metaboliten zeigten sich dabei als ständige Kontaminanten, nur für 5-OHD lag für ein KW der Median der Konzentration unterhalb der Bestimmungsgrenze (BG). Die Mediankonzentration von DF entsprach früher veröffentlichten Werten, die Summe der Konzentrationen der Metaboliten lag etwa bei der Hälfte der DF-Konzentration. Das wegen seiner Verwandtschaft zu DF ebenfalls in die Abwasseranalyse aufgenommene Aceclofenac war nicht oberhalb seiner BG detektierbar.

Außerdem erfolgte die Untersuchung der Proben aus verschiedenen Abschnitten innerhalb eines KW mit zweistufigem Belebungsverfahren. Eine Abnahme der Konzentrationen innerhalb der Klärstufen konnte beobachtet werden. Nach dem letzten Schritt, der biologischen Filtration, stiegen die Konzentrationen jedoch wieder an. 4'-OHDD konnte erst nach der zweiten Klärstufe in Konzentrationen oberhalb der BG detektiert werden. Dagegen war 5-OHD nach der Filtration (im Gegensatz zu den Ergebnissen der anderen KW) nicht mehr nachweisbar. Die Effekte in der Filtration lassen auf eine Freisetzung einiger Metaboliten aus ihren Glucuroniden durch die Mikroorganismen schließen.

Die in dieser Arbeit angewandte Methode der Vorprüfung auf Umweltrelevanz, gefolgt von der Isolierung und Charakterisierung von Metaboliten pharmazeutischer Wirkstoffe, zeigte vor allem am Beispiel von DF Erfolg. Gerade bei Wirkstoffen, für die schon eine Persistenz bekannt ist, scheinen auch die entsprechenden Metaboliten ein ähnliches Verhalten zu zeigen. Wenn für den persistenten Wirkstoff eine schädigende Wirkung auf aquatische Organismen bekannt ist, sollte diese neue Methode unbedingt angewandt werden, um die strukturähnlichen ebenfalls persistenten Metaboliten erkennen zu können. Eine Untersuchung des Einflusses dieser Kontaminanten auf die aquatische Umwelt ist für diese unabdingbar.

Literaturverzeichnis

- [Almirall GmbH 2007] ALMIRALL GMBH: Beofenac® 100 mg Filmtabletten / Almirall GmbH. Oskar-Messter-Straße 29, 85737 Ismaning, März 2007 (41231.00.00). – Patienteninformation 21
- [Andreozzi u. a. 2003] ANDREOZZI, Roberto; RAFFAELE, Marotta; NICKLAS, Paxéus: Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. In: *Chemosphere* 50 (2003), March, Nr. 10, S. 1319–1330 105
- [Arbeitsausschuss Chemische Terminologie (AchT) 1994] ARBEITSAUSSCHUSS CHEMISCHE TERMINOLOGIE (ACHT): *DIN 32645 - Chemische Analytik; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren, Auswertung*. Berlin: DIN Deutsches Institut für Normung e. V. (Veranst.), Mai 1994 97
- [BAH 2005] BAH: Der Arzneimittelmarkt in Deutschland in Zahlen 2004 - Verordnungsmarkt und Selbstmedikation / Bundesverband der Arzneimittel-Hersteller e.V., BAH. URL <http://www.bah-bonn.de/forum/zahlen/markt2004.pdf>, 2005 (18. Auflage 2005). – Forschungsbericht 3
- [BAH 2006] BAH: Der Arzneimittelmarkt in Deutschland in Zahlen 2005 - Verordnungsmarkt und Selbstmedikation / Bundesverband der Arzneimittel-Hersteller e.V., BAH. URL <http://www.bah-bonn.de/forum/zahlen/markt2005.pdf>, 2006 (19. Auflage 2006). – Forschungsbericht 3
- [Bartels und von Tümpling 2007] BARTELS, Peter; TÜMPLING, Wolf, Jr. von: Solar radiation influence on the decomposition process of diclofenac in surface waters. In: *Sci Total Environ* 374 (2007), March, Nr. 1, S. 143–155. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.11.039> 20, 70, 90
- [Bernus u. a. 1995] BERNUS, I.; HOOPER, W.D.; DICKINSON, R. G.; EADIE, M. J.: Metabolism of carbamazepine and co-administered anticonvulsants during pregnancy. In: *Epilepsy research* 21 (1995), S. 65–75. – URL [http://dx.doi.org/10.1016/0920-1211\(95\)00012-Y](http://dx.doi.org/10.1016/0920-1211(95)00012-Y) 18
- [Beyer 1990] BEYER, Karl-Heinz: *Biotransformation der Arzneimittel*. 2nd. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong : Springer-Verlag, 1990 11, 12, 18, 19

- [Blech 2005] BLECH, Jörg: *Heillose Medizin*. S. Fischer Verlag Frankfurt, 2005 3
- [Bort u. a. 1996] BORT, R.; PONSODA, X.; CARRASCO, E.; J., Gómez-Lechón M.; CASTELL, J. V.: Metabolism of aceclofenac in humans. In: *Drug Metabolism and Disposition* 24 (1996), Nr. 8, S. 834–841 21
- [Bort u. a. 1998] BORT, Roque; PONSODA, Xavier; JOVER, Ramiro; GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; CASTELL, José V.: Diclofenac toxicity to hepatocytes: A role for drug metabolism in cell toxicity. In: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 288 (1998), Nr. 1, S. 65–72 110
- [Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) 2008] BUNDESINSTITUT FÜR ARZNEIMITTEL UND MEDIZINPRODUKTE (BFARM): *Mustertexte für Fach- und Gebrauchsinformationen*. Januar 2008. – URL https://sunset-clause.dimdi.de/Mustertexte/mustertexte?STATION=smt_menu 34
- [Buser u. a. 1998] BUSER, Hans-Rudolf; MÜLLER, Markus D.; NORBERT, Theobald: Occurrence of the pharmaceutical drug clofibric acid and the herbicide mecoprop in various Swiss lakes and in the North Sea. In: *Environ Sci Technol* 32 (1998), Nr. 1, S. 188–192. – URL <http://pubs.acs.org/cgi-bin/article.cgi/esthag/1998/32/i01/pdf/es9705811.pdf> 14
- [Buser u. a. 1999] BUSER, Hans-Rudolf; POIGER, Thomas; MÜLLER, Markus D.: Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. In: *Environmental Science and Technology* 33 (1999), August, Nr. 15, S. 2529–2535. – URL <http://pubs.acs.org/cgi-bin/article.cgi/esthag/1999/33/i15/pdf/es981014w.pdf> 8
- [Cahill u. a. 2004] CAHILL, Jeffery D.; FURLONG, Edward T.; BURKHARDT, Mark R.; KOLPIN, Dana; ANDERSON, Larry G.: Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. In: *Journal of Chromatography, A* 1041 (2004), Nr. 1-2, S. 171–180. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.04.005> 23
- [Carson 1962] CARSON, Rachel L.: *Der stumme Frühling*. München : Biederstein Verlag, 1962 4
- [Cleavers 2002] CLEEVERS, Michael: Aquatische Ökotoxikologie ausgewählter Arzneimittel - Algentest und akuter Daphnientest. In: *Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie* 14 (2002), Nr. 2, S. 85–89. – URL <http://www.scientificjournals.com/sj/uwsf/Pdf/aId/4984> 110
- [Cleavers 2003] CLEEVERS, Michael: Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the as-

- assessment of combination effects. In: *Toxicol Lett* 142 (2003), Mai, Nr. 3, S. 185–194. – URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00068-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00068-7) 7, 14, 15, 19, 21, 110, IV
- [Cleuvers 2004] CLEUVERS, Michael: Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. In: *Ecotoxicol Environ Saf* 59 (2004), November, Nr. 3, S. 309–315. – URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00141-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00141-6) 7, 14, 21
- [Cleuvers 2005] CLEUVERS, Michael: Initial risk assessment for three β -blockers found in the aquatic environment. In: *Chemosphere* 59 (2005), April, Nr. 2, S. 199–205. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.090> V
- [Corcoran und Spraul 2003] CORCORAN, Olivia; SPRAUL, Manfred: LC–NMR–MS in drug discovery. In: *Drug Discovery Today* 8 (2003), July, Nr. 14, S. 624–631. – URL [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02749-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02749-1) 31
- [Daughton und Ternes 1999] DAUGHTON, Christian G.; TERNES, Thomas A.: Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? In: *Environmental Health Perspectives* 107 (1999), S. 907–944 6
- [Debska u. a. 2005] DEBSKA, Jolanta; KOT-WASIK, Agata; NAMIESNIK, Jacek: Determination of nonsteroidal antiinflammatory drugs in water samples using liquid chromatography coupled with diode-array detector and mass spectrometry. In: *J Sep Sci* 28 (2005), S. 2419–2426. – URL <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200400055> 102
- [Directorate General Health and Consumer Protection 2004] DIRECTORATE GENERAL HEALTH AND CONSUMER PROTECTION: *Guidance document on residue analytical methods*. Brüssel: EUROPEAN COMMISSION (Veranst.), 2004. – URL http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/guide_doc_825-00_rev7_en.pdf 96
- [Documed AG 2008] DOCUMED AG: *Arzneimittelkompendium der Schweiz*. online unter <http://www.kompendium.ch/Search.aspx>. Januar 2008. – URL https://sunset-clause.dimdi.de/Mustertexte/mustertexte?STATION=smt_menu 33
- [Doll 2004] DOLL, Tusnelda E.: *Photochemischer und photokatalytischer Abbau von Carbamazepin, Clofibrinsäure, Iomeprol und Iopromid*, Universität Karlsruhe, Diplomarbeit, 2004 54
- [Europäische Kommission 1993] EUROPÄISCHE KOMMISSION: Richtlinie 93/67/EWG der Kommission vom 20. Juli 1993 zur Festlegung von Grundsätzen für die Bewertung der Risiken für Mensch und Umwelt von gemäß der Richtlinie 67/548/EWG des Rates notifizierten Stoffen / Europäische Gemeinschaft. 8. September 1993 (93/67/EWG). – Richtlinie 19

- [Europäische Kommission 2002] EUROPÄISCHE KOMMISSION: Berichtigung der Entscheidung 2002/657/EG der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen (ABl. L 221 vom 17.8.2002) / Europäische Gemeinschaft. 17. August 2002 (2002/657/EG). – Entscheidung der EG 96
- [Europäisches Parlament , Rat 2006] EUROPÄISCHES PARLAMENT , RAT: Berichtigung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Agentur für chemische Stoffe, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission (ABl. L 396 vom 30.12.2006) / Europäische Gemeinschaft. 30. Dezember 2006 (1907/2006). – Verordnung der EG 7
- [Fent u. a. 2006] FENT, Karl; WESTON, Anna A.; CAMINADA, Daniel: Ecotoxicology of human pharmaceuticals. In: *Aquat Toxicol* 76 (2006), S. 122–159. – See also erratum in *Aqua. Tox.* 78 (2006), 207 4, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 16, 18, 23, 33
- [Ferrari u. a. 2004] FERRARI, Benoît; MONS, Raphael; VOLLAT, Bernard; FRAYSSE, Benoît; PAXÉUS, Nicklas; GIUDICE, Roberto L.; POLLIO, Antonino; GARRIC, Jeanne: Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? In: *Environmental Toxicology and Chemistry* 23 (2004), Nr. 5, S. 1344–1354. – URL <http://dx.doi.org/10.1897/03-246> 19, 110, IV
- [Ferrari u. a. 2003] FERRARI, Benoît; PAXÉUS, Nicklas; LO, Giudice R.; POLLIO, Antonio; GARRIC, Jeanne: Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. In: *Ecotoxicol Environ Saf* 55 (2003), Nr. 3, S. 359–370. – URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00082-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00082-9) 15, 21, 110
- [Galmier u. a. 2005] GALMIER, Marie-Josèphe; BOUCHON, Bernadette; MADELMONT, Jean-Claude; MERCIER, Fabrice; PILOTAZ, Frédéric; LARTIGUE, Claire: Identification of degradation products of diclofenac by electrospray ion trap mass spectrometry. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 38 (2005), S. 790–796 70, 90
- [Gentili 2007] GENTILI, Alessandra: Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in

- environmental samples by chromatographic and electrophoretic techniques. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387 (2007), February, Nr. 4, S. 1185–1202 6, 16, 23, 25, IV
- [Glaeske und Janhsen 2003] GLAESKE, G.; JANHSEN, K.: GEK-Arzneimittelreport 2003. In: ERSATZKASSE, GEK-Gmünder (Hrsg.): *Schriftenreihe zur Gesundheitsanalyse* Bd. 25. St. Augustin : Asgard-Verlag, 2003 4, 5, 15
- [Glaeske und Janhsen 2006] GLAESKE, G.; JANHSEN, K.: GEK-Arzneimittelreport 2006. In: ERSATZKASSE, GEK-Gmünder (Hrsg.): *Schriftenreihe zur Gesundheitsanalyse* Bd. 44. St. Augustin : Asgard-Verlag, Hippe, 2006 4, 5
- [Green u. a. 2004] GREEN, Rhys E.; NEWTON, Ian; SHULTZ, Susanne; CUNNINGHAM, Andrew A.; GILBERT, Martin; PAIN, Deborah J.; PRAKASH, Vibhu: Diclofenac poisoning as a cause of vulture population declines across the Indian subcontinent. In: *Journal of Applied Ecology* 41 (2004), S. 793–800. – URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.0021-8901.2004.00954.x> 21, 110
- [Gross u. a. 2004] GROSS, Birgit; MONTGOMERY-BROWN, John; NAUMANN, Anneke; REINHARD, Martin: Occurrence and fate of pharmaceuticals and alkylphenol ethoxylate metabolites in an effluent-dominated river and wetland. In: *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (2004), September, Nr. 9, S. 2074–2083. – URL <http://dx.doi.org/10.1897/03-606> 16
- [Hallbach 2006] HALLBACH, Jürgen: *Lehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg*. 2. Auflage. Thieme Verlag, 2006 98
- [Halling-Sørensen u. a. 1998] HALLING-SØRENSEN, B.; NIELSEN, N.; LANSKY, P.F.; INGERSLEV, F.; HANSEN, L.; LÜTZHØFT, H.C.; JØRGENSEN, S.E.: Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review. In: *Chemosphere* 36 (1998), S. 357–393. – URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00354-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00354-8) 6, 109, 111
- [Hanisch u. a. 2004] HANISCH, Bernd; ABBAS, Bettina; KRATZ, Werner; SCHÜÜRMAN, Gerrit: Humanarzneimittel im aquatischen Ökosystem. In: *Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie* 16 (2004), S. 223–238 15, IV
- [Hao u. a. 2007] HAO, Chunyan; CLEMENT, Ray; YANG, Paul: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry of bioactive pharmaceutical compounds in the aquatic environment – a decade's activities. In: *Anal Bioanal Chem* 387 (2007), February, Nr. 4, S. 1247–1257 6, 12, 22, 23, 24, 25, 98, 109, 111
- [Heberer u. a. 1997] HEBERER, Th.; DÜNNBIER, U.; REILICH, Ch.; STAN, H.-J.: Detection of drugs and drug metabolites in ground water samples of a drinking water treatment plant. In: *Fresenius Environ. Bull.* 6 (1997), S. 438–443 10, 15

- [Heberer u. a. 1998] HEBERER, Th.; SCHMIDT-BÄUMLER, K.; STAN, H.-J.: Occurrence and Distribution of Organic Contaminants in the Aquatic System in Berlin. Part 1: Drug residues and other Polar Contaminants in Berlin Surface and Groundwater. In: *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 26 (1998), S. 272–278 6
- [Heberer 2002a] HEBERER, Thomas: Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. In: *Toxicology Letters* 131 (2002), S. 5–17 6
- [Heberer 2002b] HEBERER, Thomas: Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. In: *Journal of Hydrology* 266 (2002), S. 175–189 7, 10, 15
- [Helfgott u. a. 1990] HELFGOTT, Simon M.; SANDBERG-COOK, Joanne; ZAKIM, David; NESTLER, Jeffrey: Diclofenac-associated hepatotoxicity. In: *Journal of the American Medical Association* 264 (1990), Nr. 20, S. 2660–2662 110
- [Helin-Salmivaara u. a. 2006] HELIN-SALMIVAARA, Arja; VIRTANEN, Arja; VESALAINEN, Risto; GRÖNROOS, Juha M.; KLAUKKA, Timo; IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ, Juhana E.; HUUPPONEN, Risto: NSAID use and the risk of hospitalization for first myocardial infarction in the general population: a nationwide case-control study from Finland. In: *European Heart Journal* 27 (2006), Nr. 14, S. 1657–1663. – URL <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/eh1053> 20, 110
- [Hignite und Azarnoff 1977] HIGNITE, Charles; AZARNOFF, Daniel L.: Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. In: *Life Sciences* 20 (1977), 15 January, Nr. 2, S. 337–341. – URL [http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205\(77\)90329-0](http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205(77)90329-0) 14
- [Hong u. a. 2007] HONG, H. N.; KIM, H. N.; PARK, K. S.; LEE, S.-K.; GU, M. B.: Analysis of the effects diclofenac has on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using real-time PCR. In: *Chemosphere* 67 (2007), S. 2115–2121 21, 110
- [Jux u. a. 2002] JUX, Ulrich; BAGINSKI, M.; ARNOLD, Hans-Günter; KRÖNKE, Martin; SENG, Peter N.: Detection of pharmaceutical contaminants of river, pond, and tap water from Cologne (Germany) and surroundings. In: *Int. J. Hyg. Environ. Health* 205 (2002), S. 393–398 8, 110
- [Kenny u. a. 2004] KENNY, Jane R.; MAGGS, James L.; MENG, Xiaoli; SINNOTT, Deborah; CLARKE, Stephen E.; PARK, B. K.; STACHULSKI, Andrew V.: Syntheses and Characterization of the Acyl Glucuronide and Hydroxy Metabolites of Diclofenac. In: *Journal of Medicinal Chemistry* 47 (2004), S. 2816–2825. – URL <http://dx.doi.org/10.1021/jm030891w> 110

- [Kümmerer 2001] KÜMMERER, Klaus: Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. In: *Chemosphere* 45 (2001), Nr. 6-7, S. 957–969. – URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00144-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00144-8) 6
- [León-González und Pérez-Arribas 2000] LEÓN-GONZÁLEZ, M. E.; PÉREZ-ARRIBAS, L. V.: Chemically modified polymeric sorbents for sample preconcentration. In: *J. Chromatogr., A* 902 (2000), Nr. 1, S. 3–16. – URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00942-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00942-0) 22
- [Levsen u. a. 2005] LEVSEN, Karsten; SCHIEBEL, Hans-Martin; BEHNKE, Beate; DÖTZER, Reinhard; DREHER, Wolfgang; ELEND, Manfred; THIELE, Herbert: Structure elucidation of phase II metabolites by tandem mass spectrometry: an overview. In: *Journal of Chromatography, A* 1067 (2005), Nr. 1-2, S. 55–72. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.165> 11, 13
- [Öllers u. a. 2001] ÖLLERS, Sjöf; SINGER, Heinz P.; FÄSSLER, Philipp; MÜLLER, Stephan R.: Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water. In: *Journal of Chromatography, A* 911 (2001), S. 225–234 98
- [Makarov u. a. 2006] MAKAROV, Alexander; DENISOV, Eduard; LANGE, Oliver; HORNING, Stevan: Dynamic range of mass Accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer. In: *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 17 (2006), July, Nr. 7, S. 977–982. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jasms.2006.03.006> 26
- [Makarov u. a. 2005] MAKAROV, Alexander; DENISOV, Eduard; LANGE, Oliver; KHOLOMEEV, Alexander; HORNING, Stevan: Dynamic Range of Accurate Mass in FTMS. In: *Critical Mass - Life Sciences Mass Spectrometry eNewsletter* 15 (2005), Sep. – URL <http://dialog.thermo.com/ct?g=1.1vx3t.dq1v.rs.0.1js31.ayrb&i=380057&h=1> 28
- [McGettigan und Henry 2006] MCGETTIGAN, Patricia; HENRY, David: Cardiovascular risk and inhibition of cyclooxygenase: A systematic review of the observational studies of selective and nonselective inhibitors of cyclooxygenase 2. In: *Journal of the American Medical Association* 296 (2006), S. 1633–1644. – URL <http://dx.doi.org/10.1001/jama.296.13.jrv60011> 20, 110
- [Metcalf u. a. 2003] METCALFE, Chris D.; MIAO, Xiu-Sheng; KOENIG, Brenda G.; STRUGER, John: Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. In: *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (2003), Nr. 12, S. 2881–2889. – URL <http://dx.doi.org/10.1897/02-627> 25
- [Miao und Metcalfe 2003] MIAO, Xiu S.; METCALFE, Chris D.: Determination of Carbamazepine and Its Metabolites in Aqueous Samples Using Liquid Chromatography-Electrospray Tandem

- Mass Spectrometry. In: *Anal. Chem.* 75 (2003), Nr. 15, S. 3731–3738. – URL <http://dx.doi.org/10.1021/ac030082k> 12, 17, 18, 52, 65, 66, 68, 105
- [Nebot u. a. 2007] NEBOT, Carolina; GIBB, Stuart W.; BOYD, Kenneth G.: Quantification of human pharmaceuticals in water samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In: *Anal. Chim. Acta* 598 (2007), S. 87–94. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.029> 99, 103
- [Nunes u. a. 2005] NUNES, B.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L.: Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia Perthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61 (2005), Nr. 3, S. 413–419. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.08.010> IV
- [Oaks u. a. 2004] OAKS, J. L.; GILBERT, Martin; VIRANI, Munir Z.; WATSON, Richard T.: Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. In: *Nature* 427 (2004), February 12th, S. 630–633 21, 110
- [O'Connor u. a. 2003] O'CONNOR, N.; DARGAN, P. I.; JONES, A. L.: Hepatocellular damage from non-steroidal anti-inflammatory drugs. In: *Quaternary Journal of Medicine* 96 (2003), S. 787–791. – URL <http://dx.doi.org/10.1093/qjmed/hcg138> 20, 110
- [Oetken u. a. 2005] OETKEN, M.; NENTWIG, G.; LÖFFLER, D.; TERNES, T.; OEHLMANN, J.: Effects of Pharmaceuticals on Aquatic Invertebrates. Part 1: The Antiepileptic Drug Carbamazepine. In: *Environmental Contamination and Toxicology* 49 (2005), S. 353–361 IV
- [Payá Pérez 2006] PAYÁ PÉREZ, Ana B.: Experiences with the current TGDs for risk assessment and the EUSES program. In: INSTITUTE FOR HEALTH AND CONSUMER PROTECTION (Hrsg.): *Workshop on Capacity Building for REACH: Future Role of EU Member States* European Commission (Veranst.), Joint Research Center, European Commission, 2006. – URL http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/MEETINGS_AND_WORKSHOPS/WORKSHOP_CAPACITY_BUILDING_FOR_REACH_CYPRUS_2006/08_TGDs_and_EUSES.ppt IV
- [Petrovic und Barceló 2007] PETROVIC, M.; BARCELÓ, D.: LC-MS for identifying photodegradation products of pharmaceuticals in the environment. In: *Trends in Analytical Chemistry* 26 (2007), Nr. 6, S. 486–493. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2007.02.010> 54, 70, 90
- [Pettersen u. a. 1978] PETTERSEN, Jon E.; ULSAKER, Gunnar A.; JELLUM, Egil: Studies on the metabolism of 2,4'-isobutylphenylpropionic acid (ibuprofen) by gas chromatography and mass

- spectrometry : Dialysis fluid, a convenient medium for studies on drug metabolism. In: *Journal of Chromatography, B* 145 (1978), S. 413–420. – URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)81370-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347(00)81370-5) 15
- [Pfeifer und Spitteller 2001] PFEIFER, Thomas; SPITELLER, Michael: Reducing the tailing of substances adsorbing on silica surfaces by a simple modification of the Finnigan atmospheric pressure chemical ionization source. In: *Rapid Commun Mass Spectrom* 15 (2001), Nr. 22, S. 2206–2207. – URL <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.486> 25
- [POSEIDON 2006] POSEIDON: detailed report, May 2006: Assessment of technologies for the removal of pharmaceuticals and personal care products in sewage and drinking water facilities to improve the indirect potable water reuse / POSEIDON. Braunschweig, 2006. – Forschungsbericht. – 1–81 S 8, 105, 110
- [Pérez-Estrada u. a. 2005] PÉREZ-ESTRADA, Leónidas A.; MALATO, Sixto; GERNJAK, Wolfgang; AGÜERA, Ana; THURMAN, E. M.; FERRER, Imma; FERNÁNDEZ-ALBA, Amadeo R.: Photo-Fenton degradation of diclofenac: Identification of main intermediates and degradation pathway. In: *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005), September 21, Nr. 21, S. 8300–8306. – URL <http://dx.doi.org/10.1021/es050794n> 70, 90
- [Quintana u. a. 2005] QUINTANA, José B.; WEISS, Stefan; REEMTSMA, Thorsten: Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. In: *Water Research* 39 (2005), Nr. 12, S. 2654–2664. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2005.04.068> 16
- [Radjenovic u. a. 2007] RADJENOVIC, J.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D.: Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor. In: *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007), S. 1365–1377 12, 105
- [Reddersen und Heberer 2003a] REDDERSEN, Kirsten; HEBERER, Thomas: Formation of an artifact of diclofenac during acidic extraction of environmental water samples. In: *J Chromatogr, A* 1011 (2003), S. 221–226 20, 110
- [Reddersen und Heberer 2003b] REDDERSEN, Kirsten; HEBERER, Thomas: Multi-compound methods for the detection of pharmaceutical residues in various waters applying solid phase extraction (SPE) and gas chromatography with mass spectrometric (GC-MS) detection. In: *Journal of Separation Science* 26 (2003), S. 1443–1450. – URL <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200301533> 22, 102
- [Reupert und Brausen 2003] REUPERT, Rolf; BRAUSEN, Gisela: Multiverfahren zur Bestimmung relevanter Arzneimittelwirkstoffe. In: *GIT Labor-Fachzeitschrift* 47 (2003), S. 900–904

- [Richardson 2004] RICHARDSON, Susan D.: Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues. In: *Analytical Chemistry* 76 (2004), June 15, Nr. 12, S. 3337–3364. – URL <http://dx.doi.org/10.1021/ac040060d> 6
- [Riess u. a. 1978] RIESS, W.; STIERLIN, H.; DEGEN, P.; FAIGLE, J. W.; GÉRARDIN, A.; MOPPERT, J.; SALLMANN, A.; SCHMID, K.; SHWEIZER, A.; SULC, M.; THEOBALD, W.; WAGNER, J.: Pharmacokinetics and metabolism of the anti-inflammatory agent voltaren. In: *Scandinavian Journal of Rheumatology* Suppl. 22 (1978), S. 17–29 20
- [Roberts und Thomas 2006] ROBERTS, Paul H.; THOMAS, Kevin V.: The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluents and surface waters of the lower Thyne catchment. In: *Science of the Total Environment* 356 (2006), S. 143–153. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.04.31> 8
- [Rohweder 2003] ROHWEDER, Udo: Arzneimittel in der Umwelt - Auswertung der Untersuchungsergebnisse / Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit (BLAC). Hamburg, November 2003. – Bericht. – URL <http://blak-uis.server.de/servlet/is/2146/P-2c.pdf>. Herausgeber: Freie und Hansestadt Hamburg · Umweltbehörde · Amt für Umweltschutz · Umweltuntersuchungen im Auftrag des Bund/Länderausschusses für Chemikaliensicherheit (BLAC) 4
- [Romera u. a. 1996] ROMERA, J. M.; RAMIREZ, M.; GIL, A.: Determination of pantothenic acid in infant milk formulas by high performance liquid chromatography. In: *J. Dairy Sci.* 79 (1996), Nr. 4, S. 523–526. – URL <http://jds.fass.org/cgi/reprint/79/4/523> 22
- [Rote Liste 2007] ROTE LISTE; ROTE LISTE SERVICE GMBH (Hrsg.): *Rote Liste online - Arzneimittelverzeichnis für Deutschland (einschließlich EU-Zulassungen und bestimmter Medizinprodukte)*. Frankfurt/Main : Rote Liste Service GmbH, 2007. – URL <http://www.rote-liste.de/Online> 3, 4, 5, 15
- [Roth und Fenner 2000] ROTH, Hermann J.; FENNER, Helmut: *Arzneistoffe: Struktur Bioreaktivität, wirkungsbezogene Eigenschaften*. Stuttgart : Dt. Apotheker Verlag, 2000 (3. Aufl.) 18, 19
- [Rudy u. a. 1990] RUDY, A. C.; ANLIKER, K. S.; HALL, S. D.: High-performance liquid chromatographic determination of the stereoisomeric metabolites of ibuprofen. In: *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications* 528 (1990), S. 395–405. – URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)82397-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347(00)82397-X) 15, 16
- [Sawchuk u. a. 1995] SAWCHUK, Ronald J.; MALONEY, Jill A.; CARTIER, Linda L.; RACKLEY, Russell J.; CHAN, Keith K. H.; LAU, Henry S. L.: Analysis of diclofenac and four of its me-

- tabolites in human urine by HPLC. In: *Pharm. Res.* 12 (1995), Nr. 5, S. 756–762. – URL <http://dx.doi.org/10.1023/A:1016276012891> 19, 20, 95
- [Scheytt u. a. 2000] SCHEYTT, Traugott; HEBERER, Thomas; STAN, Hans-Jürgen: *Chemische Stressfaktoren in aquatischen Systemen*. Bd. 6. Kap. Vorkommen und Verhalten von Arzneimittelwirkstoffen im Grundwasser, S. 13–21, Wasserforschung e.V., 2000. – URL [http://www.wasserforschung-berlin.de/schrift/band6/6-sche.pdf\(02.03.07\)](http://www.wasserforschung-berlin.de/schrift/band6/6-sche.pdf(02.03.07)) 8, 15
- [Schneider und Degen 1981] SCHNEIDER, W.; DEGEN, P. H.: Simultaneous Determination of Diclofenac Sodium and its Hydroxy Metabolites by Capillary Column Gas Chromatography with Electron-Capture Detection. In: *J. Chromatogr., A* 217 (1981), S. 263–271 20, 110
- [Schrey und Wilhelm 1999] SCHREY, P.; WILHELM, M.: Rückstände von Arzneimitteln in Wasserproben: Befunde und deren Bewertung aus Sicht der Trinkwasserverordnung. Teil I. In: *DVGW-Schriftenreihe Wasser* 94 (1999), S. 1–70 19, 20, 107
- [Schüssler und Sengl 2004] SCHÜSSLER, Walter; SENGL, Dr. M.: Arzneimittel in der Umwelt - F+E-Vorhaben 2000-2002, Kennnummer 73e 040100 49 / Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft. Lazarettstr. 67, D-80636 München, August 2004 (Materialien Nr. 114). – Schlussbericht. – URL <http://www.wasser.lfu.bayern.de/lfw/service/download/mat114.pdf>
- [Schwabe und Paffrath 2006] SCHWABE, U. (Hrsg.); PAFFRATH, D. (Hrsg.): *Arzneiverordnungsreport 2005*. Springer Verlag, 2006 3
- [Schwartz u. a. 2002] SCHWARTZ, Jae C.; SENKO, Michael W.; SYKA, Jojn E. P.: A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. In: *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 13 (2002), Nr. 6, S. 659–669 27
- [Skoog und Leary 1996] SKOOG, Douglas A.; LEARY, James J.: *Instrumentelle Analytik*. 4th ed. Berlin, Heidelberg, New York; Springer, 1996. – Übers. von D. Brendel und S. Hoffstetter-Kuhn 23, 24, 25, 31, 97, 98
- [Stierlin und Faigle 1979] STIERLIN, H.; FAIGLE, J. W.: Biotransformation of diclofenac sodium (Voltaren®) in animals and in man. II. Quantitative determination of the unchanged drug and principal phenolic metabolites, in urine and bile. In: *Xenobiotica* 9 (1979), Nr. 10, S. 610–621 20, 110
- [Stumpf u. a. 1998] STUMPF, Marcus; TERNES, Thomas A.; HABERER, Klaus; BAUMANN, Wolfram: Isolierung von Ibuprofen-Metaboliten und deren Bedeutung als Kontaminanten der aquatischen Umwelt. In: *Vom Wasser* 91 (1998), S. 291–303 6, 12, 16, 34, 105, 109, 111

- [Taggart u. a. 2007] TAGGART, M. A.; CUTHBERT, R.; DAS, D.; SASHIKUMAR, C.; PAIN, D. J.; GREEN, R. E.; FELTRER, Y.; SHULTZ, S.; CUNNINGHAM, A. A.; MEHARG, A. A.: Diclofenac disposition in Indian cow and goat with reference to Gyps vulture population declines. In: *Environmental Pollution* 147 (2007), S. 60–65. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2006.08.017> 21, 110
- [Tan u. a. 1997] TAN, S. C.; JACKSON, S. H. D.; SWIFT, C. G.; HUTT, A. J.: Stereospecific analysis of the major metabolites of ibuprofen in urine by sequential achiral-chiral high-performance liquid chromatography. In: *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* 701 (1997), November, Nr. 1, S. 53–63. – URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00338-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00338-1) 15, 16
- [Ternes 2000] TERNES, Thomas: *Chemische Stressfaktoren in aquatischen Systemen*. Bd. 6. Kap. Vorkommen und Verhalten von Arzneimittelwirkstoffen im Grundwasser, S. 23–33, Wasserforschung e.V., 2000. – URL [http://www.wasserforschung-berlin.de/schrift/band6/6-sche.pdf\(02.03.07\)](http://www.wasserforschung-berlin.de/schrift/band6/6-sche.pdf(02.03.07)) 6
- [Ternes u. a. 2002] TERNES, Thomas; MEISENHEIMER, Martin; MCDOWELL, Derek; SACHER, Frank; BRAUCH, Heinz-Jürgen; HAIST-GULDE, Brigitte; PREUSS, Gudrun; WILME, Uwe; ZULLEISEIBERT, Ninette: Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. In: *Environmental Science and Technology* 36 (2002), S. 3855–3863. – URL <http://dx.doi.org/10.1021/es015757k> 10, 15
- [Ternes 1998] TERNES, Thomas A.: Occurrence of drugs in german sewage treatment plants and rivers. In: *Wat. Res.* 32 (1998), Nr. 11, S. 3245–3260 7, 14, 22
- [Ternes 2001] TERNES, Thomas A.: Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. In: *Trends in Analytical Chemistry* 20 (2001), S. 419–434. – URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936\(01\)00078-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936(01)00078-4) 6, 22
- [Ternes u. a. 1998] TERNES, Thomas A.; STUMPF, Marcus; SCHUPPERT, Bärbel; HABERER, Klaus: Simultaneous determination of antiseptics and acidic drugs in sewage and river water – Simultane Bestimmung von Antiseptika und sauren Pharmaka in Abwasser und Fließgewässern. In: *Vom Wasser* 90 (1998), S. 295–309 33
- [Thermo Electron Corporation 2005] THERMO ELECTRON CORPORATION: Radial ejection and dual detection on the Finnigan LTQ linear ion trap mass spectrometer / Thermo Electron Corporation. Thermo Electron Corporation, 2005 (117). – Product support bulletin. – URL http://thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile_26157.pdf 26, 27
- [Thermo Electron Corporation 2006] THERMO ELECTRON CORPORATION: Pulsed Q collision induced dissociation (PQD) on linear ion trap mass spectrometers / Thermo Electron Cor-

- poration. Thermo Electron Corporation, 2006 (124). – Product support bulletin. – URL http://thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile_30308.pdf 27
- [Tixier u. a. 2003] TIXIER, Céline; SINGE, Heinz P.; OELLERS, Sjeff; MÜLLER, Stephan R.: Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. In: *Environmental Science and Technology* 37 (2003), Nr. 6, S. 1061–1068. – URL <http://dx.doi.org/10.1021/es025834r> 14, 106
- [Triebskorn u. a. 2007] TRIEBSKORN, R.; CASPER, H.; SCHEIL, V.; SCHWAIGER, J.: Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibric acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). In: *Anal Bioanal Chem* 387 (2007), February, Nr. 4, S. 1405–1416. – URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-006-1033-x> 110
- [UBA05 1998] LIECK, G.: Nachweisgrenze und Rauschen. In: *LaborPraxis* 6 (1998), Juni, S. 62–67 97
- [Umweltbundesamt 2007] UMWELTBUNDESAMT: *Umweltdaten Deutschland Online*. Online. Oktober 2007. – URL <http://www.env-it.de/umweltdaten/public/theme.do?nodeIdent=27007>, IV
- [Weigel u. a. 2004] WEIGEL, S.; KALLENBORN, R.; HUHNERFUSS, H.: Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography-mass spectrometry. In: *J. Chromatogr., A* 1023 (2004), 16. Januar, Nr. 2, S. 183–195. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.036> 22, 102
- [Wiegel u. a. 2004] WIEGEL, S.; AULINGER, A.; BROCKMEYER, R.; HARMS, H.; LÖFFLER, J.; REINCKE, H.; SCHMIDT, R.; STACHEL, B.; VON TÜMPLING, W.; WANKE, A.: Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. In: *Chemosphere* 57 (2004), Oktober, Nr. 2, S. 107–126 6, 8, 10, 12, 14, 105
- [Wikipedia] WIKIPEDIA: *Wikipedia*. Online (Stand 07.01.2008). – URL <http://de.wikipedia.org/wiki/Hauptseite> II
- [Winkler u. a. 2001] WINKLER, Markus; LAWRENCE, John; NEU, Thomas: Selective Degradation of Ibuprofen and Clofibric Acid in two model River Biofilm Systems. In: *Water Research* 35 (2001), Nr. 13, S. 3197–3205. – URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00026-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00026-4) 15

- [World Health Organization WHO 2007] WORLD HEALTH ORGANIZATION WHO: Essential Medicines WHO Model List. URL <http://www.who.int/medicines/publications/EML15.pdf>, March 2007 (15). – Forschungsbericht 3
- [Yamashita und Fenn 1984] YAMASHITA, Masamichi; FENN, John B.: Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. In: *J. Phys. Chem. A* 88 (1984), Nr. 20, S. 4451–4459. – URL <http://dx.doi.org/10.1021/j150664a002> 24, 25
- [Zuehlke u. a. 2004] ZUEHLKE, Sebastian; DÜNNBIER, Uwe; HEBERER, Thomas: Determination of polar drug residues in sewage and surface water applying liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In: *Analytical Chemistry* 76 (2004), November, Nr. 22, S. 6548–6554. – URL <http://dx.doi.org/10.1021/ac049324m> 12, 17
- [Zuehlke u. a. 2007] ZUEHLKE, Sebastian; DÜNNBIER, Uwe; HEBERER, Thomas: Investigation of the behavior and metabolism of pharmaceutical residues during purification of contaminated ground water used for drinking water supply. In: *Chemosphere* 69 (2007), S. 1673–1680. – URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.06.020> 11, 17
- [Zwiener 2007] ZWIENER, C.: Occurrence and analysis of pharmaceuticals and their transformation products in drinking water treatment. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387 (2007), February, Nr. 4, S. 1159–1162 3, 6

ANHANG

Anhang A

Umweltverträglichkeitsprüfung

A.1 Zweck

Durch die Umweltverträglichkeitsstudien (englisch auch „Ecotoxicological Risk Assessment“ genannt) sollen die unmittelbaren und mittelbaren Auswirkungen von Vorhaben bestimmten Ausmaßes auf die Umwelt im Vorfeld der Entscheidung über die Zulässigkeit des Vorhabens festgestellt, beschrieben und bewertet werden. Allerdings entfaltet die Umweltverträglichkeitsprüfung (UVP) keinerlei materielle Rechtswirkung, d. h. ein Projekt kann durch eine negativ ausfallende UVP nicht automatisch verhindert werden (Wikipedia, Stichwort „Umweltverträglichkeitsprüfung“).

Für chemische Substanzen heißt das vor allem, dass entsprechend der EU-Kommissionsdirektive 93/67/EEC für neue Substanzen, der EU-Richtlinie 1488/94 für existierenden Substanzen bzw. der EU-Direktive 98/8/EC für die Markteinführung biozider Substanzen eine Toxizitätsbestimmung durchgeführt werden muss. Diese beinhaltet die Ermittlung der Gefährdung, eine Einschätzung der Dosis-Wirkung-Beziehung etc. anhand von chemischen Konzentrationen oder Verabreichungsmengen der untersuchten Substanzen, Angaben über beobachtete Wirkungen und Dauer und bezieht sich in der Regel auf einen speziellen toxikologischen Endpunkt (Wikipedia).

Einige Beispiele für die betrachteten Endpunkte sind in Tabelle A.1 gegeben. Der dabei definierte Unterschied zwischen Wirkung und Schädigung ist besonders bei Arzneimitteln von Bedeutung; ein Arzneimittel sollte eine pharmakologische Wirkung bei einer Dosis zeigen, bei der keine toxische Schädigung zu befürchten ist (Wikipedia, Stichwort „Toxizitätsbestimmung“).

Die zu erfassenden Effekte sind:

- Akute Toxizität
- Irritationen

Tabelle A.1: Endpunkte in Toxizitätsbestimmungen

Bezeichnung	engl. Name	Bedeutung/Erklärung
EC ₅₀	Half maximal effective concentration	Konzentration, bei der 50 % der Testorganismen bezüglich des Testparameters Wirkungen zeigen
ED ₁₀	Effective dose, 10 %	Dosis, bei der 10 % der Testorganismen bezüglich des Testparameters Wirkungen zeigen
LC ₅₀	Median lethal concentration	Konzentration in Wasser, Boden oder Luft, bei der 50 % der Versuchsorganismen innerhalb eines bestimmten Beobachtungszeitraumes sterben
LD ₅₀	Median lethal dose	Letale Dosis, bei der 50 % aller Versuchstiere innerhalb eines bestimmten Beobachtungszeitraumes sterben
LOAEL	Lowest observed adverse effect level	Niedrigste Dosis eines verabreichten chemischen Stoffes, bei der im Tierexperiment noch Schädigungen beobachtet wurden
LOEL	Lowest observed effect level	Niedrigste Dosis eines verabreichten chemischen Stoffes, bei der im Tierexperiment noch Wirkungen beobachtet wurden
NOAEL	No observed adverse effect level	Höchste Dosis eines Stoffes, die auch bei andauernder Aufnahme keine erkennbaren und messbaren Schädigungen hinterlässt
NOEL ^a	No observed effect level	Höchste Dosis eines Stoffes, die auch bei andauernder Aufnahme keine erkennbaren und messbaren Wirkungen hinterlässt

^a wird als ED₁₀ festgelegt

- Korrosivität
- Sensibilisierung
- Toxizität durch wiederholte Dosen
- Mutagenität
- Karzinogenität
- Reproduktionstoxizität

A.2 Untersuchte Organismen

Um die Effekte auf die verschiedenartigen Lebensräume zu erfassen, werden einige Referenzorganismen untersucht. Dies sind hauptsächlich Algen, Krustentiere, Fische, Bakterien oder Pflanzen (Tabelle A.2). Dabei sollte jedoch beachtet werden, dass diese Untersuchungen sehr selektiv sind. In den UVPs kein „schlechtes“ Ergebnis zu haben, heißt nicht, dass dies auch auf alle Organismen im selben Lebensraum zutrifft.

Tabelle A.2: Einige Referenzorganismen aus der Umweltverträglichkeitsprüfung (Cleuvers, 2003; Ferrari u. a., 2004; Nunes u. a., 2005; Oetken u. a., 2005; Hanisch u. a., 2004).

Organismus	Beispiel	Spezies (Abkürzung)
Pflanzen	Kleine Wasserlinse	<i>Lemna minor</i> (<i>L. minor</i>)
	Laubmoos	<i>Cinclidotus riparius</i> (<i>C. riparius</i>)
Algen	Grünalgen	<i>Desmodesmus subspicatus</i> (<i>D. subspicatus</i>)
	Mikroalgen (ein- und wenigzellig)	<i>Tetraselmis chuii</i> (<i>T. chuii</i>)
Fische	Zebrafisch	<i>Dania rerio</i> (<i>D. rerio</i>)
	Zahnkarpfen	<i>Gambusia holbrooki</i> (<i>G. holbrooki</i>)
Krebstiere	Wasserfloh	<i>Daphnia magna</i> (<i>D. magna</i>)
	Schnecken	<i>Clausilia dubia</i> (<i>C. dubia</i>)
	Salzkrebschen	<i>Artemia parthenogenetica</i> (<i>A. parthenogenetica</i>)
Bakterien	biolumineszierende Bakterien	<i>Vibrio fischeri</i> (<i>V. fischeri</i>)

A.3 Ermittlung von vergleichbaren Werten

Die Beurteilung der Umweltrisiken soll durch den so genannten Risikoquotienten (Verhältnis von PEC/PNEC) vereinfacht werden. Er wurde sowohl von der Europäischen Arzneimittelagentur (EMEA), als auch von der US Food and Drug Administration (FDA) für die UVP eingeführt (Gentili, 2007). Dabei wird die vorausgesagte Konzentration eines Stoffes in der Umwelt (predicted environmental concentration, PEC) und die vorausgesagte Konzentration eines Stoffes, bis zu der sich keine Auswirkungen auf die Umwelt zeigen (predicted no effect concentration, PNEC), betrachtet. Das Verhältnis von PEC/PNEC bedingt eine von vier möglichen Entscheidungen der zuständigen Bewertungsstelle (Payá Pérez, 2006; Umweltbundesamt, 2007):

- $PEC/PNEC < 1$: Der Stoff gibt nicht zu unmittelbarer Besorgnis Anlass und muss erst dann erneut überprüft werden, wenn gem. Art. 7 Abs. 2, Art. 8 Abs. 3, Art. 8 Abs. 4 oder Art. 14 Abs. 1 der Richtlinie 67/548/EWG weitere Informationen vorgelegt werden.
- $1 < PEC/PNEC < 10$: Der Stoff gibt zur Besorgnis Anlass; die zuständige Behörde entscheidet darüber, welche weiteren Informationen für eine Überprüfung der Bewertung erforderlich sind; die diesbezügliche Forderung wird jedoch so lange zurückgestellt, bis für die in Verkehr gebrachte Stoffmenge die in Art. 8 Abs. 4 der Richtlinie 67/548/EWG genannte nächsthöhere Mengenschwelle erreicht ist.
- $PEC/PNEC 10 - 100$: Der Stoff gibt zur Besorgnis Anlass; weitere Informationen werden unverzüglich angefordert.
- $PEC/PNEC > 100$: Keine Prüfungen/Nachforderung mehr möglich: Der Stoff gibt zur Besorgnis Anlass und die zuständige Behörde gibt unverzüglich Empfehlungen für die Risikominderung.

In der EU-Richtlinie 93/67/EWG gab es eine Einteilung über die EC_{50} -Werte nach folgendem Schema (Cleuvers, 2005):

- $EC_{50} < 1 \text{ mg/l}$: Der Stoff ist sehr toxisch für aquatische Organismen.
- $EC_{50} = 1 - 10 \text{ mg/l}$: Der Stoff ist toxisch für aquatische Organismen.
- $EC_{50} = 10 - 100 \text{ mg/l}$: Der Stoff ist gesundheitsgefährdend für aquatische Organismen.

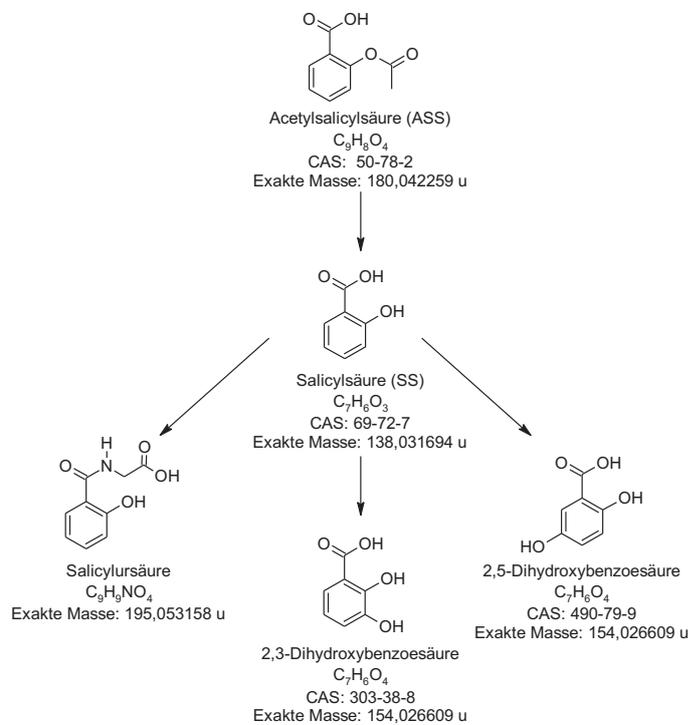
Diese Richtlinie wurde inzwischen durch die REACH-Verordnung abgelöst.

Anhang B

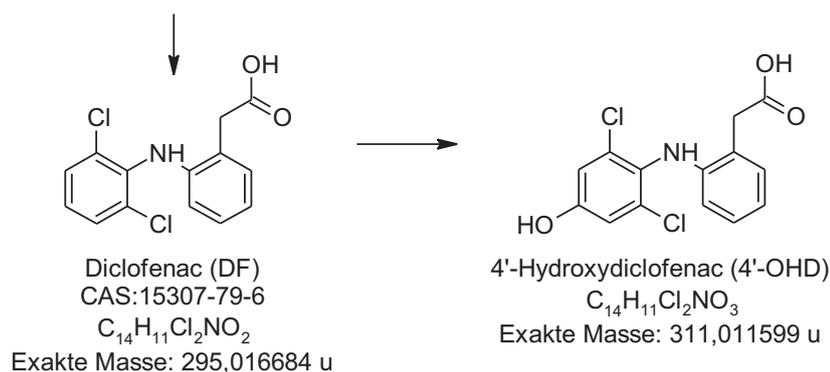
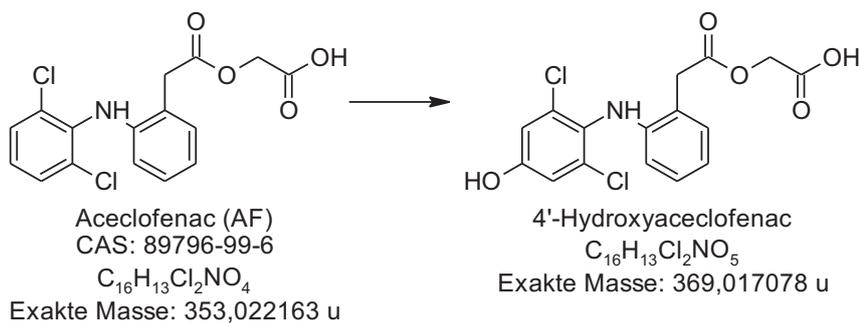
Übersicht über den Metabolismus einiger Arzneimittel

B.1 Schmerzmittel

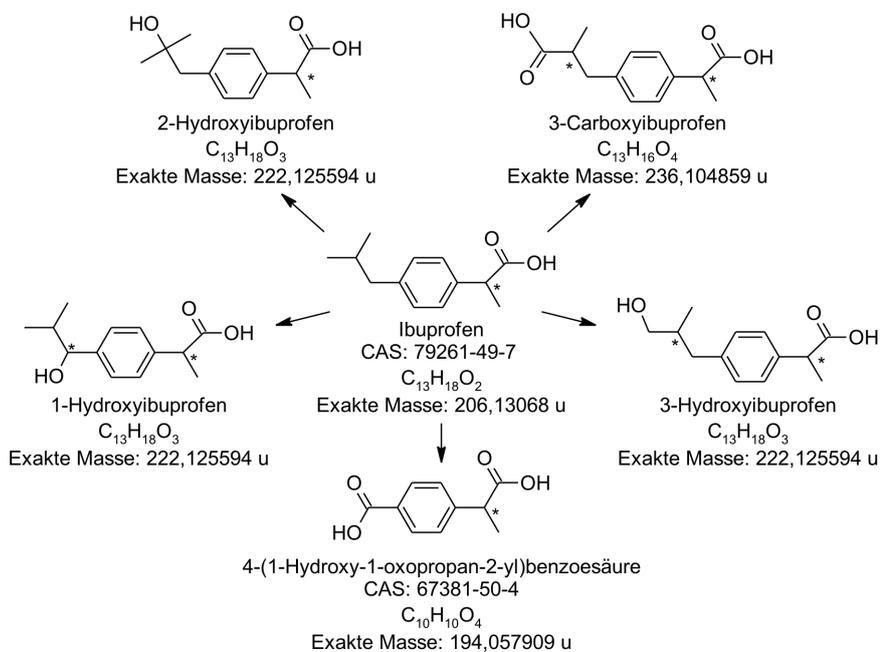
B.1.1 Acetylsalicylsäure



B.1.2 Aceclofenac

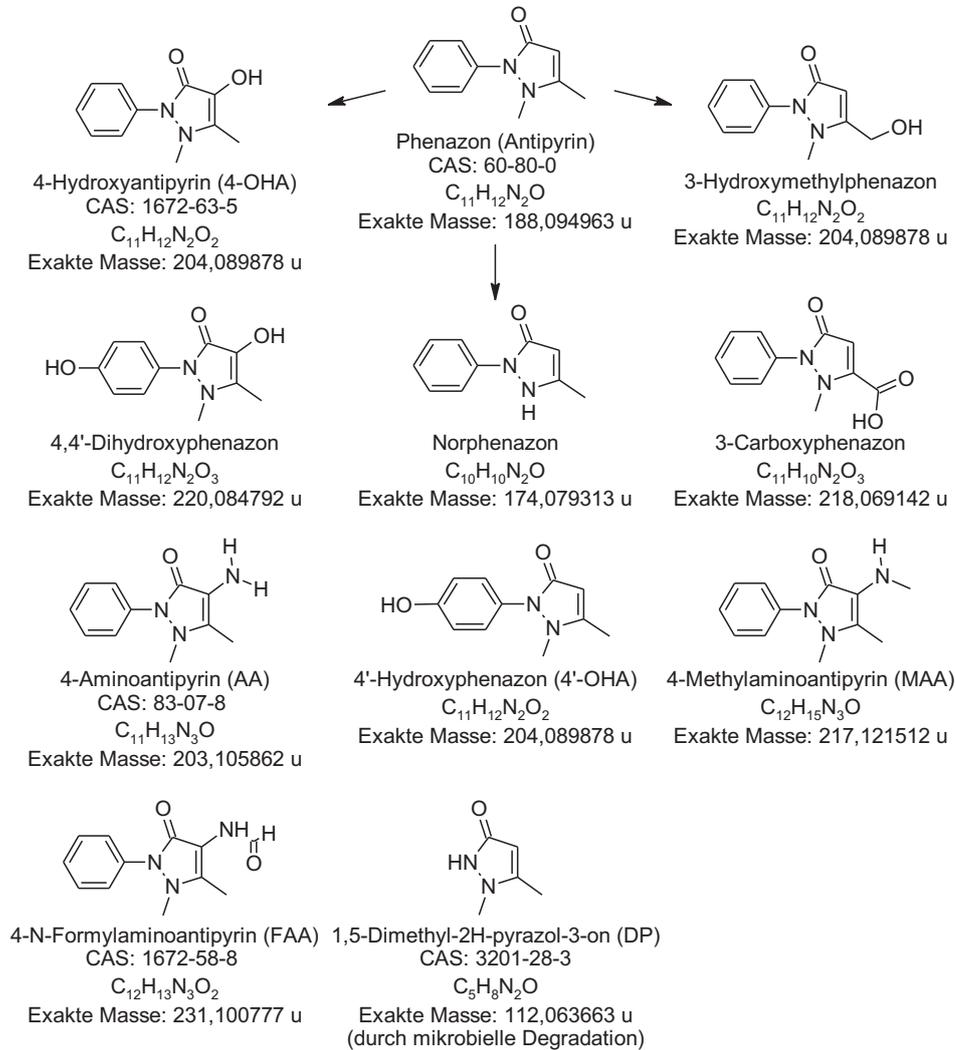


B.1.3 Ibuprofen

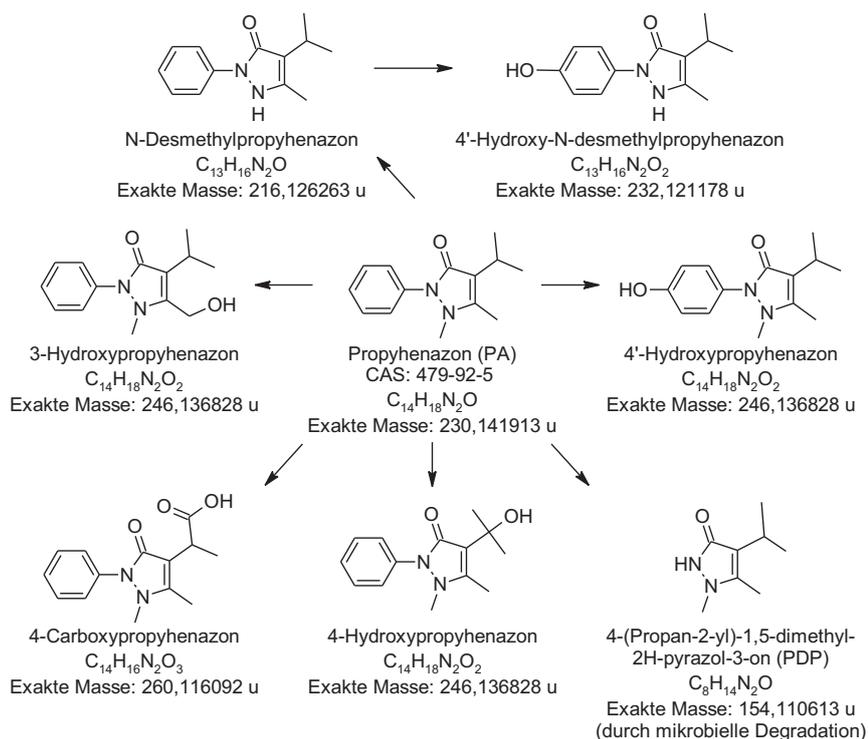


B.1.4 Pyrazolinone

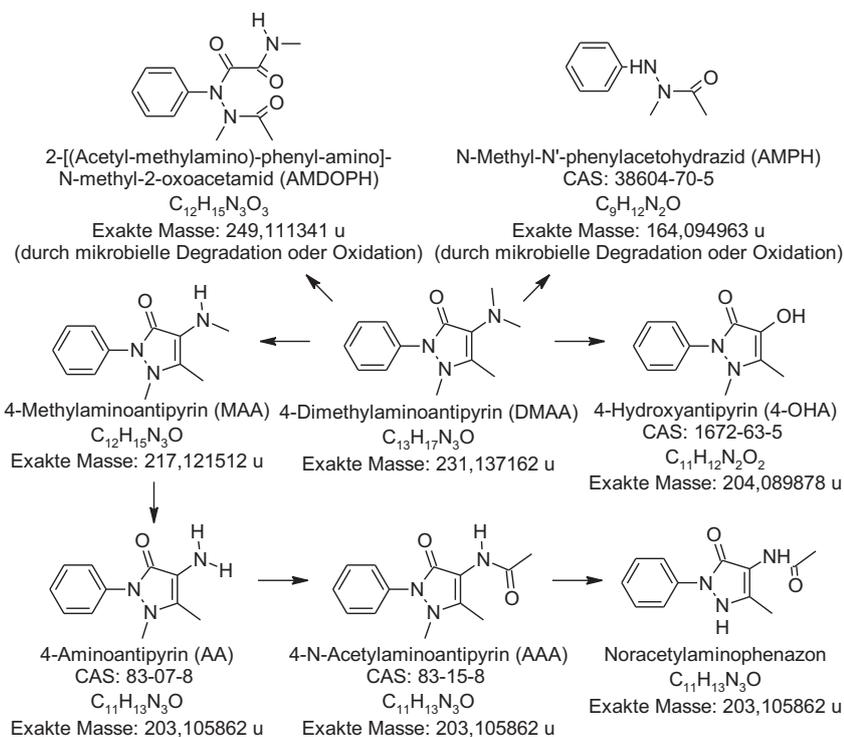
B.1.4.1 Phenazon



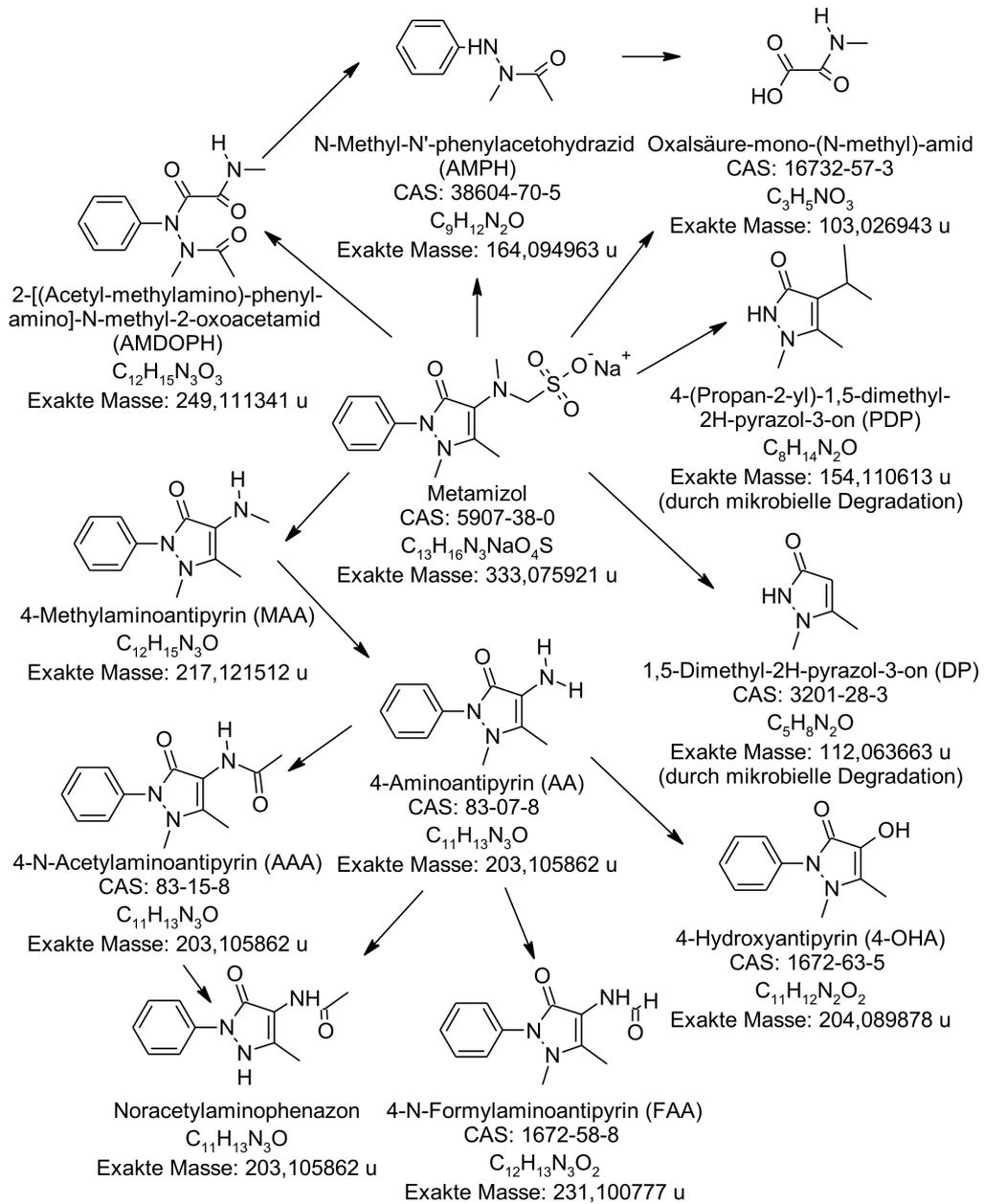
B.1.4.2 Propyphenazon



B.1.4.3 DMAA



B.1.4.4 Metamizol



Anhang C

Messungen

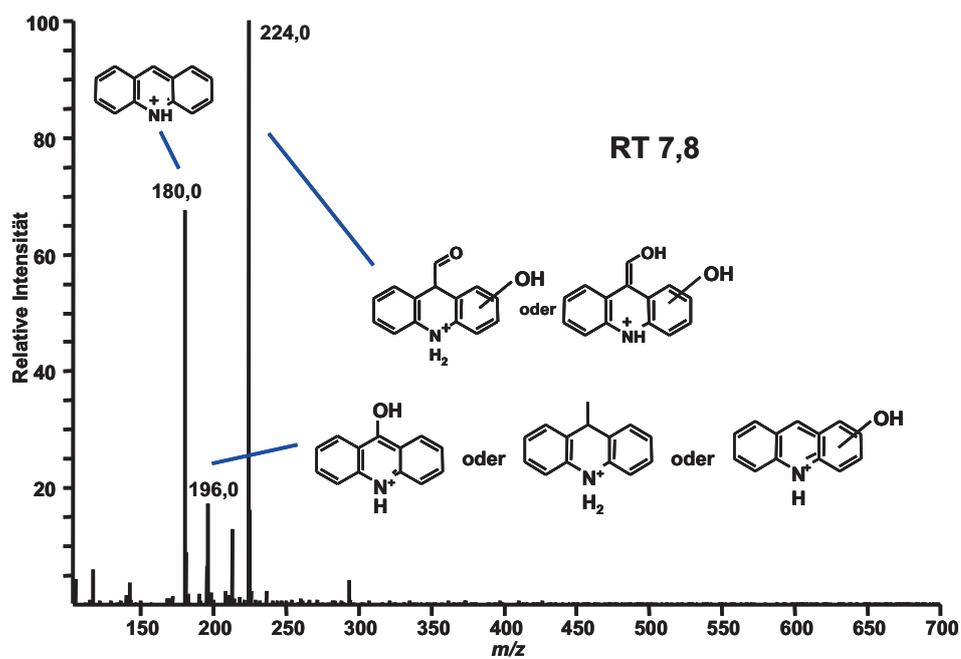
C.1 Erkennung umweltrelevanter Metaboliten aus Urinproben

C.1.1 Carbamazepin

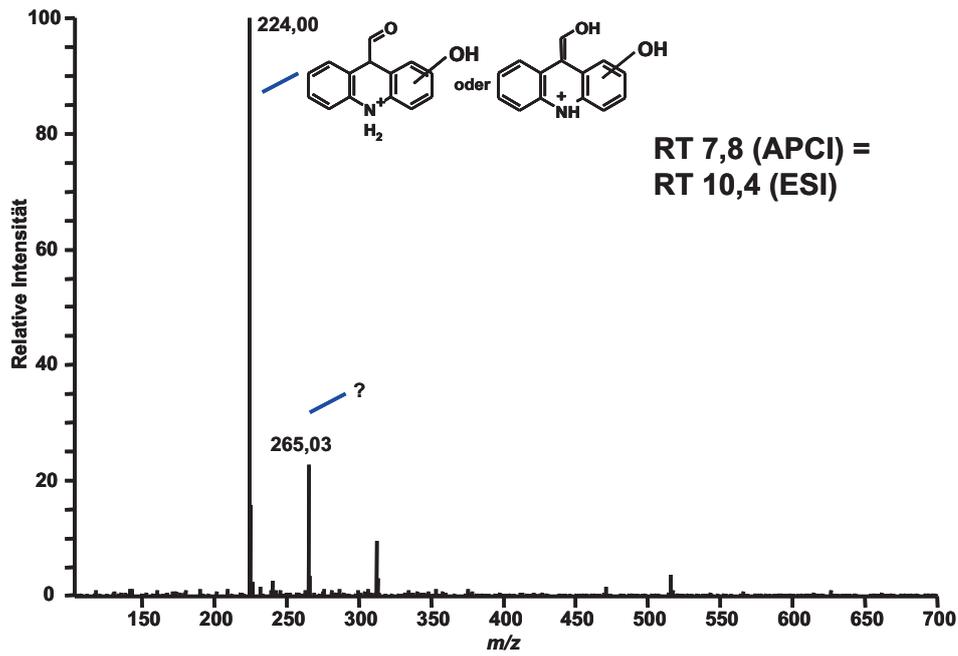
C.1.1.1 Retentionszeit 7,8 min

Fullscanspektren

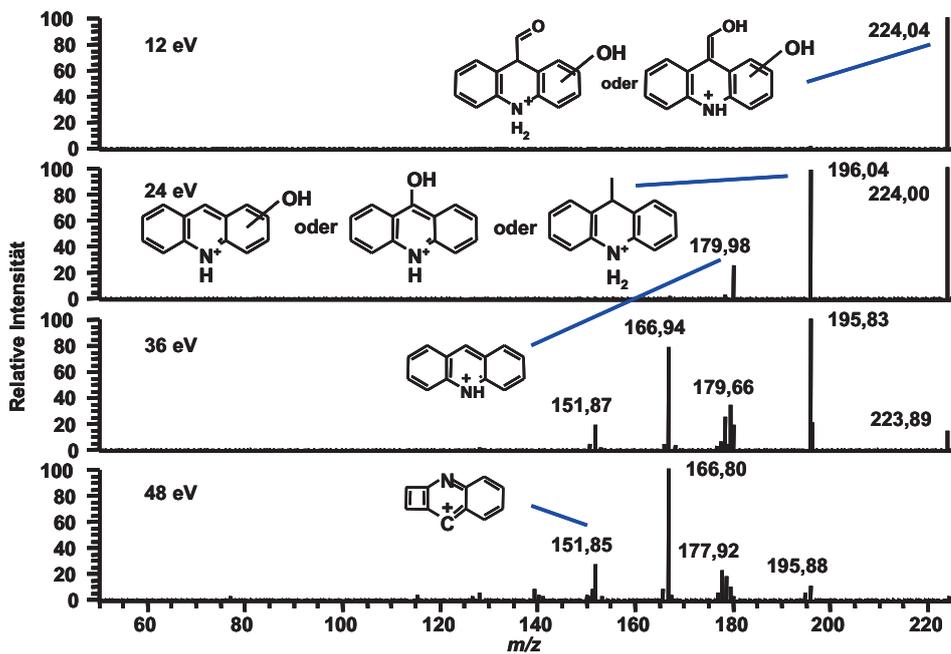
APCI-Spektrum

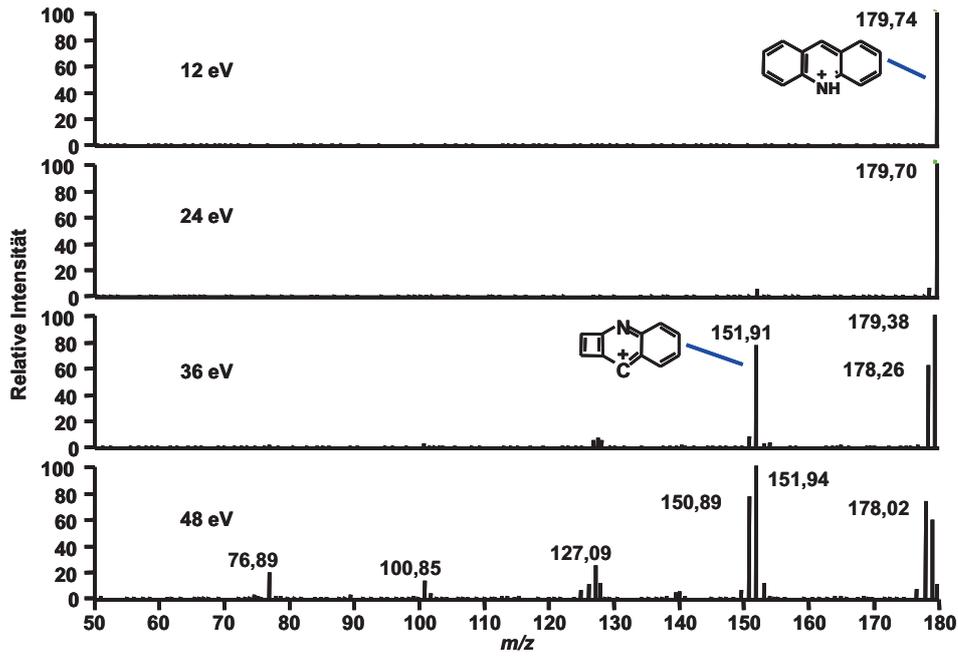


ESI-Spektrum



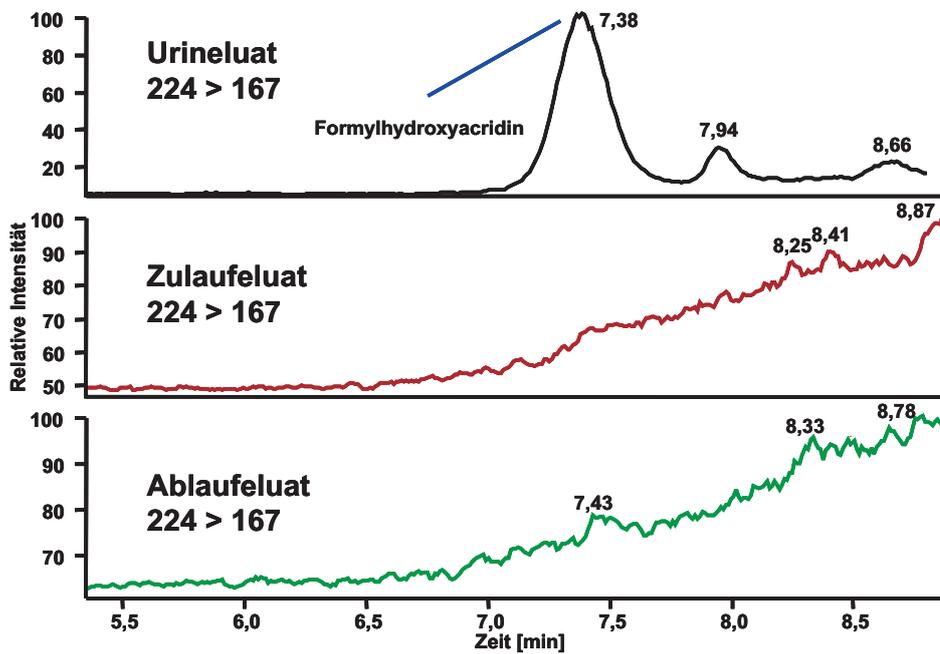
Produktionenspektren





MRM-Chromatogramm

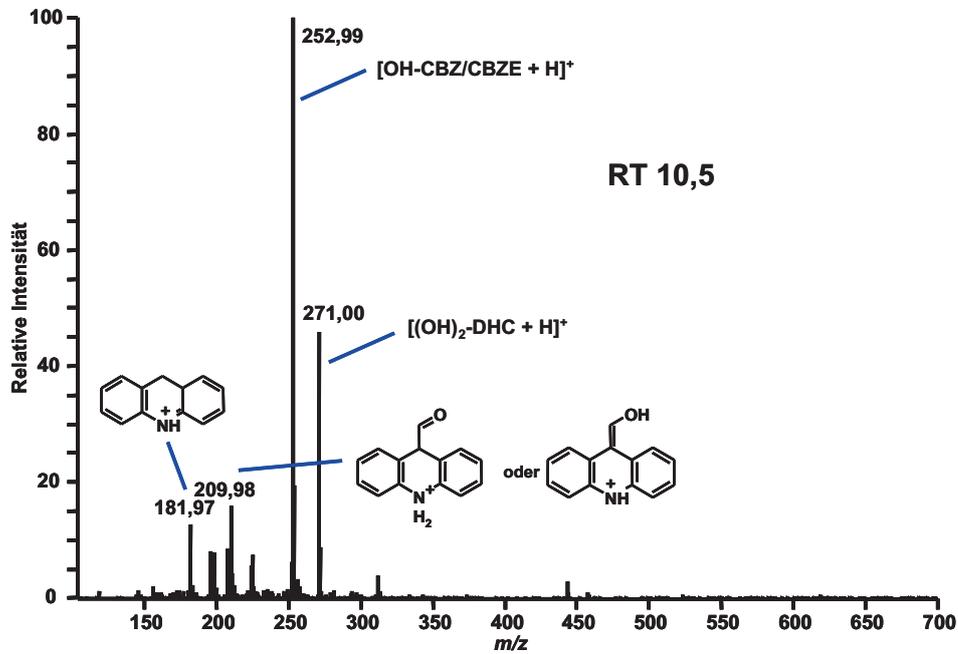
Durch eine Änderung im Aufbau des Instruments sind die RT leicht verkürzt.



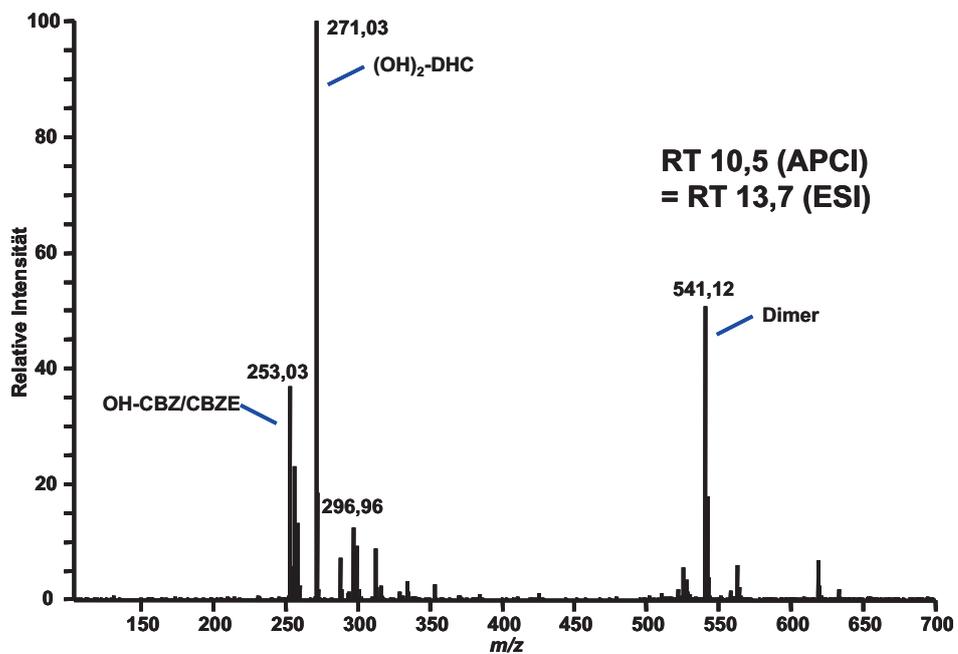
C.1.1.2 Retentionszeit 10,5 min

Fullscanspektren

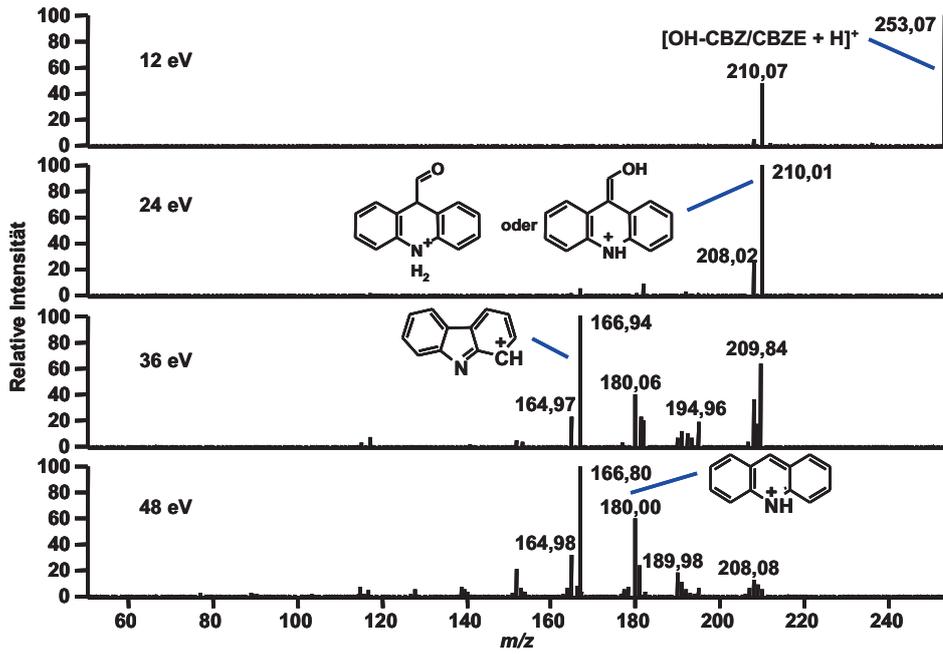
APCI-Spektrum



ESI-Spektrum

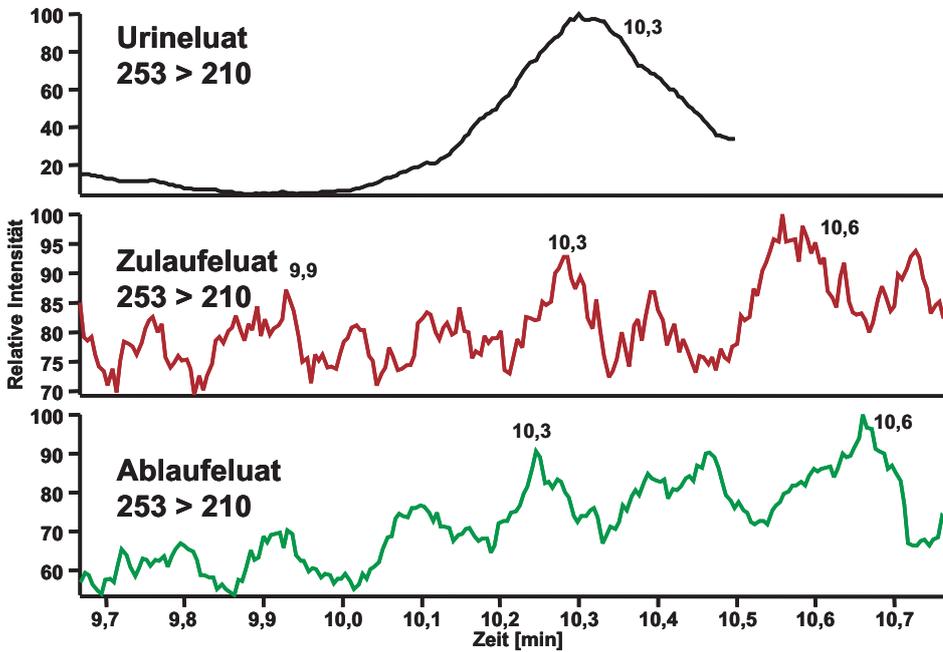


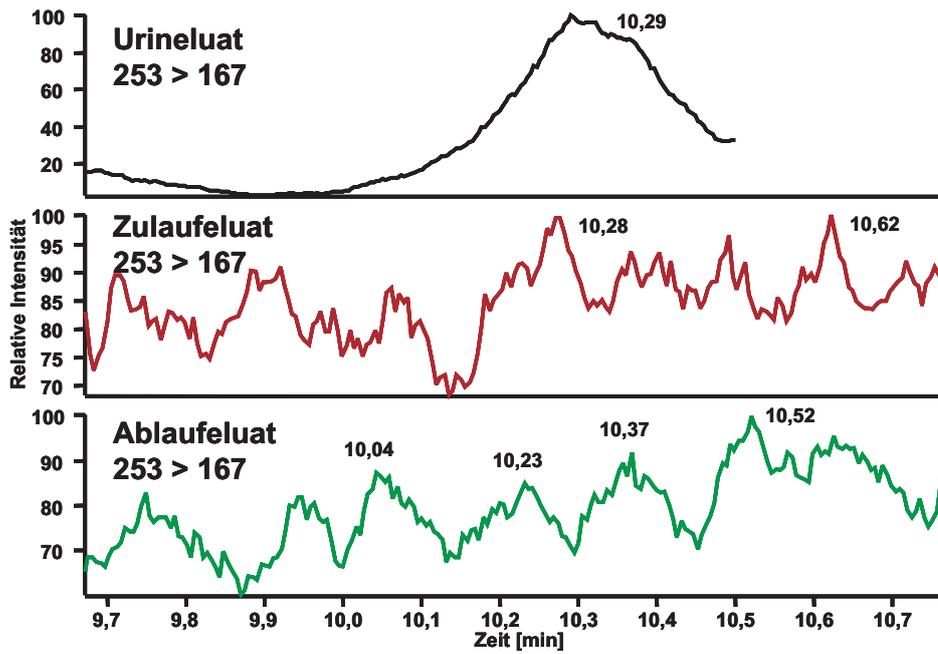
Produktionenspektren



MRM-Chromatogramme

Durch eine Änderung im Aufbau des Instruments sind die RT leicht verkürzt.

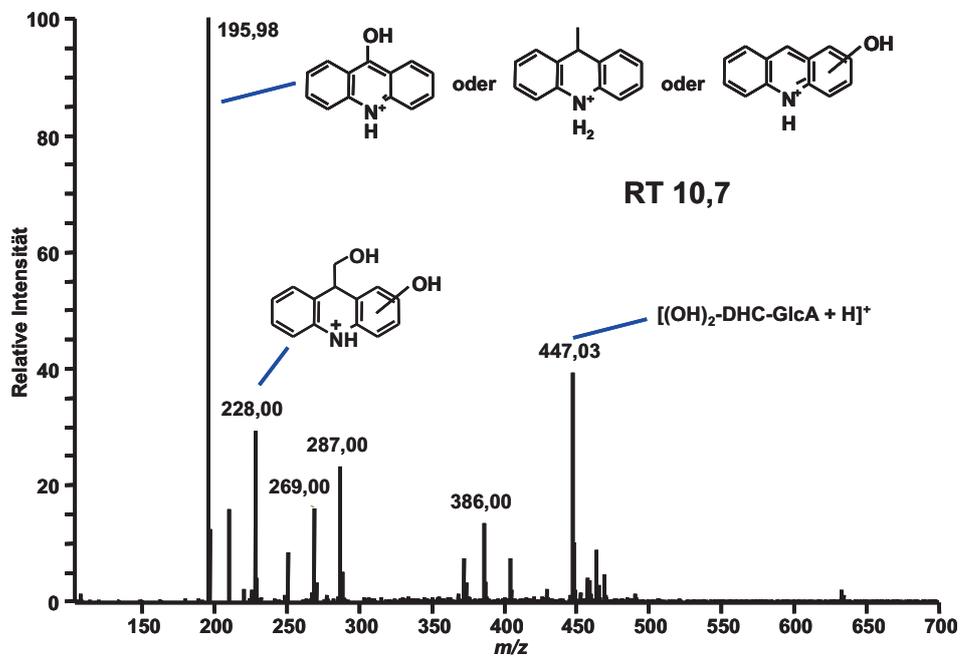




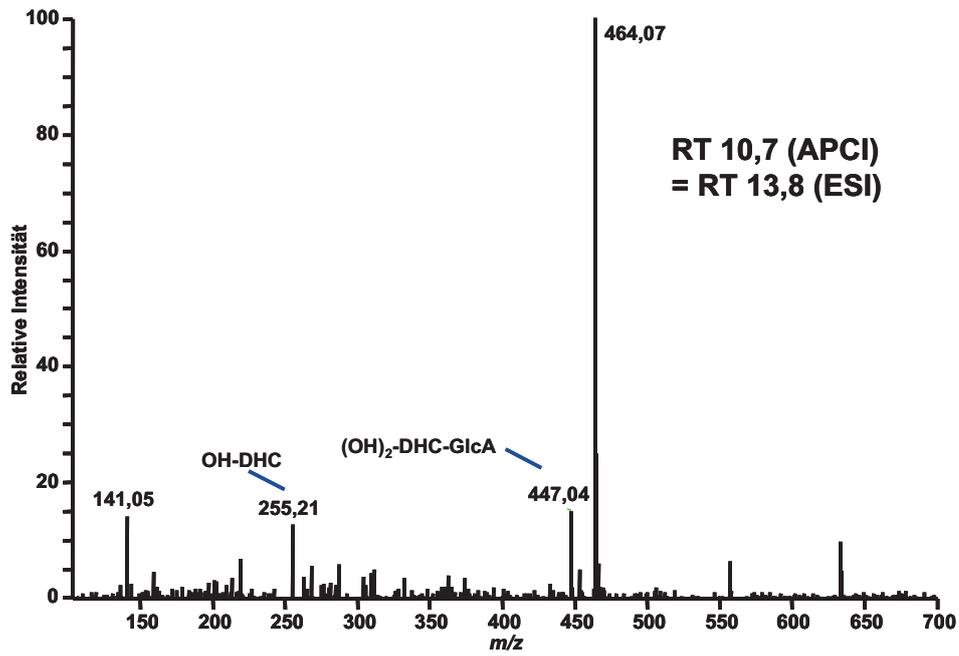
C.1.1.3 Retentionszeit 10,7 min

Fullscanspektren

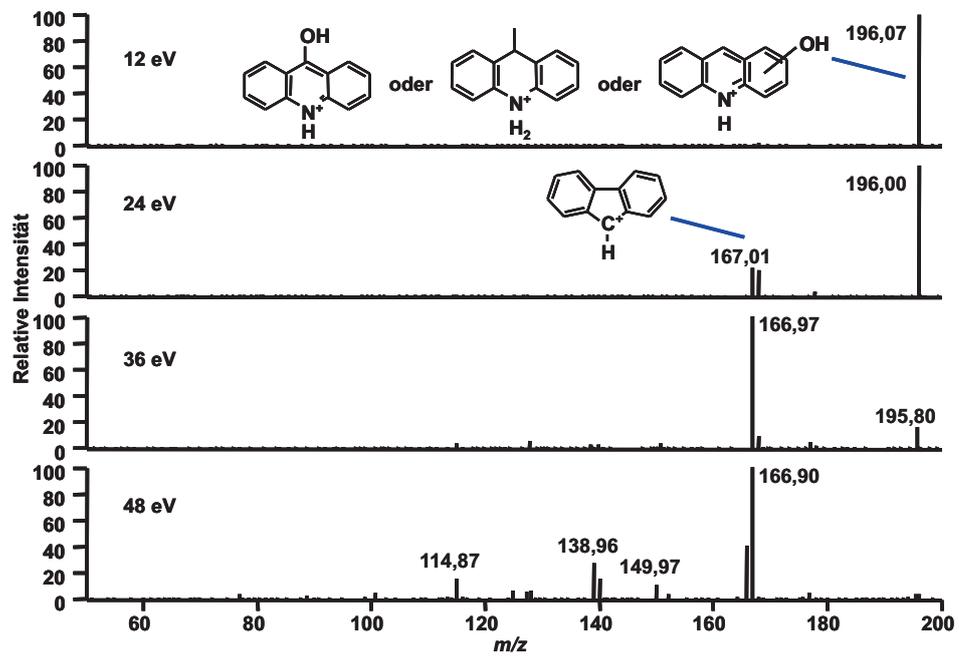
APCI-Spektrum



ESI-Spektrum

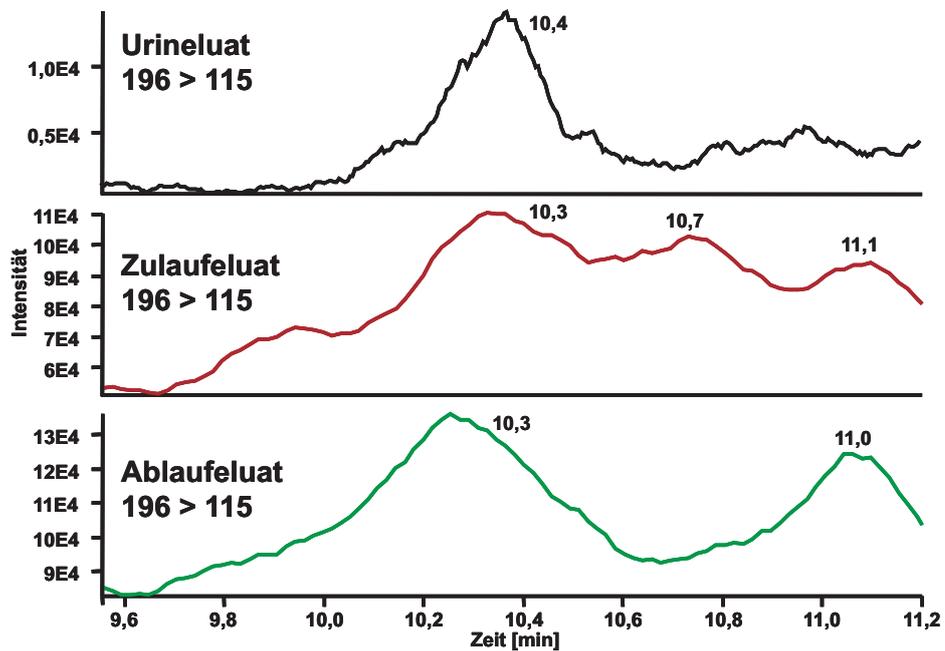
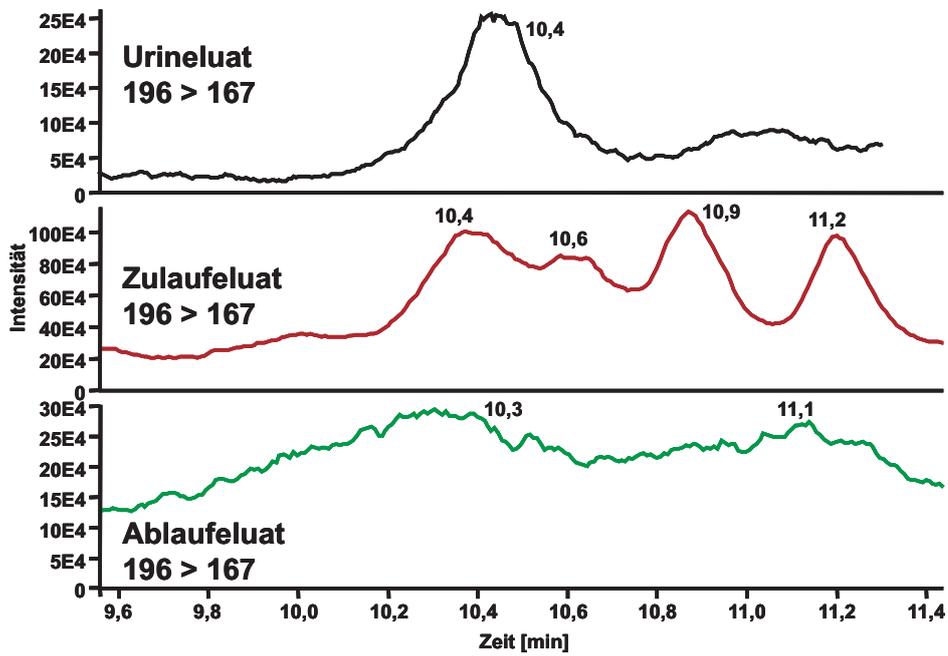


Produktionenspektren



MRM-Chromatogramme

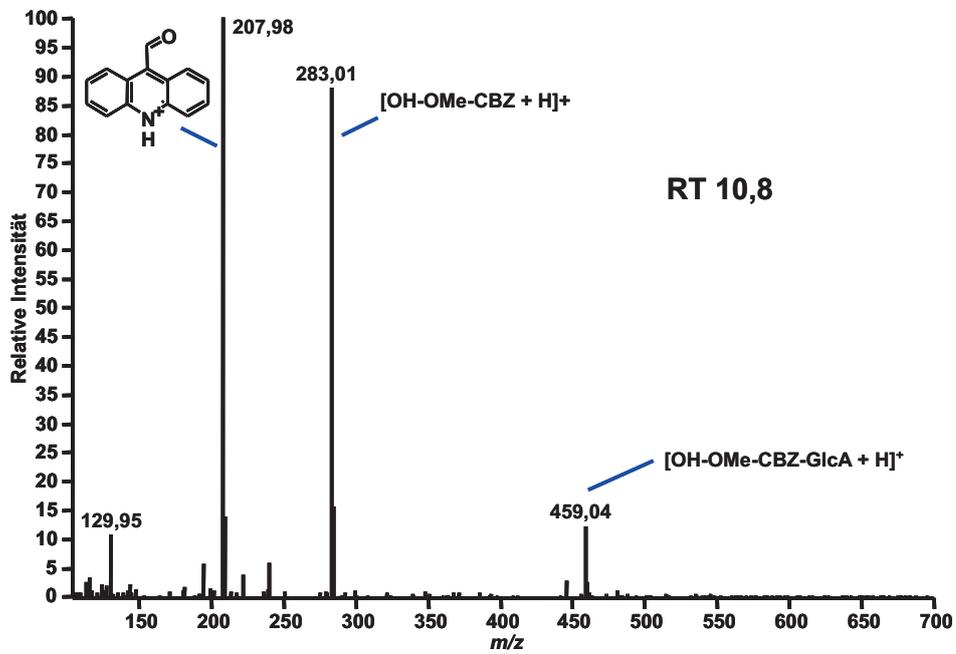
Durch eine Änderung im Aufbau des Instruments sind die RT leicht verkürzt.



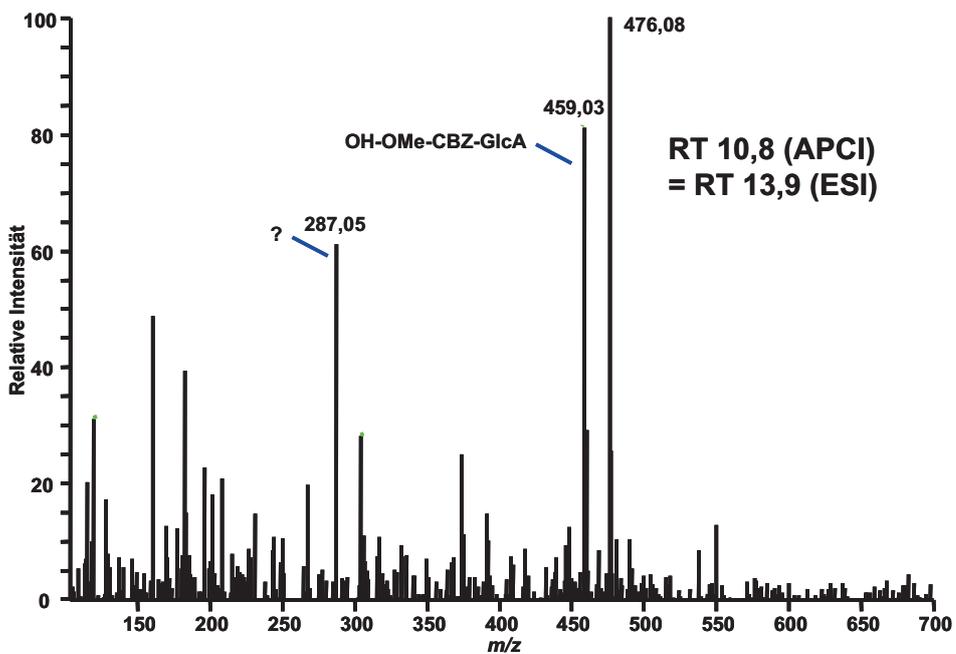
C.1.1.4 Retentionszeit 10,8 min

Fullscanspektren

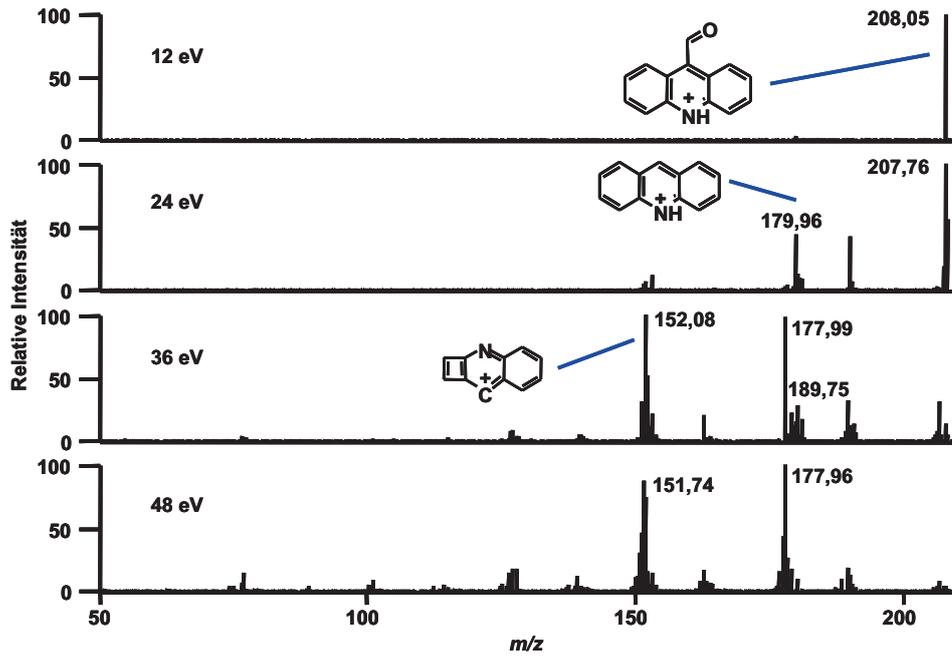
APCI-Spektrum



ESI-Spektrum

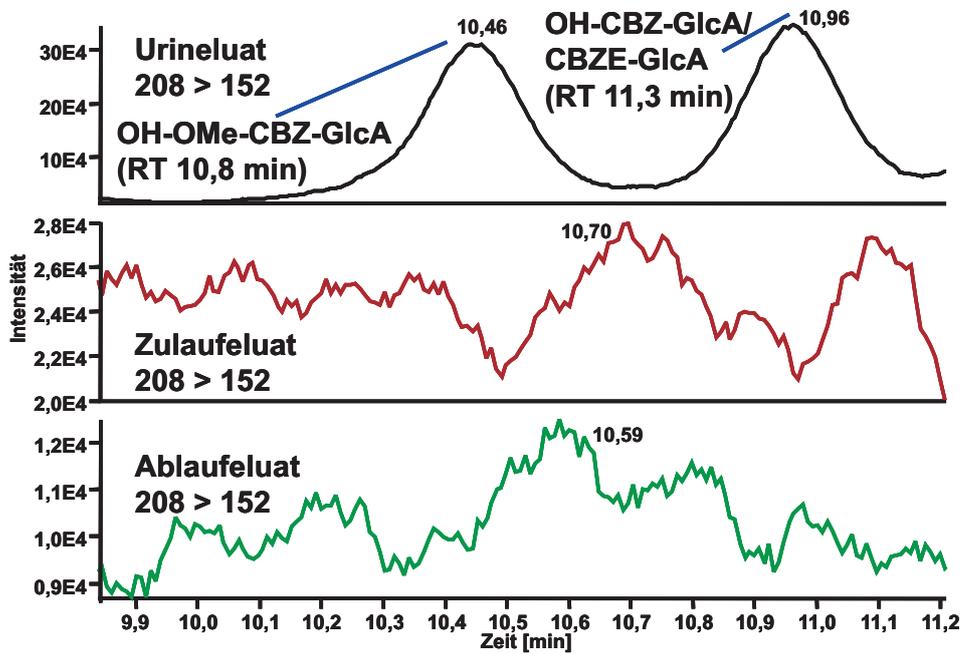


Produktionenspektren



MRM-Chromatogramme

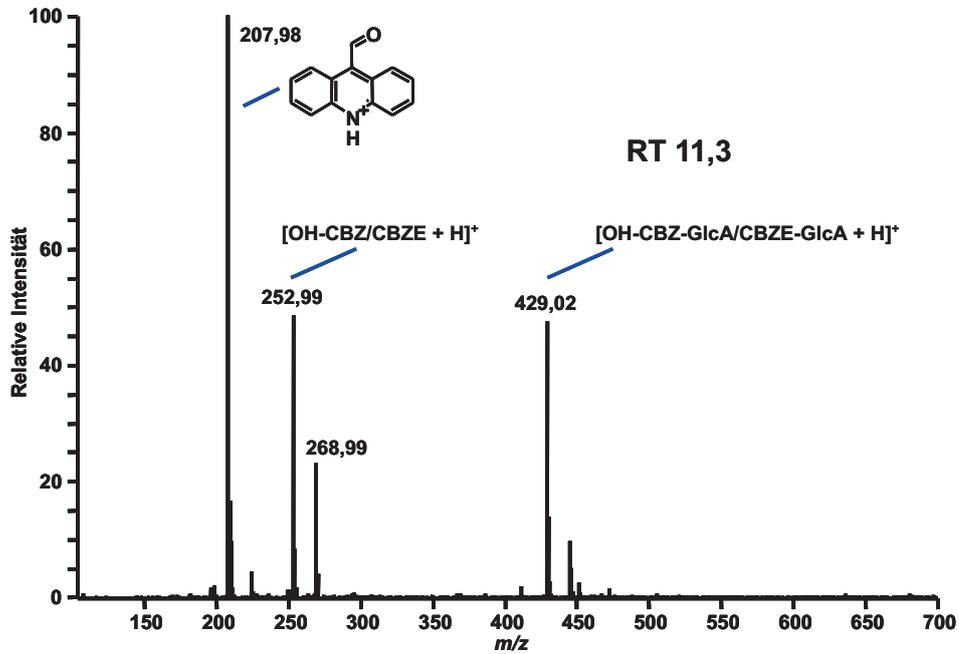
Durch eine Änderung im Aufbau des Instruments sind die RT leicht verkürzt.



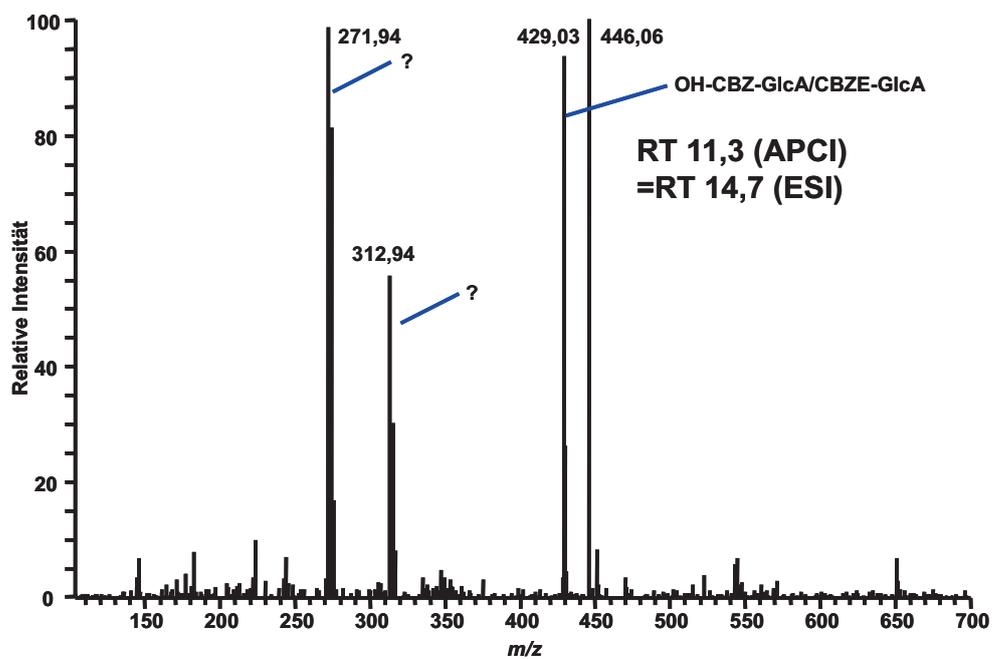
C.1.1.5 Retentionszeit 11,3 min

Fullscanspektren

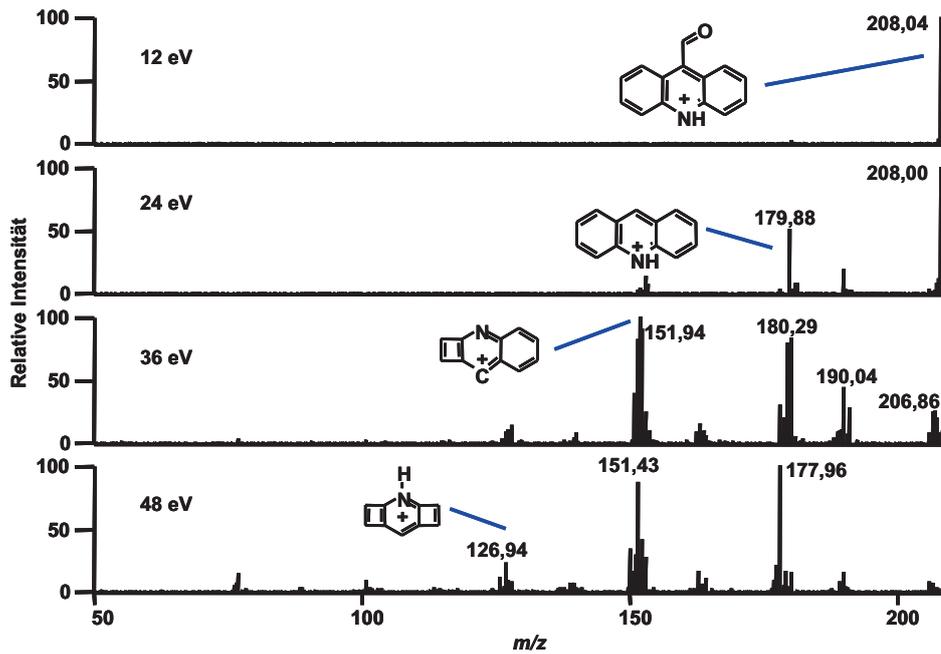
APCI-Spektrum



ESI-Spektrum

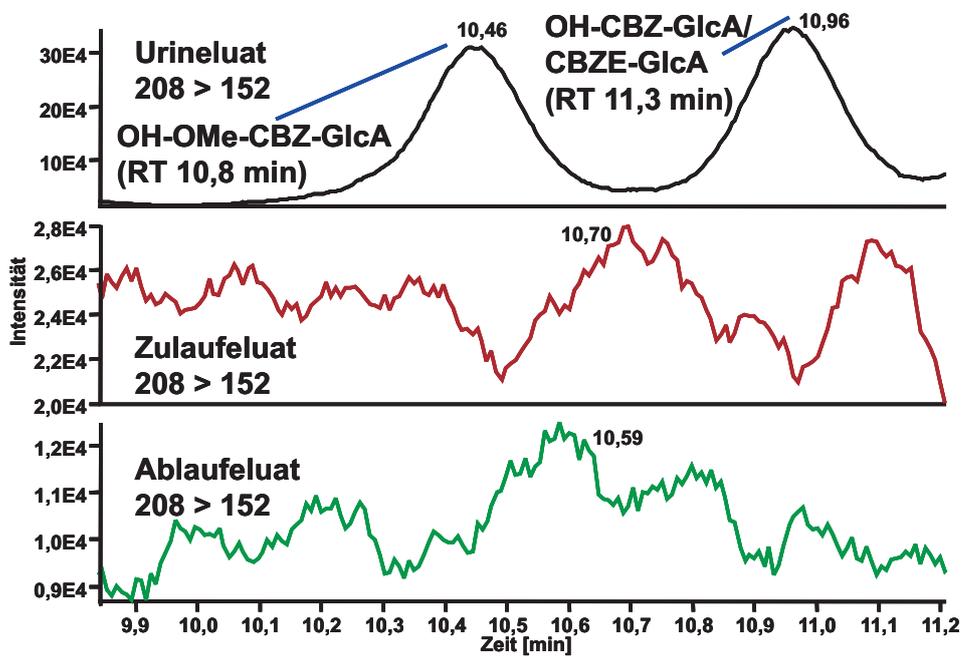


Produktionenspektren



MRM-Chromatogramme

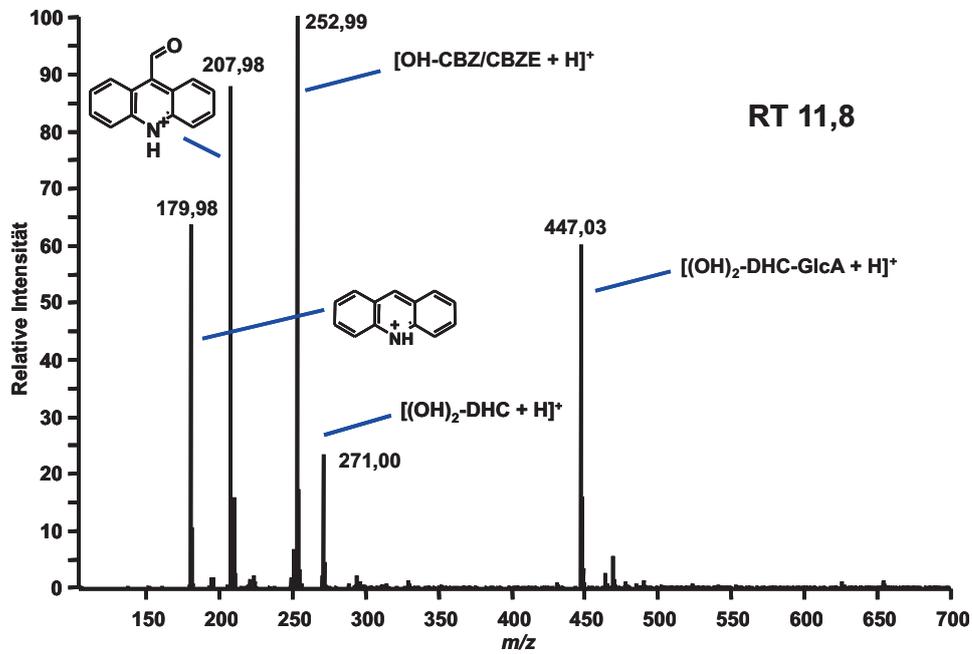
Durch eine Änderung im Aufbau des Instruments sind die RT leicht verkürzt.



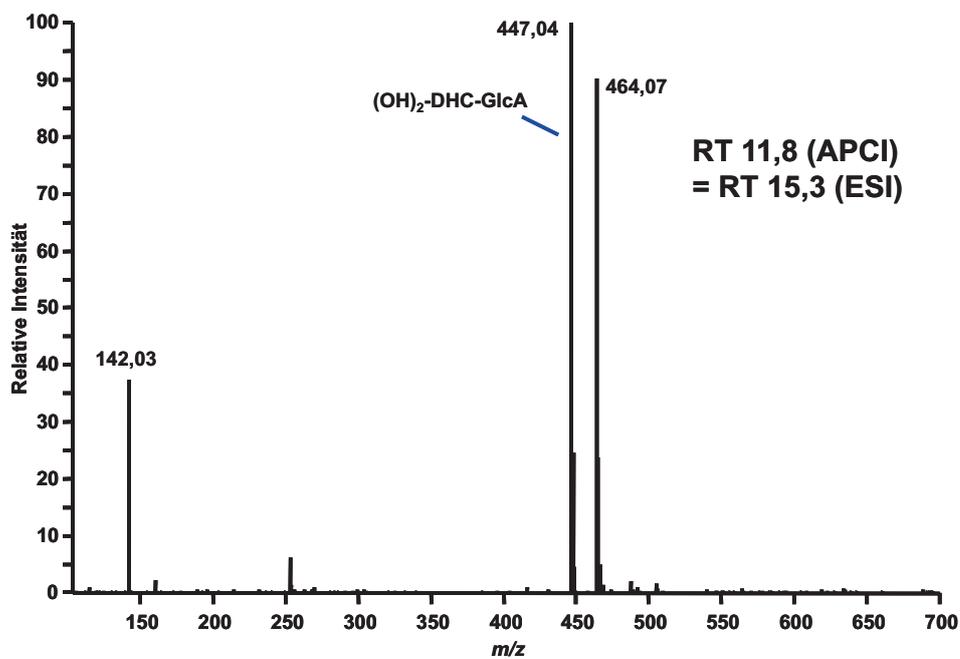
C.1.1.6 Retentionszeit 11,8 min

Fullscanspektren

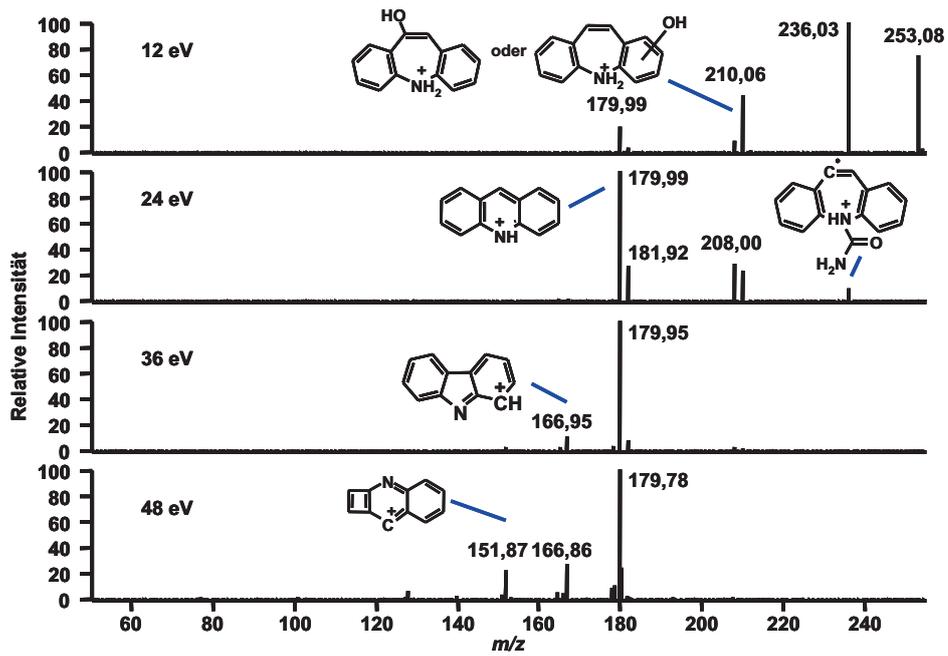
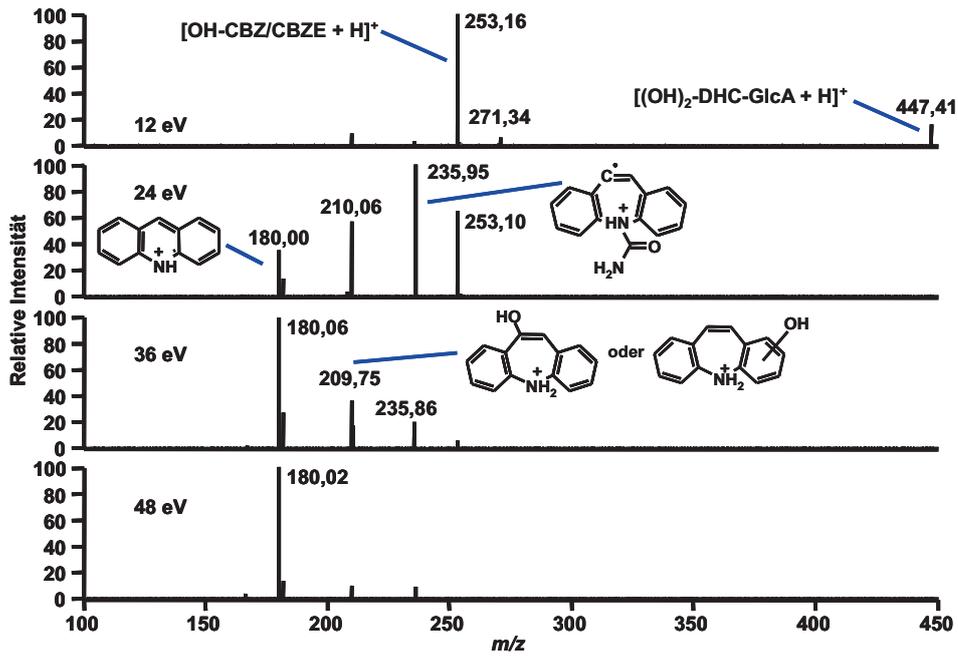
APCI-Spektrum

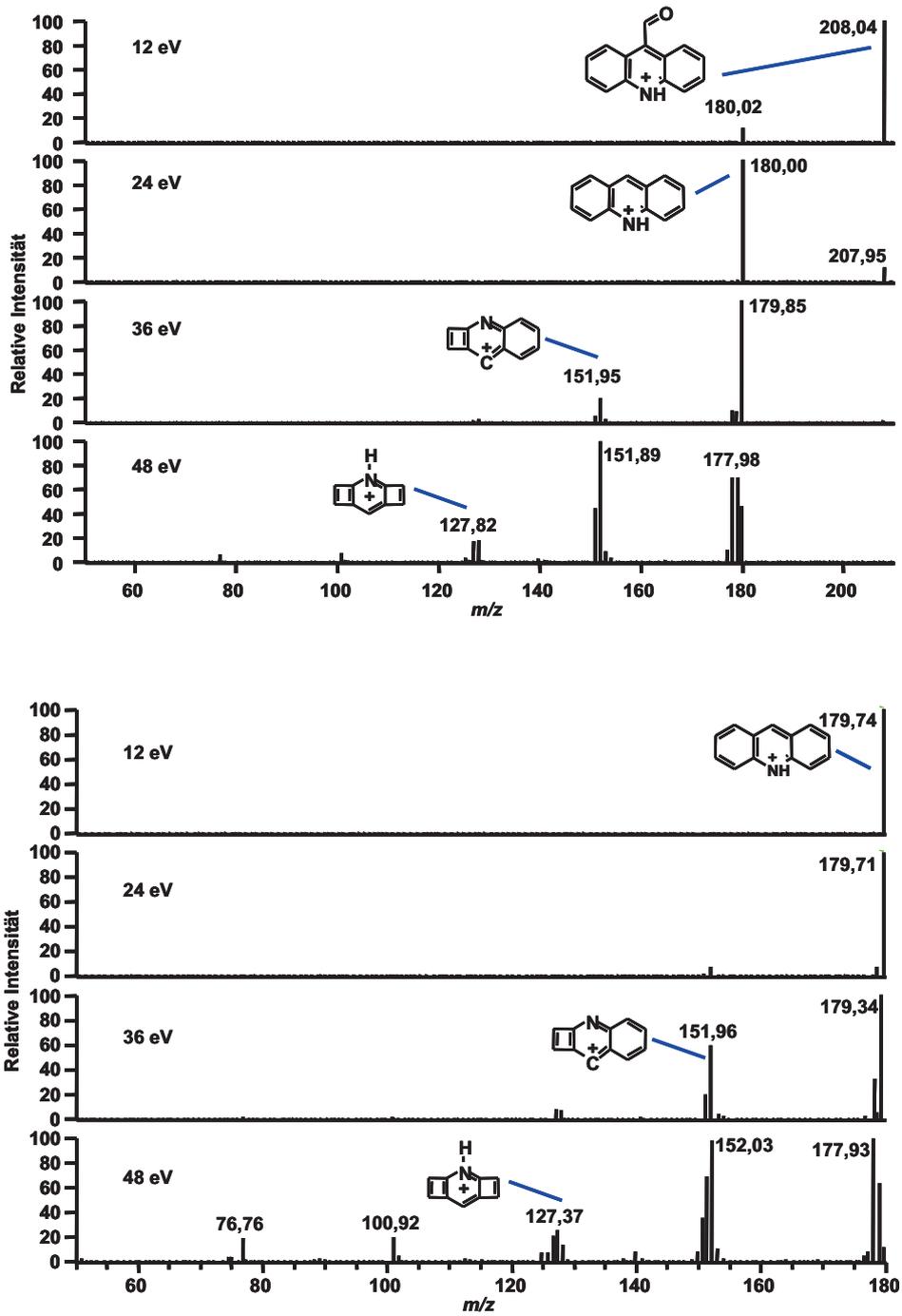


ESI-Spektrum



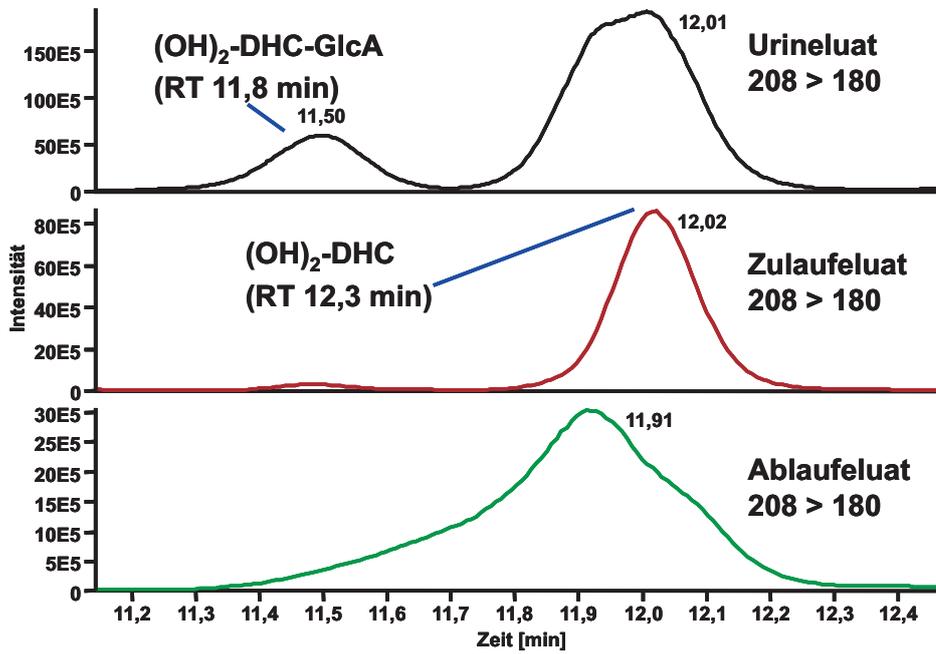
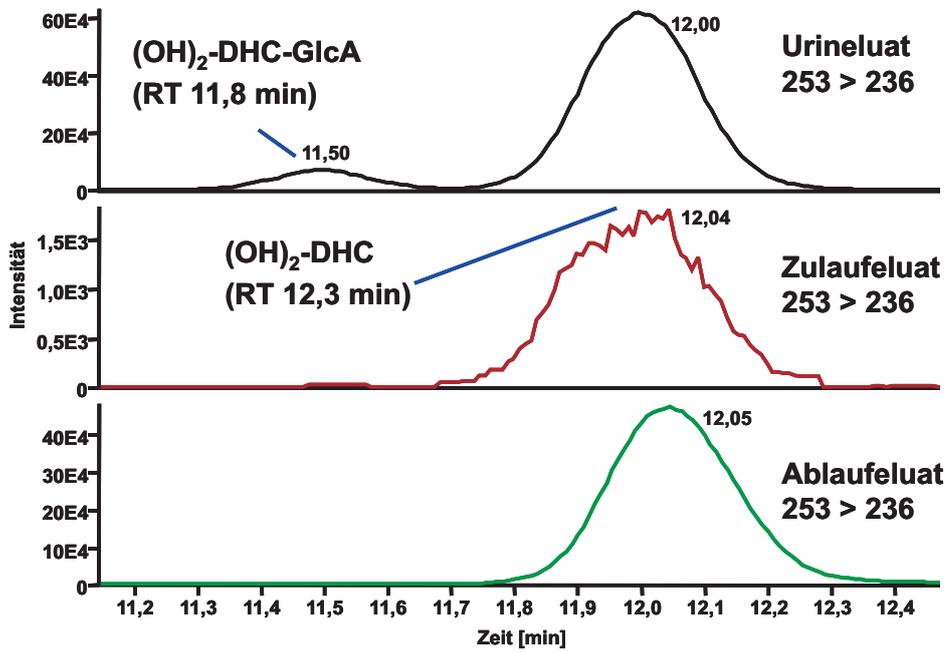
Produktionenspektren





MRM-Chromatogramme

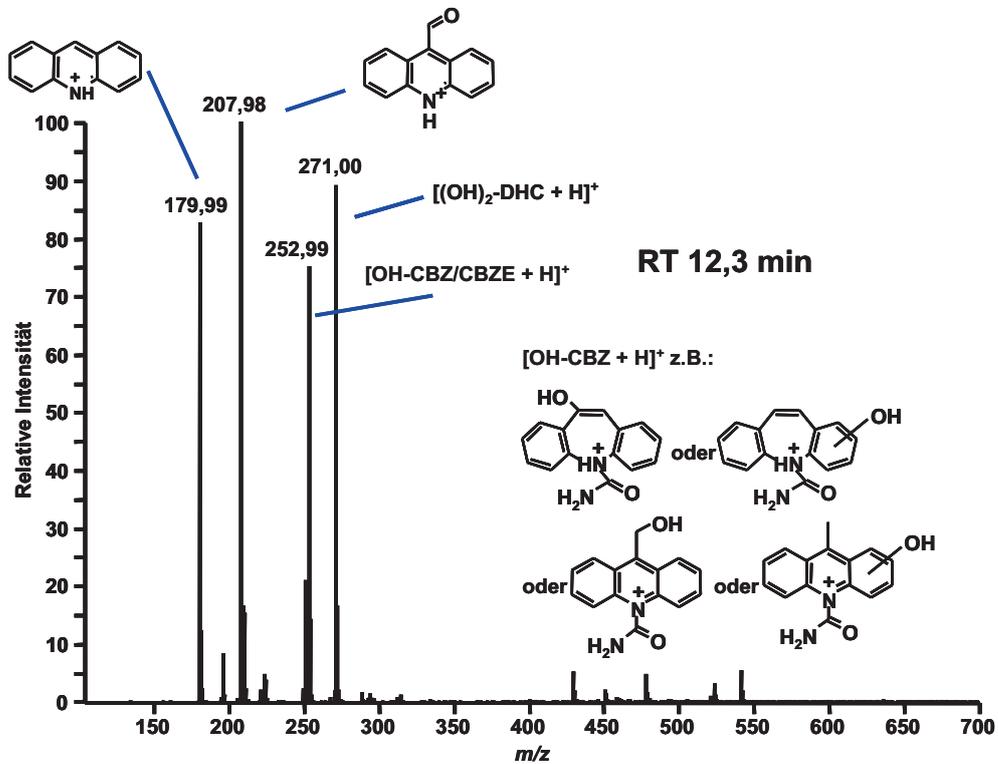
Durch eine Änderung im Aufbau des Instruments sind die RT leicht verkürzt.



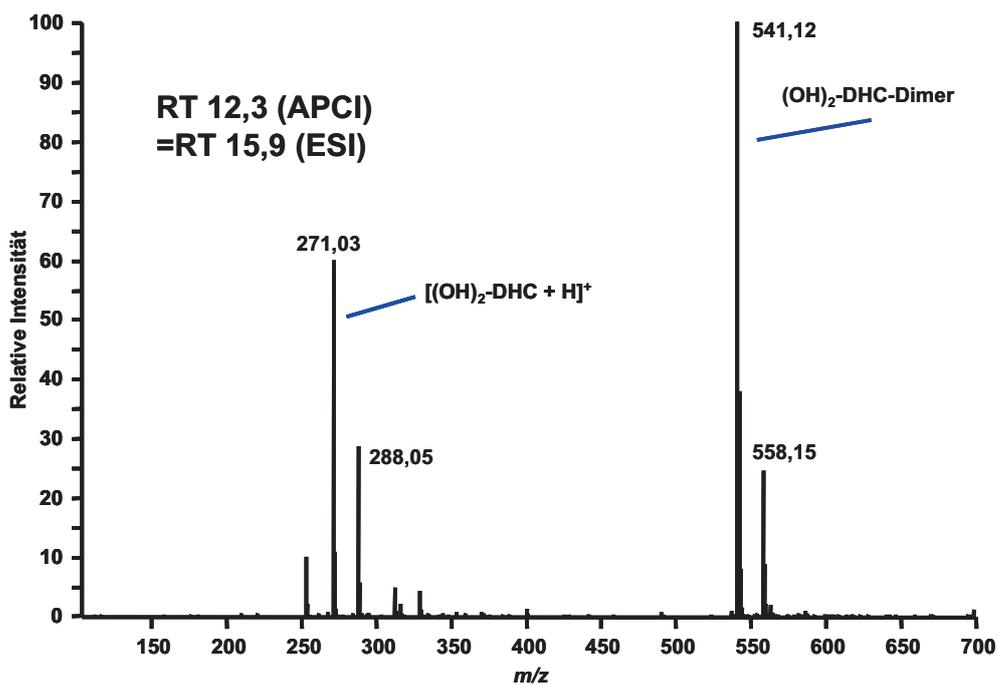
C.1.1.7 Retentionszeit 12,3 min

Fullscanspektren

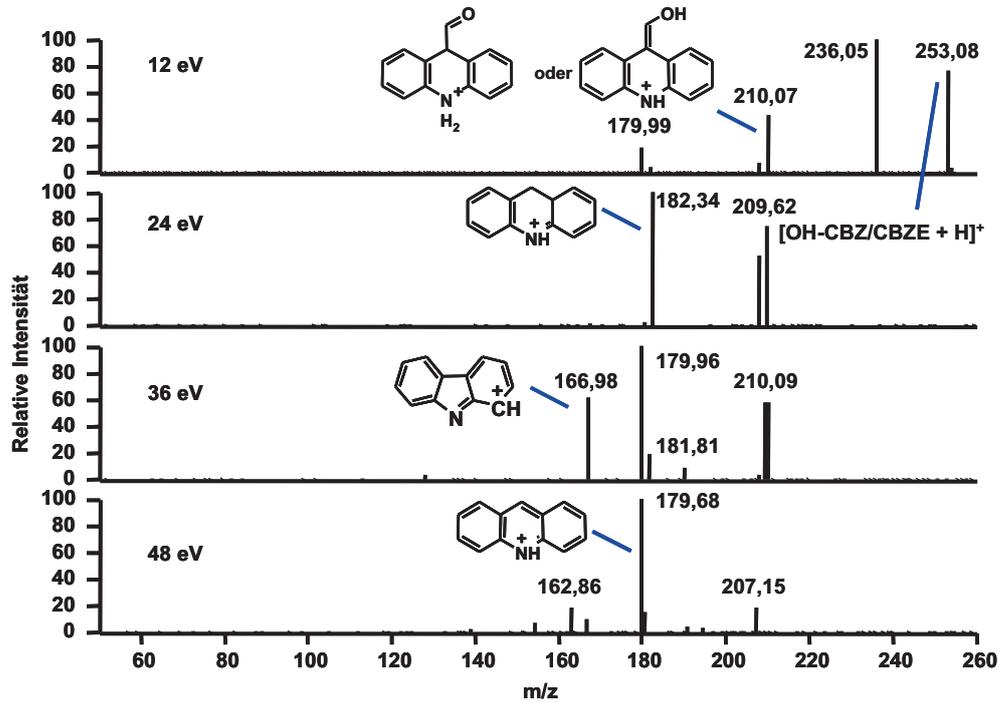
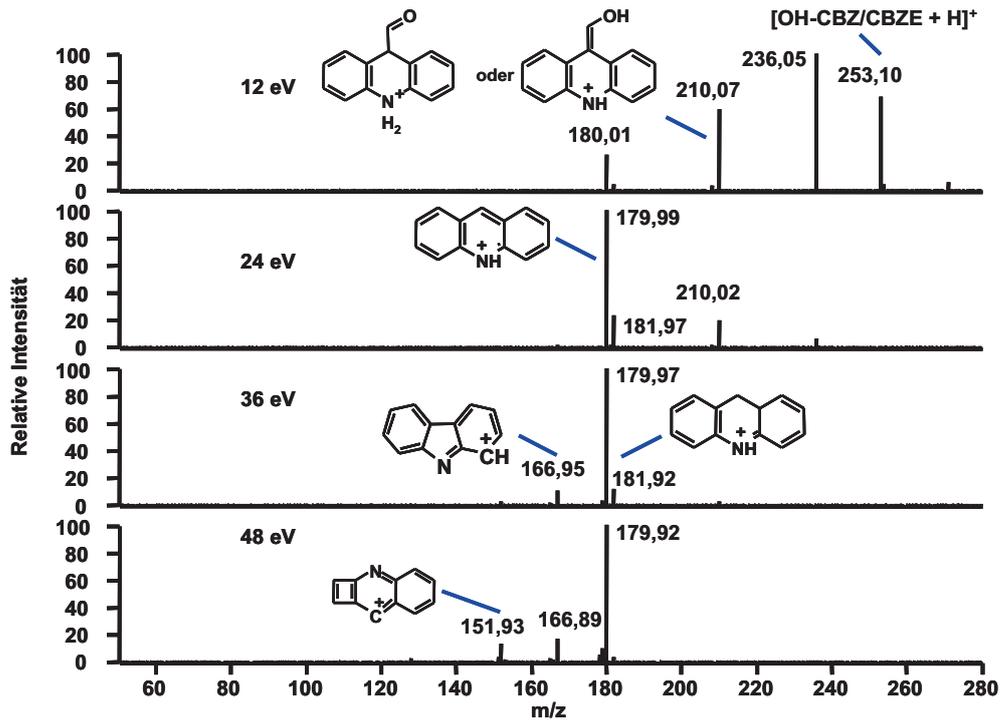
APCI-Spektrum

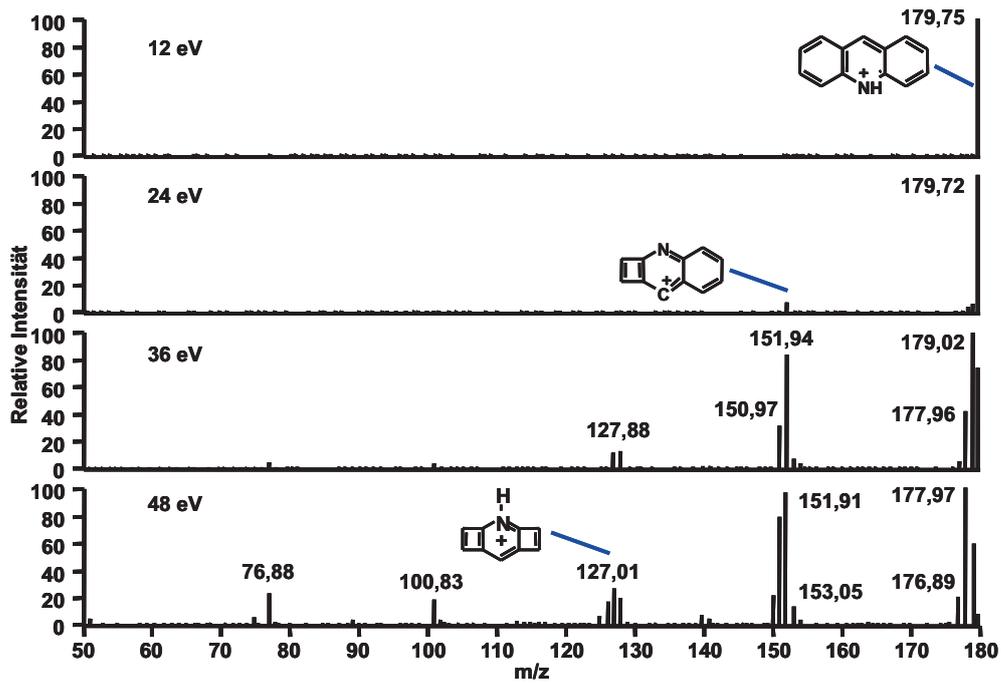
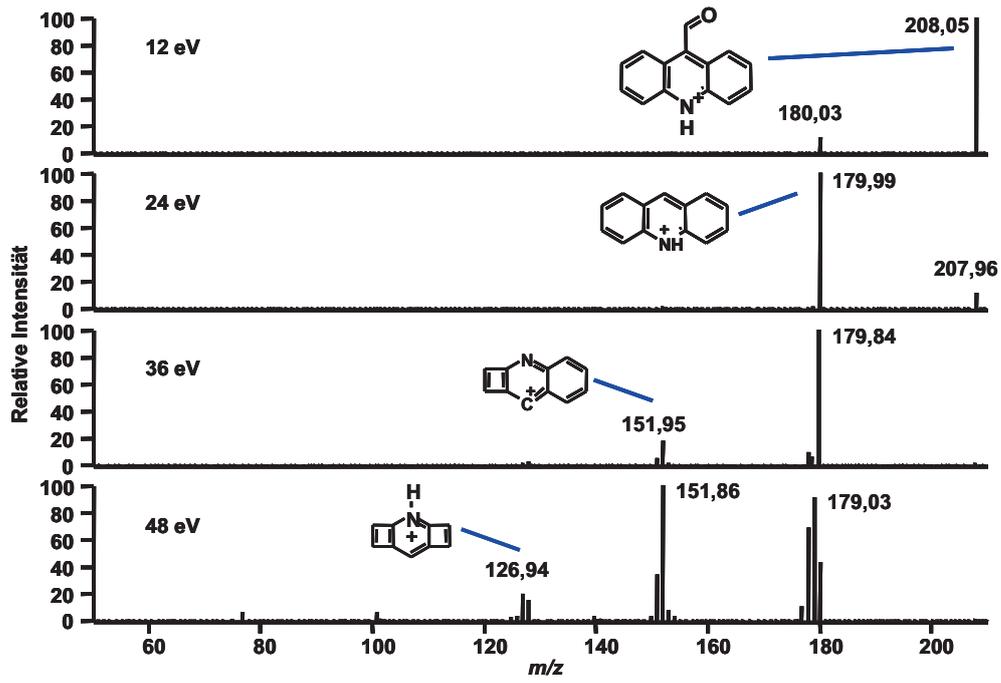


ESI-Spektrum



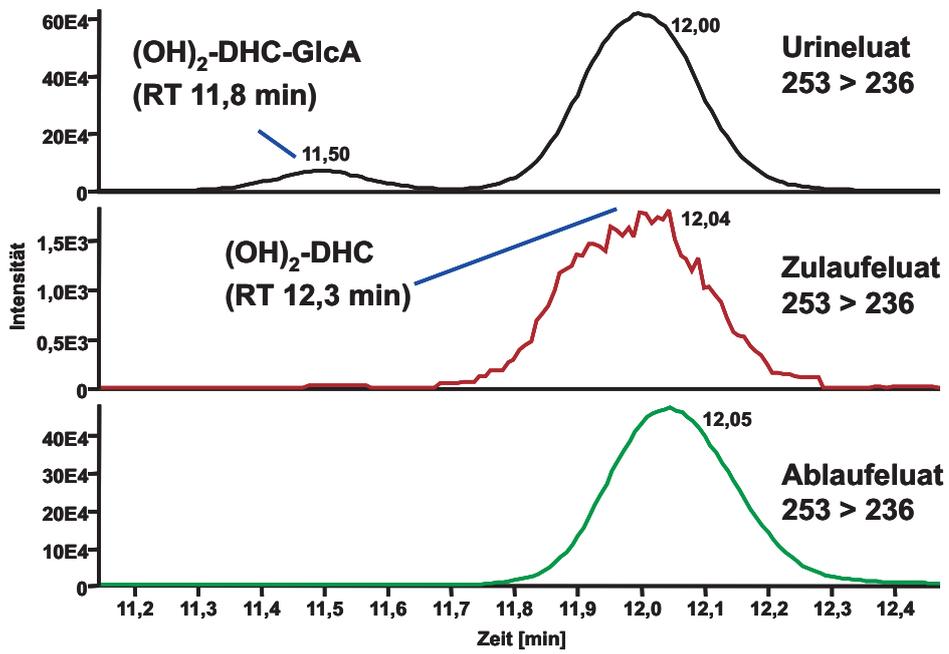
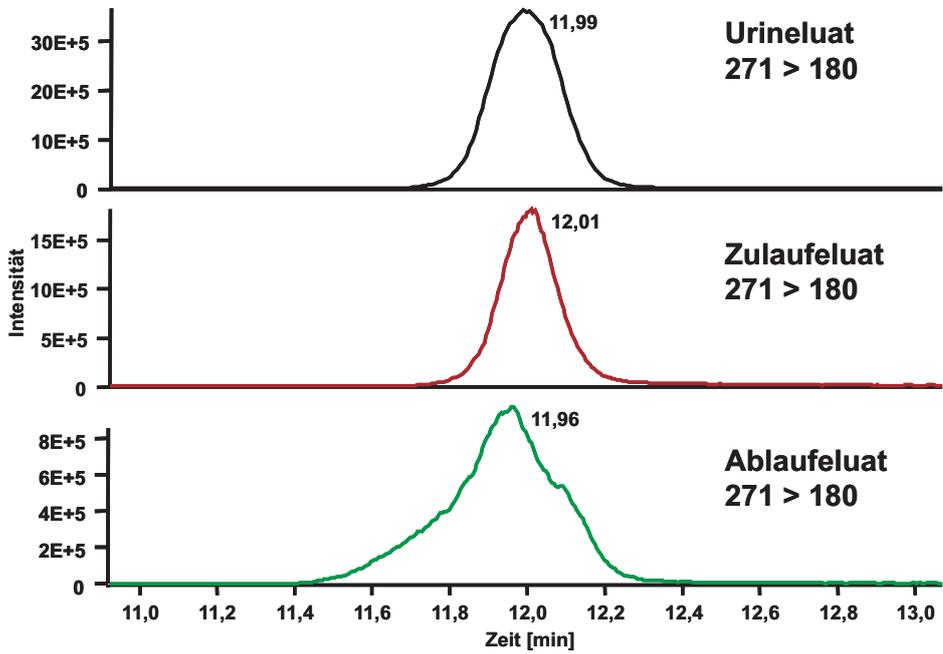
Produktionenspektren

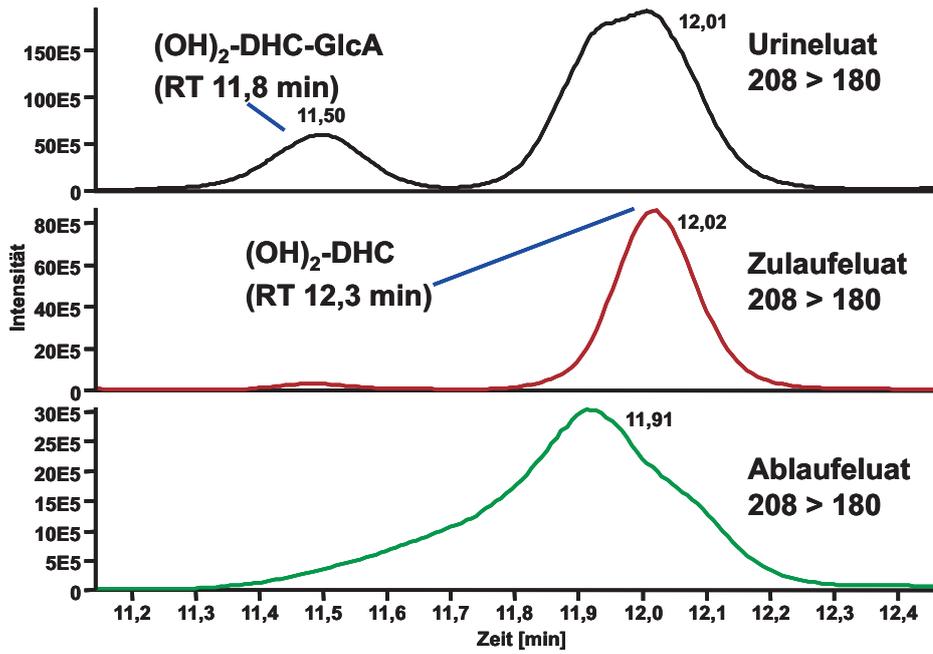




MRM-Chromatogramme

Durch eine Änderung im Aufbau des Instruments sind die RT leicht verkürzt.

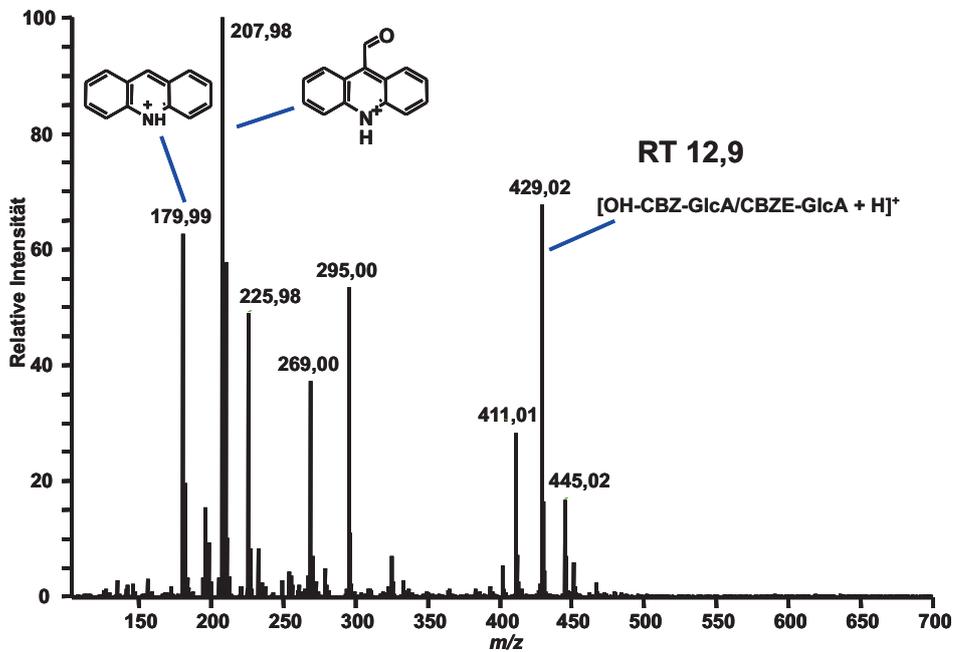




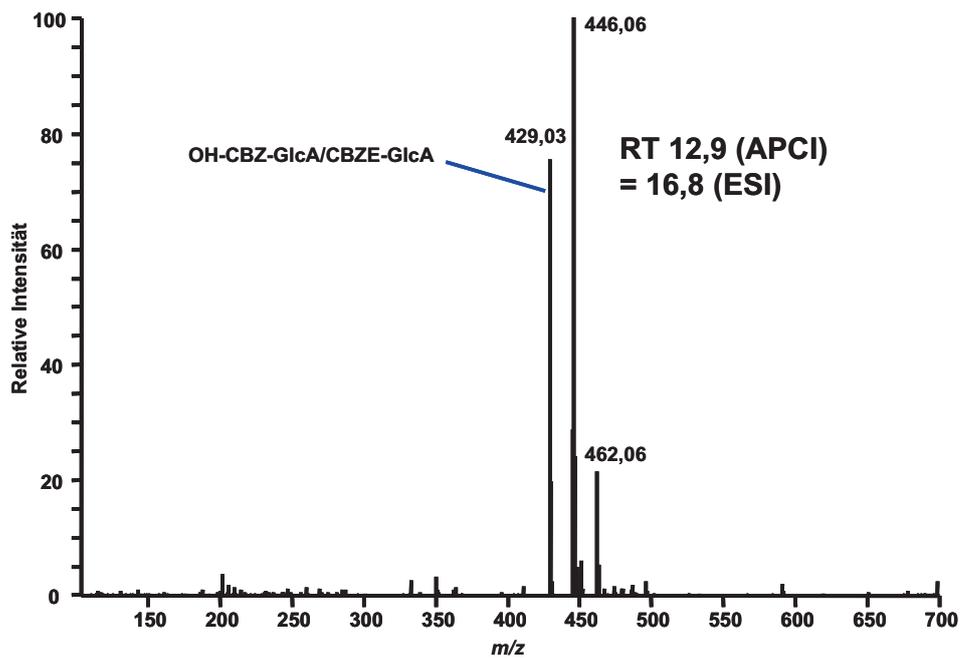
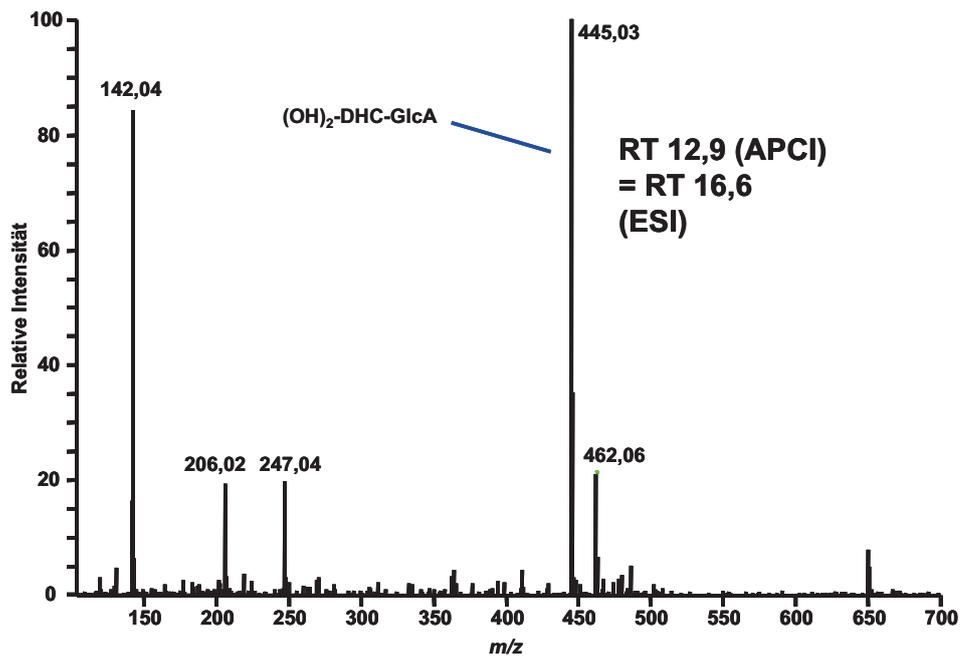
C.1.1.8 Retentionszeit 12,9 min

Fullscanspektren

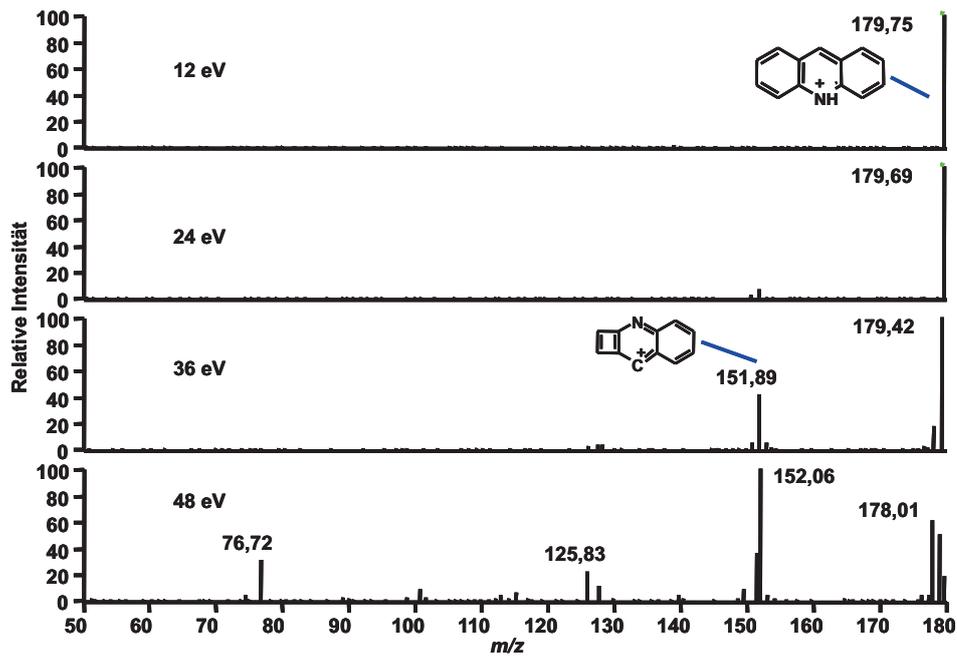
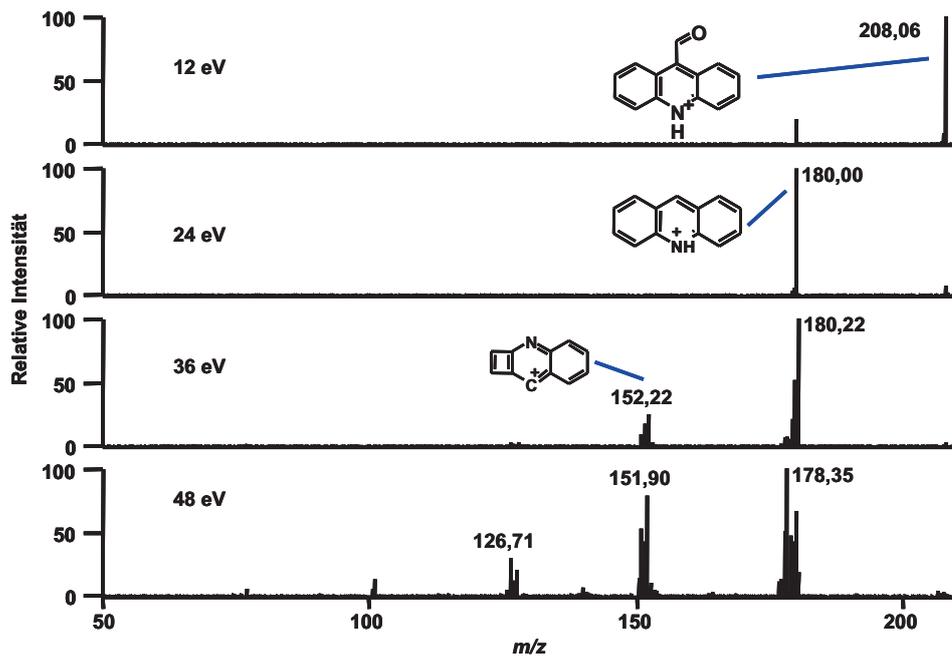
APCI-Spektrum



ESI-Spektren

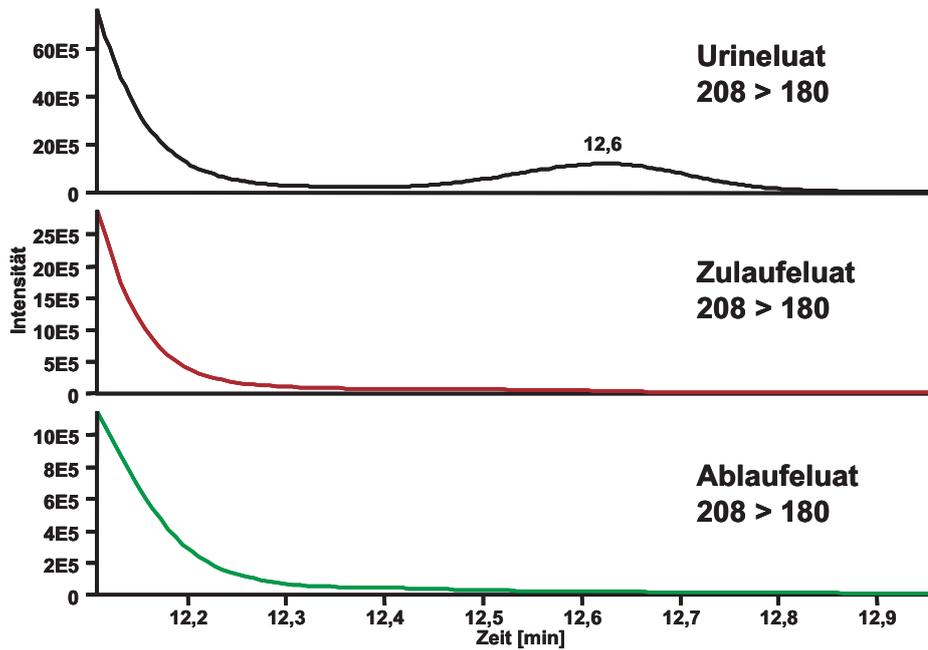


Produktionenspektren



MRM-Chromatogramme

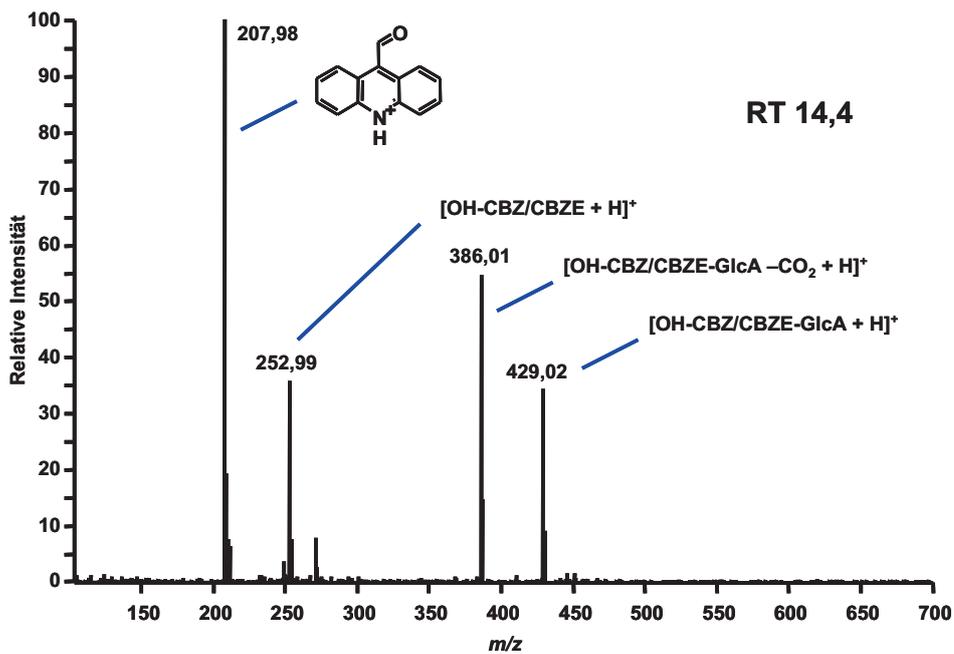
Durch eine Änderung im Aufbau des Instruments sind die RT leicht verkürzt.



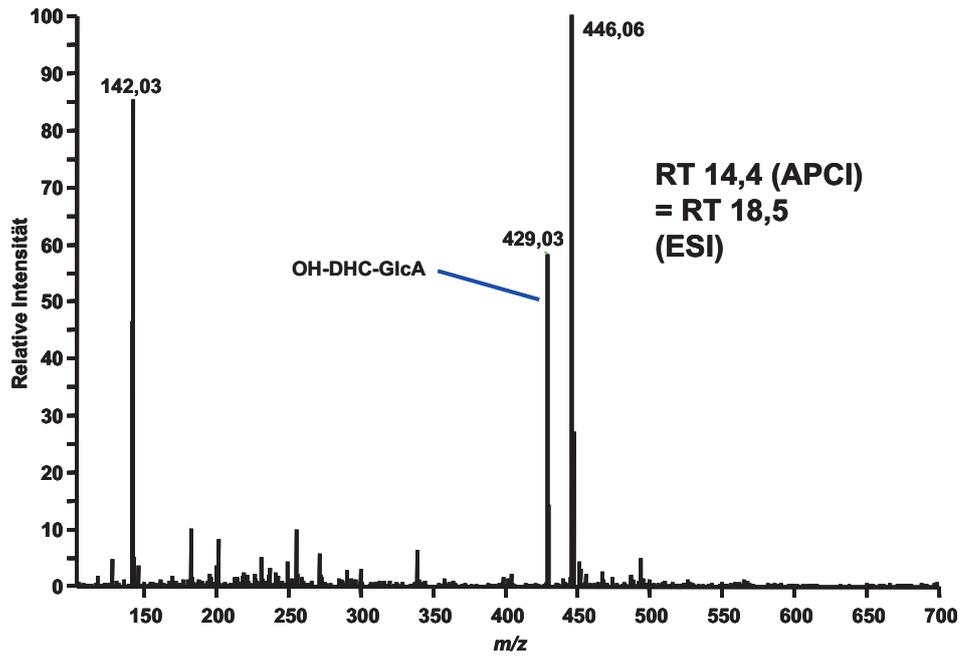
C.1.1.9 Retentionszeit 14,4 min

Fullscanspektren

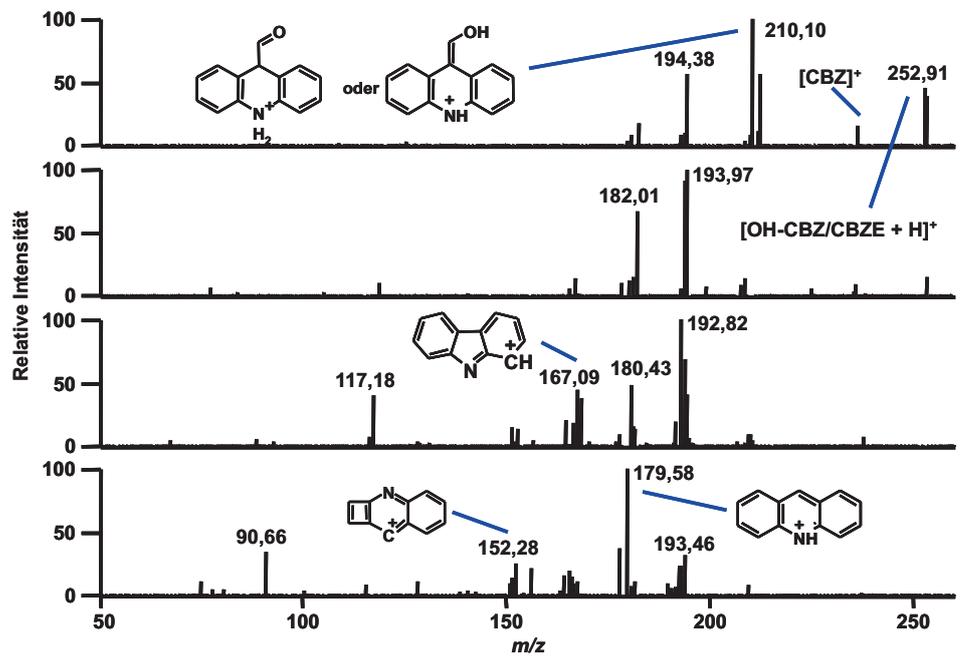
APCI-Spektrum

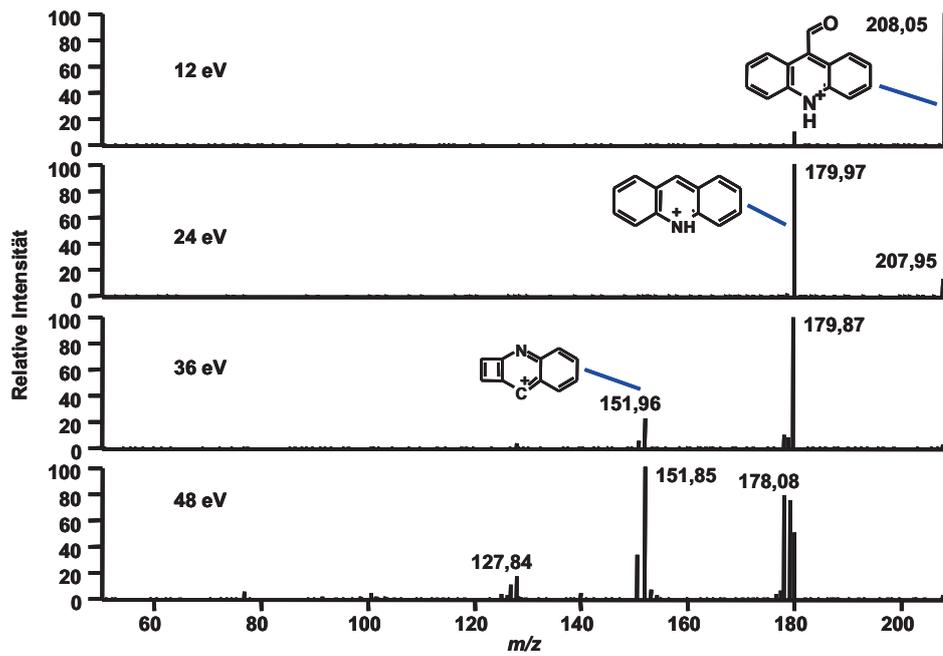


ESI-Spektrum



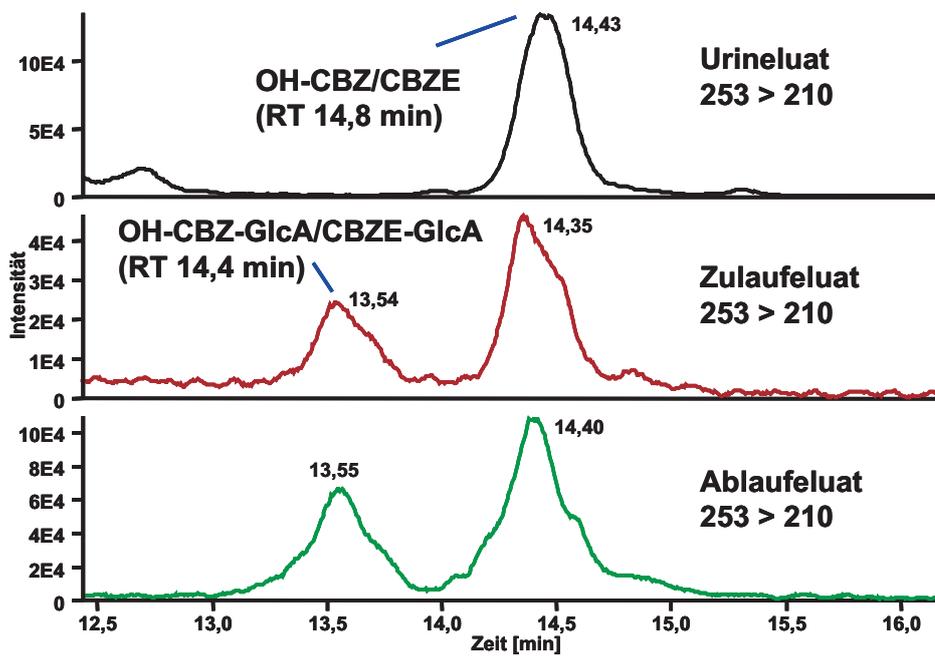
Produktionenspektren





MRM-Chromatogramme

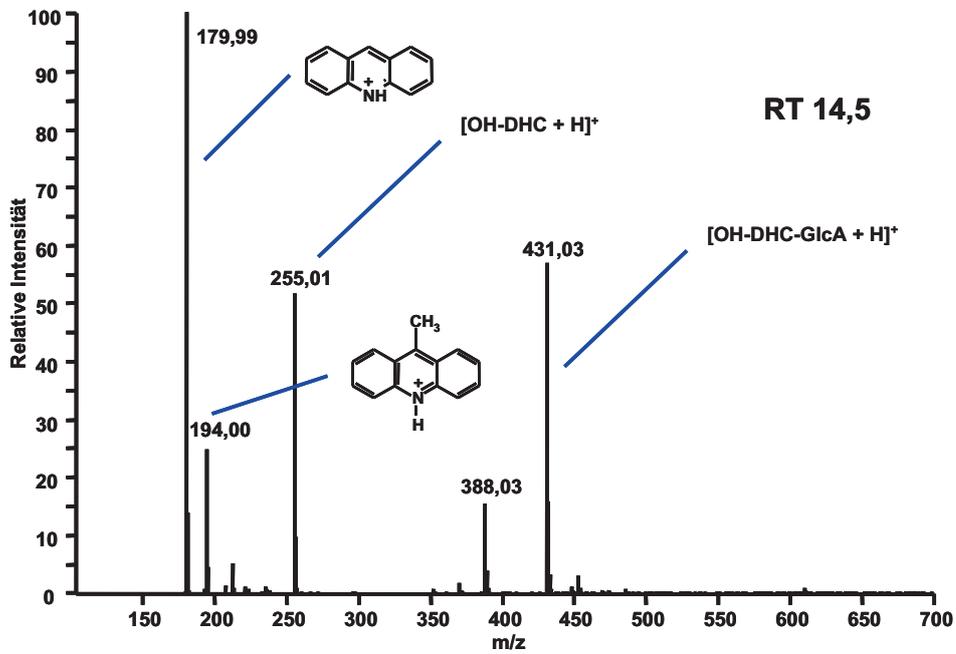
Durch eine Änderung im Aufbau des Instruments sind die RT etwas verkürzt.



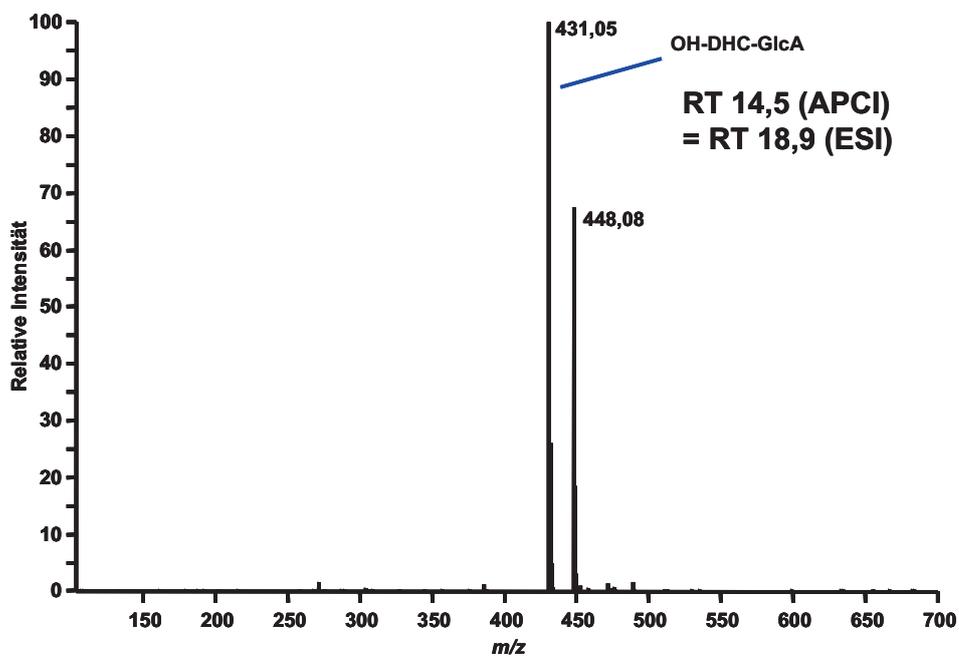
C.1.1.10 Retentionszeit 14,5 min

Fullscanspektren

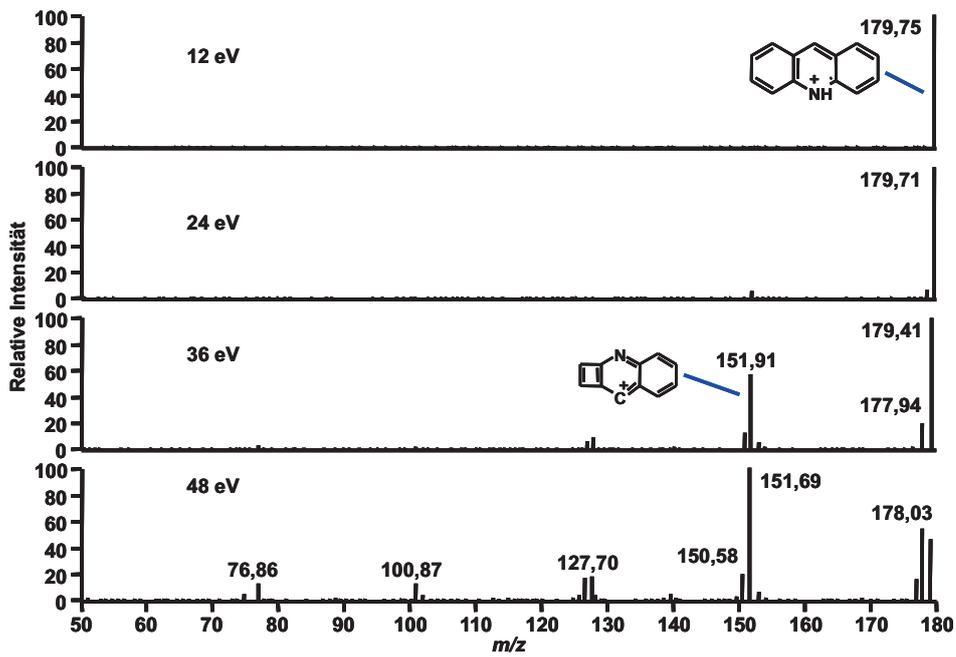
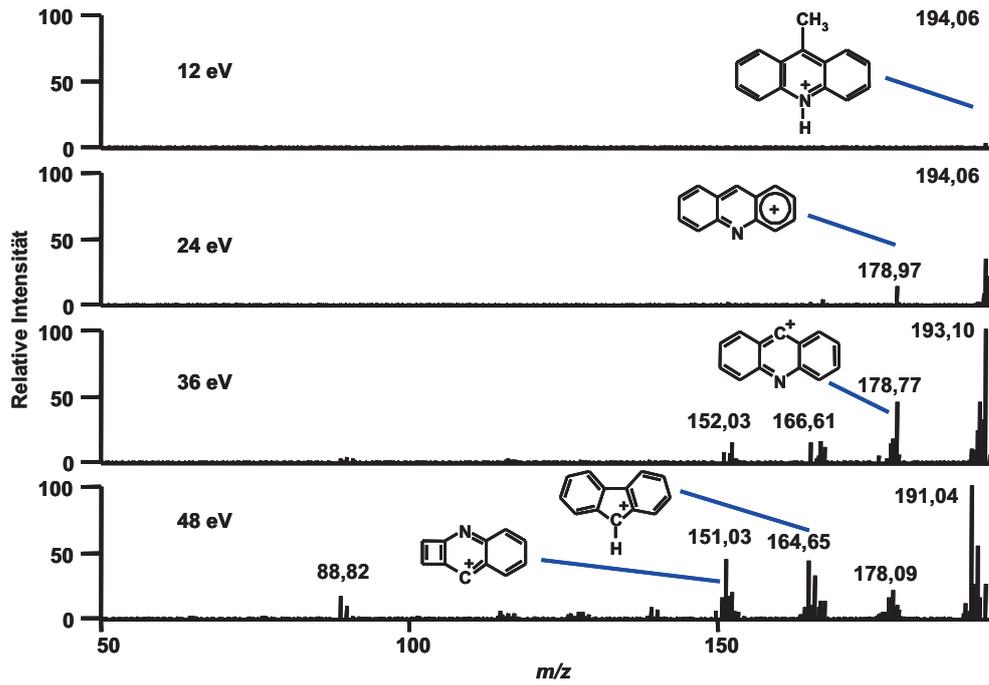
APCI-Spektrum



ESI-Spektrum

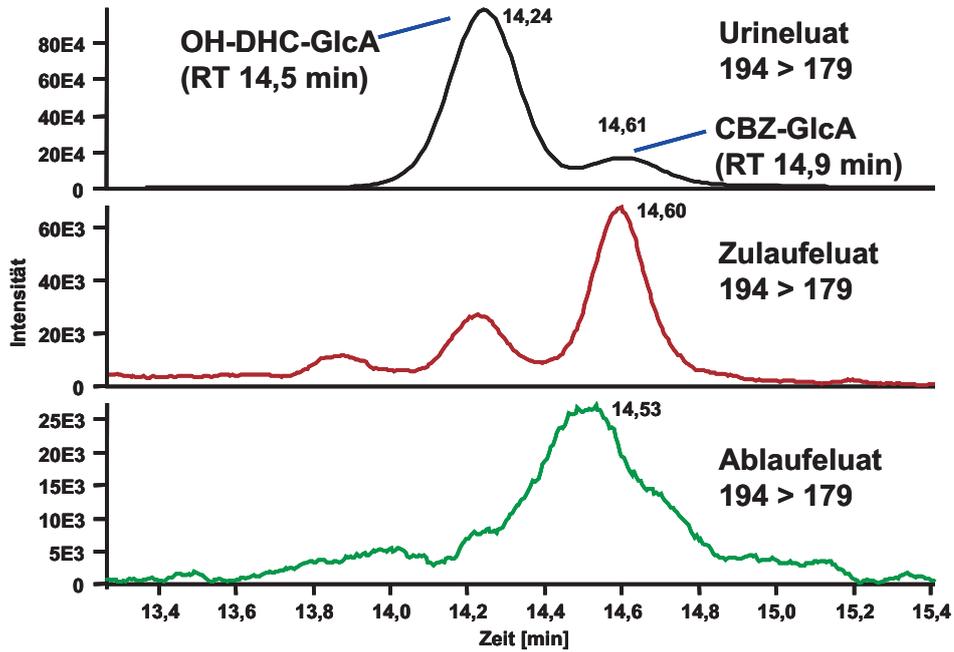


Produktionenspektren



MRM-Chromatogramme

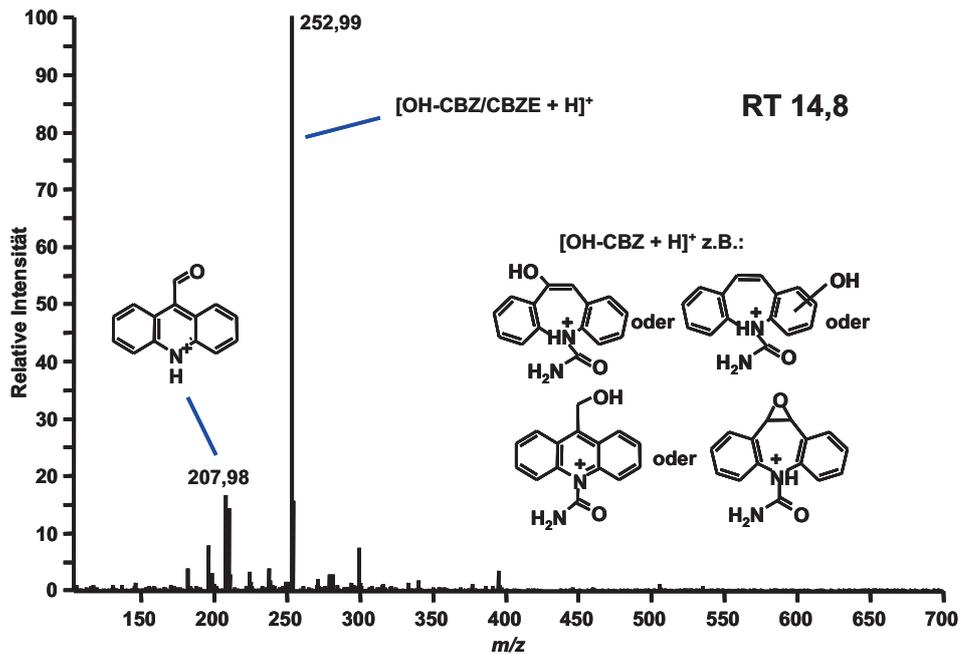
Durch eine Änderung im Aufbau des Instruments sind die RT leicht verkürzt.



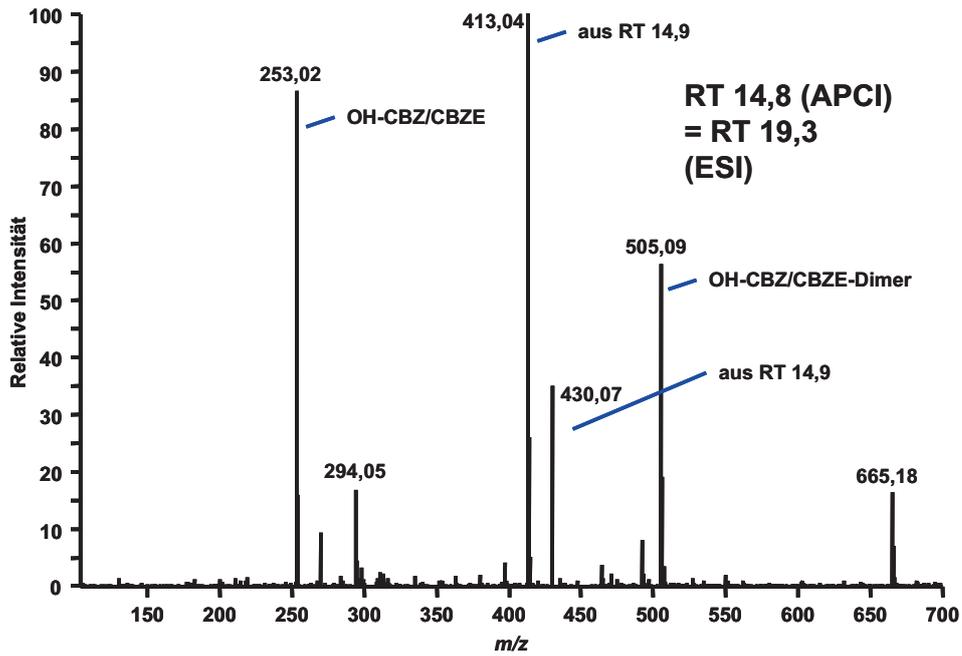
C.1.1.11 Retentionszeit 14,8 min

Fullscanspektren

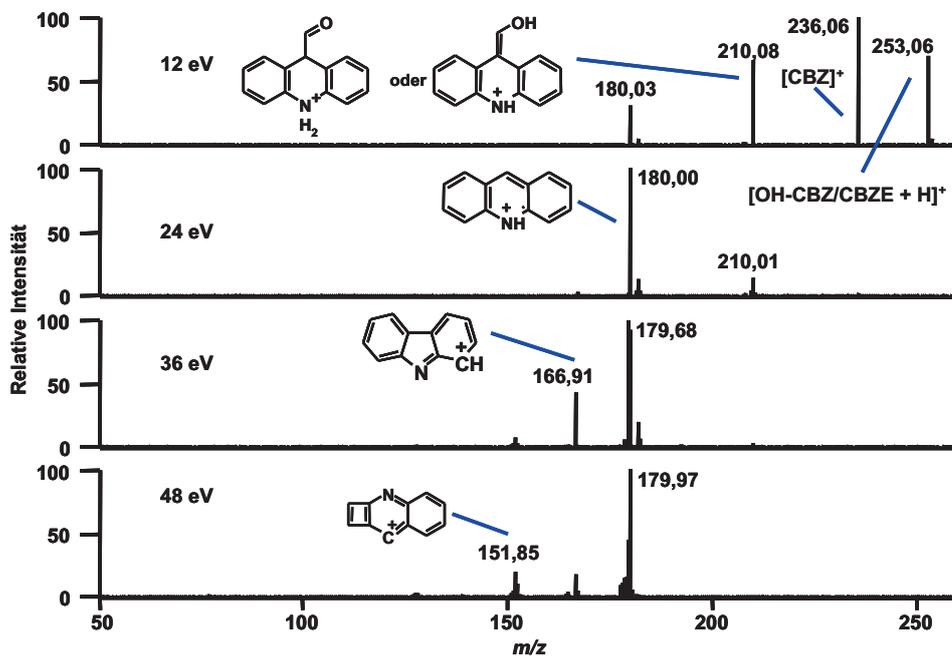
APCI-Spektrum

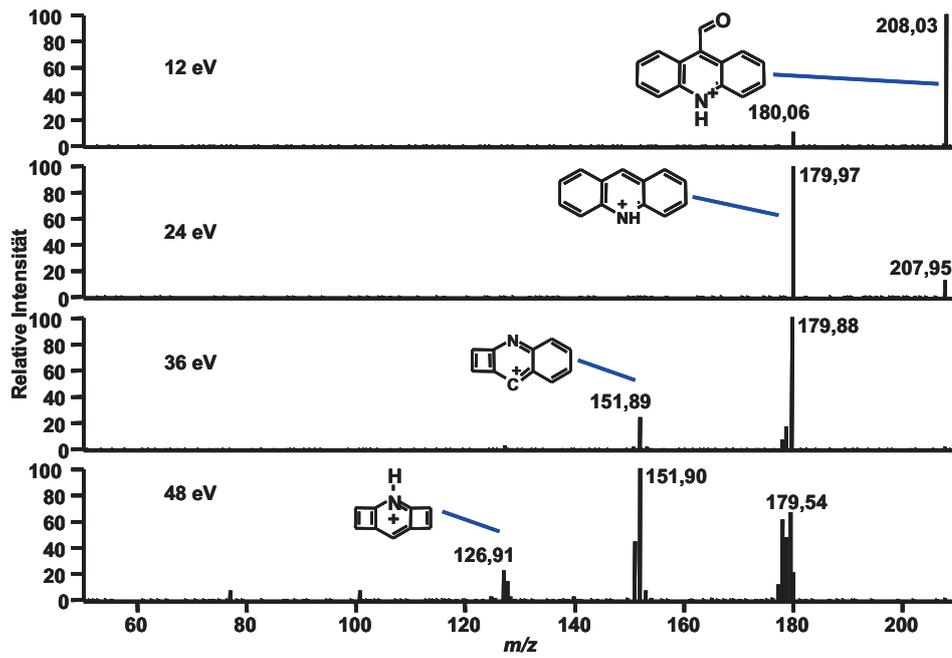


ESI-Spektrum



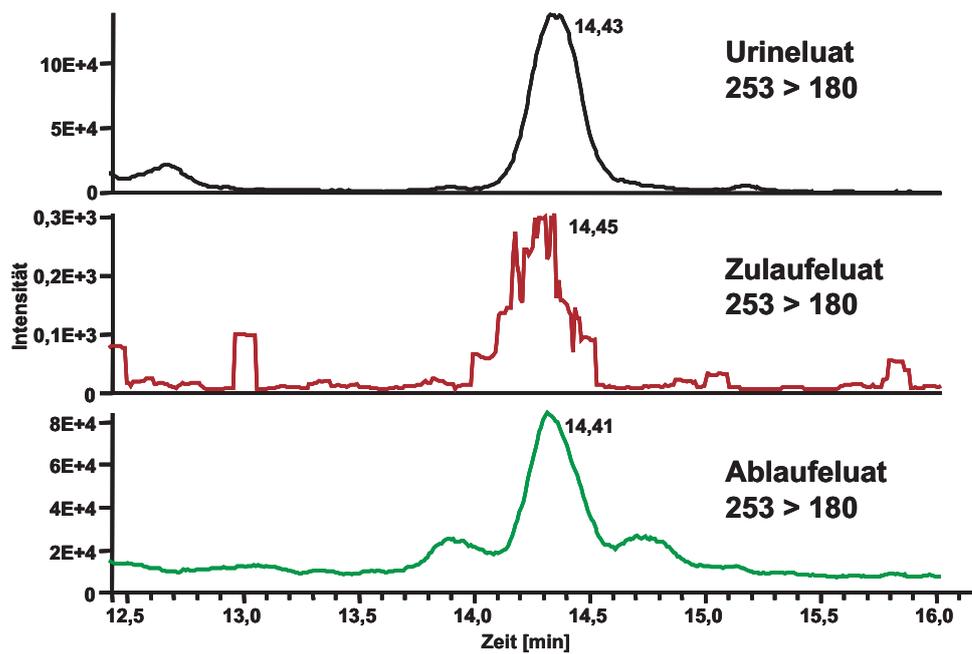
Produktionenspektren

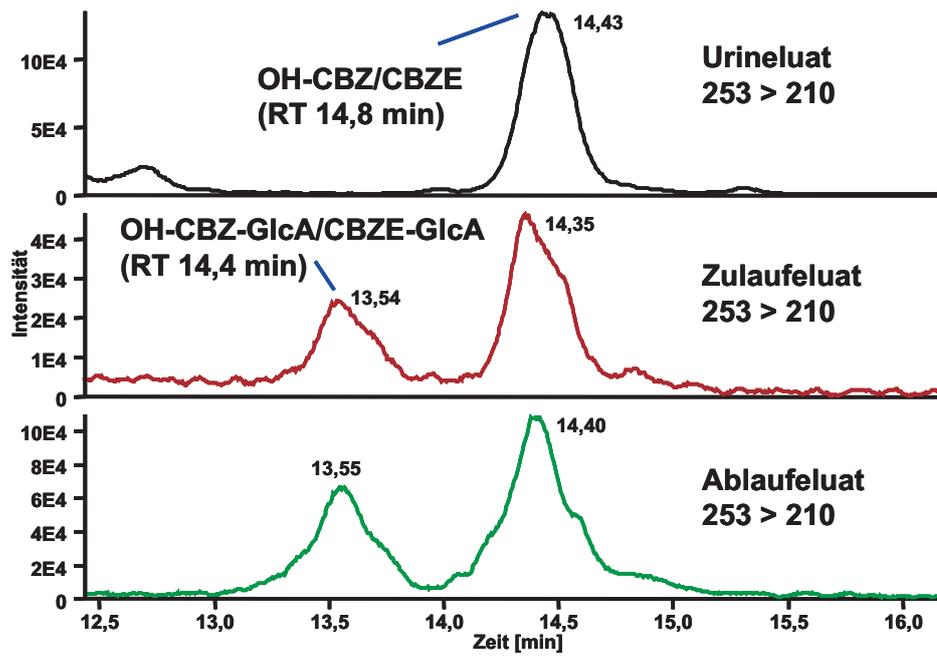




MRM-Chromatogramme

Durch eine Änderung im Aufbau des Instruments sind die RT leicht verkürzt.

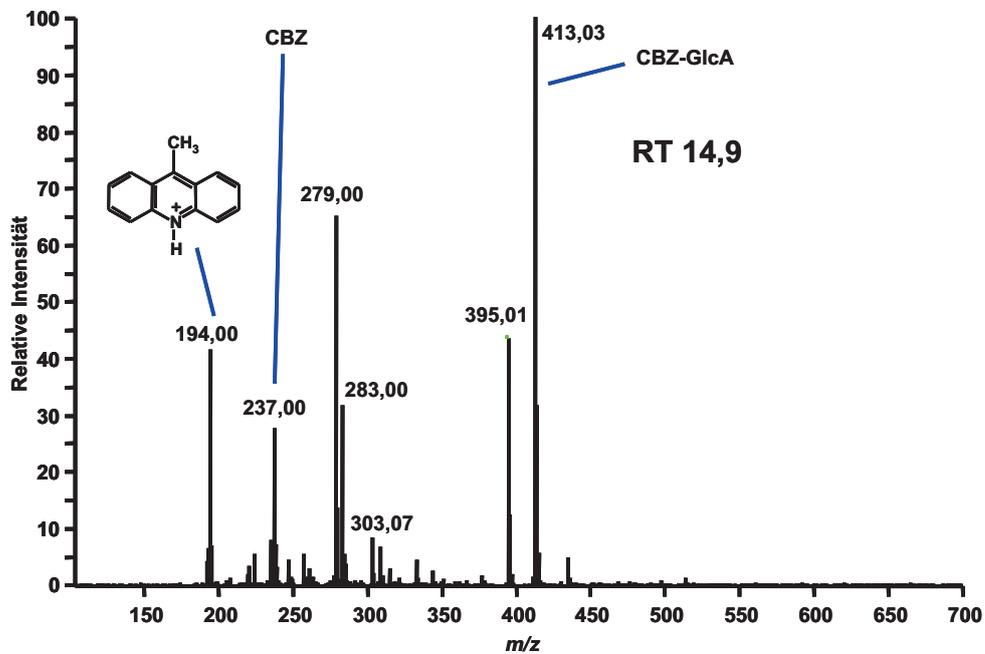




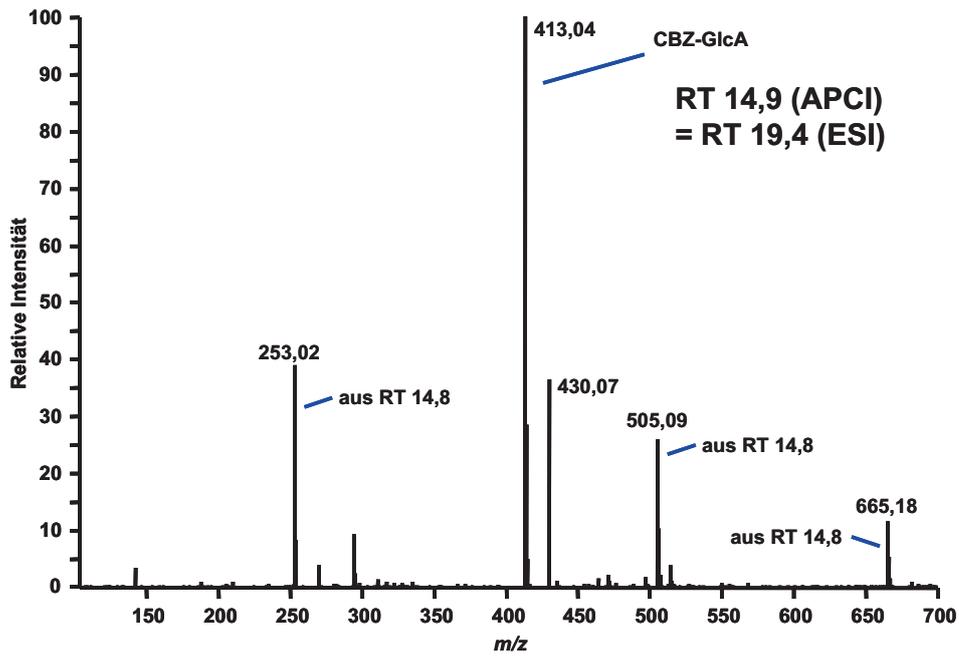
C.1.1.12 Retentionszeit 14,9 min

Fullscanspektren

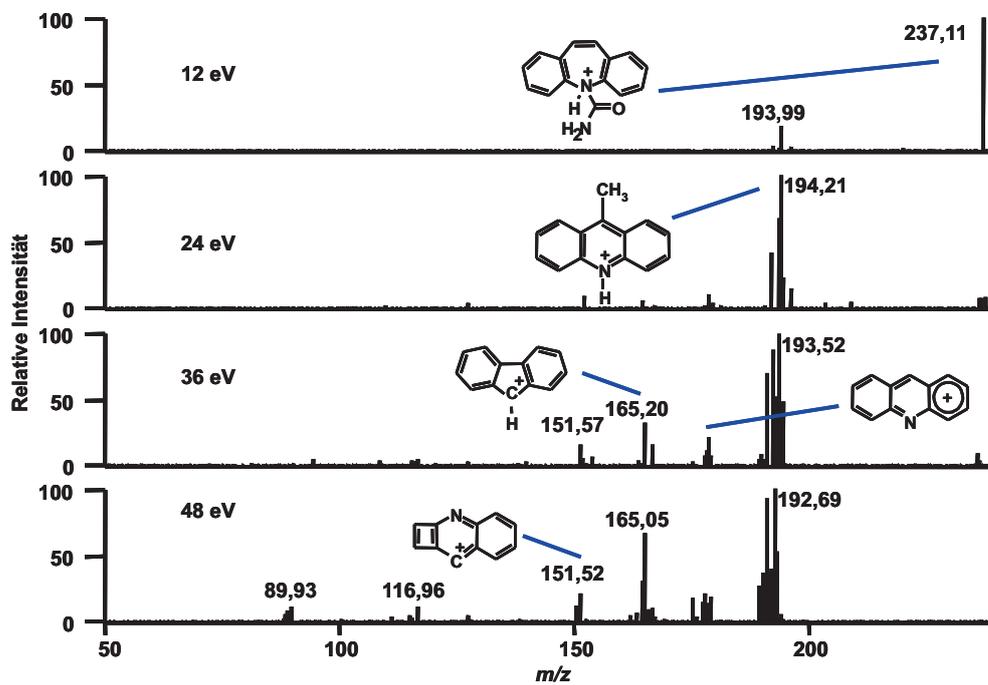
APCI-Spektrum

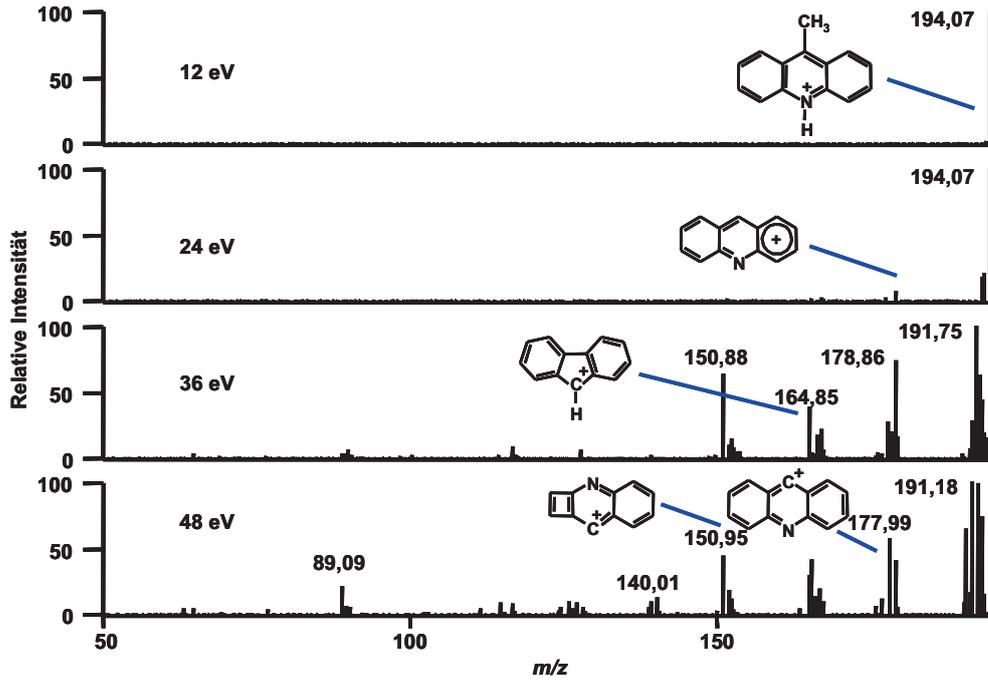


ESI-Spektrum



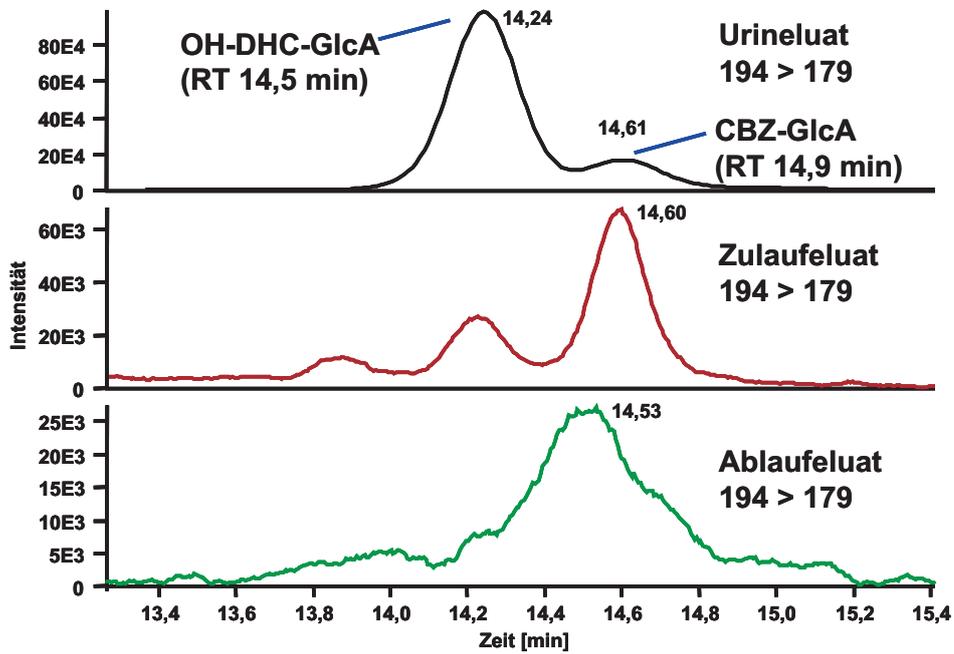
Produktionenspektren





MRM-Chromatogramme

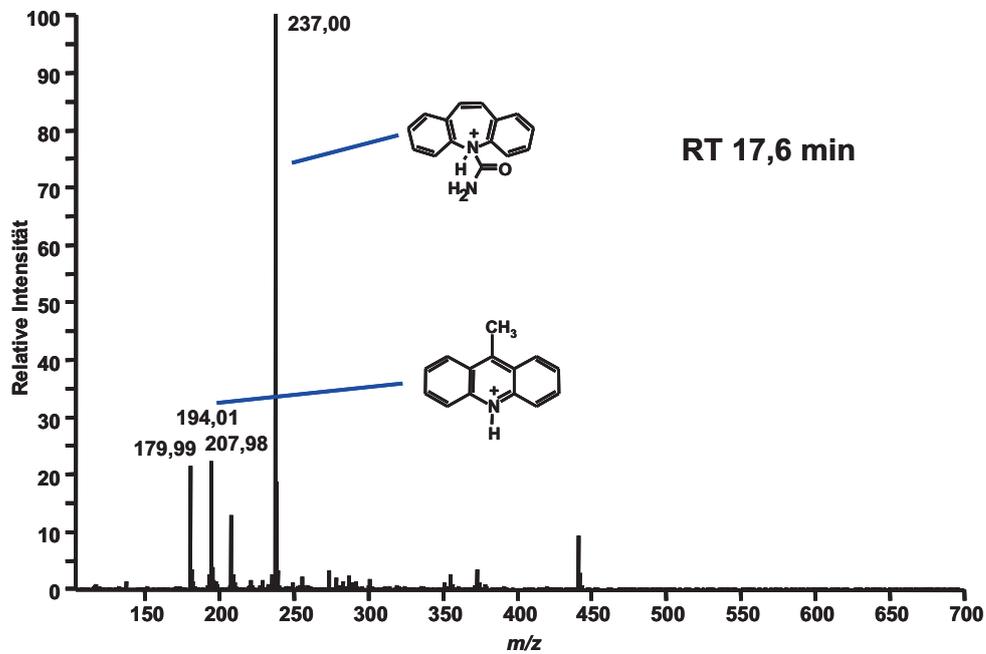
Durch eine Änderung im Aufbau des Instruments sind die RT leicht verkürzt.



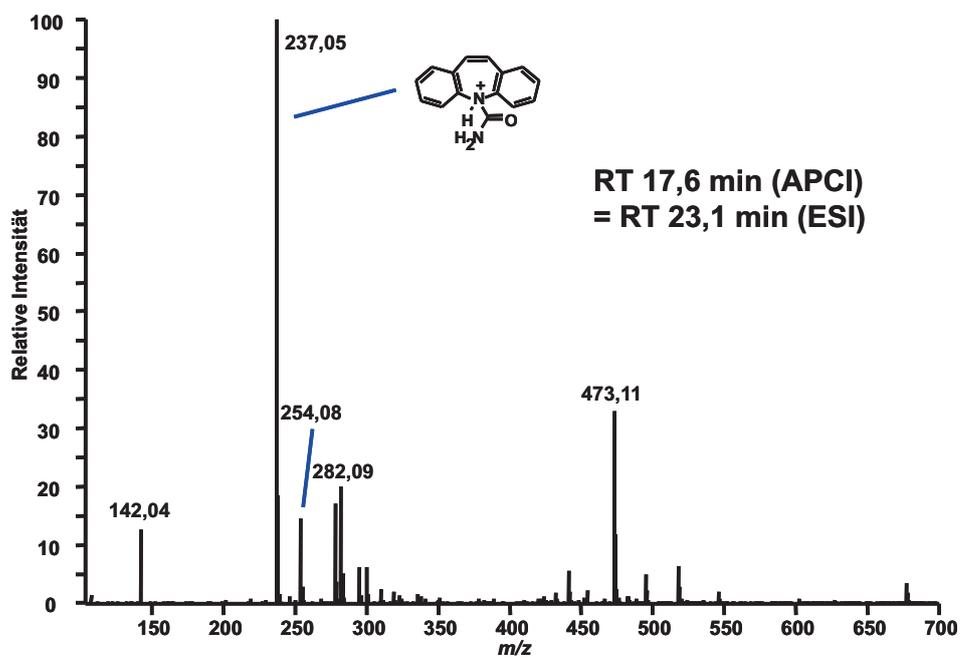
C.1.1.13 Retentionszeit 17,6 min (CBZ)

Fullscanspektren

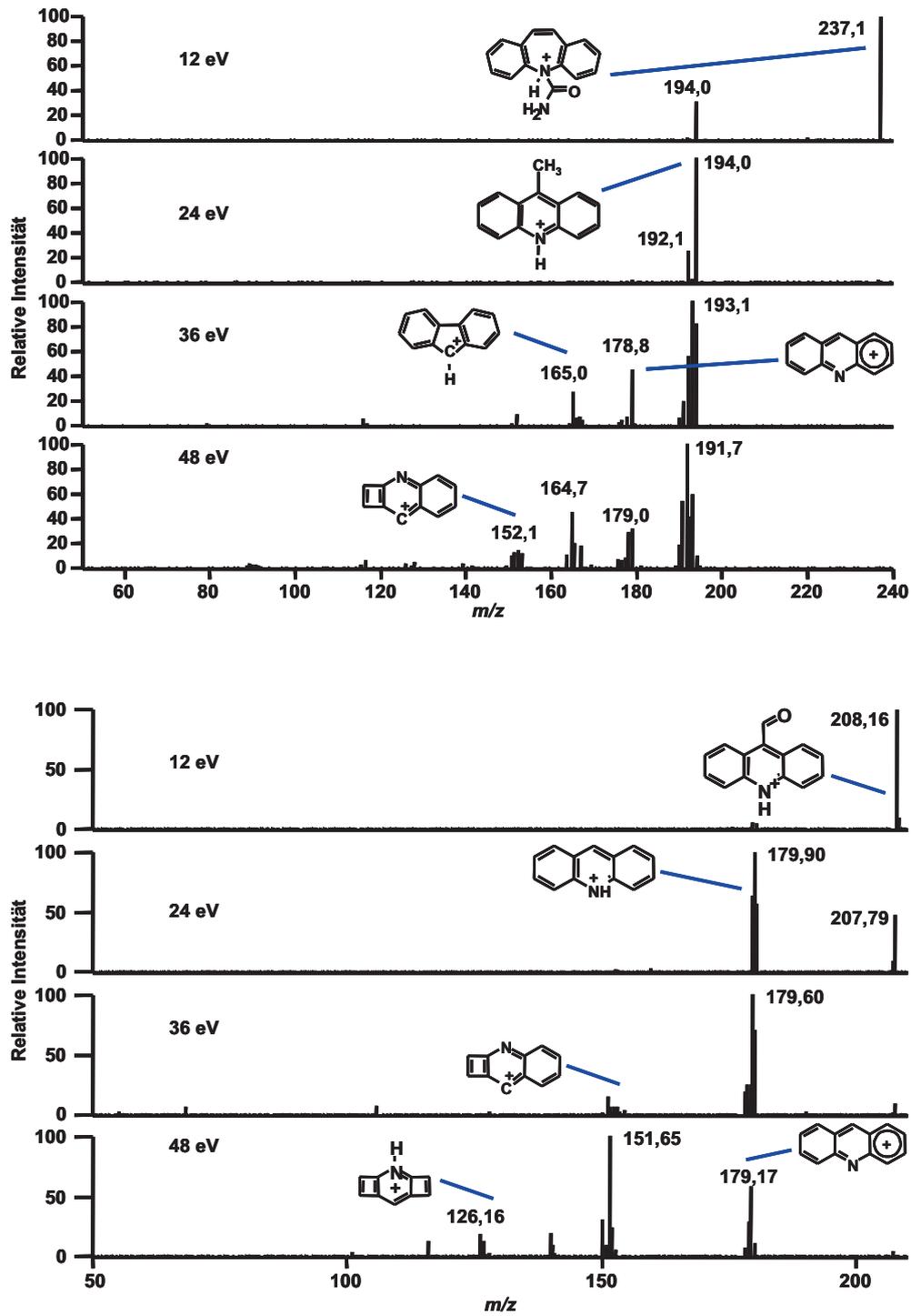
APCI-Spektrum

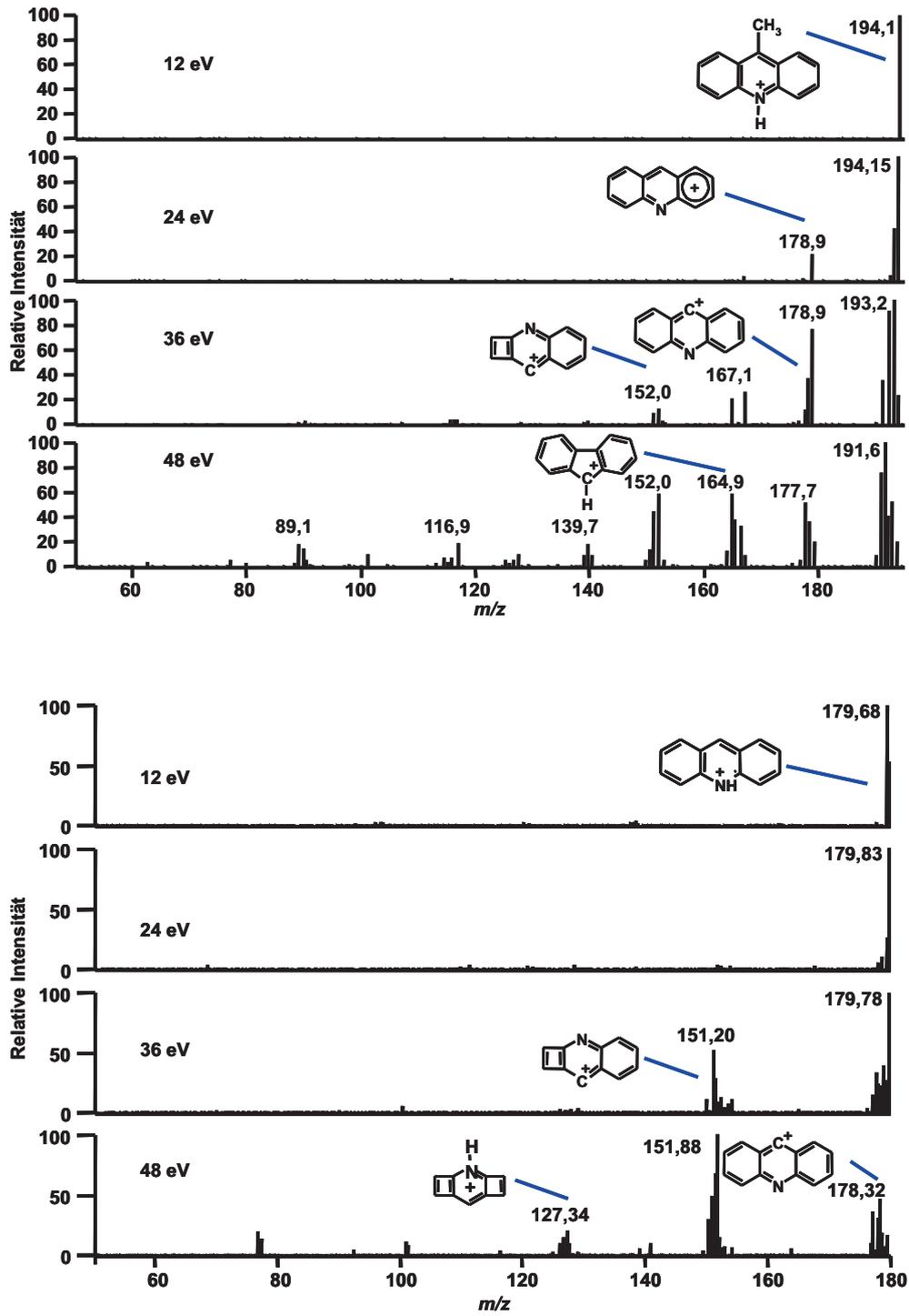


ESI-Spektrum



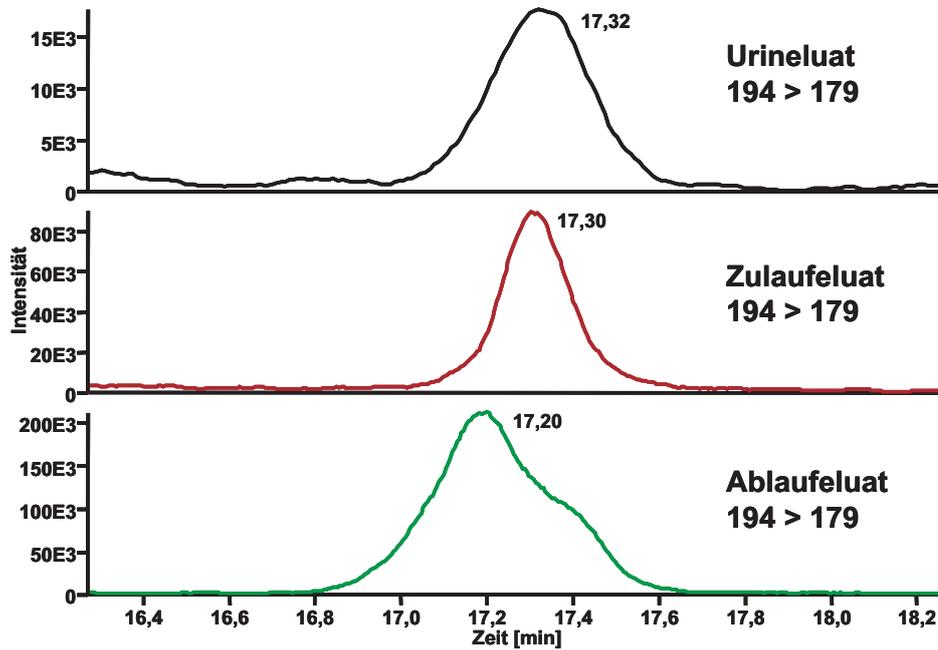
Produktionenspektren





MRM-Chromatogramme

Durch eine Änderung im Aufbau des Instruments sind die RT leicht verkürzt.

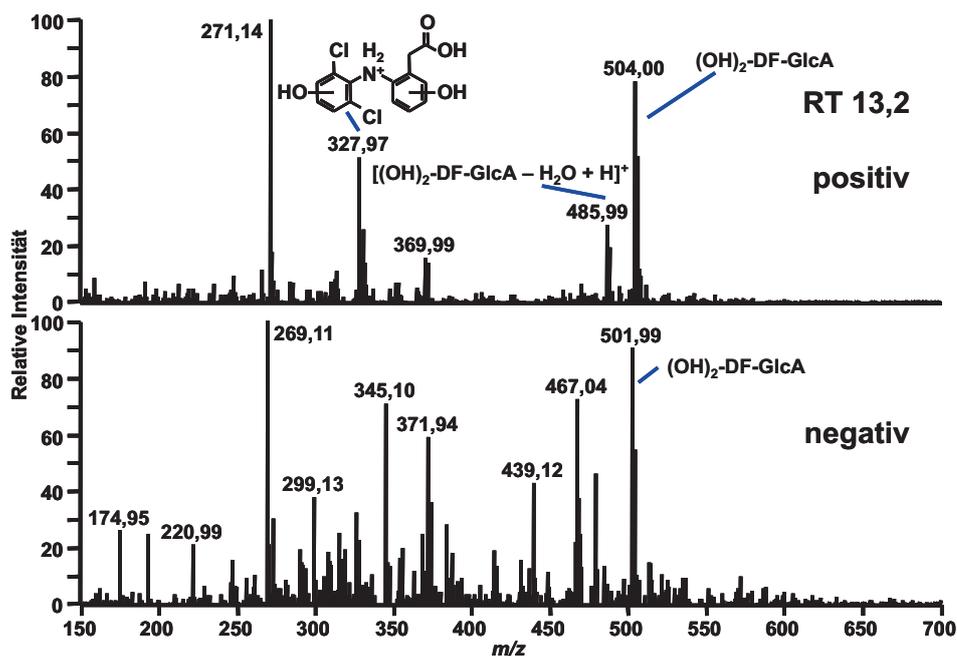


C.1.2 Diclofenac

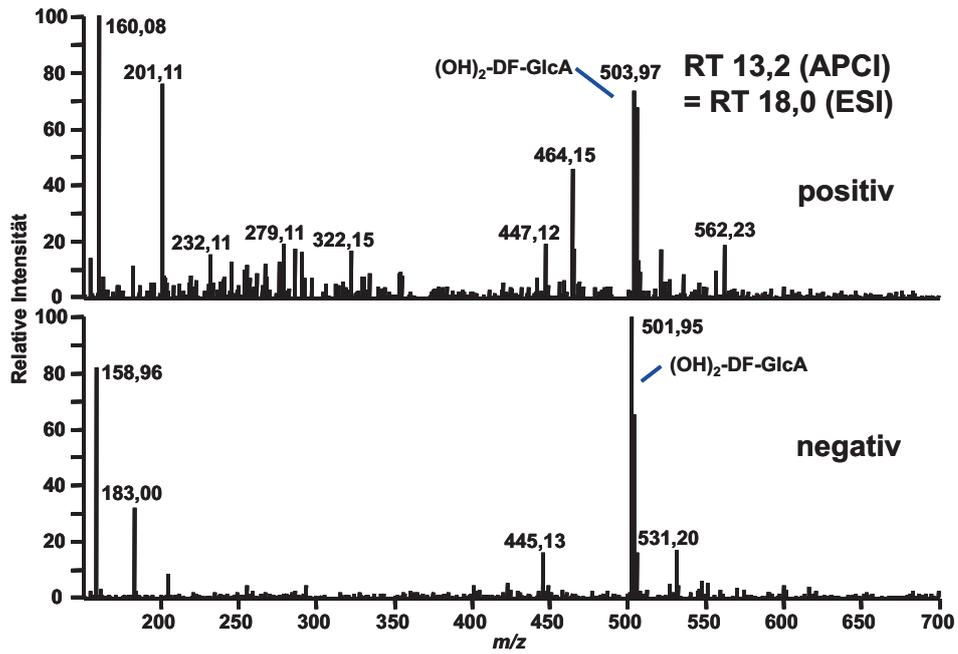
C.1.2.1 Retentionszeit 13,2 min.

Fullscanspektren

APCI-Spektrum

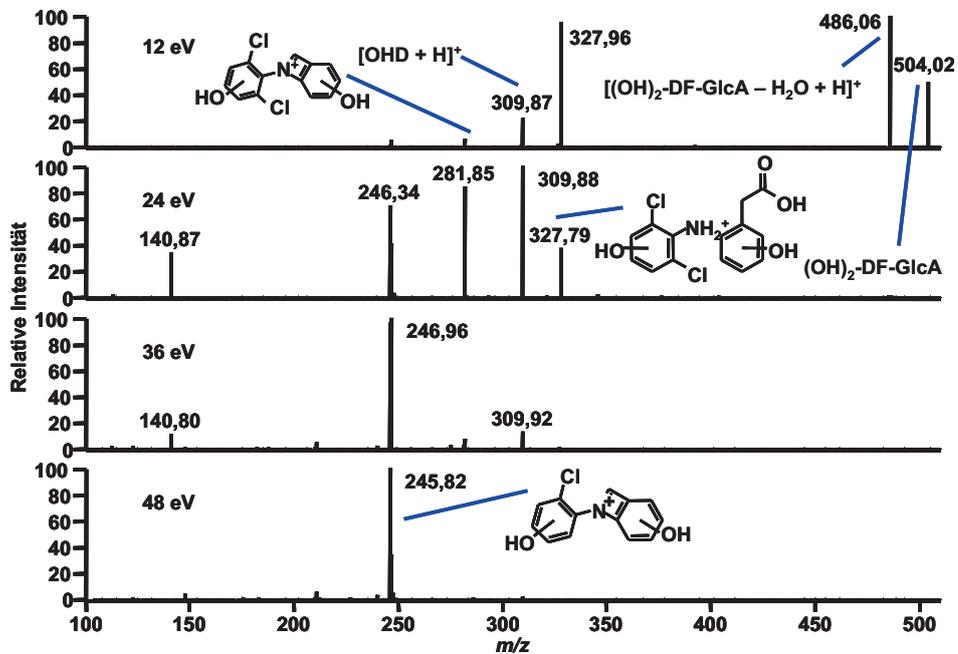


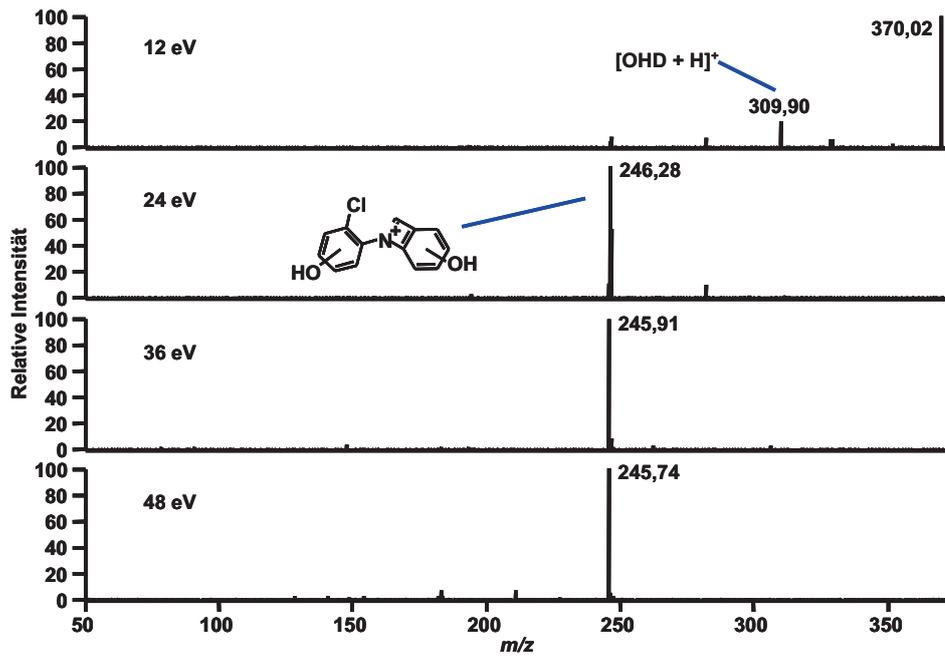
ESI-Spektrum



Produktionenspektren

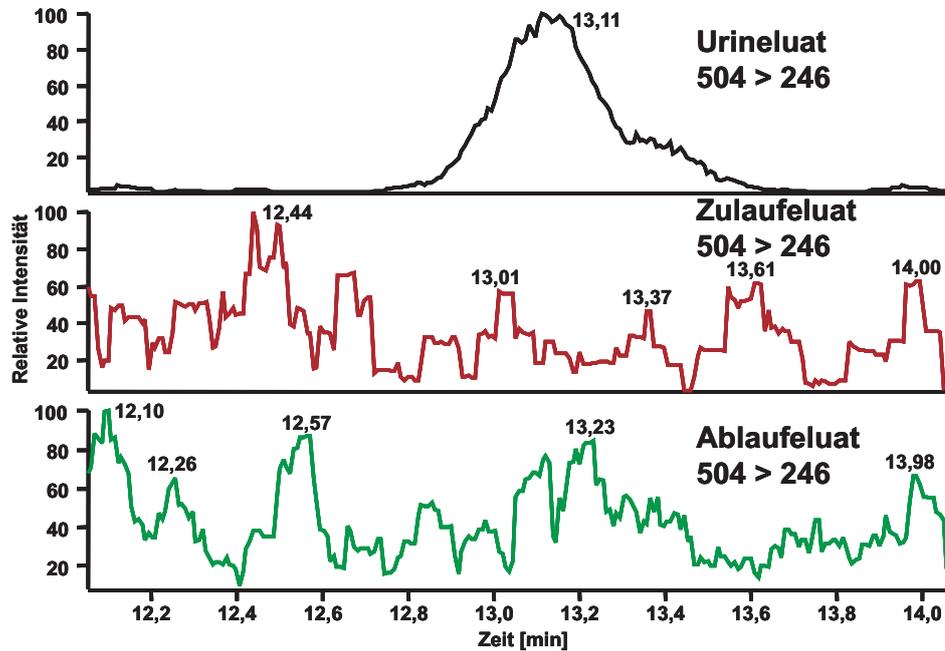
Positive Messung

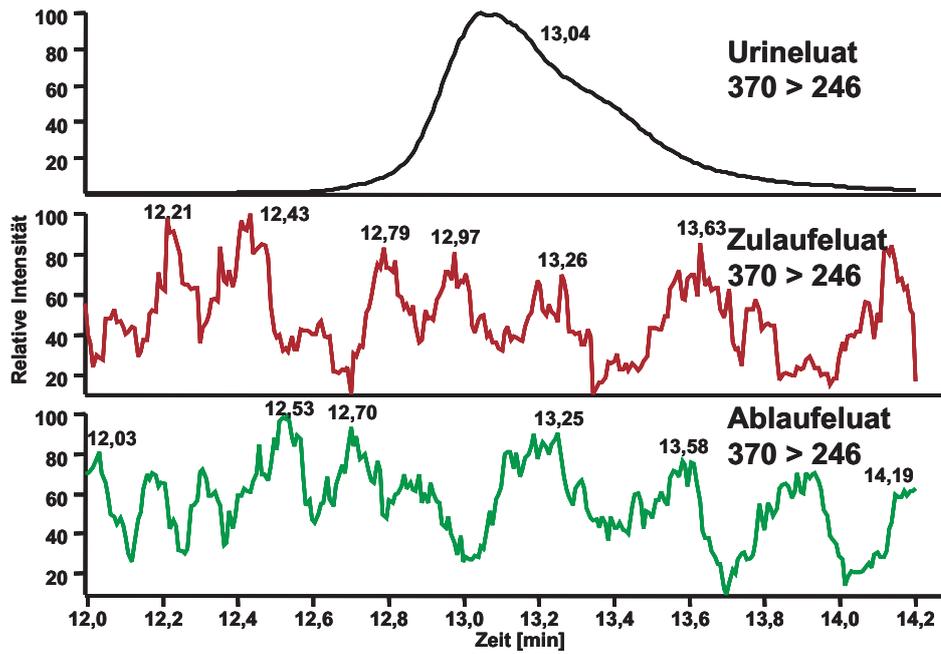




MRM-Chromatogramme

Positive Messung

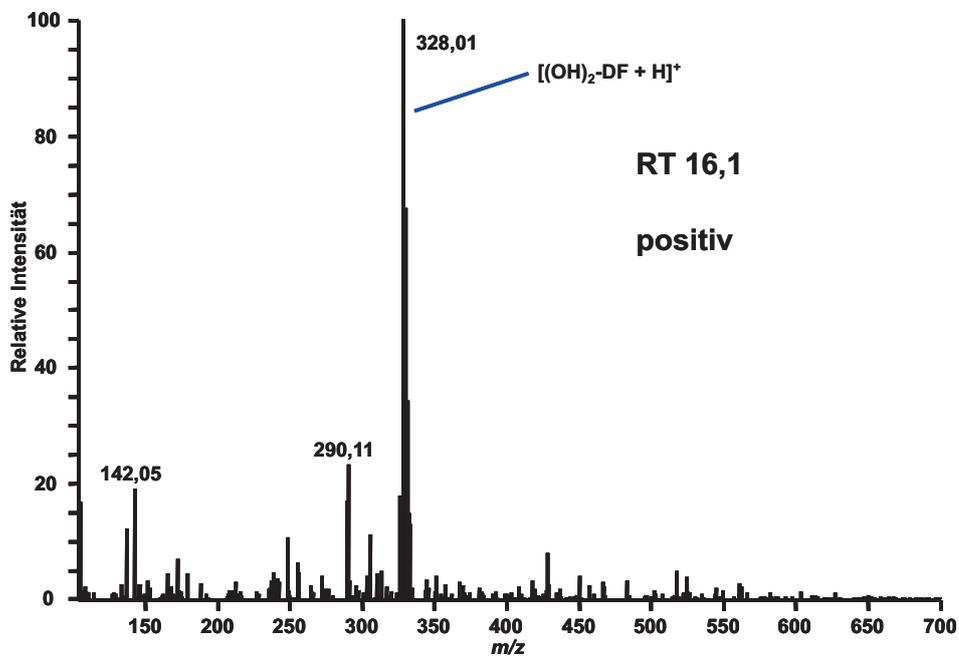




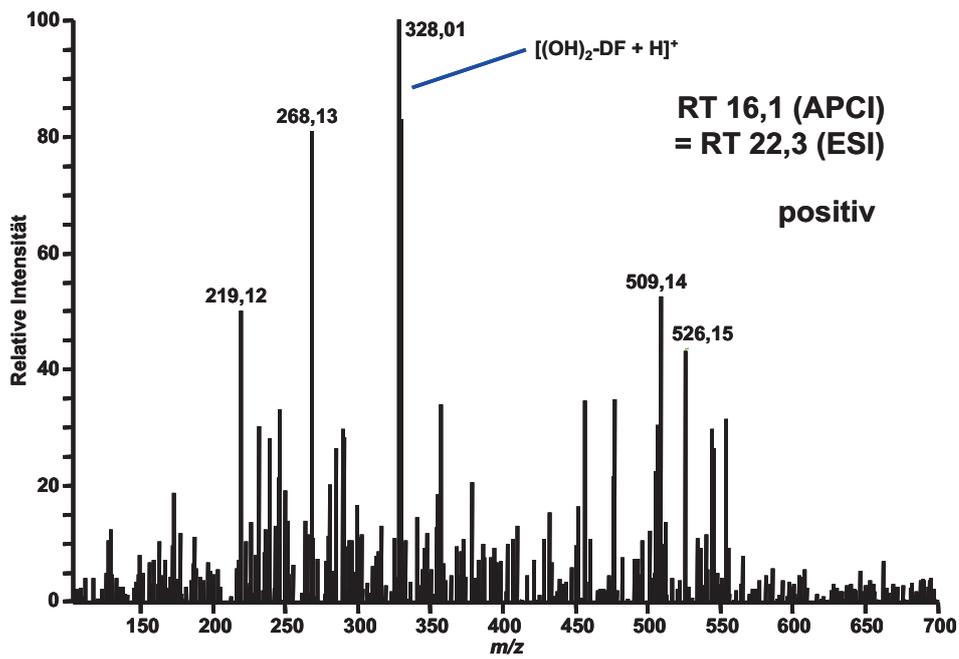
C.1.2.2 Retentionszeit 16,1 min.

Fullscanspektren

APCI-Spektrum

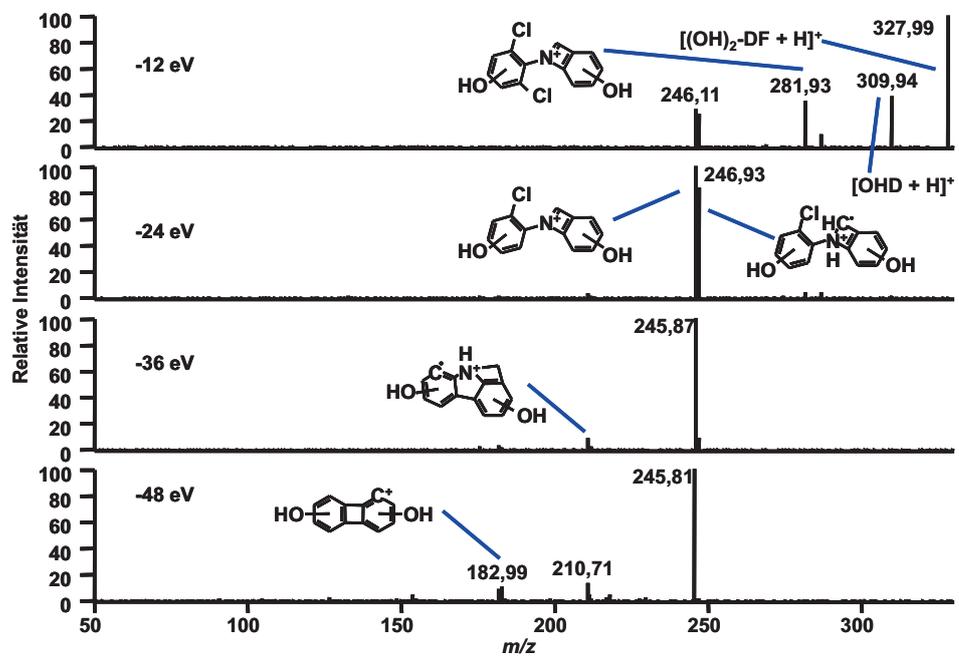


ESI-Spektrum



Produktionenspektren

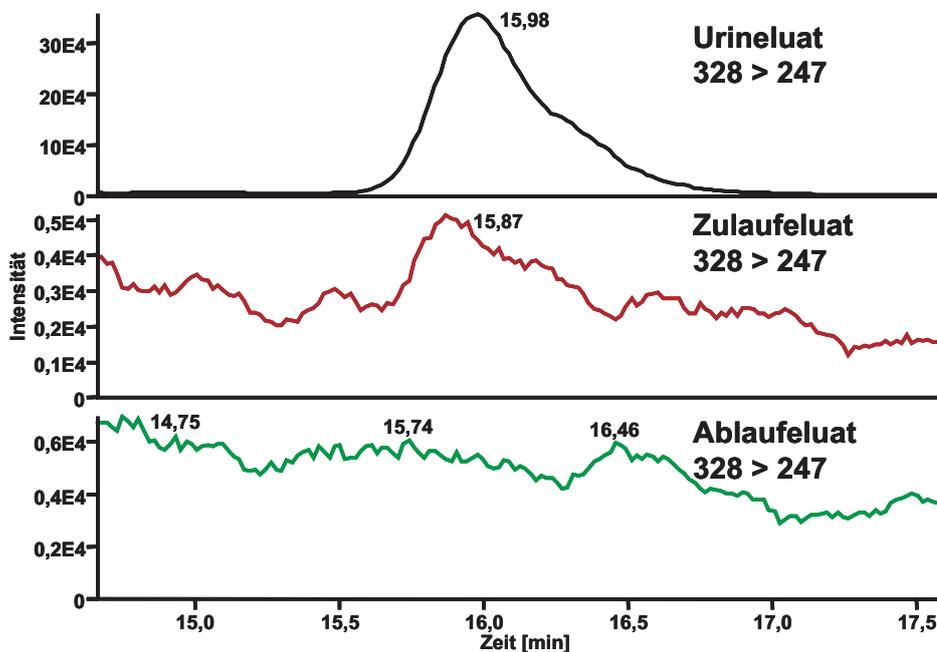
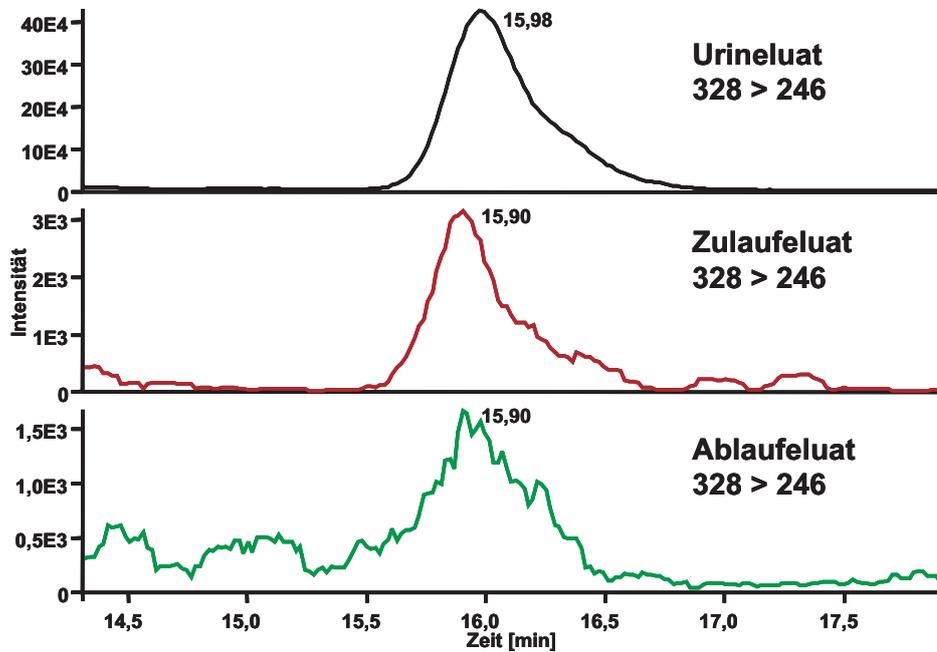
Positive Messung



MRM-Chromatogramme

Durch eine Änderung im Aufbau des Instruments sind die RT leicht verkürzt.

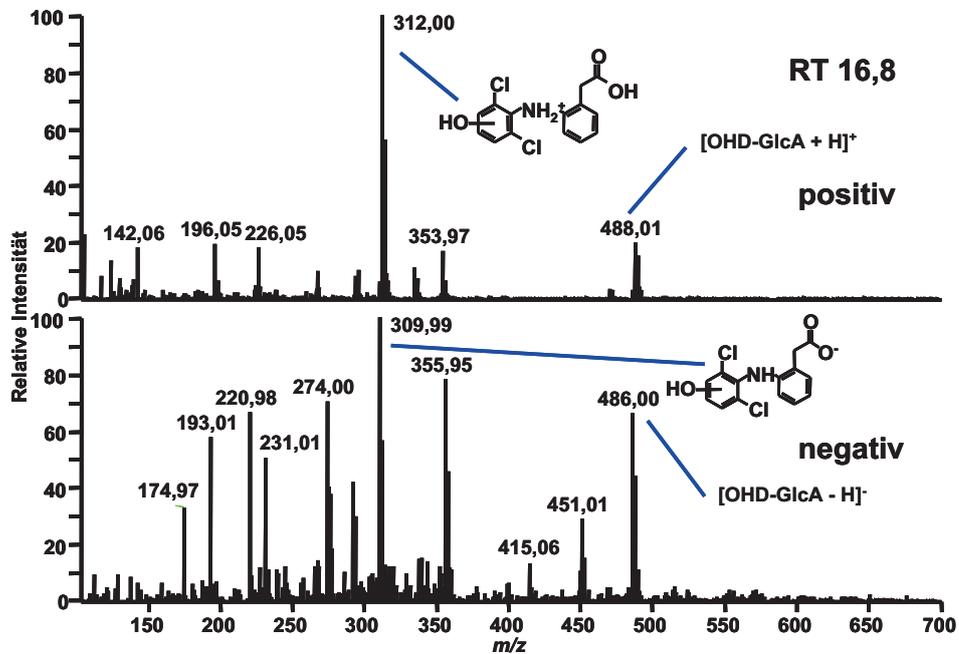
Positive Messung



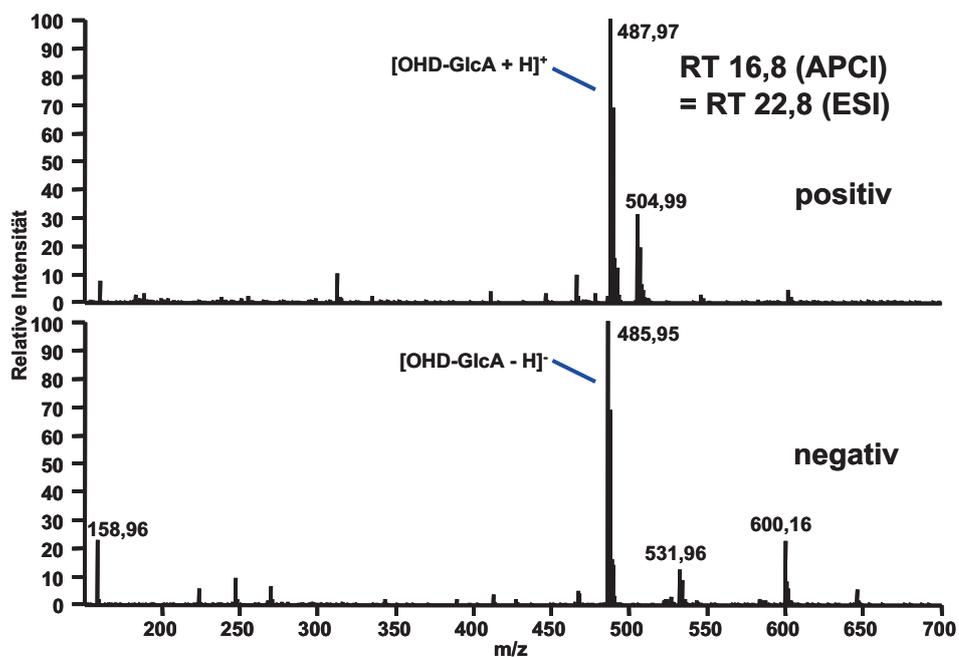
C.1.2.3 Retentionszeit 16,8 min.

Fullscanspektren

APCI-Spektrum

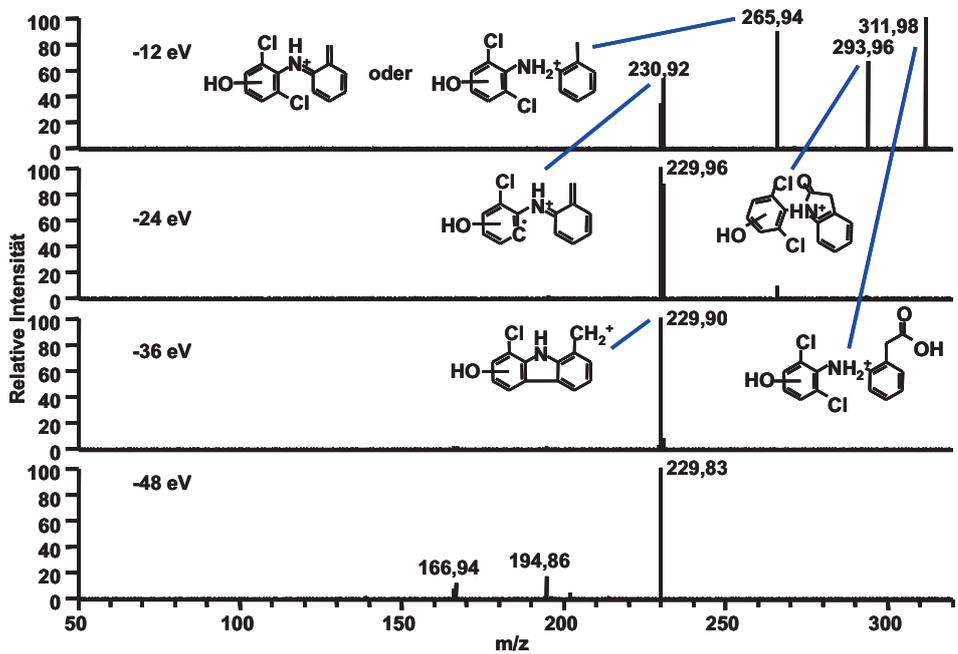
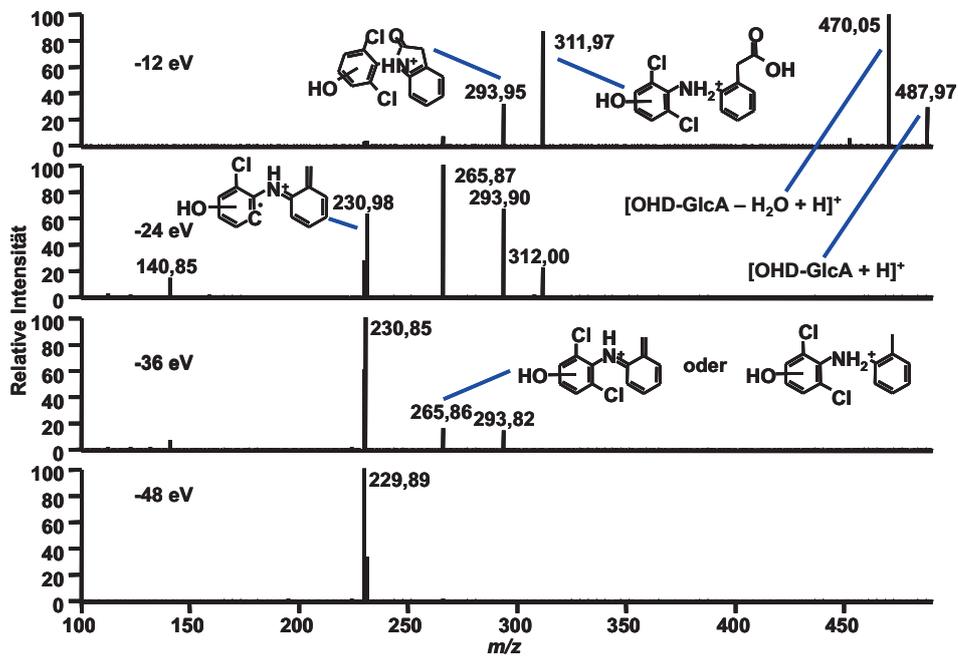


ESI-Spektrum

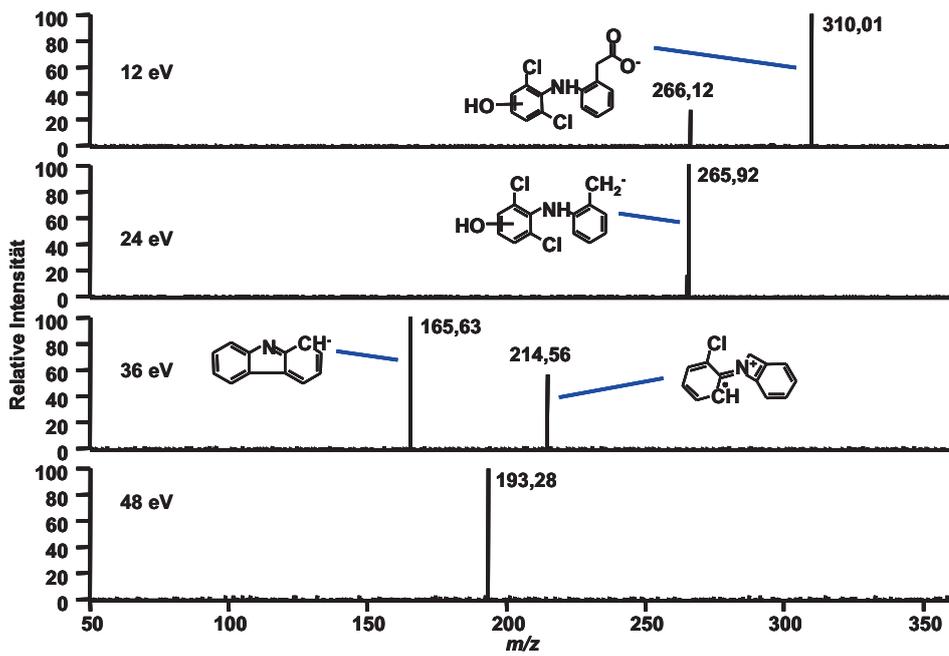
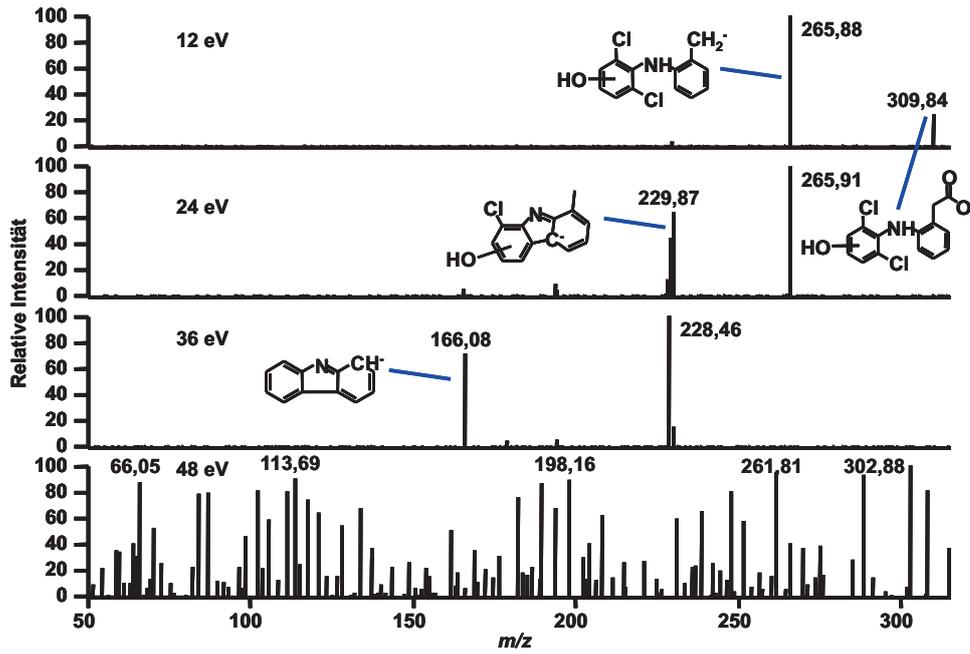


Produktionenspektren

Positive Messung



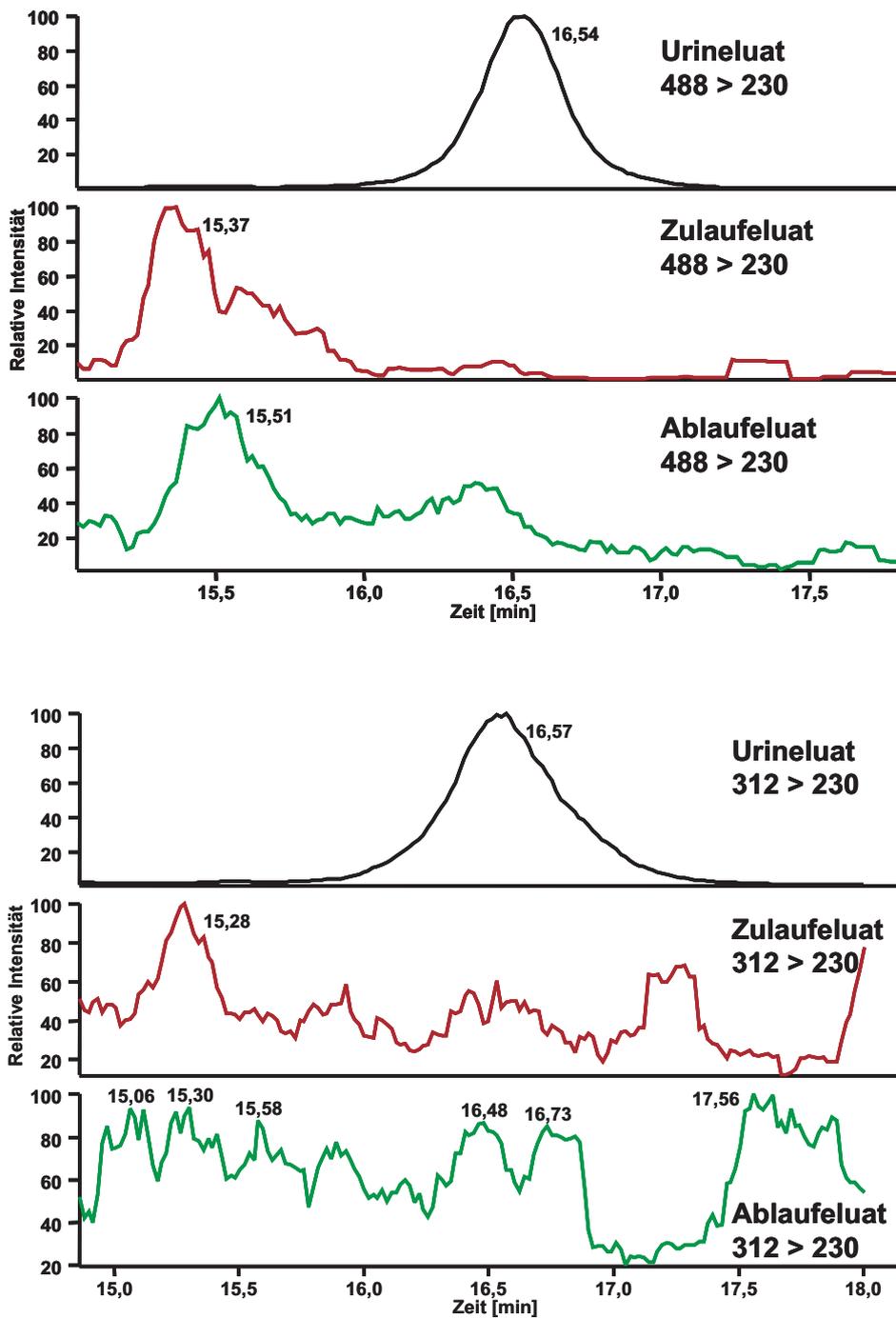
Negative Messung



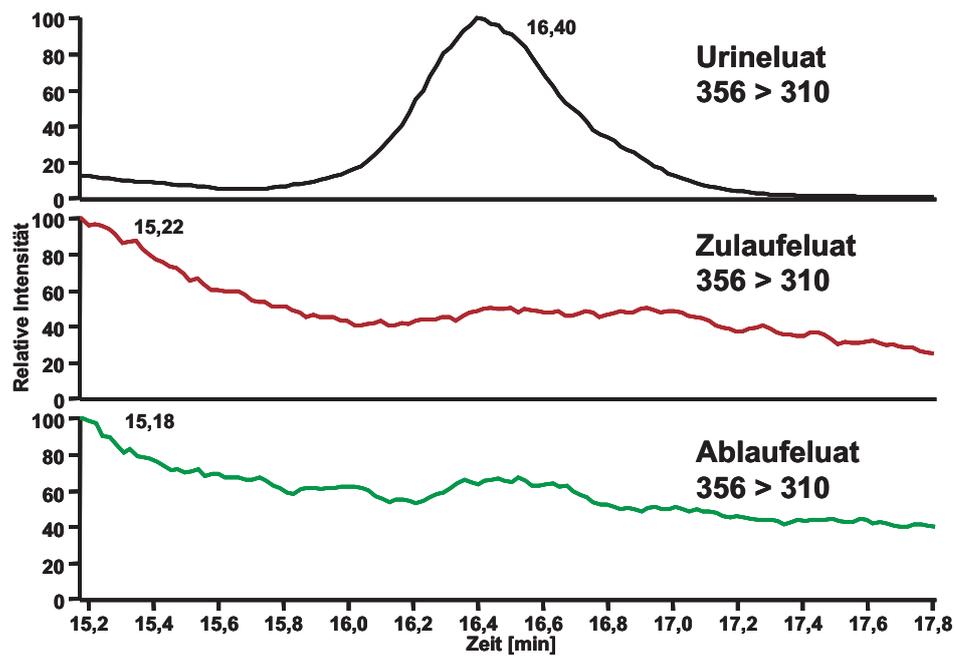
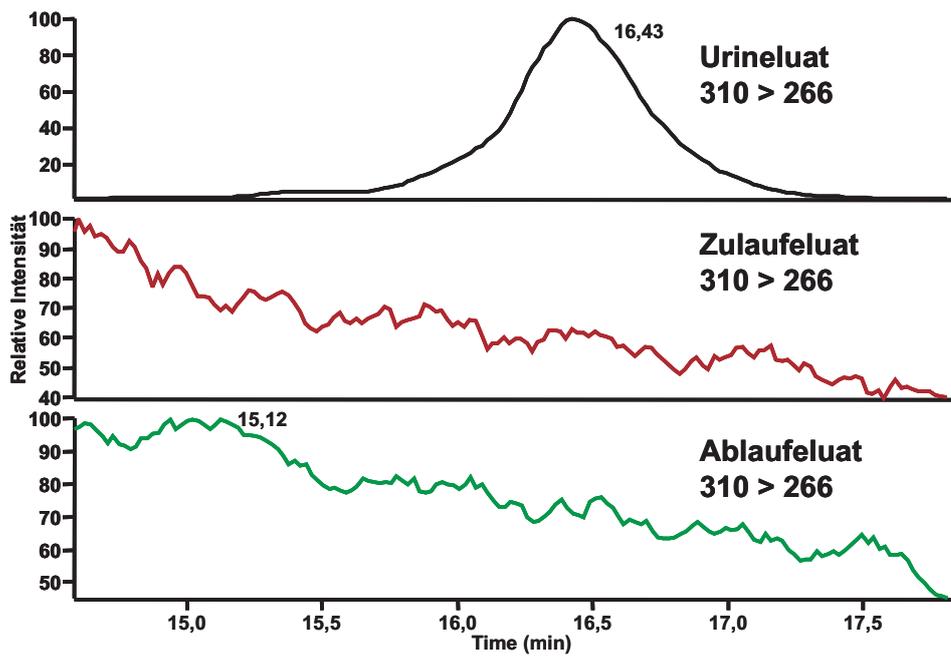
MRM-Chromatogramme

Durch eine Änderung im Aufbau des Instruments sind die RT leicht verkürzt.

Positive Messung



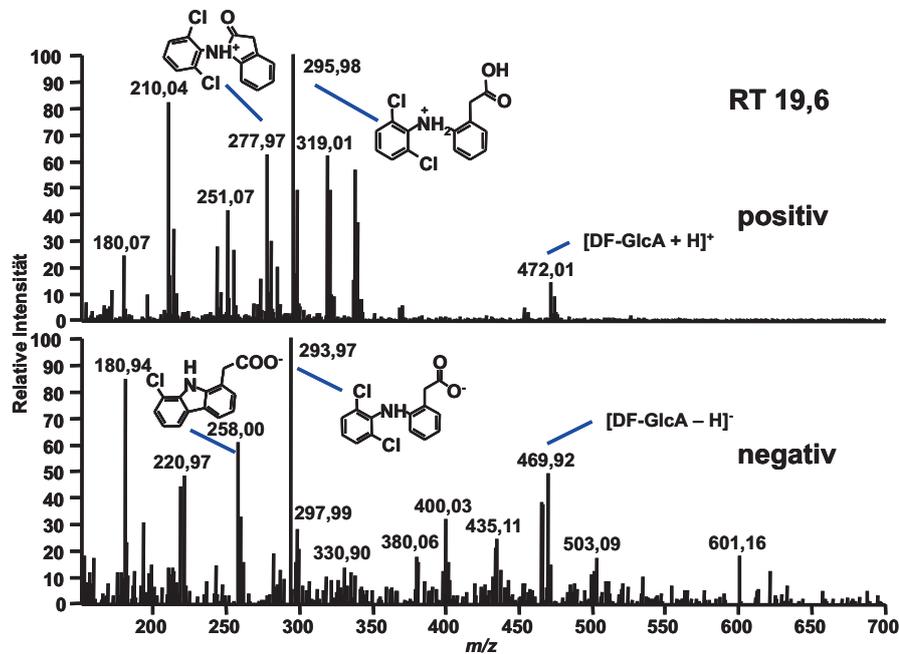
Negative Messung



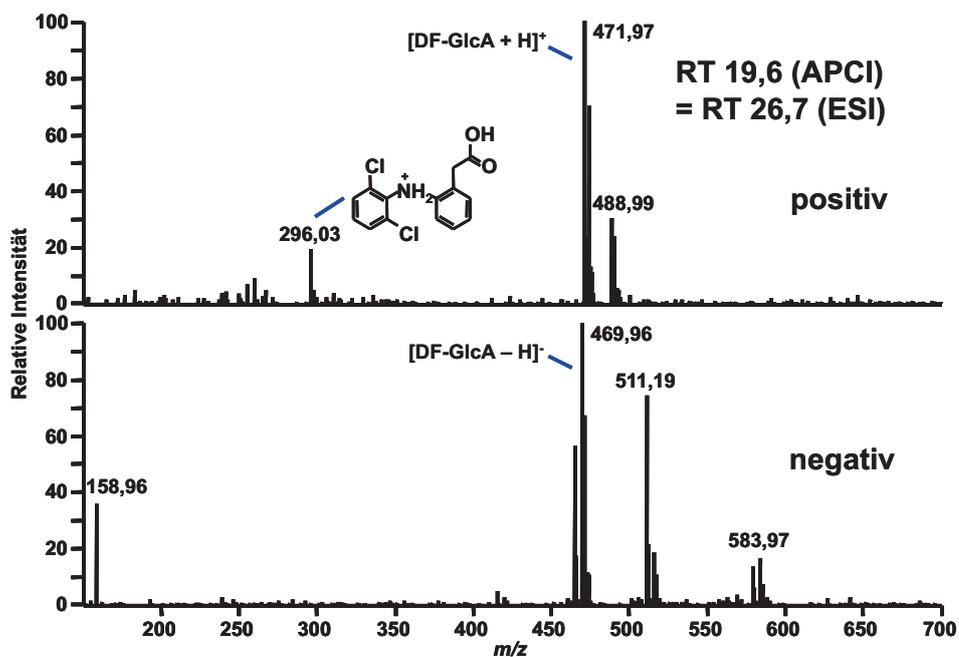
C.1.2.4 Retentionszeit 19,6 min.

Fullscanspektren

APCI-Spektrum

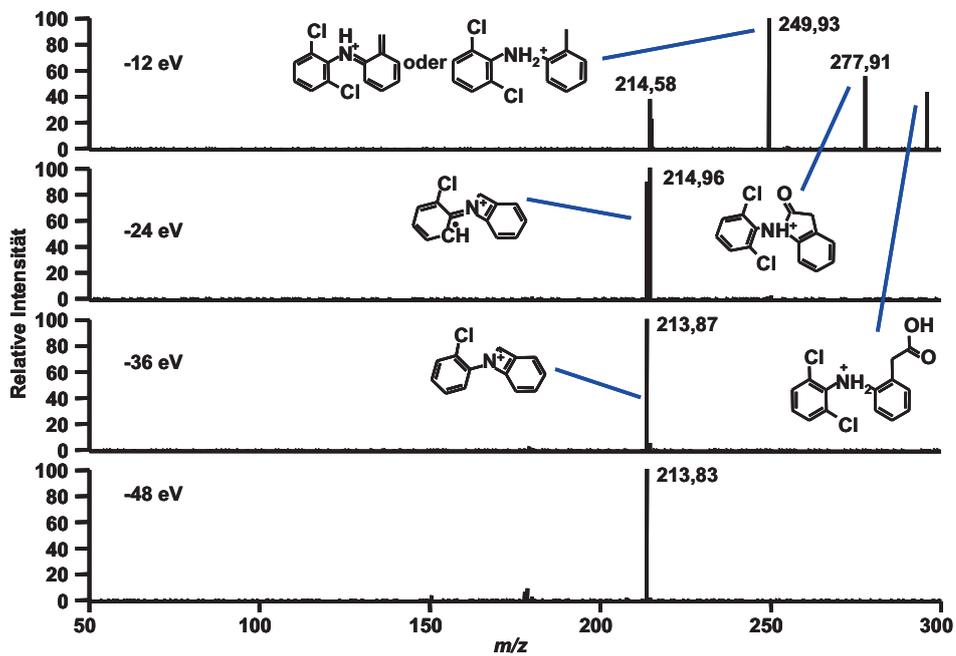
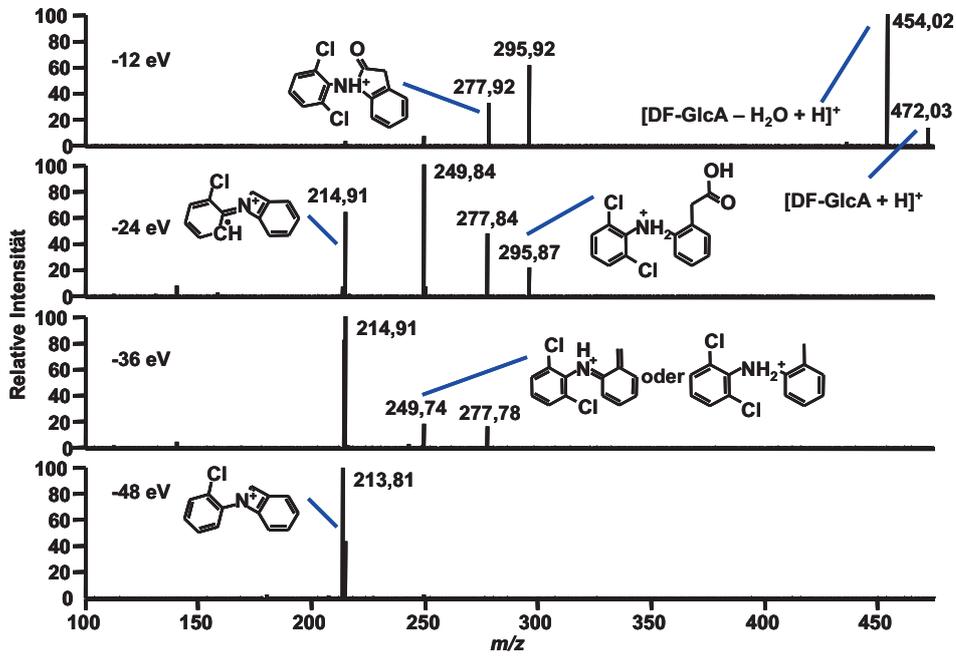


ESI-Spektrum

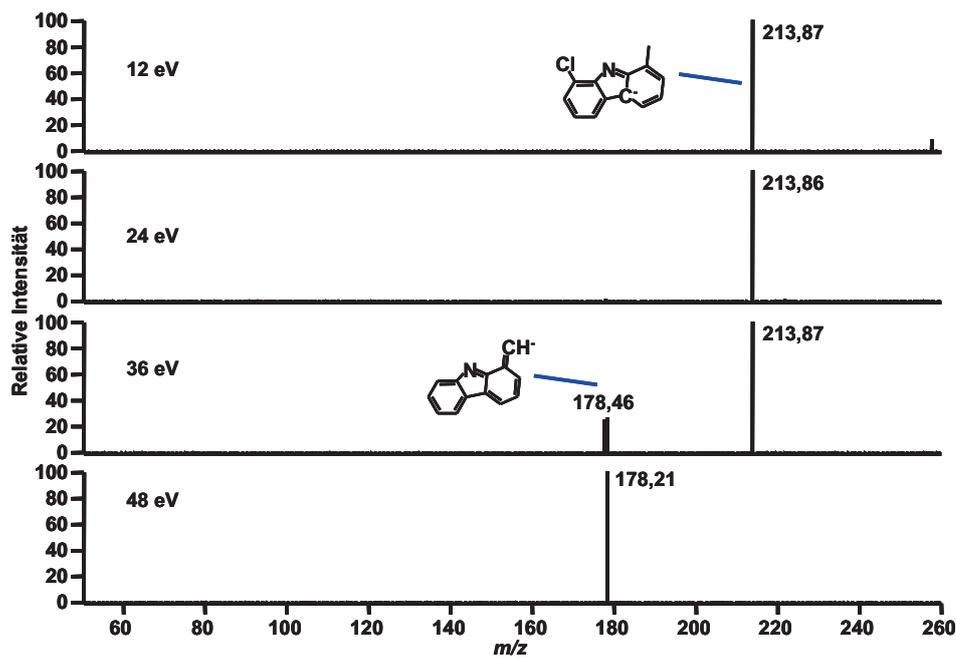
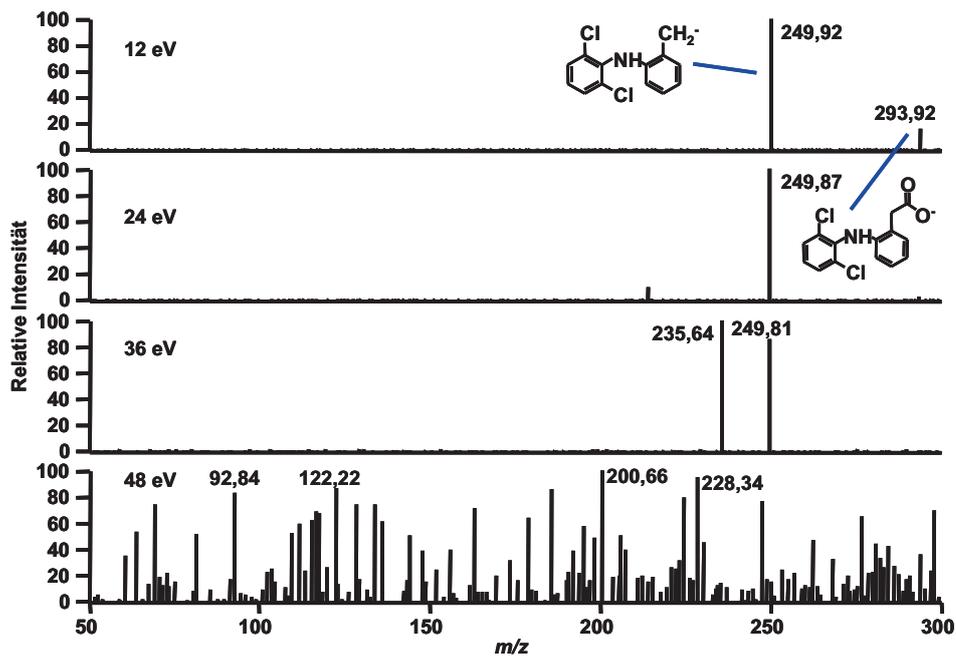


Produktionenspektren

Positive Messung

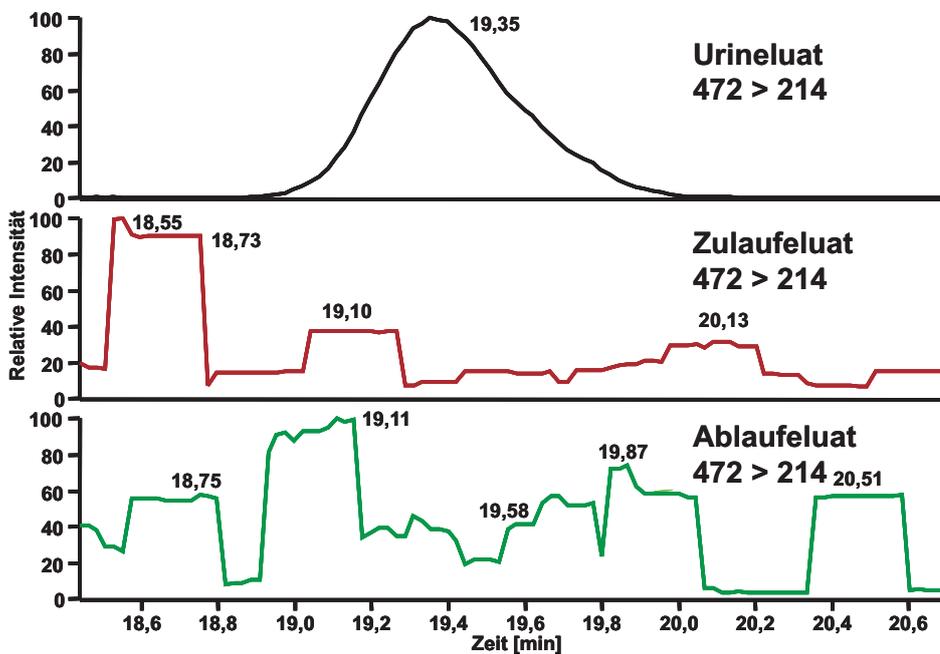
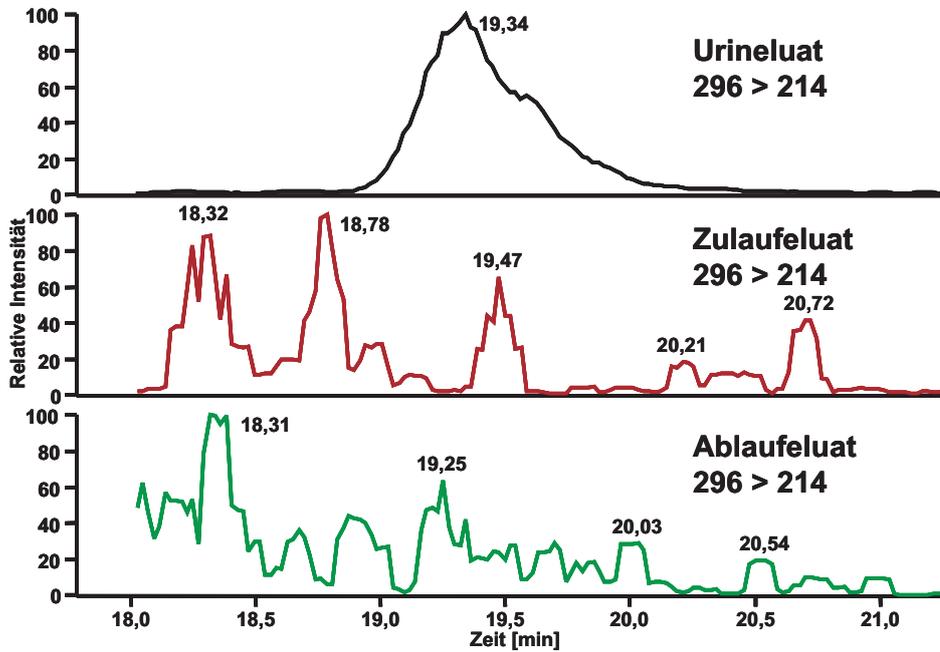


Negative Messung

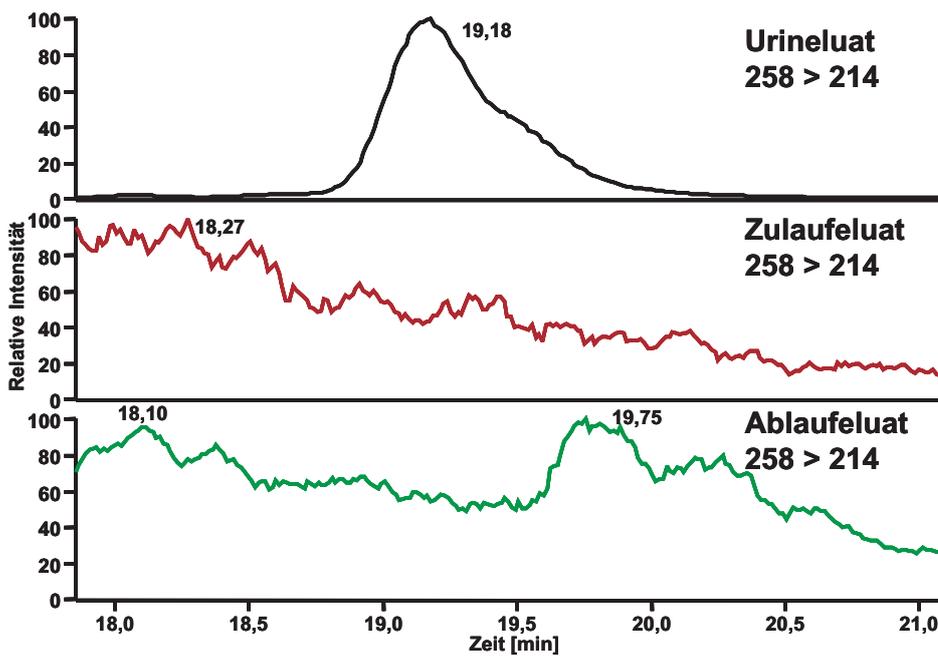
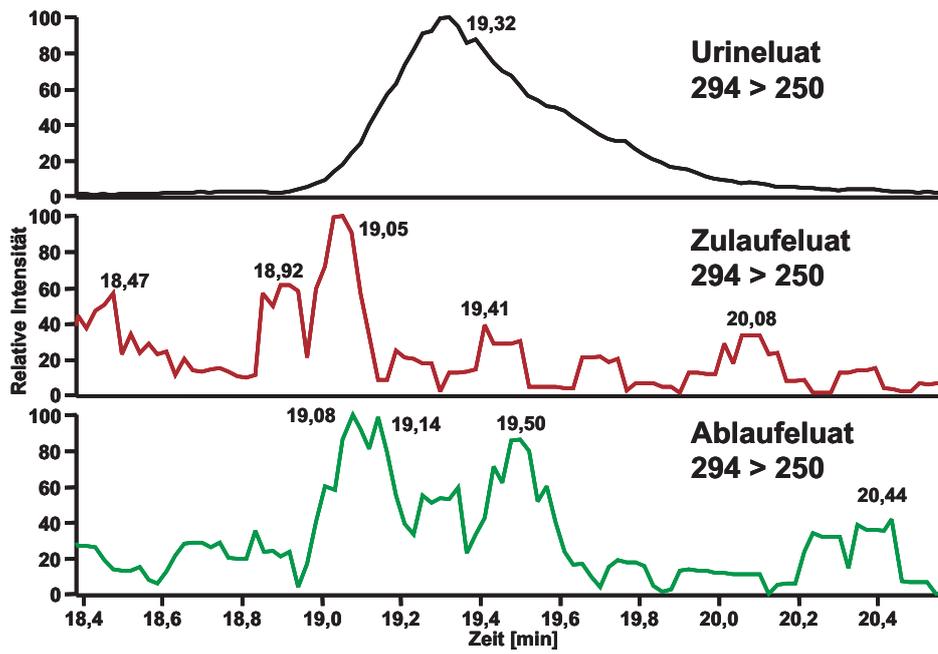


MRM-Chromatogramme Durch eine Änderung im Aufbau des Instruments sind die RT leicht verkürzt.

Positive Messung



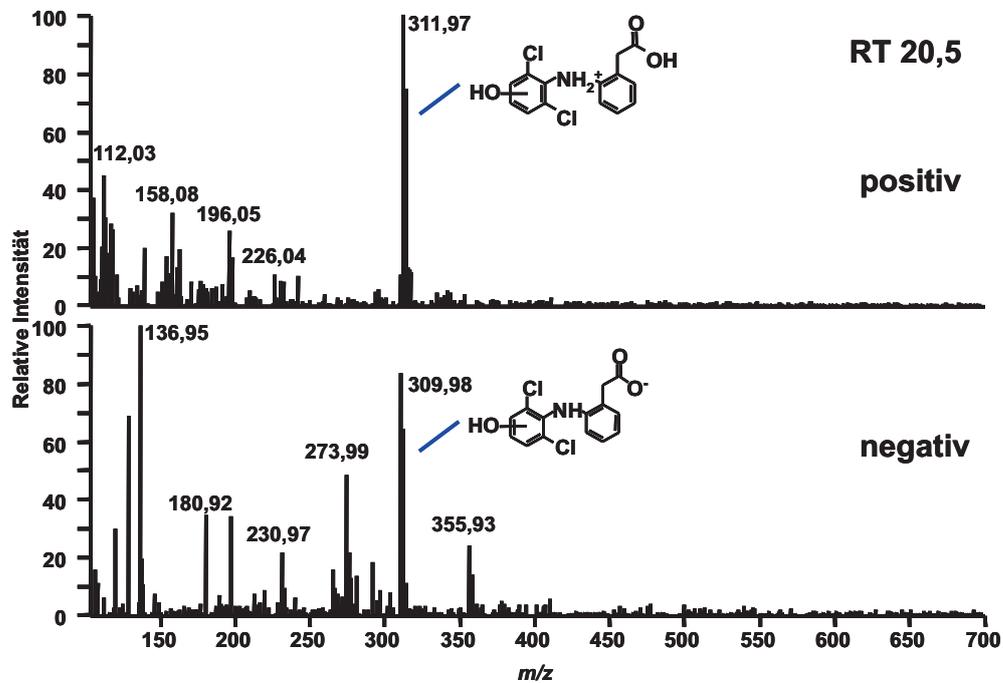
Negative Messung



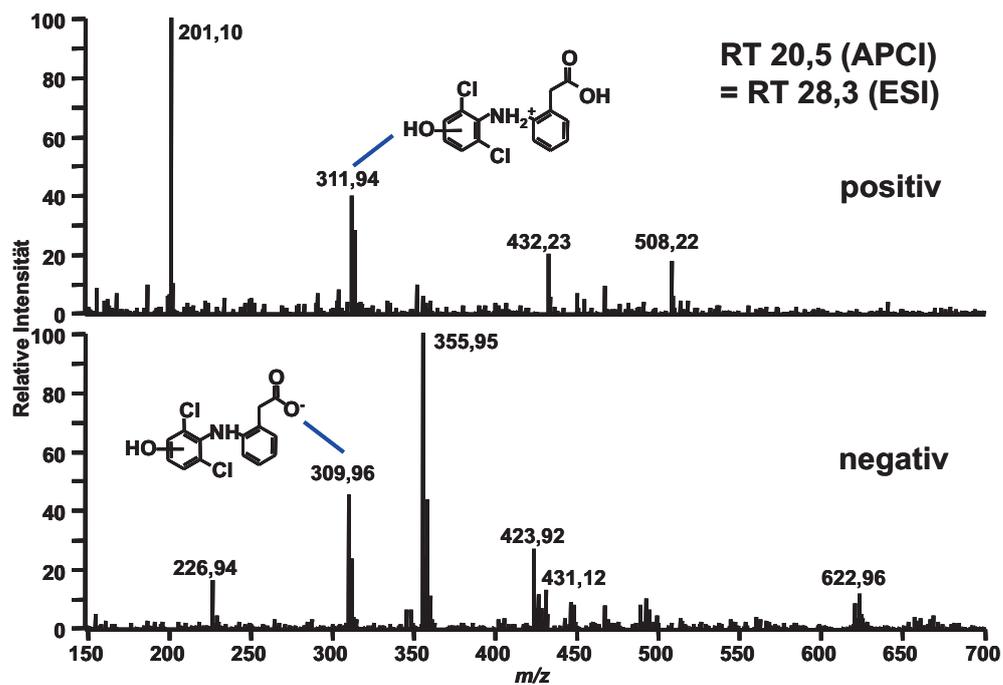
C.1.2.5 Retentionszeit 20,5 min.

Fullscanspektren

APCI-Spektrum

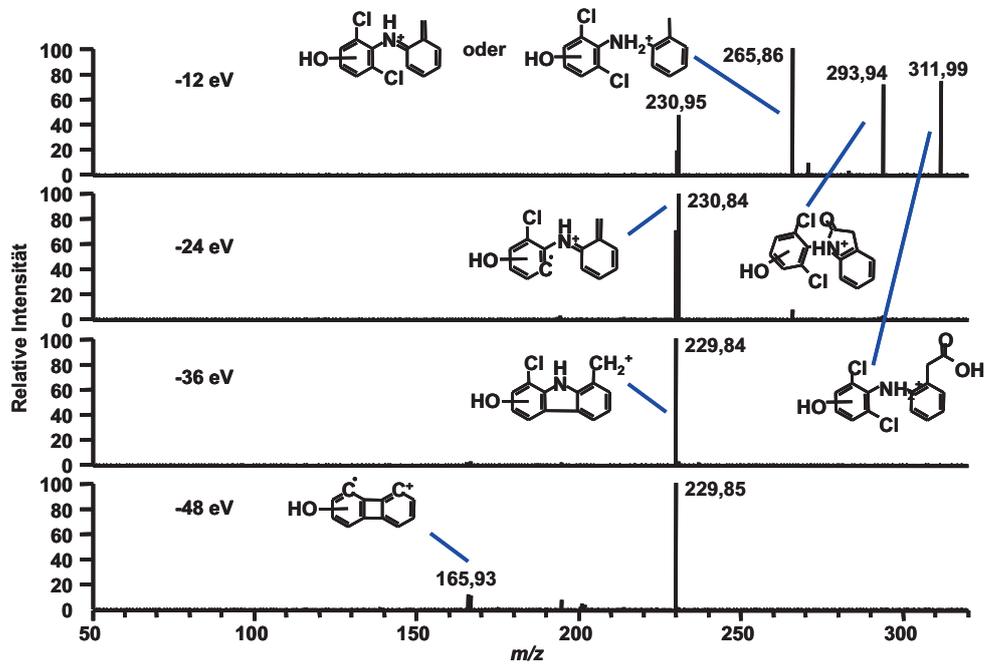


ESI-Spektrum

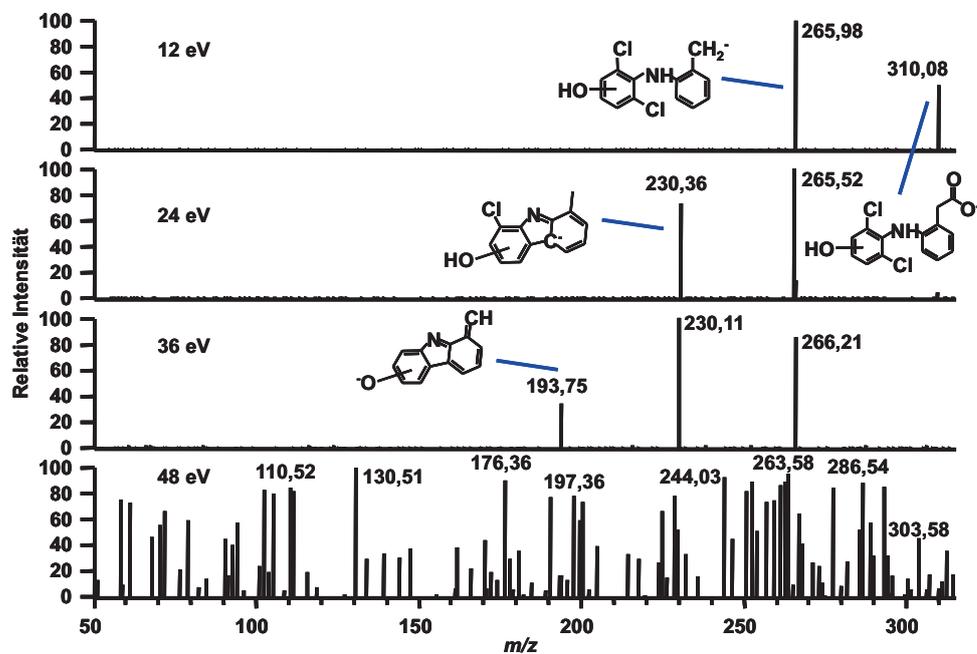


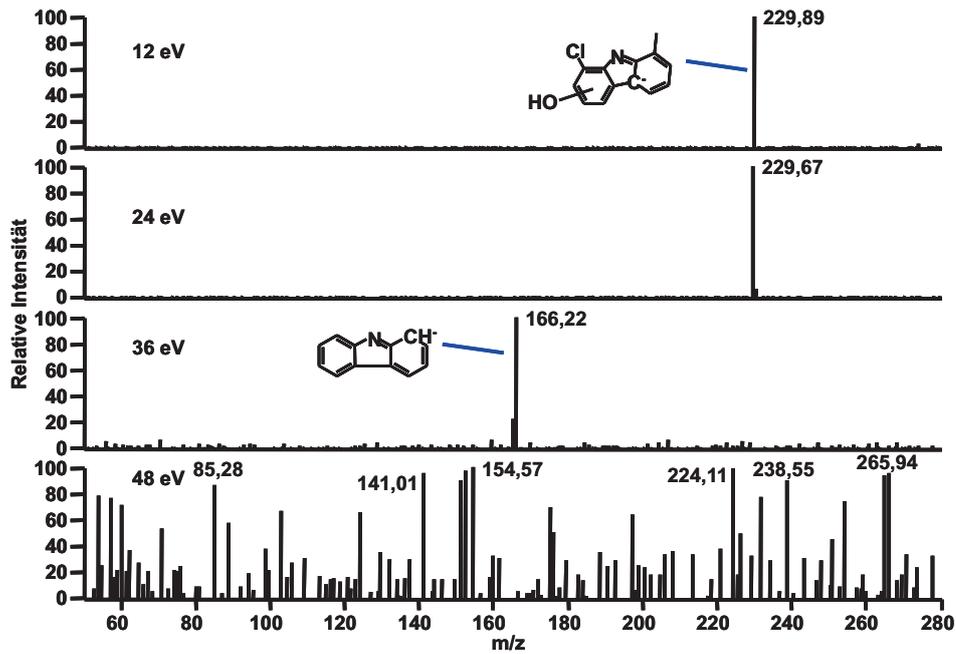
Produktionspektren

Positive Messung



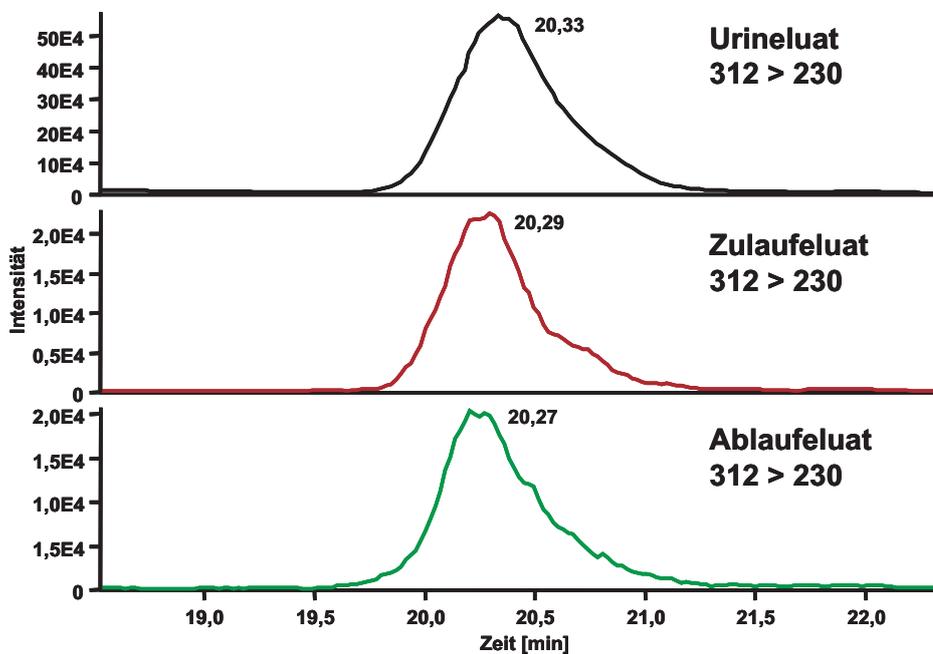
Negative Messung



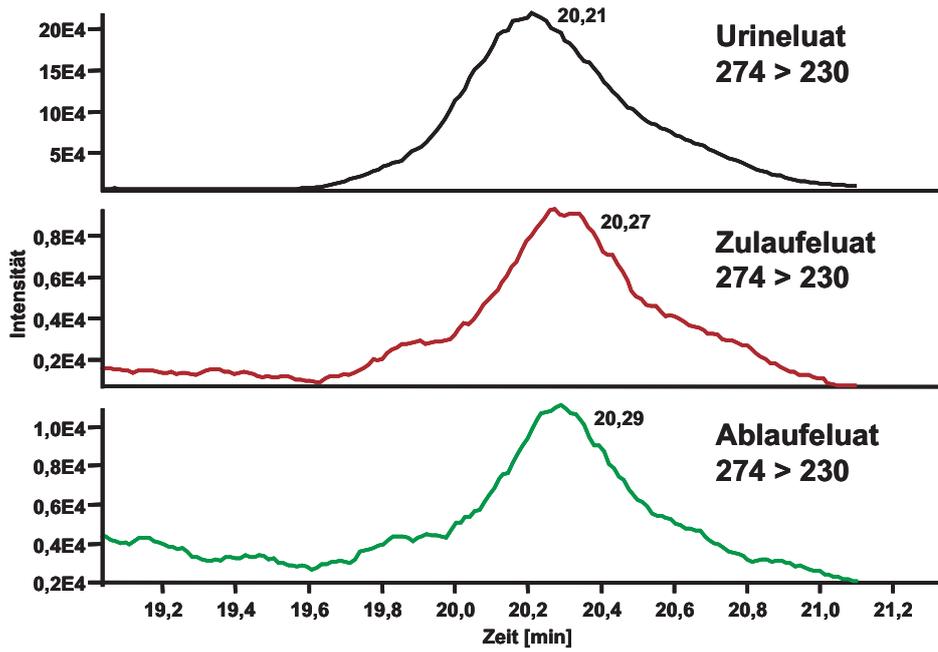


MRM-Chromatogramme Durch eine Änderung im Aufbau des Instruments sind die RT leicht verkürzt.

Positive Messung



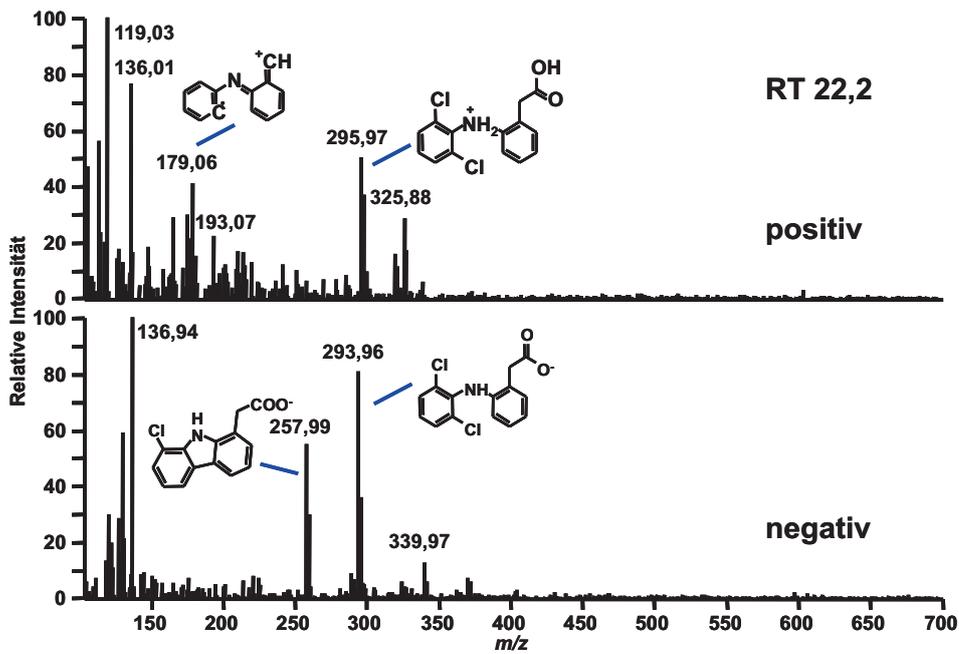
Negative Messung



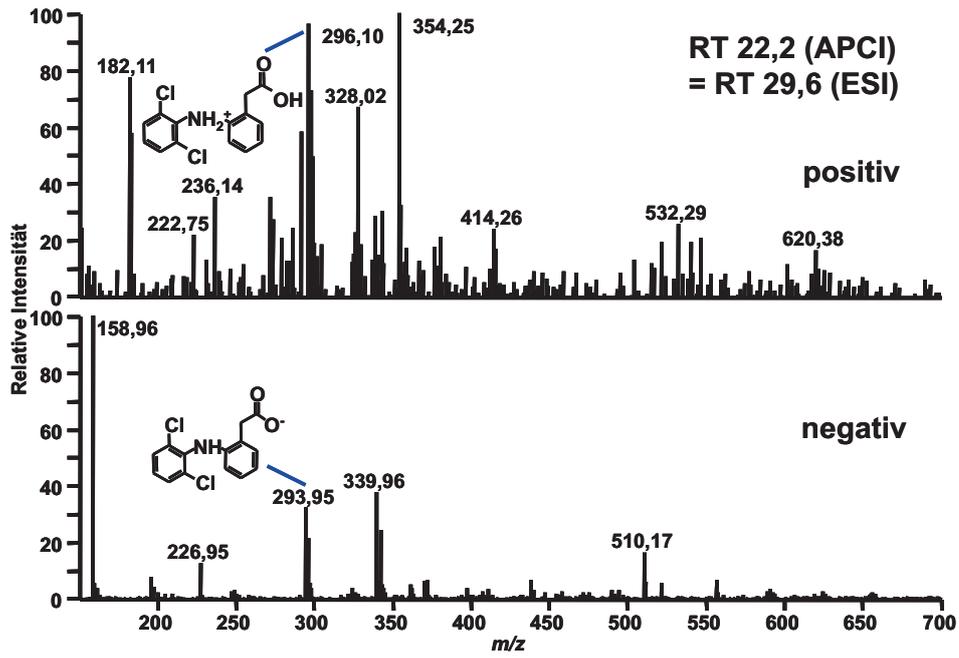
C.1.2.6 Retentionszeit 22,2 min.

Fullscanspektren

APCI-Spektrum

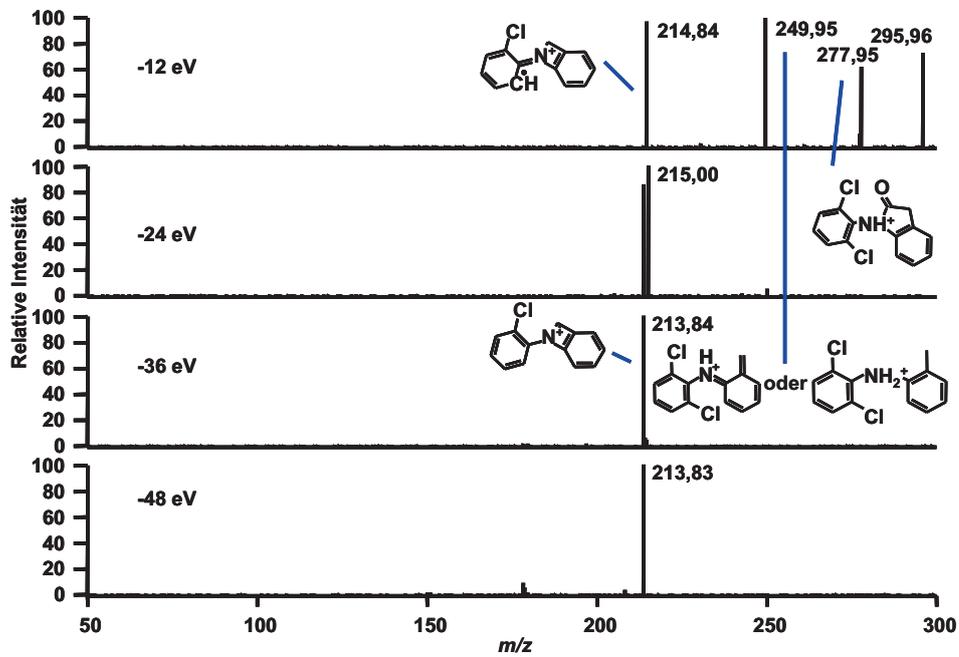


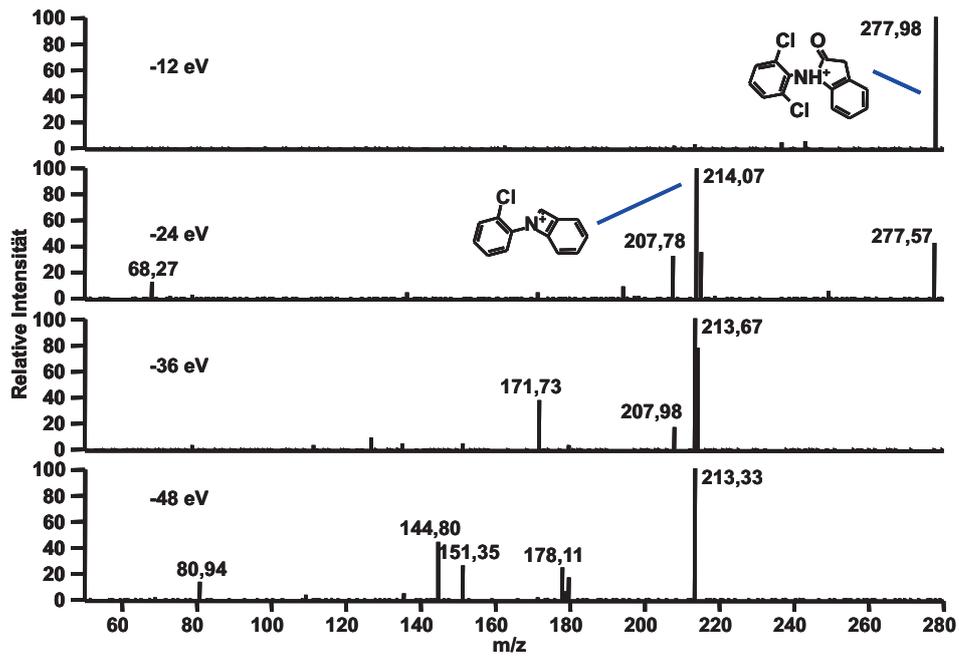
ESI-Spektrum



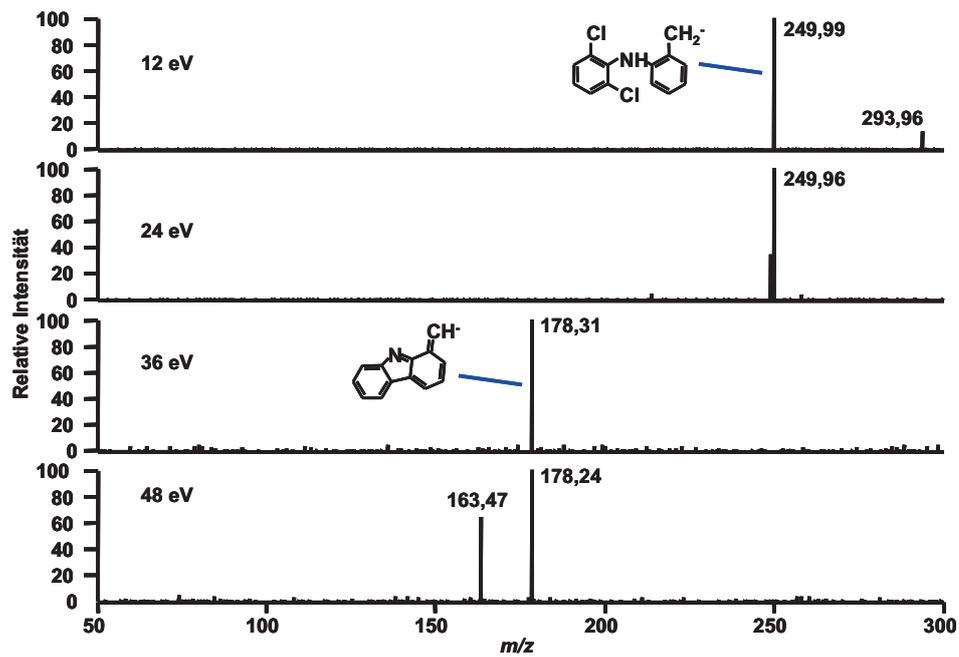
Produktionenspektren

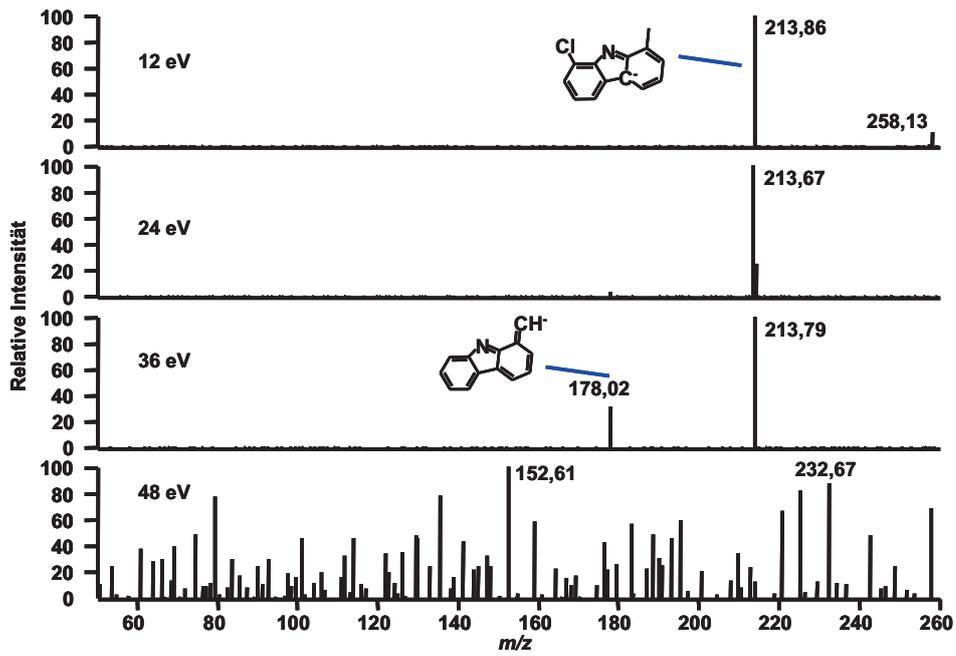
Positive Messung





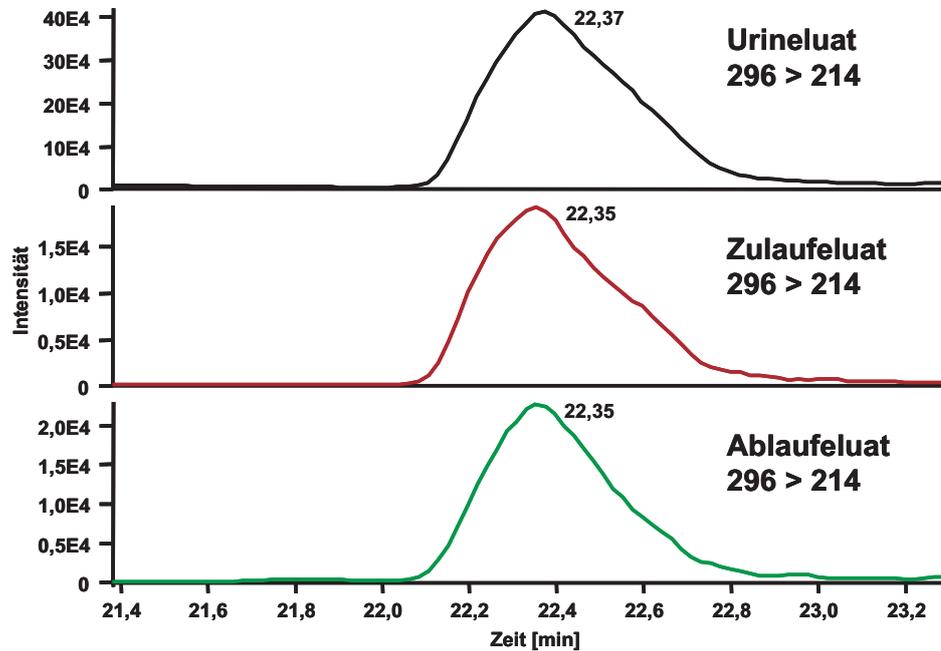
Negative Messung



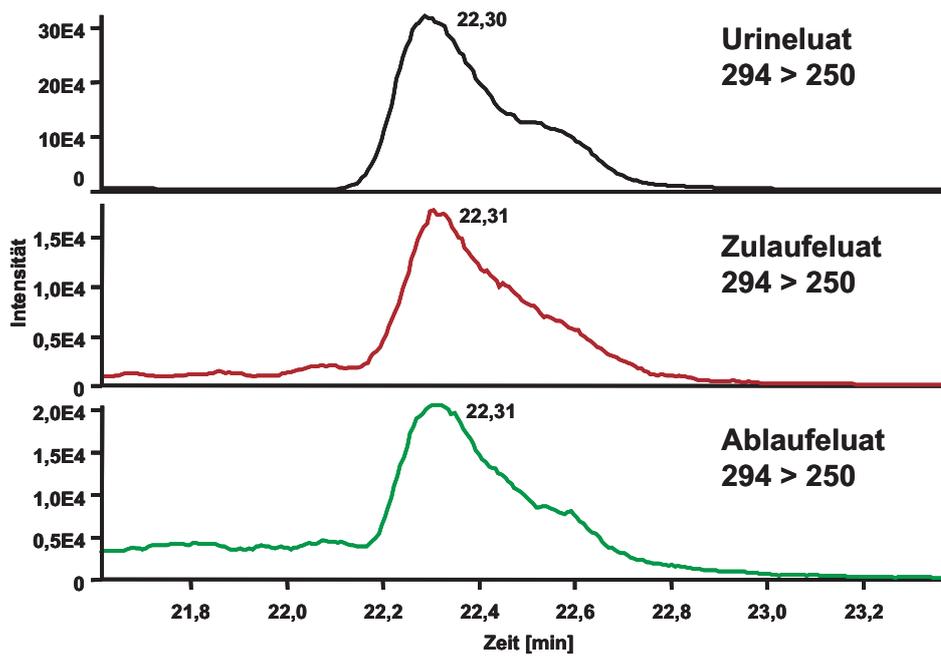


MRM-Chromatogramme

Positive Messung



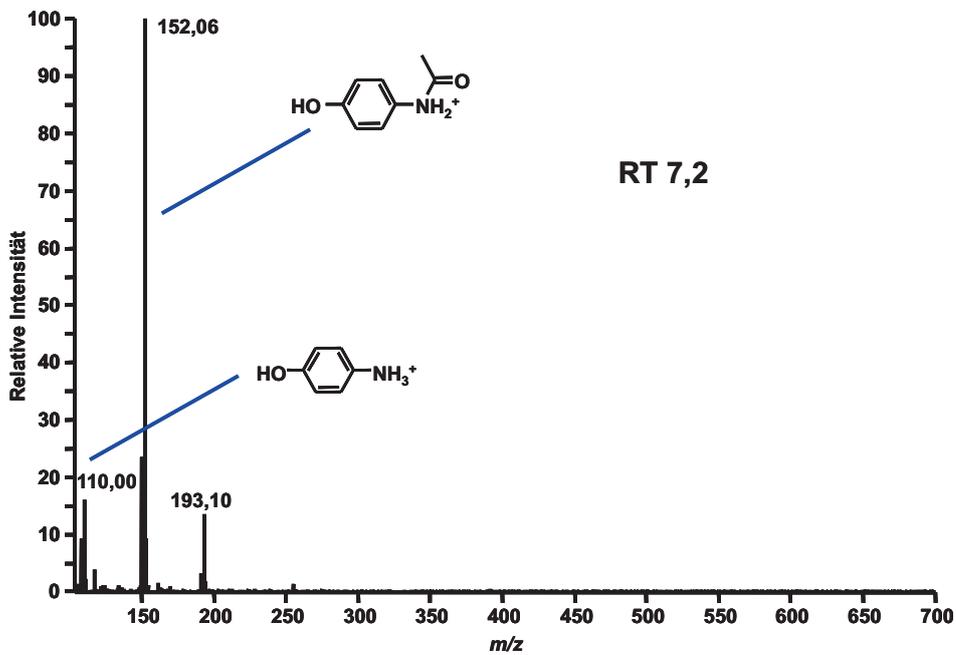
Negative Messung



C.1.3 Paracetamol

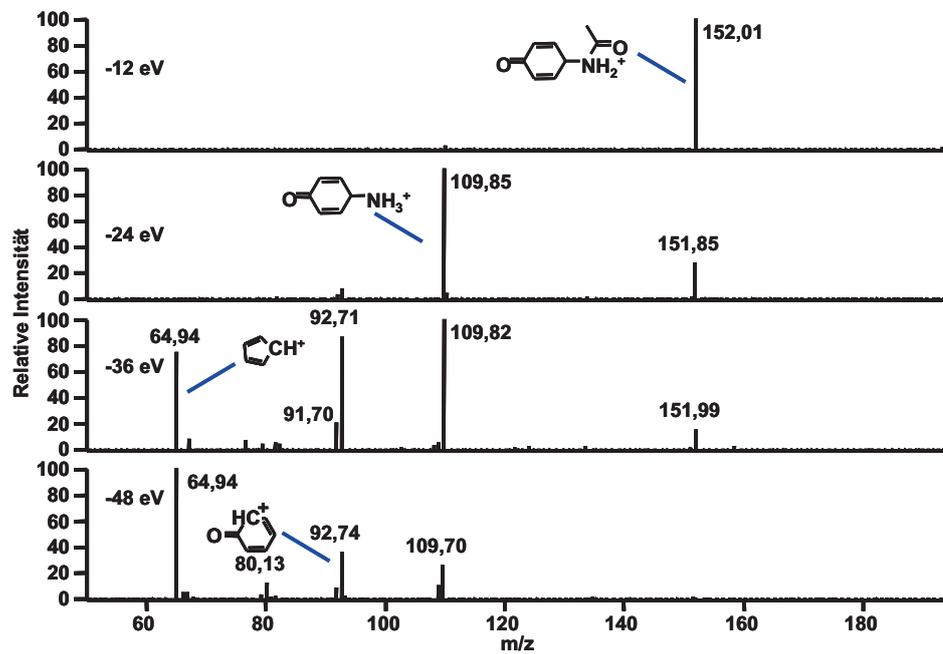
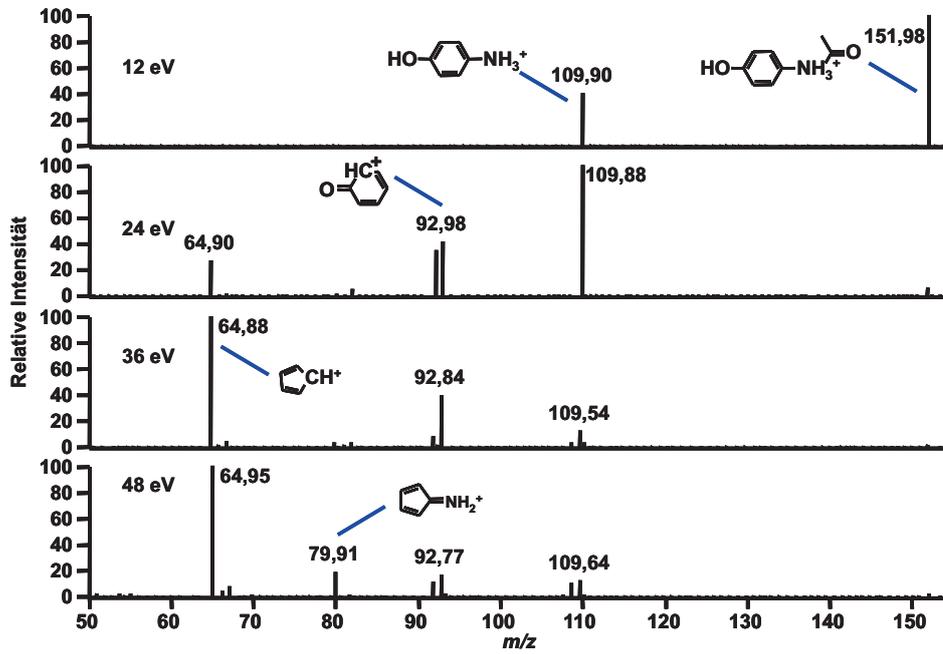
C.1.3.1 Retentionszeit 7,2 min.

APCI-Fullscanspektrum



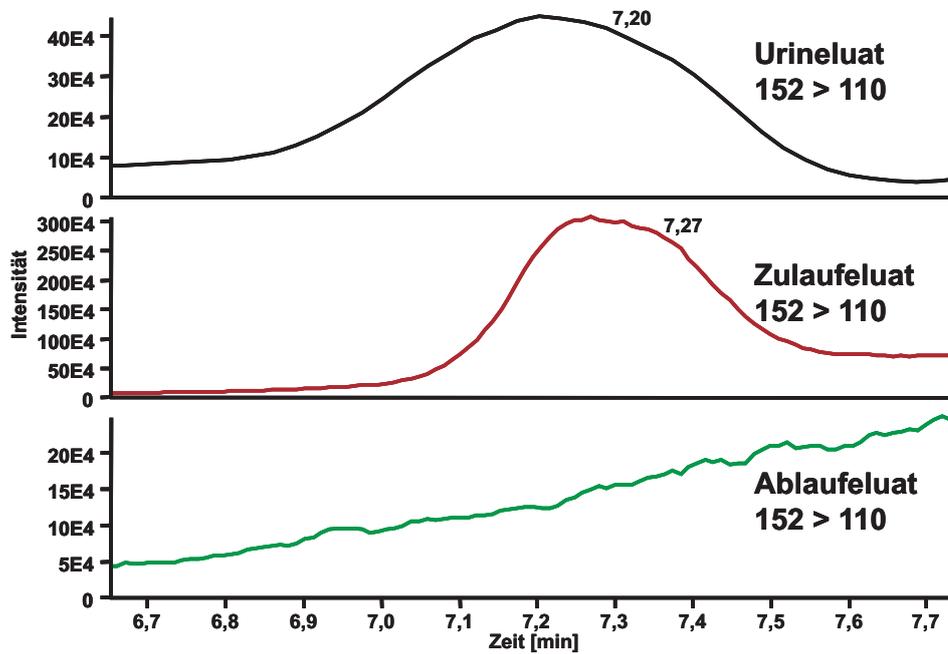
Produktionenspektren

Positive Messung



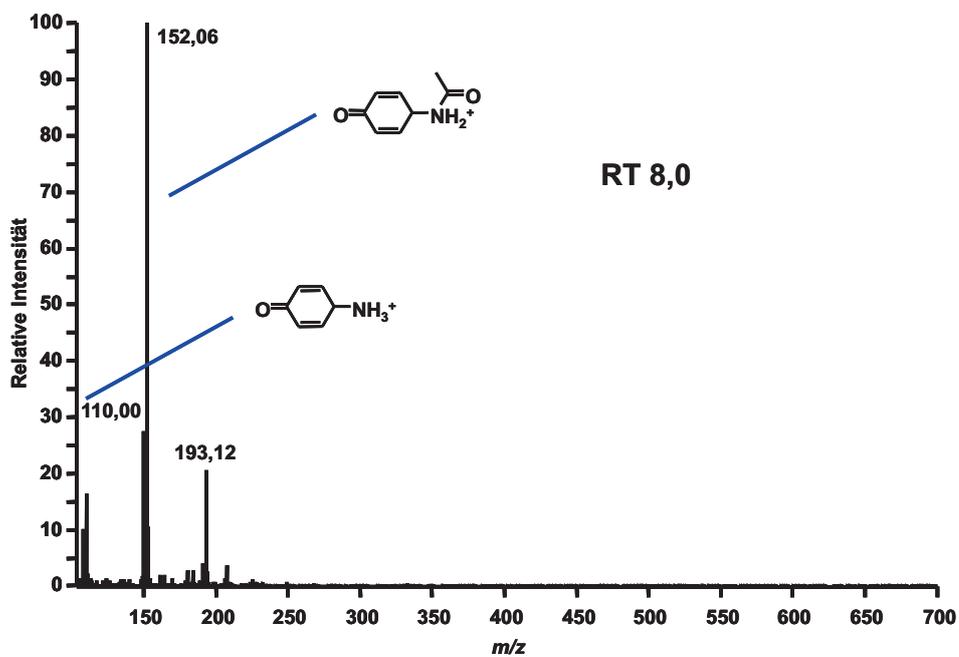
MRM-Chromatogramm

Positive Messung

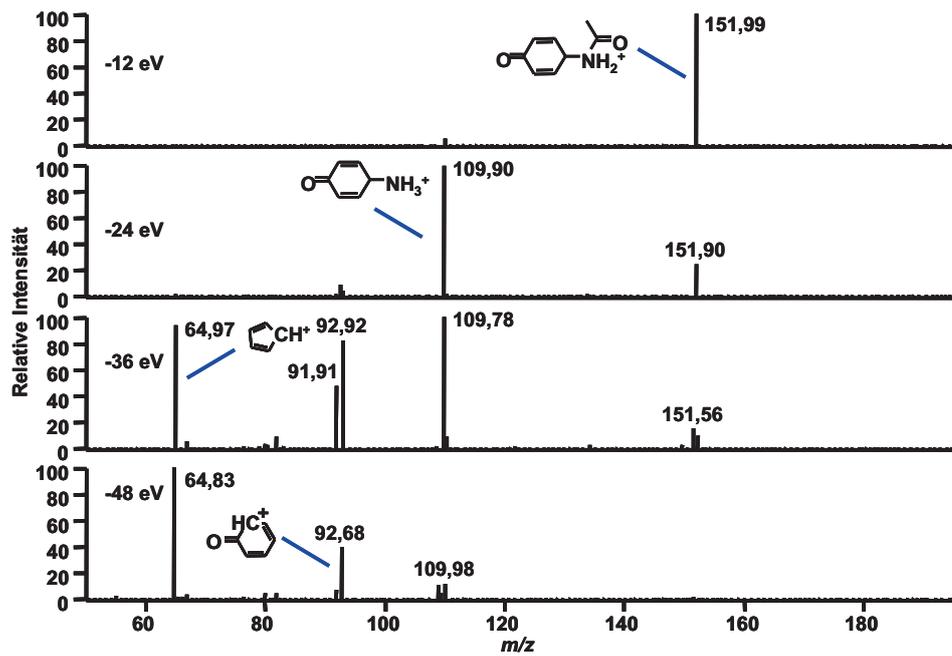
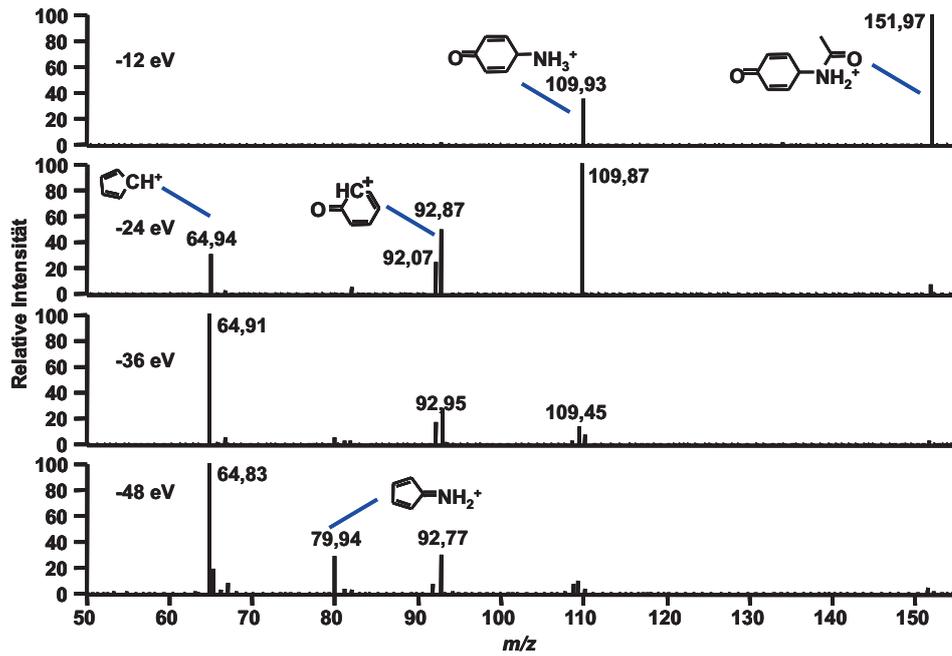


C.1.3.2 Retentionszeit 8,0 min.

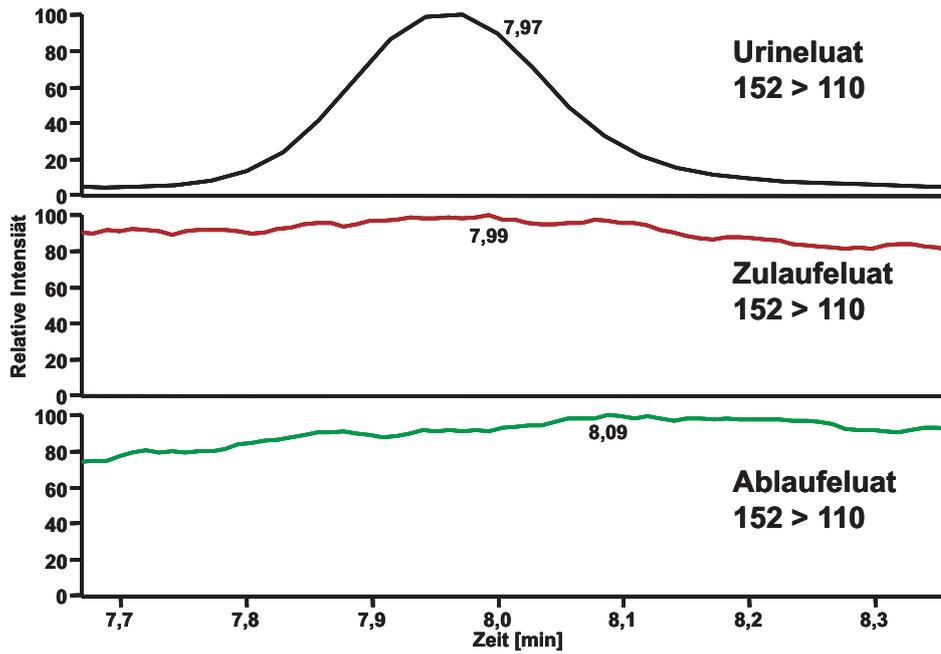
APCI-Fullscanspektrum



Produktionenspektren

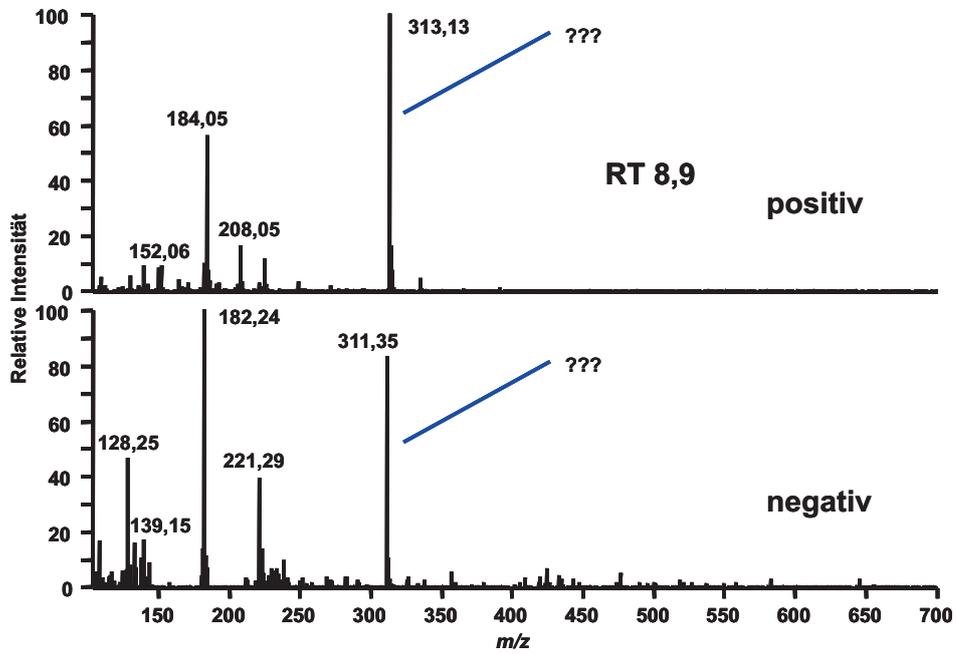


MRM-Chromatogramme



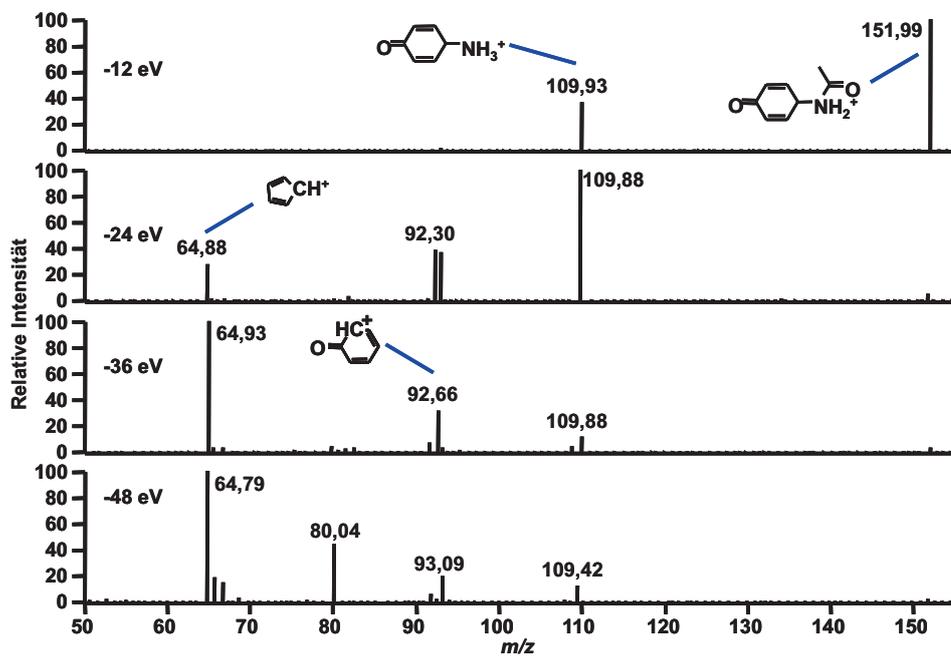
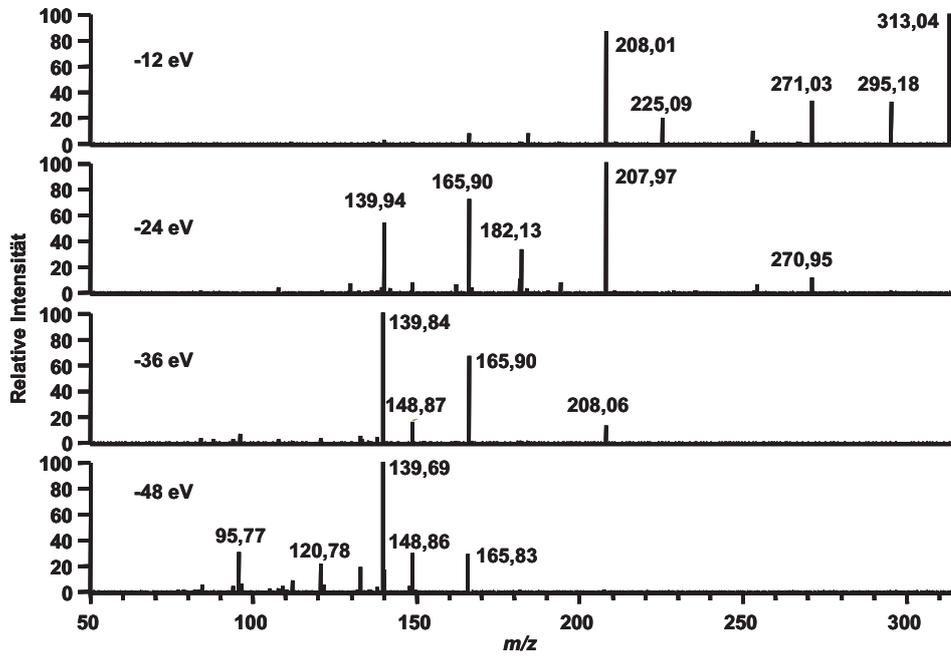
C.1.3.3 Retentionszeit 8,9 min.

APCI-Fullscanspektren

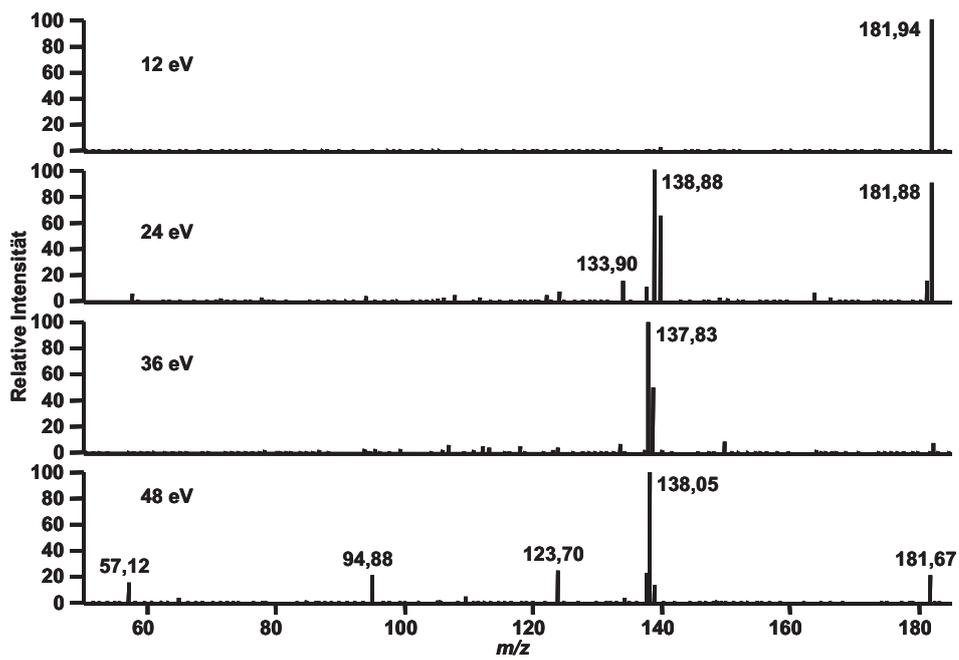
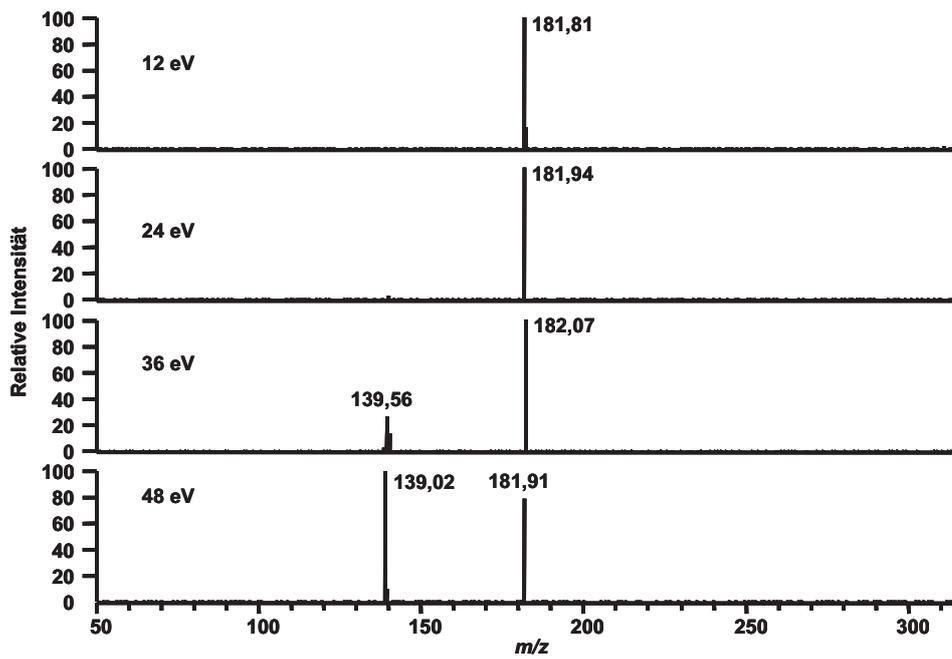


Produktionenspektren

Positive Messung

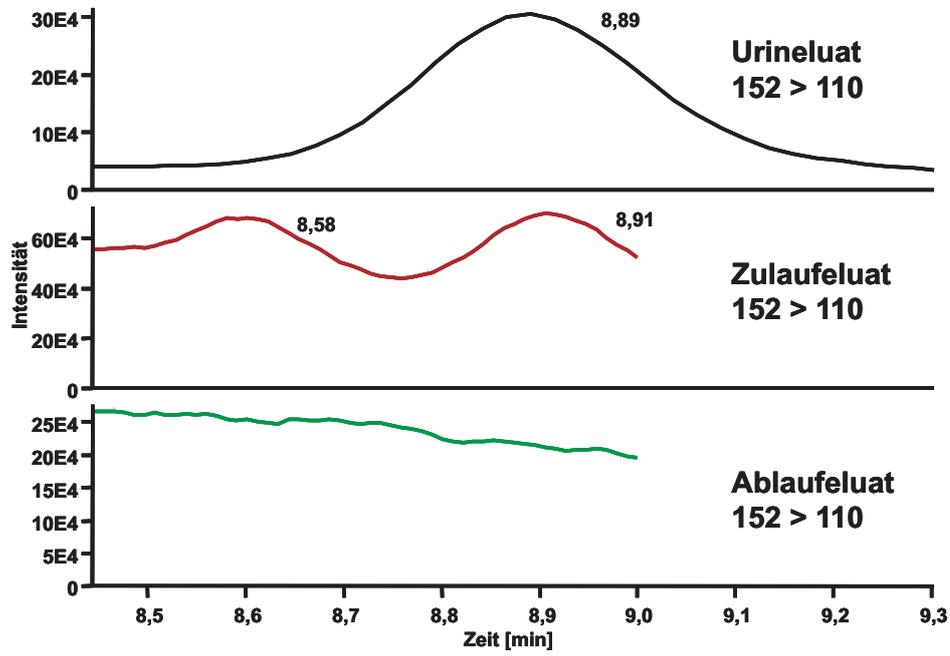


Negative Messung

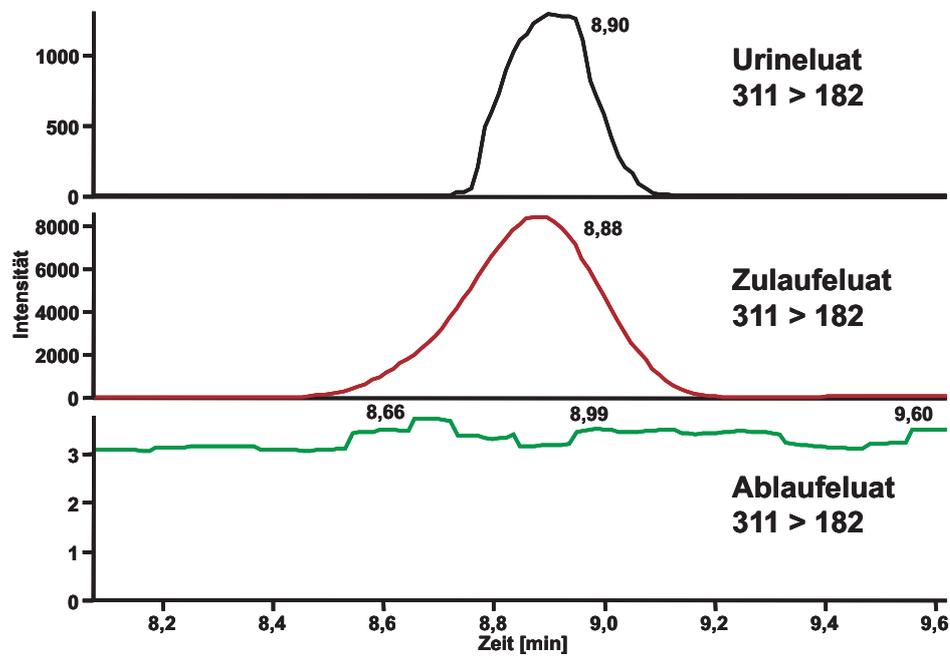


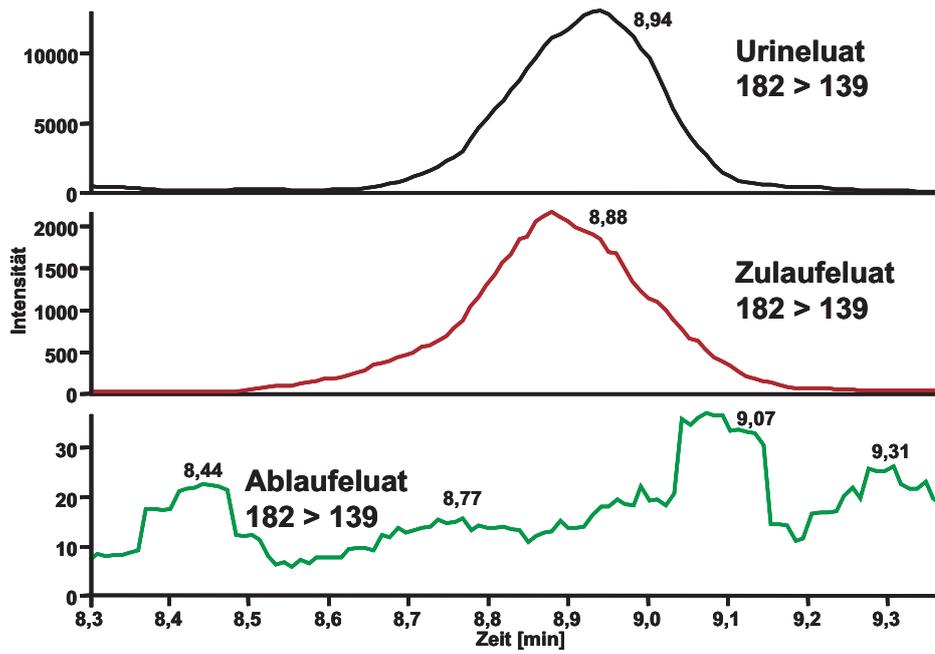
MRM-Chromatogramme

Positive Messung



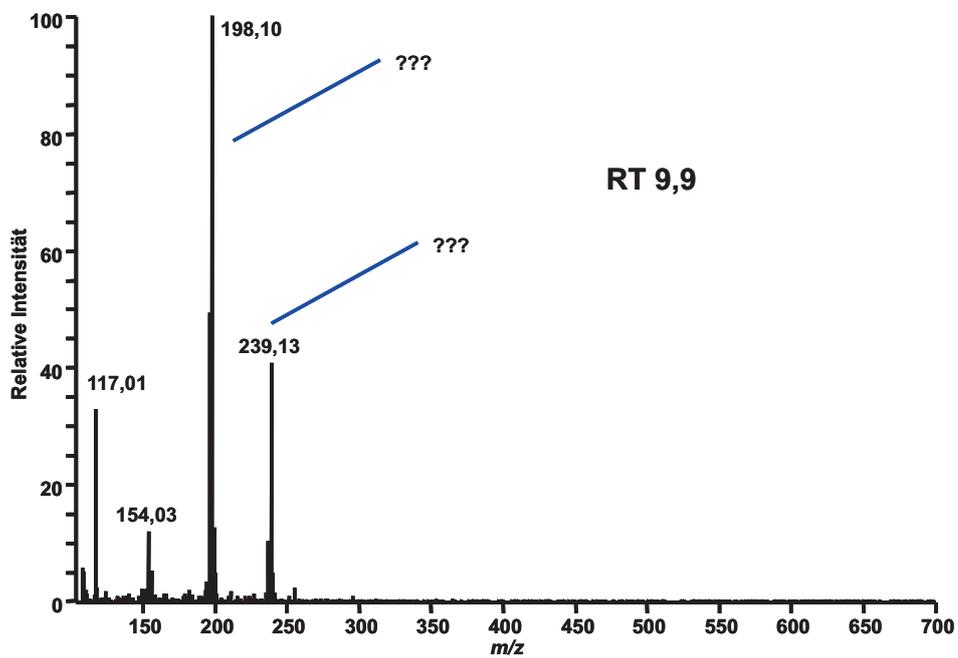
Negative Messung



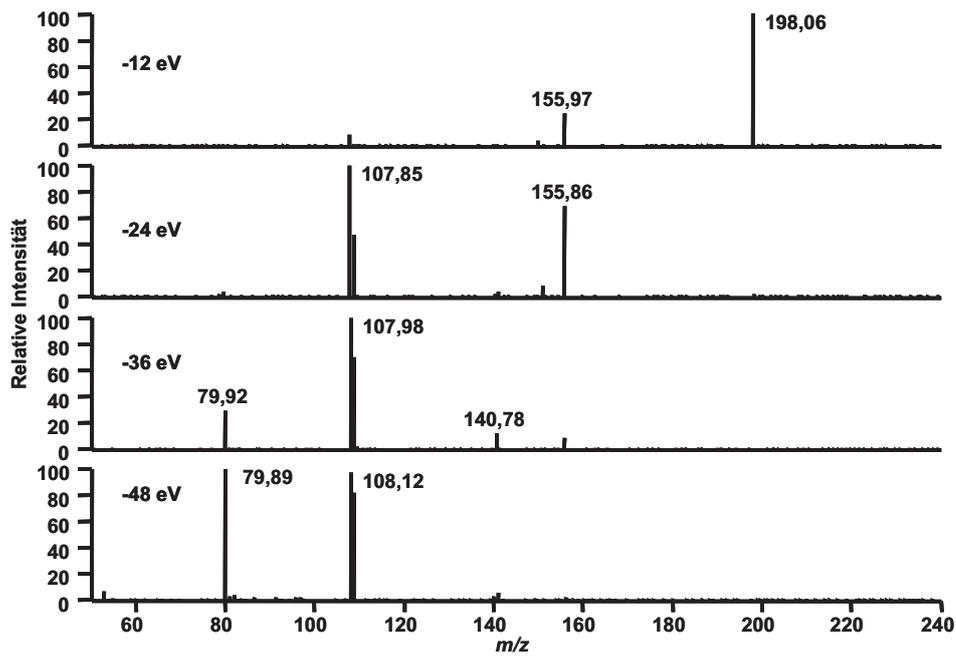


C.1.3.4 Retentionszeit 9,9 min.

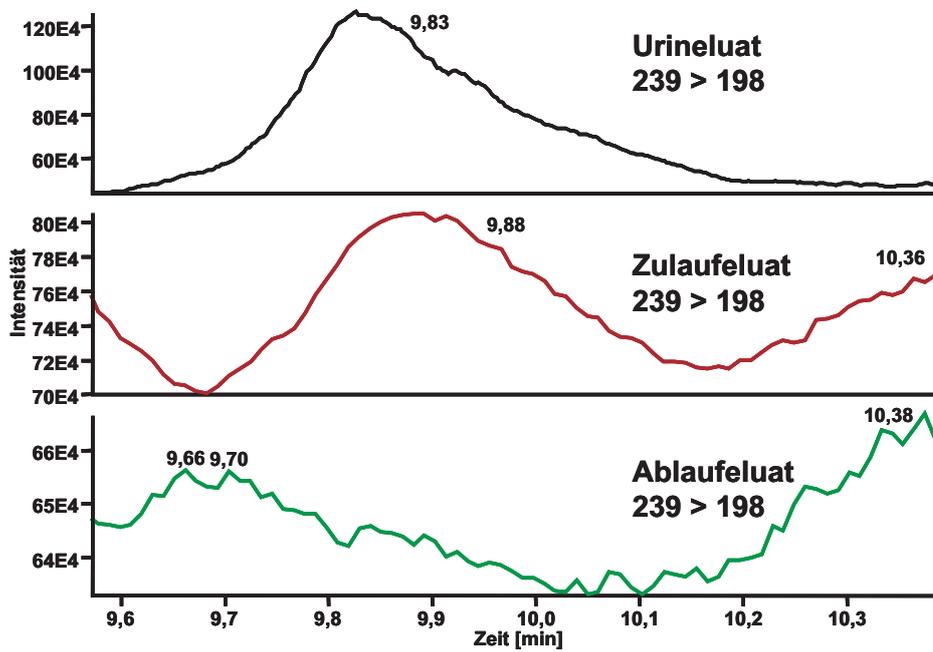
APCI-Fullscanspektrum

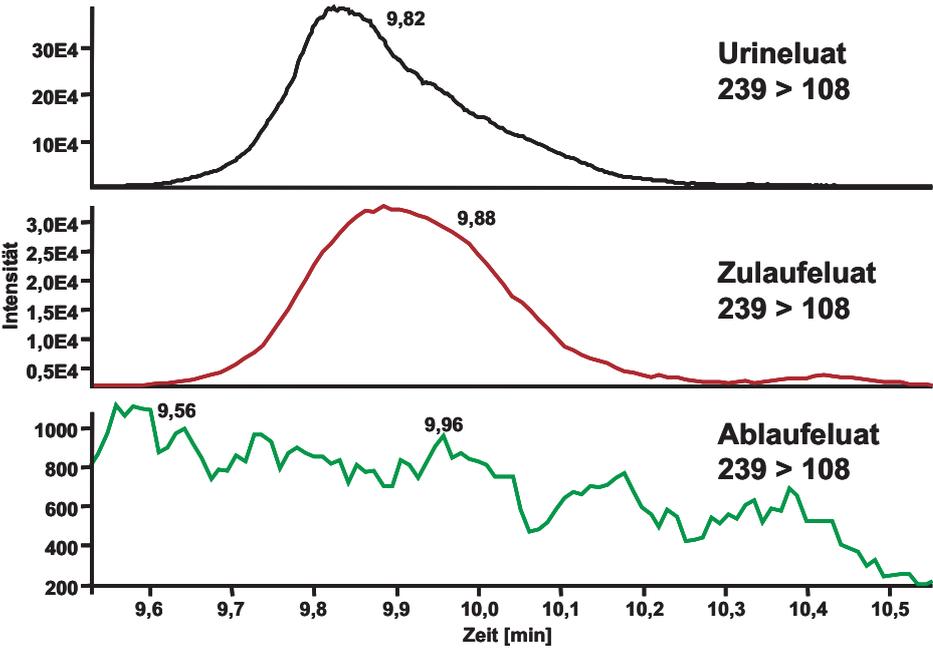


Produktionenspektren



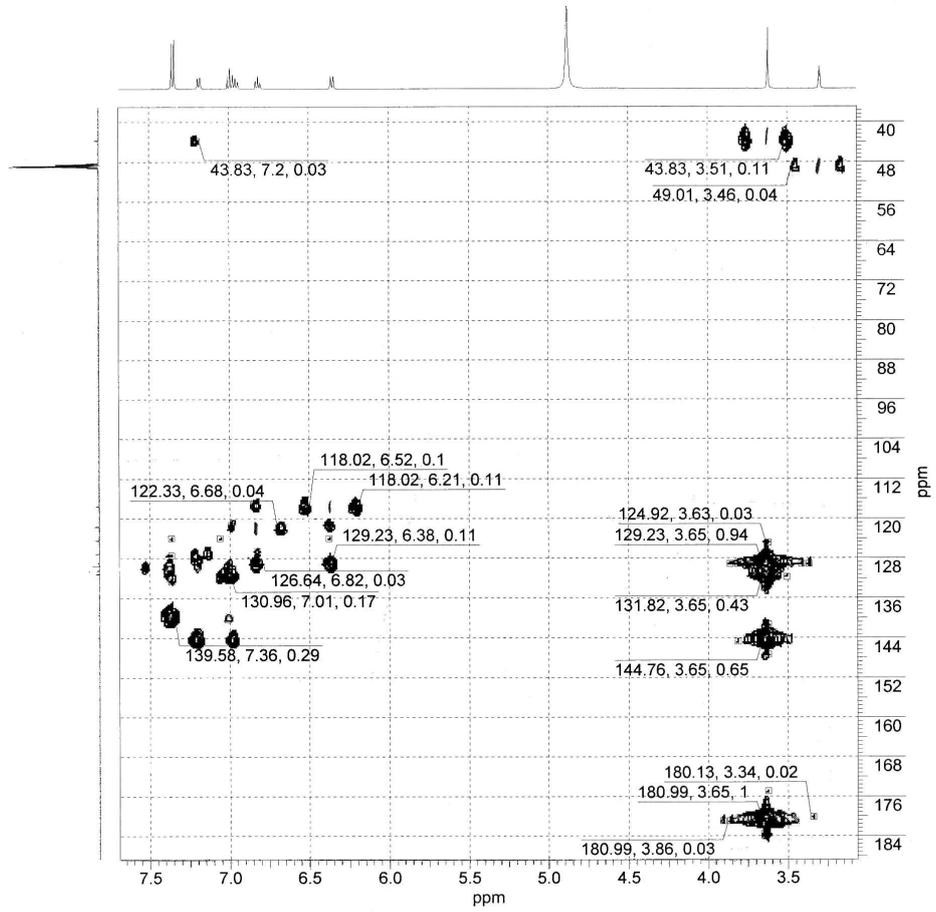
MRM-Chromatogramme



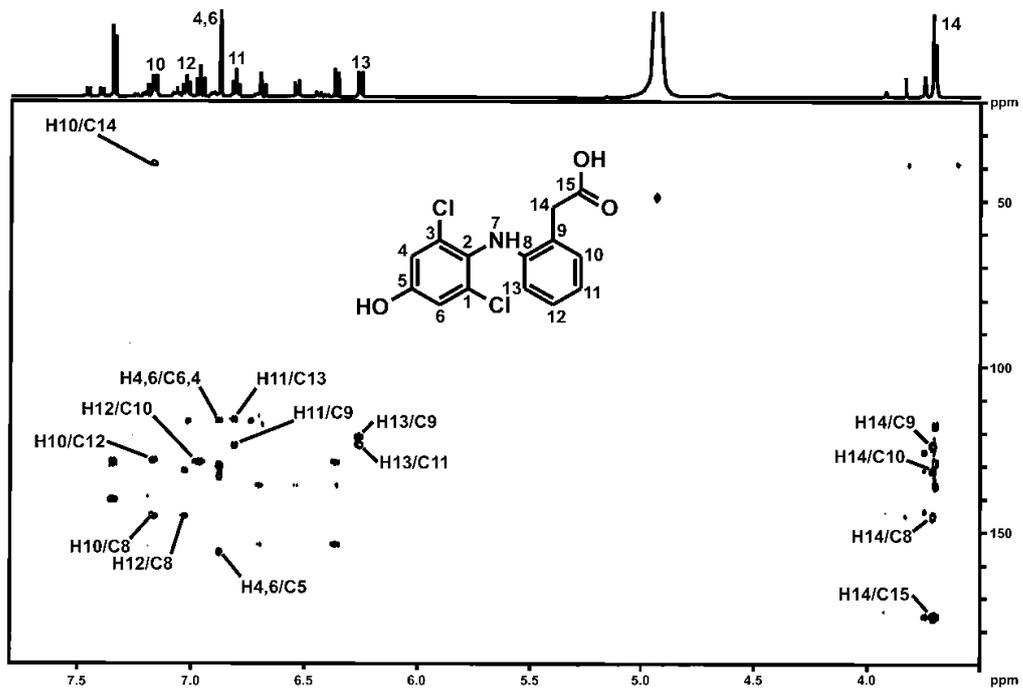


C.2 NMR-Messungen (HMBC) von DF und seinen Metaboliten

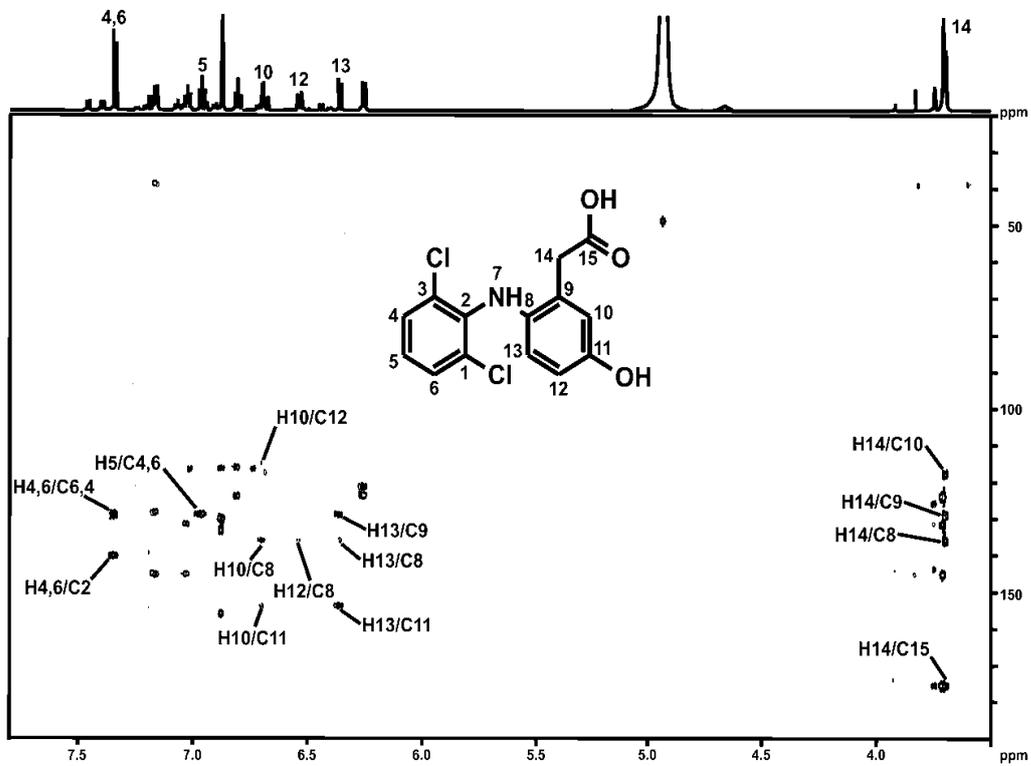
C.2.1 DF



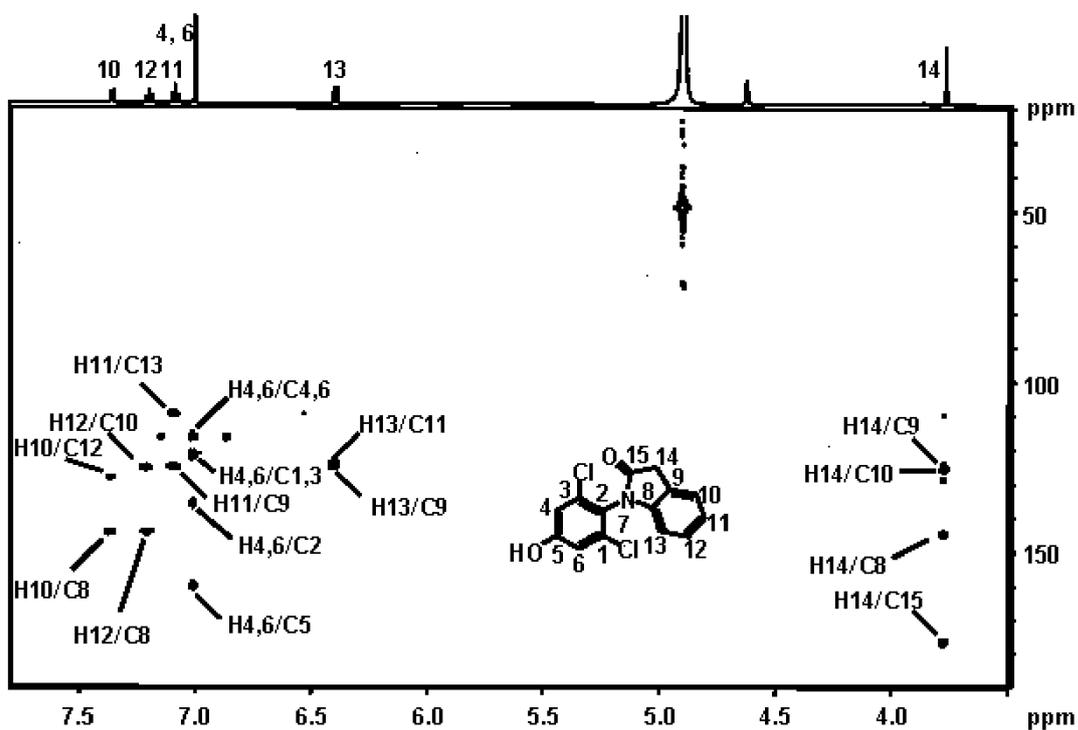
C.2.2 4'-OHD



C.2.3 5-OHD

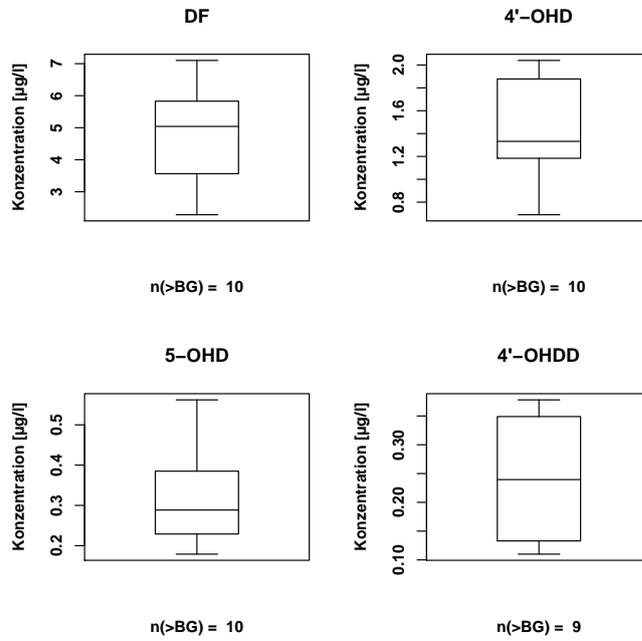


C.2.4 4'-OHDD

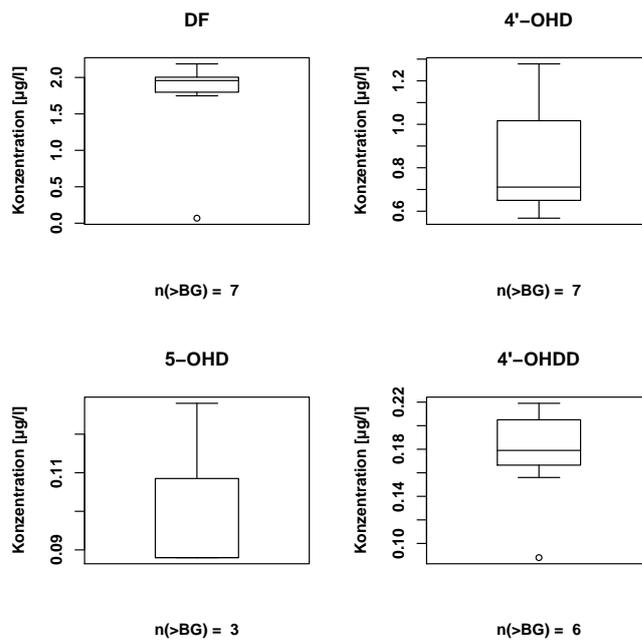


C.3 Nachweis von Diclofenac und seinen Metaboliten in verschiedenen Abwasserproben

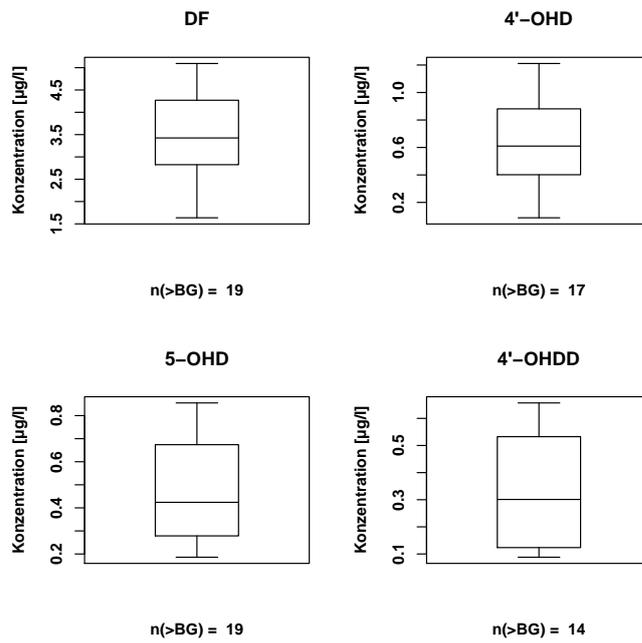
C.3.1 KW1



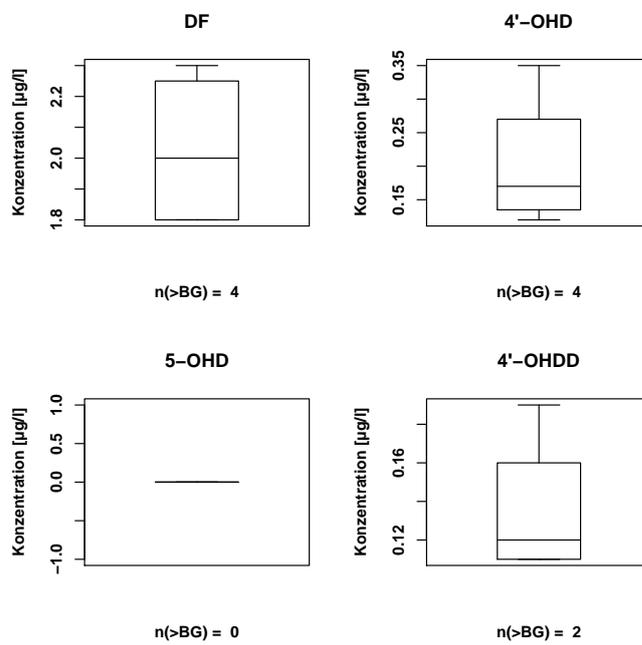
C.3.2 KW2



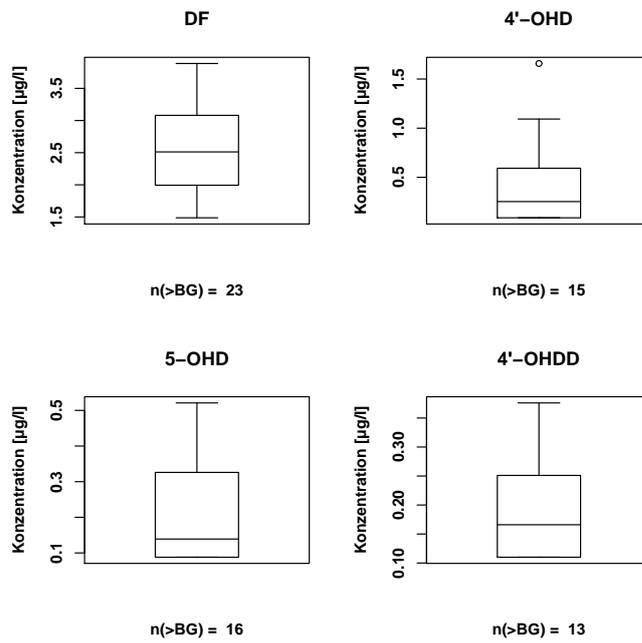
C.3.3 KW3



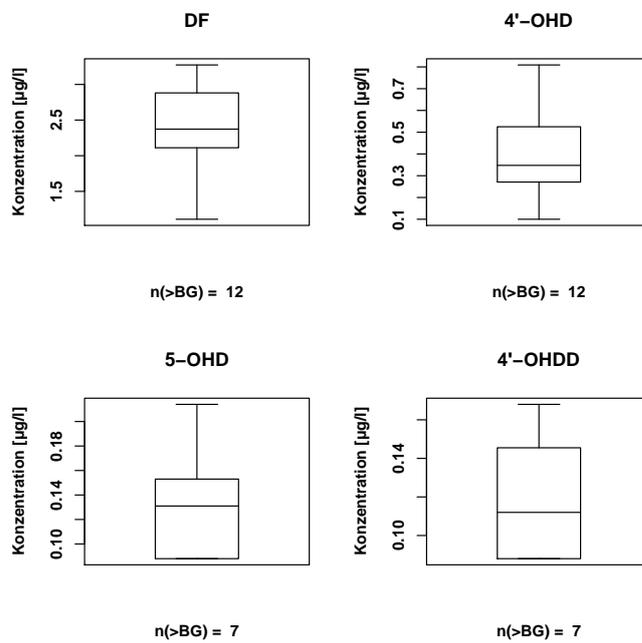
C.3.4 KW4



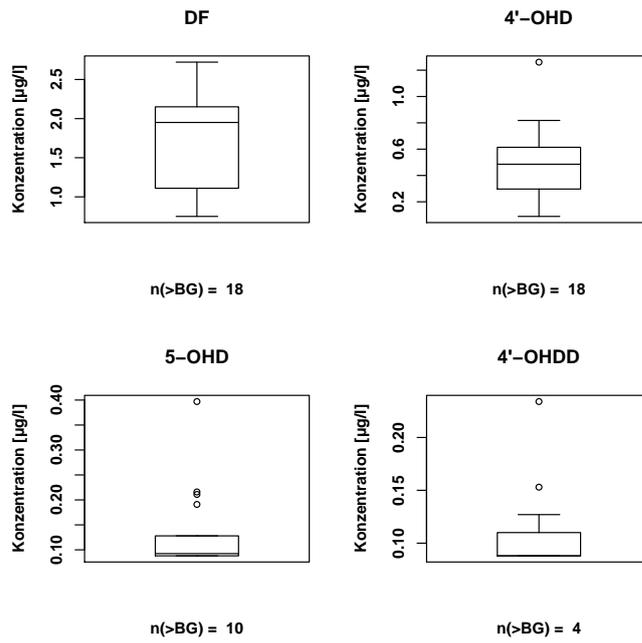
C.3.5 KW5



C.3.6 KW6



C.3.7 KW7



C.3.8 KW8

